(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2006 年11 月16 日 (16.11.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/121165 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 21/02 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/309598

(22) 国際出願日: 2006 年5 月12 日 (12.05.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2005-139798 2005 年5 月12 日 (12.05.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目１５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 板屋 寛 (ITAYA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 菊池 慶実 (KIKUCHI, Yoshimi) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 伊達 雅代 (DATE, Masayo) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋３丁目４番１０号 アクロポリス２１ビル６階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, 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, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (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
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

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。

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING PROTEIN

(54) 発明の名称: タンパク質の製造法

(57) **Abstract:** By culturing a methanol-assimilating bacterium having a DNA construct containing a promoter sequence which functions in the methanol-assimilating bacterium and a nucleotide sequence encoding a polypeptide containing a signal sequence and an objective protein sequence, which are connected to the promoter sequence such that they can be expressed, in a liquid medium containing methanol as a major carbon source, the bacterium is allowed to secrete the objective protein, and the secreted objective protein is recovered.

(57) 要約: メタノール資化性細菌で機能するプロモーター配列、及び該プロモーター配列に発現可能に連結された、シグナル配列および目的タンパク質配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含むDNA構築物を保持するメタノール資化性細菌を、メタノールを主要炭素源とする液体培地中で培養することにより、該細菌に目的タンパク質を分泌させ、分泌された目的タンパク質を回収する。

WO 2006/121165 A1

明 細 書

タンパク質の製造法

技術分野

[0001] 本発明は、産業上有用な酵素や生理活性タンパク質を含むタンパク質を、メタノール資化性細菌を用いて分泌生産する方法に関する。

背景技術

[0002] メタノールは、安価で大量に入手可能な発酵原料であり、炭素源として非常に有用である。これまでにメタノールを主要炭素源として、メタノール資化性細菌を用いてL-アミノ酸を製造する方法(特許文献1参照)、メタノール資化性細菌を用いて多糖を製造する方法(特許文献2参照)が開発されていた。

[0003] また、これまでにPichia属酵母においてアルコールオキシダーゼ(AOX)遺伝子のプロモーターを使って、メタノールで誘導することによってlacZを菌体内に生産させた例(非特許文献1参照)や、アプロチニン(ウシ由来 膵臓トリプシンインヒビター)を活性型にて培養上清に分泌させた例(非特許文献2参照)が知られている。

また、メタノール資化性細菌のうち、非偏性メタノール資化性細菌であるMethylobacterium extorquensの細胞内に蛍光蛋白質(GFP)を蓄積せしめた例(特許文献3、非特許文献3)は知られているが、偏性メタノール資化性細菌において菌体外へ蛋白質を分泌させた例は知られていない。

特許文献1:欧州特許公開第1188822号明細書
特許文献2:特開平11－56384号公報
特許文献3:WO2003/046226 A1
非特許文献1:Nucleic Acids Res. 1987 May 11;15(9):3859-76.
非特許文献2:J Ind Microbiol. 1991 Apr;7(3):197-201.
非特許文献3:FEMS Microbiol Lett. 2000 Dec 15;193(2):195-200

発明の開示

[0004] 本発明は、これまでエシェリヒア属細菌等では分泌生産が困難であったようなタンパク質などを効率的に分泌生産する方法を提供することを課題とする。

[0005] 本発明者らはメタノール資化性細菌由来のプロモーター、シグナル配列に注目し、鋭意検討を行った。その結果、メタノール資化性細菌で機能するプロモーター配列、ならびにシグナル配列および目的タンパク質をコードする核酸配列を含むDNA構築物を保持するメタノール資化性細菌を、メタノールを主要炭素源とする培地で培養することによって、効率よくタンパク質を分泌生産できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0006] すなわち本発明は以下のとおりである。

(1)メタノール資化性細菌で機能するプロモーター配列、及び該プロモーター配列に発現可能に連結された、シグナル配列および目的タンパク質配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含むDNA構築物を保持するメタノール資化性細菌を、メタノールを炭素源とする液体培地中で培養することにより、該細菌に前記目的タンパク質を分泌させ、分泌された目的タンパク質を回収することを特徴とする、タンパク質の製造方法。

(2)前記メタノール資化性細菌で機能するプロモーター配列が、メタノールデヒドロゲナーゼのプロモーター、tacプロモーター、σEプロモーター、及びリボゾームタンパク質プロモーターから選択される(1)の方法。

(3)前記プロモーター配列が、配列番号11、12、21又は22の塩基配列を有するプロモーター配列である、(1)の方法。

(4)前記シグナル配列が、メタノールデヒドロゲナーゼ、フィターゼおよび酸性フォスファターゼから選択されるタンパク質のシグナル配列である(1)～(3)のいずれかの方法。

(5)前記シグナル配列が、配列番号18、20から選択されるアミノ酸配列を有することを特徴とする(1)～(3)のいずれかの方法。

(6)前記メタノール資化性細菌が、メチロフィラス属細菌、メチロバチラス属細菌、メチロファーガ属細菌、アクロモバクター属細菌、シュードモナス属細菌、プロタミノバクター属細菌、メタノモナス属細菌、ミクロサイクラス属細菌、及びメチロバクテリウム属細菌からなる群より選択される細菌であることを特徴とする、(1)～(5)のいずれかの方法。

(7)前記タンパク質がフィターゼ、インターロイキン、トランスグルタミナーゼ、インターフェロン、インシュリン、酸性フォスファターゼ及びペプチド合成酵素から選択されるタンパク質である(1)～(6)のいずれかの方法。

(8)前記メタノール資化性細菌が、偏性メタノール資化性細菌である(1)～(7)のいずれかの方法。

(9)前記偏性メタノール資化性細菌が、メチロフィラス属細菌、メチロバチラス属細菌、メチロファーガ属細菌からなる群より選択される細菌であることを特徴とする、(8)の方法。

発明を実施するための最良の形態

[0007] 本発明の製造方法は、メタノール資化性細菌で機能するプロモーター配列、及び該プロモーター配列に発現可能に連結された、シグナル配列および目的タンパク質配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含むDNA構築物を保持するメタノール資化性細菌を、メタノールを炭素源とする液体培地中で培養することにより、該細菌に前記目的タンパク質を分泌させ、分泌された目的タンパク質を回収することを特徴とする。ここに、分泌とは、細胞内から菌体外に目的タンパク質を排出ないしは放出することをいい、細胞内への蓄積は含まない。

すなわち、該メタノール資化性細菌によって、まずシグナル配列および目的タンパク質を含むポリペプチドが産生され、次いで、シグナル配列が切断されることによって目的タンパク質がペリプラズムに移行し、その後に菌体外へと分泌される。この分泌されたタンパク質を回収することにより目的タンパク質を製造することができる。なお、タンパク質を細菌に分泌させ、該タンパク質を回収することによって製造することを、「タンパク質の分泌生産」と呼ぶことがある。

[0008] 分泌型タンパク質は一般にはプレペプチドまたはプレプロペプチドとして翻訳され、その後、成熟型タンパク質になることが知られている。すなわち、一般に、プレペプチドまたはプレプロペプチドとして翻訳された後、プレ部分が切断されて成熟型ペプチドまたはプロペプチドに変換され、プロペプチドはプロテアーゼによってさらにプロ部分が切断されて成熟型タンパク質になることが知られている。このようなシグナルペプチドの切断を担うプロテアーゼは、一般にシグナルペプチダーゼと呼ばれる。

[0009] なお、本発明では、目的タンパク質は成熟型タンパク質、プロペプチドのいずれの形態で分泌されるものでもよく、プロペプチドとして分泌される場合には、回収後に適当なプロテアーゼ処理を施すことにより、成熟型タンパク質を得ることができる。

[0010] 本明細書において、「シグナル配列」とは、分泌性タンパク質前駆体のN末端に存在し、タンパク質の分泌に際して、認識される配列をいい、「シグナルペプチド」とは当該アミノ酸残基部分からなるペプチドをいう。

なお、本明細書において、プレ配列およびプロ部分の両方を有するタンパク質、すなわち、一次翻訳産物を「プレプロタンパク質」と称することがあり、また、プレ部分を有しないがプロ部分を有するタンパク質を「プロタンパク質」と称することがある。プロタンパク質のプロ部分は「プロ構造部」または単に「プロ構造」と称することもあり、本明細書においてタンパク質の「プロ構造部／プロ構造」とタンパク質の「プロ部分」とは互換的に使用される。

[0011] 本発明の製造方法において用いる細菌は、メタノール資化性細菌で機能するプロモーター配列、及び該プロモーター配列に発現可能に連結されたシグナル配列および目的タンパク質配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含むDNA構築物を、メタノール資化性細菌に導入することによって得られる。

