

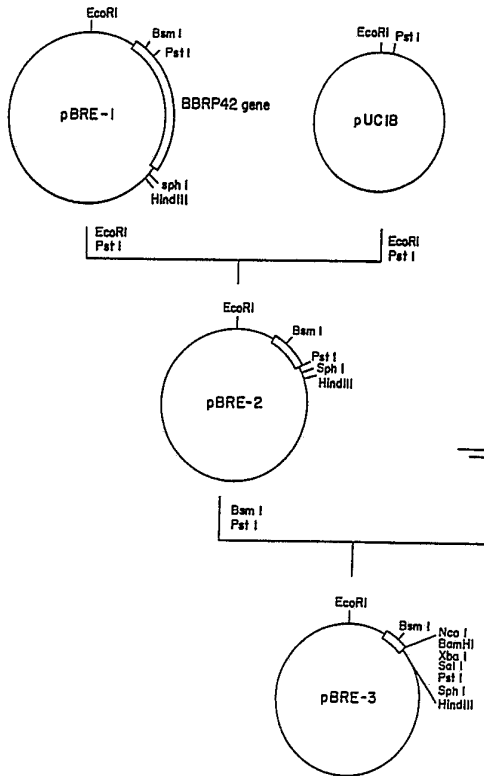


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 5 C12N 15/75, C12P 21/00 // (C12N 15/75, C12R 1/08) (C12P 21/00, C12R 1/08)</p>	<p>AI</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 91/18101 (43) 国際公開日 1991年11月28日 (28. 11. 1991)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP91/00626 (22) 国際出願日 1991年5月10日 (10. 05. 91) (30) 優先権データ 特願平 2/122166 1990年5月11日 (11. 05. 90) JP 特願平 2/334575 1990年11月30日 (30. 11. 90) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ヘキストジャパン株式会社 (HOECHST JAPAN LIMITED) [JP/JP] 〒107 東京都港区赤坂八丁目10番16号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 橋本 保 (HASHIMOTO, Tamotsu) [JP/JP] 〒351 埼玉県朝霞市栄町1丁目5番10号 Saitama, (JP) 辻村 敦 (TSUJIMURA, Atsushi) [JP/JP] 〒350 埼玉県川越市石原町1-42-34 コーポカサヤ202 Saitama, (JP) 織高重三 (UDAKA, Juzo) [JP/JP] 〒465 愛知県名古屋市長区植園町1-24-3 Aichi, (JP) (74) 代理人 弁理士 佐藤一雄, 外 (SATO, Kazuo et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FI, FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), HU, IT (欧州特許), KR, LU (欧州特許), NL (欧州特許), NO, PL, SE (欧州特許), SU, US. 添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING PROTEIN

(54) 発明の名称 蛋白質の製造法



(57) Abstract

A gene coding for BBRP42, which is a protein secreted in an earlier stage of incubation, is cloned from a genomic DNA library of *Bacillus brevis* to construct an expression vector containing a signal peptide coding region and a transcription controlling region. By incubating a host carrying a recombinant plasmid containing a foreign gene joined immediately downstream of the signal peptide coding region, it is possible to allow a foreign gene product to be secreted from the host in an earlier stage of the incubation where a protease is not secreted so much, thus enabling an efficient recovery of the product.

(57) 要約

パチルス・プレビスのゲノムDNAライブラリーから、培養初期に分泌されるタンパク質であるBBRP42をコードする遺伝子をクローニングし、そのシグナルペプチドコード領域及び転写制御領域を含む発現ベクターを構築した。この発現ベクターのシグナルペプチドコード領域のすぐ下流に外来遺伝子を連結した組換えプラスミドを保持する宿主を培養することによって、タンパク質分解酵素があまり分泌されていない培養初期に宿主から外来遺伝子産物を分泌させることができ、外来遺伝子産物を効率よく回収できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	ML	マリ
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
BB	バルバドス	FR	フランス	MR	モーリタニア
BE	ベルギー	GA	ガボン	MW	マラウイ
BF	ブルキナ・ファソ	GI	ギニア	NL	オランダ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリア	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SN	セネガル
CH	スイス	KR	大韓民国	SU	ソビエト連邦
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	TD	チャード
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TG	トーゴ
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルグ	US	米国
DE	ドイツ	MC	モナコ		
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		

明 細 書

蛋白質の製造法

〔発明の背景〕

産業上の利用分野

本発明は、いわゆるシグナルペプチドをコードする DNA 配列およびそれを利用した蛋白質の遺伝子工学的な製造法に関する。より詳細には、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis) を宿主として用いる蛋白質の製造法およびそれに必要な DNA 配列に関する。

従来技術とその課題

組換え DNA 技術を用いて異種蛋白質を微生物等で生産させる方法は、現在医薬品などの製造で多く用いられている手法である。

大腸菌はこの様な方法に宿主として最も一般的に用いられているものであるが、大腸菌などでは通常、産生された異種蛋白質は細胞内に留る。従って異種蛋白質の精製のためには、菌体を破壊し多くの大腸菌由来の蛋白質等を取り除く必要がある。また、限られた細胞内で多量に産生された異種蛋白質は多くの場合封入体を形成してしまい、この異種蛋白質の活性を再生させるためにはしばしば多くの労力を必要とする。

他方、枯草菌、酵母などを宿主として用いた系では、

産生された異種蛋白質が一般に宿主細胞外へ分泌されてその回収が容易であるという利点がある。枯草菌などが宿主としてこのような利点を有するのは、宿主菌の遺伝子が特定の遺伝情報を持っていて目的とする蛋白質をいわゆるシグナルペプチドと呼ばれるペプチド鎖の結合した前駆体としていったん産生し、これが細胞膜を通過して細胞外またはペリプラズムに分泌され、その際にシグナルペプチド鎖が切断されて成熟蛋白質となるという機構によるとされる。

バチルス属細菌を用いた系の例としては、最適培養条件下で12g/lもの蛋白質を培地中に分泌するバチルス・ブレビス47 (S. Udaka, (1976) Agric. Biol. Chem. 40, 523-528; S. Miyashiro, H. Enei, K. Takinami, Y. Hirose, T. Tsuchida and S. Udaka (1980) Agric. Biol. Chem. 44, 2297-2303) を宿主とし、この菌株が分泌する蛋白質のひとつであるMWPをコードする遺伝子のプロモーターおよびシグナルペプチドをコードするDNAを、ヒト上皮成長因子などの外来性遺伝子と連結し、バチルス・ブレビス47に導入することにより、培地中に多量の外来遺伝子産物を分泌させることに成功した例が報告されている (H. Yamagata, et. al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3589-3593)。

しかしながら、このバチルス・ブレビス47は、少量ながら蛋白質分解酵素を菌体外に分泌するため、産生さ

れた外来性遺伝子産物が、培地中で分解されてしまうという可能性が存在した。

[発明の概要]

本発明は、上記問題点を解決することを目的とし、蛋白質分解酵素があまり分泌されていない培養初期に分泌される蛋白質BBRP42を見出だし、この蛋白質をコードする遺伝子の制御部位を利用した発現系を構築することにより、この目的を達成しようとするものである。

