

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03809913.6

[51] Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 9/26 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 1 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 100359013C

[22] 申请日 2003.2.28 [21] 申请号 03809913.6
[30] 优先权

[32] 2002. 3. 1 [33] JP [31] 55853/2002

[32] 2002.12. 6 [33] JP [31] 354670/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/002401 2003.2.28

[87] 国际公布 WO2003/080830 日 2003.10.2

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.1

[73] 专利权人 天野酶株式会社

地址 日本爱知县

[72] 发明人 铃木哉子 塚越规弘

[56] 参考文献

EP 0238023 A2 1987.9.23

JP 99968 A 1997.1.14

WO 9800528 A1 1998.1.8

A novel nuclear factor, SREB, binds to a cis-acting element, SRE, required for inducible expression of the *Aspergillus oryzae* Taka-amylose A gene in *A. nidulans*. S. Tani. Mol. Gen. Genet., Vol. 263. 2000

审查员 黄磊

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹雯 王景朝

权利要求书 2 页 说明书 40 页 附图 12 页

[54] 发明名称

经过修饰的启动子

[57] 摘要

提供与启动子的表达调控相关的碱基序列。还提供以该碱基序列为基础进行启动子改变,而得到的具有高表达活性的经过修饰的启动子。即,将含 CCAATNNNNN(第 1 碱基序列)的第 1DNA 片段和含 CGGNNNNNNNNGG(第 2 碱基序列)的第 2DNA 片段插入到在丝状真菌中发挥作用的启动子中而得到的经过修饰的启动子。N 为 A 腺嘌呤(adenine)、G 鸟嘌呤(guanine)、C 胞嘧啶(cytosine)、T 胸腺嘧啶(thymine)。

1. 一种经过修饰的启动子，它是将含 CCAATNNNNNN (第 1 碱基序列：序列号 1) 的第 1 DNA 片段和含 CGGNNNNNNNNNGG (第 2 碱基序列：序列号 2) 的第 2 DNA 片段插入到在丝状真菌中发挥作用的启动子中而得到的，其中将第 1 DNA 片段和第 2 DNA 片段插入到启动子中存在的 CCAAT 序列上游的 5' 端，或启动子中存在的 SRE 区域下游的 3' 端，所述经过修饰的启动子不是米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 野生型 TAKA-淀粉酶启动子。

2. 权利要求 1 中经过修饰的启动子，其中第 1 碱基序列为 CCAATTAGAAG (序列号 3)。

3. 权利要求 1 或 2 中经过修饰的启动子，其中第 2 碱基序列为 CGGHNWWWWNWHGG (序列号 4)。

4. 权利要求 1 或 2 中经过修饰的启动子，其中第 2 碱基序列为 CGGWWWWWWHGG (序列号 5)。

5. 权利要求 1 或 2 中经过修饰的启动子，其中第 2 碱基序列为 CGGAAATTTAAAGG (序列号 6)、CGGAATTTAAACGG (序列号 7) 或 CGGAAATTTAACGG (序列号 8)。

6. 权利要求 1 或 2 中经过修饰的启动子，其中第 1 DNA 片段和第 2 DNA 片段按从启动子 5' 末端到 3' 末端的方向顺次插入。

7. 权利要求 1 或 2 中经过修饰的启动子，其中插入了多个第 1 DNA 片段和多个第 2 DNA 片段。

8. 权利要求 7 中经过修饰的启动子，其中插入的第 1 DNA 片段和第 2 DNA 片段数目相同。

9. 权利要求 8 中经过修饰的启动子，其中第 1 DNA 片段和第 2 DNA 片段的插入方式是：一个第 1 DNA 片段和一个第 2 DNA 片段配对，且各对中第 1 DNA 片段插入到启动子的 5' 末端。

10. 一种经过修饰的启动子，它是将 1-数个具有增强子功能的 DNA 片段整合到在丝状真菌中发挥作用的启动子中而得到的，其 DNA 片段是具有序列号 9 中碱基序列的 DNA 片段，其中将所述 DNA

片段插入到启动子中存在的 CCAAT 序列上游的 5'端,或启动子中存在的 SRE 区域下游的 3'端,所述经过修饰的启动子不是米曲霉野生型 TAKA-淀粉酶启动子。

11. 权利要求 1 或 2 中经过修饰的启动子,其中在丝状真菌中发挥作用的启动子是米曲霉 TAKA 淀粉酶的启动子。

12. 一种具有增强子功能的 DNA 片段,它由含 CCAATNNNNNN (序列号 1) 的第 1 DNA 片段、CGGAATTTAAACGG (序列号 7) 或 CGGAAATTTAAACGG (序列号 8) 的碱基序列构成。

13. 一种经过修饰的启动子,其中在丝状真菌中发挥作用的启动子中存在的 CCAAT 序列上游的 5'端、或所述启动子中存在的 SRE 区域下游的 3'端含有权利要求 12 中的 DNA 片断,所述经过修饰的启动子不是米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 野生型 TAKA-淀粉酶启动子。

14. 一种载体,它整合了权利要求 1-11 和 13 任一项中经过修饰的启动子。

15. 权利要求 14 的载体,其还整合了目的蛋白质的结构基因,该基因受经过修饰的启动子的调控。

16. 一种丝状真菌的转化体,它持有权利要求 15 的载体,能表达上述结构基因。

17. 一种丝状真菌,它持有权利要求 1-11 和 13 任一项中经过修饰的启动子和编码目的蛋白质、受经过修饰的启动子调控的结构基因。

18. 一种蛋白质的生产方法,其特征在于,在能够产生上述蛋白质的条件下培养权利要求 17 中的丝状真菌,回收所产生的蛋白质。

经过修饰的启动子

技术领域

本发明涉及用于蛋白质生产的启动子的改良。详细言之，涉及对在丝状真菌中发挥作用的启动子进行修饰而得到的经过修饰的启动子。还涉及利用该修饰了的启动子的蛋白质生成体系。

技术背景

曲霉属丝状真菌分泌大量的各种酶蛋白质到菌体外已经得到证实。例如，工业上利用的米曲霉，每1升培养液可生产数十g以上的酶蛋白质。以丝状真菌作宿主可大量分泌生产同种和异种蛋白质。另外，丝状真菌中有许多长久以来用于生产酿造品的菌株，从安全性考虑，可以说适于蛋白质生产。因此，近年有利用丝状真菌作为通过基因重组生产有用蛋白质的宿主的例子报道。生产分泌型蛋白质时，其生产量由从目的基因的表达、蛋白质的修饰、到其分泌过程中的各种各样的因素决定。增大蛋白质产量的最有效的手段就是提高蛋白质生产过程的第1阶段中目的基因的转录效率，即增加转录量。从该观点出发，到目前为止已经有多种丝状真菌来源的启动子被分离出来，将它们用于蛋白质的生产体系。例如，米曲霉的淀粉酶基因的启动子（例如参照专利文献1及非专利文献1），黑曲霉的葡萄糖淀粉酶基因的启动子（参照非专利文献2）等已被分离、供于利用。

现状是：有几个象这样的启动子被利用，但与启动子相关的基因表达结构还不大明了。到目前为止，作为转录调控因子，仅有与基因的分解代谢产物阻抑调控有关的因子（参照非专利文献3）、广泛区域转录活化因子HAP复合体的结合因子（参照非专利文献4）、淀粉分解酶基因群的转录活化因子（参照非专利文献5）等被报道。因此，尝试应用丝状真菌高效生产有用的蛋白质，主要地通过经典的育种制备高生产菌，分离出天然存在的、更高表达的启动子。但是，这些尝试需要很多劳力、很大程度上依赖于偶然性，所以获得高表达启动子的可能性低。另一方面，若能改善启动子的表达调节能力，该问题就能很快解决。到目前为止，作为改善启动子表达调节力的尝试，有对米曲霉的 α -葡萄糖糖苷酶基因的启动子进行改善等报道（参照专利文献

2、非专利文献 6)。但是，这些改变过的启动子可看到某种程度上表达调节力的增强，但很难说充分的表达活性就能使得蛋白质生产有效进行，期望开发出使目的蛋白质基因能更高效转录的启动子。

专利文献 1：特开昭 62-272988 号公报

专利文献 2：特开平 9-9968 号公报

非专利文献 1：Biotechnology, 5, 368 (1987)

非专利文献 2：Biotechnology, 6, 1419 (1988)

非专利文献 3：Mol. Microbiol., 7, 847-857 (1993)

非专利文献 4：Mol. Gen. Genet., 237, 251-260 (1993)

非专利文献 5：Mol. Gen. Genet., 262, 668-676 (1999)

非专利文献 6：Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 459-467 (1998)

本发明是在以上背景下完成的，其目的是提供与启动子的表达调控相关的碱基序列。此外，本发明的目的是在该碱基序列的基础上对启动子进行修饰，提供具有高表达活性的经过修饰的启动子。再者，本发明的目的是应用该经过修饰的启动子以丝状真菌作宿主构建蛋白质的高效表达体系（生产体系）。

发明公开

鉴于上述目的，本发明者们进行了以下研究。即，从米曲霉的 Taka 淀粉酶 A 基因着手，已知该基因的启动子活性高，通过修饰该启动子而试图获得获得高转录活性的经过修饰的启动子。结果，发现了一组插入到启动子区域能增强其转录活性的序列。通过应用经该序列修饰过的启动子，可获得构巢曲霉的淀粉酶高生产株。再进行研究，整合了多拷贝具有经过修饰的启动子的淀粉酶基因的菌株，可观察到更有效的蛋白质生产。

由以上研究结果得到这样的发现：新发现的序列对启动子区域的改变极其有效，应用它可构建以丝状真菌为宿主的蛋白质高效表达体系。

另一方面，以淀粉酶的表达体系作模型，研究了用多个这样的序列对启动子进行修饰时的效果。结果表明，当用整合了多个这样序列的经过修饰的启动子时，即便以葡萄糖作碳源时也可很好地产生淀粉酶。即，野生株中通过培养基中的葡萄糖进行表达抑制（代谢分解抑

制)时,若应用插入多个这样序列的经过修饰的启动子可解除这种代谢分解抑制。这提示,这种新发现的序列对封闭或解除与启动子活性抑制相关的机制有效。

另外,本发明者们关注了 SRE 具有的增强子功能,对此进行了各种突变,尝试对它进行改善,结果成功地获得了具有比 SRE 更优秀的增强子功能的序列。

本发明是基于以上研究结果而完成的,提供以下构成。

[1] 一种经过修饰的启动子,它是将含 CCAATNNNNNN (第 1 碱基序列:序列号 1)的第 1DNA 片段和含 CGGNNNNNNNNNGG (第 2 碱基序列:序列号 2)的第 2DNA 片段插入到在丝状真菌中发挥作用的启动子中而得到的。

[2] [1]中经过修饰的启动子,其中第 1 碱基序列为 CCAATTAGAAG (序列号 3)。

[3] [1] 或 [2] 中经过修饰的启动子,其中第 2 碱基序列为 CGGHNWWWWNWHGG (序列号 4)。

[4] [1] 或 [2] 中经过修饰的启动子,其中第 2 碱基序列为 CGGWWWWWWWHGG (序列号 5)。

[5] [1] 或 [2] 中经过修饰的启动子,其中第 2 碱基序列为 CGGAAATTTAAAGG (序列号 6)、CGGAATTTAAACGG (序列号 7)或 CGGAAATTTAAC GG (序列号 8)。

[6] [1] - [5]任一项中经过修饰的启动子,其中第 1DNA 片段和第 2DNA 片段按从启动子 5'末端到 3'末端的方向顺次插入。

[7] [6]中经过修饰的启动子,其中将第 1DNA 片段和第 2DNA 片段插入到启动子中存在的 CCAAT 序列的 5'端上游区域,或启动子中存在的 SRE 区域的 3'端下游区域。

[8] [1] - [7]任一项中经过修饰的启动子,其中插入了多个第 1DNA 片段和多个第 2DNA 片段。

[9] [8]中经过修饰的启动子,其中插入的第 1DNA 片段和第 2DNA 片段数目相同。

[10] [9]中经过修饰的启动子,其中第 1DNA 片段和第 2DNA 片段的插入方式是:一个第 1DNA 片段和一个第 2DNA 片段配对,且各对中第 1DNA 片段插入到启动子的 5'末端。

[11] 一种经过修饰的启动子，它是将 1 至数个具有增强子功能的 DNA 片段整合到在丝状真菌中发挥作用的启动子中而得到的，其 DNA 片段是具有序列号 9 中碱基序列的 DNA 片段，或是对该 DNA 片段进行了部分修饰的 DNA 片段。

[12] [1]-[11] 任一项中经过修饰的启动子，其中在丝状真菌中发挥作用的启动子是米曲霉淀粉酶的启动子。

[13] 一种具有增强子功能的 DNA 片段，它由 CGGAATTTAAACGG (序列号 7) 或 CGGAAATTTAAC GG (序列号 8) 的碱基序列构成。

