

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5252746号
(P5252746)

(45) 発行日 平成25年7月31日(2013.7.31)

(24) 登録日 平成25年4月26日(2013.4.26)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/02 (2006.01)

C 1 2 N 9/02

請求項の数 35 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願2010-532232 (P2010-532232)	(73) 特許権者	509240479
(86) (22) 出願日	平成20年10月30日 (2008.10.30)		ダニスコ・ユーエス・インク
(65) 公表番号	特表2011-502483 (P2011-502483A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94
(43) 公表日	平成23年1月27日 (2011.1.27)		304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロ
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/081721		ード 925
(87) 国際公開番号	W02009/058956	(74) 代理人	100071010
(87) 国際公開日	平成21年5月7日 (2009.5.7)		弁理士 山崎 行造
審査請求日	平成22年5月26日 (2010.5.26)	(74) 代理人	100121762
(31) 優先権主張番号	60/984,430		弁理士 杉山 直人
(32) 優先日	平成19年11月1日 (2007.11.1)	(74) 代理人	100126767
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 白銀 博
		(74) 代理人	100118647
			弁理士 赤松 利昭
		(74) 代理人	100138519
			弁理士 奥谷 雅子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 宿主細胞におけるタンパク質生産を改善するためのシグナル配列及び共発現したシャペロン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ラッカーゼを生産する方法であって、

(a) ラッカーゼをコードする核酸配列に作動可能に結合するシグナル配列を含む第一核酸配列を宿主細胞へ導入する段階であり、前記シグナル配列がセロピオヒドロラーゼ I シグナルペプチド又は N S P 2 4 シグナルペプチドをコードするように設けられる段階、

(b) 第一核酸配列を発現する段階、

(c) b i p 1 (配列番号 15) である、シャペロンをコードする第二核酸配列を共発現する段階、及び

(d) 前記宿主細胞から分泌される前記ラッカーゼを集める段階、
を含む方法。

10

【請求項 2】

さらに前記第一核酸配列が前記シグナル配列とラッカーゼ配列の間に酵素配列を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記酵素配列がグルコアミラーゼから又は C B H 1 酵素から得られることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記酵素配列が完全長の酵素配列を含むことを特徴とする請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 5】

20

前記酵素配列が触媒コア部位配列を含むことを特徴とする請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 6】

さらに前記第一核酸配列が前記触媒コア部位配列と前記ラッカーゼ配列の間にリンカー配列を含むことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ラッカーゼが糸状菌又は酵母由来であることを特徴とする請求項 1 から 6 のいずれかひとつに記載の方法。

【請求項 8】

前記ラッカーゼがアスペルギルス (*Aspergillus*)、ニューロスポラ (*Neurospora*)、ポドスポラ (*Podospora*)、ボトリチス (*Botrytis*)、コリビア (*Collybia*)、セレナ (*Cerrrena*)、スタキボトリス (*Stachybotrys*)、パヌス (*Panus*)、チエイラバ (*Thielavia*)、
 フォメス (*Fomes*)、レンチヌス (*Lentinus*)、プレウロツス (*Pleurotus*)、トラメテス (*Trametes*)、リゾクトニア (*Rhizoctonia*)、
 コプリナス (*Coprinus*)、プサチレラ (*Psathyrella*)、ミセリオフィソーラ (*Myceliophthora*)、シタリジウム (*Schytalidium*)、フレビア (*Phlebia*)、コリオルス (*Coriolus*)、スポンギスペリス (*Spongipellis*)、ポリポルス (*Polyporus*)、セリポリオプシス サブベルミスポラ (*Ceriporiopsis subvermispora*)、
 ガノデルマ ツノダエ (*Ganoderma tsunodae*)、又はトリコデルマ (*Trichoderma*) 由来であることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ラッカーゼがセレナ (*Cerrrena*) ラッカーゼ A 1、A 2、B 1、B 2、B 3、C、D 1、D 2、又は E 由来であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ラッカーゼが配列番号 45 のセレナ (*Cerrrena*) ラッカーゼ D の成熟タンパク質由来であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記宿主細胞が糸状菌細胞であることを特徴とする請求項 1 から 10 のいずれかひとつに記載の方法。

【請求項 12】

前記宿主細胞が子囊菌類 (*Ascomycetes*) の細胞であることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記宿主細胞がトリコデルマ (*Trichoderma*) 細胞であることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

さらに前記第一核酸配列がシグナル配列の上流にプロモーターを含むことを特徴とする請求項 1 から 13 のいずれかひとつに記載の方法。

【請求項 15】

前記プロモーターが前記宿主細胞に本来存在し、前記ラッカーゼ配列と自然には結合しないことを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記第二核酸配列がプロモーターに作動可能に結合することを特徴とする請求項 1 から 15 のいずれかひとつに記載の方法。

【請求項 17】

前記プロモーターが宿主細胞に本来存在し、前記第二核酸配列と自然には結合しないことを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記ラッカーゼが酵素を有する融合蛋白質として生産されることを特徴とする請求項 2 か

ら 17 のいずれかひとつに記載の方法。

【請求項 19】

請求項 1 から 18 のいずれかひとつに記載の方法により生産されるラッカーゼ。

【請求項 20】

請求項 19 に記載のラッカーゼを含む組成物。

【請求項 21】

所望のタンパク質を生産するための方法であって、

(a) 所望のタンパク質配列に作動可能に結合するシグナル配列を含む第一核酸配列を宿主細胞へ導入する段階、

(b) 第一核酸配列を発現する段階、

(c) b i p 1 (配列番号 15) である、シャペロンをコードする第二核酸配列を共発現する段階、及び

(d) 前記宿主細胞から分泌される前記所望のタンパク質を集める段階、を含む方法。

【請求項 22】

さらに前記第一核酸配列が前記シグナル配列と前記所望のタンパク質配列の間に酵素配列を含むことを特徴とする請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記酵素配列がグルコアミラーゼから又は C B H 1 酵素から得られることを特徴とする請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記酵素配列が完全長の酵素配列を含むことを特徴とする請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記酵素配列が触媒コア部位配列を含むことを特徴とする請求項 22 に記載の方法。

【請求項 26】

さらに前記第一核酸配列が前記触媒コア部位配列と前記所望のタンパク質配列の間にリンカー配列を含むことを特徴とする請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記シグナル配列がセロビオヒドロラーゼ I シグナルペプチド又は N S P 2 4 シグナルペプチドをコードすることを特徴とする請求項 21 に記載の方法。

【請求項 28】

前記宿主細胞が糸状菌細胞であることを特徴とする請求項 21 に記載の方法。

【請求項 29】

前記宿主細胞が子囊菌類 (A s c o m y c e t e s) の細胞であることを特徴とする請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記宿主細胞がトリコデルマ (T r i c h o d e r m a) 細胞であることを特徴とする請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

さらに前記第一核酸配列がシグナル配列の上流にプロモーターを含むことを特徴とする請求項 21 に記載の方法。

【請求項 32】

前記プロモーターが前記宿主細胞に本来存在し、前記所望のタンパク質配列と自然には結合しないことを特徴とする請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記第二核酸配列がプロモーターに作動可能に結合することを特徴とする請求項 21 に記載の方法。

【請求項 34】

前記プロモーターが宿主細胞に本来存在し、前記第二核酸配列と自然には結合しないことを特徴とする請求項 33 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 35】

前記所望のタンパク質が酵素を有する融合蛋白質として生産されることを特徴とする請求項 22 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は改善されるタンパク質生産のための方法及び組成物に関する。幾つかの実施態様においては、本明細書にて提供する方法はタンパク質に作動可能に結合するシグナル配列の使用に関する。幾つかの実施態様においては、タンパク質に作動可能に結合するシグナル配列は宿主細胞中少なくとも一つのシャペロンと組み合わせて発現される。幾つかの実施態様においては、タンパク質は糸状菌細胞中に発現される。さらなる実施態様においては、本発明の方法はグルコアミラーゼ又は C B H 1 のような酵素触媒部位へのタンパク質融合に関連する。幾つかの実施態様は、シグナル配列、一以上のシャペロン、シャペロニン、及び / 又は フォールダーゼ、及び / 又は触媒タンパク質又は部位へのタンパク質融合の組合せを提供する。

10

【背景技術】

【0002】

酵母、糸状菌、及び細菌のような宿主細胞は外来タンパク質を発現及び分泌のために長く用いられてきた。一般的に、これらの外来タンパク質又は酵母、糸状菌、及び細菌中のタンパク質の生産は宿主細胞又は細胞が増殖する培養培地からタンパク質の発現及び部分的又は完全な精製に関する。幾つかのタンパク質は宿主細胞の細胞内環境からの精製を必要とするものの、タンパク質が細胞から培養培地へ分泌される場合、精製はかなり簡略化される。

20

【0003】

細胞内タンパク質分泌は多様な細胞発現系においてタンパク質生産の複雑かつ重要な局面である。タンパク質分泌に関するファクターの一つは適切なタンパク質のフォールディングである。コンパクトに折りたたまれるタンパク質構造を特定するのに必要な多くの情報がタンパク質のアミノ酸配列中に存在するので、多くのタンパク質は希釈濃度にてインビトロ (*in vitro*) で可逆的にアンフォールディング及びリフォールディングできる。しかしながら、インビボ (*in vivo*) でのタンパク質フォールディングは多くのタンパク質が濃縮される環境にて発生し、分子間凝集反応が分子内フォールディングプロセスと競合する。これらの複雑性は原核生物の発現系より真核生物の発現系に顕著である。

30

【0004】

真核性分泌経路における第一段階は伸びた状態で小胞体 (E R) を通過する新生ポリペプチドの移送である。正確なフォールディング及びポリペプチドの組み立てが分泌経路を通過して E R 中に起こる。しかしながら、多くの場合、タンパク質は非常に過剰発現し、それらのタンパク質は十分に分泌されない。実際に、多くの場合、そのような発現に機能すべき分泌シグナルはその機能を発揮していないようである。さらに、所望のタンパク質の発現は他のタンパク質の相互作用により複雑となる。生物の種、属、又はファミリーから得られるタンパク質の発現が別の種、属、ファミリーにおいて試みられる場合、これらのファクターはさらに重要である。例えば、一般的に、担子菌類 (*Basidiomycetes*) タンパク質 (例えば、ラッカーゼ) はトリコデルマ (*Trichoderma*) のような子囊菌類 (*Ascomycetes*) 宿主中十分に発現しない。実際に、菌類の発現系の分野での多くの研究にもかかわらず、所望のタンパク質の細胞外発現の改善する必要性が残っている。

40

【発明の概要】

【0005】

本発明は改善されるタンパク質生産のための方法及び組成物を提供する。方法は所望のタンパク質に作動可能に結合するシグナル配列の使用に関し、宿主細胞中に少なくともひと

50

つのシャペロンと組み合わせて発現することを特徴とする。幾つかの実施態様においては、タンパク質は糸状菌細胞中に発現する。さらなる実施態様においては、本発明の方法はグルコアミラーゼ又はC B H 1のような宿主タンパク質の触媒部位への所望のタンパク質の融合に関する。

【0006】

幾つかの実施態様においては、本発明はタンパク質と同じ生物から得られるシャペロンタンパク質の発現と組み合わせて分泌シグナルの使用を通して糸状菌宿主（例えば子囊菌類（*Ascomycetes*））におけるタンパク質の生産を増加する方法及び組成物を提供する。幾つかの実施態様においては、タンパク質は子囊菌類（*Ascomycetes*）宿主タンパク質由来分泌シグナルに融合する非子囊菌類（*non Ascomycetes*）タンパク質である。いくつかの追加的実施態様においては、少なくともひとつのシャペロンタンパク質を子囊菌類（*Ascomycetes*）タンパク質の触媒部位へ融合するタンパク質の発現を増加する際に用いてよい。

10

【0007】

幾つかの実施態様は子囊菌類（*Ascomycetes*）宿主細胞中に少なくともひとつのタンパク質を生産する方法を提供し、宿主と同門、同属、及び／又は同種由来のシグナル配列に作動可能に結合する所望のタンパク質を含むポリヌクレオチドを宿主細胞へ導入すること、タンパク質と同門、同属、及び／又は同種由来のシャペロンを共発現すること、タンパク質の発現及び生産のための適切な培養条件下宿主細胞を培養すること、及びタンパク質を生産することによる方法の特徴とする。任意に方法は生産されるタンパク質を回収することを含んでよい。幾つかの実施態様は子囊菌類（*Ascomycetes*）由来酵素の触媒部位にタンパク質を融合することを含む。他の実施態様は子囊菌類（*Ascomycetes*）由来完全長酵素にタンパク質を融合することを含む。幾つかの実施態様においては、子囊菌類（*Ascomycetes*）宿主細胞はトリコデルマ（*Trichoderma*）である。幾つかの実施態様においては、シャペロンは次の少なくとも一つであり、BIP1、ERO1、PDI1、TIG1、PRP1、PPI1、PPI2、PRP3、PRP4、カルネキシン（*CALNEXIN*）、及びLHS1である。

20

【0008】

タンパク質の選択は任意の属、種、及び／又はファミリー由来の次のタンパク質を含むが、これらに限定されない。それは、ラッカーゼ、グルコアミラーゼ、アルファ アミラーゼ、粒状デンプン加水分解酵素、セルラーゼ、リパーゼ、キシラナーゼ、クチナーゼ、ヘミセルラーゼ、プロテアーゼ、オキシダーゼ、ラッカーゼ及びその組み合わせである。幾つかの実施態様はNSP24又はC B H 1遺伝子由来シグナル配列を含む。幾つかの実施態様においては、シャペロン遺伝子はbip1である。また、方法の態様は子囊菌類（*Ascomycetes*）プロモーターを含む。幾つかの実施態様においては、宿主細胞及びシグナル配列は同じ子囊菌類（*Ascomycetes*）宿主由来である。幾つかの実施態様においては、プロモーターはトリコデルマ（*Trichoderma*）由来C B H 1プロモーターである。幾つかの実施態様においては、タンパク質は担子菌類（*Basidiomycetes*）タンパク質である。幾つかの実施態様においては、宿主細胞は子囊菌類（*Ascomycetes*）宿主細胞である。幾つかの実施態様においては、宿主細胞は担子菌類（*Basidiomycetes*）宿主細胞であり、タンパク質は子囊菌類（*Ascomycetes*）タンパク質である。

30

40

【0009】

さらに幾つかの実施態様は子囊菌類（*Ascomycetes*）宿主細胞において少なくともひとつのタンパク質を生産する方法を提供し、子囊菌類（*Ascomycetes*）由来酵素の触媒部位に融合する所望のタンパク質を含むポリヌクレオチドを子囊菌類（*Ascomycetes*）宿主細胞へ導入し、ここで所望のタンパク質が担子菌類（*Basidiomycetes*）タンパク質であることを特徴とし、子囊菌類（*Ascomycetes*）シャペロンを共発現し、タンパク質の発現及び生産のために適した培養条件下子囊菌類（*Ascomycetes*）宿主細胞を培養し、及びタンパク質を生産することに

50

よる方法の特徴とする。幾つかの実施態様においては、生産されるタンパク質を回収する。幾つかの実施態様においては、タンパク質は子囊菌類 (Ascomycetes) シグナル配列に作動可能に結合する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1はトリコデルマ (Trichoderma) 発現プラスミド pTrex 4 ラッカーゼ D_{opt} の図を示す。ポリヌクレオチド配列を配列番号1として示す。

【図2】図2はトリコデルマ (Trichoderma) 発現プラスミド pTrex 2 g Bip 1 の図を示す。ポリヌクレオチド配列を配列番号2として示す。

【図3】図3はトリコデルマ (Trichoderma) 発現プラスミド pTrex 2 g Pdi 1 の図を示す。ポリヌクレオチド配列を配列番号3として示す。

【図4】図4はトリコデルマ (Trichoderma) 発現プラスミド pTrex 2 g Ero 1 に用いる Ero 1 配列の図を示す。ポリヌクレオチド配列を配列番号4として示す。

【図5】図5はトリコデルマ (Trichoderma) 発現プラスミド pTrGA ラッカーゼ D_{opt} の図を示す。ポリヌクレオチド配列を配列番号5として示す。

【図6】図6はトリコデルマ (Trichoderma) 発現プラスミド pKB 408 の図を示す。ポリヌクレオチド配列を配列番号6として示す。

【図7】図7はトリコデルマ (Trichoderma) 発現プラスミド pKB 410 の図を示す。ポリヌクレオチド配列を配列番号7として示す。

【図8】図8 1から図8 4はトリコデルマ レーシ (T. reesei) NSP 2 4 オープンリーディングフレーム (ORF) 配列番号8を示す。シグナルペプチドは最初の20アミノ酸である (配列番号9)。

【図9】図9 1及び図9 2はトリコデルマ レーシ (T. reesei) CBH 1 ORF (配列番号10) を示す。シグナル配列は210塩基対にて始まり、260塩基対にて終わる (配列番号11)。触媒コアは261塩基対から始まり1698塩基対 (配列番号12) に至り、イントロン1 (塩基対671から737) 及びイントロン2 (塩基対1435から1497) を含む。リンカー配列は1699塩基対にて始まり、1770塩基対 (配列番号13) にて終わる。CBH 1 タンパク質配列を配列番号14として示す。

【図10】図10は完全長トリコデルマ (Trichoderma) グルコアミラーゼヘセレナ ユニカラー (C. unicolor) ラッカーゼをコードする遺伝子の融合により改善されるラッカーゼ生産を示す。菌株 # 8 - 2 はCBH 1 ラッカーゼ融合である。菌株 1066 - 9、1066 - 13、及び1066 - 15はTrGA ラッカーゼ融合である。