要 旨

即ち、本発明はまず、シグナルペプチドをコードするDNAに関するものであって、下記の配列(I)で実質的に表されるシグナルペプチドをコードする塩基配列からなるもの、である。

Met-Phe-Ser-Lys-Thr-Lys-Met-Gly-Met-Leu-
Met-Gly-Thr-Met-Ala-Val-Val-Leu-Ser-Leu- (I)
Gly-Ser-Ile-Gly-Gly-Ala-Met-Ala

また本発明は、発現ベクターに関するものであり、前記のシグナルペプチドをコードするDNAと、その下流側末端に連結された所望の異種蛋白質をコードするDNAとを組込み、かつ、これら外来性遺伝子の発現に必要なDNAを持たせたものであることを特徴とするもの、である。

さらに本発明は、所望の蛋白質の製造法に関するものであって、本発明によるベクターで宿主細胞を形質転換

し、該形質転換体を培養することにより所望の蛋白質を培地中に分泌させることを特徴とするもの、である。

効 果

本発明によるシグナルペプチドをコードする D N A と所望の異種蛋白質をコードする D N A とを連結させて発現させることにより、この所望の異種蛋白質を宿主細胞外に分泌生産させることができる。

特に、宿主としてバチルス属細菌を用いた場合、バチルス属由来の蛋白質分解酵素よりも先に所望の異種蛋白質が培地中に産生されるため、高収率で均質な蛋白質の生産が可能となる。

[図面の簡単な説明]

第 1 図は、実験例 1 で得た、培養初期に培地中に分泌された蛋白質について行った S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す図である。

第 2 図は、B B R P 4 2 をコードする遺伝子を含む D N A 断片の制限酵素地図を示す図である。

第 3 図は実施例 3 で作成したデレーションミュータントの一つである p B R E - 1 の E c o R I から H i n d III までの塩基配列及び B B R P 4 2 のアミノ酸配列を示す図である。ここで、1 から 1 3 塩基対および 1 7 9 1 から 1 7 9 6 塩基対までは、ベクター由来のクローニングサイドを表わす。

↑ 1 は転写開始点を示す。

↑ 2 は分泌シグナル（翻訳開始点）の起点である。

↑ 3 は B B R P 4 2 の起点である。

第 4 図は、発現単位ベクターの作成の過程を示す図である。

第 5 図は、B.licheniformis α -アミラーゼ発現ベクターの構築の過程を示す図である。

第 6 図は、ヒト上皮成長因子発現ベクターの構築の過程を示す図である。

第 7 図は、p A M Y - 3 によって形質転換されたバチルス・プレビス 4 7 が分泌する α -アミラーゼ活性の培養時間による変化を示すグラフである。図中で - ● - は $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のエリスロマイシンを含む T 2 培地、- ▲ - は $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ のエリスロマイシンを含む T 2 培地、- ■ - は $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ のエリスロマイシンを含む L S 培地、- + - は $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ のエリスロマイシンと 1 % のグルコースを含む L S 培地で培養した時の培地中のアミラーゼ活性をそれぞれ示す。

第 8 図は、p E G F - 2 によって形質転換されたバチルス・プレビス 4 7 が分泌する h - E G F の培養時間による変化を示すグラフである。

第 9 図は、サルのプロインシュリン誘導体のアミノ酸配列およびその塩基配列を示す図である。

第 10 図は、p I N T 9 0 d 2 によって形質転換されたバチルス・プレビス 4 7 から分泌された蛋白質をウエ

スタンプティングによって解析した結果を示す図である。

レーン 1 は大腸菌で発現されたサルのプロインシュリン誘導体、レーン 2 はバチルス・プレビス 47 から分泌されたものを調べたものである。矢印はプロインシュリン誘導体を示す。

[発明の具体的説明]

シグナルペプチド

本発明による DNA は、アミノ酸配列が前記配列 (I) で実質的に表されるシグナルペプチドをコードする塩基配列を有するものである。

このように本発明による DNA は、これがコードするアミノ酸配列を有するペプチドによって特定されている。このペプチドは、細胞内で産生された生体産物を細胞外へ分泌させる作用を有しているいわゆるシグナルペプチドであって、そのアミノ酸配列が実質的に前記配列

(I) で表されるものである。ここで、「アミノ酸配列が実質的に前記配列 (I) で表されるもの」とは、このペプチドがいわゆるシグナルペプチドとしての作用を有する限りアミノ酸の 1 ~ 3 個について欠失、置換、付加などがあってもよいことを意味する。

この配列 (I) で表されるアミノ酸配列は、バチルス・プレビス 47 を培養した際に、その培養初期に培地に分泌される蛋白質である B B R P 42 をコードする遺伝子の解析に基づき完成されたものである。

B B R P 4 2 は、下記の性状を有する新規蛋白質である。

① S D S - P A G E によって約 4 2 0 0 0 の分子量を示す。

② N 末端の 4 番目から 2 0 番目までのアミノ酸配列が下記の通りである。

Ala-Lys-Pro-Thr-Ser-Leu-Ans-Lys-Pro-Val-Glu-Val-
Lys-Phe-Lys-Thr-Gly

③ バチルス・ブレビス 4 7 由来の蛋白質である M W P よりも培養初期に培地中に分泌される。

シグナルペプチドをコードする D N A

本発明によるシグナルペプチドをコードする D N A は、前記配列 (I) をコードする塩基配列を有するもの、並びに前記のようなシグナルペプチドとしての作用を有するペプチドのアミノ酸配列の変化に対応する塩基配列を有するものである。本発明による D N A の典型的な配列は、下記の配列 (II) のものである。

ATG-TTT-AGC-AAA-ACA-AAA-ATG-GGA-ATG-CTG-
ATG-GGA-ACG-ATG-GCA-GTA-GTT-TTG-AGT-CTG- (II)
GGT-AGC-ATA-GGC-GGA-GCJ-ATG-GCR

(ここで、J は A 又は C を表わし、R は A 又は G を表わす)

ペプチドのアミノ酸配列が与えられれば、それをコードする塩基配列はいわゆる遺伝暗号表を参照して容易に

定まり、また前記したアミノ酸配列をコードする種々の塩基配列を適宜選択することができる。従って、本発明によるシグナルペプチドをコードするDNAとは、その塩基配列が前記配列(II)であるもの並びにその縮重異性体である。ここで、「縮重異性体」とは、縮重関係にあるコドンが使用されている点以外は塩基配列が同一で同一のペプチドをコードするDNAを意味するものとする。

シグナルペプチドをコードするDNAの取得

本発明によるDNAは、その塩基配列が定まっていることから、そのDNAを取得するひとつの手段は、核酸合成の方法にしたがって製造することである。

また本発明によるDNAは、バチルス・ブレビスの遺伝子から切り出す方法も利用可能である。そのような方法の具体例としては、バチルス・ブレビス47由来のゲノムライブラリーから、遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば適当なプローブによるハイブリダイゼイゼイション法、により取得することも可能である。そのような方法の具体例については後記実験例を参照されたい。

