



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119768501 A

(43) 申请公布日 2025.04.04

(21) 申请号 202380050450.9

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限

(22) 申请日 2023.06.27

公司 11322

(30) 优先权数据

专利代理人 龙淳 沈央

2022-102704 2022.06.27 JP

(51) Int.Cl.

C12N 1/15 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12P 21/00 (2006.01)

2024.12.27

C12N 15/31 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/023726 2023.06.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/004983 JA 2024.01.04

(71) 申请人 花王株式会社

地址 日本

(72) 发明人 一濑櫻子 柴田望 高桥史员

权利要求书1页 说明书19页

序列表（电子公布） 附图3页

(54) 发明名称

赤藓糖醇利用能力缺损的突变木霉属菌和
使用其的目标物质的制造方法

(57) 摘要

本发明涉及赤藓糖醇利用能力缺损的突变木霉属菌、和使用了该突变木霉属菌的目标物质的制造。一种赤藓糖醇利用能力降低或消失的突变木霉属菌，其中，在所述突变木霉属菌中，选自下述(A)～(D)中的至少1个多肽的表达降低或消失，并且，导入有编码目标物质或与其合成相关的酶的基因和与该基因的上游连接的赤藓糖醇诱导性启动子：(A)由序列号2的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽；(B)由序列号4的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽；(C)由序列号6的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽；和(D)由序列号8的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽。

A
CN 119768501

CN

1. 一种赤藓糖醇利用能力降低或消失的突变木霉属菌, 其中,

在所述突变木霉属菌中, 选自下述 (A) ~ (D) 中的至少1个多肽的表达降低或消失, 并且, 导入有编码目标物质或与其合成相关的酶的基因和与该基因的上游连接的赤藓糖醇诱导性启动子:

(A) 由序列号2的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽;

(B) 由序列号4的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽;

(C) 由序列号6的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽;

和

(D) 由序列号8的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽。

2. 如权利要求1所述的突变木霉属菌, 其中,

选自下述 (a) ~ (d) 中的至少1个基因的表达降低或消失:

(a) 由序列号1的核苷酸序列或与其具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的基因;

(b) 由序列号3的核苷酸序列或与其具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的基因;

(c) 由序列号5的核苷酸序列或与其具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的基因;

和

(d) 由序列号7的核苷酸序列或与其具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的基因。

3. 如权利要求1或2所述的突变木霉属菌, 其中,

赤藓糖醇利用能力与亲本木霉属菌相比, 降低至50%以下。

4. 如权利要求1~3中任一项所述的突变木霉属菌, 其中,

所述木霉属菌为里氏木霉或其突变株。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的突变木霉属菌, 其中,

所述赤藓糖醇诱导性启动子由选自下述 (i) 和 (ii) 的DNA构成:

(i) 由序列号13~16中的任一个核苷酸序列构成的DNA; 和

(ii) 由与序列号13~16中的任一个核苷酸序列具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的DNA。

6. 一种目标物质的制造方法, 其中,

包括:

将权利要求1~5中任一项所述的突变木霉属菌用含有赤藓糖醇的培养基进行培养的步骤; 和

从通过该培养得到的培养物回收目标物质的步骤。

7. 如权利要求6所述的方法, 其中,

所述培养基含有初始浓度0.001~10w/v%的赤藓糖醇。

8. 如权利要求6或7所述的方法, 其中,

所述培养基中所含的碳源为纤维素酶非诱导性碳源。

赤藓糖醇利用能力缺损的突变木霉属菌和使用其的目标物质的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及赤藓糖醇利用能力缺损的突变木霉属菌和使用该赤藓糖醇利用能力缺损的突变木霉属菌的目标物质的制造方法。

背景技术

[0002] 木霉属菌能够大量生产纤维素酶、木聚糖酶等酶,作为纤维素分解酶生产用微生物比以前更引人注目(非专利文献1)。例如,里氏木霉被期待利用其高的蛋白质生产能力,用于作为来自人或其它微生物的异种蛋白质的生产(参照非专利文献2)。

[0003] 使用微生物在工业上生产目标蛋白质时,大量使用葡萄糖、纤维素等的碳源。另一方面,在存在高浓度的碳源的条件下,菌受到渗透压刺激,其结果,使蛋白质生产率降低(非专利文献3)。为了防止由于渗透压刺激导致的目标物质生产率的降低,希望降低培养中的菌的渗透压刺激。报道了:酵母和丝状菌构巢曲霉在受到渗透压刺激时,在细胞内生成甘油、赤藓糖醇等的糖醇,提高细菌细胞的渗透压耐性,避免渗透压刺激(非专利文献4、5)。

[0004] 目前进行了使用里氏木霉而从纤维素系原料生产赤藓糖醇的研究(非专利文献6)。另一方面,报道了里氏木霉利用赤藓糖醇,并且其利用速度与葡萄糖为同等以上(非专利文献7)。木霉属菌的赤藓糖醇利用通路尚未阐明,但是本发明的发明人发现了在木霉属菌工作的赤藓糖醇诱导性启动子(专利文献1)。认为木霉属菌中,生产的赤藓糖醇被再次利用,在细胞内,赤藓糖醇无法长期保持。实际上,在现有文献中,里氏木霉仅能够实现数mg/L程度的赤藓糖醇生产(非专利文献6)。在专利文献2中,记载了在用于赤藓糖醇合成的改良微生物中,优选使编码里氏木霉的赤藓酮糖激酶(序列号19)、赤藓糖醇异构酶1和2(序列号23和25)等的基因失活。

[0005] (专利文献1)日本特愿2021-178778

[0006] (专利文献2)欧州专利申请公开第3929299号

[0007] (非专利文献1)化学和生物,2012,50(8):592-599,2012

[0008] (非专利文献2)Appl Biochem Biotechnol,2011,165(5-6):1169-1177

[0009] (非专利文献3)Fungal Biol,2010,114(10):855-862

[0010] (非专利文献4)日本酿造协会志,2010,105(10):618-627

[0011] (非专利文献5)J Bacteriol,1986,168(3):1358-1365

[0012] (非专利文献6)AMB Express,2014,4:34

[0013] (非专利文献7)Appl Environ Microbiol,2006,72(3):2126-2133

发明内容

[0014] 在一个方式中,本发明提供一种赤藓糖醇利用能力降低或消失的突变木霉属菌,其中,

[0015] 在所述突变木霉属菌中,选自下述(A)~(D)中的至少1个多肽的表达降低或消失,

并且，导入有编码目标物质或与其合成相关的酶的基因和与该基因的上游连接的赤藓糖醇诱导性启动子：

[0016] (A) 由序列号2的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽；

[0017] (B) 由序列号4的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽；

[0018] (C) 由序列号6的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽；和

[0019] (D) 由序列号8的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽。

[0020] 在另一个方式中，本发明提供使用了上述突变木霉属菌的目标物质的制造方法。

附图说明

[0021] [图1]赤藓糖醇、葡萄糖或山梨糖醇添加后的基因的相对表达量。(A) 122079基因、(B) 68466基因、(C) 68606基因、(D) 68585基因。0h:刚添加后, 2h:添加2小时后。

[0022] [图2]对122079基因、68466基因、68606基因、和68585基因缺损的木霉属突变株的培养物添加赤藓糖醇后的培养上清中赤藓糖醇浓度。

[0023] [图3]122079基因、68466基因、68606基因、和68585基因缺损的木霉属突变株中由细胞内的赤藓糖醇蓄积引起的对122079基因的表达量的影响。

[0024] [图4]122079基因、68466基因、68606基因、和68585基因缺损的木霉属突变株中由细胞内的赤藓糖醇蓄积引起的对68466基因的表达量的影响。

[0025] [图5]122079基因、68466基因、68606基因、和68585基因缺损的木霉属突变株中由细胞内的赤藓糖醇蓄积引起的对68606基因的表达量的影响。

[0026] [图6]122079基因、68466基因、68606基因、和68585基因缺损的木霉属突变株中由细胞内的赤藓糖醇蓄积引起的对68585基因的表达量的影响。

具体实施方式

[0027] 本说明书中所引用的全部专利文献、非专利文献和其它的发行物其整体在本说明书中作为参考引用。

[0028] 在本发明中，氨基酸序列或核苷酸序列的同一性根据Lipman-Pearson法(Science, 1985, 227:1435-1441)进行计算。具体而言，可以使用遗传信息处理软件GENETYX Ver.12的同源性分析程序，将Unit size to compare(ktup)设为2进行分析而算出。

[0029] 在本说明书中，关于氨基酸序列或核苷酸序列的“至少90%的同一性”是指90%以上、优选95%以上、更优选96%以上、进一步优选97%以上、进一步优选98%以上、进一步优选99%以上、进一步优选99.5%以上的同一性。

[0030] 本说明书中的“缺失、取代、添加或插入有1个或多个的氨基酸的氨基酸序列”是指缺失、取代、添加或插入有优选1个以上3个以下、更优选1个或2个的氨基酸残基的氨基酸序列。在本说明书中，氨基酸残基的“添加”包括向序列的一个末端和两个末端添加氨基酸残基。本说明书中的“缺失、取代、添加或插入有1个或多个核苷酸的核苷酸序列”是指缺失、取

代、添加或插入优选1个以上10个以下、更优选1个以上5个以下、进一步优选1个以上3个以下的核苷酸的核苷酸序列。在本说明书中，核苷酸的“添加”包括向序列的一个末端和两个末端添加核苷酸。

[0031] 在本说明书中，关于基因的“上游”和“下游”是指该基因的转录方向的上游和下游。例如，基因的“上游序列”、“下游序列”分别是指在DNA有义链中位于该基因的5'侧和3'侧的序列。例如，“与基因的上游连接的启动子”意味着在DNA有义链中在基因的5'侧存在启动子。