【図11】図11は振盪フラスコにおけるCBH 1又はNSP 2 4シグナル配列ヘセレナ ユニカラー (C. unicolor) ラッカーゼをコードする遺伝子の融合により改善されるラッカーゼ生産を示す。Y軸はユニット/mlとしてラッカーゼ活性を示す。X軸は菌株 (CBH 1融合単独、又はシグナル配列を伴う) を示す。

【図12】図12は発酵装置におけるCBH 1又はNSP 2 4シグナル配列ヘセレナ ユニカラー (C. unicolor) ラッカーゼをコードする遺伝子の融合により改善されるラッカーゼ生産を示す。Y軸はユニット/mlとしてラッカーゼ活性を示す。X軸は時間として発酵時間を示す。

【図13】図13はCBH 1シグナル配列プラスBIP 1シャペロン発現によりもたらされる改善されるラッカーゼ生産を示す。Y軸はユニット/mlとしてラッカーゼ活性を示す。X軸は時間として発酵時間を示す。

【図14】図14は3、4、及び5日にて振盪フラスコ中セレナ ユニカラー (C. unicolor) を用いてシャペロンの共発現による改善されるラッカーゼ生産を示す。Y軸はユニット/mlとしてラッカーゼ活性を示す。X軸は菌株 (KB 410 - 13、又はbipの共発現を伴う) を示す。

10

20

30

40

50

【図15】図15はCBH1シグナル配列、触媒部位およびリンカーヘセレナ ユニカラー(C. unicolor)ラッカーゼをコードする遺伝子の融合及びBip1、pd11又はero1シャペロンと共発現により改善されるラッカーゼ生産を示す。Y軸はユニット/mlとしてラッカーゼ活性を示す。X軸は菌株を示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の実施には、特に定義しない限り、当業者の知識の範囲内である、分子生物学、タンパク質工学、組み換えDNA技術、微生物学、細胞生物学、細胞培養、トランスジェニックバイオロジー、免疫学、及びタンパク質精製にて通常使用される従来技術が用いられる。そのような技術は当業者に知られ、多くのテキストや参考文献に記載されている。本明細書に記載した全ての特許、特許出願、論文及び出版物は、既述の又はこれ以降に記載するもの両者ともに、引用により本明細書に明確に組み入れられる。

10

【0012】

定義

用語「子囊菌類(Ascomycetes)」とは子囊菌門(Ascomycota)に属する菌類の区分をいう。この門の仲間は子囊(言い換えると、子嚢胞子を含む細胞のような特別な袋)の存在により特徴付けられる。

【0013】

用語「担子菌類(Basidiomycetes)」は担子菌門(Basidiomycota)に属する菌類の区分をいう。この門の仲間は担子胞子(言い換えると、担子器と呼ばれる、こん棒状の末端細胞の外部領域に位置する有性胞子)の生産により特徴付けられる。

20

【0014】

「プロテアーゼ(Protease)」はタンパク質骨格(例えばE.C.3.4)の以上の多様な位置にてペプチド結合の分解を触媒する能力を有するタンパク質又はタンパク質のポリペプチド部位又はポリペプチドを意味する。プロテアーゼは微生物(例えば、菌類又は細菌類)、植物、及び/又は動物から得られる。

【0015】

「酸性プロテアーゼ(acid protease)」は酸性条件下タンパク質を加水分解する能力を有するプロテアーゼをいう。

30

【0016】

本明細書にて用いる用語「シャペロン(chaperone)」又は「分子シャペロン(molecular chaperones)」はアンフォールディング領域を周囲のタンパク質から遮断することによりタンパク質フォールディングを機能させ、タンパク質フォールディングの速度を増強させない。これは、小胞体(ER)における分泌タンパク質のフォールディング及びグリコシレーションを補助するタンパク質及びそれらの相同体を含んでよい。シャペロンはERに存在してよい。一般的なシャペロンはBip(GRP78)、GRP94及び酵母Lhs1pを含み、それらはアンフォールディング状態において露出した疎水性領域に結合することにより分泌タンパク質がフォールディングするのに役立ち、好ましくない相互作用を避けるのに役立つ。また、シャペロンはER膜を通過するタンパク質の移送に関与するタンパク質を含む。

40

【0017】

本明細書にて用いる、「シャペロニン(chaperonins)」はATPを利用して自然状態(活性状態)にタンパク質フォールディングを補助するタンパク質である。しばしば、タンパク質サブユニットは共に組み立てられ、大きな環構造を形成する。例えば、シャペロニンはそれらの中央の空洞に非天然のタンパク質を結合することにより作用し、その後ATPと結合し、基質タンパク質をまさに封入される空洞に放出し、生産的にフォールディングする。

【0018】

「フォールダーゼタンパク質(Foldase proteins)」はタンパク質フォ

50

ールディングの速度を増加するタンパク質フォールディング段階を触媒するタンパク質を意味する。例えば、それらはジスルフィド架橋の形成を補助し、プロリン残基に隣接するペプチド鎖の正しい構造の形成を補助する。一般的にフォルダーゼはタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (p d i) とその相同体及びプロリル ペプチジルシス トランスイソメラーゼとその相同体を含む。

【 0 0 1 9 】

本明細書にて用いる「 N S P 2 4 ファミリープロテアーゼ (N S P 2 4 f a m i l y p r o t e a s e) 」は N S P 2 4 プロテアーゼのファミリーに属するその天然の形態又は野生型の形態においてプロテアーゼ活性を有する酵素を意味する。 N S P プロテアーゼは酸性菌類プロテアーゼのような酸性プロテアーゼである。 N S P 2 4 プロテアーゼは配列番号 8 のアミノ酸配列及び生物学的に活性なそのフラグメントに対して少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、及び少なくとも 9 9 % の 同一性 を有する。

10

【 0 0 2 0 】

本明細書にて用いる用語「所望のタンパク質 (d e s i r e d p r o t e i n) 」は関心の有るタンパク質を意味する。所望のタンパク質及び関心有るタンパク質は本出願において互換可能に用いられる。幾つかの実施態様においては、所望のタンパク質は商業的重要な産業用タンパク質である。その用語は自然発生的遺伝子、変異遺伝子及び / 又は合成遺伝子によりコードされるタンパク質を含むことを意図する。所望のタンパク質は宿主細胞本来存在するタンパク質、又は宿主細胞に対して本来存在しない (異種の) タンパク質

20

【 0 0 2 1 】

本明細書で用いる「誘導体 (d e r i v a t i v e) 」は C 末端及び N 末端の両方又は片方に一以上のアミノ酸の添加によって、アミノ酸配列中一箇所又は多くの異なる位置に一以上のアミノ酸を置換によって、片方又は両方の蛋白質末端に又はアミノ酸配列中一以上の位置に一以上のアミノ酸の欠損によって、又はアミノ酸配列中一以上の位置に一以上のアミノ酸の挿入によって得られる、プリカーサー又は親タンパク質 (例えば、天然の蛋白質) に由来する蛋白質を意味する。

【 0 0 2 2 】

用語「組み換え体 (r e c o m b i n a n t) 」は宿主細胞中に自然的に起こらないポリヌクレオチド又はポリペプチドをいう。組み換え体分子は自然的に起こらない態様で一緒に結合する二以上の自然的に起こる配列を含んでよい。

30

【 0 0 2 3 】

用語「ペプチド (p e p t i d e s) 」, 「タンパク質 (p r o t e i n s) 」, 及び「ポリペプチド (p o l y p e p t i d e s) 」は本明細書にて互換可能に用いる。

【 0 0 2 4 】

アミノ酸配列又は核酸配列に関して本明細書で用いる「配列 同一性 割合 (%) (p e r c e n t (%) s e q u e n c e i d e n t i t y) 」は、必要であれば、最大の割合の配列 同一性 を達成するように、いずれの保存的置換をも配列 同一性 の一部とみなして、配列を整列し及びギャップを挿入した後、所望の配列 (例えば、 N S P 2 4 シグナルペプチド配列) 中のアミノ酸残基又はヌクレオチドと同定された候補配列におけるアミノ酸残基又はヌクレオチドとの割合で定義される。

40

【 0 0 2 5 】

本明細書にて用いる用語「アルファ アミラーゼ (A l p h a a m y l a s e s) (例えば、 E . C . クラス 3 . 2 . 1 . 1) 」はアルファ 1、4 グルコシド結合の加水分解を触媒する酵素をいう。また、これらの酵素は 1、4 アルファ 結合 D グルコース単位を含むポリサッカライド中 1、4 アルファ D グルコシド結合のエキソ又はエンド加水分解に影響するものとして記載される。これらの酵素を記載するために用いる別の用語は「グリコゲナーゼ (g l y c o g e n a s e) 」である。一般的に酵素はアルファ 1、4 グルカン 4 グルカノヒドラーゼ グルカノヒドロレースである。

50

【 0 0 2 6 】

本明細書にて用いる用語「グルコアミラーゼ (g l u c o a m y l a s e) 」は酵素 (例えば、E . C . クラス 3 . 2 . 1 . 3、グルコアミラーゼ、1、4 アルファ D グルカン グルコヒドロラーゼ) のアミログルコシダーゼの区分をいう。これらはエキソ 作用酵素であって、アミロース及びアミロペクチン分子の非還元末端からグルコシル残基を遊離する。また、酵素はアルファ 1 , 4 結合より非常に遅い速度だが、アルファ 1 , 6 及びアルファ 1 , 3 結合を加水分解する。

【 0 0 2 7 】

用語「プロモーター (p r o m o t e r) 」は遺伝子の転写を開始するために R N A ポリメラーゼの結合に関与する調節配列を意味する。

10

【 0 0 2 8 】

本明細書で用いる「異種プロモーター (h e t e r o l o g o u s p r o m o t e r) 」は遺伝子又は精製核酸と結合するように配置されるプロモーターで、遺伝子又は精製核酸に自然的には結合しないプロモーターをいう。

【 0 0 2 9 】

本明細書にて用いる「精製調製物 (p u r i f i e d p r e p a r a t i o n) 」及びポリペプチドの「実質的に純粋な調製物 (s u b s t a n t i a l l y p u r e p r e p a r a t i o n) 」はポリペプチドが自然に発生している細胞、他のタンパク質、脂質又は核酸から分離されたポリペプチドを意味する。

【 0 0 3 0 】

本明細書で用いる「相同性 (H o m o l o g o u s) 」は二つ以上のポリペプチド分子の間で又は二つ以上の核酸分子の間での配列相同性をいう。比較された配列の位置が同じ塩基又はアミノ酸のモノマーサブユニットによって占有されているとき、(例えば、もし二つの D N A 分子のそれぞれの位置がアデニンによって占有されているならば) それらの分子はその位置において相同性がある。二つの配列間の相同性のパーセントは二つの配列によって一致し又は相同性のある位置の数を比較した位置の数で割り、100 倍して得る関数である。例えば、二つの配列において一致し又は相同性のある場所がもし、10 のうち 6 であれば、二つの配列は 60 % の相同性である。一例として D N A 配列 A T T G C C と T A T G G C は 50 % の相同性を有している。一般的に最大の相同性を得るように二つの配列を整列させて比較を行う。用語「% ホモロジー (% h o m o l o g y) 」は用語「% 同一性 (% i d e n t i t y) 」と本明細書にて互換可能に用い、配列アライメントプログラムを用いて整列される場合、核酸配列又はアミノ酸配列間での核酸又はアミノ酸配列 同一性 のレベルをいう。

20

30

【 0 0 3 1 】

本明細書にて用いる用語「ベクター (v e c t o r) 」は核酸を 1 つ以上の細胞タイプに導入するために設計されるポリヌクレオチド配列をいう。ベクターはクローニングベクター、発現ベクター、シャトルベクター、プラスミド、ファージ粒子及びカセット等を含む。

【 0 0 3 2 】

本明細書で用いる「発現ベクター (e x p r e s s i o n v e c t o r) 」は適切な宿主において D N A の発現に影響を与えることのできる適切な制御配列に作動可能に結合される D N A 配列を含む D N A 構築体を意味する。

40

【 0 0 3 3 】

用語「発現 (e x p r e s s i o n) 」は遺伝子の核酸配列に基づいてポリペプチドが生産することによるプロセスを意味する。

【 0 0 3 4 】

用語「共発現 (c o - e x p r e s s i o n) 」は少なくとも二つの異なる遺伝子が一つの細胞中に発現されることを意味する。それらは、外因性遺伝子又は内因性遺伝子でよい。それらは同じ又は異なるプラスミドから組み入れられ又は発現されてよく、それらは同じ又は異なるプロモーターから発現されてよい。

50

【0035】

本明細書にて用いる「作動可能に結合した (operably linked)」はプロモーター、ターミネーター、分泌シグナルまたはエンハンサー領域のような調節領域が構造遺伝子に接着又は結合し、その遺伝子の発現を制御する。宿主細胞の分泌系を通してタンパク質を指示する場合、シグナル配列はタンパク質に作動可能に結合する。

【0036】

本明細書で用いる「微生物 (microorganism)」は細菌、菌類、ウイルス、原生動物及び他の微生物又は顕微鏡的生物をいう。

【0037】

用語「糸状菌 (filamentous fungi)」は周知のようにユウミコチニア (Eumycotina) 亜門のすべての糸状菌の形態をいう。これらの菌はキチン、セルロース及び他の多糖類複合体で構成される細胞壁を有する栄養菌系を特徴とする。本発明の糸状菌は形態学的、生理学的、遺伝学的に酵母と異にする。糸状菌による栄養成長は菌糸伸長であり、炭素代謝は絶対好気性である。

10

【0038】

本明細書にて用いる用語「トリコデルマ (Trichoderma)」及び「トリコデルマ種 (Trichoderma sp.)」はトリコデルマ (Trichoderma) として従来又は現在に分類される任意の真菌属をいう。

【0039】

本明細書にて用いる用語「培養 (culturing)」は液体、半固体又は固体培地において適切な条件下微生物細胞の集団を増殖することをいう。幾つかの実施態様においては、培養は周知のような容器または反応器中に導入される。幾つかの実施態様においては、粒状デンプンを含む基質のようなデンプン基質の最終産物への発酵性バイオコンバージョンをもたらす。

20

【0040】

「発酵 (fermentation)」は、より簡単な有機化合物を生産するために微生物によって有機物質の酵素的及び嫌氣的分解をすることをいう。発酵は嫌氣的条件下で行われる一方、この用語は単に嫌気条件下で行われるものに限定されず、酸素存在下での発酵も意図する。

【0041】

細胞へ核酸配列を挿入するという文脈中「導入される (introduced)」という用語は、「トランスフェクション (transfection)」、「形質転換 (transformation)」、又は「形質導入 (transduction)」を意味し、真核又は原核細胞へ核酸配列を取り込むことであって、核酸配列が細胞の遺伝子 (例えば、染色体、プラスミド、プラスチド、又はミトコンドリアDNA) へ取り込み、自律的複製への転換、又は一時的な発現 (例えば、トランスフェクトされたmRNA) を特徴とする。

30

【0042】

本明細書にて用いる用語「形質転換した (transformed)」、「安定な形質転換 (stably transformed)」及び細胞に関して用いる「トランスジェニック (transgenic)」は細胞がその染色体へ組みこまれた又は複数の世代を通して維持されるエピソーム性プラスミドのような非天然の核酸配列を有することを意味する。

40

【0043】

ポリペプチド又は所望のタンパク質をコードするポリヌクレオチドに関して本明細書にて用いる用語「異種の (heterologous)」は宿主細胞中に自然的に発生しないポリペプチド又はポリヌクレオチドを意味する。

【0044】

ポリペプチド又は所望のタンパク質をコードするポリヌクレオチドに関して用語「相同の (homologous)」又は「内因性の (endogenous)」は宿主細胞中に

50

自然に発生する又は宿主細胞により自然に発現するポリペプチド又はポリヌクレオチドをいう。

【0045】

用語「過剰発現 (overexpression)」は野生型宿主細胞によって生産されるレベルよりも高いレベルで宿主細胞中ポリヌクレオチドを発現するプロセスを意味する。さらなる幾つかの実施態様においては、その用語は野生型細胞によって発現される同じ相溶性ポリペプチドの発現より高い濃度での相溶性ポリペプチドの発現をいう。

【0046】

本明細書に記載するように、発明のある態様は、タンパク質に作動可能に結合する NSP 24 シグナル又は CBH1 シグナルペプチド及び / 又は同等のそのような核酸をコードするヌクレオチド配列を含む「実質的に純粋な (substantially pure)」核酸に特徴づけられる。これらの実施態様においては、核酸は他の核酸及び / 又は細胞成分から単離される。

【0047】

「同等なもの (equivalent)」という用語は機能的に同等なポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列をいう。同等なヌクレオチド配列は、対立遺伝子多型のような、一以上のヌクレオチド置換、追加又は欠損によって異なる配列を含む。例えば、幾つかの実施態様においては、遺伝子コードの縮重によって、同等なヌクレオチド配列は配列番号 8 のヌクレオチド配列と異なる配列を含むが、配列番号 8 によりコードされる機能的に同等なポリペプチド配列であるポリペプチドの生産をもたらす。

【0048】

本発明は所望のタンパク質を生産する方法を提供する。方法は、

(a) 所望のタンパク質配列に作動可能に結合するシグナル配列を含む第一核酸配列を宿主細胞へ導入する段階、

(b) 前記第一核酸配列を発現する段階、

(c) b i p l、e r o l、p d i l、t i g l、p r p l、p p i l、p p i 2、p r p 3、p r p 4、カルネキシン (calnexin)、及び l h s l からなる群から選択されるシャペロン又はフォールダーゼをコードする第二核酸配列を共発現する段階、及び

(d) 宿主細胞から分泌される所望のタンパク質を回収する段階、

を含む。

【0049】

ある実施態様においては、さらに、第一核酸配列はシグナル配列と所望のタンパク質配列の間に酵素配列を含む。例えば、酵素配列がグルコアミラーゼから又は CBH1 酵素から得られる。ある実施態様においては、酵素配列が触媒部位、リンカー、及び結合部位を含む完全長の酵素配列である。別の実施態様においては、酵素配列は触媒部位配列を含み、リンカーにより所望のタンパク質発現に結合する。幾つかの実施態様においては、酵素は天然の宿主中に多く発現及び / 又は分泌される宿主タンパク質である。

【0050】

さらに第一核酸配列はシグナル配列の上流にプロモーターを含む。ある実施態様においては、プロモーターは宿主細胞に本来存在し、所望のタンパク質配列と自然には結合しない。

【0051】

第二核酸配列がプロモーターに作動可能に結合する。ある実施態様においては、プロモーターが宿主細胞に本来存在し、前記第二核酸配列と自然には結合しない。

【0052】

タンパク質の改善される発現

本発明は宿主細胞中所望のタンパク質の生産のための方法を提供する。タンパク質の生産はシャペロン、シャペロニン、及び / 又はフォールダーゼの共発現と組み合わせて分泌シグナル (例えば、NSP 24 シグナルペプチド又は CBH1 シグナルペプチド) を含有することにより増加する。幾つかの実施態様においては、分泌シグナルは子囊菌類 (A s c

10

20

30

40

50

omycetes) 宿主タンパク質由来である。幾つかの実施態様においては、所望のタンパク質は酵素の触媒部位に融合する。

【0053】

本発明は特に子囊菌類 (Ascomycetes) 宿主における他の菌類ファミリーから大量のタンパク質を生産することが困難であるという事実の点において顕著な有利な効果を提供する。実際に、当業者にとって菌類又は細菌の宿主において任意の異種の菌類タンパク質を生産することはしばしば困難である。本発明は適切な菌類又は細菌の宿主において任意の適切なタンパク質の生産に有用な方法及び組成物を提供する。幾つかの実施態様においては、菌類宿主は子囊菌類 (Ascomycetes) 及びタンパク質は担子菌類 (Basidiomycetes) タンパク質であり、一方他の実施態様においては、菌類宿主は担子菌類 (Basidiomycetes) 及びタンパク質は子囊菌類 (Ascomycetes) タンパク質である。

10

【0054】

幾つかの実施態様においては、本発明はタンパク質の供給源として同じ生物からシャペロン又はフォールダーゼの一以上の共発現を組み合わせる宿主シグナルペプチドを用いる宿主中のタンパク質の発現及び/又は分泌を増加するための方法を提供する。つまり、幾つかの実施態様においては、異種の子囊菌類 (Ascomycetes) タンパク質は担子菌類 (Basidiomycetes) 宿主シグナルペプチド及び子囊菌類 (Ascomycetes) シャペロンを用いて担子菌類 (Basidiomycetes) 宿主中に発現する。幾つかの別の実施態様においては、異種の担子菌類 (Basidiomycetes) タンパク質は子囊菌類 (Ascomycetes) 宿主シグナルペプチド及び子囊菌類 (Ascomycetes) 又は担子菌類 (Basidiomycetes) シャペロンを用いて子囊菌類 (Ascomycetes) 宿主中に発現する。幾つかの実施態様においては、子囊菌類 (Ascomycetes) 宿主はトリコデルマ (Trichoderma) 属の仲間である。幾つかの実施態様においては、トリコデルマ (Trichoderma) はトリコデルマ レーシ (Trichoderma reesei) であり、トリコデルマ レーシ (T. reesei) の多様な菌株を含む。幾つかの別の実施態様においては、担子菌類 (Basidiomycetes) はセレナ (Cerrina) 属の仲間であり、セレナ ユニカラー (C. unicolor) を含むが、これに限定されない。

20

30

【0055】

本発明の幾つかの実施態様においては、所望のタンパク質の発現及び/又は分泌を所望のタンパク質と同じ生物から一以上のシャペロンの外因性共発現と組み合わせる宿主酵素にタンパク質を融合することにより増加する。共発現は同じプラスミドを介しても、分離したプラスミドを介しても達成される。

【0056】

さらに追加的な実施態様においては、所望のタンパク質の発現及び/又は分泌を宿主酵素の触媒部位にタンパク質を結合し、宿主シグナル配列にタンパク質を作動可能に結合する組み合わせ、及び好ましくはタンパク質と同じ生物由来のシャペロン、シャペロニン、及び/又はフォールダーゼの一以上の外因性共発現をすることにより増加する。

40

【0057】

本明細書にて提供する種々の実施態様に引用される要素は任意の適切な組み合わせにて用いることが考えられる。即ち、種々の実施態様の局面は互いに組み合わせることで、実施態様は本明細書にて提供する特定の記述に限定することを意図していない。

【0058】

シグナルペプチド

本発明に用いる特定のシグナルペプチドはシグナルペプチドが宿主中に作動的である限り条件はない。「作動的なシグナルペプチド (operable signal peptide)」によってシグナルペプチドが宿主細胞中タンパク質に作動可能に結合するタンパク質の分泌増加を提供する。幾つかの実施態様においては、シグナルペプチドは強く分

50

泌されるタンパク質及び／又は強力なシグナルペプチドから得られる。「強力なシグナルペプチド (strong signal peptide)」は天然のタンパク質がその天然の宿主により多く分泌される場合に得られる。幾つかの実施態様においては、シグナルペプチドは宿主細胞と同門の中での生物から得られる。実際に、幾つかの実施態様においては、これは有利である。幾つかの実施態様においては、シグナルペプチド及び宿主細胞は同属であり、一方、幾つかの追加的な実施態様においては、シグナルペプチド及び宿主細胞は同種である。例えば、幾つかの実施態様においては、宿主細胞は子囊菌類 (Ascomycetes) 宿主細胞及びシグナルペプチドは子囊菌類 (Ascomycetes) から得られる。幾つかの実施態様においては、宿主細胞はトリコデルマ (Trichoderma) 及びシグナルペプチドはトリコデルマ (Trichoderma) から得られる。幾つかの実施態様においては、宿主細胞はトリコデルマ レーシ (T. reesei) 及びシグナルペプチドはトリコデルマ レーシ (T. reesei) から得られる。幾つかの実施態様においては、シグナルペプチドは強力なシグナルペプチドである。いくつかの別の実施態様においては、宿主細胞は担子菌類 (Basidiomycetes) 宿主細胞及びシグナルペプチドは担子菌類 (Basidiomycetes) から得られる。本発明にて用いるシグナルペプチドの幾つかの例は、CBHI 及び NSP24 シグナルペプチドを含むが、これらに限定されない。シグナルペプチドは子囊菌類 (Ascomycetes) のような門の他の仲間において働くことができるが、幾つかの実施態様においては、それが得られた属において用いる場合 (言い換えると、多くの分泌を提供するために) シグナルペプチドが最適に使用される。

【0059】

本明細書にて用いる「強く分泌されるタンパク質 (strongly secreted protein)」は細胞から分泌される総タンパク質の相当の量を形成する任意のタンパク質である。また、細胞から分泌される総タンパク質は「細胞外タンパク質」という。例えば、強く分泌されるタンパク質は細胞外タンパク質の少なくとも約 2 %、少なくとも約 3 %、少なくとも約 4 %、少なくとも約 5 %、少なくとも約 6 %、少なくとも約 7 %、少なくとも約 8 %、少なくとも約 9 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、又は少なくとも約 99 % を含む。幾つかの実施態様においては、強く分泌されるタンパク質は培養上清中細胞外タンパク質の少なくとも 5 % を含む。

【0060】

CBHI シグナルペプチド、リンカー、及び触媒部位

トリコデルマ レーシ (Trichoderma reesei) は幾つかのセルラーゼ酵素を生産し、セロピオヒドロラーゼ I (CBHI) であって、延長したリンカー領域により分離される二つの分離した部位 (言い換えると、触媒及び結合部位) にフォールディングする。外来ポリペプチドは触媒部位プラス CBHI のリンカー領域を有する融合としてトリコデルマ レーシ (T. reesei) において分泌されている (例えば、Nyssonen 他、Bio/Technol. 11:591-595 [1993] を参照願いたい)。また、トリコデルマ ロンギブラキアタム (T. longibrachiatum) は融合において、並びにシグナルペプチド及び／又はリンカーの単離において用いる CBHI を生産する。リンカーは酵素の触媒部位及び所望のポリペプチドを接続するとき用いてよい。独立的にフォールディングされる領域の間でリンカーが延長され、セミ リジッドスパーサーを形成する限り、任意の適切なリンカーを本発明に用いてよい。そのようなリンカー領域は幾つかのタンパク質にみられ、特にヒドロラーゼ類 (例えば、細菌及び菌類セルラーゼ類及びヘミセルラーゼ類、例えば、Libby 他、Protein Engineering, Design and Selection (1994) vol. 7, 1109-1114 を参照願いたい) である。

【0061】

図 9 に示すように、CBHI (配列番号 10) について、シグナル配列は塩基対 210 に

10

20

30

40

50

て開始し、塩基対 260 (配列番号 11) にて終わる。触媒コアは塩基対 261 にて開始し 1698 (配列番号 12) までであり、イントロン 1 (塩基対 671 から 737)、及びイントロン 2 (塩基対 1435 から 1497) を含む。リンカー配列は塩基対 1699 にて開始し、塩基対 1770 (配列番号 13) にて終わる。セルロース結合部位は塩基対 1771 にて開始し、塩基対 1878 までである。CBHI に関する配列及び部位の情報はエクスパシー オーガニゼーション ウェブサイト (expasy organization website) を介して得られ、設計された uniprot/P62694 である。CBHI 相同体を他のトリコデルマ (*Trichoderma*) 種並びに他の糸状菌の仲間の中で同定し、必要に応じて、本発明に用いてよい。

【0062】

NSP24 シグナルペプチド及びポリヌクレオチド

NSP24 遺伝子をトリコデルマ レーシ (*T. reesei*) から単離し、シークエンシングした (例えば、米国特許第 7,429,476 号を参照願いたい、その全体を参照により本明細書に取り込まれる)。この遺伝子のシークエンシングは図 8 に示すように、407 アミノ酸オープンリーディングフレーム (配列番号 8) をコードする配列を同定した。シグナルペプチドを配列番号 8 の最初の 20 アミノ酸 (MQTFGAFLVSFLAASGLAAA; 配列番号 9) として同定した。NSP24 相同体を他のトリコデルマ (*Trichoderma*) 種並びに他の糸状菌の仲間の中で同定し、必要に応じて、本発明に用いてよい。幾つかの実施態様においては、NSP24 シグナル配列を子囊菌類 (*Ascomycetes*) 生物中に用いる。幾つかの実施態様においては、その配列をトリコデルマ種 (*Trichoderma* spp.) 中で用い、さらにある実施態様においては、トリコデルマ レーシ (*T. reesei*) 中で用いる。

【0063】

即ち、本発明はタンパク質を分泌するのに用いてよい NSP24 ファミリープロテアーゼシグナルペプチドを提供する。幾つかの実施態様においては、NSP24 シグナルペプチドは設計された「NSP24 アスパラギンプロテアーゼシグナルペプチド (NSP24 aspartic protease signal peptide)」である。

【0064】

本発明のポリヌクレオチド

本発明は多様なポリヌクレオチドを提供し、所望のタンパク質、シグナルペプチド、触媒部位、リンカー、シャペロン、シャペロニン、及びフォールダーゼを含むが、これらに限定されない。幾つかの実施態様においては、ポリヌクレオチドは上記の少なくとも 2 つを含む。さらに他の実施態様においては、本発明のポリヌクレオチドは上記の少なくとも 3 つを含む。

【0065】

幾つかの実施態様においては、ポリヌクレオチドは L アミノ酸を用いる「同類アミノ酸置換 (conservative amino acid substitution)」のような少なくとも一つのアミノ酸置換を含むタンパク質をコードする。ここで、ひとつのアミノ酸は他の生物学的に同類のアミノ酸によって置換される。同類アミノ酸置換は一般的な電荷、疎水性/親水性及び/又は置換されているアミノ酸の立体的かさ高さを保存するアミノ酸置換である。保存的置換の例は次のグループの間でのアミノ酸置換である。Gly/Ala、Val/Ile/Leu、Lys/Arg、Asn/Gln、Glu/Asp、Ser/Cys/Thr、及び Phe/Trp/Tyr である。幾つかの実施態様においては、「タンパク質誘導体 (derivative proteins)」を本発明中に用いてよい。これらの実施態様の幾つかにおいて、タンパク質誘導体は「親 (parent)」タンパク質配列に比較して、僅か約 1 から約 10 個のアミノ酸残基、例えば約 6 から約 10 個、僅か約 5 個、僅か約 4、約 3、約 2 個又は 1 個でさえアミノ酸残基の違いでもよい。表 1 は従来技術によって認められる典型的なアミノ酸置換を示す。さらなる実施態様においては、置換は一以上の非同類アミノ酸置換、欠損、又は挿入に關与し、シグナルペプチド活性を消失しない。

10

20

30

40

50

【表 1】

表1 保存的アミノ酸置換

アミノ酸	1文字 コード	次のいずれかで置換
アラニン	A	D-Ala, Gly, ベータ-Ala, L-Cys, D-Cys
アルギニン	R	D-Arg, Lys, D-Lys, ホモ-Arg, D-ホモ-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
アスパラギン	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
アスパラギン酸	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
システイン	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
グルタミン	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
グルタミン酸	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
グリシン	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, β-Ala, Acp
イソロイシン	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
ロイシン	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
リシン	K	D-Lys, Arg, D-Arg, ホモ-Arg, D-ホモ-Arg, Met, D- Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
メチオニン	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
フェニルアラニン	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, トランス-3,4,又は5-フェニルプロリン, シス-3,4,又は5- フェニルプロリン
プロリン	P	D-Pro, L-1-チオアザリジン-4-カルボン酸, D-又はL-1- オキサリジン-4-カルボン酸
セリン	S	D-Ser, Thr, D-Thr, α-Thr, Met, D-Met, Met(O), D- Met(O), L-Cys, D-Cys
トレオニン	T	D-Thr, Ser, D-Ser, α-Thr, Met, D-Met, Met(O), D- Met(O), Val, D-Val
チロシン	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
バリン	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

【0066】

幾つかの実施態様においては、本発明のポリヌクレオチドは天然の配列である。幾つかの実施態様においては、天然配列は天然から単離され、一方他の実施態様においては、それらは組み換え手段又は合成手段で作成される。用語「天然の配列(native sequence)」は特に自然に発生する欠損又は分泌形状(例えば、生物学的に活性フラグメント)及び天然配列の自然に発生する変異体の形状を含む。

【0067】

遺伝子コードは縮重するので、2以上のコドンを用いて特定のアミノ酸のコードに用いてよい。従って、幾つかの実施態様においては、異なるDNA配列をシグナルペプチド、タンパク

10

20

30

40

50

質、触媒部位、及び／又はシャペロンのような任意のポリペプチドをコードするのに用いてよい。実際に、本発明は同じポリペプチドをコードする異なるポリヌクレオチドを含むことを意図する。

【 0 0 6 8 】

温度及び溶液のイオン強度の適切な条件下核酸の一本鎖の形状が他の核酸ヘアニールすることができる時核酸は別の核酸配列にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション及び洗浄条件は低い、中程度、高い及びかなり高い条件下ハイブリダイゼーションに関してその分野において周知である。一般的にハイブリダイゼーションはヌクレオチドプローブ及びDNA相同体配列に関与し、相補ポリヌクレオチドの広い塩基対により安定な二本鎖ハイブリッドを形成する。幾つかの実施態様においては、約60に（中程度のストリンジエンシー）、65（中／高いストリンジエンシー）、70（高いストリンジエンシー）及び約75（とても高いストリンジエンシー）にてプローブ及び配列相同体を有するフィルターを2×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）、0.5% SDSで洗浄する（例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989, 6.3.1 - 6.3.6を参照願いたい、参照により本明細書に取り込まれる）。

【 0 0 6 9 】

本発明は対立遺伝子の変異体、天然の変異体、導入変異体、ラッカーゼをコードする核酸に高い又は低いストリンジエンシー条件下ハイブリダイズするDNAによりコードされるタンパク質、NSP24のシグナル配列、CBHIのシグナル配列、触媒部位、シャペロン、シャペロニン、及びフォールダーゼを含む。本発明の核酸及びポリペプチドは開示される配列中シーケンシングの誤りにより生じた、本明細書に記載の配列と異なるものも含む。

【 0 0 7 0 】

「DNA配列の相同性（Homology of DNA sequences）」は二つのDNA配列の間の相同性の程度によって決定される。しばしば相同性又は「パーセント同一性（percent identity）」は、コンピュータプログラムを用いてポリペプチド配列及び／又はヌクレオチド配列を決定される。配列整列の実行及び配列同一性の決定の方法は当業者に周知であり、過度の実験をせずに実施してよく、同一性の計算値は明確に得られる。配列整列化及び配列同一性の決定をするためのアルゴリズムの多くは入手が可能であり、当業者に周知である。また、これらのアルゴリズムに使用するコンピュータプログラムは入手可能及び当業者に周知であり、以下のものを含むがこれらに限定はされない。即ち、ALIGN又はMegalign(DANSTAR)ソフトウェア又はWU-BLAST-2、GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、TFASTA及びCLUSTALである。当業者であれば比較される配列の長さに渡って最大の配列整列を達成するために必要であるアルゴリズムを含め、整列を測定する適切なパラメータを決定できる。配列同一性はプログラムによって決定されたデフォルトパラメータを使用することにより決定される。幾つかの実施態様においては、このアルゴリズムが次のサーチパラメータで、すなわち12のギャップ開始ペナルティ及び1のギャップ伸長ペナルティで、アフラインギャップサーチを使用しているMSPRCH program (Oxford Molecular) で実行される場合、配列同一性はSmith-Waterman homology search algorithm (Smith Waterman, Meth. Mol. Biol. 70: 173-187 (1997)) によって決定される。対のアミノ酸の比較は12のギャップウエイトと2のレングスウエイトをもつblossum62アミノ酸置換行列を使用しているGenetics Computer Group, Inc. (Madison, WI) のGCG配列分析ソフトウェアパッケージのGAPプログラムの使用により実行される。二つのアミノ酸配列の最適整列に関して、種々のアミノ酸配列の連続セグメントは参照アミノ酸配列に対して追加アミノ酸残基又は欠損アミノ酸残基をもってもよい。参照アミノ酸配列と比較するために使用した連続セグメントは少なくとも20アミノ酸残基を含んでもよく、約30、約40、約50又はそ

10

20

30

40

50

れ以上のアミノ酸残基を含んでもよい。幾つかの実施態様においては、誘導体のアミノ酸配列中ギャップを含む関係で増加した配列同一性の補正はギャップペナルティを割り当てることにより実行できる。

【 0 0 7 1 】

幾つかの実施態様においては、本発明により含まれるタンパク質、シグナルペプチド、酵素触媒部位、シャペロン、シャペロニン、及び／又はフォールダーゼは細菌又は糸状菌のような菌類由来である。糸状菌の例は、アスペルギルス種 (*Aspergillus* spp.) 及びトリコデルマ種 (*Trichoderma* spp.) を含む。トリコデルマ種 (*Trichoderma* spp.) の有る例はトリコデルマ レーシ (*T. reesei*) である。しかしながら、幾つかの実施態様においては、本発明により提供さ

10

れるシグナルペプチド及び／又はシグナルペプチドをコードするDNAは菌類の別の属又は種の由来でよく、次を含むが、これらに限定されない。それは
 アブシディア種 (*Absidia* spp.)、
 アクレモニウム種 (*Acremonium* spp.)、
 アガリクス種 (*Agaricus* spp.)、
 アナエロミセス種 (*Anaeromyces* spp.)、
 アスペルギルス アキュレイタス (*A. aculeatus*)、アスペルギルス アワモリ (*A. awamori*)、アスペルギルス フラバス (*A. flavus*)、
 アスペルギルス フォエティダス (*A. foetidus*)、アスペルギルス フマリクス (*A. fumaricus*)、アスペルギルス フミガツス (*A. fumi* 20
gatus)、アスペルギルス ニドゥラン (*A. nidulans*)、アスペルギルス ニガー (*A. niger*)、アスペルギルス オリザエ (*A. oryzae*)、アスペルギルス テレウス (*A. terreus*) 及びアスペルギルス ベルシカラー (*A. versicolor*) を含むが、これらに限定されないアスペルギルス種 (*Aspergillus* spp.)、
 オーロバシジウム種 (*Aeurobasidium* spp.)、
 セレナ種 (*Cerrena* spp.)、
 セファロスボルム種 (*Cephalosporum* spp.)、
 セファロスボリウム種 (*Cephalosporium* spp.)、
 カエトミウム種 (*Chaetomium* spp.)、 30
 コプリナス種 (*Coprinus* spp.)、
 ダクチラム種 (*Dactyllum* spp.)、
 ダクチリウム種 (*Dactylium* spp.)、
 フザリウム コングロメランズ (*F. conglomerans*)、フザリウム デセムセルレーレ (*F. decemcellulare*)、フザリウム ジャバニクム (*F. javanicum*)、フザリウム リニ (*F. lini*)、フザリウム オキシスポラム (*F. oxysporum*) 及びフザリウム ソラニ (*F. solani*) を含むフザリウム種 (*Fusarium* spp.)、
 グリオクラジウム種 (*Gliocladium* spp.)、
 フミコーラ インソレンス (*Humicola insolens*)、フミコーラ ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*) を含むフミコーラ種 (*Humicola* 40
la spp.)、
 ムコール種 (*Mucor* spp.)、
 ニューロスボラ クラッサ (*N. crassa*) 及びニューロスボラ シトフィラ (*N. sitophila*) を含むニューロスボラ種 (*Neurospora* spp.)、
 ネオカリマスチックス種 (*Neocallimastix* spp.)、
 オリピノミセス種 (*Orpinomyces* spp.)、
 ペニシリウム (*Penicillium* spp.)、
 ファネロケート種 (*Phanerochaete* spp.)、
 フェレビア種 (*Phlebia* spp.)、 50

ブリオミセス種 (*Piromyces* spp.)、
 リゾプス種 (*Rhizopus* spp.)、
 シゾフィラム種 (*Schizophyllum* spp.)、
 スタキボトリス種 (*Stachybotrys* spp.)、
 ترامetes種 (*Trametes* spp.)、
 トリコデルマレーシ (*T. reesei*)、トリコデルマレーシ (*T. reesei*) (ロングブラチアタム (*longibrachiatum*)) 及びトリコデルマ
 ビリデ (*T. viride*) を含むトリコデルマ種 (*Trichoderma* spp.)、及び
 ジゴリンクス種 (*Zygorhynchus* spp.) である。

10

【0072】

触媒部位融合

所望のタンパク質を酵素へ融合することはしばしば所望のタンパク質の発現及び/又は分泌を増加させる。一般的に、酵素配列は構築体中所望のタンパク質の上流にある。例えば、酵素はグルコアミラーゼから又はCBHI酵素から得られる。ある実施態様においては、酵素配列は触媒部位、リンカー、及び結合部位を含む完全長酵素配列である。別の実施態様においては、酵素配列は触媒部位配列を含み、リンカー又は一部のリンカーにより所望のタンパク質配列に結合している。幾つかの実施態様においては、酵素は天然宿主中高く発現及び/又は分泌する宿主タンパク質である。例えば、宿主細胞がトリコデルマ (*Trichoderma*) 宿主細胞である場合、酵素はトリコデルマ (*Trichoderma*) タンパク質由来である。しかしながら、多くの糸状菌タンパク質をタンパク質への融合に用いてよく、首尾よく他の糸状菌の宿主を用いてよいことは理解される。

20

【0073】

シャペロン、シャペロニン及びフォールダーゼ

本発明の方法に用いる特定のシャペロン、シャペロニン、及び/又はフォールダーゼ及び本発明に含まれるポリヌクレオチドは限定されない。さらに、本明細書にシャペロン、シャペロニン、及び/又はフォールダーゼの使用を記載する場合、それらを方法中互換可能に用いる。例えば、シャペロンを用いる方法を記載する場合、フォールダーゼ及び/又はシャペロニンを記載されたシャペロンに変えて又は加えて用いてよいことは理解される。本発明に有用なシャペロン、シャペロニン、及び/又はフォールダーゼは宿主細胞中活性

30

【0074】

幾つかの実施態様においては、シャペロン、シャペロニン、及び/又はフォールダーゼはタンパク質と同門の生物由来であり、同属由来でよく、また、同属及び同種由来でもよい。いくつかの別の実施態様においては、シャペロン、シャペロニン、及び/又はフォールダーゼは担子菌類 (*Basidiomycetes*) 由来であり、タンパク質は担子菌類 (*Basidiomycetes*) タンパク質である。幾つかの実施態様においては、シャペロン、シャペロニン、及び/又はフォールダーゼを組み合わせで用いる。幾つかの実施態様においては、実質的に完全長のシャペロン、シャペロニン、及び/又はフォールダーゼと同様の機能を有するシャペロン、シャペロニン、及び/又はフォールダーゼのフラグメントを用いてよい。一般的なシャペロン、シャペロニン、及び/又はフォールダーゼは米国特許出願 60/919,332 及び WO 2008/115596 に記載のものを含み、全体を参照により本明細書に組み込む。一般的なシャペロン、シャペロニン、及び/又はフォールダーゼは BIP1、CLX1、ERO1、LHS1、PRP3、PRP4、PRP1、TIG1、PDI1、PPI1、PPI2、SCJ1、ERV2、EDEM、及び SIL1 を含むがこれらに限定されない。表2は本発明に使用できるシャペロン、シャペロニン、及び/又はフォールダーゼに関する番号を表示する。

40

【表 2】

表2:分泌増強タンパク質の核酸及びポリペプチド配列の例示		
タンパク質	核酸配列の例示	ポリペプチド配列の例示
BIP1	配列番号: 15	配列番号: 30
CLX1	配列番号: 16	配列番号: 31
ERO1	配列番号: 17	配列番号: 32
LHS1	配列番号: 18	配列番号: 33
PRP3	配列番号: 19	配列番号: 34
PRP4	配列番号: 20	配列番号: 35
PRP1	配列番号: 21	配列番号: 36
TIG1	配列番号: 22	配列番号: 37
PDI1	配列番号: 23	配列番号: 38
PPI1	配列番号: 24	配列番号: 39
PPI2	配列番号: 25	配列番号: 40
SCJ1	配列番号: 26	配列番号: 41
ERV2	配列番号: 27	配列番号: 42
EDEM	配列番号: 28	配列番号: 43
SIL1	配列番号: 29	配列番号: 44

【0075】

分子生物学 - プロモーター及び発現ベクター

本発明は当業者に周知である組み換え遺伝子の分野で所定の技術を用いる。幾つかの実施態様においては、本発明は複製及び/又は発現のために宿主細胞（例えば、トリコデルマレーシ（*Trichoderma reesei*）細胞）に形質転換する前に中間体ベクターへ典型的にクローン化する遺伝子プロモーター配列（例えば、糸状菌由来）を含む異種の遺伝子を提供する。これらの中間体ベクターは一般的に原核生物のベクター（例えば、プラスミド、又はシャトルベクター）である。

【0076】

一般的に、所望のタンパク質の発現は任意の適切なプロモーター下に達成される。ある実施態様においては、宿主に対して非天然のプロモーターを宿主に対して天然又は非天然いずれかである所望のタンパク質をコードするポリヌクレオチドに作動可能に結合する。別の実施態様においては、宿主に対して天然のプロモーターを宿主に対して天然又は非天然いずれかである所望のタンパク質をコードするポリヌクレオチドに作動可能に結合する。幾つかの実施態様においては、所望のタンパク質を異種プロモーター下発現し、プロモーターは所望のタンパク質遺伝子と自然に結合しないことを特徴とする。一方、幾つかの他の実施態様においては、所望のタンパク質は構成的プロモーター又は誘導プロモーター下

に発現する。幾つかの実施態様においては、所望のタンパク質はセルラーゼプロモーター（例えば、c b h 1 プロモーター）を有するトリコデルマ（*Trichoderma*）発現系中に発現する。

【0077】

本明細書にて用いる用語「プロモーター（*promoter*）」は下流遺伝子の転写を指示する機能を有する核酸配列をいう。プロモーターは、ポリメラーゼIIタイプのプロモーターの場合、TATAエレメントのような転写開始サイトの近くの必要な核酸配列を含んでよい。他の転写及び翻訳調節核酸配列と共に含むプロモーターはまとめて「調節配列（*regulatory sequences*）」といい、遺伝子の発現を制御する。一般的に、調節配列はプロモーター配列、リボゾーム結合部位、転写開始と停止配列、翻訳開始と停止配列、及びエンハンサー又は活性化配列を含むが、これらに限定されない。調節配列は一般的に宿主に適応し、認識され、下流遺伝子を発現する。幾つかの実施態様においては、用いるプロモーターは宿主細胞と同じ門由来であり、他の実施態様においては、プロモーターは宿主細胞と同じ属であり、及び幾つかの実施態様においては、宿主細胞と同じ属及び種由来である。

10

【0078】

「構成的プロモーター（*constitutive promoter*）」はたいていの環境の条件及び成長の条件下活性であるプロモーターである。「誘導的（*inducible*）」又は「抑制的プロモーター（*repressible promoter*）」は環境の調節又は成長の調節下活性であるプロモーターである。幾つかの実施態様においては、プロモーターは環境因子の変化により誘導され又は抑制され、それらの環境因子は、炭素、窒素又は他の栄養供給源、温度、pH、浸透圧、重金属の存在、阻害剤の濃度、ストレス、又は周知である外来物の組み合わせを含み、これらに限定されない。幾つかの実施態様においては、プロモーターは、特定の炭素源のレベル、特定のエネルギー源のレベル、特定のカタボライトのレベル、又は周知の外来物の組み合わせのような代謝因子により誘導され又は抑制される。

20

【0079】

適切なプロモーターの例は、c b h 1、c b h 2、e g l 1、e g l 2、e g l 3、e g l 4、e g l 5、x y n 1、とx y n 2、ベニシリウム クリソゲナム（*P. chrysogenum*）の抑制的酸性フォスファターゼ遺伝子（*phoA*）プロモーター（Graessle他、Appl. Environ. Microbiol., 63:753-756 [1997]を参照願いたい）、グルコース 抑制的PCK1プロモーター（Leuker他、Gene 192 :235-240 [1997]を参照願いたい）、マルトース 誘導的、グルコース 抑制的MRP1プロモーター（Munro他、Mol. Microbiol., 39 1414- 1426 [2001]を参照願いたい）、メチオニン 抑制的MET3プロモーター（Liu他、Eukary. Cell 5:638- 649 [2006]を参照願いたい）、pKiプロモーター、及びcpclプロモーターを含むがこれらに限定されない。

30

【0080】

本発明の幾つかの実施態様においては、レポーター遺伝子の構築中のプロモーターは温度感受性プロモーターである。幾つかの実施態様においては、温度 感受性プロモーターの活性は温度上昇により抑制される。幾つかの実施態様においては、プロモーターはカタボライト 抑制プロモーターである。幾つかの実施態様においては、プロモーターは浸透圧の変化により抑制される。幾つかの実施態様においては、プロモーターは培養培地中多糖類、二糖類、単糖類の存在レベルにより誘導され又は抑制される。

40

【0081】

本発明にて用いてよい誘導的プロモーターの例はトリコデルマ レーシ（*T. reesei*）のc b h 1 プロモーター、登録番号D86235のGenBankに寄託の核酸配列である。他のプロモーターの例はセルラーゼ酵素をコードする遺伝子の調節に関与するプロモーターを含み、それはc b h 2、e g l 1、e g l 2、e g l 3、e g l 5、x y

50

n 1 及び x y n 2 を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 8 2 】

本発明の幾つかの実施態様においては、クローン化遺伝子の高い発現レベルを得るために異種の遺伝子を自然に発生する遺伝子と同じようなプロモーターからの距離に有利に配置する。しかしながら、周知のように、この距離での幾つかの変化はプロモーターの機能の消失なしに成し遂げられる。

【 0 0 8 3 】

幾つかの実施態様においては、修飾がプロモーターの機能を変化させない限り、一以上のヌクレオチドの交換、置換、添加、又は放出によって修飾される天然のプロモーターを本発明において用いてよい。実際に、本発明はプロモーターへのそのような変異を含むが、これに限定されないことを意図する。

【 0 0 8 4 】

一般的に発現ベクター / 構築体は異種配列の発現に必要なすべての添加要素を含む転写ユニット又は発現カセットを含む。従って、典型的な発現カセットは転写物、リボソーム結合部位、及び翻訳ターミネーションの効率的なポリアデニル化を必要とする異種の核酸配列及びシグナルに作動可能に結合するプロモーターを含む。カセット内の追加的要素はエンハンサーと、もしゲノム DNA を構造遺伝子として用いるならば、機能的なスプライス供与部位及びスプライス受容部位を有するイントロン、分泌リーダーペプチド、リーダー配列、リンカー、及び切断部位を含んでよい。

【 0 0 8 5 】

本発明の実施は遺伝子構築体におけるプロモーターの選択により限定されない。上記に示すように、一般的なプロモーターはトリコデルマ レーシ (*Trichoderma reesei*) の c b h 1、c b h 2、e g 1、e g 2、e g 3、e g 5、x l n 1 及び x l n 2 プロモーターである。本発明に用いるさらなるプロモーターはアスペルギルス アワモリ (*A. awamori*) 及びアスペルギルス ニガー (*A. niger*) グルコアミラーゼ遺伝子 (g l a A) (Nunberg他、Mol. Cell Biol., 4:2306-2315 [1984]を参照願いたい) 由来のもの及びアスペルギルス ニドゥラン (*A. nidulans*) アセタミダーゼ由来のプロモーターを含む。バシルス スプチリス (*Bacillus subtilis*) にて用いるベクターでの典型的なプロモーターは A p r E プロモーター、大腸菌 (*E. coli*) にて用いる典型的なプロモーターは L a c プロモーター、サッカロミセス セレビジアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) にて用いる典型的なプロモーターは P K G 1、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) にて用いる典型的なプロモーターは g l a A、及びトリコデルマ レーシ (*Trichoderma reesei*) での典型的なプロモーターは c b h I である。しかしながら、多様な実施態様において、他の細胞及びプロモーターを用いてよいように、本発明はこれらの具体的な細胞又はこれらの具体的なプロモーターに限定されることを意図していない。

【 0 0 8 6 】

幾つかの実施態様においては、プロモーターの配列に加えて、配列カセットも構造遺伝子の下流に転写ターミネーション領域を含み、効率のよい終結を提供する。幾つかの実施態様においては、ターミネーション領域をプロモーター配列と同じ遺伝子から得る一方、他の実施態様においては、異なる遺伝子から得る。

【 0 0 8 7 】

任意の適切な機能的菌類ターミネーターを本発明にて用いてよいが、幾つかの典型的なターミネーターはアスペルギルス ニドゥラン (*Aspergillus nidulans*) t r p C 遺伝子由来のターミネーター (Yelton他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1470-1474 (1984); Mullaney他、(Molecular Genetics and Genomics [MGG] 199:37-45 (1985)を参照願いたい)、アスペルギルス アワモリ (*Aspergillus awamori*) 又はアスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) グルコアミラーゼ遺伝子 (Nunberg他、Mol. Cell. Biol., 4:2306 (1984);B

oel他、EMBO J., 3:1581-1585 (1984)を参照願いたい)、アスペルギルス オリザエ (*Aspergillus oryzae*) TAKAアミラーゼ遺伝子、ムコール ミエハイ (*Mucor miehei*) カルボキシプロテアーゼ遺伝子 (EP Pat. Publ. No. 0 215 594) 及びトリコデルマ レーシ (*Trichoderma reesei*) CBH1 遺伝子を含むが、これらに限定されない。

【0088】

遺伝子情報を宿主細胞へ輸送するために用いる発現ベクターは任意の粒子状ベクターに限定することを意図していない。真核細胞又は原核細胞での発現に用いる従来のベクターを本発明にて用いてよいことは意図される。標準細菌発現ベクターはバクテリオファージとM13並びに、pBR322ベースプラスミド、pSKF, pET23Dのようなプラスミド、及びMBP、GSTとLacZのような融合発現系を含むが、これらに限定されない。幾つかの実施態様においては、エピトープタグを組み換えタンパク質に添加することによる、便利な単離方法 (例えば、cmyc) を提供する。適切な発現/組み込みベクターの例は当業者に周知である (例えば、Bennett and Lasure (eds.) More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press pp. 70-76 and pp. 396-428 (1991); US Pat. No. 5,874,276を参照願いたい)。多くの販売業者 (例えば、プロメガ (Promega)、インビトロゲン (Invitrogen) 等) は有用なベクターを提供し、当業者に周知である。幾つかの特定の有用なベクターはpBR322、pUC18、pUC100、pDON (商標) 201、pENTR (商標)、pGEN (商標) 3Z及びpGEN (商標) 4Zを含むが、これらに限定されない。しかしながら本発明は同等の機能を果たし周知であるか又は周知になりつつある他の発現ベクターを含むものである。すなわち、広範囲の宿主/発現ベクターの組み合わせは本発明のDNA配列を発現することに使用される可能性がある。幾つかの実施態様においては、有用な発現ベクターは染色体、非染色体及び/又は合成DNA配列 (例えば、様々に知られたSV40誘導体) のセグメント及び周知微生物のプラスミド (例えばc01E1、pCR1、pBR322、pMb9、pUC19、pSL1180及びそれらの誘導体を含む大腸菌 (*E. coli*) 由来プラスミド)、より広い宿主範囲のプラスミド (例えばRP4)、ファージDNA、(例えばファージの多くの誘導体、例えばNM989、他のDNAファージ、例えばM13及び糸状一本鎖DNAファージ)、及び酵母プラスミド (例えば、2.ミュー (mu) プラスミド又はそれらの誘導体) からなってもよい。

【0089】

幾つかの実施態様においては、発現ベクターは選択マーカーを含む。選択マーカーの例は抗生物質耐性を与えるものを含む。栄養マーカーもまた本発明に用いてよく、amdS、argB及びpyr4のような当業者に周知のマーカーを含む。トリコデルマ (*Trichoderma*) の形質転換に有用なマーカーは周知である (例えば、Finkelstein, in Biotechnology of Filamentous Fungi, Finkelstein et al, (eds.), Butterworth-Heinemann, Boston MA, chapter 6 (1992)を参照願いたい)。幾つかの実施態様においては、また、発現ベクターはレプリコン、組み換えプラスミドを内部にもつ細菌の選択を可能にするため抗生物質耐性をコードしている遺伝子及び/又は異種配列を挿入させるためにプラスミドの重要でない領域に存在する独特の制限部位を含む。任意の有用な抗生物質耐性遺伝子を本発明に用いてよい。トリコデルマ レーシ (*T. reesei*) が宿主細胞である幾つかの実施態様においては、好ましくは、トリコデルマ レーシ (*T. reesei*) のDNAの複製又は組み込みを妨げないような原核生物配列が選ばれる。

【0090】

幾つかの実施態様においては、発現ベクターはレポーター遺伝子のみ、又は任意に関心のあるタンパク質と融合した任意のレポーター遺伝子を含む。レポーター遺伝子の例は蛍光レポーター、色検出レポーター (例えば、ガラクトシダーゼ)、及びビオチン化レポーターを含むが、これらに限定されない。幾つかの実施態様においては、レポーター分子

が発現する場合、シグナルペプチドが宿主細胞中で活性であるかどうか同定するために用いる。もしシグナルペプチドが活性ならば、レポーター分子は細胞から分泌される。幾つかの実施態様においては、シグナルペプチドは初期にレポーターに作動可能に結合し、特定の宿主細胞からの分泌を同定できる。関心のあるタンパク質及び/又はシグナルペプチドに特異的な抗体を用いるような別の方法も関心のあるタンパク質が分泌されたかどうか決定するために用いてよい。

【0091】

幾つかの実施態様においては、本発明の形質転換方法によって、糸状菌宿主細胞のような宿主細胞の遺伝子へ全部又は一部の形質転換ベクターの安定した組み込みをもたらす可能性はある。しかしながら、本発明は自己複製、染色体外形質転換ベクターを維持する結果をもたらす形質転換もまた意図している。

10

【0092】

多くの標準的なトランスフェクションの方法を本発明に用いてよく、蛋白質を大量発現する糸状菌（例えば、アスペルギルス（*Aspergillus*）又はトリコデルマ（*Trichoderma*）細胞株を生産できる。トリコデルマ（*Trichoderma*）のセルラーゼ生産株へのDNA構築体を導入するための方法は当業者に周知である（例えば、Lorito他、*Curr. Genet.*, 24:349-356 [1993]; Goldman他、*Curr. Genet.*, 17:169-174 [1990]; Penttila 他、*Gene* 6: 155-164 [1987]; US Pat. No. 6,022,725; US Pat. No. 6,268,328; Nevalainen他、「The Molecular Biology of *Trichoderma* and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes」 in *Molecular Industrial Mycology*, Leong and Berka (eds.), Marcel Dekker Inc., NY [1992] pp 129-148; Yelton他、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1470-1474 [1984]; Bajar他、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8202-8212 [1991]; Fernandez-Abalos 他、*Microbiol.*, 149:1623 - 1632 [2003]; and Brigidi他、*FEMS Microbiol. Lett.*, 55:135-138 [1990]を参照願いたい)。

20

【0093】

しかしながら、宿主細胞へ外来ヌクレオチド配列を導入するため任意の周知の方法を本発明に用いてもよい。これらの方法は、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリブレイン、プロトプラスト融合、電気穿孔、遺伝子銃、リポゾーム、マイクロインジェクション、プラスミドベクター、ウイルスベクター及び当業者が周知のようなゲノムDNA、cDNA、合成DNA又は他の外来遺伝子材料を宿主細胞へ導入するいずれかの他の周知の方法を含むがこれらに限定されない。また、用いる方法はアグロバクテリウム（*Agrobacterium*）介在トランスフェクション法（例えば、米国特許第6,255,115を参照願いたい）を含む。特定の遺伝子組み換え技術によって遺伝子の発現が可能である宿主細胞へ少なくともひとつの遺伝子がうまく導入できさえすればよい。幾つかの実施態様においては、本発明はタンパク質を生産する方法を提供し、宿主細胞にタンパク質をコードする核酸に結合するNSP24シグナルペプチドを含むポリヌクレオチドを導入する段階、タンパク質の発現及び生産のための適切な培養条件下宿主細胞を培養する段階、及び該タンパク質を生産する段階を含む。幾つかの実施態様においては、タンパク質は宿主細胞から分泌される。幾つかの別の実施態様においては、本発明はタンパク質の生産方法を提供し、宿主細胞にタンパク質をコードする核酸に作動可能に結合するCBH1シグナルペプチドを含むポリヌクレオチドを導入する段階、タンパク質の発現及び生産のための適切な培養条件下宿主細胞を培養する段階、及び該タンパク質を生産する段階を含む。幾つかの実施態様においては、タンパク質は宿主細胞から分泌される。

30

40

【0094】

発現ベクターが宿主細胞に導入された後、トランスフェクションされた又は形質転換された細胞を遺伝子プロモーター配列の制御下遺伝子発現に適した条件下培養する。幾つかの実施態様においては、大型パッチ式で形質転換細胞を培養する。幾つかの実施態様においては、標準手段を用いて生産物（言い換えると、タンパク質）を細胞から採取し及び/又

50

は培養物から回収する。

【0095】

かくて、本明細書に記載する発明は、所望のポリペプチドの増強された分泌及び発現を提供し、分泌がシグナルペプチド配列、融合DNA配列及び種々の異種構築体並びにシャペロン、シャペロニン、及び/又はフォールダーゼの発現によって増強されることを特徴とする。本発明はまた、そのような所望のポリペプチドの高いレベルの分泌及び発現に関するプロセスを提供する。

【0096】

所望のタンパク質

本明細書にて用いる用語「所望のタンパク質(desired protein)」は関心の対象となるタンパク質を意味する。所望のタンパク質は宿主細胞本来存在するタンパク質、又は宿主細胞に対して本来存在しない(異種の)タンパク質でよい。幾つかの実施態様においては、所望のタンパク質は菌類のタンパク質である。幾つかの実施態様においては、宿主は子囊菌類(Ascomycetes)宿主であり、タンパク質は子囊菌類(Ascomycetes)タンパク質以外のタンパク質である。幾つかの実施態様においては、宿主は担子菌類(Basidiomycetes)宿主であり、タンパク質は担子菌類(Basidiomycetes)以外の任意のタンパク質である。幾つかの実施態様においては、タンパク質はトリコデルマ(Trichoderma)タンパク質以外の任意のタンパク質である。幾つかの他の実施態様においては、タンパク質はアスペルギルス(Aspergillus)タンパク質以外の任意のタンパク質である。

【0097】

本発明はタンパク質の特定のタイプに限定することを意図していない。実際に、本発明は任意の関心あるタンパク質を含む。所望のタンパク質の例は、グルコアミラーゼ、アルファアミラーゼ、粒状デンプン加水分解酵素、セルラーゼ、リパーゼ、キシラナーゼ、クチナーゼ、ヘミセルラーゼ、プロテアーゼ、オキシダーゼ、ラッカーゼ、及びそれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない。

【0098】

幾つかの実施態様においては、グルコアミラーゼはアスペルギルス(Aspergillus)、トリコデルマ(Trichoderma)又はリゾプス(Rhizopus)の菌株のような糸状菌源から得られる野生型グルコアミラーゼである。しかしながら、他の実施態様においては、グルコアミラーゼはタンパク質組み換えグルコアミラーゼ(例えば、アスペルギルス ニガー(Aspergillus niger)グルコアミラーゼの変異体)である。幾つかの他の実施態様においては、本発明の組成物も少なくとも一つのプロテアーゼ及び少なくとも一つのアルファアミラーゼを含む。幾つかの実施態様においては、アルファアミラーゼは細菌類の供給源(例えば、バシルス種(Bacillus spp.))から又は菌類の供給源(例えば、アスペルギルス種(Aspergillus spp.))から得られる。幾つかの実施態様においては、組成物はまた少なくとも一つのプロテアーゼ、及び/又は少なくとも一つのグルコアミラーゼ、及び/又は少なくとも一つのアルファアミラーゼ酵素を含む。幾つかの実施態様においては、タンパク質は担子菌類(Basidiomycetes)から得られるラッカーゼのようなラッカーゼであり、幾つかの実施態様においては、セレナユニカラー(C. unicolor)のようなセレナ(Cerreana)属から得られる。これらの酵素の商業的供給源は周知であり、入手可能であり、例えばジェネンコインターナショナル社(Genencor International, Inc.)及びノボザイムエイ/エス(Novozymes A/S)である。

【0099】

ラッカーゼ及びラッカーゼ関連酵素

ある好ましい実施態様においては、ラッカーゼ及びラッカーゼ関連酵素が所望のタンパク質である。酵素分類(EC1.10.3.2)内の任意のラッカーゼ酵素が含まれる場合、本発明は任意の特定のラッカーゼに限定することを意図しない。幾つかの実施態様にお

いては、ラッカーゼ酵素は微生物又は植物源から得られる。幾つかの実施態様においては、微生物ラッカーゼ酵素は細菌又は菌類（糸状菌及び酵母を含む）から得られる。本発明は特定のラッカーゼに限定することを意図していないが、適切な例は、アスペルギルス（*Aspergillus*）、ニューロスボラ（*Neurospora*）（例えば、ニューロスボラ クラッサ（*N. crassa*））、ポドスポラ（*Podospora*）、ボトリチス（*Botrytis*）、コリビア（*Collybia*）、セレナ（*Cerrina*）、スタキボトリス（*Stachybotrys*）、パヌス（*Panus*）（例えばパヌス ルディス（*Panus rudis*））、チエイラバ（*Thielavia*）、フオメス（*Fomes*）、レンチヌス（*Lentinus*）、プレウロツス（*Pleurotus*）、トラメテス（*Trametes*）（例えば、トラメテス ビロサ（*T. villosa*）及びトラメテス ベルシカラー（*T. versicolor*）リゾクトニア（*Rhizoctonia*）、（例えば、リゾクトニア ソラニ（*R. solani*））、コプリナス（*Coprinus*）（例えば、コプリナス プリカチリス（*C. plicatilis*）及びコプリナス シネレウス（*C. cinereus*））、プサチレラ（*Psathyrella*）、ミセリオフィソーラ（*Myceliophthora*）（例えば、ミセリオフィソーラ テルモンヒラ（*M. thermophila*））、シタリジウム（*Schytalidium*）、フレビア（*Phlebia*）（例えば、フレビア ラジタ（*P. radita*））、例えば、WO 92/01046を参照願いたい）、コリオルス（*Coriolus*）（例えば、コリオルス ヒルスタス（*C. hirsutus*）例えば、JP 2 238885を参照願いたい）、スポンギスペリス（*Spongipellis*）、ポリポルス（*Polyporus*）、セリポリオプシス サブベルミスボラ（*Ceriporiopsis subvermispora*）、ガノデルマ ツノダエ（*Ganoderma tsunodae*）、又はトリコデルマ（*Trichoderma*）由来のラッカーゼを含む。

【0100】

幾つかの実施態様においては、ラッカーゼは、CBS 115.075 菌株由来セレナ（*Cerrina*）ラッカーゼ A1、B1 及び D2、CBS 154.29 菌株由来セレナ（*Cerrina*）ラッカーゼ A2、B2、C、D1、及び E、ATCC 20013 菌株由来セレナ（*Cerrina*）ラッカーゼ B3 酵素（例えば、US Publication No. 2008/0196173を参照願いたい、その全体を参照により取り込まれる）を含む。さらに、これらのラッカーゼの最適化型も本発明に用いてよい。

【0101】

別の実施態様においては、ラッカーゼはトリコデルマ（*Trichoderma*）において発現するセレナ（*Cerrina*）ラッカーゼ D の成熟タンパク質を含み、アミノ酸配列を次に示す（配列番号 45）。

```

AIGPVADLHIVNKDLAPDGVQRPTVLAGCTFPGLITGQKGDNFQLNVIDDLTDDRM
LTPTSIHWHGFFQKGTAWADGPAFVTQCPIIADNSFLYDFDVPDQAGTFWYHSHLST
QYCDGLRGAFVVYDPNDPHKDLYDVDDGGTVITLADWYHVLAAQTVVGAATPDSTLI
NGLGRSQTGPADAELAVISVEHNKRYRFRRLVSISCDPNFTFSVDGHNMTVIEVDGVN
TRPLTVDSIQIFAGQRYSFVLNANQPEDNYWIRAMPNIGRNTTTLDGKNAAILRYKNA
SVEEPKTVGGPAQSPLNEADLRPLVPAPVPGNAVPGGADINHRLNLTFSNGLFSINNA
SFTNPSVPALLQILSGAQNAQDILLPTGSYIGLELGKVVELVIPPLAVGGPHPFHLHGHN
FWVVRSAQSDEYNFDDAILRDVVSIGAGTDEV'TIRFVTDNPGPWFLHCHIDWHLEAG
LAIVFAEGINQTAAANPTPQAWDELCPKYNGLSASQKVKKPGGTAI

```

【0102】

宿主細胞

本発明は本明細書にて記載のようにDNA構築体及びベクターを用いて形質転換される宿主細胞を提供する。幾つかの実施態様においては、本発明は本明細書にて記載のように所望のタンパク質コードし、NSP24又はCHBIシグナルペプチドに作動可能に結合するDNA構築体を用いて形質転換される宿主細胞の提供である。幾つかの実施態様においては、本発明はプロテアーゼ、ラッカーゼ、アルファ アミラーゼ、グルコアミラーゼ、キシナーゼ、及びセルラーゼのような少なくとも一つの所望のタンパク質をコードするDNA構築体であって、宿主細胞に導入する構築体を提供する。幾つかの実施態様においては、本発明は細菌及び/又は菌類宿主細胞における遺伝子プロモーター機能の制御下タンパク質遺伝子の発現及び/又はタンパク質遺伝子の過剰発現を提供する。

10

【0103】

任意の適切な宿主細胞は本発明に有用であることを意図する。本発明は任意の特定の宿主細胞を限定することを意図していない。幾つかの実施態様においては、宿主細胞はシグナルペプチドが所望のタンパク質を分泌する時活性を有する細胞である。例えば、用いることのできるトリコデルマ レーシ (*T. reesei*) シグナルペプチドに関する宿主細胞は菌類及び細菌細胞を含むが、これらに限定されない。宿主細胞は糸状菌細胞を含むが、トリコデルマ種 (*Trichoderma* spp.) (例えば、トリコデルマ ビリデ (*T. viride*) 及びトリコデルマ レーシ (*T. reesei*)、ハイポクレアジェコリーナ (*Hypocrea jecorina*) の無性世代、以前トリコデルマ ロンギブラチアタム (*T. longibrachiatum*) として区分された)、ペニシリウム種 (*Penicillium* spp.)、フミコーラ種 (*Humicola* spp.) (例えば、フミコーラ インソレンス (*H. insolens*) 及びフミコーラ グリセア (*H. grisea*))、アスペルギルス種 (*Aspergillus* spp.) (アスペルギルス ニガー (*A. niger*)、アスペルギルス ニドゥラン (*A. nidulans*)、アスペルギルス オリザエ (*A. oryzae*)、スベルギルス アワモリ (*A. awamori*)、フザリウム種 (*Fusarium* spp.) (例えば、フザリウム グラミナム (*F. graminum*))、ニューロスポラ種 (*Neurospora* spp.)、ヒポクレア種 (*Hypocrea* spp.)、及びムコール種 (*Mucor* spp.) を含むが、これらに限定されない。別の宿主細胞はバシルス種 (*Bacillus* spp.) (例えば、バシルス スブチリス (*B. subtilis*)、バシルス リチェニフォルミス (*B. licheniformis*)、バシルス レンツス (*B. lentus*)、バシルス ステアロテルモフィルス (*B. stearothermophilus* 及びバシルス ブレビス (*B. brevis*)) 及びストレプトミセス種 (*Streptomyces* spp.) (例えば、ストレプトミセス コエリカラー (*S. coelicolor*) 及びストレプトミセス リビダンス (*S. lividans*)) を含むが、これらに限定されない。

20

30

【0104】

タンパク質が宿主細胞中分泌される又は細胞質に残るか否かを同定するための多くの方法が当分野にて周知である。任意の適切な方法をシグナル配列が活性である宿主細胞を同定するときに用いてよいことは意図される。

40

【0105】

タンパク質発現

本発明の所望のタンパク質は、NSP24又はCBH1シグナルペプチド配列、フォールダーゼ、シャペロニン、及び/又はシャペロンにより分泌が増強される遺伝子を含む発現ベクターのようなベクターを用いて形質転換した細胞を培養することにより生産される。特に本発明はタンパク質の細胞内及び/又は細胞外生産の増強に有用である。当業者に周知のように、タンパク質の生産のための最適な条件は宿主細胞の選択及び発現されたタンパク質の選択に伴って変化する。そのような条件は通例の実験又は最適化を通して当業者によって容易に確認できる。

【0106】

50

幾つかの実施態様においては、対象となるタンパク質は発現後精製又は単離される。タンパク質の単離又は精製に関する様々な方法は当業者に周知である。任意の適切な方法を本発明に用いてよい。例えば、本発明に用いてよい標準的な精製方法は電気泳動的、分子的、免疫学的及びクロマトグラフィーの方法を含むがこれらに限定されない。これらにはイオン交換、疎水性、親和性及び逆相高速液体（HPLC）クロマトグラフィー及び等電点電気泳動を含む。例えば、幾つかの実施態様においては、当該タンパク質に対する抗体を含む標準的な抗体カラムを用いてタンパク質を精製してもよい。タンパク質濃縮と組み合わせて、限外ろ過法及びダイアフィルトレーション（diafiltration）法もまた幾つかの実施態様において有用である。当業者に周知のように、タンパク質の使用に応じて精製の程度の必要性は変わってくる。実際に、幾つかの実施態様においては、精製は不必要である。

10

【0107】

幾つかの実施態様においては、本発明により提供されるように、形質転換される宿主細胞により生産されるタンパク質を当業者に周知の従来の方法により培養培地から回収する。これらの方法は、遠心分離又はろ過によって培地から宿主細胞を分離することを含むが、これに限定されない。幾つかの実施態様においては、細胞を壊し、上清を細胞分画及び細胞残屑から分離する。幾つかの実施態様においては、上清又はろ過物のタンパク質性の成分を清澄化後、塩（例えば、硫酸アンモニウム）の手段により沈殿する。沈殿タンパク質をそれから溶解し、幾つかの実施態様において、クロマトグラフィーの手法（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、及び他の当該分野で認識される手法）を含む任意の方法により精製する。

20

【0108】

幾つかの実施態様においては、動物（例えば、ウサギ又はマウス）を免疫化して本発明を用いて生産されるペプチド及びタンパク質に対する抗体を発生させ、任意の適切な周知の方法を用いて抗タンパク質及び／又はNSP24シグナルペプチド抗体を回収することにより調製する。幾つかの追加的な実施態様においては、モノクローナル抗体を任意の周知な方法を用いて作成する。

【0109】

幾つかの実施態様においては、本発明に用いてよい当業者に周知なアッセイはWO 99/34011及び米国特許第6,605,458に記載のものを含むが、これらに限定されず、両者は全体を参照により本明細書に取り込まれる。

30

【0110】

融合

幾つかの実施態様においては、所望のタンパク質を融合タンパク質として生産する。幾つかの実施態様においては、所望のタンパク質を糸状菌により効率的に分泌されるタンパク質に融合し、融合タンパク質の発現に用いる宿主細胞を同じ門、属、及び／又は種由来の酵素触媒部位に融合する。幾つかの実施態様においては、所望のタンパク質はCBHIポリペプチド、又はその一部に融合する。幾つかの追加的な実施態様においては、所望のタンパク質は触媒活性を最小限にする又は放出する改変をしているCBHIポリペプチド、又はその一部に融合する。幾つかのさらなる実施態様においては、所望のタンパク質はトリコデルマ（*Trichoderma*）グルコアミラーゼポリペプチド、又はその一部に融合する。幾つかの追加的な実施態様においては、所望のタンパク質はトリコデルマ（*Trichoderma*）グルコアミラーゼ、又はその一部に融合し、触媒活性を最小限にする又は放出する改変をしていることを特徴とする。幾つかのさらなる実施態様においては、所望のタンパク質は分泌を増強するポリペプチドに融合し、その後の精製及び／又は安定性の増強に機能する。

40

【0111】

一般的に、本発明の発現宿主中の第一、第二、及び／又は第三ポリヌクレオチドを発現宿主の遺伝子の構築物へ遺伝的に挿入しても、組み換えてもよい（例えば、それを発現宿主の染色体へ組み換える）。しかしながら、幾つかの実施態様においては、それは染色体外

50

である（例えば、それは発現宿主内に複製ベクターとして存在する）。さらなる幾つかの実施態様においては、染色体外ポリヌクレオチドをベクターに存在する選択マーカー用の適切な選択条件下発現する。

【0112】

分泌レベルアッセイ

本明細書に記載のように、発現宿主中所望のポリペプチドの分泌レベルを任意の適切な方法を用いて検出する。例えば、幾つかの実施態様においては、分泌レベルは多様な要因（例えば、宿主の増殖条件等）に基づく。しかしながら、幾つかの実施態様においては、宿主中に発現する所望のポリペプチドの分泌レベルは分泌増強タンパク質の存在なしに発現する所望のポリペプチドの分泌レベルより高い。幾つかの実施態様においては、所望のポリペプチド（例えば、トリコデルマレーシ（*T. reesei*）のような発現宿主中のセラナユニカラー（*Cerrina unicolor*）由来ラッカーゼ）の発現レベルは、宿主を振盪フラスコにおいてバッチ発酵様式で増殖する場合、少なくとも約1 mg/L、少なくとも約2 mg/L、少なくとも約3 mg/L、少なくとも約4 mg/L、又は少なくとも約5 mg/Lであり、又は宿主を制御されたpH、供給量など（例えば、流加発酵）を用いた発酵環境で増殖する場合、少なくとも約50 mg/L、少なくとも約100 mg/L、少なくとも約150 mg/L、少なくとも約200 mg/L、少なくとも約250 mg/L、少なくとも約500 mg/L、少なくとも約1000 mg/L、少なくとも約2000 mg/L、少なくとも約5000 mg/L、少なくとも約10、000 mg/L、又は少なくとも約20、000 mg/Lである。

【0113】

例えば、分泌ポリペプチドの発現及び/又は分泌を評価するために、アッセイをタンパク質レベル、RNAレベルにて、及び/又は分泌ポリペプチド活性及び/又は生産に有用な機能的バイオアッセイの利用により実施する。分泌ポリペプチドの発現及び/又は分泌を分析するために用いる一般的なアッセイはノーザンブロッティング、ドットブロッティング（DNA又はRNA分析）、RT-PCR（逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応）、又は適切なラベル化プローブ（配列をコードする核酸に基づく）を用いるインシット（*in situ*）ハイブリダイゼーション、従来のサザンブロッティング及びオートラジオグラフィを含むが、これらに限定されない。

【0114】

幾つかの実施態様においては、分泌ポリペプチドの生産、発現及び/又は分泌をサンプル中直接測定する。幾つかの実施態様においては、測定を酵素活性、発現及び/又は分泌に対するアッセイを用いて行う。幾つかの実施態様においては、タンパク質発現を免疫学的方法（例えば、細胞及び/又は組織部位の免疫組織化学的染色又はウェスタンブロッティング又はELISA法による組織培養培地の免疫測定法）により評価する。そのような免疫測定法を分泌ポリペプチドの発現を定性的及び/又は定量的に評価するのに用いてよい。これらの方法は当業者に周知である。実際に、そのような方法に用いるための多くの商業的入手可能なキット及び試薬がある。

【0115】

幾つかの実施態様においては、本発明は発現宿主を増殖するために用いる培養培地から得られる抽出物（例えば、固体又は上清）も提供する。幾つかの実施態様においては、上清は相当量の発現宿主を含まない一方、幾つかの別の実施態様においては、上清はほとんど発現宿主の量を含まない。

【0116】

細胞培養

周知のように、本発明の宿主細胞及び形質転換細胞を従来の栄養培地にて培養してよい。しかしながら、幾つかの実施態様においては、形質転換宿主細胞用の培養培地をプロモーターの活性化及び形質転換体の選別のために必要に応じて改変してよい。温度、pH等のような特定の培養条件は発現用に選択される宿主細胞のために用いる一般的なものであり、当業者にとって明らかである。宿主細胞用の培養培地及び条件は当業者にとって周知で

ある。培養中トリコデルマ (*Trichoderma*) 細胞のような菌類宿主細胞の安定した形質転換体は迅速な成長速度または個体培養培地上のでこぼこした輪郭よりむしろ滑らかな円形コロニーの形成の点で不安定な形質転換体と一般的に異なる。

【0117】

組成物

幾つかの実施態様においては、本発明はNSP24又はCBH1シグナル配列、構築体及びベクターを用いる所望のタンパク質を発現するための組成物及び方法を提供する。幾つかの実施態様においては、本発明は次の酵素を含む組成物を提供し、それはラッカーゼ、グルコアミラーゼ、アルファアミラーゼ、粒状デンプン加水分解酵素、セルラーゼ、リパーゼ、フォスフォリパーゼ、キシラナーゼ、クチナーゼ、ヘミセルラーゼ、オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、プロテアーゼ、フィターゼ、ケラチナーゼ、プルナーゼ、グルコアミラーゼ、ペクチナーゼ、オキシドリダクターゼ、リダクターゼ、ペルヒドロラーゼ、フェノールオキシダーゼ、リボキシゲナーゼ、リグニナーゼ、タンナーゼ、プルナーゼ、ペントサナーゼ、ベータグルカナーゼ、アラビノシダーゼ、ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼ、マンナンナーゼ、セステラーゼ、アシルトランスフェラーゼ及びそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0118】

利用

本発明により生産される所望のタンパク質をそのタンパク質の適用に応じて任意の利用に用いてよい。酵素のようなタンパク質に関する利用の例は飼料摂取及び飼料効率（例えば、プロテアーゼ）の改善のための動物用飼料、食物のタンパク質加水分解物（例えば、障害のある消化器系を有する個人のため）、皮革処理、タンパク質繊維（例えば、羊毛及び絹）の処理、クリーニング、タンパク質処理（例えば、苦いペプチドを除去するため、食品の香りを増強するため、及び/又はチーズ又はココアを生産するため）、パーソナルケア製品（例えば、毛髪組成物）、甘味料（例えば、高マルトース又は高フルクトースシロップの生産）、発酵及びバイオエタノール（例えば、バイオエタノールを生産する発酵用穀物を処理するために用いるアルファアミラーゼ及びグルコアミラーゼ）を含むが、これらに限定されない。ラッカーゼに関する利用の例は、パルプ及び紙の漂白、繊維漂白、排水の処理、廃紙のインク除去、芳香族化合物又はタンパク質の重合、ラジカル-仲介重合及び架橋反応（例えば、ペイント、コーティング、バイオマテリアル）、染料の活性化、及び有機化合物の結合を含むが、これらに限定されない。また、ラッカーゼは洗浄組成物に用いてよく、洗濯及び他の洗剤を含むが、これらに限定されない。

【実施例】

【0119】

次の実施例は説明のための目的であり、特許請求の範囲を限定する目的ではない。材料及び方法両者に対する多くの改変が本発明の範囲を逸脱せずに実施されて良いことは当業者にとって明らかである。

【0120】

以下に開示された実験において、次の略語が適用される。

モル (M (Molar))、マイクロモル (μ M (micromolar))、規定 (N (normal))、モル (mol (moles))、ミリモル (mmol (millimoles))、マイクロモル (μ mol (micromoles))、ナノモル (nmol (nanomoles))、グラム (g (grams))、ミリグラム (mg (milligrams))、キログラム (kg (kilograms))、マイクログラム (μ gとug (micrograms))、リットル (L (liters))、ミリリットル (mlとul (milliliters))、マイクロリットル (μ l (microliters))、センチメートル (cm (centimeters))、ミリメートル (mm (millimeters))、マイクロメートル (μ m (micrometers))、ナノメートル (nm (nanometers))、摂氏度 ((degrees Centigrade))、時間 (hとhr (hours))、分 (min (minu

tes))、秒(sec(seconds))、ミリ秒(msec(millis
seconds))、ボルト(V(voltage))、x重力(xg(times
gravity))、華氏(°F(degrees Fahrenheit))、アセタ
ミダーゼ(amdS(acetamidase, アスペルギルス ニガー(A. n
iger)から得られる選択マーカー)、ラッカーゼ(lccD(laccase))
、バイオラッド(BioRad(BioRad Laboratories, Her
cules, CA))、ディフコ(Difco(Difco Laborator
ies, Detroit, MI))、カルビオケム(Calbiochem(Calb
iochem brand owned by EMD Chemicals Inc.
, San Diego, CA))、シグマ(Sigma(Sigma Chemi
cal Co., St. Louis, MO))、スペクトロニック(Spectr
onic(Spectronic Devices, Ltd., Bedfords
hire, UK))アドバンスドカイネティクス(Advanced Kineti
cs(Advanced Kinetics and Technology Solu
tions, Switzerland))。

10

【0121】

本実施例における多くの発現ベクターを識別番号U13865のGENBANK(商標)
に提供されているpSL1180プラスミド骨格に基づいて生産した。amdSマーカー
のようなマーカー、シャペロン、またはフォールダーゼ、ラッカーゼ(lccD)、シグ
ナル配列、TrGA融合及びターミネーターを周知のようなポリリンカー及び/又はPCR
方法を用いて添加した。

20

【0122】

プラスミドの部位を次のように同定する。

cbh1 セロビオヒドロラーゼ、

Tcbh1 cbh1由来ターミネーター、

TrGA トリコデルマ(Trichoderma)グルコアミラーゼ、

lccD ラッカーゼD、

amdSマーカー 独立栄養用選択マーカー、

pSL1180 プラスミド骨格、

ラッカーゼDopt 宿主(トリコデルマ(Trichoderma))での発現用最適
化コドン使用頻度を用いて構築されるラッカーゼDの最適化バージョン、

30

Pcpc1 ニューロスボラ クラッサ(Neuropsora crassa)由来
クロスパスウェイコントロール(cross pathway control) 1由
来プロモーター、

bla ラクタマ - ゼ遺伝子(言い換えると、大腸菌(E. coli)由来選択マ
ーカー)、及び

HphR ハイグロマイシン 耐性遺伝子(大腸菌(E. coli)由来選択マーカー
)。

【0123】

発現プラスミドを構築するために、プライマーをDNA鋳型含有ヘラクレスPCR反応(
Herculase PCR reaction(Stratagene))にて設計
及び使用した。

40

【0124】

実施例1. 発現ベクターpTrex4 ラッカーゼD optの構築

この実施例は、発現ベクターpTrex4 ラッカーゼD optの構築に関与する段階
を記載する。プラスミドをCBH1プロモーター及びCBH1シグナル配列を用いてセレ
ナ ユニカラー(C. unicolor)由来コドン最適化ラッカーゼD遺伝子を発現
するために生産した。このベクターはCBH1(セロビオヒドロラーゼ)コア/リンカー
に融合し、CBH1プロモーターから発現されるラッカーゼDコドン最適化遺伝子を含ん
だ。図1はトリコデルマ(Trichoderma)発現プラスミドの図を示す。pTr

50

ex4 ラッカーゼD optプラスミド配列は配列番号1として示す。DNAの次のセグメントをpTrex4 ラッカーゼD optの構築体中に組み込んだ(図1を参照願いたい)。CBH1プロモーター及びCBH1シグナル配列及びCBH1コア/リンカーを表すトリコデルマ レーシ(T. reesei)染色体DNAのフラグメントをプラスミドpSL1180へ挿入した。セレナ ユニカラー(C. unicolor)ラッカーゼD(ラッカーゼD opt)遺伝子のコドン最適化コピーを挿入し、リンカー領域にてラッカーゼDと作動可能に結合した。トリコデルマ レーシ(T. reesei)由来CBH1ターミネーターをラッカーゼD遺伝子に作動可能に結合した。amdS遺伝子を選択独立栄養マーカーとして加えた。bla遺伝子(ラクタマーゼ、大腸菌(E. coli)から得られる選択マーカー)をpSL1180ベクター中に存在する。

10

【0125】

実施例2. 発現ベクターpTrex2g Bip1の構築

pTrex2g/Bip1プラスミドをトリコデルマ レーシ(T. reesei)由来bip1シャペロンを発現するために作成した。図2はトリコデルマ(Trichoderma)発現プラスミドpTrex2g Bip1の図を示す。プラスミドの配列は配列番号2として示す。DNAの次のセグメントをpTrex2g Bip1の構築体中に組み込んだ。トリコデルマ レーシ(T. reesei)bip1の2267bpフラグメントをPpk1プロモーター(トリコデルマ レーシ(T. reesei)由来ピルビン酸キナーゼ)に作動可能に結合するプラスミドpSL1180へ挿入した。トリコデルマ(Trichoderma)cbh1ターミネーターをbip1遺伝子に作動可能に結合した。HphR大腸菌(E. coli)由来選択マーカーを選別のために導入し、Pcpc1プロモーター(ニューロスボラ クラッサ(Neurospora crassa)由来クロスパスウェイコントロール(cross pathway control)1)及びtrpCターミネーター(アスペルギルス ニドゥラン(A. nidulans)由来トリプトファン合成遺伝子C)に作動可能に結合した。

20

【0126】

実施例3. 発現ベクターpTrex2g Pdi1の構築

トリコデルマ レーシ(T. reesei)pdi1シャペロン遺伝子(2465bp)をbip1シャペロン遺伝子に変えて挿入した以外はpTrex2g Pdi1プラスミドをpTrex2g Bip1(実施例2を参照願いたい)と同様の方法でpdi1シャペロンを発現するために作成した。図3はトリコデルマ(Trichoderma)発現プラスミドpTrex2g Pdi1の図を示す。プラスミドの配列は配列番号3として示す。

30

【0127】

実施例4. 発現ベクターpTrex2g Ero1の構築

トリコデルマ レーシ(T. reesei)ero1シャペロン遺伝子(2465bp)をbip1シャペロン遺伝子に変えて挿入した以外はpTrex2g Ero1プラスミドをpTrex2g Bip1(実施例2を参照願いたい)と同様の方法でero1シャペロンを発現するために作成した。図4はトリコデルマ(Trichoderma)発現プラスミドpTrex2g Ero1におけるero1の図を示す。ero1の配列は配列番号4として示す。

40

【0128】

実施例5. 発現ベクターpTrGA ラッカーゼD optの構築

pTrGA ラッカーゼD optがトリコデルマ レーシ(T. reesei)由来完全長グルコアミラーゼ及び最適化コドンを有するセレナ ユニカラー(C. unicolor)ラッカーゼDの融合を発現することを除いて、pTrGA ラッカーゼD optプラスミドを実施例1と同様に作成した。図5はトリコデルマ(Trichoderma)発現プラスミドpTrGA ラッカーゼD optの図を示す。ポリヌクレオチド配列は配列番号5として示す。

【0129】

50

実施例 6 . 発現ベクター p K B 4 0 8 の構築

p K B 4 0 8 プラスミドをトリコデルマ レーシ (*T. reesei*) N S P 2 4 シグナルペプチドに作動可能に融合するセレナ ユニカラー (*C. unicolor*) ラッカーゼ D o p t を発現するために作成した。プラスミドをラッカーゼ D 構築体が N S P 2 4 に作動可能に結合され、C B H 1 シグナル配列、触媒部位及びリンカーに結合するラッカーゼ D の代わりに挿入されたこと以外は図 1 に示すのと同様に構築した。図 6 はトリコデルマ (*Trichoderma*) 発現プラスミド p K B 4 0 8 の図を示す。ポリヌクレオチド配列は配列番号 6 として示す。

【 0 1 3 0 】

実施例 7 . 発現ベクター p K B 4 1 0 の構築

トリコデルマ レーシ (*T. reesei*) C B H 1 シグナル配列を N S P 2 4 シグナルペプチドの代わりに用いる点以外は、p K B 4 1 0 プラスミドを実施例 6 に記載のように作成した。図 7 はトリコデルマ (*Trichoderma*) 発現プラスミド p K B 4 1 0 の図を示す。ポリヌクレオチド配列は配列番号 7 として示す。

【 0 1 3 1 】

トリコデルマ レーシ (*T. reesei*) の形質転換及び発現の分析

この実施例において、R L P 3 7 (Sheir-Neiss and Montenecourt, Appl. Microbiol. Biotechnol., 20:46-53 (1984) を参照願いたい) 由来及び Bower 他 (Bower 他、Carbohydrases From Trichoderma reesei and Other Micro-organisms, Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 327-334 (1998) を参照願いたい) によって記載される c b h 1、c b h 2、e g l 1、及び e g l 2 遺伝子について欠損する安定組み換えトリコデルマ レーシ (*T. reesei*) 菌株を実施例 1 から 1 4 単独に又は多様な組み合わせにてプラスミドを形質転換するために用いた。遺伝子銃法 (Biolistic methods) 及び電気穿孔法 (electroporation methods) を下記に記載のようにプラスミドを形質転換するために用いた。

【 0 1 3 2 】

遺伝子銃形質転換

発現プラスミドを D N A シークエンシングにより確認し、トリコデルマ (*Trichoderma*) 菌株へ遺伝子銃を発射することにより形質転換した。遺伝子銃形質転換法によるトリコデルマ (*Trichoderma*) 菌株の形質転換を使用説明書 (WO 05/00103 6 及び US Pat. Appl. Publ. No. 2006/0003408 を参照願いたい) に従って Biolistic (商標) P D S - 1000 / h e P a r t i c l e D e l i v e r y S y s t e m (Bio - Rad) を用いて実施した。形質転換体を選別し、アセトアミド (MMA) を有する最小限の培地プレートへ移し、28 30 にて 4 日間培養した。孢子及び菌糸体を含む単一コロニーの小さなプラグを 1 m M の銅を含有する 3 0 m l の N R E L 乳糖規定培地 (p H 6 . 2) へ移した。その培地を 28 にて 5 日間培養した。培養培地を遠心分離し、上清をラッカーゼ活性に関して下記に記載のように A B T S を用いて分析した。

【 0 1 3 3 】

電気穿孔法

電気穿孔法を米国特許第 60/931,072 であって、全体を参照により本明細書に取り込まれるが、そこに記載のように実施した。トリコデルマ レーシ (*T. reesei*) 菌株を約 1 0 2 0 日間ジャガイモデキストロース寒天プレート (Difco) にて培養し、孢子を形成した。孢子を水でプレートの表面から洗い流し Miracloth (Calbiochem) を通してろ過することにより精製した。孢子を遠心分離 (3 0 0 0 x g、1 2 分) により集め、冷水で一回と 1 . 1 M ソルビトールの冷水で一回洗浄した。孢子の沈殿物を少量の 1 . 1 M ソルビトール中に再懸濁し、1 0 0 µ l の孢子懸濁液当りプラスミド D N A (p K B 4 0 8 及び p K B 4 1 0、図 6 と 7) から単離された約 8 µ g のゲル精製 D N A フラグメントと混合した。混合物 (1 0 0 µ l) を電気穿孔法用キュベット (1 m m ギャップ) に移し、次の電気穿孔法パラメーターを用いて電気パルス処理をした。

電圧 6000 20000 V / cm

電気容量 = 25 μ F

抵抗 = 50

電気穿孔法後、胞子を1.1 MソルビトールとYEPD (1%酵母抽出物、2%バクトペプトン (Bacto-peptone)、2%グルコース、pH 5.5) の比が5:1の混合液へ約100倍希釈になるように希釈し、振盪フラスコへ移し、オービタルシェーカー (orbital shaker) (28 及び200 rpm) にて16 18時間インキュベートした。胞子を再び一回遠心分離により集め、沈殿物の10倍の体積の1.1 Mソルビトール中に再懸濁し、amdS改良培地 (アセトアミド0.6 g/l、塩化セシウム1.68 g/l、グルコース20 g/l、リン酸二水素カリウム 15 g/l、硫酸マグネシウム 7水和物0.6 g/l、塩化カルシウム 2水和物 0.6 g/l、硫酸鉄 (II) 5 mg/l、硫酸亜鉛1.4 mg/l、塩化コバルト (II) 1 mg/l、硫酸マグネシウム (II) 1.6 mg/l、寒天 20 g/l 及び pH 4.25) を含む二つの15 cmペトリ皿上へ移した。形質転換体は28 30 にて約1週間インキュベーションして現れた。

10

【0134】

ABTSアッセイを次のように実施した。

ABTSストック液を水に (ABTS; シグマ (Sigma) カタログ番号 A 1888) 4.5 mM ABTSを含有するよう調製した。緩衝液を0.1 M酢酸ナトリウム pH 5.0を含有するよう調製した。それから1.5 mlの緩衝液と0.2 mlのABTSストック溶液をキュベット (10 x 4 x 45 mm, No. / REF 67.742) に加えよく混合した。余分のキュベットをブランクとして調製した。それから50 μ lの試験すべき (多様な希釈を用いて) 各酵素サンプルを混合物へ添加した。

20

【0135】

ABTS活性を次のような (Advanced Kinetics) ABTS速度論アッセイプログラムセットアップを用いて Genesys 2 装置 (Spectronic) にて測定した。即ち、

波長 420 nm、

時間間隔 (Sec) 2.0、

全実施時間 (sec) 14.0、

ファクター 1.000、

下限 (low limit) - 0.000000.00、

上限 (high limit) 999999.00、及び

反応オーダー ファースト (first)

を用いた。

30

【0136】

方法は1.5 mLのNaOAc (120 mM NaOAc緩衝液 pH 5.0) をキュベットに加え、それから0.2 mLの4.5 mM ABTSをキュベットに添加し、そして、キュベットを隠し、キュベットに0.05 mLの酵素サンプルを添加し、すばやくかつ十分に混合し、最終的に420 nm、2秒ごとに14秒間吸光度の変化を測定する。1 ABTSユニット (unit) を1分当りA 420の変化として規定する (サンプルを希釈していない)。ABTS U/mLの計算: (420 / 分における変化 * 希釈ファクター)

40

【0137】

実施例9. トリコデルマ レーシ (T. reesei) 形質転換体におけるラッカーゼ / グルコアミラーゼ融合遺伝子発現の分析

実施例8に記載のように培養し、得られた形質転換体の培養培地を遠心分離 (16000 x g、10分) により菌糸体から分離し、上清からABTS活性を分析した。結果を図10に示す。表3に図10に記載の菌株を示す。図10は完全長トリコデルマ (Trichoderma) グルコアミラーゼにセレナ ユニカラー (C. unicolor) ラッカーゼをコードする遺伝子の融合により改善されるラッカーゼの生産量を示す。トリコデ

50

ルマ (*Trichoderma*) グルコアミラーゼに融合した場合、CBH1に融合した場合より24 - 29%の改善されるラッカーゼの発現を示した。

【表3】

表3. 図10にて用いる菌株

菌株識別番号	菌株タイプ
#8-2	CBH1 ラッカーゼ融合
1066-9	TrGA ラッカーゼ融合
1066-13	TrGA ラッカーゼ融合
1066-15	TrGA ラッカーゼ融合

10

【0138】

実施例10. NSP24及び/又はCBH1シグナル配列を用いるラッカーゼ生産の分析
トリコデルマ レーシ (*T. reesei*) CBH1シグナル配列をラッカーゼ遺伝子に作動可能に結合する場合、図11 (振盪フラスコ) 及び図12 (発酵装置) において得られる結果によって示すように振盪フラスコにおいて初めのCBH1融合菌株#8-2に対して発現が4-5倍改善され、14リットル発酵装置において5-6倍改善された。トリコデルマ レーシ (*T. reesei*) NSP24シグナル配列を用いた場合、振盪フラスコにおいて発現は3-4倍改善され、14リットル発酵装置において、4-5倍改善した。振盪フラスコにおいてCBH1シグナル配列 (#7、#10、#13) について3つのクローンを分析し、NSP24シグナル配列 (#7及び#25) について2つのクローンを分析し、発現を3日 (最初のバー)、4日 (第二番目のバー) 及び5日 (三番目のバー) にて分析した。それぞれの単一のクローンを14リットル発酵装置にて分析し、図12に結果を示した。この図において、ひし形はラッカーゼDに作動可能に結合するNSP24シグナル配列を示し、四角はラッカーゼDに作動可能に結合するCBH1シグナル配列を示し、三角はCBH1のみの融合を示す。

20

30

【0139】

実施例11. 発酵装置におけるCBH1シグナル配列及びbip1の共発現を用いるラッカーゼ生産の分析

CBH1シグナル配列プラスミド (ラッカーゼに作動可能に結合) をトリコデルマ レーシ (*T. reesei*) Bip1プラスミドを用いて同時形質転換し、発現を分析した。結果を図13に示す。図13において、ひし形はCBH1シグナル配列 (ラッカーゼに作動可能に結合) プラスBIP1での得られるデータを示し、一方、四角はCBH1シグナル配列 (ラッカーゼに作動可能に結合) 単独での得られるデータを示す。図13はCBH1シグナル配列プラスBIP1シャペロン発現によって与えられるラッカーゼ生産の改善を示し、発酵装置において15%以上の顕著な発現増加を示す。

40

【0140】

実施例12. 振盪フラスコにおけるCBH1シグナル配列及びbip1の共発現を用いるラッカーゼ生産の分析

CBH1シグナル配列プラスミド (作動可能に結合ラッカーゼ) をトリコデルマ レーシ (*T. reesei*) bip1プラスミドを用いて同時形質転換し、増殖させ、ラッカーゼ発現をABTSアッセイを用いて分析した。結果を図14に示す。5つの異なるクローンを3日 (一番目のバー)、4日 (二番目のバー)、及び5日 (三番目のバー) 間分析

50

した。K B 4 1 0 - 1 3 は C B H 1 シグナル配列プラスミドを単独に有するコントロールであった。他の 4 つのクローンは次の b i p 1 の一つと同時形質転換を伴う K B 4 1 0 - 1 3 であった。それは E 3 2、E 9、E 1 6、及び E 1 0 である。図 1 4 は振盪フラスコにおいてセレナ ユニカラー (C. u n i c o l o r) を伴うシャペロンの共発現によりラッカーゼ生産の改善を示す。

【 0 1 4 1 】

実施例 1 3 . C B H 1 ラッカーゼ D 融合及び多様なシャペロンの共発現を用いるラッカーゼ生産の分析

C B H 1 シグナル配列、触媒部位及びラッカーゼに作動可能に結合するリンカーを有する発現プラスミドを多様なトリコデルマ レーシ (T. r e e s e i) シャペロンプラスミド (B I P 1、P O I 1、E R O 1) と同時形質転換した。得られた形質転換細胞を培地にて増殖させ、ラッカーゼ発現を分析した。図 1 5 はセレナ ユニカラー (C. u n i c o l o r) ラッカーゼをコードする遺伝子を C B H 1 シグナル配列、触媒部位、及びリンカーに融合させ b i p 1、p d i 1 及び e r o 1 シャペロンと共発現することによりラッカーゼ生産の改善を示す。

10

【 0 1 4 2 】

すべての菌株は C B H 1 シグナル配列、触媒部位及びラッカーゼ D に作動可能に結合するリンカーを有した。菌株 1 B 1、1 B 1 2、及び 1 B 1 9 は b i p 1 発現カセットを有した。それらは、3 つの独立した形質転換体であって、b i p 1 プラスミドコピー数、組み換えの位置が異なった。菌株 3 B 2 及び 3 B 8 は p d i 1 発現カセットを有した。それらは、2 つの独立した形質転換体であって、p d i 1 プラスミドコピー数、組み換えの位置が異なった。菌株 9 B 6 及び 9 B 7 は e r o 1 発現カセットを有した。それらは、2 つの独立した形質転換体であって、e r o 1 プラスミドコピー数が異なり、組み換えの位置が異なっていた。# 8 2 はコントロール菌株であり、シャペロン発現カセットを有していない。

20

【 0 1 4 3 】

図 1 5 の結果は発現で最も高い増加は b i p 1 シャペロンと共発現を伴うものから得られた。

【 0 1 4 4 】

実施例 1 4 . C B H 1 シグナル配列及び多様なシャペロンの共発現を用いるラッカーゼ生産の分析

C B H 1 シグナル配列プラスミド (言い換えると、ラッカーゼに作動可能に結合) を多様なトリコデルマ レーシ (T. r e e s e i) シャペロンプラスミド (b i p 1、l h s 1、p d i 1、p p i 1、p p i 2、t i g 1、p r p 1、及び e r o 1) 単独又は組み合わせのいずれかと同時に形質転換した。培養物を周知のように振盪フラスコにおいて増殖させ、ラッカーゼ発現を A B T S アッセイを用いて分析した。クローンを 3 通り分析した。表 4 から得られるデータは二以上のシャペロンの添加は b i p 1 単独の場合以上のラッカーゼの発現増加を示さなかった。表 4 のデータは同じ菌株由来 3 つの独立した孢子精製サンプル (又はクローン) を示す。

30

【表 4】

表4：シャペロン存在下ラッカーゼの発現				
異なるシャペロンとKB413-32Aの同時形質転換				
各菌株は3回繰り返す：-A,-B,-C				
	サンプル	シャペロン	4 日 SF 培地	6 日
1	KB413-32A-A	bip1 only	4.52	6.32
2	KB413-32A-B	bip1 only	4.26	6.35
3	KB413-32A-C	bip1 only	4.28	6.13
4	KB414-1-A	bip1, ero1	3.88	5.89
5	KB414-1-B	bip1, ero1	3.78	5.93
6	KB414-1-C	bip1, ero1	3.76	5.59
7	KB415-2-A	bip1, lhs1, white	3.8	5.93
8	KB415-2-B	bip1, lhs1, white	3.72	5.92
9	KB415-2-C	bip1, lhs1, white	3.78	6.06
10	KB415-3-A	bip1, lhs1, gray	4.38	6.32
11	KB415-3-B	bip1, lhs1, gray	4.3	6.66
12	KB415-3-C	bip1, lhs1, gray	3.98	6.15
13	KB416-3-A	bip1, pdi1	4.18	6.58
14	KB416-3-B	bip1, pdi1	5.26	7.12
15	KB416-3-C	bip1, pdi1	4.22	6.06
16	KB417-3-A	bip1, ppi1	4.32	6.23
17	KB417-3-B	bip1, ppi1	3.96	6.32
18	KB417-3-C	bip1, ppi1	4.18	6.88
19	KB418-2-A	bip1, ppi2	4.24	6.59
20	KB418-2-B	bip1, ppi2	3.96	5.69
21	KB418-2-C	bip1, ppi2	4.04	5.92
22	KB419-1-A	bip1, tlgA	4.66	5.98
23	KB419-1-B	bip1, tlgA	5.26	7.25
24	KB419-1-C	bip1, tlgA	4.18	6.05
25	KB413-prp2-A	bip1, prpA	3.96	5.63
26	KB413-prp2-B	bip1, prpA	3.9	5.59
27	KB413-prp2-C	bip1, prpA	3.92	5.86
28	KB414-1-A	bip1, ero1	4.2	6.01
29	KB414-1-B	bip1, ero1	3.88	5.69
30	KB414-1-C	bip1, ero1	3.92	5.88

【 0 1 4 5 】

本発明及びそれを作りかつ使用する態様と工程は十分な、明確な、簡潔な、及び正確な用語においてここに記載されるので、当業者は同様のものを作りかつ使用することができる。前述の好ましい本発明の実施態様は特許請求の範囲に記載の範囲を逸脱せず、本明細書に記載されている改変は特許請求の範囲に記載の範囲を逸脱しないことは理解される。発明に関する対象要件を特に指摘し、明確に請求するために、以下に述べる特許請求の範囲により本明細書を終わる。

10

20

30

40

【図 1】

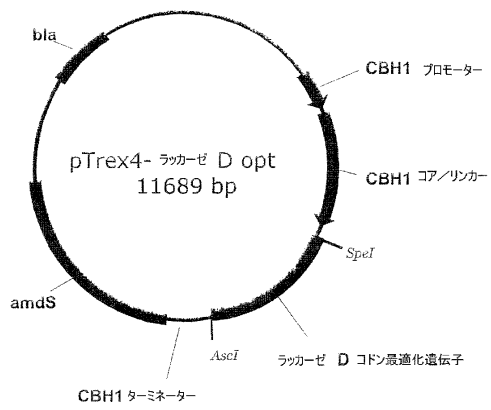


FIG. 1

【図 2】

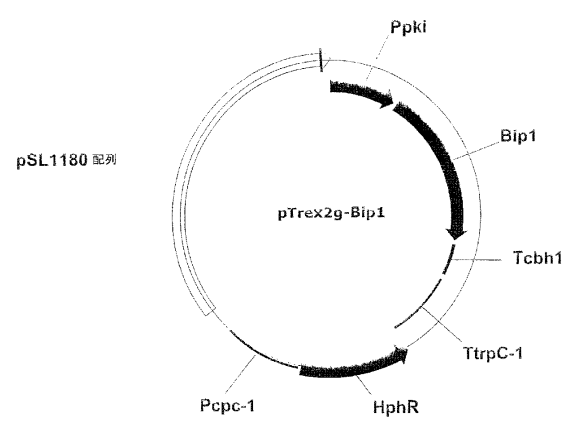


FIG. 2

【図 3】

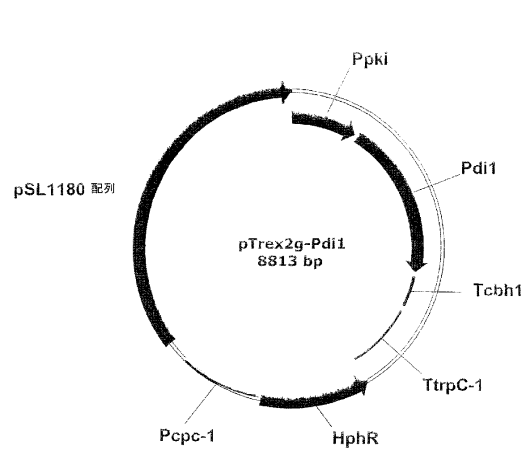


FIG. 3

【図 4】

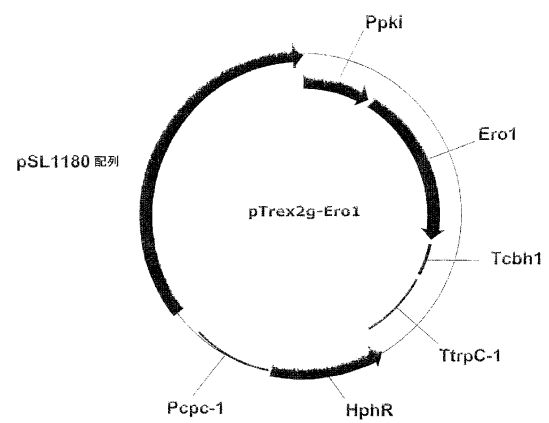
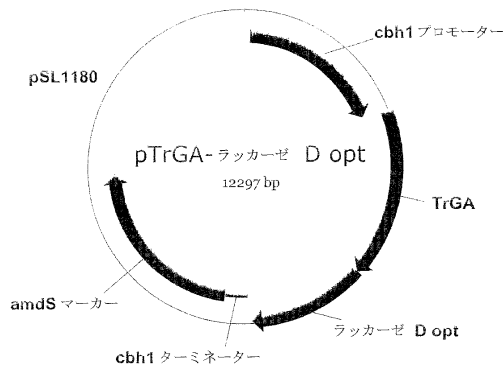
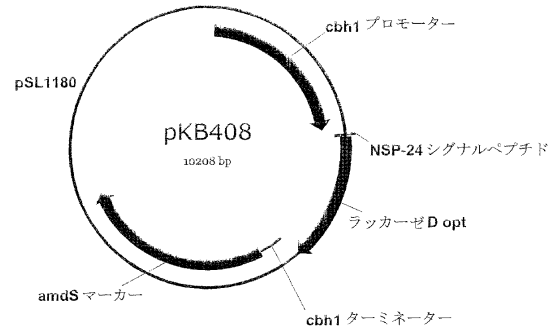


FIG. 4

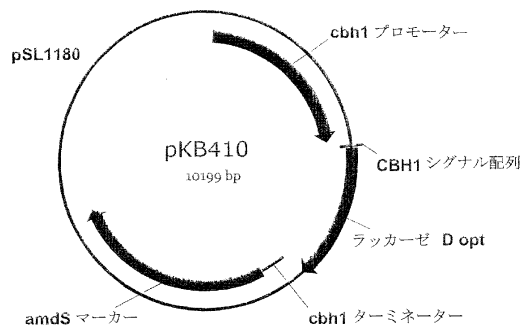
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 8 - 1】

NSP24 核酸配列 (配列番号 8)

CTGCAGCCACTTGCAGTCCCGTGGAAATTCACGGTGAATGTAGGCGCTTTTGTAGGG
TAGGAATTCCTCACTCAAGCACCCCAACCTCCATTACGCGTCCCGCATAGAGTTCCC
AATCAGTGAAGTCAATGGCACTGTTCTCAATAGATTGGGGAGAAAGTTGACTTCCGCCC
AGAGCTGAAGGTGCGACACCGCATGATATAGGGTGGGCAACGGCAAAAAAGCACGT
GGCTCACCGAAAAAGCATGTTTGGCATCTAACATCCAGGAACCTGGATACATCCA
TCATCACGCAAGCCACTTTGATCTGCTGGTAACTCGTATTCGCGCTAAACCGAAG
TGCGTGGTAAATCTACACGTGGGCGCCCTTTGGGTATCTGCGTGTCTTCTCTAGG
TGCCATCTCTTTCCCTTCCCTCTAGTGTGAATTTGTTGTGGAGTCCGAGCTGTA
ACTACCTCTGAATCTCTGGAGAATGGTGGACTAACGACTACCGTGCACCTGCATCAT
GTATATAATAGTGTCTCTGAGAAGGGGGTTTGGAGCAATGTGGGACTTTGATGGTC
ATCAAAACAAAGAACGAAGACCGCTCTTTTGCAAGTTTGTTCGGCTACGGTGAAG
AATGGATACCTTTGTTGTCTCTCTGTGTATTTTGTGGCAACAGAGGCCAGAGACA
ATCTATTCAAAACCAAGCTTGCTCTTTTGGCTACAGAACCTGTGGGTATATAT
CTAGAGTTGTGAAGTTCGGTAATCCGCTGTATAGTAAATACGAGTCCGATCTAAATAC
TCCGAAGCTGCTGCGAACCCGGAGAATCGAGATGTGCTGGAAAGCTTCTAGCGAGCG
GCTAAATTAGCATGAAAGGCTATGAGAATTTCTGGAGACGGCTTGTGAATCATGGC
GTTCCATTTCTCGACAAGCAAGCGTTCCCTCGCAGTAGCAGGCACTCATTTCCCGAA
AAAACTCGGAGATTCTTAATAGCATGGAACCGGAATATATAATAGGCAATACAT
TGAGTTGCGCTCGACGCTTGCATGCAAGGGGTACTGAGCTTGGACATAACTGTTCCTG
ACCCACCTCTCTCAACCTTTGGCGTTTCCCTGATTCAGCGTACCCGTACAGTCCG
TAATCACTATTAAACCAAGCTTGGCGTTTTCGCTTTCGCTTTCATTTGGAGAAATAA
TGTCATTCGATGTGTATTTGCTGCTTGAACGCTGGGGCTGTTCGAAGCCCGAA
TGTAGGATTGTTATCGGAATCTGCTGCTAGAGGCAITGTGTAATCTGTGTGGGC
AGGACACGCTCGAAGGTTCCAGGCAAGGCAACCCGATAGCAATGTCTAGTAGC
AACCTGTAAAGCCCAATTCAGCATCACTGGAAATACAAACCAATGGCTAAAGTA
CATAGTTAATGCTTAAAGAAAGTCAATATACAGCGGCTAATAATGTGTAATCAAGT
GGCTAAACGTACCGTAATTTGCCAAGCGCTTGTGGGTTGCAAGGCAACGCAAG
CCCCACTTCCCGAGTTTGTCTTCTCACTCAGTCCAATCTCAGCTGGGTGATCCCCC
ATTGGGTCGCTTGTCTTCTCCGTTGAATGAAAGAAAGACAGAGGTAAAGATGTCTGA
CTCGGAGCGTTTTCATACAAACCAAGGGCAGTGTGAAGACAGTGAATGTGTGACA
TTCAGGAGTATTAGCAGGGATGCTTGAAGTATCGTGAAGGAGGTTTGTCTGC
CGATACGACGAATACTGTATAGTCACTTCTGATGAAGTGTCTCATTTGAATGTAA
GTCCGCTGAAACAGGCAAGATGAGTTGAATGCTTGAAGTTCGGGCGCTCG
GGCTTCCGCTTGGGTTGATGTTTGTCTCCGCGCAATGCAAGGTGTGTGAG
GATCGAACACATGCTGCTTTTACCAAGCGCTGAGGCTATGTATAGGCAATGTT
CAGGGCCCACTGATGTTTTCGAATAGAAAGAGAAGCTTAGCCAAAGCAATAGCCG
ATAAGATAGGCTCATTAACCGAATAGAGCTAGTAGGCAAGTCAAGCAATGTGTAT
ATATAAGGTTTCAGGTCGCTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AGATCTCCAGGAGACTGTACACCATCTTTTGAAGGCAAGAAACCAATAGTCAAC
CATCAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGCGCGCGCGCTTCACTGAGAGC
CTTTGGAGCTTTTCTCGTTTCTTCTCTCGCGCCAGCGGCTTGGCGCGCGCGCTCC
CAGGAGGTCAGAAAGCGGCTTCCGTCGAGGTCAGTACAAAGAACTACGTCCTCC
CCAGGCGCTTACTGCTCTCTTCAAGGCCAAGAGAAAGTATGGCGCTCCATCAGCGA

FIG. 8-1

CBHI マップ

【 図 9 - 2 】

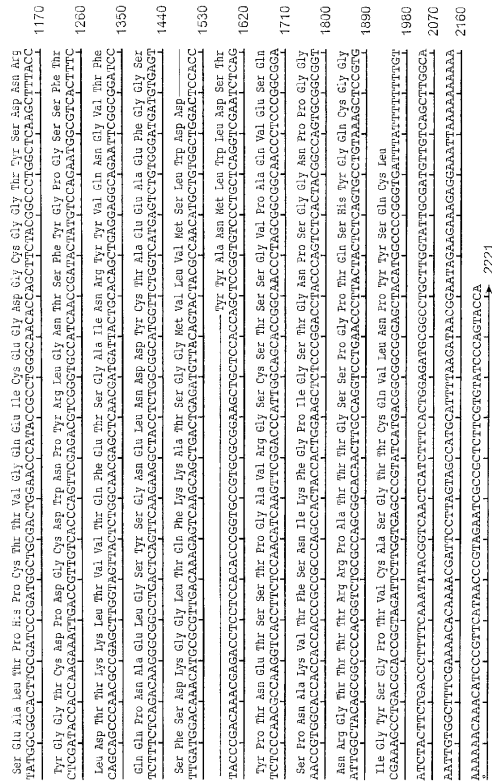


FIG. 9-2

【 図 1 0 】

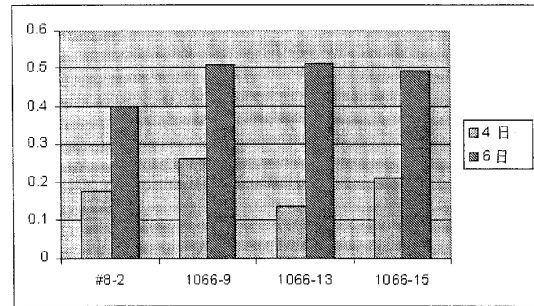


FIG. 10

【 図 1 1 】

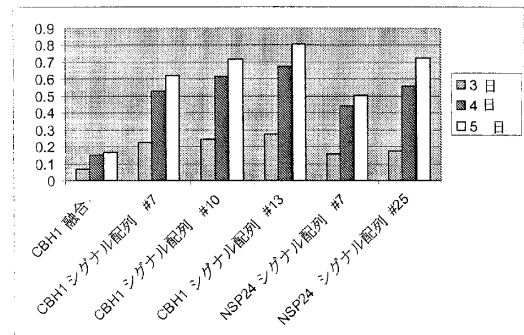


FIG. 11

【 図 1 2 】

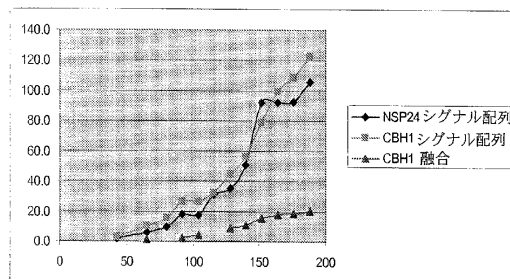


FIG. 12

【 図 1 4 】

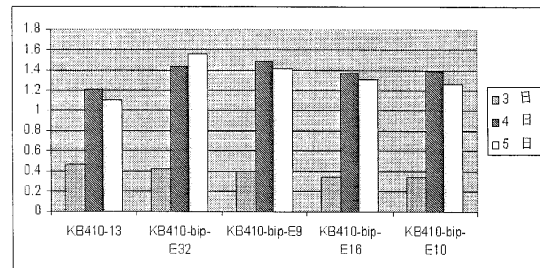


FIG. 14

【 図 1 3 】

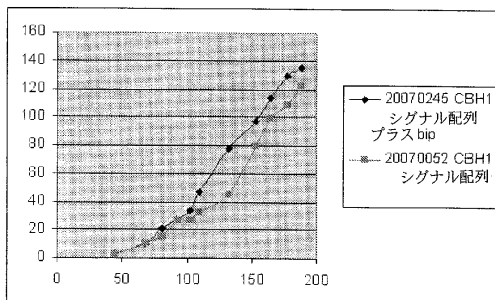


FIG. 13

【 図 1 5 】

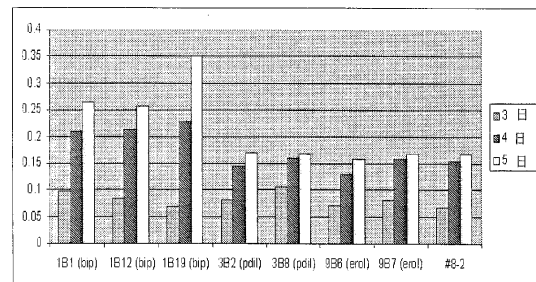


FIG. 15

【配列表】

0005252746000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100138438
弁理士 尾首 亘聰
- (74)代理人 100123892
弁理士 内藤 忠雄
- (74)代理人 100131543
弁理士 常光 克明
- (74)代理人 100159020
弁理士 安藤 麻子
- (74)代理人 100097744
弁理士 東野 博文
- (74)代理人 100161539
弁理士 武山 美子
- (72)発明者 バオ、カイ
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925、ダニスコ・ユーエス・インク、ジェネンコー・ディビジョン
- (72)発明者 ワン、ファミン
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925、ダニスコ・ユーエス・インク、ジェネンコー・ディビジョン

審査官 福澤 洋光

- (56)参考文献 特表2007-528212(JP,A)
米国特許第06207430(US,B1)
国際公開第2005/047511(WO,A1)
Molecular and General Genetics, 1999年, Vol.262, p.35-45

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- C12N1/00-15/90
C12P1/00-41/00
C07K1/00-19/00
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus(JDreamII)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
PubMed