

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 4 月 22 日 (22.04.2004)

PCT

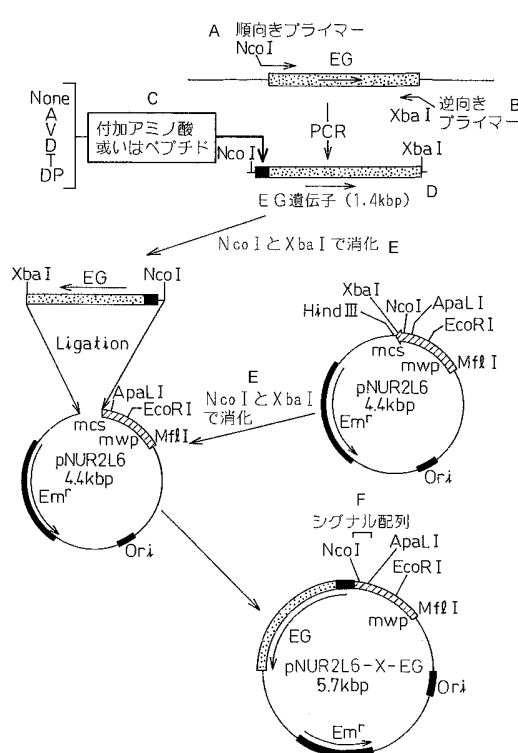
(10) 国際公開番号
WO 2004/033682 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, 9/42 (71) 出願人 および
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012998 (72) 発明者: 鶴高 重三 (UDAKA, Shigezo) [JP/JP]; 〒465-0077 愛知県 名古屋市 名東区 植園町 1 丁目 2 4 番地の 3 Aichi (JP).
(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 9 日 (09.10.2003)
(25) 国際出願の言語: 日本語 (72) 発明者; および
(26) 国際公開の言語: 日本語 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 石川 一彦 (ISHIKAWA, Kazuhiko) [JP/JP]; 〒563-8577 大阪府 池田市 緑丘 1 丁目 8 番 3 1 号 独立行政法人産業技術総合研究所 関西センター内 Osaka (JP). 鹿島 康浩 (KASHIMA, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒563-8577 大阪府 池田市 緑丘 1 丁目 8 番 3 1 号 独立行政法人産業技術総合研究所 関西センター内 Osaka (JP).
(30) 優先権データ:
特願 2002-297719
2002 年 10 月 10 日 (10.10.2002) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都 千代田区 霞が関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
(74) 代理人: 青木 篤, 外 (AOKI, Atsushi et al.); 〒105-8423 東京都 港区 虎ノ門 三丁目 5 番 1 号 虎ノ門 3 7 森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING HYPERTHERMOSTABLE ENDOGLUCANASE

(54) 発明の名称: 超耐熱性エンドグルカナーゼの製造法



A...FORWARD PRIMER
B...REVERSE PRIMER
C...ADDED AMINO ACID OR PEPTIDE
D...EG GENE
E...DIGESTION WITH NcoI AND XbaI
F...SIGNAL SEQUENCE

(57) Abstract: A process for producing a hyperthermostable endoglucanase originating in an archaeobacterium characterized by comprising culturing a bacterium belonging to the genus *Bacillus* which has a gene expression vector carrying a nucleic acid sequence encoding an endoglucanase originating in an hyperthermostable archaeobacterium and having 1 to 20 amino acids added to the amino-terminus (N-terminus) and being attached to the downstream of a DNA sequence encoding a signal peptide region originating in *Bacillus brevis*, and thus making the bacterium to produce and secrete the endoglucanase.

(57) 要約: バチルス・ブレイビス (*Bacillus brevis*) 由来のシグナルペプチド領域をコードするDNA配列の下流に、超好熱性古細菌由来でアミノ末端 (N-末端) に 1 ないし 20 個のアミノ酸を付加したエンドグルカナーゼをコードする核酸配列が接続された遺伝子発現ベクターを有するバチルス (*Bacillus*) 属細菌を培養し、エンドグルカナーゼを産生および分泌させることを特徴とする、古細菌由来超耐熱性エンドグルカナーゼの製造方法。



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

超耐熱性エンドグルカナーゼの製造法

技術分野

本発明はバチルス・ブレビス由来であって改良したシグナルペプチドを利用して、遺伝子組み換え法により一部改変した超耐熱性エンドグルカナーゼをバチルス属細菌で分泌生産させる方法に関するものである。

エンドグルカナーゼはセルラーゼ等として、繊維加工、飼料製造、食品加工、バイオマスよりの燃料やプラスチック原料の製造等に幅広く利用されている。

背景技術

異種タンパク質の分泌生産としてはこれまでにバチルス属細菌による分泌生産の総説 (Microbiol. Review, 57, 109-137 (1993)、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* による分泌生産の総説 [Bio/Technology, 11, 905-910 (1993)] , *Aspergillus* 属等のカビによる工業生産の報告 (Bio/Technology 6, 1419-1422 (1988) ; Bio/Technology, 9, 976-981 (1991)) 等のように多数報告されている。しかしながら、これらの宿主を用いる生産系によって、古細菌由来の超耐熱性エンドグルカナーゼを高効率で分泌生産した成功例は知られていない。大腸菌を用いれば、ごく少量の酵素 (1 mg/L程度) を得ることは可能であるが、効率的な菌体外への大量生産は全く期待できない。

本発明の 1 つの実施態様において分泌生産されるセルラーゼ (エンドグルカナーゼの一種) は、D-グルコースが β -1,4 結合で直鎖状

につながったホモ多糖であるセルロースをセロオリゴ糖に分解する反応を触媒する酵素であり、真菌類、放線菌、真性細菌、古細菌を含む多数の微生物により、生成分泌される。また、セルラーゼはオリゴ糖をセロビオースへ、さらにグルコースにまで分解する酵素群の総称である。

例えば、アルカリ性の環境下でよく生育するバチルス属細菌の一種が生産するアルカリセルラーゼは、pH 5 ~ 11で安定なうえ、界面活性剤やアルカリプロテアーゼにも安定である故、洗剤に配合されると木綿衣類の表面微少繊維をセルラーゼが分解し、付着の汚れを除去するので強力な洗浄力を有する洗剤用酵素として広く使用されるようになった。その他セルラーゼの多様な性質によって、幅広く利用されている。

一方、バチルス属細菌の一種、バチルス・ブレビスを宿主として異種タンパク質を効率良く分泌生産するシステムは長年にわたる研究によって開発され、バチルス・ブレビス47（特許第2082727号、特開昭62-201583号公報）の主要菌体外タンパク質の一種であるMWタンパク質（MWP）遺伝子のプロモーターおよびその遺伝子にコードされるシグナルペプチド領域を利用した分泌ベクターを作成し、タンパク質の分泌生産系が確立されている（Methods in Enzymology, 217, 23-33（1994））。さらに、バチルス・ブレビスの中で菌体外プロテアーゼの生産量が特に少ないバチルス・ブレビスHPD31が分離され、これを宿主としたタンパク質生産系が開発されている（特許第1785518号、特開昭63-56277号公報）。

耐熱性 α -アミラーゼの高効率分泌生産（Agric. Biol. Chem., 53, 2279-2289（1989）やヒト上皮増殖因子（EGF）の高生産（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3589-3593（1989））、特開平2-31682号公報、特許第2787585号）、ヒトインターロイキン-2（Biosci. B

Biotechnol. Biochem., 61, 1858-1861 (1997) やヒトインターロイキン-6 (Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 665-669 (2000) などの分泌生産に成功している。なかでも EGF については極めて高い生産量 (1.5g/L) が得られ、既に羊の採毛薬として工業的に生産されている (J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 21, 208-214 (1998))。

発明の開示

しかしながら、これまで見出されたほとんどのエンドグルカナーゼは、至適温度が 35℃ から 60℃ 付近であり、結晶状のセルロースや繊維の処理にも、耐熱性の低いカビ由来の酵素が使用されているのが現状であるが、処理効率を高めるにはより高温下で反応を行う必要がある。従って、100℃ 近い高温でもなお、安定かつ強力な触媒活性を失わない超耐熱性エンドグルカナーゼが渴望されていた。

