

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3736574号

(P3736574)

(45) 発行日 平成18年1月18日(2006.1.18)

(24) 登録日 平成17年11月4日(2005.11.4)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 9/38 (2006.01)
 C 1 2 R 1/69 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 9/38
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 R 1:69

請求項の数 6 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-503364
 (86) (22) 出願日 平成7年6月23日(1995.6.23)
 (65) 公表番号 特表平10-504449
 (43) 公表日 平成10年5月6日(1998.5.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1995/008013
 (87) 国際公開番号 W01996/000786
 (87) 国際公開日 平成8年1月11日(1996.1.11)
 審査請求日 平成14年6月3日(2002.6.3)
 (31) 優先権主張番号 08/267,631
 (32) 優先日 平成6年6月29日(1994.6.29)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC 74285

(73) 特許権者 505325028
 ヒストープロカデス ビーヴェー
 オランダ国 デルフト 2600 エムエ
 イ ピーオー ボックス 1 ワーテリン
 グセウエーグ 1
 (74) 代理人 100073184
 弁理士 柳田 征史
 (74) 代理人 100090468
 弁理士 佐久間 剛
 (72) 発明者 バーカ, ランディー エム
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 080 サウス サン フランシスコ キ
 ンボル ウェイ 180 ジェネンコア
 インターナショナル インコーポレーテッ
 ド内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アスペルギルス オリゼ (*Aspergillus oryzae*) におけるβ-ガラクトシダーゼの生産増加

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1の配列を含むアスペルギルス・オリゼから単離されたラクトース加水分解活性を有するタンパク質をコードするDNA断片を含む発現ベクターで、アスペルギルス・オリゼ宿主細胞(ATCC#74285)を形質転換して得られた細胞。

【請求項2】

アスペルギルス・オリゼ宿主細胞におけるラクターゼ産生を増加させる方法であって：

- a) アスペルギルス・オリゼ ラクターゼをコードするDNA配列および該アスペルギルス・オリゼ ラクターゼをコードするDNA配列に作用的に連結している生来のアスペルギルス・オリゼ ラクターゼのシグナル配列をコードするDNA配列を含む配列番号1のDNA配列を含むDNAを用いて宿主細胞を形質転換し；
- b) 前記DNAを有する形質転換体を形成するのに適切な条件下で前記工程a)から得られた形質転換細胞を培養し；さらに、
- c) ラクターゼ産生の増加に関して形質転換体をスクリーニングする；各工程を含み、前記アスペルギルス・オリゼ宿主細胞がアスペルギルス・オリゼ細胞(ATCC#74285)であることを特徴とする方法。

【請求項3】

アスペルギルス・オリゼ ラクターゼをコードするDNAの1以上のコピーを用いて前記宿主細胞を形質転換することを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項4】

前記宿主細胞を形質転換するのに用いるDNAが、アスペルギルス内で発現可能な選択マーカーをコードするDNA配列をさらに含むことを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項5】

選択マーカーがアスペルギルス・オリゼpyrG遺伝子であることを特徴とする請求項4記載の方法。

【請求項6】

配列番号1の配列から成るアスペルギルス・オリゼラクターゼおよびアスペルギルス・オリゼシグナル配列をコードするDNA、ならびにアスペルギルス・オリゼの選択マーカーをコードするDNAを用いてアスペルギルス・オリゼ宿主細胞を形質転換することを特徴とする請求項2記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

発明の属する技術分野

本発明は、コウジカビ（アスペルギルス・オリゼ）（*Aspergillus oryzae*）におけるラクターゼの産生増加に関する。さらに特定すると、本発明は、アスペルギルス・オリゼラクターゼをコードしているDNA配列、ならびにラクターゼ産生の制御、発現および分泌に必要な付加的なDNAからなるDNAを用いて宿主細胞を形質転換することにより、アスペルギルス（コウジカビ）属（*Aspergillus*）宿主細胞内でアスペルギルスラクターゼの産生を増加させることに関する。

発明の背景

ラクトースは牛乳やホエイ中に含まれる主な糖質である（約42%を占めている）。ホエイとは、チーズの生産工程においてクリームや牛乳から固形分を除去した後に残っている液体である。

20

-D-ガラクトシダーゼ（-D-ガラクトシドガラクトヒドロラーゼ、EC3.2.1.23、ラクターゼとも呼ばれる）は、二糖類であるラクトースをグルコースとガラクトースに加水分解する酵素である。牛乳およびホエイにラクトースが存在することにより、一部の人間にはいくつかの医学的問題が生じると考えられている。これらの医学的問題は一般的に「ラクトース不耐性」と呼ばれている。例えば、アジア人、アフリカ人、およびアフロアメリカ人では高い割合（～90%）で、ならびにおよそ5%の白系アメリカ人および西ヨーロッパ人では-D-ガラクトシダーゼ（ラクターゼ）が欠損しているといわれている。（*The Lancet*, Vol.338, 9月14日号, 1994, p.663-664参照。）ラクターゼ酵素の欠損による影響は、典型的なものとして、ラクトースを含有する製品、例えば、牛乳、アイスクリームまたはその他の乳製品を摂取した後の腹部膨満、腹鳴、および/または下痢として現れる。子供もある種のラクトース不耐性になりやすいが、これは、ガラクトースからグルコースへの変換がうまくできないためである。ガラクトースが血中に蓄積すると肝臓が肥大する。この状態をガラクトース血症とよぶ。

30

3000万から5000万人が何らかの形のラクトース不耐性に苦しんでいるといわれている。ラクトース不耐性の治療のために数種のラクターゼ製品が市販されており、それらの中には例えば、ラクタイド（Lactaid）（ジョンソン&ジョンソン（Johnson & Johnson）から発売）、デイリーイーズ（Dairy Ease）（スターリングウインスロップ（Sterling Winthrop, Inc.）から発売）、およびラクトゲスト（Lactogest）（トンプソンメディカル（Thompson Medical）から発売）などがある。これらのラクターゼ製品は、2種類のうちの一方に分類されるのが一般的である：錠剤またはカプレットの形でヒトが経口摂取できるような最適pHの低い（2.5～3.5）ラクターゼ；牛乳、チーズ、アイスクリームおよびその他ラクトースやホエイを含有する食品への食品添加物として使用する。最適pHが中性（6.5～7.0）のラクターゼである。一般的には、最適pHの低いラクターゼは麹ラクターゼ法により、菌体内で産生される。この方法は、ロール（Roehr）, M.、クビセック（Kubicek）, C.P.、コミネック（Kominek）, J.、（1992年）（ベネット（Bennett）, J.W.およびクリック（Klich）, M.A.編）pp.116-119；バターワース-ハイネマン（Butterworth-Heinemann）、ストーンハム（Stoneham）, M.A.およびロックウッド（Lockwood）, L.B.（1979年）微生物テクノロジー（Microbial Technology）、第1巻第2版（ペプラー（Pepl

40

50

er), H.J.編) pp.356-387、アカデミックプレス (Academic Press) 社刊、ニューヨーク (New York) に記載されているクエン酸の生産に用いられている麹法と類似しているものと考えられている。中性 pH のラクターゼは、ヨシダ (Yoshida), H., アラキ (Araki), K., カワイ (Kawai), M., Agric. Biol. Chem. 52: 951-955 に記載されているように、クлуйヴェロミセス ラクティス (Kluyveromyces lactis) のような酵母を用いて生産されるのが一般的である。

現在の生産方法は、工業衛生あるいは規制 / 安全性に対する配慮と関連しており、および / または生産コストがかかりすぎているため、ラクターゼを安全かつ低コストで生産するシステムを開発する必要がある。従って、本発明の目的は、ラクトース不耐性に苦しむ人々に投与することができるラクターゼの産生増加の方法を提供することである。本発明のラクターゼは、ラクトース不耐性に苦しむほ乳類に対して既知の任意の方法、例えば、錠剤、ドロップ、該酵素を実際に含有する牛乳または乳製品として投与することができる。

発明の概要

従って、本発明の目的は、ラクターゼの産生を増加させる方法を提供することにある。すなわち、本発明の一つの実施態様は、アスペルギルス株 (好ましくはアスペルギルス・オリゼ) においてラクターゼの産生を増加させる新規な方法からなる。本発明の方法は、アスペルギルスを DNA を用いて形質転換することにより行われ、ここで、この DNA には、ラクターゼ遺伝子 (好ましくはアスペルギルス ラクターゼ、最も好ましくはアスペルギルス・オリゼ ラクターゼ) をコードしている DNA 配列、および、そのようなアスペルギルス株内の分泌系で機能し、かつ、ラクターゼ遺伝子をコードしている DNA 配列に作用的に連結しているシグナル配列をコードしている DNA が含まれる。そのようなシグナル配列は、ラクターゼに関連したシグナル配列であるかもしくはその他に由来するものである。

