

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4350892号
(P4350892)

(45) 発行日 平成21年10月21日(2009.10.21)

(24) 登録日 平成21年7月31日(2009.7.31)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 N 9/10 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 1 2 N 9/10
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21

請求項の数 35 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-521210 (P2000-521210)
 (86) (22) 出願日 平成10年11月16日(1998.11.16)
 (65) 公表番号 特表2001-523462 (P2001-523462A)
 (43) 公表日 平成13年11月27日(2001.11.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/024483
 (87) 国際公開番号 W01999/025845
 (87) 国際公開日 平成11年5月27日(1999.5.27)
 審査請求日 平成17年11月2日(2005.11.2)
 (31) 優先権主張番号 60/066,107
 (32) 優先日 平成9年11月17日(1997.11.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 NRRL B-21855

(73) 特許権者 500175602
 ノボザイムス、インコーポレイティド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア 956
 16-4880、ディビス、ドリユー ア
 ベニュー 1445
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100092624
 弁理士 鶴田 準一
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100082898
 弁理士 西山 雅也
 (74) 代理人 100081330
 弁理士 樋口 外治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するポリペプチド及びそれをコードする核酸

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の群から選ばれる 5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有する単離されたポリペプチド：

(a) SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド；及び

(b) (a) のフラグメント、ここで当該フラグメントは 5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するものとする。

【請求項 2】

SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 3】

SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 2 記載のポリペプチド。

【請求項 4】

SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列と少なくとも 97% の同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 3 記載のポリペプチド。

【請求項 5】

SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列を含んで成る、請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 6】

SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列又はそのフラグメントから成る請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 7】

SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列から成る請求項 6 記載のポリペプチド。

【請求項 8】

フサリウム (Fusarium) 株から得られる、請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 9】

フサリウム・ベネナトゥム (F. venenatum) 株から得られる、請求項 8 記載のポリペプチド。

【請求項 10】

10

高ストリンジェンシー条件下でSEQ ID NO: 1 の核酸配列もしくはその相補鎖とハイブリダイズする核酸配列によりコードされる、請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 11】

フサリウム株から得られる、請求項 10 記載のポリペプチド。

【請求項 12】

フサリウム・ベネナトゥム株から得られる、請求項 11 記載のポリペプチド。

【請求項 13】

超高ストリンジェンシー条件下でSEQ ID NO: 1 の核酸配列もしくはその相補鎖とハイブリダイズする核酸配列によりコードされる、請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 14】

20

フサリウム株から得られる、請求項 13 記載のポリペプチド。

【請求項 15】

フサリウム・ベネナトゥム株から得られる、請求項 14 記載のポリペプチド。

【請求項 16】

E. コリ (E. coli) NRRL B-21855 に含まれているプラスミド pZL3-3 の中に収容された核酸配列によりコードされる、請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 17】

SEQ ID NO: 2 の 5-アミノレブリン酸シンターゼ活性の少なくとも 20% の活性を有する、請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 18】

30

請求項 1 記載のポリペプチドをコードする核酸配列を含んで成る単離された核酸。

【請求項 19】

単離された核酸であって、SEQ ID NO: 1 の核酸配列内に少なくとも 1 個の突然変異を有する核酸配列を含んで成り、その突然変異した核酸配列がSEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、単離された核酸。

【請求項 20】

5-アミノレブリン酸シンターゼをコードする単離された核酸であって、(a) 高ストリンジェンシー条件下でDNAをSEQ ID NO: 1 の配列もしくはその相補鎖とハイブリダイズさせ；そして (b) 当該核酸を単離することにより製造された単離された核酸。

【請求項 21】

40

単離された核酸であって、(a) 超高ストリンジェンシー条件下でDNAをSEQ ID NO: 1 の配列もしくはその相補鎖とハイブリダイズさせ；そして (b) 当該核酸を単離することにより製造された、請求項 20 記載の単離された核酸。

【請求項 22】

適当な発現宿主内でポリペプチドの生産を指令する 1 又は複数のコントロール配列に作用可能式に連結された請求項 18 記載の核酸を含んで成る核酸構築体。

【請求項 23】

請求項 22 記載の核酸構築体を含んで成る組換え発現ベクター。

【請求項 24】

請求項 22 記載の核酸構築体を含んで成る組換え宿主細胞。

50

【請求項 2 5】

突然変異された核酸を製造するための方法であって、（a）SEQ ID NO: 1 の核酸配列の中に少なくとも一つの突然変異を導入し、ここで当該突然変異された核酸配列はSEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし；そして（b）この突然変異された核酸を回収する；ことを含んで成る方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 記載の方法により製造された突然変異された核酸。

【請求項 2 7】

ポリペプチドを製造するための方法であって、（a）当該ポリペプチドをコードする請求項 2 6 記載の突然変異された核酸を含んで成る株を培養して当該ポリペプチドを含んで成る上清液を生成し；そして（b）当該ポリペプチドを回収することを含んで成る方法。

10

【請求項 2 8】

請求項 1 記載のポリペプチドを製造するための方法であって、（a）株を培養して当該ポリペプチドを含んで成る上清液を生成し；そして（b）当該ポリペプチドを回収することを含んで成る方法。

【請求項 2 9】

請求項 2 8 記載の方法により製造されたポリペプチド。

【請求項 3 0】

請求項 1 記載のポリペプチドを製造するための方法であって、（a）当該ポリペプチドの生産のために適当な条件下で当該ポリペプチドをコードする核酸配列を含んで成る核酸構築体を含んで成る宿主細胞を培養し；そして（b）当該ポリペプチドを回収することを含んで成る方法。

20

【請求項 3 1】

請求項 3 0 記載の方法により製造されたポリペプチド。

【請求項 3 2】

ポリペプチドを製造するための方法であって、（a）当該ポリペプチドの生産を誘導する条件下で宿主細胞を培養し、ここで当該宿主細胞はSEQ ID NO: 1 の核酸配列内に少なくとも一の突然変異を有するSEQ ID NO: 1 の突然変異された核酸配列を含んで成り、ここで当該突然変異された核酸配列はSEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし；そして（b）当該ポリペプチドを回収することを含んで成る方法。

30

【請求項 3 3】

請求項 3 2 記載の方法により製造されたポリペプチド。

【請求項 3 4】

請求項 1 記載のポリペプチドを製造するための方法であって、（a）当該ポリペプチドの生産を誘導する条件下で、当該ポリペプチドをコードする内因性核酸配列の第二エクソンに作用可能式に連結された調節配列、エクソン及び／又はスプライドナー部位を含んで成る新規の転写ユニットが組込まれた相同組換細胞を培養し；そして（b）当該ポリペプチドを回収することを含んで成る方法。

【請求項 3 5】

請求項 3 4 記載の方法により製造されたポリペプチド。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

発明の分野

本発明は 5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有する単離されたポリペプチド及びこのポリペプチドをコードする単離された核酸配列に関連する。本発明は更に当該核酸配列を含んで成る核酸構築体、ベクター及び宿主細胞、並びに当該ポリペプチドの製造及び使用するための方法に関連する。

【0002】

関連技術の説明

50

プロトポルフィリンIXと鉄分とのキレート錯体であるヘムはヘムタンパク質の補欠分子族として働く。プロトポルフィリンIXは4個のメチル基、2個のビニル基及び2個のプロピオン酸基で置換されたポルフィリン環から成り、それはヘムを形成するために鉄分を獲得する。グリシン及びスクシニル-C o Aからのヘムの生合成は8段の酵素工程を包含する。この生合成経路における第一酵素は5-アミノレブリン酸シンターゼである。

【0003】

アポタンパク質のヘムタンパク質への変換はヘム生合成経路により供されるヘムの有用率に依存する。アポタンパク質形態のヘムタンパク質はヘムと結合して活性ヘムタンパク質を生成する。この活性ヘムタンパク質は、タンパク質分解攻撃に対してヘムタンパク質をアポタンパク質よりも安定にするコンホメーションを獲得する。もし微生物により生産されるヘムの量が生産されるアポタンパク質と比べて少ないなら、アポタンパク質は蓄積し、そしてタンパク質分解を受け、活性ヘムタンパク質の収率を下げるであろう。

10

【0004】

この問題を解消するため、Jensenはヘム又はヘム含有物質を発酵培地に添加してアスペルギルス・オリザ (*Aspergillus oryzae*) により生産されるペルオキシダーゼの収量を有意に高めることを示している (WO 93/19195)。発酵培地へのヘム添加はヘムタンパク質の収量の有意な上昇をもたらすが、それは非合法であり、費用がかさみ、そして大量スケールで実施するのが困難である。

【0005】

細胞のヘム生合成経路における遺伝子の過剰発現はこの問題の解決のための別のアプローチを提供する。

20

【0006】

アスペルギルス・ニドゥランス (*A. nidulans*) からの5-アミノレブリン酸シンターゼ遺伝子のクローニング及び配列決定が開示されている (Bradshawら、1993, *Current Genetics* 2233: 501-507)。

【0007】

本発明の目的は5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有する新規のポリペプチド及びそれをコードする遺伝子の提供にある。

【0008】

発明の概要

30

本発明は下記の群から選ばれる5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有する単離されたポリペプチドに関する：

(a) SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(b) 高ストリンジェンシー条件下で (i) SEQ ID NO: 1の核酸配列もしくは(ii)その相補鎖とハイブリダイズする核酸配列により、又は少なくとも100個のヌクレオチドのそれらのサブ配列によりコードされるポリペプチド；

(c) (a)又は(b)の対立形質変異体；及び

(d) (a), (b)又は(c)のフラグメント、ここで当該フラグメントは5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するものとする。

40

【0009】

本発明は更に前記ポリペプチドをコードする単離された核酸配列並びに当該核酸配列を含んで成る核酸構築体、ベクター及び宿主細胞、並びに当該ポリペプチドを製造及び使用するための方法に関する。

【0010】

発明の詳細な説明

5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するポリペプチド

「5-アミノレブリン酸シンターゼ活性」なる語は、本明細書では5-アミノレブリン酸の形成のためのグリシンとスクシニン-C o Aとの縮合を触媒するシンターゼ活性と定義する。本発明の目的に関し、5-アミノレブリン酸シンターゼ活性はWider de Xifraら、

50

1971, Biochimica Biophysica Acta 235: 511-517 により発表され、Pavetoら、1989, Comp.Biochem.Physiol. 94B: 635-639により改良された手順に従って決定され、それではグリシン及びスクシニル-C o A の 5 - アミノレブリン酸への変換を pH 7. 5、25℃で測定する。

【0011】

第一の態様において、本発明はSEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列と少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%、更により好ましくは少なくとも約95%、そして最も好ましくは少なくとも約97%の同一性の度合いを有し、しかも5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチドに関する（以降、「相同ポリペプチド」と呼ぶ）。好適な態様において、この相同ポリペプチドは、SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列と5個のアミノ酸、好ましくは4個のアミノ酸、より好ましくは3個のアミノ酸、更により好ましくは2個のアミノ酸、そして最も好ましくは1個のアミノ酸で相違するアミノ酸配列を有する。本発明の目的に関し、2本のアミノ酸配列間の同一性の度合いはC l u s t a l 法により（Higgins, 1989, CAB IOS 5: 151-153）、同一性表の及びL A S E R G E N E（商標）M E G A L I G N（商標）ソフトウェア（DNASTAR, Inc., Madison, WI）を利用し、且つ下記のマルチプルアライメントパラメーターを利用して決定する：10のgap penalty 及び10のgap length penalty。対合アライメントパラメーターはKtuple=1, gap penalty = 3, windows = 5 及びdiagonals = 5とした。

【0012】

好ましくは、本発明のポリペプチドはSEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列もしくはその対立形質変異体、又はそれらのフラグメントを含んで成り、ここで当該フラグメントは5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するものとする。より好適な態様において、本発明のポリペプチドはSEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列を含んで成る。別の好適な態様において、本発明のポリペプチドはSEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列もしくはその対立形質変異体、又はそれらのフラグメントから成り、ここで当該フラグメントは5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するものとする。より好適な態様において、本発明のポリペプチドはSEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列から成る。

【0013】

SEQ ID NO: 2 のフラグメントは、当該アミノ酸配列のアミノ及び／又はカルボキシル末端から1又は複数個のアミノ酸が欠失したものである。好ましくは、フラグメントは少なくとも460個のアミノ酸残基、より好ましくは少なくとも500個のアミノ酸残基、そして最も好ましくは少なくとも540個のアミノ酸残基を含む。

【0014】

対立形質変異体は同一の染色体座を占める任意の二以上の形態の遺伝子を意味する。対立形質変異体は突然変異を介して自然に生じ、そして集団内に多形態をもたらさう。遺伝子突然変異はサイレントであっても（コードポリペプチドの変化なし）、又は改変したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするものであってもよい。ポリペプチドの対立形質変異体とは遺伝子の対立形質変異体によりコードされるポリペプチドをいう。

【0015】

相同ポリペプチドのアミノ酸配列はSEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列と、1もしくは複数個のアミノ酸残基の挿入もしくは欠失及び／又は別のアミノ酸残基による1もしくは複数個のアミノ酸残基の置換により、相違する。好ましくは、アミノ酸変化はささいなもの、即ち、タンパク質のフォルディング及び／又は活性に有意な影響を及ぼさない保存性アミノ酸置換；わずかな欠失、典型的には1～約30個のアミノ酸の欠失；わずかなアミノもしくはカルボキシル末端伸長、例えばアミノ末端メチオニン残基の伸長；約20～25残基までの小リンカーペプチド伸長；又は正味の電荷もしくはその他の機能を変えることにより精製を促進するわずかな伸長、例えばポリヒスチジントラクト、抗原エピトープもしくは結合ドメイン伸長とする。

【0016】

保存性置換の例は塩基性アミノ酸（アルギニン、リジン及びヒスチジン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸及びアスパラギン酸）、極性アミノ酸（グルタミン及びアスパラギン）、疎水性アミノ酸（ロイシン、イソロイシン及びバリン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）、並びに小型アミノ酸（グリシン、アラニン、セリン、スレオニン及びメチオニン）の群内での置換である。比活性を一般に改変しないアミノ酸置換は当業界において公知であり、そして例えばH.Neurath and R.L.Hill, 1979, The Proteins, Academic Press, New Yorkに記載されている。最もよく行われる交換はAla/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu及びAsp/Gly、並びにそれらの逆である。

10

【0017】

第二の態様において、本発明は低ストリンジェンシー条件下で、より好ましくは中ストリンジェンシー条件下で、更により好ましくは高ストリンジェンシー条件下で、そして最も好ましくは超高ストリンジェンシー条件下で、SEQ ID NO: 1の核酸配列もしくはその相補鎖又はそれらのサブ配列であって5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するポリペプチドフラグメントをコードする核酸配列と上記の条件でハイブリダイズする核酸プローブにハイブリダイズする核酸配列（J.Sambrook, E.F.Fritsch and T.Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor, New York）によりコードされる5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有する単離されたポリペプチドに関連する。SEQ ID NO: 1のサブ配列は少なくとも100ヌクレオチドであってよく、又は好ましくは少なくとも200ヌクレオチドであってよい。更に、このサブ配列は5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するポリペプチドフラグメントをコードする。このポリペプチドはその対立形質変異体又はフラグメントであってもよく、ここでこのフラグメントは5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するものとする。

20

【0018】

SEQ ID NO: 1の核酸配列又はそのサブ配列、並びにSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列又はそのフラグメントが、5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを当業界において周知の方法に従って様々な属又は種の株から同定及びクローニングする核酸プローブをデザインするために利用されうる。詳しくは、かかるプローブは注目の属又は種のゲノム又はcDNAとのハイブリダイゼーション、しかる後のその中の対応の遺伝子の同定及び単離のためのサザンブロッティング手順のために利用されうる。かかるプローブは配列全体よりもかなり短くてよいが、少なくとも15、好ましくは少なくとも25、そしてより好ましくは少なくとも35ヌクレオチドの長さとするべきである。長めのプローブを利用してもよい。DNA及びRNAプローブの双方を利用してよい。これらのプローブは一般に対応の遺伝子を検出するためにラベルされている（例えば、 ^{32}P , ^3H , ^{35}S 、ビオチン又はアビジンで）。かかるプローブは本発明に包含される。