最近、そのような高温に耐性を示すエンドグルカナーゼが超好熱性細菌ピロコッカスから見出されているが、その酵素をコードする遺伝子を発現ベクターに組込んでから、宿主の大腸菌に導入して少量の生産 (1 mg/L 程度) が得られているに過ぎない (Appl. Environ. Microbiol. 68, 430-433 (2002))。本発明は、微生物、特に細菌類を用いて超耐熱性エンドグルカナーゼを効率的、大量に製造する方法を提供するのを目的とする。

本発明者らは、バチルス・ブレビスが原核・真核いずれの細胞由来の外来遺伝子でも高発現できる宿主菌であること、および分泌生産の効率は分泌生産させる目的タンパク質、特にそのタンパク質のアミノ末端側のアミノ酸配列・構造によって左右されることに着目し、種々検討を加え研究した結果、産業上重要な異種タンパク質、特にエンドグルカナーゼを効率良くバチルス・ブレビスによって分

泌生産する方法を発明するに至った。

すなわち、本発明の方法は、バチルス・ブレビスを用いる宿主ベクター系により、バチルス・ブレビス由来の改良シグナルペプチド領域をコードする配列：

配列番号 1 ; Met Lys Lys (Arg) n Val Val Asn Ser Val Leu (Leu) m

1 5 10

Ala Ser Ala Leu Ala Leu The Val Ala X1 X2 Ala Phe Ala

15 20 25

(ただし、 n 、 m はそれぞれArgが0～2個及びLeuが3～5個連続に配列することを示す。またX1はProまたはAla、X2はMetまたはAsnである。)

(特開平4-103891；特開平7-170984；Appl. Microbiol. Biotechnol., 42, 358-363 (1994)；Biosci. Biotechnol. Biochem., 61, 1858-1861 (1997))の下流に、アミノ末端に1ないし複数個、例えば1～20個、のアミノ酸を付加したエンドグルカナーゼ遺伝子配列を結合した発現ベクターを構築し、その発現ベクターをバチルス・ブレビスに導入し、得られた形質転換体を培養し、生じたタンパク質を菌体外に効率良く分泌生産させ、菌体外に放出されたタンパク質を回収することによって、多量の目的異種タンパク質、特にエンドグルカナーゼを得る方法である。

この方法で異種タンパク質、特にエンドグルカナーゼのアミノ末端に少なくとも1ないし複数個のアミノ酸を付加することが必須であり、シグナルペプチドの改良のみでは効率的生産は達成できない。逆に、分泌させる異種タンパク質のみを改変して、改良シグナルペプチドを用いなければ矢張り効率生産を得ることができない。この両者の条件が効率的分泌に必要である。

従って、本発明は、バチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*) 由

来のシグナルペプチド領域をコードするDNA配列の下流に、超好熱性古細菌由来でアミノ末端（N-末端）に1ないし20個のアミノ酸を付加したエンドグルカナーゼをコードする核酸配列が接続された遺伝子発現ベクターを有するバチルス（*Bacillus*）属細菌を培養し、エンドグルカナーゼを産生および分泌させることを特徴とする、古細菌由来超耐熱性エンドグルカナーゼの製造方法を提供する。

前記シグナルペプチドとしては、バチルス・ブレビス由来で細胞表層タンパク質遺伝子のシグナルペプチドは、下記のアミノ酸配列：

配列番号1；Met Lys Lys (Arg)_n Val Val Asn Ser Val Leu (Leu)_m

1 5 10

Ala Ser Ala Leu Ala Leu Thr Val Ala X1 X2 Ala Phe Ala

15 20 25

（ただし、*n*、*m*はそれぞれArgが0～2個及びLeuが3～5個連続に配列することを示す。またX1はProまたはAla、X2はMetまたはAsnである。）

を有し、好ましくは配列番号：2に示すアミノ酸配列を示すものである。

前記エンドグルカナーゼとしては、ピロコッカス（*Pyrococcus*）属古細菌由来のエンドグルカナーゼが好ましく、具体例として配列番号4に示すアミノ酸配列を有するエンドグルカナーゼが挙げられる。前記エンドグルカナーゼは更に、配列番号4に記載のアミノ酸配列においてN-末端における1～50個のアミノ酸の欠失により、あるいは配列番号4に記載のアミノ酸配列又はそのC-末端の1～50個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入および/または付加により修飾されたアミノ酸配列を有するものであってもよい。

前記エンドグルカナーゼのN-末端に付加されるアミノ酸の数は、好ましくは1～15個であり、具体的なアミノ酸、またはアミノ酸配列の例としては、Ala、Val、Thr、Asp、Asp-Pro、Ala-Glu-Asp-Pro（配列番号：28）、Ala-Glu-Glu-Ala-Ala-Asp-Pro（配列番号：29）、Ala-Ala-Ala-Glu-Glu-Asp-Pro（配列番号：30）、Ala-Glu-Ala-Ala-Ala-Asp-Pro（配列番号：31）、Asn-Ser-Asp-Ser-Glu-Asp-Pro（配列番号：32）、Ala-Glu-Glu-Ala-Ala-Thr-Thr-Thr-Asp-Pro（配列番号：33）またはAla-Glu-Glu-Ala-Ala-Thr-Thr-Thr-Ala-Pro-Lys-Asp-Pro（配列番号：34）が挙げられる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の発現プラスミドpNUR2L6-X-EGの構築過程を示す図である。

発明の実施の形態

本発明の方法において製造の対象にするのは、古細菌由来のエンドグルカナーゼであり、その生産微生物である古細菌の例としてピロコッカス（*Pyrococcus*）属の微生物が挙げられ、より具体的な例として、ピロコッカス・ホリコシ（*Pyrococcus horikoshii*）が挙げられる。古細菌由来のエンドグルカナーゼの具体例としては、配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有するものが挙げられる。また、このアミノ酸配列をコードする核酸の塩基配列の一例として配列番号3に示す塩基配列が挙げられる。

エンドグルカナーゼのごとき加水分解酵素の場合、その活性のためには本来のアミノ酸配列が必須ではなく、酵素全体の内、活性に必須でない領域のアミノ酸配列を、1又は複数のアミノ酸の付加（例えば末端への付加）、除去または欠失、他のアミノ酸による置換

、アミノ酸の挿入（配列内部への）、などにより修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質でも、本来の活性を維持していることがよく知られている。

従って、本発明のエンドグルカナーゼは、配列番号：4に示すアミノ酸配列を有するもののみならず、配列番号4に記載のアミノ酸配列においてN-末端における1～50個のアミノ酸の欠失により、あるいは配列番号4に記載のアミノ酸配列又はそのC-末端の1～50個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入および/または付加により修飾されたアミノ酸配列を有し、且つエンドグルカナーゼの耐熱性酵素の活性を維持しているエンドグルカナーゼの変異体も本発明エンドグルカナーゼの範囲に属する。上記のアミノ酸配列の修飾に係るアミノ酸の数は1～数個、即ち10個以下であることが望ましく、好ましくは7個以下、例えば5個以下、例えば3個以下である。

上記の、エンドグルカナーゼのN-末端には、エンドグルカナーゼの生産性を増強するため、1～複数個、好ましくは1～20個のアミノ酸を付加する。付加するアミノ酸の数は、例えば1～15個であり、特に限定されない。付加するアミノ酸の種類は特に限定されず、例えば表1に示す如く、種々のアミノ酸を用いることが出来る。種々のアミノ酸又はアミノ酸配列の具体例として、例えば次のものが挙げられる。

Ala、Val、Thr、Asp、Asp-Pro、

Ala-Glu-Asp-Pro（配列番号：28）、

Ala-Glu-Glu-Ala-Ala-Asp-Pro（配列番号：29）、

Ala-Ala-Ala-Glu-Glu-Asp-Pro（配列番号：30）、

Ala-Glu-Ala-Ala-Ala-Asp-Pro（配列番号：31）、

Asn-Ser-Asp-Ser-Glu-Asp-Pro（配列番号：32）、

Ala-Glu-Glu-Ala-Ala-Thr-Thr-Thr-Asp-Pro (配列番号：33)

Ala-Gul-Glu-Ala-Ala-Thr-Thr-Thr-Ala-Pro-Lys-Asp-Pro (配列番号：34)

上記のアミノ酸やペプチドには、エンドグルカナーゼが分泌されるために生体膜を通過する過程で有利になると考えられる酸性アミノ酸 (Glu, Asp) や小さい中性アミノ酸 (Ala, Thrなど) を用いる一方、不利になるようなアミノ酸である塩基性アミノ酸 (Arg, Lys) や疎水性の強いアミノ酸 (Leu, Ile, Pheなど) を避ける。