[0032] 在本说明书中，基因与启动子等调控区的“可操作连接”是指将基因和调控区以该基因能够在该调控区的控制下表达的方式连接。基因和调控区的“可操作连接”的方法对于本领域技术人员是公知的。

[0033] 在本说明书中，对于细胞的功能、性状、特质所使用的术语“本来”是为了表示该功能、性状、特质原本就存在于该细胞中而使用的。相对而言，术语“外来”是为了表示不是原本存在于该细胞而是从外部导入的功能、性状、特质而使用的。例如，“外来”核苷酸或DNA是从外部导入细胞内的核苷酸或DNA。外来核苷酸或DNA可以来自与导入其的细胞同种的生物，也可以来自异种的生物(即异种核苷酸或异种DNA)。

[0034] 在本说明书中，“赤藓糖醇利用相关基因”定义为通过其表达降低或消失从而木霉属细菌细胞的赤藓糖醇利用能力降低或消失的基因。木霉属菌的赤藓糖醇利用能力例如能够通过以下的方法测定：在含有赤藓糖醇作为单一碳源的培养基中培养木霉属菌，测定该菌的增殖速度；边在含有赤藓糖醇的培养基中培养木霉属菌，边适时测定培养基中的赤藓糖醇浓度，求出该菌摄取赤藓糖醇的速度；在含有赤藓糖醇的培养基中以规定时间培养木霉属菌后，测定菌体内的赤藓糖醇量，求出摄入菌内的赤藓糖醇不代谢为其它的物质而作为赤藓糖醇蓄积的量等。

[0035] 在本说明书中，“启动子活性”意味着促进DNA(基因)向mRNA转录的活性。启动子活性能够通过使用适当的报告基因进行确认。例如通过连接能够在启动子的下游检测的编码蛋白质的DNA、即报告基因，测定该报告基因的基因产物的生产量，能够确认启动子活性。作为报告基因的例子，可以列举 β -半乳糖苷酶(LacZ)基因、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS)基因、荧光素酶基因、 β -内酰胺酶基因、编码Et bC(2,3-二羟基-乙基苯1,2-双加氧酶(2,3-dihydroxy-ethylbenzene1,2-dioxygenase))的基因等对显色底物起作用的酶的基因、编码GFP(Green Fluorescent Protein,绿色荧光蛋白)的基因等的荧光蛋白质的基因等。或者，启动子活性也可以通过利用测序、定量RT-PCR等测定由报告基因转录的mRNA的表达量进行确认。

[0036] 在本说明书中，“赤藓糖醇诱导性启动子”是指在赤藓糖醇存在下具有启动子活性的启动子，优选是指在赤藓糖醇存在下能够诱导在赤藓糖醇不存在下或者在纤维素、葡萄糖或山梨糖醇存在下的情况的40倍以上，优选为50倍以上，更优选为100倍以上靶标基因(即该启动子可操作连接的基因)的mRNA的表达的启动子。

[0037] 本发明提供赤藓糖醇利用能力缺损的突变木霉属菌、和使用了该突变木霉属菌的目标物质的制造方法。

[0038] 如非专利文献4、5所记载的酵母和曲霉，在木霉属菌中，只要能够使赤藓糖醇在细胞内高效地蓄积即可，期待能够降低培养基中的碳源所引起的对细菌细胞的渗透压刺激降

低,能够改善由于渗透压刺激导致的目标物质的生产率降低。并且,本发明的发明人以前发现了在木霉属菌中工作的赤藓糖醇诱导性启动子,并且发现该启动子能够不促进木霉属菌的纤维素酶表达过程而诱导目标物质的基因的表达,因此,能够以更高纯度生产目标物质(专利文献1)。在使用该赤藓糖醇诱导性启动子的目标物质的生产中,也希望能够为了高效诱导目标物质的表达而在宿主木霉属菌中使赤藓糖醇蓄积。

[0039] 本发明的发明人从木霉属菌确定了在赤藓糖醇不添加条件下几乎不表达、在赤藓糖醇添加条件下表达显著提高的基因。缺失了这些基因的菌株中,赤藓糖醇在细胞内蓄积。这些基因推定为与木霉属菌的赤藓糖醇利用相关的基因。在使用了木霉属菌的目标物质的生产中,将缺失了上述的赤藓糖醇利用相关基因的突变木霉属菌在含有赤藓糖醇的培养基中培养,使赤藓糖醇在细胞内蓄积,则能够降低培养基中的碳源引起的渗透压刺激,能够改善渗透压刺激所导致的木霉属菌中的目标物质的生产率降低。

[0040] 另外,在使用木霉属菌等的丝状菌的目标物质的生产中,期望能够不促进细胞本来的纤维素酶生产过程地生产目标物质。本发明的发明人以前发现了在木霉属菌中工作的赤藓糖醇诱导性启动子(专利文献1)。赤藓糖醇不诱导木霉属细菌细胞本来具有的纤维素系生物质分解酶的表达(参照专利文献1的实施例)。在缺失了上述的赤藓糖醇利用相关基因的突变木霉属菌中导入与该赤藓糖醇诱导性启动子可操作地连接的目标基因,将其在含有赤藓糖醇的培养基进行培养,则在细胞内蓄积的赤藓糖醇能够不促进细胞本来的纤维素酶表达诱导过程,经由该赤藓糖醇诱导性启动子选择性诱导目标基因的表达。因此,本发明中,能够在木霉属菌中以更高的纯度和更高的收量生产目标物质。

[0041] 本发明提供赤藓糖醇利用能力缺损的突变木霉属菌。本发明的赤藓糖醇利用能力缺损的突变木霉属菌(以下,也简称为“本发明的突变木霉属菌”)是以赤藓糖醇利用能力降低或消失的方式进行了改变的木霉属菌。本发明的突变木霉属菌的赤藓糖醇利用能力(在培养木霉属菌的培养基中添加赤藓糖醇2小时后该培养基中基于以HPLC测得的赤藓糖醇残存量算出的赤藓糖醇减少率)与亲本木霉属菌(被改变为该赤藓糖醇利用能力缺损之前的木霉属菌)相比,优选降低至50%以下、更优选降低至70%以下、进一步优选降低至90%以下。

[0042] 由本发明提供的赤藓糖醇利用能力缺损的突变木霉属菌对于培养培养基中的碳源所引起的渗透压刺激的耐性提高,并且,赤藓糖醇能够在细胞内以更高浓度蓄积,因此,在使用了赤藓糖醇诱导性启动子的目标物质的制造中有利。

[0043] 在优选的一个实施方式中,本发明的突变木霉属菌是以与赤藓糖醇利用相关的多肽的表达降低或消失的方式改变的突变木霉属菌。在另外优选的一个实施方式中,本发明的突变木霉属菌是以与赤藓糖醇利用相关的基因的表达降低或消失的方式改变的突变木霉属菌。如后述的实施例1所示,作为木霉属菌中的赤藓糖醇利用相关基因,确定了以下的基因。另外,以下的基因所编码的多肽是木霉属菌中与赤藓糖醇利用相关的多肽。此外,本说明书中的木霉属菌的基因的名称能够根据Ensembl Fungi数据库(fungi.ensembl.org/Trichoderma_reesei/Info/Index/)来确定。

[0044]	GENE ID	SEQ ID:No		推定功能
		基因	肽	
	TRIREDRAFT_122079	1	2	预测蛋白
	TRIREDRAFT_68466	3	4	甘油酮激酶
	TRIREDRAFT_68606	5	6	磷酸丙糖异构酶
	TRIREDRAFT_68585	7	8	半乳糖-6-磷酸异构酶

[0045] 因此,在本发明的突变木霉属菌中,作为表达降低或消失的与赤藓糖醇利用相关的多肽的例子,可以列举下述(A)~(D):

[0046] (A)由序列号2的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽;

[0047] (B)由序列号4的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽;

[0048] (C)由序列号6的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽;和

[0049] (D)由序列号8的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽。

[0050] 作为由与序列号2、4、6或8的氨基酸序列具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽的例子,可以分别列举由对序列号2、4、6或8的氨基酸序列缺失、取代、添加或插入有1个或多个氨基酸的氨基酸序列构成的多肽。

[0051] 另外,在本发明的突变木霉属菌中,作为表达降低或消失的赤藓糖醇利用相关基因的例子,可以列举下述(a)~(d):

[0052] (a)由序列号1的核苷酸序列或与其具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的基因;

[0053] (b)由序列号3的核苷酸序列或与其具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的基因;

[0054] (c)由序列号5的核苷酸序列或与其具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的基因;和、

[0055] (d)由序列号7的核苷酸序列或与其具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的基因。

[0056] 作为由与序列号1、3、5或7的核苷酸序列具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的基因的例子,可以分别列举由对序列号1、3、5或7的核苷酸序列缺失、取代、添加或插入有1个或多个核苷酸的核苷酸序列构成的基因。

[0057] 在一个实施方式中,在本发明的突变木霉属菌中,选自上述(A)~(D)中的至少1个多肽的表达降低或消失即可。在另外的一个实施方式中,在本发明的突变木霉属菌中,选自上述(a)~(d)中的至少1个基因的表达降低或消失即可。在一个实施方式中,本发明的突变木霉属菌中上述(a)~(d)的任一基因的表达量与亲本木霉属菌相比,优选降低至50%以下、更优选降低至70%以下、进一步优选降低至90%以下。基因的表达量能够通过实时PCR

进行定量。

[0058] 作为本发明的突变木霉属菌的亲本木霉属菌的例子,可以列举里氏木霉、长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、康氏木霉(*Trichoderma koningii*)、绿色木霉(*Trichoderma viride*)等,优选列举里氏木霉及其突变株。例如,作为亲本木霉属菌能够优选使用里氏木霉QM9414株及其突变株、优选里氏木霉PC-3-7株(ATCC66589)、里氏木霉PCD-10株(FERM P-8172)、里氏木霉E1AB1株(有时也称为JN13株)或这些的突变株等。E1AB1株是对里氏木霉PC-3-7株使用eg11启动子表达来自棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)的 β -葡萄糖苷酶(BGL)的株(参照Enzyme Microb Technol, 2016, 82:89-95、和W02013/115305的实施例1~3)。

