

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年5月2日(02.05.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/062029 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 21/02 (2006.01) C12R 1/13 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) C12R 1/15 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/077545
- (22) 国際出願日: 2012年10月25日(25.10.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-233864 2011年10月25日(25.10.2011) JP
- (71) 出願人: 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)
[JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 鶴井 典子(TSURUI, Noriko); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 板屋 寛(ITAYA, Hiroshi); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 菊池 慶実(KIKUCHI, Yoshimi); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4

番10号 アクロポリス21ビル6階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

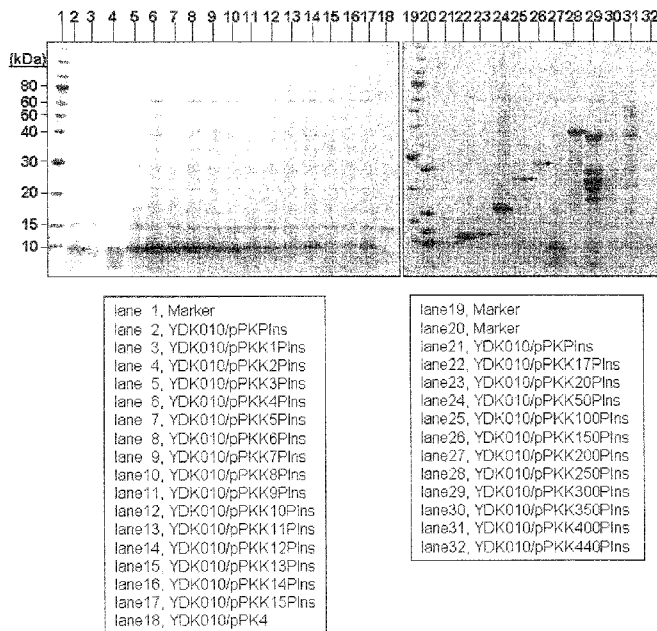
添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

[続葉有]

(54) Title: SECRETION PRODUCTION METHOD FOR PROTEIN

(54) 発明の名称: タンパク質の分泌生産法



(57) Abstract: This invention develops a novel technology that improves the secretion production of a heterologous protein using coryneform bacteria, and provides a secretion production method for the heterologous protein. A coryneform bacteria is cultivated, and a heterologous protein is secreted and produced. The coryneform bacteria has a genetic construct including: a promoter sequence functioning using the coryneform bacteria; a nucleic acid sequence that codes a signal peptide that functions using the coryneform bacteria, connected downstream from the promoter sequence; and a nucleic acid sequence that codes a fusion protein of a heterologous protein and an amino acid sequence including a Gln-Glu-Thr, connected downstream from the nucleic acid sequence coding the signal peptide.

(57) 要約: コリネ型細菌による異種タンパク質の分泌生産を向上させる新規な技術を開発し、異種タンパク質の分泌生産法を提供する。コリネ型細菌で機能するプロモーター配列、該プロモーター配列の下流に接続されたコリネ型細菌で機能するシグナルペプチドをコードする核酸配列、および該シグナルペプチドをコードする核酸配列の下流に接続された Gln-Glu-Thr を含むアミノ酸配列と異種タンパク質との融合タンパク質をコードする核酸

配列を含む遺伝子構築物を有するコリネ型細菌を培養し、異種タンパク質を分泌生産する。

WO 2013/062029 A1



-
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示（規則 13 の 2.4(d)(i)及び 48.2(a)(viii)
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)

明 細 書

発明の名称：タンパク質の分泌生産法

技術分野

[0001] 本発明は、異種タンパク質の分泌生産方法に関するものである。

背景技術

[0002] 微生物による異種タンパク質の分泌生産としては、これまでに、バチルス属細菌（非特許文献1）、メタノール資化性酵母*Pichia pastoris*（非特許文献2）、および*Aspergillus*属糸状菌（非特許文献3、4）等による異種タンパク質の分泌生産が報告されている。

[0003] また、コリネ型細菌により異種タンパク質を分泌生産する試みもなされている。コリネ型細菌による異種タンパク質の分泌生産については、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)（以後、*C. glutamicum*と略すことがある）によるヌクレアーゼ(nuclease)やリパーゼ(lipase)の分泌（特許文献1、非特許文献5）、サチライシン等のプロテアーゼの分泌（非特許文献6）、コリネ型細菌の細胞表層タンパク質PS1やPS2（CspBともいう）のシグナルペプチドを利用したタンパク質の分泌（特許文献2）、PS2（CspB）のシグナルペプチドを利用したフィブロネクチン結合タンパク質の分泌（非特許文献7）、PS2（CspB）やSlpA（CspAともいう）のシグナルペプチドを利用したプロトランスグルタミナーゼの分泌（特許文献3）、変異型分泌装置を利用したタンパク質の分泌（特許文献4）、変異株によるプロトランスグルタミナーゼの分泌（特許文献5）、Tat系依存シグナルペプチドを利用したタンパク質の分泌（特許文献6）等の報告がある。

[0004] また、シグナルペプチドと異種タンパク質とを接続して異種タンパク質を分泌生産する方法において、シグナルペプチドと異種タンパク質との間に、バチルス属細菌の細胞壁タンパク質のN末端配列からの1以上のアミノ酸残基からなる配列を挿入して異種タンパク質を分泌生産することが知られている（特許文献7、8）。

- [0005] CspB (PS2) は、*C. glutamicum*に見出された細胞表層タンパク質である（非特許文献8）。*Corynebacterium*属細菌の中には細胞表層タンパク質CspBのホモログが存在する株と存在しない株があるが、28株の*C. glutamicum*については、既にCspBホモログのアミノ酸配列が報告されている（非特許文献9）。この28株由来のCspBホモログのN末端アミノ酸配列を比較すると、シグナル配列30アミノ酸残基と、成熟タンパク質のN末端3アミノ酸残基（Gln-Glu-Thr）は完全に保存されていた（非特許文献9）。
- [0006] 上記の通り、CspB (PS2) のシグナルペプチドと異種タンパク質とを接続して異種タンパク質を分泌生産する方法は知られている（例えば、特許文献2、特許文献3、非特許文献7）。また、CspB (PS2) のシグナルペプチドと異種タンパク質とを接続して異種タンパク質を分泌生産する方法において、シグナルペプチドと異種タンパク質（プロトランスグルタミナーゼ）との間に、*C. glutamicum* ATCC13869の成熟CspB（配列番号96）のN末端の1、14、または38アミノ酸残基を挿入して異種タンパク質を分泌生産することが報告されており、38アミノ酸残基が挿入された場合にプロトランスグルタミナーゼの分泌生産量が増大することが報告されている（特許文献3）。しかしながら、特許文献3に記載の知見以外には、シグナルペプチドと異種タンパク質とを接続して異種タンパク質を分泌生産する方法において、シグナルペプチドと異種タンパク質との間に、Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列を挿入して異種タンパク質を発現することは知られていない。
- [0007] *C. glutamicum*の細胞表層タンパク質CspBの成熟型タンパク質は、そのN末端アミノ酸残基がエドマン分解を受け付けない事が報告されており、本来のN末端アミノ酸残基であるグルタミン残基がピログルタミン酸残基に変換されている事が示唆されている（非特許文献8）。一方、シグナルペプチドと異種タンパク質との間に、Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列を挿入して発現させた異種タンパク質のN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸残基に変換されることは知られていない。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：米国特許4965197
特許文献2：特表平6-502548
特許文献3：特許第4320769号
特許文献4：特開平11-169182
特許文献5：特許第4362651号
特許文献6：特許第4730302号
特許文献7：特開平11-341991
特許文献8：特開2000-316579

非特許文献

- [0009] 非特許文献1：Microbiol. rev., 57, 109-137(1993)
非特許文献2：Biotechnol., 11, 905-910(1993)
非特許文献3：Biotechnol., 6, 1419-1422(1988)
非特許文献4：Biotechnol., 9, 976-981(1991)
非特許文献5：J. Bacteriol., 174, 1854-1861(1992)
非特許文献6：Appl. Environ. Microbiol., 61, 1610-1613(1995)
非特許文献7：Appl. Environ. Microbiol., 63, 4392-4400(1997)
非特許文献8：Mol. Microbiol., 9, 97-109(1993)
非特許文献9：J Biotechnol., 112, 177-193(2004)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明は、コリネ型細菌による異種タンパク質の分泌生産を向上させる新規な技術を開発し、コリネ型細菌による異種タンパク質の分泌生産法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、シグナルペプチドに接続して異種タンパク質を発現させる異種タンパク質の分泌生

産法において、シグナルペプチドと異種タンパク質との間にGln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列を挿入することで異種タンパク質の分泌生産量が増大することを見出し、本発明を完成させた。

[0012] すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1]異種タンパク質の分泌発現用の遺伝子構築物を有するコリネ型細菌を培養し、分泌生産された異種タンパク質を回収することを含む、異種タンパク質の製造方法であって、

前記遺伝子構築物が、コリネ型細菌で機能するプロモーター配列、該プロモーター配列の下流に接続されたコリネ型細菌で機能するシグナルペプチドをコードする核酸配列、および該シグナルペプチドをコードする核酸配列の下流に接続されたGln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列と異種タンパク質との融合タンパク質をコードする核酸配列を含む、方法（ただし、前記Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列が、配列番号96の1～14位または1～38位のアミノ酸残基からなる配列である場合を除く）。

[2]前記Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列が、下記A～Hのアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列である、前記方法：

- (A) Gln-Glu-Thr
- (B) Gln-Glu-Thr-Xaa1（配列番号102）
- (C) Gln-Glu-Thr-Xaa1-Xaa2（配列番号103）
- (D) Gln-Glu-Thr-Xaa1-Xaa2-Xaa3（配列番号104）
- (E) Gln-Glu-Thrに成熟CspBの4～7位のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列
- (F) Gln-Glu-Thrに成熟CspBの4～8位のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列
- (G) Gln-Glu-Thrに成熟CspBの4～17位のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列
- (H) Gln-Glu-Thrに成熟CspBの4～50位のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列

前記アミノ酸配列において、Xaa1はAsn、Gly、Thr、Pro、またはAlaであり、Xaa2はPro、Thr、またはValであり、Xaa3はThrまたはTyrである。

[3]前記Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列が、Gln-Glu-Thr-Asn-Pro-Thr (配列番号97)、Gln-Glu-Thr-Gly-Thr-Tyr (配列番号98)、Gln-Glu-Thr-Thr-Val-Thr (配列番号99)、Gln-Glu-Thr-Pro-Val-Thr (配列番号100)、およびGln-Glu-Thr-Ala-Val-Thr (配列番号101) からなる群より選択されるアミノ酸配列である、前記方法。

[4]前記遺伝子構築物が、Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列をコードする核酸配列と異種タンパク質をコードする核酸配列との間に、さらに、酵素的切断に使用されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、前記方法。

[5]前記酵素的切断に使用されるアミノ酸配列が、Factor Xaプロテアーゼの認識配列またはProTEVプロテアーゼの認識配列である、前記方法。

[6]前記プロテアーゼの認識配列が、配列番号105または106に示すアミノ酸配列である、前記方法。

[7]前記コリネ型細菌で機能するシグナルペプチドが、コリネ型細菌由来のCspBのシグナルペプチドである、前記方法。

[8]前記CspBのシグナルペプチドが配列番号92に示すアミノ酸配列を有する、前記方法。

[9]前記培養されるコリネ型細菌がコリネバクテリウム属またはブレヴィバクテリウム属に属する細菌である、前記方法。

[10]前記培養されるコリネ型細菌がコリネバクテリウム・グルタミカムまたはコリネバクテリウム・スタティオニスである、前記方法。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、*C. glutamicum* YDK010株で、*C. glutamicum* ATCC13869のCspBのシグナル配列および*C. glutamicum* ATCC13869の成熟CspBのN末端配列を融合したプロインスリンを発現させた際のSDS-PAGEの結果を示す写真である。

[図2]図2は、*C. glutamicum* YDK010株で、*C. glutamicum* ATCC13869のCspBのシグナル配列および*C. glutamicum* ATCC13869の成熟CspBのN末端配列およ

びプロテアーゼ認識配列を融合したヒト成長ホルモン（hGH）を発現させた際のSDS-PAGEの結果を示す写真である。

[図3]図3は、*C. glutamicum* YDK010株で、*C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872のCspAのシグナル配列および*C. glutamicum* ATCC13869の成熟CspBのN末端配列およびプロテアーゼ認識配列を融合したヒト成長ホルモン（hGH）を発現させた際のSDS-PAGEの結果を示す写真である。

[図4]図4は、*C. glutamicum* ATCC13032および*C. glutamicum* ATCC6872で、*C. glutamicum* ATCC13869のCspBのシグナル配列および*C. glutamicum* ATCC13869の成熟CspBのN末端配列およびプロテアーゼ認識配列を融合したヒト成長ホルモン（hGH）を発現させた際のSDS-PAGEの結果を示す写真である。

[図5]図5は、*C. glutamicum* YDK010株で、*C. glutamicum* ATCC13869のCspBのシグナル配列、*C. glutamicum* ATCC13869の成熟CspBのN末端配列、およびプロテアーゼ認識配列を融合した生理活性ペプチドTeriparatideを発現させた際のSDS-PAGEの結果を示す写真である。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明は、異種タンパク質の分泌発現用の遺伝子構築物を有するコリネ型細菌を培養し、分泌生産された異種タンパク質を回収することを含む、異種タンパク質の製造方法であって、前記遺伝子構築物が、コリネ型細菌で機能するプロモーター配列、該プロモーター配列の下流に接続されたコリネ型細菌で機能するシグナルペプチドをコードする核酸配列、および該シグナルペプチドをコードする核酸配列の下流に接続されたGln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列と異種タンパク質との融合タンパク質をコードする核酸配列を含む、方法（以下、「本発明の方法」または「本発明の異種タンパク質の製造方法」ともいう）を提供する。

[0015] 本発明の方法に用いられるコリネ型細菌は、異種タンパク質の分泌発現用の遺伝子構築物（genetic construct）を有することにより、異種タンパク質を分泌生産する能力を有する。

[0016] なお、本発明の方法に用いられるコリネ型細菌を、「本発明の細菌」ある

いは「本発明のコリネ型細菌」ともいう。また、本発明の細菌が有する異種タンパク質の分泌発現用の遺伝子構築物を「本発明に用いられる遺伝子構築物」ともいう。また、Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列と異種タンパク質との融合タンパク質を「本発明の融合タンパク質」ともいう。

[0017] 本発明において、タンパク質が「分泌」されるとは、タンパク質が細菌菌体外（細胞外）に移送されることをいう。タンパク質が「分泌」されることには、最終的にそのタンパク質の全分子が培地中に完全に遊離状態におかれる場合はもちろん、そのタンパク質の全分子が菌体表層に存在している場合や、そのタンパク質の一部の分子が培地中に存在し、残りの分子が菌体表層に存在している場合も含まれる。

[0018] すなわち、本発明において、「異種タンパク質を分泌生産する能力」とは、本発明の細菌を培地中で培養したときに、培地中または菌体表層に異種タンパク質を分泌し、培地中または菌体表層から回収できる程度に蓄積する能力をいう。蓄積量は、例えば、培地中での蓄積量として、好ましくは10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 以上、より好ましくは1 mg/L 以上、特に好ましくは100 mg/L 以上、さらに好ましくは1 g/L 以上であってよい。また、蓄積量は、例えば、菌体表層での蓄積量として、菌体表層の異種タンパク質を回収し培地と同量の液体に懸濁した場合に懸濁液中での異種タンパク質濃度が好ましくは10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 以上、より好ましくは1 mg/L 以上、特に好ましくは100 mg/L 以上となるような量であってよい。なお、本発明において分泌生産される「タンパク質」とは、ペプチドあるいはポリペプチドと呼ばれる態様をも含む概念である。

[0019] 本発明において、「異種タンパク質」(heterologous protein)とは、同タンパク質を発現および分泌させるコリネ型細菌にとって外来性(exogenous)であるタンパク質をいう。異種タンパク質は、例えば、微生物由来のタンパク質であってもよく、植物由来のタンパク質であってもよく、動物由来のタンパク質であってもよく、ウィルス由来のタンパク質であってもよく、さらには人工的にアミノ酸配列をデザインしたタンパク質であってもよい。異種タンパク質は、単量体タンパク質であってもよく、多量体(multimer)タ

ンパク質であってもよい。多量体タンパク質とは、2またはそれ以上のサブユニットからなる多量体として存在しうるタンパク質をいう。多量体において、各サブユニットは、ジスルフィド結合等の共有結合で連結されていてもよく、水素結合や疎水性相互作用等の非共有結合で連結されていてもよく、それらの組み合わせにより連結されていてもよい。多量体においては、1またはそれ以上の分子間ジスルフィド結合が含まれるのが好ましい。多量体は、単一の種類のサブユニットからなるホモ多量体であってもよく、2またはそれ以上の種類のサブユニットからなるヘテロ多量体であってもよい。なお、多量体タンパク質がヘテロ多量体である場合には、多量体を構成するサブユニットの内、少なくとも1つのサブユニットが異種タンパク質であればよい。すなわち、全てのサブユニットが異種由来であってもよく、一部のサブユニットのみが異種由来であってもよい。異種タンパク質は、天然で分泌性であるタンパク質であってもよく、天然では非分泌性であるタンパク質であってもよいが、天然で分泌性であるタンパク質であるのが好ましい。「異種タンパク質」の具体例は後述する。

[0020] 生産される異種タンパク質は、1種類のみであってもよく、2またはそれ以上の種類であってもよい。また、異種タンパク質がヘテロ多量体である場合には、1種類のサブユニットのみが生産されてもよく、2またはそれ以上の種類のサブユニットが生産されてもよい。すなわち、「異種タンパク質を分泌生産する」ことには、目的の異種タンパク質を構成するサブユニットの内、全てのサブユニットを分泌生産する場合に加えて、一部のサブユニットのみを分泌生産する場合も含まれる。

[0021] 本発明において、コリネ型細菌とは好気性のグラム陽性細菌であり、コリネ型細菌としては、コリネバクテリウム属細菌、ブレビバクテリウム属細菌、およびマイクロバクテリウム属細菌等が挙げられる。なお、コリネ型細菌には、従来ブレビバクテリウム属に分類されていたが、現在コリネバクテリウム属に統合された細菌(Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255(1991))も含まれる。コリネ型細菌を使用することの利点としては、従来異種タンパク質の

分泌生産に利用されている糸状菌、酵母、Bacillus属細菌等と比べ、もともと菌体外に分泌されるタンパク質が極めて少なく、異種タンパク質を分泌生産した場合の精製過程の簡略化や省略化が期待できること、また、糖、アンモニア、および無機塩等を含有するシンプルな培地で良く生育し、培地代や培養方法、培養生産性で優れていること、等が挙げられる。

[0022] コリネ型細菌としては、具体的には、下記のような種が挙げられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム (Corynebacterium acetoacidophilum)

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム (Corynebacterium acetoglutamicum)

コリネバクテリウム・アルカノリティカム (Corynebacterium alkanolyticum)

コリネバクテリウム・カルナエ (Corynebacterium callunae)

コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum)

コリネバクテリウム・リリウム (Corynebacterium lilium)

コリネバクテリウム・メラセコーラ (Corynebacterium melassecola)

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス (コリネバクテリウム・エフィシエンス) (Corynebacterium thermoaminogenes (Corynebacterium efficiens))

コリネバクテリウム・ハーキュリス (Corynebacterium herculis)

ブレビバクテリウム・ディバリカタム (Brevibacterium divaricatum)

ブレビバクテリウム・フラバム (Brevibacterium flavum)

ブレビバクテリウム・イマリオフィラム (Brevibacterium immariophilum)

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) (Brevibacterium lactofermentum (Corynebacterium glutamicum))

ブレビバクテリウム・ロゼウム (Brevibacterium roseum)

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム (Brevibacterium saccharolyticum)

m)

ブレヴィバクテリウム・チオゲニタリス (*Brevibacterium thiogenitalis*)

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (コリネバクテリウム・スタティオニス) (*Corynebacterium ammoniagenes*(*Corynebacterium stationis*))

ブレヴィバクテリウム・アルバム (*Brevibacterium album*)