バチルス・ブレビスを用いる異種タンパク質を菌体外に分泌生産するために使用される遺伝子構築物は、一般にプロモーター、SD配列、適切なシグナルペプチド、目的タンパク質をコードするDNA、およびバチルス・ブレビス菌中で目的タンパク質遺伝子を発現させるために必要な制御配列 (プロモーター、ターミネーター等) を含む適切な配列を適切な位置に有するものである。この構築物のために使用できるベクターは特定の種類の制限されず、バチルス・ブレビス菌中で機能し得るものであればよく、プラスミドのように染色体外で自律増殖するものであっても染色体に組込まれるものであってもよい。

バチルス・ブレビス由来のプラスミドは特に好ましい。これらには、例えばpHT926 (特開平4-216605号公報)、およびこれらを改良した薬剤耐性遺伝子を有するプラスミドが含まれる。バチルス・サチルス (枯草菌) で利用されているpUB110 (J. Bacteriol., 134, 318-329 (1978)) も利用できる。また、ファージ、トランスポゾン等も利用しうる。本発明に使用できるプロモーター、SD、改良前のシグナルペプチドは特に限定されず、宿主内で機能するものであればいずれでもよいが、バチルス・ブレビス47またはHPD31由来のプロモーター、SD、シグナルペプチドをコードする遺伝子 (J. Bacte

riol., 170, 935-945 (1988), J. Bacteriol., 172, 1312-1320 (1990)) を用いるのが有効である。

本発明で使用するシグナルペプチドは、バチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*) (新分類では、ブレビバチルス (*Brevibacillus*) 属に属する) 由来のものであり、好ましくはそれを修飾して改良したものである。このシグナルペプチドの本来のアミノ酸配列を配列番号：1 に示し、改良されたシグナルペプチドのアミノ酸配列の一例を下記：

配列番号 1 ; Met Lys Lys (Arg) n Val Val Asn Ser Val Leu (Leu) m

1 5 10

Ala Ser Ala Leu Ala Leu The Val Ala X1 X2 Ala Phe Ala

15 20 25

(ただし、 n , m はそれぞれ Arg が 0 ~ 2 個及び Leu が 3 ~ 5 個連続に配列することを示す。また X1 は Pro または Ala, X2 は Met または Asn である。)

に示し、その具体的な配列の一例を配列番号：2 に示す。

改良されたシグナルペプチドは、ヒト、動物を含む真核生物の遺伝子を発現・分泌させる場合に特に必要で、改良されたシグナルペプチドを使用しない場合に比べその生産効率は10倍以上になる (Appl. Microbial. Biotechnol., 42, 358-363 (1994); 特開平4-103891号公報)。そもそも、シグナルペプチドの改良なしには発現ベクターをバチルス・ブレビスへ導入することが非常に困難である。プラスミドを構築する方法としては、常法が適宜用いられ、例えば、Molecular cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982) に記載の方法等が例示される。

前記条件にて構築された発現ベクターに改変エンドグルカナーゼ遺伝子を挿入したプラスミドを用いて、微生物を形質転換すれば、

改変エンドグルカナーゼを効率良く分泌生産しうる形質転換体を得ることができる。外来遺伝子産物をコードする遺伝子を組込んだベクターで形質転換する宿主菌としては、ベクター、プロモーターが発現可能な微生物であれば何れでもよく、本発明ではバチルス・ブレビス細菌が用いられる。バチルス・ブレビスとは好気性のグラム陽性桿菌であり、例えばバチルス・ブレビス47（特開昭60-58074号公報、特開昭62-201583号公報）、バチルス・ブレビスH102（HPD31と同一の菌種）（特開昭63-56277号公報）等が挙げられる。また、これらの変異株も含まれる。

微生物を形質転換する方法は公知の方法でよく、例えば、Takahashi らの方法（J. Bacteriol., 156, 1130（1983））、やTakagiらの方法（Agric. Biol. Chem., 53, 3099-3100（1989））等が例示される。

得られた形質転換体の培養に用いる培地は、形質転換体が生育して、目的とする外来遺伝子産物を生産しうるものであればいかなるものでもよい。該培地に含有される炭素源としては、グルコース、グリセロール、でんぷん、糖蜜、有機酸等が挙げられる。窒素源としては、カゼイン、ペプトン、大豆ペプトン、酵母エキス、肉エキス、カザミノ酸、尿素等の有機窒素源と硫酸アンモニウム、塩酸アンモニウム等の無機窒素源等が挙げられる。また、糖と無機窒素源を主とする合成培地を用いて培養してもよい。栄養要求性を示す菌は、その生育に必要な栄養物質を培地に添加すればよい。該栄養物質としては、アミノ酸類、ビタミン類、核酸塩基等が挙げられる。

また、培養に際して必要であれば、培地に抗生物質、例えばアンピシリン、エリスロマイシン、ネオマイシン、クロラムフェニコール等が加えられる。さらに必要であればTween40等の界面活性剤、グリシン、消泡剤等が加えられる。

培地のpHは5～9.5であり、より好ましくは6～8である。好氣的条件下で、培養温度は通常20℃～40℃であり、培養時間は48～200時間である。

本発明によって菌体外に分泌されたタンパク質は、当該者によく知られた方法に従って培養後の培地から分離精製することができる。例えば、菌体を遠心分離等により除去した後、塩析、エタノール沈殿、限外濾過、ゲル濾過、イオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、等電点電気泳動等の既知の適切な方法、またはこれらを組み合わせることによって分離精製することができる。

実施例

本発明は以下の実施例および添付の図面によって、さらに具体的に説明されるが、これらはいかなる意味でも本発明を限定するものと解してはならない。

実施例において使用された発現・分泌ベクターは次の種類がある。枯草菌などで頻用されるpUB110 (Plasmid 15, 93-103 (1986)) をベースとして、その複製起点、pHW1 (J. Bacteriol., 150, 804-814 (1982)) のエリスロマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドへバチルス・ブレビス47菌の細胞表層タンパク質遺伝子 (mwp) (J. Bacteriol., 170, 176-186 (1988)) のプロモーター領域、さらにシグナルペプチドをコードする領域を挿入したpNU210 (Methods Enzymol., 217, 23-33 (1993)) が作成された。

プラスミドpNU212はpNU210のmwpの翻訳開始コドン近傍の1塩基を変更してBspHIサイトを造成し (pNU211の作成)、pNU211にある2ヶ所のNcoIサイトのうち、シグナルペプチド領域のサイトのみに変更してpNU212を作成した (Appl. Microbiol. Biotechnol., 42,

358-363 (1994))。

プラスミドpNH326はpNH300のmwpシグナル配列をR2L6シグナル配列 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 42, 358-363 (1994)) に変更して作成したものである (Appl. Environ. Microbiol., 66, 304-309 (2000))。プラスミドpNH300はP4、P5のプロモーター領域、mwpシグナル配列、並びにマルチクローニングサイトを有するpNU210のDNA断片をpUB110 (Plasmid, 15, 93-103 (1986)) に挿入して作成した。ベクターpNH300及びpNH326はネオマイシン耐性遺伝子のみを有し、これらプラスミドによる形質転換株の選択に使用する。

実施例 1. アミノ末端へ1ないし複数個のアミノ酸を付加したエンドグルカナーゼをコードする塩基配列を有する発現ベクターの調製

発現・分泌ベクターの構築の代表例として、アミノ末端にアミノ酸を付加したエンドグルカナーゼ遺伝子を発現ベクターに組込む様式を図1に示した。

(1) プラスミドpNUR2L6-EGの構築

プラスミドpNU212をBspHI-HindIIIにて消化して得られる約4.3kbの断片に、pNH326をBspHI-HindIIIにて消化して得られる約100bpの断片を連結し、プラスミドpNUR2L6を得た。

ピロコッカス・ホリコシ (Pyrococcus horikoshii) 由来のエンドグルカナーゼ遺伝子をコードするORF (PH1171) (配列番号4) を有するプラスミドpET-EGPh (Appl. Environ. Microbiol., 68, 430-433 (2002)) を鋳型として、順方向プライマー (配列番号5) および逆方向プライマー (配列番号6) を用いてPCRを行い、エンドグルカナーゼをコードするDNA断片を調製した。

