

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4638418号  
(P4638418)

(45) 発行日 平成23年2月23日 (2011. 2. 23)

(24) 登録日 平成22年12月3日 (2010.12.3)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 Z N A C
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15

請求項の数 15 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2006-509611 (P2006-509611)	(73) 特許権者	500175602
(86) (22) 出願日	平成16年3月31日 (2004. 3. 31)		ノボザイムス, インコーポレイティド
(65) 公表番号	特表2006-521826 (P2006-521826A)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 956
(43) 公表日	平成18年9月28日 (2006. 9. 28)		16-4880, ディビス, ドリュー ア
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/010126		ベニュー 1445
(87) 国際公開番号	W02004/090155	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成16年10月21日 (2004.10.21)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成19年3月6日 (2007. 3. 6)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	60/459, 902		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成15年3月31日 (2003. 3. 31)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100108903
			弁理士 中村 和広

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アスペルギラス・ニガーの酵素-欠失変異体における生物学的物質の生成方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

異種のポリペプチドの生成方法であって、

( a ) 前記異種の生物学的物質の生成のために適切な培地において親アスペルギラス・ニガー (Aspergillus niger) 株の変異体を培養し、ここで ( i ) 前記変異体株は、前記異種のポリペプチドをコードする第 1 のヌクレオチド配列、並びに glaA、asa、amyA、amyB、prtT 及び oah の修飾を含んで成る第 2 のヌクレオチド配列を含んで成り、そして ( ii ) 前記変異体株は、同一の条件下で培養される場合、親アスペルギラス・ニガーに比較して、グルコアミラーゼ、酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼ A 及び中性 - アミラーゼ B、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼの生成を欠いており、ここで前記修飾は、( 1 ) 遺伝子又は制御要素中の 1 又は複数のヌクレイチドの導入、置換又は除去、( 2 ) 遺伝子破壊、( 3 ) 遺伝子転換、( 4 ) 遺伝子欠失、或いは ( 5 ) ランダム又は特異的変異誘発として定義され；そして

( b ) 前記培養培地から前記異種の生物学的物質を回収する；  
ことを含んで成る方法。

【請求項 2】

前記変異体株が、同一の条件下で培養される場合、親アスペルギラス・ニガーに比較して、グルコアミラーゼ、酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼ A 及び中性 - アミラーゼ B、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼを少なくとも 25% 少なく生成する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記変異体株が、同一の条件下で培養される場合、親アスペルギラス・ニガーに比較して、グルコアミラーゼ、酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼ A 及び中性 - アミラーゼ B、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼを完全に欠く、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記変異体株がさらに、タンパク質分解活性をコードする 1 又は複数の遺伝子の修飾を含んで成り、ここで前記修飾は、( 1 ) 遺伝子又は制御要素中の 1 又は複数のヌクレオチドの導入、置換又は除去、( 2 ) 遺伝子破壊、( 3 ) 遺伝子転換、( 4 ) 遺伝子欠失、或いは ( 5 ) ランダム又は特異的変異誘発として定義される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

## 【請求項 5】

前記変異体株が、カルボヒドラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、ガラクトシダーゼ、- ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコシダーゼ、ハロペルオキシダーゼ、ヘミセルラーゼ、インバーターゼ、イソメラーゼ、ラッカーゼ、リガーゼ、リパーゼ、リアーゼ、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、ペクチン分解酵素、ペルオキシダーゼ、フィターゼ、フェノールオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、トランスフェラーゼ、- 1, 6 - トランスグルコシダーゼ、トランスグルタミナーゼ及びキシラナーゼから成る群から選択される酵素をコードする 1 又は複数の遺伝子の修飾をさらに含んで成り、ここで前記修飾は、( 1 ) 遺伝子又は制御要素中の 1 又は複数のヌクレオチドの導入、置換又は除去、( 2 ) 遺伝子破壊、( 3 ) 遺伝子転換、( 4 ) 遺伝子欠失、或いは ( 5 ) ランダム又は特異的変異誘発として定義される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

異種のポリペプチドをコードする第 1 のヌクレオチド配列、並びに glaA、asa、amyA、amyB、prtT 及び oah の修飾を含んで成る第 2 のヌクレオチド配列を含んで成る、親アスペルギラス・ニガー株の変異体であって、同一の条件下で培養される場合、親アスペルギラス・ニガーに比較して、グルコアミラーゼ、酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼ A、中性 - アミラーゼ B、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼを欠いていることを特徴とする変異体株。

30

## 【請求項 7】

前記変異体株が、同一の条件下で培養される場合、親アスペルギラス・ニガーに比較して、グルコアミラーゼ、酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼ A、中性 - アミラーゼ B、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼを少なくとも 25% 少なく生成する、請求項 6 に記載の変異体株。

## 【請求項 8】

前記変異体株が、同一の条件下で培養される場合、親アスペルギラス・ニガーに比較して、グルコアミラーゼ、酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼ A、中性 - アミラーゼ B、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼを完全に欠く、請求項 6 又は 7 に記載の変異体株。

40

## 【請求項 9】

前記変異体株がさらに、タンパク質分解活性をコードする 1 又は複数の遺伝子の修飾を含んで成り、ここで前記修飾は、( 1 ) 遺伝子又は制御要素中の 1 又は複数のヌクレオチドの導入、置換又は除去、( 2 ) 遺伝子破壊、( 3 ) 遺伝子転換、( 4 ) 遺伝子欠失、或いは ( 5 ) ランダム又は特異的変異誘発として定義される、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の変異体株。

## 【請求項 10】

前記変異体株が、カルボヒドラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、デオ

50

キシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、ガラクトシダーゼ、 - ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコシダーゼ、ハロペルオキシダーゼ、ヘミセルラーゼ、インバーターゼ、イソメラーゼ、ラッカーゼ、リガーゼ、リパーゼ、リアーゼ、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、ペクチン分解酵素、ペルオキシダーゼ、フィターゼ、フェノールオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、トランスフェラーゼ、 - 1, 6 - トランスグルコシダーゼ、トランスグルタミナーゼ及びキシラナーゼから成る群から選択される酵素をコードする1又は複数の遺伝子の修飾をさらに含んで成り、ここで前記修飾は、(1) 遺伝子又は制御要素中の1又は複数のヌクレイチドの導入、置換又は除去、(2) 遺伝子破壊、(3) 遺伝子転換、(4) 遺伝子欠失、或いは(5) ランダム又は特異的変異誘発として定義される、請求項6~9のいずれか1項に記載の変異体株。

10

【請求項11】

親アスペルギラス・ニガー株の変異体の入手方法であって、

(a) 前記親アスペルギラス・ニガー株中に、異種のポリペプチドをコードする第1のヌクレオチド配列、並びにglaA、asa、amyA、amyB、prtT及びoahの修飾を含んで成る第2のヌクレオチド配列を導入し；そして

(b) 同一の条件下で培養される場合、親アスペルギラス・ニガーに比較して、グルコアミラーゼ、酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼA、中性 - アミラーゼB、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼの生成を欠いている、修飾されたヌクレオチド配列を含んで成り、ここで前記修飾は、(1) 遺伝子又は制御要素中の1又は複数のヌクレイチドの導入、置換又は除去、(2) 遺伝子破壊、(3) 遺伝子転換、(4) 遺伝子欠失、或いは(5) ランダム又は特異的変異誘発として定義される、段階(a)からの変異体株を同定することを含んで成る方法。

20

【請求項12】

前記変異体株が、同一の条件下で培養される場合、親アスペルギラス・ニガーに比較して、グルコアミラーゼ、酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼA、中性 - アミラーゼB、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼを少なくとも25%少なく生成する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記変異体株が、同一の条件下で培養される場合、親アスペルギラス・ニガーに比較して、グルコアミラーゼ、酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼA、中性 - アミラーゼB、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼを完全に欠く、請求項11に記載の方法

30

【請求項14】

前記変異体株がさらに、タンパク質分解活性をコードする1又は複数の遺伝子の修飾を含んで成り、ここで前記修飾は、(1) 遺伝子又は制御要素中の1又は複数のヌクレイチドの導入、置換又は除去、(2) 遺伝子破壊、(3) 遺伝子転換、(4) 遺伝子欠失、或いは(5) ランダム又は特異的変異誘発として定義される、請求項11~13のいずれか1項にに記載の方法。

【請求項15】

前記変異体株が、カルボヒドラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、ガラクトシダーゼ、 - ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコシダーゼ、ハロペルオキシダーゼ、ヘミセルラーゼ、インバーターゼ、イソメラーゼ、ラッカーゼ、リガーゼ、リパーゼ、リアーゼ、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、ペクチン分解酵素、ペルオキシダーゼ、フィターゼ、フェノールオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、トランスフェラーゼ、 - 1, 6 - トランスグルコシダーゼ、トランスグルタミナーゼ及びキシラナーゼから成る群から選択される酵素をコードする1又は複数の遺伝子の修飾をさらに含んで成り、ここで前記修飾は、(1) 遺伝子又は制御要素中の1又は複数のヌクレイチドの導入、置換又は除去、(2) 遺伝子破壊、(3) 遺伝子転換、(4) 遺伝子欠失、或いは(5) ランダム又

40

50

は特異的変異誘発として定義される、請求項11～14のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野：

本発明は、酵素 - 欠失アスペルギラス・ニガー変異体株における異種の生物学的物質の生成方法、酵素 - 欠失アスペルギラス・ニガー変異体株の入手方法、及び酵素 - 欠失アスペルギラス・ニガー変異体株に関する。

【背景技術】

【0002】

関連技術の説明：

アスペルギラス・ニガーは、多量のグルコアミラーゼを分泌する。しかしながら、高められたタンパク質発現及び分泌の所望する形質を有するアスペルギラス・ニガー宿主は、好結果をもたらす発酵の最も所望する特徴を必ずしも有する必要はない。発酵は、興味ある生物学的物質の回収及び精製の間、除去を必要とする複数の酵素の分泌のために、最適ではなく、又は酵素は生物学的物質と同時精製することができる。

【0003】

Boel など., 1984, EM80 J. 3: 1097-1102, 1581-1585は、アスペルギラス・ニガーのグルコアミラーゼ (glaA) 遺伝子のクローニングを開示する。Fowler など., 1990, Curr. Genet. 18: 537-545は、アスペルギラス・ニガーのグルコアミラーゼ (glaA) 遺伝子の欠失を開示する。

【0004】

Korman など., 1990, Curr. Genet. 17: 203-217は、アスペルギラス・ニガー var. アワモリ (*Aspergillus niger* var. *awamori*) からの2種の - アミラーゼ遺伝子 (amyA及びamyB) のクローニング、特徴づけ、及び発現を開示する。アメリカ特許第5,252,726号は、アスペルギラス・ニガーからの2種の十分な長さの中性 - アミラーゼ遺伝子のクローニングを開示する。

【0005】

アメリカ特許第5,252,726号は、アスペルギラス・ニガーからの酸安定性 - アミラーゼ遺伝子 (asa) の一部のクローニングを開示する。

Pedersen など., 2000, Metabolic Engineering 2: 34-41, 及び WO 00/50576号は、アスペルギラス・ニガーのグルコアミラーゼ - 生成株におけるオキサロ酢酸ヒドロラーゼ (EC 3.7.1.1) コードのオキサロ酢酸ヒドロラーゼ (oah) 遺伝子の破壊を開示し、ここで得られる株シュウ酸を生成することができなかった。

【0006】

WO01/68864号は、prtT - 破壊されたアスペルギラス・ニガー株がプロテアーゼ欠失であることを示し、このことは、その宿主株におけるprtT発現の欠失がタンパク質分解に対して敏感な回収できるタンパク質のレベルの上昇をもたらすことができることを示す。

興味ある生物学的物質の回収及び下流のプロセッシングを複雑化することができる酵素の生成を欠くと共に、商業的量の生物学的物質の発現のための能力を有する。改良されたアスペルギラス・ニガー宿主を提供することが本発明の目的である。

【発明の開示】

【0007】

発明の要約：

本発明は、異種の生物学的物質の生成方法に関し、ここで前記方法は、

(a) 前記異種の生物学的物質の生成のために適切な培地において親アスペルギラス・ニガー株の変異体を培養し、ここで (i) 前記変異体株は、前記異種の生物学的物質をコードする第1のヌクレオチド配列、並びにglaA、及びasa, amyA, amyB, prtT及びoahから成る群から選択された少なくとも1つの遺伝子の修飾を含んで成る1又は複数の第2のヌクレオチド配列を含んで成り、そして (ii) 前記変異体株は、同一の条件下で培養される

10

20

30

40

50

場合、親アスペルギラス・ニガーに比較して、グルコアミラーゼ、並びに酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼA及び中性 - アミラーゼB、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼから成る群から選択された少なくとも1つの酵素の生成を欠いており；そして (b) 前記培養培地から前記異種の生物学的物質を回収することを含んで成る。

本発明はまた、酵素 - 欠失性アスペルギラス・ニガー変異体株、及びその生成方法にも関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

発明の特定の記載：

本発明は、異種の生物学的物質の生成方法に関し、ここで前記方法は、(a) 前記異種の生物学的物質の生成のために適切な培地において親アスペルギラス・ニガー株の変異体を培養し、ここで(i) 前記変異体株は、前記異種の生物学的物質をコードする第1のヌクレオチド配列、並びにglaA、及びasa, amyA, amyB, prtT及びoahから成る群から選択された少なくとも1つの遺伝子の修飾を含んで成る1又は複数の第2のヌクレオチド配列を含んで成り、そして(ii) 前記変異体株は、同一の条件下で培養される場合、親アスペルギラス・ニガーに比較して、グルコアミラーゼ、並びに酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼA及び中性 - アミラーゼB、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼから成る群から選択された少なくとも1つの酵素の生成を欠いており；そして(b) 前記培養培地から前記異種の生物学的物質を回収することを含んで成る。

【0009】

本発明の利点は、グルコアミラーゼ、並びに酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼA及び中性 - アミラーゼB、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼから成る群から選択された少なくとも1つの酵素のアスペルギラス・ニガー酵素ブイオンにおける排除又は低下であり、そして異種の生物学的物質の下流プロセッシングを単純化する。

【0010】

用語“アミログルコシダーゼ”とは、1, 4 - 結合された -D- グルコース残基及び末端の1, 4 - 結合された -D- グルコース残基の末端加水分解を触媒するデキストリン6 - -D- グルカノヒドロラーゼ活性として本明細書において定義される。本発明に関しては、グルコアミラーゼ活性は、Fagershom and Kalkkinen, 1995, Biotechnol. Appl. Biochem. 21: 223-231により記載される方法に従って決定され、ここで0.1Mのマルチリリオースからのグルコアミラーゼにより生成されるグルコースがpH4、25 でグルコースオキシダーゼアッセイキット (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を用いて測定される。1単位のグルコアミラーゼ活性とは、25、pH4で1分あたりに生成される1.0μモルのグルコースとして定義される。

【0011】

用語“ - アミラーゼ活性”とは、水の存在下で3又はそれ以上の - 1, 4 - 結合されたグルコース単位による多糖マルト多糖への末端加水分解を触媒する1, 4 - -D- グルカノヒドロラーゼ活性として本明細書において定義される。

用語“酸安定性 - アミラーゼ活性”とは、酸性pH範囲において最適な活性を有する - アミラーゼ活性として本明細書において定義される。本発明に関しては、酸安定性アミラーゼ活性は、pH4.0でSigma Chemical Co.キット477を用いて、基質として4,6 - エチリデン (G7) - p - ニトロフェニル (G1) - -D- ニトロフェニル (G1) - -D- マルトヘプタシドを用いて決定される。

【0012】

用語“中性安定性 - アミラーゼ活性”とは、中性pH範囲において最適な活性を有する - アミラーゼ活性として本明細書において定義される。本発明に関しては、中性安定性アミラーゼ活性は、pH7.0でSigma Chemical Co.キット477を用いて、基質として4,6 - エチリデン (G7) - p - ニトロフェニル (G1) - -D- ニトロフェニル (G1) - -D- マルトヘプタシドを用いて決定される。

【0013】

10

20

30

40

50

用語“ シュウ酸ヒドロラーゼ ”とは、水の存在下でシュウ酸及び酢酸塩へのオキサロアセテートの転換を触媒する酵素活性として本明細書において定義される。酵素は、EC3.7.1.1に属するとして分類される。本発明に関しては、オキサロアセテートヒドロラーゼ活性は、本明細書の例セクションに記載される方法に従って決定される。1単位のオキサロアセテートヒドロラーゼ活性は、30、pH7.5で1分当たり生成される1.0 $\mu$ モルのシュウ酸として定義される。