[14] 一种经过修饰的启动子，它在丝状真菌中发挥作用，且含有 [13] 中的 DNA 片段。

[15] 一种载体，它整合了 [1]-[12]、[14] 任一项中经过修饰的启动子。

[16] 一种载体，它整合了 [1]-[12]、[14] 任一项中经过修饰的启动子，还整合了目的蛋白质的结构基因，该基因受经过修饰的启动子的调控。

[17] 一种丝状真菌的转化体，它持有 [16] 的载体，能表达上述结构基因。

[18] 一种丝状真菌，它持有 [1]-[12]、[14] 任一项中经过修饰的启动子和编码目的蛋白质、受经过修饰的启动子调控的结构基因。

[19] 一种蛋白质的生产方法，其特征在于，在可能产生上述蛋白质的条件下培养 [18] 中的丝状真菌，回收所产生的蛋白质。

附图简述

图 1 表示 Kata 淀粉酶 A 基因 (米曲霉) 启动子区域的序列。

图 2 表示 Kata 淀粉酶 A 基因 (米曲霉) 启动子区域的模式图，图中示出转录调控因子结合序列 (CCAAT 序列，SRE) 的位置和导入突变的部位。用下划线表示经位点特异性突变而导入的限制性酶切位点。CCAAT 表示 CCAAT 序列 (广域转录活化因子 (HAP 复合体) 的结合因子)，SRE 表示淀粉分解酶基因群的转录活化因子 (AmyR) 的结合因子，TATA 表示 TATA 盒，+1 表示转录起始点。

图 3 表示实施例 4 中启动子活性评价所用质粒的制备过程。

图 4 表示实施例 6 中淀粉酶活性测定结果的总结表。表的左边表示各个经过修饰的启动子中 CCAAT 序列或 SRE 的插入位置的模式图。

用点线围起的部分是插入片段。Taap 代表野生型启动子, PCCAATb 代表插入了 CCAAT 序列的经过修饰的启动子, PSREb 代表插入了 SRE 的经过修饰的启动子, PCSP 代表插入了 CCAAT-SRE 片段的经过修饰的启动子。

图 5 表示实施例 7 和 8 中淀粉酶活性测定结果的总结表。上半部分表示各个经过修饰的启动子中 CCAAT-SRE 片段的插入位置的模式图。用点线围起的部分是插入片段。Taap 代表野生型启动子, PCSb 及 PCSP 表示插入了一个 CCAAT-SRE 片段的经过修饰的启动子, PCSPb 表示插入了三个 CCAAT-SRE 片段的经过修饰的启动子。

图 6 表示实施例 10 中淀粉酶活性测定结果的总结表。表的左边表示各个经过修饰的启动子中 CCAAT-mSRE 的插入位置的模式图。用点线围起的部分是插入片段。Taap 代表野生型启动子。此外, PcmSa、PcmSN、PcmSb、PcmSS 分别表示将一个 CCAAT-SRE 片段插入到不同位置的经过修饰的启动子。

图 7 表示用 SPY 培养基将实施例 11 中获得的各转化体培养 5 天时, 淀粉酶产量的总结表。ABPU1 表示所使用的宿主, taa2 表示具有野生型启动子的菌株。淀粉酶产量用 TaKa 淀粉酶的比活性为 100U/mg 时的换算值表示。

图 8 是实施例 12 中淀粉酶产量测定结果的总结表, 它表示用各种各样的碳源培养具有经过修饰的启动子的菌株 5 天时的淀粉酶产量。淀粉酶产量用 TaKa 淀粉酶的比活性为 100U/mg 时的换算值表示。

图 9 表示实施例 13 中淀粉酶活性测定结果的总结表。表的左边表示各个经过修饰的启动子中 CCAAT-mSRE 片段或 sCCAAT-mSRE 片段的插入位置的模式图。用点线围起的部分是插入片段。taap 代表野生型启动子, PcmSb 表示插入了 CCAAT-mSRE 片段的经过修饰的启动子, PsCmSb 表示插入了 sCCAAT-mSRE 片段的经过修饰的启动子。

图 10 表示实施例 14 中淀粉酶活性测定结果的总结表。表的左边表示各个经过修饰的启动子中 SRE 部分的序列。taaP 代表野生型启动子。taaS 中, 从 5'末端开始的第 12 位的碱基被置换。同样, MSRE2 中从 5'末端开始的第 12-14 位的碱基被置换。

图 11 表示实施例 15 及 16 中淀粉酶活性测定结果的总结表。非重组株表示未进行转化的菌株, PCSPb 表示具有插入了两个 CCAAT-SRE

片段的启动子的菌株。

图 12 表示实施例 17 及 18 中漆酶活性测定结果的总结表。非重组株表示未进行转化的菌株，PCSPb 表示具有插入了两个 CCAAT - SRE 片段的启动子的菌株，PCSPb 表示具有插入了三个 CCAAT - SRE 片段的启动子的菌株。

实施发明的最佳状态

以下对本发明进行详细说明。需要指出的是，本发明中能提高启动子活性的功能叫做“增强子功能”。

首先，本发明者们注意到曲霉属中广泛保守的启动子区域的 CCAAT 序列（序列号 3）和 SRE（序列号 6），观察了它们外源性插入到启动子区域时对启动子活性的影响。首先，构建了含米曲霉 JCM02239 株 TaKa 淀粉酶 A 基因的启动子区域的质粒。另一方面，分别获得了含 CCAAT 序列的 DNA 片段和包含 SRE 序列的 DNA 片段。然后，将各 DNA 片段分别单独插入到上述质粒的启动子区域，构建了经过修饰的启动子。接下来制备包含各经过修饰的启动子和 TaKa 淀粉酶 A 基因的编码区域的质粒。用所得各质粒分别转化构巢曲霉，比较各转化体的淀粉酶活性。结果，具有插入了 CCAAT 序列或 SRE 序列的经过修饰的启动子的转化体的淀粉酶活性比具有未经修饰的启动子的转化体的活性低，或几乎无差异。另外，对插入多个 CCAAT 序列或多个 SRE 进行启动子修饰时也进行了研究，同样未观察到启动子活性的上升。从以上结果可以预测，即便将 CCAAT 序列或 SRE 单独插入到启动子区域中进行修饰，不能增强启动子活性。

因此，接下来对联合应用 CCAAT 序列和 SRE 序列对启动子进行修饰时启动子活性的变化进行了研究。首先，以米曲霉 JCM02269 株的 TaKa 淀粉酶 A 基因的启动子区域为模板制备包含 CCAAT 序列和 SRE 序列的 DNA 片段（CCAAT - SRE 片段：序列号 9）。用该 DNA 片段，用与上面同样的方法制备 TaKa 淀粉酶 A 基因的经修饰的启动子。然后，构建包含该经过修饰的启动子和 TaKa 淀粉酶 A 基因的编码区域的质粒。用该质粒获得构巢曲霉的转化株。测定该转化株的淀粉酶活性时，与具有未经修饰的启动子的转化株（野生菌株）相比，可见到显著的启动子活性的上升。由此可以判断，通过将 CCAAT 序列和 SRE 一并插入到启动子区域，可制备具有高活性的经过修饰的启动子。

这里,通常,即便置换了 DNA 序列的一部分碱基,有时仍能维持该 DNA 序列具有的功能。已知 CCAAT 序列是广域转录活化因子 (HAP) 的结合因子,有报道说 5'末端的序列 CCAAT 对这种结合很重要。由此,预想即便置换 5'末端 CCAAT 以外的序列也能维持 CCAAT 序列所具有的增强子功能。

另一方面,本发明者们研究了置换部分碱基时是否能维持 SRE 的增强子功能。首先,用为部分置换 SRE 而设计的引物进行 PCR,获得包含 TaKa 淀粉酶 A 基因启动子区域的 CCAAT 序列及部分碱基被置换了的 SRE (CGGAATTTAAACGG, 序列号 7) 的 DNA 片段。然后,用与上面同样的方法插入该 DNA 片段,制备成经过修饰的启动子,接着获得构巢曲霉的转化株,该菌株整合了具有经过修饰的启动子的 TaKa 淀粉酶 A 基因。测定该转化株中的淀粉酶活性,结果可以看到与用上述 CCAAT - SRE 片段进行修饰时几乎同样的淀粉酶活性的上升。该结果提示,即便对 SRE 的部分碱基进行置换,某些情况下仍能维持其增强子功能。特别是,即便 5'末端的第 6 位、第 9 位和第 12 位碱基置换成其它碱基时, SRE 的增强子功能几乎不受影响。

得到以上结果后,为了确定对 SRE 发挥增强子功能很重要的部分 (序列),对野生型启动子中存在的 SRE 进行了突变,制备出经过修饰的启动子,并检测其启动子活性。结果,观察到这样的现象:当 SRE 5'末端的第 12 位碱基置换成 C 时, SRE 具有的增强子功能不仅能维持,而且被增强。从该结果可以判断,即便 5'末端的第 12 位碱基被置换也能维持 SRE 的增强子功能,以及 SRE 5'末端的第 12 位碱基为 C 的序列 (CGGAAATTTAAACGG, 序列号 8) 具有比 SRE 更好的增强子功能。

另一方面,将 5'末端的第 13 位、第 14 位碱基置换成其它碱基时,其活性比野生型启动子的活性低。考虑到该结果以及已知的该部分序列在曲霉属中广泛保守这一事实,我们认为希望这些碱基不要置换成其它碱基。另外,已知 SRE 5'末端的 CGG 在曲霉属中也广泛保守,所以认为希望这些碱基不要置换成其它碱基。

另一方面,曲霉属的野生株中,已知 SRE 的序列为 CGGTCTTTTGTCTGG (构巢曲霉的 α - 葡萄糖苷酶) 及 CGGCGAATTCACGG (米曲霉的葡糖淀粉酶),没有这些野生株中启动子活性低下的报道。将这些序列与米曲霉 TaKa 淀粉酶基因的启动子中存在的 SRE 进行比较的

话, 5'末端的第 4、5、7、10、11 位的碱基不相同, 由此认为这些碱基对 SRE 具有的增强子功能的参与程度低。也就是说, 即便将这些碱基置换成其它碱基, 维持 SRE 具有的增强子功能的可能性也高。具体而言, 5'末端的第 4 位碱基为 T 或 C、第 5 位碱基为 C 或 G、第 7 位碱基为 A、第 10 位碱基为 G 或 C、第 11 位碱基为 T 时具有增强子功能。但是, 考虑到单个碱基的结构引起的结合性等, 期望 5'末端第 6-9 位碱基及第 11 位的碱基, 更优选 5'末端第 4 位-11 位的碱基为 A 或 T。

基于以上发现和考察, 用于修饰本发明启动子区域的第 1DNA 片段的碱基序列优选为 CCAATTAGAAG (序列号 3)。其它方面, 第 2DNA 片段的碱基序列优选为 CGGHNWWWNWHGG (序列号 4), 更优选 CGGWWWWWWWHGG (序列号 5), 更优选 CGGAAATTTAAAGG (序列号 6)、CGGAATTTAAACGG (序列号 7) 或 CGGAAATTTAAACGG (序列号 8)。这里, 碱基序列中 N 代表 A 腺嘌呤 (adenine)、G 鸟嘌呤 (guanine)、C 胞嘧啶 (cytosine) 或 T 胸腺嘧啶 (thymine), W 代表 A 腺嘌呤 (adenine) 或 T 胸腺嘧啶 (thymine), H 代表 A 腺嘌呤 (adenine)、C 胞嘧啶 (cytosine) 或 T 胸腺嘧啶 (thymine)。

另外, 如上所述, SRE5'末端第 12 位碱基置换成 C 时所得序列, 其自身即具有比 SRE 更好的增强子功能, 所以可以说可仅用该序列进行启动子的修饰。也就是说, 该序列 (CGGAAATTTAAACGG: 序列号 8) 对启动子的修饰有用, 单独利用该序列可构建高活性的启动子。另外, 当上述序列 CGGAATTTAAACGG (序列号 7) 与 CCAAT 序列同时应用时的结果, 可看到与野生型 SRE 同等的增强子功能, 由此预想该序列也可单独用于启动子活性的增强。这里所讲“用于”包括部分置换野生型启动子 (包括已经实施了其它修饰的) 中原来存在的 SRE 而构建的上述序列, 及将上述 DNA 片段插入到野生型启动子 (包括已经实施了其它修饰的) 中。另外, 这里所讲“单独”是指不与上述第 1DNA 片段同时应用。

另一方面, 本发明者们研究了插入 CCAAT-SRE 片段对启动子区域进行修饰与代谢分解抑制间的关系。首先, 制备插入了 1 拷贝 CCAAT-SRE 片段的经过修饰的启动子、插入了 2 拷贝和 3 拷贝 CCAAT-SRE 片段的经过修饰的启动子。然后分别获得插入了代谢分解抑制基因的转化体, 该基因中包含未实施修饰的启动子或经过修饰的启动子中的

