

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4302985号
(P4302985)

(45) 発行日 平成21年7月29日(2009.7.29)

(24) 登録日 平成21年5月1日(2009.5.1)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 9/14 (2006.01)

C 1 2 N 9/14

C 1 2 R 1/685 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 R 1/885 (2006.01)

C 1 2 R 1:685

請求項の数 23 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-564953 (P2002-564953)
 (86) (22) 出願日 平成14年2月13日(2002.2.13)
 (65) 公表番号 特表2004-526440 (P2004-526440A)
 (43) 公表日 平成16年9月2日(2004.9.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/FI2002/000116
 (87) 国際公開番号 W02002/064624
 (87) 国際公開日 平成14年8月22日(2002.8.22)
 審査請求日 平成16年9月2日(2004.9.2)
 (31) 優先権主張番号 20010272
 (32) 優先日 平成13年2月13日(2001.2.13)
 (33) 優先権主張国 フィンランド(FI)

前置審査

(73) 特許権者 301036984
 ヴァルシオン テクニツリネン トウトキ
 ムスケスクス
 フィンランド、エフアイー〇二一五〇 エ
 スポー、 ヴオリミエヘンティエ 3
 (74) 代理人 100064447
 弁理士 岡部 正夫
 (74) 代理人 100085176
 弁理士 加藤 伸晃
 (74) 代理人 100096943
 弁理士 臼井 伸一
 (74) 代理人 100091889
 弁理士 藤野 育男
 (74) 代理人 100101498
 弁理士 越智 隆夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 真菌における分泌タンパク質の産生のための改良法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

真菌宿主におけるタンパク質産生のためのプロモーターを製造する方法であって、

分泌可能なタンパク質のプロモーターをcbh1, cbh2, eg11, eg12, hfb1, hfb2, xyn1, swo, gla, amy,またはpepA から選択する工程

そのプロモーターを遺伝子改変する工程

改変プロモーターをリポータータンパク質のコード領域に動作可能に連結する工程

その選択されたりポータータンパク質を、真菌宿主中で、タンパク質の分泌が減少または阻害され、その細胞の分泌能力が限定され、または分泌経路に負担がかかった状態である、分泌ストレス条件下で、その改変されたプロモーターの制御下で発現させる工程

同一条件下で非改変プロモーターのもとで得られる発現に比べ、選択されたりポータータンパク質のタンパク質発現の増加または減少を示す細胞をスクリーニングまたは選択する工程

上記工程で選択される改変プロモーターを含む真菌宿主を回収する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

選択されたりポータータンパク質のコード領域が分泌可能なタンパク質のコード領域であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

タンパク質産生のための真菌宿主を製造する方法であって、

請求項 1 または 2 で得られた分泌可能なタンパク質のプロモーターを選択する工程
 改変されたプロモーターを選択された分泌可能なタンパク質をコードする遺伝子のコード領域に動作可能に連結する工程

その選択されたりポータータンパク質を真菌宿主中で、タンパク質の分泌が減少または阻害され、その細胞の分泌能力が限定され、または分泌経路に負担がかかった状態の分泌ストレス条件下で、その改変されたプロモーターの制御下で発現させる工程

同一条件化で非改変プロモーターの下での分泌可能なタンパク質の発現に比べ、選択された分泌可能なタンパク質のタンパク質発現の増加または減少を示す細胞をスクリーニングするまたは選択する工程

上記工程で選択される改変プロモーターを備える真菌宿主を回収する工程を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 4】

改変する領域がトリコデルマ c b h 1 プロモータ中ヌクレオチド 1 6 2 の上流に位置することを特徴とする、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

改変する領域がトリコデルマ c b h 1 プロモータ中ヌクレオチド 1 0 3 1 と 1 6 2 の間に位置することを特徴とする、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

改変する領域がトリコデルマ c b h 1 プロモータ中ヌクレオチド 1 0 3 1 と 5 0 1 の間に位置することを特徴とする、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 7】

改変する領域がトリコデルマ c b h 1 プロモータ中ヌクレオチド 3 4 1 と 2 1 1 の間に位置することを特徴とする、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

タンパク質産生のための真菌宿主を製造する方法であって、

真菌宿主において ace1 遺伝子を改変する工程、ここで、ace1 は真菌宿主内で分泌可能なタンパク質をコードする遺伝子のプロモーターに結合する、あるいは選ばれたある分泌可能なタンパク質の発現における調節シグナルを媒介するものである

分泌ストレス条件において、改変真菌宿主内で選択された分泌可能なタンパク質を発現する工程、

30

同一条件下での非改変宿主における分泌可能なタンパク質の発現に比べ、選択された分泌可能なタンパク質のタンパク質発現の増加または減少を示す細胞をスクリーニングまたは選択する工程および

その真菌宿主を回収する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 9】

前記発現の増加または減少の機構がセルラーゼ、ヘミセルラーゼ、デンプン分解酵素、ハイドロフォピン、プロテアーゼ、インペルターゼ、フィターゼ、ホスファターゼ、スウォレニン、リグニン分解酵素およびペクチナーゼを含む群から選択されるタンパク質をコードする遺伝子の転写に関与していることを特徴とする請求項 8 の方法。

【請求項 10】

40

前記発現の増加または減少の機構が、遺伝子 cbh1, cbh2, egl1, egl2, hfb1, hfb2, xyn1, swo, gla, amy, または pepA によりコードされるタンパク質を含む群から選択されるタンパク質をコードする遺伝子の転写に関与していることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

真菌宿主が請求項 3 から 7 のいずれか 1 項の方法により取得された宿主であることを特徴とする請求項 8 から 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

Ace1 遺伝子の発現または活性が低下または消滅していることを特徴とする請求項 8 乃至 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 13】

Ace1遺伝子の発現または活性が増幅または増加していることを特徴とする請求項 8 乃至 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

真菌宿主の菌株が、アスペルギルス属、トリコデルマ属、ニューロスボラ属、フザリウム属、ペニシリウム属、フミコラ属、トリボクラジウム・ジオデス (*Tolypocladium geodes*)、クルイペロマイセス属、ピキア属、ハンゼヌラ属、カンジダ属、ヤロウィア属、スキゾサッカロミセス属、サッカロミセス属を含む群から選択されることを特徴とする請求項 9 乃至 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

真菌宿主の菌株が、アスペルギルス属またはトリコデルマ属であることを特徴とする請求項 8 乃至 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

真菌宿主の菌株が、アスペルギルス・ニガー又はトリコデルマ・リーセイであることを特徴とする請求項 8 乃至 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

真菌において、同種または異種の分泌可能なタンパク質を過剰生産する方法であって、適切な培地において請求項 1 または 2 に記載の方法によって得られたプロモーターを選択された分泌可能なタンパク質をコードする遺伝子に作動可能に結合する、ここで上記プロモーターは促進されたタンパク質の発現に基づいて選択またはスクリーニングされるものである工程、

適切な培養条件の下で選択された分泌可能なタンパク質をプロモーターの調節下真菌宿主内で発現させる工程；あるいは

請求項 8 - 16 のいずれかに記載の方法により得られた真菌宿主内で選択された分泌可能タンパク質を発現させる、ここで上記真菌宿主は促進されたタンパク質発現に基づいてスクリーニングまたは選択されたものである工程；および

培地からタンパク質産物を回収する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 18】

真菌において、同種の分泌可能なタンパク質を過少生産する方法であって、

適切な培地において請求項 1 または 2 に記載の方法によって得られたプロモーターを選択された分泌可能なタンパク質をコードする遺伝子に作動可能に結合する、ここで上記プロモーターは低下したタンパク質の発現に基づいて選択またはスクリーニングされるものである工程、

適切な培養条件の下で選択された分泌可能なタンパク質をプロモーターの調節下真菌宿主内で発現させる工程；あるいは

請求項 8 - 17 のいずれかに記載の方法により得られた真菌宿主内で選択された分泌可能タンパク質を発現させる、ここで上記真菌宿主は低下したタンパク質発現に基づいてスクリーニングまたは選択されたものである工程；および

培地からタンパク質産物を回収する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 19】

請求項 17 または 18 に記載の方法であって、タンパク質産物が、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、デンプン分解酵素、ハイドロフォビン、プロテアーゼ、インペルターゼ、フィターゼ、ホスファターゼ、スウォレニン、リグニン分解酵素、ペクチナーゼ、免疫グロブリンまたは tPA などの細菌または下等もしくは高等真核生物または真菌もしくは哺乳類に由来するタンパク質を含む群から選択されるものであることを特徴とする方法。

【請求項 20】

真菌における分泌可能なタンパク質の最適化されたタンパク質産生のための方法であって、

分泌可能なタンパク質の遺伝子を選択する工程

タンパク質の分泌が減少または阻害され、その細胞の分泌能力が限定され、または分泌

10

20

30

40

50

経路に負担がかかった状態である、分泌ストレス条件下において、その発現が制御されないプロモーターであってトリコデルマgpd1、cDNA1、ypt1、sar1、bgl2及びアスペルギルスgpdAから選ばれるプロモーター、またはそれらのプロモーターで、その発現が上記分泌ストレス条件化で制御されないように、遺伝子改変を行ったもの、及びcbh1、cbh2、egl1、egl2、hfb1、hfb2、xyn1、swa、gla、amy、またはpepAよりなる群から選択されるプロモーターを、選択された分泌可能なタンパク質をコードする遺伝子のコード領域を動作可能に連結する工程、

適切な培養条件の下で、真菌宿主において、ACE1を過剰産生するか、ACE1の活性が増大したものを産生する真菌宿主中で選択されたタンパク質を生産する工程、及び、

宿主の培地から選択された分泌可能なタンパク質を回収する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2 1】

トリコデルマ c b h 1 プロモーターの上流 1 0 3 1 位から 5 0 1 位のヌクレオチド (配列番号 5 の 1 1 8 6 - 1 7 1 4) からなり、タンパク質の分泌が減少または阻害され、その細胞の分泌能力が限定され、または分泌経路に負担がかかった状態である、分泌ストレス条件下において、タンパク質の発現を低減するDNA。

【請求項 2 2】

トリコデルマ c b h 1 プロモーターの上流 3 4 1 位から 2 1 1 位のヌクレオチド (配列番号 5 の 1 8 7 6 - 2 0 0 4) からなり、タンパク質の分泌が減少または阻害され、その細胞の分泌能力が限定され、または分泌経路に負担がかかった状態である、分泌ストレス条件下において、タンパク質の発現を低減するDNA。

【請求項 2 3】

タンパク質の分泌が減少または阻害され、その細胞の分泌能力が限定され、または分泌経路に負担がかかった状態である、分泌ストレス下で真菌宿主において、分泌タンパク質の発現を減少させるための、請求項 2 1 または 2 2 に記載のDNAの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、真菌における分泌タンパク質の産生のための最適化された方法に関する。特に、本発明は、本方法で使用されるDNA配列、プロモーターおよび真菌宿主に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ある種の真菌、特にトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) およびアスペルギルス・ニガーは、タンパク質生産のためにバイオテクノロジー産業で広く使用されている。通常、組換えタンパク質は、それが異種タンパク質であれ同種タンパク質であれ、真菌において分泌タンパク質をコードし大量に発現している遺伝子のプロモーター、例えばトリコデルマ・リーセイのプロモーターである c b h 1 およびアスペルギルス・ニガーのプロモーターである g l a などの制御の下で産生される。トリコデルマ・リーセイおよびアスペルギルス・ニガーは、同種加水分解酵素を培地中に極めて効率的に産生するが、生産される異種タンパク質の収量は、同種タンパク質の収量に比べて通常かなり低い。特に、遠い種、例えば哺乳動物を起源とするタンパク質の産生は極めて低レベルである (*Archer* および *Peberdy* , 1997、*Penttilä* , 1998)。低収率の理由としては、ポリペプチドの翻訳および分泌経路への移行が非効率なこと、タンパク質のフォールディングおよび輸送の妨害、ならびにmRNAが不安定で異種遺伝子の転写レベルが低いことなどが示唆されている (*MacKenzie* 他 1993、*Gouka* 他 1997)。

【0 0 0 3】

タンパク質フォールディングと輸送の障害は、異種タンパク質の産生中に起こりやすく、細胞中でストレス反応を誘導することが知られている。近年、細胞がタンパク質フォールディングおよびプロセッシングのために特化された環境であるERの内腔の状態を感知し

10

20

30

40

50

て正常の機能の動揺に対応することができる2つのフィードバック機構が報告されている。これらの機構はアンフォールドタンパク質応答 (Unfolded Protein Response) (UPR) を構成し、この応答は、1つはERの内腔におけるアンフォールドタンパク質の存在に反応してシャペロンおよびフォールディング触媒をコードする遺伝子の転写活性 (Shamu 他、1994) の増加であり、もう1つは真核生物の開始因子2 のリン酸化の増加でこれは細胞において翻訳活性をダウンレギュレートする (Harding 他、1999)。酵母および哺乳類細胞の小胞体におけるアンフォールドタンパク質に対する細胞応答が最近 Mori によって概説されている (2000)。

【0004】

しかしながら、これらのストレス条件において内因性分泌タンパク質をコードする遺伝子の転写制御についてはほとんど知られていない。特に、細胞のタンパク質をフォールディングし輸送する能力の限界に応じた分泌タンパク質をコードする遺伝子のフィードバック制御に関するデータは一切報告されていない。場合によっては、異種遺伝子が同時に発現された場合、内因性細胞外タンパク質をコードする遺伝子の転写物レベルは対照菌株における発現に比べて低いことが観察されている (Margolles - Clark 他1996)。遺伝子の効率的な発現に必要な転写/制御因子の量が異種遺伝子の複数のコピーの発現中に不足するからではないかと説明されている。

【0005】

分泌タンパク質をコードする遺伝子の様々な炭素源および窒素源における制御については糸状菌で詳細に検討されており、トリコデルマ・リーセイにおけるセルラーゼおよびヘミセルラーゼの発現がその好例である。トリコデルマ・リーセイでは、セルラーゼおよびヘミセルラーゼの発現は、環境要件および栄養素の利用可能性によく適応している。複雑な植物材料を含む培地では、(ヘミ)セルラーゼ遺伝子群は協調的に誘導されるが、特異的誘導機構も知られている (Margolles - Clark 他1997)。セルロースおよびラクトースまたはソホロースなどのある種のオリゴ糖は、遺伝子の効率的インデューサーであることが知られている。グルコースの存在下では、セルラーゼおよびヘミセルラーゼの発現は異化代謝産物抑制 (カタボライト・リプレッション) 機構によって嚴重に抑制されている。セルラーゼ遺伝子発現の制御に関与するいくつかの制御因子が単離されており、これにはグルコース・リプレッサー遺伝子 cre1 およびセルラーゼ遺伝子活性化因子として機能すると仮定されてきた遺伝子 (ace1 および ace2) が含まれる (Saloheimo 他2000)。

【0006】

具体的に、ソホロースによって誘導されグルコースの存在によって抑制されない、タンパク質コード領域の上流にあるトリコデルマ・リーセイ cbh1 プロモーターのヌクレオチド配列からなる改変トリコデルマ・プロモーターが米国特許第6,001,595号に記載されている。この公報は、-184から-1、-161から-1、-140から-1および-161から-133の領域について述べている。この公報は端を切り落としたcbh1の領域について記載しているが、それらをストレス条件下での分泌タンパク質の産生に使用することは提案していない。このプロモーターは、グルコースまたはソホロースの存在下でタンパク質を産生するように設計されている。国際特許出願WO98/23642はセルラーゼ制御因子ace1およびace2について記載し、タンパク質産生の活性化因子として使用することについて記載し、因子の過剰発現によるヘミ(セルラーゼ)発現の改良を示唆している。グルコース抑制解除をもたらす改変体は、WO94/04673に記載されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、糸状菌における分泌タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルが、タンパク質合成、フォールディングまたは輸送が障害されると低下するという新規知見に基づいている。この制御機構は、タンパク質合成、フォールディングまたは輸送を妨害する化学

10

20

30

40

50

薬品（それぞれDTT、Ca²⁺ + イオノフォアA23187、プレフェルジンA）で処理した培養中、または機能的に不完全なタンパク質フォールディング系を有する菌株（遺伝子pdiaに対してアンチセンス転写物を発現する菌株）中で働いていることが立証されている。さらに、tPA（組織プラスミノゲン活性化因子）などの異種タンパク質を産生する菌株では、UPRが活性化されかつ分泌タンパク質をコードする内因性遺伝子の発現レベルが低くなることが示された。発明者は、糸状菌における分泌タンパク質の産生中にこのタイプのフィードバック制御が起きることを初めて見いだした。