【0014】

用語“ 修飾 ”とは、その転写又は翻訳のために必要とされる遺伝子又は調節要素における1又は複数のヌクレオチドの導入、置換又は除去、及びglaA、並びにasa, amyA, amyB, prtT及びoahから成る群から選択された少なくとも1つの遺伝子の、遺伝子破壊、遺伝子転換、遺伝子欠失、又はランダム又は特異的突然変異誘発として本明細書においては定義される。glaA遺伝子、並びにasa, amyA, amyB, prtT及びoah遺伝子の欠失は、部分的であっても、又は完全であっても良い。修飾は、glaA、並びにasa, amyA, amyB, prtT及びoahから成る群から選択された少なくとも1つの遺伝子の発現の低下又は排除をもたらす。

10

【0015】

好ましい観点においては、修飾は、glaA、並びにasa, amyA, amyB, prtT及びoahから成る群から選択された少なくとも1つの遺伝子の不活性化をもたらす。もう1つの好ましい観点においては、修飾は、glaA、並びにasa, amyA, amyB, prtT及びoahから成る群から選択された少なくとも1つの遺伝子の発現の低下をもたらす。もう1つの好ましい観点においては、修飾は、glaA、及び低められるか、排除されるか、又はその組合せをもたらされる、asa, amyA, amyB, prtT及びoahから成る群から選択される少なくとも1つの遺伝子の発現をもたらす。

20

【0016】

好ましい観点においては、変異体は、glaA及びasaの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA及びamyAの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA及びamyBの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA及びprtTの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA及びoahの修飾を包含する。

【0017】

もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, asa及びamyAの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, asa及びamyBの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, asa及びprtTの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, asa及びoahの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, amyA及びamyBの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, amyA及びprtTの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, amyA及びoahの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, amyB及びprtTの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, amyB及びoahの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては変異体は、glaA, prtT及びoahの修飾を包含する。

30

【0018】

もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, asa, amyA及びamyBの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, asa, amyB及びprtTの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, asa, prtT及びoahの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, asa, amyA及びprtTの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, asa, amyA及びoahの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, amyA, amyB及びprtTの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, amyA, prtT及びoahの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, amyA, amyB及びoahの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点におい

40

50

ては、変異体は、glaA, amyB, prtT及びoahの修飾を包含する。

【0019】

もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, asa, amyA, amyB,及びprtTの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, asa, amyB, prtT及びoahの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, amyA, amyB, prtT及びoahの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, asa, amyA, amyB,及びoahの修飾を包含する。もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, asa, amyA, prtT及びoahの修飾を包含する。

もう1つの好ましい観点においては、変異体は、glaA, asa, amyA, amyB, prtT及びoahを包含する。

10

【0020】

用語“欠失”とは、同一の条件下で培養される場合、親アスペルギラス・ニガー株に比較して、検出できるグルコアミラーゼ、及び酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼA及び中性 - アミラーゼB、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼから成る群から選択された少なくとも1つの酵素を生成しないか、又は他方では、同一の条件下で培養される場合、親アスペルギラス・ニガーに比較して、グルコアミラーゼ、及び酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼA及び中性 - アミラーゼB、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼから成る群から選択された1又は複数の酵素を少なくとも25%以下、より好ましくは少なくとも50%以下、さらにより好ましくは少なくとも75%以下、及び最も好ましくは少なくとも95%以下生成するアスペルギラス・ニガー変異体株として本明細書においては定義される。

20

【0021】

本発明の方法においては、親アスペルギラス・ニガー株は、野生型アスペルギラス・ニガー株又はその変異体であり得る。用語“アスペルギラス・ニガー”とは、種々のアスペルギラス・ニガーを包含する(例えば、Robert A. Samsom and Johnl. Pitt, editors, Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification, Harwood Academic Publishers, The Netherlandsを参照のこと)。好ましい観点においては、親アスペルギラス・ニガー株は、アスペルギラス・ニガーDSM12665である。

【0022】

酵素 - 欠失性アスペルギラス・ニガー変異体株は、当業者において良く知られている方法、例えば挿入、破壊、置換又は欠失を用いて、glaA, 並びにasa, amyA, amyB, prtT及びoahから成る群から選択された少なくとも1つの遺伝子の発現を低めるか又は排除することにより構成され得る。修飾されるか又は不活性化されるべき遺伝子のその部分は、コード領域であるか、又はコード領域の発現のために必要とされる調節要素であり得る。遺伝子のそのような調節又は制御配列は、プロモーター配列又はその機能的部分、すなわち遺伝子の発現に影響を及ぼすのに十分である部分であり得る。可能性ある修飾のための他の制御配列は、リーダー、プロペプチド配列、シグナル配列、転写ターミネーター及び転写活性化因子を包含するが、但し、それらだけには制限されない。

30

【0023】

アスペルギラス・ニガー変異体株は、glaA, 並びにasa, amyA, amyB, prtT及びoahから成る群から選択された少なくとも1つの遺伝子の発現を排除するか又は低めるために遺伝子欠失技法により構成され得る。遺伝子欠失技法は、遺伝子の部分的又は完全な除去を可能にし、それにより、それらの発現を排除する。そのような方法においては、遺伝子の欠失は、前記遺伝子を端に有する5'及び3'領域を隣接して含むよう構成されたプラスミドを用いて相同組換えにより達成され得る。

40

【0024】

アスペルギラス・ニガー変異体株はまた、その転写又は翻訳のために必要とされる遺伝子又は調節要素における1又は複数のヌクレオチドを導入し、置換し、そして/又は除去することにより構成され得る。例えば、ヌクレオチドは、停止コドンの導入、開始コドンの除去、又は読取枠のフレームシフトの導入をもたらすために、挿入されるか又は除去さ

50

れ得る。そのような修飾は、当業界において知られている方法に従って、特定部位の突然変異誘発又はPCR生成された突然変異誘発により達成され得る。例えば、Botstein and Shortle, 1985, Science 229: 4719; Lo et al., 1985, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 2285; Higuchi et al., 1988, Nucleic Acids Research 16: 73-75; Shimada, 1996, Meth. Mol. Biol. 57: 157; Hoeta et al., 1989, Gene 77: 61; Horton et al., 1989, Gene 77: 61; 及び Sarkar and Sommer, 1990, BioTechniques 8: 404を参照のこと。

#### 【0025】

アスペルギラス・ニガー変異体株はまた、相同性領域の重複体を創造し、そしてその重複された領域間にベクターDNAを導入する遺伝子に対して相同の核酸フラグメントを含むインテグレイティブプラスミドを、興味ある遺伝子中に挿入することによる遺伝子は破壊技法により構成され得る。そのような遺伝子破壊は、挿入されるベクターがコード領域から遺伝子のプロモーターを分離するか、又は非機能的遺伝子生成物がもたらすコード配列を中断する場合、遺伝子発現を排除することができる。破壊構造体は、前記遺伝子に対して相同の5'及び3'領域を付随する選択マーカー遺伝子を単純化することができる。選択マーカーは、破壊された遺伝子を含む形質転換体の同定を可能にする。

10

#### 【0026】

アスペルギラス・ニガー変異体はまた、遺伝子転換の工程により構成され得る(例えば、Iglesias and Trautner, 1983, Molecular General Genetics 189: 73-76を参照のこと)。例えば、遺伝子転換方法においては、前記遺伝子に対応するヌクレオチド配列は、欠陥遺伝子を生成するために親アスペルギラス・ニガー株中に形質転換される欠陥性ヌクレオチド配列を生成するためにインビトロで突然変異誘発される。相同組換えにより、欠陥性ヌクレオチド配列は、内因性遺伝子を置換する。欠陥性遺伝子又は遺伝子フラグメントはまた、その欠陥性遺伝子を含む形質転換体の選択のために使用され得るマーカーを含んで成る。

20

#### 【0027】

アスペルギラス・ニガー変異体株はまた、前記遺伝子のヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を用いて、確立されたアンチセンス技法により構成され得る(Parish and Stoker, 1997, FEMS Microbiology Letters 154: 151-157)。より特定には、アスペルギラス・ニガー株による遺伝子の発現は、前記株において転写され得、そして前記株において生成されるmRNAにハイブリダイズすることができる、遺伝子のヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を導入することにより低められるか又は排除される。mRNAへの相補的アンチセンスヌクレオチド配列のハイブリダイズを可能にする条件下で、翻訳されるタンパク質の量が低められるか、又は排除される。

30

#### 【0028】

アスペルギラス・ニガー変異体株はさらに、当業界において良く知られている方法を用いてのランダム又は特異的突然変異誘発、例えば化学的突然変異誘発(例えば、Hopwood, The Isolation of Mutants in Methods in Microbiology (J. R. Norris and D. W. Ribbons, eds.) pp 363-433, Academic Press, New York, 1970を参照のこと)、及びトランスポジション(例えば、Youngman et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2305-2309を参照のこと)(但し、それらだけには限定されない)により構成され得る。遺伝子の修飾は、親株を突然変異誘発にゆだね、そして遺伝子の発現が低められているか又は排除されている変異体株についてスクリーニングすることにより行われ得る。特異的であるか又はランダムであり得る突然変異誘発は、例えば適切な物理的又は化学的突然変異誘発の使用、適切なオリゴヌクレオチドの使用により、又はDNA配列をPCR生成された突然変異誘発にゆだねることにより行われ得る。さらに、突然変異誘発は、それらの突然変異誘発方法のいずれかの組合せの使用により行われ得る。

40

#### 【0029】

本発明のための適切な物理的又は化学的突然変異誘発剤の例は、紫外(UV)線、ヒドロキシルアミン、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)、N-メチル-

50

N' - ニトロソグアニジン (NTG)、O - メチルヒドロキシルアミン、亜硝酸、エチルメタンスルホネート (EMS)、亜硫酸水素ナトリウム、蟻酸及びヌクレオチド類似体を包含する。

【0030】

好ましい観点においては、glaAは、配列番号5に対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも85%、最も好ましくは少なくとも90%、及びさらに最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んで成る。最も好ましい観点においては、glaAは、配列番号5のヌクレオチド配列を含んで成る。もう1つの最も好ましい観点においては、glaAは、配列番号5のヌクレオチド配列から成る。

10

【0031】

もう1つの好ましい観点においては、glaAは、非常に低い、好ましくは低い、より好ましくは中位の、より好ましくは中位の高い、さらにより好ましくは高い、及び最も好ましくは非常に高い緊縮条件下で配列番号5とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んで成る。

【0034】

好ましい観点においては、amyAは、配列番号21に対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも85%、最も好ましくは少なくとも90%、及びさらに最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んで成る。最も好ましい観点においては、amyAは、配列番号21のヌクレオチド配列を含んで成る。もう1つの最も好ましい観点においては、amyAは、配列番号21のヌクレオチド配列から成る。

20

【0035】

もう1つの好ましい観点においては、amyAは、非常に低い、好ましくは低い、より好ましくは中位の、より好ましくは中位の高い、さらにより好ましくは高い、及び最も好ましくは非常に高い緊縮条件下で配列番号21とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んで成る。

【0036】

好ましい観点においては、amyBは、配列番号17に対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも85%、最も好ましくは少なくとも90%、及びさらに最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んで成る。最も好ましい観点においては、amyBは、配列番号17のヌクレオチド配列を含んで成る。もう1つの最も好ましい観点においては、amyBは、配列番号17のヌクレオチド配列から成る。

30

【0037】

もう1つの好ましい観点においては、amyBは、非常に低い、好ましくは低い、より好ましくは中位の、より好ましくは中位の高い、さらにより好ましくは高い、及び最も好ましくは非常に高い緊縮条件下で配列番号17とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んで成る。

【0038】

好ましい観点においては、oahは、配列番号23に対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも85%、最も好ましくは少なくとも90%、及びさらに最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んで成る。最も好ましい観点においては、oahは、配列番号23のヌクレオチド配列を含んで成る。もう1つの最も好ましい観点においては、oahは、配列番号23のヌクレオチド配列から成る。

40

【0039】

もう1つの好ましい観点においては、oahは、非常に低い、好ましくは低い、より好ましくは中位の、より好ましくは中位の高い、さらにより好ましくは高い、及び最も好ましくは非常に高い緊縮条件下で配列番号23とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んで

50

成る。

【0040】

好ましい観点においては、prtTは、配列番号13に対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも85%、最も好ましくは少なくとも90%、及びさらに最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んで成る。最も好ましい観点においては、prtTは、配列番号13のヌクレオチド配列を含んで成る。もう1つの最も好ましい観点においては、prtTは、配列番号13のヌクレオチド配列から成る。

【0041】

もう1つの好ましい観点においては、prtTは、非常に低い、好ましくは低い、より好ましくは中位の、より好ましくは中位の高い、さらにより好ましくは高い、及び最も好ましくは非常に高い緊縮条件下で配列番号13とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んで成る。

10

【0042】

本発明のためには、2個のアミノ酸配列間の同一性の程度は、同一性表及び次の複数の照準パラメータを伴って、LASERGENE™ MEGALIGN™ ソフトウェア (DNASTAR, Inc., Madison, WI) を用いて、Wilbur-Lipman 方法 (Wilbur and Lipman, 1983, Proceedings of the National Academy of Science USA 80: 726-730) により決定される: 10のギャップペナルティー及び10ギャップ長さペナルティー。対照準パラメータは、Ktuple = 3、ギャップペナルティー = 3、及び窓 = 20である。

20

【0043】

本明細書に開示されるヌクレオチド配列又はその副配列、及びそのアミノ酸配列又はそのフラグメントは、当業者において良く知られている方法に従って、異なった属又は種の株からのヒアルロン酸の生合成に参与する酵素をコードするDNAを同定し、そしてクローン化しよう核酸プローブを企画するために使用され得る。特に、そのようなプローブは、そこにおける対応する遺伝子を同定し、そして単離するために、標準のサザンプロット方法に従って、興味ある属又は種のゲノム又はcDNAとのハイブリダイゼーションのために使用され得る。そのようなプローブは、完全な配列よりも相当に短い、しかし少なくとも15、好ましくは少なくとも25及びより好ましくは少なくとも35個の長さのヌクレオチドであるべきである。より長いプローブがまた使用され得る。DNA及びRNAプローブの両者が使用され得る。プローブは典型的には、その対応する遺伝子を検出するために、例えば<sup>32</sup>P, <sup>3</sup>H, <sup>35</sup>S, ビオチン又はアビジンによりラベルされる。

30

【0044】

従って、そのような他の生物から調製されるゲノムDNA又はcDNAライブラリーは、上記プローブとハイブリダイズし、そしてヒアルロン酸の生合成経路に参与する酵素をコードするDNAについてスクリーンされ得る。そのような生物からのゲノム又は他のDNAは、アガロース又はポリアクリルゲル電気泳動又は他の分離技法により分離され得る。ライブラリーからのDNA又は分離されたDNAは、ニトロセルロース又は他の適切なキャリアー材料にトランスファーされるか、又は固定され得る。本明細書に開示されるヌクレオチド配列又はその副配列と相同であるクローン又はDNAを同定するために、キャリアー材料がサザンプロットに使用される。本発明のためには、ハイブリダイゼーションは、ヌクレオチド配列が非常に高い緊縮条件下で、本明細書に開示されるヌクレオチド配列、その相補的鎖又はその副配列に対応するラベルされた核酸プローブにハイブリダイズする。核酸プローブがそれらの条件下でハイブリダイズする分子は、X線フィルムを用いて検出される。

40

【0045】

少なくとも100個の長さのヌクレオチドの長さのプローブに関して、非常に低い~非常に高い緊縮条件は、標準のサザンプロット方法に従っての、5 × SSPE, 0.3% SDS, 200 µg/ml の剪断され、そして変性されたサケ精子DNA、及び25%ホルムアミド (非常に低い及び低い緊縮に関して)、35%ホルムアミド (中位及び中位の高い緊縮に関して)、又は50%ホルムアミド (高い及び非常に高い緊縮に関して) における42 でのプレハイブリダイ

50

ゼーション及びハイブリダイゼーションとして定義される。

【0046】

少なくとも100個の長さのヌクレオチドの長さプローブに関しては、キャリアー材料は最終的に、 $2 \times \text{SSC}$ 、0.2%SDS溶液を用いて、好ましくは少なくとも45（非常に低い緊縮）、より好ましくは少なくとも50（低い緊縮）、より好ましくは少なくとも55（中位の緊縮）、より好ましくは少なくとも60（中位の高い緊縮）、さらにより好ましくは少なくとも65（高い緊縮）、および最も好ましくは少なくとも70（非常に高い緊縮）で、それぞれ15分間、3度洗浄される。