任一种，用含以葡萄糖作碳源的培养基进行培养，比较菌体的淀粉酶活性。结果观察到，具有未实施修饰的启动子的菌体，其代谢分解受到抑制淀粉酶活性低下；但具有插入了 CCAAT-SRE 片段的经过修饰的启动子的菌体，其代谢分解受到抑制的程度降低，其淀粉酶活性是具有未实施修饰的启动子的菌体的 37 倍以上。基于以上发现，从获得解除代谢分解抑制效果出发，优选插入多个 CCAAT 片段和 SRE 片段对启动子实施修饰。

本发明的第 1DNA 片段和第 2DNA 片段，可以例如用商业化的 DNA 合成仪合成。另外，例如，可以通过以米曲霉的 TaKa 淀粉酶 A 基因的启动子区域为模板，应用适当的引物进行 PCR 而制备。

另外，也可制备一个包含第 1DNA 片段和第 2DNA 片段的 DNA 片段，将它整合到在丝状真菌中发挥作用的启动子中，由此制备本发明的经过修饰的启动子。例如，从曲霉属等的启动子中选择包括与第 1DNA 片段和第 2DNA 片段相对应序列的启动子，以它为模板，通过 PCR 等方法制备这样的 DNA 片段。可用作模板的适宜的启动子的例子包括米曲霉的 TaKa 淀粉酶 A 基因的启动子（序列号 12）。序列号 9 中显示了本发明中用于启动子修饰的 DNA 片段的碱基序列的一个例。该 DNA 片段（CCAAT-SRE 片段）是米曲霉的 TaKa 淀粉酶 A 基因中启动子区域的一部分（240-367 位（以转录起始点为 +1 对相当于 -312 ~ -185 位））。需要指出的是，即便是该 DNA 片段中实施了部分修饰的 DNA 片段，只要具有增强整合了该片段的启动子活性的功能（增强子功能），即可用于启动子区域的修饰。这里，部分改变是指构成 DNA 片段的部分碱基被置换、缺失，或添加或插入了 1-数个碱基。这样修饰的所允许的程度因被修饰的 DNA 片段上的部位而异。如上所述，由于对增强子功能重要的部分是与第 1DNA 片段及第 2DNA 片段相对应的序列部分，所以优选该序列部分的修饰程度要小。其它方面，由于预测其它部分与增强子功能不直接相关，所以认为可进行比较大的修饰。例如，可进行 1~20 个，优选 1~10 个，更优选 1~5 个碱基的置换、缺失、附加等。需要指出的是，这些修饰中包括向 5'末端、3'末端或其它部位导入限制性酶识别的序列和添加编码信号肽的序列等。

本发明中，向在丝状真菌中发挥功能的启动子中插入第 1DNA 片段和第 2DNA 片段（以下，将这些 DNA 片段及包含它们的 DNA 片段一并称

作“具有增强子功能的 DNA 片段”），构建经过修饰的启动子，对这些 DNA 片段的插入部位无特殊限制。但是，采用具有 CCAAT 序列和 SRE 的启动子作为被实施修饰的启动子时，优选插入到这两个序列间以外的部位。也就是说，优选将具有增强子功能的 DNA 片段插入到 CCAAT 序列 5'末端侧的部位或 SRE 3'末端侧的部位。

可通过向在丝状真菌中发挥功能的启动子中插入多个第 1DNA 片段和多个第 2DNA 片段构建本发明的经过修饰的启动子。该情况下，优选所使用的第 1DNA 片段和第 2DNA 片段的个数相同。另外，优选一个第 1DNA 片段和一个第 2DNA 片段配对，且各对中第 1DNA 片段插入到启动子的 5'末端。

应用包含第 1DNA 片段和第 2DNA 片段的 DNA 片段时，也可插入多个，从而进行启动子修饰。该情况下，采用具有 CCAAT 序列和 SRE 的启动子作为被实施修饰的启动子时，优选将该 DNA 片段插入到这两个序列间以外的部位。

通过整合多个具有增强子功能的 DNA 片段对启动子进行修饰，可期待启动子活性进一步提高。此时整合的 DNA 片段的数目优选 2 个而非 1 个，更优选 3 个而非 2 个。另外，如后面的实施例所述，通过插入 DNA 片段（显示产生淀粉酶时对解除代谢分解抑制有效），可能封闭乃至解除发挥启动子活性抑制作用的机制。

作为本发明中在丝状真菌中发挥作用的启动子，对其种类无特殊限制，只要具有在丝状真菌中发挥作用的性质即可。例如，可包括曲霉属、青霉素属、木霉属等微生物中编码蛋白质的基因的启动子。具体而言，可应用曲霉属的编码 α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶等的基因的启动子。其中，优选应用米曲霉的 TaKa 淀粉酶的启动子。可用限制性酶处理、PCR 法等遗传工程技术从含有这些启动子的微生物中获得。另外，当利用整合了目的启动子的载体时，可通过限制性酶处理、PCR 等方法从该载体中获得。需要指出的是，本发明中丝状真菌意味着广义的丝状真菌，包括酵母在内。

本发明提供整合了上述经过修饰的启动子的载体。这些载体可用于目的蛋白质的生产。例如，在经过修饰的启动子的控制下导入目的蛋白质的结构基因，构建成表达用载体。用它转化适当的宿主，在可生产该蛋白质的条件下培养适当导入了经过修饰的启动子和目的蛋白

质的结构基因的转化体。其后，从培养液或菌体内回收目的蛋白质。需要指出的是，本发明中所讲整合了经过修饰的启动子的载体中包括整合了在经过修饰的启动子的调控下的特定蛋白质的结构基因的载体。

本发明中的载体，优选具有选择标记，在转化宿主丝状真菌时该标记适于筛选转化体。根据与所使用的宿主的关系，可适当采用选择标记，例如鸟氨酸氨甲酰基转移酶基因（argB）、硝酸还原酶基因（niaD）、乙酰胺酶基因（amdS）、色氨酸合成酶基因（trpC）、二氢叶酸还原酶基因（DHFR）等营养要求性互补基因，寡霉素越霉素、潮霉素等的耐药性基因等。

作为用于蛋白质生产的宿主可应用分类为曲霉属（米曲霉、黑曲霉、构巢曲霉）、青霉素属、木霉属、根霉属等的丝状真菌。优选应用曲霉属的丝状真菌。从安全性考虑，其中优选米曲霉和黑曲霉。

另外，为了检测导入了经过修饰的启动子的丝状真菌不仅产生原本产生的蛋白质（同种蛋白质），而且可产生导入了本发明的经修饰的启动子的丝状菌。本来不产生的蛋白质，即通过外源性导入编码该蛋白的基因后开始产生的蛋白质（异种蛋白质）均高效表达，本发明者们用米曲霉的淀粉酶基因转化宿主米曲霉，得到转化体，再用系统分类学上离米曲霉较远的丝状真菌的漆酶基因进行转化，验证了蛋白质水平的表达。

利用本发明的经过修饰的启动子可生产的蛋白质无特殊限制，例如，包括 α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶、纤维素酶、果胶酶等糖相关的酶，漆酶、过氧化物酶等氧化还原酶，凝乳酶等蛋白酶，脂酶等。另外可以是同种蛋白质，也可是异种蛋白质。

本发明的载体向宿主的导入可用众所周知的方法进行。例如，通过应用原生质体化菌体的Turner等方法(Gene, 36, 321-331(1985))进行。此外，可采用五味等的方法(Agric. Biol. Chem., 51, 323-328(1987))等。

通过在结构基因可能表达的条件下培养适当导入了本发明的经过修饰的启动子和目的蛋白质结构基因的转化体，可产生出目的蛋白质。培养过程中应用的培养基可根据使用的宿主进行适当的选择。例如，可应用商品化的各种培养基，或者向其中添加了精氨酸、尿嘧啶

核苷等促进转化体繁殖、选择、蛋白质表达等必要成分的培养基等。

按期望的时间进行培养后，可从培养液或菌体中回收目的蛋白质。即，若是分泌型蛋白质则从培养液中回收，除此之外则从菌体回收。从培养液中回收时，例如过滤培养上清，离心除去不溶物后，可通过硫酸铵沉淀等盐析、联合各种色谱进行分离、纯化等获得目的蛋白质。另一方面，从菌体回收时，例如，通过对菌体进行加压处理、超声波处理等使其破碎后，可与上面同样进行分离、纯化，从而获得目的蛋白质。需要指出的是，通过过滤、离心等预先从培养液回收菌体后，也可进行上述一系列过程（菌体的破碎、分离、纯化）。

以下，通过实施例对本发明进行具体说明，但本发明并不限于这些实施例。本实施例中，除特殊说明之外，限制性酶及其它基因操作过程中应用的酶应用宝酒造或东洋纺织的产品。酶的反应条件等按附加的说明书进行。

另外，本实施例中使用的合成寡 DNA，使用宝酒造或 Invitrogen 合成的，碱基序列的测定用 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) 进行，PCR 反应应用 Thermal Cycler (PerkinElmer Japan) 进行。

[实施例 1] 启动子区域的亚克隆

以含米曲霉 JCM02239 株的 TaKa 淀粉酶 A 基因 (taaG2) 3164bp [Gene, 84, 319-327 (1989)] 的 pTG-taa [Mol. Gene. Genet., 254, 119-126 (1997)] 为出发材料，制备 TaKa 淀粉酶 A 基因启动子区域和 TaKa 淀粉酶 A 基因的编码区域。

首先，从 pTG-taa 获得包含 TaKa 淀粉酶 A (taaG2) 启动子区域的 750bp 的 EcoRI - SalI 片段，将该片段插入到质粒 pKF18K (东洋纺织株式会社) 的多克隆位点的 EcoRI - SalI 部位，获得含 TaKa 淀粉酶启动子的质粒 pKF-taaP。用该质粒进行向启动子区域导入突变的操作，及修饰启动子区域的构建。

[实施例 2] 含转录调控因子结合序列的 DNA 片段的获得

如下获得含已经报道的广域转录活化因子 (HAP) 的结合因子 CCAAT 序列 [Mol. Gene. Genet., 237, 251-260 (1993)] 和淀粉分解酶基因群的转录活化因子 (AmyR) 的结合因子 SRE [Mol. Gene. Genet., 262, 668-676 (1999)] 的片段。

首先,合成 XNF (5'-CCGCTCGAGGCACCATCCAATTAGAAGCGCGGCCGCTAAACTAT-3', 序列号 13) 和 XWF 的互补链 XNR (5'-ATAGTTTAGCGGCCGCGCTTCTAATTGGATGGTGCCTCGAGCGG-3', 序列号 14), XNF 是 CCAAT 序列的 5'末端添加了 XhoI 位点、3'末端添加了 NotI 位点的 DNA。然后混合这些合成的 DNA 的互补链, 98℃加热 10 分钟后, 经 2 小时冷却到 30℃, 其后冷却到 4℃退火, 获得单含 CCAAT 序列的 DNA 片段。

另一方面, 合成 SRef (5'-GACTAGTTAACCTAGGGGCGGAAATTTAACGGGATGTTAACTAGTC-3', 序列号 15) 和其互补链 SREr (5'-GACTAGTTAACATCCCGTTAAATTTGCCCCCTAGGTAACTAGTC-3', 序列号 16), SRef 为 SRE 的 5'末端和 3'末端添加了 SpeI 位点和 HincII 位点的合成 DNA, 用与上面同样的方法获得单含 SRE 的 DNA 片段。以后将这里制备的仅含 CCAAT 序列的 DNA 片段叫做“CCAAT 片段”, 仅含 SRE 的 DNA 片段叫做“SRE 片段”。

接下来, 应用以下引物和在实施例 1 中制备的 pKF-*taaP* 作模板, 以 94℃30 秒、54℃30 秒、72℃1 分 30 秒为 1 个循环, 通过 30 个循环的 PCR 获得含从 CCAAT 序列到 SRE 区域的 DNA 片段。需要指出的是, 制备出含 PstI 位点的片段(序列号 10, 以下叫做“CCAAT-SRE(PstI) 片段”)和含 XhoI-NotI 位点的片段(序列号 11, 以下叫做“CCAAT-SRE(XhoI-NotI) 片段”)2 种。

添加 PstI 位点的上游引物:

CSPf: 5'-AAACTGCAGACCACCTCTAGGCATCGGACG-3'(序列号 17)

添加 PstI 位点的下游引物:

CSPr: 5'-TTTCTGCAGTGTTGA TTTGTGGTTGAGTGG-3'(序列号 18)

添加 XhoI 位点的上游引物:

CSXf: 5'-CGGCTCGAGGCATCGGACGCACCATCC-3'(序列号 19)

添加 NotI 位点的下游引物:

