

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-123794

(P2017-123794A)

(43) 公開日 平成29年7月20日(2017.7.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N</b> 9/16 (2006.01)	C 1 2 N 9/16 Z N A B	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N</b> 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 5 0
<b>C 1 2 N</b> 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N</b> 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
<b>C 1 2 N</b> 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-3867 (P2016-3867)  
 (22) 出願日 平成28年1月12日 (2016.1.12)

(71) 出願人 000003300  
 東ソー株式会社  
 山口県周南市開成町4560番地  
 (71) 出願人 000173762  
 公益財団法人相模中央化学研究所  
 神奈川県綾瀬市早川2743番地1  
 (72) 発明者 冢亀 晴宇  
 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ  
 ー株式会社 東京研究センター内  
 (72) 発明者 飯田 寛  
 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ  
 ー株式会社 東京研究センター内  
 (72) 発明者 柿谷 均  
 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東ソ  
 ー株式会社 東京研究センター内  
 最終頁に続く

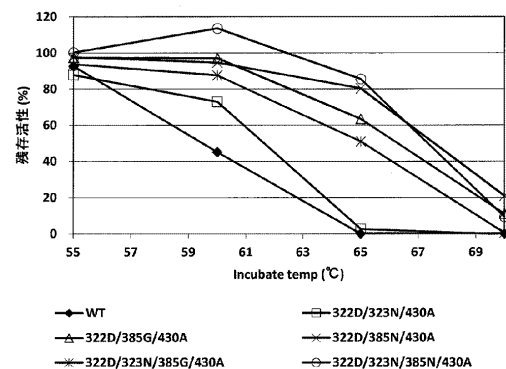
(54) 【発明の名称】 アルカリホスファターゼ及びその製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】熱安定性に優れた高活性アルカリホスファターゼを提供する。

【解決手段】特定のアミノ酸配列を含むアルカリホスファターゼ(具体的例示:b I A P I Iの322位をアスパラギン酸、430位グルタミン酸をアラニンに置換したb I A P I I変異体のうち以下の(1)および/または(2)に記載のアミノ酸に置換したもの(1)K323N、(2)S385G/N)をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを宿主に導入し、得られた質転換細胞形質転換細胞を培養し、得られた培養液からアルカリホスファターゼを回収することにより、アルカリホスファターゼを生産する。

【選択図】図7



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 4 から 8 のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むアルカリホスファターゼ。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載のアルカリホスファターゼをコードするポリヌクレオチド。

## 【請求項 3】

請求項 2 に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

## 【請求項 4】

請求項 3 に記載の発現ベクターを有する形質転換細胞。

## 【請求項 5】

大腸菌またはチャイニーズハムスター卵巣細胞である請求項 4 に記載の形質転換細胞。

## 【請求項 6】

請求項 4 または 5 に記載の形質転換細胞を培養し、得られた培養液からアルカリホスファターゼを回収する、アルカリホスファターゼの生産方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、熱安定性に優れた牛小腸由来高活性アルカリホスファターゼに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

アルカリホスファターゼ (EC 3.1.3.1) は、アルカリ性に至適 pH を有する、基質選択性の低いホスホモノエステラーゼである。アルカリホスファターゼの多くは活性中心に亜鉛を有しており、大腸菌等の原核生物から哺乳動物等の真核高等生物にいたるまで、自然界に広く存在することが知られている。

## 【0003】

アルカリホスファターゼは分子生物学分野や免疫診断分野において汎用されている有用性の高い酵素である。例えば分子生物学分野では、仔牛小腸由来のアルカリホスファターゼ (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase; 以下 C I A P と表記) や北極小エビ由来のアルカリホスファターゼや大腸菌由来のアルカリホスファターゼ等が、DNA または RNA の 5' 末端の脱リン酸化に利用されている。またヒト胎盤由来のアルカリホスファターゼ (特に分泌型に改変したもの) は、宿主細胞への外来遺伝子導入の効率を判定するためのレポーターとして利用されている。

## 【0004】

アルカリホスファターゼの中でも C I A P は比活性が高いため免疫診断分野用途での有用性が高く、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (以下 C H O 細胞と表記) (非特許文献 1) やメタノール資化性酵母 (特許文献 1) を宿主細胞とした、組換え C I A P の生産が開示されている。

## 【0005】

Manes らは、牛小腸から調製した cDNA ライブラリーからアルカリホスファターゼ遺伝子をクローニングし、牛小腸由来アルカリホスファターゼ (Bovine Intestinal Alkaline Phosphatase; 以下 b I A P と表記) が I から V I I までのアイソマーからなることを明らかにし、さらに I から I V のアイソマーの生化学的分析を行っている (非特許文献 1)。b I A P I から I V のアイソマーのアミノ酸配列は、非常に相溶性が高く、56 箇所には相違があるのみであり、b I A P I と I I の比較では、24 箇所には相違があるのみであった。しかしながらこれら 4 種類のアイソマーの生化学的性質は大きく異なっており、b I A P I I (C I A P) は、b I A P I から I V のアイソマーの中で最も高活性であるが、熱安定性は低く (T50 (10 min) = 59)、一方、b I A P I は、最も熱安定性は高い (T50 (10 min) = 66) が、比活性は b I A P I I の 1/3 以下であった (特許文献 2)。b I A P I と b I A P I I のアミノ酸配列の相違に着目し、b I A P I と b I A P I I の変異体を作製し、

10

20

30

40

50

比活性と熱安定性に有効な変異を検証した結果、高活性化には322位がグリシンであること、熱安定化には322位がアスパラギン酸であることが重要であった。ところが、b I A P I の322位をグリシンに置換した変異体 ( ( G l y 3 2 2 ) b I A P I ) は、比活性は、b I A P I I 並に向上したが、熱安定性は低下し、b I A P I とb I A P I I の間になった。さらにb I A P I I の322位をアスパラギン酸に置換した変異体 ( ( A s p 3 2 2 ) b I A P I I ) は、熱安定性は向上し、b I A P I とb I A P I I の間になったが、比活性はb I A P I 並に低下した。b I A P I 並に熱安定性が高く、かつ、b I A P I I 並に高活性であるアルカリホスファターゼ変異体は得られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【0006】

【特許文献1】特許第3657895号公報

【特許文献2】特許第4295386号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Manesら、J . B i o l . C h e m . 、 2 7 3 ( 3 6 ) 、 2 3 3 5 3 - 2 3 3 6 0 ( 1 9 9 8 )

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0008】

本発明の課題は、熱安定性に優れた高活性アルカリホスファターゼを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは上記課題を解決するため鋭意検討した結果、b I A P I I の322位がアスパラギン酸、323位がリジンもしくはアスパラギン、385位がセリンもしくはグリシンもしくはアスパラギン、430位がアラニンであるb I A P I I 変異体が、熱安定性に優れ、かつ高比活性であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち本発明は、以下の態様を包含する。

30

( 1 ) 配列番号4から8のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むアルカリホスファターゼ ( 以下、本発明のアルカリホスファターゼと称する ) 。

( 2 ) 本発明のアルカリホスファターゼをコードするポリヌクレオチド ( 以下、本発明のポリヌクレオチドと称する ) 。

( 3 ) 本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター ( 以下、本発明の発現ベクターと称する ) 。