【0008】

分泌タンパク質をコードする遺伝子のダウンレギュレーションまたはフィードバック制御と呼ばれるこの現象が、分泌タンパク質をコードする遺伝子またはそれらのプロモーターを選択的に制御し選ばれたタンパク質の産生を増強するために、本発明で利用される。このことは、分泌タンパク質をコードする遺伝子のプロモーター配列を遺伝子改変し、転写ダウンレギュレーションに対する反応性を変化させることによって達成される。あるいは、ダウンレギュレーションに關与する制御因子、または対応するシグナル伝達経路における因子をコードする遺伝子を、ダウンレギュレーションをなくすかあるいは増強するように改変することができる。通常は分泌ストレス下でダウンレギュレーションを受けるプロモーターの制御下で対象タンパク質の産生が行われる場合には、ダウンレギュレーション機構の不活性化が有益である。例えば、対象タンパク質の発現がダウンレギュレーションを受けないプロモーターの下で行われる場合には、ダウンレギュレーションの増強を利用して他のタンパク質の産生を抑制することができる。

【0009】

本発明では、分泌可能なタンパク質のプロモーター中に位置する特異的な制御領域すなわちDNA配列が転写のダウンレギュレーションに關与することを見いだした。

より具体的には、真菌において分泌可能なタンパク質のプロモーター中に位置するDNA配列の特徴は主に、請求項1の特徴部分に記載されている。

【0010】

分泌ストレス下で分泌タンパク質の転写ダウンレギュレーションに關与するプロモーター中のDNA配列を変異、不活性化または除去して、遺伝子のダウンレギュレーションをなくすか低下させることができる、あるいはプロモーター配列の改変により、例えばダウンレギュレーションを受ける反応性プロモーター要素を増幅することにより遺伝子のダウンレギュレーションを増強することができる。

より具体的には、分泌可能なタンパク質のプロモーターの特徴は主に、請求項6の特徴部分に記載されている。

【0011】

真菌宿主における改良されたタンパク質産生のためのプロモーターを作製する方法は、請求項10の特徴部分に記載されている。

本発明を用い、タンパク質産生に用いられるプロモーターの効率を向上することおよび/または分泌タンパク質の制御システムを操作することによりタンパク質産生に優れた菌株を設計することができる。

より具体的には、最適化されたタンパク質産生のための真菌宿主菌株は主に、請求項12の特徴部分に記載されている。

【0012】

改良されたタンパク質産生のための真菌宿主を産生する方法は主に、請求項26および27の特徴部分に記載されている。

本発明は、遺伝子の発現が非改変プロモーターの場合と同じようにはダウンレギュレーションを受けないように、同種であれ異種であれ、あるタンパク質の産生に使用される同種または異種プロモーターを改変するのに用いることができる。特に、本発明は、異種タンパク質を産生するのに有用であるが、同種タンパク質の産生にも応用することができる。

【0013】

さらに、本発明は、プロモーターのダウンレギュレーションに關与する制御因子の不活性化または活性もしくは発現を低下させるのに使用して、そのプロモーター、プロモーターに結合する制御因子あるいは反応に關与する制御因子の下でのタンパク質産生を改良することができる。

真菌において分泌可能なタンパク質の生産を最適化する方法の特徴は主に、請求項 28 および 30 の特徴部分に記載されている。

【0014】

本発明を用いる 1 つの可能性は、ダウンレギュレーションを受けないプロモーターの下で同種または異種タンパク質を発現させているときに他の同種分泌タンパク質の産生を低下させるために制御因子を過剰発現させることである。このような場合、異種タンパク質は、例えばトリコデルマ *g p d* などのプロモーターの下で発現かつ分泌され、ストレス条件において影響を受けない。同種分泌タンパク質は、ダウンレギュレートされたプロモーターの下で発現される。ダウンレギュレーションに關与するタンパク質をコードする遺伝子は過剰発現される。

10

【0015】

また真菌における最適化された分泌可能なタンパク質の生産方法の特徴は主に、請求項 31 の特徴部分に記載されている。

本発明に従って調製された DNA 配列、プロモーターまたは真菌宿主の使用法の特徴は、請求項 31 に記載されている。

本発明の他の特徴、態様および利点は、以下の説明および添付の特許請求の範囲から明らかになるはずである。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本明細書では、用語「内因性タンパク質」は、微生物宿主の本体の産物であるタンパク質を意味する。

本明細書では、「組換えタンパク質」は、微生物の本来の産物ではないタンパク質を意味する。所望の同種または異種タンパク質をコードする DNA 配列は、適切な方法によって宿主に伝達することができる。「同種タンパク質」は、同一微生物種によって産生されるタンパク質を意味する。「異種タンパク質」は、別の微生物種によって産生されるタンパク質を意味する。

30

【0017】

本明細書では、「分泌可能なタンパク質」または「分泌タンパク質」は、宿主細胞の外側、培地中に分泌されるタンパク質を意味する。

「改良されたタンパク質産生」は、タンパク質の産生が、ダウンレギュレーションを変えるための遺伝子組換えしていない真菌宿主菌株を用いた場合に比べ、少なくとも 3 %、好ましくは少なくとも 5 %、より好ましくは少なくとも 10 %、さらにより好ましくは少なくとも 20 %、最も好ましくは少なくとも 30 % 多いことを意味する。

【0018】

本明細書では、「分泌ストレス」または「分泌ストレス条件」は宿主の分泌能力が抑制されている、あるいは分泌経路に負担がかかり過ぎていることを意味する。この抑制は、例えば異種タンパク質の産生または同種タンパク質量の増加によって引き起こされる。あるいはタンパク質の合成やフォールディング、輸送等を妨害する毒素（例えば、イオノフォア、DTT またはブレフェルジン A (= BFA)) によることもある。また、この抑制は、遺伝的手段によりフォールディングまたは分泌経路を変更すること、例えばタンパク質のフォールディングまたは輸送に必要な成分の活性を増強または不活性化することによって引き起こされることもある。しかしながら、UPR と同様に、この分泌タンパク質遺伝子の転写ダウンレギュレーションの機構は、生物体が分泌タンパク質の合成とフォールディングおよび分泌能力のバランスをとるための自然の機構と考えられ、分泌同種タンパク質の合成が誘導された場合などの多くのタンパク質産生条件でも（部分的に）起こることがある。

40

50

【 0 0 1 9 】

本明細書では、「ダウンレギュレーション」、「転写ダウンレギュレーション」または「フィードバック制御」とは、タンパク質に対応する mRNA レベルが前述の細胞性応答が原因で低下することを意味する。このダウンレギュレーション効果は、分泌タンパク質をコードする mRNA レベルの遺伝子を測定することによって示された。

【 0 0 2 0 】

本発明によれば、分泌タンパク質をコードする遺伝子のダウンレギュレーションに関する DNA 配列は、分泌可能なタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター中に見いだすことができる。このことは、制御因子などの細胞機構の作用に対する応答の 1 つとして、遺伝子産物をダウンレギュレートすることができる領域をプロモーターが含んでいることを意味する。

10

【 0 0 2 1 】

前述のように、分泌ストレスの下で遺伝子のダウンレギュレーションを分析するには様々な条件を用いることができる。それらの条件には、例えば、分泌タンパク質（異種または内因性タンパク質）を過剰生産させる、DTT、BFA もしくは Ca イノフォアのような毒素を用いる、または遺伝的手段によりフォールディングまたは分泌経路を改変する（例えばタンパク質のフォールディングまたは輸送に必要な成分の活性を増強または不活性化することなど）がある。本発明では、培養を DTT、Ca イオノフォア A23187、BFA などで行うこと、異種分泌タンパク質（組織プラスミノゲン活性化因子）を発現させること、あるいは遺伝子操作（アンチセンス技法）によってフォールディング機構を低下させることによって分泌ストレスを模倣した。

20

【 0 0 2 2 】

本発明の目的上、あるプロモーターを含む宿主を（前述のような）分泌ストレス条件下で培養した場合、そのプロモーターの支配下にある mRNA 量が宿主を非分泌ストレス条件下で培養した場合に得られる mRNA 量に比べ少なければ、そのプロモーターは転写ダウンレギュレーション（すなわちダウンレギュレーション）に関与する DNA 配列を含んでいると規定される。

【 0 0 2 3 】

同様に、本発明の目的上、ある宿主を（前述のような）分泌ストレス条件下で培養した場合に得られる 1 つまたは複数の分泌タンパク質をコードする 1 つまたは複数の遺伝子の mRNA 量が、その宿主を非分泌ストレス条件下で培養した場合に少なくなれば、その宿主は転写ダウンレギュレーションすなわちダウンレギュレーションに関与する制御因子などの機構を備えていると規定される。

30

【 0 0 2 4 】

このダウンレギュレーション効果は、前述のように分泌ストレスの下で遺伝子の mRNA レベルを測定することによって判明する。本発明の目的上、1 つまたは複数の分泌タンパク質をコードする遺伝子の mRNA レベルに測定可能な変化を示すことができれば、転写ダウンレギュレーションに関与する機構に対する応答についてプロモーターまたは宿主を遺伝子改変する。言い換えれば、選択された分泌可能なタンパク質の発現（mRNA 量）を増加または低下させる。この変化は、非改変プロモーターまたは非改変宿主に比べ、好ましくは 10 % 以上、より好ましくは 20 % 以上、さらにより好ましくは 30 % 以上、最も好ましくは 50 % 以上の増加または減少である。

40

【 0 0 2 5 】

本発明の目的上、「リポーター・タンパク質」は、その発現または量を分析することができるすべての遺伝子またはタンパク質である。前述のように転写ダウンレギュレーションに関与するプロモーターまたは宿主の能力を試験する場合には、リポーター・タンパク質の mRNA レベルを分析することができる。

【 0 0 2 6 】

分泌タンパク質のダウンレギュレーションに関与する DNA 配列または領域は、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、デンプン分解酵素、ハイドロフォピン、プロテアーゼ、インベル

50

ターゼ、フィターゼ、ホスファターゼ、スウォレニン (swollenin)、およびペクチナーゼなどのタンパク質をコードする様々な遺伝子のプロモーター中に位置する。

DNA配列は、cbh1、cbh2、egl1、egl2、hfb1、hfb2、xyn1、swo、gla、amy、およびpepAのプロモーターを含む群から選択されるプロモーター中に位置していることが好ましい。

【0027】

本発明は、トリコデルマおよびアスペルギルスにより分泌されるタンパク質をコードする多くの遺伝子が転写ダウンレギュレーション機構に支配されることを示している。本発明による分泌可能なタンパク質のプロモーターは、トリコデルマ属の効率的に分泌される加水分解酵素のプロモーターであることが好ましい。プロモーターは、トリコデルマのセルラーゼまたはヘミセルラーゼのプロモーターであることがより好ましい。プロモーターは、トリコデルマのcbh1であることが最も好ましい。また、分泌可能なタンパク質のプロモーターは、アスペルギルス属の効率的に分泌される加水分解酵素のプロモーターであってもよい。プロモーターは、アスペルギルスのプロテアーゼまたはデンプン分解酵素遺伝子のプロモーターであることが好ましい。プロモーターは、gla、amyまたはpepAであることがより好ましい。

【0028】

本発明に例示するように、分泌可能なタンパク質のダウンレギュレーションに関与するDNA配列は、トリコデルマcbh1プロモーターの-162位の上流(配列番号5)に見いだすことができる。あるいは、-188位の上流(配列番号2)、-211位の上流(配列番号3)、-341位の上流(配列番号4)、-391位の上流(配列番号1)、-501位の上流(配列番号8)、-741位の上流(配列番号9)、-881位の上流(配列番号10)に見いだすことができる。しかしながら、それらは-1031位の下流(配列番号11)、-1201位の下流(配列番号7)、または-1281位の下流(配列番号6)に位置しているようである。したがって、cbh1プロモーター中の分泌可能なタンパク質のダウンレギュレーションに関与するDNA配列は、ヌクレオチド-1031と-162の間に位置しているようである。最も重要な領域はヌクレオチド-211と-341の間および-501と-1031の間である。

【0029】

本発明の一実施形態によれば、分泌可能なタンパク質のプロモーターは、ダウンレギュレートされないように、またはダウンレギュレーションが軽減されるように遺伝子改変される。

【0030】

本発明に従って改変されたプロモーターでは、分泌タンパク質のダウンレギュレーションに関与するDNAの効果は様々な変異方法によって減少し、または配列が不活性化もしくは除去されることがある。例えば、分泌可能なタンパク質のダウンレギュレーションに関与するDNA配列が除去されたプロモーターは、トリコデルマcbh1プロモーターの-501の上流、-188の上流、-211の上流、-341の上流、-391の上流、-162の上流、-881の上流および-741の上流のヌクレオチドを欠くプロモーターで、それぞれ(配列番号16)(配列番号17)(配列番号18)(配列番号119)(配列番号20)(配列番号21)(配列番号22)(配列番号23)にあたる。

【0031】

本発明に従って改変された別のプロモーターでは、標準的な分子生物学の方法を用い、ダウンレギュレーションに関与することを担う配列を増幅することによって分泌タンパク質のダウンレギュレーションに関与するDNAの効果を増すことができる。

分泌可能なタンパク質の最適化された産生のため、分泌タンパク質をコードする遺伝子の分泌ストレスの下での転写をダウンレギュレートする機構を遺伝子改変した真菌宿主菌株を構築することができる。

【0032】

本発明の一実施形態によれば、本発明の真菌宿主菌株は、分泌タンパク質のダウンレギ

10

20

30

40

50

ユレーションに關与するDNAの効果が減少もしくは除去されたプロモーター、または分泌タンパク質のダウンレギュレーションに關与するDNAの効果が増加したプロモーターを有することができる。

【0033】

本発明の一実施形態によれば、真菌宿主中での転写ダウンレギュレーションに關与する制御因子の発現を遺伝子改変することができる。所望ならば、制御因子の発現を軽減もしくはなくすこともできるし、制御因子の発現を増加させることもできる。

【0034】

本発明は、細胞外分泌タンパク質をコードする多くの遺伝子が、この制御機構を明らかにするために用いられた条件下では、転写的にダウンレギュレートされていること、分泌タンパク質をコードする遺伝子は、ほとんど全部ではないとしても多くがこの転写ダウンレギュレーションの下にあることを示している。制御機構の下にある遺伝子、プロモーターおよびタンパク質は、セルラーゼ（セロビオース加水分解酵素、エンドグルカナーゼおよび - グルコシダーゼなど）、ヘミセルラーゼ（キシラナーゼ、マンナーゼ）、 - キシロシダーゼなど、およびアラビノシダーゼ、グルクロニダーゼ、アセチル・キシラン・エステラーゼなどの側鎖切断酵素）、デンプン分解酵素（ - アミラーゼ、グルコアミラーゼ、ブルラナーゼ、シクロデキストリナーゼなど）ハイドロフォビン、プロテアーゼ（酸性プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、アスペルギロペプシン）、インベルターゼ、フィターゼ、ホスファターゼ、様々なペクチナーゼ（エンドおよびエキソポリガラクトナーゼ、ペクチン・エステラーゼ、ペクチンリアーゼおよびペクチン酸性リアーゼ）およびリグニナーゼ（リグニン・ペルオキシダーゼ、Mnペルオキシダーゼ、ラッカーゼなど）を含む群から選択することができる。

【0035】

制御機構は、遺伝子cbh1、cbh2、egl1、egl2、hfb1、hfb2、xyn1、swa、glu、amy、およびpepAによってコードされるタンパク質を含む群から選択されるタンパク質の転写ダウンレギュレーションに關与している。

例えば制御因子はace1遺伝子によってコードされているものであるが、ace1以外の因子もこのダウンレギュレーションに關与している。このことは、実施例の、ace1がすべての培養条件で制御（の主要部）を担っていないという事実によって示される。

【0036】

制御機構は、トリコデルマ属の加水分解酵素を制御するものであることが好ましい。トリコデルマのセルラーゼまたはヘミセルラーゼを制御していることがより好ましい。制御因子は、アスペルギルス属の加水分解酵素を制御するものでもよい。アスペルギルスのプロテアーゼまたはデンプン分解酵素を制御していることが好ましい。

【0037】

本明細書では、「真菌産生宿主」は、所望の産物を効率的に産生するために選択または遺伝子改変されたいかなる真菌宿主菌株も意味し、例えば分析的、医学的または工業的用途のタンパク質産生に有用である。宿主菌株は、目的産物を効率的に産生するために遺伝子工学的手段によって改変された組換え菌株であることが好ましい。