CSNr: 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCGCGACTGTGATTTGTGGTTGAGTGG-3'(序列号 20)

[实施例 3] 含经过修饰的启动子的质粒的构建

给 TaKa 淀粉酶 A 基因的启动子区域导入突变如下进行。首先, 为了给实施例 1 中制备的 pKF-*taaP* 导入修饰启动子区域用的限制性酶位点, 用以下所示的引物和 Mutan-Super Express Km Kit (TAKARA)

对 pKF-taaP 进行位点特异性突变的导入。需要指出的是,野生型启动子的序列(序列号 12)示于图 1,导入的限制性酶位点的位置示于图 2。

向下游区域(序列号 12 中所示 TaKa 淀粉酶启动子的存在位置 465)导入 NotI 位点时用的引物:

Not - b: 5' - CGCTTGGATTCCCCGCCCGCGCCGCAGAGCTTAAAGTATGTCCC - 3' (序列号 21)

向下游区域(序列号 12 中所示 TaKa 淀粉酶启动子的存在位置 440)导入 XhoI 位点时用的引物:

Xho - b: 5' - GAATGCATTTAAACTCTTCCTCGAGTCGCTTGGATTCCCCGCC - 3' (序列号 22)

向上游区域(序列号 12 中所示 TaKa 淀粉酶启动子的存在位置 153)导入 NotI 位点时用的引物:

Not - a: 5' - GTAGTAAAACCCCGGAGTCAGCGCCGCCAAGCCCAAGTCCTTCACG - 3' (序列号 23)

向上游区域(序列号 12 中所示 TaKa 淀粉酶启动子的存在位置 128)导入 XhoI 位点时用的引物:

Xho - a: 5' - CGTCAAGGGATGCAAGACTCGAGTAGTAAAACCCCGGAGTC - 3' (序列号 24)

向 CCAAT 序列与 SRE 间的区域(序列号 12 中所示 TaKa 淀粉酶启动子的存在位置 252)导入 NotI 位点时用的引物:

Not: 5' - GCACCATCCAATTAGAAGCGCCCGCGAAACAGCCCAAGAAAAAGG - 3' (序列号 25)

向下游区域(序列号 12 中所示 TaKa 淀粉酶启动子的存在位置 490)导入 SpeI 位点时所用引物:

STATA: 5' - TAAAGTATGTCACTAGTCGATGCGAT - 3' (序列号 26)

接下来用 XhoI 和 NotI 酶切实施例 2 中制备的 CCAAT 片段,通过琼脂糖凝胶电泳进行回收、纯化。将所得 DNA 片段插入到如上导入到启动子下游区域的 XhoI - NotI 位点,制备出含经过修饰的启动子 PCCAATb 的质粒 pKF-CCAATb。同样,用 HincII 酶切实施例 2 中制备的 SRE 片段,将所得 DNA 片段插入到启动子下游区域的 XhoI - NotI 位点,制备出含经过修饰的启动子 PSREb 的质粒 pKF-SREb;用 PstI 酶切实施例 2 中制备的 CCAAT - SRE (PstI) 片段,将所得 DNA 片段插入

到启动子下游区域的 PstI 位点, 制备出含经过修饰的启动子 PCSP 的质粒 pKF-PCSP; 用 XhoI、NotI 酶切实施例 2 中制备的 CCAAT-SRE (XhoI-NotI) 片段, 将所得 DNA 片段插入到启动子下游区域的 XhoI-NotI 位点, 制备出含经过修饰的启动子 PCSb 的质粒 pKF-PCsb。另外, 用 XhoI、NotI 酶切 CCAAT-SRE (XhoI-NotI) 片段, 将回收、纯化的片段插入到启动子下游区域的 XhoI-NotI 位点, 其后通过将 CCAAT-SRE (PstI) 片段插入到 PstI 位点, 制备含经过修饰的启动子 PCSPb 的质粒 pKF-PCSPb, 其中 PCSPb 中插入了 2 个 CCAAT-SRE 片段。

[实施例 4] 构建启动子活性评价时用的质粒

启动子活性评价用质粒的制作过程示于图 3。首先, 用 SalI 消化质粒 pUC18 (东洋纺织株式会社) 后, 通过 Klenow 处理使其末端平滑化, 通过自身连接获得 SalI 位点缺失的质粒 pUC18 (S-)。另一方面, 从质粒 pTG-taa 分离出 TaKa 淀粉酶 A 基因的 EcoRI 片段, 将该片段插入到 pUC18 (S-) 的多克隆位点的 EcoRI 位点, 获得 pUC-taa (S-)。用 EcoRI 部分分解该质粒 pUC-taa (S-), 获得 taaG 2 基因的 3' 末端 EcoRI 位点缺失的质粒 pUC-taa。同样, 获得从 pBluescriptII KS(+) 获得缺失了 XhoI、SalI、BamHI 的质粒 pBlue (XSE-)。

接下来, 从 pUC-taa 分离出含 taaG 2 的 EcoRI-HindIII 片段, 将该片段插入到质粒 pBlue (XSE-) 的多克隆位点的 EcoRI-HindIII 位点, 获得含 taaG 2 的质粒 pBlue-taa。

然后, 从实施例 3 中得到的含经过修饰的启动子的质粒 pKF-taaPM 系列 (pKF-CCAATb、pKF-SREb、pKF-PCSP、或 pKF-PCSPb) 中分离出经过修饰的启动子区域的 EcoRI-SalI 片段, 插入到质粒 pBlue-taa 的多克隆位点的 EcoRI-SalI 中, 获得经过修饰的启动子与 taaG 2 基因连接的质粒 pBlue-taaM。从 pBlue-taaM 分离出含经过修饰的启动子的 taaG 2 基因的 XbaI-BamHI 片段, 整合到质粒 pBAR7 (pBluescriptII KS(+)) 中插入了构巢曲霉来源的 C 末端缺失的 argB 基因的质粒的多克隆位点 XbaI-BamHI 中, 作为启动子活性测定用的质粒 pBAR-taaM 系列 (pBAR-CCAATb、pBAR-SREb、pBAR-PCSP、pBAR-PCsb 及 pBAR-PCSPb)。

[实施例 5] 具有经过修饰的启动子的转化体的获得

1. 转化

如下进行丝状真菌的转化。首先，用 EcoRV 消化实施例 4 中得到的 pBAR-*taaM* 系列 (pBAR-CCAATb、pBAR-SREb、pBAR-PCSP、pBAR-PCsb 及 pBAR-PCSPb) 的质粒后，进行酚/氯仿抽提及乙醇沉淀，用纯化的质粒进行转化。

其次，用这些质粒进行构巢曲霉的转化。用向完全培养基 (2% 麦芽提取物，2% 葡萄糖和 0.1% Bacto-蛋白胨) 中添加了必要营养源 (精氨酸、尿苷、维生素 B6 和生物素) 的培养基，37℃、振荡培养一晚构巢曲霉的鸟氨酸氨甲酰基转移酶基因缺失株 ABPU1 株 (*bia1*, *pyrG89*, *wa3*, *argB2*, *pyroA4*) 后，将所得菌体悬浮到细胞壁溶解液 [20mg/ml Yatalase (宝酒造)，0.8M NaCl，10mM 磷酸缓冲液 (pH 6.0)] 中，30℃ 缓慢振荡 1~2 小时使其原生质体化。用尼龙膜过滤，除去残存的菌体。然后用该原生质体，根据 Turner 等的方法 [Gene, 36, 321-331 (1985)] 进行活性细胞的制备和转化，用不含精氨酸的培养基 (Czapek-Dox 琼脂培养基 (0.2% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 2% 葡萄糖 (pH 5.5)) 中添加了尿苷、维生素 B6 和生物素的培养基) 获得可生长发育的转化体，每种质粒 20-40 株。

2. 通过 Southern Blotting 选择转化体

从各转化株中如下制备染色体 DNA。首先，用向完全培养基中添加了必要营养源 (尿苷、维生素 B6 和生物素) 的培养基，37℃、振荡培养一晚转化株后，用 Buchner 漏斗和 No.2 滤纸 (Advantech) 过滤收集得到的菌体，用无菌水洗涤。去除多余的水分后，-80℃ 冻存，用 FREEZONE (LABCONCO) 进行冷冻干燥。干燥后，加入 1mm 的玻璃珠，用 Multi-Beads Shaker (安井器械社) 2000rpm 破碎 5 分钟，使其成微粉末状，向该菌体破碎物中加入提取溶液 [1% 十六烷基甲基溴化铵，0.7M NaCl，50mM Tris-HCl，10mM EDTA，1% β-巯基乙醇]，搅拌后，室温放置 30 分钟。用酚/氯仿抽提所得溶菌液，除去杂蛋白后，加入等量的异丙醇，沉淀 DNA。将该沉淀物溶解到含 0.1mg/ml RNase 的 TE 溶液中，37℃、反应 30 分钟后，再加入含 0.2 mg/ml 蛋白酶 K 的 TE 溶液，37℃、反应 30 分钟。用酚/氯仿抽提该溶液后，用 2.5 倍体积的冷乙醇沉淀。用 70% 乙醇洗涤沉淀物，干燥后溶解到 TE 溶液中，作为染色体 DNA 溶液。

Southern Blotting 检测：用 PvuII 或 EcoRV 消化染色体 DNA 后，

用琼脂糖凝胶电泳分离，印迹到尼龙膜（Roche）上后，以 taaG2 的大约 1000bp 的 BglIII-SmaI 消化物作探针进行检测。此时，用 DIG 核酸检测试剂盒（Roche）进行探针的标记和信号检测。

根据 Southern 分析的结果任意地选择 2 株以上适于启动子活性测定的转化体，即选择在 argB 座位同源整合了 1 拷贝质粒的转化株，测定启动子活性时不受整合到染色体时的位置影响，也不受导入的基因的拷贝数影响的转化体。

[实施例 6] 转化体的淀粉酶活性测定及经过修饰的启动子的活性评价

用实施例 5 中得到的整合了 pBAR-CCAATb 或 pBAR-SREb 的各转化体，评价单独插入 CCAAT 序列或 SRE 进行修饰时启动子活性的变化。另外，用整合了 pBAR-PCSP 的转化体同样评价同时插入 CCAAT 序列和 SRE 时启动子活性的变化。首先，将各转化体放射状接种到向基本培养基（0.9% NaNO₃，0.05% KCl，0.15% KH₂PO₄，0.15% 痕量元素，0.05% MgSO₄·7H₂O，1% 葡萄糖 pH（6.5））中添加了必要营养成分（尿苷、维生素 B6 和生物素）的琼脂培养基中，37℃ 培养 3 天后，从琼脂培养基上把分生孢子悬浮到孢子悬浮溶液（0.01% tween80，0.8% NaCl）中，用海绵过滤，制备成孢子悬浮液。从孢子悬浮液中，将 1×10^8 个分生孢子接种到 100ml SP 培养基（1% 淀粉，1% 多聚蛋白胨，0.5% KH₂PO₄，0.1% NaNO₃，0.05% MgSO₄·7H₂O，pH（6.5））中，该培养基中添加了除精氨酸以外的必要营养成分（尿苷、维生素 B6 和生物素），37℃ 振荡培养 36 小时后，用 Buchner 漏斗和滤纸分离菌体与上清，上清作为酶溶液。

淀粉酶的活性测定是：向 20mM 醋酸钠缓冲液、10mM CaCl₂、2% 可溶性淀粉（Nacalai Tesque）中加入酶溶液，制备 150μl 的反应体系，37℃ 反应 20 分钟，用 Nelson-Somogy 法对所生成的还原糖量进行定量。另外，以 1 分钟内释放 1μmol 葡萄糖的酶量作为 1U。以如上测定的淀粉酶活性为指标，对野生型启动子和经过修饰的启动子进行启动子活性评价。

淀粉酶活性的测定结果示于图 4 的表中。该表表明：与野生型启动子（taaP）相比，插入了 CCAAT 序列或 SRE 的经过修饰的启动子（PCCAATb 及 PSREb）的活性降低，或者几乎无差异，单独插入 CCAAT

序列或 SRE, 未观察到启动子活性上升的效果。另外, 分别插入多个这样的片段时, 同样未观察到启动子活性上升的效果 (未显示数据)。由这些结果, 考虑该启动子已经是高度优化的启动子, 通过导入突变而对启动子结构造成的负面影响比插入 CCAAT 序列和 SRE 更显著。

其它方面, 与野生型启动子 (taaP) 相比, 同时插入 CCAAT 序列和 SRE 的经过修饰的启动子 (PCSP) 活性显著上升, 可看到约 4 倍的淀粉酶活性。通过以上结果, 可以说同时插入 CCAAT 序列和 SRE 对增强启动子活性很重要。