[0059] 作为用于使木霉属菌中的与赤藓糖醇利用相关的基因或多肽的表达降低或消失的方法,例如,可以列举使该木霉属细菌细胞中的赤藓糖醇利用相关基因缺失或失活;使从该基因转录的mRNA失活;或抑制从该基因的mRNA翻译为蛋白;等。作为使木霉属细菌细胞中的靶标基因缺失或失活的方法,可以列举将该靶标基因的核苷酸序列的一部分或全部从基因组中除去或替换为其它核苷酸序列的方法;在该靶标基因的序列中插入其它的聚核苷酸片段的方法;对该靶标基因的转录起始区域或翻译起始区域加入突变的方法等。

[0060] 优选使该靶标基因的核苷酸序列的一部分或全部缺失。作为更具体的例子,可以列举:使木霉属细菌细胞的基因组上的赤藓糖醇利用相关基因或者其转录起始区域或翻译起始区域部位特异性缺失或失活的方法;和在木霉属细菌细胞中的基因添加随机的缺失或失活突变后,选择具有所期望的突变的细胞的方法。作为用于向基因组上的靶标区域的突变导入、核苷酸序列的除去、取代或插入的具体的方法,能够列举部位特异性突变导入、同源重组法、SOE(重叠延伸剪切, splicing by overlap extension)-PCR法(Gene, 1989, 77: 61-68)等。作为使细胞中的基因随机缺失或失活的方法,可以列举:将随机克隆了失活的基因的DNA片段导入细胞中,与该细胞的基因组上的基因之间发生同源重组的方法、对细胞照射紫外线、 γ 射线等而诱发突变的方法等。根据需要,对导入了突变的木霉属菌,进行赤藓糖醇利用能力的评价、或基因解析,选择具有所期望的突变的木霉属菌。赤藓糖醇利用能力的评价的步骤如上所述。

[0061] 作为使细胞中的靶标基因的mRNA失活的方法,可以列举使用siRNA的靶标特异性的mRNA抑制。siRNA的基本步骤对于本领域技术人员来说是公知的(例如,参照特表2007-512808号公报),并且,用于siRNA的试剂或试剂盒有市售。本领域技术人员能够基于公知的文献、市售制品的操作手册来制备所期望的靶标特异性的siRNA,抑制靶标mRNA。

[0062] 本发明的突变木霉属菌能够在目标物质的制造中利用。典型而言,能够通过将本发明的突变木霉属菌作为宿主,在其中导入编码目标物质或与其合成相关的酶的基因并使其表达,来制造目标物质。为了促进所导入的基因的表达,优选将该基因与在木霉属菌中工作的启动子可操作连接。

[0063] 在优选的实施方式中,本发明的突变木霉属菌是如下的重组木霉属菌:与赤藓糖醇利用相关的多肽的表达降低或消失,并且,导入了编码目标物质或与其合成相关的酶的基因和与该基因的上游可操作连接的赤藓糖醇诱导性启动子。作为该赤藓糖醇诱导性启动子,可以列举选自以下的(i)~(ii)且赤藓糖醇存在下具有启动子活性的DNA。

[0064] (i)由序列号13~16中的任一个核苷酸序列构成的DNA;和

[0065] (ii) 由与序列号13～16中的任一个核苷酸序列具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的DNA；

[0066] 作为由与序列号13～16中的任一个核苷酸序列具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的DNA的例子，可以分别列举由对序列号13～16的核苷酸序列缺失、取代、添加或插入有1个或多个核苷酸的核苷酸序列构成的DNA。

[0067] 序列号13～16的启动子是由本发明的发明人发现的来自里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的启动子，分别是上述的序列号1～4的赤藓糖醇利用相关基因的启动子(专利文献1)。序列号13～16的启动子是在木霉属菌中首次发现的赤藓糖醇诱导性启动子。

[0068] 作为上述赤藓糖醇诱导性启动子的获取方法，没有特别限制，可以利用通常的化学合成法或基因工程方法得到。例如，可以基于序列号13～16的核苷酸序列，人工合成上述启动子DNA。DNA的人工合成例如可以利用由GenScript公司等提供的市售的DNA合成服务。或者，上述启动子可以由里氏木霉等木霉属菌进行克隆。

[0069] 上述赤藓糖醇诱导性启动子还可以通过对序列号13～16的核苷酸序列的DNA导入突变来制造。作为突变导入的手法，例如，可以列举紫外线照射和部位特异性突变导入法。通过从导入了突变的DNA选自在赤藓糖醇存在下具有启动子活性的DNA，能够获取赤藓糖醇诱导性启动子。例如，通过在导入了突变的DNA的下游可操作地连接报告基因，在赤藓糖醇存在下进行该报告基因的表达量解析，能够选择赤藓糖醇诱导性启动子的DNA。

[0070] 通过使用上述的手法，能够获得由序列号13～16的核苷酸序列、或与它们具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的赤藓糖醇诱导性启动子、或者由对序列号13～16的序列缺失、取代、添加或插入有1个或多个核苷酸的核苷酸序列构成的赤藓糖醇诱导性启动子。

[0071] 在上述赤藓糖醇诱导性启动子可操作地连接编码目标物质或与其合成相关的酶的基因(以下称为目标基因)。例如，能够构建包含目标基因和与其上游连接的赤藓糖醇诱导性启动子的DNA片段。在该DNA片段中，除了上述启动子和目标基因之外还可以包含提高该启动子的转录活性的顺式元件、或终止子。另外，该DNA片段也可以包含药剂耐受性基因、营养要求性标记基因等选择标记基因。优选包含该目标基因和该赤藓糖醇诱导性启动子的DNA片段为用于表达该目标基因的赤藓糖醇诱导性基因表达盒。该DNA片段能够构建为在两个末端具有限制酶识别序列。使用该限制酶识别序列，能够将该DNA片段导入载体中。例如，利用限制酶将载体切断，向其添加在端部具有限制酶切断序列的该DNA片段，由此能够将该目标基因和赤藓糖醇诱导性启动子导入载体中(限制酶法)。

[0072] 上述包含目标基因和赤藓糖醇诱导性启动子的DNA片段可以直接导入宿主细胞的基因组。例如，可以将该DNA片段导入宿主细胞的基因组中目标基因的上游。另外，例如，可以将前述的包含目标基因和赤藓糖醇诱导性启动子的基因表达盒导入宿主细胞的基因组。

[0073] 或者，通过将上述赤藓糖醇诱导性启动子插入能够表达目标基因的表达载体，能够得到能够在转录水平提高该目标基因的表达的表达载体。在该表达载体中，该赤藓糖醇诱导性启动子可以与该目标基因的上游可操作地连接。该表达载体可以是用于导入宿主细胞的基因组的载体，也可以是保持于基因组外的载体。优选为能够在宿主细胞内复制的载体。

[0074] 作为载体的例子，可以列举pBluescript II SK (-) (Stratagene)、pUC18/19、

pUC118/119等的pUC系载体(Takara Bio)、pET系载体(Takara Bio)、pGEX系载体(GE Healthcare)、pCold系载体(Takara Bio)、pHY300PLK(Takara Bio)、pUB110(Plasmid, 1986, 15 (2) : 93-103)、pBR322(Takara Bio)、pRS403(Stratagene)、pMW218/219(Nippon Gene)、pRI909/910等的pRI系载体(Takara Bio)、pBI系载体(Clontech)、IN3系载体(Implanta Innovations)、pPTR1/2(Takara Bio)、pDJB2(Gene, 1985, 36:321-331)、pAB4-1(Mol Gen Genet, 1987, 206:71-75)、pLeu4(Gene, 1989, 84:335-343)、pPyr225(Mol Genet Genomics, 2002, 268:397-406)、pFG1(Curr Genet, 1990, 18:447-451)、酵母表达载体pNAN8142(Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60:383-389)、pMA91(Biosci Biotechnol Biochem, 1998, 62:1615-1618)等。

[0075] 导入本发明的突变木霉属菌的目标基因只要是编码要使用本发明的突变木霉属菌制造的目标物质、或与其合成相关的酶的基因即可。该目标基因可以是编码异种表达产物的异种基因,也可以从外部导入的来自同种的基因,也可以是编码作为宿主的突变木霉属菌本来具有的表达产物的基因,也可以是编码其它的任意的蛋白质、肽、核酸等的基因。作为目标物质的例子,可以列举酶、激素、细胞因子、其它生理活性肽、转运体、非编码RNA等。作为酶的例子,可以列举氧化还原酶(Oxidoreductase)、转移酶(Transferase)、水解酶(Hydrolase)、裂解酶(Lyase)、异构酶(Isomerase)、合成酶(Ligase或Synthetase)等,作为优选例,可以列举纤维素酶、半纤维素酶等纤维素系生物质分解酶、外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶、蛋白酶、脂肪酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳糖酶(galactase)、淀粉酶等,更优选为纤维素酶或半纤维素酶。作为该半纤维素酶的例子,可以列举木聚糖酶、 β -木糖苷酶、 α -阿拉伯呋喃糖苷酶等,其中优选木聚糖酶。

[0076] 能够将包含上述目标基因和赤藓糖醇诱导性启动子的表达载体或DNA片段通过通常的转化法、例如电穿孔法、转化法、转染法、接合法、原生质体法、基因枪法、农杆菌法等导入至作为宿主的本发明的突变木霉属菌,由此得到本发明的重组木霉属菌。

