

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 10 月 15 日(15.10.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/156345 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/15 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/061068
- (22) 国際出願日: 2015 年 4 月 9 日(09.04.2015)
- (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 2014-081115 2014 年 4 月 10 日(10.04.2014) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所
(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 石川 一彦 (ISHIKAWA, Kazuhiko); 〒7390046 広島県東広島市鏡山 3-1-1-32 国立研究開発法人産業技術総合研究所 バイオマスリファイナリー研究センター内 Hiroshima (JP). 岸下 誠一郎 (KISHISHITA, Seichirou); 〒7390046 広島県東広島市鏡山 3-1-1-32 国立研究開発法人産業技術総合研究所 バイオマスリファイナリー研究センター内 Hiroshima (JP). 藤井 達也 (FUJII, Tatsuya); 〒7390046 広島県東広島市鏡山 3-1-1-32 国立研究開発法人産業技術総合研究所 バイオマスリファイナリー研究センター内 Hiroshima (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所 (SAE-GUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: SECRETORY PRODUCTION SYSTEM FOR ARACHAEA-DERIVED PROTEIN

(54) 発明の名称: 古細菌由来タンパク質の分泌生産システム

(57) Abstract: Provided is a means for the extracellular secretory production of arachaea-derived proteins. This secretory production system for arachaea-derived proteins uses talaromyces as a host.

(57) 要約: 古細菌由来のタンパク質を菌体外の分泌生産する手段を提供すること。タラロマイセス属菌を宿主として用いる古細菌由来タンパク質の分泌生産システム。



WO 2015/156345 A1

明 細 書

発明の名称：古細菌由来タンパク質の分泌生産システム

技術分野

[0001] ここに開示される発明の一部は、古細菌由来タンパク質分泌生産システムに関する。

背景技術

[0002] 古細菌は、種々の有用なタンパク質を生産することが知られている。例えば、好熱性古細菌又は超好熱性古細菌（具体的には、パイロコッカス・フリオサス（*Pyrococcus furiosus*）、パイロコッカス・ホリコシ（*Pyrococcus horikoshii*）、サーモトーガ・マリティマ（*Thermotoga maritima*）、スルフォロバス・シバタエ（*Sulfolobus shibatae*）、スルフォロバス・ソルファタリスク（*Sulfolobus solfataricus*））から耐熱性のセルラーゼが同定されており、それらはバイオマスの糖化に有用である。

[0003] 古細菌由来のタンパク質を工業的に製造する手段として、例えば、パイロコッカス・ホリコシ由来の超耐熱性エンド型セルラーゼを大腸菌で生産する方法が報告されている（非特許文献1）。また、パイロコッカス・フリオサス由来の超耐熱性エンド型セルラーゼについても、大腸菌を宿主として生産する方法が報告されている（非特許文献2）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2008-271927

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ando et al., Appl. Environ. Microbiol., 68, 1, 430-433, 2002

非特許文献2：Bauer et al., J. Bacteriol., 181, 1, 284-290

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、これまでに報告されている方法には更なる改善の余地があった。例えば、非特許文献 1 及び 2 に開示される方法では、菌体外への古細菌由来のタンパク質を分泌生産することが実質的にできないため、タンパク質の取得には菌体を破碎する必要がある。そこで、本発明は、古細菌由来のタンパク質を菌体外の分泌生産する手段を提供することを 1 つの目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 代表的な高タンパク質発現生産糸状菌である *Trichoderma reesei* を宿主として用いた場合についても、古細菌由来タンパク質を分泌発現させたという報告はない。唯一、古細菌由来ベータグルコシダーゼに関しては *Trichoderma reesei* を宿主としてタンパク質を発現生産するという報告はあるが分泌させることはできなかった。そこで、本発明者等は、上記の課題等を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、タラロマイセス属の糸状菌を宿主とすることにより、その分泌生産が可能であることを見出した。本発明者等は、斯かる知見に基づき、更なる検討と改良を重ね、本発明を完成するに至った。

[0008] 代表的な本発明は、以下の通りである。

項 1.

タラロマイセス属菌を宿主として用いる古細菌由来タンパク質の分泌生産システム。

項 2.

タラロマイセス属菌中で機能するプロモーター領域、

前記プロモーター領域の下流に存在する分泌シグナル領域、

前記分泌シグナル領域の下流に存在する古細菌由来タンパク質コード領域、

及び

前記古細菌由来タンパク質コード領域の下流に存在するターミネーター領域

、

を有する発現ベクターでタラロマイセス属菌が形質転換されている、項 1 に記載のシステム。

項 3.

該分泌シグナル領域が、配列番号 5 で示される塩基配列を有する、項 2 に記載のシステム。

項 4.

