

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5043254号
(P5043254)

(45) 発行日 平成24年10月10日 (2012. 10. 10)

(24) 登録日 平成24年7月20日 (2012. 7. 20)

(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 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 20 (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願2000-578437 (P2000-578437)	(73) 特許権者	500586299
(86) (22) 出願日	平成11年10月13日 (1999. 10. 13)		ノボザイムス アクティーゼルスカブ
(65) 公表番号	特表2002-528076 (P2002-528076A)		デンマーク国, デーコー 2 8 8 0 バグ
(43) 公表日	平成14年9月3日 (2002. 9. 3)		スバエルト, クロシェイバイ 3 6
(86) 国際出願番号	PCT/DK1999/000552	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開番号	W02000/024883		弁理士 石田 敬
(87) 国際公開日	平成12年5月4日 (2000. 5. 4)	(74) 代理人	100092624
審査請求日	平成18年10月11日 (2006. 10. 11)		弁理士 鶴田 準一
(31) 優先権主張番号	PA 1998 01375	(74) 代理人	100114340
(32) 優先日	平成10年10月26日 (1998. 10. 26)		弁理士 大関 雅人
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	(74) 代理人	100082898
(31) 優先権主張番号	PA 1999 00718		弁理士 西山 雅也
(32) 優先日	平成11年5月25日 (1999. 5. 25)	(74) 代理人	100081330
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		弁理士 樋口 外治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糸状菌細胞内の問題のDNAライブラリーの作製及びスクリーニング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

目的の生物活性又は機能をコードする少なくとも1の親ポリヌクレオチド配列のランダム突然変異誘発又は天然の対立遺伝子変異により、前記親ポリヌクレオチドに対し1又は複数の改変を含む変異ポリヌクレオチド配列のライブラリーを糸状菌細胞内で作製し及び選択又はスクリーニングする方法であって、

(a) 前記糸状菌細胞をDNAベクターの集団で形質転換し、ここで各々のベクターは、

(i) 糸状菌選択マーカー及び糸状菌複製開始配列をコードするポリヌクレオチド配列であって、該マーカー及び複製開始配列が前記集団内で変化しないポリヌクレオチド配列；並びに (i i) 前記DNAベクターの集団が前記変異ポリヌクレオチド配列の全種を含むように選択される、前記変異ポリヌクレオチド配列のうちの1種を含み；

(b) 前記細胞を選択圧下で培養し；

(c) 要求される特徴を発現する1又は複数の形質転換体について選択又はスクリーニングし；

(d) 問題の形質転換体を単離することを含む方法。

【請求項 2】

前記親ポリヌクレオチド配列が、ポリペプチドをコードする請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが、ホルモン、酵素、レセプターもしくはその一部、抗体もしくはその一部、又は調節タンパク質である請求項2に記載の方法。

10

20

【請求項 4】

前記酵素が、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、又はリガーゼである請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記酵素が、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、インベルターゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、マンノシダーゼ、ムタナーゼ、オキシダーゼ、ペクチン分解酵素、ペルオキシダーゼ、フィターゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、タンパク質分解酵素、リボヌクレアーゼ、トランスグルタミナーゼ、又はキシラナーゼである請求項 3 又は 4 に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記選択マーカーが、殺生物剤もしくはウイルス毒性に対する耐性、重金属毒性に対する耐性、又は独立栄養体に対する原栄養性を供する産物をコードする遺伝子の群から選択される請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記原栄養性が、ヌクレオチド合成、コファクター合成、アミノ酸合成、アセトアミド代謝、プロリン代謝、スルフェート代謝、及びニトレート代謝からなる代謝経路の群から選択される酵素から得られる請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記選択マーカーが、argB (オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ)、amdS (アセトアミダーゼ)、bar (ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ)、hemA (5-アミノレブリン酸シンターゼ)、hemB (ボルホビリノーゲンシンターゼ)、hygB (ヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ)、niaD (ニトレートレダクターゼ)、prn (プロリンパーミアーゼ)、pyrG (オロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ)、pyrO, ribB, sC (スルフェートアデニルトランスフェラーゼ)、及び trpC (アントラニレートシンターゼ) からなる群から選択される遺伝子である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記複製開始配列が、

(a) 配列番号：1 又は配列番号：2 の核酸配列と少なくとも 90% の同一性を有し、かつ複製を開始できる複製開始配列；及び

(b) (i) 配列番号：1 もしくは配列番号：2 の核酸配列、又は (ii) その各々の相補鎖と高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし、かつ複製開始活性を有する配列からなる群から選択される核酸配列である請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記核酸配列が、配列番号：1 又は配列番号：2 の核酸配列と、少なくとも 97% の同一性を有する請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記複製開始配列が、糸状菌細胞から得られる請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記糸状菌細胞がアスペルギルス (*Aspergillus*) の株である請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記アスペルギルスの株が A. ニジュランス (*A. nidulans*) の株から得られる請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記複製開始配列が、配列番号：1 もしくは配列番号：2 に記載される核酸配列を有する、請求項 9 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 15】

前記親ポリヌクレオチド配列の改変が、突然変異誘発により、物理的もしくは化学的変異誘発剤の使用により、ドーピング化 (doped) オリゴヌクレオチドの使用により、DNA シャッフリングにより、もしくは前記核酸配列を PCR 生成変異誘発にかけることにより、又はそれらのいずれかの組合せを用いることにより行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記変異ポリヌクレオチド配列がポリペプチドもしくは調節配列、又は両方のいずれかの組合せをコードする 2 又はそれ超の相同核酸配列間の生体内組換えにより得られる請求項 15 に記載の方法であって、

(a) 前記親ポリヌクレオチド配列間の少なくとも 1 の保存された領域を同定し；

(b) 前記親ポリヌクレオチド配列の各々のフラグメントであって、(a) の保存された領域を含むものを生成し；そして

(c) 1 又は複数の相同結合点として前記保存された領域を用いることにより (b) のフラグメントを組み換えることを含む方法。

【請求項 17】

前記 DNA ベクターの集団で形質転換される糸状菌細胞が、アクレモニウム (*Acremonium*)、アスペルギルス (*Aspergillus*)、コプリヌス (*Coprinus*)、フサリウム (*Fusarium*)、ヒュミコラ (*Humicola*)、ムコル (*Mucor*)、マイセリオフトラ (*Myceliophthora*)、ニューロスポラ (*Neurospora*)、ペニシリウム (*Penicillium*)、チセラビア (*Thielavia*)、トリポクラジウム (*Tolypocladium*) 又はトリコデルマ (*Trichoderma*) の株の細胞である請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記細胞が、アスペルギルス・オリザエ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニゲル (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・ニジュランス (*Aspergillus nidulans*)、コプリヌス・シネレウス (*Coprinus cinereus*)、フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、又はトリコデルマ・レエセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞である請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

目的の生物活性又は機能をコードする少なくとも 1 の親ポリヌクレオチド配列のランダム突然変異誘発又は天然の対立遺伝子変異により、前記親ポリヌクレオチドに対し 1 又は複数の改変を含む変異ポリヌクレオチド配列のライブラリーを糸状菌細胞内で作製し、及びスクリーニング又は選択する方法であって、

(a) 請求項 1 ～ 18 のいずれか 1 項に記載の DNA ベクターの集団で、細菌又はイースト細胞の培養物を形質転換し、ここで該ベクターは、細菌又はイースト選択マーカー及び細菌又はイースト複製開始配列をコードする核酸配列を更に含む；

(b) 前記細菌又はイースト細胞を選択圧下で培養し；

(c) (b) の形質転換体から DNA 構成物を単離し；

(d) 糸状菌細胞を (c) の DNA 構成物で形質転換し；

(e) (d) の糸状菌細胞を培養し；

(f) 要求される特徴を発現する 1 又は複数の糸状菌形質転換体について選択又はスクリーニングし、そして (g) 問題の糸状菌形質転換体を単離することを含む方法。

【請求項 20】

前記細菌又はイースト選択マーカーが、殺生物剤もしくはウイルス毒性に対する耐性、重金属毒性に対する耐性、又は独立栄養体に対する原栄養性を供する産物をコードする遺伝子の群から選択される請求項 19 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、糸状菌細胞において問題のポリヌクレオチド配列のライブラリーを作製及びスクリーニングする方法に関する。

【0002】

発明の背景

糸状菌細胞は、ポリペプチドの商業的生産のための宿主細胞として広く用いられている。しかしながら、特定の変化した特徴、例えば熱安定性、pH活性プロフィール、比活性、基質特異性、Km、Vmax等のポリペプチドの変異体を生産することが要求される場合、変異体コーディング配列のライブラリーの作製及びスクリーニングは、一般に、中間体宿主、例えば細菌細胞又はイーストの使用を要求する。これは、独立して形質転換された糸状菌細胞の中での低い形質転換の頻度及びコピー数のバリエーションによる。

【0003】

イーストにおいて問題のポリヌクレオチド配列のライブラリーの作製のためのいくつかの方法があり、ここでは、イーストにおいてライブラリーをスクリーニングした後に、生産関連宿主、例えば糸状菌が、問題の潜在的な変異体ポリヌクレオチド配列で形質転換される。

10

しかしながら、しばしば、イースト又は細菌においてスクリーニングにより同定されるポリヌクレオチド配列は、生産関連糸状菌細胞に形質転換した時に発現されないか、又は低レベルでしか発現されない。これは、コドン用法、mRNAレベルのレギュレーション、転移機構、翻訳後修飾機構（例えばシステイン架橋、グリコシル化及びアシル化パターン）等の差を含むいくつかの理由による。

【0004】

第2に、問題のポリヌクレオチド配列が商業的に有用なレベルで生産宿主内で発現されるであろうか否かは必ずしも予測できない。例えば、ライブラリーをスクリーニングするのに用いる生物が例えば細菌又はイースト細胞であり、生産関連宿主細胞が糸状菌細胞であるなら、プロテアーゼプロフィールは異なる。これにより、イーストにおいて同定されている問題の1又は複数の特徴をコードする配列は、産物関連糸状菌宿主細胞において発現されたプロテアーゼにより分解され得る。更に、調節タンパク質又は調節配列の機能を変化させることにより発現される産物の最適な収率を得ることは、生産宿主の直接の操作を要求する。

20

【0005】

A.Aleksenko 及びA.J.Clutterbuck (1997, Fungal Genetics and Biology 21: 373~387) は、遺伝子クローニング及び発現研究のための、自己複製ベクター又は自己複製配列 (ARS) の使用を開示する。AMA1 (アスペルギルスにおける自己メンテナンス) は、議論されるプラスミドレプリケーター因子の1つである。それは、0.3 kb中心スペーサーにより分離されたMATE1 (移動性アスペルギルス形質転換エンハンサー) で示すゲノム反復の2つの逆方向コピーからなる。AMA1は、再配置多重重合化又は染色体組みみなしにプラスミド複製を促進する。

30

【0006】

発明の概要

AMA-1ベースのプラスミドは、糸状菌における遺伝子クローニングにおいて2つの利点を供することが見いだされた。第1は、受容体アスペルギルス (Aspergillus) 株を、連結混合物で直接、形質転換することができるように、潜在的なライブラリーサイズを増加させ、かつ中間体宿主、例えば大腸菌でのライブラリー増幅の必要性を排除し得る形質転換の高い頻度である。第2は、遺伝子発現のために安定で標準的な環境を供することにより、その形質転換体の特性が均一になるであろうことである。

40

【0007】

本発明の目的は、独立して形質転換された細胞の中で、高い頻度の形質転換及び均一な高レベルの遺伝子発現を供するためのエピソーム複製DNAベクターの使用により、糸状菌細胞において問題のポリヌクレオチド配列のライブラリーを作製及びスクリーニングするための改良された方法を供することである。独立して形質転換された細胞の中でのコピー数のバリエーションを最小にすることにより、問題の変異体ポリペプチドは、問題の特徴の発現に基づいて直接、同定することができる。

50

【0008】

従って、第1の態様において、本発明は、糸状菌細胞内の問題のポリヌクレオチド配列のライブラリーを作製し及び選択又はスクリーニングする方法であって、

(a) 前記糸状菌細胞をDNAベクターの集団で形質転換し、ここで各々のベクターは、
(i) 真菌選択マーカー及び真菌複製開始配列をコードするポリヌクレオチド配列であって、該マーカー及び複製開始配列が前記集団内で変化しないポリヌクレオチド；並びに
(ii) 問題のポリヌクレオチド配列であって、DNAベクターの集団が該ポリヌクレオチド配列の1超の変異体を含むポリヌクレオチド配列
を含み；

(b) 前記細胞を選択圧下で培養し；

(c) 要求される特徴を発現する1又は複数の形質転換体について選択又はスクリーニングし；

(d) 問題の形質転換体を単離すること
を含む方法に関する。

10

【0009】

他の態様において、本発明は、問題のポリヌクレオチド配列のライブラリーを作製するため及びこのようなポリヌクレオチド配列のライブラリーをスクリーニング又は選択するための真菌複製開始配列の使用に関する。

発明の詳細な記載

第1の実施形態において、本発明は、糸状菌細胞内の問題のポリヌクレオチド配列のライブラリーを作製し及び選択又はスクリーニングする方法であって、

(a) 前記糸状菌細胞をDNAベクターの集団で形質転換し、ここで各々のベクターは、
(i) 真菌選択マーカー及び真菌複製開始配列をコードするポリヌクレオチド配列であって、該マーカー及び複製開始配列が前記集団内で変化しないポリヌクレオチド配列；並びに
(ii) 問題のポリヌクレオチド配列であって、DNAベクターの集団が該ポリヌクレオチド配列の1超の変異体を含むポリヌクレオチド配列を含み；

(b) 前記細胞を選択圧下で培養し；

(c) 要求される特徴を発現する1又は複数の形質転換体について選択又はスクリーニングし、

(d) 問題の形質転換体を単離すること
を含む方法に関する。

20

30

【0010】

用語“問題のポリヌクレオチド配列のライブラリー”とは、問題の同じ機能又は活性をコードし又はそれを有するポリヌクレオチド配列のコレクションをいう。ライブラリーは、変異体のコレクションとして本明細書で定義される“問題のポリヌクレオチド配列の変異体のライブラリー”であり得る。ここでその変異体は、前記親ポリヌクレオチド配列の1又は複数の改変を含むことにより親ポリヌクレオチド配列と異なる。便利には、ポリヌクレオチド配列又は変異体は、突然変異誘発、好ましくはランダム変異誘発により問題の少なくとも1の親ポリヌクレオチド配列から生成され、最小数で4、好ましくは最小で25の異なるポリヌクレオチド配列をそのコレクション内に生ずる。親ポリヌクレオチド配列を変異誘発するために役立つ種々の方法が“ランダム変異誘発”及び“局所的ランダム変異誘発”との標題の下にセクションに記載される。用語“改変”は、その変異体のものと比べて、配列中の1又は複数のヌクレオチドの置換、挿入及び／又は削除を示すことを意図し、2又はそれ超の異なる親ポリヌクレオチドのハイブリッドを含み得る。

40

【0011】

ポリヌクレオチド配列又は変異体は、親ポリヌクレオチド配列の天然の対立遺伝子バリエーションからも生じ得る。対立遺伝子変異体は、同じ染色体座を占有する遺伝子の2又はそれ超の別の型のいずれかをいう。対立遺伝子変異は、突然変異を介して生じ、集団内で表現型多型性を引き起こし得る。遺伝子変異は、サイレント（即ちコードされるポリペプチドに変化なし）であっても、変化したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードして

50

もよい。更に、1又は複数の親ヌクレオチド配列から生成されるよりむしろ、ライブラリーのポリヌクレオチド配列は異なるソースから得ることができ、異なるが同じ活性又は機能を有する高度に関連したポリペプチドをコードし得る。本文脈において、“高度に関連”は、ポリペプチドが同じ活性又は機能を有し、そして更に、“DNAシャッフリング”の標題の更に下のセクションに記載されるような共有する保存された領域を有するポリヌクレオチド配列によりコードされることを示すことを意図する。

【0012】

用語“～から得られる（由来）”は、ポリヌクレオチド配列が特定のソース、例えば微生物から単離されることを示すことを意図する。ポリヌクレオチド配列は、非培養性生物から作られたものであってよい。ポリヌクレオチド配列は、問題の生物活性又は機能を有し又はそれをコードし、変異体ヌクレオチド配列の生産を許容するために少なくとも6ヌクレオチドのサブ配列を含むいずれのポリヌクレオチド配列であってもよい。

10

【0013】

ライブラリーに含まれるポリヌクレオチド配列について用いられる用語“同じ活性又は機能”は、ポリヌクレオチド配列が（定量的に測定して）同じ又は類似した生物活性もしくは機能を有するポリペプチドをコードするか、ポリヌクレオチド配列自体が同じ（定量的）活性又は機能を有することを示すことを意図する。例えば、ポリヌクレオチド配列は、プロモーター活性を有し得、即ち転写を促進することができるか、又は同じ定量的活性もしくは機能、例えば同じ酵素活性もしくは機能、例えばプロテアーゼ、リパーゼ又はアミラーゼ活性のポリペプチドをコードし得る。

20

【0014】

用語“DNAベクター”は、自律的に複製する能力を有し、問題の配列を含み得るポリヌクレオチド配列である。これにより、DNAベクターは、複製開始配列、例えば起点（例えばColE1起点、F1起点、M13起点、2μ起点（イースト）、oriP（EBウイルス）（pi））を含む。DNAベクターは、例えばプラスミドであり得る。

【0015】

用語“DNAベクターの集団がポリヌクレオチド配列の1超の変異体を含む”とは、DNAベクターの集団が問題の生物機能又は活性をコードし又は有する異なるポリヌクレオチド配列を含むことを示すことを意図する。

好ましい実施形態において、問題のポリヌクレオチド配列はポリペプチドコーディング配列である。用語“ポリペプチド”は、ペプチド、オリゴペプチド、及びタンパク質を包含し、それゆえ特定の長さのコードされた産物に限られない。ポリペプチドは宿主細胞に対してネイティブであっても、異種ポリペプチドであってもよい。用語“異種ポリペプチド”は、宿主細胞に対してネイティブでないポリペプチドとして定義される。ポリペプチドは、ポリペプチドの生産に関連する核酸配列に対して外来性の1又は複数の調節配列を含む核酸配列によりコードされる細胞に対してネイティブであるポリペプチドである組換えポリペプチドであってもよい。ポリペプチドをコードする核酸配列は、以下に記載のよう

いくつかの様式で操作され得る。ポリペプチドは、野生型ポリペプチドであってもその変異体であってもよく、本発明の方法にかけることができる。ポリペプチドは、1又は複数のポリペプチドが細胞に対して異種であり得る少なくとも2の異なるポリペプチドから得られた部分的又は完全なポリペプチドの組合せを含むハイブリッドポリペプチドであってもよい。ポリペプチドは、更に、天然の対立遺伝子及び上述のポリペプチドの操作された変異体を含む。

30

40

【0016】

別の好ましい実施形態において、問題のポリヌクレオチド配列は、ポリペプチドコーディング配列と通常、関連した調節配列である。調節配列はポリペプチドをコードする核酸又はポリペプチドの生産に関連する他のものに作用可能に結合した全ての成分を含む。このような調節配列は、これらに限らないが、本明細書に記載される。プロモーター、シグナル配列、プロペプチド配列、転写ターミネーター、リーダー、プロモーター認識配列、エンハンサー配列及びポリアデニル化配列を含む。なお更なる実施形態において問題のポリ

50

ヌクレオチド配列は、ポリペプチドコーディング配列（又はその配列の一部）と、a）調節配列（その調節配列の一部）又はb）2もしくはそれ超の調節配列（又はその配列の一部）との組合せである。調節配列の各々は、コーディング配列に対してネイティブであっても外来性であってもよい。

【0017】

好ましい実施形態において、問題のポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドは、抗体もしくはその部分、抗原、凝固因子、酵素、ホルモンもしくはホルモン変異体、レセプターもしくはその部分、調節タンパク質、構造タンパク質、リポーター、又は輸送タンパク質である。

より好ましい実施形態において、酵素は、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、又はリガーゼである。

10

【0018】

更により好ましい実施形態において、酵素は、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、デキストラナーゼ、エステラーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ハロペルオキシダーゼ、インベルターゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、マンノシダーゼ、ムタナーゼ、オキシダーゼ、ペクチン分解酵素、ペルオキシダーゼ、フィターゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、タンパク質分解酵素、リボヌクレアーゼ、トランスグルタミナーゼ、又はキシラナーゼである。リパーゼの特定の例は、サーモマイセス・ラヌギノサ (*Thermomyces lanuginosa*) 由来のリパーゼ又はそのリパーゼの変異体、例えば、WO97/04079に開示されるようにN末端伸長部が成熟リパーゼ酵素に付加されている変異体である。

20

【0019】

別の実施形態において、ポリペプチドはヒトインスリンもしくはそのアナログ、ヒト成長ホルモン、エリトロポイエチン、又はインスリノトロピンである。

更に好ましい実施形態において、調節配列はプロモーター配列、好ましくは真菌プロモーター、例えばアスペルギルス・オリザエTAKAアミラーゼ、NA2-tpi (A. ニゲル中性 α -アミラーゼ及びA. オリザエトリオースリン酸イソメラーゼをコードする遺伝子からのプロモーターのハイブリッド) 及びアスペルギルス・ニゲル又はアスペルギルス・アワモリグルコアミラーゼをコードする遺伝子から得られるプロモーターである。

30

【0020】

別の好ましい実施形態において調節配列はプロモーター認識配列、例えばamyR認識配列(WO98/01470)、creA(WO94/13820)及びareA(WO95/35385)である。

更なる本発明に関連する問題の調節配列の例は、“DNAベクター及び調節配列”の標題のセクションに更に下に列記される。

【0021】

糸状菌選択マーカー

用語“選択圧”は有効量の好適な選択剤の存在下又はその欠如下で、真菌選択マーカー遺伝子及び問題のポリヌクレオチド配列を含む、糸状菌細胞を培養することとして本明細書で定義される。選択剤の有効量は、選択マーカーを含まない細胞からの選択マーカーを含む細胞の選択を許容するために十分な量として本明細書で定義される。

40

【0022】

好ましい実施形態において、真菌選択マーカーは、殺生物剤もしくはウイルス毒性に対する耐性、重金属毒性に対する耐性、又は栄養要求体に対する原栄養性を供することができる産物をコードする遺伝子の群から選択される。

より好ましい実施形態において、原栄養性は、ヌクレオチド合成、コファクター合成、アミノ酸合成、アセトアミド代謝、プロリン代謝、スルフェート代謝、及びニトレート代謝からなる代謝経路の群から選択される酵素から得られる。

50

【0023】

更により好ましい、実施形態において、真菌選択マーカーは、argB（オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ）、amdS（アセトアミダーゼ）、bar（ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ）、hemA（5-アミノレブリン酸シンターゼ）、hemB（ホルホビリノーゲンシンターゼ）、hygB（ヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ）、niaD（ニトレートレダクターゼ）、prn（プロリンパーミターゼ）、pyrG（オロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ）、pyrA, ribB, sC（スルフェートアデニルトランスフェラーゼ）、及びtrpC（アントラニレートシンターゼ）から選択される遺伝子である。

【0024】

真菌細胞は、要求される特徴を有し又はそれをコードする問題の変異体ポリヌクレオチド配列を有する形質転換体についてスクリーニング又は選択するための好適な培地及び好適な条件下で培養される。培養は、ポリヌクレオチド配列ライブラリーのスクリーニングのための当業界で公知の方法に従って行うことができる。

【0025】

複製開始配列

本明細書に用いる場合、用語“真菌複製開始配列”は、通常、DNAベクターの構造的再配置又は宿主細胞ゲノムへの組み込みなしに、真菌細胞内で、絶体外分子、例えばDNAベクター、例えばプラスミドの自律的複製を支持することができる核酸配列として定義される。複製開始配列は、それが真菌細胞内で複製開始活性を媒介することができる限り、い

20

ずれの起源のものであってもよい。例えば、複製開始配列はアスペルギルスにおいて複製するプラスミド能力を与えるヒト起源のテロマーであってよい（Alek Senko and Ivanova, Mo.Gen.Genet. 260 (1998) 159~164）。好ましくは、複製開始配列は、糸状菌細胞、より好ましくはアスペルギルス、フサリウム又はアルテルナリア（Alternaria）の株、更により好ましくはA. ニジュランス、A. オリザエ、A. ニゲル、F. オキシスポルム又はアルテルナリア・アルテナタ（Alternaria alternata）の株から得られる。

【0026】

真菌複製開始配列は、当業界で公知の方法により同定することができる。例えば、その配列は、問題の生物由来のゲノムフラグメントの中で、糸状菌細胞内での自律的複製の能力を示す、イーストにおいて自律的複製を維持することができる配列として同定することができる。所定の配列の真菌中の複製開始活性は、真菌を、考えられるプラスミドレプリケーターで形質転換し、そして後にプラスミド上で見出される遺伝子について選択する時に選択培地上で増殖の欠如を導くであろうセクターのプラスミドの喪失を示す、不規則な形態を有するコロニーについて選択することによっても決定することができる（Gemsら、Gene, 98 (1991) 61~67）、AMA1は、この方法で単離された、複製開始配列を単離するためのかわりの方法は、（例えばアルテルナラ・アルテナタ（Alternaria alternata）についてTsugeら、Genetics 146 (1997) 111~120に開示されるような）天然のプラスミドを単離することである。

【0027】

真菌複製開始配列の例には、これらに限らないが、Cullen, D.ら（1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163 ~9175）及びGems, D.ら（1991, Gene 98: 61 ~67）により各々記載されるような、アスペルギルス・ニジュランスのANS1及びAMA1がある。

用語“複製開始活性”は、本明細書においてその慣用的な意味で、その配列が、染色体外分子、例えば真菌細胞におけるプラスミド又はDNAベクターの自律的複製を支持することができることを示す。

【0028】

用語“プラスミドの構造的再配置なし”とは、プラスミドの部分が削除もしくはプラスミドの別の部分に挿入されることがなく、またいずれの宿主ゲノムDNAもプラスミドに挿入されることがないことを意味するとして本明細書で用いる。

10

20

30

40

50

好ましくは、本発明の方法に用いるべき複製開始配列は、

(a) 配列番号：1又は配列番号：2の核酸配列と少なくとも50%の同一性を有し、かつ真菌中で複製を開始できるヌクレオチド配列；

(b) (i) 配列番号：1もしくは配列番号：2の核酸配列、又は(ii)その各々の相補鎖と低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする複製を開始することができるヌクレオチド配列であって、該低ストリンジェンシー条件が、42℃で、5×SSPE、0.3% SDS、200mg/mLせん断変性サケ精子DNA、及び25%ホルムアミド中でのプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションにより定義され、そして洗浄条件が、50℃で、30分、2×SSC、0.2% SDS中として定義されるヌクレオチド配列；及び

(c) 真菌中で複製を開始することができる(a)又は(b)のサブ配列からなる群から選択される核酸配列である。

【0029】

好ましい実施形態において、ヌクレオチド配列は、配列番号：1又は配列番号：2に記載の核酸配列と、少なくとも約50%、より好ましくは約60%、更により好ましくは70%、更により好ましくは約80%、更により好ましくは約90%、そして最も好ましくは約97%の同一性の程度を有する（以後、“相同ポリヌクレオチド”）。相同ポリヌクレオチドは、真菌細胞内で複製開始活性を有する配列番号：1又は配列番号：2のサブ配列も包含する。本発明の目的のため、同一性の程度は、好適には、当業界で知られたコンピュータープログラム、例えば、ポリヌクレオチド配列比較のための次のセッティング：5.0のGAP creation penalty及び0.3のGAP extension penaltyでGAPを用いて、GCGプログラムパッケージ（Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711）(Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-45)に供されるGAPにより決定することができる。

【0030】

ハイブリダイゼーションは、標準的サザン・ブロットィング手順の方法により、複製開始配列が、低～高ストリンジェンシー条件（即ち42℃で5×SSPE、0.3% SDS、200µg/mLせん断変性サケ精子DNA、並びに低、中及び高ストリンジェンシーについて各々、25、35又は50%のホルムアミドでのプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーション）下で、配列番号：1又は配列番号：2に記載の核酸配列から得られるオリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズすることを示す。配列番号：1又は配列番号：2と相同であるクローン又はDNAを同定するために、ハイブリダイゼーション反応は、各々、2×SSC、0.2% SDSを用いて、好ましくは少なくとも50℃、より好ましくは少なくとも55℃、より好ましくは少なくとも60℃、より好ましくは少なくとも65℃、更により好ましくは少なくとも70℃、そして最も好ましくは少なくとも75℃で、30分、3回、洗浄される。

【0031】

オリゴヌクレオチドプローブは、配列番号：1もしくは配列番号：2の核酸配列であっても、その各々のサブ配列であってもよい。より詳しくは、オリゴヌクレオチドプローブは、全体の配列よりかなり短くてもよいが、少なくとも15、好ましくは少なくとも25、そしてより好ましくは少なくとも40ヌクレオチド長である。DNA及びRNAの両方のプローブを用いることができる。

【0032】

プローブは、典型的には、対応する遺伝子を検出するために（例えば³²P、³H、³⁵S、ビオチン、又はアビジンで）標識される。例えば、³²P-、³H-、又は³⁵S-標識化オリゴヌクレオチドプローブがハイブリダイズする分子は、X線フィルムを用いることにより検出することができる。

本発明に用いるための複製開始配列を単離する場合、その配列を有すると予想される先に

10

20

30

40

50

定義されるような生物から調製されたゲノムDNA、cDNA又はコンビナトリアル化学ライブラリーは、複製開始活性を有する上述のオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズするDNAについてスクリーニングされる。このような他の生物からのゲノム又は他のDNAは、アガロースもしくはポリアクリルアミドゲル電気泳動、又は他の分離技術によって分離することができる。ライブラリーからのDNA又は分離されたDNAは、ニトロセルロース又は他の好適な担体材料に移し、そしてそれ上に固定することができる。配列番号：1又は配列番号：2と相同であるクローン又はDNAは、次に、以下の標準的サザンブロッティング手順に従って同定することができる。

【0033】

複製開始活性を有する核酸配列を単離又はクローン化するために用いる技術は当業界で知られており、ゲノムDNA又はcDNAからの単離を含む。このようなDNAからのクローニングは、例えば共有する構造的な特徴でクローン化DNAフラグメントを検出するためにポリメラーゼ鎖反応（PCR）に基づく方法を用いることにより、行うことができる（例えばInnisら、1990、PCR: A Guide to Method and Application, Academic Press, New York）。他の核酸増幅手順、例えばリガーゼ鎖反応（LCR）を用いることができる。

【0034】

好ましい実施形態において、複製開始配列は、配列番号：1もしくは配列番号：2に記載の核酸配列、又はそれらの各々の機能的サブ配列を有する。例えば、配列番号：1の機能的サブ配列は、5'及び／又は3'端からの1又は複数のヌクレオチドが削除されていることを除いて配列番号：1又は配列番号：2により包含される核酸配列である。好ましくは、サブ配列は、少なくとも100ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも1000ヌクレオチド、そして最も好ましくは少なくとも2000ヌクレオチドを含む。より好ましい実施形態において、配列番号：1のサブ配列は、少なくとも配列番号：2に示す核酸配列を含む。