30

【0019】

かくして、かかるその他の生物から調製されたゲノムDNA又はcDNAは、上記のプローブとハイブリダイズし、且つ5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAについてスクリーニングされうる。かかるその他の生物に由来するゲノム又はその他のDNAはアガロースもしくはポリアクリルアミドゲル電気泳動により、又はその他の分離技術により分離されうる。ライブラリー由来のDNA又は分離されたDNAをニトロセルロース又はその他の適当な担体材料に転写して固定することができる。SEQ ID NO: 1と相同性であるクローン又はDNAを同定するため、この担体材料はサザンブロットに利用する。本発明の目的にとって、ハイブリダイゼーションとは核酸配列がSEQ ID NO: 1に示す核酸配列、その相補鎖、又はそれらのサブ配列に対応する核酸プローブに対し、低乃至超高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることを意味する。当該核酸プローブがこれらの条件下でハイブリダイズする分子はX線フィルムを利用して検出される。

40

50

【0020】

好適な態様において、当該核酸プローブはSEQ ID NO: 2のポリペプチド又はそのサブ配列をコードする核酸配列である。別の好適な態様において、この核酸プローブはSEQ ID NO: 1である。別の好適な態様において、この核酸プローブはエッシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) NRR L B-21855に含まれているプラスミドpZL3-3内に収容された核酸配列であり、ここでこの核酸配列はSEQ ID NO: 2のポリペプチドをコードする。

【0021】

長さが少なくとも100ヌクレオチドである長いプローブに関しては、低乃至超高ストリンジエンシー条件は42℃にて、5×のSSPE、0.3%のSDS、200μg/mlの剪断変性サケ精子DNA、低、中並びに高及び超高ストリンジエンシーについてそれぞれ25, 35又は50%のホルムアルデヒド中でのプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションと定義し、しかる後に標準のサザンブロッティング手順が続く。

【0022】

長さが少なくとも100ヌクレオチドの長いプローブに関し、担体材料は最後に3回、15分づつ、2×のSSC、0.2%のSDSで好ましくは少なくとも45℃（超低ストリンジエンシー）、より好ましくは少なくとも50℃（低ストリンジエンシー）、より好ましくは少なくとも55℃（中ストリンジエンシー）、より好ましくは少なくとも60℃（中-高ストリンジエンシー）、更により好ましくは少なくとも65℃（高ストリンジエンシー）、そして最も好ましくは少なくとも70℃（超高ストリンジエンシー）で洗浄する。

【0023】

長さが約15ヌクレオチド～約70ヌクレオチドである短めのプローブに関しては、ストリンジエンシー条件はBolton and McCarthy (1962, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48: 1390) に従う計算を利用して計算されたTmより5℃～10℃低い温度での0.9MのNaCl、0.09MのTris-HCl、pH7.6、6mMのEDTA、0.5%のNP-40、1×のDenhardt溶液、1mMのピロリン酸ナトリウム、1mMの第一リン酸ナトリウム、0.1mMのATP及び0.2mg/mlの酵母RNA中で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ハイブリダイゼーション後の洗浄、しかる後のサザンブロット手順と定義する。

【0024】

長さが約15ヌクレオチド～約70ヌクレオチドの短めのプローブに関し、担体材料は6×のSSCと0.1%のSDSの中で15分で1回、そして6×のSSCを利用し、計算したTmより5℃～10℃低い温度で15分づつ2回洗浄する。

【0025】

第三の態様において、本発明はSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して免疫化学的同一性又は部分免疫化学的同一性を有する単離されたポリペプチドに関する。この免疫化学特性は周知のアウターローニー二重免疫拡散手順による免疫学的交差反応同定試験により決定される。詳しくは、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を有するポリペプチドのエピトープに対して免疫反応性又は結合性であるポリクローナル抗体を含む抗血清を、Harboe and Ingild, N.H. Axelsen, J.Kroll, and B.Weeks 編、*A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis*, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter 23 又はJohnstone and Thorpe, *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Scientific Publications, 1982（より詳しくは頁27-31）により発表の手順に従いウサギ（又はその他のげっ歯動物）を免疫することにより調製する。免疫化学的同一性を有するポリペプチドは、特定の免疫化学技術を利用して同一の状況、例えば総合的な沈殿物の融合、同一の沈殿形態及び／又は同一の電気泳動度で抗血清と反応するポリペプチドである。免疫化学的同一性の更なる説明は、Axelsen, Bock, and Kroll, N.H. Axelsen, J.Kroll, and B.Weeks編 *A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis*, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter 10に記載されている。部分免疫化学的同一性を有するポリペプ

10

20

30

40

50

チドは特定の免疫化学技術を利用して部分的に同一の状況、例えば部分的な沈殿物の融合、部分的に同一の沈殿形態及び／又は部分的に同一の電気泳動度で抗血清と反応するポリペプチドである。部分的な免疫化学的同一性の更なる説明は、Bock and Axelsen, N.H. Axelsen, J.Kroll, and B.Weeks 編 A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter 11に記載されている。

【0026】

抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は例えばE.Harlow and D.Lane 編 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New Yorkの方法に従い、調製及び利用されうる。

【0027】

本発明のポリペプチドは、SEQ ID NO: 2 の 5-アミノレブリン酸シンターゼ活性の少なくとも 20%、好ましくは少なくとも 40%、より好ましくは少なくとも 60%、更により好ましくは少なくとも 80%、更により好ましくは少なくとも 90%、そして最も好ましくは少なくとも 100%の活性を有する。

【0028】

本発明のポリペプチドは任意の属の微生物から得られうる。

【0029】

本発明のポリペプチドは細菌性ポリペプチドであってよい。例えば、このポリペプチドはグラム陽性菌ポリペプチド、例えばバチルス (Bacillus) ポリペプチド、例えばバチルス・アルカロフィルス (Bacillus alkalophilus)、バチルス・アミロリケファシエンス (Bacillus amyloliquefaciens)、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis)、バチルス・サーキュランス (Bacillus circulans)、バチルス・コアギュランス (Bacillus coagulans)、バチルス・ロータス (Bacillus lautus)、バチルス・レンタス (Bacillus lentus)、バチルス・リシェニホルミス (Bacillus licheniformis)、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium)、バチルス・ステアロサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus)、バチルス・スブチリス (Bacillus subtilis) 又はバチルス・スリンジェンシス (Bacillus thuringiensis) ポリペプチド；又はストレプトマイセス (Streptomyces) ポリペプチド、例えばストレプトマイセス・リビダンス (Streptomyces lividans) 又はストレプトマイセス・ミュリヌス (Streptomyces murinus) ポリペプチド；又はグラム陰性菌ポリペプチド、例えば E. コリ又はシュードモナス (Pseudomonas) 種ポリペプチドであってよい。

【0030】

本発明のポリペプチドは真菌ポリペプチドであってよく、そしてより好ましくは酵母ポリペプチド、例えばカンジダ (Candida)、クルイベロマイセス (Kluyveromyces)、ピチア (Pichia)、サッカロマイセス (Saccharomyces)、シゾサッカロマイセス (Schizosaccharomyces) 又はヤロウィア (Yarrowia) ポリペプチド；又は、より好ましくは糸状菌ポリペプチド、例えばアクレモニウム (Acremonium)、アスペルギルス (Aspergillus)、オーレオバシジウム (Aureobasidium)、クリプトコッカス (Cryptococcus)、フィリバシジウム (Filibasidium)、フサリウム (Fusarium)、ヒュミコラ (Humicola)、マグナポルセ (Magnaporthe)、ムコール (Mucor)、ミセリオフソラ (Myceliophthora)、ネオカリマスティックス (Neocallimastix)、ニューロスポーラ (Neurospora)、ペシロマイセス (Paecilomyces)、ペニシリウム (Penicillium)、ピロマイセス (Piromyces)、シゾフィラム (Schizophyllum)、タラロマイセス (Talaromyces)、サーモアスカス (Thermoascus)、チェラビア (Thielavia)、トリポクラジウム (Tolypocladium) 又はトリコデルマ (Trichoderma) ポリペプチドであってよい。

【0031】

好適な態様において、このポリペプチドはサッカロマイセス・カールスバーゲンシス (Saccharomyces carlsbergensis)、サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、サッカロマイセス・ジアスタチカス (Saccharomyces diastaticus)、サッカロマイセス・ドウグラシイ (Saccharomyces douglasii)、サッカロマイセス・クルイベ

10

20

30

40

50

リ (*Saccharomyces kluyveri*)、サッカロマイセス・ノルベンシス (*Saccharomyces norbensis*) 又はサッカロマイセス・オビフォルミス (*Saccharomyces oviformis*) ポリペプチドである。

【0032】

別の好適な態様において、当該ポリペプチドはアスペルギルス・アキュレアトゥス (*Aspergillus aculeatus*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・フェチドゥス (*Aspergillus foetidus*)、アスペルギルス・ジャポニカス (*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・ニドゥランシス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリザ (*Aspergillus oryzae*)、ヒュミコラ・インソレンシス (*Humicola insolens*)、ヒュミコラ・ラスギノーザ (*Humicola lanuginosa*)、ムコール・ミーヘイ (*Mucor miehei*)、ミセリオフソラ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*)、ニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*)、ペニシリウム・パープロゲヌム (*Penicillium purpurogenum*)、トリコデルマ・ハージアヌム (*Trichoderma harzianum*)、トリコデルマ・コニンギイ (*Trichoderma koningii*)、トリコデルマ・ロンジブラチアトゥム (*Trichoderma longibrachiatum*)、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 又はトリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) ポリペプチドである。

10

【0033】

別の好適な態様において、当該ポリペプチドはフサリウム・バクトリジオイデス (*Fusarium bactridioides*)、フサリウム・セラリス (*Fusarium cerealis*)、フサリウム・クルックウェレンシス (*Fusarium crookwellense*)、フサリウム・クルモルム (*Fusarium culmorum*)、フサリウム・グラミネアルム (*Fusarium graminearum*)、フサリウム・グラミンム (*Fusarium graminum*)、フサリウム・ヘテロスポルム (*Fusarium heterosporum*)、フサリウム・ネグンジ (*Fusarium negundi*)、フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、フサリウム・レチキュラトゥム (*Fusarium reticulatum*)、フサリウム・ロゼウム (*Fusarium roseum*)、フサリウム・サンブチヌム (*Fusarium sambucinum*)、フサリウム・サルコクロムウ (*Fusarium sarcochroum*)、フサリウム・スポロトリチオイデス (*Fusarium sporotrichioides*)、フサリウム・スルフレウム (*Fusarium sulphureum*)、フサリウム・トルロスム (*Fusarium torulosum*)、フサリウム・トリコセシオイデス (*Fusarium trichothecioides*) 又はフサリウム・ベネナトゥム (*Fusarium venenatum*) ポリペプチドである。

20

30

【0034】

より好適な態様において、フサリウム・ベネナトゥム細胞はフサリウム・ベネナトゥム A3/5 であって、当初フサリウム・グラミネアルム A T C C 20334 として寄託されており、そして最近 Yoder and Christianson, 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 62-80 及び O'Donnell ら 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 57-67 によりフサリウム・ベネナトゥムに再分類されたものであるか、現在認知されている種名とは関係なくフサリウム・ベネナトゥムの分類学的均等物である。別の好適な態様において、このフサリウム・ベネナトゥム細胞は WO 97/26330 に開示の通り、フサリウム・ベネナトゥム A3/5 又はフサリウム・ベネナトゥム A T C C 20334 の形態学的突然変異体である。

40

【0035】

上記の種に関し、本発明は完全及び不完全状態の双方、並びにその他の分類学的均等物、例えばアナモルフを、認知されている種名とは関係なく、包含することが理解されるであろう。当業者は適当な均等物の同一性を容易に認定できるであろう。例えば、フサリウムの分類学的均等物は D.L.Hawksworth, P.M.Kirk, B.C.Sutton, and D.N.Pegler (editors), 1995, Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi、第8版 CAB International, University Press, Cambridge, England, pp.173-174 により特定されている。

【0036】

これらの種の株は多数の培養物寄託機関、例えば American Type Culture Collection (AT

50

CC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraal bureau Voor Schimmelcultures (CBS)及びAgricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL) で公共的に容易に入手できる。

【0037】

更に、かかるポリペプチドは、上記のプローブを利用し、自然（例えば土壌、堆肥、水等）から単離された微生物等、その他の起源から同定及び獲得できうる。自然環境から微生物を単離する技術は当業界において周知である。かくして核酸配列はその他の微生物のゲノム又はcDNAライブラリーを同様にスクリーニングすることにより得られうる。ポリペプチドをコードする核酸配列が一旦これらのプローブで検出できたら、その配列は当業者

10

【0038】

本明細書における定義に従うと、「単離された」ポリペプチドとは、他の非5-アミノレブリン酸シンターゼポリペプチドを本質的に含まないポリペプチド、例えばSDS-PAGEによる決定に従い、純度約20%以上、好ましくは純度約40%以上、より好ましくは純度約60%以上、更により好ましくは純度約80%以上、最も好ましくは純度約90%以上、そして更に最も好ましくは純度約95%以上のポリペプチドをいう。

【0039】

本発明の核酸配列によりコードされるポリペプチドには更に別のポリペプチドがこのポリペプチド又はそのフラグメントのN末端又はC末端に融合した融合ポリペプチド又は切断可能融合ポリペプチドも含まれる。融合ポリペプチドは本発明の核酸配列（又はその一部）に別のポリペプチドをコードする核酸配列（又はその一部）を融合することにより作られる。融合ポリペプチドを作るための技術は当業界において公知であり、そして当該ポリペプチドをコードするコード配列を、イン・フレームで、且つ融合ポリペプチドの発現が同じプロモーター及びターミネーターのコントロール下となるようにライゲーションすることを含む。

20

【0040】

核酸配列

本発明は更に本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸配列に関連する。好適な態様において、この核酸配列はSEQ ID NO: 1に記載のものである。別のより好適な態様において、この核酸配列はエッシェリヒア・コリNRRL B-21855に含まれているプラスミドpZL3-3内に収容された配列である。本発明は更に、遺伝子コードの縮重によりSEQ ID NO: 1とは相違する、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列を包含する。本発明は更に5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するSEQ ID NO: 2のフラグメントをコードするSEQ ID NO: 1のサブ配列に関する。

30

【0041】

SEQ ID NO: 1のサブ配列はSEQ ID NO: 1に包含される核酸配列であるが、但し5'及び/又は3'末端から1又は複数個のヌクレオチドが欠失しているものである。好ましくは、サブ配列は少なくとも1380ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも1500ヌクレオチド、そして最も好ましくは少なくとも1620ヌクレオチドを含む。

40

【0042】

本発明は更にSEQ ID NO: 1の核酸配列内に少なくとも一の突然変異を含んで成る突然変異核酸配列にも関連し、ここでこの突然変異核酸配列はSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするものである。

【0043】

ポリペプチドをコードする核酸配列を単離及びクローニングするのに利用される技術は当業界において公知であり、そしてゲノムDNAからの単離、cDNAからの調製、又はそれらの組合せが挙げられる。かかるゲノムDNAからの本発明の核酸配列のクローニングは、例えば周知のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）又は共有の構造的特徴を有するクロー

50

ニングされたDNAフラグメントを検出するための発現ライブラリーの抗体スクリーニングを利用することにより行うことができる。例えば、Innis ら、1990、PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York を参照のこと。その他の核酸増幅手順、例えばリガーゼ連鎖反応 (LCR)、ライゲーション活性化転写 (LAT) 及び核酸配列ベース増幅 (NASBA) が利用されうる。この核酸配列はフサリウムの株、又はその他のもしくは近縁の生物からクローニングし得、それ故、例えば、当該核酸配列のポリペプチドコード領域の対立形質又は種変異体であってよい。

【0044】

本明細書における定義に従うと、「単離された核酸配列」とは他の核酸配列を本質的に含まない核酸配列、例えばアガロース電気泳動による決定に従い、純度約20%以上、好ましくは純度約40%以上、より好ましくは純度60%以上、更により好ましくは純度約80%以上、そしてより好ましくは純度約90%以上の核酸配列を意味する。例えば、単離された核酸配列は、核酸配列をその天然の位置から、その再生を行う別の部位へと転位する遺伝子工学において利用される標準のクローニング手順により得られうる。このクローニング手順は当該ポリペプチドをコードする核酸配列を含んで成る所望の核酸フラグメントの切り出し及びクローニング、このフラグメントのベクター分子への挿入、及びこの核酸配列の多重コピー又はクローンを複製する宿主細胞への組換えベクターの組込みを包含しうる。この核酸配列はゲノム、cDNA、RNA、半合成体、合成起源、又は任意のそれらの組合せであってよい。