ブレヴィバクテリウム・セリナム (*Brevibacterium cerinum*)

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム (*Microbacterium ammoniaphilum*)

[0023] コリネ型細菌としては、具体的には、下記のような菌株が挙げられる。

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806

Corynebacterium alkanolyticum ATCC 21511

Corynebacterium callunae ATCC 15991

Corynebacterium glutamicum ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060, ATCC 13869, FERM BP-734

Corynebacterium lilium ATCC 15990

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

Corynebacterium thermoaminogenes AJ12340 (FERM BP-1539)

Corynebacterium herculis ATCC 13868

Brevibacterium divaricatum ATCC 14020

Brevibacterium flavum ATCC 13826, ATCC 14067, AJ12418(FERM BP-2205)

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068

Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869

Brevibacterium roseum ATCC 13825

Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066

Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240

Corynebacterium ammoniagenes (*Corynebacterium stationis*) ATCC 6871, ATCC 6872

Brevibacterium album ATCC 15111

Brevibacterium cerinum ATCC 15112

Microbacterium ammoniophilum ATCC 15354

- [0024] これらの菌株は、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (住所12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America) より分譲を受けることが出来る。すなわち各菌株に対応する登録番号が付与されており、この登録番号を利用して分譲を受けることが出来る (<http://www.atcc.org/>参照)。各菌株に対応する登録番号は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。
- [0025] とりわけ、野生株コリネバクテリウム・グルタミカム (*C. glutamicum*) ATCC13869よりストレプトマイシン(Sm)耐性変異株として分離したコリネバクテリウム・グルタミカムAJ12036(FERM BP-734)は、その親株(野生株)に比べ、タンパク質の分泌に関わる機能遺伝子に変異が存在することが予測され、異種タンパク質の分泌生産能が至適培養条件下での蓄積量としておよそ2~3倍と極めて高く、宿主菌として好適である。AJ12036は、昭和59年3月26日に工業技術院 生命工学工業技術研究所(独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、日本国つくば市東1-1-1 中央第6、郵便番号305-8566)に国際寄託として原寄託され、受託番号FERM BP-734が付与されている。
- [0026] また、上述したようなコリネ型細菌を親株として、突然変異法や遺伝子組換え法を利用してタンパク質の分泌生産能が高まった株を選抜し、宿主として利用してもよい。例えば、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロソグアニジン等の化学変異剤による処理を行なった後、タンパク質の分泌生産能が高まった株を選抜することができる。
- [0027] さらに、このような菌株から細胞表層タンパク質を生産しないように改変した菌株を宿主として使用すれば、培地中または菌体表層に分泌された異種タンパク質の精製が容易となり、特に好ましい。そのような改変は、突然変

異法または遺伝子組換え法により染色体上の細胞表層タンパク質のコード領域またはその発現調節領域に変異を導入することにより行うことができる。細胞表層タンパク質を生産しないように改変されたコリネ型細菌としては、*C. glutamicum* AJ12036(FERM BP-734)の細胞表層タンパク質PS2の欠損株である*C. glutamicum* YDK010株 (W02004/029254) が挙げられる。

[0028] すなわち、本発明の細菌は、細胞表層タンパク質の活性が低下しているものであってよい。細胞表層タンパク質は、細菌や古細菌の細胞表層 (S層) を構成するタンパク質である。コリネ型細菌の細胞表層タンパク質としては、*C. glutamicum*のPS1およびPS2 (CspBともいう)、ならびに*C. stationis*のSlpA (CspAともいう) が挙げられる。これらの中では、PS2タンパク質の活性を低下させるのが好ましい。*C. glutamicum* ATCC13869のcspB遺伝子の塩基配列および同遺伝子がコードするPS2タンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号94および95に示す。また、他の*C. glutamicum*株におけるcspB遺伝子ホモログの例については後述する。

[0029] コリネ型細菌が属する種又は菌株によって、細胞表層タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列に差異が存在することがあるため、細胞表層タンパク質をコードする遺伝子は、元の機能が維持されたタンパク質をコードする限り、上記塩基配列のバリエーションであってもよい。「元の機能が維持された」とは、例えば、コリネ型細菌で活性を低下させたときに異種タンパク質の分泌生産量を非改変株と比べて上昇させる性質を有することであってもよい。また、「元の機能が維持された」とは、CspBの場合には、例えば、後述するように、本発明の挿入配列により異種タンパク質の分泌生産量の増大が達成できることであってもよい。後述するCspBおよびそれをコードする遺伝子のバリエーションに関する記載は、他の細胞表層タンパク質およびそれらをコードする遺伝子にも準用できる。

[0030] 「コリネ型細菌で活性を低下させたときに異種タンパク質の分泌生産量を非改変株と比べて上昇させる性質」とは、コリネ型細菌で活性を低下させたときに非改変株、例えば野生株または親株よりも多い量の異種タンパク質を

分泌生産する能力をコリネ型細菌に付与する性質をいう。非改変株よりも多い量の異種タンパク質を分泌生産するとは、異種タンパク質の分泌生産量が非改変株と比較して増大する限り特に制限されないが、例えば、培地中および／または菌体表層での蓄積量として、非改変株と比較して好ましくは10%以上、より好ましくは20%以上、特に好ましくは30%以上、さらに好ましくは100%以上多い量の異種タンパク質を分泌生産することであってよい。また、非改変株よりも多い量の異種タンパク質を分泌生産するとは、濃縮していない非改変株の培養上清をSDS-PAGEに供しCBBで染色した際には異種タンパク質を検出できないが、濃縮していない改変株の培養上清をSDS-PAGEに供しCBBで染色した際には異種タンパク質を検出できることであってもよい。

[0031] コリネ型細菌で活性を低下させたときに異種タンパク質の分泌生産量を非改変株と比べて上昇させる性質を有するかどうかは、コリネ型細菌に属する菌株を基にそのタンパク質の活性が低下するよう改変された株を作製し、該改変株を培地で培養した際に分泌生産される異種タンパク質の量を定量し、改変前の株（非改変株）を培地で培養した際に分泌生産される異種タンパク質の量と比較することで確認することができる。

[0032] 本発明において、「細胞表層タンパク質の活性が低下している」ことには、細胞表層タンパク質の活性が低下するようにコリネ型細菌が改変された場合、および、コリネ型細菌においてもともと細胞表層タンパク質の活性が低下している場合が含まれる。「コリネ型細菌においてもともと細胞表層タンパク質の活性が低下している場合」には、コリネ型細菌がもともと細胞表層タンパク質を有さない場合が含まれる。すなわち、細胞表層タンパク質の活性が低下しているコリネ型細菌としては、例えば、もともと細胞表層タンパク質を有さないコリネ型細菌が挙げられる。「コリネ型細菌がもともと細胞表層タンパク質を有さない場合」としては、例えば、コリネ型細菌がもともと細胞表層タンパク質をコードする遺伝子を有さない場合が挙げられる。なお、「コリネ型細菌がもともと細胞表層タンパク質を有さない」とは、コリ

ネ型細菌が、当該コリネ型細菌が属する種の他の株に見出される細胞表層タンパク質から選択される1またはそれ以上のタンパク質をもともと有さないことであってよい。例えば、「*C. glutamicum*がもともと細胞表層タンパク質を有さない」とは、*C. glutamicum*株が、他の*C. glutamicum*株に見出される細胞表層タンパク質から選択される1またはそれ以上のタンパク質、すなわち、例えばPS1および/またはPS2 (CspB)、をもともと有さないことであってよい。もともと細胞表層タンパク質を有さないコリネ型細菌としては、例えば、もともとcspB遺伝子を有さない*C. glutamicum* ATCC 13032が挙げられる。

[0033] 以下に、タンパク質の活性を低下させる手法について説明する。

[0034] 「タンパク質の活性が低下する」とは、標的のタンパク質の活性が野性株や親株等の非改変株と比較して減少していることを意味し、活性が完全に消失している場合を含む。「タンパク質の活性が低下する」とは、具体的には、非改変株と比較して、同タンパク質の細胞当たりの分子数が低下していること、および/または、同タンパク質の分子当たりの機能が低下していることをいう。すなわち、「タンパク質の活性が低下する」という場合の「活性」とは、タンパク質の触媒活性に限られず、タンパク質をコードする遺伝子の転写量 (mRNA量) またはタンパク質の量を意味してもよい。なお、「タンパク質の細胞当たりの分子数が低下している」ことには、同タンパク質が全く存在していない場合が含まれる。また、「タンパク質の分子当たりの機能が低下している」ことには、同タンパク質の分子当たりの機能が完全に消失している場合が含まれる。

[0035] タンパク質の活性が低下するような改変は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子の発現を低下させることにより達成される。なお、「遺伝子の発現が低下する」ことを、「遺伝子の発現が弱化する」ともいう。遺伝子の発現の低下は、例えば、転写効率の低下によるものであってもよく、翻訳効率の低下によるものであってもよく、それらの組み合わせによるものであってもよい。遺伝子の発現の低下は、例えば、遺伝子のプロモーターやシャ

インデルガノ（SD）配列等の発現調節配列を改変することにより達成できる。発現調節配列を改変する場合には、発現調節配列は、好ましくは1塩基以上、より好ましくは2塩基以上、特に好ましくは3塩基以上が改変される。また、発現調節配列の一部または全部を欠失させてもよい。また、遺伝子の発現の低下は、例えば、発現制御に関わる因子を操作することによっても達成できる。発現制御に関わる因子としては、転写や翻訳制御に関わる低分子（誘導物質、阻害物質など）、タンパク質（転写因子など）、核酸（siRNAなど）等が挙げられる。

[0036] また、タンパク質の活性が低下するような改変は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子を破壊することにより達成できる。遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の遺伝子のコード領域の一部又は全部を欠損させることにより達成できる。さらには、染色体上の遺伝子の前後の配列を含めて、遺伝子全体を欠失させてもよい。タンパク質の活性の低下が達成できる限り、欠失させる領域は、N末端領域、内部領域、C末端領域等のいずれの領域であってもよい。通常、欠失させる領域は長い方が確実に遺伝子を不活化することができる。また、欠失させる領域の前後の配列は、リーディングフレームが一致しないことが好ましい。

[0037] また、遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の遺伝子のコード領域にアミノ酸置換（ミスセンス変異）を導入すること、終止コドンを導入すること（ナンセンス変異）、あるいは1～2塩基を付加または欠失するフレームシフト変異を導入すること等によっても達成できる（*Journal of Biological Chemistry* 272:8611-8617 (1997) *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95 5511-5515(1998), *Journal of Biological Chemistry* 266 20833-20839(1991)）。

[0038] また、遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の遺伝子のコード領域に他の配列を挿入することによっても達成できる。挿入部位は遺伝子のいずれの領域であってもよいが、挿入する配列は長い方が確実に遺伝子を不活化することができる。また、挿入部位の前後の配列は、リーディングフレームが一致し

ないことが好ましい。他の配列としては、コードされるタンパク質の活性を低下又は消失させるものであれば特に制限されないが、例えば、抗生物質耐性遺伝子等のマーカー遺伝子や異種タンパク質生産に有用な遺伝子が挙げられる。

[0039] 染色体上の遺伝子を上記のように改変することは、例えば、遺伝子の部分配列を欠失し、正常に機能するタンパク質を産生しないように改変した欠失型遺伝子を作製し、該欠失型遺伝子を含む組換えDNAで細菌を形質転換して、欠失型遺伝子と染色体上の遺伝子とで相同組換えを起こさせることにより、染色体上の遺伝子を欠失型遺伝子に置換することによって達成できる。その際、組換えDNAには、宿主の栄養要求性等の形質にしたがって、マーカー遺伝子を含ませておくことが操作がしやすい。欠失型遺伝子によってコードされるタンパク質は、生成したとしても、野生型タンパク質とは異なる立体構造を有し、機能が低下又は消失する。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子破壊は既に確立しており、「Redドリブンインテグレーション(Red-driven integration)」と呼ばれる方法 (Datsenko, K. A, and Wanner, B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:6640-6645 (2000))、Redドリブンインテグレーション法と入ファージ由来の切り出しシステム (Cho, E. H., Gumpert, R. I., Gardner, J. F. J. Bacteriol. 184: 5200-5203 (2002)) とを組み合わせた方法 (W02005/010175号参照) 等の直鎖状DNAを用いる方法や、温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法、接合伝達可能なプラスミドを用いる方法、宿主内で機能する複製起点を持たないサイドベクターを用いる方法などがある (米国特許第6303383号、特開平05-07491号)。

[0040] また、タンパク質の活性が低下するような改変は、例えば、突然変異処理により行ってもよい。突然変異処理としては、X線もしくは紫外線の照射、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG)、エチルメタンサルフォネート (EMS)、メチルメタンサルフォネート (MMS) 等の変異剤による通常の変異処理が挙げられる。

- [0041] 標的のタンパク質の活性が低下したことは、同タンパク質の活性を測定することで確認できる。タンパク質の活性は、具体的には、例えば、非改変株と比較して、50%以下、好ましくは20%以下、より好ましくは10%以下、さらに好ましくは5%以下、特に好ましくは0%に低下する。
- [0042] 標的の遺伝子の発現が低下したことは、同遺伝子の転写量が低下したことを確認することや、同遺伝子から発現する標的のタンパク質の量が低下したことを確認することにより確認できる。
- [0043] 標的の遺伝子の転写量が低下したことの確認は、同遺伝子から転写されるmRNAの量を非改変株と比較することによって行うことができる。mRNAの量を評価する方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR等が挙げられる (Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001))。mRNAの量は、非改変株と比較して、例えば、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下しているのが好ましい。
- [0044] 標的のタンパク質の量が低下したことの確認は、抗体を用いてウェスタンブロットによって行うことができる (Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001))。タンパク質の量は、非改変株と比較して、例えば、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下しているのが好ましい。
- [0045] 標的の遺伝子が破壊されたことは、破壊に用いた手段に応じて、同遺伝子の一部または全部の塩基配列、制限酵素地図、または全長等を決定することで確認できる。
- [0046] 異種タンパク質を分泌生産する能力を有するコリネ型細菌は、上述したようなコリネ型細菌に、本発明に用いられる遺伝子構築物を導入し保持させることにより得ることができる。
- [0047] 分泌性タンパク質 (secretory protein) は、一般に、プレタンパク質 (プレペプチドともいう) またはプレプロタンパク質 (プレプロペプチドともいう) として翻訳され、その後、プロセッシングにより成熟タンパク質 (matur

e protein) になることが知られている。具体的には、分泌性タンパク質は、一般に、プレタンパク質またはプレプロタンパク質として翻訳された後、プレ部分であるシグナルペプチドがプロテアーゼ（一般にシグナルペプチダーゼと呼ばれる）によって切断されて成熟タンパク質またはプロタンパク質に変換され、プロタンパク質はプロテアーゼによってさらにプロ部分が切断されて成熟タンパク質になる。よって、本発明の方法においては、異種タンパク質の分泌生産にシグナルペプチドを利用する。なお、本発明において、分泌型タンパク質のプレタンパク質およびプレプロタンパク質を総称して「分泌型タンパク質前駆体」という場合がある。本発明において、「シグナルペプチド」（「シグナル配列」ともいう）とは、分泌性タンパク質前駆体のN末端に存在し、かつ、通常、天然の成熟タンパク質には存在しないアミノ酸配列をいう。

[0048] 本発明に用いられる遺伝子構築物は、コリネ型細菌で機能するプロモーター配列、同プロモーター配列の下流に接続されたコリネ型細菌で機能するシグナルペプチドをコードする核酸配列、および同シグナルペプチドをコードする核酸配列の下流に接続されたGln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列と異種タンパク質との融合タンパク質をコードする核酸配列を含む。シグナルペプチドをコードする核酸配列は、プロモーター配列の下流に、同プロモーターによる制御を受けてシグナルペプチドが発現するよう連結されていればよい。融合タンパク質をコードする核酸配列は、シグナルペプチドをコードする核酸配列の下流に、同融合タンパク質がさらに同シグナルペプチドと接続して発現するよう連結されていればよい。また、本発明に用いられる遺伝子構築物は、コリネ型細菌で異種タンパク質遺伝子を発現させるために有効な制御配列（オペレーターやターミネーター等）を、それらが機能し得るよう適切な位置に有していてもよい。

[0049] 本発明で使用されるプロモーターは、コリネ型細菌で機能するプロモーターである限り特に限定されず、コリネ型細菌由来のプロモーターであってもよく、異種由来のプロモーターであってもよい。「コリネ型細菌で機能する

プロモーター」とは、コリネ型細菌においてプロモーター活性を有するプロモーターをいう。異種由来のプロモーターとして、具体的には、例えば、tacプロモーター、lacプロモーター、trpプロモーター、およびaraBADプロモーター等のE. coli由来のプロモーターが挙げられる。その中で、tacプロモーター等の強力なプロモーターが好ましく、araBADプロモーター等の誘導型のプロモーターも好ましい。

[0050] コリネ型細菌由来のプロモーターとしては、例えば、細胞表層タンパク質のPS1、PS2 (CspBともいう)、SlpA (CspAともいう) の遺伝子のプロモーター、各種アミノ酸生合成系遺伝子のプロモーターが挙げられる。各種アミノ酸生合成系遺伝子のプロモーターとして、具体的には、例えば、グルタミン酸生合成系のグルタミン酸脱水素酵素遺伝子、グルタミン合成系のグルタミン合成酵素遺伝子、リジン生合成系のアスパルトキナーゼ遺伝子、スレオニン生合成系のホモセリン脱水素酵素遺伝子、イソロイシンおよびバリン生合成系のアセトヒドロキシ酸合成酵素遺伝子、ロイシン生合成系の2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素遺伝子、プロリンおよびアルギニン生合成系のグルタミン酸キナーゼ遺伝子、ヒスチジン生合成系のホスホリボシル-ATPピロホスホリラーゼ遺伝子、トリプトファン、チロシンおよびフェニルアラニン等の芳香族アミノ酸生合成系のデオキシアラビノヘプツロン酸リン酸 (DAHP) 合成酵素遺伝子、イノシン酸およびグアニル酸のような核酸生合成系におけるホスホリボシルピロホスフェート (PRPP) アミドトランスフェラーゼ遺伝子、イノシン酸脱水素酵素遺伝子、およびグアニル酸合成酵素遺伝子のプロモーターが挙げられる。

[0051] プロモーターとしては、各種レポーター遺伝子を用いることにより、在来プロモーターの高活性型のものを取得し利用してもよい。例えば、プロモーター領域内の-35、-10領域をコンセンサス配列に近づけることにより、プロモーターの活性を高めることができる (国際公開第00/18935号)。プロモーターの強度の評価法および強力なプロモーターの例は、Goldsteinらの論文 (Prokaryotic promoters in biotechnology, Biotechnol. A

nnu. Rev., 1, 105-128 (1995)) 等に記載されている。さらに、リボソーム結合部位 (RBS) と開始コドンとの間のスペーサー領域、特に開始コドンのすぐ上流の配列 (5' -UTR) における数個のヌクレオチドの置換、あるいは挿入、あるいは欠失が mRNA の安定性および翻訳効率に非常に影響を及ぼすことが知られており、これらを改変することも可能である。

[0052] 本発明で使用されるシグナルペプチドは、コリネ型細菌で機能するシグナルペプチドである限り特に限定されず、コリネ型細菌由来のシグナルペプチドであってもよく、異種由来のシグナルペプチドであってもよい。「コリネ型細菌で機能するシグナルペプチド」とは、目的のタンパク質の N 末端に連結した際に、コリネ型細菌が当該タンパク質を分泌することができるペプチドをいう。シグナルペプチドは、宿主であるコリネ型細菌の分泌性タンパク質のシグナルペプチドであるのが好ましく、コリネ型細菌の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドであるのがより好ましい。コリネ型細菌の細胞表層タンパク質としては、*C. glutamicum* に由来する PS1 及び PS2 (CspB) (特表平 6-502548)、及び *C. ammoniagenes* (*C. stationis*) に由来する SlpA (CspA) (特開平 10-108675) が挙げられる。PS1 のシグナルペプチドのアミノ酸配列を配列番号 91 に、PS2 (CspB) のシグナルペプチドのアミノ酸配列を配列番号 92 に、SlpA (CspA) のシグナルペプチドのアミノ酸配列を配列番号 93 に示す。また、米国特許 4965197 によれば、コリネ型細菌由来の DNase にもシグナルペプチドがあるとされており、そのようなシグナルペプチドも本発明に利用することができる。