シグナルペプチドをコードするDNAの用途

本発明によるDNAは、シグナルペプチドをコードするDNAであり、従ってこのDNAと、このDNAの下流側末端に連結された所望の蛋白質をコードするDNA

とを宿主細胞内で複製可能かつ両遺伝情報が発現可能な状態で含むDNA、特に発現ベクター、の形態として宿主細胞の形質転換を行えば、宿主細胞外に産生蛋白質を得ることができる。

特に本発明によるDNAをバチルス属を宿主とする宿主-ベクター系において使用すべきベクターとして構築し、これによりバチルス属細菌、特にバチルス・プレビス、を形質転換して利用するのに適している。即ち、本発明によるDNAは、バチルス属細菌由来の蛋白質分解酵素が培地に分泌されるより先に、異種蛋白質を培地に産生させることができるからである。

本発明による発現ベクター

従って、本発明による発現ベクターは、前記のシグナルペプチドをコードするDNAと、その下流側末端に結合された所望の外来性蛋白質をコードするDNAとを組み込み、かつ、これら外来性遺伝子の発現に必要なDNAを持たせたものであることを特徴とするもの、である。

特に本発明による発現ベクターは、前記した理由により、バチルス属細菌を宿主とする宿主-ベクター系において使用すべき発現ベクターとして構築されることが好ましい。

本発明によるベクター構築のための手順ないし方法は、分子生物学、生物工学ないし遺伝子工学の分野において慣用されているものを用いればよい。

例えば、本発明によるシグナルペプチドをコードする DNA として、前記した蛋白質 BBRP42 由来の DNA をそのまま利用しようとする場合、次のような操作により、本発明によるベクターを得ることができる。即ち、前述した BBRP42 の遺伝子ライブラリーからスクリーニングにより得られた DNA を、大腸菌などで複製可能なベクターに組み込みクローニングし、続いて、得られた DNA を、その下流側末端に所望の異種蛋白質をコードする DNA を連結した形で、予定の宿主で複製可能なベクターに組み込むことにより、本発明によるベクターを得ることができる。

バチルス属細菌を宿主として用いた場合のバチルス属細菌で複製可能なベクターとしては、pTA1060、pUB110、pE194、pC194 などのプラスミドおよびこれら由来の DNA が挙げられる。

さらに、ベクターとして、遺伝子ライブラリーから得られたシグナルペプチドをコードする DNA のクローニングの際用いる微生物、例えば大腸菌、と蛋白質産生の際宿主として用いる微生物、例えばバチルス属細菌、のいずれでも複製可能なベクター、すなわちシャトルベクター、を用いることも、DNA フラグメントを移す操作を省略できる点で好ましい。大腸菌とバチルス属細菌のシャトルベクターとしては、例えば、pHP13

(P.Haima, S.Bron, G.Venema, Mol.Gen.Genet. 209, 335-

342,1987)、などのプラスミドを用いることができる。

また、これらのプラスミドは、選択マーカを含むのが必要であり、それらの選択マーカの例としてはクロラムフェニコール耐性、エリスロマイシン耐性、ネオマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、ストレプトマイシン耐性などが挙げられる。

本発明による発現ベクターは、これを実際に宿主細胞に導入して所望の異種蛋白質を分泌発現させるためには、シグナルペプチドをコードするDNAおよび異種蛋白質をコードするDNAからなる外来性遺伝子の発現に必要なDNA、即ちプロモーター、転写開始信号、リボゾーム結合部位、翻訳停止シグナル、転写終結信号などの転写調節信号や翻訳調節信号など、を有していなければならない。

これらの各因子は、既に起源ベクターに含まれている場合があり、この場合にはこの起源ベクターの調節因子をそのまま用いることができる。また前記したように蛋白質BBRP42からそのままシグナルペプチドをコードするDNAを利用する場合、シグナルペプチドをコードするDNAのみならず、プロモーターなどの制御領域もクローニングして利用するのが有利である。

宿主としてバチルス属細菌を用いた場合、培養初期にこれら外来性遺伝子を発現させるプロモーターが組込まれてなることが特に好適である。好ましいプロモーター

の具体例としては、下記の塩基配列 (Ⅲ) の少なくとも 30 塩基対以上を有してなるものが挙げられる。

```
TACGATTTTCCCTCAAGTTTTCTTTTTCTCAA      (Ⅲ)  
CGGGAATCTAAAAATACCCATGTACACTTGGTCTT
```

また、この外来性遺伝子の発現に必要な DNA として転写開始点と翻訳開始点との間に、下記の塩基配列

(Ⅳ) で表される翻訳調節信号を含んでなることが好適である。

```
TAACAAAGAACAAGCACACTACACGAGCATAGACG  
AAAGGGTTGAGTGTAT      (Ⅳ)
```

本発明において産生しうる異種蛋白質は、特に制限されない。具体例としては、バチルス・プレビス 47 を用いて外来性蛋白質を産生した前記文献記載の h - E G F の他、インターフェロン、各種インターロイキン、インスリン、N G F、T N F、G M - C S F、血液凝固因子第Ⅷ因子、各種疾患の特異的な抗原蛋白質などが挙げられる。

所望の蛋白質の製造法

本発明による所望の蛋白質の製造法は、前記した本発明による発現ベクターで宿主微生物を形質転換し、該形質転換体を培養することにより所望の蛋白質を培地中に分泌させることを特徴とするものであることは、前記した通りである。

宿主微生物としては細菌、特にバチルス属細菌、が用

いられる。好ましいバチルス属細菌の例としては、バチルス・ブレビスが挙げられる。バチルス・ブレビスの具体例としては、バチルス・ブレビス47 (FERM P-7224)、同481、同144、同899などが挙げられる。

形質転換の方法は、この分野で慣用されているものを用いればよい。

上記のようにして得られる形質転換体を培養すれば微生物の細胞外（即ち培養液中）に、所望の外来性蛋白質を産生蓄積する。

形質転換体の培養ないし培養条件は、使用宿主微生物に対するそれと本質的に変わらない。また、培養液からの所望の蛋白質の回収、精製も常法に従って行なうことができる。

[実 験 例]

実験例1. バチルス・ブレビス47の培養初期上清中の蛋白質の検索

バチルス・ブレビス47をTlura培地（0.3% K_2HPO_4 、0.2% $(NH_4)_2SO_4$ 、0.025% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.3%ペプトン、0.2%肉エキス、2%グルコース、0.2%尿素及び0.01%ウラシル）中で一夜培養した。菌液を同じTlura培地で100倍に稀釈し、660nmに於ける吸光度を測定しながら37℃で振とう培養をおこなった。2

～10時間後の培養液から菌体を遠心分離により除き、その上清に90%飽和となるように硫酸を加え4℃で静置した。その後遠心分離を行い、これによって回収された沈澱のうち、吸光度が0.01の培養液1mlに相当する量についてLaemmliの方法(Nature, 1970, 227:680-685)に従ってSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。ゲルをクーマシブリリアンブルーで染色したところ、すでに報告のあるMWP、OWP(H. Yamada et al., (1981) J. Bacteriology 148, 322-332)以外に、分子量約42000の蛋白質のバンドが培養初期の上清に見つかり(第1図参照)、この蛋白質をBBRP42と名付けた。