【0047】

約15個～約70個の長さのヌクレオチドである短いプローブに関しては、緊縮条件は、0.9MのNaCl、0.09Mのトリス-HCl、pH7.6、6 mM のEDTA、0.5のNP-40、 $1 \times \text{Denhardt}'\text{s}$ 溶液、1 mMのピロリン酸ナトリウム、1 mMの一塩基性リン酸ナトリウム、0.1 mMのATP及び0.2 mgの酵母RNA (ml当たり)における、Bolton and McCarthy (1962、Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48: 1390)に従って計算された $T_m$ よりも約5～約10

低い温度での標準のサザンプロット方法に従ってのプレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、及び後-ハイブリダイゼーション洗浄として定義される。

【0048】

約15個～約70個の長さのヌクレオチドである短いプローブに関しては、キャリアー材料は、 $6 \times \text{SSC}$ 及び0.1%SDSにより15分間、1度、及び $6 \times \text{SSC}$ を用いて、計算された $T_m$ よりも約5～約10低い温度でそれぞれ15分間、2度、洗浄される。

選択のアスペルギラス・ニガー株においてその対応する遺伝子を修飾するための酵素を生成する他の微生物源からの興味ある酵素の生成に関与する本明細書に記載されるヌクレオチド配列に対して相同か又は相補的なヌクレオチド配列が、使用され得る。

好ましい観点においては、アスペルギラス・ニガー変異体株における酵素の生成に関与する遺伝子の修飾は、選択マーカーにより標識されていない。

【0049】

選択マーカー遺伝子の除去は、逆選択培地上での変異体の培養により達成され得る。選択マーカー遺伝子がその5'及び3'末端を端に有する反復体を含む場合、その反復体は、変異体株が逆選択的にゆだねられる場合、相同組換えによる選択マーカー遺伝子からのルーピングを促進するであろう。選択マーカー遺伝子はまた、欠陥遺伝子の5'及び3'領域を含んで成るが、しかし選択マーカー遺伝子を欠いている核酸フラグメントを、変異体を株中導入し、続いて逆選択培地上での選択による、相同組換えにより除去され得る。相同組換えにより、選択マーカー遺伝子を含む欠陥遺伝子は、選択マーカー遺伝子を欠いている核酸フラグメントにより置換される。当業界において知られている他の方法がまた使用され得る。

【0050】

本発明の方法は、アスペルギラス・ニガー変異体株を得るための特定の順序に制限されないことが理解されるであろう。酵素の生成に関与する遺伝子の修飾は、生物学的物質の生成のための株の構成におけるいずれかの段階で親株中に導入され得る。好ましくは、アスペルギラス・ニガー変異体株は、異種の生物学的物質をコードする遺伝子の導入の前、すでに酵素欠失にされているべきである。

本発明のさらなる観点においては、アスペルギラス・ニガー株の変異体は、特定の生物学的物質の生成、回収又は適用に対して有害な物質をコードする他の酵素の修飾、例えば欠失又は破壊を含むことができる。

【0051】

好ましい観点においては、アスペルギラス・ニガー株はさらに、タンパク質加水分解活性をコードする、1又は複数の遺伝子の修飾、例えば破壊又は欠失を含んで成る。より好ましい観点においては、タンパク質加水分解活性は、アミノペプチダーゼ、ジペプチジルアミノペプチダーゼ、トリペプチジルアミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、アスペルギロペプシン、セリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、システインプロテアー

10

20

30

40

50

ゼ及び液胞プロテアーゼから成る群から選択される。

【0052】

もう1つの好ましい観点においては、アスペルギラス・ニガー株はさらに、カルボヒドラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコシダーゼ、ハロペルオキシダーゼ、ヘミセルラーゼ、インバーターゼ、イソメラーゼ、ラッカーゼ、リガーゼ、リパーゼ、リアーゼ、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、ペクチン分解酵素、ペルオキシダーゼ、フィターゼ、フェノールオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、トランスフェラーゼ、 $\alpha$ -1,6-トランスグルコシダーゼ、トランスグルタミナーゼ及びキシラナーゼから成る群から選択される酵素をコードする1又は複数の遺伝子の修飾、例えば破壊又は欠失を含んで成る。

10

【0053】

本発明の方法においては、アスペルギラス・ニガー変異体株は好ましくは、同一の条件下で培養される場合、その対応する親アスペルギラス・ニガー株と少なくとも同じ量の生物学的物質を生成する。より好ましい観点においては、変異体株は、同一の生成条件下で培養される場合、その対応する親アスペルギラス・ニガー株よりも、少なくとも25%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも75%、及び最も好ましくは少なくとも100%以上の生物学的物質を生成する。

【0054】

アスペルギラス・ニガー変異体株は、適切な培地において行われる実験用又は産業用発酵器において、振盪フラスコ培養、すなわち小規模又は大規模発酵（例えば、連続、バッチ、供給-バッチ又は固体状態酵母）により、生物学的物質の発現及び/又は単離を可能にする条件下で培養され得る。培養は、当業界において知られている方法を用いて、炭素及び窒素源、及び無機塩を含んで成る適切な栄養培地において行われる。適切な培地は、市販されているか、又は公開されている組成（例えば、American Type Culture Collectionのカatalogにおける）に従って調製され得る。分泌された生物学的物質は培地から直接的に回収され得る。生物学的物質が分泌されない場合、それは細胞溶解物から得られる。

20

【0055】

生物学的物質は、その生物学的物質に対して特異的である、当業界において知られている方法を用いて検出され得る。それらの検出方法は、特異的抗体の使用、高性能液体クロマトグラフィー、細管クロマトグラフィー、酵素生成物の形成、酵素基質の消出、又はSDS-PAGEを包含する。例えば、酵素アッセイは、酵素の活性を決定するために使用され得る。酵素活性を決定するための方法は、多くの酵素について当業界において知られている（例えば、D. Schomburg and M. Salzman (eds.), Enzyme Handbook, Springer-Verlag, New York, 1990を参照のこと）。

30

【0056】

得られる生物学的物質は、当業界において知られている方法により単離され得る。例えば、興味あるポリペプチドは、従来の方法、例えば遠心分離、濾過、抽出、噴霧乾燥、蒸発又は沈殿により、培養培地から単離され得る。次に、単離されたポリペプチドは、さらに当業界において知られている種々の方法、例えばクロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、疎水性、クロマトフォーカシング及びサイズ排除）、電気泳動方法（例えば、分離用等電点電気泳動（IEF））、示差溶解性（例えば、硫酸アンモニウム沈殿）、又は抽出（但し、それらだけには限定されない）により精製され得る（例えば、Protein Purification, J. -C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989を参照のこと）。興味ある代謝物は、例えば抽出、沈殿、示差溶解性、又は当業界において知られているいずれか方法により、培養培地から単離され得る。単離された代謝物は、その代謝物のために適切な方法を用いて、さらに精製され得る。

40

【0057】

異種の生物学的物質は、いずれかの生物ポリマー又は代謝物であり得る。生物学的物質

50

は、生合成又は代謝経路を構成する、単一の遺伝子又は一連の遺伝子によりコードされ得る。従って、用語、“異種の生物学的物質をコードする第1のヌクレオチド配列”とは、生物学的物質の生成に包含される1又は複数の遺伝子を包含することが理解されるであろう。用語、“異種の生物学的物質”とは、宿主株に対して生来ではない生物学的物として；構造的修飾が生来の生物学的物質を変更するために行われている、生来の生物学的物質、例えば、生来のポリペプチドのタンパク質配列として；又はその発現が組換えDNA技法によりヌクレオチド又は宿主株の操作の結果として定量的に変更される生来の生物学的物、例えば、より強いプロモーターとして本明細書において定義される。

【0058】

本発明の方法においては、生物ポリマーはいずれの生物ポリマーでもあり得る。用語、“生物ポリマー”とは、同一の、類似する、又は類似しないサブユニット（モノマー）の鎖（又はポリマー）として本明細書において定義される。生物ポリマーは、核酸、ポリアミン、ポリオール、ポリペプチド（又はポリアミド）、又はポリサッカリドであり得るが、但しそれらだけには限定されない。

【0059】

好ましい態様においては、生物ポリマーは、ポリペプチドである。ポリペプチドは、興味ある生物学的活性を有するいずれかのポリペプチドであり得る。用語、“ポリペプチド”とは、コードされる生成物の特定の長さを意味せず、そして従って、ペプチド、オリゴペプチド及びタンパク質を包含する。用語、“ポリペプチド”はまた、コードされる生成物を形成するために組み合わされる複数のポリペプチドを包含する。ポリペプチドはまた、少なくとも2種の異なったポリペプチド（1又は複数のポリペプチドはアスペルギラス・ニガー株に対して異種であり得る）から得られた部分的又は完全なポリペプチド配列の組合せを含んで成るハイブリッドポリペプチドを包含する。ポリペプチドはさらに、上記ポリペプチド及びハイブリッドの天然に存在する対立遺伝子及び構築された変動体を包含する。

【0060】

好ましくは、異種ポリペプチドは、抗体、抗原、抗菌ペプチド、酵素、成長因子、ホルモン、イムノモジュレーター、神経伝達物質、受容体、受容体タンパク質、構造タンパク質及び転写因子である。

【0061】

好ましい観点においては、異種ポリペプチドは、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ又はリガーゼである。より好ましい観点においては、ポリペプチドは、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、カルボヒドロラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、インパーターゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、マンノシダーゼ、ムタナーゼ、オキシダーゼ、ペクチン分解酵素、ペルオキシダーゼ、フィターゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、タンパク質分解酵素、リボヌクレアーゼ、トランスグルタミナーゼ、ウロキナーゼ又はキシラナーゼである。

【0062】

もう1つの好ましい観点においては、ポリペプチドはコラーゲン又はゼラチンである。もう1つの好ましい観点においては、生物ポリマーは、ポリサッカリドである。ポリサッカリドは、いずれかのポリサッカリド、例えばムコポリサッカリド（例えば、ヘパリン及びヒアルロン酸）及び窒素含有ポリサッカリド（例えば、キチン）であり得るが、但しそれらだけには限定されない。より好ましい態様においては、ポリサッカリドはヒアルロン酸である。“ヒアルロン酸”は、 $\beta$ -1,4及び $\beta$ -1,3グリコシド結合を変えることによって一緒に結合される、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）及びグルクロン酸（GlcUA）の反復二糖単位から構成される、硫酸化されていないグリコサミノグリカンとして、本明細書においては定義される。ヒアルロン酸はまた、ヒアルロナン、ヒアルロネート

10

20

30

40

50

又はHAとして知られている。もう1つの好ましい観点においては、ポリサッカリドは、キチンである。もう1つの好ましい観点においては、ポリサッカリドは、ヘパリンである。

【0063】

本発明の方法においては、代謝物はいずれの代謝物でもあり得る。代謝物は、1又は複数の遺伝子、例えば生合成又は代謝路によりコードされ得る。用語、“代謝物”とは、一次及び二次代謝物の両者を包含する。一次代謝物は、エネルギー代謝、成長及び構造に関連する、株の一次又は一般代謝の生成物である。二次代謝物は、二次代謝の生成物である(R. B. Herbert, *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*, Chapman and Hall, New York, 1981を参照のこと)。

【0064】

一次代謝物は、アミノ酸、脂肪酸、ヌクレオシド、ヌクレオチド、糖、トリグリセリド又はビタミンであり得るが、但しそれらだけには限定されない。

二次代謝物は、アルカロイド、クマリン、フラボノイド、ポリケチド、キニン、ステロイド、ペプチド又はテルペンであり得るが、但しそれらだけには限定されない。好ましい態様においては、二次代謝物は、抗生物質、摂食阻害剤、誘引剤、殺菌剤、抗菌剤、ホルモン、殺昆虫剤又は殺鼠薬である。

【0065】

本発明の方法においては、アスペルギラス・ニガー株の変異体は、生物学的物質の組換え生成に都合良く使用される、異種の生物学的物質、例えばポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んで成る組換え株である。前記株は好ましくは、異種の生物学的物質をコードするヌクレオチド配列を含んで成るベクターにより形質転換され、続いて前記ベクターが染色体中に組込まれる。“形質転換”とは、宿主株中へのヌクレオチド配列を含んで成るベクターの導入を意味し、その結果、前記ベクターは染色体成分として、又は自己複製染色体外ベクターとして維持される。組込みは一般的に、ヌクレオチド配列が株において安定して維持されるので、好都合であると思われる。染色体中へのベクターの組込みは、相同組換え、非相同組換え、又はトランスポジションにより起こる。

【0066】

異種の生物学的物質をコードするヌクレオチド配列は、いずれかの原核生物、真核生物、又は他の源、例えば古細菌から得られる。本発明のためには、一定の源に関して、用語、“～から得られる”とは、本明細書において使用される場合、生物学的物質が、前記源により、又は前記源からの遺伝子が挿入されている細胞により生成されることを意味するであろう。

【0067】

本発明の方法においては、アスペルギラス・ニガー株の変異体はまた、そのアスペルギラス・ニガー株の変異体に生来である生物学的物質の組換え生成のためにも使用され得る。生来の生物学的物質は、たとえば生物学的物質の発現を増強するために、シグナル配列の使用により細胞外への興味ある生来の生物学的物質の輸送を促進するために、及びアスペルギラス・ニガー株により通常生成される生物学的物質をコードする遺伝子のコピー数を高めるために、異なったプロモーターの制御下で生物学的物質をコードする遺伝子を配置することによって組換え的に生成され得る。従って、本発明はまた、生来の生物学的物質の組換え生成を、そのような発現がアスペルギラス・ニガー株に対して生来ではない遺伝子要素の使用、又は宿主株において通常存在しない態様で機能するよう操作された生来の要素の使用を包含する程度まで、用語“異種生物学的物質”の範囲内で包含する。

【0068】

生物学的物質をコードするヌクレオチド配列を単離し、又はクローン化するために使用される技法は、当業界において知られており、そしてゲノムDNAからの単離、cDNAからの調製又はそれらの組み合わせを包含する。そのようなゲノムDNAからのヌクレオチド配列のクローニングは、良く知られているポリメラーゼ鎖反応(PCR)を用いることによってもたらされ得る。たとえば、Innisなど., 1990, *PCR Protocols: A Guide to Method and Application*, Academic Press, New Yorkを参照のこと。クローニング方法は、生物学的

10

20

30

40

50

物質をコードするヌクレオチド配列を含んで成る所望する核酸フラグメントの切除及び単離、ベクター分子中への前記フラグメントの挿入、及びヌクレオチド配列の複数コピー又はクローンが複製されるであろうアスペルギラス・ニガー株中への組換えベクターの組み込みを包含することができる。ヌクレオチド配列は、ゲノム、cDNA、RNA、半合成、合成起原、又はそれらのいずれかの組み合わせのものであり得る。

【0069】

本発明の方法においては、生物学的物質はまた、もう1つのポリペプチドがポリペプチド又はそのフラグメントのN-末端又はC-末端で融合されている融合された又はハイブリッドポリペプチドも包含することができる。融合されたポリペプチドは、1つのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列(又はその一部)を、もう1つのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列(又はその一部)に融合することによって生成される。融合ポリペプチドを生成するための技法は、当業界において知られており、そしてポリペプチドをコードする配列を、それらが読み取り枠を整合して存在し、そして融合されたポリペプチドが同じプロモーター及びターミネーターの制御下にあるよう連結することを包含する。

【0070】

“核酸構造体”は、本明細書においては、天然に存在する遺伝子から単離され、又は他方では、天然に存在しない態様で組み合わされ、そして並置される、核酸のセグメントを含むように修飾されている、一本鎖又は二本鎖核酸分子として定義される。用語“核酸構造体”は、核酸構造体がコード配列の発現のために必要とされるすべての制御配列を含む場合、用語“発現カセット”と同じ意味である。用語“コード配列”とは、本明細書において定義される場合、mRNAに転写され、そして下記に言及される配列の制御下に配置される場合、興味ある生物学的物質中に翻訳される配列である。コード配列の境界は、一般的に、ATG開始コドン、及び他の開始コドン、例えばGTG及びTTGにより通常開始する、読み取り枠により決定される。コード配列は、DNA、cDNA、及び組換えヌクレオチド配列を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【0071】