【0045】

本発明は更にSEQ ID NO: 1の核酸配列と少なくとも約80%、好ましくは約85%、より好ましくは約90%、更により好ましくは約95%、そして最も好ましくは約97%の相同性の度合いを有し、活性ポリペプチドをコードする核酸配列に関する。本発明の目的にとって、2本の核酸配列間の相同性の度合いはWilbur-Lipman 法により (Wilbur and Lipman, 1983, Proceedings of the National Academy of Science USA 80: 726-730)、LASERGENE (商標) MEGALIGN (商標) ソフトウェア (DNASTAR, Inc., Madison, WI) を利用し、同一性表及び下記のマルチプルアラインメントパラメーターで決定する: $K_{\text{tuple}} = 3$, $\text{gap penalty} = 3$ 及び $\text{windows} = 20$)。

【0046】

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列の修飾は当該ポリペプチドと実質的に類似するポリペプチドの合成のために必要でありうる。ポリペプチドに対して「実質的に類似」とは、ポリペプチドの非天然形態を意味する。これらのポリペプチドはその天然起源から単離されたポリペプチドとは、多少の工学的態様で相違しうる。例えば、比活性、熱安定性、至適pH等の点で相違するポリペプチドの変異体を例えば部位特異的突然変異誘発により合成することが注目されうる。類似配列はSEQ ID NO: 1のポリペプチドコード部、例えばそのサブ配列として紹介する核酸配列を基礎に構築するか、又は当該核酸配列によりコードされるポリペプチドとは別のアミノ酸配列を供しないが、酵素の生産を目的とする宿主生物のコドン用法に対応する配列を供するヌクレオチド置換の導入により、又は異なるアミノ酸配列を供しうるヌクレオチド置換の導入により構築されうる。ヌクレオチド置換の一般的な説明については、例えばFordら、1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107 を参照のこと。

【0047】

かかる置換は分子の機能に本質的な領域の外側に施し、しかも活性ポリペプチドが供されるようにすべきことが当業者に明らかであろう。本発明は単離された核酸配列によりコードされるポリペプチドの活性に本質的であり、それ故好ましくは置換に委ねられないアミノ酸残基は当業界において公知の手順、例えば部位特異的突然変異誘発又はアラニンスクランニング突然変異誘発に従って同定されうる (例えば、Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085を参照のこと)。後者の技術では、突然変異は分子内の全ての正に帯電した残基に導入し、そして得られる突然変異分子を5-アミノレブリン酸シンターゼ活性について試験し、当該分子の活性に本質的なアミノ酸残基を同定する。基質-酵素

相互作用の部位は核磁気共鳴分析、結晶グラフィー又は光学親和ラベリングの如き技術による決定に従い、三次元構造の分析によって決定することもできる（例えば、de Vosら 1992, Science 255: 306-312; Smithら 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaverら 1992, FEBS Letters 309: 59-64を参照のこと）。

【0048】

本発明は更に本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸配列であって、低ストリンジエンシー条件下、より好ましくは中ストリンジエンシー条件下、更により好ましくは高ストリンジエンシー条件下、そして最も好ましくは超高ストリンジエンシー条件下で、SEQ ID NO: 1の核酸配列又はその相補鎖と同一の条件下でハイブリダイズする核酸プローブとハイブリダイズする核酸配列；又はその対立形質変異体及び本明細書において定義するそれらのサブ配列に関連する（Sambrookら、1989、前掲）。

10

【0049】

本発明は更に、（a）DNAをSEQ ID NO: 1の配列もしくはその相補鎖又はそのサブ配列であって5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するポリペプチドフラグメントをコードするものと、低、中、高又は超高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズさせ；そして（b）この核酸配列を単離することにより製造された単離された核酸配列に関連する。

【0050】

突然変異された核酸配列を製造するための方法

本発明は更に突然変異された核酸配列を製造するための方法であって、少なくとも一の突然変異をSEQ ID NO: 1の核酸配列又はそのサブ配列に導入することを含んで成る方法に関連し、ここでこの突然変異された核酸配列はSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を有するポリペプチド又は5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するそのフラグメントをコードする。

20

【0051】

一のヌクレオチドを別のヌクレオチドにスイッチするための核酸配列への突然変異の導入は当業界において公知の任意の方法を利用する部位特異的突然変異誘発により成し遂げられうる。特に有用なのは、注目のインサートの入ったスーパーコイル二本鎖DNAベクター及び所望の突然変異を含む2種の合成プライマーを使用する手順である。各々がベクターの対立鎖に相補性であるこのヌクレオチドプライマーはPfu DNAポリメラーゼを介して温度サイクル中に伸長する。プライマーの組込みにより、ゆらぎニックを含む突然変異プラスミドが作製される。温度サイクルの後、生成物をメチル化及びヘミメチル化DNAに特異的なDpnIで処理して親DNA鋳型を消化し、そして突然変異含有合成DNAを選別する。当業界公知のその他の手順も利用してよい。

30

【0052】

核酸構築体

本発明は更に、1又は複数のコントロール配列に作用可能式に連結された本発明の核酸配列を含んで成る核酸構築体に関連し、ここでこのコントロール配列はそれに適合する条件下で適当な宿主細胞内でこのコード配列の発現を指令するものである。発現とは、限定することなく、転写、後転写修飾、翻訳、後翻訳修飾及び分泌等のポリペプチドの製造に

40

【0053】

「核酸構築体」とは本明細書においては一本鎖又は二本鎖の核酸分子と定義され、それは天然遺伝子から単離されたものであるか、又は本来天然には存在しない状態で組合され、並んだ複数の核酸セグメントを含むように修飾されたものである。核酸構築体は、この核酸構築体が発明のコード配列の発現に必要なコントロール配列全てを含むとき、用語発現カセットと同義である。「コード配列」とは本明細書においては、タンパク質生成物のアミノ酸配列を直接特定する核酸配列の部分と定義する。コード配列の境界は一般にmRNAの5'末端にあるオープンリーディングフレームのすぐ上流に配置されたりボソーム結合部位（原核細胞）又はATG開始コドン（真核細胞）並びにmRNAの3'末端にあ

50

るオープンリーディングフレームのすぐ下流に配置された転写ターミネーター配列により規定される。コード配列には、限定することなく、DNA、cDNA及び組換え核酸配列が挙げられうる。

【0054】

本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸配列は当該ポリペプチドの発現を供するよう様々な手段で操作してよい。ベクターへのその挿入前の核酸配列の操作は発現ベクターに依存して所望となりうるか又は必須とされうる。組換えDNA法を利用する核酸配列の修飾のための技術は当業界において周知である。

【0055】

「コントロール配列」なる語は、本明細書において、本発明のポリペプチドの発現のために必要又は有利である全ての成分を含むように定義される。各コントロール配列は当該ポリペプチドをコードする核酸配列にとって天然でも外来のものであってもよい。かかるコントロール配列には、限定することなく、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター、シグナル配列及び転写ターミネーターが挙げられる。最低限、コントロール配列はプロモーター、並びに転写及び翻訳停止シグナルを含む。コントロール配列に、そのコントロール配列のポリペプチドをコードする核酸配列のコード領域とのライゲーションを促進する特異的な制限部位の導入の目的のためにリンカーを施してよい。「作用可能式に連結」とは本明細書においては、コントロール配列がポリペプチドの発現を指令できるDNA配列のコード配列に対して適当な位置にそのコントロール配列が配置されている形態として定義される。

【0056】

コントロール配列は適当なプロモーター配列、即ち、核酸配列の発現のために宿主細胞により認識される核酸配列であってよい。このプロモーター配列はポリペプチドの発現を媒介する転写コントロール配列を含む。このプロモーターは選定の宿主細胞内で転写活性を示す任意の核酸配列、例えば突然変異、ランケット及びハイブリッドプロモーターであってよく、そして宿主細胞に対して同種又は異種の細胞外又は細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から獲得し得る。

【0057】

特に細菌宿主細胞内での本発明の核酸構築体の転写を指令するために適当なプロモーターの例は、E. コリ lac オペロン、ストレプトマイセス・コエリカラー (S. coelicolor) アガラーゼ遺伝子 (dagA)、バチルス・スブチリスレバンスクラゼ遺伝子 (sacB)、バチルス・リシェニホルミスアルファアミラーゼ遺伝子 (amyL)、バチルス・ステアロサーモフィルスマルトジェニックアミラーゼ遺伝子 (amyM)、バチルス・アミロリケファシエンスアルファアミラーゼ遺伝子 (amyQ)、バチルス・リシェニホルミスペニシリナーゼ遺伝子 (penP)、バチルス・スブチリス xyIA 及び xyIB 遺伝子及び原核細胞ベクターラクタマーゼ遺伝子 (Villa-Kamaroffら、1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731) から得られるプロモーター、並びに tac プロモーター (DeBoerら、1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21-25) である。他のプロモーターは「Useful proteins from recombinant bacteria」Scientific American, 1980, 242: 74-94; 及び Sambrookら、1989、前掲に記載されている。

【0058】

糸状菌宿主細胞内での本発明の核酸構築体の転写を指令するために適当なプロモーターの例は、アスペルギルス・オリザ TAKA アミラーゼ、リゾムコール・ミーハイ (Rhizomucor miehei) アスパラギン酸プロテイナーゼ、アスペルギルス・ニガー中性アルファアミラーゼ、アスペルギルス・ニガー酸安定アルファアミラーゼ、アスペルギルス・ニガーもしくはアスペルギルス・アワモリグルコアミラーゼ (glA)、リゾムコール・ミーハイリパーゼ、アスペルギルス・オリザアルカリプロテアーゼ、アスペルギルス・オリザトリオース三リン酸イソメラーゼ、アスペルギルス・ニドゥランスアセトアミダーゼ、フサリウム・オキシスポルムトリプシン様プロテアーゼ (WO 96/00787)、N

A 2-T p i (アスペルギルス・ニガー中性アルファアミラーゼをコードする遺伝子から獲得されたプロモーター、及びアスペルギルス・オリザトリオースリン酸イソメラーゼをコードする遺伝子由来のプロモーターのハイブリッド)、並びにそれらの突然変異体、トランケート及びハイブリッドプロモーターである。

【0059】

酵母宿主において、有用なプロモーターはサッカロマイセス・セレビシエエノラーゼ (E N O-1) 遺伝子、サッカロマイセス・セレビシエガラクトキナーゼ遺伝子 (G A L 1)、サッカロマイセス・セレビシエアルコールデヒドロゲナーゼ/グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (A D H 2 / G A P)、及びサッカロマイセス・セレビシエ3-ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子から得られる。酵母宿主細胞にとってのその他の有用なプロモーターはRomanos ら、1992, Yeast 8: 423-488に記載されている。

10

【0060】

このコントロール配列は適当な転写ターミネーター配列、即ち、宿主細胞により転写を終止させるように認識される配列であってもよい。このターミネーター配列はポリペプチドをコードする核酸配列の3'末端に作用可能式に連結されている。選定の宿主細胞内で機能的である任意のターミネーターが本発明において利用されうる。

【0061】

糸状菌宿主細胞のための好適なターミネーターはアスペルギルス・オリザT A K Aアミラーゼ、アスペルギルス・ニガーグルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニドゥランシアントラニレートシンターゼ、アスペルギルス・ニガーアルファグルコシダーゼ及びフサリウム・オキシスポルムトリプシン様プロテアーゼをコードする遺伝子から獲得される。

20

【0062】

酵母宿主細胞のための好適なターミネーターはサッカロマイセス・セレビシエエノラーゼ、サッカロマイセス・セレビシエチトクロームC (C Y C 1) 又はサッカロマイセス・セレビシエグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子から獲得される。酵母宿主細胞のためのその他の有用なターミネーターはRomanos ら、1992、前掲に記載されている。

【0063】

このコントロール配列は適当なリーダー配列、即ち、宿主細胞による翻訳のために重要なm R N Aの非翻訳領域であってもよい。このリーダー配列はポリペプチドをコードする核酸配列の5'末端に作用可能式に連結されている。選定の宿主細胞において機能的な任意のリーダー配列が本発明において利用されうる。

30

【0064】

糸状菌宿主細胞のための好適なリーダーはアスペルギルス・オリザT A K Aアミラーゼ及びアスペルギルス・ニドゥ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。

【0065】

酵母宿主細胞のための適当なリーダーはサッカロマイセス・セレビシエエノラーゼ (E N O-1) 遺伝子、サッカロマイセス・セレビシエ3-ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子、サッカロマイセス・セレビシエアルファ因子、及びサッカロマイセス・セレビシエアルコールデヒドロゲナーゼ/グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (A D H 2 / G A P) から獲得される。

40

【0066】

コントロール配列はポリアデニル化配列、即ち、核酸配列の3'末端に作用可能式に連結されており、そして転写されると、ポリアデノシン残基を転写されたm R N Aに付加するシグナルとして宿主細胞により認識される配列であってもよい。選定の宿主細胞内で機能的である任意のポリアデニル化配列が本発明において利用されうる。

【0067】

糸状菌宿主細胞のための好適なポリアデニル化配列はアスペルギルス・オリザT A K Aアミラーゼ、アスペルギルス・ニガーグルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニドゥランシア

50

ントラニレートシンターゼ、フサリウム・オキシスポルムトリプシン様プロテアーゼ及びアスペルギルス・ニガーアルファグルコシダーゼをコードする遺伝子から得られる。

【0068】

酵素宿主細胞のために有用なポリアデニル化配列はGuo and Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15: 5983-5990 により発表されている。

【0069】

コントロール配列は、コードされたポリペプチドを細胞の分泌経路に導入できうるポリペプチドのアミノ末端に連結されたアミノ酸配列をコードするシグナルペプチドコード領域であってもよい。核酸配列のコード配列の5'末端は、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リーディングフレーム内でもとから連結されたシグナルペプチドコード領域を当初から含みうる。他方、このコード配列の5'末端はコード配列にとって外来であるシグナルペプチドコード配列を含みうる。この外来シグナルペプチドコード領域は、このコード配列が通常にはシグナルペプチドコード領域を含まない場合に必要とされうる。他方、この外来シグナルペプチドコード領域はポリペプチドの分泌を高めるため、天然シグナルペプチドコード領域と置き換えてよい。しかしながら、選定の宿主細胞の分泌経路へと発現ポリペプチドを誘導する任意のシグナルペプチドコード領域が本発明において利用されうる。

10

【0070】

細菌宿主細胞のために有効なシグナルペプチドコード領域はバチルスNCIB 11837由来のマルトジェニックアミラーゼ遺伝子、バチルス・ステアロサーモフィルスアルファアミラーゼ遺伝子、バチルス・リシェニホルミススブチリシン遺伝子、バチルス・リシェニホルミスベクターラクタマーゼ遺伝子、バチルス・ステアロサーモフィルス中性プロテアーゼ遺伝子(nprT, nprS, nprM)、又はバチルス・スブチリスprSA遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域である。他のシグナルペプチドはSimon and Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137に記載されている。

20

【0071】

糸状菌宿主細胞のための有効なシグナルペプチドコード領域はアスペルギルス・オリザTAKAアミラーゼ遺伝子、アスペルギルス・ニガー中性アミラーゼ遺伝子、アスペルギルス・ニガーグルコアミラーゼ遺伝子、リゾムコール・ミーハイアスパラギン酸プロテイナーゼ遺伝子、ヒュミコラ・インソレンスセルラーゼ遺伝子又はヒュミコラ・ラヌギノーザ(H. lanuginosa)リパーゼ遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域である。

30

【0072】

酵母宿主細胞のために有用なシグナルペプチドはサッカロマイセス・セレビシエアルファ因子及びサッカロマイセス・セレビシエインベルターゼの遺伝子から得られる。その他の有用なシグナルペプチドコード領域はRomanos ら、1992、前掲に記載されている。

【0073】

コントロール配列はプロペプチドコード領域、即ち、ポリペプチドのアミノ末端に配置されたアミノ酸配列をコードするものであってもよい。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(又は時折り、チモゲン)として知られる。プロポリペプチドは一般に不活性であり、そしてプロポリペプチドからのプロペプチドの触媒又は自己触媒分解により成熟活性ポリペプチドへと変換されうる。このプロペプチドコード領域はバチルス・スブチリスアルカリプロテアーゼ遺伝子(aprE)、バチルス・スブチリス中性プロテアーゼ遺伝子(nprT)、サッカロマイセス・セレビシエアルファ因子遺伝子、リゾムコール・ミーハイアスパラギン酸プロテイナーゼ遺伝子、又はミセリオフソラ・サーモフィララッカーゼ遺伝子(WO 95/33836)から得られうる。