[0077] 将所得到的重组木霉属菌在赤藓糖醇存在下培养,在上述赤藓糖醇诱导性启动子的控制下使目标基因表达,生产目标物质。目标物质的例子如上所述。

[0078] 上述重组木霉属菌的培养条件只要是该重组木霉属菌的细胞能够增殖和目标物质能够生产的条件即可,没有特别限定。该培养中所使用的培养基只要含有碳源、氮源、无机盐、维生素等、木霉属菌的增殖和目标物质的生产通常所需的成分即可,可以是合成培养基、天然培养基的任意种。该培养物中的赤藓糖醇的浓度以培养基中的初始浓度计,优选为0.001~10% (w/v),更优选为0.1~10% (w/v)。

[0079] 作为在培养基添加的碳源,为了避免刺激木霉属细菌细胞本来的纤维素酶表达诱导过程,希望使用纤维素酶非诱导性碳源。例如,能够使用葡萄糖、果糖等的纤维素酶非诱导性的糖质、山梨糖醇这样的糖醇、乙醇、甘油这样的醇类、乙酸这样的有机酸类等作为碳源。为了进一步降低细胞的分解代谢物阻遏并且生产目标物质,可以边流加葡萄糖等的纤维素酶非诱导性碳源边培养细胞。此时,将该纤维素酶非诱导性碳源、例如葡萄糖溶解于作为氮源的氨水或含有铵盐的水溶液中,将该溶解液流加于该培养基中进行培养,这在考虑培养效率、抑制培养中的起泡时是优选的。

[0080] 作为氮源,可以列举氨、硫酸铵等铵盐、胺等氮化合物、蛋白胨、大豆水解物这样的天然氮源等。作为无机盐,可以列举磷酸钾、硫酸镁、氯化钠、硫酸亚铁、碳酸钾等。作为维生

素,可以列举生物素、硫胺素等。根据需要,还可以添加上述重组木霉属菌生长所要求的物质。

[0081] 培养优选在振荡培养或通气搅拌培养这样的好气条件下进行。培养温度优选为10 °C以上、更优选为20°C以上、更优选为25°C以上、且优选为50°C以下、更优选为42°C以下、更优选为35°C以下。另外,优选为10~50°C、更优选为20~42°C、更优选为25~35°C。培养时的pH为3~9、优选为4~5。培养时间为10小时~10天、优选为2~7天。

[0082] 培养后,从培养物中回收目标物质,由此能够获取目标物质。根据需要,也可以对所回收的目标物质进一步进行精制。从培养物中回收或精制目标物质的方法没有特别限定,按照公知的回收或精制方法进行即可。例如,回收培养物,根据需要通过超声波或加压等进行菌体破碎处理,接着进行利用倾析法、过滤、离心分离等除去细胞成分后,回收残留的含有目标物质的组分即可。或者,使通过在木霉属菌中发挥功能的分泌信号肽与编码目标物质的基因可操作连接,能够在细胞外分泌生产该目标物质。

[0083] 根据需要,将所回收的组分供于透析、盐析、离子交换法、蒸馏、溶剂提取等方法、或它们的组合,从而能够对目标物质进行精制。在本发明的目标物质的制造方法中,重组木霉属菌的培养和目标物质的回收可以利用分批式、半分批式和连续式中的任意种方法进行。

[0084] 作为本发明的例示的实施方式,在本说明书中进一步公开以下的物质、制造方法、用途、方法等。但是,本发明并不限定于这些实施方式。

[0085] (1)一种赤藓糖醇利用能力降低或消失的突变木霉属菌,其中,

[0086] 选自下述(A)~(D)中的至少1个多肽的表达降低或消失:

[0087] (A)由序列号2的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽;

[0088] (B)由序列号4的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽;

[0089] (C)由序列号6的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽;和

[0090] (D)由序列号8的氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的氨基酸序列构成的多肽。

[0091] (2)如(1)所述的突变木霉属菌,其中,优选选自下述(A)~(D)中的至少1个基因的表达降低或消失:

[0092] (a)由序列号1的核苷酸序列或与其具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的基因;

[0093] (b)由序列号3的核苷酸序列或与其具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的基因;

[0094] (c)由序列号5的核苷酸序列或与其具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的基因;和

[0095] (d)由序列号7的核苷酸序列或与其具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的基因。

[0096] (3)如(1)或(2)所述的突变木霉属菌,其中,优选赤藓糖醇利用能力与亲本木霉属

菌相比,降低至50%以下。

[0097] (4)如(3)所述的突变木霉属菌,其中,优选上述赤藓糖醇利用能力以赤藓糖醇减少率规定:基于在培养木霉属菌的培养基中添加赤藓糖醇2小时后的该培养基中以HPLC测得的赤藓糖醇残存量算出。

[0098] (5)如(2)所述的突变木霉属菌,其中,优选上述(a)~(d)中的任一基因的表达量与亲本木霉属菌相比,降低至50%以下。

[0099] (6)如(1)~(5)中任一项所述的突变木霉属菌,其中,上述木霉属菌为里氏木霉或其突变株。

[0100] (7)如(1)~(6)中任一项所述的突变木霉属菌,其中,优选导入了编码目标物质或与其合成相关的酶的基因和与该基因的上游连接的赤藓糖醇诱导性启动子。

[0101] (8)如(7)所述的突变木霉属菌,其中,优选上述赤藓糖醇诱导性启动子由选自下述(i)和(ii)的DNA构成:

[0102] (i)由序列号13~16中的任一个核苷酸序列构成的DNA;和

[0103] (ii)由与序列号13~16中的任一个核苷酸序列具有至少90%的同一性的核苷酸序列构成的DNA。

[0104] (9)如(7)或(8)所述的突变木霉属菌,其中,优选上述目标物质为酶、激素、细胞因子、生理活性肽、转运体或非编码RNA。

[0105] (10)如(9)所述的突变木霉属菌,其中,上述酶优选为氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶或合成酶,

[0106] 更优选为纤维素酶、半纤维素酶、外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶、蛋白酶、脂肪酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳糖酶或淀粉酶,

[0107] 进一步优选为纤维素酶或半纤维素酶,

[0108] 且该半纤维素酶优选为木聚糖酶、 β -木糖苷酶或 α -阿拉伯呋喃糖苷酶。

[0109] (11)一种目标物质的制造方法,其中,包括:

[0110] 将上述(7)~(10)中任一项所述的突变木霉属菌用含有赤藓糖醇的培养基进行培养的步骤;和

[0111] 从通过该培养得到的培养物回收目标物质的步骤。

[0112] (12)如(11)所述的方法,其中,优选上述培养基含有初始浓度0.001~10% (w/v)的赤藓糖醇。

[0113] (13)如(11)或(12)所述的方法,其中,优选上述培养基中所含的碳源为纤维素酶非诱导性碳源。

[0114] (14)如(13)所述的方法,其中,优选上述纤维素酶非诱导性碳源为葡萄糖、果糖、糖醇、醇类或有机酸类。

[0115] (15)如(11)或(12)所述的方法,其中,优选在上述培养中,在上述培养基中流加在氨水或含有铵盐的水溶液中溶解有葡萄糖的溶解液。

[0116] 实施例

[0117] 以下,基于实施例更详细地说明本发明,但是本发明不限定于这些。

[0118] 实施例1赤藓糖醇利用相关基因的特定

[0119] (1)利用RNAseq解析的表达解析

[0120] 将里氏木霉(*T. reesei*)PC-3-7株以孢子数 1×10^5 个/mL在培养基中接种,以28°C、220rpm进行振荡培养(PRECI公司制PRXYg-98R)。培养基组成如下所述。3%纤维素、0.14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2% KH_2PO_4 、0.03% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1%Bacto蛋白胨、0.05%Bacto酵母提取物、0.1%Tween80、0.1%痕量元素2(Trace element 2)、1.28%柠檬酸氢二铵、50mM酒石酸缓冲液(pH4.0)(%均为w/v%)。痕量元素2(Trace element 2)如下所述制备:将6mg H_3BO_3 、26mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、100mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、40mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、8mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、200mg ZnCl_2 用蒸馏水定容到100mL。以上述条件培养72小时后,在培养基中添加赤藓糖醇使其终浓度成为0.2w/v%。进一步培养8小时后,回收菌体。作为对照,使用在赤藓糖醇不存在下以上述条件培养80小时所得到的菌体。

[0121] 从所回收的菌体提取全部RNA(使用QIAGEN公司RNeasy Plant Mini Kit),将所提取的全部RNA提供给TruSeq RNA sample Prep v3试剂盒(Illumina),从而构建下一代测序文库(cDNA文库)。对所得到的cDNA文库通过使用MiSeq Reagent Kit(300cycle)(Illumina)的MiSeq系统进行测序。将所得到的序列信息使用CLC Genomics Workbench相对于从Ensembl Fungi数据库(fungi.ensembl.org/Trichoderma_reesei/Info/Index/)获取的里氏木霉(*T. reesei*)QM6a的CDS序列进行映射。对于各基因,求出作为将映射得到的读取数利用基因的长度和总读取数进行了修正的值的RPKM(Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads)。基于所得到的RPKM对各基因的表达量进行解析。其结果,RPKM值与对照相比,在赤藓糖醇添加条件下表达高了50倍以上,作为在对照条件下几乎不表达的基因,发现了122079(TRIREDRAFT_122079)、68466(TRIREDRAFT_68466)、68606(TRIREDRAFT_68606)和68585(TRIREDRAFT_68585)的4个基因(表1)。

[0122] [表1]

