

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4194750号
(P4194750)

(45) 発行日 平成20年12月10日 (2008.12.10)

(24) 登録日 平成20年10月3日 (2008.10.3)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 2 3 K 1/165 (2006.01)	A 2 3 K 1/165 C
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
請求項の数 85 (全 27 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2000-509297 (P2000-509297)	(73) 特許権者	500061442
(86) (22) 出願日	平成10年8月13日 (1998.8.13)		ヴェレニウム コーポレーション
(65) 公表番号	特表2001-514869 (P2001-514869A)		アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォル
(43) 公表日	平成13年9月18日 (2001.9.18)		ニア州, サンディエゴ, ディレクターズ
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/016728		プレイス 4 9 5 5
(87) 国際公開番号	W01999/008539	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成11年2月25日 (1999.2.25)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成13年10月10日 (2001.10.10)	(74) 代理人	100096183
(31) 優先権主張番号	08/910,798		弁理士 石井 貞次
(32) 優先日	平成9年8月13日 (1997.8.13)	(74) 代理人	100118773
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 藤田 節
前置審査		(74) 代理人	100120905
			弁理士 深見 伸子
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 新規なフィターゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列、
 (b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列の 1 位から 4 3 2 位までの配列、
 (c) (a) または (b) に示すアミノ酸配列のうち、リーダー配列を含まない配列、
 (d) (a)、(b) または (c) に示すアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸の欠失、置換もしくは付加を有するアミノ酸配列、
 (e) (a)、(b)、(c) または (d) に示すアミノ酸配列およびシグナル配列および／または非フィターゼ異種アミノ酸配列
 より成る群から選択されるアミノ酸配列を有し、かつフィターゼ活性を有する単離された
 または組換えのフィターゼ。

10

【請求項 2】

(a) 請求項 1 記載のフィターゼをコードする配列、または
 (b) (a) に対し相補的な配列
 を含む、単離されたまたは組換えのポリヌクレオチド。

【請求項 3】

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列、
 (b) 配列番号 1 に示す塩基配列の 1 位から 1 2 9 6 位までの配列、
 (c) T が U で置換されていてもよい配列番号 1 に示す塩基配列、および
 (d) T が U で置換されていてもよい配列番号 1 に示す配列の 1 位から 1 2 9 6 位までの

20

配列、

(e) (a)、(b)、(c)または(d)に示す配列のうち、リーダー配列をコードしない配列、

(f) (a)、(b)、(c)、(d)または(e)に対し相補的な配列、

(g) (a)、(b)、(c)、(d)または(e)に示す配列に対し相補的な配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつフィターゼ活性を有するポリペプチドをコードする配列、

(h) (a)、(b)、(c)、(d)または(e)に示す塩基配列において、1もしくは数個の塩基の欠失、置換もしくは付加を有し、かつフィターゼ活性を有するポリペプチドをコードする配列、

(i) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)または(h)に示す配列およびシグナル配列および／または非フィターゼ異種配列

より成る群から選択される配列を有する、単離されたまたは組換えのポリヌクレオチド。

【請求項4】

ポリヌクレオチドが原核生物から単離されたものである、請求項2または3記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】

請求項2または3記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項6】

ベクターが発現ベクターであるかまたはプラスミドを含むものである、請求項5記載のベクター。

【請求項7】

ベクターがウイルス由来の配列を含むものである、請求項5記載のベクター。

【請求項8】

請求項5記載のベクターまたは請求項2もしくは3記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項9】

細胞が原核生物である、請求項8記載の宿主細胞。

【請求項10】

請求項1記載の単離されたまたは組換えのフィターゼに結合する抗体。

【請求項11】

抗体がポリクローナルである、請求項10記載の抗体。

【請求項12】

抗体がモノクローナルである、請求項10記載の抗体。

【請求項13】

ポリヌクレオチドの発現が可能な条件下で請求項8記載の宿主細胞を培養し、該ポリヌクレオチドによってコードされている酵素を単離することを含む、酵素の産生方法。

【請求項14】

有効量の請求項1記載のフィターゼ、または請求項2もしくは3記載のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質とフィチン酸とを接触させることを含む、フィチン酸の分解方法。

【請求項15】

有効量の請求項1記載のフィターゼ、または請求項2もしくは3記載のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質とフィチン酸とを接触させて、フィチン酸中のホスホ-モノ-エステル結合を加水分解することを含む、ホスホ-モノ-エステル結合の加水分解方法。

【請求項16】

請求項1記載のフィターゼ、または請求項2もしくは3記載のポリヌクレオチドによってコードされる、フィターゼ活性を有するタンパク質を含む動物用飼料組成物。

【請求項17】

10

20

30

40

50

フィターゼが配列番号 2 に示すアミノ酸配列、または配列番号 2 に示すアミノ酸配列の 1 位から 4 3 2 位までの配列を有するものである、請求項 1 6 記載の動物用飼料組成物。

【請求項 1 8】

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列、または配列番号 2 に示すアミノ酸配列の 1 位から 4 3 2 位までのアミノ酸配列を含む酵素をコードするポリヌクレオチド、

(b) (a) のポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチド、

(c) (a) に示す酵素をコードするポリヌクレオチドのうち、リーダー配列をコードしないポリヌクレオチド、

(d) (a) のポリヌクレオチドに対し相補的な配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつフィターゼ活性を有するポリペプチド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、または配列番号 2 に示すアミノ酸配列の 1 位から 4 3 2 位までのアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸の欠失、置換もしくは付加を有するアミノ酸配列からなり、かつフィターゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(f) (a)、(b)、(c)、(d) または (e) に示すポリヌクレオチドおよび非フィターゼ異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド

より成る群から選択される、単離されたまたは組換えのポリヌクレオチド。

【請求項 1 9】

抗体が検出可能な標識を含む、請求項 1 0、1 1 または 1 2 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 2 0】

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列、または配列番号 2 に示すアミノ酸配列の 1 位から 4 3 2 位までの配列を含む酵素、

(b) 少なくとも 1 つの保存性アミノ酸置換を有する、配列番号 2 に示すアミノ酸配列、または配列番号 2 に示すアミノ酸配列の 1 位から 4 3 2 位までの配列を含み、かつフィターゼ活性を有する酵素、

(c) (a) または (b) に示す酵素のうち、リーダー配列を含まず、フィターゼ活性を有する酵素、

(d) (a)、(b) または (c) に示すアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸の欠失、置換もしくは付加を有するアミノ酸配列を含み、かつフィターゼ活性を有する酵素、

(e) (a)、(b)、(c) または (d) に示すアミノ酸配列および非フィターゼ異種アミノ酸配列を含むポリペプチド、

(f) (a)、(b)、(c) または (d) の酵素の少なくとも 3 0 個の連続したアミノ酸残基を含み、かつフィターゼ活性を有するポリペプチド、

(g) (a)、(b)、(c) または (d) の酵素の少なくとも 3 0 個の連続したアミノ酸残基を含み、かつフィターゼ特異的抗体の作製に用いることができる抗原を含むポリペプチド

を含む単離されたまたは組換えのポリペプチド。

【請求項 2 1】

検出可能な標識が、放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤、または酵素より成る群から選択される、請求項 1 9 記載の抗体。

【請求項 2 2】

フィターゼがリーダー配列を含まないものである、請求項 1 6 記載の動物用飼料組成物。

【請求項 2 3】

以下のステップ：

(a) 請求項 2 または 3 に記載の配列を有する核酸を準備するステップ；

(b) 飼料を含む組成物を準備するステップ；

(c) 該フィターゼの発現が可能な条件下で該核酸を発現させるステップ；

(d) 前記(c)のフィターゼを(b)の組成物と混合し、フィターゼを含む飼料を調製するステップ；

を含む方法によって調製されるフィターゼを含む飼料。

【請求項24】

核酸がin vitroで発現される、請求項23記載の飼料。

【請求項25】

核酸が細胞で発現される、請求項23記載の飼料。

【請求項26】

細胞が原核細胞または真核細胞である、請求項25記載の飼料。

【請求項27】

細胞が細菌細胞、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、真菌細胞または動物細胞である、請求項25記載の飼料。

【請求項28】

酵母細胞がサッカロミセス属に属するものである、請求項27記載の飼料。

【請求項29】

酵母細胞がサッカロミセス・セレビシエである、請求項28記載の飼料。

【請求項30】

細菌が大腸菌である、請求項27記載の飼料。

【請求項31】

細菌がストレプトマイセス属またはバチルス属に属するものである、請求項27記載の飼料。

【請求項32】

細菌がバチルス・ズブチリスである、請求項31記載の飼料。

【請求項33】

真菌細胞がアスペルギルス属に属するものである、請求項27記載の飼料。

【請求項34】

真菌細胞がアスペルギルス・テラス(Aspergillus terreus)またはアスペルギルス・フィカム(Aspergillus ficum)である、請求項33記載の飼料。

【請求項35】

核酸がクローニング手段を含む、請求項23記載の飼料。

【請求項36】

クローニング手段がベクター、プラスミドまたはファージである、請求項35記載の飼料。

【請求項37】

ポリペプチドがシグナルポリペプチドまたは非フィターゼ異種アミノ酸配列を含む、請求項23記載の飼料。

【請求項38】

請求項2または3に記載のポリヌクレオチドによってコードされる組換えフィターゼを含む飼料。

【請求項39】

フィターゼがシグナルポリペプチドまたは非フィターゼ異種アミノ酸配列を含む、請求項38記載の飼料。

【請求項40】

飼料中のフィチン酸含量を低減するようにフィチン酸含有飼料を処理し、飼料中の無機リン酸含量を増加させる方法であって、以下のステップ：

(a) 請求項2または3に記載のポリヌクレオチドによってコードされる組換えフィターゼを準備するステップ；

(b) フィチン酸含有飼料を含む組成物を準備するステップ；

(c) 前記(a)のフィターゼと前記(b)の組成物を、該フィターゼがフィチン酸の加水分解を触媒する条件下で接触させ、それによってフィチン酸含量が低く、無機リン酸含

10

20

30

40

50

量が高い飼料を調製するステップ；
を含む、前記方法。

【請求項 4 1】

組換えフィターゼがシグナルポリペプチドまたは非フィターゼ異種アミノ酸配列を含む、請求項 4 0 記載の方法。

【請求項 4 2】

摂取食物中の無機リン酸量を増加させることによって動物の食餌を栄養補助する方法であって、動物に請求項 2 または 3 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる組換えフィターゼを含む組成物を与えることを含むものである、前記方法。

【請求項 4 3】

フィターゼがシグナルポリペプチドまたは非フィターゼ異種アミノ酸配列を含む、請求項 4 2 記載の方法。

【請求項 4 4】

請求項 2 または 3 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる組換えフィターゼを含む栄養補助食品。