本発明においては、糸状菌内で発現可能な任意のラクターゼ遺伝子を用いることができる。ラクトバシルス・ブルガリクス (Lactobacillus bulgaricus) 由来のラクターゼ遺伝子はクローニングされ、大腸菌 (E. coli) 内で発現している (シュミット (Schumidt), B.F.ら、Journal of Bacteriology, 1989年2月号, p.625-635)。アスペルギルス・ニガー (A. niger) 由来のラクターゼ遺伝子および cDNA 配列は既知である (クマー (Kumar), V.ら、Bio/Technology 10:82-85, 1992年)。アスペルギルス・オリゼのラクターゼ遺伝子は出願人らによってクローニングされ、部分的に配列が解析されており、アスペルギルス・オリゼ内での発現については本明細書に詳述されている。該遺伝子の C 末端部分は現在解析中である。かくして、本発明の別の態様は、アスペルギルス・オリゼ由来のラクターゼ遺伝子のすべてまたはほぼすべてをコードしている DNA 断片 (遺伝子) (配列番号 1)、および該遺伝子によりコードされ、ラクトース加水分解活性を有するラクターゼタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 2) に関する。ラクターゼ遺伝子全体が解析されているわけではないが、当業者であれば、本発明の以下の教示に従えば全遺伝子の DNA 配列を確認することができ、該遺伝子によって発現したタンパク質のアミノ酸配列を推定することができる。それゆえ、本発明は該遺伝子配列の全体または一部を包含するものである。

本発明の方法の別の態様においては、アスペルギルス宿主細胞を、プロモーター配列、すなわち、アスペルギルス宿主細胞により機能的に認識され、かつ、シグナル配列をコードしている DNA 配列に作用的に連結している配列をコードしている DNA 配列により形質転換する。さらに、宿主細胞内で発現可能な選択マーカーをコードしている DNA 配列を用いて該宿主細胞を形質転換する。例えば、アスペルギルス・オリゼ由来の pyrG DNA 配列はアスペルギルス・オリゼ内で発現可能である (デリオター - ヤコブス (deRieter-Jacobs), Y.M.J.Tら、Curr. Genet. (1989) 16:159-163)。

本発明のひとつの実施態様においては、ラクターゼ産物が発現し、その後、アスペルギルス宿主細胞から分泌されるように、必要な DNA を用いてアスペルギルス・オリゼ株を形質転換する。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

図1はCCC161からCCC28(CB587972としてオランダに寄託されている)に至る突然変異過程を模式的に示したものである。

図2は、ラクターゼ遺伝子を含むアスペルギルス・オリゼの染色体DNA由来の9kBのBgIII断片を示すサザンハイブリダイゼーションのゲルである。

図3はアスペルギルス・オリゼのラクターゼ断片の制限地図を示している。

図4はアスペルギルス・オリゼのラクターゼ遺伝子の部分配列を示している(配列番号1)。この図では、該遺伝子配列内に8個のイントロンが存在していることが示されている。ラクターゼ分泌のためのシグナル配列は314番から370番のコドンである(配列番号4)。シグナル配列のアミノ酸配列は配列番号3に示されている。

図5は、4kBのBamHI染色体断片からのアスペルギルス・オリゼ由来のpyrG遺伝子の存在を示すサザンハイブリダイゼーションのゲルである。

10

図6はアスペルギルス・オリゼpyrG断片の制限地図を示している。

図7は、pyrG11プラスミドおよびpUC218::A.o.lacプラスミドを用いたプラスミドpPyrLac4の形成を示している。

図8は、KpnIを有するpPyrLac4プラスミドが、アスペルギルス・オリゼ由来のDNAのみからなり、かつpyrGとラクターゼ遺伝子とを含有する12kBの断片をどのようにして放出するかを示している。

発明の詳細な説明

本発明は、糸状菌、好ましくはアスペルギルス・オリゼからのラクターゼの産生を増加させることに関する。特に、本発明は、アスペルギルス・オリゼ宿主株内においてアスペルギルス・オリゼラクターゼの産生を増加させることに関する。さらに特定すると、本明細書に記載されている方法を実施することにより、分泌ラクターゼ量は約10倍になる。ラクターゼ遺伝子の発現の制御についてはほとんどわかっていないため、この結果は驚くべきことである。というのも、遺伝子の複数(1以上)のコピーが挿入されることによりラクターゼの過剰産生を招き、特に10倍ものラクターゼの産生増は期待されていなかったのである。

20

そのようなラクターゼの産生増加は、ラクターゼ遺伝子の1以上のコピー(複数のコピー)が宿主株に形質転換されたために生じたものと考えられる。ラクターゼ遺伝子の複数のコピーは、ラクターゼ遺伝子および他の制御DNAをコードしているDNA配列を含むプラスミドまたはベクターにより導入され、あるいは本明細書において例示されているように、DNAの線状断片上に存在させることができる。ラクターゼ遺伝子のそのような複数のコピーによりアスペルギルス宿主が形質転換されると、該遺伝子は宿主細胞株の染色体に組み込まれるか、または染色体外に導入される。

30

本発明の教示に従えば、生物学的に活性なラクターゼはある種の糸状菌、好ましくはアスペルギルス、最も好ましくはアスペルギルス・オリゼ内で発現し、分泌させることができる。本明細書で用いている生物学的に活性なラクターゼとは、生化学的活性に関して天然に存在するものと同等の能力を示す活性型として分泌されるラクターゼを意味している。一般的には、ラクターゼをコードしている配列に作用的に連結しているシグナル配列をコードしているDNAを含むDNA断片を用いる。図4(配列番号1)はコドン番号314番から370番のシグナル配列を含んでいる。分泌シグナルに対するDNA配列を配列番号4に示す。成熟タンパク質はコドン番号371番からはじまるDNA配列によってコードされている。

40

本発明のDNA断片はさらに、選択マーカーおよび/または機能性プロモーター、ならびにターミネーター配列を有している。このように構築したDNA断片、または該DNAを保有するプラスミドを用いて、アスペルギルス・オリゼを形質転換することができる。その後、ラクターゼの発現および分泌について、また別の方法としては発現可能な選択マーカーを用いてスクリーニングすることにより、活性な組換え体を確認することができる。好ましい選択マーカーの例としては、種々の抗生物質(例えば、アミノグリコシド系、フレオマイシン、ペノミルなど)に対して耐性を有し、アスペルギルス・オリゼ由来のpyrGをコードしているか、または、アスペルギルス属由来のpyrA、argB、trpCもしくはamdS、

50

アカパンカビ (*Neurospora crassa*) 由来のpyr4などをコードしている配列を含む；これらのおよび他の多くの選択マーカーについては当業者において既知である。

形質転換は、遺伝材料を宿主微生物に導入するための既知の方法である。すなわち、形質転換とは、DNAを保持した状態で生物内にDNAを導入することを意味しており、これは、染色体外因子としてまたは染色体に組み込まれた形のいずれであってもよい。本発明の実施例において使用した形質転換法は実質的にはキャンベル (Campbell), E.I.らによって報告されているものである (Curr. Genet. (1989) 16:53-56)。

本発明において、方法に関する好ましい実施態様としては、宿主株には異種DNAを導入しないことである。商業的生産用に選ばれた株に、異種のまたは外来性のDNA配列を挿入すると、同種のDNAのみを挿入した場合よりも承認前に広範な試験を監督機関から要求される。同種DNAとは、宿主株 (好ましくはアスペルギルス・オリゼ) 由来のDNA、または宿主株 (すなわちアスペルギルス・オリゼ) のDNA配列と一致するように合成され、かつ、50塩基対未満の連続した合成DNA、好ましくは25塩基対未満の連続した合成DNAを有しているものである。現在の指針によると、「25塩基対未満の完全に配列分析されたDNA配列を挿入する場合は宿主ベクター系を変性したとはみなさない」となっている。(アメリカ合衆国健康・教育・福祉省 (U.S. Department of Health, Education and Welfare)、公衆衛生局 (Public Health Service)、国立衛生研究所 (National Institute of Health) 「公認宿主 - ベクター系の変性 (Modification of Certified Host-Vector Systems)」、Recombinant-DNA Technical Bulletin 2 (3):132, 1979)