Gene ID	推定功能	对照 (Cont)	赤藓糖醇 存在时(Ery)	倍率 (Ery/Cont)
TRIREDRAFT_123989	glycoside_hydrolase_family_7 (CBH1)	84315	57860	0.69
TRIREDRAFT_72567	glycoside_hydrolase_family_6 (CBH2)	81284	47275	0.58
TRIREDRAFT_120961	glycoside_hydrolase_family_61 (EG7)	55928	24059	0.43
TRIREDRAFT_122081	glycoside_hydrolase_family_7 (EG1)	23758	16909	0.71
TRIREDRAFT_120312	glycoside_hydrolase_family_5 (EG2)	22140	15903	0.72
TRIREDRAFT_73638	carbohydrate-binding_module_family_1 (CIP1)	19181	12067	0.63
TRIREDRAFT_68585	galactose-6-phosphate_isomerase	0	9417	>100
TRIREDRAFT_49976	glycoside_hydrolase_family_45 (EG5)	16317	7736	0.47
TRIREDRAFT_123232	glycoside_hydrolase_family_12 (EG3)	13023	6029	0.46
TRIREDRAFT_120749	glycoside_hydrolase_family_1 (BGL2)	6033	6007	1.0
TRIREDRAFT_73632	carbohydrate_esterase_family_5 (AXE1)	7314	5773	0.79
TRIREDRAFT_68466	glycerone_kinase	0	4336	>100
TRIREDRAFT_120229	glycoside_hydrolase_family_10 (XYN3)	10083	3760	0.37
TRIREDRAFT_122079	predicted_protein	54	3543	66
TRIREDRAFT_68606	triose-phosphate_isomerase	14	894	66

[0124] (2)利用实时PCR的表达解析

[0125] 通过实时PCR检验(1)中发现的4个基因的表达诱导的赤藓糖醇特异性。检验中,使

用将里氏木霉 (*T. reesei*) PC-3-7株以eg11启动子以使AaBGL1高表达的方式进行了突变的得到的里氏木霉 (*T. reesei*) E1AB1株 (Enzyme Microb Technol, 2016, 82: 89-95)。将E1AB1株以孢子数 1×10^5 个/mL接种,以28°C、220rpm进行振荡培养 (PRECI公司制PRXYg-98R)。培养基组成如下所述。1%葡萄糖、0.14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2% KH_2PO_4 、0.03% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1% Bacto蛋白胨、0.05% Bacto酵母提取物、0.1% Tween80、0.1%痕量元素2(Trace element 2)、1.28%柠檬酸氢二铵、50mM酒石酸缓冲液 (pH4.0) (%均为w/v%)。痕量元素2(Trace element 2)的组成如上述(1)所示。以上述条件培养48小时后,在培养基添加赤藓糖醇、葡萄糖或山梨糖醇使其终浓度成为0.2w/v%。在赤藓糖醇刚添加后(0h)和添加2小时后(2h)回收菌体。对照使用在培养48小时后不添加任何碳源而进行了合计50小时的培养得到的菌体。

[0126] 使用从所回收的菌体提取的RNA,合成cDNA (使用TaKaRa公司PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit)。使用所合成的cDNA进行实时PCR解析。(使用Agilent Technologies的Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mixes)。实时PCR中使用表2的引物。通过相对定量法 ($\Delta\Delta\text{Ct}$ 法)求出各基因的表达量。标准化基因使用作为糖醇解酶之一的磷酸甘油酸激酶基因pgk1 (TRIREDRAFT_21406)。

[0127] [表2]

	靶标基因	引物(5'→3'序列)		序列号	编码区域 (序列号)	所编码的蛋 白质 (序列号)
[0128]	122079	Fw	CGGTGGTGGAAAGAGGATTG	17	1	2
		Rv	AGACGGATCAGGCAGGATGT	18		
	68466	Fw	TGGACACACTCATCCCGTT	19	3	4
		Rv	CTCTTCCCAGTCTCGGCTTC	20		
	68606	Fw	ACCTGCTGGAGAGAACACA	21	5	6
		RV	CCCCATACAAAACCCTCGTC	22		
	68585	Fw	GTCTAGGCGTCGCCATTCT	23	7	8
		Rv	CAACTTCCAGCCAAACAACC	24		
	pgk1	Fw	TCTGGCGACATCTACAT	25	-	-
		Rv	GTAATCGAGCTCCTTCTCA	26		

[0129] 将各基因相对于pgk1基因的表达量的相对的表达量示于图1(A)~(D)。与刚添加赤藓糖醇后(0h)相比,添加2小时后(2h)4个基因的表达量大幅上升。另一方面,在对照、和葡萄糖或山梨糖醇添加条件中,没有确认到4个基因的表达量的上升。由此可知,122079、68466、68606和68585这4个基因被赤藓糖醇特异性地表达诱导。推定这4个基因是赤藓糖醇利用相关基因。

[0130] 实施例2赤藓糖醇利用相关基因缺损用质粒的构建

[0131] 通过将里氏木霉 (*T. reesei*) 的基因组DNA作为模板的PCR制备以下的4个DNA片段。片段1:包含122079基因的DNA (序列号9)、片段2:包含68466基因的DNA (序列号10)、片段3:包含68606基因的DNA (序列号11)、和片段4:包含68585基因的DNA (序列号12)。将这些DNA片段插入pUC118 (Takara Bio) 的HincII限制酶切断点,构建质粒pUC-122079、pUC-68466、pUC-68606和pUC-68585。以所构建的各质粒作为模板,制备以下的4个DNA片段。片段5:以

pUC-122079为模板扩增的约5.2kbp的片段、片段6:以pUC-68466为模板扩增的约5.0kbp的片段、片段7:以pUC-68606为模板扩增的约4.8kbp的片段、片段8:以pUC-68585为模板扩增的约4.8kbp的片段。作为转化用选择标记,以里氏木霉(*T. reesei*)的基因组DNA为模板,制备从片段9:pyr4基因(TRIREDRAFT_74020)的上游约1.0kbp至ORF至下游约0.3kbp的区域(约2.7kbp)。并且,为了使选择标记脱落,在片段9的上游和下游分别结合约0.7kbp的片段10和约1.0kbp的片段11,由此,制备转化用选择标记盒。使制得的转化用选择标记盒分别与片段5~8结合,构建基因缺损用质粒pUC-Δ122079-pyr4、pUC-Δ68466-pyr4、pUC-Δ68606-pyr4和pUC-Δ68585-pyr4。DNA片段的结合根据In-Fusion HD Cloning kit(Takara Bio)的说明书实施,将所使用的引物示于表3。

[0132] [表3]

	扩增长度	引物(5'→3'序列)		序列号
片段 1	约 4.4 kb	Fw	CTAGAGTATTAAATCGTCTGGAGCTTCGCTCGC	27
		Rv	TGCAGGTATTAAATAGCTCGGTTTGATCAAT	28
片段 2	约 3.1 kb	Fw	CTAGAGTATTAAATTCACTTGCATTATCGATTT	29
		RV	TGCAGGTATTAAATGCAAAGGGTCTGCTCTGCCA	30
片段 3	约 1.9 kb	Fw	CTAGAGTATTAAATGCAGGTACAGTGAGGACACG	31
		RV	TGCAGGTATTAAATAAAAGGAAGAGAACGAGCA	32
片段 4	约 2.0 kb	Fw	CTAGAGTATTAAATGGATTACTGTAAATCGATA	33
		RV	TGCAGGTATTAAATTTGGTCGAGAGGCCGATGA	34
片段 5	约 5.2 kb	Fw	CAAACCAAGAACCAAAAACCAGGGCAAGGCGTAG	35
		RV	CCATACTGGCGGGAAATGACATACACACTTGGAGC	36
片段 6	约 5.0 kb	Fw	CAAACCAAGAACCAATTGGGGACTCGAAATATACT	37
		RV	CCATACTGGCGGGAACACCCATCTGTCCAGCCAAA	38
片段 7	约 4.8 kb	Fw	CAAACCAAGAACCAACACATCCTCGATGTTGTC	39
		RV	CCATACTGGCGGGAAAGGTGAATGCGCCTTGGTCTT	40
片段 8	约 4.8 kb	Fw	CAAACCAAGAACCAATCTGAGGCATGATGGATGA	41
		RV	CCATACTGGCGGGAAAGGGCGTCGCTTCAAAGTCT	42
片段 9	约 2.7 kb	Fw	CAAACCAGCCAAGGTAGGTA	43
		Rv	CCATCACATGTCAATGT	44
片段 10	约 0.7 kb	Fw	TTCCCGCCAGTATGGCTCCA	45
		RV	ACCTTGGCTGGTTGCTGAATGCCGGTGGTAAGC	46
片段 11	约 1.0 kb	Fw	ATTGACATGTGATGGAAGTACCGCGCGCTTGACAA	47
		Rv	CCCTCCAAACCAAGAACCAA	48

[0134] 将所构建的质粒向感受态细胞E.coli DH5 α Competent Cells(Takara Bio)转化,从作为氨苄西林耐性株得到的转化体之中通过菌落PCR筛选保持插入了目标基因的质粒的菌株。筛选得到的转化体使用添加氨苄西林的LB培养基培养后(37°C、1天),从所得到的菌体使用NucleoSpin Plasmid EasyPure(MACHEREY-NAGEL)回收质粒并进行精制。

[0135] 实施例3赤藓糖醇利用相关基因缺损突变木霉属株的制作

[0136] 对于里氏木霉(*T. reesei*)E1AB1(Enzyme and Microbial Technology,2016,82:89-95)的Δpyr4株,进行实施例2中所构建的质粒的转化。导入通过原生质体PEG法(Biotechnol Bioeng.2012,109(1):92-99)进行。将pyr4基因作为选择标记,使用选择培养基(2%葡萄糖、1.1M山梨糖醇、2%琼脂、0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2% KH_2PO_4 (pH5.5)、0.06% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.06% CsCl_2 、0.06% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1%痕量元素1(Trace element 1)(%

均为w/v%)，筛选转化体。痕量元素1(Trace element 1)如下所述制备：将0.5g FeSO₄·7H₂O、0.2g CoCl₂、0.16g MnSO₄·H₂O、0.14g ZnSO₄·7H₂O用蒸馏水定容到100mL。通过接种所筛选的转化体，在稳定化后，通过菌落PCR进一步筛选稳定保持了目标基因的菌株。将筛选的突变株分别记为122079缺损株(Δ 122079)、68466缺损株(Δ 68466)、68606缺损株(Δ 68606)和68585缺损株(Δ 68585)。