【0038】

本発明はここではトリコデルマおよびアスペルギルスの2つの真菌で例示し、転写のダウンレギュレーション機構の一般的性質を示す。他の真菌でもこの機構の改変はタンパク質産生の改良に有用なはずである。

【0039】

本発明の真菌宿主菌株は、アスペルギルス属、トリコデルマ属、ニューロスポラ属、フザリウム属、ペニシリウム属、フミコラ属、トリボクラジウム（*Tolyposcladium*）属、シュワニオマイセス（*Schwanniomycetes*）属、アルクスラ（*Arxula*）属、トリコスポロン属、クルイベロマイセス（*Kluyveromyces*）属、ピキア属、ハンゼヌラ属、カンジダ属、ヤロウィア（*Yarrowia*）属、スキゾ

10

20

30

40

50

サッカロミセス属およびサッカロミセス属を含む群から選択することができる。宿主は、トリコデルマまたはアスペルギルス属、例えばトリコデルマ・ハルジアナム(*T. harzianum*)、トリコデルマ・ロンギブラキアタム(*T. longibrachiatum*)、トリコデルマ・ピリデ(*T. viride*)、トリコデルマ・コニングー(*T. koningii*)、アスペルギルス・ニデュランス(*A. nidulance*)、アスペルギルス・テレウス(*A. terreus*)、アスペルギルス・フィクム(*T. ficum*)、アスペルギルス・オリザエ(*A. oryze*)およびアスペルギルス・アワモリ(*A. awamori*)に属していることが好ましい。宿主は、トリコデルマ・リーセイ(ヒポクレア・ジェコリナ(*Hypocrea jecorina*))またはアスペルギルス・ニガーに属していることが最も好ましい。

【0040】

10

真菌における分泌可能なタンパク質の最適化されたタンパク質産生のための方法は、

- 分泌可能なタンパク質をコードする遺伝子を選択する工程、
- 分泌ストレスの下で分泌タンパク質の転写ダウンレギュレーションに関与する機構に応じて遺伝子のプロモーターを遺伝子改変する工程、
- 真菌宿主においてプロモーターの制御の下で所望の分泌可能なタンパク質を産生する工程、および
- 宿主の培地からタンパク質産物を回収する工程を含む。

【0041】

本発明によれば、真菌における分泌可能なタンパク質の最適化されたタンパク質産生のための方法は、

20

- 適切な培地中で上記で定義した真菌宿主を培養する工程、および
- 培地からタンパク質産物を回収する工程を含む。

【0042】

タンパク質産物は、細菌または高等もしくは下等真核生物に由来するいかなる産物であってもよく、タンパク質産物は、真菌または哺乳類起源に由来してもよい。タンパク質産物は、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、デンプン分解酵素、ハイドロフォビン、プロテアーゼ、インベルターゼ、フィターゼ、ホスファターゼ、ペクチナーゼなどの加水分解酵素であってもよく、または免疫グロブリンまたはt P Aなどのいかなる哺乳類タンパク質であってもよい。

【0043】

30

本発明の一実施形態によれば、タンパク質産物を転写ダウンレギュレーションを受けにくいプロモーターから発現させ、その他の望ましくないタンパク質は、ダウンレギュレーションによって制御されるプロモーターから発現させることができる。ダウンレギュレーションを増強することにより、生産を転写ダウンレギュレーションを受けにくいプロモーターから発現されるタンパク質産物にふりむけることができる。このようなプロモーターはg p dなどの構成性プロモーターであってもよい。

【0044】

真菌における分泌可能なタンパク質の最適化されたタンパク質産生のための方法は、

- 分泌可能なタンパク質をコードする遺伝子を選択する工程、
- 転写ダウンレギュレーションの機構によって制御不可能なプロモーター中に、選択された分泌可能なタンパク質のコード領域を動作可能に連結する工程、
- 適切な培養条件の下で真菌宿主を培養し、真菌宿主においてダウンレギュレーションに関与するタンパク質を過剰産生する工程、および
- 宿主の培地から選択された分泌可能なタンパク質を回収する工程を含む。

40

【0045】

選択された分泌可能なタンパク質は異種タンパク質で、望ましくない分泌可能なタンパク質は同種タンパク質であることができる。

本明細書では、「プロモーターを遺伝子改変してダウンレギュレーションによって制御可能または制御不可能にすること」とは、当技術分野でよく知られている適切な従来型または分子生物学の方法、すなわち部位特異的突然変異誘発または欠失などのDNA技法や

50

は化学薬品もしくは放射線を用いる従来の突然変異誘発などによりプロモーターを改変し、非改変プロモーターと違ってダウンレギュレーションによって制御される、または制御されないようにし、続いて転写ダウンレギュレーション機構が改変された細胞をスクリーニングまたは選択することを意味する。本発明では、トリコデルマ *c b h 1* プロモーターの部分に欠失させることによってダウンレギュレーションによって制御されないようにする遺伝子組換えを例示した。

【 0 0 4 6 】

本明細書では、「分泌ストレス下でのダウンレギュレーションに関与するタンパク質をコードする遺伝子を遺伝子改変すること」とは、遺伝子を当技術分野でよく知られている適切な従来型または分子生物学の方法により改変して、遺伝子の過剰発現または不活性化、あるいは発現の活性を変化させることを意味する。改変は、部位特異的突然変異誘発または欠失などの組換え DNA 技法により行われることが好ましいが、望ましい特性を持つ細胞との交雑または融合などの遺伝子改変のその他の方法を使用することも可能であり、または化学薬品もしくは放射線を用いる従来の突然変異誘発によりおこない、続いて転写ダウンレギュレーション機構が組み換えられた細胞をスクリーニングまたは選択する。

【 0 0 4 7 】

我々は、糸状菌に分泌ストレスに反応して分泌タンパク質をコードする遺伝子のダウンレギュレーション機構が存在することを立証した。真菌のトリコデルマ・リーセイおよびアスペルギルス・ニガーでの例を示す。タンパク質合成、フォールディングまたは輸送を妨害する化学薬品で処理した真菌培養を分析することにより、またはフォルダーゼ・レベルの低下を示す真菌株を分析することにより、新規な制御機構の証拠が得られた（実施例 1、2、3、4 および 5 を参照）。さらに、異種タンパク質を産生する菌株では、内因性分泌タンパク質をコードする遺伝子はそれらの親菌株に比べて低レベルで発現される（実施例 6 を参照）。真核生物系では、近年、ER の内腔の状態を感知し、分泌ストレスに応答して攪乱を軽減できる 2 つのフィードバック機構が報告されている。それらは UPR 経路（Shamu 他、1994）および翻訳開始の減衰（アテニュエーション）（Harding 他、1999）である。我々の新規な知見には、分泌ストレスの下で機能する 3 番目のタイプのフィードバック制御機構が含まれ、それが特定の遺伝子のプロモーター配列によって仲介されることが *c b h 1* プロモーター配列の下での *lac Z* 発現からなるリポーター遺伝子系を用いて示される（実施例 7 および 8）。

【 0 0 4 8 】

得られた結果に基づき、トリコデルマにおいて分泌タンパク質をコードする遺伝子のダウンレギュレーションに関与するプロモーター領域の性質を明らかにすることができる。関与するプロモーター領域は、例えば様々な程度の欠失のある *c b h 1* プロモーターの下で細胞外タンパク質をコードする遺伝子の mRNA レベルがダウンレギュレートされる条件、例えば DTT による処理を用い、*lac Z* リポーター遺伝子発現を検討することによって見つけだすことができる。この分析に基づき選択されたプロモーター領域を、ストレス下および非ストレス下（例えば、DTT 処理および非処理）にある培養からの細胞抽出物と一緒に用いてゲル・シフト法を行い、さらに詳細に特異的領域を特定し、制御因子にとって可能な結合部位の特徴を明らかにすることができる。プロモーター配列を比較することにより、ストレス条件に影響を受ける他のプロモーター中でダウンレギュレーションに関与している配列を特定することができる。本明細書に記載の方法または当技術分野で知られている方法を用い、どのような生物体、どのようなプロモーターでも、分泌タンパク質をコードする遺伝子からこの転写ダウンレギュレーションに応答する領域を特定することが可能である。

【 0 0 4 9 】

フィードバック制御に関与しプロモーター配列に結合する制御タンパク質のクローニングおよび性質解明は、*c b h 1* プロモーター中（およびダウンレギュレーションを示す他の関連遺伝子中）で特徴の明らかになったプロモーター要素を利用し、例えば酵母ワンハイブリッド（*yeast-one hybrid*）系を用いて行うことができる。DNA

結合タンパク質のクローニングに適用できるシステムは市販されている（例えば、ClontechのMatchmaker（商標））ものや報告されている（例えば、Salohimo他2000）ものがある。

【0050】

遺伝子のダウンレギュレーションに関与していることが判明したプロモーター配列は、ストレス条件におけるダウンレギュレーションが消滅または軽減されるように改変することができる。これらの手段により、そうでなければダウンレギュレートされると思われる条件下で遺伝子の産生レベルを増加させることが可能であり、改変プロモーター（ダウンレギュレートする配列が改変された）の下での同種あるいは異種遺伝子産物の産生を改良することができる。さらに、ダウンレギュレーションに関与する制御因子を完全または部分的に不活性化し、タンパク質産生を改良することができる。分泌タンパク質をコードする遺伝子のダウンレギュレーションを有することが知られているいかなる生物体、例えば他の種類の真菌、好ましくは他の種類の糸状菌について同様の手法を利用することができる。

10

【0051】

異種タンパク質の産生は、例えば、化学薬品DTT、BFAまたはA23187による処理と類似したタイプのストレス反応を引き起こすことがある。例えば、ヒト組織プラスミノゲン活性化因子を産生するトリコデルマ・リーセイはtPAの産生中には培養の内因性セルラーゼ転写物のレベルが低いことが観察され（実施例6）、egl1およびcbh1をコードする遺伝子のダウンレギュレーションを示す。内因性細胞外タンパク質をコードする遺伝子のプロモーターが、ストレス反応を惹き起こす異種産物の発現または同種産物の過剰発現のために使用される場合には、その内因性細胞外タンパク質の発現は、産生中に転写ダウンレギュレーションに関与するフィードバック制御の対象になることがある。プロモーターエレメント、またはプロモーターに結合するか制御シグナルに関与する制御因子を改変することは、ダウンレギュレーション・プロセスを消滅させることによってタンパク質産生を増加させるための手段である。

20

【0052】

場合によっては、分泌ストレス中にダウンレギュレーションを増強して一部の内因性タンパク質の産生を減少させたり、分泌ストレス中にダウンレギュレートしないプロモーターの下で対象タンパク質を産生することが有益なことがある。このことは、ダウンレギュレーションに関与する制御因子を過剰発現させることおよび/または抑制性制御因子の結合を増すためにプロモーターを改変すること、例えば因子の結合部位数を増やすことによって達成することができる。本発明は、分泌タンパク質遺伝子の発現がダウンレギュレートされるときに、プロモーターがダウンレギュレートされない遺伝子を特定することができる一方法について、トリコデルマ・リーセイgpdプロモーターを例にあげて記載している。

30

【0053】

これらの手段により、分泌タンパク質をコードする遺伝子を選択的に制御し、産生プロモーターのダウンレギュレーションを減少または不活性化することにより選択されたタンパク質の産生を増強し、またはダウンレギュレーションを増強して他の分泌タンパク質の発現を選択的に抑制することが可能である。本発明はタンパク質生産に利用できるばかりでなく、本明細書に記載の転写ダウンレギュレーションの機構は他の目的で真菌株を改変して宿主において特定の望ましくないまたは望ましいタンパク質の発現を選択的に制御するための手段を提供することを言うておく必要がある。

40

【実施例1】

【0054】

トリコデルマ・リーセイRut-C30培養におけるCa²⁺イオノフォアA23187、ジチオスレイトール（DTT）およびブレフェルジンA（BFA）の効果
<RNAおよびタンパク質のサンプリング、代謝標識および分析に使用するトリコデルマ菌株、培養条件および方法>

50

トリコデルマ菌株および培養条件は基本的に別の場所に記載されている (Pakula 他 2000; Ilmen 他 1996)。トリコデルマ・リーセイ Rut-C30 株 (Montenecourt & Eveleigh, 1979) は、炭素源としてラクトース 20 g l^{-1} を含有する最少培地 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7.6 g l^{-1} 、 KH_2PO_4 15.0 g l^{-1} 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g l^{-1} 、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g l^{-1} 、 CoCl_2 3.7 mg l^{-1} 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg l^{-1} 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 mg l^{-1} 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.6 mg l^{-1} 、 KOH で pH を 5.2 に調整) で培養した。 2×10^7 個の胞子を含む胞子懸濁液 (20% グリセロール中 -80 で保存) を培地 200 ml に接種し、210 rpm で振盪しながら 28 において振盪フラスコ中で培養した。4 日間の培養後、培養を新鮮な培地で 10 倍希釈し、さらに 24 時間培養し、10 mM ジチオスレイトール (DTT)、50 $\mu\text{g/ml}$ ブレフェルジン A (BFA) または 5 μM Ca^{2+} イオノフォア A23187 で処理した。無処理対照培養には保存原液の溶媒を同じ量だけ加えた (A23187 および BFA 処理についてはそれぞれ対照培養に 0.2% および 0.5% DMSO、および DTT 処理については対照に 2 回 (2 段) 蒸留水を使用)。様々な時点でタンパク質の代謝標識および RNA 単離のために培養を分割した。

【0055】

(Pakula 他 2000) に記載の方法を用い、 ^{35}S -メチオニンでタンパク質を代謝標識した。サンプルの調製および標識タンパク質の分析は、基本的に (Pakula 他 2000) にあるように行った。標識実験は、DTT または A23187 の添加後 10 分、または BFA 添加後 15 分に開始した。 [^{35}S]-メチオニン (Amersham SJ1015、in vivo 細胞標識等級、1000 Ci mmol $^{-1}$ 、10 $\mu\text{Ci } \mu\text{l}^{-1}$) 1 mCi を、培養を 50 ml 取り分けたものに加えた。無処理培養は並行して同様に標識した。経時的にサンプル 2 ml を採取した。細胞抽出物および培養上清中の総標識タンパク質は、サンプル中の TCA 不溶物のシンチレーション計数によって測定し、標識された特定のタンパク質 (例えば、CBHI) は、2D ゲル電気泳動を用いて分析し、タンパク質を PhosphorImager (Molecular Dynamics) を用いて定量した。タンパク質合成および分泌の速度、ならびに平均合成時間および最小分泌時間は、Pakula 他 2000 に記載のように決定した。

【0056】

ノーザン分析については、DTT、BFA または A23187 で処理した培養および無処理対照培養から処理後 0、15、30、60、90、120、240 および 360 分に菌糸体サンプルを採取した。一番目のサンプル (時点 0) は、DTT、BFA または A23187 の添加直後に採取した。菌糸体を濾過し、等容積の 0.7% NaCl で洗浄し、液体窒素中で直ちに凍結し、-80 で保存した。総 RNA は、基本的に製造者の使用説明書に従い Trizol (商標) (Gibco BRL) を用いて単離した。ノーザン・ブロッティングおよびハイブリッド形成は、標準の手順 (Sambrook 他) に従って行った。プローブとして遺伝子の完全長 cDNA を用いた。

【0057】

<トリコデルマ・リーセイにおけるタンパク質合成および輸送に対する A23187、DTT および BFA の効果>

分泌タンパク質をコードする遺伝子のフィードバック制御を、他の生物体においてタンパク質合成、フォールディングまたは輸送を妨害することが知られている薬剤で処理した培養で検討した。 Ca^{2+} イオノフォア A23187 は、哺乳類細胞においてタンパク質合成を低下させるばかりでなく、ER の Ca^{2+} 貯蔵を空にすることによってタンパク質のフォールディングおよび輸送を阻害することが報告されている (Bronstrom 他 1989、Lodish および Kong、1990、Lodish 他 1992)。ジチオスレイトールは、酵母および哺乳類においてジスルフィド架橋の形成およびタンパク質のフォールディングを阻害する還元剤である (Jamsa 他 1994、Alberini 他 1990、Braakman 他 1992)。BFA による細胞の処理は、例えば哺乳類で

はゴルジ構造を崩壊し、E Rからゴルジへのタンパク質の輸送を阻害することが知られているが、その作用は、生物体および特定の細胞タイプによって異なる (Pelham、1991、ShahおよびKlausner、1993)。