本発明の宿主株は任意の糸状菌であり、好ましくはアスペルギルス・オリゼである。糸状菌は真核微生物であり、真菌亜門のすべての糸状体を含む (アレクソポウロス (Alexopoulos), C.J., 1962年、菌類学入門 (Introductory Mycology)、ジョン ウィリー & サンズ (John Wiley & Sons) 社刊、ニューヨーク (New York))。発現宿主 (宿主株) としては、以下の属に含まれる種々の糸状菌を用いることができる：アスペルギルス属、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属、ニューロスポラ (*Neurospora*) 属、ポドスポラ (*Podospira*) 属、ムコール (*Mucor*) 属、アキヤ (*Achlya*) 属、シゾフィラム (*Schizophyllum*) 属、ウステイラゴ (*Ustilago*) 属およびコプリヌス (*Coprinus*) 属。特定の発現宿主としては、アスペルギルス・ニデュランス (*A. nidulans*)、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・アワモリ (*A. awamori*)、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・クラッサ (*A. crassa*)、トリコデルマ・レーセイ (*T. reesei*) (ロンゲブラキアトゥム (*longebrachiatum*)) およびトリコデルマ・ヴィリデ (*T. viride*) が挙げられる。望ましい宿主株については米国特許出願第07/413,010号、および第07/770,049号に記載されており、これらを参照として本明細書に取り入れる。

ここで使用しているように、プロモーターまたはプロモーター配列とは、発現目的のために特定の糸状菌宿主株によって認識されるDNA配列 (例えば、アスペルギルス・オリゼによって認識されるDNA配列) である。プロモーター配列は、所望するラクターゼ産物をコードしているDNA配列に作用的に連結している。そのような連結により、形質変換ベクターのシグナル配列をコードしているDNA配列の開始コドンに対してプロモーターは然るべき位置を占める。プロモーター配列は、シグナル配列および所望するラクターゼ産物の発現に関与している転写および翻訳制御配列を含む。該プロモーターの例としては、アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ由来のプロモーター、アスペルギルス・ニガーのアミラーゼプロモーター、およびその他当業者に知られているプロモーターが挙げられる。好ましいプロモーターは米国特許出願番号第07/413,010号に記載されているものであり、ここで参照として挙げておく。

シグナル配列はアミノ酸配列であり、これは、ラクターゼのアミノ末端に作用的に連結された場合に宿主株からのラクターゼの分泌を促すものである。そのようなシグナル配列は、ラクターゼに関連したシグナル配列 (すなわち、生来のシグナル配列) であるか、または他を起源とするもの (すなわち、外来性のシグナル配列) である。シグナル配列は、生来のシグナル配列を介して、または、外来性のシグナル配列をコードしているDNAを正しい読み枠内にラクターゼをコードしているDNAに結合することを介して、ラクターゼ

10

20

30

40

50

に作用的に連結し、シグナル配列およびラクターゼ産物の翻訳を行う。本発明で使用する好ましいシグナル配列は、アスペルギルス・オリゼ ラクターゼ由来の生来のシグナル配列であり、これは配列番号 4に示されている。該シグナル（または分泌）配列のアミノ酸配列は配列番号 3に示されている。

本明細書において開示されている好ましい実施態様は例示であり、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例

実施例 1

アスペルギルス・オリゼ株の確立

ラクターゼ産生に使用した株は、オランダの細菌培養中央研究所 (Centraal Bureau van Schimmelculture) を入手源とする CBS87972 の誘導体である。これは CCC28 と改名され、約 5 U/ml のラクターゼを産生する (1 U とは、FCC 標準ラクターゼ活性分析に記載されている条件下において、37 °C で ONPG から 1 分間に 1 μmol のニトロフェノールを放出する酵素量である)。図 1 に概略を示しているように、CCC28 を UV による突然変異にかけ、選択を行い、CCC161 株を得た (ATCC#74285 としてメリーランド州ロックヴィルにあるアメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection) に寄託している)。

培地

- 継代培養はポテトデキストロース寒天 (PDA) (ディフコ (Difco) 社製) 上で行った
- コロニーを単離するためには、対数増殖を防ぐ目的で PDA にデオキシコリン酸ナトリウム (180mg/ml) を添加して培養を行った (PDA Nadx)。

固体の産生培地

- ・小麦ふすま 50g
- ・寒天 (ディフコ (Difco) 社製) 17g
- ・水道水 1 : 1

液体の産生培地

- ・小麦ふすま 50g
- ・水道水 1 : 1

発芽用培地

- ・モルト抽出物 (ディフコ (Difco) 社製) 30g 30
- ・蒸留水 1 : 1

溶液 A : UV 突然変異を行うための分生子懸濁液を調製するためのものであり、液体培地に接種したもの

- ・トウイーン 80 (プロラボ (Prolabo) 社製) 1ml
- ・グリセロール (プロラボ (Prolabo) 社製) 150ml
- ・蒸留水 1 : 1

溶液 B : NTG 突然変異を行うための分生子懸濁液

- ・トウイーン 80 1ml
- ・モルト抽出物 30g
- ・蒸留水 1 : 1 40

溶液 C : NTG 突然変異用リンス液

- ・モルト抽出物 30mg
- ・グリセロール 150ml
- ・蒸留水 1 : 1

溶液 D : NTG 突然変異用処置液

- ・トウイーン 80 1ml
- ・TAPS (シグマ (Sigma) 社製) 0.1M
- ・蒸留水 1 : 1
- ・pH を 9 に調整

すべての培地および懸濁液は、グリセロールを含有するものを除き、120 °C で 20 分滅菌し 50

、グリセロールを含有するものは110 で30分滅菌した。

UV突然変異

溶液Aの分生子懸濁液は、約1～2週間経過して十分に芽胞形成しているPDAプレートから調製した。菌糸体断片を除去するためにデカンテーションを行った後、上清を採取した：4mlの該分生子懸濁液を小さいペトリ皿に移した。

この懸濁液を照射に用いた。ペトリ皿はフィリップス(Philips)社の殺菌灯(6W)の5cm下方に蓋を開けて置いた。照射時間は生存率が約1%となるように設定した。照射の間、該分生子懸濁液は均一になるように揺り動かした。

照射後、照射を受けた分生子懸濁液のサンプルを適切に希釈して培地上に塗布し、単離コロニーを得て生存率を確認した。残りの照射分生子は-20 の冷凍庫内に保存し、さらに

分析を行った。照射後は、光復帰系を阻害するため、全ての実験を暗黒下で行った。この結果、CCC159株が得られ、この株は固体培地上では最高18U/ml、液体培地内では3U/mlのラクターゼを産生した。続いてCCC159をNTG突然変異過程に供し、選択を行い、CCC161株を得たが、この株は液体培地内で最高50U/mlのラクターゼを産生することができた。NTG突然変異は以下のように実施した：

NTG突然変異

分生子懸濁液はUV突然変異用の溶液B(上記)の場合と同様に調製した。この懸濁液5mlを20mlの発芽培地を含むエーレンマイヤーフラスコに入れ、ロータリーシェーカー上で30、3時間インキュベートした。

分生子はジョウアン(JOUAN)ベンチ式遠心分離機C400を用いて4500rpmで15分間遠心分離することによりハーベストした。分生子を25mlの処置溶液D(上記)に再懸濁した。次に、8mlの分生子懸濁液を適量のNTG結晶を含むエーレンマイヤーフラスコに入れた。各々の実験において、2つの異なる量のNTGについて試験を行い、NTGを含まないものを対照とした。エーレンマイヤーフラスコはロータリーシェーカー上で1時間インキュベートした。次に、分生子を遠心分離により2回洗浄し、8mlのリンス溶液C(上記)に再懸濁した。最終懸濁液の一部をUV照射における場合と同様に生存率の確認に使用した。残りは-20 の冷凍庫内に保存し、さらに分析を行った。処理を行った分生子は適切な希釈を行ってPDA Nadx上に塗布した、30 で4日間インキュベートした後、コロニーを数えて生存率を確認した。生存率を確認した後、適切な量の処理分生子を希釈してPDA Nadx上に塗布し、ラクターゼ活性を調べるのに十分な量の生存細胞を得た。

突然変異を行った後、変異種から親種を分離するにはサブクロニング工程を経ることが必要である。このため、「変異」分生子懸濁液を適切に希釈して塗布し、単離コロニーを得るが、このとき、確実に一つのコロニーが一つの分生子から形成されるようにする。各々の変異に対して、100個のサブクローンについて固体培地上でラクターゼ活性を調べた。最も良いクローンをPDA培地上に再び取り出し、液体培地で試験を行った。