実験例2. BBRP42の精製とN末端のアミノ酸配列の決定

(1) BBRP42の精製

バチルス・プレビス47をTlura培地中で一夜培養した菌液を実験例1と同じTlura培地で100倍に希釈し、660nmにおける吸光度が0.7に達するまで37℃で振とう培養を行った。氷冷した菌液に最終濃度1mMになるようにPMSF(phenylmethanesulfonyl fluoride)を加え遠心分離によって菌体を除いた。この上清1リットルに対して474gの硫酸を加え4℃で静置した後、遠心分離により沈澱を除いた。この上清1リットルに対してさらに153gの硫酸を加え4℃で静置し、遠心分離によ

り沈澱を回収した。沈澱を50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、100 mM NaCl溶液に溶解し、Sep-pak カートリッジ(waters社)に通し、蛋白質を吸着させ、同バッファーで洗浄した後、40%のアセトニトリルで溶出してから凍結乾燥を行った。この試料は、まだ相当量の培地成分を含んでいたためBio-Gel p60 (バイオラッド社)を充填したカラムを用いてゲルろ過を行いBBRP42を含む分画を集め、0.1 Mの炭酸水素アンモニウムに対して透析し、凍結乾燥を行いアミノ酸配列決定の試料とした。

(2) アミノ酸配列の決定

(1) で得られた蛋白質40 μ gを、アプライドバイオシステム社のアミノ酸配列分析装置477Aを用いて、N末端から20残基を分析した。その結果N末端の4番目から20番目までのアミノ酸配列が、Ala-Lys-Pro-Thr-Ser-Leu-Ans-Lys-Pro-Val-Glu-Val-Lys-Phe-Lys-Thr-Glyであることが分った。

実験例3. BBRP42をコードする遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定

(1) バチルス・プレビス47のゲノムライブラリーの作成

実験例1において遠心分離した菌体を50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM EDTA、15% Sucroseに懸濁し、最終濃度5 mg/mlになるようにリゾ

チームを加え、37℃で15分間インキュベートした。その後、SDSおよびプロナーゼKをそれぞれ最終濃度0.5%、50 µg/mlになるように加え、55℃で一夜インキュベートした。フェノール抽出を数回繰り返して、最後にクロロホルムで一度抽出し、2倍量のエタノールによってDNAを沈澱させた。このDNAをManiatisらの方法(Molecular cloning 1982, Cold Spring Harbor Laboratory)に従い、Sau3A1で部分消化し、アガロースゲル電気泳動をおこなった。約20 kbのDNA断片を含むゲルを切出しTAEバッファー(40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA)と共に透析チューブに入れ、電気泳動によりDNAをゲルから溶出させた。この溶液をフェノール抽出した後、エタノールによりDNAを沈澱させた。染色体DNA 1 µgとBamHIで切断したλgt10 DNA(ストラタジーン社) 2 µgをエタノールで沈澱させ10 µlのライゲーションバッファー(66 mM Tris-HCl (pH 7.6)、6.6 mM MgCl₂、10 mM DTT、0.1 mM ATP)に溶解し、T4リガーゼを加えて16℃で一晩インキュベートした。このうちの5 µlをλDNAインビトロパッケージングキット、ギガパックゴールド(ストラタジーン社製)を用いてパッケージングを行った。

(2) BBRP42をコードとする遺伝子を持つ組換えファージのスクリーニング

前記(1)で得られたファージのうち、約5000個を大腸菌C600株の培養液と共に寒天培地にまき、Maniatisらの方法(Molecular cloning 1982, Cold Spring Harbor laboratory)従ってブランクハイブリダイゼーションを行った。プローブは、実験例2で得られた第4番目から第20番目のアミノ酸配列から予測される遺伝子のDNA配列のうち、すでにクローニングされているバチルス・プレビス47由来の蛋白質であるMWP及びOWPをコードする遺伝子(Tsuboi et. al., (1988), J. Bacteriol. 170, 935)のコードン使用頻度を参考にして、GCTAAACCAACTTCTCTGAACAACAACAGTTGAAGTTAAATTCAAAACCTGGの配列からなる50塩基のDNAを合成し、 $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP及びT4ポリヌクレオチドキナーゼにより標識したものをを用いた。その後、プローブとハイブリダイズする15個のクローンが得られた。

(3) BBRP42をコードする遺伝子の塩基配列の決定

前記(2)で得られたファージDNAについて、EcoRIで切断後サザンブロットハイブリダイゼーションを行ったところ、前述のプローブは6.6 kbの断片にハイブリダイズした。そこで1つのクローンについて、そのEcoRI断片をpUC18(宝酒造社製)のEcoRIサイトに挿入してDNAを調整し、制限酵素

地図を作成した(第2図)。さまざまな制限酵素によって切断したDNAについて前述のプロブを用いてザンハイブリダイゼーションを行ったところ、1.7 kbのS a c I - P s t I断片にハイブリダイズした。この領域を含む3.7 kbのS a l I - S p h I断片をp H S G 399(宝酒造社製)のS a l IとS p h Iサイトの間に挿入し、得られたプラスミドDNAをS a l IとK p n Iで切断後、エクソヌクレアーゼIIIとマングビーンヌクレアーゼでDNAを段階的に消化してデレーションミュータントを作成した(Heinkoff (1984), Gene, 28,351-)。各デレーションミュータントのDNAを単離して7-deaza Sequenase kit(United States Biochemical Corporation)を用いて塩基配列の決定を行った。第3図に、デレーションミュータントの1つであるp B R E - 1のE c o R IサイトからH i n d IIIサイトまでの塩基配列を示す。塩基配列データを解析したところ、第3図に示すように、237塩基対から1607塩基対にかけて、457個のコドンから成るオープンリーディングフレームが見つかった。実験例2で得られた17個のアミノ酸配列は、このオープンリーディングフレームから翻訳したアミノ酸配列の32残基から48残基に見つかった。培地中に見つかるB B R P 42は、29残基目のアラニンのN末端側で切断されており、ここよりN末端側が分泌シグナルとして働いていると考えられる。1番か

ら28番のアミノ酸中には、翻訳開始のMetになり得る部分が、6ヶ所ある。1番のMetを翻訳開始部位とした時の構造は、すでに調べられているバチルス属分泌シグナルに共通なN末端側から順に、親水性部位-疎水性部位-切断部位からなる構造とよく一致する。

(4) 転写開始点の決定

BBRP42をコードとする遺伝子の転写開始点を決定するため第3図の225塩基対から244塩基対までの配列に相補的な20塩基のDNAを合成し、プライマーエクステンションをおこなった(Jones, K.A.(1985) Cell 42,559-572)。M.Z.Gilmanらの方法(Cell,35,285-293)に従って分離したバチルス・プレビス47のRNAと、 $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼで標識した上記プライマーをアニールさせ逆転写酵素を用いて相補鎖を合成した。この産物を7M尿素/10%アクリルアミドゲルゲルでマーカールと共に電気泳動し、その長さを測定した。オートラジオグラフィの結果、60塩基と61塩基のバンドが確認でき、このことからBBRP42をコードとする遺伝子の転写開始点は、第3図の185塩基目のGと184塩基目のTであると結論した。185番目のGがメジャーであり、184番目のTはマイナーである。