( 4 ) 本発明の発現ベクターを有する形質転換細胞 ( ( 以下、本発明の細胞と称する ) ) 。

( 5 ) 本発明の細胞が、大腸菌、もしくはチャイニーズハムスター卵巣細胞である ( 4 ) に記載の細胞。

40

( 6 ) 本発明の細胞を培養し、得られた培養液からアルカリホスファターゼを回収する、アルカリホスファターゼの生産方法 ( 以下、本発明のアルカリホスファターゼ生産方法と称する ) 。

【0010】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0011】

本発明のアルカリホスファターゼは、配列番号1に記載のアミノ酸配列であるb I A P I I の322位がアスパラギン酸であり、430位がアラニンである配列番号3に記載のアミノ酸配列のうち以下の ( 1 ) および / または ( 2 ) に記載のアミノ酸置換が生じたアミノ酸配列を含むアルカリホスファターゼである。

( 1 ) K 3 2 3 N ( 2 ) S 3 8 5 G / N

50

具体的には、配列番号 4 から 8 のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むアルカリホスファターゼを例示でき、当該ポリペプチドの N 末端側および / または C 末端側にオリゴペプチドの付加された誘導体も包含している。b I A P を含め哺乳動物由来のアルカリホスファターゼの多くは膜結合性のため、アルカリホスファターゼの C 末端側 20 から 30 アミノ酸残基に G P I アンカー領域を有しているが、分泌発現させるために G P I アンカー領域を除去してもよい。

#### 【 0 0 1 2 】

さらに精製や検出を容易にするため、N 末端側および / または C 末端側にタグ配列を付加してもよい。タグ配列としては、H i s タグ、M y c タグ、H A タグ、F L A G タグが例示できる。N 末端側および / または C 末端側にタグ配列を付加した本発明のアルカリホスファターゼの具体例として、配列番号 1 1 および 1 2 をあげることができる。

10

#### 【 0 0 1 3 】

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のアルカリホスファターゼをコードする塩基配列である。アミノ酸をコードする塩基配列は複数あるため、翻訳された結果同一のアミノ酸になるポリヌクレオチドは本発明に含有されるが、宿主細胞での使用頻度の高いコドンを用いたポリヌクレオチドであることが好ましい。本発明のポリヌクレオチドの具体例として、配列番号 1 3 から 1 7 のいずれかに記載のポリヌクレオチドをあげることができる。

#### 【 0 0 1 4 】

本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドを機能発現させるための環状または直鎖状のポリヌクレオチドである。本発明の発現ベクターの構成要素としては、本発明のポリヌクレオチド、およびその 5 ' 末端側にインフレーションに連結したシグナルペプチドをコードするポリヌクレオチドに加えて、転写活性化配列 ( プロモーター / エンハンサー )、転写終結配列、薬剤耐性や栄養要求性などのマーカー遺伝子、宿主細胞内でプラスミドとして増殖するために必要な複製開始点などが含まれる。ここでインフレーションに連結とは、( ポリ ) ペプチドをコードするポリヌクレオチド同士が同じ読み取り枠で翻訳されるように配置することを指す。

20

#### 【 0 0 1 5 】

シグナルペプチドは、トランスフェクションに用いる細胞において本発明のアルカリホスファターゼを分泌発現するものであれば特に限定されるものではなく、具体的には、マウス M M P - 9 由来のシグナルペプチド ( 特開 2 0 1 4 - 1 8 0 2 2 2 号公報 ) を例示できる。

30

#### 【 0 0 1 6 】

本発明のアルカリホスファターゼをコードするポリヌクレオチド、および当該ポリヌクレオチドの 5 ' 末端側にインフレーションで連結されたシグナルペプチドをコードするポリヌクレオチドは、化学合成や c D N A を鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) による酵素合成などを組み合わせることで合成できる。

#### 【 0 0 1 7 】

前記ポリヌクレオチドを用いて発現ベクターを作製する際は、その上流に転写活性化配列 ( プロモーター / エンハンサー ) を配置すると好ましい。転写活性化配列はトランスフェクションに用いる細胞で機能するものであれば特に限定されるものではなく、恒常的に活性化されているものであっても、外部条件によって活性を調節可能なものであってもよい。恒常的に活性化されているものとしては、T 7 プロモーター、L a c U V 5 プロモーター、T i c プロモーター、T r c プロモーター、T a c プロモーター、ヒトサイトメガロウィルスプロモーター ( C M V プロモーター )、S V 4 0 初期プロモーター、R S V プロモーター、S R プロモーター、ヒト伸長因子 1 - プロモーター、ウシ成長ホルモンプロモーター、 - アクチンプロモーター、ハムスターユビキチン / S 2 7 a プロモーターなどが例示でき、調節可能なものとしては、T R E プロモーター ( クロンテック社製 )、T - R E X プロモーター ( インビトロジェン社製 ) などが例示できる。

40

#### 【 0 0 1 8 】

マーカー遺伝子は、トランスフェクションに用いる細胞において発現可能な選択マーカー

50

ーをコードする遺伝子の中から適宜選択されたものであれば良く、具体的には、カナマイシン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子（アンピシリン/カルベニシリン耐性遺伝子）ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（ネオマイシン抵抗性遺伝子）、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子（ハイグロマイシンB抵抗性遺伝子）、プラスティサイジンSデアミナーゼ遺伝子（プラスティサイジン抵抗性遺伝子）といった薬剤耐性遺伝子、グルタミンシンセターゼ遺伝子、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（*dhfr*）遺伝子といった栄養要求性に関わる遺伝子、緑色蛍光タンパク質遺伝子など光学的な識別を可能にする遺伝子等を例示できる。

#### 【0019】

本発明の発現ベクターは、大腸菌で働く *colE1* 複製開始点のような、動物細胞以外で働く複製開始点を含んでもよい。この場合には、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子と *colE1* 複製開始点とを含んだ、本発明の発現ベクターを大腸菌にトランスフェクションし、当該組換え大腸菌をカルベニシリン入りの培地で培養することで、本発明の発現ベクターを大量に調製することができる。例えば、プラスミド *pOtiVEC-TOP0*（ライフテクノロジーズ社製）やプラスミド *pECEdhfr* などから、本発明の発現ベクターを好適に調製することができる。プラスミド *pECEdhfr* は、Yasukawara、J. Biochem.、第108巻、673-676ページ（1990年）に記載の方法に従って入手することが出来る。

#### 【0020】

次に本発明の細胞及び本発明のアルカリホスファターゼ生産方法について説明する。本発明の発現ベクターをトランスフェクションされる宿主細胞は、大腸菌ではK-12株やそれに由来する任意の菌株（JM109、HB101、W3110、C600など）、T7RNAポリメラーゼを発現しているもの（例えばBL21（DE3））、哺乳動物細胞では、ヒト胎児腎臓細胞（例えば、HEK293細胞）、イヌ腎臓細胞（例えば、MDCK細胞）、アフリカミドリザル腎臓細胞（例えば、COS-7細胞）、マウスミエローマ細胞（例えば、SP2/0細胞、P3U1細胞）及びチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）が例示できる。CHO細胞の株に特に限定はなく、CHO-K1細胞（ATCC No. CCL-61）、CHO-S細胞、*dhfr* 遺伝子欠損株であるDG44細胞やDXB11細胞が例示できる。より好ましくは、大腸菌では、DH5<sup>+</sup>、CHO細胞では、DG44細胞をあげることができる。