該プロモーター領域、及び、該ターミネーター領域が、各々タラロマイセス・セルロリティカス由来のグルコアミラーゼのプロモーター領域、及び、ターミネーター領域である、項 2 又は 3 に記載のシステム。

項 5.

古細菌由来タンパク質コード領域が、そのコドン使用頻度がタラロマイセス属菌での発現に最適化されている、項 2 ～ 4 のいずれかに記載のシステム

項 6.

古細菌由来タンパク質が、パイロコッカス属由来のセルラーゼである、項 1 ～ 5 のいずれかに記載のシステム。

項 7.

古細菌由来タンパク質コード領域が、配列番号 6 又は 7 で示される塩基配列を有する、項 2 ～ 6 のいずれかに記載のシステム。

項 8.

項 1 ～ 7 のいずれかに記載のシステムを用いて古細菌由来タンパク質を分泌生産する方法。

項 9.

タラロマイセス属菌を培養する工程を含む、項 8 に記載の方法。

項 10.

古細菌由来タンパク質を分泌生産するためのタラロマイセス属菌の使用。

発明の効果

[0009] 本発明により、古細菌由来タンパク質を効率的に分泌生産することができ、
る。よって、本発明により、古細菌由来タンパク質を工業的且つ安定に提供

することが可能になる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、実施例で構築されたベクターの構造を示す。

[図2]図2は、実施例において、タラロマイセス属菌を宿主として組み換え分泌生産したパイロコッカス・フリオサス由来の耐熱性エンド型セルラーゼ及びパイロコッカス・ホリコシ由来の耐熱性エンド型セルラーゼの分子量をSDS-PAGEで測定した結果を示す。第1及び6レーンは分子マーカである。第2レーンでは、パイロコッカス・フリオサス由来の耐熱性エンド型セルラーゼが分泌生産された培養液をサンプルして用いた。第3レーンでは、パイロコッカス・フリオサス由来の耐熱性エンド型セルラーゼが分泌生産された培養液を70℃で15分間加熱処理し、夾雑タンパク質を除いたサンプルを用いた。第4レーンは、パイロコッカス・ホリコシ由来の耐熱性エンド型セルラーゼが分泌生産された培養液をサンプルして用いた。第5レーンでは、パイロコッカス・ホリコシ由来の耐熱性エンド型セルラーゼが分泌生産された培養液を70℃で15分間加熱処理し、夾雑タンパク質を除いたサンプルを用いた。

[図3]図3は、タラロマイセス属菌を宿主として組み換え分泌生産したパイロコッカス・フリオサス由来の耐熱性エンド型セルラーゼのエンドグルカナーゼ活性を50℃、60℃、70℃、及び80℃で測定した結果を示す。

[図4]図3は、タラロマイセス属菌を宿主として組み換え分泌生産したパイロコッカス・ホリコシ由来の耐熱性エンド型セルラーゼのエンドグルカナーゼ活性を50℃、60℃、70℃、及び80℃で測定した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0011] 古細菌由来タンパク質の分泌生産は、タラロマイセス属菌を宿主として用いることが好ましい。ここで、タラロマイセス属菌とは、糸状菌の一種であり、抗生物質や各種酵素の生産菌として産業界で用いられている。タラロマイセス属菌は、古細菌由来タンパク質の分泌生産が可能である限り特に制限されないが、それ自体がタンパク質（好ましくは、セルラーゼ）を分泌生産する能力を有することが好ましい。そのようなタラロマイセス属菌としては

、例えば、タラロマイセス・セルロリティカス、タラロマイセス・フラバス、タラロマイセス・マルネフェイ、タラロマイセス・ピノフィラス、タラロマイセス・エマーソニイ、タラロマイセス・スピティピタトゥスなどをあげることができる。好適なタラロマイセス・セルロリティカス菌株としては、Y-94株、Y P-4株、T N株、C-1株、及びC F-2612株である。尚、タラロマイセス・セルロリティカスは、近年までアクレモニウム・セルロリティカスと分類されていた。

[0012] タラロマイセス属菌を宿主として分泌生産する古細菌由来タンパク質は、任意であり、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、古細菌由来タンパク質としては、工業的に利用される各種酵素（例えば、加水分解酵素、酸化還元酵素、転移酵素、異性化酵素、合成酵素、リガーゼ、及びリアーゼ等）を挙げることができ、より具体的には、セルラーゼ、キシラナーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、キシラナーゼ、ペクチナーゼ、キチナーゼ、キナーゼ、ルシフェラーゼ等をあげることができる。一実施形態において、好ましい酵素は、セルラーゼであり、具体的には、エンド型セルラーゼ、エキソ型セルラーゼ（セロビオハイドロラーゼ）、及び β -グルコシダーゼ等を挙げることができる。