生物学的物質をコードする単離されたヌクレオチド配列が、生物学的物質の発現を提供するために種々の手段で操作され得る。ベクター中への挿入の前、ヌクレオチド配列の操作が、発現ベクター又はアスペルギラス・ニガー宿主株に依存して、所望され、又は必要である。クローニング方法を用いてのヌクレオチド配列を修飾するための技法は、当業界において良く知られている。

【0072】

生物学的物質をコードするヌクレオチド配列を含んで成る核酸構造体は、制御配列と適合する条件下で、本発明のアスペルギラス・ニガー変異体株におけるコード配列の発現を指図することができる1又は複数の制御配列に作用可能に結合され得る。

【0073】

用語“制御配列”とは、ヌクレオチド配列のコード配列の発現のために必要であるか、又はそのために好都合であるすべての成分を包含するよう定義される。個々の制御配列は、生物学的物質をコードするヌクレオチド配列に対して生来であっても又は外来性であっても良い。そのような制御配列は、リーダー、プロモーター、シグナル配列、及び転写ターミネーターを包含するが、但しそれらだけには限定されない。最少で、制御配列は、プロモーター、及び転写及び翻訳停止シグナルを包含する。制御配列は、生物学的物質をコードするヌクレオチド配列のコード領域と制御配列との連結を促進する特定の制限部位を導入するためにリンカーを提供され得る。

【0074】

制御配列は、ヌクレオチド配列の発現のためにアスペルギラス・オリザ工株により認識される適切なプロモーター配列である。プロモーター配列は、生物学的物質の発現を介する転写制御配列を含む。プロモーターは、アスペルギラス・オリザ工変異体株において転写活性を示すいずれかの核酸配列であり得、そして、アスペルギラス・オリザ工株に対して相同であるか又は異種である細胞外又は細胞内生物学的物質をコードする遺伝子から

10

20

30

40

50

得られる。

【0075】

本発明の方法における核酸構造体の転写を方向づけるための適切なプロモーターの例は、次の酵素をコードする遺伝子から得られるプロモーターである：アスペルギラス・オリザエTAKAアミラーゼ、リゾムコル・ミエハイ アスパラギン酸プロテイナーゼ、アスペルギラス・ニガー中性 - アミラーゼ、アスペルギラス・ニガー酸安定性 - アミラーゼ、アスペルギラス・ニガー又はアスペルギラス・アワモリグルコアミラーゼ (glA)、リゾムコル・ミエハイリパーゼ、アスペルギラス・オリザエ アルカリプロテアーゼ、アスペルギラス・オリザエトリオースリン酸イソメラーゼ、アスペルギラス・ニジュランスアセトアミダーゼ、フサリウム・ベネナタムアミログルコシダーゼ (WO 00/56900号)、フサリウム・ベネナタムDaria (WO 00/56900号)、フサリウム・ベネナタムQuinn (WO 00/56900号)、フサリウム・オキシスポラムトリプシン - 様プロテアーゼ (WO 96/00787号)、トリコダーマ・レセイ - グルコシダーゼ、トリコダーマ・レセイセロビオヒドロラーゼI、トリコダーマ・レセイエンドグルカナーゼI、トリコダーマ・レセイエンドグルカナーゼII、トリコダーマ・レセイエンドグルカナーゼIII、トリコダーマ・レセイエンドグルカナーゼIV、トリコダーマ・レセイエンドグルカナーゼV、トリコダーマ・レセイキシラナーゼI、トリコダーマ・レセイキシラナーゼII、トリコダーマ・レセイ - キシラナーゼ、及びNA2 - tpiプロモーター (アスペルギラス・ニガー中性 - アミラーゼ及びアスペルギラス・オリザエトリオースリン酸イソメラーゼをコードする遺伝子からのプロモーターのハイブリッド)；及びそれらの変異体の切断され、及びハイブリッドのプロモーター。特に好ましいプロモーターはグルコアミラーゼ、TAKAアミラーゼ及びNA2 - tpiプロモーターである。

10

20

【0076】

制御配列はまた、適切な転写ターミネーター配列、すなわち転写を終結するようアスペルギラス・ニガー株により認識される配列でもあり得る。ターミネーター配列は、異種生物学的物質をコードするヌクレオチド配列の3'側末端に作用可能に連結される。アスペルギラス・ニガー株において機能的であるいずれかのターミネーターが、本発明において使用され得る。

【0077】

好ましいターミネーターは、次の酵素をコードする遺伝子から得られる：アスペルギラス・オリザエTAKAアミラーゼ、アスペルギラス・ニガーグルコアミラーゼ、アスペルギラス・ニジュランス アントラニル酸シンターゼ、アスペルギラス・ニガー - グルコシダーゼ及びフサリウム・オキシスポラム トリプシン - 様プロテアーゼ。

30

制御配列はまた、適切なリーダー配列、すなわち、アスペルギラス・ニガー株による翻訳のために重要であるmRNAの非翻訳領域でもあり得る。リーダー配列は、異種生物学的物質をコードするヌクレオチド配列の5'側末端に作用可能に連結される。アスペルギラス・ニガー株において機能的であるいずれかのリーダー配列が、本発明に使用され得る。

【0078】

好ましいリーダーは、アスペルギラス・オリザエTAKAアミラーゼ及びアスペルギラス・ニジュランス トリオースリン酸イソメラーゼをコードする遺伝子から得られる。

40

制御配列はまた、ポリアデニル化配列、すなわちヌクレオチド配列の3'末端に作用可能に連結され、そして転写される場合、転写されたmRNAにポリアデノシン残基を付加するためにシグナルとしてアスペルギラス・ニガー株により認識される配列であり得る。アスペルギラス・ニガー株において機能するいずれかのポリアデニル化配列が、本発明において使用され得る。

好ましいポリアデニル化配列は、アスペルギラス・オリザエTAKAアミラーゼ、アスペルギラス・ニガーグルコアミラーゼ、アスペルギラス・ニジュランスアントラニル酸シンターゼ及びアスペルギラス・ニガー - グルコシダーゼをコードする遺伝子から得られる。

【0079】

制御配列はまた、異種ポリペプチドのアミノ末端に連結されるアミノ酸配列をコードし

50

、そしてそのコードされたポリペプチドを細胞の分泌路中に方向づけるシグナルペプチドコード領域でもあり得る。ヌクレオチド配列のコード配列の5'側末端は、本来、分泌されたポリペプチドをコードするコード領域のセグメントと翻訳読み取り枠を整合して、天然において連結されるシグナルペプチドコード領域を含むことができる。他方では、コード配列の5'側末端は、そのコード配列に対して外来性であるシグナルペプチドコード領域を含むことができる。通常、そのコード配列がシグナルペプチドコード領域を含まない外来性シグナルペプチドコード領域が必要とされる。他方では、外来性シグナルペプチドコード領域は、ポリペプチドの増強された分泌を得るために、天然のシグナルペプチドコード領域を単純に置換することができる。しかしながら、アスペルギラス・ニガー株の分泌路中に発現された異種ポリペプチドを方向づけるいずれかのシグナルペプチドコード領域が、本発明に使用され得る。

10

**【0080】**

アスペルギラス・ニガー宿主のための効果的なシグナルペプチドコード領域は、次の酵素のための遺伝子から得られたシグナルペプチドコード領域である：アスペルギラス・オリザエTAKAアミラーゼ、アスペルギラス・ニガー中性アミラーゼ、アスペルギラス・ニガーグルコアミラーゼ、リゾムコル・ミエハイアスパラギン酸プロテイナーゼ、ヒューミコラ・インソレンスセルラーゼ、及びヒューミコラ・ラヌギノサリパーゼ。

**【0081】**

制御配列はまた、ポリペプチドのアミノ末端で位置するアミノ酸配列をコードするプロペプチドコード領域であり得る。得られるポリペプチドは、プロ酵素又はプロポリペプチド(又は多くの場合、チモーゲン)として知られている。プロポリペプチドは一般的に不活性であり、そしてプロポリペプチドからプロペプチドの触媒又は自己触媒分解により成熟した活性ポリペプチドに転換され得る。プロペプチドコード領域は、リゾムコル・ミエハイアスパラギン酸プロテイナーゼ遺伝子、又はミセリオブソラ・サーモフィリアラッカーゼ遺伝子から得られる(W095/33836号)。

20

**【0082】**

シグナルペプチド及びプロペプチド領域の両者がポリペプチドのアミノ末端に存在する場合、そのプロペプチド領域は、ポリペプチドのアミノ末端の次に位置し、そしてシグナルペプチド領域は、プロペプチド領域のアミノ末端の次に位置する。

**【0083】**

核酸構造体はまた、異種生物学的物質の発現を方向づけるために好都合である1又は複数の因子、たとえば転写活性化因子(たとえば、トランス-作用因子)、カペロン(chaperone)及びプロセッシングプロテアーゼをコードする1又は複数のヌクレオチド配列を含んで成ることができる。アスペルギラス・ニガー株において機能的であるいずれかの因子が本発明において使用され得る。1又は複数のそれらの因子をコードする核酸は、異種生物学的物質をコードするヌクレオチド配列とタンデムに必ずしも存在する必要はない。

30

**【0084】**

アスペルギラス・ニガー株の増殖に関して、異種生物学的物質の発現の調節を可能にする調節配列を付加することがまた所望される。調節システムの例は、調節化合物の存在を包含する、化学的又は物理的刺激に応答して、遺伝子の発現の開始又は停止を引き起こすそれらのシステムである。TAKA-アミラーゼプロモーター、アスペルギラス・ニガーグルコアミラーゼプロモーター及びアスペルギラス・オリザエグルコアミラーゼプロモーターが、調節配列として使用さえ得る。調節配列の他の列は、遺伝子増幅を可能にするそれらの配列、たとえば重金属により増幅されるメタロチオネイン遺伝子である。それらの場合、異種生物学的物質をコードするヌクレオチド配列が、調節配列により作用可能に連結される。

40

**【0085】**

本発明の方法においては、ヌクレオチド配列、プロモーター、及び転写及び翻訳停止シグナルを含んで成る組換え発現ベクターが、ポリペプチド又は他の生物学的物質の組換え

50

生成のために使用され得る。上記種々の核酸及び制御配列は、前記ポリペプチド又は生物学的物質をコードするヌクレオチド配列の挿入又は置換を可能にする、1又は複数の便利な制限部位を含むことができる組換え発現ベクターを生成するために一緒に連結され得る。他方では、ヌクレオチド配列は、前記ヌクレオチド配列、又はその配列を含んで成る核酸構造体を、発現のための適切なベクター中に挿入することにより発現され得る。発現ベクターの創造においては、コード配列は、そのコード配列が発現及びたんぱく分泌のための適切な制御配列により作用可能に連結されるよう、ベクターに配置される。

**【0086】**

組換え発現ベクターは、組換えDNA方法に便利にゆだねられ得、そしてヌクレオチド配列の発現をもたらすことができるいずれかのベクターであり得る。ベクターの選択は典型的には、ベクターが導入される予定であるアスペルギラス・ニガー株とベクターとの適合性に依存するであろう。ベクターは、線状又は閉環された環状プラスミドであり得る。ベクターは自律的に複製するベクター、すなわち染色体存在物として存在するベクター（その複製は染色体複製には無関係である）、たとえばプラスミド、染色体外要素、ミニクロモソーム又は人工染色体であり得る。

10

**【0087】**

ベクターは自己複製を確かめるためのいずれかの手段を含むことができる。他方では、ベクターは、アスペルギラス・ニガー株中に導入される場合、ゲノム中に組み込まれ、そしてそれが組み込まれている染色体と一緒に複製されるベクターであり得る。ベクターシステムは、アスペルギラス・ニガー株のゲノム中に導入される全DNA又はトランスポゾンと一緒に含む、単一のベクター又はプラスミド、又は複数のベクター又はプラスミドであり得る。

20

**【0088】**

ベクターは、アスペルギラス・ニガー株中に導入される場合、その株のゲノム中に組み込まれ得る。本発明のアスペルギラス・ニガー株のゲノム中への組み込みのためには、ベクターは、相同又は非相同組換えによるゲノム中へのベクターの安定した組み込みのためのベクター中の異種生物学的物質、又はいずれか他の要素をコードするヌクレオチド配列に依存する。他方では、ベクターは、アスペルギラス・ニガー株のゲノム中への相同組換えによる組み込みを方向づけるための追加のヌクレオチド配列を含むことができる。その追加のヌクレオチド配列は、染色体における正確な位置でのゲノム中へのベクターの組み込みを可能にする。

30

**【0089】**

正確な位置での組み込みの可能性を高めるために、組み込み要素は好ましくは、相同組換えの可能性を高めるために対応する標的配列と高い相同性を示す十分な数の核酸、たとえば100~1,500個の塩基対、好ましくは400~1,500個の塩基対、及び最も好ましくは800~1,500個の塩基対を含むべきである。組み込み要素は、アスペルギラス・ニガーのゲノムにおける標的配列と相同であるいずれかの配列であり得る。さらに、組み込み要素は、非コード又はコードヌクレオチド配列であり得る。他方では、ベクターは非相同組換えにより細胞のゲノム中に組み込まれ得る。

40

**【0090】**

自律複製のためには、ベクターはさらに、問題のアスペルギラス・ニガーにおけるベクターの自律複製を可能にする複製の起点を含むことができる。

上記の種々の核酸及び制御配列は、1又は複数の便利な制限部位で異種生物学的物質をコードするヌクレオチド配列の挿入又は置換を可能にするためにそれらの部位を含むことができる組換え発現ベクターを生成するために一緒に連結され得る。他方では、異種生物学的物質をコードするヌクレオチド配列は、前記配列又は前記配列を含んで成る核酸構造体を、発現のための適切なベクター中に挿入することによって発現され得る。発現ベクターを創造する場合、そのコード配列はベクターに位置し、その結果、コード配列は発現及びたんぱく分泌のための適切な制御配列により作用可能に連結される。

**【0091】**

50

ベクターは好ましくは、形質転換されたアスペルギラス・ニガー株の容易な選択を可能にする1又は複数の選択マーカを含む。選択マーカは、1つの遺伝子であり、その生成物は、殺生物剤又はウィルス耐性、重金属に対する耐性、栄養要求性に対する原栄養要求性、及び同様のものを提供する。アスペルギラス・ニガー株に使用するための選択マーカは、次の群から選択されるが、但しそれらだけには限定されない；amdS（アセトアミダーゼ）、argB（オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ）、bar（ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ）、hph（ヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ）、niaD（硝酸レダクターゼ）、pyrG（オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ）、sC（硫酸アデニルトランスフェラーゼ）及びtrpC（アントラニル酸シンターゼ）、並びに他の種からの同等物。アスペルギラス・ニジュランス又はアスペルギラス・オリザエのamdS及びpyrG遺伝子及びストレプトミセス・ヒグロスコピカスのbar遺伝子が、アスペルギラス・ニガー株への使用のために好ましい。

【0092】

ベクターは好ましくは、ぜんき株のゲノム中へのベクターの安定した組み込み、又は細胞のゲノムに無関係に細胞におけるベクターの自律的複製を可能にする要素を含む。

“導入”とは、核酸配列を含んで成るベクターをアスペルギラス・ニガー株中に導入することを意味し、その結果、前記ベクターは染色体組み込み体として、又は自己複製染色体ベクターとして維持される。組み込みは一般的に、ヌクレオチド配列が株中に安定して維持される場合、好都合であると思われる。染色体中へのベクターの組み込みは、相同組換え、非相同組換え又はトランスポジションにより起こる。

【0093】

アスペルギラス・ニガー株中への発現ベクターの導入は、プロトプラスト形成、プロトプラストの形質転換、及びそれ自体既知の態様での細胞壁の差異性から成る方法を包含することができる。アスペルギラス宿主細胞の形質転換のための適切な方法は、ヨーロッパ特許第238023及びYeltonなど、1984, Proceedings of the National of sciences USA 81: 1470-1474に記載される。

【0094】

組換え発現ベクターを構成するために本明細書に記載される要素を連結するために使用される方法は、当業者に良く知られている（たとえば、J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor, New York を参照のこと）。

【0095】

本発明のもう1つの観点においては、変異体アスペルギラス・ニガー株はさらに、興味ある異種生物学的物質の生成、回収及び/又は適用に対して有害であり得るタンパク質をコードする1又は複数のヌクレオチド配列の修飾を含むことができる。その修飾は、同じ条件下で培養される場合、第3のヌクレオチド配列の修飾を伴わないで、変異体細胞よりも一層の異種生物学的物質を生成する変異体細胞をもたらず1又は複数の第3ヌクレオチド配列の発現を低めるか又は排除する。