[0053] シグナルペプチドは生物種を越えて一定の共通した配列上の特徴を有するが、ある生物種で分泌機能を示すシグナルペプチドが他の生物種においても必ずしも分泌機能を発揮するわけではない。よって、異種由来のシグナルペプチドを利用する場合には、適宜、コリネ型細菌で機能するものを選択すればよい。あるシグナルペプチドがコリネ型細菌で機能するかどうかは、例えば、目的のタンパク質を当該シグナルペプチドと融合させて発現させ、当該タンパク質が分泌されるかを確認することで確認できる。

- [0054] シグナル配列は、一般に、翻訳産物が菌体外に分泌される際にシグナルペプチダーゼによって切断される。なお、シグナルペプチドをコードする遺伝子は、天然型のままでも使用できるが、使用する宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドン有するように改変してもよい。
- [0055] 本発明の遺伝子構築物においては、シグナルペプチドをコードする核酸配列と異種タンパク質をコードする核酸配列との間に、Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列をコードする核酸配列が挿入されている。なお、本発明において、Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列を「本発明で用いられる挿入配列」ともいう。
- [0056] 本発明で用いられる挿入配列は、Gln-Glu-Thrを含む限り特に制限されない。また、本発明で用いられる挿入配列において、Gln-Glu-Thrが含まれる位置は特に制限されないが、挿入配列のN末端から1～3番目のアミノ酸残基がGln-Glu-Thrであるのが好ましい。すなわち、発現した異種タンパク質において、シグナルペプチドの直後にGln-Glu-Thrが存在するのが好ましい。
- [0057] 本発明で用いられる挿入配列は、コリネ型細菌の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質（以下、「成熟CspB」または「CspB成熟タンパク質」ともいう）のN末端からの3アミノ酸残基またはそれ以上からなる配列であるのが好ましい。「N末端からの3アミノ酸残基またはそれ以上からなる配列」とは、N末端の1位のアミノ酸残基から、3位またはそれ以上のアミノ酸残基までのアミノ酸配列をいう。
- [0058] CspBとして、具体的には、例えば、*C. glutamicum* ATCC13869のCspBが挙げられる。なお、CspBは、PS2と同義である。*C. glutamicum* ATCC13869のcspB遺伝子の塩基配列を配列番号94に、CspBタンパク質のアミノ酸配列を配列番号95に示す。配列番号95に示すアミノ酸配列中、1～30位のアミノ酸残基がシグナルペプチドに相当し、31～469位のアミノ酸残基がCspB成熟タンパク質に相当する。シグナルペプチド部分30アミノ酸残基を除いた、*C. glutamicum* ATCC13869のCspB成熟タンパク質のアミノ酸配列を配列番号96に示す。CspB成熟タンパク質のN末端とは、CspB成熟タンパク質からC末

端側の疎水性領域である29アミノ酸を除いた残りの部分をいう。なお、*C. glutamicum* ATCC13869の成熟CspBにおいて、N末端の1～3位のアミノ酸残基がGln-Glu-Thrに相当する。本発明においては、cspB遺伝子の塩基配列の内、成熟CspBのアミノ酸配列の本発明の挿入配列に含まれる部分をコードする部分を用いればよい。

[0059] コリネ型細菌が属する種又は菌株によって、cspB遺伝子の塩基配列に差異が存在することがあるため、本発明で用いられるcspB遺伝子は、本発明の挿入配列により異種タンパク質の分泌生産量の増大が達成できる限り、上記塩基配列のバリエーションであってもよい。なお、cspB遺伝子のバリエーションには、同遺伝子のホモログが含まれる。cspB遺伝子のホモログは、例えば、上記の*C. glutamicum* ATCC13869のcspB遺伝子（配列番号94）を問い合わせ配列として用いたBLAST検索やFASTA検索によって公開データベースから容易に取得することができ、また、コリネ型細菌の染色体を鋳型にして、これら公知の遺伝子配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRにより取得することができる。

[0060] 例えば、28株の*C. glutamicum*については、CspBホモログのアミノ酸配列が報告されている[J Biotechnol., 112, 177-193(2004)]。これら28株由来CspBホモログのN末端アミノ酸配列を比較すると、シグナル配列30アミノ酸と、成熟タンパク質のN末端3アミノ酸残基（Gln-Glu-Thr）は完全に保存されている。さらに、CspBホモログの成熟タンパク質のN末端について6アミノ酸残基までを比較すると、Gln-Glu-Thr-Asn-Pro-Thr（以下、QETNPTともいう（配列番号97））、Gln-Glu-Thr-Gly-Thr-Tyr（以下、QETGTYともいう（配列番号98））、Gln-Glu-Thr-Thr-Val-Thr（以下、QETTVTともいう（配列番号99））、Gln-Glu-Thr-Pro-Val-Thr（以下、QETPVTともいう（配列番号100））、Gln-Glu-Thr-Ala-Val-Thr（以下、QETAVTともいう（配列番号101））の5パターンに分類できる。これら28株の*C. glutamicum*とcspB遺伝子ホモログのNCBIデータベースのGenBank accessionナンバーを以下に例示する（カッコ内がGenBank accessionナンバーを示す）。

- C. glutamicum ATCC13058 (AY524990)
- C. glutamicum ATCC13744 (AY524991)
- C. glutamicum ATCC13745 (AY524992)
- C. glutamicum ATCC14017 (AY524993)
- C. glutamicum ATCC14020 (AY525009)
- C. glutamicum ATCC14067 (AY524994)
- C. glutamicum ATCC14068 (AY525010)
- C. glutamicum ATCC14747 (AY525011)
- C. glutamicum ATCC14751 (AY524995)
- C. glutamicum ATCC14752 (AY524996)
- C. glutamicum ATCC14915 (AY524997)
- C. glutamicum ATCC15243 (AY524998)
- C. glutamicum ATCC15354 (AY524999)
- C. glutamicum ATCC17965 (AY525000)
- C. glutamicum ATCC17966 (AY525001)
- C. glutamicum ATCC19223 (AY525002)
- C. glutamicum ATCC19240 (AY525012)
- C. glutamicum ATCC21341 (AY525003)
- C. glutamicum ATCC21645 (AY525004)
- C. glutamicum ATCC31808 (AY525013)
- C. glutamicum ATCC31830 (AY525007)
- C. glutamicum ATCC31832 (AY525008)
- C. glutamicum LP-6 (AY525014)
- C. glutamicum DSM20137 (AY525015)
- C. glutamicum DSM20598 (AY525016)
- C. glutamicum DSM46307 (AY525017)
- C. glutamicum 22220 (AY525005)
- C. glutamicum 22243 (AY525006)

[0061] cspB遺伝子は、本発明の挿入配列により異種タンパク質の分泌生産量の増大が達成できる限り、上記アミノ酸配列において、1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であっても良い。なお上記「1又は数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置やアミノ酸残基の種類によっても異なるが、具体的には好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個を意味する。

[0062] 上記の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加は、タンパク質の機能が正常に維持される保存的変異である。保存的変異の代表的なものは、保存的置換である。保存的置換とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、Phe、Trp、Tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、Leu、Ile、Val間で、極性アミノ酸である場合には、Gln、Asn間で、塩基性アミノ酸である場合には、Lys、Arg、His間で、酸性アミノ酸である場合には、Asp、Glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、Ser、Thr間でお互いに置換する変異である。保存的置換とみなされる置換としては、具体的には、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。また、上記のようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、遺伝子が由来する細菌の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant又はvariant) によって生じるものも含まれる。

[0063] さらに、上記のような保存的変異を有する遺伝子は、本発明の挿入配列により異種タンパク質の分泌生産量の増大が達成できる限り、コードされるアミノ酸配列全体に対して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。尚、本明細書において、「相同性」(homology)は、「同一性」(identity)を指すことがある。

[0064] また、*cspB*遺伝子は、本発明の挿入配列により異種タンパク質の分泌生産量の増大が達成できる限り、公知の遺伝子配列から調製され得るプローブ、例えば上記塩基配列の全体または一部に対する相補配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAであってもよい。「ストリンジエントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは60℃、0.1×SSC、0.1% SDS、より好ましくは、68℃、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度および温度で、1回、好ましくは2～3回洗浄する条件を挙げることができる。

[0065] 上述の通り、上記ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、遺伝子の相補配列の一部であってもよい。そのようなプローブは、公知の遺伝子配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、これらの塩基配列を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。例えば、プローブとして、300 bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件としては、50℃、2×SSC、0.1% SDSが挙げられる。

[0066] また、*cspB*遺伝子は、天然型のままでも使用できるが、任意のコドンをそ

れと等価のコドンに置換したものであってもよい。例えば、cspB遺伝子は、使用する宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンを有するように改変してもよい。

[0067] なお、上記の遺伝子やタンパク質のバリエーションに関する記載は、他の細胞表層タンパク質や本発明において分泌生産される異種タンパク質等の任意のタンパク質、およびそれらをコードする遺伝子にも準用できる。

[0068] 「本発明の挿入配列により異種タンパク質の分泌生産量の増大が達成できる」とは、本発明の挿入配列を挿入しない場合と比較して異種タンパク質の分泌生産量が増大する限り特に制限されないが、例えば、培地中および／または菌体表層での蓄積量として、本発明の挿入配列を挿入しない場合と比較して好ましくは10 %以上、より好ましくは20 %以上、特に好ましくは30 %以上、さらには100%以上、300%以上、500%以上、1000%以上多い量の異種タンパク質を分泌生産することであってよい。また、「本発明の挿入配列により異種タンパク質の分泌生産量の増大が達成できる」とは、本発明の挿入配列を挿入していない異種タンパク質発現用の遺伝子構築物を導入した株の濃縮していない培養上清をSDS-PAGEに供しCBBで染色した際には異種タンパク質を検出できないが、本発明の挿入配列を挿入した異種タンパク質発現用の遺伝子構築物を導入した株の濃縮していない培養上清をSDS-PAGEに供しCBBで染色した際には異種タンパク質を検出できることであってもよい。本発明において、本発明の挿入配列により異種タンパク質の分泌生産量の増大が達成できるかどうかは、本発明の挿入配列を挿入した異種タンパク質発現用の遺伝子構築物をコリネ型細菌に属する菌株に導入し、導入株を培地で培養した際に分泌生産される異種タンパク質の量を定量し、本発明の挿入配列を挿入していない異種タンパク質発現用の遺伝子構築物を導入した株を培地で培養した際に分泌生産される異種タンパク質の量と比較することで確認することができる。

[0069] 本発明において、「成熟CspBのX位のアミノ酸残基」とは、配列番号96におけるX位に相当するアミノ酸残基を意味する。なお、アミノ酸配列にお

ける「X位」とは、同アミノ酸配列のN末端からX番目を意味し、N末端のアミノ酸残基が1位のアミノ酸残基である。すなわち、上記各アミノ酸残基の位置は相対的な位置を示すものであって、アミノ酸の欠失、挿入、付加などによってその位置は前後することがある。例えば、「成熟CspBの50位のアミノ酸残基」とは、配列番号96における50位に相当するアミノ酸残基を意味し、50位よりもN末端側の1アミノ酸残基が欠失している場合は、N末端から49番目のアミノ酸残基が「成熟CspBの50位のアミノ酸残基」であるものとする。また、50位よりもN末端側に1アミノ酸残基挿入されている場合は、N末端から51番目のアミノ酸残基が「成熟CspBの50位のアミノ酸残基」であるものとする。すなわち、例えば、「Gln-Glu-Thrに成熟CspBの4～50位のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列」とは、Gln-Glu-Thrに、配列番号96における4～50位に相当するアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列を意味する。

[0070] 本発明で用いられる挿入配列は、成熟CspBの1位のアミノ酸残基から、3～50位のいずれかのアミノ酸残基までのアミノ酸配列であるのが好ましい。本発明で用いられる挿入配列は、成熟CspBの1位のアミノ酸残基から、3～8、17、50位のいずれかのアミノ酸残基までのアミノ酸配列であるのがより好ましい。本発明で用いられる挿入配列は、成熟CspBの1位のアミノ酸残基から、4、6、17、50位のいずれかのアミノ酸残基までのアミノ酸配列であるのが特に好ましい。

[0071] 本発明で用いられる挿入配列の長さは、好ましくは3～50アミノ酸残基であり、より好ましくは3～8、17、または50アミノ酸残基であり、特に好ましくは4、6、17、または50アミノ酸残基である。

[0072] 本発明で用いられる挿入配列のN末端から1～3番目のアミノ酸残基がGln-Glu-Thrであり、且つ、本発明で用いられる挿入配列の長さが少なくとも4、5、または6アミノ酸残基である場合、本発明で用いられる挿入配列のN末端から4番目のアミノ酸残基は好ましくはAsn、Gly、Thr、Pro、またはAlaであり、5番目のアミノ酸残基は好ましくはPro、Thr、またはValであり、6番目

のアミノ酸残基は好ましくはThrまたはTyrである。なお、本発明で用いられる挿入配列において、Gln-Glu-ThrよりもN末端側にアミノ酸残基が存在する場合には、上記の4番目のアミノ酸残基とは、Gln-Glu-ThrのThrの次のアミノ酸残基であると読み替えればよく、上記の5番目および6番目のアミノ酸残基もそれに合わせて読み替えればよい。

[0073] 本発明で用いられる挿入配列は、例えば、下記A～Hのアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であるのが好ましい。

(A) Gln-Glu-Thr

(B) Gln-Glu-Thr-Xaa1 (配列番号102)

(C) Gln-Glu-Thr-Xaa1-Xaa2 (配列番号103)

(D) Gln-Glu-Thr-Xaa1-Xaa2-Xaa3 (配列番号104)

(E) Gln-Glu-Thrに成熟CspBの4～7位のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列

(F) Gln-Glu-Thrに成熟CspBの4～8位のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列

(G) Gln-Glu-Thrに成熟CspBの4～17位のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列

(H) Gln-Glu-Thrに成熟CspBの4～50位のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列

A～Hのアミノ酸配列において、Xaa1はAsn、Gly、Thr、Pro、またはAlaであり、Xaa2はPro、Thr、またはValであり、Xaa3はThrまたはTyrである。また、A～Hのアミノ酸配列において、「Gln-Glu-Thrに成熟CspBの4～X位のアミノ酸残基が付加された」とは、Gln-Glu-ThrのThrに成熟CspBのN末端の4位からX位までのアミノ酸残基が付加されていることを意味する。なお、通常、成熟CspBのN末端の1～3番目のアミノ酸残基はGln-Glu-Thrであり、その場合、「Gln-Glu-Thrに成熟CspBの4～X位のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列」とは、成熟CspBの1～X位のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列と同義である。

- [0074] また、本発明で用いられる挿入配列は、具体的には、例えば、Gln-Glu-Thr-Asn-Pro-Thr（配列番号97）、Gln-Glu-Thr-Gly-Thr-Tyr（配列番号98）、Gln-Glu-Thr-Thr-Val-Thr（配列番号99）、Gln-Glu-Thr-Pro-Val-Thr（配列番号100）、およびGln-Glu-Thr-Ala-Val-Thr（配列番号101）からなる群より選択されるアミノ酸配列であるのが好ましい。
- [0075] 上述の通り、本発明の方法により分泌生産される異種タンパク質は、微生物、植物、動物、またはウィルス由来のタンパク質全般や人工的にアミノ酸配列をデザインしたタンパク質が含まれ、特に限定されない。
- [0076] 本発明の方法により分泌生産される異種タンパク質としては、例えば、生理活性タンパク質、レセプタータンパク質、ワクチンとして使用される抗原タンパク質、酵素が挙げられる。酵素としては、例えば、トランスグルタミナーゼ、プロテアーゼ、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、コラゲナーゼ、およびキチナーゼ等が挙げられる。
- [0077] 生理活性タンパク質としては、例えば、成長因子（増殖因子）、ホルモン、サイトカイン、抗体関連分子が挙げられる。
- [0078] 成長因子（増殖因子）として、具体的には、例えば、上皮成長因子（Epidermal growth factor；EGF）、インスリン様成長因子-1（Insulin-like growth factor-1；IGF-1）、トランスフォーミング成長因子（Transforming growth factor；TGF）、神経成長因子（Nerve growth factor；NGF）、脳由来神経栄養因子（Brain-derived neurotrophic factor；BDNF）、血管内皮細胞増殖因子（Vesicular endothelial growth factor；VEGF）、顆粒球コロニー刺激因子（Granulocyte-colony stimulating factor；G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor；GM-CSF）、血小板由来成長因子（Platelet-derived growth factor；PDGF）、エリスロポエチン（Erythropoietin；EPO）、トロンボポエチン（Thrombopoietin；TPO）、酸性線維芽細胞増殖因子（acidic fibroblast growth factor；aFGFまたはFGF1）、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast g

rowth factor ; bFGFまたはFGF2)、角質細胞増殖因子 (keratinocyto growth factor ; KGF-1またはFGF7, KGF-2またはFGF10)、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor ; HGF) が挙げられる。

[0079] ホルモンとして、具体的には、例えば、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン (somatostatin)、ヒト成長ホルモン (human growth hormone ; hGH)、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone ; PTH)、カルシトニン (calcitonin) が挙げられる。

[0080] サイトカインとして、具体的には、例えば、インターロイキン、インターフェロン、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor ; TNF) が挙げられる。

[0081] なお、成長因子 (増殖因子)、ホルモン、およびサイトカインは互いに厳密に区別されなくともよい。例えば、生理活性タンパク質は、成長因子 (増殖因子)、ホルモン、およびサイトカインから選択されるいずれか1つのグループに属するものであってもよく、それらから選択される複数のグループに属するものであってもよい。

[0082] また、生理活性タンパク質は、タンパク質全体であってもよく、その一部であってもよい。タンパク質の一部としては、例えば、生理活性を有する部分が挙げられる。生理活性を有する部分として、具体的には、例えば、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone ; PTH) の成熟体のN末端34アミノ酸残基からなる生理活性ペプチドTeriparatideが挙げられる。

[0083] 抗体関連分子として、具体的には、例えば、完全抗体、Fab、Fab'、Fab'₂、Fc、重鎖 (H鎖) と軽鎖 (L鎖) からなる二量体、Fc融合タンパク質、重鎖 (H鎖)、軽鎖 (L鎖) が挙げられる。

[0084] レセプタータンパク質は、特に制限されず、例えば、生理活性タンパク質やその他の生理活性物質に対するレセプタータンパク質であってよい。その他の生理活性物質としては、例えば、ドーパミン等の神経伝達物質が挙げられる。また、レセプタータンパク質は、対応するリガンドが知られていないオーファン受容体であってもよい。

[0085] ワクチンとして使用される抗原タンパク質は、免疫応答を惹起できるもの

であれば特に制限されず、想定する免疫応答の対象に応じて適宜選択すればよい。

[0086] これらのタンパク質をコードする遺伝子は、使用する宿主に応じて、および望みの活性を得るために改変することができる。例えば、これらのタンパク質をコードする遺伝子は、これらのタンパク質に1又は数個のアミノ酸の付加、欠失、置換などが含まれるよう改変されてもよい。上述のCspBタンパク質やcspB遺伝子に関するバリエーションの記載は、本発明の方法により分泌生産される異種タンパク質およびそれをコードする遺伝子にも準用できる。また、これらのタンパク質をコードする遺伝子は、任意のコドンとそれと等価のコドンに置換したものであってもよい。例えば、これらのタンパク質をコードする遺伝子は、必要により宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンに変換してもよい。

[0087] 本発明の遺伝子構築物は、Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列をコードする核酸配列と異種タンパク質をコードする核酸配列との間に、さらに、酵素的切断に使用されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含んでいてもよい。酵素的切断に使用されるアミノ酸配列を本発明の融合タンパク質に挿入することで、発現した融合タンパク質を酵素的に切断し、目的の異種タンパク質を得ることができる。