[0137] 实施例4突变木霉属株的赤藓糖醇利用性的检验

[0138] (1) 突变株的培养

[0139] 对实施例3中制得的突变木霉属株进行培养，检验赤藓糖醇利用性。作为预培养，在500mL的烧瓶中装入50mL培养基、将实施例2中制得的菌株的孢子以1×10⁵个/mL接种，以28°C、220rpm进行振荡培养(PRECI公司制PRXYg-98R)。培养基组成如下所述。1%葡萄糖、0.14% (NH₄)₂SO₄、0.2% KH₂PO₄、0.03% CaCl₂·2H₂O、0.03% MgSO₄·7H₂O、0.1% Bacto蛋白胨、0.05% Bacto酵母提取物、0.1% Tween 80、0.1% 痕量元素2(Trace element 2)、50mM酒石酸缓冲液(pH4.0)(%均为w/v%)。痕量元素2(Trace element 2)如下所述制备：6mg H₃BO₃、26mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O、100mg FeCl₃·6H₂O、40mg CuSO₄·5H₂O、8mg MnCl₂·4H₂O、200mg ZnCl₂用蒸馏水定容到100mL。

[0140] 48小时的预培养后，作为发酵罐使用BTR-25NA1S-8M(Biott)，进行主培养。将上述预培养液以1%(v/v%)接种，进行24小时培养。作为碳源，将葡萄糖以2%的浓度使用，其它的培养基成分使用以下的物质。0.42% (NH₄)₂SO₄、0.2% KH₂PO₄、0.03% CaCl₂·2H₂O、0.03% MgSO₄·7H₂O、0.1% Bacto蛋白胨、0.05% Bacto酵母提取物、0.1% Tween 80、0.1% 痕量元素2(Trace element 2)、0.2% Antifoam PE-L。发酵罐的设定如下所述。温度：28°C、通气量：0.5vvm、pH：4.5(用5%氨水调整)、搅拌数：700rpm。培养24小时后添加赤藓糖醇，使得成为终浓度0.2%赤藓糖醇，回收添加后0、2、4、8小时的时刻的培养上清和菌体。

[0141] (2) 培养上清中的赤藓糖醇的定量

[0142] 对(1)中回收的培养液1mL以15,000rpm、4°C离心5分钟，将上清通过过滤器DISMIC-13CP(0.2μm乙酸纤维素膜、ADVANTEC)，由此去除菌体。提供给HPLC的培养上清用37mM硫酸适当稀释后，使用AcroPrep 96滤板(0.2μmGHP膜、Nihon Pall)去除不溶物。利用HPLC的分析条件如下所述。

[0143] 分析装置：Prominence-I LC-2030C 3D plus(岛津制作所)

[0144] 分析柱：ICSep ICE ION 300 7.8mmI.D.×300mm(CONCISE SEPARATIONS)

[0145] 洗脱液：0.01N硫酸

[0146] 流速：0.5mL/分钟

[0147] 柱温度：50°C

[0148] 校正曲线通过用已知浓度的赤藓糖醇溶液同样分析来制作，基于所制作的校正曲线算出培养上清中的赤藓糖醇的浓度。

[0149] E1AB1株在添加赤藓糖醇后第4小时的时刻，培养上清中的赤藓糖醇完全消失，相对于此，122079缺损株(Δ 122079)、68466缺损株(Δ 68466)、68606缺损株(Δ 68606)和68585缺损株(Δ 68585)的全部的突变株在添加后第2小时以后的赤藓糖醇利用速度降低得低于E1AB1株，Δ 122079、Δ 68606和Δ 68585株在添加后8小时的时刻，在培养上清中仍残存有赤藓糖醇(图2)。由此显示，通过使122079基因、68466基因、68606基因或68585基因缺损，

丝状菌的赤藓糖醇的利用率降低。

[0150] 实施例5缺损突变株的细胞内赤藓糖醇蓄积量的测定

[0151] 对于实施例3中制得的突变株,使用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS),测定赤藓糖醇在细菌细胞内的蓄积量。在实施例4(1)中赤藓糖醇添加后第4小时和第8小时回收的培养液5mL中添加冷乙醇7mL,迅速冷却至-30°C。将冷却后的培养液以5,000g、4°C离心5分钟,去除上清后添加冷60%甲醇5mL,进行悬浊,由此清洗所沉淀的菌体。进行2次菌体的清洗操作后,在-80°C冷冻。将冷冻的菌体冷冻干燥。使用多珠振荡器(Multi-beads Shocker)(安井器械)将冷冻干燥的菌体破碎,在破碎的菌体5mg中作为内标添加含37μM己二酸的甲醇0.5mL进行悬浊,添加冰冷的氯仿0.5mL和水0.2mL充分搅拌。以14,000×g、4°C离心5分钟,回收上清0.5mL。将所得到的上清用离心蒸发器使其干固。

[0152] 在干固的样品中添加含40mg/mL甲氧胺的吡啶20μL,在30°C、800rpm反应90分钟后,添加MSTFA+1% TMCS 80μL,在37°C、800rpm反应30分钟。将反应后的样品在遮光条件下冷却至室温后,提供给GC-MS分析。GC-MS的分析条件如下所示。

[0153] 分析装置:Agilent 7890A GC系统(Agilent Technologies)

[0154] 柱:DB-5MS+DG 30m×0.25mm×0.25μm(Agilent Technologies)

[0155] 气化室温度:250°C

[0156] 进样方式:分流进样(分流比50:1)

[0157] 柱温箱温度:在60°C保持3.5分钟后,以10°C/min升温,在325°C保持10分钟

[0158] 柱流量:氦气1.14mL/min

[0159] 接口(Interface):250°C

[0160] 离子源:200°C

[0161] 校正曲线通过用在已知浓度的赤藓糖醇溶液添加有100μM己二酸溶液100μL的溶液同样分析来制作,基于所制作的校正曲线算出细菌细胞内的赤藓糖醇蓄积量。

[0162] 求出E1AB1株和缺损突变株的干燥菌体每1mg的细胞内赤藓糖醇浓度(nmol/mg-dry cell(干燥菌体)),结果,E1AB1株在赤藓糖醇添加后第4小时的时刻在细胞内几乎检测不到赤藓糖醇,在第8小时的时刻成为检测限以下的值,摄入细菌细胞内的赤藓糖醇被迅速利用(表4)。另一方面,缺损突变株在赤藓糖醇添加后第4小时的时刻确认到赤藓糖醇在细胞内的蓄积,在第8小时的时刻也在细胞内检测到E1AB1株的约100倍以上的赤藓糖醇,摄入细菌细胞的赤藓糖醇没有被利用而在细胞内蓄积(表4)。根据以上结果显示,通过使122079基因、68466基因、68606基因或68585基因缺损,能够使赤藓糖醇在细菌细胞内的蓄积量增加。

[0163] [表4]

菌株	菌细胞内赤藓糖醇浓度 (nmol/mg-dry cell(干燥菌体))	
	4 h	8 h
E1AB1	0.03	0.02
Δ122079	21.3	5.75
Δ68466	3.85	2.59
Δ68606	4.05	3.68
Δ68585	2.47	2.41

- [0165] 实施例6缺损突变株中的赤藓糖醇利用相关基因的表达解析
- [0166] 对于实施例3中制得的突变木霉属株,通过实时PCR检验在细胞内的赤藓糖醇蓄积所引起的对赤藓糖醇利用相关基因的表达量的影响。使用从实施例4(1)中所回收的菌体提取的RNA合成cDNA (使用TaKaRa公司的PrimeScript™II 1st strand cDNA Synthesis Kit)。使用所合成的cDNA进行实时PCR解析。(使用Agilent Technologies的Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mixes)。实时PCR用的引物使用表2所示的引物。通过相对定量法($\Delta\Delta Ct$ 法)求出各基因的表达量。标准基因使用糖醇解酶之一的磷酸甘油酸激酶基因pgk1 (TRIREDRAFT_21406)。
- [0167] 将各基因相对于pgk1基因的表达量的相对表达量示于图3~6。作为亲本株的E1AB1株中,与赤藓糖醇刚添加后(0h)相比,在添加后2小时的时刻确认到4个赤藓糖醇利用相关基因的表达量的上升,但是在添加后第4小时以后,全部基因的表达量与添加后2小时的时刻相比显著降低。另一方面,作为缺损突变株的 $\Delta 122079$ 、 $\Delta 68466$ 、 $\Delta 68606$ 和 $\Delta 68585$ 中,在添加后第2小时确认到4个基因的表达的上升,并且,在添加后第4小时和第8小时也显示与E1AB1株不同的非常高的表达量。由此显示,通过使122079基因、68466基因、68606基因或68585基因缺损,赤藓糖醇利用相关基因的表达量和表达持续性提高。
- [0168] 实施例7赤藓糖醇诱导性启动子连结基因导入重组株的制作
- [0169] 对实施例3中制得的突变木霉属株导入与赤藓糖醇诱导性启动子连结的木聚糖酶XYN3基因,制作表达赤藓糖醇诱导性的XYN3的重组株。
- [0170] (1) 基因导入用质粒的构建
- [0171] 通过以里氏木霉(*T. reesei*)的基因组DNA作为模板的PCR,制备以下的6个DNA片段。
- [0172] 片段12:122079基因的上游约1.0 kbp的启动子区域(序列号13)
- [0173] 片段13:68466基因的上游约0.8 kbp的启动子区域(序列号14)
- [0174] 片段14:68606基因的上游约0.8 kbp的启动子区域(序列号15)
- [0175] 片段15:68585基因的上游约0.8 kbp的启动子区域(序列号16)
- [0176] 片段16:木聚糖酶基因xyn3 (TRIREDRAFT_120229) 的从编码区域至下游0.5 kbp的区域
- [0177] 片段17:pyr4基因 (TRIREDRAFT_74020) 的从上游约1.0 kbp至ORF和下游约0.3 kbp的区域(约2.4 kbp)
- [0178] 片段的扩增所使用的引物示于表5。
- [0179] [表5]