#### 【0021】

本発明の発現ベクターを宿主細胞にトランスフェクションするには、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法などの当業者が通常用いる方法の中から適宜選択して行なえばよい。トランスフェクションに用いる本発明の発現ベクターは環状のポリヌクレオチドであってもよく、適切な制限酵素で消化することにより得られた直鎖状のポリヌクレオチドであってもよい。例えば、プラスミド *pOtiVEC-TOP0* 中に1ヶ所存在する制限酵素 *PvuI* の認識部位はベクターを直鎖状にする目的で用いることができる。この場合には、*pOtiVEC-TOP0* に挿入するポリヌクレオチド中に制限酵素 *PvuI* の認識部位を含まないよう設計するとよい。

#### 【0022】

本発明の発現ベクターをトランスフェクションして得られた形質転換細胞は、当業者が通常用いる方法で単クローン化し、単クローン化した細胞を培養して得られた培養液中のアルカリホスファターゼ活性を指標にして選抜することで、所望のアルカリホスファターゼ生産性を有した組換え細胞を取得することができる。なお前記選抜した組換え細胞に対して、さらに本発明の発現ベクターを導入し、そこから単クローン化した組換え細胞を培養することで、アルカリホスファターゼ活性が更に上昇した組換え細胞を選抜してもよい。

#### 【0023】

また本発明の発現ベクターに共発現可能な選択マーカーが含まれている場合、当該選択マーカーに対応した選択培地で培養することにより、当該選択マーカーが発現している組換え細胞群を選択することができ、当該選択した細胞群を単クローン化後、培養液中のアルカリホスファターゼ活性を指標にして選抜することもできる。一例として、共発現可能なd h f r遺伝子を含む本発明の発現ベクターをd h f r遺伝子欠損C H O細胞にトランスフェクションし、ヒポキサンチンおよびチミジンを含まない選択培地で培養し、d h f r遺伝子が発現している細胞群を増殖させ、当該細胞群から単クローン化した細胞を培養して培養液中のアルカリホスファターゼ活性を指標にして選抜することで所望のアルカリホスファターゼ生産性を有した組換え細胞を取得することができる。なお選択マーカーとしてd h f r遺伝子を用いた場合、組換え細胞をメトトレキサート(M T X)を含んだ培地で培養し、導入した遺伝子の増幅を誘導することで、アルカリホスファターゼ活性が更に上昇した組換え細胞を選抜することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0024】

アルカリホスファターゼ活性は、当業者が通常用いる一般的な方法により測定することが出来る。具体的な測定方法には、例えばp - ニトロフェニルリン酸を基質に用いた加水分解反応を挙げることが出来る。その一例として、反応温度25 で、p H 9 からp H 10の緩衝液(例えば、0.1 Mグリシン - 水酸化ナトリウム緩衝液(p H 9.6))中で、アルカリホスファターゼ活性による加水分解反応で生じるp - ニトロフェノールを波長405 nmにおける吸光度で定量することにより、酵素活性を算出する方法が挙げられる。なお前記緩衝液に、ウシ血清アルブミンのような酵素活性への影響が少ないタンパク質や、塩化マグネシウムのようなマグネシウム塩や、塩化亜鉛のような亜鉛塩などを適量加えてもよい。アルカリホスファターゼ活性測定の具体的態様の例として、試料溶液5 μ Lを加えたマイクロウェルプレート(N U N C社製、カタログ番号269620)に、10 m Mのp - ニトロフェニルリン酸二ナトリウム塩(以下p N P Pと略記する)と、0.1 %ウシ血清アルブミン(S I G M A社製、カタログ番号A7030)と、0.1 m M塩化マグネシウムと、0.01 m M塩化亜鉛とを含んだ、0.1 Mグリシン - 水酸化ナトリウム緩衝液(p H 9.6)(p N P P基質溶液)を100 μ L添加し、25 で一定時間保温後、0.5 Mの水酸化ナトリウム100 μ Lを加えることで反応を停止し、I n f i n i t e M200(T e c a n S y s t e m s社製)を用いて波長405 nmにおける吸光度を測定した後、アルカリホスファターゼを含まない試料溶液を用いて同様に得た測定値の吸光度を差し引くことで測定する方法があげられる。試料溶液の濃度や反応の時間は実験的に最適化すればよく、吸光度の値が2以下、好ましくは1.5以下、より好ましくは1以下になるように条件を定めればよい。

#### 【0025】

アルカリホスファターゼの比活性は、精製品を調製し、タンパク質量とアルカリホスファターゼ活性を測定することで算出できる。また、アルカリホスファターゼに前述のタグ配列を付加し、それらに対する抗体を利用することでも算出することができる。例えば、C末端側にH i sタグ、N末端側にM y cタグを付加したアルカリホスファターゼの場合、C末端側のH i sタグを特異的に認識する市販の抗H i sタグ抗体とN末端側のM y cタグを特異的に認識する市販の抗M y cタグ抗体を利用すればよく、両抗体のうち、いずれかの抗体が、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(H R P ; h o r s e r a d i s h p e r o x i d a s e)で標識されたものを用いることが好ましい。未標識の抗タグ抗体を担体(例えばマイクロウェルプレート)に固定化し、ウシ血清アルブミンを用いてブロッキング後、適度に希釈したN末端側にM y cタグ、C末端側にH i sタグを付加したアルカリホスファターゼを含む試料溶液を添加し一定時間反応後、B / F(B o u n d / F r e e)分離を行ない、p N P P基質溶液と反応させ、固定化した抗タグ抗体に結合したアルカリホスファターゼの活性を比色定量し、B / F分離後、H R P標識された抗タグ抗体と一定時間反応後、B / F分離を行ない、H R Pの基質(例えば3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(T M B))を作用させてH R Pの活性を比色定量し、C末端側にH i sタグ、N末端側にM y cタグを付加したb I A P I Iのアルカリホスファター