【0096】

前記第3ヌクレオチド配列は、いずれかのタンパク質又は酵素をコードすることができる。たとえば、前記酵素は、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、インベルターゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、マンノシダーゼ、ムタナーゼ、オキシダーゼ、ペクチン分解酵素、ペルオキシダーゼ、ホスホリパーゼ、フィターゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、タンパク質分解酵素、リボヌクレアーゼ、トランスグルタミナーゼ、又はキシラーゼである。第3ヌクレオチド配列は、好ましく、タンパク質分解酵素、たとえばアミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ又はプロテアーゼをコードする。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 7 】

本発明はまた、( a ) それぞれ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、シュウ酸ヒドロラーゼ、酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼA及び中性 - アミラーゼBの生成に  
関与する、glaA、並びにasa, amyA, amyB, prtT及びoahから成る群から選択された少なく  
とも1つの遺伝子の修飾を含んで成る第1のヌクレオチド配列中にアスペルギラス・ニガ  
ー株を導入し；そして( b ) 同一の条件下で培養される場合、親アスペルギラス・ニガ  
ーに比較して、グルコアミラーゼ、並びに酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼA  
及び中性 - アミラーゼB、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼから成る群から選択  
された少なくとも1つの酵素の生成を欠いている、修飾されたヌクレオチド配列を含んで  
成る、段階( a ) からの変異体株を同定することを含んで成る方法にも関する。

10

## 【 0 0 9 8 】

本発明はさらに、異種の生物学的物質をコードする第1のヌクレオチド配列、及びそれ  
ぞれ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、シュウ酸ヒドロラーゼ、酸安定性 - アミラー  
ゼ、中性 - アミラーゼA及び中性 - アミラーゼBの生成に関与する、glaA、並びにasa,  
amyA, amyB, prtT及びoahから成る群から選択された少なくとも1つの遺伝子の修飾を含  
んで成る1又は複数の第2のヌクレオチド配列を含んで成る、親アスペルギラス・ニガ  
ー株の変異体に関し、ここで同一の条件下で培養される場合、親アスペルギラス・ニガ  
ーに比較して、グルコアミラーゼ、並びに酸安定性 - アミラーゼ、中性 - アミラーゼA及  
び中性 - アミラーゼB、プロテアーゼ及びシュウ酸ヒドロラーゼから成る群から選択さ  
れた少なくとも1つの酵素を欠いていることを特徴とする。

20

本発明はさらに、次の例により記載されるが、それらは本発明の範囲を制限するもの  
ではない。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 9 9 】

すべてのプライマー及びオリゴマーは、MWG Biotech, Inc., High Point, NCにより供給  
された。

DNA配列決定は、ABI 3700 Sequencing (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)  
により行われた。

## 株：

すべての株は、アスペルギラス・ニガ-Bo - 1 (DSM 12665) に由来する。アスペルギ  
ラス・ニガ-Bo - 1は、 - 1, 6 - トランスグルコシダーゼ活性をもたらさない - 1  
 , 6 - トランスグルコシダーゼ遺伝子の突然変異を含んで成る。

30

## 【 0 1 0 0 】

## 培地及び溶液：

最少培地は、1L当たり6 g のNaNO<sub>3</sub>, 0.52 g のKCl, 1.52 g のKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 g のNoble寒  
天, 10 gのグルコース, 0.5g のMgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 及び 1 mlのCove 微量元素から構成された  
。

Coveプレートは、1L当たり342. 3 g のスクロース, 20 mlのCove塩(50X), 10 mM のア  
セトアミド, 15 mM のCsCl, 及び25 g のNoble 寒天から構成された。

50 × COVE塩溶液は、1L当たり、26gのKCl、26gのMgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、76gのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及び50mlの  
Cove微量元素から構成された。

40

## 【 0 1 0 1 】

Cove微量元素溶液は、1L当たり、0.004gのNaB<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O, 0.4gのCuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 1.2g  
のFeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.7gのMnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.8gのNa<sub>2</sub>MoO<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O及び10gのZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>Oから構成  
された。

AMG微量元素溶液は、1L当たり、14.3 g のZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2.5 g の CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.5  
g のNiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 13.8 gのFeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 8.5 g のMnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O,及び3 g のクエン酸から  
成った。

## 【 0 1 0 2 】

YP培地は、1L当たり10gの酵母抽出物及び20gのBactoペプトンから構成された。

50

STCは、0.8Mのソルビトール、50mMのトリス (pH8)、25mMのCaCl<sub>2</sub>から構成された。

SPTCは、40%のPEG4000、0.8Mのソルビトール、50mMのトリス (pH8)、50mMのCaCl<sub>2</sub>から構成された。

SPCは、1L当たり40%PEG 4000、0.8Mのソルビトール及び50mMのCaCl<sub>2</sub> (pH4.5)から構成された。

#### 【0103】

カゼインプレートは、1L当たり7gのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O、0.5gのKCl、0.2gのMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、2gの酵母抽出物、10gのグルコース、0.5gのTriton X-100、20gのNoble寒天、及び10gのカゼインから構成された。

スターチアズールプレートは、1L当たり0.1gのグルコース、1gのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5gのMgSO<sub>4</sub>、0.5gのKCl、3gのNaNO<sub>3</sub>、0.1gの酵母抽出物、1ml of Cove微量元素、5gのスターチアズール、15gのNoble寒天、及び100mMのグリシンpH 2.9から構成された。

#### 【0104】

##### 例1：形質転換方法

次の例に記載される個々の破壊カセット20μgを、制限酵素により消化し、そして破壊のために使用されるべきフラグメントを切除し、そしてQIAEXII Gel Extraction Kit(QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA)を用いて、1%アガロース - 50mMのトリス塩基 - 50mMのボレート - 0.1mMの二ナトリウムEDTA緩衝液 (TBE) ゲルから精製した。合計体積を、無菌ガラス蒸留された水において20μlにし、そして4種の形質転換の間に流した。

#### 【0105】

プロトプラストを次のプロトコールを用いて調製した。5%のグルコースにより補充された20mlのYP培地を含む振盪フラスコを、アスペルギラス・ニガー分生子により約10<sup>6</sup> - 10<sup>8</sup>/mlの密度で接種した。34℃で一晩 (15 - 17時間) のインキュベーション (200rpm) に続いて、菌糸体を、無菌Miracloth™ (Calbiochem, San Diego, CA)による濾過により集め、そして1.2Mのソルビトール (アスペルギラス・ニガー株JPoy3、SM0110及びMBin111~MBin114、例6~9を参照のこと) 又は1MのMgSO<sub>4</sub> (アスペルギラス・ニガー株MBin115~MBin120、例9~12を参照のこと) 10 - 20ml中、3 - 5mgのNovozym™234の溶液に移した。Novozym™234による消化を典型的には、80 - 100rpmで軽く振盪しながら、37℃で30 - 45分間、行った。

#### 【0106】

プロトプラストを、無菌Miracloth™を通して濾過し、1.2Mのソルビトール (アスペルギラス・ニガー株MBin111 - MBin114) 又は2Mのソルビトール (アスペルギラス・ニガー株MBin115-MBin120) によりすすぎ、そして3000xgで10分間、遠心分離した。アスペルギラス・ニガー株JPoy3、SM0110及びMBin111-MBin114を1.2Mのソルビトール10mlにより2度、及び1.2Mのソルビトール - 50mMのCaCl<sub>2</sub>の溶液10mlにより1度、洗浄し、そして次に、1.2Mのソルビトール1ml当たり3 × 10<sup>7</sup> ~ 1 × 10<sup>8</sup>個のプロトプラストの濃度で再懸濁した。アスペルギラス・ニガー株MBin115 - MBin120を、1Mのソルビトール30mlにより1度及び30mlのSTCにより1度、洗浄し、そして次に、STC:SPTC:DMSO(8:2:0.1 v/v)に再懸濁し、1ml当たり3 × 10<sup>7</sup> ~ 1 × 10<sup>8</sup>個のプロトプラストの濃度を得た。アスペルギラス・ニガープロトプラストを、続く形質転換のために直接的に使用するか、又は - 80℃で凍結した。

#### 【0107】

プロトプラストの形質転換の前、選択的オーバーレイを溶融し、そして50℃で配置した。pyrG選択のためのオーバーレイは、1L当たり、20mlのCove塩、273.8gのスクロース、8gの希ガス、6gのNaNO<sub>3</sub>及び1gのNZAmineカサミノ酸 (pH5.5) から構成された。pyrG選択オーバーレイを、すべての遺伝子破壊の創造のために使用した。amdS選択のためのオーバーレイは、1L当たり20mlのCove塩 (50X)、273.8gのスクロース、8gの希ガス、10gのアセトアミド及び15mMのCsClから構成された。amdS選択オーバーレイを、いずれかの発現プラスミドが形質転換される場合、使用した。

#### 【0108】

DNA + 5μlのヘパリン (5mg/mlのSTC) を、100μlのプロトプラストに添加し、そして氷

10

20

30

40

50

上に30分間、置いた。アスペルギラス・ニガーMBin115の前、アスペルギラス・ニガー株は、ヘパリンを受けなかった。SPCを添加し（アスペルギラス・ニガー株JRoy3, SMO110及びMBin111 - MBin114に関して、250  $\mu$ l、及び残りの株に関して、1ml）、そして軽く混合し、続いて、室温で30分間インキュベートした。10mlの体積のオーバーレイ（50）を添加し、そしてすぐに、選択プレート上に注いだ。選択マーカーとしてpyrGを用いて遺伝子の破壊のための選択は、1Mのスクロースにより補充された最少培地であった。アスペルギラス・ニガーMBin111株の生成においては、1L当たり1Mのスクロース、1gの5 - フルオロ - オロト酸（5 - FOA）及び10mMのウリジンにより構成される最少培地プレートを使用した。Coveプレートを用いて、発現プラスミドを含む形質転換体について選択した。プレートを34 で3 - 7日間インキュベートした。

10

【 0 1 0 9 】

例 2：サザン分析

アスペルギラス・ニガー菌系体を、5%のグルコース（及び適用できる場合、10mMのウリジン）により補充されたYP培地5mlを含む15mmプレートから収穫し、濾過し、そしてサイドアームフラスコ及び磁器を用いて、10mMのトリス（pH7.4） - 0.1mMのEDTA（pH8）（TE）によりすすぎ、そして最後に、微小遠心分離管に入れ、高速バキューム下で1時間、乾燥した。

【 0 1 1 0 】

DNAを、Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA)を用いて単離した。5  $\mu$ gの単離されたDNAを2時間、消化し（40  $\mu$ lの合計体積、4Uの特定された制限エンドヌクレアーゼ/1  $\mu$ lのDNA）、そしてTBE緩衝液を用いて1%アガロースゲル上で電気泳動した。DNAを、0.25MのHClによる処理によりゲルにおいて断片化し、1.5MのNaCl - 0.5MのNaOHにより変性し、そして1.5MのNaCl - 1Mのトリス（pH8）により中和し、そして次に、20  $\times$  SSC中、MSI MagnaGraph ナイロン移行膜(Micron Separations, Inc., Westborough, MA)に移した。DNAを膜にUV架橋し、そして20mlのDIG Easy Hyb (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)において60 で1時間プレハイブリダイズした。

20

【 0 1 1 1 】

プローブを、製造業者により記載されるようにして製造業者(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)により記載されるようにしてPCR DIG Probe Synthesis Kitにより調製し、電気泳動し、そして1%低溶融アガロースゲルから切除した。使用前、ゲルを溶融し、そしてプローブを、10分間の煮沸により変性した。合計ゲルの体積の10%を、ハイブリダイゼーション緩衝液に添加した。変性されたプローブを、DIG Easy Hyb緩衝液に直接添加し、そして60 での一晚のハイブリダイゼーションを行った。後ハイブリダイゼーション洗浄（2  $\times$  SSCにおいて2度、0.4  $\times$  SSCにおいて1度、60 、それぞれ10分）に続いて、DIG検出システム及びCPD-Star (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)を用いての化学ルミネセント検出を行った。DIG-ラベルされたDNA Molecular Weight Marker III (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)を、標準として使用した。

30

【 0 1 1 2 】

例 3：アスペルギラス・ニガーゲノム ライブラリーの構成

40

アスペルギラス・ニガーBo - 1 DNAをWahleithner など., 1996, Current Genetics. 29: 395-403の方法に従って、グアニジン塩酸塩における溶解により単離し、続いてQiagen Maxiprep 過ラム(QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA)上でその製造業者による記載のようにして精製した。アスペルギラス・ニガーBo - 1のゲノムライブラリーを、EMBL4 (Clontech, Palo Alto, CA)において、その製造業者の説明書に従って創造した。アスペルギラス・ニガーBo - 1ゲノムDNAを、Sau3Aにより部分的に消化した。消化の後、DNAを、分離用低融点アガロースゲル上で電気泳動し、そして8 ~ 23kbのDNAを含む領域をゲルからスライスした。

【 0 1 1 3 】

DNAを、 - アガロース (New England Biolabs, Waltham, MA) によりゲルから抽出した

50

。単離されたDNAを、EMBL4アーム (Clonetech, Palo Alto, CA) により、その供給業者の説明書に記載のようにして連結した。その連結を、Gigapack Gold11 Packaging Kit (Stratagene, La Jolla, CA) によりインビトロでパッケージした。ライブラリーの力価を決定し、そしてライブラリーをE. コリ K802 細胞 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) により増幅した。増幅されていないライブラリーは、26,500個の独立した組換え体を含むものとして評価された。

#### 【 0 1 1 4 】

##### 例 4 : pyrGカセットの構成

EMBL4に含まれるアスペルギラス・ニガーBo - 1 のゲノムライブラリーからの約26,500個のブランクを、ナイロンフィルター上にレプリカプレートし、そしてアスペルギラス・ニジュランスのpyrG遺伝子からの1.4kbのフラグメントによりプローブした。いくつかの陽性クローンを、製造業者により記載の通りにして、精製し、そして増殖した。陽性クローンからのファージDNAを、Qiagen lambda Mini Prep Kit (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA) を用いて単離した。ファージDNAを、いくつかの制限酵素により消化し、続いて、pyrG遺伝子を含むフラグメントを同定するためにサザン分析した。クローン7bと命名された1つのクローンは、3.5kbのXbaIフラグメント上のプロモーター及びターミネーター配列の両者を包含する、アスペルギラス・ニガーpyrG遺伝 (配列番号 1 (DNA配列) 及び 2 (推定されるアミノ酸配列)) を含んだ。

#### 【 0 1 1 5 】

pyrG遺伝子フラグメントを、3.5kbのXbaIフラグメントとして、pUC118 (Roche Diagnostics Corporation, Mannheim, Germany) 中にクローン7bからサブクローン化し、pJRoy10 (図 1) をもたらした。プロモーター及びターミネーター配列の両者を含むpyrG遺伝子を、KspI及びSpeIによる消化によりpJRoy10から単離した。5' 末端でKspI部位及び3' 末端でSpeI部位を含むフラグメントを、1% アガロース - TBEゲル上で電気泳動に従って、QIAEX II ゲル抽出キットを用いて単離し、そして精製した。

#### 【 0 1 1 6 】

pyrGターミネーター配列の582bpのフラグメントを、SpeI及びKspI部位がそれぞれ前記フラグメント5' 及び3' 末端に付加されるよう、pJRoy10からPCR増幅した。プライマー 1 を用いて、SpeI部位を創造し、そしてプライマー 2 を用いて、KspI部位を付加した。

プライマー 1 : 5' - GGGACTAGTGGATCGAAGTTCTGATGGTTA - 3' (配列番号 3)

プライマー 2 : 5' - ATACCGCGGGTTTCAAGGATGGAGATAGGA - 3' (配列番号 4)

#### 【 0 1 1 7 】

PCR増幅を、10ngのpJRoy10プラスミドDNA、50pモルの個々のプライマー、2.5mMの個々のdATP、dCTP、dGTP及びdTTP、1 × PCR緩衝液 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)、並びに2.5mMのMgCl<sub>2</sub>、及び2.5単位のTaq DNAポリメラーゼ (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) から構成されるべき反応物50 µlにおいて行った。反応を、次のようにプログラムされたRoboCycler40サーモサイクラーにおいて: 95 °C で 3分 (1サイクル); 95 °C で 1分、60 °C で 1分及び72 °C で 1.5分 (30サイクル); 及び72 °C で 5分 (1サイクル)。