[0012] ここで、「メタノール資化性細菌」とは、メタノールを主たる炭素源として生育することができる細菌であり、メチロフィラス属、メチロバチラス属、メチロファーガ属、アクロモバクター属、シュードモナス属（特開昭45-25273号公報）、プロタミノバクター属（特公昭49-125590号公報）、メタノモナス属（特開昭50-25790号公報）、ミクロサイクラス属（特開昭52-18886号公報）、及びメチロバクテリウム属などに属する細菌が含まれる。中でも、グルコースを単一炭素源とした状態では生育しないか、微弱にしか生育しない、偏性メタノール資化性細菌が好ましい。具体的には、メタノールを主たる炭素源として成育し、グルコースを単一炭素源とした状態では生育しないか、微弱にしか生育しない細菌としては、メチロフィラス属細菌、メチロバチラス属細菌、メチロファーガ属細菌が挙げられる。メチロフィラス属細菌としては、メチロフィラス・メチロトロファス（Methylophilus methylotrophus）等が挙げられ、メチロバチラス属細菌としては、メチロバチラス・グリコゲネス（Methylobacillus glycogenes）、メチロバチラス・フラジェラタス（Me

thylobacillus flagellatus)等が挙げられ、メチロファーガ属細菌としては、メチロファーガ・サラシカ(Methylophaga thalassica)、メチロファーガ・マリーナ(Methylophaga marina)、メチロファーガ・アルカリフィラ(Methylophaga alcaliphila)等のメチロファーガ属細菌などが含まれる(Biology of Methylotrophs;Edited by Israel Goldberg and J. Stefan Roken and published by Butterworth-Heinemann)。また、メタノールデヒドロゲナーゼ(MDH)を菌体外に分泌する機能を有する細菌類であることも好ましい。

[0013] メチロフィラス・メチロトロファスとしては、AS1株(NCIMB10515)、W3A1(NCIMB 11348株)、ATCC53528株などが挙げられる。メチロフィラス・メチロトロファスAS1株(NCIMB10515)、W3A1(NCIMB 11348株)は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストゥリアル・アンド・マリン・バクテリア(National Collections of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Lts., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom)から入手可能である。

[0014] また、メチロバチラス・グリコゲネスとしては、T-11株(NCIMB 11375)、ATCC 21276株、ATCC 21371株、ATCC 29475株、ATR80株(Appl. Microbiol. Biotechnol., (1994)、42巻, p67-72に記載)、A513株(Appl. Microbiol. Biotechnol., (1994)、42巻, p67-72に記載)等が挙げられる。メチロバチラス・グリコゲネスNCIMB 11375株は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストゥリアル・アンド・マリン・バクテリア(National Collections of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Lts., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom)から入手可能である。

[0015] メチロバチラス・フラジェラタスとしては、ATTC 51484株、KT株(N.I. Govorukhinaら. Microbiology (Russia) 56 (1987), pp. 849-854.に記載)、VKM B-1610株等が挙げられる。メチロバチラス・フラジェラタスVKM B-1610株は、ALL-RUSSIAN COLLECTION OF MICROORGANISMS(Russia, 142290, Moscow Region, Pushchino, pr. Nauki, 5, IBPM)から入手可能である。

メチロフィラス・メチロトロファスATCC53528株、メチロバチラス・グリコゲネスATCC 21276株、ATCC 21371株、ATCC 29475株、メチロバチラス・フラジェラタスATTC 51484株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)より分譲を受けることができる(住所 ATCC, Address: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, 1,United States

of America)。

[0016] メチロファーガ・サラシカとしては、ATTC 33145株、ATTC 33146株等が挙げられる。メチロファーガ・マリーナとしては、ATCC35842株等が挙げられる。メチロファーガ・アルカリフィラとしては、ATCCBAA-297™等が挙げられる。メチロファーガ・サラシカATTC 33145株、ATTC 33146株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)より分譲を受けることができる(住所 ATCC, Address: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, 1,United States of America)。

[0017] 上記メタノール資化性細菌に導入されるDNA構築物に含まれる「メタノール資化性細菌で機能するプロモーター」とは、上述のメタノール資化性細菌においてプロモーター活性を有するプロモーターを意味するが、メタノール資化性細菌由来のプロモーターに限定されず、他の微生物由来のプロモーターであってもよい。また、メタノールで誘導可能なプロモーターも、非誘導型のプロモーターも含む。メタノールで誘導可能なプロモーターとしては、メタノールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター、ジヒドロキシアセトンシンターゼ遺伝子のプロモーター、ギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターなどが挙げられる。

[0018] メタノール資化性細菌で機能するプロモーターとして、具体的には、メタノールで誘導されるメタノールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター(配列番号11)、エシェリヒア・コリ由来の高発現プロモーターであるtacプロモーター(配列番号12)、σEプロモーター(配列番号21)、リボゾームタンパク質プロモーター(配列番号22)等が挙げられるがこれに限定されない。

[0019] またプロモーター配列は野生型のプロモーターに限定されず、目的遺伝子を高発現化するために野生型の配列を改変したプロモーターであっても構わない。たとえば、上記細菌内でプロモーター活性を有する限り、上記のような野生型プロモーター配列を数塩基置換、欠失、付加、挿入した配列であっても構わない。また、プロモーター活性を上昇させるために、－35領域、－10領域に改変したものや、－35、－10領域間のスペーサー領域の長さを調節して改変したものでも構わない。これらの－35、－10領域を改変する方法としては、欧州特許公開第1033407号明細書に記載の方法、Nucleic Acids Res. 1999 Dec 15;27(24):4768-74.に記載の方法などが挙げら

れる。

なお、プロモーター活性は、RNA合成開始の頻度により定義される。プロモーター活性の評価法および本発明において用いることのできる強力なプロモーターの例は、Goldsteinらの論文(Prokaryotic promoters in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev., 1995, 1, 105-128)等に記載されている。また、国際公開00/18935号パンフレットに開示されているように、目的遺伝子のプロモーター領域に数塩基の塩基置換を導入し、より強力なものに改変することも可能である。

[0020] メタノール資化性細菌に導入されるDNA構築物においては、前記プロモーターの下流に、シグナル配列および目的タンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸配列が発現可能に連結されている。

「メタノール資化性細菌で機能するシグナル配列」とは、目的タンパク質に連結したときに、上述のメタノール資化性細菌が、該シグナル配列を認識し、該目的タンパク質を分泌させることのできる配列を意味する。

シグナル配列は目的タンパク質とは異なるタンパク質に由来するシグナル配列であっても、目的タンパク質の前駆体タンパク質に含まれるシグナル配列であってもよい。ただし、シグナル配列は、使用する宿主メタノール資化性細菌の分泌性タンパク質に由来することが好ましい。なお、本発明の目的に使用し得るシグナル配列は、それが由来する前駆体タンパク質において該シグナル配列に続く目的タンパク質のN末端側アミノ酸配列を一部含んでいてもよい。

なお、シグナル配列と目的タンパク質の起源が異なる場合はプレプロタンパク質を特に「異種融合プレプロタンパク質」と称することもある。例えば、タンパク質がインスリンの場合は、「プレプロインスリン」、「プロインスリン」に対し、「異種融合プレプロインスリン」と称することがある。

[0021] シグナル配列はメタノール資化性細菌で機能するものであれば特に制限されず、メタノール資化性細菌の分泌タンパク質に由来するシグナル配列や、その他の細菌、酵母、植物、または動物などの分泌タンパク質に由来するシグナル配列を用いることができる。より具体的には、メチロトロファス・メチロフィラス由来のメタノールデヒドロゲナーゼ(MDH)のシグナル配列(配列番号18のアミノ酸配列)が挙げられる。また、他

の細菌由来のシグナル配列としては、エシェリヒア・コリのappA遺伝子によってコードされるフィターゼのシグナル配列(配列番号20のアミノ酸配列)や、Morganella morganiiの酸性フォスファターゼのシグナル配列(配列番号26の1～20位)などが挙げられる。これらのアミノ酸配列をコードする塩基配列は、配列番号17、19、25にそれぞれ示される。

なお、シグナル配列をコードする塩基配列は、野生型のシグナル配列をコードする塩基配列であってもよいが、該配列を、タンパク質を分泌生産するメタノール資化性細菌の使用コドンに併せて置換した配列であってもよい。

[0022] 本発明の方法によって分泌させ、回収し得る「目的タンパク質」は、前述のメタノール資化性細菌で機能するシグナル配列と連結されることによりメタノール資化性細菌を用いて分泌されることのできるタンパク質であれば特に限定されず、動植物や微生物由来の分泌タンパク質および菌体内タンパク質を含むタンパク質全般が含まれる。本発明の方法は、これまでエシェリヒア属細菌などのグラム陰性細菌で分泌生産できなかったタンパク質についても適用することができる。なお、「目的タンパク質」は、宿主のメタノール資化性細菌とは起源の異なる異種タンパク質が好ましい。