ゼ活性の比色定量値をH R P活性の比色定量値で割った値を基準にして、測定対象の比活性を相対値として求めることができる。

【0026】

本発明の細胞を培養するための培地は、当業者が通常用いる培地中から適宜選択すればよく、大腸菌では、L B ( L u r i a - B e r t a n i ) 培地、2 x Y T 培地、M 9 培地、哺乳動物細胞では、R o s w e l l P a r k M e m o r i a l I n s t i t u t e ( R P M I ) 1 6 4 0 培地、L - 1 5 培地、ダルベッコの修正イーグル培地 ( D M E M ; D u l b e c c o ' s m o d i f i e d E a g l e ' s m e d i u m ) 、イーグルの最小必須培地 ( M E M ; E a g l e ' s m i n i m a l e s s e n t i a l m e d i u m ) 、ハムのF 1 2 培地、にそれぞれ5 から1 0 % 容量のウシ胎児血清を加えた培地を例示できる。また分泌生産されたアルカリホスファターゼを効率よく精製するために、ウシ胎児血清を添加しない、いわゆる無血清培地を使用してもよい。なお無血清培地を使用する場合、多くの細胞の生育に必要とされるインシュリンやトランスフェリンを添加すると好ましい。さらに上皮成長因子 ( E G F ) 、線維芽細胞成長因子 ( F G F ) 、インシュリン様成長因子I およびI I ( I G F I およびI G F I I ) 等の成長因子や、プロスタグランジンや、セルロプラスミンや、高密度リボタンパク質や、低密度リボタンパク質や、ウシ血清アルブミンや、脂肪酸等を、本発明の細胞の生育や、アルカリホスファターゼの分泌生産や、アルカリホスファターゼの精製に好ましい範囲で培地に添加してもよい。具体例として本発明の細胞がd h f r 遺伝子欠損C H O 細胞であるD G 4 4 細胞の場合には、ヒポキサンチンとチミジンを含んでいる培地、例えばC D C H O 培地 ( 商品名、ライフテクノロジー社製 ) にグルタミンを添加した培地を用いて培養するとよく、d h f r 遺伝子を含むD G 4 4 細胞の場合には、ヒポキサンチンとチミジンを含んでいない培地、例えば、C D O p t i C H O 培地 ( 商品名、ライフテクノロジー社製 ) にグルタミンを添加した培地を用いて培養するとよい。なおブルロニックF 6 8 ( 商品名、ライフテクノロジー社製 ) のような非イオン性界面活性剤や、市販のペニシリン - ストレプトマイシン混合溶液を適宜培地に加えてもよい。

【0027】

本発明の細胞を培養する際の、容器、温度、C O 2 濃度、振とう条件 ( エアレーション ) などの外的な培養条件に特に制限はなく、例えば、本発明の細胞が大腸菌の場合、培養液1 0 m L を入れた1 2 5 m L 容のバッフル付き三角フラスコで、温度3 0 、振とう速度1 5 0 r p m で培養することで、効率よく本発明の細胞を培養することができる。本発明の細胞がD G 4 4 細胞の場合、培養液3 0 m L を入れた2 0 0 m L 容のフラスコで、温度3 7 、C O 2 濃度8 % 、振とう速度1 3 5 r p m で培養することで、効率よく本発明の細胞を培養することができる。培養液中の細胞密度の測定は、当業者が通常用いる方法の中から適宜選択して測定すればよい。例えば、細胞が懸濁している培養液を採取し、採取した培養液と同容量の市販のトリパンブルー染色液 ( 例えば、商品名0 . 4 w / v % T r y p a n B l u e S o l u t i o n 、和光純薬社製 ) と混合して、染色されない細胞 ( 生細胞 ) の数を、顕微鏡下で溶液血球計算盤を用いて計測し算出すればよい。

【0028】

本発明の細胞の培養液から、アルカリホスファターゼを回収するには、当業者が通常用いる方法の中から適宜選択 / 組み合わせで行なえばよい。回収方法の一例として、遠心分離、限外ろ過膜を用いた濃縮、硫酸塩析、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、または前述した方法を組み合わせた方法があげられる。なおアルカリホスファターゼのN 末端側および / またはC 末端側にタグを付加している場合は、前記の方法に加え、タグに対する親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーを組み合わせで精製してもよい。

【発明の効果】

【0029】

本発明のアルカリホスファターゼ、本発明のポリヌクレオチド、本発明の発現ベクター、本発明の細胞及び本発明のアルカリホスファターゼ生産方法を用いることにより、熱安

10

20

30

40

50

定性に優れた高活性アルカリホスファターゼを効率的に生産することができる。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】プラスミド pCIPm2092H2 の模式図である。

【図2】プラスミド pECedhfr2 の模式図である。

【図3】プラスミド pCIP400-1001H2 の模式図である。

【図4】プラスミド pCIP434-m1001H2 の模式図である。

【図5】実施例9表5に記載の bIAPII 変異体の比活性測定結果を示す図である。

【図6】実施例9表4に記載の bIAPII 変異体の熱安定性試験結果を示す図である。

【図7】実施例9表5に記載の bIAPII 変異体の熱安定性試験結果を示す図である。

10

【実施例】

【0031】

以下に本発明を更に詳細に説明するために実施例を示すが、これら実施例は本発明の一例を示すものであり、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0032】

実施例1 プラスミド（発現ベクター）の作製

本検討に用いたプラスミド（発現ベクター）を、それぞれ以下に示す方法で作製した。

【0033】

（A）プラスミド pCIP1000

（A-1）N末端側に仔牛小腸由来のアルカリホスファターゼ（CIP）のシグナルペプチド（配列番号18）を、C末端側にヒスチジン6個からなるHisタグを、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるbIAPIIに付加したポリペプチドをコードする配列番号19に記載のポリヌクレオチドを含むプラスミドである、pCIP-1をOPERON

20

Biotechnologies社で合成し、これを鋳型とし、配列番号20に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド（Primer-#1）と配列番号21に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド（Primer-#2）をプライマーセットとして、Taq DNA polymerase（ライフテクノロジー社製）を用いてPCRを行なった。

（A-2）得られた1.5kbpのポリヌクレオチド（DNA-1）を、CMVプロモーターを用いた発現ベクターであるpOptiVEC-TOPO（ライフテクノロジー社製）のクローニングサイトに挿入した。

30

（A-3）（A-2）でDNA-1を挿入したプラスミドの塩基配列を調べた。結果、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（配列番号22）が挿入されたプラスミド（5.9kbp）であることを確認し、当該プラスミドをpCIP1000と名付けた。

【0034】

（B）プラスミド pCIP1000H

pCIP-1を制限酵素EcoRIとMluIで二重消化して得た1.5kbpのポリヌクレオチド（DNA-2）と、pCIP1000を制限酵素EcoRIとMluIで二重消化して得た4.4kbpのポリヌクレオチド（DNA-3）をDNA Ligation Kit Mighty Mix（タカラバイオ社製）を用いてライゲーションすることによって得たプラスミド（5.9kbp）をpCIP1000Hと名付けた。

40

【0035】

（C）プラスミド pCIPm2092H

（C-1）pTrc99Aを制限酵素HindIIIで消化後、DNA Blunting Kit（タカラバイオ社製）で平滑化し、それを制限酵素NcoIで消化して4.1kbpのポリヌクレオチド（DNA-4）を得た。

（C-2）配列番号23に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド（Primer-#3）、配列番号24に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド（Primer-#4）、配列番号25に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド（Primer-#5）、配列番号26に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド（Primer-#6）をプライマーセッ

50



トとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用いてPCRを行ない、配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるSalmonella typhimurium由来mg1Bのシグナルペプチドをコードする0.085kbpのオリゴヌクレオチド(DNA-5)を得た。

【0036】

(C-3) 配列番号28に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer-#7)、配列番号29に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer-#8)、配列番号30に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer-#9)をプライマーセットとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用いてPCRを行ない、Mycタグと配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるbIAPIIのN末端6アミノ酸をコードする0.069kbpのオリゴヌクレオチド(DNA-6)を得た。

(C-4) DNA-5とDNA-6を鋳型セットにして、配列番号23に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer-#3)と配列番号30に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer-#9)をプライマーセットとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用いてPCRを行ない、配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるmg1Bシグナルペプチド、Mycタグおよび配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるbIAPIIのN末端6アミノ酸をコードする0.138kbpのオリゴヌクレオチド(DNA-7)を得た。