【請求項 4 5】

フィターゼがシグナルポリペプチドまたは非フィターゼ異種アミノ酸配列を含む、請求項 4 4 記載の栄養補助食品。

【請求項 4 6】

請求項 2 または 3 に記載の配列を有する核酸を準備するステップ；
酵素の発現が可能な条件下で該核酸を発現させるステップ；
を含むフィターゼの調製方法。

【請求項 4 7】

請求項 2 または 3 に記載の配列を有する核酸を準備するステップ；
酵素の発現が可能な条件下で該核酸を発現させるステップ；
を含むフィターゼの調製方法。

【請求項 4 8】

請求項 4 6 または 4 7 記載の方法によって調製された組換えにより生成したフィターゼ。

【請求項 4 9】

請求項 4 6 または 4 7 記載の方法によって調製されたフィターゼを含む食品または飼料。

【請求項 5 0】

さらに、発現されたフィターゼを単離することを含む、請求項 4 6 または 4 7 記載の方法。

【請求項 5 1】

核酸が細胞溶解物またはその等価物で発現されるものである、請求項 4 6 または 4 7 記載の方法。

【請求項 5 2】

核酸が細胞で発現されるものである、請求項 4 6 または 4 7 記載の方法。

【請求項 5 3】

細胞が原核細胞または真核細胞である、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 4】

細胞が細菌細胞、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、真菌細胞または動物細胞である、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 5】

酵母細胞がサッカロミセス属に属するものである、請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 5 6】

酵母細胞がサッカロミセス・セレビシエである、請求項 5 5 記載の方法。

【請求項 5 7】

10

20

30

40

50

細菌が大腸菌である、請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 5 8】

細菌がストレプトマイセス属またはバチルス属に属するものである、請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 5 9】

細菌がバチルス・ズブチリスである、請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 0】

真菌細胞がアスペルギルス属に属するものである、請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 6 1】

真菌細胞がアスペルギルス・テラス (*Aspergillus terrus*) またはアスペルギルス・フィカム (*Aspergillus ficcum*) である、請求項 6 0 記載の方法。 10

【請求項 6 2】

核酸がクローニング手段を含む、請求項 4 6 または 4 7 記載の方法。

【請求項 6 3】

クローニング手段が、ベクター、プラスミドまたはファージである、請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 6 4】

ポリペプチドがシグナルポリペプチドまたは非フィターゼ異種アミノ酸配列を含む、請求項 4 6 または 4 7 記載の方法。

【請求項 6 5】

20

以下のステップ：

(a) 請求項 2 または 3 に記載の配列を有する核酸を準備するステップ；

(b) 飼料を含む組成物を準備するステップ；

(c) フィターゼの発現が可能な条件下で核酸を発現させるステップ；

(d) 前記 (c) のフィターゼを (b) の組成物と混合し、フィターゼを含む飼料を調製するステップ；

を含む方法によって調製されるフィターゼを含む飼料。

【請求項 6 6】

核酸が *in vitro* で発現される、請求項 6 5 記載の飼料。

【請求項 6 7】

30

核酸が細胞で発現される、請求項 6 5 記載の飼料。

【請求項 6 8】

核酸が、酵母細胞における酵素の発現が可能な条件下で、酵母細胞で発現させたものである、請求項 6 7 記載の飼料。

【請求項 6 9】

フィターゼがシグナルポリペプチドまたは非フィターゼ異種アミノ酸配列を含む、請求項 6 5 記載の飼料。

【請求項 7 0】

請求項 2 または 3 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる組換えフィターゼを含む飼料。 40

【請求項 7 1】

飼料中のフィチン酸含量を低減するようにフィチン酸含有飼料を処理し、飼料中の無機リン酸含量を増加させる方法であって、以下のステップ：

(a) 請求項 2 または 3 に記載の配列を有する核酸を準備するステップ；

(b) フィチン酸含有飼料を含む組成物を準備するステップ；

(c) 前記 (a) のフィターゼと (b) の組成物を、該フィターゼがフィチン酸の加水分解を触媒する条件下で接触させ、それによってフィチン酸含量が低く無機リン酸含量が高い飼料を調製するステップ；

を含む前記方法。

【請求項 7 2】

50

フィターゼがシグナルポリペプチドまたは非フィターゼ異種アミノ酸配列を含む、請求項 7 1 記載の方法。

【請求項 7 3】

摂取食物中の無機リン酸の量を増加させることによって動物の食餌を栄養補助する方法であって、請求項 2 または 3 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる組換えフィターゼを含む組成物を動物に与えることを含むものである、前記方法。

【請求項 7 4】

フィターゼがシグナルポリペプチドまたは非フィターゼ異種アミノ酸配列を含む、請求項 7 3 記載の方法。

【請求項 7 5】

請求項 2 または 3 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる組換えフィターゼを含む組成物を含む栄養補助食品。

【請求項 7 6】

フィターゼがシグナルポリペプチドまたは非フィターゼ異種アミノ酸配列を含む、請求項 7 5 記載の栄養補助食品。

【請求項 7 7】

フィターゼをグリコシル化できる細胞内で請求項 2 または 3 に記載の配列を有する核酸を発現させることを含む、フィターゼをグリコシル化する方法。

【請求項 7 8】

in vitro でフィターゼをグリコシル化することを含む、請求項 2 または 3 に記載のポリヌクレオチドによってコードされるフィターゼをグリコシル化する方法。

【請求項 7 9】

細胞が、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、真菌細胞または動物細胞である、請求項 7 7 または 7 8 記載の方法。

【請求項 8 0】

酵母細胞がサッカロミセス属に属するものである、請求項 7 9 記載の方法。

【請求項 8 1】

酵母細胞がサッカロミセス・セレビシエである、請求項 8 0 記載の方法。

【請求項 8 2】

フィターゼがシグナルポリペプチドまたは非フィターゼ異種アミノ酸配列を含む、請求項 7 7 または 7 8 記載の方法。

【請求項 8 3】

請求項 7 7 または 7 8 記載の方法によって得られるグリコシル化フィターゼ。

【請求項 8 4】

組換えフィターゼの製造方法であって、以下のステップ：

(a) 請求項 1 (c) に記載の、フィターゼ活性を有するがリーダー配列を含まないポリペプチドをコードする核酸を提供するステップ、

(b) (a) に異種核酸配列を付加するステップであって、得られる融合核酸が融合タンパク質をコードするものである、上記ステップ、

(c) (b) の融合核酸を宿主細胞に導入し、融合タンパク質を発現させるステップを含む前記方法。

【請求項 8 5】

異種配列がリーダー配列をコードする、請求項 8 4 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、新たに同定されたポリヌクレオチド、そのようなポリヌクレオチドによりコードされているポリペプチド、そのようなポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用、ならびにそのようなポリヌクレオチドおよびポリペプチドの生産および単離に係る。より具体的には、本発明のポリペプチドは、フィターゼ、特にフィターゼ活性を有する酵素とし

10

20

30

40

50

て同定された。

【0002】

背景

ミネラルはすべての生物の成長に欠かせない元素である。胃が1つの動物（たとえば、豚、家禽）および魚の畜産では一般に飼料にミネラルが加えられる。植物の種子は、フィチン酸のリン酸基と錯体化したイオンを含有するので、ミネラルの豊富な供給源である。反芻動物は無機リン酸およびミネラルを必要としない。というのは、ルーメン（第一胃）内の微生物が、フィチン酸（phytate；すなわち、myo-イノシトール六リン酸）からイノシトールと無機リン酸への変換を触媒する酵素を産生するからである。このプロセスではフィチン酸と錯体化したミネラルが放出される。

10

【0003】

フィチン酸はほとんどすべての植物種子で貯蔵リン源として存在している [Phytic Acid, Chemistry and Applications, E. Graf (Ed.), Pilatus Press: Minneapolis, MN, U.S.A., 1986]。フィチン酸は、穀類や豆類で種子の正常な一部を構成しており、種子から発芽する際の新しい植物にとって欠かせない食餌ミネラルと結合する機能を果たす。フィチン酸のリン酸基が種子の酵素フィターゼによって除去されると、金属イオンと結合する能力が失われ、ミネラルが植物に利用可能になる。家畜の飼料としての穀粒の場合、フィチン酸に結合した微量のミネラルは、フィターゼ活性を欠く一胃動物による吸収には部分的にのみ利用可能である。結腸でフィチン酸の加水分解が多少生起するが、ほとんどのフィチン酸は一胃動物の胃腸管を通過し、糞内に排泄されて家畜の集約生産分野で糞のリン酸汚染問題を引き起こす。無機リンは、小腸でしか吸収されないので結腸内に放出される無機リンは家畜にとって栄養価がない。したがって、栄養的に重要な食餌ミネラルのかなりの量が一胃動物には利用できない可能性がある。

20

【0004】

フィチン酸からイノシトールと無機リン酸への変換は、広くフィターゼといわれる微生物酵素によって触媒することができる。フィターゼ# EC 3. 1. 3. 8 のようなフィターゼは、myo-イノシトール六リン酸から D-myoinositol 1, 2, 4, 5, 6-pentakisphosphate と正リン酸への加水分解を触媒することができる。ある種の菌類フィターゼはイノシトール五リン酸を四リン酸、三リン酸、およびさらに下級のリン酸へ加水分解すると報告されている。たとえば、*A. ficuum* フィターゼは myoinositol 二リン酸と一リン酸の混合物を生成することが報告されている (Ullah, 1988)。フィターゼを産生する微生物は、*Bacillus subtilis* (V.K. Powar and V.J. Jagannathan, J. Bacteriol. 151:1102-1108, 1982) および *Pseudomonas* (D.J. Cosgrove, Austral. J. Biol. Sci. 2:1207-1220, 1970) のような細菌、*Saccharomyces cerevisiae* のような酵母 (N.R. Nayini and P. Markakis, Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 17:24-26, 1984)、ならびに *Aspergillus terreus* のような菌類 (K. Yamada, et al., Agric. Biol. Chem. 32:1275-1282 1968) を含む。フィターゼを産生することができる微生物の、一胃性動物用の飼料添加剤としての可能な用途はすでに報告されている (Shieh and Ware, 米国特許第 3, 297, 548 号, Nelson, T.S. et al., J. Nutrition 101:1289-1294, 1971)。

30

【0005】

また、微生物フィターゼはある種の工業プロセスで動物用飼料、たとえば小麦やトウモロコシの廃棄物を製造するのに有用であることが報告されている。トウモロコシの湿式ミルプロセスでは動物用飼料として販売されているグルテンが生成する。フィターゼを添加すると製品飼料の栄養価が改善され得ることが報告されている。菌類のフィターゼ酵素およびプロセス条件 ($t \sim 50^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH} \sim 5.5$) はすでに欧州特許出願第 0321004 号に報告されている。大豆粉の加工処理において、フィターゼが存在すると、その粉と廃棄物は魚、家禽その他の非反芻動物および授乳中の子牛を飼育するのに使われる飼料として不適切となる。フィターゼは、この高タンパク大豆材料の栄養・商用価値を改善するのに有用であることが報告されている (フィナーゼ酵素 (Finase Enzymes)、Alko, Rajamäki, Finland 参照)。フィターゼと *A. niger* 由来の至適 pH 2.5 の酸性ホスファターゼ