【0035】

DNAベクター及び調節配列

真菌選択マーカーをコードするポリヌクレオチド配列、真菌複製開始配列及び問題のポリヌクレオチド配列を含むDNAベクターにおいて、そのポリヌクレオチド配列は、ポリペプチドをコードし得る。この場合、そのコーディング配列の発現を指示する1又は複数の調節配列に作用可能に結合する。あるいは、ポリヌクレオチド配列は、調節配列であり、この場合、問題の調節配列に依存して、それは、通常、調節配列の活性を評価することができるためにポリペプチドコーディング配列に作用可能に連結する（これにより、要求される特性を有する親調節配列の変異体を選択することができる）。

【0036】

DNAベクターの要素を連結するために用いる手順は当業者に公知である（例えばSambrookら、1989、前掲を参照のこと）。

用語“作用可能に連結”は、調節配列がポリペプチドの発現を指示し、又はポリペプチドの生産に関連するように、調節配列がポリペプチドコーディング配列に関連する位置に適切に配置されるコンフィグレーションとして本明細書で定義される。

【0037】

以下に、異なる調節配列が更に詳細に議論される。調節配列は、問題のポリヌクレオチド配列に作用可能に結合したもの（問題のポリヌクレオチド配列はポリペプチドをコードする）、及び問題のポリヌクレオチド配列を構成するもの（ポリヌクレオチド配列が調節配列である場合）をコードする。問題のポリヌクレオチド配列として（ライブラリーが調節配列のライブラリーである場合）又は問題のポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドの生産に関連した調節配列として（ライブラリーがポリペプチドをコードする問題のポリヌクレオチド配列のライブラリーである場合）1つ及び同じ調節配列を用いることができ、そして以下の開示が両方のタイプの調節配列の使用をカバーすることが理解されよう。

【0038】

調節配列は、ポリペプチドコーディング配列の発現のために宿主細胞により認識される核酸配列である好適なプロモーター配列であり得る。プロモーター配列は、ポリペプチドの発現を媒介する転写調節配列を含む。プロモーターは、変異体、トランケート化、及びハイブリッドプロモーターを含む選択された宿主細胞内で転写活性を示すいずれの核酸配列であってもよく、宿主細胞に対して同種又は異種の細胞外又は細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得ることができる。

【0039】

糸状菌宿主細胞内でポリペプチドコーディングヌクレオチド配列の転写を指示するための好適なプロモーターの例は、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Rhizomucor miehei* アスパラチックプロテイナーゼ、*Aspergillus niger* 中性 α -アミラーゼ、*Aspergillus niger* 酸安定性 α -アミラーゼ、*Aspergillus niger* 又は *Aspergillus awamori* グルコアミラーゼ (*glA*)、*Rhizomucor miehei* リパーゼ、*Aspergillus oryzae* アルカリプロテアーゼ、*Aspergillus oryzae* トリオースホスフェートイソメラーゼ、*Aspergillus nidulans* アセトアミダーゼ、*Fusarium oxysporum* トリプシン様プロテアーゼ (米国特許4, 288, 627) 並びにその変異体、トランケート化、及びハイブリッドプロモーターをコードする遺伝子から得られるプロモーターである。糸状菌宿主細胞に用いるための特に好ましいプロモーターは、TAKAアミラーゼ、NA2-tpi (アスペルギルス・ニゲル中性 α -アミラーゼ及びアスペルギルス・オリザエトリオースリン酸イソメラーゼからのプロモーターのハイブリッド)、及び *glA* プロモーターである。

【0040】

調節配列は、転写を終了させるために糸状菌細胞により認識される配列である好適な転写ターミネーター配列であってもよい。ターミネーター配列はポリペプチドコーディングヌクレオチド配列の3'末端に作用可能に結合される、糸状菌細胞内で機能的であるいずれのターミネーターも本発明に用いることができる。

好ましいターミネーターは、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ、*Aspergillus nidulans* アントラニレートシンターゼ、*Aspergillus niger α -グルコシダーゼ、及び *Fusarium oxysporum* トリプシン様プロテアーゼをコードする遺伝子から得られる。*

【0041】

調節配列は糸状菌細胞による翻訳のために重要であるmRNAの非翻訳領域である好適なリーダー配列であってもよい。リーダー配列は、ポリペプチドコーディングヌクレオチド配列の5'末端に作用可能に結合される。糸状菌細胞内で機能的であるいずれのリーダー配列も本発明に用いることができる。

好ましいリーダーは、アスペルギルス・オリザエ TAKAアミラーゼ及びアスペルギルス・ニジュランストリオースホスフェートイソメラーゼをコードする遺伝子から得られる。

【0042】

調節配列は、転写された時に、転写されたmRNAにポリアデノシン残量を加えるためのシグナルとして糸状菌細胞により認識されるポリペプチドコーディングヌクレオチド配列の3'末端に作用可能に結合された配列であるポリアデニル化配列であってもよい。糸状菌細胞内で機能的であるいずれのポリアデニル化配列も本発明に用いることができる。

【0043】

好ましいポリアデニル化配列は、アスペルギルス・オリザエ TAKAアミラーゼ、アスペルギルス・ニゲルグルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニジュランスアントラニレートシンターゼ、及びアスペルギルス・ニゲル α -グルコシダーゼをコードする遺伝子から得られる。

調節配列は、細胞の分泌経路にコードされたポリペプチドを向かわせることができるポリ

10

20

30

40

50

ペプチドのアミノ末端に結合したアミノ酸配列をコードするシグナルペプチドコーディング領域であってもよい。ポリペプチドコーディングヌクレオチド配列の5'端は、固有に、分泌されるポリペプチドをコードするコーディング領域のセグメントに翻訳読み枠内で天然で連結したシグナルペプチドコーディング領域を含んでもよい。あるいは、コーディング配列の5'端は、そのコーディング配列に対して外来性であるシグナルペプチドコーディング領域を含み得る。コーディング配列がシグナルペプチドコーディング領域を通常、含まない場合に、外来シグナルペプチドコーディング領域が必要とされ得る。あるいは、外来シグナルペプチドコーディング領域はそのポリペプチドの分泌を増強させるために、天然のシグナルペプチド領域に単に置きかわることができる。シグナルペプチドコーディング領域は、アスペルギルス種からのグルコアミラーゼもしくはアミラーゼ遺伝子、又はリゾムコル種からのリパーゼもしくはプロテイナーゼ遺伝子から得ることができる。しかしながら、発現されたポリペプチドを糸状菌細胞の分泌経路に向かわせるいずれのシグナルペプチドコーディング領域も本発明に用いることができる。

10

【0044】

有効なシグナルペプチドコーディング領域は、アスペルギルス・オリザエ T A K A アミラーゼ遺伝子、アスペルギルス・ニゲル中性アミラーゼ遺伝子、リゾムコル・ミエハイアスパラチックプロテイナーゼ遺伝子、又はヒュミコラ・ラヌギノサセルラーゼ遺伝子から得られるシグナルペプチドコーディング領域である。

調節配列は、ポリペプチドのアミノ末端に位置したアミノ酸配列をコードするプロペプチドコーディング領域であってもよい。得られたポリペプチドは、プロ酵素又はプロポリペプチド（又は特定の場合、チモーゲン）として知られる。プロポリペプチドは一般に不活性であり、そのプロポリペプチドからのプロペプチドの触媒的又は自己触媒的開裂により成熟活性ポリペプチドに変換することができる。プロペプチドコーディング領域は、リゾムコル・ミエハイアスパラチックプロテイナーゼ遺伝子又はマイセリオフトラ・サーモフィララッカーゼ遺伝子から得られる（WO 95/33836）。

20

【0045】

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

ポリペプチドコーディングヌクレオチド配列は、ポリペプチドの発現を指示するために有利な1又は複数の因子、例えば転写アクティベーター（例えばトランス作用因子）、シャペロン、及びプロセッシングプロテアーゼをコードする1又は複数の核酸配列に作用可能に結合させることもできる。糸状菌細胞において機能的であるいずれの因子も本発明に用いることができる。これらの因子を1又は複数、コードする核酸は、ポリペプチドコーディングヌクレオチド配列と必ずしもタンデムである必要はない。

30

【0046】

アクティベーターは、ポリペプチドコーディングヌクレオチド配列の転写を活性化するタンパク質である（Kudla ら、1990, EMBO, Journal 9: 1355 ~1364; Jarai及びBuxton, 1994, Current Genetics 26: 2238~244; Verdier, 1990, Yeast 6: 271~297）。アクティベーターをコードする核酸配列は *Saccharomyces cerevisiae* ヘムアクティベータープロテイン1 (hap1)、*Saccharomyces cerevisiae* ガラクトース代謝プロテイン4 (gal4)、*Aspergillus nidulans* アンモニア調節タンパク質 (areA)、及び *Aspergillus oryzae* α-アミラーゼアクティベーター (amyR) をコードする遺伝子から得られる。更なる例について、Verdier, 1990, supra and MacKenzie et al., 1993, Journal of General Microbiology 139: 2295-2307を参照のこと。

40

【0047】

シャペロンは、別のポリペプチドが正確にフォールディングするのを目かけるタンパク質である（Hartl et al., 1994, TIBS 19: 20-25; Bergeron et al., 1994, TIBS 19: 124-128; Demolder et al., 1994, Journal of Biotechnology 32: 179-189; Craig, 1993, Sci

50

ence 260: 1902-1903; Gething and Sambrook, 1992, Nature 355: 33-45; Puig and Gilbert, 1994, Journal of Biological Chemistry 269: 7764-7771; Wang and Tsou, 1993, The FASEB Journal 7: 1515-11157; Robinson et al., 1994, Bio/Technology 1: 381-384; Jacobs et al., 1993, Molecular Microbiology 8: 957-966)。シャペロンをコードする核酸配列は、アスペルギルス・オリザエタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ又はサッカロマイセス・セレビシアエカルネキシン、サッカロマイセス・セレビシアエ B i P / G R P 7 8、及びサッカロマイセス・セレビシアエ H s p 7 0 から得ることができる。更なる例について、Gething 及び Sambrook, 1992、前掲、及び Hartl ら、1994、前掲を参照のこと。

【0048】

プロセッシングプロテアーゼは、成熟した生化学的に活性なポリペプチドを作り出すためにプロペプチドを開裂するプロテアーゼである。(Enderlin and Ogrydziak, 1994, Yeast 10: 67-79; Fuller et al., 1989, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86: 1434-1438; Julius et al., 1984, Cell 37: 1075-1089; Julius et al., 1983, Cell 32: 839-852; 米国特許 5, 702, 934)。プロセッシングプロテアーゼをコードする核酸配列は *Saccharomyces cerevisiae* ジペプチジルアミノペプチダーゼ、*Saccharomyces cerevisiae* Kex2、*Yarrowia lipolytica* 塩基性プロセッシングエンドプロテアーゼ (xpr6)、及び *Fusarium oxysporum* metalloprotease (p45 遺伝子) から得られる。

【0049】

糸状菌細胞の増殖に関連するポリペプチドの発現の調節を許容する調節配列を加えることも要求され得る。調節システムの例は、調節化合物の存在を含む、化学的又は物理的刺激に対する応答において遺伝子の発現をターン・オン又はオフするものである。TAKA α-アミラーゼプロモーター、アスペルギルス・ニゲルグルコアミラーゼプロモーター、及びアスペルギルス・オリザエグルコアミラーゼプロモーターを調節配列として用いることができる。他の調節配列の例は、遺伝子増幅を許容するもの、例えば重金属で増幅されるメタロチオネイン遺伝子である。これらの場合、ポリペプチドコーディングヌクレオチド配列は、調節配列に作用可能に結合するであろう。

【0050】

DNAベクターの糸状菌細胞への導入は、それ自体、知られた様式で、プロトプラスト形成、プロトプラストの形質転換、及び細胞壁の再生からなる方法に関連し得る。アスペルギルス宿主細胞の形質転換のための好適な手順は、EP 238023 及び Yelton ら、1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470~1474 に記載される。フサリウム種を形質転換する好適な方法は、Malardier ら、1989, Gene 78: 147~156 又は WO 96 / 00787 に記載される。

【0051】

真菌細胞

DNAベクターの集団で形質転換すべき真菌細胞は糸状菌細胞である。

“糸状菌”は(Hawksworth ら、1995、前掲に定義される) 亜門真菌類及び卵菌類の全ての糸状菌型を含む。糸状菌は、キチン、セルラーゼ、グルカン、キトサン、マンナン、及び他の複合ポリサッカライドから構成される菌糸壁を特徴とする。栄養生長は、菌糸伸長により、炭素異化作用は絶対好気性である。対照的に、サッカロマイセスセレビシアエのようなイーストによる栄養生長は、単細胞葉状体により、炭素異化作用は発酵的であり得る。好ましい実施形態において、糸状菌細胞はこれらに限られないが、*Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Scytalidium*, *Thielavia*, *Tolypocladium*、及び *Trichoderma* の種の細胞である。

【0052】

本発明に用いるべき糸状菌細胞は、通常、問題のポリヌクレオチド配列に基づき選択される。例えば、問題のポリヌクレオチドがアスペルギルス細胞に用いることを意図した調節配列であるなら、糸状菌細胞は通常、アスペルギルス細胞である。本発明に用いる糸状菌細胞の例には、*Aspergillus*細胞、*Acremonium*細胞、*Fusarium*細胞、*Humicola*細胞、*Mucor*細胞、*Myceliophthora*細胞、*Neurospora*細胞、*Penicillium*細胞、*Thielavia*細胞、*Tolypocladium*細胞、及び*Trichoderma*細胞がある。

【0053】

より詳しくは、糸状菌細胞は、*Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*、又は*Aspergillus oryzae*細胞；

Fusarium bactridioides, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotricioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*細胞又は*Fusarium venenatum*細胞（*Nirenberg sp. nov*；*Humicola insolens cell*又は*Humicola lanuginosa*細胞；, *Mucor miehei*細胞；*Myceliophthora thermophila*細胞；*Neurospora crassa*細胞；*Penicillium purpurogenum*細胞；*Thielavia terrestris*細胞；又は*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*、又は*Trichoderma viride*細胞である。

【0054】

問題の形質転換体についてのライブラリーの選択又はスクリーニング

本発明の方法の選択又はスクリーニングステップc)を行うために用いるべき方法は、問題のポリヌクレオチド配列に依存するであろう。ステップc)に用いる“要求される特徴を発現する1又は複数の形質転換体についての選択又はスクリーニング”とは、要求される活性又は機能を有し、任意に、以下に例示されるような更なる特徴を有する（培養ステップbの間に問題のポリヌクレオチド配列に基づいて生成されている）問題の改変されたポリヌクレオチド配列を含む形質転換体を同定するために、スクリーニング又は選択を行うことを示すことを意図する。これにより、問題のポリヌクレオチド配列が特定の活性又は機能を有するポリペプチドをコードするなら、その選択は、要求される活性又は機能を有するポリペプチドを発現する形質転換体が増殖するのを許容するだけであろう。これにより、問題のポリヌクレオチド配列が特定の活性又は機能を有するポリペプチドをコードするなら、その要求される活性又は機能を有するポリペプチドを発現する形質転換体を同定するためにスクリーニングが行われよう。例えば、問題のポリヌクレオチド配列が酵素、例えばリパーゼをコードするなら、選択又はスクリーニングステップc)は、リパーゼ活性を発現する形質転換体を同定するために行われよう。リパーゼを、特定の特徴、例えば高い熱安定性として同定すべきであることが要求されるなら、スクリーニングは、要求される高い熱安定性を有するリパーゼを同定することができる条件（典型的な温度）下で行われるべきである。