[0013] 一実施形態において、分泌生産に好ましいタンパク質は、エンド型セルラーゼである。エンド型セルラーゼとは、非結晶セルロース分子の β -グルコシド結合を加水分解する反応を触媒する酵素を意味する。主にカルボキシメチルセルロース（CMC）を基質としてその活性を評価することができる。例えば、1%CMCを含む50 mM酢酸バッファー950 μ Lに酵素希釈液50 μ L添加し、30分後に強アルカリ性のDNSアッセイ溶液3 mLを加えて反応を停止させ、CMCから生成した還元末端量をDNS法で定量することで活性の測定ができる。1分間あたり1 μ molの還元糖を生成する活性が1 Uと定義される。

[0014] 分泌生産されるタンパク質が由来する古細菌の種類は任意であり、生産するタンパク質の種類に応じて適宜選択することができる。一実施形態において、古細菌は、超好熱菌、好塩菌、又は好酸菌等に分類される古細菌である。

ことが好ましい。超好熱菌としては、例えば、パイロコッカス属、サーモコッカス属、サーモトーガ属、又はスルフォロバス属に属する古細菌を好適に挙げることができる。より具体的にはパイロコッカス・ホリコシ、パイロコッカス・フリオサス、サーモコッカス・コダカラエンシス、サーモトーガ・マリティマ、スルフォロバス・シバタエ、スルフォロバス・ソルファタリスクを挙げるができる。

[0015] 一実施形態において、分泌生産に好ましいタンパク質は、パイロコッカス属由来の耐熱性エンド型セルラーゼであり、より具体的には、パイロコッカス・ホリコシ由来の耐熱性エンド型セルラーゼ及びパイロコッカス・フリオサス由来の耐熱性エンド型セルラーゼである。パイロコッカス・ホリコシ由来の耐熱性エンド型セルラーゼのアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列は、各々配列番号1及び2に示される。パイロコッカス・フリオサス由来の耐熱性エンド型セルラーゼのアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列は、各々配列番号3及び4に示される。パイロコッカス・フリオサス由来の耐熱性エンド型セルラーゼ及びパイロコッカス・ホリコシ由来の耐熱性エンド型セルラーゼは、80℃以上の温度領域でも安定であり、高い活性を発揮するため、その利用（特に、バイオマスの糖化での利用）は有望である。

[0016] 古細菌由来タンパク質は天然に存在するタンパク質であっても良いが、人為的に改変されたタンパク質であっても良い。例えば、公知のタンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号1又は3に示されるアミノ酸配列）と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、又は98%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つ、エンド型セルラーゼ活性を有するタンパク質を利用することもできる。

[0017] 配列番号1のアミノ酸配列において、第1位～第28位のアミノ酸のアミノ酸領域はシグナル配列であり、第29位～第416位のアミノ酸領域は活性ドメイン領域であり、第417位以降は機能未知の膜結合領域である。配列番号3のアミノ酸配列において、第1位～第18位のアミノ酸領域は、シグナル配列であり、第19位～第49位のアミノ酸領域は、機能が未知の領

域であり、第50位以降の領域は活性ドメイン領域である。

[0018] 古細菌由来タンパク質の分泌生産を行うタラロマイセス属菌は、古細菌由来タンパク質をコードする塩基配列をその発現が可能な状態で組み込んだベクターで形質転換されていることが好ましい。そのようなベクターは、タラロマイセス属菌中で機能するプロモーター領域、前記プロモーター領域の下流に存在する分泌シグナル領域、前記分泌シグナル領域の下流に存在する古細菌由来タンパク質コード領域、及び前記古細菌由来タンパク質コード領域の下流に存在するターミネーター領域を有していることが好ましい。

[0019] タラロマイセス属菌中で機能するプロモーター領域及びターミネーター領域は、特に制限されず、任意に加工・選択することができる。例えば、糸状菌由来のもの、好ましくはタラロマイセス属由来のものを任意に選択して使用することができる。複数のタラロマイセス属由来のプロモーター領域及びターミネーター領域が既に公知である。また、新たなプロモーター領域及びターミネーター領域は、基地のプロモーター及びターミネーターの塩基配列又は基地のタンパク質の配列を基にして公知の技術を用いて容易に探し出すことができる。プロモーター領域及びターミネーター領域は、宿主として使用するタラロマイセス属菌由来のものであってもよく、別の菌由来のものであっても良い。タラロマイセス属菌由来の好適なプロモーター及びターミネーターとしては、後述する実施例で使用されるデンプン誘導性のグルコアミラーゼプロモーター及びグルコアミラーゼターミネーターを挙げることができる。また、タラロマイセス属菌が有するセロバイオハイドロラーゼIの発現を制御するプロモーター及びターミネーターも好適であり、これらは、培養条件を調節することにより、より強力に遺伝子を発現させることができる。