(C-5) DNA-4と、NA-7を制限酵素BspHIとBbvCIで二重消化して得たオリゴヌクレオチド(DNA-8)と、pCIP1000Hを制限酵素BbvCIとHpaIで二重消化して得た1.5kbpのポリヌクレオチド(DNA-9)をライゲーションすることで得たプラスミド(5.7kbp)をpCIPm2092H(図1)と名付けた。

【0037】

(D) プラスミドpCIPm2092H2

(D-1) pCIPm2092Hを鋳型とし、配列番号31に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer-#10)と配列番号32に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer-#11)をプライマーセットとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用いてPCRを行ない、1.5kbpのポリヌクレオチド(DNA-10)を得た。

(D-2) DNA-10を鋳型とし、配列番号31に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer-#10)と配列番号33に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer-#12)をプライマーセットとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用いてPCRを行ない、1.5kbpのポリヌクレオチド(DNA-11)を得た。

(D-3) DNA-11を制限酵素BbvCIとAgeIで二重消化して得た1.5kbpのポリヌクレオチド(DNA-12)とpCIPm2092Hを制限酵素BbvCIとAgeIで二重消化して得た4.2kbpのポリヌクレオチド(DNA-13)をライゲーションすることで得たプラスミド(5.7kbp)をpCIPm2092H2と名付けた。pCIPm2092H2は、配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるmg1Bシグナルペプチド、Mycタグおよび配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるbIAPII、および配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるヒスタグをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドである(図1)。

【0038】

(E) プラスミドpCIPm2093H2

(E-1) 配列番号34に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer-#13)、配列番号35に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer-#14)をプライマーセットとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用いてPCRを行ない、0.045kbpのオリゴヌクレオチド

(DNA - 14)を得た。

(E - 2) pCIPm2092H2を鋳型とし、配列番号36に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer - #15)と配列番号37に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer - #16)、配列番号32に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer - #11)をプライマーセットとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase(タカラバイオ社製)を用いてPCRを行ない、0.535 kbpのポリヌクレオチド(DNA - 15)を得た。

【0039】

(E - 3) DNA - 15とDNA - 16をプライマーセットとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase(タカラバイオ社製)を用いてPCRを行ない、0.558 kbpのオリゴヌクレオチド(DNA - 16)を得た。

10

(E - 4) DNA - 16を制限酵素XmaIとSacIIで二重消化して得た0.5 kbpのポリヌクレオチド(DNA - 17)とpCIPm2092H2を制限酵素XmaIとSacIIで二重消化して得た5.2 kbpのポリヌクレオチド(DNA - 18)をライゲーションすることで得たプラスミド(5.7 kbp)をpCIPm2093H2と名付けた。

pCIPm2093H2は、配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるmg1Bシグナルペプチド、Myctag、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるbIAPII変異体(配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるbIAPIIの322位がアスパラギン酸に置換された変異体)および配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるヒスタグをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドである。

20

【0040】

(F) プラスミドpECEdhfr2

(F - 1) プラスミドpECEdhfr(Yasukawara, J. Biochem., 108, 673 - 676 (1990))を鋳型とし、配列番号38に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer - 17)および配列番号39に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer - 18)をプライマーセットとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase(タカラバイオ社製)を用いてPCRを行ない、0.37 kbpの増幅産物(ポリヌクレオチド)(DNA - 18)を得た。

(F - 2) DNA - 18を鋳型とし、配列番号38に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer - 17)および配列番号40に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer - 19)をプライマーセットとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase(タカラバイオ社製)を用いてPCRを行ない、0.39 kbpの増幅産物(ポリヌクレオチド)(DNA - 19)を得た。

30

(F - 3) プラスミドpECEdhfrを鋳型とし、配列番号41に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer - 20)および配列番号42に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer - 21)をプライマーセットとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase(タカラバイオ社製)を用いてPCRを行ない、0.69 kbpの増幅産物(ポリヌクレオチド)(DNA - 20)を得た。

【0041】

40

(F - 4) DNA - 20を鋳型とし、配列番号43に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer - 22)および配列番号42に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド(Primer - 21)をプライマーセットとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase(タカラバイオ社製)を用いてPCRを行ない、0.71 kbpの増幅産物(ポリヌクレオチド)(DNA - 21)を得た。

(F - 5) DNA - 19を制限酵素MfeIとXbaIで二重消化し得られたポリヌクレオチド(DNA - 22)と、DNA - 21を制限酵素XbaIとPciIで二重消化して得られたポリヌクレオチド(DNA - 23)と、プラスミドpECEdhfrを制限酵素EcoRIとPciIで二重消化し得られた2.8 kbpのポリヌクレオチド(DNA - 24)を、ライゲーションすることで、配列番号44に記載の塩基配列を含んだプラスミ

50

ド p E C E d h f r 2 を作製した。なおプラスミド p E C E d h f r 2 は、プラスミド p E C E d h f r の S V 4 0 後期 ( l a t e ) プロモーターと d h f r 遺伝子の間にある制限酵素 E c o R I の認識部位をなくし、かつ、S V 4 0 初期 ( e a r l y ) プロモーターから S V 4 0 ポリ A までの領域を置換したプラスミドである ( 図 2 )。

【 0 0 4 2 】

( G ) プラスミド p E C E d h f r 3

( G - 1 ) p E C E d h f r 2 を制限酵素 K a s I で消化後、DNA L i g a t i o n K i t M i g h t y M i x ( タカラバイオ社製 ) を用いてライゲーションすることで、配列番号 3 7 に記載の塩基配列を含んだプラスミド p E C E d h f r 3 を作製した。

【 0 0 4 3 】

( H ) プラスミド p C I P 4 0 0 - 1 0 0 1 H 2

( H - 1 ) p T r c 9 9 A を鋳型とし、配列番号 4 5 に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド ( P r i m e r - 2 3 ) および配列番号 4 6 に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド ( P r i m e r - 2 4 ) をプライマーセットとして、P r i m e S T A R H S DNA p o l y m e r a s e ( タカラバイオ社製 ) を用いて P C R を行ない、0 . 0 6 3 k b p の増幅産物 ( ポリヌクレオチド ) ( DNA - 2 5 ) を得た。

( H - 2 ) 配列番号 4 7 に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドを鋳型とし、配列番号 4 8 に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド ( P r i m e r - 2 5 ) および配列番号 4 9 に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド ( P r i m e r - 2 6 ) をプライマーセットとして、P r i m e S T A R H S DNA p o l y m e r a s e ( タカラバイオ社製 ) を用いて P C R を行ない、マウス M M P - 9 由来のシグナルペプチド ( 配列番号 5 0 ) をコードする 0 . 0 7 5 k b p の増幅産物 ( ポリヌクレオチド ) ( DNA - 2 6 ) を得た。

( H - 3 ) p T r c 9 9 A を鋳型とし、DNA - 2 5 と DNA - 2 6 をプライマーセットとして、P r i m e S T A R H S DNA p o l y m e r a s e ( タカラバイオ社製 ) を用いて P C R を行ない、0 . 1 5 k b p の増幅産物 ( ポリヌクレオチド ) ( DNA - 2 7 ) を得た。