【0058】

タンパク質の代謝標識を用い、トリコデルマ・リーセイ培養におけるタンパク質合成および分泌に対するA23187、DTTおよびBFAの効果について特徴を明らかにした (用いた方法についてはPakula他2000を参照)。

標識メチオニンの添加前に、5 μ M A23187もしくは10 mM DTTで10分間または50 μ g/ml BFAで15分間、培養を処理した。標識総タンパク質ならびに標識された特定のタンパク質を、標識実験の様々な時点で細胞抽出物および培養上清で分析した。

10

【0059】

総タンパク質合成の速度および総タンパク質分泌の速度は、細胞抽出物および培養上清において時間単位当たりTC A不溶物中に取り込まれた放射能の量として測定した (図1、TC A不溶物中の放射能はバイオマス乾燥重量1 mg当たりで示し、時点0分は、標識メチオニンの添加に当たる)。速度は、処理の初めの15 ~ 45分間に測定された値から推定した。DTTまたはBFAの存在下では、総タンパク質合成の速度は影響を受けなかったが、イオノフォアによる処理は、対照細胞の速度の51%までタンパク質合成速度を低下させた。細胞外標識タンパク質の産生は、DTTまたはBFAで処理した培養中でありかなり効率的に阻害された。これらの培養では、総標識タンパク質の培地中への分泌速度は、対照細胞の速度の5%に過ぎなかった。さらに、BFA処理培養では、細胞外タンパク質の産生は、対照培養に比べて顕著に遅くなった。イオノフォアA23187で処理した培養では、標識タンパク質の培地への産生速度は、無処理培養における速度の23%まで低下した。タンパク質合成および分泌の速度を表1に要約して示す (表1では、速度の値は、無処理対照培養における値のパーセントとして示す)。この結果は、DTTおよびBFAはタンパク質合成を妨害しないが細胞からのタンパク質輸送を遮断し、一方A23187はタンパク質合成に対する阻害効果も有していることを示唆している。

20

【0060】

細胞外タンパク質の合成、具体的にはタンパク質の輸送に対する処理の効果を、モデルタンパク質として真菌類によって産生される主要なセロビオヒドロラーゼI (CBHI)を用いて検討した。タンパク質の合成および分泌ならびに輸送中のタンパク質のpIパターン変化は、2Dゲル電気泳動を用いてモニターした (Pakula他2000に記載のように; 図2は、各パネルの左から右へ約3.5 ~ 4.5のpH範囲において2Dゲルで分析した標識実験の様々な時点における標識CBHIを示す)。DTTまたはBFAで処理した培養から調製した細胞抽出物では、まさに最初の新生pI型のみが検出でき、タンパク質が生合成経路内では完全には翻訳後修飾されないことを示している。DTT処理培養では、培地中への標識CBHIの産生は一切検出されず、BFA処理培養では、標識実験の末期に微量のCBHIが分泌されたに過ぎなかった (産生速度は、対照培養で測定された速度の4%であった)。この結果は、これらの条件では、不均一なpIをもたらす修飾が行われるコンパートメントにタンパク質が到達する前に、タンパク質の輸送が遮断されることを示唆している。しかしながら、BFA処理培養の培地中で検出された微量のCBHIは完全なpIパターンを獲得しており、タンパク質のごく一部は修飾され輸送されるが、完全に処理された形のタンパク質の量があまりに少ないために細胞抽出物中に検出されないことを示している。タンパク質輸送に対するイオノフォアA23187による処理の効果は明確ではなかった。CBHIのpI型の全パターンの形成は、対照細胞に比べて15 ~ 20分遅くなり、pI型パターンが全部揃ったCBHIは培地中に分泌されたが遅延していた。

30

40

【0061】

標識実験の様々な時点における細胞抽出物および培養上清のサンプルからの標識CBHIを2Dゲル中で分析し、PhosphorImager (Molecular Dyn

50

am i c s) を用いて定量した。C B H I の合成および分泌速度 (時間単位当りに産生した標識タンパク質の量) ならびに C B H I の平均合成時間および最小分泌時間などのパラメータを決定した (方法については P a k u l a 他 2 0 0 0 を参照) 。図 3 には標識実験中の標識 C B H I の定量結果を示し、これらの条件における C B H I の合成および分泌をあらわす推定パラメータを表 1 に要約して示す。D T T および B F A 処理培養では完全長 C B H I の平均合成時間は影響を受けず、これはこれらの処理によって総タンパク質合成が影響を受けないという結果 (上記参照) と合致している。B F A 処理培養で測定された分子の最小分泌時間は 1 1 分から 6 9 分に増加し、D T T 処理培養ではこの条件下で産生された細胞外タンパク質は極めて少量であるためにパラメータを決定できなかった。イオノフォア A 2 3 1 8 7 で処理した培養では、C B H I 合成ならびにタンパク質の輸送が影響を受けた。対照培養に比べ A 2 3 1 8 7 で処理した培養中での C B H I の最小分泌時間は 1 0 分増加し、C B H I の合成時間は対照培養中よりも 3 ~ 4 分長かった。

【 0 0 6 2 】

驚いたことに、D T T または B F A による処理は、総タンパク質合成の速度を低下させるか C B H I 分子の合成に必要な時間を延ばすことはなかったが、D T T または B F A 処理培養中では C B H I 合成の速度 (時間単位当りに合成された標識 C B H I の量) が低下することが見いだされた (表 1 では、速度は、対照培養で測定された値のパーセントとして示す) 。C B H I 合成速度は、D T T 処理培養では対照培養中で測定された速度の 4 ~ 2 4 % であり、B F A 処理培養中では 5 2 % であった。合成された C B H I の大部分は細胞内に残る。培地中への C B H I 産生の速度は D T T 処理培養中では測定できず、B F A 処理培養では対照培養中で測定された速度の 4 % であった。イオノフォア A 2 3 1 8 7 で処理した培養では、C B H I 合成の速度は、総タンパク質合成速度より大きな影響を受けた。C B H I 合成の速度は、対照細胞中で測定された速度の 2 6 % であり、総タンパク質合成速度は 5 1 % であった。培地中へのタンパク質分泌速度は、C B H I の合成速度と同程度に低下した (対照培養中で測定された速度の 2 7 %) 。

【 0 0 6 3 】

この結果は、B F A または D T T による処理はトリコデルマにおけるタンパク質輸送を明らかに妨害し恐らく E R からのタンパク質輸送を妨げるが、A 2 3 1 8 7 による処理はタンパク質輸送にわずかな遅れを引き起こすに過ぎないことを示している。D T T または B F A で処理した培養では、総タンパク質合成活性は影響を受けないが、分泌モデルタンパク質の C B H I の合成速度は、タンパク質輸送の障害と同時に特異的に低下した。A 2 3 1 8 7 処理培養では、総タンパク質合成速度の明らかな低下が測定されたが、C B H I の合成速度は、総タンパク質合成に対する効果に比べてより大きな影響を受けた。

【 0 0 6 4 】

【表 1】

トリコデルマ・リーセイにおけるタンパク質合成および分泌に対する
A23187、DTTまたはBFAによる処理の効果
(n. d. =検出されず)

	総タンパク質 合成速度	総タンパク質 分泌速度	CBHI 合成速度	CBHI 分泌速度
無処理細胞	100%	100%	100%	100%
A23187	51%	23%	26%	27%
BFA	100%	5%	52%	4%
DTT	105%	5%	4-24%	n.d.

	CBHI 合成の 平均時間	CBHI の最小 分泌時間
無処理細胞	5.7 min	11 min
A23187	9 min	21 min
BFA	4.6 min	69 min
DTT	4.3 min	n.d.

【 0 0 6 5 】

< Ca^{2+} イオノフォア A23187、DTTまたはBFAで処理したトリコデルマ・リーセイにおけるUPR反応に關与するフォルダーゼPDI、シャペロンBIP、および転写因子HAC1をコードする遺伝子の転写物レベル>

A23187、DTTまたはBFAによる処理中に採取したサンプルのノーザン分析を行い、転写レベルにおける処理の効果について検討した。また、DTTまたはBFAで処理した培養中のタンパク質輸送およびフォールディングにおける妨害は、pdiおよびbip1遺伝子の誘導(図4、pdiについての結果はすでに報告されている; Saloheimo他1999)および、活発に翻訳されてUPR反応に關与する短形のhac1転写物の発現(図5は、各時点における全hac1シグナルで正規化した短形および長形の転写物のシグナルを示す)が示すように、アンフォールド反応(UPR)経路の活性化として現れた。A23187処理培養では、タンパク質輸送はわずかに影響を受けたに過ぎず、合成されたタンパク質の総量は減少した。これらの条件では、pdiおよびbip1の誘導は観察されなかった(図4)。しかしながら、短形のhac1 mRNAの一過性かつ弱い発現がA23187処理細胞で観察され、UPR経路に対する若干の効果を示している(図5)。

【 0 0 6 6 】

Ca^{2+} イオノフォア A23187、DTTまたはBFAで処理したトリコデルマ・リーセイ培養における内因性分泌タンパク質をコードする遺伝子の転写物レベル

DTTまたはBFA処理培養では、無処理対照細胞に比べてCBHI合成速度は低下したが、これらの条件下では総タンパク質合成は影響を受けなかった。A23187処理培養では、CBHIの合成は、処理培養中の総タンパク質合成に比べて大きく妨げられた。薬物で処理した培養から調製したサンプルのノーザン分析は、cbh1のmRNAレベルが処理中に顕著に低下したことを示した(図6、処理の様々な時点でgpdのシグナルで正規化したcbh1シグナル)。mRNAレベルの低下は、標識実験におけるタンパク質の合成速度の低下を少なくとも部分的には説明するように見える。DTTおよびA23187処理培養では、遺伝子のmRNAレベルの低下の動態はRNAの測定半減期に対応し

た。BFA処理培養では、低下は若干少なめであった。同様の低下は、処理中のegl1 mRNAレベルで観察された(図6、処理の様々な時点でgpdのシグナルで規格化したシグナル)。さらに、DTT処理培養のサンプルについて、より広範囲な遺伝子についてノーザン分析を行った。細胞外タンパク質をコードする様々な他の遺伝子、例えばxyn1およびhfb2の転写物レベルが低下し(図7)、細胞外タンパク質をコードする多くの遺伝子が、タンパク質の合成、フォールディング、または輸送に制限がある時にはフィードバック制御の下にあることを示している。

【0067】

また、ダウンレギュレーションは、真菌類によって発現されるすべての遺伝子に影響を及ぼすわけではないが、細胞外タンパク質をコードする遺伝子の群には共通していることは明らかである。UPRの制御下にアップレギュレートされる遺伝子に加え、ダウンレギュレートされない遺伝子がいくつか見いだされた(図8)。興味深いことに、細胞内グルコシダーゼをコードするbg11は真菌類が利用できる炭素源に応じてセルラーゼと同様な制御を受けるにもかかわらず、これらの条件下ではbg12のmRNAレベルは低下しない。小胞輸送で機能するタンパク質をコードする遺伝子、例えばsar1(Veldhuisen他1997)およびypt1の発現レベルは、DTTによる処理によって影響を受けなかった(Salohelim他投稿中)。その発現がDTT処理によって明らかには影響を受けないその他の遺伝子は、例えばcDNA1およびgpd(グリセルアルデヒド-6-P-デヒドロゲナーゼ)である。このgpdシグナルをノーザン分析でのシグナルの正規化に用いた。

【実施例2】

【0068】

DTTで処理したアスペルギルス・ニガーの培養における内因性分泌タンパク質をコードする遺伝子の転写物レベル

<アスペルギルス・ニガー菌株、培養条件およびRNAのサンプリングおよび分析に使用する方法>

実験で使用するアスペルギルス・ニガー菌株は、AB4.1(van Hartingsveldt他、1987)およびAS1.1(Ngiam他、2000)とした。0.1% Tween 20(Sigma、UK)に再懸濁した胞子を、最終密度が培地1ml当たり 1×10^5 個となるよう液体培地に接種した。菌株はポテト・デキストロース寒天斜面(Difco、USA)上で維持した。アスペルギルス・ニガーAB4.1の場合には、10mMウリジンを培地に追加した。胞子を形成するまで30で斜面培養し、実験毎に更新した。液体培養に関するすべての実験にはACMS/N/P培地(Archer他、1990)を使用した。アスペルギルス・ニガーAB4.1培養にはやはり10mMウリジンを追加した。培養は、50ml三角フラスコ中の培地100ml中、25、150rpmで培養した。DTTストレス実験では、AB4.1培養を44時間培養してから2MのDTT 1mlを加え、最終濃度20mMとした。対照AB4.1培養には等容積の水を加えた。培地交換実験では、培養はACMS/N/P中で25および150rpm 44時間行った。Miracloth(CalBiochem、USA)により菌糸体を収集し、25に温めておいた炭素源を含まない培地100mlで2回洗浄した。次いで、あらかじめ温めておいた、必要に応じて添加物を加えたACMX/N/P 100mlを入れたフラスコに菌糸体を移し、前と同じ条件でインキュベーションを続けた。ACMX/N/Pは、1リットル当たり可溶性デンプン10gの代わりに1リットル当たりキシロース10gを含有するという点でACMS/N/Pとは異なる。

【0069】

2層のMiraclothにより菌糸体を収集し、液体窒素中で瞬間冷凍した。次いで、液体窒素中で菌糸体を粉碎して細かい粉末とし、Edwards Modulyo凍結乾燥器中で2日間凍結乾燥した。凍結乾燥器中で乾燥すること2日後、次いでさらに1日後に菌糸体の重量を測定して乾燥重量を決定した。この期間に重量の減少が一切観察されない場合には、培養物は完全に乾燥していると見なした。

【0070】

総RNAは、製造者の使用説明書に従ってRNeasy Plant Mini Kit (Qiagen、UK)を用い、凍結乾燥し粉碎した菌糸体100mgから抽出した。Uvikon 850分光光度計 (Kontron Instruments、UK)で230、260および280nmにおける吸光度を読み取ることによってRNAを定量した。260nm:280nmの読み取り値の比が2.0を超えれば良質のRNAを示していると思われた。また、7%ホルムアルデヒド・ゲル (Sambrook他、1989)上でサンプルを泳動することによってRNAの品質を評価した。ノーザン・ブロッティングの場合には、1レーン当たりRNA10μgを7%ホルムアルデヒド・ゲル上で電気泳動した (Life Technologies Horizon 11-14サブマリン・ゲル電気泳動タンク、25V、6時間、MOPS泳動バッファー (Sambrook他、1989))。サンプルは、Sigma RNAローディング・ダイ (Cat. # R4268)を用いて調製した。電気泳動後、DEPC処理水 (Sambrook他、1989)で20分間づつ5回、ゲルを洗浄し、次いで50mM NaOH中に10分間浸漬した。Hybond XLナイロン膜 (Amersham Intl. UK)への転写は、製造者の使用説明書に従って転写用バッファーとして10×SSC (Sambrook他、1989)を用い、Appliceneバキューム・プロッターを用いて行った。転写時間は2.5時間とした。転写後、プロットを50mM NaOH中に5分間浸漬し、次いで2×SSC中で30秒間洗浄してから一夜空気乾燥した。

10

【0071】

ノーザン・プロットのためのプローブは、製造者の使用説明書に従ってMegaprime 標識キットおよび γ -³²P dATP (どちらもAmersham Intl.、UK)を用いて標識した。glcAプローブは、アスペルギルス・ニガー・グルコアミラーゼ遺伝子 (Boel他、1984)の配列中の座標+1059から+1696に対応する637bp断片とした。アクチン・プローブは、アスペルギルス・ニゲラのアクチン遺伝子 (Fidel他、1988)中の座標+889から+1654に対応する765bp断片とした。pdiAプローブは、アスペルギルス・ニゲラのpdiA遺伝子 (Ngiam他、1997)の配列中の座標+63から+365に対応する303bp断片とした。pepAプローブは、アスペルギルス・アワモリのアスペルギロペプシン遺伝子 (Berka他、1990)中の座標+1186から+1631に対応する445bp断片とした。bipAプローブは、アスペルギルス・ニゲラのbipA遺伝子 (van Gemeren他、1997)の座標+712から+1156に対応する445bp断片とした。すべてのプローブは、アスペルギルス・ニゲラのゲノムDNAからPCRによって増幅し、Qiagquickゲル抽出キット (Qiagen、UK)を用いてアガロース-TAEゲルから精製した。