	扩增长度	引物(5'→3'序列)		序列号
[0180]	约 1.0 kb	Fw	ATTATACGAACGGTACTTCGACATCAAATCACCT	49
		Rv	GACGTTGCTTCATGTTTGATAAGGAGCGGTAG	50
片段 13	约 0.8 kb	Fw	ATTATACGAACGGTACGTATATGTCTATCAGTGAT	51
		Rv	GACGTTGCTTCATTGTTCTATTCTGTAGAATGT	52
片段 14	约 0.8 kb	Fw	ATTATACGAACGGTATGGATGACACGGTAGACAAG	53
		RV	GACGTTGCTTCATTTGGTCGAGAGGCCGATGA	54
片段 15	约 0.8 kb	Fw	ATTATACGAACGGTATGTTCTATTCTGTAGAATGT	55
		Rv	GACGTTGCTTCATCGTATATGTCTATCAGTGAT	56
片段 16	约 1.9 kb	Fw	ATGAAAGCAAACGTCATCTT	57
		RV	ACAAACGAGAAAAGAAGTCTGGCTGAGTGCTCGT	58
片段 17	约 2.4 kb	Fw	TTCTTTCTCGTTGTCTCACTCT	59
		RV	AGATCCACCAGATATGTCAGGA	60

[0181] 使片段16和17结合,制作XYN3-pyr4。接着,使XYN3-pyr4和片段1~4分别结合。将所得到的片段分别插入pUC118(Takara Bio)的HincII限制酶切断点,由此,构建4个载体pUC-P122079-XYN3-pyr4、pUC-P68466-XYN3-pyr4、pUC-P68606-XYN3-pyr4和pUC-P68585-XYN3-pyr4。DNA片段的结合根据In-Fusion HD Cloning kit(Takara Bio)的操作手册来实施。将所构建的质粒向感受态细胞E.coli DH5 α Competent Cells(Takara Bio)转化,从作为氨苄西林耐性株得到的转化体之中通过菌落PCR筛选保持插入了目标基因的质粒的菌株。使用添加氨苄西林的LB培养基培养所筛选的转化体(37℃、1天),使用NucleoSpin Plasmid EasyPure(MACHEREY NAGEL)从所得到的菌体回收和精制质粒。

[0182] (2) XYN3表达重组木霉属株的制作

[0183] 为了对实施例3中制得的突变木霉属株再次进行转化,使用含有0.2%的5-氟乳清酸(5-FOA)一水合物的PDA培养基,再次筛选获得5-FOA耐性并增殖的菌株。将Δ122079、Δ68466、Δ68606和Δ68585分别涂布于含5-FOA的培养基,将增殖的菌株作为Δ122079 Δpyr4、Δ68466 Δpyr4、Δ68606 Δpyr4和Δ68585 Δpyr4获得。对所获得的菌株和E1AB1 Δpyr4通过原生质体PEG法导入(1)中制得的质粒。将pyr4基因作为选择标记,使用选择培养基(2%葡萄糖、1.1M山梨糖醇、2%琼脂、0.5% (NH₄)₂SO₄、0.2% KH₂PO₄(pH5.5)、0.06% CaCl₂ • 2H₂O、0.06% CsCl₂、0.06% MgSO₄ • 7H₂O、0.1%痕量元素1(Trace element 1)(%均为w/v%)筛选转化体。通过接种所筛选的转化体,在稳定化后,通过菌落PCR进一步筛选稳定保持了目标基因的菌株。

[0184] 实施例8利用重组株生产目标蛋白

[0185] (1) 通过重组株的培养生产XYN3

[0186] 对实施例7中制得的来自Δ122079的重组株和来自E1AB1的重组株进行培养,进行利用赤藓糖醇诱导的蛋白质生产。培养中,在500mL的烧瓶中装入培养基50mL,将实施例7中制得的重组株的孢子以1×10⁵个/mL接种,以28℃、220rpm振荡培养(PRECI公司制PRXYg-98R)。培养基组成如下所述。1%葡萄糖、0.14% (NH₄)₂SO₄、0.2% KH₂PO₄、0.03% CaCl₂ • 2H₂O、0.03% MgSO₄ • 7H₂O、0.1% Bacto蛋白胨、0.05% Bacto酵母提取物、0.1% Tween80、0.1%痕量元素1(Trace element 1)。培养48小时后,在培养基添加赤藓糖醇使其终浓度为

0.2w/v%，回收培养液。并且，在培养4小时和24小时后，再次回收培养液。

[0187] (2) XYN3活性测定

[0188] 通过pNP(对硝基苯酚)法测定(1)中回收的培养液中的木聚糖酶(XYN3)活性。将培养上清稀释，制备酶溶液。将1mM pNP- β -木二糖昔(Xylobioside)溶液(50mM Na-acetate buffer, pH5.0)作为底物溶液。在酶溶液20 μ L中添加底物溶液80 μ L，在50°C反应10分钟后，添加100 μ L的1M Na₂Co₃溶液使反应停止。此后测定420nm的吸光度。使用对硝基苯酚进行同样的操作，由此制作校正曲线。将1分钟内使1 μ mol的pNP游离的酶量定义为1U，求出各培养液中的XYN3的活性。其结果，以E1AB1株为宿主的122079启动子诱导性XYN3表达株(E1AB1P122079)、68466启动子诱导性XYN3表达株(E1AB1P68466)和68585启动子诱导性XYN3表达株(E1AB1P68585)中，与刚添加赤藓糖醇后0小时的时刻相比，在添加4小时后的时刻的XYN3的活性提高，但是在24小时后的时刻，显示与4小时后同等或稍高的活性(表6)。

[0189] 另一方面，以 Δ 122079为宿主的122079启动子诱导性XYN3表达株(Δ 122079P122079)、68466启动子诱导性XYN3表达株(Δ 122079P68466)和68585启动子诱导性XYN3表达株(Δ 122079P68585)中，添加赤藓糖醇4小时后的XYN3活性显示高于以E1AB1株为宿主的启动子诱导性XYN3表达株的活性，并且在24小时后与4小时后相比显示约2.5倍以上的高的活性(表6)。68606启动子诱导性XYN3表达株(Δ 122079P68606)也稍上升，通过添加赤藓糖醇使XYN3活性上升。另外，分别以实施例9的方法培养以 Δ 68466、 Δ 68606和 Δ 68585为宿主的68466启动子诱导性XYN3表达株(分别为 Δ 68466P68466、 Δ 68606P68466和 Δ 68585P68466)，测定培养上清中的XYN3活性，结果，与以E1AB1株为宿主的XYN3表达株(E1AB1P68466)相比，显示高的XYN3活性(表7)。并且，在上述全部缺损突变株 Δ 122079、 Δ 68466、 Δ 68606和 Δ 68585中，确认了分别与4个赤藓糖醇诱导性启动子P122079、P68466、P68606和P68585连结的基因对赤藓糖醇的添加发生应答并被诱导转录，表达长时间维持。因此，可以认为，在该缺损突变株中，通过在该赤藓糖醇诱导性启动子的下游连结目标基因，能够在赤藓糖醇存在下长时间诱导目标基因的转录。根据以上的结果显示，赤藓糖醇利用相关基因缺损突变株通过使用赤藓糖醇诱导性启动子诱导蛋白质表达，显示高的蛋白质生产率。

[0190] [表6]

菌株名	赤藓糖醇	0 h (U/ml)	4 h (U/ml)	24 h (U/ml)
E1AB1	-	0.00	0.00	0.01
	+	0.00	0.00	0.00
Δ 122079	-	0.00	0.00	0.01
	+	0.00	0.00	0.00
E1AB1 P122079	-	0.27	0.31	0.45
	+	0.27	0.78	1.39
Δ 122079 P122079	-	0.29	0.38	0.78
	+	0.28	1.60	3.96
E1AB1 P68466	-	0.00	0.00	0.00
	+	0.00	1.86	1.82
Δ 122079 P68466	-	0.00	0.00	0.01
	+	0.00	3.40	10.75
E1AB1 P68606	-	0.00	0.00	0.00
	+	0.00	0.00	0.00
Δ 122079 P68606	-	0.00	0.00	0.00
	+	0.00	0.00	0.01
E1AB1 P68585	-	0.00	0.00	0.00
	+	0.00	1.29	1.58
Δ 122079 P68585	-	0.00	0.02	0.22
	+	0.00	2.04	6.20

[0192] [表7]

菌株名	赤藓糖醇	0 h (U/ml)	4 h (U/ml)	24 h (U/ml)
E1AB1	-	0.00	0.00	0.00
	+	0.00	0.00	0.00
E1AB1 P68466	-	0.00	0.00	0.00
	+	0.00	1.59	1.56
Δ 68466 P68466	-	0.00	0.00	0.00
	+	0.00	1.83	7.83
Δ 68606 P68466	-	0.00	0.00	0.00
	+	0.00	2.86	7.25
Δ 68585 P68466	-	0.00	0.00	0.01
	+	0.00	5.43	18.96