40

50

との組み合わせは、Alko, Ltd.により、フィチン酸分解産物Finas FおよびFinase S中に動物飼料添加物として使用されている。費用効果的なフィターゼ源があれば、動物飼料としての大豆粉の価値を大きく高めることになろう(Shiehら、1969)。

【0006】

フィターゼおよびそれより特異性の低い酸性ホスファターゼは菌類*Aspergillus ficuum*により細胞外酵素として産生される(Shieh et al., 1969)。Ullahの報告によると、野生型*A. ficuum*から精製した酵素は、見掛けの分子量が61.7 kDa (SDS-PAGE、グリコシル化に対して補正)、至適pHが2.5と5.5、Kmが約40 (m、そして比活性が約50 U/mg (Ullah, A., Preparative Biochem 18:443-458, 1988)であった。国際特許出願公開第WO 91/05053号にも、至適pHが2.5と5.5、Kmが約250 (m、比活性が約100 U/mgタンパク質であるフィターゼの*Aspergillus ficuum*からの単離と分子クローニングが報告・開示されている。

10

【0007】

酸性ホスファターゼは広範囲のリン酸エステルを触媒的に加水分解し、通常至適pHが6.0未満である酵素である(Hollander, 1971)。たとえば、#EC 3.1.3.2は正リン酸モノエステルから正リン酸生成物への加水分解を触媒する。酸性ホスファターゼが*A. ficuum*から精製されたことが報告されている。この酸性ホスファターゼの脱グリコシル化された形態は見掛けの分子量が32.6 kDaである(Ullah et al., 1987)。

本発明の目的は、フィチン酸およびフィチン酸の塩からのリンの放出効率を向上させる、大腸菌(*Escherichia coli*) B株から単離された組換えフィターゼを提供することである。本発明の別の目的は、飼料への商業用途および最小の加工処理による工業プロセスに適した組換え酵素の供給源を提供することである。

20

【0008】

発明の概要

本発明は、ポリヌクレオチド、およびこれによりコードされており、フィターゼ活性を有するフィターゼ酵素として同定されたポリペプチドを提供する。本発明の1つの態様によると、新規な組換え酵素ならびにその活性断片、類似体および誘導体が提供される。

【0009】

本発明の別の態様により、本発明の酵素ならびにそのような酵素の活性類似体および断片をコードしている単離された核酸分子、たとえばmRNA、DNA、cDNA、ゲノムDNAが提供される。

30

本発明のさらに別の態様によると、本発明の酵素をコードしている核酸配列を含有する組換え原核生物および／または真核生物の宿主細胞を、前記酵素の発現を促進する条件下で培養し、その後前記酵素を回収することからなる、組換え技術によって前記のようなポリペプチドを生産する方法が提供される。

【0010】

本発明の別の態様においては、前記のような酵素またはそのような酵素をコードしているポリヌクレオチドを、商用プロセスに、たとえばin vitroで(すなわち飼料処置プロセスで)、またはin vivoで(すなわち前記酵素を動物に投与することによって)、フィチン酸から植物材料中にミネラルを放出させるプロセスのような方法に、利用する方法が提供される。

40

【0011】

さらに別の本発明の態様によると、前記のような酵素またはそのような酵素をコードしているポリヌクレオチドを、科学研究に関連してin vitroの目的で、たとえば、他の生物に由来する類似の酵素をコードしているかもしれない同様な配列を同定するためのプローブを製造するのに利用する方法が提供される。

本発明のこれらの態様およびその他の態様は、本明細書の教示から当業者には明らかとなる。

【0012】

発明の詳細な説明

50

添付の図面は本発明の実施形態の例示であり、特許請求の範囲に含まれる本発明の範囲を限定する意味は全くない。

「遺伝子」という用語はポリペプチド鎖を生産するのに関わるDNAのセグメントを意味しており、コード領域の前後の領域（リーダーおよびトレーラー）および個々のコードセグメント（エキソン）間の介在配列（イントロン）を含む。

【0013】

コード配列が別のコード配列と「機能し得る形で結合している」とは、RNAポリメラーゼがこれら2つのコード配列を単一のmRNAに転写し、次いでこのmRNAが両方のコード配列から導かれるアミノ酸を有する単一のポリペプチドに翻訳される場合をいう。これらコード配列は、発現された配列が最終的にプロセッシングを受けて所望のタンパク質

10

【0014】

「組換え」酵素とは、組換えDNA技術によって、すなわち、所望の酵素をコードしている外来DNA構築物により形質転換された細胞から産生される酵素をいう。「合成」酵素は化学合成によって調製されるものをいう。

【0015】

特定の酵素「のコード配列」または「をコードしているヌクレオチド配列」とは、適当な調節配列の制御下に置かれると転写され酵素に翻訳されるDNA配列をいう。「プロモーター配列」とは、細胞中でRNAポリメラーゼと結合し、下流（3'方向）のコード配列の転写を開始することができるDNA調節領域をいう。プロモーターはDNA配列の一部である。この配列領域はその3'末端に開始コドンをもっている。プロモーター配列は、バックグラウンドより高い検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な要素を含んで最小の数の塩基を含んでいる。しかし、RNAポリメラーゼが配列に結合し、開始コドン（プロモーターの3'末端）で転写が開始した後は、転写は3'方向の下流に向かって進行する。このプロモーター配列内には、転写開始部位（ヌクレアーゼS1によるマッピングで定義するのが便利である）およびRNAポリメラーゼの結合に関与するタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）がある。

20

【0016】

本発明は、フィチン酸複合体からのミネラルの放出を伴うフィチン酸のイノシトールと遊離リン酸への加水分解を触媒する精製された組換え酵素を提供する。精製された酵素の一例は大腸菌(*Escherichia coli*) B株に由来するフィターゼである。この例示酵素を図1の配列番号2に示す。

30

配列番号2をコードしているポリヌクレオチドは最初、以下に記載するように大腸菌B株から単離されたゲノムDNAから回収された。これは、アミノ酸残基432個のタンパク質をコードしているオープンリーディングフレームを含有している。

【0017】

1つの実施形態において、本発明の配列番号2のフィターゼ酵素はSDS-PAGEゲル電気泳動によって測定して約47,056キロダルトンの分子量と、遺伝子のヌクレオチド配列から推測される分子量とをもっている。pIは6.70である。この酵素のpHおよび温度プロファイルおよび安定性データを図2に示す。この精製された酵素は、所望によりフィチン酸からイノシトールと遊離リン酸への加水分解を触媒するのに使用できる。本発明のフィターゼ酵素は熱安定性が高い。

40

本発明の1つの態様によると、図1の推定アミノ酸配列を有する成熟酵素をコードしている単離された核酸分子（ポリヌクレオチド）が提供される。

【0018】

本発明を使用して、図1（配列番号1）に開示されたフィターゼ酵素をコードしている単離された核酸分子と実質的に類似する核酸配列を単離することができる。単離される核酸配列が実質的に類似するとは、(i) 後述のストリンジェントな条件下で配列番号1とハイブリダイズすることができるか、または(ii) 配列番号1に縮重されるDNA配列をコードしている場合をいう。縮重DNA配列は配列番号2のアミノ酸配列をコードしている

50

が、ヌクレオチドコード配列に違いがある。本明細書で使用する「実質的に類似」という用語は本発明の配列と類似した同一性を有する配列をいうものとする。実質的に類似するヌクレオチド配列は、ハイブリダイゼーションまたは配列比較によって同定することができる。実質的に類似する酵素配列は、タンパク質消化、ゲル電気泳動および／または微量配列決定(microsequencing)の1つ以上によって同定することができる。

【0019】

フィターゼ酵素をコードしている核酸分子を単離する1つの手段は、業界で認識されている手法を用いて天然または人工的に設計したプローブによりゲノム遺伝子ライブラリーをプローブすることである（たとえば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F.M. et al. (EDS.) Green Publishing Company Assoc. and John Wiley Interscience, New York, 1989, 1992参照）。当業者には分かるように、配列番号1またはその断片（少なくとも15個の連続したヌクレオチドを含む）は特に有用なプローブである。この目的に特に有用な他のプローブは、配列番号1の配列とハイブリダイズできる断片（少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含み、標的配列と少なくとも70%相補的なもの）が特に有用なプローブである。この目的に特に有用な他のプローブは配列番号1の配列とハイブリダイズできる断片（すなわち、少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含み、標的配列と少なくとも70%相補的なもの）である。

【0020】

本明細書に開示した特定の核酸配列とハイブリダイズする核酸配列に関して、ハイブリダイゼーションは低ストリンジェンシー条件下、中ストリンジェンシー条件下、またはストリンジェントな条件下で実施することができる。オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションの一例として、まず、固定化された変性核酸を含有するポリマー膜を、0.9MのNaCl、50mMの NaH_2PO_4 、pH7.0、5.0mMの Na_2EDTA 、0.5%のSDS、 $10\times$ Denhardt、および0.5mg/mLのポリリボアデニル酸より成る溶液中45℃で30分プレハイブリダイズする。次に、この溶液に、約 2×10^7 cpm（比活性 $4\sim 9\times 10^8$ cpm/ug）の ^{32}P 末端標識オリゴヌクレオチドプローブを加える。12～16時間のインキュベーション後、膜を、0.5%のSDSを含有する $1\times$ SET（150mMのNaCl、20mMのTris塩酸塩、pH7.8、1mMの Na_2EDTA ）中室温で30分洗浄した後、オリゴヌクレオチドプローブの融解温度 $T_m-10^\circ\text{C}$ で新鮮な $1\times$ SET中で30分洗浄する。次いで、膜をオートラジオグラフィフィルムに露光してハイブリダイゼーションシグナルを検出する。

【0021】

ストリンジェントな条件とは、配列間の同一性が少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも97%の場合にのみハイブリダイゼーションが起ることを意味する。J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2d Ed. 1989)(Cold Spring Harbor Laboratory)参照。この文献は引用によりその全体が本明細書に含まれているものとする。

【0022】

本明細書で使用する「同一（性）」という用語は、基準のポリヌクレオチド（配列番号1）と同じ塩基をある割合で含むポリヌクレオチド配列をいう。たとえば、基準のポリヌクレオチドと少なくとも90%同一であるポリヌクレオチドは、基準のポリヌクレオチドを構成する塩基と90%が同一であるポリヌクレオチド塩基を有し、そのポリヌクレオチド配列を構成する塩基の10%に異なる塩基を有してもよい。

【0023】

また本発明は、基準のポリヌクレオチドとは異なっているがその差異がサイレント変化であり、たとえばその変化により当該ポリヌクレオチドがコードしているアミノ酸配列が変化しないようなポリヌクレオチドにも係る。本発明はまた、基準のポリヌクレオチドによってコードされている酵素（配列番号1）においてアミノ酸の置換、付加、欠失、融合および末端切断を引き起こすヌクレオチドの変更にも係る。本発明の好ましい態様ではこれらの酵素は基準のポリヌクレオチドによってコードされている酵素と同じ生物学的作用を