20

30

【0072】

プローブDNAを加える前に、Hyb9ハイブリダイゼーション溶液 (Puregene、USA)中30分間、65℃においてプロットを予備交雑した。次いで、65℃において一夜、ハイブリダイゼーションを行った。プロットは、2×SSC、0.1%SDS中(65℃, 15分間)2回、次いで0.1×SSC、0.1%SDS中(65℃, 30分間)で1回洗浄した。プロットを可視化し、FujiFilm BAS1500バイオイメージングアナライザー(phosphorimaging system)を用いてバンド強度を定量した。RNA負荷量は、 α -アクチン・プローブを用いて正規化した。グラフに示す図は、標的mRNAシグナルと α -アクチンのシグナルとの比を表している。シグナルは、各リン光イメージ・プレート上のプロットに対する曝露時間に左右される。様々なグラフ上の値は転写物の絶対レベルを表していないため、直接比較することはできない。

40

【0073】

<アスペルギルス・ニガー培養における遺伝子glcA、pepA、pdiAおよびbipAの転写物レベルに対するDTTの効果>

図9は、DTTの時間経過実験(ストレス試剤の添加から10時間、3回測定の平均シ

50

グナル) から得られた結果を示している。パート (A) は、この期間の *g l a A* 遺伝子の定常状態 *m R N A* レベルに対する効果を示している。明らかに分かるように、*D T T* 処理培養では、*m R N A* の量が経時的に着実に減少し、半減期は約 70 分であった。このことは、*g l a A m R N A* 合成の非存在下での *g l a A m R N A* の $T 1 / 2$ が約 70 分であることを示す本研究室で行った培地交換試験のデータとよく相関している (図 10)。したがって、図 9 A における結果は、*D T T* 処理が *g l a A* の転写を阻害し、*g l a A m R N A* のレベルの減少は生体内の正常な分解によることを示唆している。図 9 B は、別の分泌タンパク質アスペロギロペプシン (*p e p A*) に対する *D T T* ストレスの効果を示している。この遺伝子は、培地の *p H* が酸性に傾いた場合にのみ誘導されるため、時間経過の後期まで転写は起こらない。データは、対照培養中では *p e p A m R N A* のレベルの増加が認められるが、*D T T* 処理培養では有意な増加が認められないことを示している。図 9 C および D は、アンフォールドタンパク質反応に関与する遺伝子に対する *D T T* の効果を示している。示した *p d i A* および *b i p A* のどちらの遺伝子も、ストレス試剤の添加に迅速な反応を示す。この反応は一過性のように見えず、逆にいうと長続きするようである。このことが *D T T* 添加後の長時間にわたるメッセンジャー *R N A* の産生によるものか当該 *m R N A* の長い半減期によるものかは不明である。

【実施例 3】

【0074】

グルコアミラーゼ・プロモーターの制御下に *p d i A* アンチセンス転写物を発現するアスペルギルス・ニガーの培養における遺伝子 *g l a A* および *p e p A* の転写物レベル

p d i A アンチセンス構築体を発現するアスペルギルス・ニガー菌株およびその親菌株における *g l a A* および *p e p A* の発現を比較した。菌株の培養および *R N A* 分析の方法は実施例 2 に記載した。

【0075】

図 11 は、グルコアミラーゼ・プロモーターの制御下に *p d i A* アンチセンス配列の複数のコピーを含むアスペルギルス・ニガー *A S 1 . 1* と、親菌株のアスペルギルス・ニガー *A B 4 . 1* を比較し、炭素源としてデンプンを含む培地上で培養した場合に得られたデータを示している。パネル (a) は、*g l a A* 遺伝子の *m R N A* レベルに対する効果を示している。最初の時点 (24 時間目) から *A S 1 . 1* 菌株における *g l a A m R N A* のレベルは漸減を示すが、*A B 4 . 1* では増加することが分かる。このことおよび図 1 におけるパネル (a) から分かるように、親菌株 (*A B 4 . 1*) における *g l a A m R N A* のレベルは、正規化に用いた α -アクチンのレベルに対しても実際に増加している。これは一部には *g l a A m R N A* の長い半減期に起因している可能性がある。すなわち *m R N A* の分解の速度が、合成の速度よりも有意に低くその結果この *m R N A* の集団が増えつづけるのであろう。パネル (b) には *p e p A* 遺伝子の転写に対する効果を示す。やはり、*A S 1 . 1* における *m R N A* のレベルは親の *A B 4 . 1* に比べて著しく低かった。パネル (c) は、この実験における乾燥重量測定値を示しており、アンチセンス構築物が発現した場合に真菌の生育に対する有意な効果はないことを示している。

【実施例 4】

【0076】

g p d A プロモーターの制御下に *p d i A* アンチセンス転写物を構成的に発現するアスペルギルス・ニガーの培養における遺伝子 *g l a A* の転写物レベルおよび分泌グルコアミラーゼのレベル

g p d A プロモーターの制御下に *p d i A* アンチセンス *c D N A* を構成的に発現するアスペルギルス・ニガー菌株 (*A S G 6 7* 株) およびその親菌株における *g l a A* の発現を比較した。菌株の培養および *R N A* 分析の方法は実施例 2 に記載した。分泌されたグルコアミラーゼ・タンパク質レベルの分析については、各フラスコから培養濾液のサンプル 7 m l を採取し、必要となるまで $- 20^{\circ}\text{C}$ で保存した。グルコアミラーゼの測定に用いた方法は、*M a c K e n z i e* 他 (1994) の方法とした。

【0077】

図12は、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ・プロモーターの制御下に *pdiA* アンチセンス配列の複数のコピーを含むアスペルギルス・ニガー A S G 6 7 と親菌株の A B 4 . 1 を、炭素源としてデンプンを含有する培地上で培養し比較して得られたデータを示している。パネル (a) は、分泌グルコアミラーゼのレベルに対する効果を示している。これから分かるように、分泌グルコアミラーゼのレベルは経時的に両菌株中で増加するものの、アンチセンス菌株でのレベルは、特に真菌の生育後期には親菌株 (A B 4 . 1) でのレベルよりも低い。パネル (b) では、*glA* 遺伝子の転写物レベルに対する効果を見ることができる。36時間目で同一の転写物レベルに達した後、親菌株 (A B 4 . 1) では転写物レベルが漸増しているが、*pdiA* アンチセンス菌株 (A S G 6 7) ではそうではない。パネル (c) は、実験における乾燥重量測定値を示しており、アンチセンス構築体が発現した場合も真菌の生育に対して有意な効果は認められないことを示している。

【実施例5】

【0078】

pdiA アンチセンス転写物を構成的に発現するアスペルギルス・ニガーにおける *hacA* 転写物のスプライシング

pdiA アンチセンス配列を構成的に発現するアスペルギルス・ニガー菌株およびその親菌株において、アンフォールドタンパク質反応に対してプラスに作用する制御因子をコードする *hacA* 転写物のスプライシングを分析した。菌株の培養およびRNA分析の方法は実施例2に記載した。実験で使用する *hacA* プロローブは、VTTにおいて単離された *hacA* cDNAとした。同じ培養物が、実施例4におけるデータが得らるのに使用された。

【0079】

図13は、経時的な *hacA* のノーザン・プロットを示している。アンフォールドタンパク質反応 (UPR) の誘導があった場合には、ゲル上にあるmRNAよりもわずかに低い第二のmRNA分子種が現れるであろう。存在するmRNAはスプライシングされていない *hacA* と正確に同じサイズである。これらのデータは、UPRの誘導が存在しないことを示唆し、転写ダウンレギュレーション機構はUPRとは区別され、異なったやり方で制御されていることを意味している。

【実施例6】

【0080】

異種タンパク質を産生するトリコデルマ・リーセイ菌株における内因性分泌タンパク質をコードする遺伝子の発現レベル

< 培養物の分析に使用する菌株、培養条件および方法 >

ヒト組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA、Verheijen他、1986) を産生するトリコデルマ・リーセイ *Rut - C30* 株は、Penttilä他、1987に記載の方法を用い、図14Aに示す発現カセットで親菌株を形質転換することによって構築した。

【0081】

tPA産生菌株および親菌株 *Rut - C30* は、並行してバイオリアクター中で培養した。使用する培地は、VTT Biotechnologyにおいて用いられるラクトースをベースにした緩衝化培地 (ラクトース40g/l、ペプトン4g/l、酵母エキス1g/l、 KH_2PO_4 4g/l、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.8g/l、 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6g/l、 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.8g/l、微量元素を追加) とした。バイオマスの乾燥重量は、実施例7に記載のように測定した。培地中のラクトース濃度は、Boehringer Mannheimから購入したキットを用いて決定し、培地中の総タンパク質は、BioRadから購入したProtein Assayを用いて測定し、HEC活性は、(BaileyおよびNevalainen、1981; IUPAC、1987) に記載のように測定し、tPA濃度は、TNO (オランダ) より提供されたEIAキットを用いて測定した。RNA単離およびノーザン分析は、実施例1、7、8、および

10

20

30

40

50

9に記載のように行った。

【0082】

< t P A 産生菌株およびその親菌株における内因性細胞外タンパク質の発現 >

トリコデルマ・リーセイ R u t - C 3 0 および t P A (ヒト組織プラスミノゲン活性化因子) を産生する形質転換体で、内因性分泌タンパク質の産生および対応する遺伝子の発現について検討した。t P A は、真菌によって極めて少量産生され、宿主における様々なストレス反応を誘導することが期待される異種タンパク質の一例である。この形質転換体は、約 5 個の発現カセットのコピーを持つと推定され、c b h 1 プロモーターの下で C B H I 融合タンパク質として t P A が産生される。

【0083】

2つの菌株においてタンパク質産生および対応する遺伝子の発現を比較するため、バイオリアクター中で並行培養を行った。バイオマスの生成および炭素源ラクトースの消費を培養中に測定し、生育をモニターした (図 1 4 B) 。培地中に産生した総タンパク質およびセルラーゼ活性 (基質 H E C に対する活性で主にエンドグルカナーゼ活性を測定する) を培養の始めから終わりまで測定した (図 1 4 C) 。ノーザン分析を行い、培養物における e g l 1 (図 1 4 D) 、 c b h 1 (図 1 4 E) および b i p 1 (図 1 4 F) の発現を分析した。ノーザンにおけるシグナルの正規化にはアクチンのシグナルを用いた。

【0084】

2つの菌株は、培養中にどちらかと言えば同様に生育したが、t P A 産生菌株が培地中に産生した総タンパク質およびセルラーゼ活性は、親菌株に比べてかなり低かったことは明らかである。形質転換体によって産生された t P A は、産生された総タンパク質のわずかな部分に過ぎず、得られた最高収量は 2 5 m g / l であった。t P A 産生培養菌における低いタンパク質産生と合致するように、細胞外エンドグルカナーゼ I をコードする e g l 1 およびセロビオヒドロラーゼ I をコードする c b h 1 の発現レベルも、t P A を産生する培養菌の方が低かった。t P A 産生培養中でシャペロン遺伝子 b i p 1 の発現が誘導され、異種タンパク質の産生による U P R などのストレス反応の活性化を示している。このように、形質転換体における分泌タンパク質をコードする内因性遺伝子の低い発現レベルは、分泌ストレス中に働くダウンレギュレーション機構のためと考えられる。

【実施例 7】

【0085】

トリコデルマ・リーセイの D T T 処理培養における完全長 c b h 1 プロモーターおよび最小 c b h 1 プロモーターの下でのリポーター遺伝子 l a c Z の発現 - ダウンレギュレーションにおけるプロモーター配列の役割

< R N A サンプルの分析に使用する培養条件、および方法 >

Q M 9 4 1 4 株 (M a n d e l s 他、1 9 7 1) ならびにそれに由来し c b h 1 プロモーターの下で大腸菌 l a c Z を発現する p M I 3 4 および p M L O 1 6 (I l m e n 他、1 9 9 6) を、0 . 0 5 % プロテオース・ペプトンおよび 2 0 g / l ソルビトールまたはグリセロールを含有する最小培地上で培養した。8 × 1 0 ⁷ 個の胞子を生育培地 2 0 0 m l に接種し、三角フラスコ中で 2 1 0 r p m で振盪しながら 2 8 ℃ で培養した。培養開始 2 3 時間後および 3 2 時間後に - ソホロース (1 m M) を加え、ソルビトール培地上でセルラーゼ遺伝子発現を誘導した。培養開始 4 0 時間後に 1 0 m M D T T による培養物の処理を開始した。R N A 単離のため菌糸体サンプルを採取し、実施例 1 に記載のようにノーザン分析にかけた。ソホロース誘導および D T T の処理の前後には、菌糸体サンプルを濾過し恒量になるまで 1 0 5 ℃ において乾燥する (2 4 時間) ことにより、培養物の乾燥重量を測定した。培養物の乾燥重量は、D T T による処理の開始時には 1 . 1 ~ 1 . 4 g / l であった。

【0086】

< D T T 処理中の c b h 1 プロモーターの下でのリポーター遺伝子活性 >

m R N A レベルのフィードバック制御が、その遺伝子のプロモーター配列によって仲介されるか否かを検討するため、リポーター遺伝子系を用いた。リポーター遺伝子発現カセ

10

20

30

40

50

ットの概略図を図15Aに示す。大腸菌lacZ遺伝子を、トリコデルマ・リーセイ菌株のcbh1プロモーター、すなわち2.2kbの完全長cbh1プロモーターあるいは161bpの最小プロモーターの下で発現させ、菌株をDTT処理している間の発現レベルを検討した。gpd1のシグナルで正規化したlacZシグナルの定量を図15Bに示す。lacZ転写物レベルは、完全長cbh1プロモーターの下で発現する場合にのみDTT処理中にダウンレギュレートされた。しかしながら、推定上のTATAボックスおよび転写開始部位を含む最小のcbh1プロモーターをlacZ発現に用いた場合には、その短いプロモーターは機能しかつソホロースによる誘導もできるにもかかわらず、ダウンレギュレーションは観察されなかった。ダウンレギュレーション機構がこれらの条件下でこれらの菌株で機能することを確認するために、egl1の転写物レベルを両菌株で分析した。この結果は、cbh1プロモーター中の配列エレメントがダウンレギュレーションには必要であり、mRNAの不安定性以外の機構がこのプロセスに関与していることを示している。

【実施例8】

【0087】

トリコデルマ・リーセイのDTT処理培養における切り詰めcbh1プロモーターの下でのリポーター遺伝子lacZの発現 - 分泌ストレス条件下にプロモーターのダウンレギュレーションに関与するプロモーター領域の同定方法

切り詰めcbh1プロモーターの下に大腸菌lacZ遺伝子を持つトリコデルマ・リーセイ菌株を培養し、実施例7に記載のようにDTTで処理し、lacZ遺伝子の発現を分析した（実施例7と同様）。図16Aは、様々な菌株におけるlacZ発現に使用したcbh1プロモーター構築物の概略図を示している。DTTで処理した培養および無処理培養におけるlacZ、egl1およびgpd1 mRNAレベルのノーザン分析を図16B、CおよびDに示す。分泌ストレス条件（例えば、DTT処理培養）の下でダウンレギュレーションを受けやすい内因性遺伝子の例としてegl1のmRNAレベルを分析し、サンプル負荷の対照としてgpd1のシグナルを用いた。lacZおよびegl1 mRNAのシグナルを定量しgpd1のシグナルで正規化し、処理の様々な時点におけるDTT処理サンプルのシグナルと対照サンプル中のシグナルの比をグラフとして示す。cbh1プロモーターの長さが1029bp以上である構築物を持つ菌株では（図16Bに示す）、DTTによる処理中に2.2kbの完全長cbh1プロモーターの下で遺伝子を発現する菌株と同じ程度にlacZの発現が減少した。長さが339bpから499bpのcbh1プロモーターの下でlacZ遺伝子を発現する菌株では（図16Cに示す）、DTTによる処理中にlacZ mRNAのレベルが明らかに減少したが、完全長cbh1プロモーターの下での発現とは同程度ではなく、この菌株におけるダウンレギュレーションの内部対照として用いたegl1のmRNAレベルと同程度でもなかった。長さが161bpから209bpの切り詰めプロモーターの下でlacZ遺伝子を発現する菌株では（図16Dに示す）、DTTによる処理中にlacZの強い発現（無処理培養中のシグナルと比較して）が検出された。これらの結果は、cbh1プロモーターの場合には、DTT処理中の発現レベルの減少に関与する領域は、翻訳開始コドンの上流1029bp領域内に位置し、開始コドンの上流の領域500～1029bpおよび209～339bpに最も重要な領域が位置していることを示唆している。