[0088] 酵素的切断に使用されるアミノ酸配列は、ペプチド結合を加水分解する酵素により認識され切断される配列であれば特に制限されず、目的の異種タンパク質のアミノ酸配列に応じて使用可能な配列を適宜選択すればよい。酵素的切断に使用されるアミノ酸配列をコードする核酸配列は、同アミノ酸配列に基づいて適宜設定すればよく、また、例えば、宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンを用いればよい。

[0089] 酵素的切断に使用されるアミノ酸配列は、基質特異性の高いプロテアーゼの認識配列であるのが好ましい。そのようなアミノ酸配列として、具体的には、例えば、Factor Xaプロテアーゼの認識配列やproTEVプロテアーゼの認識配列が挙げられる。Factor Xaプロテアーゼはタンパク質中のIle-Glu-Gly-Ar

g (=IEGR) (配列番号 105) のアミノ酸配列を、proTEVプロテアーゼはタンパク質中のGlu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln (=ENLYFQ) (配列番号 106) のアミノ酸配列を認識し、各配列のC末端側を特異的に切断する。

[0090] 本発明の方法により最終的に得られる異種タンパク質のN末端領域は、天然のタンパク質と同一であってもよく、天然のタンパク質と同一でなくてもよい。例えば、本発明の方法により最終的に得られる異種タンパク質のN末端領域は、Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列を有していてもよく、Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列および上述の酵素的切断に使用されるアミノ酸配列を有していてもよく、それらのいずれも有していなくともよい。また、例えば、最終的に得られる異種タンパク質のN末端領域は、天然のタンパク質と比較して、1又は数個のアミノ酸を余分に付加された、あるいは欠失したものであってもよい。なお上記「1又は数個」とは、目的の異種タンパク質の全長や構造等によっても異なるが、具体的には好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個を意味する。

[0091] また、分泌生産される異種タンパク質は、プロ構造部が付加したタンパク質(プロタンパク質)であってもよい。分泌生産される異種タンパク質がプロタンパク質である場合、最終的に得られる異種タンパク質はプロタンパク質であってもよく、そうでなくてもよい。すなわち、プロタンパク質はプロ構造部を切断されて成熟タンパク質になってもよい。切断は、例えば、プロテアーゼにより行うことができる。プロテアーゼを使用する場合は、最終的に得られるタンパク質の活性という観点から、プロタンパク質は一般には天然のタンパク質とほぼ同じ位置で切断されることが好ましく、天然のタンパク質と完全に同じ位置で切断され天然のものと同一の成熟タンパク質が得られるのがより好ましい。従って、一般には、天然に生じる成熟タンパク質と同一のタンパク質を生じる位置でプロタンパク質を切断する特異的プロテアーゼが最も好ましい。しかしながら、上述の通り、最終的に得られる異種タンパク質のN末端領域は、天然のタンパク質と同一でなくてもよい。例えば、生産される異種タンパク質の種類や使用目的等によっては、天然のタンパク

質に比較してN末端がアミノ酸1～数個分長いあるいは短いタンパク質がより適切な活性を有することがある。本発明において使用できるプロテアーゼには、Dispase（ベーリンガーマンハイム社製）のような商業的に入手できるものの他、微生物の培養液、例えば放線菌の培養液等から得られるものが含まれる。そのようなプロテアーゼは未精製状態で使用することもでき、必要に応じて適当な純度まで精製した後に使用してもよい。なお、プロ構造部を切断して成熟タンパク質を得る場合には、挿入したGln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列はプロ構造部とともに切断除去されるため、Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列の後に酵素的切断に使用されるアミノ酸配列を配位せずとも目的のタンパク質を得ることができる。

[0092] 本発明に用いられる遺伝子構築物をコリネ型細菌に導入する手法は特に制限されない。本発明の細菌において、本発明に用いられる遺伝子構築物は、プラスミドのように染色体外で自律増殖するベクター上に存在していてもよく、染色体上に組み込まれていてもよい。なお、本発明の細菌を構築するに当たり、本発明に用いられる遺伝的構築物の導入、タンパク質の分泌生産能の付与または増強、その他の改変は、任意の順番で行うことができる。

[0093] 本発明に用いられる遺伝子構築物は、例えば、同遺伝子構築物を含むベクターを用いて宿主に導入できる。ベクターは、コリネ型細菌で自律複製可能なものであれば特に制限されず、例えば、細菌プラスミド由来のベクター、酵母プラスミド由来のベクター、バクテリオファージ由来のベクター、コスミド、またはファージミド等であってよい。ベクターとしては、例えば、コリネ型細菌由来のプラスミドが好ましい。コリネ型細菌で自律複製可能なベクターとして、具体的には、pHM1519(Agric, Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984)); pAM330 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984)) ; これらを改良した薬剤耐性遺伝子を有するプラスミド ; 特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30 ; 特開平2-72876号公報及び米国特許5,185,262号明細書公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX ; 特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2およびpCRY3 ; 特開昭58

-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号公報に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4およびpCG11等が挙げられる。

[0094] また、人工トランスポゾン等も利用することができる。トランスポゾンが使用される場合は相同組換えまたはそれ自身の転移能によって異種タンパク質遺伝子が染色体上に導入される。その他、相同組換えを利用する導入法としては、例えば、直鎖状DNA、温度感受性複製起点を含むプラスミド、接合伝達可能なプラスミド、または宿主内で機能する複製起点を持たないサイサイドベクター等を用いる方法が挙げられる。なお、異種タンパク質遺伝子が染色体上に導入される場合には、本発明に用いられる遺伝子構築物が染色体上に構成される限り、同遺伝子構築物に含まれるプロモーター配列、シグナルペプチドをコードする核酸配列、およびGln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列をコードする核酸配列から選択される1以上の配列は宿主の染色体上にもともと存在するものであってもよい。具体的には、例えば、宿主の染色体上にもともと存在するプロモーター配列と同プロモーター配列の下流に接続されたシグナルペプチドをコードする核酸配列をそのまま利用し、同シグナルペプチドをコードする核酸配列の下流に接続された遺伝子のみをGln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列と異種タンパク質との融合タンパク質をコードする核酸配列に置換することによっても、染色体上に本発明に用いられる遺伝子構築物が構成され、本発明の細菌を構築できる。

[0095] なお、2またはそれ以上の種類のタンパク質を発現する場合、各タンパク質の分泌発現用の遺伝子構築物は、目的の異種タンパク質の分泌発現が達成できるように本発明の細菌に保持されていればよい。具体的には、例えば、各タンパク質の分泌発現用の遺伝子構築物は、全てが単一の発現ベクター上に保持されていてもよく、全てが染色体上に保持されていてもよい。また、各タンパク質の分泌発現用の遺伝子構築物は、複数の発現ベクター上に別々に保持されていてもよく、単一または複数の発現ベクター上と染色体上とに別々に保持されていてもよい。「2またはそれ以上の種類のタンパク質を発

現する場合」とは、例えば、2またはそれ以上の種類の異種タンパク質が分泌生産される場合や、ヘテロ多量体タンパク質が分泌生産される場合をいう。

- [0096] 本発明に用いられる遺伝子構築物のコリネ型細菌への導入方法は特に限定されず、一般に使用される方法、例えば、プロトプラスト法(Gene, 39, 281-286(1985))、エレクトロポレーション法(Bio/Technology, 7, 1067-1070)(1989))等を使用することができる。
- [0097] 上記のようにして得られる本発明の細菌を培養し、異種タンパク質を発現させることにより、菌体外に分泌された多量の異種タンパク質が得られる。
- [0098] 本発明の細菌は通常用いられる方法および条件に従って培養することができる。例えば、本発明の細菌は炭素源、窒素源、無機イオンを含有する通常の培地で培養することができる。さらに高い増殖を得るために、ビタミン、アミノ酸等の有機微量栄養素を必要に応じて添加することもできる。
- [0099] 炭素源としてはグルコースおよびシュークロースのような炭水化物、酢酸のような有機酸、アルコール類、その他を使用することができる。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩、その他が使用できる。無機イオンとしては、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、リン酸イオン、カリウムイオン、鉄イオン等を必要に応じて適宜使用する。培養はpH5.0~8.5、15°C~37°Cの適切な範囲にて好氣的条件下で行い、1~7日間程度培養する。また、コリネ型細菌のL-アミノ酸生産における培養条件や、その他Sec系、Tat系のシグナルペプチドを用いたタンパク質の製造法に記載の条件を用いることが出来る(W001/23591、W02005/103278参照)。また、異種タンパク質の発現のために誘導型プロモーターを用いた場合は、培地にプロモーター誘導剤を添加して培養を行うこともできる。このような条件下で本発明の細菌を培養することにより、目的タンパク質は菌体内で多量に生産され効率よく菌体外に分泌される。なお、本発明の方法によれば、生産された異種タンパク質は菌体外に分泌されるため、例えばトランスグルタミナーゼ等の微生物の菌体内で多量に蓄積すると一般に致死的であるタンパク

質も、致命的影響を受けることなく連続的に生産できる。

[0100] 本発明の方法によって培地中に分泌されたタンパク質は、当業者によく知られた方法に従って培養後の培地から分離精製することができる。例えば、菌体を遠心分離等により除去した後、塩析、エタノール沈殿、限外濾過、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、中高圧液体クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー等の既知の適切な方法、またはこれらを組み合わせることにより分離精製することができる。また、ある場合には、培養物や培養上清をそのまま使用してもよい。本発明の方法によって菌体表層に分泌されたタンパク質も当業者によく知られた方法、例えば塩濃度の上昇、界面活性剤の使用等によって可溶化した後に、培地中に分泌された場合と同様にして分離精製することができる。また、ある場合には、菌体表層に分泌されたタンパク質を可溶化せずに、例えば固定化酵素として使用しても良い。

[0101] 目的の異種タンパク質が分泌生産されたことは、培養上清および／または菌体表層を含む画分を試料として、SDS-PAGEを行い、分離されたタンパク質バンドの分子量を確認することにより確認することができる。また、培養上清および／または菌体表層を含む画分を試料として、抗体を用いたウェスタンブロットによって確認できる (Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001))。また、プロテインシーケンサーを用いて目的タンパク質のN末端アミノ酸配列を決定することによって確認出来る。また、質量分析計を用いて、目的タンパク質の質量を決定することによって確認出来る。また、目的の異種タンパク質が酵素や何らかの測定可能な生理活性を有するものである場合には、培養上清および／または菌体表層を含む画分を試料として、目的の異種タンパク質の酵素活性または生理活性を測定することにより目的の異種タンパク質が分泌生産されたことを確認できる。

[0102] 本発明の遺伝子構築物から発現するタンパク質において、シグナルペプチ

ドの直後がグルタミン残基である場合、シグナルペプチドが切断されて得られるタンパク質のN末端アミノ酸残基は、本来のグルタミン残基が脱水縮合して形成されたピログルタミン酸残基となる。すなわち、例えば、本発明の方法によって培地中に分泌される異種タンパク質のN末端アミノ酸残基はピログルタミン酸残基となり得る。目的の異種タンパク質のN末端アミノ酸残基がピログルタミン酸残基であることは、質量分析計によって目的の異種タンパク質の質量を決定し、決定された質量が本来の理論質量から水分子相当質量(=18)を減じた質量であると確認することによって確認出来る。また、タンパク質のN末端アミノ酸残基がピログルタミン酸残基である場合、エドマン分解反応がブロックされる為、プロテインシーケンサーを用いてN末端アミノ酸配列決定を行う事が出来ない。よって、目的の異種タンパク質のN末端アミノ酸残基がピログルタミン酸残基であることは、プロテインシーケンサーを用いても、直接、目的の異種タンパク質のN末端アミノ酸配列が決定されないが、目的の異種タンパク質に対してピログルタミン酸アミノペプチダーゼを作用させた後にプロテインシーケンサーを用いることで本来のN末端アミノ酸配列の2番目以降のアミノ酸残基が決定されることによっても確認出来る。さらに、目的の異種タンパク質のN末端アミノ酸残基がピログルタミン酸残基であることは、簡易には、プロテインシーケンサーを用いても、直接、目的の異種タンパク質のN末端アミノ酸配列が決定されないことによっても確認出来る。

実施例

- [0103] 本発明は以下の実施例によって、更に具体的に説明されるが、これらはいかなる意味でも本発明を限定するものと解してはならない。
- [0104] 実施例1 : *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質N末端の1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 440アミノ酸残基を融合したプロインスリンの分泌発現(1)プロインスリン遺伝子の全合成と、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質CspBのシ

グナル配列を用いたプロインスリン分泌発現プラスミドの構築

プロインスリン（以下、PIns と表記する）のアミノ酸配列は既に決定されている（Genbank Accession No. NP_000198.1）。この配列と *C. glutamicum* のコドン使用頻度を考慮して、〈配列番号1〉～〈配列番号8〉に示したDNAを合成した。これらのDNAを鋳型とし、〈配列番号9〉と〈配列番号10〉に示したDNAをプライマーとして用いて、PInsをコードする遺伝子をPCR法によって増幅し、〈配列番号11〉に示した約0.3kbpのDNA断片を得た。このDNA断片をクローニングベクターpHSG398（タカラバイオ社製）のSma I部位に挿入する事によりpHSG-PInsを得た。このpHSG-PInsを鋳型にして、〈配列番号9〉と〈配列番号10〉に示したDNAをプライマーとして用いて、PIns遺伝子領域をPCR法によって増幅し、約0.3kbpのPIns遺伝子断片を得た。

[0105] 一方、*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるCspBをコードしている遺伝子の塩基配列は既に決定されている（非特許文献8；[Mol. Microbiol., 9, 97-109(1993)]）。この配列を参考にして、W001/23591に記載のpPKPTG1（pPKPTG1は、プロトランスグルタミナーゼ（プロ構造部付きトランスグルタミナーゼ）の分泌発現用ベクターであって、*C. glutamicum* ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーター、同プロモーターの下流に発現可能に連結された*C. glutamicum* ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基をコードするDNA、および同シグナルペプチドをコードするDNAの下流に同シグナルペプチドとの融合タンパク質として発現するよう連結された放線菌 *Streptomyces toverticillium mobaraense* 由来のプロトランスグルタミナーゼ遺伝子を有する）を鋳型に、〈配列番号12〉と〈配列番号13〉に示したプライマーを用いて、*C. glutamicum* ATCC13869株由来のCspBのプロモーター領域とシグナルペプチドをコードする領域をPCR法にて増幅し、約0.7kbpのDNA断片を得た。

[0106] 更に、増幅した両DNA断片（PIns遺伝子断片と、プロモーター領域とシグナルペプチドをコードする領域の断片）を鋳型に、〈配列番号12〉と〈配列番号10〉に記載のDNAをプライマーとして用いたPCR法により、両DNA断片が融合した約0.9kbpのDNA断片を得た。なお、〈配列番号12〉と〈配列番号10〉のプライマー

には制限酵素Kpn Iの認識配列がデザインしてある。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。このDNA断片を制限酵素Kpn I処理後に、特開平9-322774に記載のpPK4のKpnI部位に挿入することによって、pPKPInsを得た。挿入断片の塩基配列決定の結果、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。なお、塩基配列の決定はBigDye (登録商標) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製)と3130 ジェネティックアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて行った。

[0107] (2) *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質N末端の1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 440アミノ酸残基を融合したプロインスリンの分泌発現プラスミドの構築

上述の通り、*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるCspBをコードしている遺伝子の塩基配列は既に決定されている(非特許文献8; [Mol. Microbiol., 9, 97-109(1993)])。 *C. glutamicum*においてCspBは細胞表層に局在し、S-layerと呼ばれる層を形成しているが、その局在にはC末端側の疎水性に富んだアミノ酸残基領域が関与している事が知られている(非特許文献8; [Mol. Microbiol., 9, 97-109(1993)])。この配列を参考にして、<配列番号12>と<配列番号14>に記載のプライマーを合成し、常法に従って(斉藤、三浦の方法[Biochem. Biophys. Act., 72, 619(1963)])調製した*C. glutamicum* ATCC13869の染色体DNAを鋳型として、CspBをコードする遺伝子のプロモーターを含む5' -上流域(以下、CspBプロモーター領域ともいう)、ならびにCspBのN末端のシグナルペプチド30アミノ酸残基およびCspB成熟タンパク質のN末端440アミノ酸残基をコードする領域をPCR法にて増幅した。なお、CspB成熟タンパク質のN末端440アミノ酸残基とは、*C. glutamicum* ATCC13869のCspB成熟タンパク質全長469アミノ酸(配列番号96)からC末端側の疎水性領域である29アミノ酸を除いたものである。PCR反応にはPyobest DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った

。

[0108] 次に、*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質N末端のアミノ酸残基をそれぞれ1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 440残基融合させたプロインスリンを分泌発現させるプラスミドを構築する目的で、上記にて増幅したPCR反応産物を鋳型とし、それぞれ〈配列番号12〉と〈配列番号15〉、〈配列番号12〉と〈配列番号16〉、〈配列番号12〉と〈配列番号17〉、〈配列番号12〉と〈配列番号18〉、〈配列番号12〉と〈配列番号19〉、〈配列番号12〉と〈配列番号20〉、〈配列番号12〉と〈配列番号21〉、〈配列番号12〉と〈配列番号22〉、〈配列番号12〉と〈配列番号23〉、〈配列番号12〉と〈配列番号24〉、〈配列番号12〉と〈配列番号25〉、〈配列番号12〉と〈配列番号26〉、〈配列番号12〉と〈配列番号27〉、〈配列番号12〉と〈配列番号28〉、〈配列番号12〉と〈配列番号29〉、〈配列番号12〉と〈配列番号20〉、〈配列番号12〉と〈配列番号31〉、〈配列番号12〉と〈配列番号32〉、〈配列番号12〉と〈配列番号33〉、〈配列番号12〉と〈配列番号34〉、〈配列番号12〉と〈配列番号35〉、〈配列番号12〉と〈配列番号36〉、〈配列番号12〉と〈配列番号37〉、〈配列番号12〉と〈配列番号38〉、〈配列番号12〉と〈配列番号39〉、〈配列番号12〉と〈配列番号40〉に示した各合成DNAをプライマーとして、CspBプロモーター領域、ならびにCspBのN末端のシグナルペプチド30アミノ酸残基およびCspB成熟タンパク質のN末端の1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 440アミノ酸残基をコードする領域をPCR法にてそれぞれ増幅した。一方、実施例1(1)で構築したプラスミドpPKPIInsを鋳型とし、〈配列番号9〉と〈配列番号41〉に示した合成DNAをプライマーとして、PIIns遺伝子領域をPCR法にて増幅し、PIIns遺伝子断片を得た。

[0109] 更に、増幅させた両DNA断片（CspBプロモーター領域、ならびにCspBシグナルペプチドおよび成熟CspBのN末端の1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 440アミノ酸残基をコードする領域の断片と、PIIns遺伝子断片）を鋳型に、〈配列番号

12>と<配列番号41>に記載のDNAをプライマーとして用いたPCR法により、両DNA断片が融合したDNA断片を得た。なお、<配列番号12>と<配列番号41>のプライマーは制限酵素Kpn Iの認識配列がデザインされており、<配列番号15>～<配列番号40>のプライマーは、CspB成熟タンパク質のN末端をコードする領域とPIIns遺伝子との融合遺伝子を構築するためにPIInsのN末端側のアミノ酸配列をコードする配列を含んでいる。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase（タカラバイオ社製）を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。これらのDNA断片を制限酵素Kpn I処理後に、特開平9-322774に記載のpPK4のKpn I部位に挿入することによって、それぞれpPKK1PIIns, pPKK2PIIns, pPKK3PIIns, pPKK4PIIns, pPKK5PIIns, pPKK6PIIns, pPKK7PIIns, pPKK8PIIns, pPKK9PIIns, pPKK10PIIns, pPKK11PIIns, pPKK12PIIns, pPKK13PIIns, pPKK14PIIns, pPKK15PIIns, pPKK17PIIns, pPKK20PIIns, pPKK50PIIns, pPKK100PIIns, pPKK150PIIns, pPKK200PIIns, pPKK250PIIns, pPKK300PIIns, pPKK350PIIns, pPKK400PIIns, pPKK440PIInsを得た。挿入断片の塩基配列決定の結果、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。なお、塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）と3130 ジェネティックアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて行った。