【 0 0 4 4 】

( H - 4 ) DNA - 2 7 を制限酵素 A o r 5 1 H I と B g l I I で二重消化して得られた 0 . 1 4 k b p のポリヌクレオチド ( DNA - 2 8 ) と、p C I P m 2 0 9 2 H 2 を制限酵素 A o r 5 1 H I と M l u I で二重消化して得られた 1 . 5 k b p のポリヌクレオチド ( DNA - 2 9 ) と、p E C E d h f r 3 を制限酵素 B g l I I と M l u I で二重消化して得られた 3 . 7 k b p のポリヌクレオチド ( DNA - 3 0 ) をライゲーションすることで得たプラスミド ( 5 . 3 k b p ) を p C I P 4 0 0 - 1 0 0 1 H 2 と名付けた。p C I P 4 0 0 - 1 0 0 1 H 2 は、配列番号 5 0 に記載のアミノ酸配列からなるマウス M M P - 9 由来のシグナルペプチド、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる b I A P I I および配列番号 1 0 に記載のアミノ酸配列からなるヒスタグをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドである ( 図 3 )。

【 0 0 4 5 】

( I ) プラスミド p C I P 4 3 4 - m 1 0 0 1 H 2

( I - 1 ) p C I P 4 0 0 - 1 0 0 1 H 2 を鋳型とし、配列番号 5 1 に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド ( P r i m e r - 2 7 ) および配列番号 5 2 に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド ( P r i m e r - 2 8 ) をプライマーセットとして、P r i m e S T A R H S DNA p o l y m e r a s e ( タカラバイオ社製 ) を用いて P C R を行ない、0 . 3 k b p の増幅産物 ( ポリヌクレオチド ) ( DNA - 3 1 ) を得た。

( I - 2 ) DNA - 3 1 と配列番号 5 3 に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド ( P r i m e r - 2 9 ) をプライマーセットとして、P r i m e S T A R H S DNA p o l y m e r a s e ( タカラバイオ社製 ) を用いて P C R を行ない、0 . 3 3 k b p の増幅産物 ( ポリヌクレオチド ) ( DNA - 3 2 ) を得た。

(I - 3) DNA - 32 を制限酵素 S f i I と A o r 5 1 H I で二重消化して得られた 0 . 3 k b p のポリヌクレオチド (DNA - 33) と、p C I P 4 0 0 - 1 0 0 1 H 2 を制限酵素 S f i I と A o r 5 1 H I で二重消化して得られた 5 . 1 k b p のポリヌクレオチド (DNA - 34) をライゲーションすることで得たプラスミド (5 . 4 k b p) を p C I P 4 3 4 - m 1 0 0 1 H 2 と名付けた。p C I P 4 3 4 - m 1 0 0 1 H 2 は、配列番号 50 に記載のアミノ酸配列からなるマウス MMP - 9 由来のシグナルペプチド、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列からなる M y c タグ、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる b I A P I I、および配列番号 10 に記載のアミノ酸配列からなるヒスタグをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドである (図 4)。

【0046】

10

#### 実施例 2 変異導入

##### エラーブローン P C R 法による変異導入

p C I P m 2 0 9 3 H 2 を鋳型 (50 ng /  $\mu$ l) として、配列番号 54 に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド (Primer - 30) (0 . 4  $\mu$ M)、配列番号 55 に記載の配列からなるオリゴヌクレオチド (Primer - 31) (0 . 4  $\mu$ M)、0 . 08 mM M n C l<sub>2</sub>、5 mM M g C l<sub>2</sub>、0 . 2 mM d A T P、0 . 2 mM d G T P、1 mM d C T P、1 mM d T T P、5 unit G o T a q D N A P o l y m e r a s e (プロメガ株式会社) を混合し、95 で 2 分加熱後、95 (30 秒)、60 (30 秒)、72 (88 秒) の P C R 反応を 30 サイクル繰り返した。1 . 4 k b p の増幅産物をアガロース電気泳動により回収後、制限酵素 B b v C I と S a c I I で二重消化した。

20

【0047】

#### 実施例 3 大腸菌での高活性変異体のスクリーニング

実施例 2 のエラーブローン P C R 法による変異導入で調製した制限酵素消化物と p C I P m 2 0 9 3 H 2 を制限酵素 B b v C I と S a c I I で二重消化して得た 4 . 3 k b p のポリヌクレオチド (DNA - 35) をライゲーションして得たプラスミドを大腸菌 D H 5 (ニッポンジーン社製) にトランスフェクションし、2 mM M g C l<sub>2</sub>、40  $\mu$ g / ml B C I P (5 - b r o m o - 4 - c h l o r o - 3 - i n d o l y l p h o s p h a t e d i s o d i u m s a l t)、50  $\mu$ g / ml C a r b e n i c i l l i n N a を含む L B 寒天培地にて 28 で培養した。青く呈色したコロニーを、1 mM M g C l<sub>2</sub>、25  $\mu$ g / ml C a r b e n i c i l l i n N a を含む 1 / 2 濃度の L B 培地にて 28 で培養し、菌濁度 (O D 600) と培養液中のアルカリホスファターゼ活性を測定し、菌濁度あたりのアルカリホスファターゼ活性の高い菌を回収した。

30

【0048】

#### 実施例 4 大腸菌ペリプラズム画分の調製

実施例 3 で回収した大腸菌を 5 mM M g C l<sub>2</sub>、50  $\mu$ g / ml C a r b e n i c i l l i n N a を含む 4 x Y T 培地 (B a c t o T r y p t o n 3 . 2 %、Y e a s t E x t r a c t 2 %、N a C l 0 . 5 %) にて 28 で培養後、遠心分離 (3 , 500 rpm、10 min) して菌を回収した。

【0049】

40

その菌を菌濁度 (O D 600) が 100 となるように、20 % ショ糖、0 . 15 M K C l、0 . 1 mg / ml 卵白リゾチームを含む 0 . 03 M B i c i n e - N a O H 緩衝液 (p H 8 . 0) [以下、S K B 溶液という] に懸濁し、4 で 24 時間以上インキュベートした。菌懸濁液を遠心分離 (12 , 000 rpm、10 min) して上清を回収後、ポアサイズ 0 . 45  $\mu$ m のカートリッジフィルターでろ過した。そのろ液をペリプラズム画分とした。

【0050】

#### 実施例 5 大腸菌で生産した b I A P I I 変異体の比活性測定

抗 c - M y c 抗体 (R o c h e 社製) を 0 . 4  $\mu$ g / ml に希釈し 100  $\mu$ l ずつ 96 ウェルイムノプレート (N U N C 社製 M A X I S O R P 430341) に添加し、抗

50

体固定化プレートを作製した。それに実施例 4 で調製したペリプラズム画分を添加し、一時間インキュベートした。プレートを洗浄後、pNPP 溶液を添加し室温下で波長 405 nm の吸光度をモニタリングし吸光度増加速度 (OD 405/min) を求めた。抗 c-Myc 抗体固定化プレートに実施例 4 で調製したペリプラズム画分を添加し、一時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、HRP 標識抗ヒスタグ抗体 (Bethyl 社製) を添加し、一時間インキュベートした。プレートを洗浄後、TMB 溶液を添加し室温下で波長 620 nm の吸光度をモニタリングし吸光度増加速度 (OD 620/min) を求めた。pNPP を基質にした吸光度増加速度 (OD 405/min) の値を、TMB を基質にした吸光度増加速度 (OD 620/min) の値で割った値 (OD 405/OD 620) を比活性として表し、対照サンプルと比較した。