[0020] 分泌シグナル領域は、古細菌由来タンパク質のタラロマイセス属菌の菌体外への分泌を可能にする限り特に制限されず、任意に加工・選択することができる。例えば、古細菌由来のシグナル領域でもあり得る。シグナル領域は、分泌生産するタンパク質と由来を同じくするものであっても、異なるもの

であってもよく、分泌生産するタンパク質について本来存在するシグナル領域であっても良い。好適なシグナル領域の具体例としては、配列番号5で示されるタラロマイセス・セルロリティカス由来のセロビオハオドロラーゼの分泌シグナルペプチドをコードする領域を挙げることができる。

[0021] 分泌シグナルおよび古細菌由来タンパク質をコードする領域（又は塩基配列）は、タラロマイセス属菌中で発現可能である限り特に制限されないが、タラロマイセス属菌中での発現に適したようにコドンユースエッジが最適化されていることが好ましい。コドンユースエッジの最適化は、タンパク質をコードする塩基配列のすべてのマイナーコドンについて行っても一部のマイナーコドンについて行っても良いが、できる限り多くのマイナーコドンについて行うことが好ましい。ここで、マイナーコドンとは、タラロマイセス属菌において、特定のアミノ酸をコードするコドンのうち、最も使用頻度が高いコドン（メジャーコドン）以外のコドンを意味する。コドンユースエッジの最適化は、最適化によってコードするアミノ酸が変化しない範囲で行うことが望ましい。コドンユースエッジの最適化の手法は公知であり、任意の手段を用いて実施することができる。例えば、核酸プライマーを用いた変異の導入や、核酸合成によって実施することができる。

[0022] タラロマイセス属菌での発現量を高めるためのコドンユースエッジの最適化は、各アミノ酸をコードするコドンを次のものに変更することによって実施することができる：フェニルアラニン（UUC）、ロイシン（CUC）、イソロイシン（AUC）、バリン（GUC）、セリン（UCU）、プロリン（CCU）、トレオニン（ACC）、アラニン（GCU）、チロシン（UAC）、ヒスチジン（CAU）、グルタミン（CAA）、アスパラギン（AAC）、リジン（AAG）、アスパラギン酸（GAU）、グルタミン酸（GAA）、システイン（UGC）、アルギニン（CGA）、グリシン（GGC）である。タラロマイセス属での発現用にコドンユースエッジが最適化されたパイロコッカス・ホリコシ由来の耐熱性エンド型セルラーゼをコードする塩基配列が配列番号6に示される。タラロマイセス属での発現用にコドンユースエッジ最適化されたパイロコッカス・フリオサス由来の耐熱性エン

ド型セルラーゼをコードする塩基配列が配列番号8に示される。

[0023] プロモーター領域、分泌シグナル領域、タンパク質コード領域、及びターミネーター領域をタンパク質の発現が可能な態様で有する発現ベクターは、適当な制限酵素認識部位を介して連結し得る。また、発現ベクターは、薬剤耐性や栄養要求性相補等の選択マーカー遺伝子を有していても良い。このような発現ベクターの構築は常法に従って行うことができる。

[0024] 宿主であるタラロマイセス属菌への発現ベクターの導入は、常法に従って行うことができる。例えば、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、アグロバクテリウム法等を用いることができる。導入するベクターは、1種であっても2種以上であっても良い。導入した遺伝子によるタラロマイセス属真菌の遺伝子の組み換えは、相同組み換え／非相同組み換えのいずれでもよい。相同組み換えを利用して高発現量を目指す場合は、タラロマイセス属菌が有するセルラーゼ遺伝子部位への相同組み換えが好ましい。特に、タラロマイセス属菌が有するセロビオハイドラーゼ遺伝子部位への相同組み換えは、その酵素の発現量が高いことから好ましい。また、タラロマイセス属菌が有するエンド型セルラーゼ遺伝子部位への相同組み換えは、セロビオハイドラーゼ遺伝子部位への相同組み換えと比較して、セロビオハイドラーゼ活性が低下せず、結果としてバイオマス分解活性の低下が少ないことから好ましい。いずれの場合もタラロマイセス属菌の内因性のセロビオハイドラーゼ遺伝子やエンド型セルラーゼ遺伝子のプロモーターやターミネーターがそのまま利用できるよう、ターゲットとなるセロビオハイドラーゼやエンドグルカナーゼ遺伝子のプロモーター、シグナルペプチド、ターミネーターなどと連結した相同組み換えを行うことが好ましい。