[0110] (3) *Corynebacterium glutamicum* YDK010株における、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質N末端の1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 440アミノ酸残基を融合したプロインスリンの分泌発現

実施例1(1)で構築した成熟CspBのN末端アミノ酸残基を融合していないプロインスリンの分泌発現プラスミドであるpPKPIIns、および実施例1(2)構築した*C. glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質N末端の1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 440アミノ酸残基を融合したプロイ

ンスリンの分泌発現プラスミドであるpPKK1PIIns、pPKK2PIIns、pPKK3PIIns、pPKK4PIIns、pPKK5PIIns、pPKK6PIIns、pPKK7PIIns、pPKK8PIIns、pPKK9PIIns、pPKK10PIIns、pPKK11PIIns、pPKK12PIIns、pPKK13PIIns、pPKK14PIIns、pPKK15PIIns、pPKK17PIIns、pPKK20PIIns、pPKK50PIIns、pPKK100PIIns、pPKK150PIIns、pPKK200PIIns、pPKK250PIIns、pPKK300PIIns、pPKK350PIIns、pPKK400PIIns、pPKK440PIInsを用いて、W02004/029254に記載の*C. glutamicum* YDK010株を形質転換した。なお、*C. glutamicum* YDK010株は、*C. glutamicum* AJ12036(FERM BP-734)の細胞表層タンパク質PS2 (CspB) の欠損株である (W02004/029254)。得られた各形質転換体を、25 mg/lのカナマイシンを含むMM液体培地 (グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3g、硫酸アンモニウム 30g、リン酸二水素カリウム 1.5g、硫酸鉄七水和物 0.03g、硫酸マンガン四水和物 0.03g、チアミン塩酸塩 0.45mg、ビオチン 0.45mg、DL-メチオニン0.15g、および炭酸カルシウム 50gを水で1LにしてpH7.0に調整) で30 °C、72時間培養した。培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清10 µlを還元SDS-PAGEに供してからCBB R-250 (バイオラッド社製) にて染色を行った。その結果、CspBの成熟タンパク質のN末端アミノ酸を融合していないPIInsを発現するプラスミドpPKPIInsを導入した株では、目的とする分子量を有するタンパク質を示すバンドが肉眼で辛うじて確認できる程度に検出されたのに対して、CspBの成熟タンパク質のN末端アミノ酸を融合したPIInsを発現する各プラスミドを導入した株では、目的とする分子量を有するタンパク質を示すタンパク質バンドが濃く検出され、CspBの成熟タンパク質のN末端アミノ酸との融合により有意に分泌量が向上している事が確認された。この分泌量の向上効果は、特にCspBのN末端3~8残基、17残基、および50アミノ酸残基を融合させた場合において顕著であった (図1)。さらに、分泌量については、SDS-PAGEにて検出された目的の各タンパク質バンドについて、デンストメーターを用いた定量を行った。その結果、PIInsの分泌量は、成熟CspBのN末端アミノ酸を融合させていないPIInsを発現するpPKPIIns導入株に比べて、成熟CspBのN末端アミノ酸を融合させたPIInsを発現するプラスミドを導入したほぼ全ての株で1.5倍以上に増

加しており、特に成熟CspBのN末端4, 6, 17, 50アミノ酸残基を融合させたpPKK4PIIns, pPKK6PIIns, pPKK17PIIns, pPKK50PIIns導入株では10倍以上に増加していた(表1の「Secretion amount (%)」)。また、成熟CspBのN末端3~8アミノ酸残基を融合させた場合においても、PIInsの分泌量は5倍以上に増加していた(表1の「Secretion amount (%)」)。さらに、目的の各融合タンパク質の分子量を考慮して、分泌された分子数の相対値を算出した。その結果、PIInsの分泌量は、特に成熟CspBのN末端3~8, 17, および50アミノ酸残基を融合させた場合において顕著に増加している事が再確認された(表1の「Relative amount (%)」)。一方、これら分泌量の向上が確認された各融合タンパク質のN末端アミノ酸配列をプロテインシークエンサーPPSQ-21A(島津製作所製)で決定しようと試みたところ、いずれもN末端アミノ酸残基が決定されなかった事から、後述する結果を考慮し、これら融合タンパク質のN末端アミノ酸残基はピログルタミン酸残基に変換されている事が確認された。

[0111] [表1]

表1

株	分泌量 (%)	分子量	相対量 (%) *
YDK010/pPKPIIns	100.0	9394.5	100.0
YDK010/pPKK1PIIns	0.0	9522.7	0.0
YDK010/pPKK2PIIns	134.2	9651.9	130.6
YDK010/pPKK3PIIns	585.6	9752.9	584.1
YDK010/pPKK4PIIns	1459.3	9867.0	1388.6
YDK010/pPKK5PIIns	767.9	9964.1	724.0
YDK010/pPKK6PIIns	1188.3	10066.2	1108.1
YDK010/pPKK7PIIns	576.6	10212.4	530.4
YDK010/pPKK8PIIns	568.7	10326.5	517.3
YDK010/pPKK9PIIns	288.2	10439.6	269.3
YDK010/pPKK10PIIns	213.6	10553.7	190.2
YDK010/pPKK11PIIns	186.6	10667.8	164.4
YDK010/pPKK12PIIns	424.4	10724.9	371.6
YDK010/pPKK13PIIns	109.1	10872.0	94.2
YDK010/pPKK14PIIns	81.9	10986.1	70.0
YDK010/pPKK15PIIns	316.3	11101.2	267.7
YDK010/pPKK17PIIns	1456.6	11267.4	1212.2
YDK010/pPKK20PIIns	316.4	11532.6	267.7
YDK010/pPKK50PIIns	1705.1	15010.3	1067.2
YDK010/pPKK100PIIns	228.9	20296.9	186.0
YDK010/pPKK150PIIns	101.9	25739.9	37.2
YDK010/pPII250PIIns	626.8	36749.1	180.2

*相対量 (%) = 分泌量 (%) × 9394.5 / 分子量

[0112] 実施例 2 : 細胞表層タンパク質CspBホモログを有するCorynebacterium属細菌由来の各CspB成熟タンパク質のN末端6アミノ酸残基を融合させたプロインスリンの分泌発現

(1) 細胞表層タンパク質CspBホモログを有するCorynebacterium属細菌由来の各CspB成熟タンパク質のN末端6アミノ酸残基を融合させたプロインスリン分泌発現プラスミドの構築

Corynebacterium属細菌の中には細胞表層タンパク質CspBのホモログが存在する株と存在しない株があるが、28株のC. glutamicumについては、CspBホモログのアミノ酸配列が報告されている[非特許文献9 ; J Biotechnol., 112, 177-193(2004)]。この28株由来のCspBホモログのN末端アミノ酸配列を比較すると、シグナル配列30アミノ酸と、成熟タンパク質のN末端3アミノ酸残基 (Gln-Glu-Thr) は完全に保存されていた。さらに、CspBホモログの成熟タンパク質のN末端について6アミノ酸残基までを比較すると、Gln-Glu-Thr-Asn-Pro-Thr (以下、QETNPTともいう (配列番号97))、Gln-Glu-Thr-Gly-Thr-Tyr (以下、QETGTYともいう (配列番号98))、Gln-Glu-Thr-Thr-Val-Thr (以下、QETTVTともいう (配列番号99))、Gln-Glu-Thr-Pro-Val-Thr (以下、QETPVTともいう (配列番号100))、Gln-Glu-Thr-Ala-Val-Thr (以下、QETAVTともいう (配列番号101)) の5パターンに分類できることがわかった。一方、実施例1で用いたC. glutamicum ATCC13869の成熟CspBのN末端配列はQETNPT型である。そこで、他の4パターン (QETGTY型、QETTVT型、QETPVT型、QETAVT型) のアミノ酸を融合させたプロインスリン発現プラスミドを構築する目的で、実施例1(2)にて構築したpPKK6PInsを鋳型とし、それぞれ<配列番号12>と<配列番号42>、<配列番号12>と<配列番号43>、<配列番号12>と<配列番号44>、<配列番号12>と<配列番号45>に示した各合成DNAをプライマーとして、CspBプロモーター領域、およびCspBシグナルペプチド30アミノ酸残基をコードする領域に、さらに成熟CspBのN末端の6アミノ酸残基 (QETGTY、QETTVT、QETPVT、QETAVT) をコードする領域が付加された断片をPCR法にてそれぞれ増幅した。一方、実施例1(1)で構築したプラスミドpPKPInsを鋳型

とし、〈配列番号9〉と〈配列番号41〉に示した合成DNAをプライマーとして、PIns遺伝子領域をPCR法にて増幅し、PIns遺伝子断片を得た。

[0113] 更に増幅させた両DNA断片（CspBプロモーター領域、ならびにCspBシグナルペプチドおよび成熟CspBのN末端の6アミノ酸残基（それぞれQETGTY、QETT VT、QETPVT、QETA VT）をコードする領域の断片と、PIns遺伝子断片）を鋳型に、〈配列番号12〉と〈配列番号41〉に記載のDNAをプライマーとして用いたPCR法により、両DNA断片が融合したDNA断片を得た。なお、〈配列番号12〉と〈配列番号41〉のプライマーは制限酵素Kpn Iの認識配列がデザインされており、〈配列番号42〉～〈配列番号45〉のプライマーは、各CspB成熟タンパク質のN末端をコードする領域とPIns遺伝子との融合遺伝子を構築するためにPInsのN末端側のアミノ酸配列をコードする配列を含んでいる。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase（タカラバイオ社製）を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。これらのDNA断片を制限酵素Kpn I処理後に、特開平9-322774に記載のpPK4のKpn I部位に挿入することによって、それぞれpPK-QETGTY-PIn、pPK-QETT VT-PIns、pPK-QETPVT-PIns、pPK-QETA VT-PInsを得た。挿入断片の塩基配列決定の結果、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。なお、塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）と3130ジェネティックアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて行った。

[0114] (2) *Corynebacterium glutamicum* YDK010株における、細胞表層タンパク質CspBホモログを有する*Corynebacterium*属細菌由来の各CspB成熟タンパク質のN末端6アミノ酸残基を融合させたプロインスリンの分泌発現

実施例1(1)で構築した成熟CspBのN末端アミノ酸残基を融合していないプロインスリンの分泌発現プラスミドであるpPKPIns、実施例1(2)で構築した*C. glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質のN末端6アミノ酸残基(QETNPT)を融合したプロインスリンの分泌発現プラスミドであるpPKK6PIns、および実施例2(1)で構築した*Corynebacterium*属細菌由来の各CspBホモログの成熟タンパク質のN末端6アミノ酸残基(QETGTY

、QETT VT、QETPVT、QETA VT) を融合させたプロインスリン発現プラスミドであるpPK-QETGTY-PI ns、pPK-QETT VT-PI ns、pPK-QETPVT-PI ns、pPK-QETA VT-PI nsを用いて、W02004/029254に記載の*C. glutamicum* YDK010株を形質転換した。得られた各形質転換体を、25 mg/lのカナマイシンを含むMM液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3g、硫酸アンモニウム 30g、リン酸二水素カリウム 1.5g、硫酸鉄七水和物 0.03g、硫酸マンガン四水和物 0.03g、チアミン塩酸塩 0.45mg、ビオチン 0.45mg、DL-メチオニン0.15g、および炭酸カルシウム 50gを水で1LにしてpH7.0に調整）で30 °C、72時間培養した。培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清を還元SDS-PAGEに供してからCBB R-250（バイオラッド社製）にて染色を行った。その結果、pPK6PI nsを導入した株と同様に、pPK-QETGTY-PI ns、pPK-QETT VT-PI ns、pPK-QETPVT-PI ns、pPK-QETA VT-PI nsのいずれのプラスミドを導入した株においても、明確な目的の分子量を有する融合タンパク質バンドが検出され、成熟CspBのN末端アミノ酸を融合させていないPI nsを発現するpPKPI ns導入株に比べて、有意に分泌量が向上している事が確認された。さらに、分泌量については、SDS-PAGEにて検出された目的の各タンパク質バンドについて、デンストメーターを用いた定量を行った。その結果、PI nsの分泌量は、成熟CspBのN末端アミノ酸を融合させていないPI nsを発現するpPKPI ns導入株に比べて、成熟CspBのN末端アミノ酸を融合させたPI nsを発現するプラスミドを導入した全ての株で5倍以上に増加している事が確認された（表2）。一方、これら分泌量の向上が確認された各融合タンパク質のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーPPSQ-21A（島津製作所製）で決定しようと試みたところ、いずれもN末端アミノ酸残基が決定されなかった事から、後述する結果を考慮し、これら融合タンパク質のN末端アミノ酸残基はピログルタミン酸残基に変換されている事が確認された。

[0115]

[表2]

表 2

株	分泌量 (%)
YDK010/pPKPIns	100.0
YDK010/pPKK6PIns	811.0
YDK010/pPK-QETGTY-PIns	548.0
YDK010/pPK-QETTVT-PIns	809.6
YDK010/pPK-QETPVT-PIns	904.4
YDK010/pPK-QETA VT-PIns	586.4

[0116] 実施例 3 : CspB成熟タンパク質のN末端アミノ酸配列とプロインスリン配列との間にプロテアーゼ認識配列を挿入した融合プロインスリンの分泌発現

(1) CspB成熟タンパク質のN末端アミノ酸配列とプロインスリン配列との間にFactor XaプロテアーゼもしくはProTEVプロテアーゼの認識配列を挿入した融合プロインスリンの分泌発現プラスミドの構築

ある目的タンパク質を、当該目的タンパク質以外のアミノ酸配列と融合させた形で発現させる場合、目的タンパク質のアミノ酸配列と、融合させたアミノ酸配列との間に特定の基質特異性の高いプロテアーゼ認識配列を配位する事により、発現した融合タンパク質を特定のプロテアーゼで切断し、簡便に目的タンパク質を得る方法が広く知られている。一方、基質特異性の高いプロテアーゼとして、Factor XaプロテアーゼやProTEVプロテアーゼなどが知られており、それぞれタンパク質中のIle-Glu-Gly-Arg (=IEGR) (配列番号 105) およびGlu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln (=ENLYFQ) (配列番号 106) の配列を認識して各配列のC末端側を特異的に切断する。よって、例えば、CspB融合PInsにおいて、CspB成熟タンパク質のN末端アミノ酸残基をコードする塩基配列とプロインスリンをコードする塩基配列との間にFactor Xaプロテアーゼの認識配列 (IEGR) もしくはProTEVプロテアーゼの認識配列 (ENLYFQ) をコードする塩基配列を挿入した融合PIns遺伝子を構築し、融合PInsを分泌発

現させる事によって、これらのプロテアーゼを用いて、簡便に融合PIInsからPIInsを得る事が可能となる。

[0117] 実施例1(2)で構築したpPKK6PIInsを鋳型として、〈配列番号12〉と〈配列番号46〉、〈配列番号12〉と〈配列番号47〉に示した各合成DNAをプライマーとして、CspBプロモーター領域、ならびにCspBのN末端のシグナルペプチド30アミノ酸残基およびCspB成熟タンパク質のN末端6アミノ酸残基(QETNPT)をコードする領域に、さらにFactor Xaプロテアーゼにより認識されるIEGRまたはProTEVプロテアーゼにより認識されるENLYFQをコードする領域が付加された断片をPCR法にてそれぞれ増幅した。一方、実施例1(1)で構築したプラスミドpPKPIInsを鋳型とし、〈配列番号48〉と〈配列番号41〉、〈配列番号49〉と〈配列番号41〉に示した各合成DNAをプライマーとして、PIIns遺伝子領域をPCR法にて増幅し、PIIns遺伝子断片を得た。更に、増幅させた両DNA断片(CspBプロモーター領域、ならびにCspBシグナルペプチド、成熟CspBのN末端6アミノ酸残基(QETNPT)、およびIEGRまたはENLYFQをコードする領域の断片と、PIIns遺伝子断片)を鋳型に、〈配列番号12〉と〈配列番号41〉に記載のDNAをプライマーとして用いたPCR法により、両DNA断片が融合したDNA断片を得た。なお、〈配列番号12〉と〈配列番号41〉のプライマーは制限酵素Kpn Iの認識配列がデザインされており、〈配列番号46〉のプライマーはIEGRをコードする塩基配列とPIIns遺伝子との融合遺伝子を構築するためのPIInsのN末端側のアミノ酸配列をコードする配列がデザインされており、〈配列番号47〉のプライマーはENLYFQをコードする塩基配列とPIIns遺伝子との融合遺伝子を構築するためのPIInsのN末端側のアミノ酸配列をコードする配列がデザインされている。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(タカラバイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。これらのDNA断片を制限酵素Kpn I処理後に、特開平9-322774に記載のpPK4のKpn I部位に挿入することによって、それぞれpPKK6Xa-PIIns, pPKK6TEV-PIInsを得た。

[0118] 同様に、実施例1(2)で構築したpPKK17PIInsおよびpPKK50PIInsを鋳型として、〈配列番号12〉と〈配列番号50〉、〈配列番号12〉と〈配列番号51〉に示した

各合成DNAをプライマーとして、CspBプロモーター領域、ならびにCspBのN末端のシグナルペプチド30アミノ酸残基およびCspB成熟タンパク質のN末端17または50アミノ酸残基をコードする領域に、さらにFactor Xaプロテアーゼにより認識されるIEGRをコードする領域が付加された断片をPCR法にてそれぞれ増幅した。一方、実施例1(1)で構築したプラスミドpPKPInsを鋳型とし、〈配列番号48〉と〈配列番号41〉、〈配列番号49〉と〈配列番号41〉に示した各合成DNAをプライマーとして、PIns遺伝子領域をPCR法にて増幅し、PIns遺伝子断片を得た。更に、増幅させた両DNA断片(CspBプロモーター領域、ならびにCspBシグナルペプチド、成熟CspBのN末端17または50アミノ酸残基(QETNPT)、およびIEGRをコードする領域の断片と、PIns遺伝子断片)を鋳型に、〈配列番号12〉と〈配列番号41〉に記載のDNAをプライマーとして用いたPCR法により、両DNA断片が融合したDNA断片を得た。なお、〈配列番号12〉と〈配列番号41〉のプライマーは制限酵素Kpn Iの認識配列がデザインされており、〈配列番号50〉と〈配列番号51〉のプライマーはIEGRをコードする塩基配列とPIns遺伝子との融合遺伝子を構築するためのPInsのN末端側のアミノ酸配列をコードする配列がデザインされている。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(タカラバイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。これらのDNA断片を制限酵素Kpn I処理後に、特開平9-322774に記載のpPK4のKpn I部位に挿入することによって、それぞれpPKK17Xa-PIns, pPKK50Xa-PInsを得た。挿入断片の塩基配列決定の結果、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。なお、塩基配列の決定はBigDye(登録商標) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオシステムズ社製)と3130ジェネティックアナライザ(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて行った。

[0119] (2) *Corynebacterium glutamicum* YDK010株における、CspB成熟タンパク質のN末端アミノ酸配列とプロインスリン配列との間にFactor XaプロテアーゼもしくはproTEVプロテアーゼの認識配列を挿入した融合プロインスリンの分泌発現