実施例2

アスペルギルス・オリゼ ラクターゼのクローニング

アスペルギルス・ニガー由来のラクターゼのcDNAは既知であり、報告されている(クマー(Kumer), V.ら、Bio/Technology 10:82-85,1992)。転写、翻訳および分泌に必要な配列を有するラクターゼ遺伝子を保持するのに十分な大きさのアスペルギルス・オリゼ CCC161の染色体のDNAの断片を同定するために、アスペルギルス・ニガーのDNAを鋳型として用い、アスペルギルス・ニガーの配列に基くPCRにより、プローブを作成した。これらのプローブを用いることにより、ラクターゼ遺伝子を含むアスペルギルス・オリゼの染色体DNA由来の9kbのBglII断片をサザンハイブリダイゼーションにより同定した(図2)。このサイズのクラスを含み、BglIIで切断された染色体DNAのサブゲノムライブラリーを、pUC218内で構築し、上述のプローブを用いて、ラクターゼ遺伝子を含む個々のクローン(pUC218::A.o.lac)をコロニーハイブリダイゼーションにより同定した。該断片の制限地図が得られ(図3)、遺伝子の配列は解析中である。該遺伝子の部分配列を図4(配列番号1)に示すが、ここには該遺伝子に存在するイントロンが含まれている。アスペルギルス・オリゼのラクターゼ遺伝子により発現されたタンパク質の部分推定ア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列は、配列番号 2として示している。

実施例 3

アスペルギルス・オリゼ pyrG のクローニング

アスペルギルス・オリゼの pyrG 遺伝子は、4 kb の BamHI 染色体断片上に存在することが知られている（デリオター - ヤコブス（deRieter-Jacobs）, Y.M.J.ら、Curr. Genet. 16: 159-163, 1989）。このことは、アスペルギルス・ニガールの DNA を鋳型として用い、アスペルギルス・ニガールの配列に基づく PCR により作成したプローブを使用して、BamHI で消化したアスペルギルス・オリゼの染色体 DNA にサザンハイブリダイゼーションを行うことにより確認した（図 5）。このサイズのクラスを含み、BglII で切断された染色体 DNA のサブゲノムライブラリーを pUC218 内で構築し、上述のプローブを用いて、pyrG 遺伝子を含む個々のクローン（pyrG11）をコロニーハイブリダイゼーションにより同定した。断片の制限地図はそれが本物であることを示している（図 6）。

10

実施例 4

pPyrLac4 の構築

上述の 2 つのプラスミド（pyrG11 および pUC218::A.o.lac）を用いて、以下の方法によりプラスミド pPyrLac4 を構築した（図 7）：

（1）pyrG11 を KpnI および BamHI で切断し、pyrG を含む断片を単離し、pUC19 を切断した KpnI および BamHI 部位にクローニングすることによりプラスミド pyrGKB を得た。このプラスミドはアスペルギルス・オリゼ pyrG 断片内にあるが、pyrG 遺伝子の外側に存在する唯一の BglII 部位を有する。

20

（2）pUC218::A.o.lac を BglII で消化し、ラクターゼ遺伝子を含むアスペルギルス・オリゼの断片を単離し、pyrGKB の唯一の BglII 部位にクローニングすることにより、プラスミド pPyrLac4 を得た。続いて pPyrLac4 を KpnI で切断し、アスペルギルス・オリゼ DNA のみからなり、pyrG とラクターゼ遺伝子とを含む 12kb の断片を切り出した（図 8）。この断片をアスペルギルス・オリゼの CCC161pyr6 の形質転換に使用し、ラクターゼの産生を増加させた。

実施例 5

アスペルギルス・オリゼ CCC161 の形質転換

本発明者らの産生株の形質転換に上述の DNA 断片を使用するため、CCC161 の pyrG 変異体を調製した。pyrG 変異体はマターン（Mattern, I.E.）らにより記載された方法（Mol. Gen. Genet. 210:460-461, 1987）を一部変更し、5 - フッ化オロト酸（5 - FOA）に耐性の変異体を選択し、続いて増殖にウリジンを必要とするコロニーをスクリーニングすることにより調製した。そのような変異体のうちのひとつである CCC161pyr6 を次の段階に用いた。

30

キャンベル（Campbell, E.I.）らの方法（Curr. Genet. 16:53-56, 1989）を一部変更し、上述の KpnI 断片を用いて CCC161pyr6 を形質転換した。PyrG 遺伝子を取り込み、増殖にもはやウリジンを必要としない形質転換体について、ラクターゼ産生能を調べた。ラクターゼ産生の増加をスクリーニングするにあたっては、X-gal（5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドール - D - ガラクトシド）指示プレート - これは大腸菌（E.Coli）における - ガラクトシダーゼ活性の確認に使用する標準法であり、以下および「高等細菌遺伝学（Advanced Bacterial Genetics）」（デーヴィス（Davis）, R.W.、ボトステイン（Botstein）, D.、およびロス（Roth）, J.R. 編、コールドスプリングハーバー研究所（Cold Spring Harbor Laboratory）刊、p.48、1980年）に記載されている - の培地を変更して用いた。

40

X-gal検出プレート1リットルあたりの量

NaNO ₃	6 g	
KCl	0.52 g	
KH ₂ PO ₄	1.52 g	
小麦粉	10 g	
トレース剤	1.0 ml	10

NaOHでpHを6.5に調整

バクト寒天 (Bacto-Agar) 20 g

オートクレーブにかける

次のものを添加 500mlあたり1.25mlの20%MgSO₄

500mlあたり500μlの抗生物質

最終濃度50μg/mlのX-gal (最終濃度1mMのIPTGを含有) 20

(283mgのIPTG+50mgのX-gal+2mlのDMF、溶液になるまで待った後8mlの滅菌水を加える。これで1リットルに十分な量である)

種々の濃度のグルコースを添加 (標準スクリーニング用は1%)

プレートに注ぐ

プレート上に細胞の大きな斑点をつくる

30℃または37℃で2~3日放置した後に色をチェックする 30

以下の表Iは、プレート培養および液体培養における第1回目の形質転換体のスクリーニングの結果を示している。

表 I
 形質転換結果
 宿主株：CCC161
 プラスミド：pPyrLac4
 振とうによる 14リットルあたりの

コロニー番号	U/ml	U/ml	青色
1	18	NT	-
2	56	NT	-
3	101	NT	-
4	405	890	+
5	80	NT	-
6	38	NT	-
7	44	NT	-
8	47	NT	-
9	114	NT	-
10	39	NT	-
11	21	NT	-
12	7	NT	-
13	51	NT	-
14	14	NT	-
15	28	NT	-
16	55	NT	-
17	207	NT	-
18	286	500	+
19	96	NT	-
21	648	750	+

NT = 未試験

振とうフラスコおよび14リットルの発酵器（ファーマンター）の両方を用いて試験を繰り返した結果、コロニー番号4が最も一貫したラクターゼ産生体であることがわかり、その量は振とうフラスコおよび14リットルのファーマンターの両方において500U/ml以上に達し、Lac4と命名した。ラベルしたラクターゼ遺伝子をBamHI切断した染色体DNAに対するプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションによりLac4を親株であるCCC161と比較すると、形質転換株においてはラクターゼ遺伝子のコピー数が増加していることが示された（図8）。pUC19のDNAをプローブとして用いた場合にはハイブリダイゼーションが起こらないことから、外来性DNAは存在しないことが示された。

配列リスト

(1) 一般情報

(i) 出願人：ジェネンコア インターナショナル (Genencor International, Inc.)

(ii) 発明の名称：アスペルギルス・オリゼにおける - ガラクトシダーゼの産生増加

(iii) 配列の数：4

(vi) 問い合わせ先：

(A) 名宛て人：ジェネンコア インターナショナル (Genencor International, Inc.)