実験例 4. 発現単位ベクターの構築

実験例 3 で得られたデレションミュータントのうち、第 3 図に示す DNA 断片を持つプラスミド p B R E - 1 から、E c o R I と P s t I によって、プロモーター、シグナルペプチド、および B B R P 4 2 の N 末端領域を含む DNA 断片を切出し、プラスミドベクターの p U C 1 8 の E c o R I と P s t I の間に挿入して p B R E - 2 を作成した。この p B R E - 2 のうち、B s m I サイトと P s t I サイトの間の DNA を、

```

5'
GATGGGAACGATGGCAGTAGTTTTGAGTCTGGGTAGCATAGG
GACTACCCTTGCTACCGTCATCAAACTCAGACCCATCGTATCC
3'

```

```

CGGAGCCATGGCGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCA
GCCTCGGTACCGCCTAGGAGATCTCAGCTGG
3'
5'

```

から成る一対の合成 DNA でおき変えることにより、p B R E - 3 を作成した。このプラスミドは、B B R P 4 2 をコードする遺伝子のプロモーター、B B R P 4 2 のシグナルペプチドをコードし、さらに下流には N c o I 、 B a m H I 、 X b a I 、 P s t I 、 S p h I 、 H i n d III サイトから成るポリクロニングサイトを持っている。この N c o I サイトに異種蛋白質遺伝子を直接連結することによって一つの発現単位を作成すること

ができる。N c o I で切断することによりシグナルペプチドの最後のアミノ酸の A l a をコードする D N A 部分が切断されてしまうため遺伝子を連結する場合には、その 5' 末端に A l a をコードする D N A を付加しておく必要がある。またこのプラスミドは、バチルス・ブレビス中では複製できないので p B R E - 3 上で作成した発現単位をバチルス・ブレビス 47 中で複製可能なプラスミドに移す必要がある。例えば、異種蛋白質遺伝子を p B R E - 3 に組込んだプラスミドから E c o R I と H i n d III で切出した D N A 断片を、p H P 13 などのバチルス中でも複製可能なシャトルベクターの適切なサイトに挿入することが必要である。

以下に、B. licheniformis の α -アミラーゼとヒト上皮成長因子を発現させた例を示す。

実験例 5. B. licheniformis α -アミラーゼの発現ベクターの構築およびバチルス・ブレビス 47 のでの発現

B. licheniformis α -アミラーゼ遺伝子を含むプラスミド p T N 1 (T.Yuuki, et al. (1985) J. Biochem., 98, 1147-) から B a m H I, B c I I で切出した D N A 断片を、実験例 4 で作成した p B R E - 3 の B a m H I サイトに挿入し、アミラーゼ遺伝子が正しい方向に入ったものを選択して、p A M Y - 1 を作成した。このプラスミドから N c o I, E c o 47 III で不要な部分を取り去り、

代りに

```

5'
CATGGCGGCAAATCTTAATGGGACGCTGATGCAGTATTTTGAAT
CGCCGTTTAGAATTACCCTGCGACTACGTCATAAAACTTA
3'

```

```

3'
GGTACATGCCCAATGACGGCCAACATTGGAAGC
CCATGTACGGGTTACTGCCGGTTGTAACCTTCG
5'

```

から成る一対の合成DNAを挿入することによって
 pAMY-2を作成した。pAMY-2は、BBRP
 42をコードする遺伝子のプロモーター、BBRP42
 のシグナルペプチドとそれに続いてB.licheniformisの
 α -アミラーゼをコードする1つの発現単位を持ってい
 る。さらにpAMY-2からEcoRI, HindIIIで
 発現単位をふくむDNAを切出し、大腸菌、B.subtilis
 のシャトルベクターのひとつであるpHP13の
 EcoRI, HindIIIサイトに挿入することによって
 pAMY-3を作成した。このプラスミドを用いて、高
 橋らの方法(J. Bacteriol., (1983)156, 1130-1134)に従
 い、バチルス・プレビス47を形質転換した。得られた
 形質転換体を、10 μ g/mlのエリスロマイシンを含む
 T2培地(1% ペプトン、0.5% 肉エキス、
 0.2% 酵母エキス、1% グルコース)に植え37
 °Cで振とう培養を行った。培養液から菌体を遠心分離に

より取り除き、上清中のアミラーゼ活性をH. Fuwaの方法の松崎変法(J. Biochemistry 41, 583, 1954)により測定した。その結果、アミラーゼが培地中に分泌されていることが確認された。

実験例 6. p A M Y - 3 によって形質転換されたバチルス・ブレビス 47 が分泌するアミラーゼの定量

実験例 5 で得られた p A M Y - 3 を含むバチルス・ブレビス 47 形質転換体を、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ のエリスロマイシンを含む T 2 培地、 $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ のエリスロマイシンを含む T 2 培地、 $2000 \mu\text{g} / \text{ml}$ のエリスロマイシンを含む L S 培地 (1% ペプトン、0.5% 酵母エキス、0.25% 食塩) または 1% グルコースと $200 \mu\text{g}$ のエリスロマイシンを含む L S 培地に植え、 37°C で振とう培養を行った。24 時間ごとに培養液の一部を取り、遠心によって菌体を除いた上清をアミラーゼ酵素液として活性測定に用いた。上清中のアミラーゼ活性の測定は、実験例 5 と同様に、H. Fuwa の方法の松崎変法を用いて行った。第 7 図に上清中に分泌されるアミラーゼ活性の時間経緯を示す。24 時間の時点では $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ のエリスロマイシンを含む L S 培地での分泌が最も良く、次いで $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ のエリスロマイシンを含む T 2 培地、1% グルコースと $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ のエリスロマイシンを含む L S 培地、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ のエリスロマイシンを含む T 2 培地の順であった。しかし培養時間が 72 時間にな

ると、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のエリスロマイシンを含むT2培地、 1% グルコースと $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ のエリスロマイシンを含むLS培地、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ のエリスロマイシンを含むLS培地、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ のエリスロマイシンを含むT2培地の順となった。72時間後の $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のエリスロマイシンを含むT2培地では1ml当たり920ユニットのアミラーゼが分泌されていた。

実験例7. ヒト上皮成長因子(h-EGF)発現ベクターの構築およびバチルス・プレビス47での発現

ヒト上皮成長因子は、58アミノ酸からなる比較的小さなポリペプチドであり、本実験例では、ヒト上皮成長因子をコードするDNAとして化学合成したものをを用いた。DNAを合成する際、上流にはシグナル配列の最後のAlaをコードする配列を、下流には終止コドンコードするTAAを含みさらに両端には、NcoIおよびXbaIサイトに結合可能なDNAを4本に分けて合成した。この合成DNAをpBRE-3のNcoI, XbaIサイトに挿入してpEGF-1を作成した。このプラスミドからEcoRIとHindIIIによって切出したDNA断片をpHP13に挿入することによってpEGF-2を作成した。この発現ベクターを実験例5と同様にバチルス・プレビス47に導入した。得られた形質転換体を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のエリスロマイシンを含むT2培地に植え、 37°C で振とう培養を行った。菌体を除いた上