[实施例 7] 插入多个 CCAAT 序列和 SRE 对启动子进行修饰时的效果

接下来, 在启动子区域插入 1 拷贝、2 拷贝、3 拷贝的 CCAAT-SRE 片段, 检测用这样的启动子时淀粉酶产量的增加效果。为了检测在启动子区域最多插入 3 个 CCAAT-SRE 片段时 (起始点 1 + 插入的片段 3 = 4) 对启动子活性的效果, 制备质粒 pKF-PCSPb。它是将实施例 2 中获得的 CCAAT-SRE (PstI) 片段 (序列号 10) 插入到实施例 3 中获得的 pKF-PCSPb 的 PstI 位点获得的。用该质粒, 按实施例 4 制备测定启动子活性用的质粒 pBAR-CSPPb, 按实施例 5 获得整合了 pBAR-CSPPb 的转化体。用与实施例 6 同样的方法, 制备该转化体的孢子悬浮液。从孢子悬浮液中, 将 1×10^8 个分生孢子接种到 100ml SP 培养基 (1% 淀粉, 1% 多聚蛋白胨, 0.5% KH_2PO_4 , 0.1% NaNO_3 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH (6.5)) 中, 该培养基中添加了除精氨酸以外的必要营养成分 (尿苷、维生素 B6 和生物素), 37℃ 振荡培养 40 小时后, 按照实施例 6 测定淀粉酶活性。测定整合了质粒 pBAR-taa 的转化体、整合了质粒 pBAR-CSb 的转化体和整合了质粒 pBAR-CSPb 的转化体的淀粉酶活性, 进行比较。其中质粒 pBAR-taa 具有野生型启动子, 质粒 pBAR-CSb 具有插入了一个 CCAAT-SRE 片段的经过修饰的启动子, 质粒 pBAR-CSPb 具有插入了二个 CCAAT-SRE 片段的经过修饰的启动子。

测定结果示于图 5 的表 (淀粉栏) 中。需要指出的是, 图的上半部分表示各经过修饰的启动子中 CCAAT 序列或 SRE 的插入位置模式图。如该表所示, 每插入一个包含从 CCAAT 序列到 SRE 的区域可看到淀粉酶产量的增加。也就是说, 可以确认通过插入多个 CCAAT-SRE 片段, 可提高淀粉酶的产量。

[实施例 8] 经过修饰的启动子对碳源的效果

为了检测插入了 1 拷贝、2 拷贝、3 拷贝 CCAAT-SRE 片段的经过修饰的启动子 PCSb、PCSPb 及 PCSPpb 对葡萄糖代谢分解抑制的减弱效果, 测定以葡萄糖作碳源的 GP 培养基 (1% 葡萄糖, 1% 多聚蛋白胨, 0.5% KH_2PO_4 , 0.1% NaNO_3 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH (6.5)) 培养整合了 pBAR-CSb 的转化体、整合了质粒 pBAR-CSPb 的转化体和整合了 pBAR-PCSPpb 的转化体时的淀粉酶活性, 与用以淀粉作碳源的 SP 培养基 (1% 淀粉, 1% 多聚蛋白胨, 0.5% KH_2PO_4 , 0.1% NaNO_3 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH (6.5)) 进行培养时的淀粉酶活性进行比较。

以葡萄糖作碳源时的测定结果于图 5 的表 (葡萄糖栏) 中。用以葡萄糖作碳源的培养基培养具有野生型启动子的转化株时, 其淀粉酶产量是用以淀粉作碳源的培养基进行培养时的酶产量的 40 分之一。另一方面, 用以葡萄糖作碳源的培养基培养具有经过修饰的启动子的转化株时, 其淀粉酶产量与用以淀粉作碳源的培养基进行培养时酶产量相比, 为 1: 8。该结果表明: 启动子区域插入了 CCAAT-SRE 片段的经过修饰的启动子, 与野生型启动子相比, 可得到减弱代谢分解抑制的效果。另外, 由于用以葡萄糖作碳源的培养基进行培养时, 与用以淀粉作碳源的培养基进行培养时同样, 通过插入多个 CCAAT-SRE 片段可看到表达增强效果, 所以表明通过应用经过修饰的启动子, 可获得 2 种效果 - 表达增强效果和减弱代谢分解抑制效果。总而言之, 可以证明用整合了多个 CCAAT-SRE 序列的经过修饰的启动子时, 即便以葡萄糖作碳源, 也可很好地产生淀粉酶。

[实施例 9] 具有增强子功能的 DNA 片段多样性检测

检测部分改变 CCAAT-SRE 片段的 SRE 部分时, 是否保持启动子活性的增强效果。首先, 设计以下的引物 MSRE, 使 SRE 部分由野生型 (CGGAAATTTAAAGG, 序列号 6) 置换成 (CGGAATTTAAACGG, 序列号 7), 应用 MSRE 和 Mutan-Super Express Km Kit (TAKARA), 对 pKF 进行位点特异性突变的导入。从导入突变了的启动子区域获得 CCAAT-SRE (XhoI-NotI) 片段, 叫做 CCAAT-mSRE 片段。然后, 用与实施例 2 和 3 同样的方法, 将 CCAAT-mSRE 片段插入到启动子下游区域的 XhoI-NotI 位点, 制作经过修饰的启动子 PCmSb。用含该经过修饰的启动子的质粒 pKF-PCmSb, 用与实施例 4 同样的方法构建淀粉酶活性测定

时用的质粒 pBAR-CmSb, 然后用与实施例 5 及 6 同样的方法进行启动子活性评价。

用于将 SRE 部分的一部分碱基置换成其它碱基的引物:

MSRE: 5' - TAGGGGCGGAATTTAAACGGGATTAA - 3' (序列号 27)

淀粉酶活性的测定结果于图 6 的表中。如表所示, 实施碱基置换的启动子 (PCmSb), 其淀粉酶表达量是野生型 (taaP) 的大约 3.2 倍, 与 SRE 未实施碱基置换的启动子 (PCSb) 具有同等的启动子活性增强效果。由此证实, 即便对 SRE 部分实施部分突变也能保持增强启动子活性的效果, 即保持增强子功能。

[实施例 10] 增强子序列插入位置的检测

比较将 CCAAT - SRE 片段插入到多种不同部位进行启动子修饰时, 对启动子活性的影响, 检测有效的插入位置。

首先, 用与实施例 3 同样的方法, 将实施例 9 中制备的 CCAAT - mSRE 片段插入到启动子上游区域的 XhoI - NotI 位点、CCAAT 序列与 SRE 之间区域的 NotI 位点、或下游的 SpeI 位点, 分别制备经过修饰的启动子 PCmSa、PCmSN、PCmSS。用与实施例 3 和 4 同样的方法, 构建含这些经过修饰的启动子的淀粉酶活性测定时用的质粒, 然后用与实施例 5 及 6 同样的方法进行启动子活性比较。

淀粉酶活性的测定结果于图 6 的表中。需要指出的是, 表的左侧是各经过修饰的启动子中 CCAAT - mSRE 片段插入位置的模式图。如表所示, 将包含从 CCAAT 序列到 SRE 的区域插入到原本存在的 CCAAT 序列与 SRE 之间而得到的经过修饰的启动子 PCmSN 中, 未见到启动子活性的上升, 但是插入到 CCAAT 序列与 SRE 之间以外区域时, 无论插入到哪个区域均见到淀粉酶表达量的增加。但是, 与插入到 CCAAT 序列上游和直接插入到 TATA - box 之前的经过修饰的启动子 PCmSa 和 PCmSS 相比, 插入到启动子下游区域的 XhoI - NotI 位点的 PCmSb (实施例 9) 类型的表达量多。这些结果表明: CCAAT - mSRE 片段的插入位置在原来存在的 SRE 下游区域最合适, 另外提示从转录起始点到 CCAAT - mSRE 片段的距离与启动子活性无相关性。需要指出的是, 对 CCAAT - SRE 片段同样适用。

[实施例 11] 淀粉酶高生产株的获得

尝试用持有经过修饰的启动子的淀粉酶基因获得构巢曲霉的淀粉

酶高生产株。

从实施例 5 或 7 中制备的转化体中选择具有经过修饰的启动子的淀粉酶基因多拷贝同源整合到 *argB* 座位的转化株 (CSb16、CSP6、CSPb19)，用 100ml SPY 培养基 (3%淀粉, 0.2% KCl, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母提取物) 37℃ 培养 5 天, 用实施例 6 所示的方法测定淀粉酶活性。其结果示于图 7 的表中。与持有野生型启动子的 *taa2* 株相比, 持有经过修饰的启动子的 CSb17 株显示 5 倍的淀粉酶表达量。整合了多拷贝淀粉酶基因的菌株中, 有随拷贝数增加表达量增加的倾向, 表达量最高的菌株是野生型启动子的 34 倍, 每 1 升蛋白质质量表达大约 10g 的淀粉酶。由此可以确认, 通过多拷贝整合持有经过修饰的启动子的淀粉酶基因, 可进行大量的蛋白质生产。

[实施例 12] 不同碳源的淀粉酶生产性的比较

下面, 应用启动子区域中有 2 个 CCAAT-SRE 片段的 CSP6 株和启动子区域中有 3 个 CCAAT-SRE 片段的 CSPb19 株检测对各种不同碳源的表达量差异。

用 100ml SPY 培养基 (淀粉碳源: 3%淀粉, 0.2% KCl, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母提取物) 和 MPY 培养基 (麦芽糖碳源: 3% 麦芽糖, 0.2% KCl, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母提取物) 及 GPY 培养基 (葡萄糖碳源: 3% 葡萄糖, 0.2% KCl, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母提取物) 培养 CSP6 株和 CSPb19 株, 37℃ 培养 5 天, 用与实施例 6 同样的方法测定淀粉酶活性。

其结果示于图 8 的表中。如表中所示, 与以淀粉作碳源进行培养时相比, 以麦芽糖作碳源进行培养时, 无论哪一株其淀粉酶活性均降低。考虑这是由于用低分子碳源时受到碳源枯竭等影响。另外, 以葡萄糖作碳源时, CSP6 株由于代谢分解抑制表达量显著降低, 而 CSPb19 株则维持与以淀粉作碳源时几乎同等的表达量。由该结果可以确认长时间培养导入了多拷贝质粒的转化株时, 代谢分解抑制效果和表达增强效果更显著表现出来。也就是说, 以获取淀粉酶高生产株为目的导入多拷贝质粒时, 通过应用具有 3 个以上 CCAAT-SRE 序列的经过修饰的启动子, 可更高效获得淀粉酶高生产株。

[实施例 13] 改变 CCAAT 与 SRE 间的距离时的效果

探讨改变 CCAAT - SRE 片段中 CCAAT 序列与 SRE 间的距离时对增强子功能的影响。

首先,用实施例 2 中所示引物 CSXf、CSNr 与以下所示引物 CbgIr、SBglf 进行 PCR 反应,分别获得含 CCAAT 序列的片段和含 SRE 的片段。通过用 BglII 位点连接这些片段,获得 CCAAT 序列与 SRE 间距离短的 DNA 片段(以下,叫做“sCCAAT-mSRE 片段”),将之插入到启动子(taaP)区域的下游区域的 XhoI - NotI 位点,制备出经过修饰的启动子。应用该经过修饰的启动子,用与实施例 3-6 同样的方法评价启动子活性。

添加 BglII 位点的下游引物:

CBglr: 5' - GAAGATCTCTGTTTCGCTTTGCTGCTTC

添加 BglII 位点的上游引物:

SBglf: 5' - GAAGATCTTCCAGAGTGACTAGGGGCGG-3' (序列号 29)

测定淀粉酶活性的结果示于图 9 的表中。如表中所示,与野生型启动子(taaP)相比,用 CCAAT - SRE 片段进行修饰的启动子(PsCmSb)显现 1.6 倍的淀粉酶表达量增加效果。也就是说,CCAAT 序列与 SRE 间的距离缩短时,也能获得启动子活性的增强效果。该结果强烈提示与启动子活化相关的区域是 CCAAT 序列与 SRE 2 个区域。需要指出的是,PsCmSb 与插入了原来大小的 CCAAT-mSRE 区域的 PCmSb 相比,仅增加约一半的效果,考虑这种增加效果的降低是由于改变 CCAAT 序列与 SRE 间的距离而造成与 CCAAT 序列结合的 HAP 复合体和与 SRE 结合的 AmyR 的位置关系偏离最适距离。总而言之,通过使从 CCAAT 序列到 SRE 的距离最适化,即便应用更短的 DNA 片段,也十分可能保持 CCAAT - SRE 片段具有的启动子活性增强效果。

[实施例 14] 增强子序列(SRE)多样性的探讨

检测向野生型启动子(taaP)的 SRE 部分导入各种突变时对启动子活性的影响。首先,用以下所示的引物进行 PCR 反应,制备经过修饰的启动子 taaS(SRE 部分的序列为:CGGAAATTTAACGG,序列号 8)和 MSRE2(SRE 部分的序列为:CGGAAATTTAATTA,序列号 30),其中野生型启动子(taaP)中存在的 SRE 的一部分碱基被置换成其它碱基。用这些经过修饰的启动子,按与实施例 3-6 同样的方法评价启动子活性。