10

## 【0051】

## 実施例 6 配列解析

実施例 5 の比活性測定の結果選択された bIAPII 変異体を生産する大腸菌よりプラスミドを抽出し、配列解析を行った。その結果、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列の 430 位のグルタミン酸がアラニンに置換されていた。このプラスミドを pCIPm2103H2 と名付けた。

## 【0052】

## 【表 1】

プラスミド名	322位アミノ酸	430位アミノ酸	配列番号
pCIPm2092H2	グリシン (G)	グルタミン酸 (E)	1
pCIPm2093H2	アスパラギン酸 (D)	グルタミン酸 (E)	2
pCIPm2103H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	3

20

## 実施例 7 多重変異体の作製 (1)

実施例 6 で得られた pCIPm2103H2 を鋳型として用い、実施例 2 に記載の変異導入、実施例 3 に記載の大腸菌での高活性変異体のスクリーニング、実施例 4 に記載の大腸菌ペリプラズム画分の調製、実施例 5 に記載の比活性測定、実施例 6 に記載の配列解析を実施した結果、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列の 323 位がアスパラギン (N)、385 位のセリンがグリシン (G)、アスパラギン (N) に置換された多重変異体を得られた。これらのプラスミドをそれぞれ pCIPm2157H2、pCIPm2155H2、pCIPm2156H2 と名付けた。

30

## 【0053】

## 【表 2】

プラスミド名	322位アミノ酸	430位アミノ酸	323位アミノ酸	385位アミノ酸	配列番号
pCIPm2092H2	グリシン (G)	グルタミン酸 (E)	リジン (K)	セリン (S)	1
pCIPm2103H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	リジン (K)	セリン (S)	3
pCIPm2157H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	アスパラギン (N)	セリン (S)	4
pCIPm2155H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	リジン (K)	グリシン (G)	5
pCIPm2156H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	リジン (K)	アスパラギン (N)	6

## 実施例 8 多重変異体の作製 (2)

実施例 7 で得られた bIAPII 多重変異体のアミノ酸置換を掛け合わせた多重変異体を作製した。pCIPm2155H2、pCIPm2156H2 を制限酵素 PstI と MluI で二重消化して得た 0.4 kbp のポリヌクレオチド (DNA-36、DNA-37) と pCIPm2157H2 を制限酵素 PstI と MluI で二重消化して得た 5.3 kbp のポリヌクレオチド (DNA-38) をライゲーションすることで得たプラスミド (5.7 kbp) を pCIPm2158H2、pCIPm2159H2 と名付けた。

40

## 【0054】

## 【表 3】

プラスミド名	322位アミノ酸	430位アミノ酸	323位アミノ酸	385位アミノ酸	配列番号
pCIPm2158H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	アスパラギン (N)	グリシン (G)	7
pCIPm2159H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	アスパラギン (N)	アスパラギン (N)	8

## 実施例 9 変異体遺伝子の発現ベクターへの載せ変え

50

実施例 3 から 8 の結果、得られた b I A P I I 多重変異体のプラスミドを制限酵素 B b v C I と M l u I で二重消化し、1.4 k b p のポリヌクレオチド (DNA - 39) を回収した。実施例 1 (H) で作製した p C I P 400 - 1001H2 を制限酵素 B b v C I と M l u I で二重消化し、3.9 k b p のポリヌクレオチド (DNA - 40) を回収した。実施例 1 (I) で作製した p C I P 434 - m1001H2 を制限酵素 B b v C I と M l u I で二重消化し、3.9 k b p のポリヌクレオチド (DNA - 41) を回収した。DNA - 39 と DNA - 40、DNA - 39 と DNA - 41 をライゲーションすることで、以下に示すプラスミドを作製した。

【0055】

【表 4】

プラスミド名	322位アミノ酸	430位アミノ酸	323位アミノ酸	385位アミノ酸	配列番号
pCIP400-1001H2	グリシン (G)	グルタミン酸 (E)	リジン (K)	セリン (S)	1
pCIP400-1002H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	リジン (K)	セリン (S)	3
pCIP400-1003H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	アスパラギン (N)	セリン (S)	4
pCIP400-1005H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	リジン (K)	グリシン (G)	5
pCIP400-1006H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	リジン (K)	アスパラギン (N)	6
pCIP400-1019H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	アスパラギン (N)	グリシン (G)	7
pCIP400-1008H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	アスパラギン (N)	アスパラギン (N)	8

【0056】

【表 5】

プラスミド名	322位アミノ酸	430位アミノ酸	323位アミノ酸	385位アミノ酸	配列番号
pCIP434-m1001H2	グリシン (G)	グルタミン酸 (E)	リジン (K)	セリン (S)	1
pCIP434-m1002H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	リジン (K)	セリン (S)	3
pCIP434-m1003H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	アスパラギン (N)	セリン (S)	4
pCIP434-m1005H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	リジン (K)	グリシン (G)	5
pCIP434-m1006H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	リジン (K)	アスパラギン (N)	6
pCIP434-m1019H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	アスパラギン (N)	グリシン (G)	7
pCIP434-m1008H2	アスパラギン酸 (D)	アラニン (A)	アスパラギン (N)	アスパラギン (N)	8

実施例 10 CHO 細胞へのトランスフェクションおよび b I A P I I 変異体の生産  
(1) 実施例 9 で作製したプラスミドを制限酵素 P v u I で消化することで直鎖化後、Free Style MAX 試薬 (ライフテクノロジーズ社製) を使用したリポフェクション法によりチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞) である DG44 細胞に導入した。

(2) プラスミドを導入した DG44 細胞を、8 mM のグルタミンおよび 0.18 % の Pluronic F-68 (ライフテクノロジーズ社製) を含んだ CD CHO 培地 (培地 1) で、温度 37、CO2 濃度 8 %、回転振とう速度 135 rpm で 3 日間培養した。

(3) 培養液を低速 (900 rpm) で遠心分離することで培養細胞を回収後、8 mM グルタミンおよび 0.18 % Pluronic F-68 を含んだ CD Opti CHO 培地 (培地 2) に懸濁して (培地交換 1 回目)、7 日間培養を継続した。

(4) (3) と同様にして、培養細胞を回収後、培地 2 に懸濁して (培地交換 2 回目)、7 日間培養を継続した。

(5) (3) と同様にして、培養細胞を回収後、培地 2 に懸濁して (培地交換 3 回目)、7 日間培養を継続した。

(6) (3) と同様にして、培養細胞を回収後、培地 2 に懸濁して (培地交換 4 回目)、7 日間培養を継続した。

(7) (6) の 7 日目の培養液を遠心分離 (12,000 rpm、10 min) して培養上清を回収した。

【0057】

実施例 11 CHO 細胞で生産した b I A P I I 変異体の比活性測定

抗ヒスタグ抗体 (和光純薬社製) を 0.5 μg/ml に希釈し 100 μl ずつ 96 ウェルイムノプレート (NUNC 社製 MAX ISORP 430341) に添加し、抗体固定化プレートを作製した。それに実施例 10 で調製した、N 末端に配列番号 9 に記載のアミノ酸配列からなる Myc タグ、C 末端に配列番号 10 に記載のアミノ酸配列からなるヒスタグが付加された実施例 9 表 5 に記載の b I A P I I 変異体を含んだ培養上清を添加し