得られた断片をNcoI-XbaIによって消化し、プラスミドpNUR2L6をNcoI-XbaIにて消化して得られる約4.3kbの断片と連結することによ

って、分泌されるエンドグルカナーゼのN末端には何も付加されない、エンドグルカナーゼ発現プラスミド (pNUR2L6-EG) を調製した。本プラスミド中のエンドグルカナーゼ遺伝子およびその近傍の塩基配列はABI prism 310 DNAシーケンサーを用いてプロモーター領域からエンドグルカナーゼ遺伝子の下流領域までの約1.5kbの塩基配列が正しいことを確認した。

配列番号 5 ; 5'-CATGCCATGG CTTTCGCTGA AAATACAACA TATCAAACAC CGA-3'

配列番号 6 ; 5'-GCTCTAGATC AAGAACTTTT GGAACAACATA T

(2) プラスミドpNUR2L6-A-EGの構築

上記pET-EGPhを鋳型として、順方向プライマー (配列番号 7) および逆方向プライマー (配列番号 6) を用いたPCRを実施し、エンドグルカナーゼをコードするDNA断片を調製した。得られた断片をPstI-XbaIによって消化し、プラスミドpNUR2L6をPstI-XbaIにて消化して得られる約4.4kbの断片と連結することによって、分泌されるエンドグルカナーゼのN末端にAlaが付加されるように、エンドグルカナーゼ発現プラスミド (pNUR2L6-A-EG) を調製した。この塩基配列の正しいことを上記 (1) と同様の方法で確認した。

配列番号 7 ; 5'-AACTGCAGAA AATACAACAT ATCAAACACC GA-3'

配列番号 6 ; 5'-GCTCTAGATC AAGAACTTTT GGAACAACATA T-3'

(3) プラスミドpNUR2L6-V-EGの構築

上記と同一の鋳型を使用し、配列番号 8 (順方向) および配列番号 6 の合成オリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、エンドグルカナーゼをコードするDNA断片を調製した。その後は、上記 (1) と同様の方法でエンドグルカナーゼのアミノ末端にValが付加したエンドグルカナーゼを発現するプラスミドを調製した。

配列番号 8 ; 5'-CATGCCATGG CTTTCGCAGT AGAAAATACA ACATATCAAA

CACCGA-3'

(4) プラスミド pNUR2L6-D-EG の構築

上記と同一の鋳型を使用し、配列番号 9（順方向）および配列番号 6 の合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR を行い、エンドグルカナーゼをコードする DNA 断片を調製した。その後は、上記（１）と同様の方法でエンドグルカナーゼのアミノ末端に Asp が付加したエンドグルカナーゼを発現するプラスミドを調製した。

配列番号 9 ; 5'-CATGCCATGG CTTTCGCAGA TGAAAATACA ACATATCAAA
CACCGA-3'

(5) プラスミド pNUR2L6-T-EG の構築

上記と同一の鋳型を使用し、配列番号 10（順方向）および配列番号 6 の合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR を行い、エンドグルカナーゼをコードする DNA 断片を調製した。その後は、上記（１）と同様の方法でエンドグルカナーゼのアミノ末端に Thr が付加したエンドグルカナーゼを発現するプラスミドを調製した。

配列番号 10 ; 5'-CATGCCATGG CTTTCGCAAC TGAAAATACA ACATATCAAA
CACCGA-3'

(6) プラスミド pNUR2L6-DP-EG の構築

上記と同一の鋳型を使用し、配列番号 11（順方向）および配列番号 6 の合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR を行い、エンドグルカナーゼをコードする DNA 断片を調製した。その後は、上記（１）と同様の方法でエンドグルカナーゼのアミノ末端に Asp-Pro が付加したエンドグルカナーゼを発現するプラスミドを調製した。

配列番号 11 ; 5'-CATGCCATGG CTTTCGCAGA TCCAGAAAAT ACAACATATC
AAACACCGA-3'

(7) プラスミド pNUR2L6-AEDP-EG の構築

上記鑄型を使用し、配列番号12および配列番号6のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、エンドグルカナーゼをコードするDNA断片を調製した。得られた断片をBamHI-XbaIによって消化し、プラスミド pNUR2L6をBamHI-XbaIにて消化して得られる約4.3 kbp の断片と連結し、プラスミド pNUR2L6cEGを得た。

得られたプラスミド pNUR2L6cEGをNcoI-BamHIによって消化して得られる約5.6kbp のDNA断片に、互いに相補的なオリゴヌクレオチド IP1 (配列番号13) および IP2 (配列番号14) 同士をアニールさせることによって調製した2本鎖DNA断片を結合し、分泌されるエンドグルカナーゼのN末端にAla-Glu-Asp-Proの配列 (配列番号: 28) が付加されるように、エンドグルカナーゼ発現プラスミド (pNUR2L6-AEDP-EG) を調製した。塩基配列の確認も行った。

配列番号12 ; 5'-CGGGATCCGG AAAATACAAC ATATCAAACA CCGA-3'

配列番号13 ; 5'-CATGGCTTTC GCAGCAGAA-3'

配列番号14 ; 5'-GATCTTCTGC TGCGAAAGC-3'

(8) プラスミド pNUR2L6-AEEAADP-EG の構築

プラスミド pNUR2L6cEGをNcoI-BamHIにて消化して得られる約5.6kbpのDNA断片に、互いに相補的なオリゴヌクレオチド IP5 (配列番号15) および IP6 (配列番号16) 同士をアニールさせた2本鎖DNA断片を結合し、分泌されるエンドグルカナーゼのN末端にAla-Glu-Glu-Ala-Ala-Asp-Proの配列 (配列番号: 29) が付加されるように、エンドグルカナーゼ発現プラスミドを調製した。塩基配列の確認も行った。

配列番号15 ; 5'-CATGGCTTTC GCAGCAGAAG AAGCAGCA-3'

配列番号16 ; 5'-GATCTGCTGC TTCTTCTGCT GCGAAAGC-3'

(9) プラスミド pNUR2L6-AAAEEDP-EG の構築

プラスミドpNUR2L6cEGをNcoI-BamHIにて消化して得られる約5.6kbのDNA断片に、互いに相補的なオリゴヌクレオチドIP7（配列番号17）およびIP8（配列番号18）同士をアニールさせた2本鎖DNA断片を結合し、分泌されるエンドグルカナーゼのN末端にAla-Ala-Ala-Glu-Glu-Asp-Proの配列（配列番号：30）が付加されるように、エンドグルカナーゼ発現プラスミドを調製した。塩基配列の確認も行った。

配列番号17；5'-CATGGCTTTC GCAGCAGCAG CTGAAGAA-3'

配列番号18；5'-GATCTTCTTC AGCTGCTGCT GCGAAAGC-3'

（10）プラスミドpNUR2L6-AEAAADP-EGの構築

プラスミドpNUR2L6cEGをNcoI-BamHIにて消化して得られる約5.6kbのDNA断片に、互いに相補的なオリゴヌクレオチドIP9（配列番号19）およびIP10（配列番号20）同士をアニールさせた2本鎖DNA断片を結合し、分泌されるエンドグルカナーゼのN末端にAla-Glu-Ala-Ala-Ala-Asp-Proの配列（配列番号：31）が付加されるように、エンドグルカナーゼ発現プラスミドを調製した。塩基配列も確認した。

配列番号19；5'-CATGGCTTTC GCAGCAGAAG CAGCAGCA-3'

配列番号20；5'-GATCTGCTGC TGCTTCTGCT GCGAAAGC-3'

（11）プラスミドpNUR2L6-NSDSEDP-EGの構築

プラスミドpNUR2L6cEGをNcoI-BamHIにて消化して得られる約5.6kbのDNA断片に、互いに相補的なオリゴヌクレオチドIP11（配列番号21）およびIP12（配列番号22）同士をアニールさせた2本鎖DNA断片を結合し、分泌されるエンドグルカナーゼのN末端にAsn-Ser-Asp-Ser-Glu-Asp-Proの配列（配列番号：32）が付加されるように、エンドグルカナーゼ発現プラスミドを調製した。塩基配列も確認した。

配列番号21 ; 5'-CATGGCTTTC GCAAACAGTG ATAGTGAA-3'