清中の h - E G F を、抗 h - E G F 抗体を用いて調べた結果、上清中に h - E G F の存在が確認された。

実施例 8. p E G F - 2 によって形質転換されたバチルス・ブレビス 47 の分泌する h - E G F の定量

実験例 7 で得られた p E G F - 2 によって形質転換されたバチルス・ブレビス 47 を 10 μ g / ml のエリスロマイシンを含む T 2 培地に植え 37 $^{\circ}$ C で振とう培養を行った。24 時間ごとに培養液の一部を取り、遠心によって菌体を除いた上清中の h - E G F の濃度をヒト上皮成長因子に対するモノクローナル抗体を用いた E L I S A 法 (Current protocols in molecular biology Vol.2

Green Publishing Associates and Wiley-Interscience 1989) により定量した。標準試料として精製された組み換えヒト E G F (アース製薬株式会社製) を用いた。第 8 図にその結果を示す。h - E G F の量は 48 時間まで増加し、それ以上の培養では増加しなかった。この時の h - E G F の量は 1 ml 当たり 10.5 μ g であった。

実施例 9. バチルス・ブレビス 47 により分泌された h - E G F の精製および N 末のアミノ酸配列の確認

バチルス・ブレビス 47 より分泌された h - E G F の N 末のシグナルペプチドが正しく切断されているどうかを確認するため h - E G F の精製を行った。実験例 7 で得られた p E G F - 2 によって形質転換されたバチルス・ブレビス 47 を 10 μ g / ml のエリスロマイシンを含

む L S 培地に植え、37℃で48時間振とう培養を行った。培養上清40 mlに9.72 gの硫酸を加え、4℃で1時間静置した後、遠心により残渣を取除き、BUTYL-TOYOPEARL 650S (トソー株式会社製) を充填したカラムに吸着させ、40%硫酸を含むPBS (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na₂HPO₄, 0.024% KH₂PO₄ pH 7.4) で洗浄後、硫酸濃度を40%から0%に徐々に落とし、h-EGFを溶出させた。溶出液のうちh-EGFを含む分画をさらに高速液体クロマトグラフィーで精製するため、C18カラム (ハイパー高速液体クロマトグラフィー用充填カラム LiChrospher 100 RP-18、関東化学株式会社) に吸着させ、0.1%のトリフルオロ酢酸を含む0%から40%のアセトニトリル溶液のグラジェントによりh-EGFを溶出させた。h-EGFを含む分画を取り、その一部を用いN末20個のアミノ酸配列分析をおこなった (ABI社製477A)。得られたアミノ酸配列は、Asn-Ser-Asp-Ser-Glu-X-Pro-Leu-Ser-His-Asp-Gly-Tyr-X-Leu-His-Asp-Gly-Val-Xであった。Xは解読不明の残基を示す。N末のアミノ酸残基はAsnでありヒト上皮成長因子のN末の残基と一致し、シグナル配列が正しく切断されていることが確認された。また、解読不明の残基とは、アミノ酸が修飾されているために分析できない場合と、アミノ酸がCys残基であ

る場合があるが、今回得られたアミノ酸配列中の X 残基に対応するヒト上皮成長因子のアミノ酸残基はすべて C y s 残基であることから X は C y s に対応し、バチルス・ブレビス 47 より分泌された h - E G F の N 末 20 個のアミノ酸配列は正しい配列を持っていると結論される。

実施例 10. バチルス・ブレビス 47 によるサル由来のプロインシュリン誘導体の分泌発現

バチルス・ブレビス 47 におけるサル由来のプロインシュリン誘導体の分泌発現について検討した。用いた遺伝子は第 9 図に示されているものである。

この誘導体は、サルのプロインシュリンの N 末端に Met-Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg の人工的アミノ酸配列が付加されている。この誘導体をコードする D N A 断片を実験例 4 で得られた発現ベクター p B R E - 3 の N c o I と S a l I サイトの間に挿入し、p I N T 9 0 d 1 を作製した。このプラスミドから E c o R I と H i n d III によって切り出した発現単位を、p H P 1 3 の E c o R I と H i n d III サイトの間に挿入し、p I N T 9 0 d 2 を作製した。この p I N T 9 0 d 2 をバチルス・ブレビス 47 に導入し、得られた形質転換体を 200 μ g/ml のエリスロマイシンを含む T 2 培地に植え、37 $^{\circ}$ C で 48 時間振とう培養を行った。培養液 1 ml を取り、遠心により菌体を取除いた上清を凍結乾

燥し、Laemmli の方法（前述）に従って SDS ポリアクリルアミド電気泳動で蛋白を分離した。さらに蛋白を電気泳動的にナイロン膜に転写し、抗ヒトインシュリン抗体およびホースラディッシュ・パーオキシターゼで標識した二次抗体を用いて Western-Blotting を行った

(Current Protocols in molecular biology vol.2 Green Publishing Associates and Wiley-Interscience 1989)。その結果、第 10 図に示すように、抗ヒトインシュリン抗体と反応する単一の蛋白質のバンドが確認された。

請求の範囲

1. 下記の配列 (I) で実質的に表されるシグナルペプチドをコードする塩基配列からなる DNA。

Met-Phe-Ser-Lys-Thr-Lys-Met-Gly-Met-Leu-
Met-Gly-Thr-Met-Ala-Val-Val-Leu-Ser-Leu- (I)
Gly-Ser-Ile-Gly-Gly-Ala-Met-Ala

2. シグナルペプチドをコードする塩基配列が下記の配列 (II) のものである、請求項 1 記載の DNA。

ATG-TTT-AGC-AAA-ACA-AAA-ATG-GGA-ATG-CTG-
ATG-GGA-ACG-ATG-GCA-GTA-GTT-TTG-AGT-CTG- (II)
GGT-AGC-ATA-GGC-GGA-GCJ-ATG-GCR

(ここで、J は A 又は C を表わし、R は A 又は G を表わす)

3. 請求項 1 または 2 記載のシグナルペプチドをコードする DNA と、その下流側末端に連結された所望の異種蛋白質をコードする DNA とを組み込み、かつ、これら外来性遺伝子の発現に必要な DNA を持たせたものであることを特徴とする、発現ベクター。

4. 宿主細胞を培養したとき培養初期に前記外来性遺伝子を発現させるプロモーターを含んでなる、請求項 3 記載のベクター。

5. プロモーターが下記の塩基配列 (III) の少なくとも 30 塩基対以上を有してなるものである、請求項 3

または4記載のベクター。

TACGATTTTCCCTCAAGTTTTCTTTTTCTCAA (III)