実施例1(1)で構築した成熟CspBのN末端アミノ酸を融合していないプロ

インスリンの分泌発現プラスミドであるpPKPIns、実施例3(1)で構築したCspB成熟タンパク質のN末端アミノ酸残基(6, 17, 50アミノ酸残基)とプロインスリン配列との間にFactor Xaプロテアーゼの認識配列を挿入した融合プロインスリンの分泌発現プラスミドであるpPKK6Xa-PIns、pPKK17Xa-PIns、pPKK50Xa-PIns、および同じく実施例3(1)で構築したCspB成熟タンパク質のN末端アミノ酸残基(6アミノ酸残基)とプロインスリン配列との間にproTEVプロテアーゼの認識配列を挿入した融合プロインスリンの分泌発現プラスミドであるpPKK6TEV-PInsを用いて、W02004/029254に記載の*C. glutamicum* YDK 010株を形質転換した。得られた各形質転換体を、25 mg/lのカナマイシンを含むMM液体培地(グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3g、硫酸アンモニウム 30g、リン酸二水素カリウム 1.5g、硫酸鉄七水和物 0.03g、硫酸マンガン四水和物 0.03g、チアミン塩酸塩 0.45mg、ビオチン 0.45mg、DL-メチオニン0.15g、および炭酸カルシウム 50gを水で1LにしてpH7.0に調整)でそれぞれ30℃、72時間培養した。培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清を還元SDS-PAGEに供してからCBB R-250(バイオラッド社製)にて染色を行った。その結果、pPKK6Xa-PIns、pPKK17Xa-PIns、pPKK50Xa-PIns、pPKK6TEV-PInsのいずれのプラスミドを導入した株においても、目的の分子量を有する融合タンパク質バンドが検出され、成熟CspBのN末端アミノ酸を融合させていないPInsを発現するpPKPIns導入株に比べて、有意に分泌量が向上している事が確認された。さらに、デンストメーターを用いて分泌量を定量したところ、PInsの分泌量は、成熟CspBのN末端アミノ酸を融合させていないPInsを発現するpPKPIns導入株に比べて、成熟CspBのN末端アミノ酸とプロテアーゼ認識配列を融合させたPInsを発現するプラスミドを導入した全ての株で増加している事が確認され、CspB成熟タンパク質のN末端アミノ酸残基の直後にプロテアーゼ認識配列を融合させても目的タンパク質の分泌量が向上する事が明らかとなった(表3)。一方、これら分泌量の向上が確認された各融合タンパク質のN末端アミノ酸配列をプロテインシークエンサーPPSQ-21A(島津製作所製)で決定しようと試みたところ、いずれもN末端アミノ酸残基が

決定されなかった。さらに、このうちYDK010/pPKK6Xa-PIns株にて分泌生産された融合タンパク質を逆層HPLCにて分離精製後に質量分析計micrOTOF (Bruker Daltonics社製)にて分子量を決定した結果、理論分子量10514.69に対して測定値が10497となり、水分子相当の質量(約18)が減少している事が判明した。また、YDK010/pPKK6TEV-PIns株にて分泌生産された融合タンパク質について同様に質量分析計AXIMA-TOF2(島津製作所製)にて分子量を決定した結果、理論分子量の10854.02に対して測定値が10836.89となり、やはり水分子相当の質量(約18)が減少していた。これらと後述する結果から、これら融合タンパク質のN末端アミノ酸残基はピログルタミン酸残基に変換されている事が確認された。

[0120] [表3]

表3

株	分泌量 (%)	分子量	相対量 (%) *
YDK010/pPKPIns	100.0	9394.5	100.0
YDK010/pPKK6Xa-PIns	2271.5	10538.7	2024.8
YDK010/pPKK17Xa-PIns	782.4	11780.9	835.0
YDK010/pPKK50Xa-PIns	545.5	15483.9	330.9
YDK010/pPKK6TEV-PIns	395.3	10878.0	288.5

*相対量 (%) = 分泌量 (%) × 9394.5 / 分子量

[0121] (3) CspB成熟タンパク質のN末端アミノ酸配列とプロインスリン配列との間にFactor XaプロテアーゼもしくはProTEVプロテアーゼの認識配列を挿入したCspB融合プロインスリンの各プロテアーゼによる切断

実施例3(2)で得られたYDK010/pPKK6Xa-PIns、YDK010/pPKK17Xa-PIns、YDK010/pPKK50Xa-PInsの各培養液を遠心分離して得られた培養上清を基質として、Factor Xaプロテアーゼ(Novagen社製)を用いて、業者の推奨するプロトコルに従って切断反応を行い、反応後の溶液を還元SDS-PAGEに供してからCBB R-250(バイオラッド社製)にて染色を行った。その結果、いずれの株においても目的のPIInsと同じ分子量を有するタンパク質バンドが検出された。これらのタンパク質バンドのN末端アミノ酸配列を、プロテインシーケン

サーPPSQ-21A（島津製作所製）を用いて決定したところ、いずれもPIInsのN末端配列が確認出来たことから、融合させたペプチドがFactor Xaプロテアーゼにより切断され目的のPIInsが生成している事が確認出来た。

[0122] 一方、同じく実施例3（2）で得られたYDK010/pPKK6TEV-PIInsの培養液を遠心分離して得られた培養上清を基質として、ProTEV プロテアーゼ（Promega社）を用いて、業者の推奨するプロトコルに従って切断反応を行い、反応後の溶液を還元SDS-PAGEに供してからCBB R-250（バイオラッド社製）にて染色を行った。その結果、目的のPIInsと同じ分子量を有するタンパク質バンドが検出された。このタンパク質バンドのN末端アミノ酸配列を、プロテインシーケンサーPPSQ-21A（島津製作所製）を用いて決定したところ、PIInsのN末端配列が確認出来たことから、融合させたペプチドがProTEV プロテアーゼにより切断され目的のPIInsが生成している事が確認出来た。

[0123] 実施例4：Corynebacterium glutamicum ATCC13869の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質のN末端アミノ酸残基を融合したヒト成長ホルモンhGHの分泌発現

（1）ヒト成長ホルモンhGH遺伝子の全合成とCorynebacterium glutamicumにおけるヒト成長ホルモンhGH分泌発現プラスミドの構築

ヒト成長ホルモン（human growth hormone；hGH）のアミノ酸配列は既に決定されている（Genbank Accession No. CAA23779.1）。この配列のうちN末端のシグナル配列26残基を除いた成熟型hGHのアミノ酸配列とC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して、〈配列番号52〉～〈配列番号65〉に示したDNAを合成した。これらのDNAを鋳型とし、別途合成した〈配列番号66〉と〈配列番号67〉に示したDNAをプライマーとして用いて、hGH遺伝子をPCR法によって増幅し、〈配列番号68〉に記した約0.6kbpのDNA断片を得た。このDNA断片をクローニングベクターpHSG398（タカラバイオ社製）のSmaI部位に挿入する事によりpHSG-hGHを得た。このpHSG-hGHを鋳型にして、〈配列番号66〉と〈配列番号67〉に示したDNAをプライマーとして用いて、hGH遺伝子領域をPCR法によって増幅し、約0.6kbpのhGH遺伝子断片を得た。次にW001/23591記載のpPKSPTG1（pPKSPTG1は

、プロトランスグルタミナーゼ（プロ構造部付きトランスグルタミナーゼ）の分泌発現用ベクターであって、*C. glutamicum* ATCC13869株由来の*cspB*遺伝子のプロモーター、同プロモーターの下流に発現可能に連結された*C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872株由来の*CspA* (SlpA) <Genbank Accession No. BAB62413.1>のシグナルペプチド25アミノ酸残基をコードするDNA、および同シグナルペプチドをコードするDNAの下流に同シグナルペプチドとの融合タンパク質として発現するよう連結された*S. mobaraense*由来のプロトランスグルタミナーゼ遺伝子を有する）、およびW001/23591記載のpPKPTG1 (*C. glutamicum* ATCC13869株由来の*CspB*のプロモーター領域とシグナルペプチドをコードするDNAを含む)を鋳型として、<配列番号12>と<配列番号69>、または<配列番号12>と<配列番号70>に示したプライマーを用いて、*C. glutamicum* ATCC13869由来*CspB*のプロモーター領域、および*C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872株由来*CspA*または*C. glutamicum* ATCC13869株由来*CspB*のシグナルペプチドをコードする領域をPCR法にて増幅し、それぞれ約0.7kbpのDNA断片を得た。更に、増幅させた両DNA断片（hGH遺伝子断片と、*CspB*プロモーター領域および各シグナルペプチドをコードする領域の断片）を鋳型に、<配列番号12>と<配列番号67>に記載のDNAをプライマーとして用いたPCR法により、両DNA断片が融合したそれぞれ約1.2kbpのDNA断片を得た。なお、<配列番号12>と<配列番号67>のプライマーには制限酵素Kpn Iの認識配列がデザインされており、<配列番号69>、<配列番号70>の各プライマーは各シグナルペプチドをコードする領域とhGH遺伝子との融合遺伝子を構築するためのhGHのN末端アミノ酸残基をコードする配列がデザインされている。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase（タカラバイオ社製）を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。これらのDNA断片を制限酵素Kpn I処理後に、特開平9-322774に記載のpPK4のKpn I部位に挿入することによって、それぞれpPS-hGH、pPK-hGHを得た。挿入断片の塩基配列決定の結果、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。なお、全ての塩基配列の決定はBigDye（登録商標） Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社

製)と3130 ジェネティックアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて行った。

[0124] (2) *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869の細胞表面タンパク質CspBのシグナルペプチドおよび成熟タンパク質N末端アミノ酸残基、ならびにFactor Xaプロテアーゼ認識配列を融合したヒト成長ホルモンhGHの分泌発現プラスミドの構築

実施例3(1)で構築したpPKK6Xa-PIns、pPKK17Xa-PIns、pPKK50Xa-PInsのそれぞれを鋳型として、〈配列番号12〉と〈配列番号71〉、〈配列番号12〉と〈配列番号72〉、〈配列番号12〉と〈配列番号73〉のそれぞれに示した各合成DNAをプライマーとして、CspBプロモーター領域、ならびにCspBのN末端のシグナルペプチド30アミノ酸残基、CspB成熟タンパク質のN末端アミノ酸残基(6、17、50残基)、およびFactor Xaプロテアーゼ認識配列(IEGR)をコードする領域をPCR法にて増幅した。一方、実施例4(1)で構築したプラスミドpPS-hGHを鋳型とし、〈配列番号66〉と〈配列番号67〉に示した合成DNAをプライマーとして、hGH遺伝子領域をPCR法にて増幅した。更に、増幅させた両DNA断片(CspBプロモーター領域、ならびにCspBシグナルペプチド、成熟CspBのN末端アミノ酸残基、およびIEGRをコードする領域の各断片と、hGH遺伝子断片)を鋳型に、〈配列番号12〉と〈配列番号67〉に記載のDNAをプライマーとして用いたPCR法により、両DNA断片が融合したDNA断片を得た。なお、〈配列番号12〉と〈配列番号67〉のプライマーは制限酵素Kpn Iの認識配列がデザインされており、〈配列番号71〉、〈配列番号72〉、〈配列番号73〉の各プライマーはFactor Xaプロテアーゼ認識配列(IEGR)をコードする領域とhGH遺伝子との融合遺伝子を構築するためのhGHのN末端アミノ酸残基をコードする配列がデザインされている。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(タカラバイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。これらのDNA断片を制限酵素Kpn I処理後に、特開平9-322774に記載のpPK4のKpn I部位に挿入することによって、それぞれpPKK6Xa-hGH、pPKK17Xa-hGH、pPKK50Xa-hGHを得た。

[0125] (3) *Corynebacterium ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872の細胞表面

タンパク質CspAのシグナルペプチド、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質N末端アミノ酸残基、およびFactor Xaプロテアーゼ認識配列を融合したヒト成長ホルモンhGHの分泌発現プラスミドの構築 W001/23591に記載のpPKSPTG1を鋳型として、〈配列番号12〉と〈配列番号74〉に示した各合成DNAをプライマーとして、CspBプロモーター領域と、*C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872由来CspAのN末端のシグナルペプチド25アミノ酸残基をコードする領域をPCR法にて増幅した。一方、実施例4(2)で構築したプラスミドpPKK6Xa-hGHを鋳型とし、〈配列番号75〉と〈配列番号67〉に示した合成DNAをプライマーとして、CspB成熟タンパク質のN末端6アミノ酸残基(QETNPT)およびFactor Xaプロテアーゼの認識配列(IEGR)をコードする領域とhGH遺伝子領域をPCR法にて増幅した。更に、増幅させた両DNA断片(CspBプロモーター領域およびCspAシグナルペプチドをコードする領域の断片と、CspBのN末端アミノ酸残基およびIEGRをコードする領域ならびにhGH遺伝子の断片)を鋳型に、〈配列番号12〉と〈配列番号67〉に記載のDNAをプライマーとして用いたPCR法により、両DNA断片が融合したDNA断片を得た。なお、〈配列番号12〉と〈配列番号67〉のプライマーは制限酵素Kpn Iの認識配列がデザインされており、〈配列番号74〉のプライマーはCspAシグナルペプチドをコードする領域とCspB成熟タンパク質のN末端アミノ酸残基をコードする配列との融合遺伝子を構築するためのCspB成熟タンパク質のN末端アミノ酸残基をコードする配列がデザインされている。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(タカラバイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。これらのDNA断片を制限酵素Kpn I処理後に、特開平9-322774に記載のpPK4のKpn I部位に挿入することによって、pPSK6Xa-hGHを得た。

[0126] また、W001/23591に記載のpPKSPTG1を鋳型として、〈配列番号12〉と〈配列番号76〉に示した各合成DNAをプライマーとして、CspBプロモーター領域と、*C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872由来CspAのN末端のシグナルペプチド25アミノ酸残基をコードする領域をPCR法にて増幅した。一方、実施例4(2)で構築したプラスミドpPKK17Xa-hGH、pPKK50Xa-hGHのそれぞれを鋳型とし、〈

配列番号75>と<配列番号67>に示した合成DNAをプライマーとしてCspB成熟タンパク質のN末端17または50アミノ酸残基およびFactor Xaプロテアーゼの認識配列 (IEGR) をコードする領域とhGH遺伝子領域をPCR法にて増幅した。更に、増幅させた両DNA断片 (CspBプロモーター領域およびCspAシグナルペプチドをコードする領域の断片と、CspBのN末端アミノ酸残基およびIEGRをコードする領域ならびにhGH遺伝子の断片) を鋳型に、<配列番号12>と<配列番号67>に記載のDNAをプライマーとして用いたPCR法により、両DNA断片が融合したDNA断片を得た。なお、<配列番号12>と<配列番号67>のプライマーは制限酵素Kpn Iの認識配列がデザインされており、<配列番号76>のプライマーはCspAシグナルペプチドをコードする領域とCspB成熟タンパク質のN末端アミノ酸残基をコードする配列との融合遺伝子を構築するためのCspB成熟タンパク質のN末端アミノ酸残基をコードする配列がデザインされている。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase (タカラバイオ社製) を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。これらのDNA断片を制限酵素Kpn I処理後に、特開平9-322774に記載のpPK4のKpn I部位に挿入することによって、それぞれpPSK17Xa-hGH, pPSK50Xa-hGHを得た。

[0127] (4) *Corynebacterium glutamicum* YDK010株における、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質N末端アミノ酸残基を融合したヒト成長ホルモンhGHの分泌発現

実施例4 (1) で構築した*C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872のCspAのシグナル配列もしくは*C. glutamicum* ATCC13869のCspBのシグナル配列をそれぞれ用いたヒト成長ホルモンhGHの分泌発現プラスミドであるpPS-hGHとpPK-hGH、実施例4 (2) で構築した*C. glutamicum* ATCC13869のCspBのシグナル配列に接続したCspBの成熟タンパク質N末端アミノ酸残基を融合したhGHの分泌発現プラスミドであるpPKK6Xa-hGH、pPKK17Xa-hGH、pPKK50Xa-hGH、および実施例4 (3) で構築した*C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872のCspAのシグナル配列に接続したCspBの成熟タンパク質N末端アミノ酸残基を融合したhGHの分泌発現プラスミドであるpPSK6Xa-hGH、pPSK17Xa-hGH、pPSK50Xa-

hGHを用いて、W02004/029254に記載の*C. glutamicum* YDK010株を形質転換した。得られた各形質転換体を、25 mg/lのカナマイシンを含むMM液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3g、硫酸アンモニウム 30g、リン酸二水素カリウム 1.5g、硫酸鉄七水和物 0.03g、硫酸マンガン四水和物 0.03g、チアミン塩酸塩 0.45mg、ビオチン 0.45mg、DL-メチオニン0.15g、および炭酸カルシウム 50gを水で1LにしてpH7.0に調整）で30 °C、72時間培養した。培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清を還元SDS-PAGEに供してからCBB R-250（バイオラッド社製）にて染色を行った。その結果、pPS-hGHならびにpPK-hGHを有する株では目的のタンパク質バンドが検出されなかったが、成熟CspBのN末端アミノ酸残基との融合hGH発現プラスミドであるpPKK6Xa-hGH, pPKK17Xa-hGH, pPKK50Xa-hGH, pPSK6Xa-hGH, pPSK17Xa-hGH, pPSK50Xa-hGHを有する YDK010株では、シグナル配列の違いに因らずに、いずれも目的の融合タンパク質のタンパク質バンドを検出する事ができた（図2、図3）。さらに、これら分泌量の向上が確認された各融合タンパク質のN末端アミノ酸残基配列をプロテインシークエンサーPPSQ-21A（島津製作所製）で決定しようと試みたところ、いずれもN末端アミノ酸残基が決定されなかった事から、後述する結果を考慮し、これら融合タンパク質のN末端アミノ酸残基残基はピログルタミン酸残基に変換されている事が確認された。

[0128] (5) *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032および*Corynebacterium ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872における、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質N末端アミノ酸残基を融合したヒト成長ホルモンhGHの分泌発現

実施例4(1)で構築した*C. glutamicum* ATCC13869のCspBのシグナル配列を用いたヒト成長ホルモンhGHの分泌発現プラスミドであるpPK-hGH、および実施例4(2)で構築した*C. glutamicum* ATCC13869のCspBのシグナル配列に接続したCspBの成熟タンパク質N末端アミノ酸残基を融合したhGHの分泌発現プラスミドであるpPKK6Xa-hGHを用いて、*C. glutamicum* ATCC13869株および*C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872株を形質転換した。得られた各形

質転換体を、25 mg/lのカナマイシンを含むMM液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3g、硫酸アンモニウム 30g、リン酸二水素カリウム 1.5g、硫酸鉄七水和物 0.03g、硫酸マンガン四水和物 0.03g、チアミン塩酸塩 0.45mg、ビオチン 0.45mg、DL-メチオニン0.15g、および炭酸カルシウム 50gを水で1LにしてpH7.0に調整）でそれぞれ30 °C、72時間培養した。培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清を還元SDS-PAGEに供してからCBB R-250（バイオラッド社製）にて染色を行った。その結果、pPK-hGHを有する株では目的のタンパク質バンドが検出されなかったが、成熟CspBのN末端6アミノ酸残基との融合hGH発現プラスミドであるpPKK6Xa-hGHを有する株では、いずれの株においても目的の融合タンパク質のタンパク質バンドを検出する事ができた（図4）。さらに、これら分泌量の向上が確認された各融合タンパク質のN末端アミノ酸残基配列をプロテインシークエンサーPPSQ-21A（島津製作所製）で決定しようとして試みたところ、いずれもN末端アミノ酸残基が決定されなかった事から、後述する結果を考慮し、これら融合タンパク質のN末端アミノ酸残基残基はピログルタミン酸残基に変換されている事が確認された。

[0129] (6) *Corynebacterium ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872の細胞表層タンパク質CspAの成熟タンパク質N末端アミノ酸残基を融合したヒト成長ホルモンhGHの分泌発現プラスミドの構築と*Corynebacterium glutamicum* YDK010株における分泌発現

C. ammoniagenes (*C. stationis*) ATCC6872の主要な細胞表層タンパク質であるCspAのアミノ酸配列は既に決定されている（Genbank Accession No. BAB62413.1）。実施例4（3）で構築したpPSK6Xa-hGHを鋳型として、〈配列番号12〉と〈配列番号77〉に示した合成DNAをプライマーとして、CspBプロモーター領域と、*C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872由来CspAのN末端のシグナルペプチド25アミノ酸残基をコードする領域をPCR法にて増幅した。一方、実施例4（1）で構築したプラスミドpPS-hGHを鋳型とし、〈配列番号78〉と〈配列番号67〉に示した合成DNAをプライマーとしてhGH遺伝子領域をPCR法にて