【0055】

同様に、問題のポリヌクレオチド配列が調節配列、例えばプロモーター配列であるなら、選択又はスクリーニングステップc)は、プロモーター活性を評価することができる条件下で行われる。典型的には、ライブラリーにおいて、問題のプロモーターポリヌクレオチド配列は、そのプロモーター活性が第2の配列の転写を引用してアッセイすることができるように、転写されるべき第2の配列（例えばポリペプチドコーディング配列）に作用可能に結合される。

【0056】

細菌又はイースト宿主におけるライブラリー作製

本発明は、糸状菌細胞において問題のポリヌクレオチド配列のライブラリーを作製し、及びスクリーニング又は選択する方法であって、

(a) 細菌又はイースト細胞の培養物を、DNAベクターの集団で形質転換し、ここで各々のベクターは、

(i) 糸状菌選択マーカー、糸状菌複製開始配列、細菌又はイースト選択マーカー及び細菌又はイースト複製開始配列（各々は、DNAベクターの集団内で実質的に変化がない）をコードするポリヌクレオチド配列、及び

(ii) 問題のポリヌクレオチド配列であって、そのポリヌクレオチド配列の1超の変異体がDNAベクターの集団内に含まれるものを含み；

(b) 細菌又はイースト細胞を選択圧下で培養し；

(c) (b)の形質転換体からDNAベクターを単離し；

(d) 糸状菌細胞を(c)のDNAベクターで形質転換し；

(e) (d)の糸状菌細胞を選択圧下で培養し；

(f) 要求される特徴を発現する1又は複数の糸状菌形質転換体について選択又はスクリーニングし；そして

(g) 問題の糸状菌形質転換体を単離することを含む方法にも関する。

【0057】

中間体宿主としてイースト又は細菌を用いる利点は、形質転換頻度がアスペルギルスのような糸状菌細胞についてのものより100～1000倍高く、最初に、操作され任意に連結されたDNAベクターをイースト又は細菌に形質転換し、次にその単離されたスーパーコイルベクターを糸状菌細胞に形質転換する場合により大きなライブラリーを作り出すことである。

【0058】

好ましい実施形態において、問題のポリヌクレオチド配列のライブラリーは、上述の問題の生物機能を有し又はそれをコードする少なくとも1の親ポリヌクレオチド配列のランダム変異誘発又は天然の対立遺伝子変異体によって調製される。

別の好ましい実施形態において、細菌細胞は大腸菌の株である。

別の好ましい実施形態において、イースト細胞は、サッカロマイセス種の株、特にサッカロマイセス・セレビシアエ又はサッカロマイセス・クルイベリ又はスキゾサッカロマイセス種の株である。好適なイースト細胞の更なる例は、クルイベロマイセス、例えばK. ラクチス、ハンセヌラ (*Hansenula*)、例えばH. ポリモルファ (*H. polymorpha*)、又はピキア (*Pichia*)、例えばP. パストリス (*P. pastoris*) の株である。

【0059】

上述の方法に従って、DNAベクターは、形質転換された細菌又はイースト細胞の容易な選択を許容する選択マーカーを含む。細菌選択マーカーの例には、これらに限らないが、抗生物質、耐性例えばアンピシリン、カナマイシン、エリトロマイシン、クロランフェニコール又はテトラサイクリン耐性を与えるマーカーがある。更に、選択は、例えばWO 91/09129に記載されるように、同時形質転換によって行うことができる。ここでは、選択マーカーは別個のベクター上にある。

【0060】

イースト宿主細胞のための好適なマーカーは、A D E 2, H I S 3, L E V 2, L Y S 2, M E T 3, T R P 1、及びU R A 3である。

好ましい実施形態において、細菌又はイースト選択マーカーは、殺生物剤に対する耐性を与え、ここで殺生物剤は、アンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、ヒグロマイシン及びメトトレキサートからなる群から選択される。

【0061】

別の好ましい実施形態において、細菌又はイースト選択マーカーは、殺生物剤もしくはウイルス毒性に対する耐性、重金属毒性に対する耐性又は栄養要求体に対する原栄養性を供する産物をコードする遺伝子の群から選択される。

別の好ましい実施形態において、原栄養性は、ヌクレオチド合成、コファクター合成、アミノ酸合成、アセトアミド代謝、プロリン代謝、スルフェート代謝、及びニトレート代謝からなる代謝経路からなる群から選択される酵素から得られる。

【0062】

自律的複製のために、ベクターは、そのベクターが問題の細菌又はイースト細胞内で自律的に複製することを可能にする複製の起点を更に含み得る。複製の細菌の起点の例は、大腸菌内で複製を許容するプラスミド p B R 3 2 2, p U C 1 9, p A C Y C 1 7 7、及び p A C Y C 1 8 4 の複製の起点である。

イースト宿主細胞に用いるための複製の起点の例は、複製の 2 ミクロン起点、A R S 1, A R S 4, A R S 1 と C E N 3 の組合せ、及び A R S 4 と C E N 6 の組合せである。

【0063】

細菌又はイースト細胞の形質転換は、例えば、コンピテント細胞を用いることにより、エレクトロポレーションにより、又は細菌細胞のコンジュゲーションにより、行うことができる（例えば J. Sambrook, E. F. Fritsch、及び T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York を参照のこと）。これらの細胞の選択圧下での培養は、当業界で知られた方法に従って行うことができる。

【0064】

糸状菌選択マーカー、真菌複製開始配列及び問題のポリヌクレオチド配列は、好ましくは本明細書、例えば“糸状菌選択マーカー”及び“複製開始配列”の標題のセクションに記載される通りである。

問題の形質転換体の選択又はスクリーニングは、“形質転換体の選択及びスクリーニング”の標識のセクションに上述されるように行うことができる。

【0065】

問題のポリヌクレオチド配列

本発明は、いずれの型の問題のポリヌクレオチドのライブラリーをスクリーニング又は選択するためにも有用であろう。より詳しくは、本発明の方法に用いるべき問題のポリヌクレオチド配列は、問題の生物活性又は機能を有し又はそれをコードする親ポリヌクレオチド配列から生成することができる。例えば、問題のポリヌクレオチド配列は、遺伝子のランダム変異誘発により問題のポリペプチドをコードする遺伝子から生成される。あるいは、問題のポリヌクレオチド配列は、先に定義されるような調節配列、例えばプロモーター配列である。また、更に上述されるように、問題のポリヌクレオチド配列は、異なるソース、例えば異なる天然のソース、例えば微生物から得ることができる。問題のポリヌクレオチド配列は、ポリペプチドコーディング配列及び調節配列の組合せであり得る。

【0066】

好ましい実施形態において、親ポリヌクレオチド配列の改変は、物理的もしくは化学的変異誘発剤の使用、ドーピング (doped) オリゴヌクレオチドの使用、DNA シャッフリングにより、核酸配列を PCR 生成変異誘発にかけることにより、又はそれらのいずれかの組合せにより行われる。

あるいは、問題のポリヌクレオチド配列は、誤りがちなポリメラーゼ (error-pr

10

20

30

40

50

one polymerase) 又はエラーの形成を促進するために最適以下の条件下で作用するポリメラーゼを用いることにより、即ち、エラー・プローンPCRにより、ヌクレオチド塩基の誤った組込みにより、配列を変異誘発にかけることにより得ることができる、エラー・プローンDNA合成は、例えば種々のミューテーター株の使用により、試験管内又は生体内で行うことができる。

【0067】

ランダム変異誘発

改変タンパク質及び酵素をコードする変異体ポリヌクレオチド配列を生成するための一般的なアプローチは、例えばUS 4, 894, 331及びWO 93/01285に開示されるような、ランダム変異誘発に基づいている。このアプローチは、本発明とあわせて用いることもできる。例えば、ランダム変異誘発は、好適な物理的もしくは化学的変異誘発剤の使用により、好適なオリゴヌクレオチドの使用により、又はポリヌクレオチド配列をPCR生成変異誘発にかけることにより行うことができる。更に、ランダム変異誘発は、これらの変異誘発剤のいずれかの組合せの使用により行うことができる。変異誘発剤は、例えば、転位、トランスバージョン、逆位、スクランブリング、削除及び／又は挿入を誘導するものであってよい。

【0068】

本目的に適した物理的又は化学的変異誘発剤の例には、紫外線(UV)照射、ヒドロキシルアミン、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロングアニジン(MNNG)、O-メチルヒドロキシルアミン、亜硝酸、エチルメタンスルホネート(EMS)、重硫酸ナトリウム、ギ酸、及びヌクレオチドアナログがある。このような剤を用いる場合、変異誘発は、典型的には、問題のポリヌクレオチド配列を、選択された変異誘発剤の存在下で、変異誘発がおこるために適した条件下でインキュベートすることにより行われる。

【0069】

変異誘発をオリゴヌクレオチドの使用により行う場合、オリゴヌクレオチドは、変化すべき位置でオリゴヌクレオチドの合成の間、3つの非親ヌクレオチドでドーピング又はスパイクすることができる。ドーピング又はスパイクは、不要なアミノ酸のためのコドンが回避されるように行うことができる。ドーピング又はスパイク化オリゴヌクレオチドは、いずれかの公開された技術により、例えばPCR、LCR又は好適と思われるいずれかのDNAポリメラーゼ及びリガーゼにより問題のポリヌクレオチドに組込むことができる。

【0070】

好ましくは、ドーピングは、各々の位置での野生型及び変異の割合が予め規定されている“コンスタントランダムドーピング”を用いて行われる。更に、ドーピングは、特定のヌクレオチドの導入のための選択、それにより1又は複数の特定のアミノ酸残基の導入についての選択に対して行うことができる。ドーピングは、例えば各々の位置での90%野生型及び10%変異の導入を許容するように、行うことができる。ドーピングスキームの選択における更なる考慮は、遺伝子及びタンパク質構造束縛に基づく。ドーピングスキームは、とりわけ終止コドンの導入を避けるDOPEプログラム(例えば、Tomardl, Dら、1997, Journal of Computer-Aided Molecular Design 11: 29~38; Jensen, LJ, Andersen KV, Svendsen, A., 及びKretzschmar, T., 1998, Nucleic Acids Research 26: 697~702)を用いることによって行うことができる。

【0071】

PCR生成変異誘発を用いる場合、化学的に処理した又は非処理の問題の親ポリヌクレオチド配列は、ヌクレオチドの誤った組込みを増加させる条件下でPCRにかけられる(De shler, J.O., 1992, Genetic Analysis, Techniques and Applications 9: 103 ~106; Leungら、1989, Technique 1: 11 ~15)。

大腸菌(Foulerら、1974, Molec.Gen.Genet. 133: 179~191)、S. セレビシアエ又はいずれかの他の微生物のミューテーター株は、問題のポリヌクレオチド配列のランダム変異誘発のために、例えば親ポリヌクレオチド配列を含むプラスミドをミューテーター株に形質転換し、そのミューテーター株をプラスミドと共に増殖させそしてそのミューテーター

10

20

30

40

50

株から変異したプラスミドを単離することにより用いることができる。変異したプラスミドは、次に、発現生物に形質転換することができる。

【0072】

変異誘発すべきポリヌクレオチド配列は、便利には、その配列を有する生物から調製されたゲノム又はcDNAライブラリー中に存在し得る。あるいは、その配列は、それ自体、変異誘発剤と共にインキュベートすることができ、又はそれに露出することができるプラスミド又はバクテリオファージのような好適なベクター上に存在し得る。変異誘発すべきポリヌクレオチド配列は、単離された形態であってよい。ランダム変異誘発にかけるべきポリヌクレオチド配列は、好ましくはcDNA又はゲノムDNA配列であることが理解されよう。その変異誘発されたDNA配列は、変異されたDNA配列の発現を許容する機能をコードするDNA配列を更に含み得る。

10

【0073】

DNAシャッフリング

本発明による問題のポリヌクレオチド配列の変異体の迅速な調製のための別の方法には、生体内又は試験管内DNAシャッフリングの方法がある。ここで、DNAシャッフリングは、2又はそれ超の相同ポリヌクレオチド間のヌクレオチド配列フラグメントの生体内又は試験管内の組換えとして定義され、インプットポリヌクレオチド（即ちシャッフリングにかけられるポリヌクレオチド）と比べて、いくつかの変化したヌクレオチドフラグメントを含むアウトプットポリヌクレオチド（即ちシャッフリングサイクルにかけられたポリヌクレオチド）を生ずる。シャッフリングは、その例が以下に列記される当業界で知られた方法により、細胞内での組換えにより試験管内又は生体内で行うことができる。

20

【0074】

例えば、H.Weher 及びWeissmanu, C. (1983. Nucleic Acids Research 11: 5661~5669) は、2つの相同遺伝子間の生体内組換えにより遺伝子を改変するための方法を記載する。ここでは、組換え体は、耐性マーカーを用いて同定され、単離される。

Pomponら (1989, Gene 83: 15 ~24) は、サッカロマイセス・セレビシアエを、フィル・イン端を有する直鎖化プラスミド、及びそのプラスミドの端と部分的に相同であるDNAフラグメントで形質転換することにより、サッカロマイセス・セレビシアエにおける部分的に相同な配列の生体内組換えによる哺乳動物シトクロムP-450の遺伝子ドメインをシャッフリングするための方法を記載する。

30

【0075】

WO97/07205においては、ポリペプチド変異体が、テンプレートとしてプラスミドDNAを用いる生体内組換えにより、相同なDNA配列の異なるヌクレオチド配列をシャッフリングすることにより調製される方法が記述される。

米国特許第5,093,257号 (Genencor International, Inc.) は、生体内組換えによりハイブリッドポリペプチドを生産するための方法を開示する。

【0076】

好ましい実施形態において、問題の変異体ポリヌクレオチド配列は、問題の2又はそれ超の相同な核酸配列間の生体内組換えによって得られ、

(a) 問題のポリヌクレオチド配列間の少くとも1の保存された領域を同定し；

40

(b) 問題のポリヌクレオチド配列の各々のフラグメントであって、(a)の保存された領域を含むフラグメントを生成し；

(c) 1又は複数の相同なリンク点として保存された領域を用いることにより(b)のフラグメントを組換えることを含む。

【0077】

好ましくは、問題のポリヌクレオチド配列は、ポリペプチドもしくはその一部をコードするか、又は先に定義されるような調節配列もしくは両方のいずれかの組合せである。

用語“保存(された)領域”とは、2又はそれ超の配列が共有する好ましくは少くとも10bpのサブ配列をいい、少くとも約50%、より好ましくは少くとも約60%、更により好ましくは少くとも約70%、更により好ましくは少くとも約80%、更により好ましく

50

は少なくとも約90%、そして最も好ましくは少なくとも約97%のサブ配列間の同一性の程度がある。

【0078】

保存された領域を2つの配列間の“結合（連結、リンク）点”として用いるために、保存された領域内の配列間の同一性の程度は、配列間の例えば上述の条件下で、ハイブリダイゼーションを可能にするのに十分に高く、それにより保存された領域はリンク点として機能する。

試験管内の相同DNA配列のシャッフリングのための1つの方法は、Stemmer (Stemmer, 1994. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 91: 10747-10751; Stemmer, 1994. Nature 370: 389-391; Cramer, A., et al., 1997. Nature Biotechnology 15: 436-438) により記載されている。その方法は、試験管内PCR技術を用いることにより相同DNA配列をシャッフリングすることに関する。シャッフ化DNA配列を含む陽性細胞組換え遺伝子は、発現されたタンパク質の改良された機能に基づきDNAライブラリーから選択される。

【0079】

上述の方法は、相同DNA配列をシャッフリングするための方法に関連してWO95/22625にも記載される。その方法における重要なステップは、相同なテンプレート二本鎖ポリヌクレオチドを、要求されるサイズのランダムフラグメントに開裂し、次にそれらフラグメントを全長遺伝子に相同的に再アセンブルすることである。