[0025] 非相同組み換えの場合、組み換えターゲットとなる遺伝子に特に制限はない。非相同組み換えの場合、セルラーゼ遺伝子の欠損はほぼ起きない。よって、バイオマス分解活性の低下は少なく好ましいため好ましい。非相同組み換えを行う場合、目的タンパク質を発現させるためにプロモーターやターミネーターを適宜連結した遺伝子が用いられる。

[0026] このようにして形質転換された宿主を培養することにより、目的の古細菌由来タンパク質が発現され、菌対外に分泌される。形質転換体の培養は、常法に従って実施することができる。例えば、培地としては、慣用の成分、例えば炭素源としては、グルコース、シュークロース、セルロース、水飴、デキストリン、澱粉、グリセロール、糖蜜、動・植物油等が使用できる。また、窒素源としては、ポリペプトン、大豆粉、小麦胚芽、綿実粕、ブイヨン、ペプトン、イーストエキス、硫酸アンモニウム、硝酸カリウム、尿素等が使用できる。その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、燐酸、硫酸及びその他のイオンを生成することのできる無機塩類、例えば塩化カリウム、硫酸マグネシウム、燐酸一カリウム、硫酸亜鉛、硫酸マンガン、硫酸銅等を添加することも有効である。また、必要に応じて各種ビタミン、アミノ酸、ヌクレオチド等の微量栄養素、抗生物質等の選抜薬剤を添加することもできる。さらに、菌の発育を助け、導入遺伝子の発現を促進するような有機物及び無機物を適当に添加することができる。そのような物質としては、例えば、セルロース、キシラン、ラクトース等を挙げることができる。

[0027] 培養方法は任意であり、振とう培養、攪拌培養、攪拌振とう培養、静置培養、連続培養など、様々な培養方式を採用しうるが、好ましくは、振とう培養又は攪拌培養である。培養温度は、通常、20℃～35℃、好ましくは25℃～31℃であり、培養時間は、目的のタンパク質の分泌生産量に応じて適宜設定することができる、例えば、3～10日、好ましくは4～9日である。

[0028] 宿主を培養することにより培養液中に分泌された目的のタンパク質は、培養液のまま利用することもできるが、培養液を濃縮、抽出及び／又は精製して、濃縮物、抽出物、粗精製タンパク質、精製タンパク質として取得することもできる。濃縮、抽出、及び精製は、任意の手法を実施することができる。例えば、ろ過、遠心分離、塩析法、溶媒沈殿法、透析法、限外ろ過法、ゲル電気泳動法、各種クロマトグラフィー（イオン交換、疎水性、逆相、ゲルろ過、アフィニティー等）の技術を組み合わせ実施することができる。

実施例

[0029] 以下、実施例により本発明についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに制限されるものではない。

[0030] 1. 組換えベクターの調製

タラロマイセス・セルロリティカス由来のセロビオハオドロラーゼの分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列（配列番号5）の下流に、タラロマイセス属での発現用にコドン改変したパイロコッカス・ホリコシ由来の耐熱性エンド型セルラーゼをコードする塩基配列（配列番号6）が連結した塩基配列を有するポリヌクレオチド（以下、「配列H」と称する場合もある）を合成法により調製した。また、タラロマイセス・セルロリティカス由来のセロビオハイドロラーゼ分泌シグナルペプチドをコードする塩基配列（配列番号5）の下流に、タラロマイセス属での発現用にコドン改変したパイロコッカス・フリオサス由来の耐熱性エンド型セルラーゼをコードする塩基配列（配列番号7）が連結したポリヌクレオチド（以下、「配列F」と称する場合もある）を合成法により調製した。これら2種類のポリヌクレオチドをタラロマイセス・セルロリティカス由来のデンプン誘導性のグルコアミラーゼプロモーター及びグルコアミラーゼターミネーターを有するプラスミドベクター（Inoue et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2013, 40: 823-830）に組み込んだ。このようにして、グルコアミラーゼプロモーターとグルコアミラーゼターミネーターとの間にH配列を有するプラスミドベクター（以下、「Hベクター」とも称する）、及び、グルコアミラーゼプロモーターとグルコアミラーゼターミネーターとの間にF配列を有するプラスミドベクター（以下、「Fベクター」とも称する）を作製した（図1）。図1に示す通り、各領域の連結部には適宜制限酵素認識サイト（EcoRVサイト及びSbfIサイト）が設けられている。