SREc (taaS 用): 5'-GGGGCGGAAATTTAACGGGATTAATTTCC-3' (序列号 31)

MSRE2 (MSRE2 用): 5'-CGGAAATTTAATTAGATTAATTTCC-3' (序列号 32)

测定淀粉酶活性的结果示于图 10 的表中。野生型启动子中存在的 SRE5' 末端第 12 位碱基突变成 C 的经过修饰的启动子 taaS, 显现野生型启动子 1.2 倍的淀粉酶活性。该结果表明: 即便给 SRE5' 末端第 12 位碱基造成突变也能维持 SRE 具有的增强子功能, 将该碱基置换成 C 时所得序列具有更好的增强子功能。另一方面, SRE5' 末端第 13 和第 14 位碱基分别置换成 T 和 A 时的经过修饰的启动子 MSRE2 的淀粉酶表达量降低, 是野生型启动子的 0.8 倍。根据该结果, 可以说不突变 SRE5' 末端的第 13 和第 14 位碱基对维持高增强子功能很重要。

[实施例 15] 构建表达淀粉酶而用的质粒

为了证明在利用米曲霉作宿主的酶的生产体系中利用经过修饰的启动子有效, 应用实施例 3 和实施例 7 中制备的各种经过修饰的启动子进行以下实验。首先, 用 XbaI 和 BamHI 酶切实施例 4 中制备的质粒 pBAR-CSPb, 然后通过琼脂糖凝胶电泳回收、纯化约 3600bp 的 DNA 片段。将回收的 DNA 片段插入到导入了鸟氨酸 5' 磷酸脱羧酶基因 (pyrG 基因) 的质粒 pYRG100 的 XbaI - BamHI 酶切位点, 构建淀粉酶基因表达用质粒 pYRG-CSPb。需要指出的是, 按先前的报道 (日本酱油研究所杂志, 25 (1), 21-26 (1999)) 如下制备 pYRG100。即, 以米曲霉 AMA1201 株 (FERM P-19089) 的染色体 DNA 为模板, 应用以下引物 PyrF 和 PyrR 进行 PCR 反应, 用 SalI 和 HindIII 酶切所得扩增产物, 得到约 1.9Kbp 的 DNA 片段。将该片段导入 pUC119 多克隆位点的 SalI - HindIII 位点, 得到 pYRG100。

PyrF: 5' TATGTCGACCCAAGCCGCTGCTGGAATTGA 3' (序列号 33)

PyrR: 5' GAAAAGCTTGATCAATACCGTACGGGAGAT 3' (序列号 34)

[实施例 16] 淀粉酶低生产株 (米曲霉 AMA1201 - P 株) 和淀粉酶高生产株 (米曲霉 KBN6217-56 株) 的转化

1. 米曲霉的转化

用实施例 15 中所得质粒 pYRG-CSPb, 在米曲霉同种内 (用米曲霉的基因转化米曲霉) 利用经过修饰的启动子时, 评价蛋白质生产性提

高效果。首先,用实施例 15 中所得质粒 pYRG-CSPb 如下进行米曲霉的转化。用向完全培养基(2%麦芽提取物,2%葡萄糖,0.1%细菌蛋白胨)中添加了尿苷的培养基培养 pyrG 基因的缺损株米曲霉 1201-P 株和同基因的缺损株米曲霉 KBN6217-56 株,30℃振荡培养一晚后,将所得菌体悬浮到细胞壁溶解液(20mg/ml Yatalase(宝酒造),0.8M NaCl,10mM 磷酸缓冲液(pH 6.0))中,30℃缓慢振荡,使其原生质体化。然后,用尼龙膜过滤含原生质体的悬浮液,除去残存的菌体。

需要指出的是,AMA1201 株为米曲霉 AMA1201-P 株的亲株,KBN6217 株是米曲霉 KBN6217-56 株的亲株,均是按 Mol. Gen. Genet. (1987), 210: 460-461, 分离出 5 氟乳清酸(5-FOA)的耐性株后,筛选出尿苷要求性突变株的。

米曲霉 AMA1201 株如下保藏。

保藏号: FERM P-19089

国际保藏机关:独立行政法人产业技术综合研究所 专利生物保藏中心, 305-8566 茨城县筑波市东 1 丁目 1 番 3 号 中央第 6

保藏日: 2002 年(平成 14 年)11 月 1 日

同样,米曲霉 KBN6217 株如下保藏。

保藏号: FERM P-19088

国际保藏机关:独立行政法人产业技术综合研究所 专利生物保藏中心, 305-8566 茨城县筑波市东 1 丁目 1 番 3 号 中央第 6

保藏日: 2002 年(平成 14 年)11 月 1 日

接下来,应用用上述方法而得的各原生质体,通过 Turner 等的方法(Gene, 36, 321-331(1985))进行活性细胞的制备和转化。每一宿主得到数十株能在不含尿苷的培养基(Czappek-Dox 培养基(0.2% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 2% 葡萄糖(pH 5.5)))中生长发育的转化体。

2. 淀粉酶高生产株的获得

将上面 1. 中所得各转化株点植到淀粉酶活性检测用的琼脂培养基(2%麦芽糖,1%支链淀粉,0.09% NaNO₃, 0.15% KH₂PO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 1.5% 琼脂(pH 6.5))上。从菌体分泌出的淀粉酶作用于底物,使支链淀粉分解产生晕,以晕的大小为指标,分别筛选各宿主的淀粉酶高生产株。

3. 淀粉酶活性的测定

用施用器刮取上面 2. 中获得的淀粉酶高生产株, 接种到 100mlSP 培养基 (1% 淀粉, 1% 多聚蛋白胨, 0.5% KH_2PO_4 , 0.1% NaNO_3 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH (6.5)) 中, 30℃、振荡培养 66 小时, 然后按照实施例 6 测定淀粉酶活性。

测定结果示于图 11 的表中。淀粉酶低生产株 AMA1201-P 株或高生产株 KBN6217-56 株任一株作宿主时, 其转化体的淀粉酶生产量均比其亲株有显著增加。具体而言, 以淀粉酶低生产株 AMA1201-P 株为宿主所得转化株中, 其淀粉酶生产量是其亲株的 57 倍以上。另一方面, 当用淀粉酶高生产株 KBN6217-56 株作宿主所得转化株中, 其淀粉酶生产量是其亲株的 10 倍以上。由以上结果可以确认: 即便以米曲霉作宿主时, 对于高表达其导入基因而言, 本发明的经过修饰的启动子也能有效发挥功能。

[实施例 17] 异种基因 (漆酶基因) 表达用质粒的构建

接下来探讨表达异种基因时经过修饰的启动子的效果。如下进行漆酶基因表达用质粒的构建。首先, 为了与漆酶基因连接, 用以下所示的引物, 通过 PCR 法, 分别向 TaKa 淀粉酶启动子和经过修饰的启动子 (PCSPb、PCSPpb) 导入突变。

TaKa 淀粉酶基因启动子 5' 末端 (有 EcoRI 酶切位点) 的引物: 5' GGAATTCATGGTGTTTTGATC 3' (Taa1F, 序列号 35)

向 TaKa 淀粉酶基因启动子 3' 末端添加 EcoT221 酶切位点时的引物: 5' GAGACCACCACGCGACATGCATAAATGCCTTCTGTGG 3' (Taa-E, 序列号 36)

另一方面, 为了将 *Paraphaeoshaeria* 属或鉴定为与该属近缘的 KL112 株来源的漆酶基因与启动子连接, 整合到载体中, 用以下所示引物, 通过 PCR 法导入突变进行漆酶基因的扩增及限制性酶识别。

漆酶基因扩增及向其 5' 末端添加 EcoT221 酶切位点时的引物: P11: 5' CCATGCATTTCTTTATCATTGGAG 3' (序列号 37)

漆酶基因扩增及向其 3' 末端添加 SacI 酶切位点时的引物: P12: 5' CCGAGCTCTGGTATAGTATCTTGAATGTATC 3' (序列号 38)

按 Raeder 等的方法 (U. Raeder and P. Broda, Lett. Appl. Microb., 1, 17-20 (1985)), 从用马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (DIFCO)

培养的 KL112 株制备供于 PCR 反应的模板 DNA。KL112 株如下保藏：

保藏号：FERM P-19071

国际保藏机关：独立行政法人产业技术综合研究所 专利生物保藏中心，305-8566 茨城县筑波市东 1 丁目 1 番 3 号 中央第 6

保藏日：2002 年（平成 14 年）10 月 18 日

用 EcoRI 和 EcoT221 酶切用以上方法导入突变了各启动子区域，另一方面，用 EcoT221 和 SacI 酶切扩增的漆酶基因。然后利用琼脂糖凝胶电泳回收、纯化各限制性酶切片段。将所得各限制性酶切片段插入到表达载体 pYRG100 的 EcoRI-SacI 酶切位点，构建漆酶表达用载体 pTALC100 (TaKa 淀粉酶启动子)、pTALCPb (经过修饰的启动子 PCSPb) 及 pTALCPPb (经过修饰的启动子 PCSPb)。

[实施例 18] 以米曲霉作宿主的转化体的获得

1. 漆酶高生产株的获得

用实施例 17 中得到的质粒 pTALC100、pTALCPb 及 pTALCPPb，用与实施例 16 1. 中记载的同样方法转化米曲霉 AMA1201-P 株。接下来，将转化体点植到漆酶活性检测用琼脂培养基（马铃薯葡萄糖琼脂培养基（DIFCO）：10mM CuSO₄，1mM 咖啡酸）上。通过菌体分泌出来的漆酶的作用，底物中的咖啡酸被氧化开裂、聚合，生成褐色物质，由此形成晕，以晕的大小为指标，筛选淀粉酶高生产株。

2. 漆酶活性测定

用施用器刮取上面 1. 中获得的漆酶高生产株，接种到 50ml SPN 培养基（3% 淀粉，1% 多聚蛋白胨，1% 发酵粕，0.1% KH₂PO₄，0.2% KCl，0.05% MgSO₄·7H₂O，10mM CuSO₄ pH (6.5)）中，30℃、振荡培养 6 日。培养终止后，用 Buchner 漏斗和滤纸分离菌体与上清，以上清作为酶溶液。

向 50mM 醋酸钠缓冲液、1mM 邻甲氧基苯酚（和光纯药）中加入酶溶液，制成 2.5ml 的反应体系，40℃、反应 10 分钟，通过检测 430nm 处吸光度的变化求出漆酶活性。

测定漆酶活性的结果示于图 12 的表中。用非重组体（用米曲霉 AMA1201-P 株作宿主）的菌株中未见到漆酶活性，转化体中任一株中均检测出高漆酶活性。导入了含三个 CCAAT-SRE 片段的启动子（PCSPb）的转化体的漆酶生产性，与导入了野生型启动子的转化体相

同。但是，通过导入含四个 CCAAT - SRE 片段的启动子 (PCSPPb)，可获得更高效生产漆酶的菌株。

以上结果证明：即使是以表达异种基因为目的，应用含较多 CCAAT - SRE 序列的改良启动子利于高效生产酶。

需要指出的是，对各转化体的培养滤液进行 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳时可以发现，由漆酶基因而来的预想分子量大小的蛋白质量在任一种转化体中均比非重组体有明显增多。

产业上利用的可能性

本发明提供在丝状真菌发挥功能的表达效率高的经过修饰的启动子。用该经过修饰的启动子可构建以丝状真菌为宿主的同种或异种蛋白质的高效生产体系。以生产淀粉酶蛋白质为模型进行检测时，与应用野生型启动子时相比，可获得具有其 7 倍表达量的转化体。由此可以证明，本发明的经过修饰的启动子对蛋白质的高效生产体系的构建极其有用。

序列表

<110> 天野酶株式会社

<120> 经过修改的启动子

<130> P0200102

<150> JP P2002-055853

<151> 2002-03-01

<150> JP P2002-354670

<151> 2002-12-06

<160> 38

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 11

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：增强子序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(11)

<223> n 代表任何碱基

<400> 1

ccaatnnnn n

<210> 2

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：增强子序列

11

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(12)
<223> n 代表任何碱基

<400> 2
cggnnnnnnn nngg 14

<210> 3
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：增强子序列

<400> 3
ccaattagaa g 11

<210> 4
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：增强子序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n 代表任何碱基