配列番号22 ; 5'-GATCTTCACT ATCACTGTTT GCGAAAGC-3'

(12) プラスミドpNUR2L6-AEEAATTTDP-EGの構築

プラスミドpNUR2L6cEGをNcoI-BamHIにて消化して得られる約5.6kbのDNA断片に、互いに相補的なオリゴヌクレオチドIP13（配列番号23）およびIP14（配列番号24）同士をアニールさせた2本鎖DNA断片を結合し、分泌されるエンドグルカナーゼのN末端にAla-Glu-Glu-Ala-Ala-Thr-Thr-Thr-Asp-Pro（配列番号：33）の配列が付加されるように、エンドグルカナーゼ発現プラスミドを調製した。塩基配列も確認した。

配列番号23 ; 5'-CATGGCTTTC GCAGCAGAAG AAGCAGCAAC TACTACA-3'

配列番号24 ; 5'-GATCTGTAGT AGTTGCTGCT TCTTCTGCTG CGAAAGC-3'

(13) プラスミドpNUR2L6-AEEAATTTAPKDP-EGtの構築

上記（1）のpET-EGPhを鋳型に使用し、配列番号12および配列番号27のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、エンドグルカナーゼをコードするDNA断片を調製した。得られた断片をBamHI-XbaIによって消化し、プラスミドpNUR2L6をBamHI-XbaIにて消化して得られる約4.3kbpの断片と連結し、プラスミドpNUR2L6cEGtを得た。

EGtは配列番号3に示すエンドグルカナーゼ遺伝子からコードされるポリペプチド（シグナルペプチドを除く、第1アミノ酸残基から第430アミノ酸残基まで）であり、EGはEGtよりカルボキシ末端から42アミノ酸残基少ないポリペプチド。

得られたプラスミドpNUR2L6cEGtをNcoI-BamHIによって消化して得られる約5.6kbのDNA断片に、互いに相補的なオリゴヌクレオチドIP15（配列番号25）およびIP16（配列番号26）同士をアニールさせた2本鎖DNA断片を結合し、分泌されるエンドグルカナーゼのN末

端にAla-Glu-Glu-Ala-Ala-Thr-Thr-Thr-Ala-Pro-Lys-Asp-Pro（配列番号：34）の配列が付加されるように、エンドグルカナーゼ発現プラスミドを調製した。

本プラスミド中のエンドグルカナーゼ遺伝子およびその近傍の塩基配列はABI prism 310 DNAシーケンサーを用いてプロモーター領域からエンドグルカナーゼ遺伝子の下流領域までの約1.5kbpの塩基配列が正しいことを確認した。

配列番号25；5'-CATGGCTTTC GCAGCAGAAG AAGCAGCAAC TACTACAGCT CCAAAG-3'

配列番号26；5'-GATCCTTTGG AGCTGTAGTA GTTGCTGCTT CTTCTGCTGC GAAAGC-3'

配列番号27；5'-GCTCTAGACT ACCTGGGAGC CCTTCTTAAG-3'

(14) プラスミドpNU212-EGの構築

上記（1）のpET-EGPhを鋳型として、配列番号5および配列番号6の合成オリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCRを実施し、エンドグルカナーゼをコードするDNA断片を調製した。得られた断片をNcoI-XbaIにて消化し、プラスミドpNU212をNcoI-XbaIにて消化して得られる断片約4.3kbの断片と連結することによって、分泌されるエンドグルカナーゼの末端には何も付加されない、エンドグルカナーゼ発現プラスミド（pNU212-EG）を調製した。また、本発現プラスミドは、改良配列ではなく原配列のシグナルペプチドを有する。塩基配列も確認した。

(15) プラスミドpNU212-A-EGの構成

上記（1）のpET-EGPhを鋳型として、配列番号7および配列番号6の合成オリゴヌクレオチドをプライマーに用いてPCRを行い、エンドグルカナーゼをコードするDNA断片を調製した。得られた断片をPstI-XbaIによって消化し、プラスミドpNU212をPstI-XbaIで消化

してえられる約4.3kbの断片と連結することによって、分泌されるエンドグルカナーゼのN末端にAlaが付加されるように、発現プラスミド（pNU212-A-EG）を調製した。塩基配列も確認した。

（16）プラスミドpNU212-A-EGtの構築

上記（1）のpET-EGPhを鋳型として、配列番号7および配列番号27の合成オリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、エンドグルカナーゼをコードするDNA断片を調整した。この後のプラスミド調製過程は上記（15）の場合と全く同様であるが、得られた発現プラスミドはpNU212-A-EGtであった。塩基配列も確認した。

（17）プラスミドpNH326-A-EGの構築

上記（1）のpET-EGPhを鋳型として、EG3（配列番号7）およびEG2（配列番号6）をプライマーとしたPCRを実施し、エンドグルカナーゼをコードするDNA断片を調製した。得られた断片をPstI-XbaIによって消化し、プラスミドpNH326をPstI-XbaIにて消化して得られる約3.9kbpの断片と連結することによって、分泌されるエンドグルカナーゼのN末端にAlaが付加されるように、エンドグルカナーゼ発現プラスミドを調製した。本プラスミド中のエンドグルカナーゼ遺伝子およびその近傍の塩基配列はABI prism 310 DNAシーケンサーを用いてプロモーター領域からエンドグルカナーゼ遺伝子の下流領域までの約1.5kbpの塩基配列が正しいことを確認した。

（18）プラスミドpNH326-A-EGtの構築

上記（1）のpET-EGPhを鋳型として、EG3（配列番号7）およびEG8（配列番号27）をプライマーとしたPCRを実施し、エンドグルカナーゼをコードするDNA断片を調製した。得られた断片をPstI-XbaIによって消化し、プラスミドpNH326をPstI-XbaIにて消化して得られる約3.9kbpの断片と連結することによって、分泌されるエンドグルカナーゼのN末端にAlaが付加されるように、エンドグルカナー

ゼ発現プラスミドを調製した。本プラスミド中のエンドグルカナーゼ遺伝子およびその近傍の塩基配列はABI prism 310 DNAシーケンサーを用いてプロモーター領域からエンドグルカナーゼ遺伝子の下流領域までの約1.5kbpの塩基配列が正しいことを確認した。

実施例 2. 発現ベクターを有するバチルス・ブレビスによるエンドグルカナーゼの分泌生産

実施例 1 の (1) ～ (18) で構築した各種発現ベクター・プラスミドによってバチルス・ブレビス HPD31 株、或いは 31-0K 株を形質転換し、得られた形質転換体を好氣的に培養することによって、エンドグルカナーゼを培養液中に分泌生産させた。生産はそれぞれの菌を生産用培地（3 % ポリペプトン-S、0.8 % 酵母エキス、3 % グルコース、その他、必要に応じて各種金属塩、Tween-40、エリスロマイシン、ネオマイシン等を含有する）に接種し、30℃、振とう培養で数日間培養することにより行った。それらの培養液の上清中のエンドグルカナーゼ活性を測定した結果を表 1 に示す。

分泌生産されたエンドグルカナーゼ量は、カルボキシメチルセルロース（CMC）を基質として活性を測定することにより測定した。0.2ml の 1 % CMC 水溶液と 0.2ml の 0.2M 酢酸緩衝液（pH5.6）を混合し、これに 50mM トリスー塩酸緩衝液（pH8.0）に対して一晚透析した培養液上清を加え、85℃にて反応させた。0.2ml の反応液と 0.4ml の Somogi 銅液を混合し、沸騰浴中にて 20 分間加熱した後、0.4ml の Nelson 試薬を混合した。

この溶液の、500nm における吸光度を測定し、別にグルコースを用いて作成した検量線より、還元性末端量（Main）を測定した。また、培養液の代わりに 50mM トリスー塩酸緩衝液（pH5.6）を用いたブランク 1、CMC の代わりに水を用いたブランク 2 を同様に処理し、それぞれの還元性末端量を測定した。Main の値とブランク 1 およ

びブランク 2 の差を算出することにより、反応によって増加した還元性末端量を求めた。活性 1 単位 (U) は CMC から 1 分間に 1 mg グルコースに相当する還元力を生じる酵素量と定義した。精製酵素の比活性は 8.5 U/mg タンパク質であった。