CGGGAATCTAAAAATACCCATGTACACTTGGTCTT

6. 下記の塩基配列 (IV) で表される翻訳調節信号を転写開始点と翻訳開始点との間に含んでなる、請求項3-5いずれか一項記載のベクター。

TAACAAAGAACAAGCACACTACACGAGCATAGACG

AAAGGGTTGAGTGTAT (IV)

7. 請求項3-6のいずれか一項記載のベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換体を培養することにより所望の蛋白質を培地中に分泌させることを特徴とする、所望の蛋白質の製造法。

8. 宿主細胞がバチルス属細菌である、請求項7記載の製造法。

9. バチルス属細菌がバチルス・ブレビスである、請求項8記載の製造法。

1/10

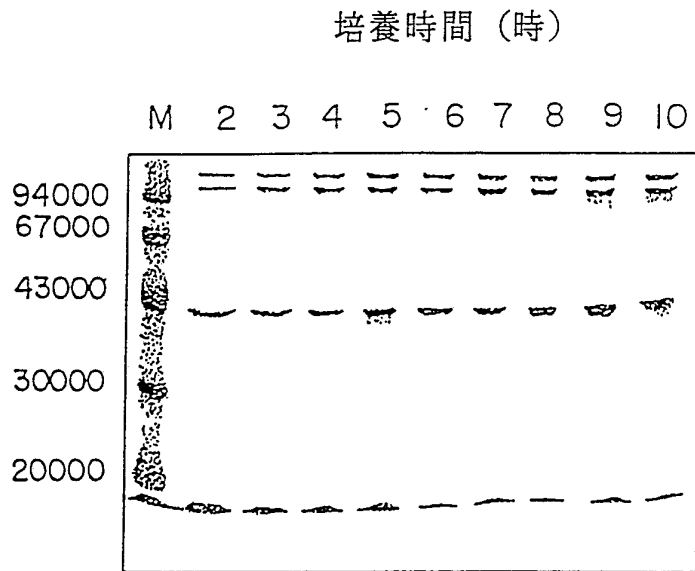


FIG. 1

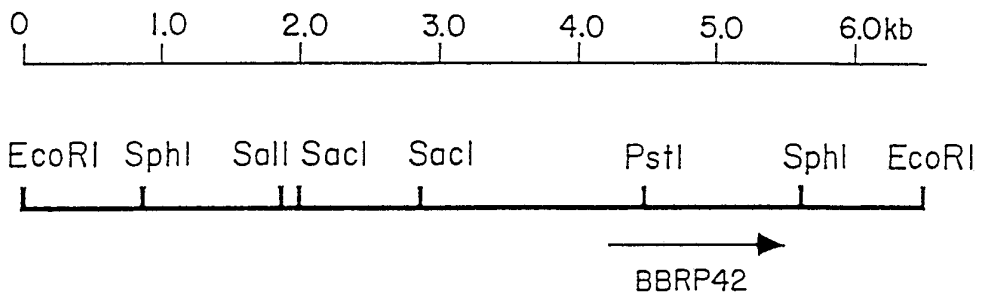


FIG. 2

2/10

EcoRI SacI
 1 GAATTCGAGCTCGCCCCTTTTTGGAGTGGAGACGGCCAGTCAATCCCCAGAGCGTGTCA

61 GAGTCGAAGAGAACTGTGCTTTTTCTTTTCCTCCACTATGTTGACATAGTTTTCTACGAT

121 TTTCCCTCAAGTTTTCTTTTTCTCAAACGGGAATCTAAAAATACCCATGTACACTTGG

181 TCTTGTAACAAAGAACAAGCACACTACACGAGCATAGACGAAAGGGTTGAGTGTATATGT
 ↑1 MetP

BsmI
 241 TTAGCAAAACAAAATGGGAATGCTGATGGGAACGATGGCAGTAGTTTTGAGTCTGGGTA
 heSerLysThrLysMetGlyMetLeuMetGlyThrMetAlaValValLeuSerLeuGlyS
 ↑2

301 GCATAGGCGGAGCAATGGCAGCCGATTCAGCAAAACCAACTTCATTGAATAAACCCGTAG
 erIleGlyGlyAlaMetAlaAlaAspSerAlaLysProThrSerLeuAsnLysProValG
 ↑3

361 AAGTAAAATTCAAACCGGCAAGATGGGCCACCACGGTGGGGTGGGCTTCAAAGAAAATA
 luValLysPheLysThrGlyLysMetGlyHisHisGlyGlyValGlyPheLysGluAsnL

421 AAGAGCTGCTCTCGCTGTTAAAGCTGGATGCTGACAAGCTGAAAGAAGAGCTTGCGGCAG
 ysGluLeuLeuSerLeuLeuLysLeuAspAlaAspLysLeuLysGluGluLeuAlaAlaG
PstI

481 GGAAAACACTCGCAGCGATTGCACAAGCCCAAGGAGTTGACACTGCAGATGTCGTGGCAC
 lyLysThrLeuAlaAlaIleAlaGlnAlaGlnGlyValAspThrAlaAspValValAlaL

541 TTCTGGTTGACCAGCAAGAGGCCAAACTGAAAGGAGCAGTAACAGCAGGCAAGCTGACGC
 euLeuValAspGlnGlnGluAlaLysLeuLysGlyAlaValThrAlaGlyLysLeuThrG

601 AGGAGCAGGCAGATAAGCTGTCTGAAAATCTGAGCGACCGGTAAAAGAACAGGTAGAAA
 lnGluGlnAlaAspLysLeuSerGluAsnLeuSerAspArgValLysGluGlnValGluA

661 ACTCGAAACCGGATAAAGGCTTCGGCAGAGGAGGCTTCATCGGTGGCTTCGAGAAAACG
 snSerLysProAspLysGlyPheGlyArgGlyGlyPheIleGlyGlyPheGluLysAsnG

721 AAGAAGTGTCTCTCTTGAAGCTGGATGCCGATAAACTCCAAGAAGAACTGAAAGCCG
 luGluLeuLeuSerLeuLeuLysLeuAspAlaAspLysLeuGlnGluGluLeuLysAlaA

781 ACAAATCGCTGGCTACAATCGCAGAGGCTCAAGGCGTATCTGTGGATGATCTGGTGGCTC
 spLysSerLeuAlaThrIleAlaGluAlaGlnGlyValSerValAspAspLeuValAlaL

841 TGTGGTAAAACAACAAGAAACCAAGCTGAAAGAGGCAGTAGCGGCAGGCAAGCTCACTC
 euLeuValLysGlnGlnGluThrLysLeuLysGluAlaValAlaAlaGlyLysLeuThrG

901 AGGAGCAAGCCGACAAGATGAATGAAAAAGCGAACGAACGAGTAAAAGAAATGGTGCAAA
 lnGluGlnAlaAspLysMetAsnGluLysAlaAsnGluArgValLysGluMetValGlnA

961 ATACGCATCACGGACGTGGACCGGGTAGAGAAATGGGCTTCGAGAAAACCAAGAAGTGT
 snThrHisHisGlyArgGlyProGlyArgGluMetGlyPheGluLysAsnGlnGluLeuL