【0080】

WO98/41653は、組換えた相同ポリヌクレオチドのライブラリーが試験管内DNA合成の間に誘導されたテンプレートシフトによりいくつかの異なるインプットDNAテンプレート及びプライマーから作製される。

局所化ランダム変異誘発

ランダム変異誘発は、問題の親ポリヌクレオチド配列の一部に有利に局在化させることができる。改変すべき配列は例えば、遺伝子産物の活性のために本質的である遺伝子のコーディング領域もしくはその一部、又は先に定義される調節配列もしくはその一部であり得る。このような調節配列の好ましい例は、プロモーター配列又はその機能的部分、即ち核酸配列の発現を行うために十分である部分である。

【0081】

局所化ランダム変異誘発は、例えば、問題のポリヌクレオチド配列の特定の領域が特に重要であると特定されている場合に有利であり得る。例えば、問題のポリヌクレオチド配列がポリペプチドをコードする場合、その重要な領域は、そのポリペプチドの所定の特性のために本質的なものであり得、その領域の改変はこの特性が改変されている変異体を生ずると予想される。このような領域は、通常、親ポリペプチドの三次構造が解明されてその機能と関連づけられている場合に同定することができる。同様に、問題のポリヌクレオチド配列が、調節配列、例えばプロモーターである場合、問題の領域は、プロモーター活性に本質的であるか又はそれに関連すると予想されるものであり得る。

【0082】

局在化、又は領域特異的ランダム変異誘発は、便利には、上述のようなPCR生成変異誘発技術又は当業界で知られたいずれかの他の好適な技術の使用により行われる。あるいは、改変すべきポリヌクレオチド配列の部分をコードするヌクレオチド配列は、例えば好適なベクターへの挿入により単離することができ、その部分は、次に、先に議論した変異誘発法のいずれかの使用により変異誘発にかけることができる。

【0083】

真菌複製開始配列の使用

更なる態様において、本発明は、糸状菌細胞において問題のポリヌクレオチド配列のライブラリーを作製し、選択又はスクリーニングするための本明細書に定義される真菌複製開始配列の使用に関する。好ましくは、ライブラリーは、本発明の第1又は第2の態様に従う方法によって作製される。好ましい実施形態において、真菌複製開始配列は、

(a) 配列番号：1もしくは配列番号：2の核酸配列と少なくとも50%の同一性を有し、

複製を開始することができる複製開始配列；

(b) (i) 配列番号：1もしくは配列番号：2の核酸配列、又は(ii)それら各々の相補鎖と低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする複製開始配列であって、その低ストリンジェンシー条件は、42℃で、5×SSPE、0.3% SDS、200mg/mLせん断変性サケ精子DNA、及び25%ホルムアミド中でのプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションにより規定され、洗浄条件が50℃で30分、2×SSC、0.2% SDS中として規定される複製開始配列；

(c) (a) 又は (b) のサブ配列であって複製開始活性を有するものからなる群から選択される。

【0084】

好ましくは、複製開始配列は、糸状菌細胞から、特にアスペルギルス、例えばA. ニジュランスの株から得られる。最も好ましい実施形態において、複製開始配列は、配列番号：1もしくは配列番号：2に記載の核酸配列を有するか、又はそれらの各々の機能的サブ配列である。この態様に従って用いるべき複製開始配列は、“複製開始配列”の標題の上述のセクションに記載され得る通りである。

【0085】

問題のポリヌクレオチド配列のライブラリー

更なる態様において、本発明は、DNAベクターの集団で形質転換された糸状菌細胞を含む問題のポリヌクレオチド配列のライブラリーであって、各々のベクターが、

(i) 真菌選択マーカー及び真菌複製開始配列をコードする遺伝子であって、該マーカー及び複製開始配列が前記集団内で変化していない遺伝子；及び

(ii) 問題のポリヌクレオチド配列であって、DNAベクターの集団がポリヌクレオチド配列の1超の変異体を含むポリヌクレオチド配列を含むライブラリーに関する。

【0086】

好ましい実施形態において、そのベクターは細菌又はイースト選択マーカー及び細菌又はイースト複製開始配列をコードする核酸を更に含む。好ましくは、ライブラリーは、本発明の第1又は第2の態様に従う方法によって調製される。好ましくは、ライブラリーの要素、例えばDNAベクター及びその言及される構成物は明細書に記載される。

【0087】

本発明は、以下の例により更に記述されるが、それらは本発明の範囲を限定するものとして解釈すべきでない。

実施例

材料

緩衝液及び基質として用いる化学物質は少くとも試薬グレードの商用製品であった。

【0088】

プラスミド

pMT1505 : 実施例1に後述の通り作製

pHep1 : Gems, D., ら (1991, Gene 98: 61~67) に記載されるよう

に選択マーカーとしてA. オリザエからの pyrG 遺伝子及

びA. ニジュランスにおける自己複製を可能にするAMA1

配列を含む。

pTOC68 : EPO 531372 (Novo Nordisk A/S) に記載

pAHL : WO92/05249に記載、リパーゼコーディング配列を含む

pSO2 : WO96/29391に記載、アスペルギルス・オリザエ pyrG 遺伝子を含む

pENI1127 : 実施例1に後述の通り作製

pENI1245 : 実施例1に後述の通り作製

pENI1246 : 実施例1に後述の通り作製

pENI1298 : 実施例1に後述の通り作製

10

20

30

40

50

p E N I 1 2 9 9 : 実施例 1 に後述の通り作製株

J a L 2 5 0 : W O 9 8 / 0 1 4 7 0 に記載される通り、p y r Gが不活性化されているアスペルギルス・オリザエ A 1 5 6 0 の誘導体

D H 5 a : GIBCO BRL から購入した大腸菌宿主細胞 (Life Technologies, Inc., Rockville MD)

D L M 1 5 : 以下の実施例 5 に記載されるようなフサリウム・ベネナトゥム (F u s a r i u m v e n e n a t u m) の誘導体

実施例 1 : p E N I 1 2 9 8 及び p E N I 1 2 9 9 の作製

p M T 1 4 6 6 を、p H e l p 1 からの S p h I / N a r I フラグメントを p T p C 6 8 に挿入することにより作製した。p M T 1 4 8 9 を、p M T 1 4 6 6 を S p h I 及び S t u I で消化し、次に再連結することにより作製した。p M T 1 5 0 0 を、p M T 1 4 8 9 を A a t II 及び N u r I で消化し、リンカーを連結することにより作製した。p M T 1 5 0 4 を、p M T 1 5 0 0 を N h e I で消化し、再連結することにより作製した。p M T 1 5 0 5 を、A. ニジュランスゲノム DNA から a m d S コーディング遺伝子を含む 2.7 kb X b a I フラグメント (Corrick, C.M. ら, 1987, Gene 53: 63 ~ 71) を、N h e I で切断された p M T 1 5 0 4 に挿入することにより作製した。p E N I 1 1 2 7 を、S a l I で消化した p M T 1 5 0 5 から作製し、A M A 1 反復のうちの 1 つ及び中心スペーサー領域を除去した。

【0089】

p E N I 1 1 2 7 及び p M T 1 5 0 5 を、各々 H i n d III で切断し、各々 2 4 0 3 bp 及び 5 2 5 3 bp のフラグメントを作り、それらを 1 % アガロースのゲルから精製し、リパーゼコーディング配列を含むベクター p A H L 内の H i n d III 部位にクローン化した。得られたプラスミドを各々 p E N 1 2 4 5 及び p E N 1 2 4 6 と呼んだ。

【0090】

p y r G 遺伝子を含む 3 5 2 7 bp S t u I / B b u I フラグメントを p S O 2 から切り出し、p E N I 1 2 4 5 及び p E N I 1 2 4 6 の両方の S t u I / B b u I 部位に挿入した。得られたプラスミドを各々 p E N 1 2 9 8 及び p E N 1 2 9 9 と呼んだ。p E N I 1 2 9 8 についての制限地図を図 1 に、p E N I 1 2 9 9 を図 2 に示す。

【0091】

実施例 2 : 独立して増殖させたアスペルギルス・オリザエ形質転換体におけるリパーゼの発現レベル

J a L 2 5 0 を、例えば W O 9 8 / 0 1 4 7 0 に記載される標準的手順を用いて、p E N I 1 2 9 8 及び p E N I 1 2 9 9 で形質転換した。次にその細胞を 3 7 °C で C o v e プレート上で培養した。

【0092】

形質転換体は、 $10^4 \sim 10^5 / \mu g$ DNA の形質転換頻度で、3 日のインキュベーション後に現れた。それは、A M A 1 配列の欠如下での形質転換頻度の 1 0 0 ~ 1 0, 0 0 0 倍の増加であった。

p E N I 1 2 9 8 及び p E N I 1 2 9 9 形質転換体からの 3 0 の独立した形質転換体を、C o v e プレート上で単離し、同時に、各々のウェル中に $1^* v o g e l$ 、2 % マルトースの 2 0 0 μL 最小培地 (例えば Methods in Enzymology, Vol.17 p.84) を含む 9 6 ウェルマイクロタイター皿に接種した。

【0093】

3 4 °C で 3 日のインキュベーションの後、そのマイクロタイター皿内の培養物からの培地を、リパーゼ活性についてアッセイした。各々のウェルからの培地の 1 0 μL アリコート、0. 0 1 8 % p - ニトロフェニルブチレートのリパーゼ基質 2 0 0 μL 、0. 1 % T r i t o n X - 1 0 0、1 0 mM C a C l₂、5 0 mM T r i s pH 7. 5 を含むマイクロタイターウェルに加えた。活性を、標準的酵素学プロトコル (例えば Enzyme Kinetics, Paul C.Engel, ed, 1981, Chapman and Hall Ltd.) を用いて、カイネティックマ

10

20

30

40

50

イクロタイターリーダー (Molecular Device Corp., Sunnyvale CA) を用いて 5 分間にわたり、15 秒間隔で分光光度測定によりアッセイした、要約すると、産物形成は、基質ターンオーバーの最初の比率の間、測定し、5 分間、15 秒毎に 405 nm での吸光度から計算した曲線の傾きとして規定した。任意リパーゼ活性単位を、最も高いリパーゼ活性を示す形質転換体に対して標準化した。30 の形質転換体の各々のグループについて平均値及び標準偏差を計算した。

【0094】

同時に、37℃で3日間、Coveプレート上で培養した形質転換体を第2のCoveプレート上に再び単離し、前述のようにマイクロタイターウェルに再接種した。更に3日間、培養した後に、もう1回、アッセイ、再単離及び再接種の手順をくり返した。

以下の表1に要約した結果は、形質転換後6日にpENI1298形質転換体により生産される量に対する、生産されたリパーゼの量を示す。標準偏差の低い値により示されるように、30の独立して増殖させた形質転換体の中でリパーゼ発現レベルにほとんど変化はない。通常、糸状菌の形質転換を行う場合、ベクターのゲノムへのランダム組込み及び組み込まれたベクターの数の両方により、かなり大きい相対的な標準偏差が見られる(70%~100%)。最も悪い及び最も優れた生産性真菌形質転換体間で発現レベルで100~1000倍の差となり得る。

【0095】

【表1】

日数	プラスミド	発現 (%)	標準偏差
6	pENI1298	100	17
6	pENI1299	62	20
9	pENI1298	100	17
9	pENI1299	55	37
12	pENI1298	82	27
12	pENI1299	47	57

【0096】

表1. 形質転換後6日の、pENI1298に対する30の独立して増殖させた形質転換体からのリパーゼの平均発現レベル及び各々についての標準誤差

実施例3：プラスミドの再配置についてのテスト

pENI1298又はpENI1299のいずれかを含むJal250の形質転換体をYPD培地中で一晚、増殖させた。

【0097】

製造元により供される手順が改変されているQIAGEN (登録商標) Miniprepキット (QIAGEN, Venlo, The Netherlands) を用いて形質転換体の各々からDNAを調製した。要約すると、各々の株を3日間、5mL YPD中で増殖させた。その菌糸体を、ろ過により収集し、200mLの水で洗い、次に2mLマイクロフュージチューブに移し、60℃で3時間、真空下で遠心により凍結乾燥した。その乾燥した菌糸体を次に、粉碎し、1mLの溶解緩衝液 (100mM EDTA、10mM Tris pH8.0、1% Triton X-100、500mMグアニジン-HCl、200mM NaCl) に再度懸濁し、次に全体を混合した。20mgのRNaseを各々のチューブに加え、次にそれを10分、37℃でインキュベートした。100µgのプロテイナーゼKを加え、その反応を30分

、50℃でインキュベートした。次に各々のチューブを、標準的トップ・マイクロフュージ中でトップヒスPEEDで15分、遠心した。その上清をQIAprep（登録商標）スピンカラムに適用し、次に遠心してろ液を捨てた。そのカラムを次に、そのキットに供される0.5mL PB中で洗い、1分間、再び遠心した。ろ液を捨てた後、そのカラムをキットに供される0.75mL PE中で洗い、次にもう1回、1分、遠心した。そのカラムを空気乾燥させ、そのDNAを100μLのTE緩衝液を加えることにより溶出し、最後に1分、回転させた。

【0098】

DNAを大腸菌DH5aに形質転換した場合に形質転換体を得て、プラスミドがA. オリザエ内のエピソームに維持した。プラスミドDNAを製造元の説明に従って、QIAprep（登録商標）Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて細菌細胞から精製した。次にその精製したプラスミドDNAをScaIで消化し、その制限パターンを、標準的アガロースゲル分画技術により分析した。

10

【0099】

もとのプラスミドの制限パターンと比べた時、結果は、5のpENI1299JaL250形質転換体に再配置は1つもなく、8のpENI1298JaL250形質転換体のうち1つのみが再配置を示し、プラスミド再配置がまれであることを示した。

実施例4：ライブラリーのスクリーニング

変異体ポリペプチドを、親ポリペプチドに相当するレベルで発現される改良された機能的特徴で同定するために、変異体ポリペプチドのライブラリーを作製し、アスペルギルス・オリザエにおいてスクリーニングした。テンプレートとしてpENI1298並びに以下に記載のような各々のプライマー2pmol/mL：1つのプライマーとしてoligo19670、第2のプライマーとしてドープ化oligo23701、23702又は23703を用いるポリメラーゼ鎖反応を以下の条件下で行った；94℃、5分；30サイクルの（94℃、30秒；50℃、30秒；75℃、1分）、及び72℃、5分。商用Taqポリメラーゼ、AmpliTaqを、供給元（Perkin-Elmer Corp., Branchburg NJ, USA）により推奨される通り用いた。

20

【0100】

19670：配列番号：3

23701：配列番号：4

23702：配列番号：5

23703：配列番号：6

30

得られた産物をマイクロフュージスピンカラムS300（Pharmacia-LKB, Uppsala SE）を用いて精製した。pENI1298 DNAを含むその精製された産物を以下の条件下で2回目のPCR増幅にかけた：94℃、5分；30サイクルの（94℃、1分；50℃、10分；72℃、2分）；及び72℃7分。以下のプライマーを用いた。

【0101】

19671：配列番号：7

次にその産物をテンプレートDNAを除去するためDpn1消化にかけ、次に94℃で30分、インキュベートしてDpn1酵素を不活性化した。

40

JaL250を、Bali及びSgrAI消化してリパーゼコーディング配列のほとんどを除去した2μgのpENI1298、並びに23701、23702又は23703ドープ化オリゴ反応起源のPCRフラグメントのうちの1つ5μgを用いて形質転換した。そのベクター及びPCRフラグメントをWO97/07205に記載のように生体内で組み換えた。JaL250細胞は、消化したpENI1298又はPCR産物各々のみでも形質転換した。細胞をベクターのみで形質転換した場合に1つの形質転換体を得て、PCRフラグメントのみの形質転換からは形質転換体は得られなかった。