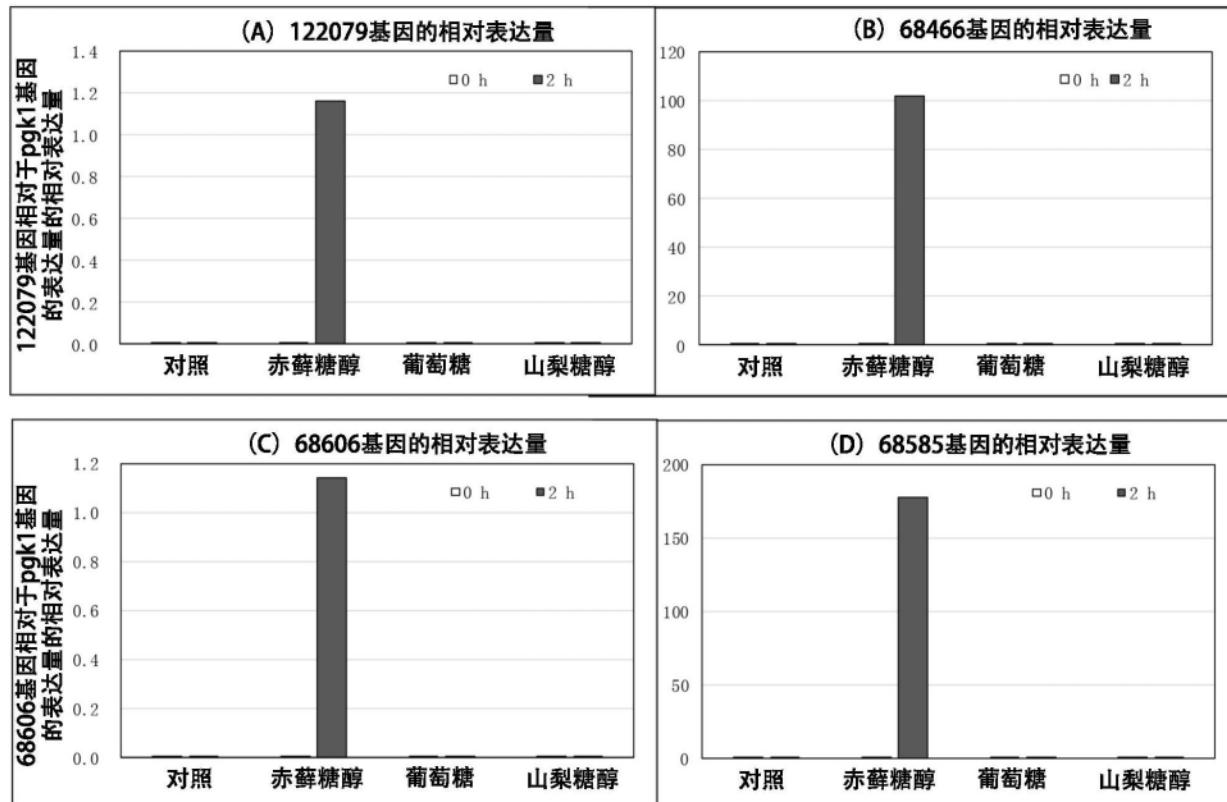


图1

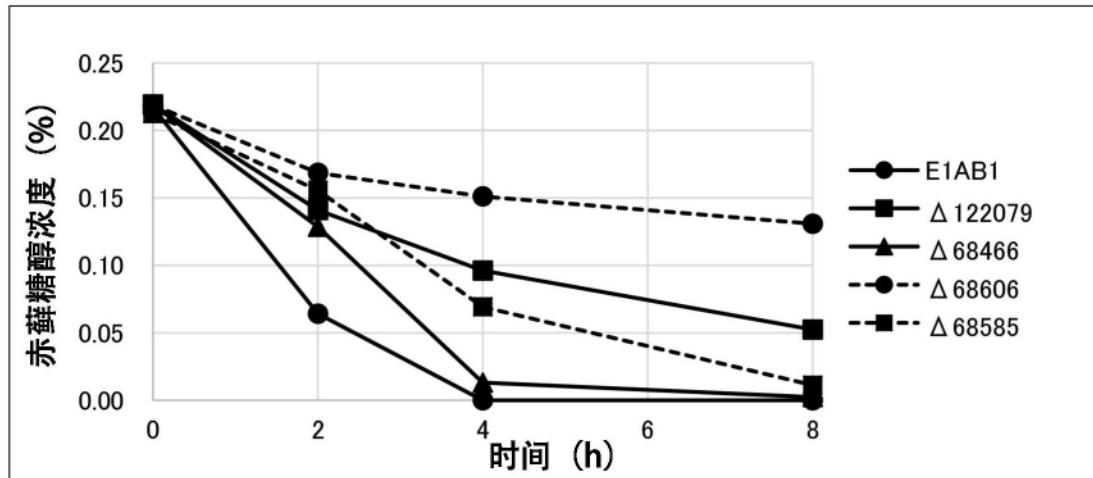


图2

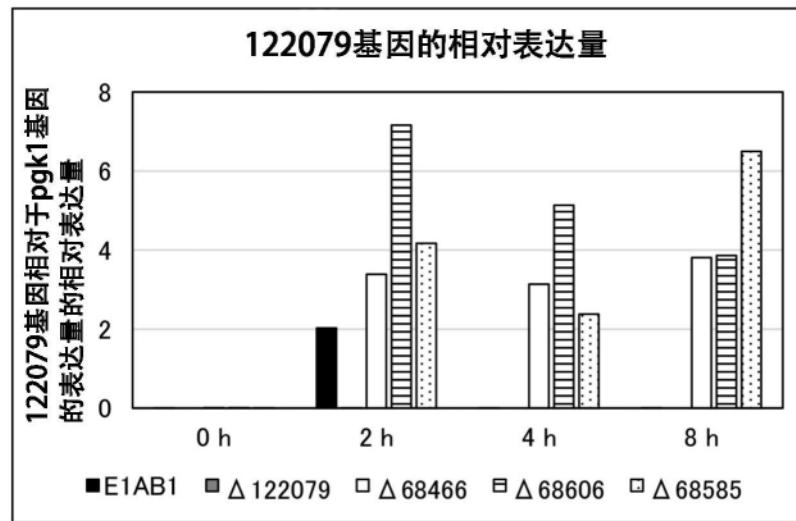


图3

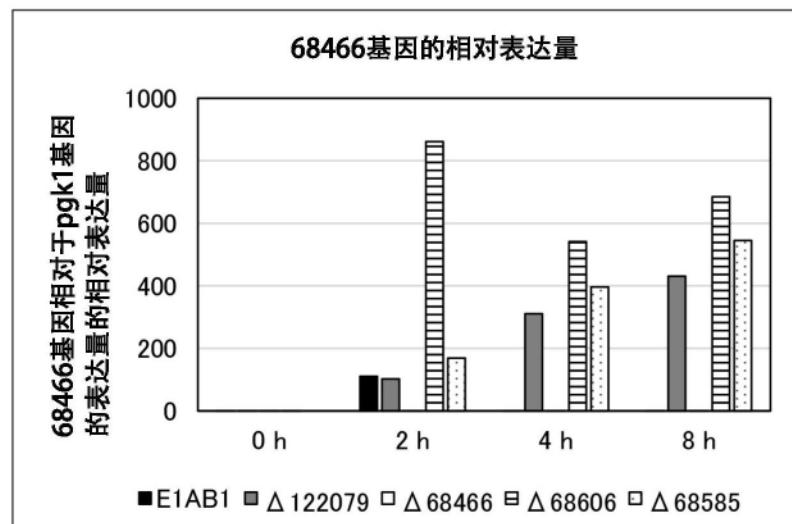


图4

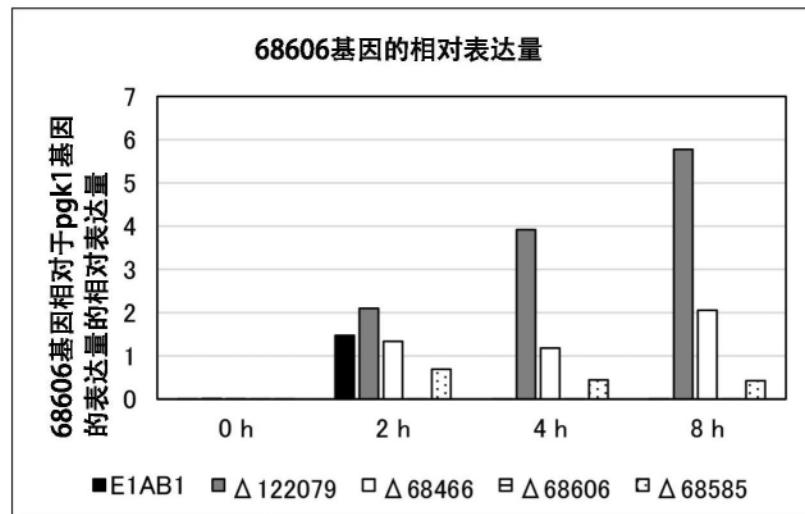


图5

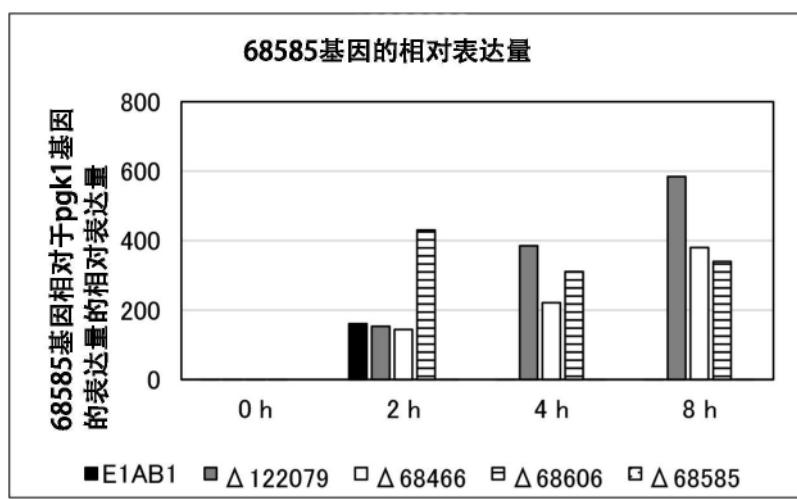


图6