40

【0074】

シグナルペプチド及びプロペプチド領域の双方がポリペプチドのアミノ末端にあるとき、このプロペプチド領域はポリペプチドのアミノ末端の隣りに配置され、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隣りに配置される。

【0075】

50

宿主細胞の増殖を基準にポリペプチドの発現を調節する調節配列を付加することも所望されうる。調節配列の例は、調節化合物の存在等、化学又は物理的刺激に応答して遺伝子の発現のオン・オフを引き起こすものである。原核系における調節システムには *lac*, *tac* 及び *trp* オペレーターシステムが含まれるであろう。酵母においては、*ADH2* システム又は *GAL1* システムが使用されうる。糸状菌においては、*TAKA* アルファアミラーゼプロモーター、*Aspergillus*・*Niger* グルコアミラーゼプロモーター及び *Aspergillus*・オリザグルコアミラーゼプロモーターが調節配列として使用できうる。調節配列のその他の例は遺伝子増幅を可能にするものである。真核系においては、これらにはメトトレキセートの存在下で増幅するジヒドロフォレートリダクターゼ遺伝子、重金属により増幅されるメタロチオネイン遺伝子が挙げられる。このような場合、当該ポリペプチドをコードする核酸配列は調節配列に作用可能式に連結されているであろう。

10

【0076】

本発明は更に本発明のポリペプチドをコードする内因性遺伝子の発現を改変するための核酸構築体に関連する。これらの構築体は内因性遺伝子の発現を改変するのに必要な最少限の成分を含みうる。一の態様において、この核酸構築体は好ましくは (a) ターゲッティング配列、(b) 調節配列、(c) エキソン及び (d) スプライスドナー部位を含む。細胞への核酸構築体の導入により、この構築体は相同組換を介して細胞ゲノムの内因性遺伝子部位に挿入される。ターゲッティング配列は要素 (a) ~ (d) の内因性遺伝子への組込みを指令し、その結果要素 (b) ~ (d) は内因性遺伝子に作用可能式に連結される。別の態様において、この核酸は (a) ターゲッティング配列、(b) 調節配列、(c) エキソン、(d) スプライスドナー部位、(e) イントロン、及び (f) スプライスアクセプター部位を含み、ここでこのターゲッティング配列は要素 (a) ~ (f) の組込みを指令し、かくして要素 (b) ~ (f) は内因性遺伝子に作用可能式に連結される。しかしながら、この構築体は追加の成分、例えば選択マーカーを含んでよい。

20

【0077】

双方の態様において、これらの成分の導入は内因性遺伝子の発現が改変された新しい転写ユニットの製造をもたらす。本質的には、この新しい転写ユニットはターゲッティング構築体及び内因性遺伝子により導入された配列の融合生成物である。内因性遺伝子が改変されている一の態様において、遺伝子は活性化されている。この態様において、調節配列の挿入を介して親細胞の内因性遺伝子に通常天然に結合した調節領域を置換、中断又は妨害するために相同組換が利用され、これは対応の親細胞よりも高いレベルでの遺伝子の発現を及ぼす。この活性化遺伝子は当業界において周知の方法を利用して、この構築体の中に増幅可能な選択マーカー遺伝子を合体させることにより更に増幅されうる（例えば、米国特許第 5,641,670 号を参照のこと）。内因性遺伝子が改変されている別の態様においては、遺伝子の発現が低下している。

30

【0078】

ターゲッティング配列は内因性遺伝子内、遺伝子のすぐ隣り、上流遺伝子内、又は内因性遺伝子上流且つ離れて存在してよい。1又は複数のターゲッティング配列を使用してよい。例えば、環状のプラスミド又はDNAフラグメントは好ましくは単独のターゲッティング配列を採用し、一方線形のプラスミド又はDNAフラグメントは好ましくは2本のターゲッティング配列を採用する。

40

【0079】

この構築体の調節配列は1又は複数のプロモーター、エンハンサー、スカフォールド付加領域又はマトリックス付加部位、陰性調節要素、転写結合部位又はこれらの配列の組合せを含んで成ってよい。

【0080】

この構築体は更にこの内因性遺伝子の1又は複数のエキソンを含んで成る。エキソンはRNAへと複製され、そして成熟mRNA分子の中にエキソン配列が内因性遺伝子のコード領域とイン・フレームとなるように存在しているDNA配列と定義される。このエキソンは任意的に、1又は複数のアミノ酸をコードする及び／又は1個のアミノ酸を部分的にコ

50

ードするDNAを含む。他方、このエクソンは5'非コード領域に対応するDNAを含む。内因性エクソンが1又は複数のアミノ酸及び／又は1個のアミノ酸の一部をコードする場合、この核酸構築体は、転写及びスプライシングにより、リーディングフレームが内因性遺伝子のコード領域とイン・フレームとなり、第二エクソンに由来するmRNAの一部の適当なリーディングフレームがそのままとなるようにデザインする。

【0081】

この構築体のスプライス・ドナー部位は一のエクソンを別のエクソンからスプライシングするのを指令する。典型的には、第一エクソンは第二エクソンの5'側にあり、そしてこの第一エクソンの3'側で重複且つ隣接するスプライスドナー部位は第二エクソンの5'側上の第二エクソンに隣接するスプライスアクセプター部位を認識する。スプライスアクセプター部位は、スプライスドナー部位と同様、一のエクソンの別のエクソンからのスプライシングを指令する配列である。スプライスドナー部位と一緒に働くことにより、このスプライシング装置はイントロンの除去を及ぼすためにスプライスアクセプター部位を使用する。

10

【0082】

発現ベクター

本発明は更に、本発明の核酸配列、プロモーター並びに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に関連する。上記の様々な核酸及びコントロール配列は、1又は複数の慣用の制限部位を、かかる部位での当該ポリペプチドをコードする核酸配列の挿入又は置換を可能にするために含みうる組換え発現ベクターを作るように合体させてよい。他方、本発明の核酸配列は当該核酸配列又は当該配列を含んで成る核酸構築体を適当な発現用ベクターに挿入することにより発現されうる。発現ベクターの構築において、このコード配列はベクター内に、それが発現のために適当なコントロール配列と作用可能式に連結されるように配置する。

20

【0083】

組換え発現ベクターは組換えDNA手順に簡単にかけることができ、そして核酸配列の発現をもたらすことのできる任意のベクター（例えばプラスミド又はウィルス）であってよい。選定のベクターは一般にそのベクターを導入すべき宿主細胞とベクターとの適合性に依存するであろう。これらのベクターは線形又は閉環プラスミドであってよい。

【0084】

当該ベクターは自己複製式ベクター、即ち、染色体外質として存在するベクターであって、その複製が染色体の複製とは独立したものの、例えばプラスミド、染色体外要素、ミニクロソーム、又は人工染色体であってよい。このベクターは自己複製を確実にする任意の手段を含みうる。他方、このベクターは、宿主細胞に導入したとき、ゲノムに組込み、そしてそれが組込まれた染色体と一緒に複製するものであってよい。更に、単独のベクターもしくはプラスミド、又は2種以上のベクターもしくはプラスミドであって一緒に宿主細胞のゲノムの中に導入される総DNAを含むもの、又はトランスポゾンを使用してよい。

30

【0085】

本発明のベクターは好ましくは1又は複数の選択マーカーであって、形質転換細胞の選択を容易にするものを含む。選択マーカーはその生成物が、殺生物剤又はウィルス耐性にする、重金属に耐性にする、原栄養性を独立栄養性にする遺伝子である。細菌選択マーカーの例はバチルス・スプチリスもしくはバチルス・リシェニホルミスに由来のdal遺伝子、又は抗生物質耐性、例えばアンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール又はテトラサイクリン耐性を授けるマーカーである。酵母宿主細胞のために適当なマーカーはADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1及びURA3である。糸状菌宿主内で使用するための選択マーカーは、限定することなく、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）、hygB（ヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ）、niaD（ニトレートリダクターゼ）、pyrG（オルチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼ）、sc（スルフェートアデニルトランスフェラーゼ）、trpC（

40

50

アントラニレートシンターゼ)並びに他の種由来の均等物を含む群から選ばれうる。アスペルギルス細胞において利用するのに好ましいのはアスペルギルス・ニドゥランス又はアスペルギルス・オリザのamdS及びpyrG遺伝子、及びストレプトマイセス・ヒグロスコピカス(S. hygroscopicus)のbar遺伝子である。

【0086】

本発明のベクターは好ましくは宿主細胞ゲノムへのベクターの安定な組込み又は細胞のゲノムとは独立の細胞へのベクターの自己複製を可能にする要素を含む。

【0087】

宿主細胞ゲノムへの組込みのため、このベクターは当該ポリペプチドをコードする核酸配列又は相同もしくは非相同組換によるゲノムへのベクターの安定な組換のためのこのベクターの任意のその他の要素を頼りとしうる。他方、このベクターは宿主細胞のゲノムへの相同組換による組換を誘導するための更なる核酸配列を含みうる。この更なる核酸配列はベクターが宿主細胞ゲノムの中に染色体内の正確な位置において組込まれることを可能にする。正確な位置での組込みの傾向を高めるため、組込み要素は好ましくは十分な数の核酸、例えば100～1,500塩基対、好ましくは400～1,500塩基対、そして最も好ましくは800～1,500塩基対を含むべきであり、それは相同組換の確率を高めるよう対応の標的配列と十分に相同性なものとする。組込み要素は宿主細胞のゲノム内の標的配列と相同である任意の配列であってよい。更に、この組込み要素は非コード又はコード核酸配列であってよい。他方、このベクターは非相同組換により宿主細胞のゲノムに組込まれうる。

【0088】

自己複製のため、このベクターは注目の宿主細胞内でベクターが自己複製できるようにする複製起点を更に含んで成ってよい。細菌の複製起点の例はE. コリ内での複製を可能にするプラスミドpBR322, pUC19, pACYC177及びpACY184、並びにバチルス内での複製を可能にするpUB110, pE194, pTA1060及びpAMβ1の複製起点である。酵母宿主細胞内で使用するための複製起点の例は2ミクロン複製起点、ARS1, ARS4、並びにARS1とCEN3との組合せ、及びARS4とCEN6との組合せである。複製起点はその機能を宿主細胞内で温度感受性にする突然変異を有するものであってよい(例えば、Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1433 参照)。

【0089】

複数の本発明の核酸配列のコピーを遺伝子生成物の生産性を高めるために宿主細胞に挿入してよい。核酸配列のコピー数の増大は当該配列の少なくとも一の追加コピーを宿主細胞ゲノムの中に組込むことにより、又は核酸配列に増幅可能な選択マーカー遺伝子を含ませることにより得ることができ、ここでこの選択マーカー遺伝子の増幅コピー、それ故核酸配列の追加のコピーを含む細胞は適当な選択剤の存在下で細胞を培養することにより選択できるようになる。

【0090】

上記の要素を本発明の組換発現ベクターの構築のためにライゲーションするのに利用する手順は当業者に周知である(例えば、Sambrookら、1989、前掲参照のこと)。

【0091】

宿主細胞

本発明は更に、当該ポリペプチドの組換製造に好適に利用される本発明の核酸配列を含んで成る組換宿主細胞に関連する。本発明の核酸配列を含んで成るベクターは宿主細胞の中に、前述の通りかかるベクターが染色体組込み体として、又は自己複製式染色体外ベクターとして維持されるように導入する。「宿主細胞」とは、複製の間に起こる突然変異により親細胞とは同一でなくなった親細胞の任意の子孫を包含する。選定の宿主細胞はポリペプチドをコードする遺伝子及びその起源に著しく依存する。

【0092】

宿主細胞の単細胞微生物、例えば原核細胞、又は非単細胞微生物、例えば真核細胞であっ

10

20

30

40

50

てよい。

【0093】

有用な単細胞は細菌細胞、例えばグラム陽性菌、例えばバチルス細胞、例えばバチルス・アルカロフィルス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・ブレビス、バチルス・サーキュランス、バチルス・クラウシイ (*Bacillus clausii*)、バチルス・コアギュランス、バチルス・ロータス、バチルス・レントス、バチルス・リシェニホルミス、バチルス・メガテリウム、バチルス・ステアロサーモフィルス、バチルス・スブチリス及びバチルス・スリンジェンシス；又はストレプトマイセス細胞、例えばストレプトマイセス・リビダンス又はストレプトマイセス・ミュリヌス、又はグラム陰性菌、例えば *E. コリ* 又はシュードモナス種である。好適な態様において、この細菌宿主細胞はバチルス・レントス、バチルス・リシェニホルミス、バチルス・ステアロサーモフィルス又はバチルス・スブチリス細胞である。別の好適な態様において、バチルス細胞は好アルカリ性バチルスである。

10

【0094】

細菌宿主細胞へのベクターの導入は、例えばプロトプラスト形質転換（例えば、Chang and Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115参照）、コンピテント細胞の使用（例えばYoung and Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829 又はDubnau and Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221 参照）、エレクトロポレーション（例えばShigekawa and Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751 参照）、又はコンジュゲーション（例えばKoehler and Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278参照）により行われうる。

20

【0095】

宿主細胞は真核細胞、例えば哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞又は菌類細胞であってよい。

【0096】

好適な態様において、宿主細胞は菌類細胞である。本明細書で用いる「菌類」とは、子嚢菌類 (Ascomycota)、担子菌類 (Basidiomycota)、ツボカビ類 (Chytridiomycota) 及び接合菌類 (Zygomycota) (Hawksworthら、Ainsworth and Bisby's *Dictionary of The Fungi*、第8版、1995, CAB International, University Press, Cambridge, UKにより規定) 並びに卵菌類 (Oomycota) (Hawksworthら、1995、前掲、頁171 に記載) 及び全ての不完全菌類 (Hawksworthら、1995、前掲) の族が含まれる。

30

【0097】

より好適な態様において、真菌宿主細胞は酵母細胞である。「酵母」とは、本明細書ではアスコスポロジェナス (ascosporogenous) 酵母 (エンドマイセタールス: Endomycetales)、バシジオスポロジェナス (basidiosporogenous) 酵母、並びに不完全菌類 (ブラストマイセテス: Blastomycetes) に属する酵母が含まれる。酵母の分類は将来において変わらうため、本発明の目的に関し、酵母は *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc.App.Bacteriol.Symposium Series No.9, 1980) の定義に従う。

【0098】

更により好適な態様において、酵母宿主細胞は、カンジダ、ハンセンラ、クルイペロマイセス、ピチア、サッカロマイセス、シゾサッカロマイセス又はヤロウィア細胞である。

40

【0099】

最も好適な態様において、酵母宿主細胞はサッカロマイセス・セレビシエ、サッカロマイセス・ジアスタチカス、サッカロマイセス・ドウグラシイ、サッカロマイセス・クルイベリ、サッカロマイセス・ノルベンシス又はサッカロマイセス・オビフォルミス細胞である。他の最も好適な態様において、酵母宿主細胞はクルイペロマイセス・ラクチス細胞である。別の最も好適な態様において、酵母宿主細胞はヤロウィア・リポリチカ (*Y. lipolytica*) 細胞である。

【0100】

50

別のより好適な態様において、菌類宿主細胞は糸状菌細胞である。「糸状菌細胞」には真菌類及び卵菌類の副分類の全ての糸状形態が含まれる（Hawksworthら、1995前掲により規定）。糸状菌はキチン、セルロース、グルカン、キトサン、マンナン及びその他の複雑な多糖類から構成される菌糸体壁を特徴とする。栄養増殖は菌糸伸長により、そして炭素異化は専ら好気性である。対照的に、サッカロマイセスの如き酵母の栄養増殖は単細胞葉状体の出芽により、そして炭素異化は発酵的でありうる。

【0101】

更により好適な態様において、糸状菌宿主細胞は限定することなく、アクレモニウム、アスペルギルス、フサリウム、ヒュミコラ、ムコール、ミセリオフソラ、ニューロスボラ、ペニシリウム、チェラビア、トリポクラジウム又はトリコデルマの種の細胞である。