「目的タンパク質」として分泌タンパク質を用いる場合、前駆体からプレ配列およびプロ配列を除いた配列を有するものと、プロ配列を含むもののいずれを用いてもよい。ただし、「目的タンパク質」は、前駆体タンパク質からペプチド結合を切断することによってプレ部分およびプロ部分を構成する少なくとも1以上のアミノ酸が除去されたタンパク質であればよく、そのN末端領域が天然の成熟型タンパク質のものと完全に一致するタンパク質、および、天然の成熟型タンパク質に比較してN末端にプレ部分またはプロ部分に由来する1以上の余分のアミノ酸を有するもの、および天然の成熟型タンパク質よりもアミノ酸配列が短いタンパク質も含まれる。

[0023] 本発明の製造法を適用できる目的タンパク質は特に限定されるものではないが、例えば、以下のようなタンパク質の成熟型タンパク質又はプロタンパク質が挙げられる。

フィターゼ[EC:3.1.3.2 3.1.3.26]

ヒトインターロイキン2(IL2: Genbank Accession No. AAK26665等、成熟型は21～153位のアミノ酸配列)

プロテイングルタミナーゼ

トランスグルタミナーゼ(Genbank Accession No. AF531437等)

インターフェロン

インシュリン(特開平07-284394等)

酸性フォスファターゼ

ペプチド合成酵素(WO 2004/011653号、WO2004/065610号)

顆粒球刺激因子(GCSF)

[0024] 中でも好ましくは、後述する実施例にて製造した、フィターゼ及び酸性フォスファターゼが挙げられる。

フィターゼ(phosphoanhydride phosphorylaseとも呼ばれる)は、フィチン(イノシトールヘキサキスリン酸、フィチン酸ともいう)を加水分解する酵素であり、食品分野、農業分野及び医薬品分野等で有用な酵素である。フィターゼとして、以下のものが利用出来る。各フィターゼのアミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列の情報はそれぞれのGenbank Accession No.を参照することにより入手できる。

エシェリヒア・コリ由来フィターゼ Genbank Accession No. AAC74065(配列番号16)

成熟型タンパク質は23～432位のアミノ酸配列

カビ由来フィターゼ Genbank Accession No. AAU93518、AAU93517、AAG40885、BAB40715、

バチルス由来フィターゼ Genbank Accession No.AAC38573、AAG17903、AAL59320、

酵母由来フィターゼ Genbank Accession No.CAB70441、

エルシニア由来フィターゼ Genbank Accession No.YP_070934、

クレブシエラ由来フィターゼ Genbank Accession No.AAM23271、

キサントモナス由来フィターゼ Genbank Accession AAM38967、

シュードモナス由来フィターゼ Genbank Accession AAN77879、

キノコ由来フィターゼ Genbank Accession No.CAC48195、CAC48164、CAC48234

トウモロコシ由来フィターゼ Genbank Accession No.AAB52233

大豆由来フィターゼ Genbank Accession No.AAK49438

サツマイモ由来フィターゼ Genbank Accession No.AAF60315

ラット由来フィターゼ Genbank Accession No.AAA42305

[0025] 酸性フォスファターゼとは、燐酸エステルを酸性条件下で加水分解する反応を触媒する酵素であり(EC 3.1.3.2)、例えば、以下のMorganella morganii由来の酸性フォスファターゼや、国際公開WO96／37603号パンフレットに記載の酸性フォスファターゼや、これらの変異体を用いることが出来る。

Morganella morganii由来酸性フォスファターゼGenbank Accession No. AB035805(配列番号25)

成熟型タンパク質は21～259位のアミノ酸配列

[0026] これらのタンパク質をコードする遺伝子は、使用する宿主に応じて、および／または、望みの活性を得るために改変することができ、それらにはコードするアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の付加、欠失、置換などが生じるような改変が含まれる。改変技術、遺伝子のクローニング技術、生産されたタンパク質の検出技術を含む、このような一般的な分子生物学的手法は当業者によく知られたものであり、例えば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York、DNA cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985)、F.M. Ausubel et al. (eds), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994)、PCR Technology: Principles and Application for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Press等を参照することができる。異種タンパクである場合は、分泌発現を行う微生物で使用頻度の高いコドンに置換した遺伝子を用いてもよい。

[0027] タンパク質をコードする遺伝子は既知の配列に基づいて設計されたプライマーを用いたPCRなどによって得ることができる。また、ホモロジー等に基いて目的タンパク質をコードする遺伝子を微生物、動植物等の染色体からハイブリダイゼーション法などによって単離し、塩基配列を決定したものなども使用することができる。また、既知の塩基配列にしたがって化学合成した遺伝子を使用することもできる。なお、配列情報はGenbank等のデータベースから入手出来る。

[0028] また、目的タンパク質は、目的とするタンパクの活性を有する限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含むタンパクであってもよい。ここで、「1若しくは数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、具体的には1から30個、好ましくは、1から20個、より好ましくは1から10個である。

[0029] 上記のタンパク質の置換は、タンパク質の活性が維持されるような保存的置換である。置換は、アミノ酸配列中の少なくとも1残基が除去され、そこに他の残基が挿入される変化である。酵素タンパクの元々のアミノ酸を置換し、かつ、保存的置換とみなされるアミノ酸としては、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。

[0030] 上記のようなタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように、これら酵素をコードするの塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、変異処理前のDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及び変異処理前のDNAを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN－メチル－N'－ニトロ－N－ニトロソグアニジン（NTG）もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法、PCR反応液の中のデオキシヌクレオチドの構成比を、例えば通常の等量から不揃いにすることにより人為的にランダムなエラーを発生させる方法として、エラープローンPC

R法等が挙げられる。

このような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現産物の活性を調べることにより、実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。

また、変異を有するタンパクをコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば野生型遺伝子の塩基配列の相補配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、目的タンパクの活性を有するタンパク質をコードするDNAを得ることもできる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC, 0. 1%SDS、好ましくは、0. 1×SSC、0. 1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

[0031] 上述したような目的タンパク質はシグナル配列に直接連結されていてもよいし、リンカー配列を介して間接的に連結されていてもよい。リンカー配列を含む場合、そのようなリンカー配列はポリペプチドの生産性や目的タンパク質の活性を阻害しない限り任意の配列を用いることができるが、例えば、ポリヒスチジンなど目的タンパク質を精製するための配列などを用いてもよい。

シグナル配列と目的タンパク質を含むポリペプチドをコードする核酸配列は、シグナル配列をコードする核酸配列と目的タンパク質をコードする核酸配列を、制限酵素などを用いて連結させるなどして適宜調製することができる。

また、シグナル配列と目的タンパク質として互いに同種の前駆体タンパク質由来のものを用いるときは、シグナル配列と目的タンパク質を含む前駆体タンパク質をコードする配列をPCRなどにより増幅して用いることもできる。PCR法としては、種々の公知の変法を用いることが出来るが、中でもクロスオーバーPCR法が増幅に有利に用いられる。

[0032] メタノール資化性細菌に導入するDNA構築物は、シグナル配列と目的タンパク質を

含むポリペプチドをコードする核酸配列を、発現可能にプロモーターに連結することによって調製することができる。「発現可能に連結する」とは、該細菌に導入した場合に、プロモーターによってポリペプチドをコードするmRNAが転写され、該ポリペプチドが該細菌によって産生されることを意味する。

前記核酸配列はポリペプチドをコードする配列の開始コドンの前に、転写開始点を含む5'非翻訳領域を含む状態でプロモーターに連結させることが好ましい。5'非翻訳領域としては、例えば、MDH遺伝子プロモーターの場合にMDH遺伝子の5'非翻訳領域を用いるなど、プロモーターが由来する配列の5'非翻訳領域であってもよい。また、フィターゼのシグナル配列を用いる場合に5'非翻訳領域をフィターゼ遺伝子のものにするなど、シグナル配列をコードする配列が由来する遺伝子の5'非翻訳領域であってもよい。

なお、5'非翻訳領域を用いる場合、リボソーム結合部位(RBS)と開始コドンとの間のスペーサー、特に開始コドンのすぐ上流の配列における数個のヌクレオチドの置換がmRNAの翻訳効率に非常に影響を及ぼすことが知られているため、そのように改変した5'非翻訳領域を用いてもよい。

なお、上記のようなDNA構築物を得るための操作は、エシェリヒア等、遺伝子組換えが容易なグラム陰性細菌を用いてもよいし、直接タンパク質を分泌させる微生物で行ってもよい。

[0033] メタノール資化性を上記のようなDNA構築物を保持するように改変するためには、例えば、上記DNA構築物を搭載したベクターを導入すればよい。例えば、前記タンパク質をコードする遺伝子断片を、メタノール資化性細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組換えDNAを作製し、これをメタノール資化性細菌宿主に導入して形質転換すればよい。