10

20

30

40

50

、一時間インキュベートした。プレートを洗浄後、pNPP溶液を添加し室温下で波長405nmの吸光度をモニタリングし吸光度増加速度(OD405/min)を求めた。抗ヒスタグ抗体固定化プレートに実施例10で調製した、N末端に配列番号9に記載のアミノ酸配列からなるMycタグ、C末端に配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるヒスタグが付加された実施例9表5に記載のbIAPII変異体を含んだ培養上清を添加し、一時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、HRP標識抗c-Myc抗体(和光純薬社製)を添加し、一時間インキュベートした。プレートを洗浄後、TMB溶液を添加し室温下で波長620nmの吸光度をモニタリングし吸光度増加速度(OD620/min)を求めた。pNPPを基質にした吸光度増加速度(OD405/min)の値を、TMBを基質にした吸光度増加速度(OD620/min)の値で割った値(OD405/OD620)を比活性として表し、対照サンプルと比較した。

10

比活性測定の結果を図5に示す。配列番号4から8に記載のbIAPII変異体は、配列番号1に記載のbIAPIIと同等の比活性を示した。

#### 【0058】

実施例12 CHO細胞で生産したbIAPII変異体の熱安定性試験

実施例10で調製した、bIAPII変異体を含んだ培養上清をアルカリホスファターゼ活性が同等になるように実施例10に記載の培地2で希釈後、7.5μlずつPCR8連チューブ(eppendorf社製)に分注した。それらをGeneAmp PCR system9700(Applied Biosystems社製)で55 から70 で10分間加温後、氷冷した。それらにpNPP溶液を150μL添加し、室温で一定時間保温後、それらのうちの100μLを0.5Mの水酸化ナトリウム100μLと混合することで反応を停止し、波長405nmにおける吸光度を測定した。未加温のサンプルの活性を100%としたときの各温度での加温サンプル中の残存活性を示す。

20

#### 【0059】

実施例9表4に記載のbIAPII変異体の熱安定性試験結果を図6に示す。配列番号4から8に記載のアミノ酸配列からなるbIAPII変異体のC末端に配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるヒスタグが付加した本発明のアルカリホスファターゼは、bIAPIIと同等以上の熱安定性を示した。

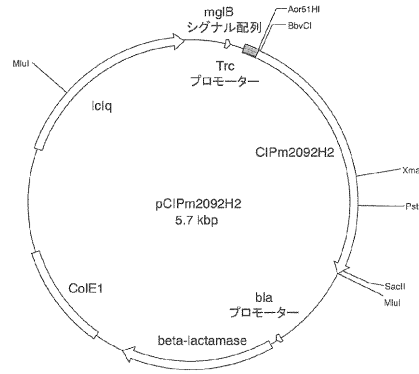
#### 【0060】

実施例9表5に記載のbIAPII変異体の熱安定性試験結果を図7に示す。配列番号4から8に記載のアミノ酸配列からなるbIAPII変異体のN末端に配列番号9に記載のアミノ酸配列からなるMycタグが付加し、それらのC末端に配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるヒスタグが付加した本発明のアルカリホスファターゼは、bIAPIIと同等以上の熱安定性を示した。

30

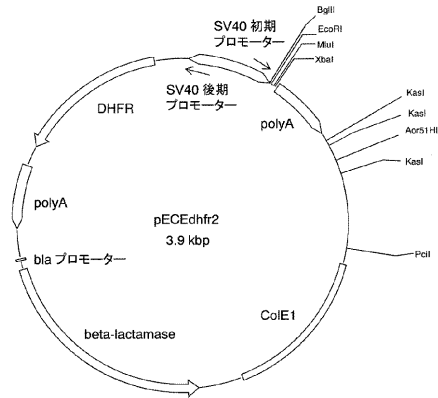
【 図 1 】

pCIPm2092H2



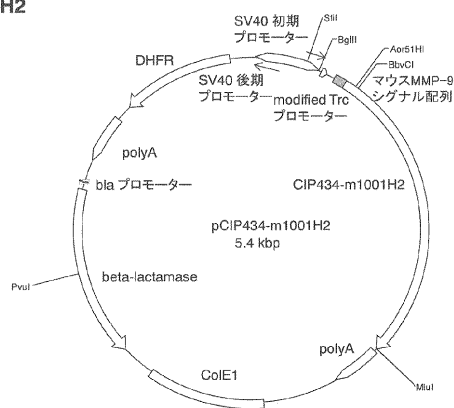
【 図 2 】

pECEdhfr2

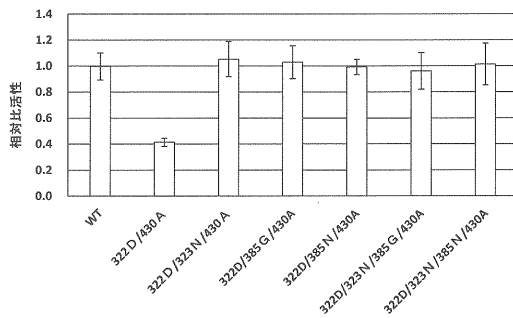


【 図 4 】

pCIP434-m1001H2

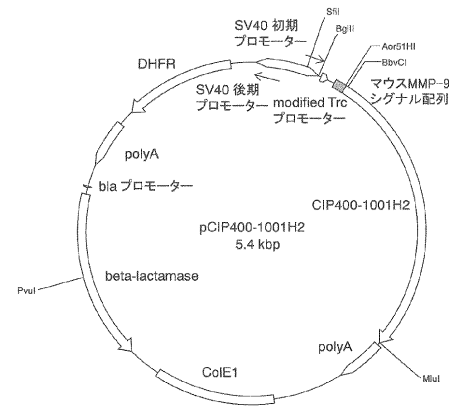


【 図 5 】

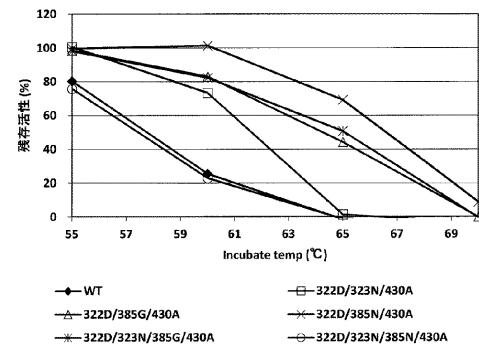


【 図 3 】

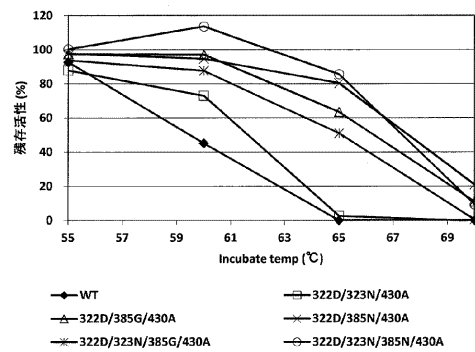
pCIP400-1001H2



【 図 6 】



【 図 7 】





【配列表】

2017123794000001.app

---

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/10	
<b>C 1 2 N 5/16 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/16	

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA11 CA04 CA20 DA02 EA04 GA11  
4B050 CC04 DD11 HH02 LL03  
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA31 CA46