(B) 通り名：180 キンボール通り (Kimball Way)

(C) 市名：南サンフランシスコ (South San Francisco)

(D) 州名：カリフォルニア

(E) 国名：アメリカ合衆国

- (F) 郵便番号 : 94080
- (v) コンピュータによる読みとり可能な形式 :
 - (A) 媒体の形式 : フロッピーディスク
 - (B) コンピューター : I B M P C コンパチブル
 - (C) 操作システム : P C - D O S / M S - D O S
 - (D) ソフトウェア : パテントイン リリース (PatentIn Release) # 1.0、バージョン # 1.25
- (vi) 出願データ :
 - (A) 出願番号 :
 - (B) 出願日 : 10
 - (C) 分類 :
- (viii) 代理人情報 :
 - (A) 氏名 : ホーン、マーガレット A (Horn, Mergaret)
 - (B) 登録番号 : 33,401
 - (C) 識別番号 : GC250 - PCT
- (ix) 電信情報 :
 - (A) 電話 : (415) 742 - 7536
 - (B) テレファクス : (415) 742 - 7217
- (2) 配列番号 1に関する情報 :
 - (i) 配列の特徴 : 20
 - (A) 長さ : 3515塩基対
 - (B) 種類 : 核酸
 - (C) 鎖 : 1本
 - (D) トポロジー : 直線状
 - (ii) 分子型 : D N A (ゲノム)
- (xi) 配列の記載 : 配列番号 1 :

CCCCATCTGA TTTGGATGTT AATGGTGCTT TGACCAGCCG TGGTCATTGT GGCTGGTTTG	60
TTTGTATACA GCTCCACGAC CTCTACATGA TGTTAAGATG AAATCGTACG GGACTIONACT	120
TTCGGCTAAG GACTCTATTG GACCATTCCC TCCTCTATAC ATCATCAACG CAAGGTGTCG	180
GACATTTTAA TTAACGAAGT CGGTTATTTT TGACTATTTA TCCTTTCAAT CTTACTTATA	240
TTCGTGCAAT TGCCCCGAA ACATGGGAAA TCTGCTGTAA GCTCTCACTG GGGTCTTCT	300
GCAGCACGGC ACCATGAAGC TCCTCTCTGT TGCTGCTGTT GCCTTGCTGG CGGCACAGGC	360
AGCGGGTGCT TCCATCAAGC ATCGTCTCAA TGGCTTCACG ATCCTGGAAC ATCCGGATCC	420
GGCGAAAAGA GACTTGCTGC AAGACATTGT ATGTCGTCAT CAAATCTGAA TCACTAGCTA	480
TGCTCCATAG TGATTATGTA AACATACTGA CCCTCTGCAG GTTACATGGG ATGACAAATC	540
TCTGTTTATC AATGGAGAGA GGATTATGTT ATTCAGCGGA GAAGTGCATC CTTTCAGGTA	600
CACTAGCCCC GCGTACTTTA TGGTTTAATT CTGATGAAAA CAGATTGCCA GTACCTTCGC	660
TTGGCTTGA TATCTCCAC AAGATCAGAG CTCTTGGTTT CAACTGTGTA TCTTTCTATA	720
TTGATTGGGC TCTTCTGGAG GGAAAGCCTG GCGACTACAG AGCAGAAGGC ATCTTTGCTC	780

10

20

TGGAACCCCTT CTTTGATGCA GCCAAGGAAG CAGGCATTTA TCTGATCGCC CGCCCCGGTT	840
CGTACATCAA TGCCGAGGTC TCAGGCGGTG GCTTCCCTGG ATGGTTGCAG AGGGTCAATG	900
GCACTCTTCG CTCGTCTGAT GAGCCATTCC TTAAAGCTAC TGATAAGTAT GGGCTCATTG	960
ATGAGCTACT TCAGACACTT GCTTACAGTG TGATTTTAGC TATATCGCCA ATGCCGCTGC	1020
TGCCGTGGCG AAGGCTCAAA TCACGAATGG AGGGCCAGTA ATTCTCTACC AGCCCCGAAA	1080
CGAATACAGC GGTGGCTGCT GCGGTGTCAA ATACACCGAT GCAGACTACA TGCAGTATGT	1140
TATGGATCAG GCCCGGAAGG CTGACATTGT TGTACCTTTC ATCAGCAACG ATGCCTCACC	1200
TTCTGGGCAC AATGCTCCTG GAAGTGAAC GGGCGCTGTT GATATTTATG GTCACGATAG	1260
CTATCCGTAA GTTATTCTGC ATATGAGCTC CTTTCTTTTA GAGATTTTCC GTTTGACGGC	1320
AACTGACATT TCCCTAGCCT CGGCTTTGAT TCGGTATGTT CTATCCTGCG AGCGAGATTG	1380
AATACTTCTG ACGTATATAG GCAAACCCAT CCGTATGGCC CGAGGGTAAA CTGCCCCACA	1440
ACTTCCGCAC GCTCCATCTT GAGCAGAGCC CATCGGCTCC GTATTCACTT CTTGAGGTAA	1500
GTTACTACTC AGCCTCGAGG ACTAGTAATG TGTCTCACTG TTTTCTAGTT CCAAGCGGGT	1560
GCTTTCGACC CATGGGGTGG ACCCGGCTTT GAAAAATGCT ATGCCCTCGT TAACCACGAA	1620
TTCTCGAGAG TTTTCTATAG GAACGACTTG AGTTTCGGAG TTTCTACCTT TAACTTATAC	1680
ATGGTATGGT CTATTCATAT CTCTGGAACA TACATCGCGC TGACAATATA TAGACTTTCG	1740
GCGGAACAAA CTGGGGTAAC CTCGGACATC CCGGTGGATA TACATCCTAC GACTACGGAT	1800
CGCCTATAAC TGAAACGCGA AACGTTACAC GGGAGAAGTA CAGCGACATA AAGCTCCTTG	1860
CCAACTTTGT CAAAGCATCG CCATCCTATC TCACCGCTAC TCCCAGAAAC CTGACTACTG	1920
GTGTTTACAC AGACACATCT GACCTGGCTG TCACCCCGTT AATTGGTGAT AGTCCAGGCT	1980
CATTCTTCGT GGTGAGACAT ACGGACTATT CCAGCCAAGA GTCAACCTCG TACAACTTA	2040
AGCTTCCTAC CAGTGCTGGT AACCTGACTA TTCCCCAGCT GGAGGGCACT CTAAGTCTCA	2100

10

20

30

40

ACGGACGTGA	CTCAAAAATT	CATGTTGTTG	ATTATAATGT	GTCTGGAACG	AACATTATCT	2160	
ATTGACAGC	TGAAGTCTTC	ACCTGGAAGA	AGTTTGACGG	TAACAAGGTC	CTGGTGTTAT	2220	
ACGGCGGACC	GAAGGAACAC	CATGAATTGG	CCATTGCCTC	CAAGTCAAAT	GTGACCATCA	2280	
TCGAAGGTTT	GGAAGTCTGA	ATTGTCTCAA	CGAGGAAGGG	CAGCTCTGTT	ATCATTGGCT	2340	
GGGATGTCTC	TTCTACTCGT	CGCATCGTTC	AAGTCGGTGA	CTTGAGAGTG	TTCCTGCTTG	2400	
GTAAGTAAAT	TCACAAGAAA	CTCGCGTTCA	CGACTAATGA	ATCCACAGAT	AGGAACTCTG	2460	10
CTTACAATA	CTGGGTCCCC	GAAGTCCCCA	CAGAAGGTAC	TTCTCCCGGG	TTCAGCACTT	2520	
CGAAGACGAC	CGCCTCCTCC	ATTATTGTGA	AGGCTGGCTA	CCTCCTCCGA	GGCGCTCACC	2580	
TTGATGGTGC	TGATCTTCAT	CTTACTGCTG	ATTTCAATGC	CACCACCCCG	ATTGAAGTGA	2640	
TCGGTGCTCC	AACAGGCGCT	AAGAATCTGT	TCGTGAATGG	TGAAAAGGCT	AGCCACACAG	2700	20
TCGACAAGAA	CGGCATCTGG	AGCAGTGAGG	TCAAGTACGC	GGCTCCAGAG	ATCAAGCTCC	2760	
CCGGTTTGAA	GGATTTGGAC	TGGAAGTATC	TGGACACGCT	TCCCGAAATT	AAGTCTTCCT	2820	
ATGATGACTC	GGCCTGGGTT	TCGGCAGACC	TTCCAAAGAC	AAAGAACACT	CACCGTCCTC	2880	
TTGACACACC	AACATCGCTA	TACTCCTCTG	ACTATGGCTT	CCACACTGGC	TACCTGATCT	2940	
ACAGGGGTCA	CTTCGTTGCC	AACGGTAAGG	AAAGCGAATT	TTTTATTTCGC	ACACAAGGCG	3000	30
GTAGCGCATT	CGGAAGTTCC	GTATGGCTGA	ACGAGACGTA	TCTGGGCTCT	TGGACTGGTC	3060	
CCGATTATAC	GATGGACGGT	AACTCTACCT	ACAAGCTATC	TCAGCTGGAG	TCGGGCAAGA	3120	
ATTACGTCAT	CACTGTGGTT	ATTGATAACC	TGGGTCTCGA	CGAGAATTGG	ACGGTCGGCG	3180	
AGGAAACCAT	GAAGAATCCT	CGTGGTATTC	TTAGCTACAA	GCTGAGCGGA	CAAGACGCCA	3240	
GCGCAATCAC	CTGGAAGCTC	ACTGGTAACC	TCGGAGGAGA	AGACTACCAG	GATAAGGTTA	3300	40
GAGGACCTCT	CAACGAAGGT	GGAAGTACG	CAGAGCGCCA	GGGTTTCCAT	CAGCCTCAGC	3360	
CTCCAAGCGA	CTCCTGGGAG	TCGGGCAGTC	CCCTGAAGG	GCTGTCCAAG	CCGGGTATCG	3420	
GATTCTACAC	TGCCCAGTTC	GACCTTGACC	TCCCGAAGGG	GTGGGATGTG	CCGCTGTACT	3480	
TCAACTTTGG	CAACAACACC	CAGGCGGCTC	GGGCC			3515	