582bpのPCR生成物を、SpeI及びKspIにより消化し、そして下記のようにして直接使用した。

#### 【 0 1 1 8 】

プラスミドpMbin01 (図 2) を、アスペルギラス・ニガーpyrG遺伝子フラグメント及びアスペルギラス・ニガーpyrGターミネーターフラグメントを、pyrGが両側上に582bpのターミネーター配列を有するよう、pBluescriptSK- (Stratagene, La Jolla, CA) のSpeI部位中に連結することにより構成した。2696bpのSpeIフラグメントを、pMbin01+ から単離し、そして1% アガロース - TBEゲル上での電気泳動に続いて、QIAEXII Gel Extraction Kitを用いて精製した。プラスミドDNAを、Qiagen QiaPrep8 Miniprep又はMaxiprep Kits (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA) を用いて単離した。次に、2696bpのSpeIフラグメントを用いて、すべての破壊カセットを構成した。

## 【 0 1 1 9 】

例 5 : ウリジン栄養要求株の作成

次の例に記載される遺伝子破壊は、選択マーカーとしてアスペルギラス・ニガー-pyrG遺伝子を用いた。pyrG遺伝子は、ウリジンを添加しないでウリジン栄養要求株の増殖を可能にするオロトジン - 5' - ホスフェートデカルボキシラーゼをコードする。pyrGの反復使用を、例 4 に記載されるようにマーカーの末端への反復配列の付加により可能にした。pyrGの切除は、5 - FOA上での選択に基づいて直線的な反復体間での相同組換えにより生じた (d'Enfert, 1996, Current Genetics 30: 76-82)。

## 【 0 1 2 0 】

例 4 に記載されるように、破壊カセットは、582bpの反復pyrGターミネーター配列を端に有するpyrG遺伝子を含んだ。遺伝子破壊に続いて、個々の株を、pyrG遺伝子についての選択を排除するために、10mMのウリジンを含む最少培地で1度、継代した。胞子を、10mMのウリジンを含むプレートから集め、そして1L当たり10mMのウリジン及び1gの5 - FOAを含む最少培地プレートに移した。pyrG遺伝子が失われたアスペルギラス・ニガー細胞は、5 - FOAの存在下で増殖し、そして前記遺伝子を保持するそれらの細胞は5 - FOAを5 - フルオロ - UMP (毒性中間体) に転換した。

## 【 0 1 2 1 】

よりすばやく増殖し、そして孢子形成したコロニーを、遅く増殖する非孢子形成コロニーから採取し、そして1L当たり10mMのウリジン及び1gの5 - FOAを含む最少培地上で2度、継代し、そして単一の孢子形成コロニーについて選択することにより単離した。サザン分析を例 2 に記載のようにして行い、pyrG遺伝子が切除されたことを確めた。pyrGターミネーターの1つのコピーを、破壊の部位に放置した。

## 【 0 1 2 2 】

例 6 : アスペルギラス・ニガー-SM0110 ( gla ) の構成

アスペルギラス・ニガーグルコアミラーゼ ( gla ) 遺伝子 ( 配列番号 5 : DNA配列、及び 6 : 推定されるアミノ酸配列 ) を、8kbのフラグメントとして、例 3 に記載されるゲノムライブラリーから単離し、そしてPUC118 ( Roche Diagnostics Corporation, Mannheim, Germany ) 中にサブクローン化し、pJRoy13を生成した。アスペルギラス・ニガーグルコアミラーゼ遺伝子及び1.8kbのフランギングDNAを含むpJRoy13からの4kbのSpeIフラグメントを、pBluescriptSK+ ( Stratagene, La Jolla, CA ) 中に挿入し、pJRoy17 ( 図 3 ) を生成した。

## 【 0 1 2 3 】

pytG遺伝子を含む2.3kbのSpeI/XhoIフラグメントを、1%アガロース - TBEゲル上での電気泳動に従って、QIAEXII Gel Extraction Kitを用いて、pJRoy10から単離した。制限された末端を、クレノウ ( Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN ) によりフィルインし、そしてそのフラグメントを、pJRoy17のグルコアミラーゼ遺伝子コード領域内のBgl II部位中に挿入し、プラスミドpSM0127 ( 図 4 ) を創造した。pSM0127の2つのSpeI部位間に、2.2kb及び2.3kbの5'及び3'グルコアミラーゼ遺伝子配列をそれぞれ端に有する、2.3kbのpyrG遺伝子が存在した。

## 【 0 1 2 4 】

プラスミド、SM0127をSpeIにより消化し、そして線状破壊カセットから成る6kbのフラグメントを単離し、そしてpyrG欠失株アスペルギラス・ニガーJRoy3を、例 1 に記載される形質転換方法を用いて形質転換するために使用した。アスペルギラス・ニガーJRoy3を、例 5 に記載される方法を用いて、アスペルギラス・ニガーBo - 1 から得た。約700個の形質転換体を得た。

## 【 0 1 2 5 】

グルコアミラーゼ遺伝子プロモーターを含む1100bpのフラグメントを、アスペルギラス・ニガーグルコアミラーゼ遺伝子座 ( 開始コドンの直接前の1113bp ) からPCR増幅し、そしてサザンプロット分析においてプローブとして使用した。プローブを、プライマー 3 及び 4 により生成し、ここでプライマー 3 は、5'末端でSpeI部位にハイブリダイズし、そ

10

20

30

40

50

してプライマー 4 は3'末端でSphI部位を付加する。

プライマー 3 : 5' - ACTAGTGGCCCTGTACCCAGA - 3' (配列番号 7)

プライマー 4 : 5' - GCATGCATTGCTGAGGTGTAATGATG - 3' (配列番号 8)

【 0 1 2 6 】

グルコアミラーゼ遺伝子プロモーターのPCR増幅を、10ngのpJRoy17プラスミドDNA、50pモルの個々のプライマー、2.5mMの個々のdATP, dCTP, dGTP及びdTTP, 2.5mMのMgCl<sub>2</sub>を含む1×PCR緩衝液、及び2.5単位のTaq DNAポリメラーゼから構成される50μlの反応において行った。反応を、次のようにプログラムされたRoboCycler 40サーモサイクラーにおいて行った: 95 で3分(1サイクル): 95 で1分、55 で1分、及び72 で2分(30サイクル); 及び72 で5分(1サイクル)。

グルコアミラーゼ遺伝子プロモータープローブを、例2に記載のようにして単離し、そしてラベルした。

【 0 1 2 7 】

ゲノムDNAを、例2に記載のようにして、700個の形質転換体のうち200個から調製した。ゲノムDNAを、SpeIにより消化し、そして次に、例2に記載されるプロトコールを用いて、上記プローブによるサザン分析にゆだねた。グルコアミラーゼ遺伝子中への破壊カセットの遺伝子置換は、6.3kbへの野生型の4kbのグルコアミラーゼ遺伝子バンドの上昇、すなわち2.3kbのpyrG遺伝子による上昇をもたらした。1つのそのような形質転換体を同定し、そしてアスペルギラス・ニガーSMO110と命名した。

【 0 1 2 8 】

例7: アスペルギラス・ニガーMBin111 ( pyrG, gla ) の構成

アスペルギラス・ニガーグルコアミラーゼ遺伝子ターミネーターを、3'末端でSpeI部位にハイブリダイズするプライマー5、及び5'末端にSphI部位を付加するプライマー6により、800bpのフラグメントとしてpJRoy17から増幅した。

プライマー 5 : 5' - GAGGTCGACGGTATCGATAAG - 3' (配列番号 9)

プライマー 6 : 5' - GCATGCAGATCTCGAGAATACACCGTTCCTCAG - 3' (配列番号10)

【 0 1 2 9 】

gla遺伝子ターミネーターのPCR増幅を、10ngのpJRoy17プラスミドDNA、50pモルの個々のプライマー、2.5mMの個々のdATP, dCTP, dGTP及びdTTP, 2.5mMのMgCl<sub>2</sub>を含む1×PCR緩衝液、及び2.5単位のTaq DNAポリメラーゼから構成される50μlの反応において行った。反応を、次のようにプログラムされたRoboCycler 40サーモサイクラーにおいて行った: 95 で3分(1サイクル): 95 で1分、55 で1分、及び72 で2分(30サイクル); 及び72 で5分(1サイクル)。

グルコアミラーゼ遺伝子ターミネーターを含む800bpのフラグメントを、精製し、そして下記のようにして直接使用した。

【 0 1 3 0 】

グルコアミラーゼ遺伝子プロモーター(例7)及びターミネーターPCR生成物を、TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて、その製造業者の説明書に従って、pCR2.1ベクター中にサブクローン化した。グルコアミラーゼ遺伝子プロモーターを含む1.1kbのSpeI/SphIフラグメントを、1%アガロース-TBEゲル上での電気泳動につづいて、QIAEXII Gel Extraction Kitを用いて単離した。グルコアミラーゼ遺伝子ターミネーターを、同じ態様で単離したが、しかしながらSpeI/SphIによる消化は、内部SphI部位により554bpのフラグメントをもたらした。プロモーター及びターミネーターを、pBluescript SK- (Stratagene, La Jolla, CA)のSpeI部位中に連結し、pMBin05(図5)をもたらした。

【 0 1 3 1 】

SpeIフラグメントを、制限酵素消化によりpMBin05から除去し、そして1%アガロース-TBEゲル上での電気泳動につづいて、QIAEXII Gel Extraction Kitを用いて単離した。単離されたフラグメントを、例1に記載される形質転換方法を用いて、アスペルギラス・ニガーSMO110(例6)を形質転換し、pyrG破壊されたグルコアミラーゼ遺伝子座を欠失せ

10

20

30

40

50

しめた。pyrG<sup>-</sup>表現型(例5を参照のこと)を選択するために5-FOA上に形質転換体をプレートする前、増殖を、選択の前、組換えのための十分な時間を可能にするために行った。前記増殖を、5%グルコース、0.9Mのスクロース及び10mMのウリジンにより補充されたYP培地5mlにおいて、37及び100rpmで24時間、行った。

【0132】

9個の形質転換体を得、そして1つが、例5に記載される選択培地に移される場合、pyrG<sup>-</sup>表現型を維持した。pyrG<sup>-</sup>表現型を維持する形質転換体を、アスペルギラス・ニガーMBin111と命名した。

プローブを、アスペルギラス・ニガーグルコアミラーゼ及びpyrG遺伝子に対して生成した。上記プライマー3及び5を用いて、pJRoy17からのgla遺伝子(プロモーター及びターミネーターを包含する)をPCR増幅し、そしてプライマー1及び2(例4を参照のこと)を用いて、例4に記載される同じ方法を用いて、pJRoy10からpyrGターミネーター配列を増幅した。プローブを、例2に記載のようにして単離し、そしてラベルした。

【0133】

ゲノムDNAを、例2に記載のようにして、アスペルギラス・ニガー株JRoy3, SM0110及びMBin111から単離し、SpeIにより消化し、そしてサザン分析についての例2に記載されるプロトコールに従って、アスペルギラス・ニガーグルコアミラーゼ遺伝子によりプローブした。破壊されていないgla遺伝子座を表わす4kbのバンドを、アスペルギラス・ニガーJRoy3において観察し、そして6.3kbのバンドを、破壊カセットの挿入のために、アスペルギラス・ニガーSM0110から得た。

【0134】

ハイブリダイゼーションは、アスペルギラス・ニガーMBin111からのゲノムDNAにより検出されず、このことは、グルコアミラーゼ遺伝子が検出されたことを示す。さらに、SpeIにより消化されたDNAを、pyrGターミネーター配列によりプローブし、そして再び、ハイブリダイゼーションは、アスペルギラス・ニガーMBin111株においては観察されなかったが、しかしアスペルギラス・ニガーSM0110は6.3kbのバンドを維持した。それらの結果は、全グルコアミラーゼ遺伝子座及びpyrG遺伝子がアスペルギラス・ニガーMBin111において欠失されたことを示した。

【0135】

例8：アスペルギラス・ニガーMBin112(asa, pyrG, gla)の構成

アスペルギラス・ニガー酸安定性 - アミラーゼ遺伝子(asa)の一部を単離し、そしてアメリカ特許第5,252,726号に記載のようにして、pUC19(Roche Diagnostics Corporation, Mannheim, Germany)中にクローン化した。前記酸安定性 - アミラーゼ遺伝子の一部の開始コドンの上流の346bpを、酸安定性アミラーゼ遺伝子を含むpUC19から、HpaIによる消化により切除し、そしてpMBin01(図6)を創造した。pMBin04<sup>+</sup>の二重消化を、SmaI及びSpeIにより行い、そして4237bpのSmaI/SpeIフラグメントを、1%アガロース-TBEゲル上での電気泳動に続いて、QIAEX11 Gel Extraction Kitを用いて単離した。その4237bpのSmaI/SpeIフラグメントは、酸安定性 - アミラーゼ遺伝子の5'末端、pyrGターミネーター、全pyrG遺伝子(ターミネーターを包含する)、及び酸安定性 - アミラーゼ遺伝子の3'末端から成った。

【0136】

アスペルギラス・ニガー株MBin111を、例1に記載される形質転換方法を用いて、pMBin04<sup>+</sup>からのSmaI/SpeIにより形質転換した。全体的に、160個の形質転換体を、最少培地上で得た。次に、形質転換体を、酸安定性 - アミラーゼ活性を欠いているそれらをスクリーンするために、スターチアズールプレートに移した。16個の形質転換体は、ほとんどが又はまったく透明な領域を生成せず、そして10mMのウリジンにより補充された最少培地上で2度、単離された単一のコロニーであった。

【0137】

522bpのフラグメントを、酸安定性 - アミラーゼ遺伝子座からPCR増幅し、そしてサザンブロット分析においてプローブとして使用した。プローブを、プライマー7及び8によ

10

20

30

40

50

り生成した。

プライマー 7 : 5' - CTCATTGGCCGAAACTCCGAT - 3' (配列番号11)

プライマー 8 : 5' - AGCAGACGATGTCCTGAGCTG - 3' (配列番号12)

【 0 1 3 8 】

PCR増幅を、10ngのpUC19/HW360プラスミドDNA、50pモルの個々のプライマー、2.5mMの個々のdATP、dCTP、dGTP及びdTTP、1×PCR緩衝液 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)、並びに2.5mMのMgCl<sub>2</sub>、及び2.5単位のTaq DNAポリメラーゼ (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) から構成されるべき反応物50μlにおいて行った。反応を、次のようにプログラムされたRoboCycler40サーモサイクラーにおいて: 95 で3分 (1サイクル); 95 で1分、55 で1分及び72 で1.5分 (30サイクル); 及び72 で5分 (1サイクル)。

10

522bpのプローブを、例2に記載のようにして単離し、そしてラベルした。

【 0 1 3 9 】

ゲノムDNAを、例2に記載のようにして、16個の形質転換体から単離し、そして形質転換されているアスペルギラス・ニガー株MBin111を対照として使用した。次に、ゲノムDNAをXhoI及びSpeIにより消化し、そして上記プローブを用いて、例2に記載のようにしてサザンハイブリダイゼーションにゆだねた。損なわれていない酸安定性 - アミラーゼ遺伝子座を、2.3bpのバンドとして可視化し、そして破壊された遺伝子座は5.3kbのサイズであった。このサイズの差異は、例4に記載される3kbのpMBin01\*SpeIフラグメントの挿入のためである。酸安定性 - アミラーゼ遺伝子破壊を含む5個の形質転換体を得、そして1つをアスペルギラス・ニガーMBin112と命名した。アスペルギラス・ニガー株MBin113をもたらす、破壊カセットのループアウトを、pyrGターミネーターの後ろに放置し、そして2.8kbのバンドを創造した。ループアウトを、例5に記載のようにして行い、そしてアスペルギラス・ニガーMBin113をもたらした。

20

【 0 1 4 0 】

例9: アスペルギラス・ニガーMBin114 ( prtT, asa, pyrG, gla) の構成

アスペルギラス・ニガーparT遺伝子 (配列番号13: DNA配列、及び14: 推定されるアミノ酸配列) を、W000/20596号に記載される2種のオーバーラッピングするクローン、NcE1.4及びCIE1.8を用いて構成した (pMBin09、図7)。NcE、CIE1.8及びpZeR0-2 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を、PstIにより消化し、それぞれクローンの5' 及び3' 末端でPstI部位を生成し、そして複数のクローニング部位でpZeR0-2を洗浄した。両prtTクローンの共有される領域におけるSspI部位を用いて、三元連結を、PstI部位でpZeR0-2中にPstI/SspIクローンフラグメントを連結することにより行い、pMBin09をもたらした。