10

【0102】

最も好適な態様において、この糸状菌宿主細胞はアスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・フェチドゥス、アスペルギルス・ジャポニカス、アスペルギルス・ニドゥランス、アスペルギルス・ニガー又はアスペルギルス・オリザ細胞である。別の最も好適な態様において、糸状菌宿主細胞はフサリウム・バクトリジオイデス、フサリウム・セラリス、フサリウム・クルックウェレンス、フサリウム・クルモルム、フサリウム・グラミネアルム、フサリウム・グラミヌム、フサリウム・ヘテロスポルム、フサリウム・ネグンジ、フサリウム・オキシスポルム、フサリウム・レチキュラトゥム、フサリウム・ロゼウム、フサリウム・サンブチヌム、フサリウム・サルコクロムウ、フサリウム・スポロトリチオイデス、フサリウム・スルフレウム、フサリウム・トルロスム、フサリウム・トリコセシオイデス又はフサリウム・ベネナトゥム細胞である。更に最も好適な態様において、糸状菌親細胞はフサリウム・ベネナトゥム（Nirenberg 種nov.）細胞である。別の最も好適な態様において、糸状菌宿主細胞はヒュミコラ・インソレンス又はヒュミコラ・ラヌギノーザ細胞である。別の最も好適な態様において、糸状菌宿主細胞はムコール・ミーハイ細胞である。別の最も好適な態様において、糸状菌宿主細胞はニューロスボラ・クラッサ細胞である。別の最も好適な態様において、糸状菌宿主細胞はペニシリウム・パープロゲヌム細胞である。別の最も好適な態様において、糸状菌宿主細胞はチェラビア・テレストリス（*Thielavia tervestris*）細胞である。別の最も好適な態様において、トリコデルマ細胞はトリコデルマ・ハージアヌム、トリコデルマ・コニンギイ、トリコデルマ・ロンジブラチアトゥム、トリコデルマ・リーセイ又はトリコデルマ・ビリデ細胞である。

20

30

【0103】

菌類細胞は周知の態様でのプロトプラスト形成、プロトプラストの形質転換及び細胞壁の再生を包含する方法により形質転換されうる。アスペルギルス宿主細胞の形質転換のために適当な手順はEP 238023号及びYeltonら、1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 1470-1474 に記載されている。フサリウム種を形質転換するために好適な方法はMalardier ら、1989, *Gene* 78: 147-156及びWO 96/00787 に記載されている。酵母は、Becker and Guarente, Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Itoら 1983, *Journal of Bacteriology* 153: 163;及びHinnenら 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 1920 に記載の手順を利用して形質転換されうる。

40

【0104】

製造方法

本発明は更に、本発明のポリペプチドを製造するための方法であって、（a）株であってその野生型が当該ポリペプチドを生産できるものを培養して当該ポリペプチドを含んで成る上清液を生成し；そして（b）当該ポリペプチドを回収することを含んで成る方法に関連する。好ましくは、この株はフサリウム属であり、そしてより好ましくはフサリウム・ベネナトゥムである。

【0105】

本発明は更に本発明のポリペプチドを製造するための方法であって、（a）宿主細胞を当

50

該ポリペプチドの生産を誘導する条件下で培養し；そして（b）当該ポリペプチドを回収する；ことを含んで成る方法に関する。

【0106】

本発明は更に本発明のポリペプチドを製造するための方法であって、（a）宿主細胞を当該ポリペプチドの生産を誘導する条件下で培養し、ここで当該宿主細胞はSEQ ID NO: 1の核酸配列内に少なくとも1個の突然変異を有するSEQ ID NO: 1の突然変異核酸配列を含んで成り、ここで当該突然変異核酸配列はSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし；そして（b）当該ポリペプチドを回収する；ことを含んで成る方法に関する。

【0107】

本発明は更に、本発明のポリペプチドを製造するための方法であって、（a）当該ポリペプチドをコードする内因性核酸配列の第二エクソンに作用可能式に連結された調節配列、エクソン及び／又はスプライスドナー部位を含んで成る新しい転写ユニットが組込まれている相同組換え細胞をこのポリペプチドの生産を誘導する条件下で培養し；そして（b）このポリペプチドを回収する、ことを含んで成る方法に関する。これらの方法は例えば米国特許第5,641,670号に記載の遺伝子活性化技術の利用を基礎とする。遺伝子活性化技術は、通常細胞の中で発現されない遺伝子の活性化、又は細胞内で極めて低レベルで発現される遺伝子の発現の増大を基礎とする。遺伝子活性化技術は調節配列、エクソン及び／又はスプライスドナー部位を細胞のゲノムDNA内に、その挿入が、調節配列、エクソン及び／又はスプライスドナー部位が内因性遺伝子に作用可能式に連結されてその発現を活性化するようになっている新しい転写ユニットの製造をもたらすような状況で挿入する方法を含む。

【0108】

本発明の製造方法において、細胞は当業界周知の方法を利用して当該ポリペプチドの製造のために適当な栄養培地の中で培養する。例えば、この細胞は振盪フラスコ培養、小スケール又は大スケール発酵（連続、バッチ、供給バッチ、又は固定状態発酵等）により、実験室又は産業用発酵槽の中で、当該ポリペプチドの発現及び／又は単離を可能にする適当な培地中及び条件下で培養してよい。培養は炭素及び窒素源並びに無機塩を含んで成る適当な栄養培地の中で当業界公知の手順を利用して実施する。適当な培地は商業的供給業者から入手するか、又は公開の処方に従って調製できうる（例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカatalog）。もしこのポリペプチドが栄養培地の中に分泌されるなら、このポリペプチドは培地から直接回収できる。ポリペプチドが分泌されないのなら、それは細胞リゼートから回収できる。

【0109】

このポリペプチドはそれに特異的な当業界公知の方法を利用して検出できうる。このような検出方法には特異的な抗体の利用、酵素生成物の形成、又は酵素基質の消失の利用が含まれうる。例えば、ポリペプチドの活性の決定のために酵素アッセイを利用できうる。5-アミノレブリン酸シンターゼ活性の測定のための手順は当業界において公知である。前述の通り、5-アミノレブリン酸シンターゼ活性はWider de Xifraら、1971、前掲により発表され、Pavetoら、1989、前掲により改良された手順に従って決定される。

【0110】

得られるポリペプチドは当業界に公知の方法により回収できうる。例えば、このポリペプチドは、限定することなく、遠心分離、濾過、抽出、スプレー乾燥、エバポレーション又は沈殿等の慣用の手順により栄養培地から回収できうる。

【0111】

本発明のポリペプチドは、限定することなく、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー、疎水性、クロマトフォーカシング、及びサイズ排除）、電気泳動手順（例えば、調製等電点電気泳動）、示差溶解（例えば、硫酸アンモニウム沈殿）、SDS-PAGE、又は抽出等の様々な手順により精製し得る（例えば、Protein Purification, J.C.Janson and Lars Ryden 編、VCH Publishers, New York, 1989）。

【0112】

用途

本発明は5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するポリペプチドを利用する方法にも関連する。

【0113】

本発明のポリペプチドは、5-アミノレブリン酸シンターゼ活性が宿主細胞内でのヘムの生産の律速段階となっている宿主細胞により生産されるヘムタンパク質の収量を高めるため、この宿主細胞内の5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を過剰発現させることにより利用されうる。この方法は：(a)ヘムタンパク質を生産できる宿主細胞に、5-アミノレブリン酸シンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列の1又は複数のコピーを導入し、ここで当該核酸配列は当該ポリペプチドの発現を指令できる調節配列に作用可能式に連結されている；(b)この細胞をヘムタンパク質及び当該ポリペプチドの生産に適する栄養培地の中で培養し；そして(c)このヘムタンパク質を細胞の栄養培地から回収する、ことを含んで成る(WO 97/47746号参照)。

10

【0114】

本発明は異種ポリペプチドの製造のためにも利用されうる。本方法は(a)呼吸欠陥細胞突然変異体に本発明のポリペプチドをコードする第一核酸配列及び第二核酸配列を含んで成る核酸構築体を導入し、ここでこの第一核酸配列は発現するとこの呼吸欠陥を補完し、そしてこの第二核酸配列は異種ポリペプチドをコードするものであり；(b)この第一及び第二核酸配列を培養培地の中で、この第一及び第二核酸配列の発現に適する好気的条件下で培養し；そして(c)この異種ポリペプチドを回収する、ことを含んで成る(WO 98/41640号参照)。

20

【0115】

本発明を以下の限定でない実施例により更に説明する。

【0116】

実施例

培地

50×Vogel'sは1リットル当たり150gのクエン酸ナトリウム、250gの KH_2PO_4 、10gの $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10gの $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2.5mlのビオチンストック溶液及び5.0mlの微量元素溶液から成る。

30

【0117】

微量元素溶液は1リットル当たり14.3gの $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.5gの $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.5gの NiCl_2 、13.8gの FeSO_4 、8.5gの MnSO_4 及び3.0gのクエン酸から成る。

【0118】

RA胞子形成培地は1リットル当たり50gのコハク酸、12.1gの NaNO_3 、1gのグルコース、20mlの50×Vogel's及び0.5mlの10mg/mlの NaMoO_4 ストック溶液、pH6.0から成る。

40

【0119】

YEG培地は1リットル当たり5gの酵母エキスを及び20gのグルコースから成る。

【0120】

YEPG培地は10gの酵母エキスを、20gのペプトン及び20gのグルコースから成る。

【0121】

STCは0.8Mのソルビトール、25mMのTris、pH8、25mMの CaCl_2 から成る。

【0122】

SPTCは40%のPEG 4000、0.8Mのソルビトール、25mMのTris、pH8、25mMの CaCl_2 から成る。

50

【0123】

M400培地 (pH6.0) は1リットル当り50gのマルトデキストリン、2gの $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2gの KH_2PO_4 、4gのクエン酸、8gの酵母エキス、2gの尿素、0.5mlの微量金属溶液及び0.5gの CaCl_2 から成る。

【0124】

COVE微量金属溶液は1リットル当り0.04gの $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、0.4gの $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.2gの $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.7gの $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.8gの $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 及び10gの $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ から成る。

【0125】

最少培地上層 (pH6.5) は1リットル当り、6.0gの NaNO_3 、0.52gの KCl 、1.52gの KH_2PO_4 、1mlのCOVE微量金属溶液、20mlの50%のグルコース、2.5mlの20%の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、20mlのビオチンストック溶液及び20gの低融点アガロースから成る。

【0126】

ビオチンストック溶液は100mlの50%のエタノール中5mgのビオチンから成る。

【0127】

最少培地プレート (pH6.5) は6.0gの NaNO_3 、0.52gの KCl 、1.52gの KH_2PO_4 、1.0mlのCOVE微量金属溶液、20gのNobel Agar (Difco)、20mlの50%のグルコース、20mlのメチオニン (50g/l)、20mlのビオチン (200mg/l)、2.5mlの20%の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及び1.0mlのストレプトマイシンから成る。

【0128】

実施例1：フサリウム・グラミネアルム株ATCC 20334ゲノムDNA抽出
フサリウム・グラミネアルム (=フサリウム・ベネナトゥム) 株ATCC 20334を25mlの0.5%の酵母エキス-2%のグルコース (YEG) 培地の中で72時間、30℃で250rpmにおいて増殖させた。菌糸体をMiracloth (Calbiochem, La Jolla, CA) を介する濾過により集め、そして25mlの10mMのTris-1mMのEDTA (TE) バッファーで1回洗った。過剰のバッファーを菌糸体から排液し、次いでその菌糸体を液体窒素の中で凍結させた。凍結菌糸体を電気コーヒーグラインダーで微粉末へと粉碎し、そしてこの粉末をディスポーザブルプラスチック遠沈管中の20mlのTEバッファー及び5mlの20%w/vのドデシル硫酸ナトリウム (SDS) に加えた。この混合物を数回静かに反転させて混合を確実にし、そして当容量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1 v/v/v) で2回抽出した。酢酸ナトリウム (3M溶液) を0.3Mの最終濃度となるように加え、次いで2.5容量の氷冷エタノールを加えて核酸を沈殿させた。次いでこの核酸をこの遠沈管を15,000×gで30分遠心分離することによりペレットにした。このペレットを30分風乾してから0.5mlのTEバッファーに再懸濁した。DNaseフリーリボヌクレアーゼAを100mg/mlの濃度となるように加え、そしてこの混合物を37℃で30分インキュベーションした。次いでプロテイナーゼKを200mg/mlの濃度となるように加え、そしてこの混合物を更に1時間37℃でインキュベーションした。最後に、この混合物をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1 v/v/v) で2回抽出し、そしてそのDNAを酢酸ナトリウム及びエタノールで前述の通りに沈殿させた。このDNAペレットを真空中で風乾し、TEバッファーに再懸濁し、そして4℃で使用するまで保存した。

【0129】

実施例2：プラスミドpGAGa5の構築

プラスミドpGAGa5はフサリウム株ATCC 20334ゲノムDNAを含む増幅反応体からのPCRフラグメントのライゲーションにより構築した。この増幅反応体は下記の成分を含む：50ngのゲノムDNA、100μMづつのdATP, dCTP, dGTP及びdTTP (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)、50pmoleのプライマーh

10

20

30

40

50

hemA Deg 5' 5' -GTITGGTGYTCIAAYGAYTAYCT - 3' (SEQ ID NO: 3) 及び hemA Deg 3' 5' -CCNACNGCRTCACACATCTTC - 3' (SEQ ID NO: 4)、2 ユニットの Taq DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Corp., Branchburg, NJ) 並びに 1 × Taq DNA ポリメラーゼバッファー (Perkin-Elmer Corp., Branchburg, NJ)。この反応体を Perkin-Elmer Thermal Cycler (Perkin-Elmer Corp., Branchburg, NJ) で、95℃で1分、53℃で1分、72℃で90秒のサイクル30回にプログラムしてインキュベーションした。450bpのPCR生成物を1.1%の低融点アガロースゲル (FMC, Rockland, ME) を用い、40mMのTris-酢酸-1mMの二ナトリウムEDTA (TAE バッファー) での電気泳動後に切り出すことにより単離し、そしてpCRIIベクター (Invitrogen, San Diego, CA) の中に、その製造業者の仕様書に従ってサブクローニングし、pGAGA 10
5ができた。

【0130】

実施例3：フサリウムDNAライブラリー及び5-アミノレブリン酸シンターゼ (hemA) クローンの同定

フサリウム株ATCC 20334ゲノムDNAライブラリーをバクテリオファージクローニングベクターλZipLox (Life Technologies, Gaithersburg, MD) を用い、その製造業者の仕様書に従って組換バクテリオファージのプレーティング及び精製のための宿主としてE. コリY1090ZL細胞を、そして個々のpZL1-hemAクローンの切り出しのためにE. コリDH10Bzipを用い、構築した。実施例1に記載の通りにして調製した総細胞DNAをTsp509Iで部分消化し、そして1%のアガロースゲル 20
上で50mMのTris-50mMの硼酸-1mMの二ナトリウムEDTA (TBE) バッファーによりサイズ分画した。4~7kbのサイズ範囲で泳動したDNAフラグメントを切り出し、そしてPrep-a-Gene 試薬 (BioRad Laboratories, Hercules, CA) を利用してゲルから溶出させた。溶出させたDNAフラグメントをEcoRI-切断し且つ脱リン酸化したλZipLoxベクターアームとライゲーションし、そしてそのライゲーション混合物を商業用のパッケージング抽出物 (Stratagene, La Jolla, CA) を用いてパッケージングした。このパッケージングしたDNAライブラリーをプレート培養し、そしてE. コリY1090ZL細胞の中で増幅させた。未増幅ゲノムライブラリーは 1×10^6 pfu/m) を含んだ。

【0131】

7×10^4 プラーク由来のバクテリオファージDNAを二重環状Nytran Plus 膜 (Schleicher & Schuell, Keene, NH) に移し、そして実施例3に記載のプラスミドpGAGA5由来のフサリウム株ATCC 20334ゲノムDNAのPCR増幅により調製した。この増幅反応体は下記の成分を含む：1×のDIGプローブ合成混合物 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)、50pmoleのプライマーhemA 5' 38 5' -CCATACTTGTCGCAAG - 3' (SEQ ID NO: 5) 及びプライマーhemA 3' 423 5' -GAACGACTACCTTGGC - 3' (SEQ ID NO: 6)、2 ユニットの Taq DNA ポリメラーゼ及び 1 × Taq DNA ポリメラーゼバッファー。この反応体をPerkin-Elmer Thermal Cycler で、95℃で1分、55℃で1分、72℃で2分のサイクル30回にプログラムしてインキュベーションした。変性プローブをハイブリダイゼーションバッファーに2ng/mlの濃度 40
に加え、そしてプレハイブリダイゼーションした膜と一夜インキュベーションした。プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションは42℃で5×SSC、0.1%のサルコシル、0.02%のSDS、1%のGeniusブロッキング剤 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 及び30%のホルムアミドの中で実施した。膜を5×SSC-0.1%のSDSの中で2回洗い、次いで2×SSC-0.1%のSDSで2回洗った。各洗浄は室温で15分実施した。洗浄した膜をKodak X-OMAT AR フィルムに約2時間室温で露出し、次いでKonica QX-70自動フィルムプロセッサを用いて製造業者の仕様書に従って現像した。第一プラークを精製し、そして2回目にスクリーニングした。3つのクロー 50
ンが同定され、そして製造業者の仕様書 (Bethesda Research Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) に従ってpZL誘導体へと切り出した。このpZL誘導体をpZL1-