保持している。

【0024】

また、このようなプローブはそのプローブの同定を容易にするために分析的に検出可能な試薬で標識することができ、標識されているのが好ましいことも分かる。有用な試薬には、放射能、蛍光染料または検出可能な生成物の精製を触媒することができる酵素があるが限定されることはない。したがって、本プローブは他の動物起源からのDNAの相補的コピーを単離したり、そのような起源に関連する配列をスクリーニングしたりするのに有用である。

【0025】

本発明は実質的に純粋なフィターゼ酵素を提供する。本明細書で使用する「実質的に純粋な」という用語は、天然では伴われる他のタンパク質、脂質、炭水化物、核酸その他の生物学的物質を実質的に含まないポリペプチド（たとえば、フィターゼポリペプチドまたはその断片）のような分子を意味している。たとえば、実質的に純粋なポリペプチドのような分子は、所望の分子を乾燥重量で少なくとも60%含むことができる。ポリペプチドの純度は、たとえばポリアクリルアミドゲル電気泳動（たとえばSDS-PAGE）、カラムクロマトグラフィー（たとえば高速液体クロマトグラフィー（HPLC））、およびアミノ末端アミノ酸配列解析を始めとする標準的な方法を用いて決定することができる。

【0026】

本発明に包含されるフィターゼポリペプチドは図1（配列番号1）に示したフィターゼのアミノ酸配列を有することができる。大腸菌B株から単離されたようなフィターゼポリペプチドは、フィチン酸複合体からのミネラルの放出を伴うフィチン酸からイノシトールおよび遊離リン酸への加水分解を触媒することによって特徴付けることができる。

【0027】

また、本発明には、配列番号1のようなフィターゼポリペプチドの配列と「実質的に同一な」配列を有するポリペプチドも包含される。「実質的に同一な」アミノ酸配列とは、基準の配列とは保存性のアミノ酸置換、たとえば1個のアミノ酸と同クラスの別のアミノ酸との置換（たとえば、イソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンのような疎水性アミノ酸1個と別のアミノ酸との置換、または、アルギニンとリシン、グルタミン酸とアスパラギン酸、もしくはグルタミンとアスパラギンの置換のような極性のアミノ酸1個と別のアミノ酸との置換）によってのみ異なっている配列をいう。

【0028】

本発明のフィターゼポリペプチドの断片はフィターゼ特異的活性すなわちエпитープを少なくとも1つ保持していることができる。フィターゼ活性は、フィチン酸からイノシトールおよび遊離リン酸への触媒作用を検査することによってアッセイすることができる。一例を挙げると、たとえば少なくとも8~10個のアミノ酸を含有するフィターゼポリペプチド断片を免疫原として使用してフィターゼ特異的抗体を産生することができる。この断片は、たとえばフィターゼで保存されているアミノ酸配列を含有することができ、このアミノ酸配列はフィターゼで保存されているアミノ酸を含有することができる。そのような断片は図1に示したフィターゼの配列と比較することによって容易に同定することができる。上記フィターゼ断片は、ペプチド免疫原としての用途に加えて、ELISAのようなイムノアッセイにおいてサンプル中のフィターゼ特異的抗体の存否を検出するのに使用することができる。

【0029】

本発明に包含されるその他のフィターゼポリペプチドは、配列番号2のようなフィターゼポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも50%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。アミノ酸配列相同性を決定する際の比較の長さは、たとえばアミノ酸少なくとも15個、たとえば少なくとも20個、25個、または35個とすることができる。相同性は標準的な配列解析ソフトウェア（たとえば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI53705。また、Ausubel et al., 前掲も参照され

10

20

30

40

50

たい)を用いて測定することができる。そのような手法とアルゴリズムとして、たとえば、B L A S T プログラム(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information)、A L I G N、A M A S (Analysis of Multiply Aligned Sequences)、A M P S (Protein Multiple Sequence Alignment)、A S S E T (Aligned Segment Statistical Evaluation Tool)、B A N D S、B E S T S C O R、B I O S C A N (Biological Sequence Comparative Analysis Node)、B L I M P S (B L O C K S I M P R O V E D S earcher)、F A S T A、Intervals & Points、B M B、C L U S T A L V、C L U S T A L W、C O N S E N S U S、L C O N S E N S U S、W C O N S E N S U S、Smith-Watermanアルゴリズム、D A R W I N、Las Vegasアルゴリズム、F N A T (Forced Nucleotide Alignment Tool)、Framealign、Framesearch、D Y N A M I C、F I L T E R、F S A P (Fristensky Sequence Analysis Package)、G A P (Global Alignment Program)、G E N A L、G I B B S、G e n Q u e s t、I S S C (Sensitive Sequence Comparison)、L A L I G N (Local Sequence Alignment)、L C P (Local Content Program)、M A C A W (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench)、M A P (Multiple Alignment Program)、M B L K P、M B L K N、P I M A (Pattern-Induced Multi-sequence Alignment)、S A G A (Sequence Alignment by Genetic ALgorithm)およびW H A T - I F がある。

10

【0030】

本発明のフィターゼポリペプチドはいくつかの標準的な方法のいずれかによって得ることができる。たとえば、フィターゼポリペプチドは、標準的な組換え発現系で産生させることができ(下記参照)、化学合成することができ(この手法は小さいフィターゼペプチド断片に限られるであろう)、またはそれらが天然に発現している生物から精製することができる。

20

【0031】

本発明はまた、上記フィターゼポリペプチドをコードしている単離された核酸分子も提供する。たとえば、配列番号1をコードする核酸は本発明に包含される。これらの核酸は天然のヌクレオチド配列を含有していることもできるし、または、フィターゼをコードする天然の核酸の配列とは異なるが遺伝コードの縮重のために同じアミノ酸をコードしている配列を含有していることもできる。本発明の核酸はDNAもしくはRNAヌクレオチドまたはこれらの組み合わせもしくは修飾体を含有することができる。本発明の核酸の一例を配列番号1に示す。

30

【0032】

「単離された核酸」とは、由来生物の天然のゲノム中に存在するときには通常直接連続している5'および3'フランキング配列と直接連続してはいない核酸、たとえばDNAまたはRNA分子を意味する。すなわち、この用語は、たとえば、プラスミドもしくはウイルスベクターのようなベクター中に組み込まれた核酸、異種細胞のゲノム中に(または、同種細胞のゲノムではあるが、天然とは異なる部位に)組み込まれた核酸、および、別個の分子として存在する核酸、たとえばPCR増幅または制限酵素消化によって生成されるDNA断片またはin vitro転写によって生成されるRNA分子を記述する。またこの用語は、たとえば融合タンパク質の生産に使用することができるさらなるポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部を形成する組換え核酸も記述する。

40

【0033】

本発明の核酸分子は、フィターゼ遺伝子産物(たとえば、フィターゼRNAおよびフィターゼポリペプチド)の生産用の標準的な方法で鋳型として用いることができる。また、フィターゼポリペプチド(およびその断片)をコードする核酸分子ならびに関連する核酸、たとえば、(1)フィターゼポリペプチドをコードする核酸またはその断片(たとえば、少なくとも10個、12個、15個、20個、もしくは25個のヌクレオチドを含有する断片)と相補的であるかまたはそのような核酸とハイブリダイズする配列を含有する核酸、および、(2)フィターゼポリペプチドをコードする核酸またはその断片(たとえば、少なくとも10個、12個、15個、20個、もしくは25個のヌクレオチドを含有する

50

断片)と相補的な配列とハイブリダイズする配列を含有する核酸は、そのハイブリダイゼーション特性に焦点を当てた方法で使うことができる。たとえば、以下により詳細に説明するように、このような核酸分子は、以下の方法、すなわちフィターゼ核酸を合成するためのPCR法、サンプル中のフィターゼ核酸の存在を検出する方法、新しいフィターゼファミリーのメンバーをコードする核酸を同定するスクリーニング法に使うことができる。スクリーニング法に有用なオリゴヌクレオチドプローブは10～約150ヌクレオチド長である。なお、そのようなプローブは10～約100ヌクレオチド長であるのが好ましく、10～約50ヌクレオチド長であるとさらに好ましい。

【0034】

本発明はまた、配列番号1に加えてフィターゼポリペプチドファミリーのメンバーをコードしている核酸分子を同定する方法も包含する。これらの方法では、フィターゼポリペプチドをコードしている核酸を含有するサンプル、たとえばcDNAライブラリーのような核酸ライブラリーを、フィターゼ特異的プローブ、たとえばフィターゼ特異的核酸プローブでスクリーニングする。フィターゼ特異的核酸プローブは、フィターゼポリペプチドをコードする核酸またはその相補配列と特異的にハイブリダイズする核酸分子(たとえば、DNAもしくはRNAヌクレオチドを含有する分子、またはこれらの組み合わせもしくは修飾体)である。本発明のこの方法に関して「フィターゼ特異的プローブ」という用語は、フィターゼポリペプチドをコードする核酸またはその相補配列に結合するプローブであって、他の酵素をコードする核酸またはその相補配列に対する結合の程度と比べてより検出可能な程度に高度に結合するプローブをいう。

【0035】

本発明により、フィターゼ特異的核酸プローブの製造が容易になる。そのようなプローブを得る方法は、図1に示したアミノ酸配列に基づいて設計することができる。少なくとも10個、たとえば少なくとも15個、25個、35個、50個、100個または150個のヌクレオチドを含有することができるプローブは、いくつかの標準的な方法のいずれかによって製造することができる(たとえば、Ausubel, et al., 前掲参照)。たとえば、PCR増幅法を用いてこれらプローブを製造するのが好ましい。これらの方法では、フィターゼ保存配列(図1参照)に相当しフィターゼ特異的アミノ酸を含むことができるようにプライマーを設計し、得られたPCR産物をプローブとして用いてcDNAライブラリーのような核酸ライブラリーをスクリーニングする。

【0036】

本発明のフィターゼ酵素のコード配列は、たとえば大腸菌BゲノムDNAを調製し、そのゲノムDNAから(たとえばPCR増幅によって)フィターゼ活性をコードしているDNAを回収することによって同定した。このような回収法は業界でよく知られている。たとえば、1つの手段は、コード配列を回収するように増幅プライマーを設計し、ゲノムDNAから遺伝子を増幅し、DNAをベクターにサブクローニングし、得られた構築物を宿主株中に形質転換し、フィターゼ酵素を発現・評価することからなる。このような手順は業界でよく知られており、たとえば、Maniatis, T., et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 1982(引用によりその全体が本明細書に含まれているものとする)に記載されている。

【0037】

好ましい実施形態において、本発明の酵素は、以下の技術によって大腸菌BゲノムDNAから単離した。

大腸菌BゲノムDNAは、シグマ社(ニュージャージー州セントルイス)から得た(カタログ#D-2001)。

次のプライマーを用いてゲノムDNAから直接遺伝子を増幅した。

5'プライマー gtttctgaattcaaggagggaatttaaATGAAAGCGATCTTAATCCCATT

3'プライマー gtttctggatccTTACAAACTGCACGCCGGTAT

Pfuポリメラーゼは製造業者のプロトコルに従って使用した(Stratagene Cloning Systems, Inc., カリフォルニア州ラジョラ)。

P C R産物と p Q E 6 0 ベクター(Qiagen)を両方とも、E c o R IおよびB g l I I制限エンドヌクレアーゼ(New England Biolabs)で製造業者のプロトコルに従って消化した。ライゲーション、ならびにM 1 5 p R E P 4 宿主細胞(Qiagen)への形質転換およびその中の発現により、c 末に6 個のH i s タグをもつタンパク質が得られる。