30

【 0 1 4 1 】

prtTコード配列の233bpの欠失を、まず、Bst11071/SspIによるpMBin09の消化により行い、そして例4に記載されるpMBin01 SpeIフラグメントを、消化されたpMBin09中にブラントフラグメントとして挿入し、pMBin10 (図8) を創造した。prtT破壊を、1%アガロース - TBEゲル上での電気泳動に続いて、QIAEXII Gel Extraction Kitを用いて単離されたpMBin10からのDraIII /NheIフラグメントを用いて行った。

【 0 1 4 2 】

アスペルギラス・ニガーMBin113を、例1に記載される形質転換方法を用いて、pMBin10からのDraIII /NheIフラグメントにより形質転換した。102個の形質転換体を、カゼインプレート上でスクリーンした。9個の形質転換体はほとんどか又はまったく透明領域を示さず、そして10mMのウリジにより補充された最少培地上で2度、単離された単一のコロニーである。

40

【 0 1 4 3 】

prtTコード配列の232bpのフラグメントを、pMBin10におけるprtT遺伝子座からPCR増幅し、そしてサザンプロット分析におけるプローブとして使用した。フラグメントを、プライマー9及び10を用いて生成した。

プライマー 9 : 5' - TGTGATTGAGGTGATTGGCG - 3' (配列番号15)

50

プライマー-10 : 5' - TCAGCCACACCTGCAAAGGC - 3' (配列番号16)

【0144】

PCR増幅を、10ngのpMBin10プラスミドDNA、50pモルの個々のプライマー、2.5mMの個々のdATP、dCTP、dGTP及びdTTP、1×PCR緩衝液(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)、並びに2.5mMのMgCl<sub>2</sub>、及び2.5単位のTaq DNAポリメラーゼ(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)から構成されるべき反応物50μlにおいて行った。反応を、次のようにプログラムされたRoboCycler40サーモサイクラーにおいて: 95 で3分(1サイクル); 95 で1分、60 で1分及び72 で1分(30サイクル); 及び72 で5分(1サイクル)。

プローブを、例2に記載のようにして単離し、そしてラベルし、そしてそのプローブは破壊の下流に232bpのprtTコード配列を含んだ。

10

【0145】

ゲノムDNAを、例2に記載のようにして、9個の形質転換体、並びに対照としてのアスペルギラス・ニガー-Bo-1及びアスペルギラス・ニガー-MBin112から単離し、そして例2に記載のようにしてサザン分析にゆだねた。ゲノムDNAを、PstIにより消化し、そして破壊されていないprtT遺伝子に対応する2.5kbのバンドを、対照株において観察した。prtT遺伝子破壊に対応する、1.3kbでのバンドを、プローブが132bpのpyrGターミネーター及び1198bpのprtT遺伝子を含むPstIフラグメントにハイブリダイズされる場合に観察した。1つの破壊体を選択し、そしてアスペルギラス・ニガー-MBin114と命名した。pyrG遺伝子を、例5に記載のようにしてループアウトし、アスペルギラス・ニガー-MBin115をもたらした。

20

【0146】

例10: アスペルギラス・ニガー-MBin116 ( amyB, prtT, asa, pyrG, gla ) の構成

アスペルギラス・ニガー-中性 - アミラーゼ遺伝子amyA及びamyBを、アメリカ特許第5,252,726号 (NA1=amyA及びNA2=amyB)に開示されるようにしてクローン化した。

【0147】

アスペルギラス・ニガー-中性 - アミラーゼ遺伝子 ( amyB ) の2.6kbのフラグメント ( 配列番号17: DNA配列、及び18: 推定されるアミノ酸 ) を、EcoRI/BglII消化によりpTaka17 (アメリカ特許第5,536,661号) から単離し、そして1%アガロース-TBEゲル上での電気泳動に続いてQIAEXII Gel Extraction Kitを用いて単離した。2.6kbのフラグメントを、pZero2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) のEcoRI/BamHI部位中に挿入し、pMBin02 (図9) を創造した。相同amyB遺伝子の第5エキソンから186bp及び第6エキソンから52bpを除去する298bpの欠失を、PmeI/SmaI消化によりpMBin02において行い、そしてpMBin01の2696bpのSpeIフラグメント (例4に記載される) を、プラント末端連結により挿入し、pMBin03 (図10) を創造した。

30

【0148】

アスペルギラス・ニガー-MBin115を、pMBin03から単離されたEcoRI/AvrIIフラグメントにより、例1に記載されるプロトコルを用いて形質転換した。192個の形質転換体を得、そして次の変化を伴って例8に記載されるようにして、スターチアズールプレートに移した: スターチアズールプレートはグリシンを欠失し、そしてpHは5であった。8個の形質転換体が低められた透明な領域を示し、そして10mMのウリジンにより補充された最少培地上で2度、単離された単一コロニーである。

40

【0149】

ATG部位の450bp下流の295bpのアスペルギラス・ニガー-amyA又はamyBコード配列に対応する配列を有するプローブ ( amyA及びamyB配列は、この領域において同一である ) を、プライマー-11及び12を用いて、PCR増幅により生成した。

プライマー-11 : 5' - GGCAGCAGGATATGTAAGTCG - 3' (配列番号19)

プライマー-12 : 5' - CACTGTAATCGACTGAGCTAC - 3' (配列番号20)

【0150】

50

PCR増幅を、10ngのpMbin03プラスミドDNA、50pモルの個々のプライマー、2.5mMの個々のdATP、dCTP、dGTP及びdTTP、1×PCR緩衝液(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)、並びに2.5mMのMgCl<sub>2</sub>、及び2.5単位のTaq DNAポリメラーゼ(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)から構成されるべき反応物50μlにおいて行った。反応を、次のようにプログラムされたRoboCycler40サーモサイクラーにおいて: 95 で3分(1サイクル); 95 で1分、60 で1分及び72 で1分(30サイクル); 及び72 で5分(1サイクル)。

【0151】

プローブを、例2に記載のようにして単離し、そしてラベルした。ゲノムDNAを、例2に記載のようにして、8個の形質転換及び対照としての形質転換されていないアスペルギラス・ニガー-HBin115から単離し、そしてEcoRI及びBspLU111により消化した。消化されたゲノムDNAを、例2に記載される方法を用いてサザン分析にゆだねた。開始コドンの616bp上流にEcoRI、及び停止コドンの99bp上流にBspLU111が存在した。野生型アスペルギラス・ニガー株Bo-1 amyB遺伝子バンドは、2659bpであった。amyB遺伝子の破壊は、2659bpのバンドの消出、及びpMbin01 SpeIフラグメントの挿入による5359bpでのバンドの出現をもたらした。

【0152】

1つの形質転換体は、透明な破壊を含み、そしてアスペルギラス・ニガー-MBin116と命名された。pyrG遺伝子を、例5に記載のようにして、アスペルギラス・ニガー-MBin116から切除し、そしてその株をアスペルギラス・ニガー-MBin117と命名した。

【0153】

例11: アスペルギラス・ニガー-MBin118 ( amyA, amyB, prtT, asa, pyrG, gla)の構成

アスペルギラス・ニガーamyA遺伝子配列はその3'末端を除いて、amyBと実質的に同一であるので(Korman など, 1990, Current Genetics 17: 203-212)、例10に使用される破壊構造体及びプロトコールが適用された。アスペルギラス・ニガー-MBin117を、amyA遺伝子(配列番号21: DNA配列、及び22: 推定されるアミノ酸配列)を破壊するために、pMbin03からのEcoRI/AvrIIフラグメントにより、例1に記載されるプロトコールに従って形質転換した。

【0154】

356個の形質転換体を得、そして例10に記載のようにしてスターチアズールプレートに移した。スターチアズールプレート上で透明な領域を生成しない4個の形質転換体は、10mMのウリジンにより補充された最少培地上で2度、単離された単一コロニーであった。

ゲノムDNAを、4個の形質転換体、及び対照としてのアスペルギラス・ニガー-MBin117から単離し、そして例2に記載される方法を用いて、サザン分析にゆだねた。ゲノムDNAを、EcoRI及びBspLU111により消化し、そして例10に記載のようにしてプローブした。amyB遺伝子に対応する2.7kbのバンド、及びamyA遺伝子を表わす、わずかに大きなバンドが野生型アスペルギラス・ニガーBo-1株に存在した。

【0155】

amyAバンドの正確なサイズは、BspLU111がamyA遺伝子の下流の未知の部位で切断するので、知られていなかった。分析される1つの形質転換体においては、amyA遺伝子に対応するバンドは、プローブによりもはや可視化され得ず、このことは、そのプローブの位置を包含するamyA遺伝子の欠失が生じたことを示す。この形質転換体を、アスペルギラス・ニガー-MBin118と命名した。pyrG遺伝子を、例5に記載のようにして、アスペルギラス・ニガー-MBin118から切除し、そしてこの株を、アスペルギラス・ニガー-MBin119と命名した。

【0156】

例12: アスペルギラス・ニガー-MBin120 ( oxa, amyA, amyB, prtT, asa, pyrG, gla)の構成

アスペルギラス・ニガーシュウ酸ヒドロラーゼ(oah)遺伝子(配列番号23: DNA配列、及び24: 推定されるアミノ酸配列)を、W000/50576号に記載される方法に従ってクローン

10

20

30

40

50

化した。プラスミドpHP1を、W000/50576号に記載のようにして構成した。

【0157】

プロモーターの156bp及びシュウ酸ヒドロラーゼ遺伝子コード配列の129bpを含む285bpの欠失を、pHP1をBstEIIにより消化することにより除去した。例4に記載されるpMBin01 SpeIフラグメントを、この部位中にプラント末端連結し、pMBin01(図11)を創造した。プラスミドpMBin08を、NotIにより消化し、そして7155bpのフラグメントを、1%アガロース-TBEゲル上での電気泳動に続いてQIAEX II Gel Extraction Kitを用いて単離した。pMBin08からのNotIフラグメントを用いて、アスペルギラス・ニガ-MBin119におけるシュウ酸ヒドロラーゼ遺伝子を破壊した。

【0158】

アスペルギラス・ニガ-MBin119を、例1に記載される形質転換方法を用いて、pMBin08からのNotIフラグメントにより形質転換した。49個の形質転換体を得、そしてSigma Oxalate Kit (number 591, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO)を用いて、オキサレート生成についてスクリーンした。形質転換体を、形質転換体の分生子を約 $10^4$ /mlの密度で、5%グルコースにより補充されたYP培地20mlを含む125mlの振盪フラスコに接種することにより、振盪フラスコにおいて培養した。振盪フラスコを、37及び200rpmで3~6日間インキュベートした。振盪フラスコ培養物のサンプル5 $\mu$ lを3日目に除き、そして遠心分離し、酵素アッセイのための上清液を生成した。3日目の上清液を、96ウェルプレートのウェルに添加し、続いて、その製造業者により特定されるような(但し、その体積1/10)オキサレートキット試薬を添加した。オキサレートの生成を、590nmで分光学的に測定した。1つの形質転換体は検出できるオキサレートを生成せず、そして10mMのウリジンにより補充された最少培地上で2度単離され単一コロニーであった。

【0159】

シュウ酸ヒドロラーゼ遺伝子内からの579bpの配列(開始コドンの404bp下流)を含んで成るフラグメントを、プライマー13及び14を用いてサザンプロット分析においてプローブとして使用のためにPCR増幅した。

プライマー13: 5' - CTACGACATGAAGACCAACGC - 3' (配列番号25)

プライマー14: 5' - GCACCGTTCTCCACCATGTTG - 3' (配列番号26)

【0160】

PCR増幅を、10ngのpMBin08プラスミドDNA、50pモルの個々のプライマー、2.5mMの個々のdATP, dCTP, dGTP及びdTTP, 1xPCR緩衝液(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)、並びに2.5mMのMgCl<sub>2</sub>、及び2.5単位のTaq DNAポリメラーゼ(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)から構成されるべき反応物50 $\mu$ lにおいて行った。反応を、次のようにプログラムされたRoboCycler40サーモサイクラーにおいて: 95 で3分(1サイクル); 95 で1分、60 で1分及び72 で1分(30サイクル); 及び72 で5分(1サイクル)。

【0161】

プローブを、例2に記載のようにして単離し、そしてラベルした。形質転換体、及び対照としてのアスペルギラス・ニガ-Bo-1及びアスペルギラス・ニガ-MBin118からのゲノムDNAを、例2に記載のようにして単離し、そしてNdeI及びSspIにより消化した。上記プローブによるアスペルギラス・ニガ-対照株Bo-1及びMBin118のサザン分析は、破壊されていないシュウ酸ヒドロラーゼ遺伝子に対応する2.5kbのバンドを示した。形質転換体は、シュウ酸ヒドロラーゼ遺伝子座で破壊カセットの挿入に適合する4.9kbのバンドを有した。形質転換体を、アスペルギラス・ニガ-MBin120と命名した。

【0162】

例13: アスペルギラス・ニガ-一般宿主株の発現分析

グルコアミラーゼ、酸安定性の - アミラーゼ、中性 - アミラーゼ、及びプロテアーゼを生成する一般宿主アスペルギラス・ニガ-株の能力を、振盪フラスコ及び/又は発酵器において株を培養することにより評価した。アスペルギラス・ニガ-Bo-1を、対照として用いた。

10

20

30

40

50

約 $10^4$ /mlの密度でのアスペルギラス・ニガー株の分生子を、5%グルコースにより補充されたYP培地20mlを含む125mlの振盪フラスコ中に接種した。振盪フラスコを、37℃及び200rpmで3～6日間インキュベートした。振盪フラスコ培養物のサンプルを、3～6日目に除き、そして遠心分離し、酵素アッセイについての上清液を生成した。

【0163】

アスペルギラス・ニガー株をまた、1L当たり、2gの $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2gの $KH_2PO_4$ 、2gのクエン酸、2gの $K_2SO_4$ 、0.5mlのAMG微量金属溶液、300gの高マルトースシロップ、1.8gの $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、及び1.8mlのプルロン酸から構成される培地1.8Lを含む2Lの発酵器中に接種した。1L当たり50gのウレア及び5mlのプルロン酸から構成される培地を、発酵培地に供給した。発酵の条件は、34℃、pH4.5 +/- 0.05、1.0vvmの通気及び8日間の1000rpmであった。発酵のサンプルを1～8日目に除き、そして遠心分離し、酵素アッセイのための上清液を生成した。

10

【0164】

グルコアミラーゼ活性を、基質としてマルトースを用いて、pH4.3で0.1Mの酢酸ナトリウムにおいて25℃で測定した。グルコースを、Sigma Trinder 色彩試薬 (Sigma 試薬キット 315-100, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を用いて、その製造業者の説明書に従って、490nmで測定した。AMG™ (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark; batch 7-195)を、AGU/mlで測定されたグルコアミラーゼ活性を有する標準として使用した。

【0165】

アスペルギラス・ニガーSM0110が、検出できるグルコアミラーゼ活性を生成しないことが決定された(4日目の振盪フラスコサンプルにおいて0.5AGU/ml以下)。アスペルギラス・ニガーMBin111が、検出できるグルコアミラーゼ活性を生成しないことが決定された(4日目の振盪フラスコ又は発酵サンプルにおいて0.5AGU/ml以下)。

20

酸安定性及び中性 - アミラーゼ活性を、Sigma - アミラーゼ基質 (Sigma Kit & #8201; 577, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を用いて30℃で、それぞれpH4.5及び7.0で測定した。検出は405nmであった。Fungamyl™を、標準として使用し、そして活性をFAU/mlで報告した。

【0166】

酸安定性 - アミラーゼ活性が、アスペルギラス・ニガーBo-1(5日目の発酵サンプルにおいて51FAU/ml)に比較して、アスペルギラス・ニガーMBin113, MBin116, 及びMBin118(3日目の振盪フラスコ又は発酵サンプルにおいて0.1FAU/ml以上)によりかろうじて検出できることが見出された。中性の - アミラーゼ活性は、発酵サンプルにおけるアスペルギラス・ニガーBo-1に比較して、アスペルギラス・ニガーMBin114(3日目の振盪フラスコサンプルから検出されず、そして5日目の発酵サンプルにおいて5.7FAU/ml)により実質的に低められ、そしてアスペルギラス・ニガーMBin118(5日目の発酵サンプルにおいて0.5FAU/ml)によりかろうじて検出できた。