【実施例9】

【0088】

トリコデルマ・リーセイQM9414および遺伝子ace1に欠失を有するその誘導体のDTT処理培養におけるcbh1の発現

分泌ストレス条件下のセルラーゼプロモーターのダウンレギュレーションにおけるセルラーゼ制御因子ace1が果たしている役割を検討するため、トリコデルマ・リーセイQM9414および遺伝子ace1が欠失しているその誘導体（Salohemo他、2000）をDTTで処理し、セルラーゼ発現について分析した。菌株をソルビトール含有培地上で培養し、ソホロースで誘導し、実施例7に記載したように10mM DTTで処

10

20

30

40

50

理した。RNA分析のための菌系のサンプリングならびにノーザン分析は、実施例1および7に記載した通りである。処理中にc b h 1の転写物レベルを定量し、シグナルはg p d 1のシグナルで正規化した(図17)。

【0089】

トリコデルマ・リーセイR u t - C 3 0株の場合と同様(実施例1)、Q M 9 4 1 4の培養物をD T T処理するとc b h 1はダウンレギュレーションを受ける。しかしながら、ソルビトール含有培地で培養したa c e 1が欠失したQ M 9 4 1 4株の培養では、D T Tによる処理中もc b h 1が構成的に発現される。これらの特異的条件では、c b h 1プロモーターのダウンレギュレーションにとってa c e 1活性が必要であるように見える。しかしながら、発明者他は、他の培養条件(例えば、グリセロール含有培地上)では、a c e 1活性が必要でないという証拠をつかんでおり、この制御機構にはまだ知られていない他の要因が関与していることを示した。

【実施例10】

【0090】

分泌ストレス条件下で遺伝子の転写ダウンレギュレーションの機構を欠く真菌変異株の単離

完全長c b h 1プロモーターの下で大腸菌l a c Zリポーター遺伝子を発現するトリコデルマ・リーセイp M L O 1 6株にUV照射を用いて突然変異を起こさせ、B F Aの存在という分泌ストレス条件下でl a c Zを発現することができる突然変異体を呈色反応に基づいてスクリーニングした。

【0091】

1 m l当たり 10^7 個の孢子を含有する孢子懸濁液に対し、孢子生存率が15~46%となるようUV照射を行った。変異処理した孢子は、マイクロタイター・プレート上、ウェル当たりおよそ3個の孢子を用い、炭素源としてソルビトールを含有する最小培地で培養した(実施例7と同じだが、ただしこの場合にはp H 7.0とした)。7日間培養した後、ソホロースおよびブレフェルジンAを加えてl a c Z発現を誘導すると同時に分泌ストレス条件を作り出した。B F A存在下のl a c Z産生の誘導は、培養中にX - g a lを添加することによる呈色反応によって検出した。l a c Zを発現する培養物をP Dプレート上で純化し、B F A存在下にc b h 1プロモーターを誘導する(l a c Z発現を制御する)突然変異体の能力を確認した。図18Aは、ダウンレギュレーションを受ける完全長c b h 1プロモーターの下でのl a c Zを発現するp M L O 1 6の対照培養、c b h 1の最小プロモーター(分泌条件においてダウンレギュレートされない、実施例8も参照)の下でl a c Zを発現するp M I 3 3株、およびl a c Z陰性菌株Q M 9 4 1 4、それぞれにおけるl a c Z活性を示している。呈色反応によって示されるように、ソホロース添加後、B F Aの存在下ではl a c Z産生が認められないか、B F Aの非存在下ではl a c Zが産生される。図18Bは、マイクロタイター・プレート培養における突然変異体のスクリーニングの一例を示している。分泌ストレス条件下でl a c Zを発現する突然変異体を呈色反応に基づいて単離することができる。対照として、p M L O 1 6の非突然変異誘発孢子をB F Aの存在下および非存在下にプレート上で培養した(四角で囲んだウェルを参照; B F Aの非存在下のl a c Z産生を示す陽性呈色反応、およびB F Aの存在下で陰性呈色反応)。

【参考文献】

【0092】

Alberini, C. M., Bet, P., Milstein, C. & Sitia, R. (1990). Secretion of immunoglobulin M assembly intermediates in the presence of reducing agents. Nature 347, 485-487.

Archer, D. B., Jeenes, D. J., MacKenzie, D. A., Brightwell, G., Lambert, N., Lowe, G., Radford, S. E. and Dobson, C. M. 1990. Hen egg white lysozyme expressed in, and secreted from, *Aspergillus niger* is correctly processed and folded. Bio/Technology 8: 741-745.

- Archer, D. B. & Peberdy, J. F. (1997). The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. *Cri. Rev Biotechnol* 17,273-306
- Bailey, M. J. and Nevalainen, K. M. H. (1981) Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase. *Enzyme, Microb. Technol.* 3,153-157.
- Braakman, I, Helenius, J. & Helenius, A. (1992). Manipulating disulphide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum,. *EMBO J* 11, 1717-1722.
- Boel, E., Hansen, M. T., Hjort, I., Hoegh, I. and Fiil, N. P. 1984. Two different types of intervening sequences in the glucoamylase gene from *Aspergillus niger*. *EMBO Journal* 3: 1581-1585. 10
- Brostrm, C. O., Chin, K. V., Wong, W. L., Cade, C. and Brostrm, M. A. (1989) Inhibition of translational initiation in eucaryotic cells by calcium ionophore. *J. Biol. Chem.* 264,1644-1649.
- Fidel, S., Doonan, J. H. and Morris, N. R. 1988. *Aspergillus nidulans* contains a single actin gene that has unique intron locations and encodes gamma actin. *Gene* 70: 283-293. van Gemen, I. A., Punt, P. J., Drint-Kuyvenhoven, A., Broekhuijsen, M. P., van't Hoog, A., Beijersbergen, A., Verrips, C. T. and van den Hondel, C. A. M. J. J. 1997. The ER chaperone encoding *bipA* of black *Xspergilli* is induced by heat shock and unfolded proteins. *Gene* 198: 43-52.
- Gouka, R. J., Punt, P. J. & van den Hondel, C. A. M. J. J. (1997). Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus* : progress, limitations and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 47, 1-11. 20
- Harding, H. P., Zhang, Y. H. and Ron, D. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic reticulum-resident kinase. *Nature* 397: 271-274.
- van Hartingsveldt, W., Mattern, I. E., van Zeijl, C. M., Pouwels, P. H. and van den Hondel, C. A. M. J. J. 1987. Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. *Molecular and General Genetics* 206: 71-75.
- Filmen, M., Onnela, M.-L., Klemsdal, S., Kernen, S. & Penttila, M. (1996). Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Mol Genet* 253, 303-314. 30
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure and Appl. Chem.* 59,257-268.
- Jamsa, E., Simonen, M. & Makarow, M. (1994). Selective retention of secretory proteins in the yeast endoplasmic reticulum by treatment of cells with a reducing agent. *Yeast* 10, 355-370.
- Mori, K. 2000. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101 : 451-454.
- Lodish, H. F. and Kong, N. (1990). Perturbation of cellular calcium blocks exit of secretory proteins from the rough endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265,10893-10899. 40
- Lodish, H. F., Kong, N., and Wikstrm, L. (1992) Calcium is required for folding of newly made subunits of the asialoglycoprotein receptor within the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 267,12753-12760.
- MacKenzie, D. A., Jeenes, D. J., Belshaw, N. J., and Archer, D. B. (1993) Regulation of secreted protein production by filamentous fungi : recent development and perspectives. *J.Gen. Microbiol.* 139,2295-2307.
- MacKenzie, D. A., Gendron, L. C. G., Jeenes, D. J., and Archer, D. B. (1994) Physiological optimisation of secreted protein production by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb.Technol.* 16,276-279. 50

- Mandels, M., Weber, J., and Parizek, R. (1971) Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol.* 21,152-154.
- Margolles-Clark, E., Hayes, C. K., Harman, G. And Penttila, M. (1996) Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*. *Appl. Env. Microbiol.* 62,2145-2151.
- Margolles-Clark, E., Ilmen, M. and Penttila, M. (1997) Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *J Biotechnol.* 57,167-179.
- Montenecourt, B. S. & Eveleigh, D. E. (1979). Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. *Adv Chem Ser* 181, 289-301. 10
- Ngiam, C., Jeenes, D. J. and Archer, D. B. 1997. Isolation and characterisation of a gene encoding protein disulphide isomerase, *pdiA*, from *Aspergillus niger*. *Current Genetics* 31 : 133-138.
- Ngiam, C., Jeenes, D. J., Punt, P. J., van den Hondel, C. A. M. J. J. and Archer, D. B. 2000..Characterisation of a foldase, *PDIA*, in the secretory pathway of *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 775-782.
- Pakula, T. M., Uusitalo, J., Saloheimo, M., Salonen, K., Aarts, J., and Penttila, M. (2000) Monitoring the kinetics of glycoprotein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*: cellobiohydrolase I (CBHI) as a model protein. *Microbiology* 146, 223-232. 20
- Pelham, H. R. B. (1991) Multiple targets for Brefeldin A. *Cell* 67,449-451.
- Penttila, M., Nevalainen, H., Ratio, M., Salminen, E., and Knowles, J. K. C. (1987) *Gene* 61,155-164.
- Penttila, M. (1998). Heterologous protein production in *Trichoderma*. In *Trichoderma & Gliocladium*, pp. 365-382. Edited by G. E. Harman & C. P. Kubicek. London: Taylor & Francis LTD.
- Saloheimo, A., Aro, N., Ilmen, M. and Penttila, M. (2000) Isolation of the *acel* gene encoding a Cys2-His2 transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbhl* of *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.* 275,5817-5825. 30
- Saloheimo, M., Lund, M. & Penttila, M. (1999) The protein disulphide isomerase gene of the fungus *Trichoderma reesei* is induced by endoplasmic reticulum stress and regulated by the carbon source. *Mol Gen Genet* 262,35-45.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York).
- Shah, N. and Klausner, R. D. (1993) Brefeldin A reversibly inhibits secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268,5345-5348.
- Shamu, C. E., Cox, J. S. and Walter, P. 1994. The unfolded protein response pathway in yeast. *Trends in Cell Biology* 4: 56-60. 40
- Veldhuisen, G., Saloheimo, M., Fiers, M. A., Punt, P. J., Contreras, R., Penttila, M. & van den Hondel, C. A. M. J. J. (1997). Isolation and analysis of functional homologues of the secretion-related *SAR1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* from *Aspergillus niger* and *Trichoderma*. *Mol Gen Genet* 256,446-455.
- Verheijen, J. H., Caspers, M. P. M., Chang, G. T. G., de Munk, G. A. W., Pouwels, P. H., and Enger-Valk, B. E. (1986) Involvement of finger domain and kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator in fibrin binding and stimulation of activity by fibrin. *EMBO J.* 5, 3525-3530.

【図面の簡単な説明】

【 0 0 9 3 】

【図1】A 2 3 1 8 7、D T TおよびB F Aで処理した培養における総タンパク質合成および分泌。 A) 5 μ M A 2 3 1 8 7で処理した培養(菱形、)、および無処理対照培養(黒い菱形、)から調製した細胞抽出液中のT C A不溶画分に取り込まれた放射能の量。 B) 5 μ M A 2 3 1 8 7で処理した培養(菱形、)、および無処理対照培養(黒い菱形、)の培養上清中のT C A不溶画分に取り込まれた放射能の量。 C) 1 0 m M D T Tで処理した培養(菱形、)、および無処理対照培養(黒い菱形、)から調製した細胞抽出液中のT C A不溶画分に取り込まれた放射能の量。 D) 1 0 m M D T Tで処理した培養(菱形、)、および無処理対照培養(黒い菱形、)の培養上清中のT C A不溶画分に取り込まれた放射能の量。 E) 5 0 μ g / m l B F Aで処理した培養(菱形、)、および無処理対照培養(黒い菱形、)から調製した細胞抽出液中のT C A不溶画分に取り込まれた放射能の量。 F) 5 0 μ g / m l B F Aで処理した培養(菱形、)、および無処理対照培養(黒い菱形、)の培養上清中のT C A不溶画分に取り込まれた放射能の量。

10

【図2】時間を変えて5 μ M A 2 3 1 8 7、5 0 μ g / m l B F Aあるいは1 0 m M D T Tで処理し^{3 5}S - メチオニンで標識した培養からのC B H Iの2 D (2次元)ゲル分析。 A) 無処理対照培養、およびA 2 3 1 8 7、D T TまたはB F Aで処理した培養から標識実験中の様々な時点で調製された細胞抽出液中の標識C B H I (時点は、標識メチオニン添加後の時間(分)として各パネル上に示す)。 B) A 2 3 1 8 7またはB F Aで処理した培養および無処理培養の標識1 8 0分後の培養上清からの標識C B H I。

【図3】C B H Iの合成および分泌。 A) 5 μ M A 2 3 1 8 7で処理した培養(白丸、)中、および無処理対照培養(黒い菱形、)の、標識実験の様々な時点における細胞抽出液中の標識C B H Iの量 B) 5 μ M A 2 3 1 8 7で処理した培養(白丸、)中、および無処理対照培養(黒い菱形、)の、標識実験の様々な時点における培養上清中の標識C B H Iの量 C) 1 0 m M D T Tで処理した培養(白丸、)、および無処理対照培養(黒い菱形、)の標識実験の様々な時点における細胞抽出液中の標識C B H Iの量 D) 1 0 m M D T Tで処理した培養(白丸、)、および無処理対照培養(黒い菱形、)の標識実験の様々な時点における培養上清中の標識C B H Iの量 E) 5 0 μ g / m l B F Aで処理した培養(白丸、)、および無処理対照培養(黒い菱形、)の、標識実験の様々な時点における細胞抽出液中の標識C B H Iの量 F) 5 0 μ g / m l B F Aで処理した培養物(白丸、)中、および無処理対照培養(黒い菱形、)の、標識実験の様々な時点における培養上清中の標識C B H Iの量

20

30

【図4】A 2 3 1 8 7、D T TまたはB F Aで処理した培養におけるp d i 1およびb i p 1発現のノーザン分析。 A) 様々な時点におけるA 2 3 1 8 7による処理培養、および無処理対照培養中のb i p 1およびp d i 1の定常状態m R N Aレベル(g p dのシグナルで規格化したシグナル)(処理培養は黒い棒、対照培養は白い棒)。 B) 様々な時点におけるD T Tによる処理培養、および無処理対照培養中のb i p 1およびp d i 1の定常状態m R N Aレベル(g p dのシグナルで規格化したシグナル)(処理培養は黒い棒、対照培養は白い棒)。 C) 様々な時点における、B F Aによる処理培養および無処理対照培養中のb i p 1およびp d i 1の定常状態m R N Aレベル(g p dのシグナルで規格化したシグナル)(処理培養は黒い棒、対照培養は白い棒)。

40

【図5】B F AおよびA 2 3 1 8 7で処理した培養(黒い棒)および無処理対照培養(白い棒)中のh a c 1 m R N Aのノーザン分析。

【図6】様々な時間A 2 3 1 8 7、D T TまたはB F Aで処理した培養(黒い棒)中および無処理対照培養(白い棒)中のc b h 1およびe g l 1のノーザン分析。

【図7】D T T処理中の、トリコデルマ・リーセイにおけるx y n 1およびh f b 2タンパク質のノーザン分析(g p dのシグナルで規格化したシグナル)。

【図8】D T Tによる処理中にダウンレギュレートされない転写物のノーザン分析：分泌経路の成分をコードするy p t 1およびs a r 1、未知の機能のc D N A 1、および細胞内 - グルコシダーゼをコードするb g l 2のシグナル(シグナルは、g p dのシグナルで規格化した)。

50

【図 9 A】アスペルギルス・ニガーからの遺伝子の転写に対する D T T の効果：グルコアミラーゼ遺伝子、g l a A (3 回測定の前平均シグナル) (実線は D T T 処理培養を示し、破線は水処理対照を示す)

【図 9 B】アスペルギルス・ニガーからの遺伝子の転写に対する D T T の効果：酸性プロテアーゼであるアスペルギロペプシン遺伝子 (p e p A) (3 回測定の前平均シグナル) (実線は D T T 処理培養を示し、破線は水処理対照を示す)