[0031] 2. 形質転換タラロマイセスの作製

上記1. で作製した組み換えベクターを、それぞれ別個にタラロマイセス・セルロリティカスYP-4株に導入した。導入は、プロトプラストPEG

法で行い、形質転換体をウラシル要求性選択培地を用いて選抜した。ウラシル要求性選択培地の組成は次の通りである：1質量% グルコース、1.0M スクロース、1.5質量% agar、0.04質量% KH_2PO_4 (pH5.5)、0.01質量% 塩化カリウム、0.01質量% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05質量% 塩化アンモニウム、及び0.5質量% Trace element。前記Trace elementは200mgの $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、200mgの $\text{MnCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、及び200mgの $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を蒸留水に溶解し、100mlにフィルアップしたものである。得られた形質転換体のゲノムDNAへの目的遺伝子の挿入は、PCR法を用いて確認した。

[0032] 3. 形質転換タラロマイセスを用いた古細菌由来タンパク質の分泌生産

各形質転換体を別個に液体培地10mLを含む100mL三角フラスコに植菌し、220rpmで4日間、pH4.0、28.5℃で培養した。培地組成は次の通りである：1質量% コーンステープリカー、2質量% デンプン、0.5質量% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2.4質量% KH_2PO_4 、0.47質量% 酒石酸カリウム2水和物、0.12質量% MgSO_4 、0.1質量% Tween80、0.2質量% Urea、0.1質量% Trace element。得られた培養液を各々3500rpmで10分間遠心分離し、培養上清と細胞とに分離した。培養上清を70℃で15分間熱処理し、その後セルラーゼ活性を測定して、その存在を確認した。熱処理後の培養上清中に含まれるパイロコッカス・ホリコシ由来の耐熱性エンド型セルラーゼ、及び、パイロコッカス・フリオサス由来の耐熱性エンド型セルラーゼのタンパク量をBCA法を用いて測定したところ、発現量はBSA換算でいずれも100mg/L以上であった。

[0033] 4. 分子量の測定

上記3. で得られた培養上清を70℃で15分間加熱処理し、夾雑蛋白質を分離した後、SDS-PAGEで分子量を測定した。パイロコッカス・ホリコシ由来の耐熱性エンド型セルラーゼ、及び、パイロコッカス・フリオサス由来の耐熱性エンド型セルラーゼの分子量は、各々約44kDa及び30kDaであり、目的酵素であることが確認された（図2）。

[0034] 5. 耐熱性エンド型セルラーゼ活性の測定

タラロマイセス属糸状菌で発現させたパイロコッカス・ホリコシ、及び、

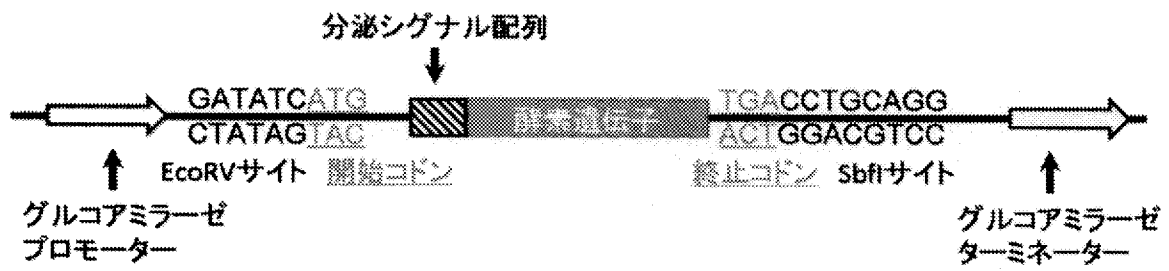
パイロコッカス・フリオサス由来耐熱性エンド型セルラーゼを精製し、50、60、70、及び80℃の反応温度でエンドグルカナーゼ活性を測定した。具体的には、CMCを1質量%含む20mM酢酸ナトリウム緩衝液1mlあたりに、3.0 μ gのパイロコッカス・ホリコシ由来の耐熱性エンド型セルラーゼ、又は1.5 μ gのパイロコッカス・フリオサス由来の耐熱性エンドグルカナーゼを添加し、各温度で1時間反応させ、生成した還元末端量をDNS法で測定して活性を求めた。その結果、野生型エンドグルカナーゼと同様に高い耐熱性を持つことを確認した。その結果、本酵素には耐熱性が確認された（図3及び4）。図3及び4において、横軸は測定温度を示し、縦軸は、50℃における活性を100%として他の温度における活性を相対的に示す。