(2) 配列番号 2に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ：911アミノ酸

(B) 種類：アミノ酸

(C) 鎖：1本

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子型：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列番号 2:

Met Lys Leu Leu Ser Val Ala Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Gln Ala

1 5 10 15

Ala Gly Ala Ser Ile Lys His Arg Leu Asn Gly Phe Thr Ile Leu Glu

20 25 30

10

His Pro Asp Pro Ala Lys Arg Asp Leu Leu Gln Asp Ile Val Thr Trp

35 40 45

Asp Asp Lys Ser Leu Phe Ile Asn Gly Glu Arg Ile Met Leu Phe Ser

50 55 60

Gly Glu Val His Pro Phe Arg Leu Pro Val Pro Ser Leu Trp Leu Asp

65 70 75 80

20

Ile Phe His Lys Ile Arg Ala Leu Gly Phe Asn Cys Val Ser Phe Tyr

85 90 95

Ile Asp Trp Ala Leu Leu Glu Gly Lys Pro Gly Asp Tyr Arg Ala Glu

100 105 110

Gly Ile Phe Ala Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ala Ala Lys Glu Ala Gly	
115	120 125
Ile Tyr Leu Ile Ala Arg Pro Gly Ser Tyr Ile Asn Ala Glu Val Ser	
130	135 140
Gly Gly Gly Phe Pro Gly Trp Leu Gln Arg Val Asn Gly Thr Leu Arg	
145	150 155 160
Ser Ser Asp Glu Pro Phe Leu Lys Ala Thr Asp Asn Tyr Ile Ala Asn	10
165	170 175
Ala Ala Ala Ala Val Ala Lys Ala Gln Ile Thr Asn Gly Gly Pro Val	
180	185 190
Ile Leu Tyr Gln Pro Glu Asn Glu Tyr Ser Gly Gly Cys Cys Gly Val	
195	200 205
Lys Tyr Thr Asp Ala Asp Tyr Met Gln Tyr Val Met Asp Gln Ala Arg	20
210	215 220
Lys Ala Asp Ile Val Val Pro Phe Ile Ser Asn Asp Ala Ser Pro Ser	
225	230 235 240
Gly His Asn Ala Pro Gly Ser Gly Thr Gly Ala Val Asp Ile Tyr Gly	
245	250 255
His Asp Ser Tyr Pro Leu Gly Phe Asp Cys Ala Asn Pro Ser Val Trp	
260	265 270
Pro Glu Gly Lys Leu Pro Asp Asn Phe Arg Thr Leu His Leu Glu Gln	30
275	280 285
Ser Pro Ser Ala Pro Tyr Ser Leu Leu Glu Phe Gln Ala Gly Ala Phe	
290	295 300
Asp Pro Trp Gly Gly Pro Gly Phe Glu Lys Cys Tyr Ala Leu Val Asn	
305	310 315 320
His Glu Phe Ser Arg Val Phe Tyr Arg Asn Asp Leu Ser Phe Gly Val	40
325	330 335

Ser Thr Phe Asn Leu Tyr Met Thr Phe Gly Gly Thr Asn Trp Gly Asn
 340 345 350

Leu Gly His Pro Gly Gly Tyr Thr Ser Tyr Asp Tyr Gly Ser Pro Ile
 355 360 365

Thr Glu Thr Arg Asn Val Thr Arg Glu Lys Tyr Ser Asp Ile Lys Leu
 370 375 380

Leu Ala Asn Phe Val Lys Ala Ser Pro Ser Tyr Leu Thr Ala Thr Pro
 385 390 395 400

10

Arg Asn Leu Thr Thr Gly Val Tyr Thr Asp Thr Ser Asp Leu Ala Val
 405 410 415

Thr Pro Leu Ile Gly Asp Ser Pro Gly Ser Phe Phe Val Val Arg His
 420 425 430

Thr Asp Tyr Ser Ser Gln Glu Ser Thr Ser Tyr Lys Leu Lys Leu Pro
 435 440 445

20

Thr Ser Ala Gly Asn Leu Thr Ile Pro Gln Leu Glu Gly Thr Leu Ser
 450 455 460

Leu Asn Gly Arg Asp Ser Lys Ile His Val Val Asp Tyr Asn Val Ser
 465 470 475 480

Gly Thr Asn Ile Ile Tyr Ser Thr Ala Glu Val Phe Thr Trp Lys Lys
 485 490 495

30

Phe Asp Gly Asn Lys Val Leu Val Leu Tyr Gly Gly Pro Lys Glu His
 500 505 510

His Glu Leu Ala Ile Ala Ser Lys Ser Asn Val Thr Ile Ile Glu Gly
 515 520 525

Ser Asp Ser Gly Ile Val Ser Thr Arg Lys Gly Ser Ser Val Ile Ile
 530 535 540

Gly Trp Asp Val Ser Ser Thr Arg Arg Ile Val Gln Val Gly Asp Leu
 545 550 555 560

40

Arg Val Phe Leu Leu Gly Lys Asn Ser Ala Tyr Asn Tyr Trp Val Pro
 565 570 575

Glu Leu Pro Thr Glu Gly Thr Ser Pro Gly Phe Ser Thr Ser Lys Thr
 580 585 590

Thr Ala Ser Ser Ile Ile Val Lys Ala Gly Tyr Leu Leu Arg Gly Ala
 595 600 605

His Leu Asp Gly Ala Asp Leu His Leu Thr Ala Asp Phe Asn Ala Thr
 610 615 620

Thr Pro Ile Glu Val Ile Gly Ala Pro Thr Gly Ala Lys Asn Leu Phe
 625 630 635 640

Val Asn Gly Glu Lys Ala Ser His Thr Val Asp Lys Asn Gly Ile Trp
 645 650 655

Ser Ser Glu Val Lys Tyr Ala Ala Pro Glu Ile Lys Leu Pro Gly Leu
 660 665 670

Lys Asp Leu Asp Trp Lys Tyr Leu Asp Thr Leu Pro Glu Ile Lys Ser
 675 680 685

Ser Tyr Asp Asp Ser Ala Trp Val Ser Ala Asp Leu Pro Lys Thr Lys
 690 695 700

Asn Thr His Arg Pro Leu Asp Thr Pro Thr Ser Leu Tyr Ser Ser Asp
 705 710 715 720

Tyr Gly Phe His Thr Gly Tyr Leu Ile Tyr Arg Gly His Phe Val Ala
 725 730 735

Asn Gly Lys Glu Ser Glu Phe Leu Ile Arg Thr Gln Gly Gly Ser Ala
 740 745 750

Phe Gly Ser Ser Val Trp Leu Asn Glu Thr Tyr Leu Gly Ser Trp Thr
 755 760 765

Gly Ala Asp Tyr Thr Met Asp Gly Asn Ser Thr Tyr Lys Leu Ser Gln
 770 775 780

Leu Glu Ser Gly Asn Tyr His Val Ile Thr Val Val Ile Asp Asn Leu
 785 790 795 800

Gly Leu Asp Glu Asn Trp Thr Val Gly Glu Glu Thr Met Lys Asn Pro
 805 810 815

10

20

30

40

Arg Gly Ile Leu Ser Tyr Lys Leu Ser Gly Gln Asp Ala Ser Ala Ile
 820 825 830

Thr Trp Lys Leu Thr Gly Asn Leu Gly Gly Glu Asp Tyr Gln Asp Lys
 835 840 845

Val Arg Gly Pro Leu Asn Glu Gly Gly Leu Tyr Ala Glu Arg Gln Gly
 850 855 860

Phe His Gln Pro Gln Pro Pro Ser Asp Ser Trp Glu Ser Gly Ser Pro
 865 870 875 880

Leu Glu Gly Leu Ser Lys Pro Gly Ile Gly Phe Tyr Thr Ala Gln Phe
 885 890 895

Asp Leu Asp Leu Pro Lys Arg Ala Glu Gly Pro Ser Ser Thr Ser
 900 905 910

(2) 配列番号 3に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 19アミノ酸

(B) 種類 : アミノ酸

(C) 鎖 : 1本

(D) トポロジー : 直線状

(ii) 分子型 : タンパク質

(xi) 配列の記載 : 配列番号 3 :