【図 9 C】アスペルギルス・ニガーからの遺伝子の転写に対する D T T の効果：E R 中の常在フォルダーゼ (f o l d a s e) であるタンパク質ジスルフィド異性化酵素 (p d i A) (3 回測定の前平均シグナル) (実線は D T T 処理培養を示し、破線は水処理対照を示す)

10

【図 9 D】アスペルギルス・ニガーからの遺伝子の転写に対する D T T の効果：E R - 常在シャペロンである b i p A (3 回測定の前平均シグナル) (実線は D T T 処理培養を示し、破線は水処理対照を示す)

【図 1 0】炭素源としてデンプンを含む培地を炭素源としてキシロースを含む培地に交換することがアスペルギルス・ニガー A B 4 . 1 における g l a A の転写に与える効果 (交換は T = 0 で行い、結果は 2 回の測定の前平均を示す)

【図 1 1 A】グルコアミラーゼ遺伝子の転写に対するアンチセンス p d i A の効果 (g l a A 、 2 つの異なる実験からの 6 個のフラスコの平均シグナル) (菌株 A B 4 . 1 は実線で示し、菌株 A S 1 . 1 は破線で示す。)

【図 1 1 B】アスペルギロペプシン遺伝子の転写に対するアンチセンス p d i A の効果 (p e p A 、 2 つの異なる実験からの 6 個のフラスコの平均シグナル) (菌株 A B 4 . 1 は実線で示し、菌株 A S 1 . 1 は破線で示す。)

20

【図 1 1 C】培養の乾燥重量測定 (2 つの異なる実験からの 6 個のフラスコの平均シグナル)

【図 1 2 A】g p d A プロモーターの制御下にアンチセンス p d i A を発現するアスペルギルス・ニガーの分泌グルコアミラーゼ・タンパク質のレベル。 (データは各時点の 3 回測定の前平均であり、菌株 A B 4 . 1 は黒い棒で示し、菌株 A S G 6 7 は灰色の棒で示す)

【図 1 2 B】g p d A プロモーターの制御下にアンチセンス p d i A を発現するアスペルギルス・ニガーにおける g l a A m R N A の定常状態レベル。 (菌株 A B 4 . 1 は実線で示し、菌株 A S G 6 7 は破線で示す)

30

【図 1 2 C】培養の乾燥重量測定 (菌株 A B 4 . 1 は実線で示し、菌株 A S G 6 7 は破線で示す)

【図 1 3】h a c A をプローブとした、アスペルギルス・ニガー A B 4 . 1 および A S G 6 7 のノーザン・プロット分析。レーン 1 ~ 7 は、2 4、3 6、4 8、6 0、7 2、8 4 および 9 6 時間におけるアスペルギルス・ニガー A B 4 . 1 のサンプルを示し、レーン 8 ~ 1 4 は、同じ時点におけるアスペルギルス・ニガー A S G 6 7 (アンチセンス p d i A 菌株) について示す。

【図 1 4 A】トリコデルマ・リーセイ R u t - C 3 0 および t P A 産生形質転換体 3 0 6 / 3 6 のバイオリアクター培養：トリコデルマ・リーセイ R u t - C 3 0 において t P A を産生するための発現力セット

40

【図 1 4 B】トリコデルマ・リーセイ R u t - C 3 0 および t P A 産生形質転換体 3 0 6 / 3 6 のバイオリアクター培養：増殖をモニターするため培養中に測定されたバイオマス乾燥重量およびラクトース濃度。

【図 1 4 C】トリコデルマ・リーセイ R u t - C 3 0 および t P A 産生形質転換体 3 0 6 / 3 6 のバイオリアクター培養：培地中で産生される総タンパク質および H E C 活性 (セルラーゼ、特にエンドグルカナーゼ、活性を測定する)

【図 1 4 D】トリコデルマ・リーセイ R u t - C 3 0 および t P A 産生形質転換体 3 0 6 / 3 6 のバイオリアクター培養：分泌タンパク質をコードする遺伝子の例として分析された e g l 1 の転写物レベル (アクチン遺伝子のシグナルで規格化)

50

【図14E】トリコデルマ・リーセイ R u t - C 3 0 および t P A 産生形質転換体 3 0 6 / 3 6 のバイオリクター培養：c b h 1 および c b h 1 - t P A 融合物の転写物レベル（アクチン遺伝子のシグナルで規格化）

【図14F】トリコデルマ・リーセイ R u t - C 3 0 および t P A 産生形質転換体 3 0 6 / 3 6 のバイオリクター培養：培養中の b i p 1 の転写物レベル（アクチン遺伝子のシグナルで規格化）

【図15】c b h 1 プロモーターの下での l a c Z リポーター遺伝子の発現 A) 1 0 m M D T T 存在下の発現試験に用いた l a c Z 発現カセットの概略図：菌株 p M L O 1 6 中では完全長 c b h 1 プロモーターの下で、菌株 p M I 3 4 中では切り詰めプロモーターの下での l a c Z 発現。 B) 菌株 p M L O 1 6 中（左のグラフ）および菌株 p M I 3 4 中（右のグラフ）において 1 0 m M D T T 処理培養（黒い棒）および無処理対照培養（白い棒）中の l a c Z および e g l 1 の m R N A レベル（g p d シグナルで規格化）。

10

【図16A】様々な程度に欠失させた c b h 1 プロモーターの下での l a c Z リポーター遺伝子の発現：分泌ストレス条件の下でプロモーターの活性を検討するためトリコデルマ・リーセイにおける大腸菌 l a c Z 発現のために使用した c b h 1 プロモーターの欠失シリーズの略図

【図16B】様々な程度に欠失させた c b h 1 プロモーターの下での l a c Z リポーター遺伝子の発現：菌株 p M L O 1 6、p M L O 1 6 S、d e l 1 (1) S および d e l 0 (2) S の D T T 処理培養および同一菌株の無処理培養における l a c Z、e g l 1 および g p d 1 の発現のノーザン分析。処理の時点は、処理の開始からの時間（分）として各レーンの上部に示す。各時点における D T T 処理培養中の相対 m R N A レベル（無処理対照培養中の m R N A レベルを 1 と設定した）は、右のグラフに示す（l a c Z シグナル、白丸；e g l 1 シグナル、黒い菱形）

20

【図16C】様々な程度に欠失させた c b h 1 プロモーターの下での l a c Z リポーター遺伝子の発現：B) と同様な、菌株 d e l 2 3、d e l 5 (1 1) S、d e l 5 (1 1) および d e l 6 (1 4) のノーザン分析

【図16D】様々な程度に欠失させた c b h 1 プロモーターの下での l a c Z リポーター遺伝子の発現：B) と同様な、菌株 d e l 7 (5) S、p M I 3 3 および p M I 3 4 のノーザン分析

【図17】トリコデルマ・リーセイ Q M 9 4 1 4 および a c e 1 遺伝子が欠失した Q M 9 4 1 4 の培養における D T T 処理中の c b h 1 m R N A レベル

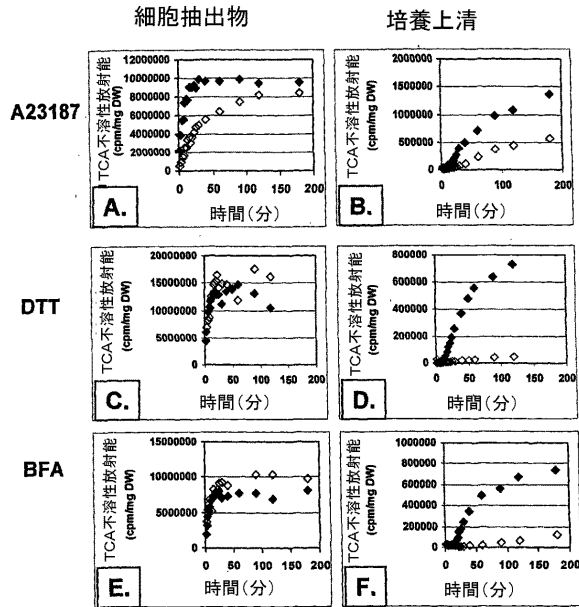
30

【図18A】分泌ストレス条件の下で遺伝子のダウンレギュレーションの機構を欠いた真菌変異体のスクリーニング：菌株 p M L O 1 6、p M I 3 3 および Q M 9 4 1 4 のマイクロタイター平板培養を B F A およびソホロースの存在下および非存在下で l a c Z 産生を試験した。l a c Z 産生は暗色反応として検出した

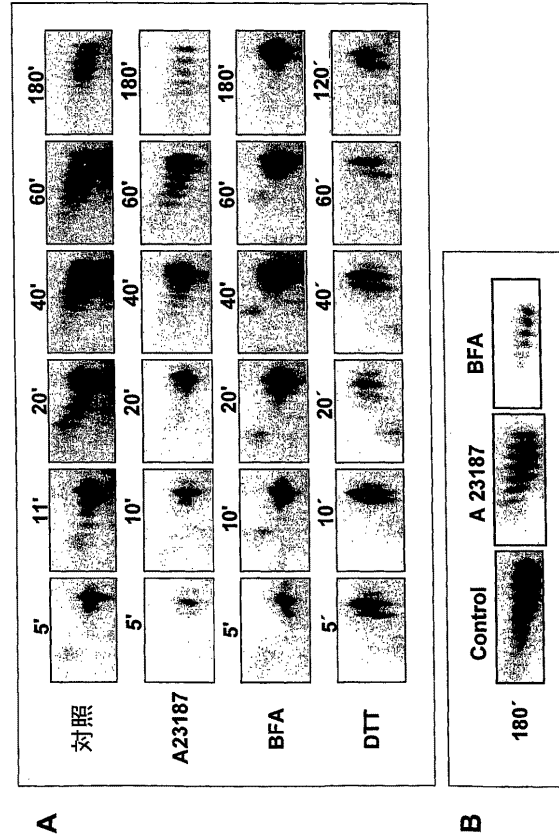
【図18B】分泌ストレス条件の下で遺伝子のダウンレギュレーションの機構を欠いた真菌変異体のスクリーニング：マイクロタイター平板培養における、B F A 存在下でのソホロース誘導後の l a c Z の発現についての変異体のスクリーニング。l a c Z 産生変異体は、X - g a l 基質の添加後に暗色反応に基づいて検出した。変異誘発されていない p M L O 1 6 の培養は、B F A の存在下および非存在下ソホロース誘導後に l a c Z 産生についてアッセイした（四角で囲んだウェル）