目的とするプロモーター、シグナル配列、タンパク質配列は、例えば、目的の配列を有する動物・植物・微生物の染色体DNAを鋳型とするPCR法(PCR:polymerase chain reaction; White,T.J. et al., Trends Genet. 5, 185 (1989)参照)によって、取得することができる。染色体DNAは、DNA供与体である細菌から、例えば、斎藤、三浦の方法(H. Saito and K.Miura, Biochem.B iophys. Acta, 72, 619 (1963)、生物工学実

験書、日本生物工学会編、97～98頁、培風館、1992年参照）等により調製することができる。PCR用プライマーは、Genbank等公知のデータベースに登録されている遺伝子配列に基づいて、又は他の細菌等で配列が公知の遺伝子間で保存されている領域の情報に基づいて、調製することができる。

[0034] メタノール資化性細菌で自律複製可能なベクターとしては、例えばメチロフィラス属細菌、メチロバチルス属細菌で自律複製出来るプラスミドである。具体的には、広宿主域ベクターであるRSF1010及びその誘導体、例えばpAYC32（Chistosrerdov, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167）、あるいはpMFY42（gene, 44, 53(1990)）、pRP301、pTB70（Nature, 287, 396, (1980)）等が挙げられる。

[0035] また、本明細書中の実施例で用いられているpAYCTER3も好適なベクターである。pAYCTER3は、pAYC32のストレプトマイシン耐性遺伝子（strA,B）の上流部分を欠失し、pUC19のマルチクローニングサイトと、E.coli rrnB遺伝子のターミネーターを挿入したプラスミドである。すなわち、pAYCTER3はストレプトマイシン耐性を発現しないが、マルチクローニングサイトにstrAと順向きにプロモーター配列を含むDNAが挿入されると、リードスルーでストレプトマイシン耐性になる高発現ベクターである。

[0036] 上記DNA構築物とメタノール資化性細菌で機能するマーカーを搭載したベクターを連結して組換えDNAを調製するには、目的遺伝子の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結はT4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。

上記のように調製した組換えDNAをメタノール資化性細菌に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法（Dubunau and Davidoff-Abelson, J. Mol. Biol., 56, 209 (1971); Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1, 153 (1977)）、又は、宿主細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法（Chang,S.and Choen,S.N.,Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979)）が挙げられる。

[0037] また、本発明のDNA構築物を有するメタノール資化性細菌を構築するためには、同DNA構築物をメタノール資化性細菌の染色体DNA上に1コピー、あるいは多コピー

存在させることによっても達成できる。メタノール資化性細菌の染色体DNA上に本発明を1コピーあるいは多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的として利用する相同組換え、もしくはファージなどを用いた染色体DNA上へのランダムな挿入により行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、トランスポゾン、繰返し配列、転移因子の端部に存在するインバーテッド・リピート等が利用できる。また、ベクターの増幅、染色体上での多コピー化は、上述の発現調節配列の改変したものと組合わせてもよい。

[0038] 上記のようにして得られたメタノール資化性細菌を、メタノールを炭素源とする液体培地中で培養することにより、該細菌に前記目的タンパク質を分泌させ、分泌された目的タンパク質を回収することによってタンパク質を製造することができる。

なお、本明細書において、タンパク質またはペプチドが「分泌」されるとは、タンパク質またはペプチドの分子が細菌菌体外(細胞外)に移送されることをいい、最終的にそのタンパク質またはペプチド分子が培地中に完全に遊離状態におかれる場合はもちろん、一部のみが菌体外に存在している場合、菌体表層に存在している場合も含む。

本発明においては目的タンパク質が培地や菌体から回収できる程度に分泌されることが好ましい。

[0039] メタノール資化性細菌はメタノールを炭素源とする培地を用いて培養する。メタノールを炭素源とする培地とは、例えば、メタノールを0．001～30％添加する培地を挙げることができる。なお、メタノール以外の炭素源、例えば、グルコース、シュクロース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースやでんぷんの加水分解物などの糖類、グリセロールやソルビトールなどのアルコール類、フマール酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類が含まれていても良い。

メタノール以外の培地成分としては、通常の培養に用いられる、窒素源、無機イオンなどの培地成分を添加することができる。さらに高い増殖を得るため、ビタミン、アミノ酸等の有機微量栄養素を必要に応じて添加することもできる。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩、その他が使用できる。無機イオンとしては、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、リン酸イオン、カリウムイオン、鉄イオン

等を必要に応じて適宜使用することができる。培養は例えば、pH5．0～9．0、15℃～45℃の適切な範囲にて好気的条件下で行えばよく、培養期間は1～7日間程度でよい。このような条件下でメタノール資化性細菌を培養することにより、目的タンパク質は菌体内で多量に生産され、効率よく分泌される。

[0040] MDH遺伝子プロモーターなどメタノールで誘導可能なプロモーターを用いる場合、ポリペプチドの生産量を増加させるために誘導条件で培養を行ってもよい。誘導は通常MDH遺伝子プロモーターなどを誘導するために用いられている条件にしたがって行うことができる。通常、メタノール資化性菌をメタノール中で培養する場合、特段の誘導を要することなく、MDHプロモーターは機能する。

[0041] 本発明によって培地中に分泌されたタンパク質は、当業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、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニーティークロマトグラフィー、中高圧液体クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー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り分離精製することができる。なお、ポリペプチドが精製用の配列を含む場合はその配列を利用して精製することもできる。

本発明によって菌体表層に分泌されたタンパク質も当業者によく知られた方法、例えば塩濃度の上昇、界面活性剤の使用等によって可溶化した後に、培地中に分泌された場合と同様にして分離精製することができる。また、ある場合には、菌体表層に分泌されたタンパク質を可溶化せずに、例えば固定化酵素として使用しても良い。

[0042] 本発明は以下の実施例によって、更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ではない。

実施例

[0043] 実施例1：Escherichia coli K-12株由来のベータラクタマーゼのMethylophilus methylotrophus ATCC 53528での分泌発現

(1)メタノール資化性細菌中で機能する発現用プラスミドpAYCTER3の構築

pUC19のマルチクローニングサイトの配列を含有するようにデザインした配列番号3と配列番号4に記載の合成DNAを、当該者に良く知られた方法でアニーリングさせて

ポリリンカーを作成した。このポリリンカーは制限酵素EcoRIとBglIIで切断後と同じ末端形状となる様にデザインしてある。更に、配列番号5と配列番号6に記載のプライマーを合成し、常法に従って(斉藤、三浦の方法[Biochim. Biophys. Acta, 72, 619(1963)])調製したEscherichia coli K-12株の染色体DNAからrrnBのターミネーター配列をコードする領域をPCR法にて増幅した。配列番号3のプライマーには制限酵素BglIIの認識配列を、配列番号4のプライマーには制限酵素BclIの認識配列をそれぞれデザインしてある。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝バイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。このPCR断片を制限酵素BglIIとBclIで消化させた後、このPCR断片と先程のポリリンカーとをライゲーションさせて約400bpのDNA断片を作成した。ライゲーション反応にはDNA Ligation Kit Ver.2.1(宝バイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。次に、公知のプラスミドであるpAYC32(J. Gen. Microbiol., 137, 169-178 (1991))の制限酵素EcoRIとBamHIで切り出される約9.2kbpの断片を回収し、先程のDNA断片を挿入する事により、M.methylotrophus ATCC 53528中で機能する発現用プラスミドpAYCTER3を構築した。なお、このpAYCTER3は、pAYC32中にコードされているstrA遺伝子の5'側上流配列を欠損し、代わりにpUC19のマルチクローニングサイトとrrnBターミネーターを持ち、E.coli由来のベータラクタマーゼ遺伝子を含む構造になっている。

[0044] (2)ベータラクタマーゼのMethylophilus methylotrophus ATCC53528での分泌発現

上記(1)で構築したpAYCTER3でMethylophilus methylotrophus ATCC53528を形質転換し、25mg/lのアンピシリンと1%のメタノールを含むSEIIA寒天培地(硫酸アンモニウム 5g、K_2HPO_4 1.9g、$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.56g、硫酸マグネシウム 200mg、塩化カルシウム 72mg、硫酸銅 5μg、硫酸マンガン 25μg、硫酸亜鉛 23μg、三塩化鉄 9.7mg、寒天 15g、水で1LにしてpH7.0に調整)で生育した菌株を選択した。次に、選択したpAYCTER3を有するM. methylotrophus ATCC53528を、25mg/lのアンピシリンと2%のメタノールを含むSEIIA液体培地で37℃、48時間培養した。培養終了後、pAYCTER3を有するM. methylotrophus ATCC53528の菌体の培養上清をSDS-PAGEに供したところ、培養上清中にベータラクタマーゼと同じ分子量を有するタンパク質を検出することができた。このタンパク質のN末端配

列をプロテインシークエンサーPPSQ-21A(島津製作所製)を用いて決定したところ、ベータラクタマーゼの成熟型配列である事が判明し、培養上清中にベータラクタマーゼを分泌している事が確認できた。

[0045] 実施例2:Escherichia coli K-12株由来のフィターゼのMethylophilus methylotrophus ATCC 53528での分泌発現