Met Lys Leu Leu Ser Val Ala Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Gln Ala
 1 5 10 15

Ala Gly Ala

(2) 配列番号 4に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 57塩基対

(B) 種類 : 核酸

(C) 鎖 : 1本

(D) トポロジー : 直線状

(ii) 分子型 : DNA (ゲノム)

(xi) 配列の記載 : 配列番号 4 :

ATGAAGCTCC TCTCTGTTGC TGCTGTTGCC TTGCTGGCGG CACAGGCAGC GGGTGCT

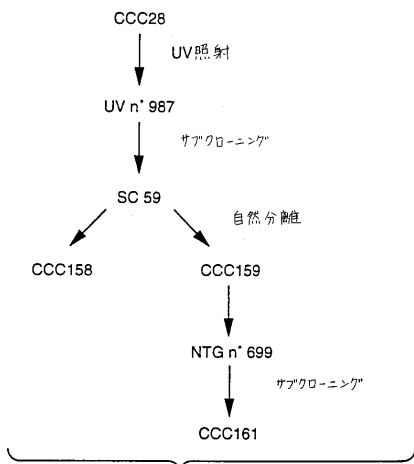
10

20

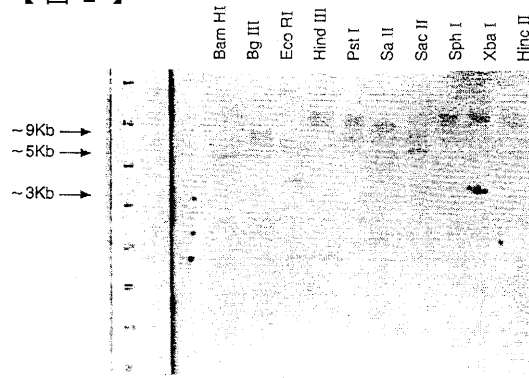
30

57

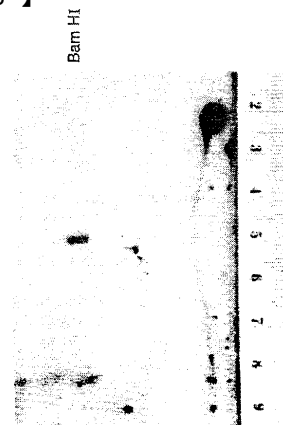
【 図 1 】
突然変異の系統図



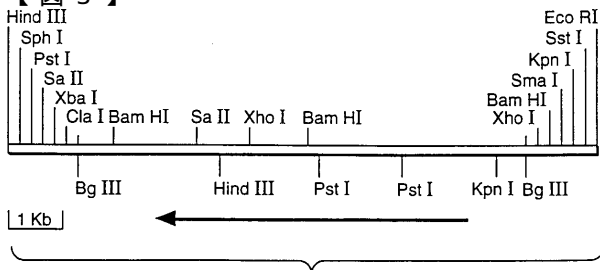
【 図 2 】



【 図 5 】



【 図 3 】



【 図 4 A 】

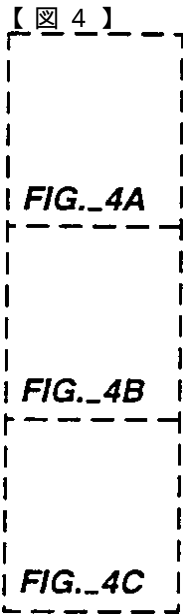
```

CCCCATCTGA TTTGGATGTT AATGGTGCTT TGACAGCCG TGGTCATTGT 50
GGCTGGTTTG TTTGTATACA GCTCCACGAC CTCTACATGA TGTAAAGATG 100
AAATCGTACG GGACTCCACT TTCGGCTAAG GACTCTATTG GACCATTCCC 150
TCCTCTATAC ATCATCAACG CAAGGTGTCG GACATTTTAA TTAACGAAGT 200
CGGTATTATT TGACTATTTA ATTCAGTCAAT CTTACTTATA TTCGTGCAAT 250
TGCCCCCGAA ACATGGGAAA TCTGCTGTAA GCTCTCACTG GGGTCTTCT 300
GCAGCACGGC ACCATGAAGC TCCTCTCTGT TGCTGCTGTT GCCTTGCTGG 350
CGGCACAGGC AGCGGGTGTCT TCCATCAAGC ATCGTCTCAA TGGCTTCACG 400
ATCCTGGAAC ATCCGATCC GCGGAAAAGA GACTTGCTGC AAGACATTGT 450
ATGTCGTCAT CAAATCTGAA TCACTAGCTA TGCTCCATAG TGATTATGTA 500
AACATACTGA CCCTCTGCAG GTTACATGGG ATGACAAATC TCTGTTCATC 550
AATGGAGAGA GGATTATGTT ATTCAGCGGA GAAGTGCAAT CTTTCAGGTA 600
CACTAGCCCC GCGTACTTTA TGGTTTAATT CTGATGAAAA CAGATTGCCA 650
GTACTTTCGC TTTGGTTGA TATCTTCCAC AAGATCAGAG CTCTTGGTFT 700
CAACTGTGTA TCTTTCTATA TTGATTGGGC TCTTCTGGAG GGAAGCCTG 750
GCGACTACAG AGCAGAAGGC ATCTTTGCTC TGGAAACCCTT CTTTGTATGCA 800
GCCAAGGAAG CAGCATTTA TCTGATCGCC GCGCCCGTTC CGTACATCAA 850
TGCCGAGGTC TCAGGCGGTG GCTTCCCTGG ATGTTGTCAG AGGGTCAATG 900
GCACCTCTCG CTCGCTGAT GAGCCATTCC TTAAGCTAC TGATAAGTAT 950
GGGCTCATTT ATGAGCTACT TCAGACACTT GCTTACAGTG TGATTTTAGC 1000
TATATCGCCA ATGCCGCTGC TGCCGTGGCG AAGGCTCAAA TCACGAATGG 1050
AGGGCCAGTA ATTCTCTACC AGCCCCGAAA CGAATACAGC GGTGGCTGCT 1100
GCGGTGTCAA ATACACCCAT CGAGACTACA TGCAGTATGT TATGGATCAG 1150
GCCCCGAAGG CTGACATTGT TGTACCTTTC ATCAGCAACG ATGCCTCACC 1200
TTCTGGGCAC AATGCTCTCG GAAGTGAAC GGGCGCTGTT GATATTTATG 1250
GTCACGATAG CTATCCGTAA GTTATTCTGC ATATGAGCTC CTTTCTTTTA 1300
GAGATTTTCC GTTTGACGGC AACTGACATT TCCCTAGCCT CGGCTTTGAT 1350
TGCTATGTTT CTATCTCTGC AGCGAGATT AACTACTCTG ACGTATATAG 1400
GCAAACCCAT CCGTATGGCC CGAGGGTAAA CTGCCGACA ACTTCCGCAC 1450
GCTCCATCTT GAGCAGAGCC CATCGGCTCC GTATTCACTT CTTGAGTTAA 1500
GTTACTACTC AGCCTCGAG ACTAGTAATG TGCTCTCACT TTTTCTAGTT 1550
CAAAGCGGTT
  