請求の範囲

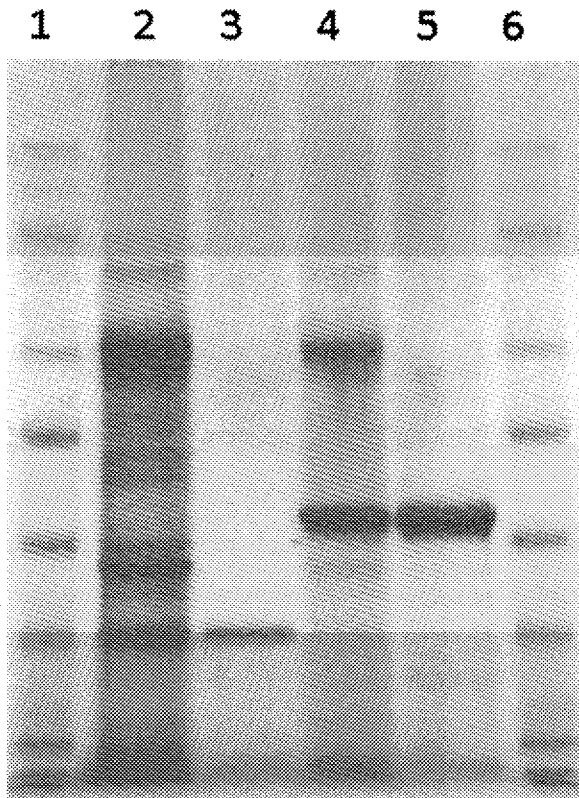
- [請求項1] タラロマイセス属菌を宿主として用いる古細菌由来タンパク質の分泌生産システム。
- [請求項2] タラロマイセス属菌中で機能するプロモーター領域、
前記プロモーター領域の下流に存在する分泌シグナル領域、
前記分泌シグナル領域の下流に存在する古細菌由来タンパク質コード領域、及び
前記古細菌由来タンパク質コード領域の下流に存在するターミネーター領域、
を有する発現ベクターでタラロマイセス属菌が形質転換されている、請求項1に記載のシステム。
- [請求項3] 該分泌シグナル領域が、配列番号5の塩基配列を有する、請求項2に記載のシステム。
- [請求項4] 該プロモーター領域、及び、該ターミネーター領域が、各々タラロマイセス・セルロリティカス由来のグルコアミラーゼのプロモーター領域、及び、ターミネーター領域である、請求項2又は3に記載のシステム。
- [請求項5] 古細菌由来タンパク質コード領域が、そのコドン使用頻度がタラロマイセス属菌での発現に最適化されている、請求項2～4のいずれかに記載のシステム。
- [請求項6] 古細菌由来タンパク質が、パイロコッカス属由来のセルラーゼである、請求項1～5のいずれかに記載のシステム。
- [請求項7] 古細菌由来タンパク質コード領域が、配列番号6又は7の塩基配列を有する、請求項2～6のいずれかに記載のシステム。
- [請求項8] 請求項1～7のいずれかに記載のシステムを用いて古細菌由来タンパク質を分泌生産する方法。
- [請求項9] タラロマイセス属真菌を培養する工程を含む、請求項8に記載の方法。

[請求項10] 古細菌由来タンパク質を分泌生産するためのタラロマイセス属真菌の使用。

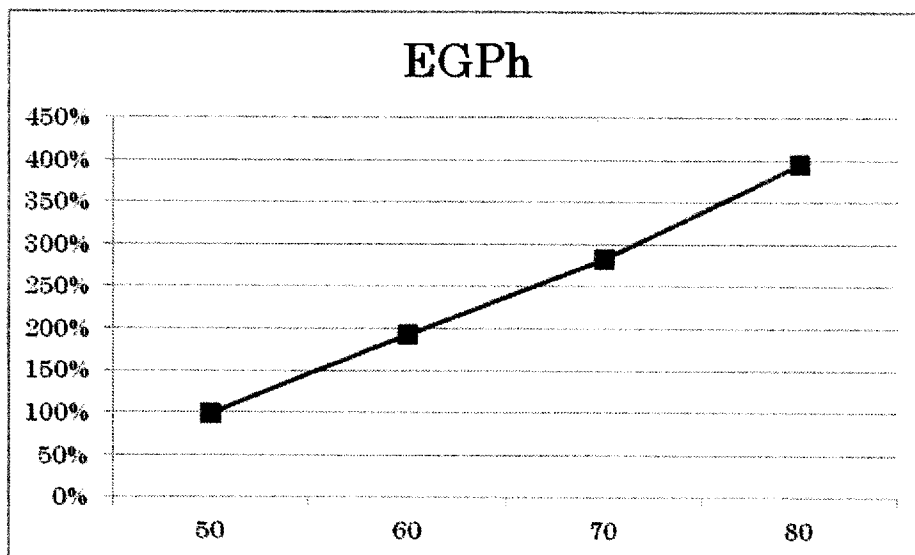
[図1]