(1)Methylophilus methylotrophus ATCC 53528由来メタノールデヒドロゲナーゼ遺伝子の取得

M. methylotrophus W3A1株由来メタノールデヒドロゲナーゼ遺伝子の配列は既に決定されている [Genbank Accession No. U41040]。この配列を参考にして、配列番号1と配列番号2に示したプライマーを合成し、前記斉藤、三浦の方法に従って調製したM. methylotrophus ATCC53528の染色体DNAからメタノールデヒドロゲナーゼ配列をコードする領域をPCR法にて増幅した。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝バイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。

[0046] 次に増幅した約1.0kbのDNA断片を、Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2(宝バイオ社製)と[α-32P]dCTPを用いて、添付のプロトコールに従って反応させ、DNAプローブを作製した。作製したプローブとM. methylotrophus ATCC53528の染色体DNAを用いて、Molecular Cloning 2nd edition[J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p9.31(1989)]に記載されているような一般的な方法に従って、サザンブロットハイブリダイゼーションを行ったところ、制限酵素PvuIIで切り出される約5.5kbの断片にメタノールデヒドロゲナーゼ遺伝子が存在していることが確認できた。そこでM. methylotrophus ATCC53528の染色体DNAをPvuIIで消化した約5.5kbの断片をEASYTRAP Ver.2(宝バイオ社製)を用いてアガロースゲル電気泳動により回収し、これをpUC18(宝バイオ社製)のSmaI部位に挿入した後、Escherichia coli JM109(宝バイオ社製)のコンピテントセルに導入し、ライブラリーを作製した。

[0047] 先に作製したメタノールデヒドロゲナーゼのDNAプローブを用いて、Molecular Cloning 2nd edition[J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p1.90(1989)]記載のコロニーハイブリダイゼーションにより、ライブラリ

ーのスクリーニングを行い、メタノールデヒドロゲナーゼ遺伝子断片がクローン化されたプラスミドを保持する菌株を取得し、これよりプラスミドを回収し、pUMDHと名付けた。pUMDHにクローン化されている断片の塩基配列を決定したところ、M. methylotrophus ATCC53528のメタノールデヒドロゲナーゼの遺伝子は、M. methylotrophus W3A1株のメタノールデヒドロゲナーゼの遺伝子と95%以上の相同性を示す塩基配列を有することが確認された(配列番号13)。塩基配列の決定の結果、このPvuIIの約5.5kbの断片は完全長のメタノールデヒドロゲナーゼ遺伝子及びその5'側上流約2.5kbを含んでいる事が判明した。尚、塩基配列の決定はダイターミネーターサイクルシークエンシングキット(PEアプライドバイオシステムズ社製)とDNAシークエンサー373A(PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いて行った。

[0048] (2)Escherichia coli K-12株由来のフィターゼ遺伝子の取得と分泌発現用プラスミドの構築

Escherichia coli K-12株由来のフィターゼ遺伝子の配列は既に決定されている(Genbank Accession No. AE000200:配列番号15)。この配列を参考にして、配列番号7と配列番号8に示したプライマーを合成し、前記斉藤、三浦の方法に従って調製したEscherichia coli K-12株の染色体DNAからフィターゼ配列(成熟型)をコードする領域をPCR法にて増幅した。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝バイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。

[0049] 次に前記斉藤、三浦の方法に従って調製したM. methylotrophus ATCC 53528の染色体DNAから配列番号9と配列番号10に示したプライマーを用いてメタノールデヒドロゲナーゼのプロモーター領域とシグナル配列領域をPCR法にて増幅した。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝バイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。なお、配列番号10に示したプライマーはフィターゼとの融合遺伝子を構築するために、フィターゼのN末端側のアミノ酸配列をコードする配列を含んでいる。

[0050] 次に、上記で増幅したEscherichia coli K-12株のフィターゼ配列(成熟型)をコードする領域と、やはり上記で増幅したMethylophilus methylotrophus ATCC 53528のメタノールデヒドロゲナーゼのプロモーター領域及びシグナル配列領域のPCR反応液

1μlを混ぜて鋳型とし、配列番号9と配列番号8のプライマーを用いてクロスオーバーPCRを行い、Methylophilus methylotrophus ATCC 53528のメタノールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター及びシグナル配列に接続されたフィターゼの融合遺伝子を増幅させた。アガロースゲル電気泳動により約2.4kbの増幅断片を検出した。この断片をEASYTRAP Ver.2(宝バイオ社製)を用いてアガロースゲルから回収し、pHSG398(宝バイオ社製)のSmaI部位に挿入することによって、pHSGMappAを得た。挿入断片の塩基配列決定の結果、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。尚、塩基配列の決定はダイターミネーターサイクルシークエンシングキット(PEアプライドバイオシステムズ社製)とDNAシークエンサー373A(PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いて行った。次に、pHSGMappAのBamHI-KpnI断片をEASYTRAP Ver.2(宝バイオ社製)を用いてアガロースゲルから回収し、DNA blunting Kit(宝バイオ社製)を用いて断片の末端平滑化を行った。次に、実施例1(1)で構築したpAYCTER3をEcoRI断片をEASYTRAP Ver.2(宝バイオ社製)を用いてアガロースゲルから回収し、DNA blunting Kit(宝バイオ社製)を用いて断片の末端平滑化を行った後、先程の平滑末端化させたBamHI-KpnI断片を挿入することによって、pAYCMappAを得た。前述の方法に従って、挿入断片の塩基配列の決定を行った結果、予想通りの異種融合遺伝子が構築されていることを確認した。

[0051] (3)フィターゼ遺伝子のMethylophilus methylotrophus ATCC53528での発現

上記(2)で構築したpAYCMappA(Methylophilus methylotrophus ATCC53528由来のメタノールデヒドロゲナーゼのプロモーター配列及びシグナル配列とEscherichia coli K-12株由来のフィターゼ遺伝子を連結)及び対照とするpAYCTER3でMethylophilus methylotrophus ATCC53528をそれぞれ形質転換し、25mg/lのアンピシリンと1%のメタノールを含むSEIIA寒天培地(硫酸アンモニウム 5g、K_2HPO_4 1.9g、$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.56g、硫酸マグネシウム 200mg、塩化カルシウム 72mg、硫酸銅 5μg、硫酸マンガン 25μg、硫酸亜鉛 23μg、三塩化鉄 9.7mg、寒天15g、水で1LにしてpH7.0に調整)で生育した菌株を選択した。次に、選択したpAYCMappAもしくはpAYCTER3を有するM. methylotrophus ATCC53528を、25mg/lのアンピシリンと2%のメタノールを含むSEIIA液体培地でそれぞれ37℃、48時間培

養した。培養終了後、pAYCMappAもしくはpAYCTER3を有するM. methylotrophus ATCC53528の各菌体の培養上清をSDS－PAGEに供したところ、pAYCMappAを有する株においてのみ培養上清中に目的とする分子量を有するタンパク質を検出することができた。次に、各菌体の培養上清を粗酵素液としてフィターゼ活性を測定した。尚、酵素活性測定は既報に従って(J AOAC Int. 1994 May-Jun;77(3):760-4.)行った。その結果、pAYCTER3を有するM. methylotrophus ATCC53528は、培養上清中に酵素活性を検出できなかったが、pAYCMappAを有するM. methylotrophus ATCC 53528は、培養上清中に60 FTU/mL(37℃、pH5.5)の活性を検出でき、培養上清中にフィターゼを分泌している事が確認できた。

[0052] 実施例3:Morganella morganii株由来の酸性フォスファターゼのMethylophilus methylotrophus ATCC 53528での分泌発現

(1)Morganella morganii株由来の酸性フォスファターゼ遺伝子の取得と分泌発現用プラスミドの構築

Morganella morganii株由来の酸性フォスファターゼ遺伝子の配列は既に決定されている(Genbank Accession No.AB035805:配列番号25)。この配列を参考にして、配列番号27と配列番号28に示したプライマーを合成し、前記斉藤、三浦の方法に従って調製したMorganella morganii株の染色体DNAから酸性フォスファターゼ配列(成熟型)をコードする領域をPCR法にて増幅した。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝バイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。なお、配列番号27に示したプライマーはM. methylotrophusのメタノールデヒドロゲナーゼとの融合遺伝子を構築するために、メタノールデヒドロゲナーゼのシグナル配列のC末端側のアミノ酸配列をコードする配列を含んでいる。

[0053] 次に前記斉藤、三浦の方法に従って調製したM. methylotrophus ATCC 53528の染色体DNAから配列番号9と配列番号29に示したプライマーを用いてメタノールデヒドロゲナーゼのプロモーター領域とシグナル配列領域をPCR法にて増幅した。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝バイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。

[0054] 次に、上記で増幅したMorganella morganii株の酸性フォスファターゼ配列(成熟型)