増幅した。更に、増幅させた両DNA断片（CspBプロモーター領域およびCspAシグナルペプチドをコードする領域の断片と、hGH遺伝子断片）を鋳型に、〈配列番号12〉と〈配列番号67〉に記載のDNAをプライマーとして用いたPCR法により、両DNA断片が融合したDNA断片を得た。なお、〈配列番号12〉と〈配列番号67〉のプライマーは制限酵素Kpn Iの認識配列がデザインされている。また、〈配列番号77〉と〈配列番号78〉のプライマーは融合遺伝子を構築するための配列として*C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872のCspA成熟タンパク質のN末端配列6アミノ酸残基をコードする配列がデザインされており、得られた融合DNA断片においては、CspAシグナルペプチドをコードする領域とhGH遺伝子との間にCspA成熟タンパク質のN末端配列6アミノ酸残基をコードする配列が挿入されている。なお、CspA成熟タンパク質のN末端6アミノ酸残基のアミノ酸配列は、Ala-Glu-Lys-Thr-Pro-Ala (AEKTPA)（配列番号107）であり、Gln-Glu-Thr (QET) を含まない。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase（タカラバイオ社製）を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。これらのDNA断片を制限酵素Kpn I処理後に、特開平9-322774に記載のpPK4のKpn I部位に挿入することによって、pSS6-hGHを得た。

[0130] 次に、構築した*C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872のCspAの成熟タンパク質N末端6アミノ酸残基を融合したヒト成長ホルモンhGHの分泌発現プラスミドであるpSS6-hGHを用いて、W02004/029254に記載の*C. glutamicum* YDK 010株を形質転換した。得られた各形質転換体を、25 mg/lのカナマイシンを含むMM液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3g、硫酸アンモニウム 30g、リン酸二水素カリウム 1.5g、硫酸鉄七水和物 0.03g、硫酸マンガン四水和物 0.03g、チアミン塩酸塩 0.45mg、ビオチン 0.45mg、DL-メチオニン0.15g、および炭酸カルシウム 50gを水で1LにしてpH7.0に調整）でそれぞれ30 °C、72時間培養した。培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清を還元SDS-PAGEに供してからCBB R-250（バイオラッド社製）にて染色を行った。その結果、pSS6-hGHを有する株において目的のタンパク質バンドが検出されなかった。

[0131] 実施例5 : *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質のN末端アミノ酸残基を融合したインスリン様成長因子hIGF-1の分泌発現

(1) *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質N末端アミノ酸残基を融合したインスリン様成長因子hIGF-1の分泌発現プラスミドの構築

ヒトインスリン様成長因子 (human insulin-like growth factor-1 ; hIGF-1) のアミノ酸配列は既に決定されている (J Biol Chem, 1978, 253(8): p.2769-76) 。このhIGF-1のアミノ酸配列と*C. glutamicum*のcodon使用頻度を考慮して構築されたhIGF-1遺伝子が搭載された特開2008-271973記載のプラスミドpPSIGFmを鋳型とし、〈配列番号79〉と〈配列番号80〉に示した合成DNAをプライマーとして、hIGF-1遺伝子領域をPCR法にて増幅した。次に実施例1 (2) で構築したpPKK6PIInsを鋳型として、〈配列番号12〉と〈配列番号81〉に示した各合成DNAをプライマーとして、CspBプロモーター領域、ならびにCspBのN末端のシグナルペプチド30アミノ酸残基およびCspB成熟タンパク質のN末端6アミノ酸残基をコードする領域をPCR法にて増幅した。更に、増幅させた両DNA断片 (hIGF-1遺伝子断片と、CspBプロモーター領域、ならびにCspBシグナルペプチドおよびCspBのN末端アミノ酸配列6残基をコードする領域の断片) を鋳型に、〈配列番号12〉と〈配列番号80〉に記載のDNAをプライマーとして用いたPCR法により、両DNA断片が融合したDNA断片を得た。なお、〈配列番号12〉と〈配列番号80〉のプライマーは制限酵素Kpn Iの認識配列がデザインされており、〈配列番号79〉と〈配列番号81〉のプライマーはCspB成熟タンパク質のN末端6アミノ酸残基をコードする配列とhIGF-1遺伝子との融合遺伝子を構築するための成熟CspBのN末端アミノ酸残基をコードする配列とhIGF-1のN末端アミノ酸残基をコードする配列がそれぞれデザインされている。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase (タカラバイオ社製) を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。これらのDNA断片を制限酵素Kpn I処理後に、特開平9-32274に記載のpPK4のKpn I部位に挿入することによって、pPKK6IGFmを得た。

[0132] 同様に、実施例4(3)で構築したpPSK6Xa-hGHを鋳型として、〈配列番号12〉と〈配列番号81〉に示した各合成DNAをプライマーとして、*C. glutamicum* ATCC13869のCspBプロモーター領域、ならびに*C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872のCspAのN末端のシグナルペプチド25アミノ酸残基および*C. glutamicum* ATCC13869のCspBの成熟タンパク質のN末端側6アミノ酸残基をコードする領域をPCR法にて増幅した。一方、特開2008-271973記載のプラスミドpPSIGFmを鋳型とし、〈配列番号79〉と〈配列番号80〉に示した合成DNAをプライマーとして、hIGF-1遺伝子領域をPCR法にて増幅した。

[0133] 更に、増幅させた両DNA断片(CspBプロモーター領域、ならびにCspBシグナルペプチドおよび成熟CspBのN末端6アミノ酸残基をコードする領域の断片と、hIGF-1遺伝子断片)を鋳型に、〈配列番号12〉と〈配列番号80〉に記載のDNAをプライマーとして用いたPCR法により、両DNA断片が融合したDNA断片を得た。なお、〈配列番号12〉と〈配列番号80〉のプライマーは制限酵素Kpn Iの認識配列がデザインされており、〈配列番号79〉と〈配列番号81〉のプライマーはCspB成熟タンパク質のN末端6アミノ酸残基をコードする配列とhIGF-1遺伝子との融合遺伝子を構築するための成熟CspBのN末端アミノ酸残基をコードする配列とhIGF-1のN末端アミノ酸残基をコードする配列がそれぞれデザインされている。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(タカラバイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。これらのDNA断片を制限酵素Kpn I処理後に、特開平9-322774に記載のpPK4のKpn I部位に挿入することによって、pPSK6IGFmを得た。挿入断片の塩基配列決定の結果、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。なお、塩基配列の決定はBigDye(登録商標) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオシステムズ社製)と3130ジェネティックアナライザ(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて行った。

[0134] (2) *Corynebacterium glutamicum* YDK010株における、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質N末端アミノ酸残基を融合したインスリン様成長因子hIGF-1の分泌発現

特開2008-271973 記載のインスリン様成長因子hIGF-1の分泌発現プラスミドであるpPSIGFmならびに、実施例5(1)で構築したCspBの成熟タンパク質N末端アミノ酸残基を融合したhIGF-1の分泌発現プラスミドであるpPKK6IGFm、pPSK6IGFmを用いて、W02004/029254に記載の*C. glutamicum* YDK010株を形質転換した。得られた各形質転換体を、25 mg/lのカナマイシンを含むMM液体培地(グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3g、硫酸アンモニウム 30g、リン酸二水素カリウム 1.5g、硫酸鉄七水和物 0.03g、硫酸マンガン四水和物 0.03g、チアミン塩酸塩 0.45mg、ビオチン 0.45mg、DL-メチオニン0.15g、および炭酸カルシウム 50gを水で1LにしてpH7.0に調整)でそれぞれ30℃、72時間培養した。培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清を還元SDS-PAGEに供してからCBB R-250(バイオラッド社製)にて染色を行った。その結果、pPKK6IGFm、pPSK6IGFmいずれのプラスミドを導入した株においても、明確な目的の分子量を有する融合タンパク質バンドが検出され、成熟CspBのN末端アミノ酸を融合させていないhIGF-1を発現するpPSIGFm導入株に比べて、有意に分泌量が向上している事が確認された。さらに、デンストメーターを用いて分泌量を定量したところ、hIGF-1の分泌量は、pPSIGFm導入株に比べて、成熟CspBのN末端アミノ酸を融合させたhIGF-1を発現するpPKK6IGFm、pPSK6IGFmいずれのプラスミドを導入した株でも増加している事が確認された(表4)。さらに、これら分泌量の向上が確認された各融合タンパク質のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーPPSQ-21A(島津製作所製)で決定しようと試みたところ、いずれもN末端アミノ酸残基が決定されなかった事から、後述する結果を考慮し、これら融合タンパク質のN末端アミノ酸残基はピログルタミン酸残基に変換されている事が確認された。

[0135]

[表4]

表 4

株	分泌量 (%)
YDKQ10/pPSIGFm	100.0
YDKQ10/pPKIGIGFm	431.6
YDKQ10/pPSKIGIGFm	294.6

[0136] 実施例 6 : *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質のN末端アミノ酸残基を融合した生理活性ペプチドTeriparatideの分泌発現

(1) 生理活性ペプチドTeriparatideの全合成と*Corynebacterium glutamicum*における生理活性ペプチドTeriparatide分泌発現プラスミドの構築

ヒトの副甲状腺ホルモンPTHの成熟体のアミノ酸配列は既に決定されている (Genbank Accession No. AAA60215.1)。このヒトの副甲状腺ホルモンPTHのN末端1-34残基までのペプチドは、骨粗鬆薬としての生理活性を有するペプチドTeriparatideとして知られている。このTeriparatideのアミノ酸配列と*C. glutamicum*のコドン使用頻度を考慮して、〈配列番号82〉と〈配列番号83〉に示したDNAを合成した。このDNAを鋳型とし、別途合成した〈配列番号84〉と〈配列番号85〉に示したDNAをプライマーとして用いて、〈配列番号86〉に記したTeriparatide遺伝子をPCR法によって増幅した。このDNA断片をクローニングベクターpHSG398 (タカラバイオ社製) のSma I部位に挿入する事によりpHSG-Teriを得た。このpHSG-Teriを鋳型にして、〈配列番号84〉と〈配列番号85〉に示したDNAをプライマーとして用いて、Teriparatide遺伝子領域をPCR法によって増幅した。次にW001-23591記載のpPKSPTG1 (*C. glutamicum* ATCC13869株由来のCspBのプロモーター領域と、*C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872株由来のCspA (SlpA) シグナルペプチドをコードするDNAを含む)、およびW001/23591記載のpPKPTG1 (*C. glutamicum* ATCC13869株由来のCspBのプロモーター領

域とシグナルペプチドをコードするDNAを含む)を鋳型として、〈配列番号12〉と〈配列番号87〉もしくは〈配列番号12〉と〈配列番号88〉に示したプライマーを用いて、*C. glutamicum* ATCC13869由来CspBのプロモーター領域、および*C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872株由来CspAまたは*C. glutamicum* ATCC13869株由来CspBのシグナルペプチドをコードする領域をPCR法にて増幅した。更に、増幅させた両DNA断片 (Teriparatide遺伝子断片と、CspBプロモーター領域および各シグナルペプチドをコードする領域の断片)を鋳型に、〈配列番号12〉と〈配列番号85〉に記載のDNAをプライマーとして用いたPCR法により、両DNA断片が融合したそれぞれ約0.8kbpのDNA断片を得た。なお、〈配列番号12〉と〈配列番号85〉のプライマーには制限酵素Kpn Iの認識配列がデザインされており、〈配列番号87〉と〈配列番号88〉の各プライマーは各シグナルペプチドをコードする領域とTeriparatide遺伝子との融合遺伝子を構築するためのTeriparatideのN末端アミノ酸残基をコードする配列がデザインされている。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。これらのDNA断片を制限酵素Kpn I処理後に、特開平9-322774に記載のpPK4のKpn I部位に挿入することによって、それぞれpPS-Teri, pPK-Teriを得た。

[0137] 次に、上記pHSG-Teriを鋳型にして、〈配列番号89〉と〈配列番号85〉に示したDNAをプライマーとして用いて、Teriparatide遺伝子領域をPCR法によって増幅した。また、実施例4(2)で構築したpPKK6Xa-hGHを鋳型として、〈配列番号12〉と〈配列番号90〉、に示したプライマーを用いて、CspBプロモーター領域、ならびにCspBのN末端のシグナルペプチド30アミノ酸残基、CspB成熟タンパク質のN末端6アミノ酸残基、およびFactor Xaプロテアーゼ認識配列 (IEGR)をコードする領域をPCR法にて増幅した。更に、増幅させた両DNA断片 (Teriparatide遺伝子断片と、CspBプロモーター領域、ならびにCspBシグナルペプチド、CspB成熟タンパク質のN末端6アミノ酸残基、およびIEGRをコードする領域の断片)を鋳型に、〈配列番号12〉と〈配列番号85〉に記載のDNAをプライマーとして用いたPCR法により、両DNA断片が融合した約0.8kbpのDNA断片を得た

。なお、〈配列番号12〉と〈配列番号85〉のプライマーには制限酵素Kpn Iの認識配列がデザインされており、〈配列番号89〉のプライマーはFactor Xaプロテアーゼ認識配列 (IEGR) をコードする領域とTeriparatide遺伝子との融合遺伝子を構築するためのFactor Xaプロテアーゼ認識配列 (IEGR) をコードする配列がデザインされている。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase (タカラバイオ社製) を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。これらのDNA断片を制限酵素Kpn I処理後に、特開平9-322774に記載のpPK4のKpn I部位に挿入することによって、pPKK6Xa-Teriを得た。挿入断片の塩基配列決定の結果、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。なお、全ての塩基配列の決定はBigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) と3130 ジェネティックアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて行った。

[0138] (2) *Corynebacterium glutamicum* YDK010株における、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質CspBの成熟タンパク質のN末端アミノ酸残基を融合した生理活性ペプチドTeriparatideの分泌発現

実施例6(1)で構築した*C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872のCspAのシグナル配列もしくは*C. glutamicum* ATCC13032のCspBのシグナル配列をそれぞれ用いた生理活性ペプチドTeriparatideの分泌発現プラスミドであるpPS-TeriとpPK-Teri、および実施例6(1)で構築した*C. glutamicum* ATCC13032のCspBのシグナル配列に接続したCspBの成熟タンパク質N末端アミノ酸6残基を融合したTeriparatideの分泌発現プラスミドであるpPKK6Xa-Teriを用いて、W02004/029254に記載の*C. glutamicum* YDK010株を形質転換した。得られた各形質転換体を、25 mg/lのカナマイシンを含むMM液体培地 (グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3g、硫酸アンモニウム 30g、リン酸二水素カリウム 1.5g、硫酸鉄七水和物 0.03g、硫酸マンガン四水和物 0.03g、チアミン塩酸塩 0.45mg、ビオチン 0.45mg、DL-メチオニン0.15g、および炭酸カルシウム 50gを水で1LにしてpH7.0に調整) でそれぞれ30 °C、72時間培養した。培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清を還元SDS-PAGE

に供してからCBB R-250（バイオラッド社製）にて染色を行った。その結果、pPS-TeriならびにpPK-Teriを有する株では目的のタンパク質バンドが検出されなかったが、CspBのN末端残基との融合Teriparatide発現プラスミドであるpPKK6Xa-Teriを有する YDK010株では、目的の融合タンパク質のタンパク質バンドを検出する事ができた（図5）。さらに、分泌量の向上が確認された融合タンパク質のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーPPSQ-21A（島津製作所製）で決定しようと試みたところ、N末端アミノ酸残基が決定されなかったが、ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ処理を行った後にプロテインシーケンサーPPSQ-21A（島津製作所製）を用いてN末端アミノ酸配列を決定したところ、目的の融合タンパク質の2番目以降のN末端アミノ酸配列が解読できたことから、培養上清中に、N末端アミノ酸残基がピログルタミル化された目的の融合Teriparatideが分泌発現している事が確認出来た。

産業上の利用可能性

[0139] 本発明により、異種タンパク質、例えば産業上有用なタンパク質、を効率よく分泌生産することができる。

[0140] 〔配列表の説明〕

配列番号1～8：プロインスリン全合成用DNAの塩基配列

配列番号9、10：プライマー

配列番号11：プロインスリン遺伝子の塩基配列

配列番号12～51：プライマー

配列番号52～65：ヒト成長ホルモンhGH全合成用DNAの塩基配列

配列番号66、67：プライマー

配列番号68：hGH遺伝子の塩基配列

配列番号69～85：プライマー

配列番号86：Teriparatide遺伝子の塩基配列

配列番号87～90：プライマー

配列番号91：C. glutamicum由来PS1のシグナルペプチドのアミノ酸配列

配列番号92：C. glutamicum由来PS2（CspB）のシグナルペプチドのアミノ

酸配列

配列番号 93 : *C. ammoniagenes* (*C. stationis*)由来SlpA (CspA) のシグナルペプチドのアミノ酸配列

配列番号 94 : *C. glutamicum* ATCC13869のcspB遺伝子の塩基配列

配列番号 95 : *C. glutamicum* ATCC13869のCspBタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 96 : *C. glutamicum* ATCC13869のCspB成熟タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 97 ~ 101 : *C. glutamicum*由来CspBホモログの成熟タンパク質のN末端6アミノ酸残基のアミノ酸配列

配列番号 102 ~ 104 : 本発明で用いられる挿入配列の一態様のアミノ酸配列

配列番号 105 : Factor Xaプロテアーゼの認識配列

配列番号 106 : ProTEVプロテアーゼの認識配列

配列番号 107 : *C. ammoniagenes* (*C. stationis*) ATCC6872のCspA成熟タンパク質のN末端6アミノ酸残基のアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1] 異種タンパク質の分泌発現用の遺伝子構築物を有するコリネ型細菌を培養し、分泌生産された異種タンパク質を回収することを含む、異種タンパク質の製造方法であって、

前記遺伝子構築物が、コリネ型細菌で機能するプロモーター配列、該プロモーター配列の下流に接続されたコリネ型細菌で機能するシグナルペプチドをコードする核酸配列、および該シグナルペプチドをコードする核酸配列の下流に接続されたGln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列と異種タンパク質との融合タンパク質をコードする核酸配列を含む、方法（ただし、前記Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列が、配列番号96の1～14位または1～38位のアミノ酸残基からなる配列である場合を除く）。

[請求項2] 前記Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列が、下記A～Hのアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列である、請求項1に記載の方法：

(A) Gln-Glu-Thr

(B) Gln-Glu-Thr-Xaa1（配列番号102）

(C) Gln-Glu-Thr-Xaa1-Xaa2（配列番号103）

(D) Gln-Glu-Thr-Xaa1-Xaa2-Xaa3（配列番号104）

(E) Gln-Glu-Thrに成熟CspBの4～7位のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列

(F) Gln-Glu-Thrに成熟CspBの4～8位のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列

(G) Gln-Glu-Thrに成熟CspBの4～17位のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列

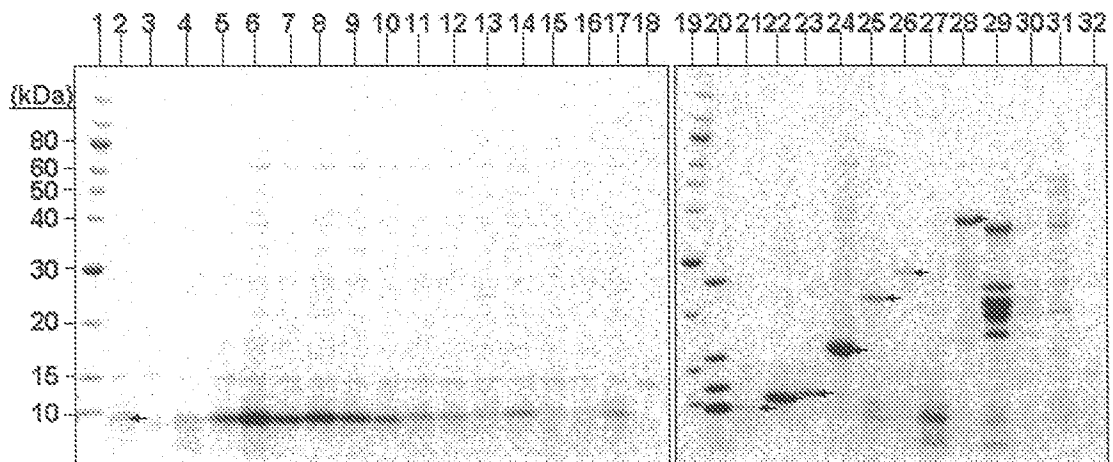
(H) Gln-Glu-Thrに成熟CspBの4～50位のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列

前記アミノ酸配列において、Xaa1はAsn、Gly、Thr、Pro、またはAl

aであり、Xaa2はPro、Thr、またはValであり、Xaa3はThrまたはTyrである。

- [請求項3] 前記Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列が、Gln-Glu-Thr-Asn-Pro-Thr（配列番号97）、Gln-Glu-Thr-Gly-Thr-Tyr（配列番号98）、Gln-Glu-Thr-Thr-Val-Thr（配列番号99）、Gln-Glu-Thr-Pro-Val-Thr（配列番号100）、およびGln-Glu-Thr-Ala-Val-Thr（配列番号101）からなる群より選択されるアミノ酸配列である、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記遺伝子構築物が、Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列をコードする核酸配列と異種タンパク質をコードする核酸配列との間に、さらに、酵素的切断に使用されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] 前記酵素的切断に使用されるアミノ酸配列が、Factor Xaプロテアーゼの認識配列またはProTEVプロテアーゼの認識配列である、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 前記プロテアーゼの認識配列が、配列番号105または106に示すアミノ酸配列である、請求項5に記載の方法。
- [請求項7] 前記コリネ型細菌で機能するシグナルペプチドが、コリネ型細菌由来のCspBのシグナルペプチドである、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項8] 前記CspBのシグナルペプチドが配列番号92に示すアミノ酸配列を有する、請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 前記培養されるコリネ型細菌がコリネバクテリウム属またはブレヴィバクテリウム属に属する細菌である、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項10] 前記培養されるコリネ型細菌がコリネバクテリウム・グルタミカムまたはコリネバクテリウム・スタティオニスである、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

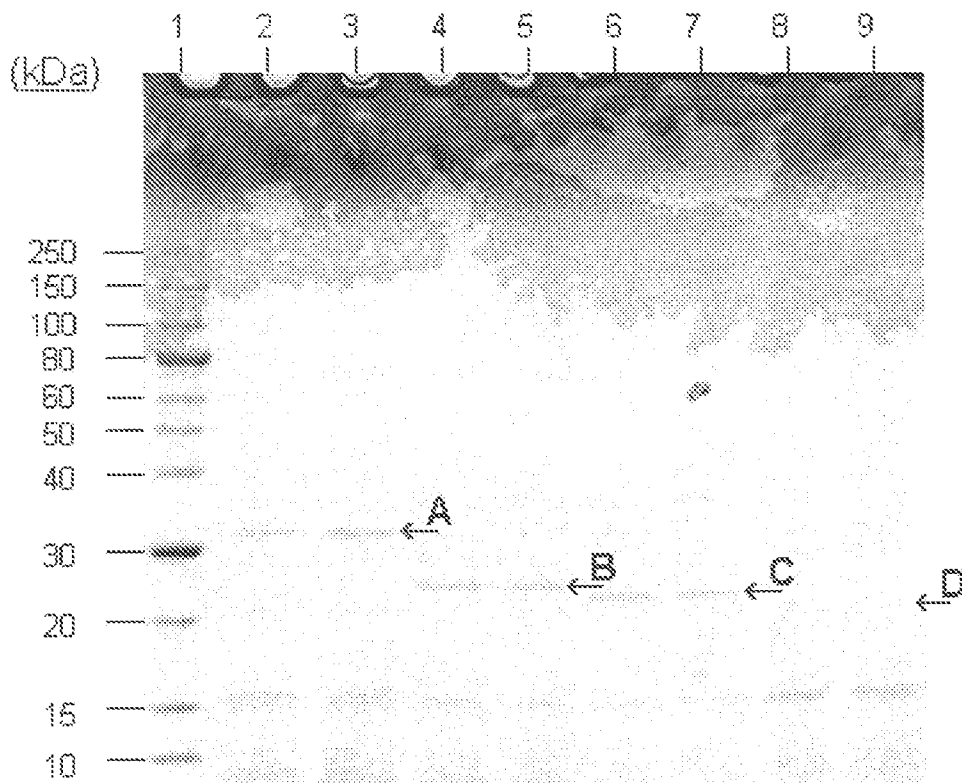
[図1]



lane 1, Marker
 lane 2, YDK010/pPKPIns
 lane 3, YDK010/pPKK1PIns
 lane 4, YDK010/pPKK2PIns
 lane 5, YDK010/pPKK3PIns
 lane 6, YDK010/pPKK4PIns
 lane 7, YDK010/pPKK5PIns
 lane 8, YDK010/pPKK6PIns
 lane 9, YDK010/pPKK7PIns
 lane 10, YDK010/pPKK8PIns
 lane 11, YDK010/pPKK9PIns
 lane 12, YDK010/pPKK10PIns
 lane 13, YDK010/pPKK11PIns
 lane 14, YDK010/pPKK12PIns
 lane 15, YDK010/pPKK13PIns
 lane 16, YDK010/pPKK14PIns
 lane 17, YDK010/pPKK15PIns
 lane 18, YDK010/pPK4

lane 19, Marker
 lane 20, Marker
 lane 21, YDK010/pPKPIns
 lane 22, YDK010/pPKK17PIns
 lane 23, YDK010/pPKK20PIns
 lane 24, YDK010/pPKK50PIns
 lane 25, YDK010/pPKK100PIns
 lane 26, YDK010/pPKK150PIns
 lane 27, YDK010/pPKK200PIns
 lane 28, YDK010/pPKK250PIns
 lane 29, YDK010/pPKK300PIns
 lane 30, YDK010/pPKK350PIns
 lane 31, YDK010/pPKK400PIns
 lane 32, YDK010/pPKK440PIns

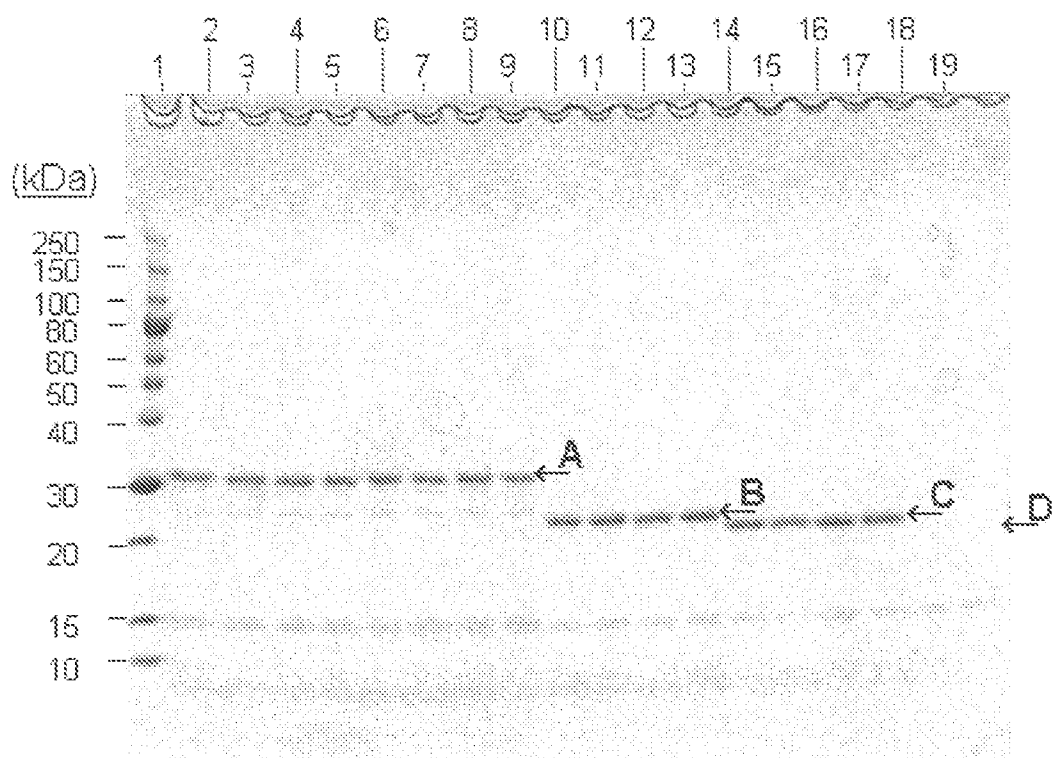
[図2]



lane 1, Marker
lanes 2-3, YDK010/pPKK50Xa-hGH
lanes 4-5, YDK010/pPKK17Xa-hGH
lanes 6-7, YDK010/pPKK6Xa-hGH
lane 8, YDK010/pPK-hGH
lane 9, YDK010/pPS-hGH

A, CspB50Xa-hGH
B, CspB17Xa-hGH
C, CspB6Xa-hGH
D, hGH

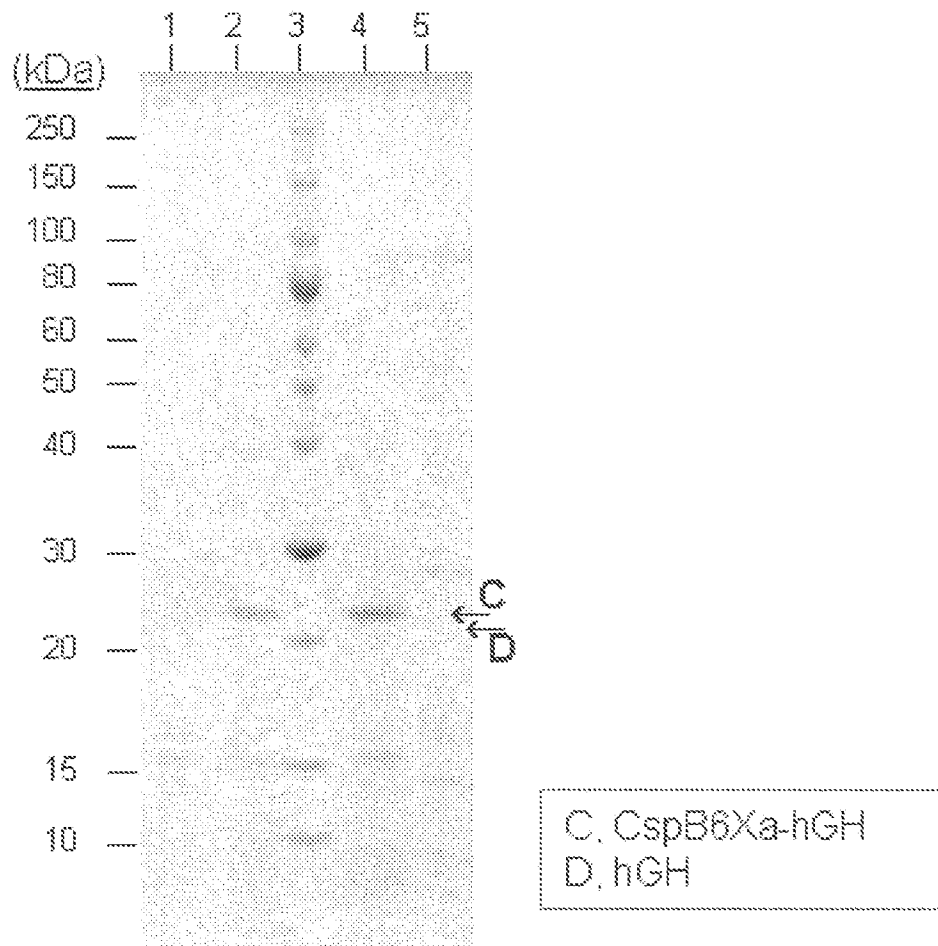
[図3]



lane 1, Marker
lanes 2-9, YDK010/pPSK50Xa-hGH
lanes 10-13, YDK010/pPSK17Xa-hGH
lanes 14-17, YDK010/pPSK6Xa-hGH
lane 18, YDK010/pPK-hGH
lane 19, YDK010/pPS-hGH

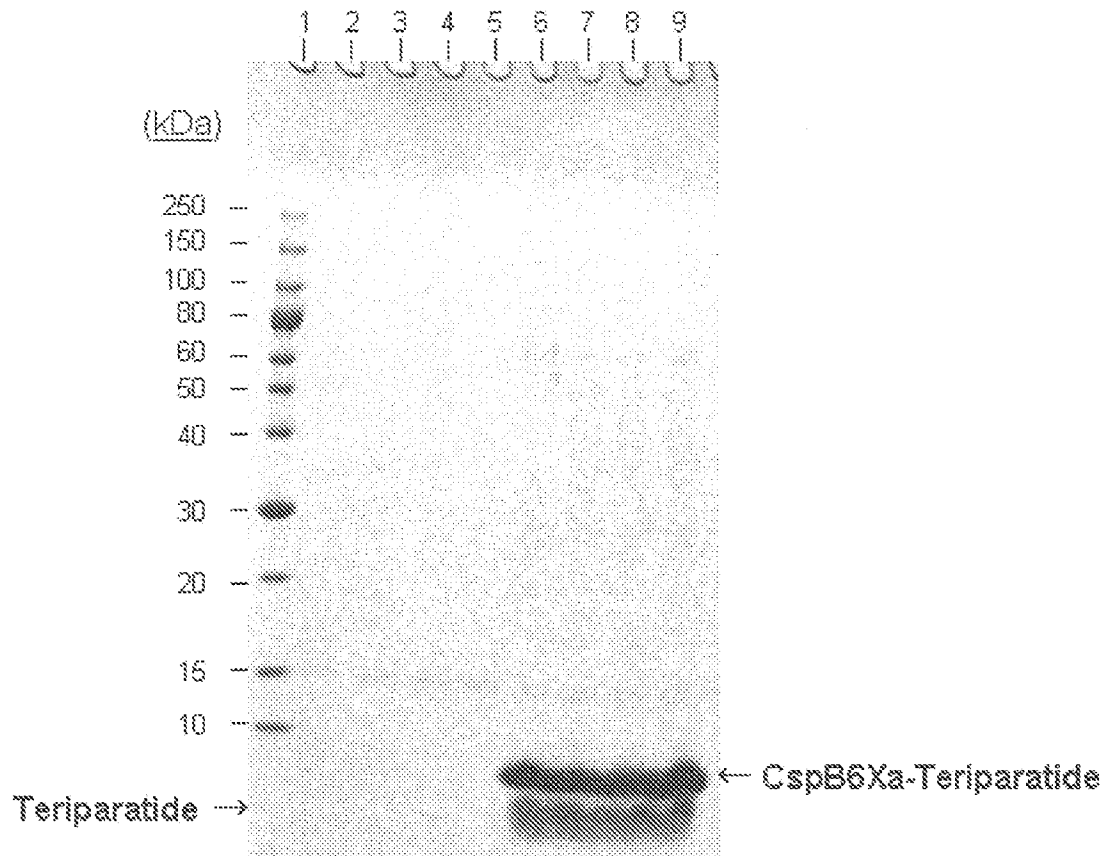
A, CspB50Xa-hGH
B, CspB17Xa-hGH
C, CspB6Xa-hGH
D, hGH

[圖4]



lane 1, *C. glutamicum* ATCC13032 /pPK-hGH
lane 2, *C. glutamicum* ATCC13032 /pPKK6Xa-hGH
lane 3, Marker
lane 4, *C. ammoniagenes* ATCC6872 /pPKK6Xa-hGH
lane 5, *C. ammoniagenes* ATCC6872 /pPK-hGH

[図5]



lane 1, Marker
lanes 2-3, YDK010/pPS-Teri
lanes 4-5, YDK010/pPK-Teri
lanes 6-9, YDK010/pPKK6Xa-Teri

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/077545

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12P21/02</i> (2006.01) <i>i</i> , <i>C12N15/09</i> (2006.01) <i>i</i> , <i>C12R1/13</i> (2006.01) <i>n</i> , <i>C12R1/15</i> (2006.01) <i>n</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12P21/02</i> , <i>C12N15/09</i> , <i>C12R1/13</i> , <i>C12R1/15</i> Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	SALIM K. et al., 'Heterologous expression of the Mycobacterium tuberculosis gene encoding antigen 85A in Corynebacterium glutamicum', Appl. Environ. Microbiol., 1997, Vol.63, No.11, p.4392-4400	<u>1, 7, 9, 10</u> 1-10
Y	WO 2001/023591 A1 (Ajinomoto Co., Inc.), 05 April 2001 (05.04.2001), page 13, line 11 to page 14, line 5; page 27, line 22 to page 30, line 15; table 1	1-10
Y	WO 2002/081694 A1 (Ajinomoto Co., Inc.), 17 October 2002 (17.10.2002), page 13, line 13 to page 14, line 7; page 24, line 6 to page 27, line 2; table 1	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 November, 2012 (15.11.12)		Date of mailing of the international search report 27 November, 2012 (27.11.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer Telephone No.
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/077545

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-291476 A (Ajinomoto Co., Inc.), 08 October 2002 (08.10.2002), paragraphs [0008], [0020] to [0022]	1-10
A	JP 06-502548 A (Orsan), 24 March 1994 (24.03.1994)	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/077545

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Document 1: SALIMK. et al., Appl. Environ. Microbiol., 1997, Vol. 63, No. 11, p. 4392-4400

(Continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/077545

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The inventions set forth in claims 1 to 10 have a common technical feature that is "a method for producing a heterologous protein, which comprises: culturing a corynebacterium having a gene construct, said gene construct comprising a promoter sequence functioning in the corynebacterium, a nucleic acid sequence encoding a signal peptide, and a nucleic acid sequence encoding a fused protein of an amino acid sequence containing Gln-Glu-Thr with a heterologous protein; and then collecting the thus secreted heterologous protein".

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the document 1.

Further, there is no other same or corresponding special technical feature among these inventions.

Therefore, the present application has 8 (groups of) inventions in total respectively containing, as the amino acid sequence containing Gln-Glu-Thr that is mentioned in claims 1 to 10, amino acid sequences (A) to (H) as set forth in claim 2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2012/077545

WO 2001/023591 A1	2001.04.05	JP 4320769 B US 2003/0082746 A1 US 2010/0297729 A1 EP 1219713 A1
WO 2002/081694 A1	2002.10.17	JP 4362651 B US 2004/0126847 A1 EP 1375664 A1
JP 2002-291476 A	2002.10.08	(Family: none)
JP 06-502548 A	1994.03.24	US 6027920 A EP 551506 A1 WO 1993/003158 A1

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12P21/02(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12R1/13(2006.01)n, C12R1/15(2006.01)n		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12P21/02, C12N15/09, C12R1/13, C12R1/15		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2012年 日本国実用新案登録公報 1996-2012年 日本国登録実用新案公報 1994-2012年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, REGISTRY(STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	SALIM K. et al., 'Heterologous expression of the Mycobacterium tuberculosis gene encoding antigen 85A in Corynebacterium glutamicum', Appl. Environ. Microbiol., 1997, Vol.63, No.11, p.4392-4400	1, 7, 9, 10 1-10
Y	W0 2001/023591 A1 (味の素株式会社) 2001.04.05, 第13頁第11行~第14頁第5行、第27頁第22行~第30頁 第15行、表1	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 15. 11. 2012	国際調査報告の発送日 27. 11. 2012	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 伊藤 良子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3644

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2002/081694 A1 (味の素株式会社) 2002.10.17, 第13頁第13行~第14頁第7行、第24頁第6行~第27頁第 2行、表1	1-10
Y	JP 2002-291476 A (味の素株式会社) 2002.10.08, 【0008】、【0020】~【0022】	1-10
A	JP 06-502548 A (オルサン) 1994.03.24,	1-10

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

文献1：SALIM K. et al., Appl. Environ. Microbiol., 1997, Vol.63, No.11, p.4392-4400

請求項1-10に係る発明は、コリネ型細菌で機能するプロモーター配列、シグナルペプチドをコードする核酸配列、Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列と異種タンパク質との融合タンパク質をコードする核酸配列を含む遺伝子構築物を有するコリネ型細菌を培養し、分泌生産された異種タンパク質を回収することを含む、異種タンパク質の製造方法であるという共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、ほかに同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

よって、本出願は、請求項1-10のGln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列として、請求項2に記載のA~Hのアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、計8発明が包含されている。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

WO 2001/023591 A1	2001. 04. 05	JP 4320769 B US 2003/0082746 A1 US 2010/0297729 A1 EP 1219713 A1
WO 2002/081694 A1	2002. 10. 17	JP 4362651 B US 2004/0126847 A1 EP 1375664 A1
JP 2002-291476 A	2002. 10. 08	ファミリーなし
JP 06-502548 A	1994. 03. 24	US 6027920 A EP 551506 A1 WO 1993/003158 A1