表 1. アミノ末端にアミノ酸を付加したエンドグルカナーゼのバチルス・ブレビスによる生産。

発現・分泌ベクター	シグナルペプチド	付加したアミノ酸	タイプ**	エンドグルカナーゼのタイプと生産量*	
				2日目	4日目
pNUR2L6	改良配列	None	EG	0.03	0.04
"	"	A	"	0.50	0.75
"	"	V	"	0.42	0.70
"	"	T	"	0.18	0.20
"	"	D	"	0.12	0.16
"	"	DP	"	0.20	0.58
"	"	AEDP	"	0.25	0.18
"	"	AEAAADP	"	0.40	0.78
"	"	AAAEEDP	"	0.24	0.23
"	"	AEAAADP	"	0.26	0.26
"	"	NSDSED	"	0.22	0.20
"	"	AEAAATTTDP	"	0.37	0.47
"	"	AEAAATTTAPKDP	Egt	<0.01	0.21
pNU212	原配列	None	EG	<0.01	0.05
"	"	A	"	<0.01	0.05
"	"	A	Egt	0.01	0.03
pNH326	改良配列	A	EG	0.53	1.05
"	"	A	Egt	0.05	0.18

* : 培養液上澄 ml 当りの酵素活性 unit 数。 ** : Egtについては実施例 1 の (13) にて説明。

表 1 から、エンドグルカナーゼ生産量は、そのアミノ末端に 1 ないし数個のアミノ酸を付加した場合にアミノ酸を付加しない場合の生産量の 5～20 数倍になり、顕著に増加することが分かる。また、本酵素の生産量をその比活性で重量に換算すると、効率よい場合は 1 リットル当たり 100mg 以上であり、大腸菌による生産量の約 100 倍であった。

実施例 1 の (2) 及び (13) の発現ベクターによって得られたエンドグルカナーゼを含有する培養液を遠心分離し、菌体を除いた後、硫酸塩析、陰イオン交換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、ゲルろ過クロマトグラフィー等により、電気泳動的に単一に精製した。そのタンパク質の分子量、酵素活性、耐熱性、最適 pH、基質特異性、などは、大腸菌で生産されたものと一致した。アミノ末端のアミノ酸配列を決定したところ、(2) 及び (13) のどちらの場合も A 或いは AEEAATTTAPKDP の付加したエンドグルカナーゼが生産されていることが明らかになり、それらの付加アミノ酸やペプチドが酵素の性質に有意の影響を与えていないことが示された。

請 求 の 範 囲

1. バチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*) 由来のシグナルペプチド領域をコードするDNA配列の下流に、超好熱性古細菌由来でアミノ末端 (N-末端) に 1 ないし 20 個のアミノ酸を付加したエンドグルカナーゼをコードする核酸配列が接続された遺伝子発現ベクターを有するバチルス (*Bacillus*) 属細菌を培養し、エンドグルカナーゼを産生および分泌させることを特徴とする、古細菌由来超耐熱性エンドグルカナーゼの製造方法。

2. 前記シグナルペプチドがバチルス・ブレビス由来で細胞表面タンパク質遺伝子のシグナルペプチドを改変した下記のアミノ酸配列：

配列番号 1 ; Met Lys Lys (Arg)_n Val Val Asn Ser Val Leu (Leu)_m

1 5 10

Ala Ser Ala Leu Ala Leu The Val Ala X1 X2 Ala Phe Ala

15 20 25

(ただし、*n*, *m* はそれぞれ Arg が 0 ~ 2 個及び Leu が 3 ~ 5 個連続に配列することを示す。また X1 は Pro または Ala, X2 は Met または Asn である。)

を有するペプチドである請求項 1 記載の方法。

3. 前記エンドグルカナーゼがピロコッカス (*Pyrococcus*) 属古細菌由来のエンドグルカナーゼである請求項 1 及び 2 記載の方法。

4. 前記エンドグルカナーゼが配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

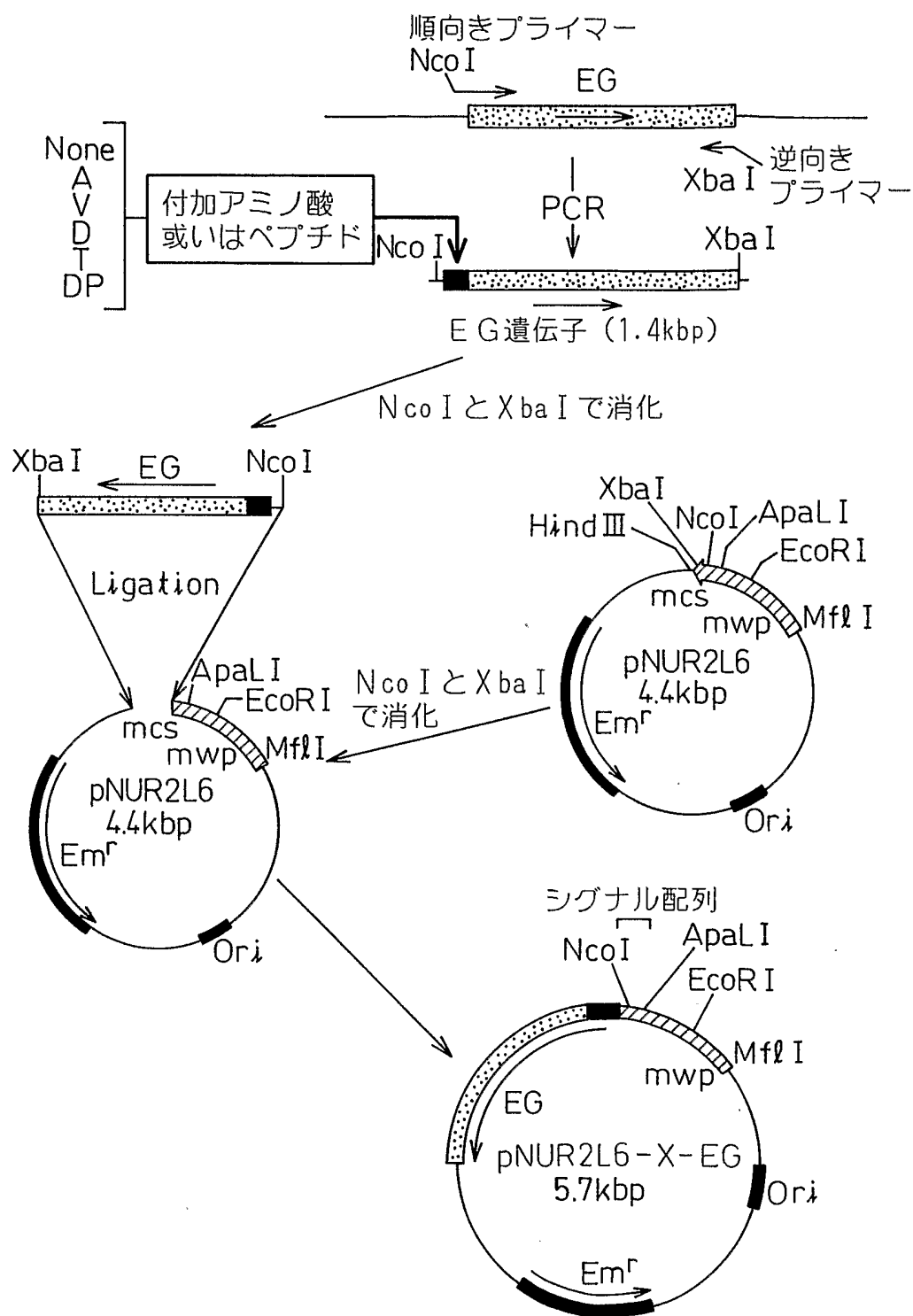
5. 前記エンドグルカナーゼが、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において N-末端における 1 ~ 50 個のアミノ酸の欠失により、あるいは配列番号 4 に記載のアミノ酸配列又はその C-末端の 1 ~ 50

個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入および/または付加により修飾されたアミノ酸配列を有する請求項1～3に記載の方法。

6. 前記エンドグルカナーゼのN-末端に付加されるアミノ酸の数が1～15個である、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