をコードする領域と、同じく上記で増幅したMethylophilus methylotrophus ATCC 53528のメタノールデヒドロゲナーゼのプロモーター領域及びシグナル配列領域のPCR反応液1μlを混ぜて鋳型とし、配列番号9と配列番号28のプライマーを用いてクロスオーバーPCRを行い、Methylophilus methylotrophus ATCC 53528のメタノールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター及びシグナル配列に接続された酸性フォスファターゼの融合遺伝子を増幅させた。アガロースゲル電気泳動により約1.8kbの増幅断片を検出した。この断片をEASYTRAP Ver.2(宝バイオ社製)を用いてアガロースゲルから回収し、pHSG398(宝バイオ社製)のSmaI部位に挿入することによって、pHSGMphoCを得た。挿入断片の塩基配列決定の結果、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。尚、塩基配列の決定はダイターミネーターサイクルシークエンシングキット(PEアプライドバイオシステムズ社製)とDNAシークエンサー373A(PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いて行った。次に、pHSGMphoCのBamHI-KpnI断片をEASYTRAP Ver.2(宝バイオ社製)を用いてアガロースゲルから回収し、DNA blunting Kit(宝バイオ社製)を用いて断片の末端平滑化を行った。次に、実施例1(1)で構築したpAYCTER3のSmaI断片をEASYTRAP Ver.2(宝バイオ社製)を用いてアガロースゲルから回収し、平滑末端化させたBamHI-KpnI断片を挿入することによって、pAYCMphoCを得た。前述の方法に従って、挿入断片の塩基配列の決定を行った結果、予想通りの異種融合遺伝子が構築されていることを確認した。

[0055] (2)酸性フォスファターゼ遺伝子のMethylophilus methylotrophus ATCC53528での発現

上記(1)で構築したpAYCMphoC(Methylophilus methylotrophus ATCC53528由来のメタノールデヒドロゲナーゼのプロモーター配列及びシグナル配列とMorganella morganii株由来の酸性フォスファターゼ遺伝子を連結)及び対照とするpAYCTER3でMethylophilus methylotrophus ATCC53528をそれぞれ形質転換し、25mg/lのアンピシリンと1%のメタノールを含むSEIIA寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpAYCMphoCもしくはpAYCTER3を有するM. methylotrophus ATCC53528を、25mg/lのアンピシリンと2%のメタノールを含むSEIIA液体培地でそれぞれ37℃、48時間培養した。培養終了後、pAYCMphoCもしくはpAYCTER3を有するM. methyl

otrophus ATCC53528の各菌体の培養上清をSDS－PAGEに供したところ、pAYCMphoCを有する株においてのみ培養上清中に目的とする分子量約25kDaを有するタンパク質を検出することができた。次に、各菌体の培養上清を粗酵素液として基質pNPPを用いてフォスファターゼ活性を測定した結果、pAYCTER3を有するM. methylotrophus ATCC53528は、培養上清中に酵素活性を検出できなかったが、pAYCMappAを有するM. methylotrophus ATCC53528は、培養上清中に活性を検出でき、培養上清中に酸性フォスファターゼを分泌している事が確認できた。

[0056] 実施例4:シグナル配列を置換したEscherichia coli K-12株由来のフィターゼのMethylophilus methylotrophus ATCC 53528での分泌発現

(1)シグナル配列を置換したEscherichia coli K-12株由来のフィターゼの分泌発現用プラスミドの構築

前記斉藤、三浦の方法に従って調製したM. methylotrophus ATCC 53528の染色体DNAから配列番号30と配列番号31に示したプライマーを用いてメタノールデヒドロゲナーゼのプロモーター領域をPCR法にて増幅した。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝バイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。なお、配列番号30に示したプライマーは制限酵素HindIIIの認識配列を含んでいる。

[0057] E. coli K-12株由来フィターゼのシグナル配列を利用する目的で、前記斉藤、三浦の方法に従って調製したE. coli K-12株の染色体DNAから、配列番号32と配列番号33に示したプライマーを用いてシグナル配列を含むフィターゼ遺伝子をPCR法にて増幅した。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝バイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。なお、配列番号32に示したプライマーはM. methylotrophusのメタノールデヒドロゲナーゼとの融合遺伝子を構築するために、メタノールデヒドロゲナーゼのプロモーター配列のC末端側のアミノ酸配列をコードする配列を含んでおり、配列番号33に示したプライマーは制限酵素KpnIの認識配列を含んでいる。

[0058] 次に、上記で増幅したEscherichia coli K-12株のフィターゼ配列をコードする領域と、同じく上記で増幅したMethylophilus methylotrophus ATCC 53528のメタノールデヒ

ドロゲナーゼのプロモーター領域のPCR反応液1μlを混ぜて鋳型とし、配列番号30と配列番号33のプライマーを用いてクロスオーバーPCRを行い、Methylophilus methylotrophus ATCC 53528のメタノールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターに接続されたE. coli フィターゼのシグナル配列と成熟遺伝子の融合遺伝子を増幅させた。アガロースゲル電気泳動により約2.4kbの増幅断片を検出した。この断片HindIII-KpnI断片をEASYTRAP Ver.2(宝バイオ社製)を用いてアガロースゲルから回収し、実施例1(1)のpAYCTER3のHindIII-KpnI部位に挿入することによって、pAYCAappAを得た。挿入断片の塩基配列決定の結果、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。尚、塩基配列の決定はダイターミネーターサイクルシークエンシングキット(PEアプライドバイオシステムズ社製)とDNAシークエンサー373A(PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いて行った。

[0059] 一方、Morganella morganii株の酸性フォスファターゼのシグナル配列を利用する目的で、前記斉藤、三浦の方法に従って調製したM. morganii株の染色体DNAから配列番号34と配列番号28に示したプライマーを用いてシグナル配列を含む酸性フォスファターゼ遺伝子をPCR法にて増幅した。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝バイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。なお、配列番号34に示したプライマーはM. methylotrophusのメタノールデヒドロゲナーゼとの融合遺伝子を構築するために、メタノールデヒドロゲナーゼのプロモーター配列のC末端側のアミノ酸配列をコードする配列を含んでいる。

上記で増幅した酸性フォスファターゼ遺伝子と上述したメタノールデヒドロゲナーゼのプロモーター領域のPCR反応液1μlを混ぜて鋳型とし、配列番号30と配列番号28のプライマーを用いてクロスオーバーPCRを行い、M. methylotrophus ATCC 53528のメタノールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターに接続されたM. morganiiの酸性フォスファターゼのシグナル配列と成熟遺伝子の融合遺伝子を増幅させた。更にこの融合遺伝子を鋳型として、配列番号30と配列番号35に示したプライマーを用いて、M. methylotrophus ATCC 53528のメタノールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターとM. morganiiの酸性フォスファターゼのシグナル配列部分を増幅させた。なお、配列番号35に示したプライマーはE. coliフィターゼとの融合遺伝子を構築するために、

フィターゼ成熟型配列のN末端側のアミノ酸配列をコードする配列を含んでいる。

[0060] 上記で増幅したメタノールデヒドロゲナーゼのプロモーター領域及び酸性フォスファターゼのシグナル配列の融合遺伝子と、実施例2(2)で増幅したフィターゼ遺伝子のPCR反応液1μlを混ぜて鋳型とし、配列番号30と配列番号33のプライマーを用いてクロスオーバーPCRを行い、M. methylotrophus ATCC 53528のメタノールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターに接続されたM. morganiiの酸性フォスファターゼのシグナル配列とE. coliフィターゼの成熟遺伝子の融合遺伝子を増幅させた。アガロースゲル電気泳動により約2.4kbの増幅断片を検出した。この増幅断片を制限酵素HindIIIとKpnIで処理し、HindIII-KpnI断片をEASYTRAP Ver.2(宝バイオ社製)を用いてアガロースゲルから回収し、実施例1(1)のpAYCTER3のHindIII-KpnI部位に挿入することによって、pAYCCappAを得た。挿入断片の塩基配列決定の結果、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。尚、塩基配列の決定はダイターミネーターサイクルシークエンシングキット(PEアプライドバイオシステムズ社製)とDNAシークエンサー373A(PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いて行った。

[0061] (2)E.coliのフィターゼのシグナル配列及びM. morganiiの酸性フォスファターゼのシグナル配列に接続されたE.coliの成熟型フィターゼのMethylophilus methylotrophus ATCC53528での発現

上記(1)で構築したpAYCAappA(M. methylotrophus ATCC53528由来のメタノールデヒドロゲナーゼのプロモーター配列及びE. coli由来のフィターゼのシグナル配列と成熟型配列の遺伝子を連結)及びpAYCCappA(M. methylotrophus ATCC53528由来のメタノールデヒドロゲナーゼのプロモーター配列及びM. morganii株由来の酸性フォスファターゼのシグナル配列とE. coli由来のフィターゼの成熟型配列の遺伝子を連結)及び対照とするpAYCTER3でM. methylotrophus ATCC53528をそれぞれ形質転換し、25mg/lのアンピシリンと1%のメタノールを含むSEIIA寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpAYCAappAもしくはpAYCCappAもしくはpAYCTER3を有するM. methylotrophus ATCC53528を、25mg/lのアンピシリンと2%のメタノールを含むSEIIA液体培地でそれぞれ37℃、48時間培養した。培養終了後、pAYCAappAもしくはpAYCCappAもしくはpAYCTER3を有するM. methylotrophus ATC