【0102】

23701、23702及び23703ライブラリー各々からの15、12及び26の形質転換体を1.1* v o g e l、2%グルコース培地200μLを含むマイクロタイター

50

プレートに接種し、72時間、インキュベートした。pENI1298のJaL250形質転換体もコントロールとして接種した。次にその培養物をCoveプレート上にストリーキングした。マイクロタイター培養物中のリパーゼ活性を先の実施例2に記載されるように、及びマイクロタイターウェル中商用洗濯用界面活性剤を用いて調製した200 μ Lのリパーゼ基質に10 μ Lのマイクロタイター培養物を加える界面活性剤含有アッセイでアッセイした。活性は、分光光度測定により405nmで測定し、先の実施例2に記載されるように計算した。

【0103】

界面活性剤含有アッセイにおいて活性を示した形質転換体の各々をCoveプレート上に再単離した。72時間、37℃でインキュベートしたCoveプレート各々から、上述の通り、10のpENI1298形質転換体と共に、2つのコロニーをマイクロタイター皿に接種し、次に72時間、34℃で培養した。全てのクローンが界面活性剤アッセイで活性を示したが、pENI1298形質転換体は示さなかった。更に、独立して重複した培養物として増殖させた形質転換体は、相対的に小さいレベルの活性しか示さなかった。結果を以下の表2に要約する。

【0104】

【表2】

ライブラリー	クローン	Pnp-ブチレート活性			界面活性剤活性		
		平均	標準偏差		平均	標準偏差	
pEN11298		96	16		3	80	
		コロン1	コロン2	平均	コロン1	コロン2	平均
23701	1	97	114	105.5	45	53	49
	2	60	87	73.5	12	19	15.5
	3	53	68	60.5	9	14	11.5
23702	1	58	55	56.5	16	15	15.5
	2	62	71	66.5	16	21	18.5
	3	47	65	56	17	17	17
	4	49	45	47	16	17	16.5
	5	35	42	38.5	11	13	12
	6	34	40	37	17	14	15.5
	7	80	79	79.5	30	28	29
	8	49	56	52.5	17	23	20
23703	1	111	122	116.5	28	28	28
	2	122	110	116	32	28	30
	3	106	98	102	32	29	30.5
	4	55	32	43.5	11	6	8.5

【0105】

表2 pnp-ブチレート及び商用洗濯用界面活性剤でのリパーゼ活性

クローン23701. 1がpnp-ブチレート及び界面活性剤アッセイの両方において優れた発現及び能力を示したので、そのポリペプチドの縮重したN末端配列を決定するためにDNAを単離し、それはSPPRRPPであると決定された。天然のN末端配列はSPIRREであり、それはkex2様プロテアーゼにより切断除去されるプロペプチドをコードする。他の形質転換体のいくつかからのDNAを配列決定し、それは次の縮重N末端配列を生じた：23701. 2 (SPPRRRR), 23702. 1 (SPPRPRRR), 23702. 7 (SPPRPRRP), 23703. 1 (SPPRRRRRP)、及び23703. 4 (SPPRRPRRR)。これにより、親ポリペプチドに相当するレベルで発現することができる改良された機能的特徴を有する変異体ポリペプチドが生産宿主において同定された。

【0106】

本明細書に記載され及びクレームされる本発明は、本明細書に開示される特定の実施形態にその範囲が限定されるべきでない。なぜならこれらの実施形態は本発明のいくつかの態

様を説明する目的だからである。いずれの等価な実施形態も本発明の範囲内にあることを意図する。実際、本明細書に示され、記述されるものに加えて、本発明の種々の改変が先の記載から当業者に明らかになるであろう。このような改変も添付の請求の範囲の範囲内にあることを意図する。

【0107】

本明細書に言及される全ての出版物は、その出版物が言及する特定の情報を記載し及び開示する目的のために引用により本明細書に組み込まれる。上述の出版物は本願の出願日前、それらの開示のためのみに供される。本発明者らが先の発明によるこのような開示に先立つ権利がないとの承認として解釈すべきものではない。

【0108】

本発明は、記述される特定の方法及び組成物に限定されず、もちろん、変化し得ることが理解されるはずである。本明細書に用いる用語は、特定の実施形態を記述する目的のためだけであり、限定を意図したものではない。なぜなら本発明の範囲は添付の請求の範囲によってのみ限定されるであろうからである。

特に示さない限り、本明細書に用いる全ての技術及び科学用語は、本発明の属する分野の当業者により一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるのと類似した又は等価のいずれの材料又は方法も本発明の実施又はテストに用いることができるが、その好ましい方法及び材料が記載される。

【0109】

実施例 5：フサリウム・ベネナトウム株 D L M 1 5 株の作製

現在、フサリウム・ベネナトウム (F u s a r i u m v e n e n a t u m) として再分類されるフサリウム株 A 3 1 5 (Yoder and Christianson, 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 62-80; O'Donnell et al., 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 57-67) を、Dr. Anthony Trinci, University of Manchester, Manchester, England から又は American Type Culture Collection, Manassas, VA から F u s a r i u m 株 A T C C 2 0 3 3 4 として得た。C C 1 - 3 と呼ぶフサリウム・ベネナトウム A 3 1 5 の形態変異体 (Wiebe et al., 1992, Mycological Research 96: 555-562; Wiebe et al., 1991, Mycological Research 95: 1284-1288; Wiebe et al., 1991, Mycological Research 96: 555-562) は高度に枝分れしたコロニー状変異体である。この実験で用いた株 M L Y 3 は、フサリウム・ベネナトウム A 3 1 5 形態転換体 C C 1 - 3 から得た。それは C C 1 - 3 と同一の補足特性を有する。

【0110】

培地及び溶液

最小培地は、1 リッター当り、6 g の NaNO_3 、0.52 g の KCl 、1.52 g の KH_2PO_4 、1 ml の C O V E 微量金属溶液、1 g のグルコース、500 mg の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、342.3 g のスクロース、及び 20 g の不活性寒天 (pH 6.5) から構成される。

【0111】

R A 発芽培地は、1 リッター当り 50 g のコハク酸、12.1 g の NaNO_3 、1 g のグルコース、20 ml の $50 \times \text{Vogel's}$ 、及び 0.5 ml の 10 mg/ml NaMoO_4 保存溶液、(pH 6.0) から構成される。

Y E P G 培地は、1 リッター当り 10 g のイーストエキス、20 g のペプトン、及び 20 g のグルコースから構成される。

【0112】

S T C は、0.8 M ソルビトール、25 mM Tris pH 8、25 mM CaCl_2 から構成される。

S P T C は、40% PEG 4000 、0.8 M ソルビトール、25 mM Tris pH 8、25 mM CaCl_2 から構成される。

C O V E 微量金属溶液は、1 リッター当り 0.04 g の $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、0.4 g の $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.2 g の $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.7 g の MnSO_4

10

20

30

40

50

・ H_2O 、0.8 gの $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、及び10 gの $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ から構成される。

【0113】

50×COVE塩溶液は、1リッター当り26 gの KCl 、26 gの $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、76 gの KH_2PO_4 、及び50 mlのCOVE微量金属から構成される。

COVEトッパガロースは、1リッター当り、20 mLの50×COVE塩、0.8 Mスクロース、1.5 mMセシウムクロライド、1.0 mMアセトアミド、及び10 gの低融点アガロース (pH 6.0) から構成される。

【0114】

COVE培地は、1リッター当り、342.3 gのスクロース、20 mLの50×COVE塩溶液、10 mLの1 Mアセトアミド、10 mLの1.5 M CsCl_2 、及び25 gのNoble寒天から構成される。

50×Vogel's培地は、1リッター当り150 gのクエン酸ナトリウム、250 gの KH_2PO_4 、10 gの $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10 gの $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2.5 mLのビオチン保存溶液、及び5.0 mLのAMG微量金属溶液から構成される。

【0115】

Vogel's / アセトアミド寒天は、1リッター当り、30 gのスクロース、1×Vogel's塩、10 mMアセトアミド、15 mM CsCl 、及び25 gのNoble寒天から構成される。

フルオロアセトアミド培地は、1リッター当り、12 gの酢酸ナトリウム、2 gの塩化ナトリウム、0.5 gの MgSO_4 、3 gの KH_2PO_4 、0.3 gの尿素、2 gのフルオロアセトアミド、1 mLの50×Vogel's塩、及び15 gのAgarose I (Amresco; Solon, Ohio)、pH 6.1から構成される。

【0116】

フサリウム・ベネナトゥムMLY3におけるpyrG遺伝子の削除

フサリウム・ベネナトゥム発現宿主MLY3のゲノム内の非マーク化pyrG削除を、最初にpyrG遺伝子を削除しそしてそれを、アスペルギルス・オリザエpyrG遺伝子上流領域から単離された反復DNA配列に隣接したアスペルギルス・ニジュランスamdS遺伝子で置きかけることにより形成した。次に、amdS遺伝子から処理した単離物を、フルオロアセトアミドを含むプレート上での増殖により選択した。

【0117】

プラスミドpDM156.2を、フサリウム・ベネナトゥム株ATCC 20334からクローン化した3.9 kbゲルEcoRI pyrGフラグメントをpUC118のEcoRI部位に挿入することによって作製した。そのpyrGフラグメントは、全コーディング領域+1.3 kbのプロモーター及び1.5 kbのターミネーターを含んだ (図3)。フサリウム・ベネナトゥムMLY3のネイティブpyrG遺伝子を相同的組換えにより、pyrGの全オープンリーディングフレームが削除されている4.4 kbフラグメントにより相同的組換えを介して置換し、そして図3に示す通り230 bp反復配列に隣接するamdS遺伝子で置換した。

【0118】

pJRoy47は、最初に、PacI及びXbaI部位がSwaI部位で置換されているpNEB193 (New England Biolabs) から構成されるpJRoy43を作製することにより作製した。これを達成するために、5' 端にBamHI部位、中間にSwaI部位、及び3' 端にSalI部位を含むリンカーを、次の2つのオリゴを一緒にアニーリングすることにより作った。

【0119】

プライマー1：配列番号：8

プライマー2：配列番号：9

得られたリンカーをpNEB193に連結し、それをBamHI及びSalIで消化し、pJRoy43を作った。

10

20

30

40

50

次に、アスペルギルス・オリザエ p y r G 遺伝子上流 230bp 領域をフサリウム・ベネナトウム中の反復配列として選択した。この領域を以下の 2 つのプライマー対、プライマー 3 と 4 及びプライマー 5 と 6 を用いて、アスペルギルス・オリザエ p y r G プラスミド p J a L 3 3 5 (W O 9 8 / 1 2 3 0 0) からの 2 つの異なる産物として増幅した：

プライマー 3：配列番号：10

プライマー 4：配列番号：11

プライマー 5：配列番号：12

プライマー 6：配列番号：13

増幅反応物 (50 μ L) を、テンプレートとして D N e a s y P l a n t M i n i K i t を用いて調製したゲノム DNA 約 40~50 μ g を用いて調製した。各々の反応は次の成分を含んだ：40~50 μ g のゲノム DNA、各々 50 pmol のプライマー 3 及び 4 又はプライマー 5 及び 6、各々 200 μ M の d A T P、d C T P、d G T P、及び d T T P、1 $\times$ T a q DNA ポリメラーゼ緩衝液、及び 2.5 Unit の T a q DNA ポリメラーゼ。その反応物を次の通りプログラムした P e r k i n - E l m e r M o d e l 4 8 0 T h e r m a l C y c l e r 中でインキュベートした：94 $^{\circ}$ C で 2.5 分及び 72 $^{\circ}$ C で 2.5 分のサイクル 1；各々 94 $^{\circ}$ C で 45 秒、50 $^{\circ}$ C で 45 秒、及び 72 $^{\circ}$ C で 2 分のサイクル 2~26；並びに 94 $^{\circ}$ C で 45 秒、50 $^{\circ}$ C で 45 秒、及び 72 $^{\circ}$ C で 10 分のサイクル 27。

【0120】

その反応産物を 1% アガロースゲル上で単離し、ここでは約 230bp のフラグメントが単離された。最初の PCR 産物 (約 230bp フラグメント) はその 5' 端に S w a I 部位及び 3' 端に E c o R V 部位を含むが、2 回目の PCR 産物 (約 230bp フラグメント) は 5' 端に E c o R V 部位及び 3' 端に P m e I 部位を含んだ。それら 2 つの精製した反復フラグメントを最初に E c o R V で消化し、一緒に連結した。精製 (フェノールクロロホルム抽出及びエタノール沈殿) 後、その連結産物を次に P m e I 及び S w a I で消化して約 500bp のフラグメントを作り出し、それをアガロースゲル電気泳動及びアガロース処理により精製した。

【0121】

得られたフラグメントを、P m e I 及び S w a I で消化した p J R o y 4 3 にクローン化して p J R o y 4 4 を作り出した (図 4)。このベクターは、E c o R V 部位により分離され、S w a I 及び P m e I 部位に隣接した 2 つの 230bp 反復を含む。

a m d S 遺伝子を含む E c o R I フラグメント及び調節領域を p 3 S R 2 (Kelly 及び Hynes, 1985, EMBO Journal 4: 475~479) から単離し、クレノウフラグメントで平滑化し、そして E c o R V で消化した p J R o y 4 4 に連結して p J R o y 4 7 を作った (図 3)。

【0122】

230bp 反復配列に隣接した a m d S 遺伝子を S w a I / P m e I フラグメントとして p J R o y 4 7 から得て、E c o R V / S t u I で消化した p D M 1 5 6. 2 に挿入して p D M 2 2 2. A を作った (図 3)。p D M 2 2 2. A を E c o R I で消化し、p y r G 削除カセットを含む 4.4kb E c o R I フラグメントを Q i a q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t (Qiagen, Chatsworth, CA) を用いてゲル精製した後、形質転換した。

【0123】

フサリウム・ベネナトウム M L Y 3 の胞子を、500mL の R A 胞子形成培地を含むフラスコに、最小培地プレートからの 3 つの 1cm² 菌子体プラグを接種し、そして 28 $^{\circ}$ C、150rpm で 2~3 日、インキュベートすることにより形成した。胞子を M i r a c l o t h (Calbiochem, San Diego, CA) を介して収集し、S o r v a l l R C - 5 B セントリフュージ (E.I.DuPont De Nemours and Co., Wilmington, DE) 中の 7000rpm で 20 分、遠心した。ペレット化胞子を滅菌蒸留水で 2 回、洗い、少量の水に再度懸濁し、そして次にヘモサイトメーターを用いてカウントした。

【0124】

プロトプラストを、100mLのYEPG培地に 4×10^7 のフサリウム・ベネナトゥムMLY3の胞子を接種し、そして16時間、24℃で150rpmでインキュベートすることにより調製した。その培養物を7分、3500rpmでSorvall RT 6000D (E.I.DuPont De Nemours and Co., Wilmington, DE) 中で遠心した。ペレットを30mLの1M $MgSO_4$ で2回、洗い、1M $MgSO_4$ 中5mg/mlのNOVOZYME 234TM (batch PPM 4356, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) 15mLに再度懸濁した。培養物を24℃、150rpmで、プロトプラストが形成されるまでインキュベートした。35mLの容量の2Mソルビトールをプロトプラスト消化物に加え、その混合物を2500rpmで10分、遠心した。そのペレットを再度懸濁し、STCで2回、洗い、そして2000rpmで10分、遠心してプロトプラストをペレット化した。プロトプラストをヘモサイトメーターでカウントし、STC:SPTC:DMSOの8:2:0.1溶液中に 1.25×10^7 プロトプラスト/mLの最終濃度まで再度懸濁した。そのプロトプラストを、Nalgene Cryo 1°C Fretzing Container (VWR Scientific, Inc., San Francisco, CA) 中で速度制御凍結した後、-80℃に保存した。