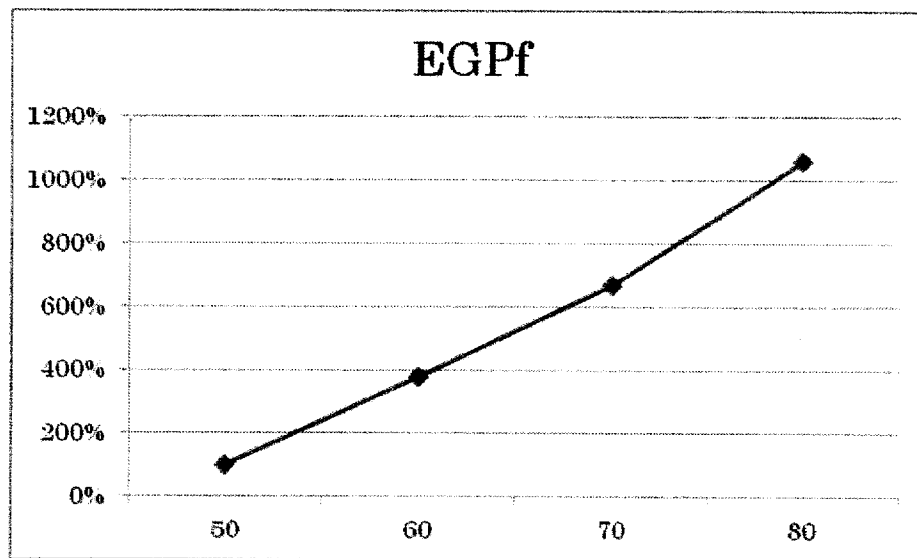
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/061068

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/15(2006.01)i, C12N9/42(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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)

C12N1/15, C12N9/42, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS(STN),

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, DWPI(Thomson Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Dai 65 Kai Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 25 August 2013 (25.08.2013), page 64 (1P-187), main text	1-10
Y	INOUE, H. et al., Construction of a starch-inducible homologous expression system to produce cellulolytic enzymes from Acremonium cellulolyticus, Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2013, 40(8), pp. 823-830, Abstract, Fig. 1, page 829, right column, lines 30 to 33	1-10
Y/A	JP 2007-174962 A (Bio-energy Corp.), 12 July 2007 (12.07.2007), claims; paragraphs [0016] to [0021], [0023] (Family: none)	1-2, 5-10/3-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 July 2015 (03.07.15)Date of mailing of the international search report
14 July 2015 (14.07.15)Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/061068

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	KISHISHITA, S. et al., Heterologous expression of hyperthermophilic cellulases of archaea <i>Pyrococcus</i> sp. by fungus <i>Talaromyces cellulolyticus</i> , <i>Journal of industrial microbiology & biotechnology</i> , 42(1), pp. 137-141, Abstract, Table 1, Fig. 1-5	1-10
P,A	WO 2014/192647 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 04 December 2014 (04.12.2014), claims; examples (Family: none)	1-10
P,A	FUJII, T. et al., Draft Genome Sequence of <i>Talaromyces cellulolyticus</i> Strain Y-94, a Source of Lignocellulosic Biomass-Degrading Enzymes, <i>Genome announcements</i> , 2015.02.26, 3(1), pii: e00014-15, doi: 10.1128/genomeA.00014-15	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N1/15(2006.01)i, C12N9/42(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N1/15, C12N9/42, C12N15/09											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/REGISTRY/MEDLINE/ BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, DWPI (Thomson Innovation)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y	第65回日本生物工学会 大会講演要旨集, 2013.08.25, p. 64 (1P-187), 本文	1-10									
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ 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 03.07.2015		国際調査報告の発送日 14.07.2015									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 晴絵 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 5374								

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	INOUE, H. et al., Construction of a starch-inducible homologous expression system to produce cellulolytic enzymes from <i>Acremonium cellulolyticus</i> , Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2013, 40(8), pp. 823-830, Abstract, Fig. 1, 第829頁右欄第30～33行	1-10
Y/ A	JP 2007-174962 A (バイオ・エナジー株式会社) 2007.07.12, 特許請求の範囲、段落【0016】～【0021】、【0023】 (ファミリーなし)	1-2, 5-10/ 3-4
P, X	KISHISHITA, S. et al., Heterologous expression of hyperthermophilic cellulases of archaea <i>Pyrococcus</i> sp. by fungus <i>Talaromyces cellulolyticus</i> , Journal of industrial microbiology & biotechnology, 42(1), pp. 137-141, Abstract, Table 1, Fig. 1-5	1-10
P, A	WO 2014/192647 A1 (独立行政法人産業技術総合研究所) 2014.12.04, 請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-10
P, A	FUJII, T. et al., Draft Genome Sequence of <i>Talaromyces cellulolyticus</i> Strain Y-94, a Source of Lignocellulosic Biomass-Degrading Enzymes, Genome announcements, 2015.02.26, 3(1), pii: e00014-15, doi: 10.1128/genomeA.00014-15	1-10