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n 代表任何碱基

<400> 4
cgglmwwwwn whgg 14

<210> 5
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：增强子序列

<400> 5
cggwwwwww whgg 14

<210> 6
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：增强子序列

<400> 6
cggaaattta aagg 14

<210> 7
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：增强子序列

<400> 7
cggaaatttaa acgg 14

<210> 8
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：增强子序列

<400> 8

cggaatttta acgg

14

<210> 9

<211> 128

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：包含 CCAAT 序列和 SRE 的 DNA 片段

<400> 9

ccaattagaa gcagcaaage gaaacagccc aagaaaaagg tcggcccgtc ggccttttct 60

gcaacgc1ga tcaegggcag cgateccaacc aacaccctcc agagtgacta ggggcggaaa 120

tttaaagg 128

<210> 10

<211> 196

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：包含 CCAAT 序列和 SRE 的 DNA 片段

<400> 10

ctgcagacca cctctaggca tcggacgcac catccaatta gaagcagcaa agcgaaacag 60

cccaagaaaa aggtcgcccc gtggcccttt tctgcaacgc tgatcacggg cagcgatcca 120

accaacaccc tccagagtga ctagggcgcg aaattttaaag ggattaattt ccaactcaacc 180

acaaatcaca ctgcag 196

<210> 11

<211> 193

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：包含 CCAAT 序列和 SRE 的 DNA 片段

<400> 11

```
ctcgagagge atcggaagca ccatccaatt agaagcagca aagcgaaaca gccaagaaa      60
aaggteggce cgtcggeett ttctgcaacg ctgatcacgg gcagcgatcc aaccaacacc      120
ctccagagtg actaggggag gaaattttaa gggattaatt tccactcaac cacaatcac      180
agtcggcgge cgc                                     193
```

<210> 12

<211> 615

<212> DNA

<213> 米曲霉

<220>

<221> 启动子

<222> (1)..(615)

<223>

<400> 12

```
gaattcatgg tgttttgatc attttaaatt tttatatgga ggttggtggg caactcgctt      60
ccgggcaact cgttaccga ttacgttagg gctgatattt acgtaaaaat cgtcaaggga      120
tgcaagacca aagtagtaaa accceggagt caacagcate caagcccaag tccttcacgg      180
agaaacccca gggtccacat cagcagcgaa ggaccacctc taggcacggg acgcaccate      240
caattagaag cagcaaagcg aaacagccca agaaaaaggt cgcccctcg gcctttcttg      300
caacgtgatg caggggcagc gatccaacca acacctcca gaggactag gggcggaaat      360
ttaaagggat taatttcac tcaaccacaa atcacagtcg tcccgggtat tgtcctgcag      420
aatgcaattt aaactcttct ggaatcgct tggattcccc gccctggcc gtagagetta      480
aagtatgtcc cttgtcgatg cgatgtatca caacatataa atactagcaa gggatgccat      540
gcttggagga tagcaaccga caacatcaca tcaagctctc cttctctga acaataaacc      600
```

ccacagaagg cattt 615

- <210> 13
- <211> 44
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 人工序列说明：用于扩增 CCAAT 序列的 PCR 引物

<400> 13
ccgctcgagg caccatccaa ttagaagcgc ggccgctaaa ctat 44

- <210> 14
- <211> 44
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 人工序列说明：用于扩增 CCAAT 序列的 PCR 引物

<400> 14
atagtttagc ggccgcgctt ctaattggat ggtgcctega gogg 44

- <210> 15
- <211> 46
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 人工序列说明：用于扩增 SRE 的 PCR 引物

<400> 15
gaactagttaa cctaggggcg gaaatttaac gggatgttaa ctagtc 46

- <210> 16
- <211> 46
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>	
<223> 人工序列说明：用于扩增 SRE 的 PCR 引物	
<400> 16	
gaactagttaa catcccgtaa aatttcgcgc cctagggttaa ctagtc	46
<210> 17	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列说明：用于扩增包含 CCAAT 序列和 SRE 的 DNA 片段的 PCR 引物	
<400> 17	
aaactgcaga ccacctctag gcatcgacg	30
<210> 18	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列说明：用于扩增包含 CCAAT 序列和 SRE 的 DNA 片段的 PCR 引物	
<400> 18	
tttctgcagt gttgatttgt ggttgagtgg	30
<210> 19	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列说明：用于扩增包含 CCAAT 序列和 SRE 的 DNA 片段的 PCR 引物	
<400> 19	
cggtctgagg catcgacgc accatcc	27

<210> 20

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：用于扩增包含 CCAAT 序列和 SRE 的 DNA 片段的 PCR 引物

<400> 20

atagttttagc ggccgccgac tgtgatttgt ggttgagtgg 40

<210> 21

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：用于定点诱变的引物

<400> 21

cgtttggatt ccccgccgcg ggccgcagag cttaaagtat gtccc 45

<210> 22

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：用于定点诱变的引物

<400> 22

gaatgcaatt taaactcttc ctcgagtcgc ttggattccc cgcgc 45

<210> 23

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：用于定点诱变的引物

<400> 23
gtagtaaaac cccggagtca gcggccgccca agcccaagtc cttcacg 47

<210> 24
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：用于定点诱变的引物

<400> 24
cgtaaggga tgcaagactc gagtagtaaa accccggagt c 41

<210> 25
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：用于定点诱变的引物

<400> 25
gcaccatcca attagaagcg cggcgcgcaa acagcccaag aaaaagg 47

<210> 26
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：用于定点诱变的引物

<400> 26
taaagtatgt cactagtcca tgcgat 26

<210> 27
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：用于定点诱变的引物

<400> 27

taggggcgga atttaaacgg gattaa 26

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：用于扩增包含 CCAAT 序列的 DNA 片断的 PCR 引物

<400> 28

gaagatctct gtttcgcttt gctgettc 28

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：用于扩增包含 SRE 的 DNA 片段的 PCR 引物

<400> 29

gaagatcttc cagagtgact aggggcgg 28

<210> 30

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：部分修饰的 SRE

<400> 30

cggaaattta atta 14

<210> 31
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：用于诱变 SRE 的 PCR 引物

<400> 31
ggggcggaaa tttaacggga ttaatttcc 29

<210> 32
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：用于诱变 SRE 的 PCR 引物

<400> 32
cggaattta attagattaa ttcc 25

<210> 33
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：RCR 引物

<400> 33
tatgtcgacc caagccgctg ctggaattga 30

<210> 34
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明：RCR 引物

<400> 34

gaaaagcttg atcaataccg tacgggagat

30

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: RCR 引物

<400> 35

ggaattcatg gtgttttgat c

21

<210> 36

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: RCR 引物

<400> 36

gagaccacca cggacatgc ataaatgcct tctgtgg

37

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: RCR 引物

<400> 37

ccatgcattt ctttatcatt ggag

24

<210> 38

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：RCR 引物

<400> 38

ccgagctcig gtatagtatc ttgaatgtat c 31

15

```
1 GAATTCATGG TGTTTGTGATC ATTTTAAATT TTTATATGGC GGGTGGTGGG CAACTCGCTT 60
60 CCGGGCAACT CGCTTACCGA TTACGTTAGG GCTGATATTT ACGTAAAAAT CGTCAAGGGA 120
121 TGCAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCCGGAGT CAACAGCATC CAAGCCCAAG TCCTTCACGG 180
181 AGAAACCCCA GCGTCCACAT CACGAGCGAA GGACCACCTC TAGGCATCGG ACGCACCATC 240
241 CAATTAGAAG CAGCAAAGCG AAACAGCCCA AGAAAAAGGT CGGCCCGTCG GCCTTTTCTG 300
301 CAACGCTGAT CACGGGCAGC GATCCAACCA ACACCCTCCA GAGTGACTAG GGGCGGAAAT 360
361 TTAAAGGGAT TAATTTCCAC TCAACCACAA ATCACAGTCG TCCCCGGTAT TGTCTGCAG 420
421 AATGCAATTT AAACCTCTCT GCGAATCGCT TGGATTCCCC GCCCCTGGCC GTAGAGCTTA 480
481 AAGTATGTCC CTTGTCGATG CGATGTATCA CAACATATAA ATACTAGCAA GGGATGCCAT 540
541 GCTTGGAGGA TAGCAACCGA CAACATCACA TCAAGCTCTC CCTTCTCTGA ACAATAAACC 600
601 CCACAGAAGG CATT 615
```

图 1

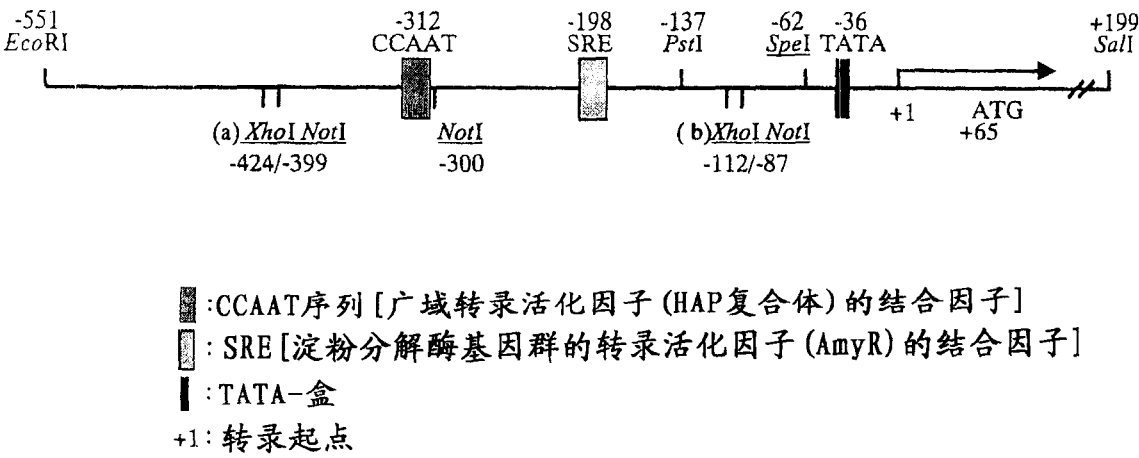
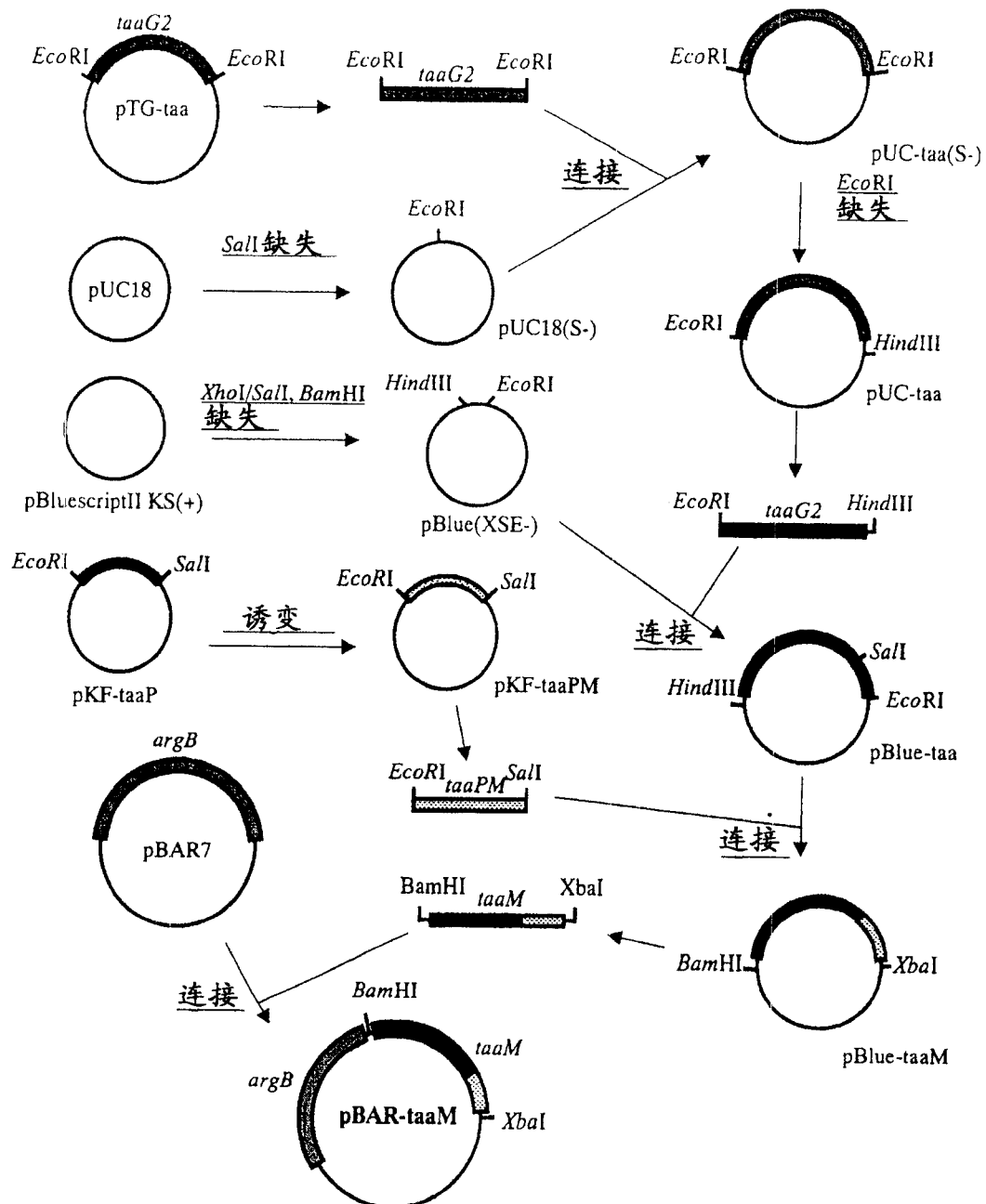