10

【0125】

フサリウム・ベネナトゥムMLY3の凍結したプロトプラストを氷上で解凍した。上述のpDM22.2Aからの4.4kb EcoRIフラグメント1μg及びヘパリン5μL (STS 1mL当たり5mg) を50mL滅菌ポリプロピレンチューブに加えた。100μLのプロトプラストを加え、静かに混合し、そして30分、氷上でインキュベートした。1mLのSPTLを加え、20分、室温でインキュベートした。25mLの40℃ COVEトッパグロース+10mMウリジンを加えた後、その混合物を、amdS遺伝子の組込みについて選択するためにCOVE寒天を含む150mm径プレートに注いだ。

20

【0126】

フサリウム・ベネナトゥムMLY3のpyrG遺伝子のネイティブ3.9kb EcoRIフラグメントを、pyrG隣接配列、及び230bp反復配列に隣接するamdS遺伝子を含む4.4kbフラグメントによる相同的組換えを介して置換した。これは、全pyrGコーディング領域+0.78kbの5'非翻訳及び0.8kbの3'非翻訳領域を削除した。その削除カセットでのネイティブpyrG遺伝子の置換を、サザン・ハイブリダイゼーションにより確認した。サザンハイブリダイゼーションは、製造元により供されるAmer sham (Arlington, IL) Vista and Rapid Hybプロトコル又はBoehringer Mannheim DIG Systemプロトコルを用いて行った。推定上の削除体の真菌ゲノムDNAを、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Chatworth, CA) を用いて調製し、EcoRIで消化した。サザンブロットを、Magna graph膜 (Micron Separations, Inc; Westborough, MA) 及び標準的分子生物学技術を用いて行った。膜は、製造元の説明に従って展開し、フルオレセイン標識化プローブのためにSTORM 860 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) を用いてスキャンするか、又はDIG標識化プローブのためにフィルムに露出した。3.2kb pyrGプローブは、全pyrGコーディング領域、0.64kb 5'領域、及び1.42kb 3'非翻訳領域を含んだ。

30

40

【0127】

削除体株を、RA培地+10mMウリジン中で、約3日間、28℃、150rpmで胞子形成させ、マイクロマニピレーターを用いて単一の胞子を単離した。胞子単離物を、Vogel's/アセトアミド寒天+10mMウリジン上で増殖させた。1つの胞子単離物をRA培地+10mMウリジン中で胞子形成させた。その胞子培養物をMiraclothを介してろ過して菌糸体を除いた。確認されたpyrG削除体の約 9.5×10^5 胞子を、フロオロアセトアミド培地+10mMウリジンを含む5つの150mmプレートの各々に広げることによりamdSマーカーの損失についての選択を行った。これらのプレートを室温で2週間までインキュベートした。得られたコロニーをCOVEプレート及びフロオロアセトアミドプレート+10mMウリジンにサブクローン化した。フロオロアセトアミドで十分に

50

生長し、C O V E上でほとんど又は全く生長しなかったコロニーを更に分析した。これらの株のうちの3つからの孢子単離物をサザンブロット分析にかけた。ゲノムDNAをE c o R Iで切断し、上述のp y r Gプローブでプロービングした。孢子単離物のいくつかは1.4 kbハイブリダイズバンドを形成し、a m d S “ループアウト”を示した。1つの孢子単離物を選択し、フサリウム・ベネナトウムD L M 1 5と呼んだ。

【0128】

実施例6：独立して増殖させたフサリウム・ベネナトウムD L M 1 5形質転換体におけるリパーゼの発現レベル

実施例5に記載されるp y r Gマイナスフサリウム・ベネナトウム株D L M 1 5を、アセトアミドを硝酸ナトリウム(25 mM)で置きかえるRoyer ら1995, Biotech, 13, 1479 ~ 1483に記載される通り、標準的手順を用いて、(実施例2に記載される) p E N I 1 2 9 8で形質転換した。形質転換体は、2週間のインキュベーション後、50 ~ 100 / μ g

D N Aの形質転換頻度で現れ、それはA M A 1配列の欠如下の形質転換頻度の10 ~ 100倍の増加であった。20の形質転換体を最小培地プレート上に単離し、更に2週間、室温で増殖させた。その形質転換体を20 mMウリジンを補給した又はウリジンのない(実施例2のような)200 μ L v o g e l培地中マイクロタイター皿中でインキュベートし、室温で増殖させた。ウリジンを補給した形質転換体は十分に増殖したが、ウリジンなしの最小培地プレート上で単離した場合、増殖することができず、このことは、p y r G遺伝子を含むプラスミドが失われており、これによりそのプラスミドが自律的に複製することを示す。ウリジン補給培地中で増殖した形質転換体からリパーゼ活性は検出することができなかった。リパーゼ活性は、ウリジンを補給しなかった最小培地中で増殖する形質転換体からの培地中で検出することができなかった。平均任意活性は、独立して増殖させたフサリウム形質転換体と比べた場合、15%の相対標準偏差で34.8であった。これにより、このプラスミドは、フサリウム種におけるライブラリーの作製のために潜在的に用いることができる。

【0129】

実施例7：P C Rフラグメントの同時形質転換についてのテスト

以下の実験を、多重P C Rフラグメントが同じ細胞内で(実施例4のような)切断ベクターで生体内で組み換えり、そして同じクローンからの多重酵素の発現を保持するであろうか否かを評価するために行った。2つのP C Rフラグメントを、標準的P C R条件(94 °C、5分；(94 °C、30秒；50 °C、30秒；72 °C、1分)の30サイクル；及び72 °C、5分)、o l i g o 1 1 5 1 2 0 (配列番号：14)、o l i g o 1 3 4 5 3 2 (配列番号：15)及びテンプレートとしてp A H L誘導体(p A H Lのリパーゼ変異体)又はp E N I 1 5 4 3誘導体(A M G変異体)を用いて、リパーゼ遺伝子又はA M G遺伝子(プロモーター及びターミネーターを含む)のように作った。p E N I 1 5 4 3を、B a l I I及びS a l Iで切断し、それをB a m H I及びX h o Iで切断したp A H Lにクローン化したo l i g o 1 3 9 1 2 3 (配列番号：16)及び139124 (配列番号：17)を用いてアスペルギルス・ニゲルからのグルコアミラーゼ遺伝子(c D N A)を含むP C Rフラグメント(E M B L：A C：X 0 0 5 4 8、テンプレートとして)を形成することにより作製した。

【0130】

約1 μ gの各々のP C Rフラグメントを、B a l I I及びS g r A Iで切断しウシ腸ホスファターゼで処理したp E N I 1 2 9 9 (1 μ g)と共に(実施例4に記載のような)J a 1 2 5 0に形質転換した。20の形質転換体を単離し、(実施例4に記載の通り)最小培地に接種した。72時間のインキュベーションの後、その培養培地をリパーゼ(p n p -ブチレート活性)及びグルコアミラーゼ(p n p -グルコピラノシド活性)の存在についてアッセイした。リパーゼ及びグルコアミラーゼ活性の両方を示す形質転換体はなく、これにより、同じ細胞内での多重変異体の同時形質転換及び発現は極めて頻度の低い事象であり、これにより糸状菌ライブラリーのスクリーニングに問題とならないことを示す。

【0131】

実施例 8 : p J e r S 2 8 0 1 及び p H P O D 1 の作製

3 断片連結を、p E N I 1 2 9 8 からの 5 . 8 kb B a l I I / S p h I フラグメント、p E N I 1 2 9 8 からの 4 . 0 kb B s s H I I / S p h I フラグメント、及び p B A N e 6 (T A K A / N A 2 / T P I プロモーター / A M G ターミネーター ; W O 9 8 / 1 2 0 3 に記載) からの 0 . 7 5 kb B s s H I / B a l I I フラグメントを用いて行い、これにより p J e r s 2 8 0 1 を作った。クルバリア・ベルルクロサ (*Curvularia verruculosa*) からのハロペルオキシダーゼを含む P C R フラグメント (特許 W O 9 7 4 1 0 2 - A 1) を、o l i g o 1 0 2 9 f u p (配列番号 : 1 8) 及び 1 0 2 9 r e v (配列番号 : 1 9) を用いて形成した。その P C R フラグメントを S w a I 及び N o t I で切断し、同じ制限酵素で切断した p J e r s 2 8 0 1 にクローン化し、これにより p H P O D 1 を形成した。

10

【0132】

実施例 9 : 独立して増殖させた形質転換体におけるハロペルオキシダーゼの発現レベル p H P O D 1 を実施例 2 に記載されるように J a l 2 5 0 に形質転換した。p E N i 1 2 9 8 (実施例 2) についてのほぼ同じ形質転換頻度を得た。10 の独立したアスペルギルス形質転換体を各々のウェル内に 200 μ L の G 2 - g l y ー培地を含む 96 ウェルマイクロタイタープレートに接種し、72 時間、増殖させた。ハロペルオキシダーゼ活性は、本質的に De Boer らにより記載されるように 10 の形質転換体の各々について決定した [1987; Vanadium containing bromoperoxidase: An example of an oxidoreductase with a high operational stability in aqueous and organic media, Biotechnol. Bioeng. 30: 607-610]。平均発現レベルは 82.5 $\pm$ 9.1 (アービトラリーユニット) であった。独立した形質転換体間の発現レベルの相対的な標準偏差は約 11 % であり、それは驚くほど低い。これにより、本発明はリパーゼに適用できるばかりでなく、更に他の酵素にも適用できる。

20

【0133】

実施例 10 : 2 つの異なる酵素をコードする 2 つのプラスミドの J a l 2 5 0 への同時形質転換

2 つの異なる酵素を形質転換し、増殖の間、同じ細胞内に保持され、これにより 1 超のプラスミドがコードする酵素の細胞外同時発現を導き得るか否かを評価するために以下の実験を行った。

30

【0134】

J a l 2 5 0 を 0 . 1 μ g p E N I 1 2 9 9 及び 0 . 1 μ g p H P O D 1 (実施例 2 に記載) の両方で同時形質転換した。40 の独立した形質転換体を単離し、(実施例 4 に記載される通り) 最小培地に接種した。72 時間のインキュベーションの後、その培養培地を (実施例 4 に記載されるように) リパーゼ及び (実施例 8 に記載されるように) ハロペルオキシダーゼ活性の存在についてアッセイした。リパーゼ及びハロペルオキシダーゼ活性の両方を示す形質転換体はなく、このことは、同じ細胞内の多重変異体の同時形質転換及び同時発現は極めて頻度の低い出来事であり、糸状菌ライブラリーのスクリーニングに問題はないことを示す。

【図面の簡単な説明】

40

【図 1】 その作製が実施例 1 に記載されるプラスミド p E N I 1 2 9 8 の制限地図である。

【図 2】 その作製が実施例 1 に記載されるプラスミド p E N I 1 2 9 9 の制限地図である。

【図 3】 実施例 5 に記載されるプラスミド p D M 1 5 6 . 2 , p J R o y 4 7 及び p D M 2 2 2 . A の制限地図である。

【図 4】 実施例 5 に記載されるプラスミド p J R o y 4 4 の制限地図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Methods of constructing and screening a library of polynucleotide sequences of interest in filamentous fungal cells

<130> 5579.204-WO PWL/LiIs

<140>

10

<141>

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5259

<212> DNA

<213> *Aspergillus nidulans*

20

<400> 1

aagcttattt tttgtatact gttttgtgat agcacgaagt ttttccacgg tatcttgtaa 60
aatatataat ttgtggcggg cttacctaca tcaaattaat aagagactaa ttataaacta 120
aacacacaag caagctactt tagggtaaaa gtttataaat gcttttgacg tataaacggt 180
gcttgatatt attattacaa ttaaagggtg atagaaaacc tagagactag ttagaaacta 240
atctcagggt tgcgttaaac taaatcagag cccgagaggt taacagaacc tagaagggga 300
ctagatatcc gggtagggaa acaaaaaaaaa aaaacaagac agccacatat tagggagact 360
agttagaagc tagttccagg actaggaaaa taaaagacaa tgataccaca gtctagttag 420
caactagata gattctagat tgaggccaaa gtctctgaga tccaggtagg ttgcaactaa 480
tactagttag tatctagtct cctataactc tgaagctaga ataacttact actattatcc 540
tcaccactgt tcagctgcgc aaacggagtg attgcaagggt gttcagagac tagttattga 600
ctagtccagt actagcaata actaacaagg tattaacctc ccatgtctgc catcaccctg 660
cacttcctcg ggctcagcag ccttttcctc ctcattttca tgctcatttt ccttggttaa 720
gactgtgact agtcaaagac tagtccagaa ccacaaagga gaaatgtctt accactttct 780
tcattgcttg tctcttttgc attatccatg tctgcaacta gttagagtct agttagttag 840
tagtccgacg aggacttgct tgtctccgga ttgttgaggg aactctccag ggccccaaga 900

30

tccacaacag agccttctag aagactgggc aataactagt tggctcttgt ctgagtctga 960
 cttacgaggt tgcatactcg ctccctttgc ctggtcaatc gatgagaaaa agcgccaaaa 1020
 ctgcgaatat ggctttgaac cacacgggtgc tgagactagt tagaatctag tcccaaaacta 1080
 gcttgatag cttacctttg ccctttgctg tgcgacaggt cttgcagggt atgggttcctt 1140
 tctcaccagc tgatttagct gccttgctac cctcaaggcg gatctgccat aaagagtggc 1200
 tagaggttat aaattagcac tgatcctagg tacggggctg aatgtaactt gcctttcctt 1260
 tctcatcgcg eggcaagaca ggcttgctca aattcctacc agtcacaggg gtatgcacgg 1320
 cgtacggacc acttgaacta gtcacagatt agttagcaac tagtctgcat tgaatggctg 1380
 tacttacggg ccctcgccat tgtctgac atttccagct tcaccctcgt tgctgcaaag 1440
 tagttagtga ctagtcaagg actagttgaa atgggagaag aaactcacga attctcgact 1500
 cccttagtat tgtggtcctt ggacttgggt ctgctatata ttagctaata cactagttag 1560
 actcacagaa acttacgcag ctgcttgctg cttcttggtg ggagtcgggg ttgggagaac 1620
 agtgccttca aacaagcctt cataccatgc tacttgacta gtcagggact agtcaccaag 1680
 taatctagat aggacttgcc tttggcctcc atcagttcct tcatagtggg aggaccattg 1740
 tgcaatgtaa actccatgcc gtgggagttc ttgtccttca agtgcttgac caatatgttt 1800
 ctgttggcag agggaaacct tcaactagtt aataactagt cagaaactat gatagcagta 1860
 gactcactgt acgcttgagg catcccttca ctgcgcagta gacttcatat ggatggatat 1920
 caggcacgcc attgtcgtcc tgtggactag tcagtaacta ggcttaaagc tagtcgggtc 1980
 ggcttactat cttgaaatcc ggcagcgtaa gctccccgtc cttaactgcc tcgagatagt 2040
 gacagtactc tggggacttt cggagatcgt tctcgttacc gcgaatgctc ggcatactaa 2100
 ctgttgacta gtcttggact agtcccagc aaaaaggatt ggaggaggag gaggaagggtg 2160
 agagtggagc aaagagcgaa ataagagctt caaaggctat ctctaagcag tatgaagggt 2220
 aagtatctag ttcttgacta gatttaaaga gatttcgact agttatgtac ctggagtttg 2280
 gatataggaa tgtgttgtgg taacgaaatg taagggggag gaaagaaaaa gtcgtcaaga 2340
 ggtaaactca agtcggccat tcctttttgg gaggcgctaa ccataaacgg catgggtcgac 2400
 ttagagttag ctacgggaat ttagggagtt atctgcgacc accgaggaaac ggcggaatgc 2460
 caaagaatcc cgatggagct ctagctggcg gttgacaacc ccaccttttg gcgtttctgc 2520
 ggcgttgtag gcgggactgg atacttcgta gaaccagaaa ggcaaggcag aacgcgctca 2580
 gcaagagtgt tgggaagtgt agcatgatgt gccttggtta ctaggtacca atctgcagta 2640
 tgcttgatgt tatccaaagt gtgagagagg aagggtccaaa catcacgat tgggagaggg 2700
 cctagggtata agagtttttg agtagaacgc atgtgagccc agccatctcg aggagattaa 2760
 acacgggccc gcatttgatg gctatgttag taccccaatg gaaacggtga gagtccagt 2820
 gtcgcagata actccctaaa ttccctgagc taactctaag tcgaccatgc cgtttatggt 2880
 tagcgctcc caaaaaggaa tggccgactt agagttacct cttgacgact ttttcttcc 2940
 tcccccttac atttcgttac cacaacacat tcctatatcc aaactccagg tacataacta 3000
 gtcgaaatct ctttaaactc agtcaagaac tagatactta accttcatac tgcttagaga 3060
 tagcctttga agotcttatt tcgctctttg tctcaactcc aacttctcc tctcctcca 3120
 atcctttttg ctgggacta gtccaagact agtcaacagt tagtatgcc agcatctcgc 3180
 ataacgataa cgatctccga aagtccccag agtactgtca ctatctcgag gcagttaagg 3240