3, p Z L 3-3 及び p Z L 1 2-1 と命名し、そして 3. 8 kb の領域を含むことが見い出された。

【0132】

実施例 4：フサリウム 5-アミノレブリン酸シンターゼ (h e m A) 遺伝子の特性決定
実施例 3 に記載の p Z L 3-3 を下記の手順に従う D N A 配列決定にかけた。D N A 配列決定は Applied Biosystems Model 373A 自動 D N A シンセサイザー (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) で、M 1 3 リバーズ (-48) 及び M 1 3 フォワード (-20) プライマー (New England Biolabs, Beverly, MA) 並びに配列決定する D N A に固有なプライマーを用い、染料ターミネーター化学 (Giesecke ら、1992, Journal of Virol. Methods 38: 47-60) によりプライマー歩行技術を利用して両鎖で実施した。

10

【0133】

クローニングした遺伝子のヌクレオチド配列は 2 つの短い推定イントロンにより区切られた図 1 (SEQ ID NO: 1) に示す 1 9 2 2 ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを示した。このヌクレオチド配列は分子量 6 5 kDa の 5 8 8 個のアミノ酸の推定タンパク質をコードする。

【0134】

フサリウム株 A T C C 2 0 3 3 4 遺伝子生成物の推定アミノ酸配列を図 1 に示す (SEQ ID NO: 2)。全体的に、この推定アミノ酸配列はアスペルギルス・ニドゥランス h e m A 遺伝子 (Bradshaw ら、1993、前掲) と 7 3 % の同一性を有し、サッカロマイセス・セレビシエ H E M 1 遺伝子 (Urban-Grimal, 1986, European Journal of Biochemistry 156: 511-519) と 5 7 % の同一性を有した。これは、C l u s t a l 法 (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) により、L A S E R G E N E (商標) M E G A L I G N (商標) ソフトウェア (DNASTAR, Inc., Madison, WI) を利用し、同一性表及び下記のマルチプルアライメントパラメーターを利用して決定した: gap penalty 10, gap length penalty 10。対合アライメントパラメーターは Ktuple = 1, gap penalty = 3, windows = 5、そして diagonals = 5 とした。

20

【0135】

実施例 5：p Δ H e m A の構築

プラスミド p Δ H e m A は h e m A Δ::a m d S アレルを含むように構築した。

【0136】

プラスミド p J R o y 4 7 をまず、a m d S マーカーの組換え及び除去を促進するようにデザインされた 2 2 4 bp の直接反復配列の隣接するアスペルギルス・ニドゥランス a m d S 遺伝子を含むように構築した。p N E B 1 9 3 (New England Biolabs, Beverly, MA) を B a m H I 及び S a l I で消化し、そして Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA) を利用してゲル精製した。2 種のオリゴヌクレオチド B a m / S w a / S a l リンカー 3 及び B a m / S w a / S a l リンカー 4 (以下に示す) を水に 5 0 p m o l / μ l の濃度となるように再懸濁し、混合し、5 0 °C で 1 0 分加熱し、そしてゆっくりと冷やした。

30

B a m / S w a / S a l リンカー 3: 5' -GATCGATTTAAAT -3' (SEQ ID NO: 7)

B a m / S w a / S a l リンカー 4: 5' -TCGAATTTAAATC -3' (SEQ ID NO: 8)

40

【0137】

このオリゴヌクレオチドを上記の B a m H I 及び S a l I 制限処理した p N E B 1 9 3 にライゲーションし、プラスミド p J R o y 4 3 を作った (図 2)。

【0138】

反復配列フラグメントを作るため、2 通りの P C R 反応を下記のプライマーペアで実施した。

ペア 1:

反復オリゴ 1: 5' -GCGAATTCATATTTAAATGCCGACCAGCAGACGGCCCTCG -3' (SEQ ID NO: 9)

反復オリゴ 2: 5' -GCGATATCATGATCTCTCTGGTACTCTTCG -3' (SEQ ID NO: 10)

50

ペアー 2 :

反復オリゴ 3 : 5' - GCGATATCATCGACCAGCAGACGGCCCTCG - 3' (SEQ ID NO: 11)

反復オリゴ 4 : 5' - GCGTTTAAACATGATCTCTCTGGTACTCTTCG - 3' (SEQ ID NO: 12)

【0139】

増幅反応体 (50 μ l) は下記の成分を含む: 50 ng の p J a L 4 9 3 (W O 9 8 / 4 1 6 4 0)、50 pmol の反復オリゴ 1 及び 50 pmol の反復オリゴ 2、又は 50 pmol の反復オリゴ 3 及び 50 pmol の反復オリゴ 4、5 μ l の 2.5 mM の d A T P、d C T P、d G T P 及び d T T P、1 $\times$ T a q ポリメラーゼバッファー (Perkin-Elmer Corp., Branchburg, NJ) 及び 5 ユニットの T a q ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Corp., Branchburg, NJ)。この反応体を Perkin-Elmer Model 480 Thermal Cycler で下記の通りにプログラムしてインキュベーションした: 95 $^{\circ}$ C で 1 分、55 $^{\circ}$ C で 1 分及び 72 $^{\circ}$ C で 1 分のサイクル 2 ~ 30 回、並びに 4 $^{\circ}$ C での浸漬サイクル。得られる 224 bp のフラグメントを 1 % のアガロースゲル上で T A E バッファー中で泳動させ、そして Qiaquick Gel Extraction Kit を利用して精製した。次いでこれらのフラグメントを E c o R V 及び E c o R I で消化し、互いとライゲーションさせ、そして再び Qiaquick Gel Extraction Kit を利用してゲル精製した。

【0140】

プラスミド p J R o y 4 3 及び反復配列含有フラグメントを共に S w a I 及び P m e I で消化し、そしてライゲーションさせて p J R o y 4 4 を作った (図 3)。

【0141】

次いでプラスミド p J R o y 4 4 を E c o R V で消化し、そして QiaQuick Gel Extraction Kit を用いてゲル精製した。アスペルギルス・ニドゥランス a m d S 遺伝子を含むプラント 2.7 kb N s i I 制限処理フラグメントを E c o R V 消化 p J R o y 4 4 にライゲーションして、p J R o y 4 7 を作った (図 4)。

【0142】

a m d S マーカーの組換え及び除去を促進するようにデザインされた 224 bp の直接反復配列の隣接するアスペルギルス・ニドゥランス a m d S 遺伝子を含む 3.2 kb のフラグメントを、p J R o y 4 7 の P m e I、S c a I 及び S w a I による制限処理により得た。このプラント末端型 DNA フラグメントを QiaQuick Gel Extraction Kit を用いて精製した。

【0143】

精製した DNA フラグメントを実施例 4 に記載の p Z L 3 - 3 にクローニングし、N r u I で制限処理し (開始コドンを含む h e m A O R F の 1616 bp のフラグメントの除去のため)、そしてライゲーションして p Δ H e m A を作った (図 5)。欠失を含む h e m A 遺伝子の領域を h e m A Δ :: a m d S アレルの種類を確認するために配列決定した。配列決定は、h e m A 欠失がコード配列を除去し、そしてこの遺伝子のリーディングフレームを破壊することを示した。

【0144】

実施例 6 : p Δ H e m A によるフサリウム・ベネナトゥムの形質転換

フサリウム株 A T C C 2 0 3 3 4 (Wiebe ら、1991, Mycol. Research 95: 1284-1288) の形態学的突然変異体であるフサリウム・ベネナトゥム C C 1 - 3 (M L Y - 3) を p Δ H e m A で形質転換し、野生型 h e m A 遺伝子を h e m A Δ :: a m d S 欠失アレルで置換した。

【0145】

フサリウム・ベネナトゥム M L Y - 3 の胞子は 500 ml の R A 胞子形成用培地を含むフラスコに、2.5 % のグルコース及び 2.5 mM の硝酸ナトリウムの添加された 1 $\times$ V o g e l s 培地由来の 10 個のプラグを接種し、そして 28 $^{\circ}$ C で 150 rpm、2 ~ 3 回インキュベーションすることにより作製した。胞子は Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA) で回収し、そして Sorvall RC-5B 遠心機 (E. I. Dupont De Nemours and Co., Wilmington, DE) の中で 7000 rpm で 20 分遠心分離した。ペレットにした胞子を実験用蒸留水で 2 回

10

20

30

40

50

洗い、少容量の水に再懸濁し、次いでヘモサイトメーターを利用してカウントした。

【0146】

プロトプラストは100mlのYEPG培地に 4×10^7 胞子フサリウム・ベネナトゥムMLY-3を接種し、そして24℃で150rpmにて16時間インキュベーションすることにより調製した。この培養物をSorvall RT 6000D (E.I. Dupont De Nemours and Co., Wilmington, DE) で3500rpmにて7分遠心分離した。ペレットを30mlの1MのMgSO₄で2回洗い、そして15mlの5mg/mlのNOVOZYME 234 (商標) (バッチPPM 4356, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) の中で1MのMgSO₄の存在下で再懸濁した。培養物を24℃で150rpm、プロトプラストが形成されるまでインキュベーションした。容量35mlの2Mのソルビトールをこのプロトプラスト消化物に加え、そしてこの混合物を2500rpmで10分遠心分離した。このペレットを再懸濁し、STCで2回洗い、そして2000rpmで10分遠心分離してプロトプラストをペレットにした。このプロトプラストをヘモサイトメーターでカウントし、そしてSTC:SPTC:DMSOの8:2:0.1の溶液の中に 2×10^7 プロトプラスト/mlの最終濃度となるように再懸濁した。このプロトプラストをNalgene Cryo 1℃ Freezing Container (VWR Scientific, Inc., San Francisco, CA) の中で速度制御凍結してから-80℃で保存した。

10

【0147】

フサリウム・ベネナトゥムMLY-1の凍結プロトプラストを氷の上で融解した。形質転換をプロトプラストで、 2×10^7 プロトプラスト/mlの濃度で実施した。200μlのプロトプラストを40μgのpΔHemA+5μlのヘパリン(5mg/mlのSTC)と混合し、そして30分水の上でインキュベーションした。2mlのSPTCを加え、そしてこのプロトプラストを更に20分室温でインキュベーションした。最少培地上層(50ml)を形質転換反応体に加え、そしてこの反応体を5mMの5-アミノレブリン酸の添加された2枚の最少培地プレートでプレート培養した。5-アミノレブリン酸の独立栄養性が、室温で12日間の5-アミノレブリン酸欠如最少培地での一次形質転換体の増殖により決定された。

20

【0148】

この形質転換は100超のコロニーを供した。5-アミノレブリン酸欠如最少培地上での30個の一次形質転換体のスクリーニングは、増殖が臨界的な株19個をもたらした。その形質転換体10個をサザン分析のために選んだ。

30

【0149】

10個の形質転換体各々からのゲノムDNA(10μg)を実施例1に記載の通りに調製し、そしてEcoRVで制限消化した。このフラグメントを1%のアガロースゲル電気泳動によりTAEバッファーを用いて分離した。DNAをNytran Plus ナイロン膜に10×SSC中でTurboBlot装置(Schleicher & Schuell, Keene, NH)を利用し、その製造業者の仕様書に従って転写した。この膜を2時間、65℃で、5×SSC、0.1%のサルコシル、0.02%のSDS、1%のGeniusブロッキング剤(Genius DIG Luminescent Detection Kit, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)及び50%のホルムアルデヒドの中で、Hybaidオーブン(Labnet, Woodbridge, NJ)内でプレハイブリダイゼーションした。欠失hemA遺伝子の5'隣接領域に基づくDIG-ラベル化プローブは、以下のプライマー3-3243U及び3for.1を利用し、pΔHemA由来のDNAフラグメントのPCR増幅により調製した。

40

3-3243: 5'-CCCTTCTAGGCAAGTCTATGG-3' (SEQ ID NO:13)

3for.1: 5'-CCGCAGCATGGCCGCAACTTG-3' (SEQ ID NO:14)

【0150】

増幅反応体(50μl)は下記の成分を含む: 50ngのpΔHemA、50pmolの3-3243Uプライマー、50pmolの3for.1プライマー、5μlのDIGラベル化dATP、1×DIGプローブ合成混合物(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)、dCTP、dGTP及びdTTP、1×Taqポリメラーゼバッファー(Perkin-Elmer Cor

50

p., Branchburg, NJ)、及び5ユニットのTaqポリメラーゼ(Perkin-Elmer Corp., Branchburg, NJ)。反応体をPerkin-Elmer Model 480 Thermal Cycler で下記の通りにプログラムしてインキュベーションした: 95℃で5分、55℃で2分、そして72℃で5分のサイクル1回; 95℃で1分、55℃で1分、そして72℃で1分のサイクルを2~30回; そして4℃での浸漬サイクル。この反応生成物を1.5%のアガロースゲル上でTAEバッファーを利用して単離し、300bpの生成物バンドをゲルから切り出し、そしてQiaex II (Qiagen, Chatsworth, CA) を用い、その製造業者の仕様書に従って精製した。

【0151】

精製したプローブをまず水の中で4ng/mlにて沸騰湯浴の中で10分加熱することにより変性させ、次いで上記のハイブリダイゼーション溶液を加えた。65℃で一夜のハイブリダイゼーションの後、この膜を2×SSC、0.1%のSDSで10分室温で洗い、次いで0.5×SSC、0.1%のSDSで15分、68℃で2回洗浄した。この洗浄した膜を2×SSCですすぎ、Genius DIG Luminescent Detection Kitを用い、その製造業者の仕様書に従って現像し、そしてKodak Xomat ARフィルムに約1時間露出させた。

【0152】

形質転換体のサザン分析は4種の形質転換体がhemAΔ::amdSアレル(対立遺伝子)しか含まず、そして6種が野生型及びhemAΔ::amdSアレルの双方を含むことを示した。hemAΔ::amdSアレルしか含まない4種の形質転換体のうち2種を胞子単離し、次いでサザン分析(前述の通り)にかけてhemAΔ::amdSアレルの存在及び野生型アレルの欠如を確認した。サザン分析は双方の形質転換体がhemAΔ::amdS遺伝子しか含まないことを示す。フサリウム・ベネナトゥム46-3と称した一つの形質転換をhemA突然変異宿主株として選定した。

【0153】

実施例7: 5-アミノレブリン酸の添加による致死hemA欠失表現型の救済
hemA欠失表現型を救済する5-アミノレブリン酸の能力を5-アミノレブリン酸の添加により決定した。

【0154】

5-アミノレブリン酸(Porphyrin Products, Logan UT)の250mMのストック溶液を水の中で調製し、0.22ミクロンフィルター除菌し、-20℃で暗所で保存し、そして使用直前に調製培地に添加又は注いだ。0.005mg/ml~0.3mg/mlの濃度に範囲する5-アミノレブリン酸を最少培地アガー又はYEG液体培地に加えた。フサリウム・ベネナトゥム46-3をこれらの培地の中で28℃で7日間培養した。YEG液体培地を200rpmで攪拌した。

【0155】

結果は、30μM(5.0μg/ml)程に低い5-アミノレブリン酸の濃度で最少培地アガーに添加するだけで独立栄養表現を求済するのに十分であることを示した。液体YEG培地中での増殖はやや高めの濃度を要した(1mMまで)。

【0156】

実施例8: pJRoy54HemAの構築

プラスミドpJRoy54HemAを野生型hemAアレル及びLIPOLEASE(商標)(Nove Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark)として知られるサーモマイセス(ヒュミコラ)ラヌギノーザリパーゼをコードする異種遺伝子の発現を誘導する発現カセットを含むように構築した。詳しくは、その天然プロモーター及びターミネーターを含むフサリウム・ベネナトゥムhemA遺伝子を含む3.5kbのフラグメントを、BamHIでpZL3-3を消化し、そしてそのへこんだ末端をクレノウ酵素で埋めることにより得た。このプラント末端型DNAフラグメントをQiaQuick Gel Extraction Kitを利用してゲル精製した。