图 2



taaG2: Taka-淀粉酶A基因
argB: 鸟氨酸氨甲酰基转移酶(筛选标记)
taaM: 含经修饰的启动子的Taka-淀粉酶基因

图 3

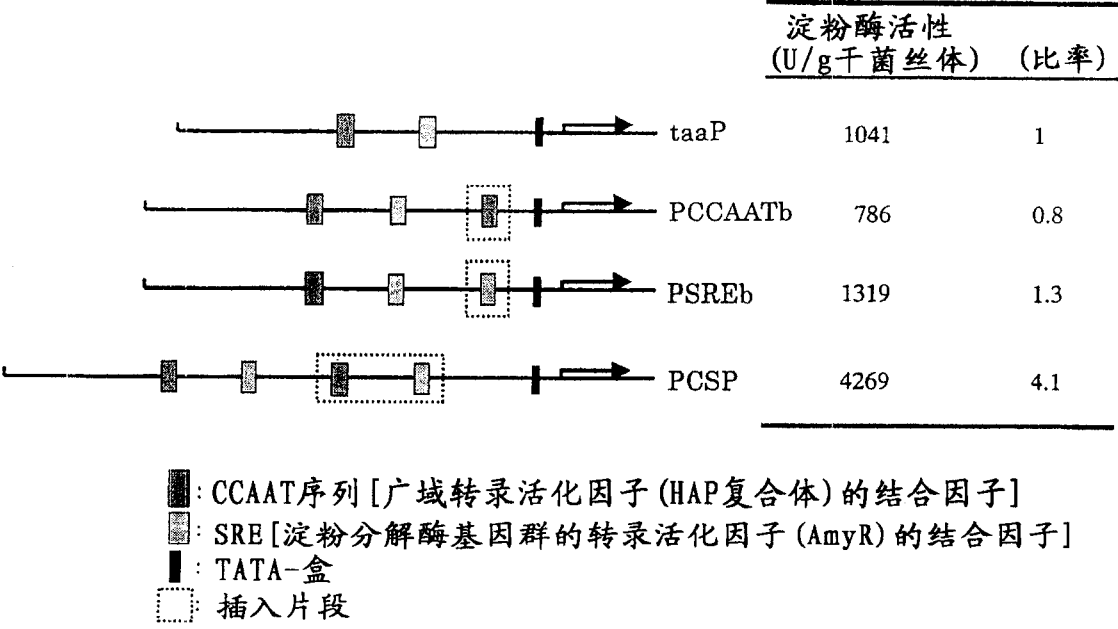
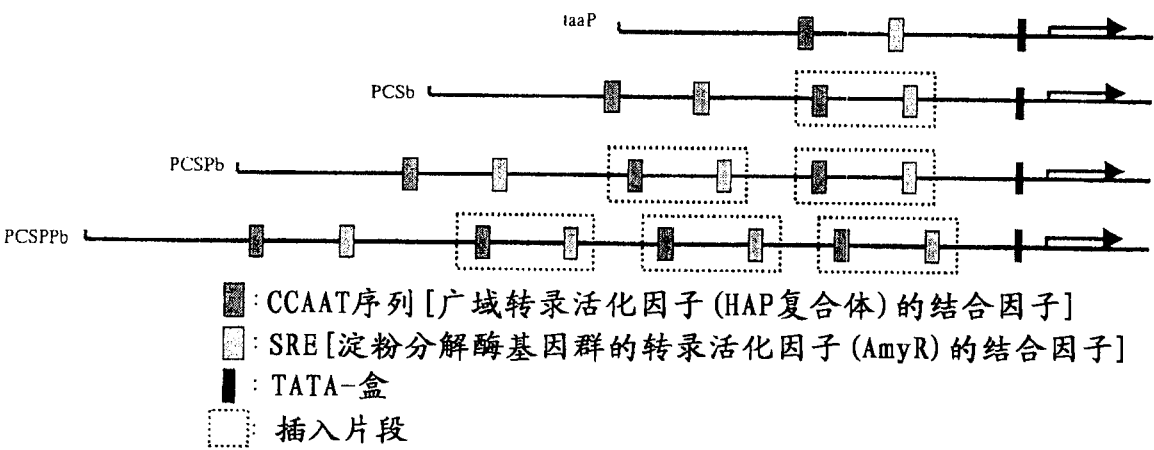


图 4



启动子	淀粉酶活性			
	淀粉		葡萄糖	
	(U/g干菌重) (比率)		(U/g干菌重) (比率)	
taaP	916	1	25	1
PCSB	4601	5.0	601	24.1
PCSPb	6455	7.0	740	29.6
PCSPPb	7084	7.7	941	37.7

图 5

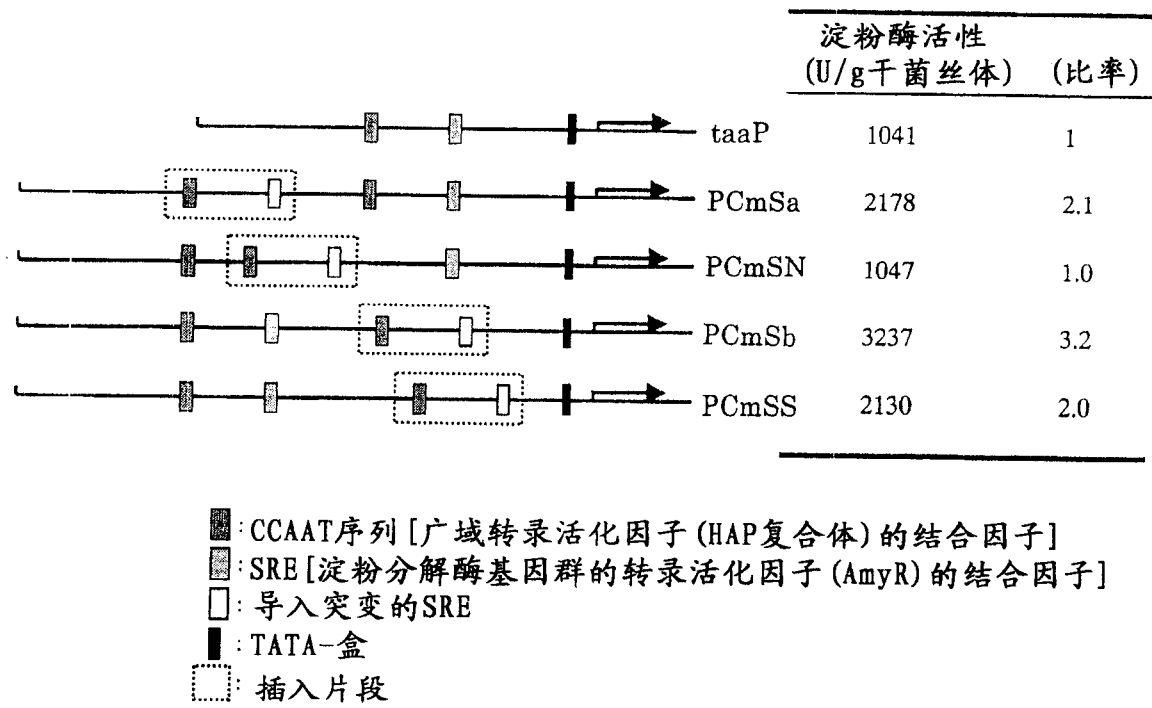


图 6

菌株	拷贝数	淀粉酶产量 (g/L)	(比率)
ABPU1	0	0.01	
taa2	1	0.29	1
CSb17	1	1.46	5.0
CSb16	多	9.90	34.1
CSP6	多	6.41	22.1
CSPb19	多	7.35	25.3

ABPU1；宿主 taa2；野生型启动子

图 7

菌株	淀粉酶产量 (g/L)		
	SPY 培养基	MPY 培养基	GPY 培养基
CSP6	6.41	4.86	2.94
CSPb19	7.35	5.25	6.25

淀粉酶的表达量用Taka淀粉酶的比活性为100U/mg时的换算值表示

图 8

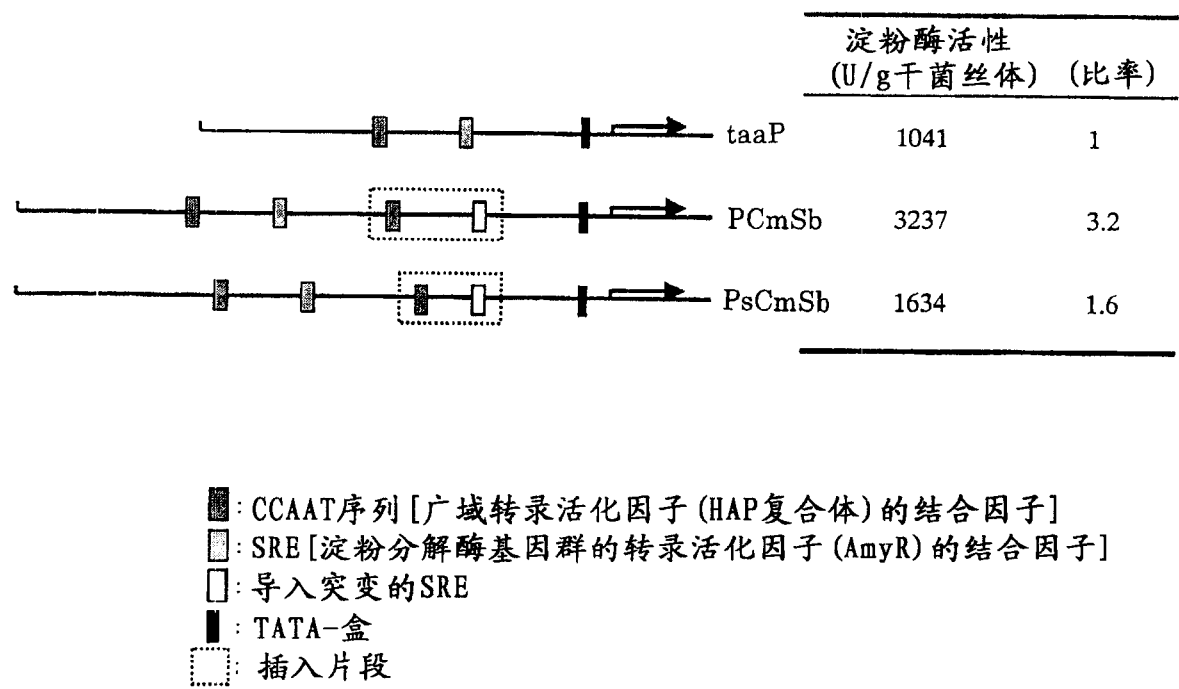


图 9

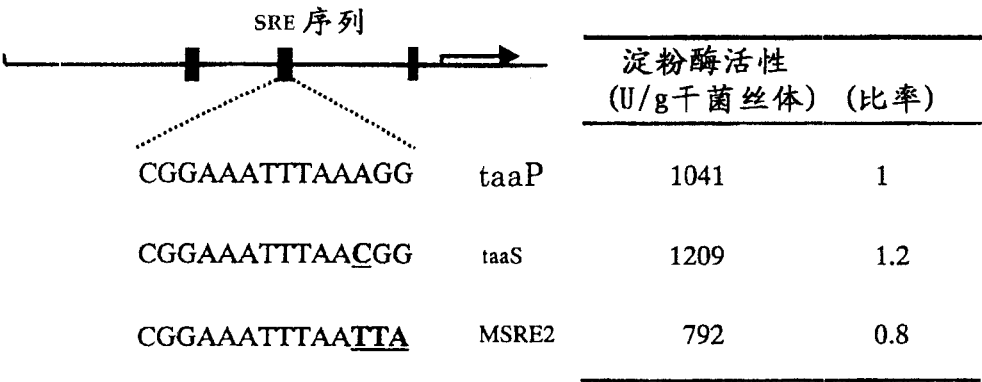


图 10

启动子	淀粉酶活性			
	A. 米曲霉 KBN616		A. 米曲霉 KBN6217	
	(U/g干菌重) (比率)		(U/g干菌重) (比率)	
非重组菌株	377	1	13003	1
PCSPb	21702	57.6	137179	10.6

图 11

启动子	淀粉酶活性	
	(Δ O.D. / 0.1ml)	(比率)
非重组菌株	0	-
taaP	174	1
PCSPb	136	0.8
PCSPPb	281	1.6

图 12