C53528の各菌体の培養上清をSDS－PAGEに供したところ、pAYCAappA及びpAYCCappAを有する株においてのみ培養上清中に目的とする分子量を有するタンパク質を検出することができた。次に、各菌体の培養上清を粗酵素液としてフィターゼ活性を測定した結果、pAYCTER3を有するM. methylotrophus ATCC53528は、培養上清中に酵素活性は検出されなかったが、pAYCAappA及びpAYCCappAを有するM. methylotrophus ATCC53528は、培養上清中にそれぞれ酵素活性が検出され、培養上清中にフィターゼを分泌している事が確認できた。なお、酵素活性の測定方法は、前記実施例2に記載の方法と同様にして行った。

[0062] 実施例5:プロモーターを置換したEscherichia coli K-12株由来のフィターゼのMethylophilus methylotrophus ATCC 53528での分泌発現

(1)プロモーターを置換したEscherichia coli K-12株由来のフィターゼの分泌発現用プラスミドの構築

tacプロモーターを利用する目的で、pKK223-3(pharmacia社)を鋳型として配列番号36と配列番号37に示したプライマーを用いてtacプロモーター領域をPCR法にて増幅した。用いたtacプロモーターの配列は配列番号12に示す。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝バイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。なお、配列番号36に示したプライマーは制限酵素EcoRIの認識配列を含んでいる。

実施例2(2)のpAYCMappAを鋳型にして配列番号38と配列番号39に示したプライマーを用いてM. methylotrophus由来メタノールデヒドロゲナーゼのシグナル配列とE. coli由来フィターゼ(成熟型)の融合遺伝子をPCR法にて増幅した。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝バイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。なお、配列番号38に示したプライマーはtacプロモーターとの融合遺伝子を構築するために、tacプロモーターの一部の配列を含んでおり、配列番号39に示したプライマーは制限酵素EcoRIの認識配列を含んでいる。

[0063] 次に、上記で増幅したtacプロモーター配列をコードする領域と、同じく上記で増幅したM. methylotrophus由来のメタノールデヒドロゲナーゼのシグナル配列とE.coli由来のフィターゼ(成熟型)の融合遺伝子をコードする領域のPCR反応液1μlを混ぜて

鋳型とし、配列番号36と配列番号39のプライマーを用いてクロスオーバーPCRを行い、tacプロモーターに接続されたM. methylotrophus由来のメタノールデヒドロゲナーゼのシグナル配列とE. coli 由来フィターゼの成熟遺伝子を融合させた遺伝子を増幅させた。アガロースゲル電気泳動により約1.6kbの増幅断片を検出した。この増幅断片をEcoRI処理した後、EASYTRAP Ver.2(宝バイオ社製)を用いてアガロースゲルから回収し、実施例1(1)のpAYCTER3のEcoRI部位に挿入することによって、pAYCPtacMappAを得た。挿入断片の塩基配列決定の結果、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。尚、塩基配列の決定はダイターミネーターサイクルシークエンシングキット(PEアプライドバイオシステムズ社製)とDNAシークエンサー373A(PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いて行った。

[0064] (2)tacプロモーターに接続されたE.coli由来フィターゼのMethylophilus methylotrophus ATCC53528での発現

上記(1)で構築したpAYCPtacMappA(tacプロモーター配列及びM. methylotrophus ATCC53528由来のメタノールデヒドロゲナーゼのシグナル配列及びE. coli由来のフィターゼの成熟型配列の遺伝子を連結)及び対照とするpAYCTER3でM. methylotrophus ATCC53528をそれぞれ形質転換し、25mg／lのアンピシリンと1％のメタノールを含むSEIIA寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpAYCPtacMappAもしくはpAYCTER3を有するM. methylotrophus ATCC53528を、25mg／lのアンピシリンと2％のメタノールを含むSEIIA液体培地でそれぞれ37℃、48時間培養した。培養終了後、pAYCPtacMappAもしくはpAYCTER3を有するM. methylotrophus ATCC53528の各菌体の培養上清をSDS－PAGEに供したところ、pAYCPtacMappAを有する株においてのみ培養上清中に目的とする分子量を有するタンパク質を検出することができた。次に、各菌体の培養上清を粗酵素液としてフィターゼ活性を測定した結果、pAYCTER3を有するM. methylotrophus ATCC53528は、培養上清中に酵素活性を検出できなかったが、pAYCPtacMappAを有するM. methylotrophus ATCC53528は、培養上清中に酵素活性を検出でき、培養上清中にフィターゼを分泌している事が確認できた。なお、酵素活性の測定方法は、前記実施例2に記載の方法と同様にして行った。

[0065] 実施例6:Escherichia coli K-12株由来のベータラクタマーゼのMethylobacillus glycogenes ATCC 29475での分泌発現

(1)Methylobacillus glycogenes ATCC 29475中で機能する発現用プラスミドpAYCTER-tetの構築

M.glycogenes ATCC29475株は、アンピシリン及びストレプトマイシンに耐性で、テトラサイクリンに感受性を示す事から、実施例1(1)で作成した分泌発現プラスミドpAYCTER3にテトラサイクリン耐性遺伝子を導入する事とした。pRK310(Plasmid. 1985 Mar;13(2):149-53に記載)を鋳型にして配列番号23と配列番号24のプライマーを用いてテトラサイクリン耐性遺伝子をPCR法により増幅させた。アガロースゲル電気泳動により約1.5kbの増幅断片を検出した。この増幅断片を制限酵素BamHIで処理し、断片をEASYTRAP Ver.2(宝バイオ社製)を用いてアガロースゲルから回収し、実施例1(1)のpAYCTER3のBamHI部位に挿入することによって、pAYCTER-tetを得た。挿入断片の塩基配列決定の結果、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。尚、配列番号23と配列番号24に示したプライマーは制限酵素BamHIの認識配列を含んでおり、塩基配列の決定はダイターミネーターサイクルシークエンシングキット(PEアプライドバイオシステムズ社製)とDNAシークエンサー373A(PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いて行った。

[0066] (2)ベータラクタマーゼのMethylobacillus glycogenes ATCC 29475での分泌発現

上記(1)で構築したpAYCTER-tetでMethylobacillus glycogenes ATCC 29475を形質転換し、5mg/lのテトラサイクリンと1%のメタノールを含むSEIIA寒天培地(硫酸アンモニウム 5g、K_2HPO_4 1.9g、$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.56g、硫酸マグネシウム 200mg、塩化カルシウム 72mg、硫酸銅 5μg、硫酸マンガン 25μg、硫酸亜鉛 23μg、三塩化鉄 9.7mg、寒天 15g、水で1LにしてpH7.0に調整)で生育した菌株を選択した。次に、選択したpAYCTER-tetを有するM.glycogenes ATCC 29475を、5mg/lのテトラサイクリンと2%のメタノールを含むSEIIA液体培地で30℃、48時間培養した。培養終了後、pAYCTER-tetを有するM. glycogenes ATCC 29475の菌体の培養上清をSDS-PAGEに供したところ、培養上清中にベータラクタマーゼと同じ分子量を有するタンパク質を検出することができた。このタンパク質のN末端配

列をプロテインシークエンサーPPSQ-21A(島津社製)を用いて決定したところ、ベータラクタマーゼの成熟型配列である事が判明し、培養上清中にベータラクタマーゼを分泌している事が確認できた。

[0067] 実施例7:Escherichia coli K-12株由来のフィターゼのMethylobacillus glycogenes ATCC 29475での分泌発現

(1)Methylobacillus glycogenes ATCC 29475におけるEscherichia coli K-12株由来のフィターゼの分泌発現用プラスミドの構築

M.glycogenes ATCC29475株でE.coli由来フィターゼを分泌発現させる目的で、実施例5(1)で作成したフィターゼ分泌発現プラスミドpAYCPtacMappAのBamHI部位に、実施例6(1)で作成したテトラサイクリン耐性遺伝子のBamHI処理断片を挿入する事によって、pAYCPtacMappA-tetを得た。挿入断片の塩基配列決定の結果、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。尚、塩基配列の決定はダイターミネーターサイクルシークエンシングキット(PEアプライドバイオシステムズ社製)とDNAシークエンサー373A(PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いて行った。