7. 前記エンドグルカナーゼのN-末端に付加されるアミノ酸が、次のアミノ酸またはアミノ酸配列：Ala、Val、Thr、Asp、Asp-Pro、Ala-Glu-Asp-Pro（配列番号：28）、Ala-Glu-Glu-Ala-Ala-Asp-Pro（配列番号：29）、Ala-Ala-Ala-Glu-Glu-Asp-Pro（配列番号：30）、Ala-Glu-Ala-Ala-Ala-Asp-Pro（配列番号：31）、Asn-Ser-Asp-Ser-Glu-Asp-Pro（配列番号：32）、Ala-Glu-Glu-Ala-Ala-Thr-Thr-Thr-Asp-Pro（配列番号：33）またはAla-Glu-Glu-Ala-Ala-Thr-Thr-Thr-Ala-Pro-Lys-Asp-Pro（配列番号：34）を構成する、請求項6に記載の方法。

Fig.1



SEQUENCE LISTING

<110> Shigezo Uda

<120> Process for production of hyperthermostable endoglucanase

<130> M899

<160> 34

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> Bacillus brevis

<223> signal peptide from Bacillus brevis

<400> 1

Met Lys Lys Val Val Asn Ser Val Leu Ala Ser Ala Leu Ala Leu Thr

1 5 10 15

Val Ala Pro Met Ala Phe Ala

20

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> modified signal peptide from Bacillus brevis

<400> 2

Met Lys Lys Arg Arg Val Val Asn Ser Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ala Ser Ala Leu Ala Leu Thr Val Ala Pro Met Ala Phe Ala

20 25 30

<210> 3

<211> 1377

<212> DNA

<213> *Pyrococcus horikoshii*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1374)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(84)

<220> mat_peptide

<222> (85)..(1374)

<223> nucleotide sequence encoding endoglucanase

<400> 3

atg gag ggg aat act att ctt aaa atc gta cta att tgc act att tta	48
Met Glu Gly Asn Thr Ile Leu Lys Ile Val Leu Ile Cys Thr Ile Leu	
-25 -20 -15	
gca ggc cta ttc ggg caa gtc gtg cca gta tat gca gaa aat aca aca	96
Ala Gly Leu Phe Gly Gln Val Val Pro Val Tyr Ala Glu Asn Thr Thr	
-10 -5 -1 1	
tat caa aca ccg act gga att tac tac gaa gtg aga gga gat acg ata	144
Tyr Gln Thr Pro Thr Gly Ile Tyr Tyr Glu Val Arg Gly Asp Thr Ile	
5 10 15 20	
tac atg att aat gtc acc agt gga gag gaa act ccc att cat ctc ttt	192
Tyr Met Ile Asn Val Thr Ser Gly Glu Glu Thr Pro Ile His Leu Phe	
25 30 35	

ggt gta aac tgg ttt ggc ttt gaa aca cct aat cat gta gtg cac gga 240
 Gly Val Asn Trp Phe Gly Phe Glu Thr Pro Asn His Val Val His Gly
 40 45 50
 ctt tgg aag aga aac tgg gaa gac atg ctt ctt cag atc aaa agc tta 288
 Leu Trp Lys Arg Asn Trp Glu Asp Met Leu Leu Gln Ile Lys Ser Leu
 55 60 65
 ggc ttc aat gca ata aga ctt cct ttc tgt act gag tct gta aaa cca 336
 Gly Phe Asn Ala Ile Arg Leu Pro Phe Cys Thr Glu Ser Val Lys Pro
 70 75 80
 gga aca caa cca att gga ata gat tac agt aaa aat cca gat ctt cgt 384
 Gly Thr Gln Pro Ile Gly Ile Asp Tyr Ser Lys Asn Pro Asp Leu Arg
 85 90 95 100
 gga cta gat agc cta cag att atg gaa aag atc ata aag aag gcc gga 432
 Gly Leu Asp Ser Leu Gln Ile Met Glu Lys Ile Ile Lys Lys Ala Gly
 105 110 115
 gat ctt ggt atc ttt gtc tta ctc gac tat cat agg ata gga tgc act 480
 Asp Leu Gly Ile Phe Val Leu Leu Asp Tyr His Arg Ile Gly Cys Thr
 120 125 130
 cac ata gaa ccc ctc tgg tac acg gaa gac ttc tca gag gaa gac ttt 528
 His Ile Glu Pro Leu Trp Tyr Thr Glu Asp Phe Ser Glu Glu Asp Phe
 135 140 145
 att aac aca tgg ata gag gtt gcc aaa agg ttc ggt aag tac tgg aac 576
 Ile Asn Thr Trp Ile Glu Val Ala Lys Arg Phe Gly Lys Tyr Trp Asn
 150 155 160
 gta ata ggg gct gat cta aag aat gag cct cat agt gtt acc tca ccc 624
 Val Ile Gly Ala Asp Leu Lys Asn Glu Pro His Ser Val Thr Ser Pro
 165 170 175 180

cca gct gct tat aca gat ggt acc ggg gct aca tgg ggt atg gga aac	672
Pro Ala Ala Tyr Thr Asp Gly Thr Gly Ala Thr Trp Gly Met Gly Asn	
185 190 195	
cct gca acc gat tgg aac ttg gcg gct gag agg ata gga aaa gcg att	720
Pro Ala Thr Asp Trp Asn Leu Ala Ala Glu Arg Ile Gly Lys Ala Ile	
200 205 210	
ctg aag gtt gcc cct cat tgg ttg ata ttc gtg gag ggg aca caa ttt	768
Leu Lys Val Ala Pro His Trp Leu Ile Phe Val Glu Gly Thr Gln Phe	
215 220 225	
act aat ccg aag act gac agt agt tac aaa tgg ggc tac aac gct tgg	816
Thr Asn Pro Lys Thr Asp Ser Ser Tyr Lys Trp Gly Tyr Asn Ala Trp	
230 235 240	
tgg gga gga aat cta atg gcc gta aag gat tat cca gtt aac tta cct	864
Trp Gly Gly Asn Leu Met Ala Val Lys Asp Tyr Pro Val Asn Leu Pro	
245 250 255 260	
agg aat aag cta gta tac agc cct cac gta tat ggg cca gat gtc tat	912
Arg Asn Lys Leu Val Tyr Ser Pro His Val Tyr Gly Pro Asp Val Tyr	
265 270 275	
aat caa ccg tac ttt ggt ccc gct aag ggt ttt ccg gat aat ctt cca	960
Asn Gln Pro Tyr Phe Gly Pro Ala Lys Gly Phe Pro Asp Asn Leu Pro	
280 285 290	
gat atc tgg tat cac cac ttt gga tac gta aaa tta gaa cta gga tat	1008
Asp Ile Trp Tyr His His Phe Gly Tyr Val Lys Leu Glu Leu Gly Tyr	
295 300 305	
tca gtt gta ata gga gag ttt gga gga aaa tat ggg cat gga ggc gat	1056
Ser Val Val Ile Gly Glu Phe Gly Gly Lys Tyr Gly His Gly Gly Asp	
310 315 320	

cca agg gat gtt ata tgg caa aat aag cta gtt gat tgg atg ata gag 1104
Pro Arg Asp Val Ile Trp Gln Asn Lys Leu Val Asp Trp Met Ile Glu
325 330 335 340
aat aaa ttt tgt gat ttc ttt tac tgg agc tgg aat cca gat agt gga 1152
Asn Lys Phe Cys Asp Phe Phe Tyr Trp Ser Trp Asn Pro Asp Ser Gly
345 350 355
gat acc gga ggg att cta cag gat gat tgg aca aca ata tgg gaa gat 1200
Asp Thr Gly Gly Ile Leu Gln Asp Asp Trp Thr Thr Ile Trp Glu Asp
360 365 370
aag tat aat aac ctg aag aga ttg atg gat agt tgt tcc aaa agt tct 1248
Lys Tyr Asn Asn Leu Lys Arg Leu Met Asp Ser Cys Ser Lys Ser Ser
375 380 385
tca agt act caa tcc gtt att cgg agt acc acc cct aca aag tca aat 1296
Ser Ser Thr Gln Ser Val Ile Arg Ser Thr Thr Pro Thr Lys Ser Asn
390 395 400
aca agt aag aag att tgt gga cca gca att ctt atc atc cta gca gta 1344
Thr Ser Lys Lys Ile Cys Gly Pro Ala Ile Leu Ile Ile Leu Ala Val
405 410 415 420
ttc tct ctt ctc tta aga agg gct ccc agg tag 1377
Phe Ser Leu Leu Leu Arg Arg Ala Pro Arg
425 430