【0157】

pJRoy54はフサリウム・オキシスポルムSP387プロモーター及びターミネーターにより誘導されるLIPOLEASE(商標)遺伝子を含む発現カセットを含むように構

10

20

30

40

50

築した。まず、プラスミド pNEB193 を blunt カッター HindIII で制限処理し、そして Qiaquick Gel Extraction Kit を利用してゲル精製した。次いでフサリウム・オキシスポルム SP387 プロモーター及びターミネーターで誘導される blunt 末端型 LIPOLEASE (商標) 発現カセットを WO 96/00787 号に記載の通りにして得、そして pNEB193 にライゲーションしてプラスミド pJRoy54 を得た (図6)。

【0158】

精製したフサリウム・ベネナトゥム hemA 遺伝子を含む 3.5 kb のフラグメントを PmeI 消化 pJRoy54 にクローニングし、pJRoy54 hemA を作った (図7)。このプラスミドの配列決定は hemA 遺伝子の存在を確認した。

10

【0159】

実施例9: pJRoy54 hemA の形質転換

形質転換を、実施例6に記載の手順を利用してフサリウム・ベネナトゥムから調製したプロトプラストで実施した。これらのプロトプラストを 50 µg の pJRoy54 hemA で形質転換し、5-アミノレブリン酸欠如最少培地上にプレートし、そして室温でインキュベーションした。形質転換したコロニーが10日間のインキュベーション後に認められた。7種の形質転換体が pJRoy54 hemA で得られ、「DNAなし」のコントロールプレート、即ち、コントロールとしてのフサリウム・ベネナトゥム 46-3 ではコロニーは出現しなかった。

【0160】

20

7種の形質転換体は5-アミノレブリン酸原栄養性であることが認められた。DNAを7種の形質転換体 (HL1~7と命名) から単離し、そして実施例6に記載の手順に従ってサザン分析にかけた。これらの結果はそれらが hemA 欠失アレルの他に、インタクト hemA 遺伝子の少なくとも1のコピーを含むことを示した。このデータは hemA 欠失表現型が野生型 hemA 遺伝子による形質転換により求済されることを確認した。

【0161】

更に、形質転換体 HL1~7 を7日間 28℃で25mlのM400培地を含む125mlの振盪フラスコの中で増殖させた。リパーゼ活性を下記の手順に従って測定した。アッセイ基質はストック基質 (10 µl の p-ニトロフェニルブチレート/mlのDMSO) を MCバッファー (3mMのCaCl₂ - 0.1MのMOPS pH7.5) で使用直前に1:5希釈することにより調製した。標準 LIPOLEASE (商標) (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) は1000 LU/mlの50%のグリセロール - 0.66mMのCaCl₂ - 33mMのTris pH7.5を含み、そして-20℃で保存した。標準 LIPOLEASE (登録商標) を使用直前にMCバッファーで1/100に希釈した。培養液サンプルをMCバッファーに希釈し、そして希釈した培養液サンプルのアリコート100 µlを96穴マイクロタイターディッシュに分注し、次いで希釈基質100 µlを分注した。405nmでの吸収を時間の関数として記録した。培養液のリパーゼユニット/ml (LU/ml) を LIPOLEASE (登録商標) 標準品に基づき計算した。形質転換体は全て7日目のリパーゼ活性を示した。

30

【0162】

40

生物材料の寄託

以下の生物材料をブダベスト条約に従い、Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604 に寄託し、そして下記の受託番号が与えられた:

寄託物	受託番号	寄託日
E. coli DH5a pZL3-3	NRRL B-21855	1997年10月20日

【0163】

【表1】

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13 bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>39</u> , line <u>10</u>	
B. IDENTIFICATION OF Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depository institution Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL)	
Address of depository institution (including postal code and country) Northern Regional Research Center 1815 University Street Peoria, IL 61604, US	
Date of deposit October 20, 1997	Accession Number NRRL B-21855
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
Until the publication of the mention of grant of a European patent or, where applicable, for twenty years from the date of filing if the application has been refused, withdrawn or deemed withdrawn, a sample of the deposited microorganism is only to be provided to an independent expert nominated by the person requesting the sample (cf. Rule 28(4) EPC). And as far as Australia is concerned, the expert option is likewise requested, reference being had to Regulation 3.25 of Australia Statutory Rules 1991 No. 71. Also, for Canada we request that only an independent expert nominated by the Commissioner is authorized to have access to a sample of the microorganism deposited.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indication listed below will be submitted to the International Bureau Later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only ☒ This sheet was received with the international application Authorized officer 	For International Bureau use only ☐ This sheet was received with the International Bureau on: Authorized officer
--	--

Form PCT/RO/134 (July 1992)

【図面の簡単な説明】

【図1】 フサリウム・5-アミノレブリン酸シンターゼの核酸配列及び推定アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 1 及び 2、それぞれ)。

【図2】 pJRoy43の制限地図。

【図3】 pJRoy44の制限地図。

【図4】 pJRoy47の制限地図。

【図5】 pΔHemAの制限地図。

【図6】 pJRoy54の制限地図。

【図7】 pJRoy54HemAの制限地図。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Gambetta, Greg

<120> Polypeptides Having 5-Aminolevulinic Acid Synthase Activity
And Nucleic Acids Encoding Same

<130> 5399.204-WO

<160> 12

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 3853

<212> DNA

<213> Fursarium

<400> 1

gaattcatcg	tacgagacgg	ttggtataaa	gccgagagca	gagtattttg	gacgtgggga	60
tatctgagtt	tgacattttg	agatacctat	gaagagacga	gctaaaggat	tgatcataaa	120
gtacattggc	aatactactt	actgtacaat	taggtttttt	tgtgacttgt	tcattgtaag	180
acacttgtec	gcctttcgat	aaccattcaa	caataactcaa	ccaatgggtg	taaagctgtc	240
aagggtctaa	aggctaaaaa	tacgactgca	acgtgcatga	acagaacgag	ccaatcaagg	300
gcaatgtatt	tctctacagc	cgctccctgag	tttgactcgg	gcggtttcgt	ccctgtacga	360
ttgcgagcgy	ttgtacgtgc	ggaactttgga	actcaaggtt	gcgggccgca	gcatggccgc	420
aacttgacaa	tctttttcgc	cgaggtcatt	ctgtttccga	gtttttttta	ttttatgttg	480
agttaataag	agggtcagga	cttcaactag	tcagttagtt	cgtttatgag	gaaacgttta	540
cgcggtttgt	agatacagaa	agtaaatcaa	cgggtcaaac	gcttcacgtg	tcagatcatt	600
atttacaac	cccgctgtct	aggccttaca	gccagcatcg	gggcctgcat	ggcgacaaga	660
atgtaccata	gacttgcccta	gaaggggaaa	tttgagcgga	gttagttgag	aagaacagaa	720
gaaaatggac	ggaatcgaaa	cggaagtaat	ttatgggtca	atgaccgacc	gttcttgccg	780
agccatggac	caccgactta	ttcaatcctc	tctttacggg	catctatcta	ccgctttatt	840
atcctccttc	ttcatatttt	ccctcctctc	tctttttcct	ttttacactc	aaacctcaacc	900
tcaaacccgc	tctcctcact	tgcaaaagct	caattgcttt	tgcttcgcct	cgcttggtcg	960
ctctcgcgat	cgagtgtgaag	cccctcgctt	ttttttttat	tcacctggca	tatttgcccc	1020
tccaagttca	aactaccacg	ttttgcccc	ctggttcgct	ttacgaaagc	attgctatcg	1080
caacttgacc	tgtgccacca	aatacacgta	acaatggatg	ctgttcttcg	ccagtccaag	1140
gccatgtgac	cttttatgaa	gacggccact	cccgccactc	tgccgcccct	gtcaacttog	1200
tctcgcgccc	ttccggtctc	tgccctcgcca	tgtggaggca	ccatgtcgaa	gctgcagctt	1260
cttgggtcagc	gatgccccgt	catgggtaag	gcatggctgt	tcagaccgcc	aagaaccgcg	1320
ctgctggctc	tgctcggtgc	ttctccaacc	actccaagac	tggaaaaggcc	aagattcata	1380
cttccagcaa	caaggagggt	cgtgctgttg	aacgcccact	cttcgaaggc	cgcgacaatg	1440
gtatgttcga	atcccagtaa	aatctgttta	cttctttccg	tcacttgatt	gtatctaato	1500
ttgcgcccag	ggaactcggt	tattcacgcg	aaccgaaagg	cgcacatcgc	atcccccaac	1560
gcttcgctg	ccgcccgtgg	cttccaatct	cctggcaaat	tcgactatga	aaacctttac	1620
aacactgagc	tcgagaagaa	acacaaggat	aaatcctacc	gttacttcaa	caatatcaac	1680
cgtttgccaa	aggagtttcc	gcgtgcacac	atgtctgaca	aggaggatcg	agtaactgtc	1740
tgggtgcgcca	acgactacct	tgccatgggc	cgcaatcccc	atgttctcaa	cacgatgcac	1800
aaaaccttgg	aggaatatgg	tgctggtgcg	ggcggtactc	gaaacatctc	tggtcacaac	1860
aagcacgcgc	ttgagctgga	ggctacactg	gccaaagctt	acgccaaagga	tagcgctctt	1920
gtgttcagct	cttgcctatgt	tgccaacgac	gcaaccctgg	cgacactcgg	cagcaagtgg	1980
cccgaaatcg	ttattctttc	cgatagcttg	aaccacgcct	ctatgatcca	gggaatccga	2040
cactctggca	ccaagaagat	tgtttttcaa	cacaacgatg	tcgaggacct	cgaggccaag	2100
ctggcttcgc	tacocctaca	cgtgcctaag	atcatagctt	tcgagtcggg	gtacagtatg	2160
tgccgctcca	ttggtcctat	tgaggaaatc	tgtgatcttg	ccgacaagta	tggcgccatc	2220
acttttcttg	atgaagtcca	tgccgtcggc	atgtacgggc	ttcatgggtg	tgggtgtgct	2280
gagcaccttg	actggggaag	ccatgccaac	gggtgccctt	gcgggaccat	catggaccga	2340
atcgacatta	tactgggtac	tctgggcaag	gcgtacgggt	gcgtcgggtg	ctatatcgct	2400
ggtagecgca	agttcattga	cgtgatccga	tcgttggccc	ccggcttcat	cttcaactact	2460
tctttgcctc	ctgctaccat	ggcgtggtgc	caaacctcta	ttgagtacca	gatggagtac	2520
gatggcgacc	gacgactcca	gcagctgcac	actcgtgctg	tcaaggaggc	tatgaacgct	2580
cgagacatcc	ctgtcatccc	caatccctct	cacatcatte	ctgtactagt	tggcaacgcc	2640

10

20

30

```

gagaccgcca aggcggcttc cgacatgctt ctcaacgact acggaattta tgtccaatcc 2700
atcaactacc ccaccgttcc agttggctcag gagcgtcttc gcatcaccoc taccoccggc 2760
catgtcaagg agtaccgcaa ccagcttgct gaggtgtgtg atgagatctg gactcgcttc 2820
aacatcaagg gaacctccga ctgggctgcc gaggtgtgtt ttattggtgt oggcgaggag 2880
agcaacgtac agaacctctt ttggactgac aagcaactca acgttgagca ggctacgaag 2940
gagatcaagg ccaccggtca agccgccaat ggtattactg aggcgcttct cgagcttgag 3000
attaagcaat cctccgaggt cgctactgct gcttaagcgt aagatatact cagcacctta 3060
cgcgactgct catcataggt gaaagatgag cagttccagt tcacttctat gataaccatt 3120
ttgagatata tttttcatt tatgctatcc attggatatg taaattgaat tatttttacg 3180
tccattacca catgacgtgg tatatggagc aactgcaact tttagtctct ccactatttc 3240
tgtgatgtta atgaaatgct gctctcatga cacttgacca atttgtatgg aaacgatact 3300
ctgacattgt tgcattttaa accggaacaa tgttttgccg ataatagaat gaggaagggt 3360
gcagggatga cgggctcca cagaaccgga gcaacggcga gatttcgagg cccgggtccg 3420
tttctagtga caggatccct gcatatcaac aacttcagac cagtcaaaga gcgctcgaga 3480
cgaccagggt caacagaata ttgatcaatg tctgggatgt cgccgttttt caactccgtc 3540
tcctttttcaa actgctcaat ctctgtgaga caagcacact cagataccta agtcgtgaca 3600
agatgagtc tggctcagct caagctaaga acaaggggcc caaagcatgc acaacatgcg 3660
ctaaggctaa ggcaagatgc gtcccgggcc ctcttgggag cctcaagtgc gacaggtaag 3720
tcatgataat tggttcattt ttgggaatat ctggtggct tgcgtttaat cgtcgccgta 3780
ccaggcttgt ctgtaccat atacatatgt ggtgtgagtt ggtggagagg tacatatgct 3840
gacattagaa ttc 3853

```

```

<210> 2
<211> 588
<212> PRT
<213> Fusarium

```

```

<400> 2
Met Asp Ala Val Leu Arg Gln Ser Lys Ala Met Cys Pro Phe Met Lys
1 5 10 15
Thr Ala Thr Pro Ala Thr Leu Arg Ala Leu Ser Thr Ser Ser Arg Ala
20 25 30
Leu Pro Ala Pro Ala Ser Pro Cys Gly Gly Thr Met Ser Lys Leu Gln
35 40 45
Leu Leu Gly Gln Arg Cys Pro Val Met Ala Thr Arg Arg Leu Val Leu
50 55 60
Leu Asn Ala His Ser Ser Lys Ala Ala Thr Met Val Cys Ser Asn Pro
65 70 75 80
Thr Pro Pro Gly Ile His Ala Asn Arg Lys Ala Ala Ser Ala Ser Pro
85 90 95
Thr Ala Ser Ala Ala Ala Ala Gly Phe Gln Ser Pro Gly Lys Phe Asp
100 105 110
Tyr Glu Thr Phe Tyr Asn Thr Glu Leu Glu Lys Lys His Lys Asp Lys
115 120 125
Ser Tyr Arg Tyr Phe Asn Asn Ile Asn Arg Leu Ala Lys Glu Phe Pro
130 135 140
Arg Ala His Met Ser Asp Lys Glu Asp Arg Val Thr Val Trp Cys Ala
145 150 155 160
Asn Asp Tyr Leu Gly Met Gly Arg Asn Pro His Val Leu Asn Thr Met
165 170 175
His Lys Thr Leu Glu Glu Tyr Gly Ala Gly Ala Gly Gly Thr Arg Asn
180 185 190
Ile Ser Gly His Asn Lys His Ala Val Glu Leu Glu Ala Thr Leu Ala
195 200 205
Lys Leu His Ala Lys Asp Ser Ala Leu Val Phe Ser Ser Cys Tyr Val
210 215 220
Ala Asn Asp Ala Thr Leu Ala Thr Leu Gly Ser Lys Leu Pro Glu Cys
225 230 235 240
Val Ile Leu Ser Asp Ser Leu Asn His Ala Ser Met Ile Gln Gly Ile
245 250 255
Arg His Ser Gly Thr Lys Lys Ile Val Phe Lys His Asn Asp Val Gln
260 265 270
Asp Leu Glu Ala Lys Leu Ala Ser Leu Pro Leu His Val Pro Lys Ile
275 280 285
Ile Ala Phe Glu Ser Val Tyr Ser Met Cys Gly Ser Ile Gly Pro Ile
290 295 300
Glu Glu Ile Cys Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Ala Ile Thr Phe Leu

```

10

20

30

20

23

20

30

17

16

<210> 7		
<211> 13		
<212> DNA		
<213> Fusarium		
<400> 7		
gatcgattta aat	13	
<210> 8		
<211> 13		
<212> DNA		
<213> Fusarium		
<400> 8		
tcgaatttaa atc	13	
<210> 9		10
<211> 40		
<212> DNA		
<213> Fusarium		
<400> 9		
gcgaattcat atttaaagtc cgaccagcag acggccctcg	40	
<210> 10		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Fusarium		
<400> 10		
gcgatatcat gatctctctg gtactcttcg	30	
<210> 11		20
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Fusarium		
<400> 11		
gcgatatcat cgaccagcag acggccctcg	30	
<210> 12		
<211> 32		
<212> DNA		
<213> Fusarium		
<400> 12		
gcgtttaaac atgatctctc tggtaactctt cg	32	