[0068] (2)E.coli由来フィターゼのMethylobacillus glycogenes ATCC 29475での発現

上記(1)で構築したpAYCPtacMappA-tetもしくは対照とする実施例6(2)で作成したpAYCTER-tetでMethylobacillus glycogenes ATCC 29475をそれぞれ形質転換し、5mg/lのテトラサイクリンと1%のメタノールを含むSEIIA寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpAYCPtacMappA-tetもしくはpAYCTER-tetを有するM.glycogenes ATCC 29475を、5mg/lのテトラサイクリンと2%のメタノールを含むSEIIA液体培地でそれぞれ37℃、48時間培養した。培養終了後、pAYCPtacMappA-tetもしくはpAYCTER-tetを有するM.glycogenes ATCC 29475の各菌体の培養上清をSDS-PAGEに供したところ、pAYCPtacMappA-tetを有する株においてのみ培養上清中に目的とする分子量を有するタンパク質を検出することができた。次に、各菌体の培養上清を粗酵素液としてフィターゼ活性を測定した結果、pAYCTER-tetを有するM.glycogenes ATCC 29475は、培養上清中に酵素活性を検出できなかったが、pAYCPtacMappA-tetを有するM.glycogenes ATCC 29475は、培養上清中に酵素活性を検出でき、培養上清中にフィターゼを分泌している事が確認できた。なお、酵素活性の測

定方法は、前記実施例2に記載の方法と同様にして行った。

産業上の利用の可能性

[0069] 本発明により、タンパク質を安価に効率的に分泌生産することができる。特に、産業上有用なタンパク質、例えば、フィターゼなどを効率的に分泌生産することができる。

請求の範囲

[1] メタノール資化性細菌で機能するプロモーター配列、及び該プロモーター配列に発現可能に連結された、シグナル配列および目的タンパク質配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含むDNA構築物を保持するメタノール資化性細菌を、メタノールを炭素源とする液体培地中で培養することにより、該細菌に前記目的タンパク質を分泌させ、分泌された目的タンパク質を回収することを特徴とする、タンパク質の製造方法。

[2] 前記メタノール資化性細菌で機能するプロモーター配列が、メタノールデヒドロゲナーゼのプロモーター、tacプロモーター、σEプロモーター、及びリボゾームタンパク質プロモーターから選択される請求項1に記載の方法。

[3] 前記プロモーター配列が、配列番号11、12、21又は22の塩基配列を有するプロモーター配列である、請求項1に記載の方法。

[4] 前記シグナル配列が、メタノールデヒドロゲナーゼ、フィターゼおよび酸性フォスファターゼから選択されるタンパク質のシグナル配列である請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

[5] 前記シグナル配列が、配列番号18、及び20から選択されるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

[6] 前記メタノール資化性細菌が、メチロフィラス属細菌、メチロバチラス属細菌、メチロファーガ属細菌、アクロモバクター属細菌、シュードモナス属細菌、プロタミノバクター属細菌、メタノモナス属細菌、ミクロサイクラス属細菌、及びメチロバクテリウム属細菌からなる群より選択される細菌であることを特徴とする、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

[7] 前記タンパク質がフィターゼ、インターロイキン、トランスグルタミナーゼ、インターフェロン、インシュリン、酸性フォスファターゼ及びペプチド合成酵素から選択されるタンパク質である請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

[8] 前記メタノール資化性細菌が、偏性メタノール資化性細菌である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

[9] 前記偏性メタノール資化性細菌が、メチロフィラス属細菌、メチロバチラス属細菌、メ

チロファーガ属細菌からなる群より選択される細菌であることを特徴とする、請求項8記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/309598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12P21/02(2006.01)i, *C12N9/16*(2006.01)i, *C12N15/63*(2006.01)i, *C12R1/01*(2006.01)n

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)
C12P21/02, C12N9/16, C12N15/63, C12R1/01

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus(JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HAYASE, N. et al., Secretion of human epidermal growth factor (EGF) in autotrophic culture by a recombinant hydrogen-utilizing bacterium, Pseudomonas pseudoflava, carrying broad-host-range EGF secretion vector pKSEGF2., Appl. Environ.Microbiol. (1994), Vol.60, No.9, pages 3336 to 3342, full text	1-9
Y	JP 2003-153695 A (Ajinomoto Co., Inc.), 27 May, 2003 (27.05.03), Par. Nos. [0004] to [0005] & US 2003/0119155 A1	1-9
Y	JP 2003-061687 A (Ajinomoto Co., Inc.), 04 March, 2003 (04.03.03), Par. No. [0004] & EP 1266966 A2 & US 2003/0124687 A1	1-9

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 July, 2006 (19.07.06)	01 August, 2006 (01.08.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/309598

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 2004-208537 A (Osaka Gas Co., Ltd.), 29 July, 2004 (29.07.04), Par. No. [0024] (Family: none)	1-9
Y	WO 2004/037998 A2 (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND CO.), 06 May, 2004 (06.05.04), Claims 4 to 6 & US 2004/0126848 A1 & JP 2006-515166 A	1-9
Y	FITZGERALD, K.A. and LIDSTROM, M.E., Overexpression of a heterologous protein, haloalkane dehalogenase, in a poly-beta-hydroxybutyrate-deficient strain of the facultative methylotroph Methylobacterium extorquens AM1., Biotechnol.Bioeng. (2003), Vol.81, No.3, pages 263 to 268, abstract, INTRODUCTION, MATEIALS AND METHODS	1-9
Y	CHESSHYRE, J.A. and HIPKISS, A.R., Low temperatures stabilize interferon α -2 against proteolysis in Methylophilus methylotrophus and Escherichia coli., Appl.Microbiol.Biotechnol. (1989), Vol.31, pages 158 to 162, full text	1-9
Y	MARCHENKO, N.D. et al., Cloning and expression of mosquitocidal endotoxin gene crylVB from Bacillus thuringiensis var israelensis in the obligate methylotroph Methylobacillus flagellatum., J.Ind.Microbiol.Biotechnol. (2000), Vol.24, pages 14 to 18, full text	1-9
P,X P,Y	GUTIERREZ, J. et al., Heterologous extra cellular production of enterocin P from Enterococcus faecium P13 in the methylotrophic bacterium Methylobacterium extorquens., FEMS Microbiol.Lett. (01 July, 2005 (01.07.05)), Vol.248, No.1, pages 125 to 131, full text	1,2,6 3-5,7-9

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３０９５９８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12P21/02(2006.01)i, C12N9/16(2006.01)i, C12N15/63(2006.01)i, C12R1/01(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12P21/02, C12N9/16, C12N15/63, C12R1/01

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

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２００６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００６年

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

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus(JDream2)

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	HAYASE, N. et al., Secretion of human epidermal growth factor (EGF) in autotrophic culture by a recombinant hydrogen-utilizing bacterium, Pseudomonas pseudoflava, carrying broad-host-range EGF secretion vector pKSEGF2., Appl. Environ. Microbiol. (1994), Vol.60, No.9, p.3336-3342, 全文	１－９
Y	JP 2003-153695 A (味の素株式会社) 2003.05.27, [0004]-[0005] & US 2003/0119155 A1	１－９

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

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願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	国際調査報告の発送日
１９．０７．２００６	０１．０８．２００６

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）　４Ｎ　３３３５
新留　豊
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 2003-061687 A (味の素株式会社) 2003.03.04, [0004] & EP 1266966 A2 & US 2003/0124687 A1	１－９
Ｙ	JP 2004-208537 A (大阪瓦斯株式会社) 2004.07.29, [0024] (ファミリーなし)	１－９
Ｙ	WO 2004/037998 A2 (E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 2004.05.06, 請求項 4-6 & US 2004/0126848 A1 & JP 2006-515166 A	１－９
Ｙ	FITZGERALD, K. A. and LIDSTROM, M. E. Overexpression of a heterologous protein, haloalkane dehalogenase, in a poly-beta-hydroxybutyrate-deficient strain of the facultative methylotroph Methylobacterium extorquens AM1., Biotechnol. Bioeng. (2003), Vol.81, No.3, p.263-268, Abstract, INTRODUCTION, MATEIALS AND METHODS	１－９
Ｙ	CHESSHYRE, J. A. and HIPKISS, A. R. Low temperatures stabilize interferon α -2 against proteolysis in Methylophilus methylotrophus and Escherichia coli., Appl. Microbiol. Biotechnol. (1989), Vol.31, p.158-162, 全文	１－９
Ｙ	MARCHENKO, N.D. et al., Cloning and expression of mosquitocidal endotoxin gene crylVB from Bacillus thuringiensis var israelensis in the obligate methylotroph Methylobacillus flagellatum., J. Ind. Microbiol. Biotechnol. (2000), Vol.24, p.14-18, 全文	１－９
ＰＸ ＰＹ	GUTIERREZ, J. et al., Heterologous extracellular production of enterocin P from Enterococcus faecium P13 in the methylotrophic bacterium Methylobacterium extorquens., FEMS Microbiol. Lett. (2005.07.01), Vol.248, No.1, p.125-131, 全文	１，２，６ ３－５、７－９