<210> 4

<211> 458

<212> PRT

<213> *Pyrococcus horikoshii*

<220>

<223> amino acid sequence of endoglucanase

<400> 4

Met Glu Gly Asn Thr Ile Leu Lys Ile Val Leu Ile Cys Thr Ile Leu
 -25 -20 -15
 Ala Gly Leu Phe Gly Gln Val Val Pro Val Tyr Ala Glu Asn Thr Thr
 -10 -5 -1 1
 Tyr Gln Thr Pro Thr Gly Ile Tyr Tyr Glu Val Arg Gly Asp Thr Ile
 5 10 15 20
 Tyr Met Ile Asn Val Thr Ser Gly Glu Glu Thr Pro Ile His Leu Phe
 25 30 35
 Gly Val Asn Trp Phe Gly Phe Glu Thr Pro Asn His Val Val His Gly
 40 45 50
 Leu Trp Lys Arg Asn Trp Glu Asp Met Leu Leu Gln Ile Lys Ser Leu
 55 60 65
 Gly Phe Asn Ala Ile Arg Leu Pro Phe Cys Thr Glu Ser Val Lys Pro
 70 75 80
 Gly Thr Gln Pro Ile Gly Ile Asp Tyr Ser Lys Asn Pro Asp Leu Arg
 85 90 95 100
 Gly Leu Asp Ser Leu Gln Ile Met Glu Lys Ile Ile Lys Lys Ala Gly
 105 110 115
 Asp Leu Gly Ile Phe Val Leu Leu Asp Tyr His Arg Ile Gly Cys Thr
 120 125 130
 His Ile Glu Pro Leu Trp Tyr Thr Glu Asp Phe Ser Glu Glu Asp Phe
 135 140 145
 Ile Asn Thr Trp Ile Glu Val Ala Lys Arg Phe Gly Lys Tyr Trp Asn
 150 155 160
 Val Ile Gly Ala Asp Leu Lys Asn Glu Pro His Ser Val Thr Ser Pro
 165 170 175 180

Pro Ala Ala Tyr Thr Asp Gly Thr Gly Ala Thr Trp Gly Met Gly Asn
185 190 195

Pro Ala Thr Asp Trp Asn Leu Ala Ala Glu Arg Ile Gly Lys Ala Ile
200 205 210

Leu Lys Val Ala Pro His Trp Leu Ile Phe Val Glu Gly Thr Gln Phe
215 220 225

Thr Asn Pro Lys Thr Asp Ser Ser Tyr Lys Trp Gly Tyr Asn Ala Trp
230 235 240

Trp Gly Gly Asn Leu Met Ala Val Lys Asp Tyr Pro Val Asn Leu Pro
245 250 255 260

Arg Asn Lys Leu Val Tyr Ser Pro His Val Tyr Gly Pro Asp Val Tyr
265 270 275

Asn Gln Pro Tyr Phe Gly Pro Ala Lys Gly Phe Pro Asp Asn Leu Pro
280 285 290

Asp Ile Trp Tyr His His Phe Gly Tyr Val Lys Leu Glu Leu Gly Tyr
295 300 305

Ser Val Val Ile Gly Glu Phe Gly Gly Lys Tyr Gly His Gly Gly Asp
310 315 320

Pro Arg Asp Val Ile Trp Gln Asn Lys Leu Val Asp Trp Met Ile Glu
325 330 335 340

Asn Lys Phe Cys Asp Phe Phe Tyr Trp Ser Trp Asn Pro Asp Ser Gly
345 350 355

Asp Thr Gly Gly Ile Leu Gln Asp Asp Trp Thr Thr Ile Trp Glu Asp
360 365 370

Lys Tyr Asn Asn Leu Lys Arg Leu Met Asp Ser Cys Ser Lys Ser Ser
375 380 385

Ser Ser Thr Gln Ser Val Ile Arg Ser Thr Thr Pro Thr Lys Ser Asn

390

395

400

Thr Ser Lys Lys Ile Cys Gly Pro Ala Ile Leu Ile Ile Leu Ala Val

405

410

415

420

Phe Ser Leu Leu Leu Arg Arg Ala Pro Arg

425

430

<210> 5

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer

<400> 5

catgccatgg ctttcgctga aaatacaaca tatcaaacac cga

43

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer

<400> 6

gctctagatc aagaactttt ggaacaacta t

31

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer

<400> 7

aactgcagaa aatacaacat atcaaacacc ga

32

<210> 8

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer

<400> 8

catgccatgg ctttcgcagt agaaaataca acatatcaaa caccga

46

<210> 9

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer

<400> 9

catgccatgg ctttcgcaga tgaaaataca acatatcaaa caccga

46

<210> 10

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer

<400> 10

catgccatgg ctttcgcaac tgaaaataca acatatcaaa caccga

46

<210> 11

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer

<400> 11

catgccatgg ctttcgcaga tccagaaaat acaacatatc aaacaccga

49

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer

<400> 12

cgggatccgg aaaatacaac atatcaaaca ccga

34

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer

<400> 13

catggctttc gcagcagaa

19

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer

<400> 14

gatcttctgc tgcgaaagc

19

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer

<400> 15

catggctttc gcagcagaag aagcagca

28

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer

<400> 16

gatctgctgc ttcttctgct gcgaaagc

28

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer

<400> 17	
catggctttc gcagcagcag ctgaagaa	28
<210> 18	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> reverse primer	
<400> 18	
gatcttcttc agctgctgct gcgaaagc	28
<210> 19	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> forward primer	
<400> 19	
catggctttc gcagcagaag cagcagca	28
<210> 20	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> reverse primer	
<400> 20	
gatctgctgc tgcttctgct gcgaaagc	28
<210> 21	

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer

<400> 21

catggctttc gcaaacagtg atagtga

28

<210> 22

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer

<400> 22

gatcttcact atcactgttt gcgaaagc

28

<210> 23

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 37

<223> forward primer

<400> 23

catggctttc gcagcagaag aagcagcaac tactaca

37

<210> 24

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer

<400> 24

gatctgtagt agttgctgct tcttctgctg cgaaagc

37

<210> 25

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 46

<223> forward primer

<400> 25

catggctttc gcagcagaag aagcagcaac tactacagct ccaaag

46

<210> 26

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer

<400> 26

gatacctttgg agctgtagta gttgctgctt cttctgctgc gaaagc

46

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer

<400> 27

gctctagact acctgggagc ctttcttaag

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12998

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N9/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N9/42

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq,
Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Susumu ANDO et al., Hyperthermostable endo glucanase from <i>Pyrococcus horikoshii</i> ., Applied and Environmental Microbiology, 2002, Vol.68, No.1, pages 430 to 433	1-7
Y	JP 7-170987 A (Juzo UDAKA), 11 July, 1995 (11.07.95), (Family: none)	1-7
Y	Tsutomu KAJINO et al., Efficient production of artificially designed gelatins with <i>Bacillus brevis</i> system., Applied and Environmental Microbiology, 2000, Vol.66, No.1, pages 304 to 309	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
05 December, 2003 (05.12.03)

Date of mailing of the international search report
24 December, 2003 (24.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/12998

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 6-38741 A (Kumamoto-Ken, Higeta Shoyu Co., Ltd., Tonen Corp.), 15 February, 1994 (05.02.94), (Family: none)	1-7
Y	JP 11-341991 A (Itoham Foods Inc., Juzo UDAKA), 14 December, 1999 (14.12.99), (Family: none)	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N9/42

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N9/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS/WPI(DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Susumu Ando et al., Hyperthermostable endoglucanase from <i>Pyrococcus horikoshii</i> , Applied and Environmental Microbiology, 2002, Vol.68, No.1, p.430-433	1-7
Y	JP 7-170987 A (鵜高重三) 1995.07.11 (ファミリーなし)	1-7
Y	Tsutomu Kajino et al., Efficient production of artificially designed gelatins with a <i>Bacillus brevis</i> system., Applied and Environmental Microbiology, 2000, Vol.66, No.1, p.304-309	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.12.03

国際調査報告の発送日

24.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

印

4B

3227

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 6-38741 A (熊本県, ヒゲタ醤油株式会社, 東燃株式会社) 1994. 02. 15 (ファミリーなし)	1 - 7
Y	JP 11-341991 A (伊藤ハム株式会社, 鵜高重三) 1999. 12. 14 (ファミリーなし)	1 - 7