30

【0167】

一般的なプロテアーゼ活性を、基質としてFITC - ガゼイン (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を用いて決定した。アッセイを、0.1Mのリン酸カリウム (pH5.0)により希釈された培養物サンプル10µlと共に、40µlのFITC - カゼイン基質 (源液: 0.1Mのリン酸カリウム (pH6.0)又は0.1Mのクエン酸ナトリウム (pH5.0)による1:1に希釈された)を混合し、そしてその溶液を37℃で1時間インキュベートすることによって行った。1時間のインキュベーションの後、反応を150µlの5%トリクロロ酢酸により停止し、そして冷たい部屋で1時間インキュベートした。停止された反応を、Eppendorf管に移し、そして10分間、遠心分離した。

40

【0168】

上清液の10µlアリコートをし、1mlの0.5Mのボレート (pH9.0)を含む試験管に移し、そして混合した。その溶液の200µlのアリコートを、ブラック“U”底96ウェルプレート (ThermoLabsystems, Franklin, MA)に移した。蛍光を、参照チャンネル3及び1176の設定を用いて、Fluorolite 1000測定器 (ThermoLabsystems, Franklin, MA)により測定した。

50

活性を、プロテアーゼ蛍光単位で測定した。

アスペルギラス・ニガーMBin114におけるprtT遺伝子の欠失により、合計のプロテアーゼ活性は、アスペルギラス・ニガーBo-1の約20%に低下した。MBin114の6日目の発酵サンプルは、692のプロテアーゼ活性を有し、そしてBo-1は3953蛍光単位/mlであった。

【0169】

例14：アスペルギラス・ニガーMBin114, MBin118及びMBin120におけるカンジダ・アンタルクチカリパーゼBの発現

カンジダ・アンタルクチカリパーゼB遺伝子（配列番号27：DNA配列、及び28：推定されるアミノ酸配列）を、アメリカ特許第6,020,180号に記載のようにしてクローン化した。リパーゼB遺伝子を含むプラスミドpMT1335を、Hoegh など., in Can. J. Bot. 73 (Suppl. 1) :S869-S875 (1995)による記載のようにして構成した。アスペルギラス・ニジュランスamdS遺伝子を含むプラスミドpTOC90を、WO91/17243号に記載のようにして構成した。プラスミドpMT1335及びpTOC90を、例1に記載されるプロトコールに従って、アスペルギラス・ニガーMBin114中に同時形質転換し、そして形質転換体をアセトアミド上で選択した。

【0170】

30個の形質転換体を、アセトアミドプレートに画線培養することにより単離した。分生子を、形質転換体から集め、そして例13に記載のようにして振盪フラスコを接種するために使用した。振盪フラスコ培養物のサンプルを、3～6日目に除き、そして遠心分離し、酵素アッセイのための上清液を生成した。

【0171】

prtT遺伝子の破壊が合計レベルのプロテアーゼ活性及びカンジダ・アンタルクチカリパーゼB (CLB) の収率に対して有する効果を評価するために、プロテアーゼ及びリパーゼBの両活性を決定した。いくつかの形質転換体は、リパーゼBを生成し、そして最高の生成体を発酵により評価した。

対照としてのアスペルギラス・ニガーMBin114及びアスペルギラス・ニガーBo-1を、例13に記載のようにして、2Lの発酵器において培養した。

一般的なプロテアーゼ活性を、例9に記載のようにして測定した。

【0172】

リパーゼBアッセイを、基質としてp-ニトロフェニルブチレート (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を用いて、pH7で行った。培養上清液を、0.1MのMOPS - 4mMのCaCl<sub>2</sub> (pH7.0) により適切なように希釈した。培養上清液の100 µlアリコート、96ウェルマイクロプレートのウェル中、100 µlのp-ニトロフェニルブチレート基質溶液に添加した。p-ニトロフェニルブチレート基質溶液は、10 µlのp-ニトロフェニルブチレート、990 µlのDMSO、及び4mlの0.1MのMOPS - 4mMのCaCl<sub>2</sub> (pH7.0) から構成された。リパーゼ活性を、カンジダ・アンタルクチカリパーゼB標準 (Novozymes Japan Ltd., Chiba-shi, Japan) を用いて、405nmで分光的に測定し、LU/mlを計算した。

【0173】

図14及び15は、それらのアッセイの結果を示す。合計のプロテアーゼ活性は、野生型の約20%に低下し（例13、図12を参照のこと）、そしてリパーゼB活性は発酵を通して一定して上昇した（図13）。

【0174】

例15：アスペルギラス・ニガーMBin114, MBin118及びMBin120におけるシタリジウム・サーモフィラスカタラーゼの発現

シタリジウム・サーモフィラス (Scytalidium thermophilum) カタラーゼ遺伝子（配列番号29：DNA配列、及び30：推定されるアミノ酸配列）を、アメリカ特許第5,646,025号に記載のようにしてクローン化した。カタラーゼ遺伝子を含むプラスミドpDM153を、アメリカ特許第5,646,025号に記載のようにして構成した。プラスミドpDM153を用いて、例1に記載されるプロトコールに従って、アスペルギラス・ニガー株MBin114, MBin118及びMBin120を形質転換した。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 7 5 】

40個の形質転換体を選択し、そして1.5mlのM400培地の1：4希釈溶液を含む24ウェルプレートにおいて培養した。プレートを、34及び125rpmで90時間インキュベートした。アッセイのサンプルを、90時間で除いた。最高レベルのカタラーゼ活性を生成する3個の形質転換体を、発酵器において評価した。

## 【 0 1 7 6 】

カタラーゼ活性を、18.2µlの過酸化水素原液を含む、10mMのリン酸緩衝液(pH7)において25で測定した。過酸化水素原液は、10mMのリン酸カリウム(pH7)10ml当たり30%過酸化水素から構成された。培養上清液の25µlアリコートをし、96ウェルマイクロプレートのウェル中、25µlの過酸化水素原液に添加した。5分間のインキュベーションに続いて、200µlのチタン試薬を添加し、そして吸光度を405nmで読み取った。チタン試薬は、1.0gの酸化チタン及び10gのK<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>から構成され、これを150mlの濃硫酸により180 - 220で2 - 3時間、消化し、冷却し、そして次に1.5Lの脱イオン水により希釈した。カタラーゼ活性を、標準としてCatazyme™ (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark, バッチ31-2197)を用いて、405nmで分光的に測定し、そしてKCIU/mlで報告した。

10

## 【 0 1 7 7 】

アスペルギラス・ニガー株MBin114, MBin118及びMBin120を、例13に記載のようにして2Lの発酵器において培養した。

図15は、アスペルギラス・ニガール一般宿主株MBin114, MBin118及びMBin120におけるシタリジウム・サーモフィラムカタラーゼ生成の比較を示す。酵素生成における明白な変化は、試験されるいずれの株にも観察されなかった。

20

## 【 0 1 7 8 】

本明細書に記載される発明は、本明細書に開示される特許の態様により範囲を限定されるものではない。何故ならば、それらの態様は本発明のいくつかの観点为例示するものである。いずれかの同等の態様が本発明の範囲内で意図される。実際、本明細書に示され、そして記載されるそれらの修飾の他に、本発明の種々の修飾は、前述の記載から当業者に明らかになるであろう。そのような修飾はまた本発明の範囲内にある。抵触の場合では、定義を含む現在の公開は制御されるだろう。

種々の文献が本明細書に引用されており、それらの開示は引用により本明細書に組み込まれている。

30

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 1 7 9 】

【 図 1 】 図 1 は、pJRoy10の制限地図を示す。

【 図 2 】 図 2 は、pMBin01+の制限地図を示す。

【 図 3 】 図 3 は、pJRoy17の制限地図を示す。

【 図 4 】 図 4 は、pSM0127の制限地図を示す。

【 図 5 】 図 5 は、pMBin05の制限地図を示す。

【 図 6 】 図 6 は、pMBin04+の制限地図を示す。

【 図 7 】 図 7 は、pMBin09の制限地図を示す。

【 図 8 】 図 8 は、pMBin10の制限地図を示す。

40

【 図 9 】 図 9 は、pMBin02の制限地図を示す。

【 図 1 0 】 図10は、pMBin03の制限地図を示す。

【 図 1 1 】 図11は、pMBin08の制限地図を示す。

【 図 1 2 】 図12は、プロテアーゼ活性に対するprtT欠失の効果を示す。

【 図 1 3 】 図13は、カンジダ・アンタルクチカリパーゼB活性に対するprtT欠失の効果を示す。

【 図 1 4 】 図14は、アスペルギラス・ニガール一般宿主株MBin114, MBin118及びMBin120におけるシタリジウム・サーモフィラムカタラーゼ生成の比較を示す。

【 図 1 】

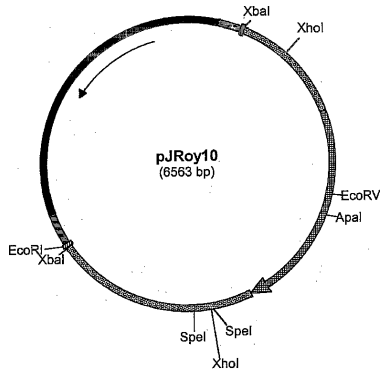


Fig. 1

【 図 2 】

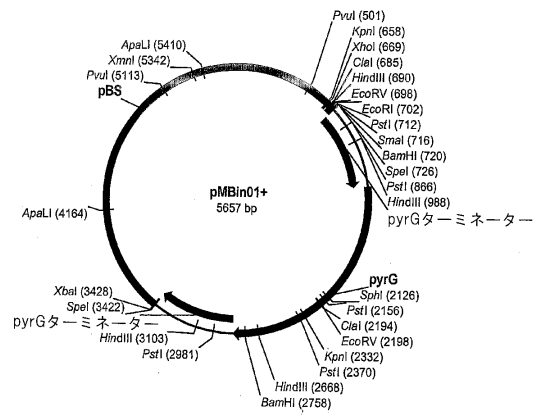


Fig. 2

【 図 3 】

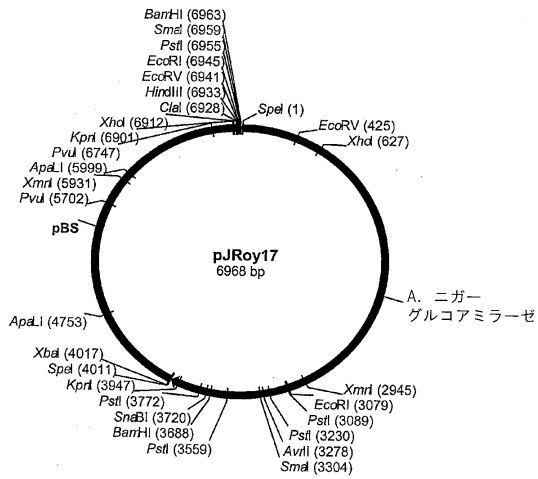


Fig. 3

【 図 4 】

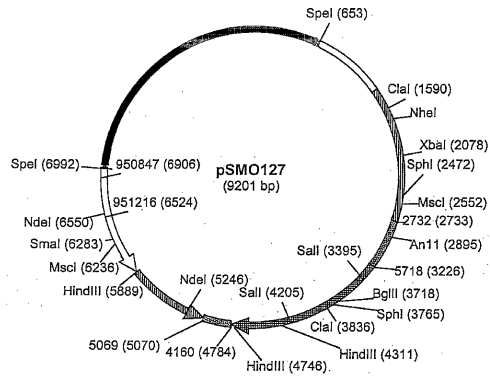


Fig. 4

【 図 5 】

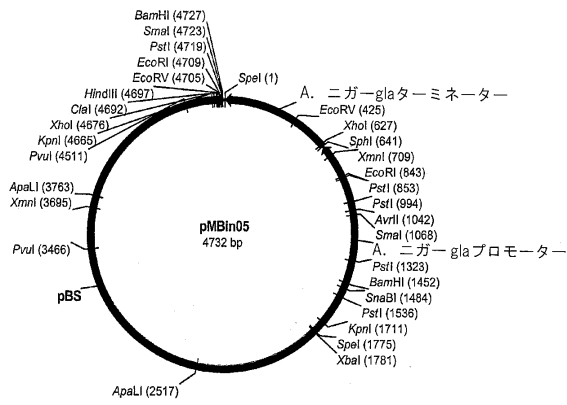


Fig. 5

【 図 6 】

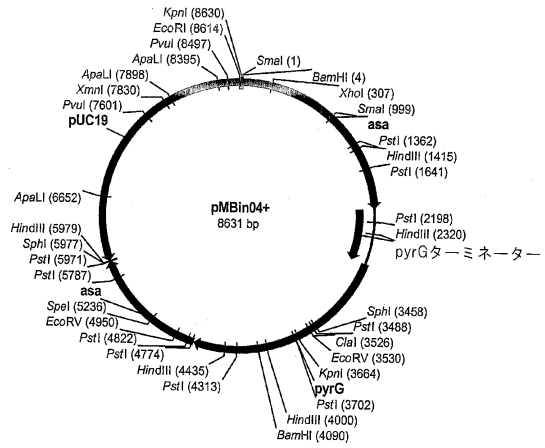


Fig. 6

【 図 7 】

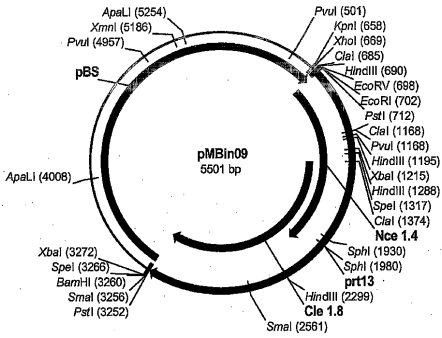


Fig. 7

【 図 8 】

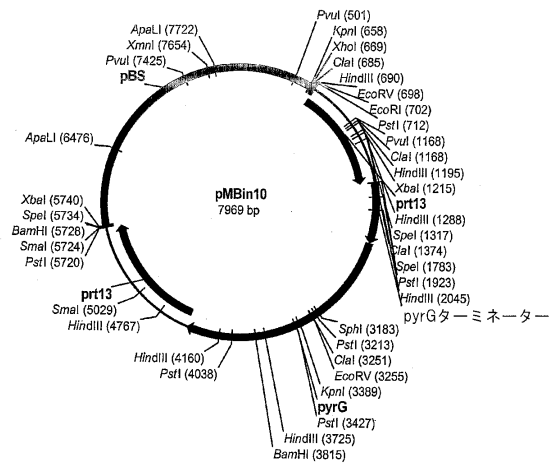


Fig. 8



【 図 1 3 】

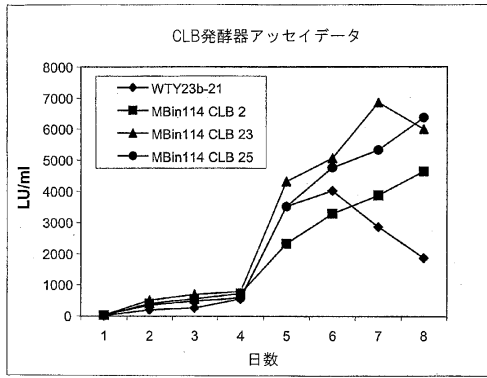


Fig. 13

【 図 1 4 】

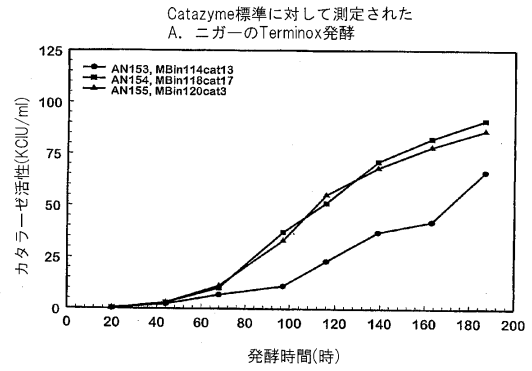


Fig. 14

【 配 列 表 】

0004638418000001.app

---

フロントページの続き

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 コネリー, マライア

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95819, サクラメント, フィフティセブンス ストリート 1043

(72)発明者 プロディ, ハワード

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95616, デイビス, エル セモンテ アベニュー 5136

審査官 吉田 知美

(56)参考文献 Appl. Environ. Microbiol., 2000年, Vol.66, No.7, p.3016-3023

J. Biotechnol., 1993年, Vol.31, p.135-145

Curr. Genet., 1990年, Vol.18, p.537-545

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

C12P 21/0-21/08

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)