1 GAATTCATCGTACGAGACGGTTCGGTATTAAGCCGAGACGAGTATTTTGGACGCTGGGA 60
61 TATCTGAGTTTGACATTTTGGAGATACCTATGAAGAGACGAGCTAAAGGATTTGATCATAAA 120
121 GTACATTTGCCAACTACTACTTACTGTGTACAAATTAGGTTTTTTTGTGACTTGTTCATTTGTAAG 180
181 ACAGTTGTCCGCGCTTTCGATTAACCAATTCACAATACTCAACCAATGGGTGTAAAGCTGTG 240
241 AAGGCTCTAAAGGCTAAAGATGAATGACACTGCAAGTGCATGAACAGAACGAGACCAATCAAGG 300
301 GCATCTATTTTCTCTACAGCCGTCCCTGAGTTTGAATCTCGGGCGGTTTTCTCCCTGTGACGA 360
361 TTGCGAGCGGTGTACGTGCGGACTTTTGGAACTCAAGGTTGCGGGCCGCGACATGCGCGC 420
421 AACCTGCAATCTTTTTCGCCGCGAGGTCAITCTGTTCGCGAGTTTTCGAGTTTTTATATGTTG 480
481 AGTTAATTAAGAGGGTACAGAAAGTAAATCAACGGGTCAACGCTTCAGTGTCAAGCTTTTA 540
541 CGCGGTTGTAGATACAGAAAGTAAATCAACGGGTCAACGCTTCAGTGTCAAGCTTTTA 600
601 ATTACAAACCCCGCTGTCTAGGCCCTTACAGCCAGCATCGGGGCTGCATCGGCAAGA 660
661 ATGTACCATAGACTTGCCCTAGAAGGGGAAATTTGACGGGAGTTAGTTGAGAGAACAGAA 720

Fig. 1A

721 GAAAAATGACGGGAATCGAAAACGGAAGTAATTTATGGGTCAATGACCGACCGTTCTTGC 780
781 AGCCATGGAACACCGACTTAATTCAAATCCTCTCTTTACGGTCACTATCTACCGCTTTAAT 840
841 ATCTCCTCTTCTCATATTTTTCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 900
901 TCACCCGCGCT 960
961 CTCCTCGGATTCGAGTGTAAAGCCCTCGCTTTTTTTTTTTTATTCACCTGGCATATTTGCC 1020
1021 TCAGAGTTCAAACTACACGTTTTTGGCCCTCTGTTTCGCTTTTACGAAGCATTGTATCG 1080
1081 CAACTTGACCTGTGCGCACCAATACACGTAACA ATG GAT GCT GTT CTT CGC CAG 1034
M D A V L R Q
1135 TCC AAG GCC ATG TGC CCT TTT ATG AAG ACG GCC ACT CCC GCC ACT 1179
S K A M C P F M K T A T P A T
1180 CTG CGC GCC TTG TCA ACT TCG TCT CGC GCC CTT CCG GCT CTT GCC 1224
L R A L S T S R A L P A P A
1225 TCG CCA TGT GGA GCC ACC ATG TCG AAG CTG CAG CTT CTT GGT CAG 1269
S P C G G T M S K L Q L L G Q
1270 CGA TSC CCC GTC ATG G GTAAGCATGGCTGTTCAGACCCGCCAAGAACCGCGCTG 1323
R C P V M

Fig. 1B

1324 CTGGCTCTCTTCTGTCCTTCTCCAACTCAAGACTGGAAGGCCAAGATTCATCATTT 1383
1384 CCAG CA ACA AGG AGG CTC GTG TTG AAC GCC CAC TCT TCG AAG 1428
A T R R L V L L N A H S S K
1429 GCC GCG ACA ATG GTA TGT TCG AAT CCC A GTAAATCTGTACTTCTTTTC 1478
A A T M V C S N P
1479 CGTCACTTGATTTGTATCTAATCTTGGCCGAG CT CCT CCT GGT ATT CAC GCG 1530
T P F G I H A
1531 AAC CGA AAG GCC GCA TCC CCA ACC GCT TCC GCT GCT GCC GCG 1575
N R K A A S A S P T A S A A
1576 GCT GCG TTC CAA TCT OCT GGC AAA TTC GAC TAT GAA ACC TTT TAC 1620
A G F Q S F G K F D Y E T P Y
1621 AAC ACT GAG CTC GAG AAG AAA CAC AAG GAT AAA TCC TAC CGT TAC 1665
N T E L E K H K D R S Y R Y
1666 TTC AAC AAT ATC AAC CGT TTG GCA AAG GAG TTT CCG CGT GCA CAC 1710
F N N I N R L A K E F P R A H
1711 ATG TCT GAC AAG GAG GAT CGA GTA ACT CTC TCG TCG GCC AAC GAC 1755
M S D K E D R V T V W C A N D

Fig. 1C

1756 TAC CTT GGC ATG GGC CGC AAT CCC CAT GTT CTC AAC ACG ATG CAC 1800
Y L G M G R N P H V L N T M H
1801 AAA ACC TTG GAG GAA TAT GGT GCT GGT GCG GGC GGT ACT CGA AAC 1845
K T L E E Y G A G A G G T R N
1846 ATC TCT GGT CAC AAC AAG CAC GCC GTT GAG CTG GAG GCT ACA CTG 1890
I S G H N K H A V E L E A T L
1891 GCC AAG CTT CAC GCC AAG GAT AGC GCT CTT GTG TTC AGC TCT TGC 1935
A K L H A K D S A L V F S S C
1936 TAT GTT GCC AAC GAC GCA ACC CTG GCG ACA CTC GGC AGC AAG TTG 1980
Y V A N D A T L A T L G S K L
1981 CCC GAA TGC GTT ATT CTT TCC GAT AGC TTG AAC CAC GCC TCT ATG 2025
P E C V I L S D S L N H A S M
2026 ATC CAG GGA ATC CGA CAC TCT GGC ACC AAG AAG ATT GTT TTC AAG 2070
I Q G I R H S G T K K I V F K
2071 CAC AAC GAT GTG CAG GAC CTC GAG GCC AAG ATG CTT TCG CTA CCC 2115
H N D V Q D L E A K L A S L P

Fig. 1D

2746 ACC CTT ACC CCC GGC CAT GTC AAG GAG TAC CGC AAC CAG CTT GTC 2790
T P T P G H V K E Y R N Q L V
2791 GAG GCT GTT GAT GAG ATC TGG ACT CGC CTC AAC ATC AAG CGA ACC 2835
E A V D E I W T R L N I K R T
2836 TCC GAC TGG GCT GCC GAG GGT GGC TTT ATT GGT GTC GGC GAG GAG 2880
S D W A A E G G F I G V G E E
2881 AGC AAC GTA CAG AAC CCT CTT TGG ACT GAC AAG CAA CTC AAC GTT 2925
S N V Q N P L W T D R K L N V
2926 GAG CAG GCT ACG AAG GAG ATC AAG GCC ACC GGT CAA GCC GCC AAT 2970
E Q A T K E I K A T G Q A A N
2971 GGT ATT ACT GAG GCG CTT CTC GAG CTT GAG ATT AAG CAA TCC TCC 3015
G I T E A L E L E I K Q S S
3016 GAG GTC GCT ACT GCT TACCGTTAAGTATCTACGACCTTACGGCACT 3068
E V A T A A
3069 GCCATCATAGGTGAAGATGAGCAGTTCCAGTTCACTTCTATGATACCACTTTTGAGAT 3127
3128 ATCTTTTATCATTTTATGCTATCCATTGGATATCTAAATTGCAATTTATTTTACGTCCATT 3186

Fig. 1G

3187 ACCACATGACGTGGTATATGGAGCAACTGCACCTTTTATGTCCTCTCCACTATTCTGTGA 3245
3246 TGTTAATGAATAATGCTCTCTCATGACACCTGACCAATTTGTATGGAACGATACTCTGA 3304
3305 CATTGTTGCATTTTAAACCGGAACAATGTTTTGCCGATATATGAAGTGAGGAAGTTGCA 3363
3364 GGGATGACCGGCTCCACAGAACCGGAGCAACGGCGAGATTTCCGAGCCCGGTCGGTT 3422
3423 TCTAGTGACAGGATCCCTGONATCAACAACCTTCAGACACAGTCAAGAGCGCTCGAGAC 3481
3482 GACCAGGFTCAACAGAAATTTGATCAATGTCTGGGATGTGCGCGTTTTTCACTCCGTC 3540
3541 TCCTTTTCAAACCTGCTCAATCTCTGTGAGACAGCACACTCAGATACCTTAAGTCGTGAC 3599
3600 AAGATGATGCTCTGCTCAGCTCAAGCTNAGAACAAGGGGCCCAAGCATGCAACAACATG 3658
3659 CGCTAAGGCTAAGGCAAGATGGCTCCCGGCCCTCTTGGGAGCCCTCAAGTGCACAGGT 3717
3718 AAGTCATGATTAATTGGTTTCATTTTGGGAATATCTTGTATGGCTTGGGTTAATCGTCGC 3776
3777 CGTACCAAGGCTTGTCTTGTACCATATATCATATGTGGTGTGAGTTGGTGGAGAGGTACAT 3835
3836 ATGCTGACATTAAGATTTC 3853

Fig. 1H

2116 CTA CAC GTG CCT AAG ATC ATA GCT TTC GAG TCG GTG TAC AGT ATG 2160
L H V P K I I A F E S V Y S M
2161 TGC GGC TCC ATT GGT CCT ATT GAG GAA ATC TGT GAT CTT GCC GAC 2205
C G S I G P I E E I C D L A D
2206 AAG TAT GGC GCC ATC ACT TTT CTT GAT GAA GTC CAT GCC GTC GGC 2250
K Y G A I T F L D E V H A V G
2251 ATG TAC GGT CTT CAT GGT GCT GGT GTT GCT GAG CAC CTT GAC TGG 2295
M Y G L H G A G V A E H L D W
2296 GAA GCC CAT GCC AAC GGT GCC CTT CGC GGG ACC ATC ATG GAC CGA 2340
E A H A N G A L R G T I M D R
2341 ATC GAC ATT ATC ACT GGT ACT CTG GGC AAG GCG TAC GGT TGC GTC 2385
I D I T G T L G R A Y G C V
2386 GGT GGC TAT ATC CTT GGT ACC GCC AAG TTC ATT GAC GTG ATC CGA 2430
G G Y I A G S A K F I D V I R
2431 TCG TTG GCC CCC GGC TTC ATC TTC ACT ACT TCT TTG CCT CTT GCT 2475
S L A P G F I F T T S L P P A

Fig. 1E

2386 GGT GGC TAT ATC GCT GGT AGC GCC AAG TTC ATT GAC GTG ATC CGA 2430
G G Y I A G S A K F I D V I R
2431 TCG TTG GCC CCC GGC TTC ATC TTC ACT ACT TCT TTG CCT CTT GCT 2475
S L A P G F I F T T S L P P A
2476 ACC ATG GCT GGT GCC CAA ACC TCT ATT GAG TAC CAG ATG GAG TAC 2520
T M A G A Q T S I E Y Q M E Y
2521 GAT GGC GAC CGA CTC CAG CAG CTG CAC ACT CGT GCT GTC AAG 2565
D G D R R L Q Q L H T R A V K
2566 GAG GCT ATG AAC GCT CGC GAC ATC CCT GTC ATC CCC AAT CCC TCT 2610
E A M N A R D I P V I P N P S
2611 CAC ATC ATT CCT GTA CTA GTT GGC AAC GCC GAG ACC GCC AAG CGC 2655
H I I P V L V G N A E T A K A
2656 GCT TCC GAC ATG CTT CTC AAC GAC TAC GGA ATT TAT GTC CAA TCC 2700
A S D M L N D Y G I Y V Q S
2701 ATC AAC TAC CCC ACC GTT CCA GTT GGT CAG GAG CGT CTT CGC ATC 2745
I N Y P T V P G Q E R L R I

Fig. 1F

【図 2】

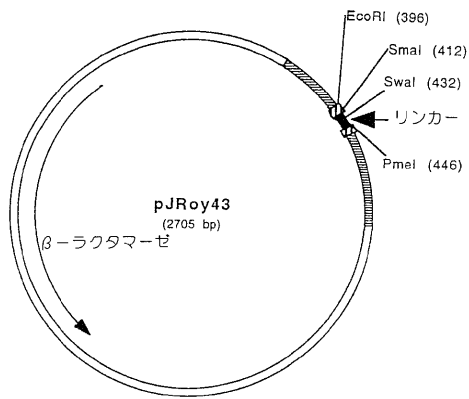


Fig. 2

【図 3】

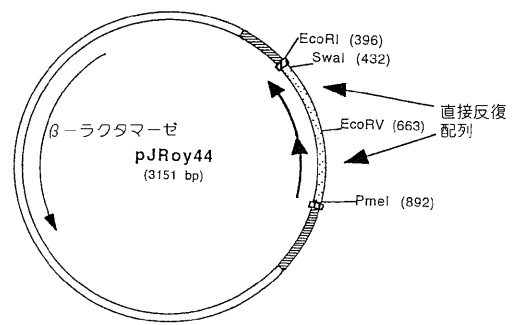


Fig. 3

【図 4】

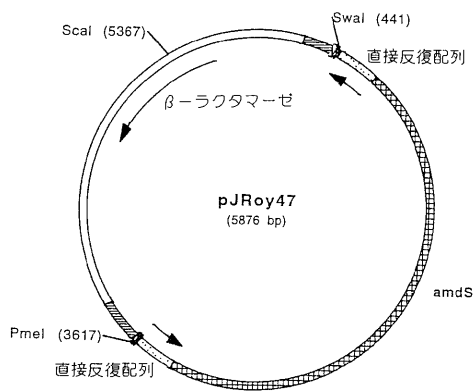


Fig. 4

【図 5】

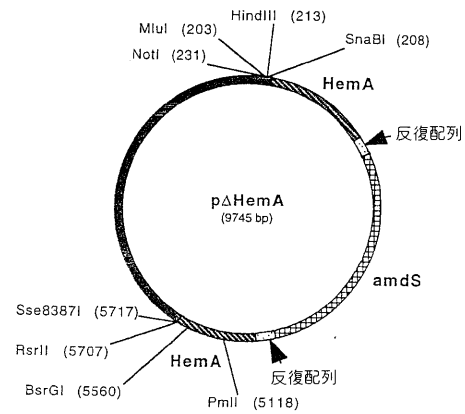


Fig. 5

【図 6】

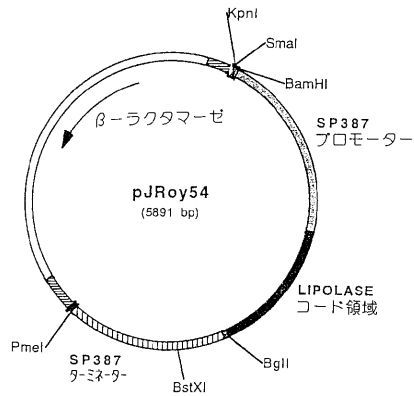


Fig. 6

【図 7】

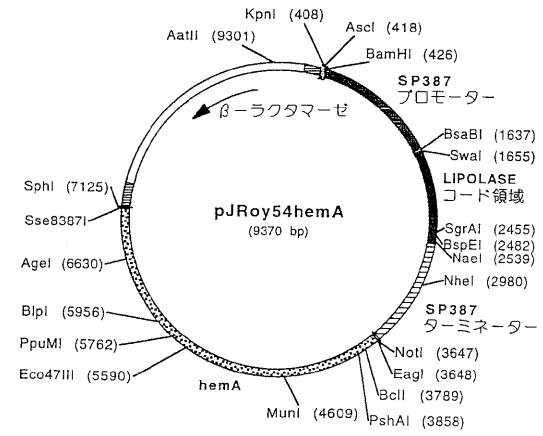


Fig. 7

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 5/00 A
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i> 21/00 C
<i>C 1 2 P</i>	<i>13/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i> 13/00
<i>C 1 2 R</i>	<i>1/77</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 9/10
			<i>C 1 2 R</i> 1:77

(72)発明者 ガンベッタ, グレグ エー.
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 6 1 6, デイビス, ウィッティア ドライブ 2 4 1 5

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特表平07-504572 (JP, A)
BRADSHAW R. E. et al., Isolation and nucleotide sequence of the 5-aminolevulinate synt
hase gene from *Aspergillus nidulans*, Curr. Genet., 1993年, Vol.23, No.5-6, p.501-5
07

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/09
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
PubMed
WPI