40

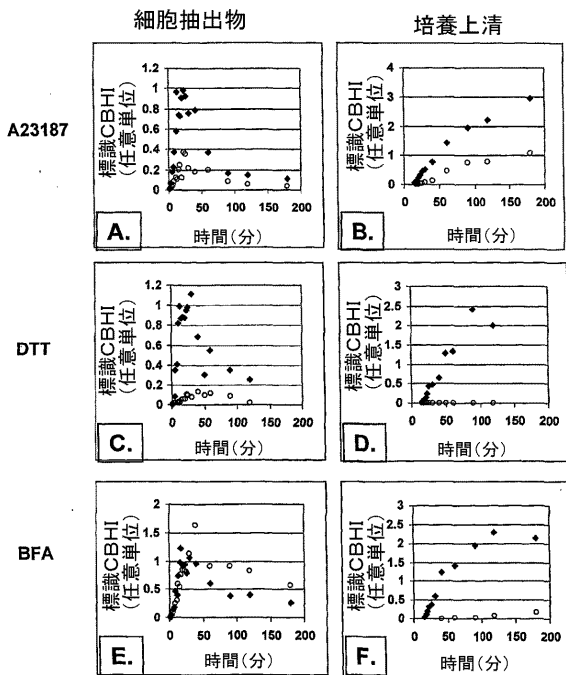
【図1】



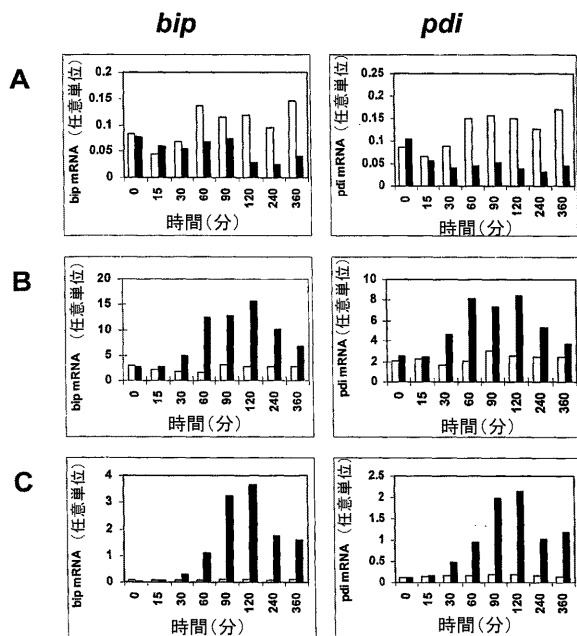
【図2】



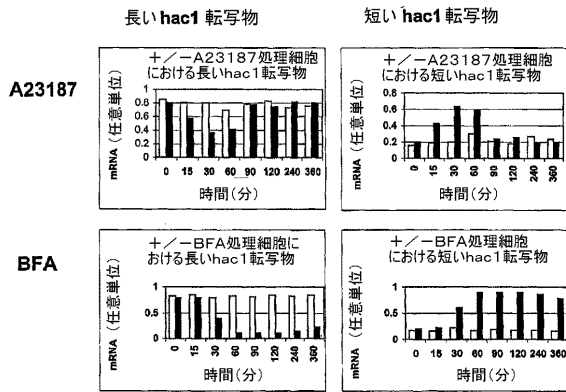
【図3】



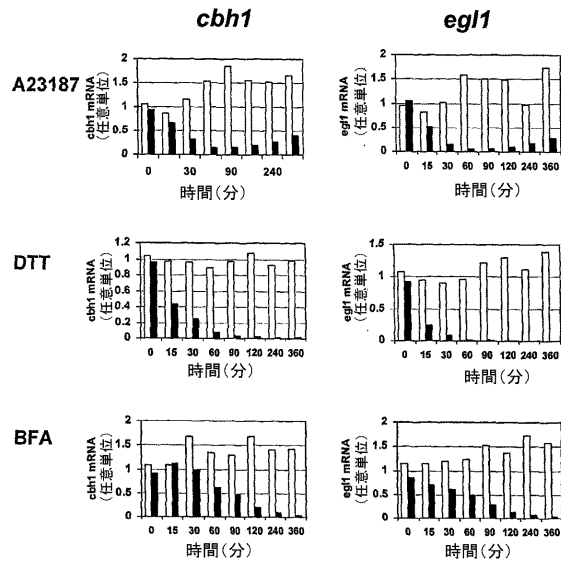
【図4】



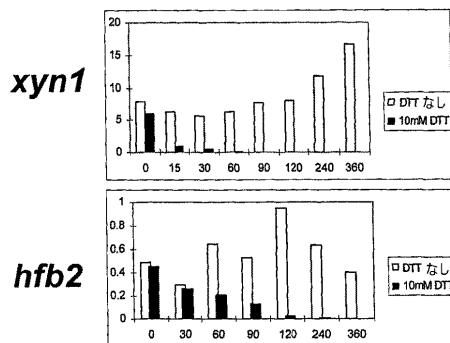
【図 5】



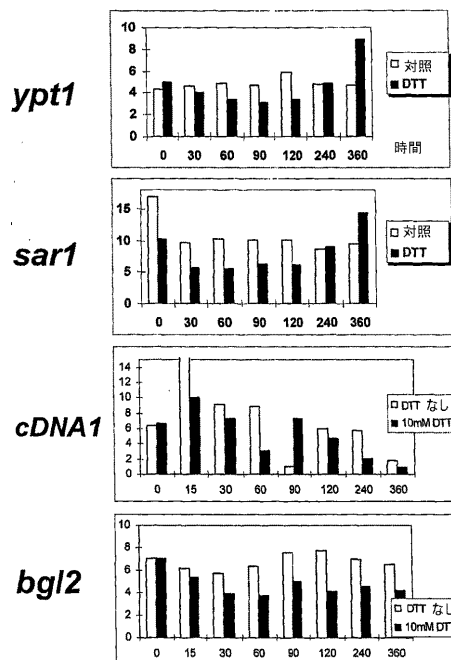
【図 6】



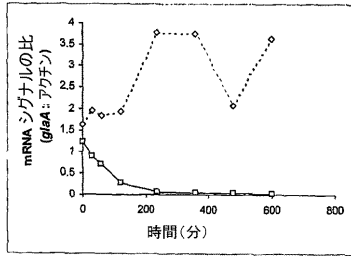
【図 7】



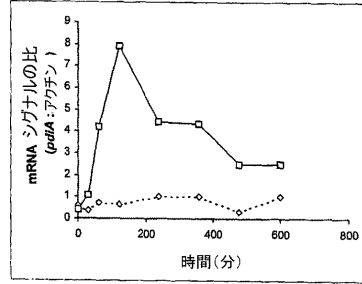
【図 8】



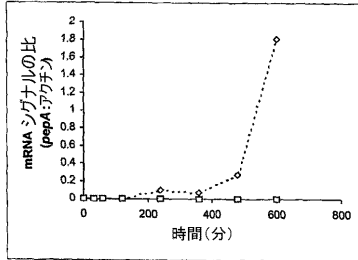
【図 9 A】



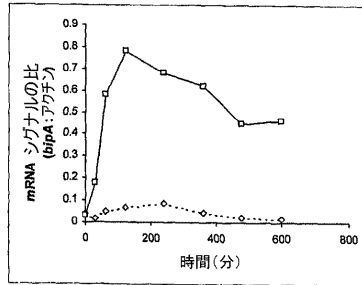
【図 9 C】



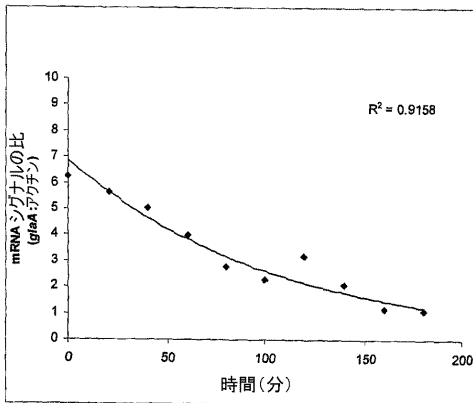
【図 9 B】



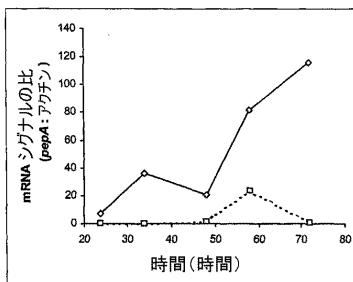
【図 9 D】



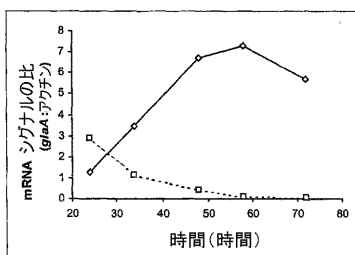
【図 10】



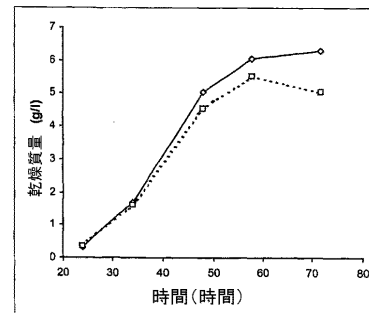
【図 11 B】



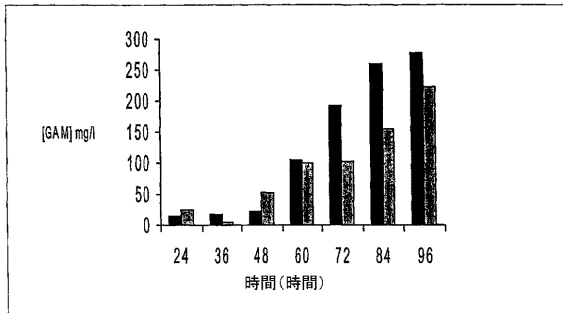
【図 11 A】



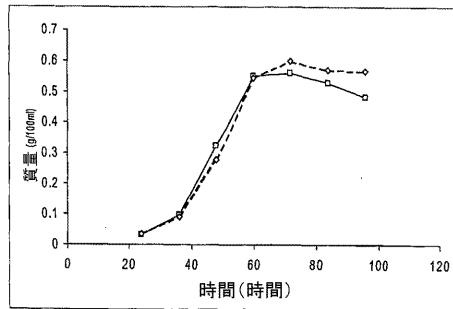
【図 11 C】



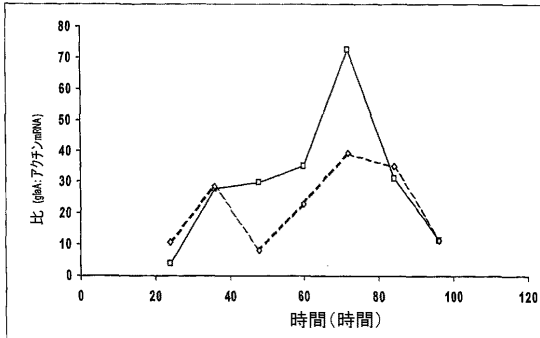
【図 12 A】



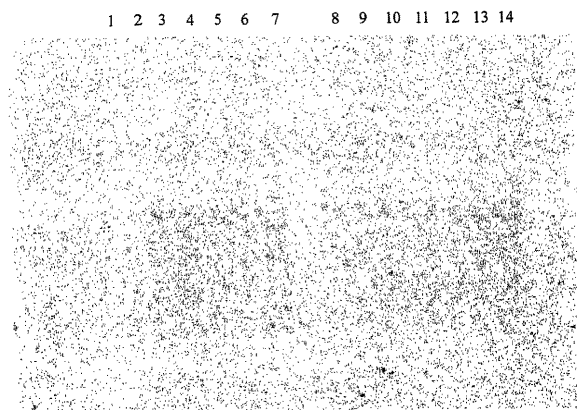
【図 12 C】



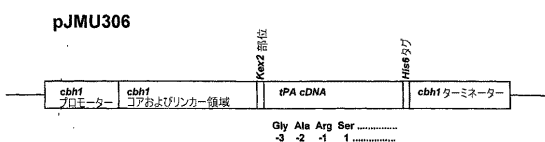
【図 12 B】



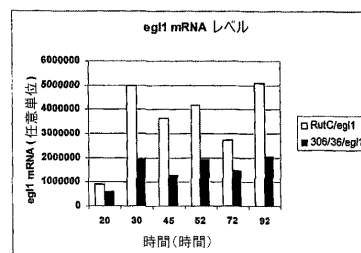
【図 13】



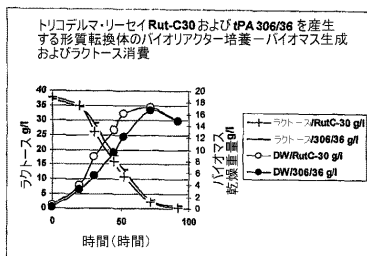
【図 14 A】



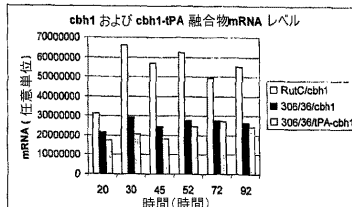
【図 14 D】



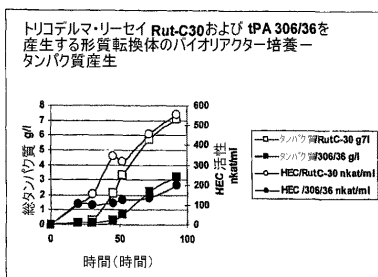
【図 14 B】



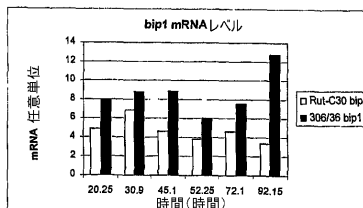
【図 14 E】



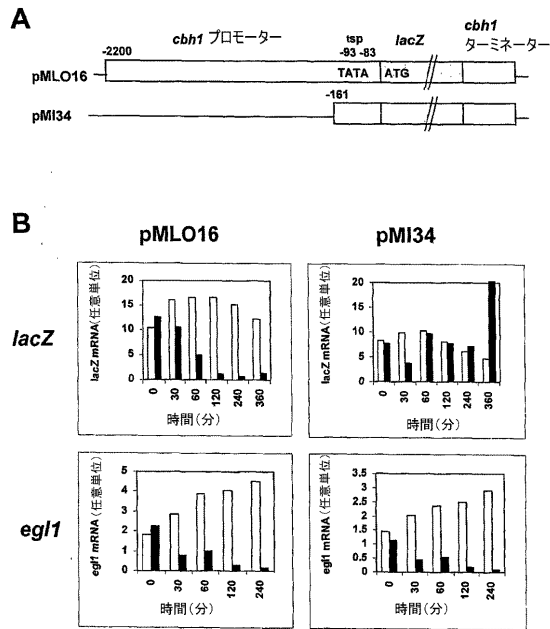
【図 14 C】



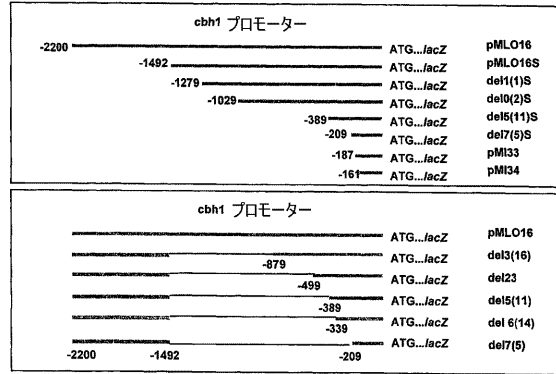
【図 14 F】



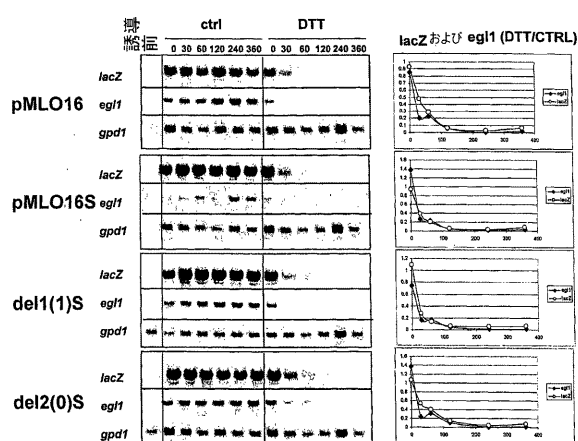
【図 15】



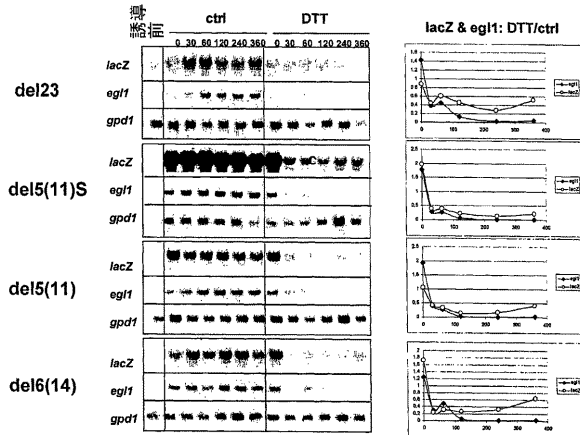
【図 16 A】



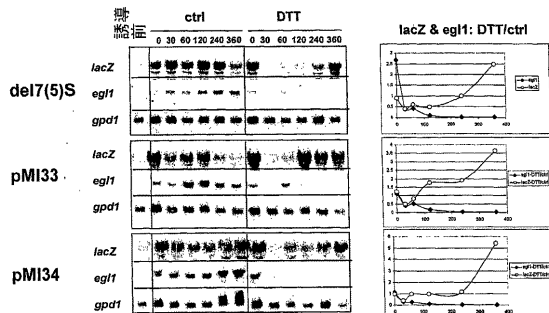
【図 16 B】



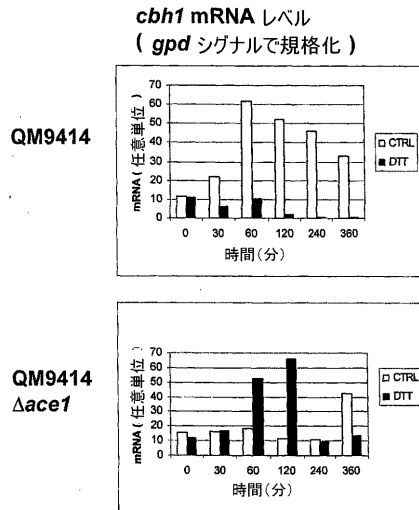
【図 16 C】



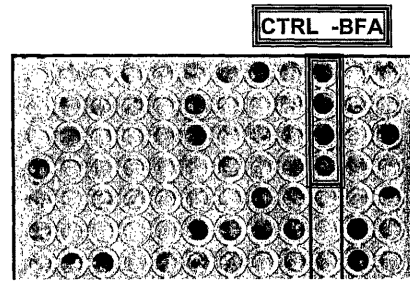
【図 16 D】



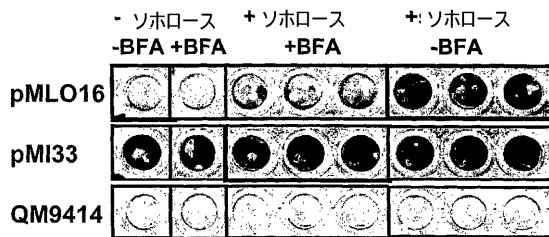
【図 17】



【図 18 B】



【図 18 A】



【配列表】

0004302985000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 R 1/645 (2006.01)		C 1 2 N 1/15
C 1 2 R 1/77 (2006.01)		C 1 2 R 1:885
C 1 2 R 1/80 (2006.01)		C 1 2 N 1/15
C 1 2 R 1/84 (2006.01)		C 1 2 R 1:645
C 1 2 R 1/78 (2006.01)		C 1 2 N 1/15
C 1 2 R 1/72 (2006.01)		C 1 2 R 1:77
C 1 2 R 1/85 (2006.01)		C 1 2 N 1/15
		C 1 2 R 1:80
		C 1 2 N 1/15
		C 1 2 R 1:84
		C 1 2 N 1/15
		C 1 2 R 1:78
		C 1 2 N 1/15
		C 1 2 R 1:72
		C 1 2 N 1/15
		C 1 2 R 1:85

(74)代理人 100102808

弁理士 高梨 憲通

(72)発明者 バクラ, テーナ

フィンランド・F I N - 0 0 2 0 0 , ヘルシンキ, ハーフカティエ 1 2 A 6

(72)発明者 サロヘイモ, マルック

フィンランド・F I N - 0 0 3 9 0 ヘルシンキ, キュンテエンティエ 1 8 B

(72)発明者 ウーシタロ, ヤンナ

フィンランド・F I N - 0 2 3 6 0 エスポー, カイターンクルマ 6 B 4

(72)発明者 フースコネン, アンネ

フィンランド・F I N - 0 0 4 4 0 ヘルシンキ, ホベアティエ 1 0 C 5 3

(72)発明者 ワトソン, アドリアン

イギリス・ノーフォーク NR4 7UA, ノーウィック, コルネイ, ノーウィック リサーチ
パーク, インスティテュート オブ フード リサーチ, ジェネティクス アンド マイクロバイ
オロジー デパートメント

(72)発明者 ジェーネス, ディヴィッド

イギリス・ノーフォーク NR4 7UA, ノーウィック, コルネイ, ノーウィック リサーチ
パーク, インスティテュート オブ フード リサーチ, ジェネティクス アンド マイクロバイ
オロジー デパートメント

(72)発明者 アーチャー, ディヴィッド

イギリス・ノッティンガムシャー NG7 2RD, ノッティンガム, ユニヴァーシティ パーク
, スクール オブ ライフ アンド エンヴァイロンメンタルサイエンス, ユニヴァーシ
ティ オブ ノッティンガム

(72)発明者 ペンッティラ, メルヤ

フィンランド・F I N - 0 0 2 1 0 ヘルシンキ, ヴァッツニエメンカトゥ 2 A 2 2

審査官 吉田 知美

(56)参考文献 米国特許第06001595 (US, A)

国際公開第00/058342 (WO, A1)

Mol. Gen. Genet., 1996年, 253, p.303-314

J. Biol. Chem. , 1996年, 271 [41] , p.25624-25629
Genetics , 1999年, 151 , p.557-567
Microbiology , 1999年, 145 , p.729-734
J. Biotechnol. , 1998年, 65 , p.163-171
Curr. Genet. , 1994年, 26 , p.238-244
J. Biol. Chem. , 2000年 2月, 275 [8] , p.5817-5825

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

C12N 1/15

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed