(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
2015 年 9 月 11 日(11.09.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/133074 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/000762

(22) 国際出願日: 2015 年 2 月 18 日(18.02.2015)

(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 2014-041820 2014 年 3 月 4 日(04.03.2014) JP

(71) 出願人: 国立大学法人山口大学(YAMAGUCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田１６７７－１ Yamaguchi (JP).

(72) 発明者: 赤田 倫治(AKADA, Rinji); 〒7558611 山口県宇部市常盤台２丁目１６－１国立大学法人山口大学工学部内 Yamaguchi (JP). 星田 尚司(HOSHIDA, Hisashi); 〒7558611 山口県宇部市常盤台２丁目１６－１国立大学法人山口大学工学部内 Yamaguchi (JP). 鎗水 透(YARIMIZU, Tohru); 〒7558611 山口県宇部市常盤台２丁目１６－１国立大学法人山口大学工学部内 Yamaguchi (JP). 中村 美紀子(NAKAMURA, Mikiko); 〒7558611 山口県宇部市常盤台２丁目１６－１国立大学法人山口大学工学部内 Yamaguchi (JP).

(74) 代理人: 廣田 雅紀(HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目２番１９号アドレスビル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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, 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, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

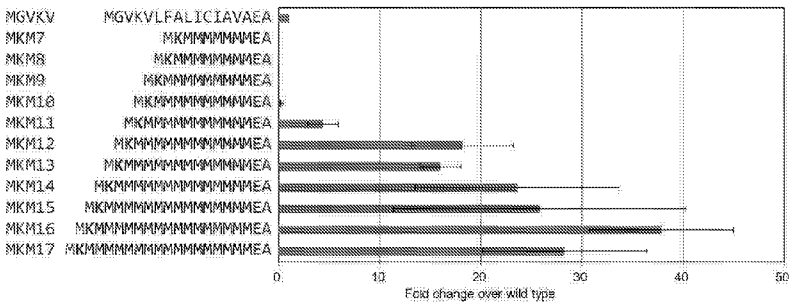
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

[続葉有]

(54) **Title**: DNA ENCODING SECRETION SIGNAL PEPTIDE

(54) 発明の名称 : 分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡ

[図6]



(57) **Abstract**: Provided is DNA encoding a secretion signal peptide that has high secretion capability, is capable of secreting multiple proteins and has broad utility. DNA encoding a secretion signal peptide comprising an amino acid sequence represented by item (a) or (b). (a) A secretion signal peptide which comprises the amino acid sequence represented by formula (I): X-M_1-M_2 ⋯-M_i-E (wherein X represents a lysine residue or an arginine residue; M represents a methionine residue; E represents a glutamic acid residue; and i represents an integer of 12 to 17); and (b) a secretion signal peptide which comprises an amino acid sequence produced by substituting one or two methionine residues independently by a hydrophobic amino acid residue in formula (I), and which is capable of secreting a desired protein expressed in a yeast cell out of the cell.

(57) 要約: 分泌能力が高く、かつ複数のタンパク質を分泌することができる汎用性の高い分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡを提供する。 次の（ａ）又は（ｂ）に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡを作製する。 （ａ）式（Ｉ）に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチド； Ｘ－$Ｍ_1$－$Ｍ_2$・・・－$Ｍ_i$－Ｅ 式（Ｉ） （式（Ｉ）中、Ｘはリジン又はアルギニンを示し、Ｍはメチオニンを示し、Ｅはグルタミン酸を示し、ｉは１２～１７の整数を示す） （ｂ）上記式（Ｉ）において１又は２個のメチオニンが疎水性アミノ酸に置換したアミノ酸配列からなり、酵母細胞で発現した目的タンパク質を細胞外に分泌する能力を有する分泌シグナルペプチド；

WO 2015/133074 A1

— 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 ： 分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡ

技術分野

[0001] 本発明は、タンパク質を細胞外に分泌させることが可能な分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡに関する。

背景技術

[0002] これまでに、酵母をはじめとする様々な微生物を利用したタンパク質の生産技術が開発されている。遺伝子組み換え技術を利用してタンパク質を工業的に生産するには、タンパク質をコードするＤＮＡを宿主となる細胞に導入し、細胞内でタンパク質を発現させる方法が用いられている。細胞内で発現したタンパク質には、細胞外に分泌されるタンパク質と、細胞外に分泌されない若しくは分泌されにくいタンパク質が存在する。後者のタンパク質を生産する場合には、細胞を破砕してタンパク質を細胞破砕物から分離する必要があり、生産効率が悪いという問題があった。そこで、細胞外に分泌されない若しくは分泌されにくいタンパク質を生産する場合には、タンパク質のＮ末端側に分泌シグナルペプチドを結合又は置換し、発現したタンパク質を細胞外に分泌させる方法が用いられている。

[0003] 分泌シグナルペプチドとしては、キャンディダ・ユティリス（Candida utilis）のゲノムに由来する、真核細胞宿主内で分泌シグナルとして機能しうるペプチド（特許文献１参照）や、アスペルギルス・オリーゼ（Aspergillus oryzae）由来タカ（Taka）アミラーゼシグナル配列（ＴＡＡシグナル配列）（特許文献２参照）や、カイアシ類又は貝虫類のルシフェラーゼに由来する分泌シグナルペプチド（特許文献３参照）が提案されているが、いずれの分泌シグナルペプチドも、分泌能力が高いとはいえず、十分に満足いくものではなかった。

[0004] また、野生型の分泌シグナルペプチドを改変したペプチドを利用する方法が開発されており、例えば、異種性タンパク質の分泌のための発現カセット

として、シグナルペプチドをコード化しているＤＮＡ配列が、アミノ酸配列ＭＭＲＰ［疎水性アミノ酸］ｎ　ＴＳＡＬＡをコード化しているＤＮＡ配列又はアミノ酸配列ＭＫＴ［疎水性アミノ酸］ｎ　ＣＡＴＶＨＣをコード化しているＤＮＡ配列から選択され、式中のｎは４～１６の整数であり、前記疎水性アミノ酸はＡ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ又はＶである発現カセット（特許文献４参照）が提案されているが、ルーチン的に使用されたシグナル配列を用いたコントロールと比較して、分泌量はわずか３０％程度増加しているにすぎなかった。さらに、卵白リゾチームの天然のシグナルペプチドの第１、第２及び第１６～１８番目のアミノ酸を除く全て、又は少なくとも大部分のアミノ酸を１種の疎水性アミノ酸で置換した該シグナルペプチドのアミノ酸配列（特許文献５参照）が開示されているが、分泌量の向上は２．５倍程度にとどまっていた。

[0005] このように、野生型の分泌シグナルペプチドを改変しても十分な分泌量を得られていない理由の一つとして、分泌に関わるアミノ酸の種類や位置が特定されていないことが挙げられる。分泌シグナルペプチドはＮ末端近傍に塩基性アミノ酸が存在し、その後に疎水性アミノ酸、特にバリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファンが多く含まれていることは知られているが、どのアミノ酸がどのように配置されていれば分泌量が増加するかについては十分に明らかにされていない。そのため、分泌シグナルペプチドを改変するには、膨大なアミノ酸の組み合わせを検討する必要が生じ、手間も費用も必要となる。したがって、分泌シグナルペプチドを利用して細胞外へタンパク質を分泌させる場合には、既知の分泌シグナルペプチドの中から経験と勘によって最適と思われる分泌シグナルペプチドを選択して用いるのが現状であった。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：再表２０１１－０７８３５１号公報

特許文献2：特開２００９－０６０８０４号公報

特許文献3：特開２００７－５２０２００号公報

特許文献4：特開２０１０－５２８６３４号公報

特許文献5：特開昭６３－２３３７８９号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の課題は、分泌能力が高く、かつ複数のタンパク質を分泌することができる汎用性の高い分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した中で、まずは様々な生物由来の分泌タンパク質のアミノ酸配列から得た分泌シグナルペプチドを用いて酵母でガウシアルシフェラーゼ（ＧＬｕｃ）を分泌させた。その結果、用いた各分泌シグナルペプチドはいずれも主に疎水性のアミノ酸から構成されているにも関わらず、分泌シグナルペプチドの種類によって分泌量が多い場合と少ない場合と様々であった。

[0009] そこで、分泌シグナルペプチドを構成するアミノ酸の一部を削除又は置換し、分泌に関わるアミノ酸を特定することを試みた。改変する分泌シグナルペプチドとしては、本明者らのこれまでの長年の知見等に基づいて、アミノ酸配列を改変することにより分泌能力が向上すると考えられるガウシアルシフェラーゼ（ＧＬｕｃ）の分泌シグナルペプチドを選択した。

[0010] その結果、Ｎ末端側のリジン又はアルギニンから一定の長さのメチオニンの連続配列が分泌量を高めることが明らかとなった。また、連続するメチオニンに続くＣ末端側のアミノ酸が、グルタミン酸の場合には分泌量が多いことが明らかとなった。さらに、リジン又はアルギニンとグルタミン酸の間のメチオニンの数を変えてみたところ、連続するメチオニンの数が１２～１７個の場合に、野生型のガウシアルシフェラーゼの分泌シグナルペプチドを用いた場合と比べて１５倍以上もの高い分泌能力を有することが明らかとなった。加えて、かかる人工的な配列からなる分泌シグナルペプチドは、酵母に

おいて分泌させることが難しいヒトのＬＩＦタンパク質（ｈＬＩＦ）を分泌させる能力を有することを見いだし、本発明を完成した。

[0011] すなわち、本発明は［１］（ａ）式（I）に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチド；

$X-M_1-M_2-\cdots-M_i-E$　式（I）

（式（I）中、Ｘはリジン又はアルギニンを示し、Ｍはメチオニンを示し、Ｅはグルタミン酸を示し、ｉは１２～１７の整数を示す）

（ｂ）上記式（I）において１又は２個のメチオニンが疎水性アミノ酸に置換したアミノ酸配列からなり、酵母細胞で発現した目的タンパク質を細胞外に分泌する能力を有する分泌シグナルペプチド；

の（ａ）又は（ｂ）に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡや、［２］配列番号１に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドをコードする上記［１］記載のＤＮＡや、［３］上記［１］又は［２］記載のＤＮＡを含む酵母用組換えベクターや、［４］目的タンパク質をコードするＤＮＡを含む上記［３］記載の組換えベクターや、［５］上記［４］記載の組換えベクターを含む酵母の形質転換体や、［６］上記［５］記載の形質転換体を培養し、培養液から目的タンパク質を回収することを特徴とする目的タンパク質の生産方法に関する。

[0012] また、本発明は、［７］（ａ）式（I）に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチド；

$X-M_1-M_2-\cdots-M_i-E$　式（I）

（式（I）中、Ｘはリジン又はアルギニンを示し、Ｍはメチオニンを示し、Ｅはグルタミン酸を示し、ｉは１２～１７の整数を示す）

（ｂ）上記式（I）における１又は２個のメチオニンが疎水性アミノ酸に置換したアミノ酸配列からなり、酵母細胞で発現した目的タンパク質を細胞外に分泌する能力を有する分泌シグナルペプチド；

の（ａ）又は（ｂ）に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドに関する。

発明の効果

[0013] 本発明により、酵母細胞で発現した目的タンパク質を細胞外に分泌する能力を有する分泌シグナルペプチドをコードする新たなＤＮＡを提供することができる。かかる本発明の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡを用い、目的タンパク質を分泌生産させることにより、細胞を破砕することなく様々なタンパク質を効率よく生産することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]プラスミドｐＫＭ１５２のマップを示す図である。

[図2]配列番号３に示す野生型ガウシアルシフェラーゼ（ＧＬｕｃ）のアミノ酸配列において、２番目のグリシンと３番目のバリンを削除し、４番目のリジンを他のアミノ酸に置換した、変異分泌シグナルペプチドを備えた変異ＧＬｕｃを酵母で発現させた場合のルシフェラーゼ活性を示す図である。

[図3]配列番号３に示すＧｌｕｃのアミノ酸配列において、２番目のグリシンと３番目のバリンを削除し、４番目のリジン又はアルギニンに続くアミノ酸を連続する８個の同一のアミノ酸に置換した、変異分泌シグナルペプチドを備えた変異ＧＬｕｃを酵母で発現させた場合のルシフェラーゼ活性を示す図である。

[図4]配列番号３に示すＧｌｕｃのアミノ酸配列において、２番目のグリシンと３番目のバリンを削除し、５番目から１５番目のアミノ酸を７個～１７個の連続するロイシンに置換した、変異分泌シグナルペプチドを備えた変異ＧＬｕｃを酵母で発現させた場合のルシフェラーゼ活性を示す図である。

[図5]配列番号３に示すＧｌｕｃのアミノ酸配列において、１６番目のグルタミン酸を他のアミノ酸に置換した、変異分泌シグナルペプチドを備えた変異ＧＬｕｃを酵母で発現させた場合のルシフェラーゼ活性を示す図である。

[図6]配列番号３に示すＧｌｕｃのアミノ酸配列において、２番目のグリシンと３番目のバリンを削除し、５番目から１５番目のアミノ酸を７個～１７個の連続するメチオニンに置換した変異分泌シグナルペプチドを備えた変異ＧＬｕｃを酵母で発現させた場合のルシフェラーゼ活性を示す図である。

[図7]ＲＡＫ６２０５株、ＲＡＫ８７７２株の培養液上澄みのウェスタンブロッティング解析結果を示す図である。

[図8]プラスミドｐＫＭ３９８のマップを示す図である。

[図9]配列番号８７に示されるｈＬＩＦアミノ酸配列の１番目のメチオニンと２番目のリジンの間に配列番号１に示されるアミノ酸配列を導入した変異ペプチド（ＭＫＭ１６Ｅ－２Ｋ）、ｈＬＩＦアミノ酸配列の２番目～１９番目のアミノ酸を配列番号１に示されるアミノ酸配列に置換した変異ペプチド（ＭＫＭ１６Ｅ－２０Ｇ）、ｈＬＩＦアミノ酸配列の２番目～２６番目のアミノ酸を配列番号１に示されるアミノ酸配列に置換した変異ペプチド（ＭＫＭ１６Ｅ－２７Ｉ）を発現させた場合のウェスタンブロッティング解析によるｈＬＩＦの分泌（右の写真）を示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明における分泌シグナルペプチドとしては、

（ａ）式（Ｉ）に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチド；

$X-M_1-M_2-\cdots-M_i-E$ 式（Ｉ）

（式（Ｉ）中、Ｘはリジン又はアルギニンを示し、Ｍはメチオニンを示し、Ｅはグルタミン酸を示し、ｉは１２～１７の整数を示す）

（ｂ）上記式（Ｉ）における１又は２個のメチオニンが疎水性アミノ酸に置換したアミノ酸配列からなり、酵母細胞で発現した目的タンパク質を細胞外に分泌する能力を有する分泌シグナルペプチド；

の（ａ）又は（ｂ）に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドであれば特に制限されないが、ｉは好ましくは１４～１７の整数、より好ましくは１６であり、式（Ｉ）に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドが好ましい。式（Ｉ）に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドであって、ｉが１６の分泌シグナルペプチドとしては、配列番号１に示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることがより好ましい。

[0016] また、本発明の分泌シグナルペプチドにおいて、式（Ｉ）におけるリジン又はアルギニンのＮ末端側に開始コドンとしてのメチオニンを有する分泌シグ

ナルペプチドであることが好ましい。

[0017] なお、以下、グリシンをG、バリンをV、リジンをK、ロイシンをL、イソロイシンをI、メチオニンをM、セリンをS、プロリンをP、スレオニンをT、アラニンをA、チロシンをY、ヒスチジンをH、グルタミンをQ、アスパラギンをN、アスパラギン酸をD、グルタミン酸をE、システインをC、トリプトファンをW、アルギニンをR、フェニルアラニンをFということもある。

[0018] 本発明の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡとしては、上記本発明の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡであれば特に制限されないが、配列番号２に示される塩基配列からなるＤＮＡであることがより好ましい。

[0019] 本発明において、「分泌」とは、細胞内で発現したタンパク質が細胞外に輸送されることを意味し、「分泌シグナルペプチド」とはタンパク質を分泌させるために機能するペプチドを意味する。

[0020] 本発明において、式（I）における１又は２個のメチオニンが疎水性アミノ酸に置換したアミノ酸配列としては、式（I）における１個のメチオニンが疎水性アミノ酸に置換したアミノ酸配列であることが好ましい。

[0021] 本発明において、疎水性アミノ酸としては、ロイシン、アラニン、フェニルアラニン、トリプトファン、イソロイシン、バリン、チロシンを挙げることができ、好ましくはロイシン、アラニン、フェニルアラニン、トリプトファンを挙げることができる。

[0022] 本発明において、目的タンパク質としては特に制限されず、分泌性タンパク質でも非分泌性タンパク質でもよく、酵素、抗体、ホルモン、アルブミン等の貯蔵タンパク質、構造タンパク質、金属結合タンパク質、補因子タンパク質等を挙げることができる。なお、非分泌性タンパク質には分泌性タンパク質における分泌シグナルが削除されたタンパク質も含まれる。

[0023] 本発明における酵母としては、分類学上酵母に属するものであれば特に制限されず、例えば、クルイベロマイセス属（Kluyveromyces）、デバリオマイセス属（Debaryomyces）、ハンゼヌラ属（Hansenuala）、キャンディダ属（C

andida）、メチニコウィア属（Metschnikowia）、ネマトスポラ属（Nematospora）、ピキア属（Pichia）、サッカロマイセス属（Saccharomyces）、サッカロマイコデス属（Saccharomycodes）、シゾサッカロマイセス属（Schizosaccharomyces）、シュワニオマイセス属（Schwanniomyces）、トリコスポロン属(Trichosporon)、トルロプシス属（Torulopsis）、ロドトルラ属（Rhodotorula）、ヤローウィア属（Yarrowia）等の酵母を挙げることができ、より具体的には、クルイベロマイセス・アフリカヌス（K.africanus）、クルイベロマイセス・ラクチス（K.lactis）、クルイベロマイセス・マルキシアヌス（K.marxianus）、クルイベロマイセス・ファゼオロスポラス（K.phaseolosporus）等のクルイベロマイセス属の酵母、デバリオマイセス・ハンセニイ（D.hansenii）等のデバリオマイセス属の酵母、ハンゼヌラ・アノマラ（H.anomala）等のハンゼヌラ属の酵母、キャンディダ・アルビカンス（C.albicans）、キャンディダ・ウティリス（C.utilis）、キャンディダ・グラブラタ（C.glabrata）、キャンディダ・ボイジニィ(C.boidinii)、キャンディダ・トロピカリス（C.tropicalis）、キャンディダ・リポリティカ（C.lipolytica）、キャンディダ・フレーベリ（C.flaveri）キャンディダ・ビルサチルス（C.versatilis）等のキャンディダ属の酵母、メチニコウィア・プルテェリマ（M.pulcherrima）等のメチニコウィア属の酵母、ネマトスポラ・コリリ（N.coryli）等のネマトスポラ属の酵母、ピキア・スチピチス（P.stipitis）ピキア・ファリノサ（P.farinosa）、ピキア・パストリス（P.pastris）、ピキア・アノマラ（P.anomala）等のピキア属の酵母、サッカロマイセス・クドリアヴゼヴィイ（S.kudriavzevii）、サッカロマイセス・セレビシエ（S.cerevisiae）、サッカロマイセス・ドウグラシ（S.douglasii）、サッカロマイセス・カールスベルゲンシス（S.carlsbergensis）、サッカロマイセス・パラドキサス（S.paradoxus）、サッカロマイセス・パストリアヌス（S.pastorianus）、サッカロマイセス・バヤヌス（S.bayanus）、サッカロマイセス・マンジニ（S.mangini）、サッカロマイセス・ミカタエ（S.mikatae）等のサッカロマイセス属の酵母、サッカロマイコデス・ルドウイギ（S.ludwigii）等のサッ

カロマイコデス属の酵母、シゾサッカロミセス・ポンベ（S.pombe）等のシゾサッカロミセス属の酵母、シュワニオマイセス・アルビウス(S.a11uvius)、シュワニオマイセス・オシデンタリス（S.occidentalis）、シュワニオマイセス・カステリ（S.castellii）等のシュワニオマイセス属の酵母、トリコスポロン・プルランス(T.pu11ulans)、トリコスポロン・ペニシァタム（T.penicillatum）等のトリコスポロン属の酵母、トルロプシス・マグノリアエ（T.magnoliae）、トルロプシス・ヴェラティリス（T.veratilis）、トルロプシス・キャンディダ（T.candida）等のトルロプシス属の酵母、ロドトルラ・ミニュータ（R.minuta）、ロドトルラ・ムシラギノーザ（R.mucilaginosa）等のロドトルラ属の酵母、ヤローウィア(サッカロマイコプシス)・リポリティカ(Y.(Saccharomycopsis)lipolytica)等のヤローウィア属の酵母を挙げることができるが、クルイベロマイセス属又はサッカロマイセス属の酵母の酵母、中でもクルイベロマイセス・マルシアヌス又はサッカロマイセス・セレビシエを好適に挙げることができる。また、本発明における酵母には、これらの酵母の変異株も含まれる。

[0024] 酵母細胞で発現した目的タンパク質を細胞外に分泌する能力は、細胞外に分泌される目的タンパク質の量で評価することができる。細胞外に分泌される目的タンパク質の量は、本発明の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡの下流に作動可能に目的タンパク質をコードするＤＮＡを含んだ組換えベクターを用いて酵母を形質転換し、形質転換体を培養して分泌された培養液中のタンパク質の量を公知の方法で定量することで求めることができる。

[0025] 本発明において、酵母細胞で発現した目的タンパク質を細胞外に分泌する能力を有する分泌シグナルペプチドとしては、たとえば、ガウシアルシフェラーゼ（ＧＬｕｃ）の野生型分泌シグナルペプチドを用いて目的タンパク質を発現させた場合の細胞外に分泌される目的タンパク質の量と比較して、１５倍以上、好ましくは２０倍以上、より好ましくは３５倍以上の目的タンパク質を分泌することが可能なペプチドを挙げることができる。

[0026] 本発明の組換えベクターとしては、本発明の分泌シグナルペプチドをコー

ドするＤＮＡを含んでいる組換えベクターであれば特に制限されず、かかるベクターを用いてＰＣＲやライゲーションを行うことにより、目的タンパク質をコードするＤＮＡの上流に本発明の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡを導入することが可能となる。目的タンパク質が既に分泌シグナルペプチドを有している場合であっても、本発明の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡの付与や置換は、分泌量をさらに高めたい場合に有用である。

[0027] また、本発明の組換えベクターは、分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡの下流に作動可能に目的タンパク質をコードするＤＮＡを含んでもよく、かかるベクターを用いて細胞内で目的タンパク質を発現させれば、発現した目的タンパク質を分泌させることができる。

[0028] 本発明の組換えベクターに用いるベクターとしては、目的タンパク質を発現できるものであれば特に制限されず、直鎖状でも環状でもよく、自立複製可能であるものや、あるいは染色体中へ組込み可能であるものが好ましく、また、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター等の制御配列を含有しているものを好適に使用することができる。

[0029] 本発明の組換えベクターを含む酵母の形質転換体としては、本発明の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡの下流に作動可能に目的タンパク質をコードするＤＮＡを含んだ組換えベクターを含んでいる酵母の形質転換体であって、酵母としては、クルイベロマイセス属又はサッカロマイセス属の酵母が好ましい。

[0030] 本発明の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡは、市販されている種々のＤＮＡ合成機を用いて常法に従って合成できる。

[0031] 本発明の分泌シグナルペプチドは、そのアミノ酸配列に従って、一般的な化学合成法により製造することができる。化学合成法には、通常の液相法及び固相法によるペプチド合成法が包含され、より詳しくは、アミノ酸配列情報に基づいて、各アミノ酸を１個ずつ逐次結合させ鎖を延長させていくステップワイズエロゲーション法と、アミノ酸数個からなるフラグメントを予め合成し、次いで各フラグメントをカップリング反応させるフラグメント・コ

ンデンセーション法とが包含される。

[0032] 本発明の組換えベクターを含む酵母の形質転換体の製造方法としては、本発明の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡの下流に作動可能に目的タンパク質をコードするＤＮＡを含んだ組換えベクターを酵母内に導入し、前記目的タンパク質が発現する形質転換細胞を製造する方法であれば特に制限されず、かかる形質転換細胞を製造する方法としては、組換えベクターを細胞内に導入する一般的な方法であればよく、酢酸リチウム法、リポソーム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、ＤＥＡＥデキストラン法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等、当技術分野で広く用いられている手法を挙げることができる。

[0033] 本発明の目的タンパク質の生産方法としては、本発明の組換えベクターを含む酵母の形質転換体を培養し、培養液から目的タンパク質を回収する方法であれば特に制限されず、培養方法としては酵母の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。例えば、形質転換体の作製に用いる酵母細胞がクルイベロマイセス属又はサッカロマイセス属の場合は、３０℃前後、ｐＨ６前後、及び、振とう培養又は通気攪拌培養等の好気的条件下で培養することができる。培養液から目的タンパク質を回収する方法としては、公知のタンパク質の回収方法、例えば、遠心分離、次いで、ゲルろ過、イオン交換、アフィニティ等のクロマトグラフィーにより回収する方法を挙げることができる。目的タンパク質は細胞外に分泌されるため、細胞を破壊せずに目的タンパク質を回収することが好ましい。

[0034] 本発明の形質転換体を培養する培地としては、酵母細胞が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体を培養し得る培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。上述の培地に用い得る炭素源としては、グルコース、ガラクトース、フラクトース、スクロース、ラフィノース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類を挙げることができる。上述の培地に用い得る窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム

、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物や、ペプトン、肉エキス、コーンスティープリカー、各種アミノ酸等の窒素源を含む物質を挙げることができる。上述の培地に用い得る無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を挙げることができる。

[0035] 本発明の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡは、目的タンパク質を分泌生産するためのキットとして提供することもでき、かかるキットには本発明の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡの他、バッファー、ｄＮＴＰｓ、コントロールテンプレート、説明書等を含んでもよい。

実施例 1

[0036] ガウシアルシフェラーゼ（ＧＬｕｃ）はＮ末端側に分泌シグナルペプチドを有している。かかる分泌シグナルペプチドの一部に変異を加えてＧＬｕｃを発現させることで、分泌能力の高い分泌シグナルペプチドの作製を試みた。

[0037] ［リジンの置換］

配列番号３に示すＧＬｕｃのアミノ酸配列において、２番目のグリシンと３番目のバリンを削除し、４番目のリジンを他のアミノ酸に置換した、変異分泌シグナルペプチドを備えた変異ＧＬｕｃを酵母で発現させ、培養液のルシフェラーゼ活性を調べることにより変異分泌シグナルペプチドの分泌能力を評価した。

[0038] （変異ペプチドをコードするＤＮＡ断片の作製）

プラスミドｐＫＭ１５２（図１）が維持されたクルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ６２０５株(ura3 ade2 p[ScADE2c-KmARS7c-ScTDH3p-yGLuc-ScURA3-KmCEND])の染色体ＤＮＡをテンプレートとし、表１に示される各フォワードプライマーとリバースプライマーを用いてＰＣＲを行い、配列番号３に示すアミノ酸配列からなる野生型ペプチド(MGVKV)、配列番号３に示すアミノ酸配列において、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損したペプチド２

Ｇ３ＶΔ（MKV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアルギニンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＲ（MRV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアスパラギンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＮ（MNV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをトリプトファンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＷ（MWV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをフェニルアラニンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＦ（MFV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをチロシンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＹ（MYV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをメチオニンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＭ（MMV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをヒスチジンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＨ（MHV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをイソロイシンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＩ（MIV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをロイシンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＬ（MLV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをシステインに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＣ（MCV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをスレオニンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＴ（MTV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをグルタミン酸に置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＥ（MEV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをグリシンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＧ（MGV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアスパラギン酸に置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＤ（MDV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをセリンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＳ（MSV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをバリンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＶ（MVV）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをプロリンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＰ（MPV）、２番目のグリシ

ンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアラニンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＡ（MAV）、又は２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをグルタミンに置換したペプチド２Ｇ３ＶΔ４ＫＱ（MQV）と、ＵＲＡ３マーカーと、ＫｍＣｅｎＤと、ＡＤＥ２マーカーと、ＫｍＡＲＳ７と、ＴＤＨ３プロモーターとをコードするＤＮＡ断片を作製した。ＰＣＲは、ＫＯＤ　ＦＸ　ｎｅｏ（東洋紡社製）を用い、そのプロトコールに従って行った。ＫＯＤ　ＦＸ　ｎｅｏ反応混合液は、反応液１０μｌ中に１μｌのテンプレートＤＮＡ溶液、０．３μｌの１０μＭフォワードプライマー溶液、０．３μｌの１０μＭリバースプライマー溶液、５μｌの２×ＫＯＤ　ＦＸ　ｎｅｏバッファー、２μｌの２ｍＭ　ｄＮＴＰｓ、０．２μｌのＫＯＤ　ＦＸ　ｎｅｏ　ＤＮＡポリメラーゼ、１．２μｌの滅菌超純水を混ぜて調製した。反応は、９４℃で２分間初期変性させた後、９８℃で１０秒間の熱変性、６５℃で３０秒間のアニーリング、６８℃で３分間の伸長反応を３０サイクルの条件で行った。

[0039]

[表1]

Mutant	Amino acid sequece	リバースプライマー	フォワードプライマー
Wild Type (MGVKV)	MGVKVLFALICIAVAEA…	URA3+771c (配列番号5)	URA3+772 (配列番号4)
2G3VΔ(MKV)	MKVLFALICIAVAEA…	yGLuc+3-TDH3-1c (配列番号7)	yGLuc+10 (配列番号6)
2G3VΔ4KR(MRV)	MRVLFALICIAVAEA…	MRc-TDH3-1c (配列番号9)	
2G3VΔ4KN(MNV)	MNVLFALICIAVAEA…	MNc-TDH3-1c (配列番号10)	
2G3VΔ4KW(MWV)	MWVLFALICIAVAEA…	MWc-TDH3-1c (配列番号11)	
2G3VΔ4KF(MFV)	MFVLFALICIAVAEA…	MFc-TDH3-1c (配列番号12)	
2G3VΔ4KY(MYV)	MYVLFALICIAVAEA…	MYc-TDH3-1c (配列番号13)	
2G3VΔ4KM(MMV)	MMVLFALICIAVAEA…	MMc-TDH3-1c (配列番号14)	yGLuc+13 (配列番号8)
2G3VΔ4KH(MHV)	MHVLFALICIAVAEA…	MHc-TDH3-1c (配列番号15)	
2G3VΔ4KI(MIV)	MIVLFALICIAVAEA…	MIc-TDH3-1c (配列番号16)	
2G3VΔ4KL(MLV)	MLVLFALICIAVAEA…	MLc-TDH3-1c (配列番号17)	
2G3VΔ4KC(MCV)	MCVLFALICIAVAEA…	MCc-TDH3-1c (配列番号18)	
2G3VΔ4KT(MTV)	MTVLFALICIAVAEA…	MTc-TDH3-1c (配列番号19)	
2G3VΔ4KE(MEV)	MEVLFALICIAVAEA…	MEc-TDH3-1c (配列番号20)	
2G3VΔ4KG(MGV)	MGVLFALICIAVAEA…	MGc-TDH3-1c (配列番号21)	
2G3VΔ4KD(MDV)	MDVLFALICIAVAEA…	MDc-TDH3-1c (配列番号22)	
2G3VΔ4KS(MSV)	MSVLFALICIAVAEA…	MSc-TDH3-1c (配列番号23)	
2G3VΔ4KV(MVV)	MVVLFALICIAVAEA…	MVc-TDH3-1c (配列番号24)	
2G3VΔ4KP(MPV)	MPVLFALICIAVAEA…	MPc-TDH3-1c (配列番号25)	
2G3VΔ4KA(MAV)	MAVLFALICIAVAEA…	MAc-TDH3-1c (配列番号26)	
2G3VΔ4KQ(MQV)	MQVLFALICIAVAEA…	MQc-TDH3-1c (配列番号27)	

[0040] （形質転換体の作製）

クルイベロマイセス・マルシアヌスの形質転換体はAbdel-Banatらの方法(Abdel-Banat et al.,Yeast vol.27 29-39(2009))に従って作製した。２５０ｍｌのフラスコを用い、３０ｍｌのＹＰＤ培地（１％酵母エキス、２％ポリペプトン、２％グルコース）でクルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ３９０８株(ura3 ade2:Yarimizu et al., Yeast vol. 30: 485-500(2013))を１５０ｒｐｍ、２４時間３０℃の条件下で振とう培養した。培養した細胞を３０００ｒｐｍ、３分間遠心して回収し、９００μｌのＴＦＢバッファー（２０ｍｌの６０％ポリエチレングリコール３３５０（シグマ・アルドリッチ社製）、３ｍｌの１Ｍジチオスレイトール（和光純薬工業社製）、１．５ｍｌの４Ｍリチウムアセテート（キシダ化学社製）、５．５ｍｌの滅菌水で懸濁した。再度３０００ｒｐｍ、３分間遠心して回収し、６００μｌのＴＦＢバッファーで懸濁した。細胞懸濁液を５０μｌずつ１．５ｍｌチューブに移し、上述で作製した野生型及び各変異ペプチドをコードするＤＮＡ断片７０ｎｇと混和した。４２℃で３０分培養後、細胞懸濁液をウラシル欠損培地（０．１７％イーストニトロゲンベース（アミノ酸、硫酸アンモニウム不含）、０．５％硫酸アンモニウム、２％グルコース、ウラシル以外の必要な栄養素）に塗布し、２８℃で２－３日培養し、生育したコロニーを形質転換体とした。

[0041] （ルシフェラーゼ活性の測定）

ルシフェラーゼ活性の測定にはBioLux（登録商標）Gaussia Luciferase Assay Kit（ニューイングランド・バイオラボ社製）を用いた。まず、上述で得られた形質転換体をウラシル欠損培地で培養し、前培養液を調製した。次に、９６ウェルのマイクロプレートを用い、３００μｌのＹＰＤ培地に１０μｌの前培養液を加えて、２８℃で２４時間培養し、かかる培養液１０μｌとＧＬｕｃアッセイ溶液（１ｍｌのBioLux(商標登録) GLuc Assay Buffer（×１）、１０μｌのBioLux(商標登録) GLuc Assay Substrate（×１００））２０μｌを混合し、室温で５秒間静置してルシフェラーゼ活性をCentro LB960 mi

croplate reader（Berthold社製）により測定した。結果を図２に示す。

[0042]（結果）

図２において、横軸は野生型のＧＬｕｃ（MGVKV）を発現させて測定したルシフェラーゼ活性を１とした場合の、それぞれの変異ペプチドを発現させて測定したルシフェラーゼ活性の相対値、縦軸は発現させたペプチドの種類を示す。図２に示すように、分泌シグナルペプチドのＮ末端側の塩基性アミノ酸としてリジン又はアルギニンがあれば、分泌能力が野生型に比べて２倍以上に高くなることが明らかとなった。

[0043]［リジン又はアルギニンに続くアミノ酸の置換］

配列番号３に示すＧＬｕｃのアミノ酸配列において２番目のグリシンと３番目のバリンを削除し、４番目のリジン又はアルギニンに続くアミノ酸を連続する８個の同一のアミノ酸に置換した、変異分泌シグナルペプチドを備えた変異ＧＬｕｃを酵母で発現させ、培養液のルシフェラーゼ活性を調べることにより変異分泌シグナルペプチドの分泌能力を評価した。

[0044]（変異ペプチドをコードするＤＮＡ断片の作製）

プラスミドｐＫＭ１５２（図１）が維持されたクルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ６２０５株の染色体をテンプレートとして、配列番号２８に示されるフォワードプライマー（yGLuc+37）と配列番号２９に示されるリバースプライマー（TDH3-1c40）を用いてＰＣＲを行い、ＧＬｕｃと、ＵＲＡ３マーカーと、ＫｍＣｅｎＤと、ＡＤＥ２マーカーと、ＫｍＡＲＳ７と、ＴＤＨ３プロモーターとをコードするＤＮＡ断片を得た。次に、得られたＤＮＡ断片をテンプレートとして、表２に示される各フォワードプライマーとリバースプライマーを用いてＰＣＲを行い、配列番号３に示されるアミノ酸配列において、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１２番目のアミノ酸をロイシンに置換したペプチド（MKL8）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアルギニンに置換し、５番目～１２番目のアミノ酸をロイシンに置換したペプチド（MRL8）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアルギニンに置換し、５番

目～１２番目のアミノ酸をメチオニンに置換したペプチド（MRM8）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアルギニンに置換し、５番目～１２番目のアミノ酸をトリプトファンに置換したペプチド（MRW8）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアルギニンに置換し、５番目～１２番目のアミノ酸をフェニルアラニンに置換したペプチド（MRF8）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアルギニンに置換し、５番目～１２番目のアミノ酸をイソロイシンに置換したペプチド（MRI8）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアルギニンに置換し、５番目～１２番目のアミノ酸をスレオニンに置換したペプチド（MRT8）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアルギニンに置換し、５番目～１２番目のアミノ酸をセリンに置換したペプチド（MRS8）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアルギニンに置換し、５番目～１２番目のアミノ酸をグルタミンに置換したペプチド（MRQ8）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアルギニンに置換し、５番目～１２番目のアミノ酸をチロシンに置換したペプチド（MRY8）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアルギニンに置換し、５番目～１２番目のアミノ酸をアラニンに置換したペプチド（MRA8）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアルギニンに置換し、５番目～１２番目のアミノ酸をバリンに置換したペプチド（MRV8）、又は２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、４番目のリジンをアルギニンに置換し、５番目～１２番目のアミノ酸をシステインに置換したペプチド（MRC8）と、ＵＲＡ３マーカーと、ＫｍＣｅｎＤと、ＡＤＥ２マーカーと、ＫｍＡＲＳ７と、ＴＤＨ３プロモーターとをコードするＤＮＡ断片を作製した。ＰＣＲ反応は、上述と同様の条件で行った。

[0045]

[表2]

Mutant	Amino acid sequece	リバースプライマー	フォワードプライマー
MKL8	MKLLLLLLLLAVAEA…		MKL8-hGLuc+37 (配列番号 30)
MRL8	MRLLLLLLLLAVAEA…		MRL8-hGLuc+37 (配列番号 31)
MRM8	MRMMMMMMMMAVAEA…		MRM8-hGLuc+37 (配列番号 32)
MRW8	MRWWWWWWWWAVAEA…		MRW8-hGLuc+37 (配列番号 33)
MRF8	MRFFFFFFFFAVAEA…		MRF8-hGLuc+37 (配列番号 34)
MRI8	MRIIIIIIIIAVAEA…		MRI8-hGLuc+37 (配列番号 35)
MRT8	MRTTTTTTTTAVAEA…	TDH3-1c40 (配列番号 29)	MRT8-hGLuc+37 (配列番号 36)
MRS8	MRSSSSSSSSAVAEA…		MRS8-hGLuc+37 (配列番号 37)
MRQ8	MRQQQQQQQQAVAEA…		MRQ8-hGLuc+37 (配列番号 38)
MRY8	MRYYYYYYYYAVAEA…		MRY8-hGLuc+37 (配列番号 39)
MRA8	MRAAAAAAAAAVAEA…		MRA8-hGLuc+37 (配列番号 40)
MRV8	MRVVVVVVVVAVAEA…		MRV8-hGLuc+37 (配列番号 41)
MRC8	MRCCCCCCCCAVAEA…		MRC8-hGLuc+37 (配列番号 42)

[0046] （形質転換体の作製及びルシフェラーゼ活性の測定）

作製した各変異ペプチドをコードするＤＮＡ断片を用い、上述と同様の方法でクルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ３９０８株の形質転換体を作製し、かかる形質転換体をＹＰＢ培地で培養して培養液中のルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図３に示す。

[0047] （結果）

図３において、横軸は野生型のＧＬｕｃ(MGVKV)を発現させて測定したルシフェラーゼ活性を１とした場合の、それぞれの変異ペプチドを発現させて測定したルシフェラーゼ活性の相対値、縦軸は発現させたペプチドの種類を示す。図３に示すように、分泌シグナルペプチドのＮ末端側の塩基性アミノ酸として、リジン又はアルギニンに続くアミノ酸がロイシンやメチオニンやトリプトファンであれば、分泌能力が野生型に比べて２倍以上に高くなることが明らかとなった。

[0048] ［連続したロイシンへの置換］

上記結果より、リジン又はアルギニンに続くアミノ酸がロイシンの場合に分泌能力が高かったことから、配列番号３に示すＧｌｕｃのアミノ酸配列において、２番目のグリシンと３番目のバリンを削除し、５番目から１５番目のアミノ酸を７個～１７個の連続するロイシンにした、変異分泌シグナルペプチドを備えた変異ＧＬｕｃを酵母で発現させ、培養液のルシフェラーゼ活性を調べることにより変異分泌シグナルペプチドの分泌能力を評価した。

[0049] （変異ペプチドをコードするＤＮＡ断片の作製）

プラスミドｐＫＭ１５２（図１）が維持されたクルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ６２０５株の染色体をテンプレートとして、配列番号４３に示されるフォワードプライマー(yGLuc+64)と配列番号２９に示されるリバースプライマー(TDH3-1c40)を用いてＰＣＲを行い、ＧＬｕｃと、ＵＲＡ３マーカーと、ＫｍＣｅｎＤと、ＡＤＥ２マーカーと、ＫｍＡＲＳ７と、ＴＤＨ３プロモーターとをコードするＤＮＡ断片を得た。次に、得られたＤＮＡ断片をテンプレートとして、表３に示される各フォワードプライマーとリバースプライマーを用いてＰＣＲを行い、配列番号３に示されるアミノ酸配列において、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する７個のロイシンに置換したペプチド（MKL7E）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する８個のロイシンに置換したペプチド（MKL8E）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する９個のロイシンに

置換したペプチド（MKL9E）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１０個のロイシンに置換したペプチド（MKL10E）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１１個のロイシンに置換したペプチド（MKL11E）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１２個のロイシンに置換したペプチド（MKL12E）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１３個のロイシンに置換したペプチド（MKL13E）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１４個のロイシンに置換したペプチド（MKL14E）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１５個のロイシンに置換したペプチド（MKL15E）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１６個のロイシンに置換したペプチド（MKL16E）、又は２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１７個のロイシンに置換したペプチド（MKL17E）と、ＵＲＡ３マーカーと、ＫｍＣｅｎＤと、ＡＤＥ２マーカーと、ＫｍＡＲＳ７と、ＴＤＨ３プロモーターとをコードするＤＮＡ断片を作製した。ＰＣＲ反応は、上述と同様の条件で行った。

[0050]

[表3]

Mutant	Amino acid sequece	リバースプライマー	フォワードプライマー
MKL7E	MKLLLLLLLEA…	TDH3-1c40 (配列番号29)	MKL(7)-hGLuc+46 (配列番号44)
MKL8E	MKLLLLLLLLEA…		MKL(8)-hGLuc+46 (配列番号45)
MKL9E	MKLLLLLLLLLEA…		MKL(9)-hGLuc+46 (配列番号46)
MKL10E	MKLLLLLLLLLLEA…		MKL(10)-hGLuc+46 (配列番号47)
MKL11E	MKLLLLLLLLLLLEA…		MKL(11)-hGLuc+46 (配列番号48)
MKL12E	MKLLLLLLLLLLLLEA…		MKL(12)-hGLuc+46 (配列番号49)
MKL13E	MKLLLLLLLLLLLLLEA…		MKL(13)-hGLuc+46 (配列番号50)
MKL14E	MKLLLLLLLLLLLLLLEA…		MKL(14)-hGLuc+46 (配列番号51)
MKL15E	MKLLLLLLLLLLLLLLLEA…		MKL(15)-hGLuc+46 (配列番号52)
MKL16E	MKLLLLLLLLLLLLLLLLEA…		MKL(16)-hGLuc+46 (配列番号53)
MKL17E	MKLLLLLLLLLLLLLLLLLEA…		MKL(17)-hGLuc+46 (配列番号54)

[0051] （形質転換体の作製及びルシフェラーゼ活性の測定）

作製した各変異ペプチドをコードするＤＮＡ断片を用い、上述と同様の方法でクルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ３９０８株の形質転換体を作製し、かかる形質転換体をＹＰＢ培地で培養してルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図４に示す。

[0052] （結果）

図４において、横軸は野生型のＧＬｕｃ（MGVKV）を発現させて測定したルシフェラーゼ活性を１とした場合の、それぞれの変異ペプチドを発現させて測定したルシフェラーゼ活性の相対値、縦軸は発現させたペプチドの種類を示す。図４に示すように、リジン又はアルギニンに続くアミノ酸がロイシンの場合、ルシフェラーゼ活性は、連続するロイシンの個数が１１～１３の場合に高かったが、野生型に対して３倍程度であった。

[0053] ［１６番目のグルタミン酸の置換］

配列番号３に示すＧｌｕｃのアミノ酸配列において、１６番目のグルタミ

ン酸を他のアミノ酸に置換した、変異分泌シグナルペプチドを備えた変異ＧＬｕｃを酵母で発現させ、培養液のルシフェラーゼ活性を調べることにより変異分泌シグナルペプチドの分泌能力を評価した。

[0054] （変異ペプチドをコードするＤＮＡ断片の作製）

プラスミドｐＫＭ１５２（図１）が維持されたクルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ６２０５株の染色体をテンプレートとして、配列番号４３に示されるフォワードプライマー(yGLuc+64)と配列番号２９に示されるリバースプライマー(TDH3-1c40)を用いてＰＣＲを行い、ＧＬｕｃと、ＵＲＡ３マーカーと、ＫｍＣｅｎＤと、ＡＤＥ２マーカーと、ＫｍＡＲＳ７と、ＴＤＨ３プロモーターをコードするＤＮＡ断片を得た。次に、得られたＤＮＡ断片をテンプレートとして、表４に示される各フォワードプライマーとリバースプライマーを用いてＰＣＲを行い、配列番号３に示されるアミノ酸配列において、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸をロイシンに置換したペプチド（MKL13E）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸をロイシンに置換し、１６番目のグルタミン酸をプロリンに置換したペプチド（MKL13P）、１６番目のグルタミン酸をアスパラギン酸に置換したペプチド（MKL13D）、１６番目のグルタミン酸をグルタミンに置換したペプチド（MKL13Q）、１６番目のグルタミン酸をアスパラギンに置換したペプチド（MKL13N）、１６番目のグルタミン酸をヒスチジンに置換したペプチド（MKL13H）、１６番目のグルタミン酸をリジンに置換したペプチド（MKL13K）、１６番目のグルタミン酸をアルギニンに置換したペプチド（MKL13R）、１６番目のグルタミン酸をセリンに置換したペプチド（MKL13S）、１６番目のグルタミン酸をチロシンに置換したペプチド（MKL13Y）、１６番目のグルタミン酸をフェニルアラニンに置換したペプチド（MKL13F）、１６番目のグルタミン酸をスレオニンに置換したペプチド（MKL13T）、１６番目のグルタミン酸をアラニンに置換したペプチド（MKL13A）、１６番目のグルタミン酸をロイシンに置換したペプチド（MKL13L）、１６番目のグルタミン酸をメチオニンに置換したペプチド（MKL13M）

、１６番目のグルタミン酸をシステインに置換したペプチド（MKL13C）、１６番目のグルタミン酸をバリンに置換したペプチド（MKL13V）、１６番目のグルタミン酸をイソロイシンに置換したペプチド（MKL13I）、１６番目のグルタミン酸をトリプトファンに置換したペプチド（MKL13W）、又は１６番目のグルタミン酸をグリシンに置換したペプチド（MKL13G）と、ＵＲＡ３マーカーと、ＫｍＣｅｎＤと、ＡＤＥ２マーカーと、ＫｍＡＲＳ７と、ＴＤＨ３プロモーターとをコードするＤＮＡ断片を作製した。ＰＣＲ反応は、上述と同様の条件で行った。

[0055]

[表4]

Mutant	Amino acid sequece	リバースプライマー	フォワードプライマー
MKL13E	MKLLLLLLLLLLLLLEA…	TDH3-1c40（配列番号29）	MKL(13)-hGLuc+46（配列番号50）
MKL13P	MKLLLLLLLLLLLLLPA…		MKL(13)P-hGLuc+46（配列番号55）
MKL13D	MKLLLLLLLLLLLLLDA…		MKL(13)D-hGLuc+46（配列番号56）
MKL13Q	MKLLLLLLLLLLLLLQA…		MKL(13)Q-hGLuc+46（配列番号57）
MKL13N	MKLLLLLLLLLLLLLNA…		MKL(13)N-hGLuc+46（配列番号58）
MKL13H	MKLLLLLLLLLLLLLHA…		MKL(13)H-hGLuc+46（配列番号59）
MKL13K	MKLLLLLLLLLLLLLKA…		MKL(13)K-hGLuc+46（配列番号60）
MKL13R	MKLLLLLLLLLLLLLRA…		MKL(13)R-hGLuc+46（配列番号61）
MKL13S	MKLLLLLLLLLLLLLSA…		MKL(13)S-hGLuc+46（配列番号62）
MKL13Y	MKLLLLLLLLLLLLLYA…		MKL(13)Y-hGLuc+46（配列番号63）
MKL13F	MKLLLLLLLLLLLLLFA…		MKL(13)F-hGLuc+46（配列番号64）
MKL13T	MKLLLLLLLLLLLLLTA…		MKL(13)T-hGLuc+46（配列番号65）
MKL13A	MKLLLLLLLLLLLLLAA…		MKL(13)A-hGLuc+46（配列番号66）
MKL13L	MKLLLLLLLLLLLLLLA…		MKL(13)L-hGLuc+46（配列番号67）
MKL13M	MKLLLLLLLLLLLLLMA…		MKL(13)M-hGLuc+46（配列番号68）
MKL13C	MKLLLLLLLLLLLLLCA…		MKL(13)C-hGLuc+46（配列番号69）
MKL13V	MKLLLLLLLLLLLLLVA…		MKL(13)V-hGLuc+46（配列番号70）
MKL13I	MKLLLLLLLLLLLLLIA…		MKL(13)I-hGLuc+46（配列番号71）
MKL13W	MKLLLLLLLLLLLLLWA…		MKL(13)W-hGLuc+46（配列番号72）
MKL13G	MKLLLLLLLLLLLLLGA…		MKL(13)G-hGLuc+46（配列番号73）

[0056]（形質転換体の作製及びルシフェラーゼ活性の測定）

作製した各変異ペプチドをコードするＤＮＡ断片を用い、上述と同様の方法でクルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ３９０８株の形質転換体を作製し、かかる形質転換体をＹＰＢ培地で培養してルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図５に示す。

[0057]（結果）

図５において、横軸は野生型のＧＬｕｃ（MGVKV）を発現させて測定したルシフェラーゼ活性を１とした場合の、それぞれの変異ペプチドを発現させて測定したルシフェラーゼ活性の相対値、縦軸は発現させたペプチドの種類を示す。図５に示すように、連続するロイシンのＣ末端側のアミノ酸が酸性アミノ酸であるグルタミン酸の場合に分泌能力が高いことが明らかとなった。

[0058]［連続したメチオニンへの置換］

塩基性アミノ酸であるリジン又はアルギニンと、酸性アミノ酸であるグルタミン酸の間にロイシンが１１～１３個あれば、分泌能力を有することが明らかとなったが、さらに分泌能力が高い分泌シグナルペプチドの作製を試みた。配列番号３に示すＧｌｕｃのアミノ酸配列において、２番目のグリシンと３番目のバリンを削除し、５番目から１５番目のアミノ酸を７個～１７個の連続するメチオニンに置換した、変異分泌シグナルペプチドを備えた変異ＧＬｕｃを酵母で発現させ、培養液のルシフェラーゼ活性を調べることにより変異分泌シグナルペプチドの分泌能力を評価した。

[0059]（変異ペプチドをコードするＤＮＡ断片の作製）

プラスミドｐＫＭ１５２（図１）が維持されたクルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ６２０５株の染色体をテンプレートとして、配列番号４３に示されるフォワードプライマー(yGLuc+64)と配列番号２９に示されるリバースプライマー(TDH3-1c40)を用いてＰＣＲを行い、ＧＬｕｃと、ＵＲＡ３マーカーと、ＫｍＣｅｎＤと、ＡＤＥ２マーカーと、ＫｍＡＲＳ７と、ＴＤＨ３プロモーターをコードするＤＮＡ断片を得た。次に、得られたＤＮＡ断片をテンプレートとして、表５に示される各フォワードプライマーとリバースプライマーを用いてＰＣＲを行い、配列番号３に示されるアミノ酸配列において、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する７個のメチオニンに置換したペプチド（MKM7）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する８個のメチオニンに置換したペプチド（MKM8）、２番目のグリシンと３番目

のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する９個のメチオニンに置換したペプチド（MKM9）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１０個のメチオニンに置換したペプチド（MKM10）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１１個のメチオニンに置換したペプチド（MKM11）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１２個のメチオニンに置換したペプチド（MKM12）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１３個のメチオニンに置換したペプチド（MKM13）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１４個のメチオニンに置換したペプチド（MKM14）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１５個のメチオニンに置換したペプチド（MKM15）、２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１６個のメチオニンに置換したペプチド（MKM16）、又は２番目のグリシンと３番目のバリンが欠損し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１７個のメチオニンに置換したペプチド（MKM17）と、ＵＲＡ３マーカーと、ＫｍＣｅｎＤと、ＡＤＥ２マーカーと、ＫｍＡＲＳ７と、ＴＤＨ３プロモーターとをコードするＤＮＡ断片を作製した。ＰＣＲ反応は、上述と同様の条件で行った。

[0060]

[表5]

Mutant	Amino acid sequece	リバースプライマー	フォワードプライマー
MKM7	MKMMMMMMMMEA…		MKM(7)-hGLuc+46 (配列番号 74)
MKM8	MKMMMMMMMMEA…		MKM(8)-hGLuc+46 (配列番号 75)
MKM9	MKMMMMMMMMEA…		MKM(9)-hGLuc+46 (配列番号 76)
MKM10	MKMMMMMMMMEA…		MKM(10)-hGLuc+46 (配列番号 77)
MKM11	MKMMMMMMMMEA…		MKM(11)-hGLuc+46 (配列番号 78)
MKM12	MKMMMMMMMMEA…	TDH3-1c40 (配列番号 29)	MKM(12)-hGLuc+46 (配列番号 79)
MKM13	MKMMMMMMMMEA…		MKM(13)-hGLuc+46 (配列番号 80)
MKM14	MKMMMMMMMMEA…		MKM(14)-hGLuc+46 (配列番号 81)
MKM15	MKMMMMMMMMEA…		MKM(15)-hGLuc+46 (配列番号 82)
MKM16	MKMMMMMMMMEA…		MKM(16)-hGLuc+46 (配列番号 83)
MKM17	MKMMMMMMMMEA…		MKM(17)-hGLuc+46 (配列番号 84)

[0061] （形質転換体の作製及びルシフェラーゼ活性の測定）

作製した各変異ペプチドをコードするＤＮＡ断片を用い、上述と同様の方法でクルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ３９０８株の形質転換体を作製し、かかる形質転換体をＹＰＢ培地で培養してルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図６に示す。

[0062] （ルシフェラーゼ活性の測定結果）

図６において、横軸は野生型のＧＬｕｃ（MGVKV）を発現させて測定したルシフェラーゼ活性を１とした場合の、それぞれの変異ペプチドを発現させて測定したルシフェラーゼ活性の相対値、縦軸は発現させたペプチドの種類を

示す。図６に示すように、リジンに続くアミノ酸が１２～１７個のメチオニンであれば分泌能力が非常に高く、特に配列番号１に示すアミノ酸配列からなるペプチドが非常に高い分泌能力を有することが明らかとなった。これまでに疎水性アミノ酸のロイシンが分泌に深く関与していると考えられていたが、ロイシンに比べてメチオニンに置換したペプチドの方が、分泌能力が高いことは予想外であった。また、メチオニンの数が１２～１７で高い分泌能力を有することから、発現させる目的タンパク質の種類に応じてメチオニンの数を調整し、発現させるタンパク質に最適な分泌シグナルペプチドを選択して目的タンパク質を効率よく分泌させることが可能となる。

[0063]（ウェスタンブロッティング解析）

配列番号３に示すＧｌｕｃのアミノ酸配列において、２番目のグリシンと３番目のバリンを削除し、５番目～１５番目のアミノ酸を連続する１６個のメチオニンに置換したペプチド（MKM16）をコードするＤＮＡ断片を用い、クルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ３９０８株を形質転換体し、ＲＡＫ８７７２株を得た。かかるＲＡＫ８７７２株及びクルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ６２０５株をそれぞれ２ｍｌのＹＰＤ培地で一晩培養した。培養後、上澄み液に１ｍｌのアセトンを加えて１２，０００ｒｐｍで５分間遠心した。沈殿を２０μｌのＬａｅｍｍｌｉサンプルバッファー：バイオラッド社製）で溶解し、９５℃で５分間加熱した。

[0064] ＳＤＳ－ＰＡＧＥはカセット電気泳動槽（コスモ・バイオ社製）とＳｕｐｅｒＳｅｐ Ａｃｅ １７ウェル（和光純薬工業社製）を用いて行った。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後、タンパク質はimmobilon PVDF膜（ミリポア社製）に転写した。抗体反応においては、１／５０００希釈抗ＧＬｕｃ抗体Ｅ８０２３Ｓ（New England Biolabs社製）及び１／１０００希釈抗ラビットＩｇＧ－ＨＲＰ抗体（Jackson ImmunoResearch社製）を用い、発光試薬としてはImmnostar（登録商標）Zeta（和光純薬工業社製）を用いて行った。ウェスタンブロッティング解析の結果を図７に示す。図７中、ＷＴはＲＡＫ６２０５株、M^{16}はＲＡＫ８７７２株の培養液上澄みにおけるＧＬｕｃである。

[0065]（ウェスタンブロッティング解析の結果）

図７に示すように、M[16]では約２０ｋＤより低い位置にバンドが検出され、ＷＴではバンドが検出されなかったことから、本発明のシグナルペプチドはタンパク質を細胞外に分泌する能力が高いことが確認された。また、１６個のメチオニンを含むシグナル配列を有するMKM16の推定分子量は２０．７ｋＤ、シグナル配列無しのＧＬｕｃの推定分子量は１８．４ｋＤであり、図７の結果から、１６個のメチオニンを含むシグナル配列は切断されていることが推測された。

実施例 2

[0066]［ヒトＬＩＦの分泌］

配列番号１に示す分泌シグナルペプチドを用いて、酵母での分泌が難しいヒトＬＩＦ（ｈＬＩＦ）を分泌させた。

[0067]（分泌シグナルペプチドの付与）

ｈＬＩＦ－ＦＬＡＧペプチドに配列番号１に示されるペプチド（ＫＭＭＭＭＭＭＭＭＭＭＭＭＭＥ）を付与するために、プラスミドｐＫＭ３９８（図８）が維持されたクルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ１０２５２の染色体ＤＮＡをテンプレートとし、配列番号８５に示されるフォワードプライマー(hLIF+4)と、配列番号２９に示されるリバースプライマー(TDH3p-1c40)を用いてＰＣＲを行い、ｈＬＩＦと、ＦＬＡＧタグと、ＵＲＡ３マーカーと、ＫｍＣｅｎＤと、ＫｍＡＲＳ７と、ＡＤＥ２マーカーと、ＴＤＨ３プロモーターとをコードするＤＮＡ断片（hLIF-FLAG-URA3-KmCenD-KmARS7-ADE2-TDH3）を得た。次に、得られたＤＮＡ断片をテンプレートとし、配列番号８５に示されるフォワードプライマー（hLIF+4）と、配列番号８６に示されるリバースプライマー（MKM(16)Ec-TDH3p-1c）を用いてＰＣＲを行い、配列番号８７に示されるｈＬＩＦアミノ酸配列の１番目のメチオニンと２番目のリジンの間に配列番号１に示されるアミノ酸配列を導入した、変異ペプチド（ＭＫＭ１６Ｅ－２Ｋ）と、ＦＬＡＧタグと、ＵＲＡ３マーカーと、ＫｍＣｅｎＤと、ＫｍＡＲＳ７と、ＡＤＥ２マーカーと、ＴＤＨプロモーターとをコ

ードするＤＮＡ断片（MKM16E-2K-hLIF-FLAG-URA3-KmCenD-KmARS7-ADE2-TDH3）を作製した。また、得られたＤＮＡ断片（hLIF-FLAG-URA3-KmCenD-KmARS7-ADE2-TDH3）をテンプレートとし、配列番号８８に示されるフォワードプライマー（hLIF+58）と、配列番号８６に示されるリバースプライマー（MKM(16)Ec-TDH3p-1c）を用いてＰＣＲを行い、配列番号８７に示されるｈＬＩＦアミノ酸配列の２番目～１９番目のアミノ酸を配列番号１に示されるアミノ酸配列に置換した変異ペプチド（ＭＫＭ１６Ｅ－２０Ｇ）と、ＦＬＡＧタグと、ＵＲＡ３マーカーと、ＫｍＣｅｎＤと、ＫｍＡＲＳ７と、ＡＤＥ２マーカーと、ＴＤＨプロモーターとをコードするＤＮＡ断片（MKM16E-20G-hLIF-FLAG-URA3-KmCenD-KmARS7-ADE2-TDH3）を作製した。さらに、得られたＤＮＡ断片（hLIF-FLAG-URA3-KmCenD-KmARS7-ADE2-TDH3）をテンプレートとし、配列番号８９に示されるフォワードプライマー（hLIF+79）と、配列番号８６に示されるリバースプライマー（MKM(16)Ec-TDH3p-1c）を用いてＰＣＲを行い、配列番号８７に示されるｈＬＩＦアミノ酸配列の２番目～２６番目のアミノ酸を配列番号１に示されるアミノ酸配列に置換した変異ペプチド（ＭＫＭ１６Ｅ－２７Ｉ）と、ＦＬＡＧタグと、ＵＲＡ３マーカーと、ＫｍＣｅｎＤと、ＫｍＡＲＳ７と、ＡＤＥ２マーカーＴＤＨと、プロモーターとをコードするＤＮＡ断片（MKM16E-27I-hLIF-FLAG-URA3-KmCenD-KmARS7-ADE2-TDH3）を作製した。

[0068] 作製した変異ペプチドをコードする３つのＤＮＡ断片をクルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ３９０８株にそれぞれ導入し、ウラシル欠損培地で培養し、生育した株を形質転換体として選択した。ＭＫＭ１６Ｅ－２Ｋをコードするｄｎａ断片を導入して得られたアデニン、ウラシル非栄養要求性形質転換体をＲＡＫ１１６１６、ＭＫＭ１６Ｅ－２０Ｇをコードするｄｎａ断片を導入して得られたアデニン、ウラシル非栄養要求性形質転換体をＲＡＫ１１６１８、ＭＫＭ１６Ｅ－２７Ｉをコードするｄｎａ断片を導入して得られたアデニン、ウラシル非栄養要求性形質転換体をＲＡＫ１１６２０と命名して保存した。それぞれの株の遺伝子型を表６に示す。

[0069] [表6]

Strain	Genotype
RAK3908	*ura3-1 ade2-1*
RAK10252	*ura3-1 ade2-1 p[ScURA3-1c-KmCenD/ARS7-ScADE2-1-ScTDH3p-hLIF-DYKDDDDK]*
RAK11616	*ura3-1 ade2-1 p[ScURA3-1c-KmCenD/ARS7-ScADE2-1-ScTDH3p-MKM16E-hLIF+4-DYKDDDDK]*
RAK11618	*ura3-1 ade2-1 p[ScURA3-1c-KmCenD/ARS7-ScADE2-1-ScTDH3p-MKM16E-hLIF+58-DYKDDDDK]*
RAK11620	*ura3-1 ade2-1 p[ScURA3-1c-KmCenD/ARS7-ScADE2-1-ScTDH3p-MKM16E-hLIF+79-DYKDDDDK]*

[0070] （ウェスタンブロッティング解析）

クルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ１１６１６株、ＲＡＫ１１６１８株、ＲＡＫ１１６２０株それぞれをＹＰＤ培地で１５０ｒｐｍ、２８℃で２日間振とう培養した。培地を１２，０００ｇで１０分間遠心し、４００μｌの上澄み液を得た。かかる上澄み液に５００μｌのアセトンを加えてタンパク質を沈殿させた。１２，０００ｇで１０分間遠心後、沈殿を４０ｍｌのＳＤＳ－ＰＡＧＥサンプルバッファー（５％　２－メルカプトエタノール含有Ｌａｅｍｍｌｉサンプルバッファー：バイオラッド社製）で溶解し、その後Ｌａｅｍｍｌｉサンプルバッファー（バイオラッド社製）で１０倍に希釈後に９５℃で３０分間加熱した。

[0071] ＳＤＳ－ＰＡＧＥはカセット電気泳動槽（コスモ・バイオ社製）とＳｕｐｅｒＳｅｐ　Ａｃｅ　１７ウェル（和光純薬工業社製）を用いて行った。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後、タンパク質はimmobilon PVDF膜（ミリポア社製）に転写した。抗体反応においては、抗ＦＬＡＧモノクローナル抗体１Ｅ６（和光純薬工業社製）を用い、発光試薬としてはImmnostar（登録商標）Zeta（和光純薬工業社製）を用いて行った。ウェスタンブロッティング解析の結果を図９に示す。

（結果）

[0072] 図９に示すように野生型（Wild type）のｈＬＩＦを発現させた場合にはバンドが検出されず、ｈＬＩＦタンパク質が分泌していなかったが、配列番号１に示されるアミノ酸配列を有する変異ｈＬＩＦタンパク質を発現させた場合にはバンドが検出され、ｈＬＩＦタンパク質が分泌されていることが明ら

かとなった。したがって、本発明のシグナルペプチドは、ＧＬｕｃだけでなく、酵母での分泌が難しいｈＬＩＦを細胞外へ分泌する能力を有することが明らかとなった。

実施例 3

[0073] ［サッカロマイセス・セレビシエでの分泌］

実施例１、２においては酵母としてクルイベロマイセス・マルシアヌスを用いたが、他の酵母においても本発明の分泌シグナルペプチドが同様に機能することを確かめるため、本発明の分泌シグナルペプチドを有するＧＬｕｃをサッカロマイセス・セレビシエで発現させて、ＧＬｕｃの分泌を調べた。

[0074] （形質転換体の作製）

まず、変異ペプチド（MKM16）をコードするＤＮＡ断片を用いて作製したクルイベロマイセス・マルシアヌスＲＡＫ３９０８株の形質転換体であるＲＡＫ８７７２株、及び野生型ペプチド（MGVKV）をコードするＤＮＡを有するＲＡＫ６２０５株それぞれのＤＮＡをテンプレートとして、配列番号９０に示されるフォワードプライマー(TDH3-572)と配列番号９１に示されるリバースプライマー(3CG9-yGLuc+558c)を用いて１ｓｔＰＣＲを行い、ＳｃＴＤＨプロモーターとMKM16シグナル配列とｙＧＬｕｃとをコードするＤＮＡ断片、及びＳｃＴＤＨ３プロモーターとｙＧＬｕｃをコードするＤＮＡ断片を得た。得られたそれぞれの１ｓｔＰＣＲ産物をテンプレートとして、相同組換えのためのＳｃＵＲＡ３のＣ末部分の配列を付加するために配列番号９０に示されるフォワードプライマー(TDH3-572)と配列番号９２に示されるリバースプライマー(ScURA3(717786TAA)-3CG9)を用いて２ｎｄＰＣＲを行い、ＳｃＴＤＨプロモーターとMKM16シグナル配列とｙＧＬｕｃとＳｃＵＲＡ３の一部をコードするＤＮＡ断片、及びＳｃＴＤＨ３プロモーターとｙＧＬｕｃとＳｃＵＲＡ３の一部をコードするＤＮＡ断片を得た。ベクターＤＮＡは、YEpGAP-cherry plasmid DNA(Keppler-Ross et al., Genetics 179:705-710(2008))をテンプレートとして、配列番号５に示されるフォワードプライマー(URA3+771c)と配列番号２９に示されるリバースプライマー(TDH3-1c40)を用いてＰＣＲを行

うことで調製した。１ｓｔ、２ｎｄＰＣＲは、ＫＯＤ　ＦＸ　ｎｅｏ（東洋紡社製）を用い、そのプロトコールに従って行った。

[0075] それぞれの２ｎｄＰＣＲ産物、及びベクターＤＮＡを混合してサッカロマイセス・セレビシエＢＹ４７００株を形質転換し、ウラシル欠損培地に塗布後に２８℃で２－３日培養し、生育した形質転換体をそれぞれＲＡＫ１１９１１、ＲＡＫ１１９０８と命名した。ＢＹ４７００、ＲＡＫ１１９１１株、ＲＡＫ１１９０８株の遺伝子型を表７に示す。

[0076] [表7]

Strain	Genotype
BY4700	MATa ura3Δ0
RAK11908	MATa ura3Δ0 YEp-ScTDH3p-yGLuc-ScURA3
RAK11911	MATa ura3Δ0 YEp-ScTDH3p-M16:yGLuc-ScURA3

[0077] ＲＡＫ１１９１１株、ＲＡＫ１１９０８株をＹＰＢ培地で培養して培養液上澄みのルシフェラーゼ活性を、GloMax（登録商標）20/20ルミノメーター（プロメガ社製）を用いた以外は実施例１と同様の方法により測定した。結果を表８に示す。表中、ＷＴはＲＡＫ１１９０８株、M^{16}はＲＡＫ１１９１１株の培養液上澄みにおけるＧＬｕｃである。

[0078] [表8]

Name	シグナル配列	$\times 10^5$ RLU±SE	Fold	n/N
WT	MGVKVLFALICIAVAE	4.2 ± 0.8	1	24/24
M^{16}	MKMMMMMMMMMMMMMMME	6450.9 ± 1027.9	1513	15/15

RLU:relativeluminescence units (value/(μl·sec·OD600))
Fold:ratio of GLuc activity with artificialsignal sequence per wild type activity
n:number of transformants used for calculation
N:number of transformants measured

[0079] 表８から明らかなように、ＲＡＫ１１９０８株の培養液上澄みに対してＲＡＫ１１９１１株の培養液上澄みにおいて１５１３倍ものルシフェラーゼ活性が検出され、本発明のシグナルペプチドはサッカロマイセス・セレビシエにおいても発現したタンパク質を細胞外に分泌する能力が高いことが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0080] 本発明の分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡは、有用タンパク質の高分泌生産に利用される。

請求の範囲

[請求項1] 次の（ａ）又は（ｂ）に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドをコードするＤＮＡ。

（ａ）式（Ｉ）に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチド；

Ｘ－$Ｍ_1$－$Ｍ_2$・・・－$Ｍ_i$－Ｅ　式（Ｉ）

（式（Ｉ）中、Ｘはリジン又はアルギニンを示し、Ｍはメチオニンを示し、Ｅはグルタミン酸を示し、ｉは１２～１７の整数を示す）

（ｂ）上記式（Ｉ）において１又は２個のメチオニンが疎水性アミノ酸に置換したアミノ酸配列からなり、酵母細胞で発現した目的タンパク質を細胞外に分泌する能力を有する分泌シグナルペプチド；

[請求項2] 配列番号１に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチドをコードする請求項１記載のＤＮＡ。

[請求項3] 請求項１又は２記載のＤＮＡを含む酵母用組換えベクター。

[請求項4] 目的タンパク質をコードするＤＮＡを含む請求項３記載の組換えベクター。

[請求項5] 請求項４記載の組換えベクターを含む酵母の形質転換体。

[請求項6] 請求項５記載の形質転換体を培養し、培養液から目的タンパク質を回収することを特徴とする目的タンパク質の生産方法。

[請求項7] 次の（ａ）又は（ｂ）に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチド。

（ａ）式（Ｉ）に示されるアミノ酸配列からなる分泌シグナルペプチド；

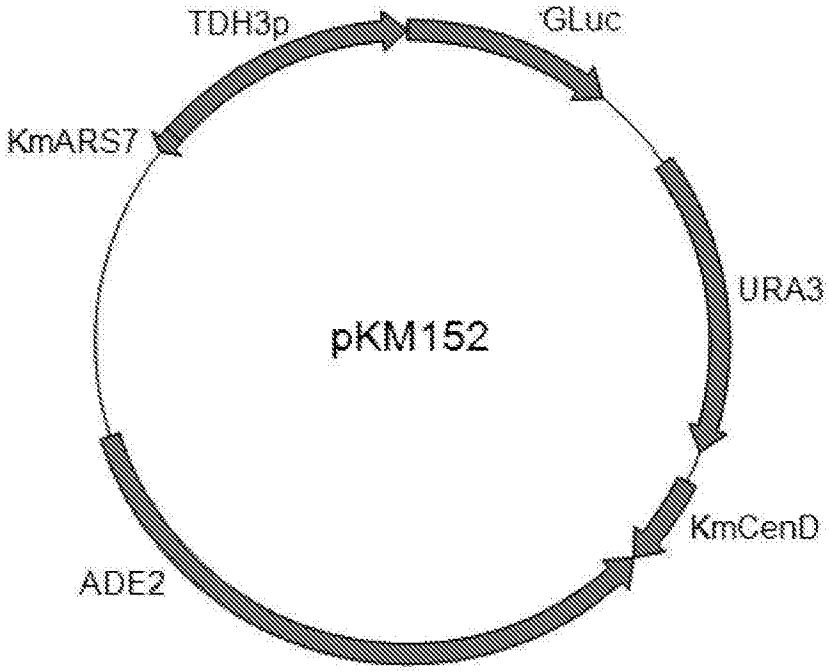
Ｘ－$Ｍ_1$－$Ｍ_2$－・・・－$Ｍ_i$－Ｅ　式（Ｉ）

（式（Ｉ）中、Ｘはリジン又はアルギニンを示し、Ｍはメチオニンを示し、Ｅはグルタミン酸を示し、ｉは１２～１７の整数を示す）

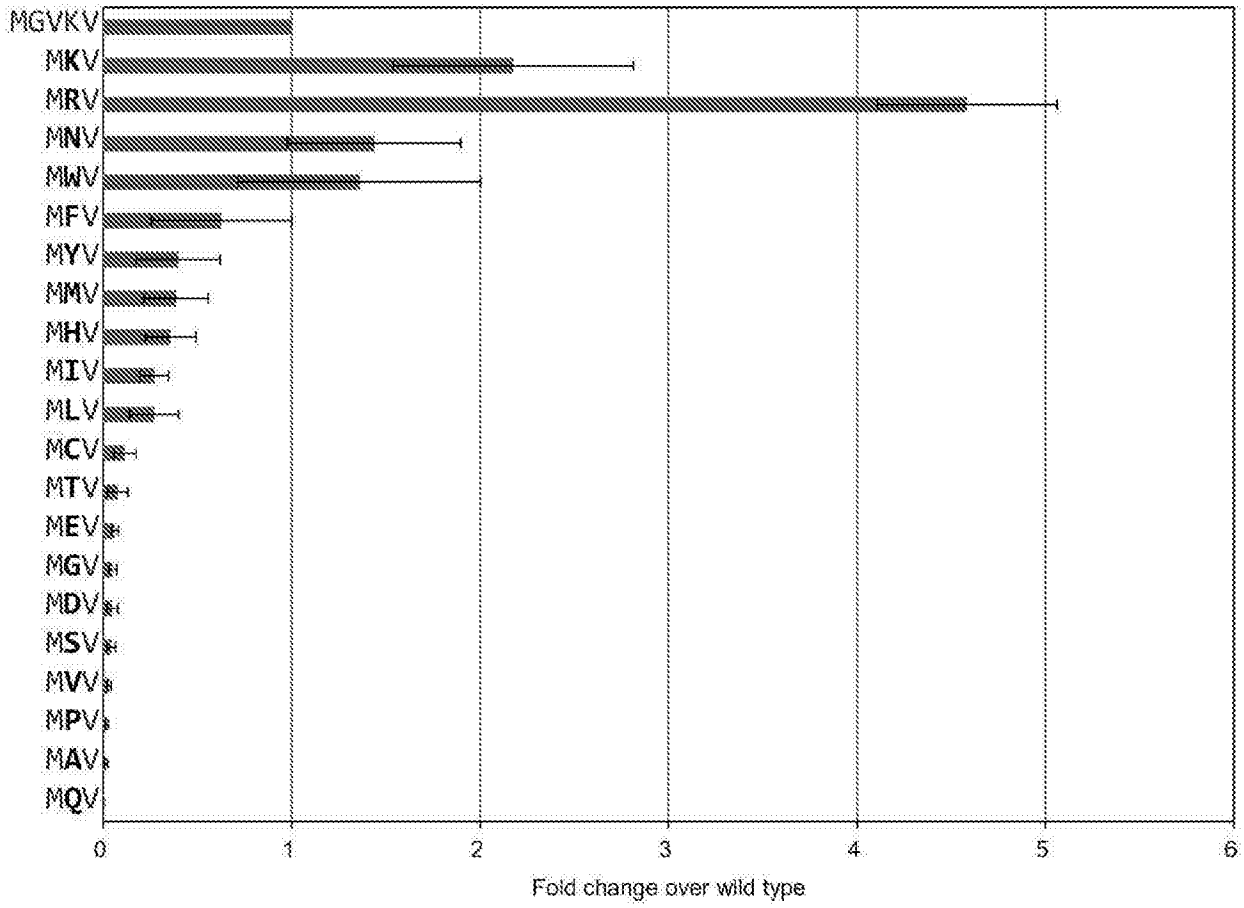
（ｂ）上記式（Ｉ）における１又は２個のメチオニンが疎水性アミノ酸に置換したアミノ酸配列からなり、酵母細胞で発現した目的タンパ

ク質を細胞外に分泌する能力を有する分泌シグナルペプチド；

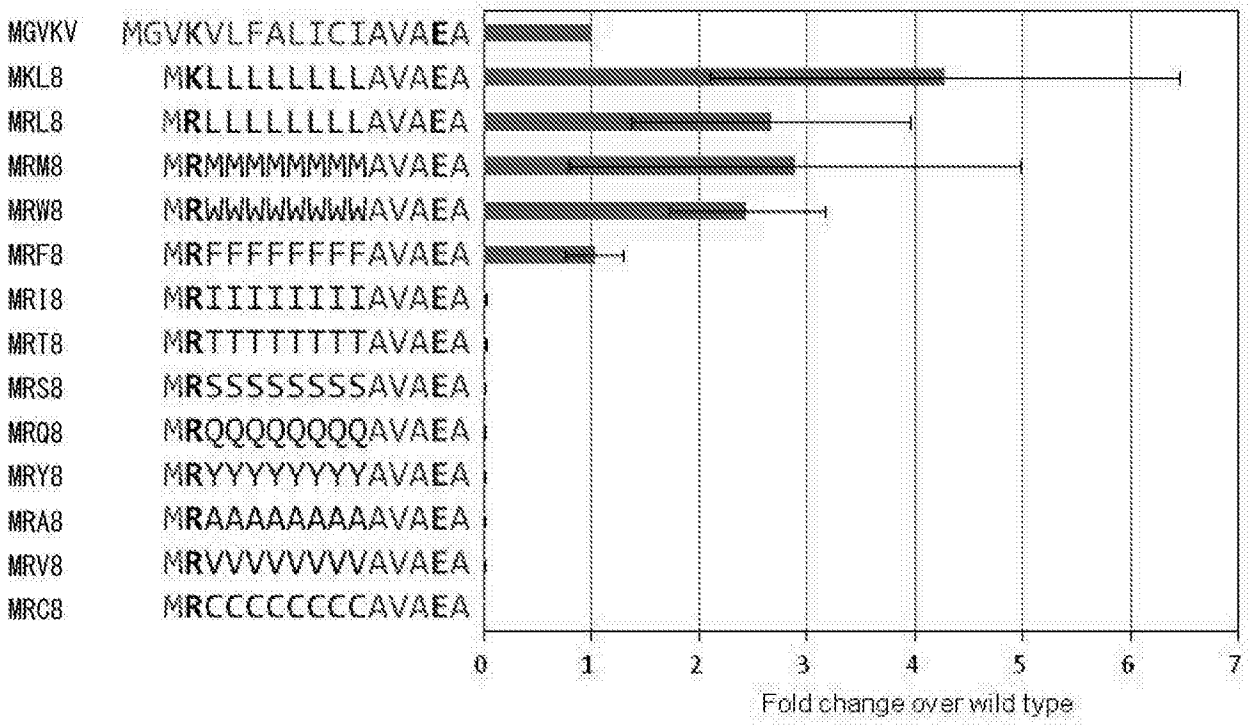
[図1]


TDH3p
GLuc
KmARS7
URA3
pKM152
KmCenD
ADE2

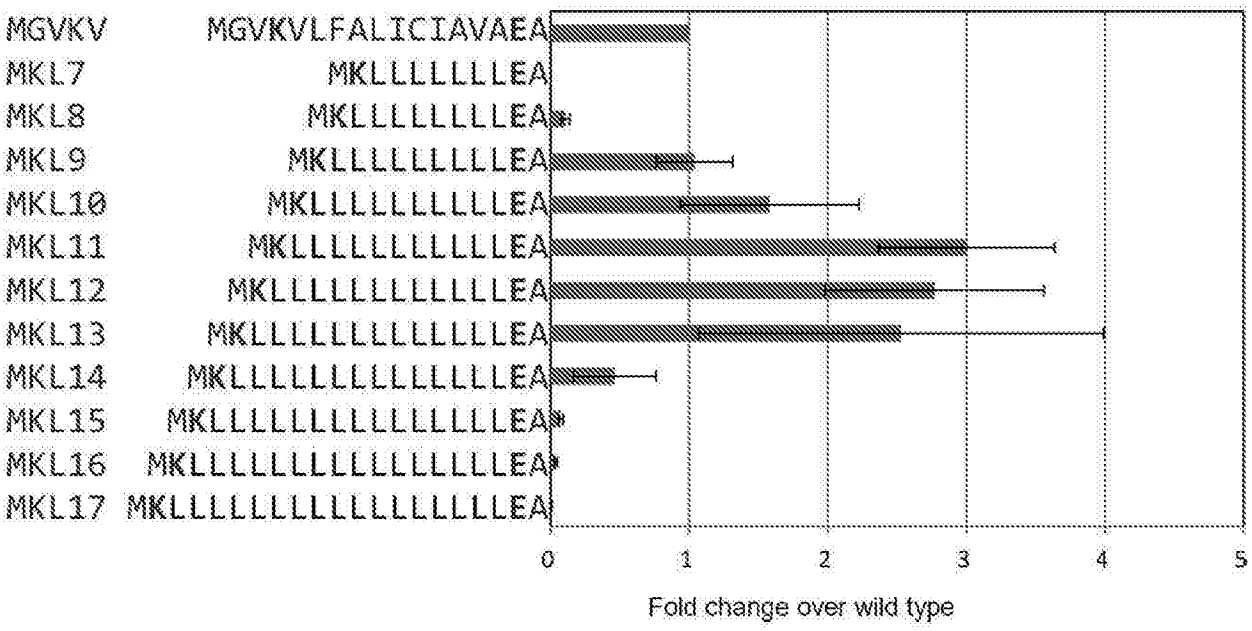
[図2]


MGVKV
MKV
MRV
MNV
MWV
MFV
MYV
MMV
MHV
MIV
MLV
MCV
MTV
MEV
MGV
MDV
MSV
MVV
MPV
MAV
MQV
0
1
2
3
4
5
6
Fold change over wild type

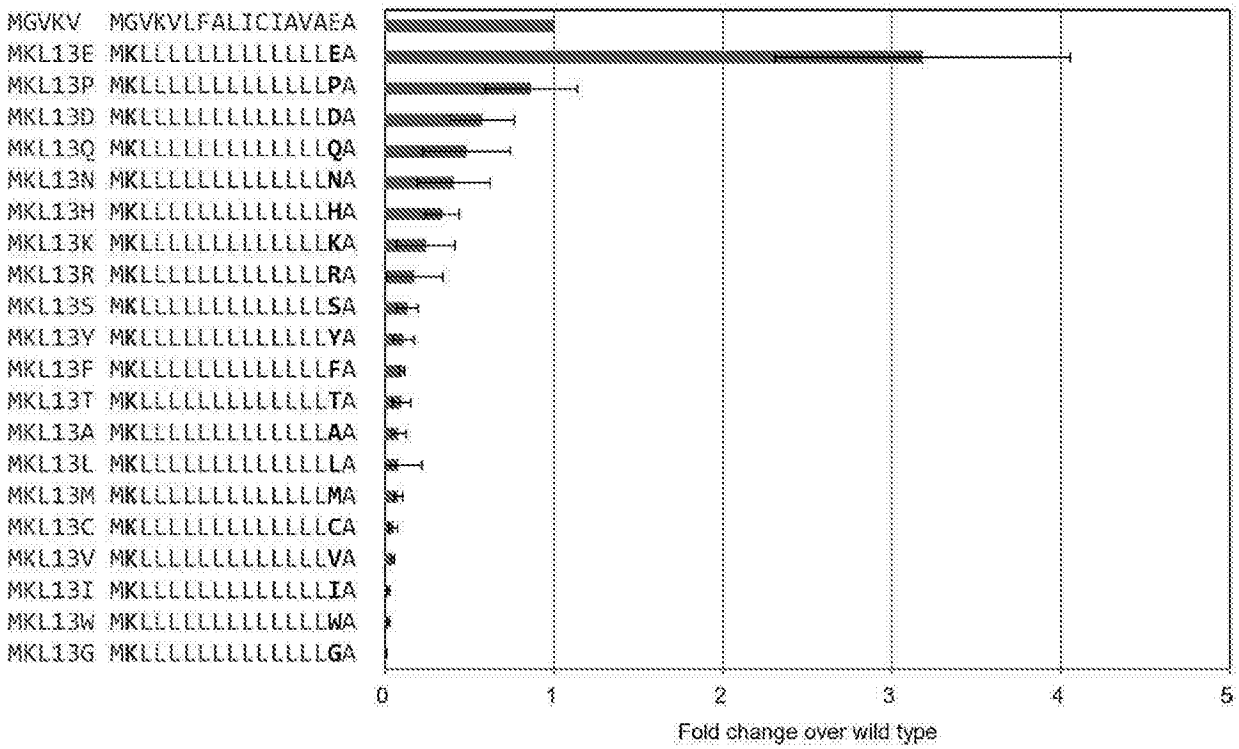
[図3]


MGVKV MGVKVLFALICIAVAEA
MKL8 MKLLLLLLLLAVAEA
MRL8 MRLLLLLLLLAVAEA
MRM8 MRMMMMMMMMAVAEA
MRW8 MRWWWWWWWWAVAEA
MRF8 MRFFFFFFFFAVAEA
MRI8 MRIIIIIIIIAVAEA
MRT8 MRTTTTTTTTAVAEA
MRS8 MRSSSSSSSSAVAEA
MRQ8 MRQQQQQQQQAVAEA
MRY8 MRYYYYYYYYAVAEA
MRA8 MRAAAAAAAAAVAEA
MRV8 MRVVVVVVVVAVAEA
MRC8 MRCCCCCCCCAVAEA
0 1 2 3 4 5 6 7
Fold change over wild type

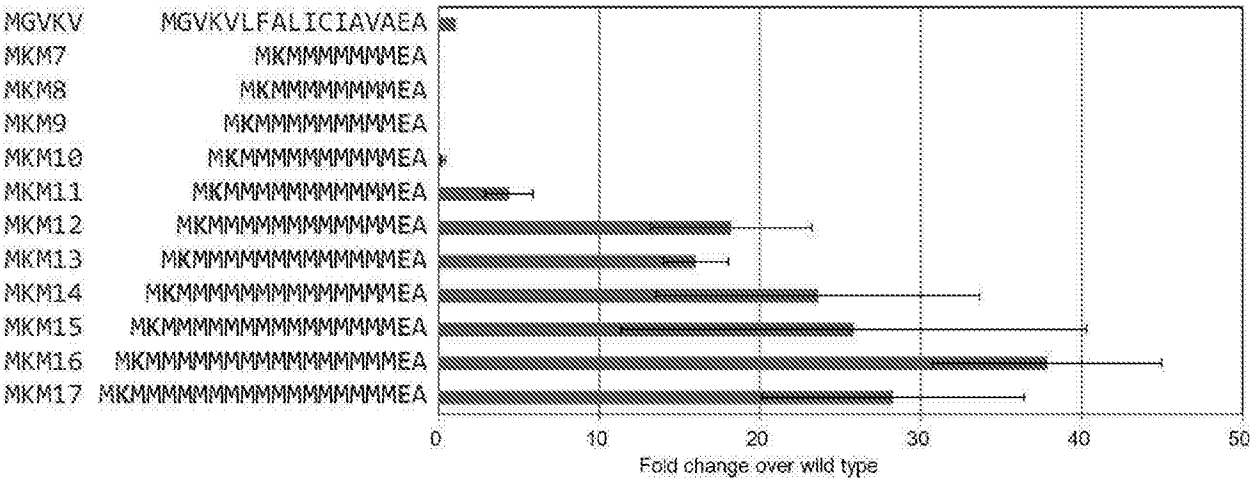
[図4]


MGVKV MGVKVLFALICIAVAEA
MKL7 MKLLLLLLLEA
MKL8 MKLLLLLLLEA
MKL9 MKLLLLLLLLEA
MKL10 MKLLLLLLLLLEA
MKL11 MKLLLLLLLLLLEA
MKL12 MKLLLLLLLLLLEA
MKL13 MKLLLLLLLLLLLEA
MKL14 MKLLLLLLLLLLLLEA
MKL15 MKLLLLLLLLLLLLLEA
MKL16 MKLLLLLLLLLLLLLLEA
MKL17 MKLLLLLLLLLLLLLLLEA
0 1 2 3 4 5
Fold change over wild type

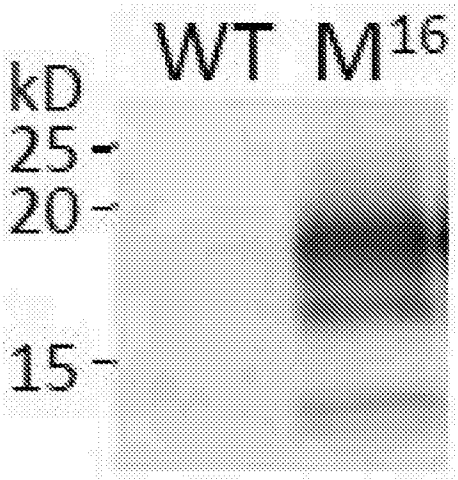
[図5]


MGVKV MGVKVLFALICIAVAEA
MKL13E MKLLLLLLLLLLLLLEA
MKL13P MKLLLLLLLLLLLLPA
MKL13D MKLLLLLLLLLLLLDA
MKL13Q MKLLLLLLLLLLLLQA
MKL13N MKLLLLLLLLLLLLNA
MKL13H MKLLLLLLLLLLLLHA
MKL13K MKLLLLLLLLLLLLKA
MKL13R MKLLLLLLLLLLLLRA
MKL13S MKLLLLLLLLLLLLSA
MKL13Y MKLLLLLLLLLLLLYA
MKL13F MKLLLLLLLLLLLLFA
MKL13T MKLLLLLLLLLLLLTA
MKL13A MKLLLLLLLLLLLLAA
MKL13L MKLLLLLLLLLLLLLA
MKL13M MKLLLLLLLLLLLLMA
MKL13C MKLLLLLLLLLLLLCA
MKL13V MKLLLLLLLLLLLLVA
MKL13I MKLLLLLLLLLLLLIA
MKL13W MKLLLLLLLLLLLLWA
MKL13G MKLLLLLLLLLLLLGA
0
1
2
3
4
5
Fold change over wild type

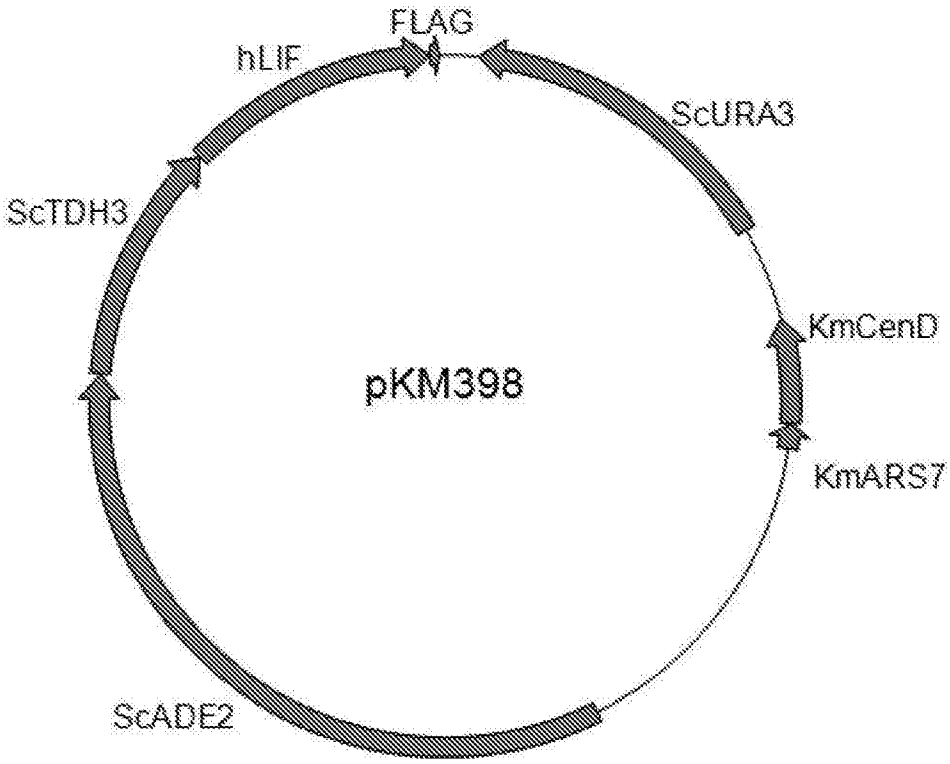
[図6]


MGVKV MGVKVLFALICIAVAEA
MKM7 MKMMMMMMMEA
MKM8 MKMMMMMMMMEA
MKM9 MKMMMMMMMMMEA
MKM10 MKMMMMMMMMMMEA
MKM11 MKMMMMMMMMMMMEA
MKM12 MKMMMMMMMMMMMMEA
MKM13 MKMMMMMMMMMMMMMEA
MKM14 MKMMMMMMMMMMMMMMEA
MKM15 MKMMMMMMMMMMMMMMMEA
MKM16 MKMMMMMMMMMMMMMMMMEA
MKM17 MKMMMMMMMMMMMMMMMMMEA
0
10
20
30
40
50
Fold change over wild type

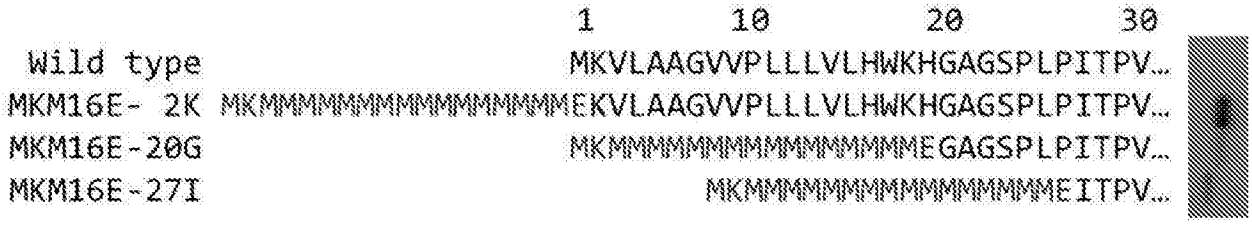
[図7]


WT
M16
kD
25
20
15

[図8]


FLAG
hLIF
ScURA3
ScTDH3
KmCenD
pKM398
KmARS7
ScADE2

[図9]


1 10 20 30
Wild type MKVLAAGVVPLLLVLHWKHGAGSPLPITPV…
MKM16E- 2K MKMMMMMMMMMMMMMMMMEKVLAAGVVPLLLVLHWKHGAGSPLPITPV…
MKM16E-20G MKMMMMMMMMMMMMMMMMEGAGSPLPITPV…
MKM16E-27I MKMMMMMMMMMMMMMMMMEITPV…

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/000762

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *C07K7/08*(2006.01)i, *C12N1/19*(2006.01)i, *C12P21/02*(2006.01)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)
C12N15/09, C07K7/08, C12N1/19, C12P21/02

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 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), UniProt/GeneSeq, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	YARIMIZU, T., et al., Synthetic signal sequences that enable efficient secretory protein production in the yeast Kluyveromyces marxianus, 2015.02.14, Microbial Cell Factories, Vol.14:20, p.1-14, entire text	1-7
A	US 2012/0238456 A1 (UNI'TARGETING RESEARCH AS), 20 September 2012 (20.09.2012), fig. 1 & WO 2011/018766 A1 & EP 2464728 A	1-7
A	JP 2007-520200 A (UNI'TARGETING RESEARCH AS), 26 July 2007 (26.07.2007), fig. 1 & US 2007/0142623 A1 & US 2012/0142090 A1 & WO 2005/001099 A2 & EP 1639111 A	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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	Date of mailing of the international search report
28 April 2015 (28.04.15)	19 May 2015 (19.05.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/000762

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	INOUYE, S., et al., Luminescence enhancement of the catalytic 19 kDa protein (KAZ) of Oplophorus luciferase by three amino acid substitutions, 2014 Feb., Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.445, p.157-162, abstract, fig. 1	1-7
A	SUZUKI, T., et al., Real-time bioluminescence imaging of a protein secretory pathway in living mammalian cells using Gaussia luciferase, 2007, FEBS Letters, Vol.581, p.4551-4556, page 4553, left column, 1st paragraph to right column, 1st paragraph, fig. 1	1-7

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０００７６２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i

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.　C12N15/09, C07K7/08, C12N1/19, C12P21/02

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　１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１５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）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamⅢ), UniProt/GeneSeq, PubMed

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
P,X	YARIMIZU, T., et al., Synthetic signal sequences that enable efficient secretory protein production in the yeast Kluyveromyces marxianus, 2015.02.14, Microbial Cell Factories, Vol.14:20, p.1-14 全文	１－７
A	US 2012/0238456 A1 (UNI'TARGETING RESEARCH AS) 2012.09.20 図１ & WO 2011/018766 A1 & EP 2464728 A	１－７

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　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の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	国際調査報告の発送日
２８．０４．２０１５	１９．０５．２０１５

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｂ　３９６３
福澤　洋光
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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
A	JP 2007-520200 A (ユニターゲッティング　リサーチ　エイエス) 2007.07.26 図１ & US 2007/0142623 A1 & US 2012/0142090 A1 & WO 2005/001099 A2 & EP 1639111 A	１－７
A	INOUYE, S., et al., Luminescence enhancement of the catalytic 19 kDa protein (KAZ) of Oplophorus luciferase by three amino acid substitutions, 2014 Feb., Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.445, p.157-162 要約および図１	１－７
A	SUZUKI, T., et al., Real-time bioluminescence imaging of a protein secretory pathway in living mammalian cells using Gaussia luciferase, 2007, FEBS Letters, Vol.581, p.4551-4556 第４５５３頁左欄第１段落－右欄第１段落および図１	１－７