10

20

30

40

acggggagct tacgctgccg gatttcaaga tagtaagccg acccgactag ctttaagcct 3300
 agttactgac tagtccacag gacgacaatg gcgtgcctga tatccatcca tatgaagtct 3360
 actgccgagt gaagggatgc ctcaagcgta cagtgagttct actgctatca tagtttctga 3420
 ctagttatta actagttgac aggttccctc tgccaacaga aacatattgg tcaagcactt 3480
 gaaggacaag aactcccacg gcatggagtt tacattgcac aatggtcctc ccactatgaa 3540
 ggaactgatg gagggccaaag gcaagtccta tctagattac ttgggtgacta gtccctgact 3600
 agtcaagtag catgggtatga aggcttgttt gaaggcactg ttctcccaac cccgactcct 3660
 accaagaagc gcaagcgagc tgcgtaagtt tctgtgagtc taactagtgt attagctaat 3720
 atatagcagc accaagtcca aggaccacaa tactaaggga gtcgagaatt cgtgagtttc 3780
 ttctccatt tcaactagtc cttgactagt cactaactac tttgcagcaa cgagggtgaa 3840
 gctggaaatg atcaggacaa tggcgagggc ccgtaagtac agccattcaa tgcagactag 3900
 ttgctaacta atctgtgact agttcaagtg gtccgtacgc cgtgcatacc cctgtgactg 3960
 gtaggaatth gagcaagcct gtcttgccgc gcgatgagaa aggaaaggca agttacattc 4020
 agccccgtac ctaggatcag tgctaattta taacctctag ccactcttta tggcagatcc 4080
 gccgtgaggg tagcaaggca gctaaatcag ctgggtgagaa aggaaccata cctgcaaga 4140
 cctgtcgcaa cgcaaagggc aaaggttaagc tatccaagct agtttgggac tagattctaa 4200
 ctagtctcag caccgtgtgg ttcaaagcca tattgcgagt tttggcgctt tttctcatcg 4260
 attgacgagg caaagggagc gagtatgcaa cctcgtaagt cagactcaga caaagaccaa 4320
 ctagtatttg accagtcttc tagaaggctc tgttgtggat cttgaggccc tggagagttc 4380
 ctccaacaat ccggagacaa gcaagtcctc gtccgactag tcactaacta gactctaact 4440
 agttgcagac atggataatg caaaagagac aagcaatgaa gaaagtggta agacatttct 4500
 cctttgtggg tctggactag tctttgacta gtcacagtct taaacaagga aaatgagcat 4560
 gaaaatgagg aggaaaaggc tgctgagccc gaggaagtgc aggggtgatgg cagacatggg 4620
 aggttaatac cttgttagtt attgctagtc actgactagt caataactag tctctgaaca 4680
 ccttgcaatc actccgtttg cgcagctgaa cagtgggtgag gataatagta gtaagttatt 4740
 ctacttcag agttatagga gactagatac taactagtat tagttgcaac taacctggat 4800
 ctacagagact ttggcctcaa tctagaatct atctagttgt caactagact gtggtatcat 4860
 tgtcttttat tttctagtc ctggaactag cttctaacta gtctccctaa tatgtggctg 4920
 tcttgttttt tttttttgtt tccctacccg gatattctagt ccccttctag gttctgttaa 4980
 cctctcgggc tctgatttag tttaacgcaa acctgagatt agtttctaac tagtctctag 5040
 gttttctatc cacccttaat tgtaataata aatacaagca acgtttatac gtcaaaagca 5100
 tttataaact tttaccctaa agtagcttgc ttgtgtgttt agtttataat tagtctctta 5160
 ttaatttgat gtaggtaagc ccgccacaaa tatatatattt tacaagatac cgtggaaaaa 5220
 cttcgtgcta tcacaaaaca gtatacaaaa aataagctt 5259

<210> 2

<211> 2400

<212> DNA

10

20

30

40

<213> *Aspergillus nidulans*

<400> 2

aagcttattt tttgtatact gttttgtgat agcacgaagt ttttccacgg tatcttgtaa 60
aatatataat ttgtggcggg cttacctaca tcaaattaat aagagactaa ttataaacta 120
aacacacaag caagctactt tagggtaaaa gtttataaat gcttttgacg tataaacggt 180
gcttgatatt attattacaa ttaaagggtg atagaaaacc tagagactag ttagaaacta 240
atctcagggt tgcgttaaac taaatcagag cccgagaggt taacagaacc tagaagggga 300
ctagatatcc gggtagggaa acaaaaaaaaa aaaacaagac agccacatat tagggagact 360
agttagaagc tagttccagg actaggaaaa taaaagacaa tgataccaca gtctagttag 420
caactagata gattctagat tgaggccaaa gtctctgaga tccagggttag ttgcaactaa 480
tactagttag tatctagtct cctataactc tgaagctaga ataacttact actattatcc 540
tcaccactgt tcagctgctc aaacggaggt attgcaaggt gttcagagac tagttattga 600
ctagtctagt actagcaata actaacaagg tattaacctc ccatgtctgc catcaccctg 660
cacttcctcg ggctcagcag ccttttctct ctcattttca tgcctatttt ccttggttaa 720
gactgtgact agtcaaagac tagtccagaa ccacaaagga gaaatgtctt accactttct 780
tcattgcttg tctcttttgc attatccatg tctgcaacta gttagagtct agttagttag 840
tagtccgacg aggacttgct tgtctccgga ttgttgaggg aactctccag ggcctcaaga 900
tccacaacag agccttctag aagactgggc aataactagt tggctcttgg ctgagttctg 960
cttacgaggt tgcatactcg ctccctttgc ctctcaatc gatgagaaaa agcgccaaaa 1020
ctcgcaatat ggctttgaac cacacggtgc tgagactagt tagaatctag tcccaacta 1080
gcttgatag cttacctttg ccctttgcgt tgcgacaggt cttgcagggg atgggttcctt 1140
tctcaccagc tgatttagct gccttgctac cctcacggcg gatctgccat aaagagtggc 1200
tagaggttat aaattagcac tgatcctagg tacggggctg aatgtaactt gcctttcctt 1260
tctcatcgcg cggcaagaca ggcttgctca aattcctacc agtcacaggg gtagtcacgg 1320
cgtacggacc acttgaacta gtcacagatt agttagcaac tagtctgcat tgaatggctg 1380
tacttaaggc ccctcgccat tgtcctgac atttccagct tcacctcgt tgcgcaaaag 1440
tagttagtga ctagtcaagg actagttgaa atgggagaag aaactcacga attctcgact 1500
cccttagtat tgtggtcctt ggacttggtg ctgctatata ttagctaata cactagttag 1560
actcacagaa acttacgcag ctgccttgcg cttcttggtg ggagtcgggg ttgggagaa 1620
agtgccttca aacaagcctt cataccatgc tacttgacta gtcagggact agtcaccaag 1680
taatctagat aggacttgcc tttggcctcc atcagttcct tcatagtggg aggaccattg 1740
tgcaatgtaa actccatgcc gtgggagttc ttgtccttca agtgcttgac caatatgttt 1800
ctggtggcag agggaaacctg tcaactagtt aataactagt cagaaactat gatagcagta 1860
gactcactgt acgcttgagg catcccttca ctgggcagta gacttcatat ggatggatat 1920
caggcacgcc attgtcgtcc tgtggactag tcagtaacta ggcttaagc tagtcgggtc 1980
ggcttactat cttgaaatcc ggcagcgtaa gctcccgcgc cttaactgcc tcgagatagt 2040
gacagtactc tggggacttt cggagatcgt tctcgttatc gcgaatgctc ggcatactaa 2100
ctggtgacta gtcttgagct agtcccagac aaaaaggatt ggaggaggag gaggaagggtg 2160

10

20

30

40

agagtgcagac aaagagcgaa ataagagctt caaaggctat ctctaagcag tatgaagggtt 2220
aagtatctag ttcttgacta gatttaaaga gatttcgact agttatgtac ctggagtttg 2280
gatataggaa tgtgttggtg taacgaaatg taagggggag gaaagaaaaa gtcgtcaaga 2340
ggtaactcta agtcggccat tccttttttg gaggcgctaa ccataaacgg catggtcgac 2400

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 19670

<400> 3

ccccatcctt taactatagc g

21

<210> 4

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 23701

<400> 4

cgtggacggc ottggctagc cctcctcsac saccsacsagt ctgcaggat ctg

53

30

<210> 5

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 23702

<400> 5

40

ctgcgtggac ggccttggct agccctcctc saccsacsacs acsagtctcg caggatctgt 60
ttaaccag 68

<210> 6
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer 23703

10

<400> 6
tctctgcgtg gacggccttg gctagcctc ctcsacsacs acsacsacsa gtctcgagg 60
atctgtttta ccag 74

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer 19671

<400> 7
ctcccttctc tgaacaataa accc 24

<210> 8
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer 1

<400> 8
gatcgattta aat 13

40

<210> 9
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer 2

<400> 9
tcgaatttaa atc

13

10

<210> 10
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer 3

20

<400> 10
cgaatttcac atttaaatgc cgaccagcag acggccctcg

40

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer 4

30

<400> 11
gcgatatcat gatctctctg gtactcttcg

30

<210> 12

<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer 5

<400> 12
gcgatatcat cgaccagcag acggccctcg 30

10

<210> 13
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer 6

<400> 13
gcgtttaaac atgatctctc tgg tactctt cg 32

20

<210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer 115120

30

<400> 14
gctttgtgca gggtaaatac 19

<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 134532

<400> 15

gagcaatatac aggcgcgcga cg

22

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 139123

<400> 16

cgcacgagat ctgcaatgtc gttccgatct cta

33

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 139124

<400> 17

cagccggtcg actcacagtg acataccaga gcg

33

30

<210> 18

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 1029fwp

<400> 18

caactggatt taaatatgat ggggtccggtt acacc

35

<210> 19

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 1029rev

<400> 19

ctagatctgc ggccgctcga gttaattaat cactgg

36

10

【図 1】

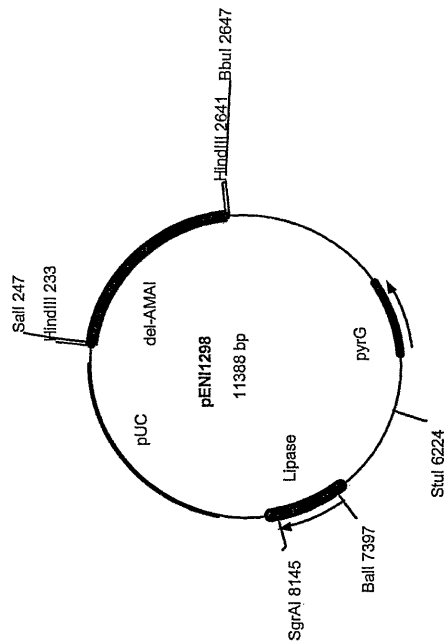


Fig. 1

【図 2】

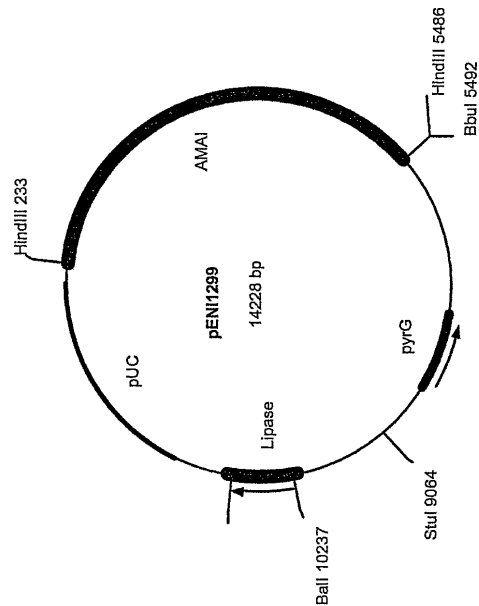


Fig. 2

【図 3】

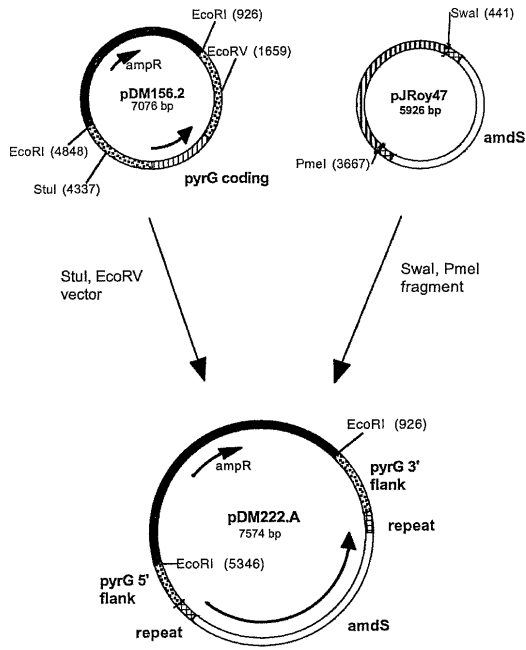


Fig. 3

【図 4】

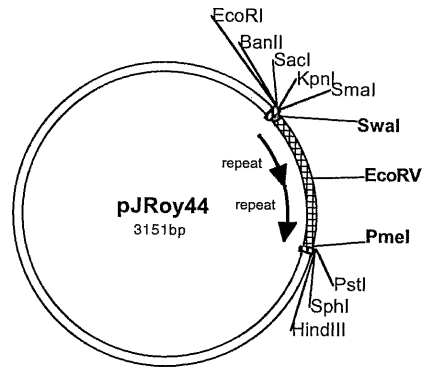


Fig. 4

フロントページの続き

(72)発明者 ビント, イエスベル

デンマーク国, デーコー 2800 リュンビュー, バグスバエルトバイ 115

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献 特開平07-115976 (JP, A)

国際公開第98/001470 (WO, A1)

国際公開第98/046755 (WO, A1)

国際公開第98/042832 (WO, A1)

国際公開第98/024475 (WO, A1)

特開平08-275780 (JP, A)

特開平09-070292 (JP, A)

Gene, 1991年, Vol.98, p.61-67

Curr Genet, 1993年, Vol.24, p.520-524

Fungal Genetics and Biology, 1997年, Vol.21, p.373-387

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)