【0038】

本発明の完全長遺伝子の断片は、完全長DNAを単離し、前記遺伝子と高い配列類似性または類似の生物学的活性を有する他のDNAを単離するのに、c DNAもしくはゲノムライブラリーとのハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。このタイプのプローブは少なくとも10 個、好ましくは少なくとも15 個、さらに好ましくは少なくとも30 個の塩基を有しており、たとえば少なくとも50 個以上の塩基を含有することもある。またこのプローブは、完全長転写物に相当するDNAクローンと、調節およびプロモーター領域、エキソンおよびイントロンを含めた完全な遺伝子を含有する1 個以上のゲノムクローンを同定するのに使用してもよい。

10

【0039】

単離された核酸配列および他の酵素は、次いで、たとえば酵素フィターゼ活性を検出するアッセイで、本発明の酵素に特徴的な生物学的活性の保持について測定することができる。このような酵素には、フィターゼの末端が切除された形態、および欠失変異体や挿入変異体のような変異体が包含される。

【0040】

そのようなアッセイの例としてはフィターゼ活性を検出する次のアッセイがある。フィターゼ活性を測定するには、1 mMのC a C l₂を添加した100 mMのT r i s H C l 緩衝液(p H 7. 5)中の2 mMフィチン酸ナトリウム600 μ lと共に150 μ lの酵素調製液を37℃で30分インキュベートすることができる。インキュベーション後750 μ lの5%トリクロロ酢酸を加えて反応を停止する。遊離されたリン酸は、1500 μ lの着色試薬(体積4の5. 5%硫酸中1. 5%モリブデン酸アンモニウムおよび体積1の2. 7%硫酸第一鉄、Shimizu, M., 1992; Biosci. Biotech. Biochem., 56:1266-1269)を加えた後700 nmでリン酸標準に対して分光学的に測定した。酵素活性の1単位は、アッセイ条件下で1分あたり1マイクロモルのP iを放出するのに必要とされる酵素の量と定義する。比活性は、タンパク質1 mgあたりの酵素活性の単位数で表すことができる。

20

30

本発明の酵素は、フィチン酸からイノシトールと遊離のリン酸への加水分解に対して酵素活性を有する。

【0041】

本発明のポリヌクレオチドはDNAの形態でもよく、このDNAにはc DNA、ゲノムDNAおよび合成DNAが包含される。このDNAは二本鎖でも一本鎖でもよく、一本鎖の場合はコード鎖でも非コード(アンチセンス)鎖でもよい。成熟酵素をコードしているコード配列は、図1に示したコード配列および/または寄託されたクローン(配列番号1)のコード配列と同じでもよいし、あるいは、遺伝コードの重複または縮重の結果として図1のDNA(たとえば配列番号1)と同じ成熟酵素をコードする異なるコード配列であってもよい。

40

【0042】

図1の成熟酵素(たとえば配列番号2)をコードするポリヌクレオチドとしては、成熟酵素のコード配列のみ、成熟酵素のコード配列とリーダー配列やプロタンパク質配列のような付加的コード配列、成熟酵素(および場合により追加のコード配列)のコード配列と成熟酵素のコード配列の5'および/または3'の非コード配列やイントロンのような非コード配列があるが、これらに限られることはない。

【0043】

したがって、「酵素(タンパク質)をコードしているポリヌクレオチド」という用語は、酵素のコード配列のみを含むポリヌクレオチドと、追加のコード配列および/または非コード配列を含むポリヌクレオチドとを包含する。

50

【0044】

本発明はさらに、図1の推定アミノ酸配列（たとえば配列番号2）を有する酵素の類似体および誘導体をコードする上記ポリヌクレオチドの変異体にも係る。このポリヌクレオチドの変異体はポリヌクレオチドの天然の対立遺伝子変異体または該ポリヌクレオチドの非天然変異体でよい。

【0045】

したがって、本発明は、図1に示したものと同一成熟酵素をコードしているポリヌクレオチドと、図1の酵素の誘導体または類似体をコードする前記ポリヌクレオチドの変異体とを包含する。そのようなヌクレオチド変異体としては欠失変異体、置換変異体および付加または挿入変異体がある。

10

【0046】

上に示したとおり、ポリヌクレオチドは、図1に示したコード配列の天然の対立遺伝子変異体であるコード配列を有していてもよい。業界では公知のように、対立遺伝子変異体は、1個以上のヌクレオチドの置換、欠失または付加を有することのあるポリヌクレオチド配列の別の形態であって、コードされている酵素の機能を実質的に変化させないものである。

【0047】

また、本発明はポリヌクレオチドをも含み、ここでは成熟酵素のコード配列が同じ読取り枠内で宿主細胞からの酵素の発現及び分泌を補助するポリヌクレオチド配列、例えば、細胞からの酵素の移送を制御する機能を果たすリーダー配列に融合していてもよい。リーダー配列を有する酵素はプレタンパク質であり、宿主細胞による切断を受けてその酵素の成熟形態を形成するリーダー配列を有し得る。これらのポリヌクレオチドは、成熟タンパク質にさらなる5'アミノ酸残基を加えたプロタンパク質をコードすることもできる。プロ配列（prosequence）を有する成熟タンパク質はプロタンパク質であり、かつそのタンパク質の不活性形態である。ひとたびそのプロ配列が切断すると、活性成熟タンパク質が残る。

20

【0048】

したがって、例えば、本発明のポリヌクレオチドは成熟酵素、又はプロ配列を有する酵素もしくはプロ配列及びプレ配列（リーダー配列）の両者を有する酵素をコードすることができる。

30

【0049】

本発明は、さらに、図1の推定アミノ酸配列を有する酵素に加えて、そのような酵素の類似体及び誘導体に関する。

【0050】

「誘導体」及び「類似体」という用語は、図1の酵素に対しては、本質的にそのような酵素と同じ生物学的機能又は活性を保持する酵素を意味する。したがって、類似体には、そのプロタンパク質部分を切断することによって活性化されて活性成熟酵素を生成し得るプロタンパク質が含まれる。

【0051】

本発明の酵素は組換え酵素であっても、天然酵素であっても、又は合成酵素であってもよく、好ましくは組換え酵素である。

40

【0052】

図1の酵素の誘導体又は類似体は、(i) 1つ以上のアミノ酸残基がその遺伝暗号によってコードされないアミノ酸残基で置換されているもの、又は(ii) 1つ以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの、又は(iii) 成熟酵素が別の化合物、例えば、その酵素の半減期を増加させる化合物（例えば、ポリエチレングリコール）と融合しているもの、又は(iv) さらなるアミノ酸、例えば、リーダーもしくは分泌配列又は成熟酵素もしくはプロタンパク質配列の精製に用いられる配列が成熟酵素に融合しているものであり得る。このような誘導体及び類似体は、本明細書の教示から、当業者の範囲内にあるものと考えられる。

【0053】

50

本発明の酵素及びポリヌクレオチドは好ましくは単離形態で提供され、好ましくは均一に精製される。

【0054】

「単離された」という用語は、その物質がその元の環境（例えば、それが天然のものであるならば自然環境）から取り出されていることを意味する。例えば、生きている動物の体内に存在する天然のポリヌクレオチド又は酵素は単離されていないが、自然系において共存する幾つかの、又は全ての物質から分離されている同じポリヌクレオチド又は酵素は単離されている。このようなポリヌクレオチドはベクターの一部であってもよく、及び／又はそのようなポリヌクレオチドもしくは酵素は組成物の一部であってもよく、このようなベクターもしくは組成物は、自然環境の一部ではない点で依然として単離されていると言

10

【0055】

本発明の酵素には、図1の酵素（特には、成熟酵素）に加えて、図1の酵素に対して少なくとも70%の類似性（好ましくは、少なくとも70%の同一性）、より好ましくは図1の酵素に対して少なくとも90%の類似性（より好ましくは、少なくとも90%の同一性）、さらに好ましくは図1の酵素に対して少なくとも95%の類似性（さらにより好ましくは、少なくとも95%の同一性）を有する酵素が含まれ、一般には少なくとも30個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも50個のアミノ酸を含むそのような酵素の一部も含まれる。

【0056】

当該技術分野において公知のように、2つの酵素の間の「類似性」は、一方の酵素のアミノ酸配列及びその保存アミノ酸置換を第2の酵素の配列と比較することによって決定される。核酸及びアミノ酸配列における類似性は、当該技術分野において公知の手順及びアルゴリズムによって決定することができる。このような手順及びアルゴリズムには、例えば、BLASTプログラム（Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information）、ALIGN、AMAS（Analysis of Multiple Aligned Sequences）、AMPS（Protein Multiple Sequence Alignment）、ASSET（Aligned Segment Statistical Evaluation Tool）、BANDS、BESTSCOR、BIOSCAN（Biological Sequence Comparative Analysis Node）、BLIMPS（BLOCKS IMPROVED Searcher）、FASTA、Intervals & Points、BMB、CLUSTAL V、CLUSTAL W、CONSENSUS、LCONSENSUS、WCONSENSUS、Smith-Watermanアルゴリズム、DARWIN、Las Vegasアルゴリズム、FNAT（Forced Nucleotide Alignment Tool）、Framealign、Framesearch、DYNAMIC、FILTER、FSAP（Fristensky Sequence Analysis Package）、GAP（Global Alignment Program）、GENAL、GIBBS、GenQuest、ISSC（Sensitive Sequence Comparison）、LALIGN（Local Sequence Alignment）、LCP（Local Content Program）、MACAW（Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench）、MAP（Multiple Alignment Program）、MBLKP、MBLKN、PIMA（Pattern-Induced Multi-sequence Alignment）、SAGA（Sequence Alignment by Genetic Algorithm）及びWHAT-IFが含まれる。

20

30

【0057】

変異体、すなわち、「類似体」又は「誘導体」と基準となる酵素とはアミノ酸配列が1つ以上の置換、付加、欠失、融合及び末端切断によって異なることがあり、これらはいかなる組み合わせで存在していてもよい。

40

【0058】

好ましい変異体のうちにあるものは、保存アミノ酸置換が基準と異なるものである。このような置換は、ポリペプチドの中の所定のアミノ酸を同様の特徴を有する他のアミノ酸で置換するものである。保存置換として典型的に見られるものは、脂肪族アミノ酸Ala、Val、Leu及びIleのうちのあるものから他のものへの置換；ヒドロキシル残基Ser及びThrの相互交換、酸性残基Asp及びGluの交換、アミド残基Asn及びGlnの間での置換、塩基性残基Lys及びArgの交換並びに芳香族残基Phe、Tyrのうちでの置換である。

【0059】

最も好ましいものは、変化前の基準ポリペプチドと同じ生物学的機能及び活性を保持する

50

変異体である。

【0060】

本発明の酵素の断片又は一部を、ペプチド合成による対応する完全長酵素の生成に用いることができる；したがって、これらの断片は完全長酵素を生成するための中間体として用いることができる。本発明のポリヌクレオチドの断片又は一部を本発明の完全長ポリヌクレオチドの合成に用いることができる。

【0061】

また、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターで遺伝子操作された宿主細胞、及び組換え技術による本発明の酵素の産生にも関する。

【0062】

宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターで遺伝子操作（形質導入又は形質転換又はトランスフェクト）する。このようなベクターは、例えば、クローニングベクターであっても、発現ベクターであってもよい。このベクターは、例えば、プラスミド、ウイルス粒子、ファージ等の形態であり得る。遺伝子操作された宿主細胞は、プロモーターの活性化、形質転換体の選択、又は本発明の遺伝子の増幅に適切であるように改変された慣用の栄養培地中で培養することができる。温度、pHのような培養条件は、発現のために選択された宿主細胞に関して従来用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【0063】

本発明のポリヌクレオチドは組換え技術による酵素の生成に用いることができる。したがって、例えば、酵素を発現させるために、このポリヌクレオチドを様々な発現ベクターのうちのいずれか1つに含めることができる。このようなベクターには、染色体、非染色体及び合成DNA配列、例えば、SV40の誘導体；細菌プラスミド；ファージDNA；バキュロウイルス；酵母プラスミド；プラスミドとファージDNA、ウイルスDNA、例えば、ワクチニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、及び仮性狂犬病との組み合わせから誘導されるベクターが含まれる。しかしながら、宿主において複製可能で生存可能である限り、他のあらゆるベクターを用いることができる。

【0064】

適切なDNA配列を様々な手順によってベクターに挿入することができる。一般には、このDNA配列を当該技術分野において公知の手順により適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入する。このような手順及び他の手順は当業者の範囲内にあるものと考えられる。

【0065】

発現ベクター中のこのDNA配列は、mRNAの合成に適した発現制御配列（プロモーター）に機能し得る形で連結される。このようなプロモーターの代表的な例として、LTRもしくはSV40プロモーター、大腸菌（*E. coli*）lacもしくはtrp、ファージラムダP_Lプロモーター及び原核細胞もしくは真核細胞又はそれらのウイルスにおいて遺伝子の発現を制御することが知られる他のプロモーターを挙げることができる。発現ベクターは翻訳開始のためのリボソーム結合部位及び転写ターミネーターをも含む。また、このベクターは発現を増幅するのに適した配列を含むこともできる。

【0066】

加えて、発現ベクターは、好ましくは、形質転換された宿主細胞を選択するための表現型の特色をもたらす1種類以上の選択マーカー遺伝子、例えば、真核細胞培養の場合にはジヒドロ葉酸レダクターゼもしくはネオマイシン耐性、又は大腸菌（*E. coli*）ではテトラサイクリンもしくはアンピシリン耐性を含む。

【0067】

上述の適切なDNA配列に加えて適切なプロモーター又は制御配列を含むベクターを適切な宿主の形質転換に用い、その宿主にタンパク質を発現させることができる。

【0068】

適切な宿主の代表的な例として、細菌細胞、例えば、大腸菌（*E. coli*）、ストレプトマイセス（*Streptomyces*）、枯草菌（*Bacillus subtilis*）；真菌細胞、例えば、酵素；昆

10

20

30

40

50

虫細胞、例えば、Drosophila S2及びSpodoptera Sf9；動物細胞、例えば、CHO、COSもしくはBowesメラノーマ；アデノウイルス；植物細胞等を挙げることができる。適切な宿主の選択は、本明細書の教示から、当業者の範囲内にあるものと考えられる。

【0069】

特には、本発明は、上で広く記述される配列を1つ以上含む組換え構築物をも含む。これらの構築物はベクター、例えば、プラスミド又はウイルスベクターを含み、そのベクターには本発明の配列が順方向又は逆方向に挿入されている。この態様の好ましい態様においては、この構築物は、例えばプロモーター等の、配列に機能し得る形で連結されている調節配列を含む。多数の適切なベクター及びプロモーターが当業者に公知であり、かつ市販されている。例として以下のベクターが挙げられる；細菌：pQE70、pQE60、pQE-9 (Qiagen)、pBluescript II (Stratagene)；pTRC99a、pKK223-3、pDR540、pRIT2T (Pharmacia)；原核生物：pXT1、pSG5 (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVLSV40 (Pharmacia)。しかしながら、宿主において複製可能で生存可能である限り、あらゆる他のプラスミド又はベクターを用いることができる。

【0070】

プロモーター領域は、CAT（クロラムフェニコールトランスフェラーゼ）ベクター又は選択マーカーを有する他のベクターを用いてあらゆる所望の遺伝子から選択することができる。2つの適切なベクターがpKK232-8及びpCM7である。特別に命名されている細菌プロモーターにはlacI、lacZ、T3、T7、gpt、ラムダP_R、P_L及びtrpが含まれる。真核生物プロモーターにはCMV前初期、HSVチミジンキナーゼ、初期及び後期SV40、レトロウイルス由来のLTR、及びマウス・メタロチオネイン-Iが含まれる。適切なベクター及びプロモーターの選択も当業者のレベルの範囲内にある。

【0071】

さらなる態様において、本発明は上述の構築物を含む宿主細胞に関する。この宿主細胞は高等真核細胞、例えば哺乳動物細胞であっても、下等真核細胞、例えば酵母細胞であってもよく、又は宿主細胞は原核細胞、例えば細菌細胞であってもよい。宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、又は電気穿孔法によって行うことができる (Davis, L., Dibner, M., Batty, I., Basic Methods in Molecular Biology, (1986))。

【0072】

宿主細胞内の構築物は、その組換え配列によってコードされる遺伝子産物の産生に慣用の方法で用いることができる。あるいは、本発明の酵素は、慣用のペプチド合成によって合成的に生成することができる。

【0073】

成熟タンパク質は、適切なプロモーターの制御の下で、哺乳動物細胞、酵母、細菌又は他の細胞において発現させることができる。本発明のDNA構築物から誘導されるRNAを用い、無細胞翻訳系を使用してそのようなタンパク質を産生することもできる。原核宿主及び真核宿主に用いる適切なクローニングベクター及び発現ベクターはSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989)に記載されており、その開示は引用により本明細書に含まれるものとする。

【0074】

高等真核生物による本発明の酵素をコードするDNAの転写は、エンハンサー配列をベクターに挿入することによって高められる。エンハンサーは、通常約10～300bpのDNAのシス作用性エレメントであり、プロモーターに対してその転写を高めるように作用する。例には、複製開始点の後期側bp100～270に位置するSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。

【0075】

一般に組換え発現ベクターは、複製開始点、並びに宿主細胞の形質転換を許容する選択マーカー、例えば、大腸菌 (E. coli) のアンピシリン耐性遺伝子及び酵母 (S.cerevisiae

10

20

30

40

50

）RTP1遺伝子、並びに下流構造配列の転写を指示する高度に発現した遺伝子から誘導されるプロモーターを含む。このようなプロモーターは、解糖酵素、例えば、特に3-ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）、A因子、酸性ホスファターゼ、又は熱ショックタンパク質をコードするオペロンから誘導することができる。適切な相において、異種構造配列を翻訳開始及び終止配列、好ましくは、翻訳された酵素の分泌を指示することが可能なリーダー配列を用いて組み立てることができる。任意に、この異種配列は、望ましい特徴、例えば、発現した組換え産物の安定化又は簡便な精製を付与するN末端識別ペプチドを含む融合タンパク質をコードしてもよい。

【0076】

細菌用に有用な発現ベクターは、所望のタンパク質をコードする構造DNA配列を、適切な翻訳開始及び終止シグナルと共に、機能性プロモーターを有する機能可能な読取り相に挿入することによって構築される。このベクターは、1種類以上の表現型上の選択マーカー、並びにそのベクターの維持及び、所望であれば、宿主内での増幅を保証する複製開始点を含む。形質転換に適した原核生物宿主には、大腸菌（*E. coli*）、枯草菌（*Bacillus subtilis*）、サルモネラ菌（*Salmonella typhimurium*）並びにシュードモナス属（*Pseudomonas*）、ストレプトマイセス属（*Streptomyces*）及びスタフィロкокカス属（*Staphylococcus*）の様々な種が含まれるが、他のものを特に用いてもよい。

【0077】

代表的ではあるが非限定的な例として、細菌用に有用な発現ベクターは、選択マーカー及び公知のクローニングベクターpBR322（ATCC 37017）の遺伝子エレメントを含む市販のプラスミドから誘導される細菌複製開始点を含むことができる。このような市販のベクターには、例えば、pKK223-3（Pharmacia Fine Chemicals、Uppsala、スウェーデン）及びGEM1（Promega Biotec、Madison、WI、USA）が含まれる。これらのpBR322「主鎖」部分を適切なプロモーター及び発現させようとする構造配列と組み合わせる。

【0078】

適切な宿主株を形質転換し、宿主株を適切な細胞密度に増殖させた後、選択されたプロモーターを適切な手段（例えば、温度シフト又は化学的誘導）によって誘導し、細胞をさらに培養する。

【0079】

細胞を典型的には遠心分離によって回収し、物理的又は化学的手段によって破壊し、生じた粗抽出物をさらなる精製のために保持する。

【0080】

タンパク質の発現に用いられる微生物細胞は、凍結-融解の繰返し、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤の使用を含むあらゆる都合の良い方法によって破壊することができ、そのような方法は当業者に公知である。

【0081】

様々な哺乳動物細胞培養系も組換えタンパク質の発現に用いることができる。哺乳動物発現系の例には、Gluzman, Cell. 23:175 (1981)によって記述されるサル腎線維芽細胞のCOS-7系、並びに適合性のベクターを発現し得る他の細胞系、例えば、C127、3T3、CHO、HeLa及びBHK細胞系が含まれる。哺乳動物発現ベクターは、複製開始点、適切なプロモーター及びエンハンサーを含み、かつ必要なあらゆるリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与及び受容部位、転写終止配列、並びに5'フランキング非転写配列をも含む。SV40スプライスから誘導されるDNA配列及びポリアデニル化部位を用いて必要な非転写遺伝子エレメントを与えることができる。

【0082】

酵素は、組換え細胞培養物から、硫酸アンモニウムもしくはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンもしくはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィーを含む方法によって回収し、精製することができる。成熟タンパク質の立体配置を完成させる上で、必要に応じて、

10

20

30

40

50

タンパク質のリフォールディング工程を用いることができる。最後に、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を最終精製工程に用いることができる。

【0083】

本発明の酵素は自然に精製された産物であっても、化学合成法の生成物であっても、組換え技術によって原核生物もしくは真核生物宿主から（例えば、細菌、酵母、高等植物、昆虫及び哺乳動物細胞を培養して）産生してもよい。組換え産生法において用いられる宿主に依存して、本発明の酵素はグリコシル化されていることも、グリコシル化されていないこともある。また、本発明の酵素は開始メチオニンアミノ酸残基を含んでいることも、含んでいないこともある。

【0084】

本発明の酵素は、そのような酵素の活性が必要であり、又はそれが望ましいあらゆる目的に用いることができる。好ましい態様においては、この酵素はフィチン酸の加水分解を触媒するのに用いられる。フィチン酸の分解は動物飼料に利用することができる。

【0085】

好ましい態様においては、本発明の酵素は熱に対して安定で耐熱性の、フィチン酸の酵素加水分解を触媒するフィターゼ酵素であり、すなわち、この酵素は短時間（すなわち、5～30秒）又はより長期間、例えば数分もしくは数時間、50℃、最適には50℃を上回る温度に晒した後でも活性を取戻して回復することが可能である。

【0086】

これらの酵素、それらの断片又は他の誘導體、又はそれらの類似体、又はそれらを発現する細胞は、それらに対する抗体を産生する免疫原として用いることができる。これらの抗体は、例えば、ポリクローナル又はモノクローナル抗体であり得る。本発明は、Fab断片又はFab発現ライブラリの産物の他に、キメラ抗体、単鎖抗体およびヒト化抗体も含む。当該技術分野において公知の様々な手順をそのような抗体及び断片の産生に用いることができる。

【0087】

本発明の配列に相当する酵素に対して生じる抗体は、その酵素を動物に直接注射することにより、又はその酵素を動物、好ましくは非ヒトに投与することにより得ることができる。そのようにして得られた抗体はその酵素自体に結合する。このように、酵素の断片のみをコードする配列であっても、元々の酵素全体へ結合する抗体の産生に用いることができる。このような抗体は、その酵素を発現する細胞から酵素を単離するのに用いることができる。

【0088】

モノクローナル抗体を調製するのに、連続細胞系培養によって産生される抗体を提供するあらゆる技術を用いることができる。例には、ハイブリドーマ技術（Kohler及びMilstein, 1975, Nature, 256:495-497）、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozborら, 1983, Immunology Today 4:72）、及びヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ技術（Coleら, 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96）が含まれる。

【0089】

単鎖抗体の産生について記述される技術（米国特許第4,946,778号）を、本発明の免疫原性酵素産物に対する単鎖抗体の産生に適合させることができる。また、本発明の免疫原性酵素産物に対するヒト化抗体を発現させるのにトランスジェニックマウスを用いることができる。

【0090】

本発明の酵素に対して生じた抗体は、他の生物及びサンプルからの類似酵素のスクリーニングにおいて用いることができる。このようなスクリーニング技術は当該技術分野において公知である。また、抗体をこの生物又は他の生物から作製した遺伝子ライブラリをスクリーニングするためのプローブとして用いて、この反応活性又は交差反応活性を同定することもできる。

10

20

30

40

50

【0091】

上述の系において産生されたポリペプチドの単離及び精製は、個々の系に適切な慣用の方法を用いて行うことができる。例えば、分離用クロマトグラフィー及びモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のような抗体を用いる免疫学的分離を用いることができる。

【0092】

「抗体」という用語は、本明細書中では、完全な免疫グロブリン分子に加えて、免疫グロブリン分子の断片、例えば、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、及びSCA断片を指し、いずれもエンドグルカナーゼポリペプチドのエピトープに結合することが可能なものである。これらの抗体断片の派生元である抗体の抗原（例えば、エンドグルカナーゼ抗原）に選択的に結合する能力を幾らか保持するこれらの抗体断片は、当該技術分野において公知の方法を用いて作製することができ（例えば、Harlow及びLane、前出を参照）、さらに以下のように説明される：

(1) Fab断片は抗体分子の一価の抗原結合断片からなり、全抗体分子を酵素パパインで消化して完全な軽鎖と重鎖の一部からなる断片を得ることによって産生することができる。

(2) 抗体分子のFab'断片は、全抗体分子をペプシンで処理した後に還元して完全な軽鎖と重鎖の一部からなる分子を生成させることによって得ることができる。このようにして処理した抗体分子当たり2つのFab'断片が得られる。

(3) 抗体の(Fab')₂断片は、全抗体分子を引き続く還元なしに酵素ペプシンで処理することによって得ることができる。(Fab')₂断片は、2つのジスルフィド結合によって互いに保持される2つのFab'断片の二量体である。

(4) Fv断片は、2本の鎖として発現される軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域を含む遺伝子工学的に作製された断片として定義される。

(5) 単鎖抗体（「SCA」）は、適切で柔軟なポリペプチドリinkerで連結された軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域を含む遺伝子工学的に作製された一本鎖の分子である。

【0093】

本発明において用いられる場合、「エピトープ」という用語は抗原上の抗原決定基、例えば、フィターゼポリペプチドを指し、抗体のパラトープ、例えば、フィターゼ特異的抗体がそれに結合する。抗原決定基は、通常、化学的に活性な表面分子集団、例えば、アミノ酸又は糖側鎖からなり、特定の三次元構造特性に加えて特定の電荷特性を有することができる。

【0094】

上述のように、フィターゼ特異的抗体の産生に用いることができる抗原にはフィターゼポリペプチド、例えば、図1のポリペプチド断片に示されるフィターゼのいずれもが含まれる。動物の免疫化に用いられるポリペプチド又はペプチドは、標準的な組換え、化学合成、又は精製方法によって得ることができる。当該技術分野において公知のように、免疫原性を高めるため、抗原を担体タンパク質に結合させることができる。通常用いられる担体には、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、サイログロブリン、ウシ血清アルブミン（BSA）、及び破傷風トキソイドが含まれる。結合させたペプチドを次に動物（例えば、マウス、ラット、又はウサギ）の免疫化に用いる。このような担体に加えて、公知のアジュバントを抗原と共に投与して強い免疫応答の誘導を促進することができる。

【0095】

フィターゼ特異的ポリクローナル及びモノクローナル抗体は、例えば、フィターゼポリペプチド、例えば、抗体が生起されたフィターゼポリペプチド（又はそれらの断片）を含むマトリックスに結合させ、そこから溶離することによって精製することができる。抗体の精製及び濃縮のためのさらなる方法は当該技術分野において公知であり、本発明のフィターゼ特異的抗体で実施することができる（例えば、Coliganら、Unit 9, Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1994を参照）。

【0096】

フィターゼ特異的抗原に対応する抗イディオタイプ抗体も本発明に含まれ、標準的な方法を用いて産生させることができる。これらの抗体はフィターゼ特異的抗体に対して生じ、

したがって、フィターゼ特異的エピトープを模倣する。

【0097】

一对の分子（例えば、抗体-抗原対又は核酸対）の構成メンバーは、それらが他の非特異的分子よりも高い親和性で互いに結合する場合、互いに「特異的に結合する」と言う。例えば、ある抗原に対して生じた抗体は非特異的なタンパク質よりもその抗原に効率的に結合し、その抗原に特異的に結合すると記述することができる。（同様に、核酸プローブは、塩基対形成相互作用によって核酸標的と特定の二重鎖を形成する場合、その標的核酸に特異的に結合すると記述することができる（上を参照））。

【0098】

本発明を以下の例を参照してさらに説明する。しかしながら、本発明がこのような例に限定されるものではないことは理解されるべきである。全ての部又は量は、他に指定されない限り、重量基準である。

【0099】

本発明の一態様においては、図1に示されるもののようなフィターゼ酵素の産生方法が提供される。この方法は、酵素（例えば、配列番号1）をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、この核酸の発現を許容する条件下で増殖させ、この核酸によってコードされる酵素を単離することを含む。宿主細胞の培養方法は実施例に記載されており、当業者には公知である。

【0100】

別の態様においては、本発明は、フィチン酸複合体からの無機物の放出を伴うイノシトール及び遊離リン酸へのフィチン酸の加水分解を触媒するための方法を提供する。この方法は、フィチン酸を分解有効量の本発明の酵素、例えば、配列番号1に示される酵素と接触させることを含む。「分解有効」量という用語は、酵素と接触してないフィチン酸と比較して、フィチン酸の少なくとも50%を分解するのに要する酵素の量を指す。好ましくは、少なくとも80%のフィチン酸が分解される。

【0101】

別の態様においては、本発明はリン酸におけるホスホ-モノ-エステル結合を加水分解するための方法を提供し、この方法は、有効量の本発明の酵素（例えば、配列番号1）を投与してイノシトール及び遊離リン酸を生成させることを含む。「有効」量は、酵素と接触していないフィチン酸と比較して、ホスホ-モノ-エステル結合の少なくとも50%を加水分解するのに要する酵素の量を指す。好ましくは、少なくとも80%の結合が加水分解される。

【0102】

以下の例の理解を容易にするため、頻繁に現れる方法及び／又は用語を説明する。

【0103】

「プラスミド」は、大文字及び／又は数字に先行及び／又は後続する小文字のpで表される。本明細書での出発プラスミドは制限されることなく市販され、公に入手可能であるか、又は入手可能なプラスミドから公開されている手順に従って構築可能である。加えて、記述されるものと等価のプラスミドが当該技術分野において公知であり、当業者には明らかである。

【0104】

DNAの「消化」は、そのDNAの特定の配列にのみ作用する制限酵素でDNAを触媒的に切断することをいう。本明細書で用いられる様々な制限酵素は市販されており、それらの反応条件、補因子及び他の必要条件是当業者に公知の通りに用いた。分析の目的では、典型的には1μgのプラスミド又はDNA断片を約2単位の酵素と共に約20μlのバッファ溶液中で用いた。プラスミド構築用のDNA断片を単離する目的では、典型的には5~50μgのDNAを20~250単位の酵素を用いてより大容積中で消化する。特定の制限酵素に適切なバッファ及び基質の量は製造業者によって指定されている。37℃で約1時間のインキュベーション時間が通常用いられるが、販売元の指示に従って変えることができる。消化の後、反応物をポリアクリルアミドで直接電気泳動し、所望の断片を単離する。

【0105】

切断した断片のサイズ分離は、一般には、例えば、Goeddel, D.ら, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057(1980)に記載される8パーセントポリアクリルアミドゲルを用いて行う。

【0106】

「オリゴヌクレオチド」は一本鎖ポリデオキシヌクレオチド又は2本の相補的なポリデオキシヌクレオチド鎖を指し、これらは化学的に合成することができる。このような合成オリゴヌクレオチドは5'リン酸を有していても、いなくてもよい。有していないものは、キナーゼの存在下においてATPでリン酸を付加しなければ他のオリゴヌクレオチドにはライゲートしない。合成オリゴヌクレオチドは脱リン酸されていない断片にライゲートする。

【0107】

「ライゲーション」は2つの二本鎖核酸断片の間にホスホジエステル結合を形成するプロセスを指す (Maniatis, T.ら、前出、p146)。他に示されない限り、ライゲーションは、公知のバッファ及び条件を用いて、ライゲートしようとするほぼ等モル量のDNA断片0.5µg当たり10単位のT4 DNAリガーゼ（「リガーゼ」）で達成することができる。

【0108】

他に言明されていない限り、形質転換はSambrook、Fritsch及びManiatis、1989の方法に記載される通りに行った。以下の実施例は、本発明を説明することを目的とするものであり、本発明を制限するものではない。これらの実施例に記載される手順は本発明の特定の態様を実施するのに用いることができる典型的なものであるが、当業者に公知の他の手順を用いることもできる。実施例に記載される実験を実施するにあたり、以下の材料及び方法を用いた。

【0109】

実施例1

フィターゼの単離、細菌による発現及び精製

大腸菌BゲノムDNAをニュージャージー州セントルイスのSigma（カタログ番号D-2001）から入手した。

【0110】

このゲノムDNAから直接遺伝子をPCR増幅するのに以下のプライマーを用いた：

5'プライマー gtttctgaattcaaggaggaatttaaATGAAAGCGATCTTAATCCCAT

3'プライマー gtttctggatccTTACAACTGCACGCCGGTAT

【0111】

PCR反応におけるPfuポリメラーゼ、及び増幅は製造業者のプロトコルに従って行った (Stratagene Cloning Systems, Inc., La Jolla, CA)。

PCR産物を精製し、精製した産物及びpQE60ベクター (Qiagen) を製造業者のプロトコルに従って両者ともEcoRI及びBglII制限エンドヌクレアーゼ (New England Biolabs) で消化した。標準プロトコルを用いて一晚ライゲーションを行い、pQE60を得た。

【0112】

増幅した配列を、RBSをコードする配列と共に読取り枠が合うように挿入した。次に、そのライゲーション混合物を電気穿孔法による大腸菌 (E. coli) M15/pREP4株 (Qiagen, Inc.) の形質転換に用いた。M15/pREP4はプラスミドpREP4の複数のコピーを含み、これはlacIリプレッサーを発現し、カナマイシン耐性 (Kan^r) をも付与する。プラスミドDNAを単離し、制限分析によって確認した。所望の構築物を含むクローンを、Amp (100 µg/ml) 及びKan (25 µg/ml) の両者を補足したLB培地における液体培養で一晚 (0/N) 増殖させた。この0/N培養物を1:100~1:250の比で多量の培養物の接種に用いた。これらの細胞を0.4~0.6の光学密度600 (O.D.⁶⁰⁰) まで増殖させた。次に、IPTG（「イソプロピル-B-D-チオガラクトピラノシド」）を最終濃度1mMまで添加した。IPTGはlacIリプレッサーを不活性化することによりP/Oの消去を誘発し、これが遺伝子発現の増加につながる。細胞を3~4時間余分に増殖させた。その後、遠心分離によって細胞を回収した。

【0113】

上述のプライマー配列は、上述のハイブリダイゼーション技術によって寄託材料から標的遺伝子を単離するのに用いることもできる。

【0114】

上の教示に照らして本発明の多くの改変及び変形が可能であり、したがって、特許請求の範囲内であれば、本発明は特に記載されているものとは別の方法で実施することができる。本発明を上述の詳細な説明を参照して説明してきたが、前述の記載は本発明の説明を目的とするもので、その範囲を限定するものではないことは理解されるべきである。本発明の他の態様、利点、及び改変は特許請求の範囲内に含まれる。本明細書に引用される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、引用によりその全体を本明細書に含めるものとする。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、本発明の酵素のヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す。配列決定には、378自動化DNAシーケンサー(Applied Biosystems, Inc.)を使用した。

【図2】 図2は、本発明のフィターゼ酵素に対するpHおよび温度プロファイルならびに安定性データを示す。これらの分析でフィターゼ活性の検出に用いたアッセイは次の通り。フィターゼ活性を測定するには、1mMのCaCl₂を添加した100mMのTrisHCl緩衝液(pH7.5)中の600μlの2mMフィチン酸ナトリウムと共に150μlの酵素調製液を37℃で30分インキュベートする。インキュベーション後750μlの5%トリクロロ酢酸を加えて反応を停止する。遊離されたリン酸は、1500μlの着色試薬(体積4の5.5%硫酸中1.5%モリブデン酸アンモニウムおよび体積1の2.7%硫酸第一鉄、Shimizu, M., 1992; Biosci. Biotech. Biochem., 56:1266-1269)を加えた後700nmでリン酸標準に対して分光学的に測定した。700nmでの吸光度(OD)を図2のグラフのY軸に示す。グラフのX軸には温度またはpHを示す。

【図1】

(配列番号1のヌクレオチド配列、配列番号2のアミノ酸配列)

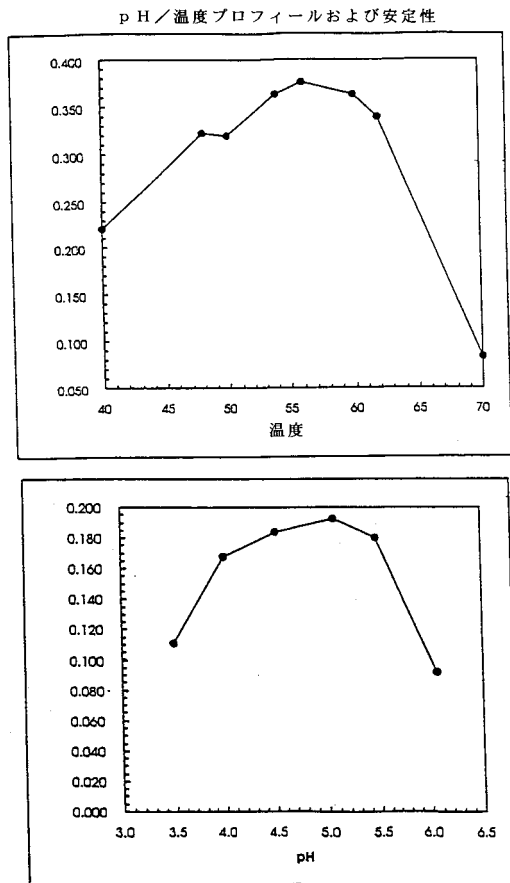
大腸菌Bフィターゼ配列

```
1
ATG AAA GCG ATC TTA ATC CCA TTT TTA TCT CTT CTG ATT CCG TTA ACC CCG
Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr Pro
CAA TCT GCA TTC GGT CAG AGT GAG CCG GAG CTG AAG CTG GAA AGT GTG GTG
Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val
ATT GTC AGT CGT CAT GGT GTG CGT GCT CCA ACC AAG GCC ACG CAA CTG ATG
Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met
CAG GAT GTC ACC CCA GAC GCA TGG CCA ACC TGG CCG GTA AAA CTG GGT TGG
Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Trp
CTG ACA CCG CGN GGT GGT GAG CTA ATC GCC TAT CTC GGA CAT TAC CAA CGC
Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Gln Arg
CAG CGT CTG GTA GCC GAC GGA TTG CTG GCG AAA AAG GGC TGC CCG CAG TCT
Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys Lys Gly Cys Pro Gln Ser
GGT CAG GTC GCG ATT ATT GCT GAT GTC GAC GAG CGT ACC CGT AAA ACA GGC
Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly
GAA GCC TTC GCC GCC GGG CTG GCA CCT GAC TGT GCA ATA ACC GTA CAT ACC
Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr
CAG GCA GAT ACG TCC AGT CCC GAT CCG TTA TTT AAT CCT CTA AAA ACT GGC
Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly
GTT TGC CAA CTG GAT AAC GCG AAC GTG ACT GAC GCG ATC CTC AGC AGG GCA
Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Ser Arg Ala
GGA GGG TCA ATT GCT GAC TTT ACC GGG CAT CCG CAA ACG GCG TTT CGC GAA
Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu
CTG GAA CCG GTG CTT AAT TTT CCG CAA TCA AAC TTG TGC CTT AAA CGT GAG
Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu
AAA CAG GAC GAA AGC TGT TCA TTA ACG CAG GCA TTA CCA TCG GAA CTC AAG
Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys
GTG AGC GCC GAC AAT GTC TCA TTA ACC GGT CCG GTA AGC CTC GCA TCA ATG
Val Ser Ala Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met
CTG ACG GAG ATA TTT CTC CTG CAA CAA GCA CAG GGA ATG CCG GAG CCG GGG
Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly
TGG GGA AGG ATC ACC GAT TCA CAC CAG TGG AAC ACC TTG CTA AGT TTG CAT
Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His
AAC GCG CAA TTT TAT TTG CTA CAA CGC ACG CCA GAG GTT GCC CGC AGC CGC
Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg
GCC ACC CCG TTA TTG GAT TTG ATC ATG GCA GCG TTG ACG CCC CAT CCA CGG
```

図1の続き

```
Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Met Ala Ala Leu Thr Pro His Pro Pro
CAA AAA CAG CCG TAT CGT GTG ACA TTA CCC ACT TCA GTA CTG TTT ATT GCC
Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala
GGA CAC GAT ACT AAT CTG GCA AAT CTC GGC GGC GCA CTG GAG CTC AAC TGG
Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Asn Trp
ACG CTT GCC GGT CAG CCG GAT AAC ACG CCG CCA GGT GGT GAA CTG GTG TTT
Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe
GAA CGC TGG CGT CCG CTA AGC GAT AAC AGC CAG TGG ATT CAG GTT TCG CTG
Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser Leu
GTC TTC CAG ACT TTA CAG CAG ATG CGT GAT AAA ACG CCG CTG TCA TTA AAT
Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn
ACG CCG CCC GGA GAG GTG AAA CTG ACC CTG GCA GGA TGT GAA GAG CGA AAT
Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn
CGC CAG GGC ATG TGT TCG TTG GCA GGT TTT ACG CAA ATC GTG AAT GAA GCA
Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala
CGC ATA CCG GCG TGC AGT TTG AGA TCT CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA 1323
Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu Arg Ser His His His His His His End
```

【図 2】



【配列表】

0004194750000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 0 7 K 16/40	
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 N 9/16	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/53	N
	C 1 2 P 21/08	

- (72)発明者 クレッツ, キース
 アメリカ合衆国 9 2 0 6 9 カリフォルニア州, サンマルコス, ホーソン ドライブ 9 7 3
- (72)発明者 ショート, ジェイ エム.
 アメリカ合衆国 9 2 0 1 4 カリフォルニア州, デル マール, ヴィア エスペリア 1 2 9 8
 5
- (72)発明者 ロバートソン, ダン
 アメリカ合衆国 0 2 4 7 8 マサチューセッツ州, ベルモント, レイク ストリート 2 4 4

審査官 斎藤 真由美

- (56)参考文献 特開平04-506007 (J P, A)
 Archives of Biochemistry and Biophysics, 1 9 9 3年, Vol.303, No.1, P.107-113

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
- C12N 15/00-90
 - C07K 14/00-19/00
 - C12P 21/00-08
 - C12N 1/00-7/08
 - C12Q 1/00-70
 - G01N 33/00-99
 - A61K 31/00-48/00
 - A61P 1/00-43/00
 - A23K 1/00-24
 - PubMed、MEDLINE(STN)
 - BIOSIS/WPI(DIALOG)
 - GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq
 - UniProt/GeneSeq