```

【 図 4 B 】

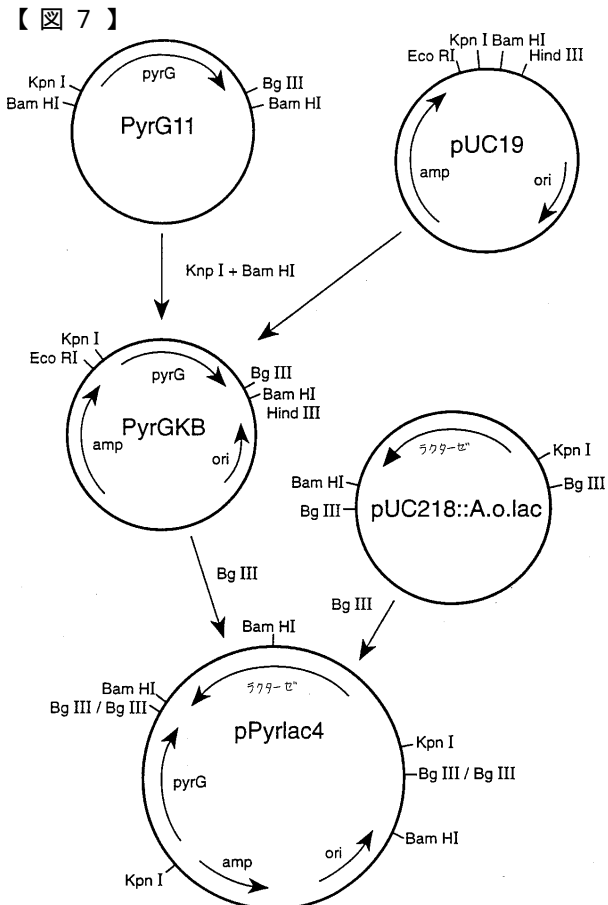
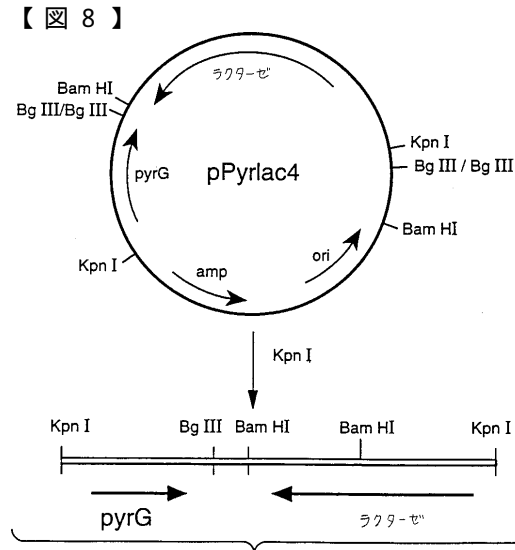
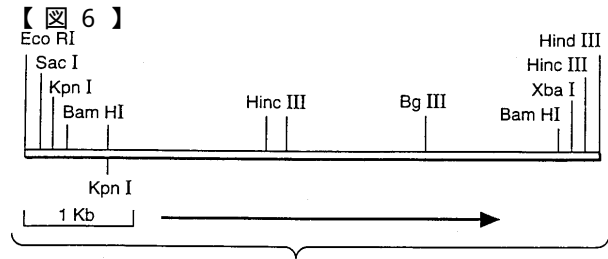
```

GCTTTCGACC CATGGGGTGG ACCCGGCTTT GAAAAATGCT ATGCCCTCGT 1610
TAACCACGAA TTCTCGAGAG TTTTCTATAG GAACGACTTG AGTTTCGGAG 1660
TTTCTACCTT TAACCTATAC ATGCTATGGT CTATTCATAT CTCTGGAAACA 1710
TACATCGCGC TGACAATATA TAGACTTTCC GCGGAAACAA CTGGGGTAAAC 1760
CTCGGACATC CCGGTGGATA TACATCCCTAC GACTACGGAT CGCCTATAAC 1810
TGAAACCGCA AACGTTACAC GGGAGAAGTA CAGCGACATA AAGCTCCTTG 1860
CCAACCTTGT CAAAGCATCG CCATCCTATC TCACCCTAC TCCAGAAAC 1910
CTGACTACTG GTGTTTACAC AGACACATCT GACCTGGCTG TCACCCCGTT 1960
AATTTGGTAT AGTCCAGGCT CATTCTTCGT GGTCCAGCAT ACGGACTATT 2010
CCAGCCAAGA GTCAACCTCG TACAACTTA AGTTCCTAC CAGTGTCTGT 2060
AACCTGACTA TTCCCAGCT GGAGGCGACT CTAAGTCTCA ACGGACGTGA 2110
CTCAAAAATT CATGTTGTTG ATTATAATG GTCTGGACCG AACATTATCT 2160
ATTCGACAGC TGAAGTCTTC ACCTGGAAGA AGTTTGACGG TAACAAGGTC 2210
CTGGTGTAT ACGGCGGACC GAAGGAACAC CATGAATTGG CCATTGCTC 2260
CAAGTCAAAT GTGACCATCA TCGAAGGTTG GGACTCTGGA ATTTGCTCAA 2310
CGAGGAAGGG CAGCTCTGTT ATCATTGGCT GGGATGTCTC TTCTACTCGT 2360
CGCATCGTTC AAGTCGGTGA CTTGAGAGTG TTCTGCTTGG GTAACTAAAT 2410
TCACAAGAAA CTCGCTTCA CGACTAATGA ATCCACAGAG ATCAAGCTCTG 2460
CTTACAATA CTGGGTCCCC GAACTCCCCA CAGAAGGTAC TTCTCCGGG 2510
TTGAGCATT CGAAGACGAC CGCCTCCTCC ATTATTGPGA AGGCTGGCTA 2560
CCTCCTCCGA GCGCTCACC TTGATGGTGC TGATCTTCACT CTTACTGCTG 2610
ATTTCAATGC CACCACCCCG ATTGAAGTGA TCGGTGCTCC AACAGGCGCT 2660
AAGAATCTGT TCGTGAATGG TGAAAAGGCT AGCCACACAG TCGCAAGAA 2710
CGGCATCTGG AGCAGTGGAG TCAAGTACGC GGCTCCAGAG ATCAAGCTCC 2760
CCGTTTGAAG GGATTTGGAC TGGAAATATC TGGACACGCT TCCGAAAT 2810
AAGTCTTCTC ATGATGACTC GGCTGGGTT TCGGCAGACC TTCCAAAGAC 2860
AAAGAACACT CACCGTCTC TTGACACACC AACATCGCTA TACTCTCTG 2910
ACTATGGCTT CCACACTGGC TACCTGATCT ACAGGGGTCA CTTCTGTTCC 2960
AACGGTAAAG AAAGCGAATT TTTTATTCTG ACACAAGGCG GTAGCGCAT 3010
CGGAAGTTCC GTATGGCTGA ACGAGACGTA TCTGGGCTCT TGGACTGGTC 3060
CCGATTATAC GATGGACGGT AACTCTACCT ACAAGCTATC TCAGCTGGAG 3110
TCGGGCAAGA ATTACGTCAT CACTGTGGTT ATTGATAACC TGGGTCTCGA 3160
CGAAGTGG ACGGTCGGG
  
```



【 4 C 】

AGGAAACCAT GAAGAATCCT CGTGGTATTC TTAGCTACAA GCTGAGCGGA	3230
CAAGACGCCA GCGCAATCAC CTGGAAGCTC ACTGTAACC TCGGAGGAGA	3280
AGACTACCAG GATAAGGTTA GAGGACCTCT CAACGAAGGT GGACTGTACG	3330
CAGAGCGCCA GGGTTTCCAT CAGCCTCAGC CTCCTGGGAG	3380
TCGGGCAGTC CCCTTGAAGG GCTGTCGAAG CCGGGTATCG GATTCTACAC	3430
TGCCCAGTTC GACCTTGACC TCCCGAAGGG GTGGGATGTG CCGCTGTACT	3480
TCAACTTTGG CAACAACACC CAGGCGGCTC GGGCC	3515



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 9/38
C 1 2 R 1:69

(72)発明者 ハカル, ジョン エイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 8 0 サウス サン フランシスコ キンボル ウェ
イ 1 8 0 ジェネンコア インターナショナル インコーポレーテッド内

(72)発明者 ワード, マイケル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 8 0 サウス サン フランシスコ キンボル ウェ
イ 1 8 0 ジェネンコア インターナショナル インコーポレーテッド内

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第90/010703(WO, A1)
米国特許第03919049(US, A)
特開平06-022749(JP, A)
特開昭62-065694(JP, A)
Bio/Technology, 1992, Vol.10, p.82-85
Curr. Genet., 1989, Vol.16, p.159-163

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90