FIG. 3A

3/10

1021 TGTCTCTCTTGAAGCTGGACGCCGATAAGCTCCAAGAAGAGCTGAAAGCGGAGAAATCGC
euSerLeuLeuLysLeuAspAlaAspLysLeuGlnGluGluLeuLysAlaGluLysSerL

1081 TGGCTACAATCGCAGAGACCCAAGGCGTATCTGTGGATGATCTGGTGGCTTTGTTGGTAA
euAlaThrIleAlaGluThrGlnGlyValSerValAspAspLeuValAlaLeuLeuValL

1141 AACAAACAGGAAACCAAGCTGAAAGAGGCAGTAGCGGCAGGCAAGCTCACTCAGGAGCAAG
ysGlnGlnGluThrLysLeuLysGluAlaValAlaAlaGlyLysLeuThrGlnGluGlnA

1201 CCGACAAGATGAATGAAAAAGCGAGCGAACGAGTAAAAGAAATGGTGCAAAATACGCATC
laAspLysMetAsnGluLysAlaSerGluArgValLysGluMetValGlnAsnThrHisH

1261 ATGGACGTGGACCAGGTAAAGGAATGGGTATCGAGAAAAATGAAGAACTGCTGTCCCTCC
isGlyArgGlyProGlyLysGlyMetGlyIleGluLysAsnGluGluLeuLeuSerLeuL

1321 TCAAGCTGGATGCAGACAAGCTGAAGGAAGAGCAAAAAGCAGGAAAATCGTTGGCGACTA
euLysLeuAspAlaAspLysLeuLysGluGluGlnLysAlaGlyLysSerLeuAlaThrI

1381 TCGCCAAGGAGCAAGGTGTAGAAGTGGATGATGTTATCAAGCTCTTGGTAGGTCAACACG
leAlaLysGluGlnGlyValGluValAspAspValIleLysLeuLeuValGlyGlnHisG

1441 AAACCAAGCTAAAAGAAGCAGTTAAGGCAGGCAAGCTCACACAGGAGCAAGCTGACAAGC
luThrLysLeuLysGluAlaValLysAlaGlyLysLeuThrGlnGluGlnAlaAspLysA

1501 GCAGCGAGGAATTGACTGCGATGGTGCAAAAGATGGTGGATGGCAGCTTTGAAAAAGTCG
rgSerGluGluLeuThrAlaMetValGlnLysMetValAspGlySerPheGluLysValV

1561 TTTTCCAAAACATGAAAAAGAGAAAAAGACCAGAAGGAAACCATGTAGAAAAGTCAGG
alPheProLysHisGluLysGluLysLysAspGlnLysGluThrMet***

1621 CAGGTGGGAGTTACTCCCATCTGCTTTTCTATTTTCTCGGGATTGGTCGATGTGCGTCGA

1681 TTTGTACATAAAAACCAACGTGCGAATGAGGTGAAAGGACAATCCGCGAATTGACACACA

1741 GCGGGAAAACACGATACATTGAGTAAGTATTGAAATGAGGTGGCATGCAAGCTT

SphI HindIII

FIG. 3B

4/10

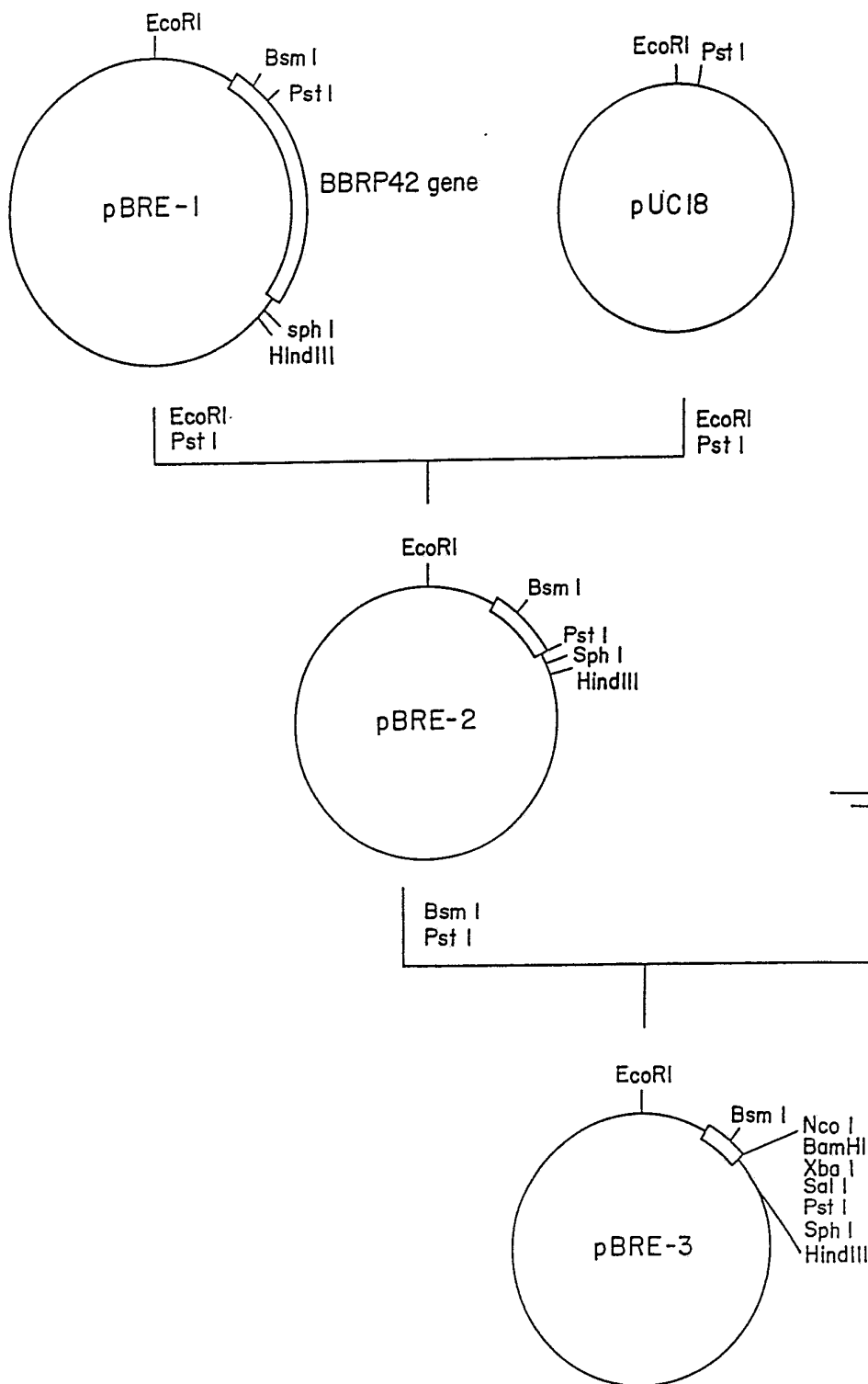


FIG. 4

5/10

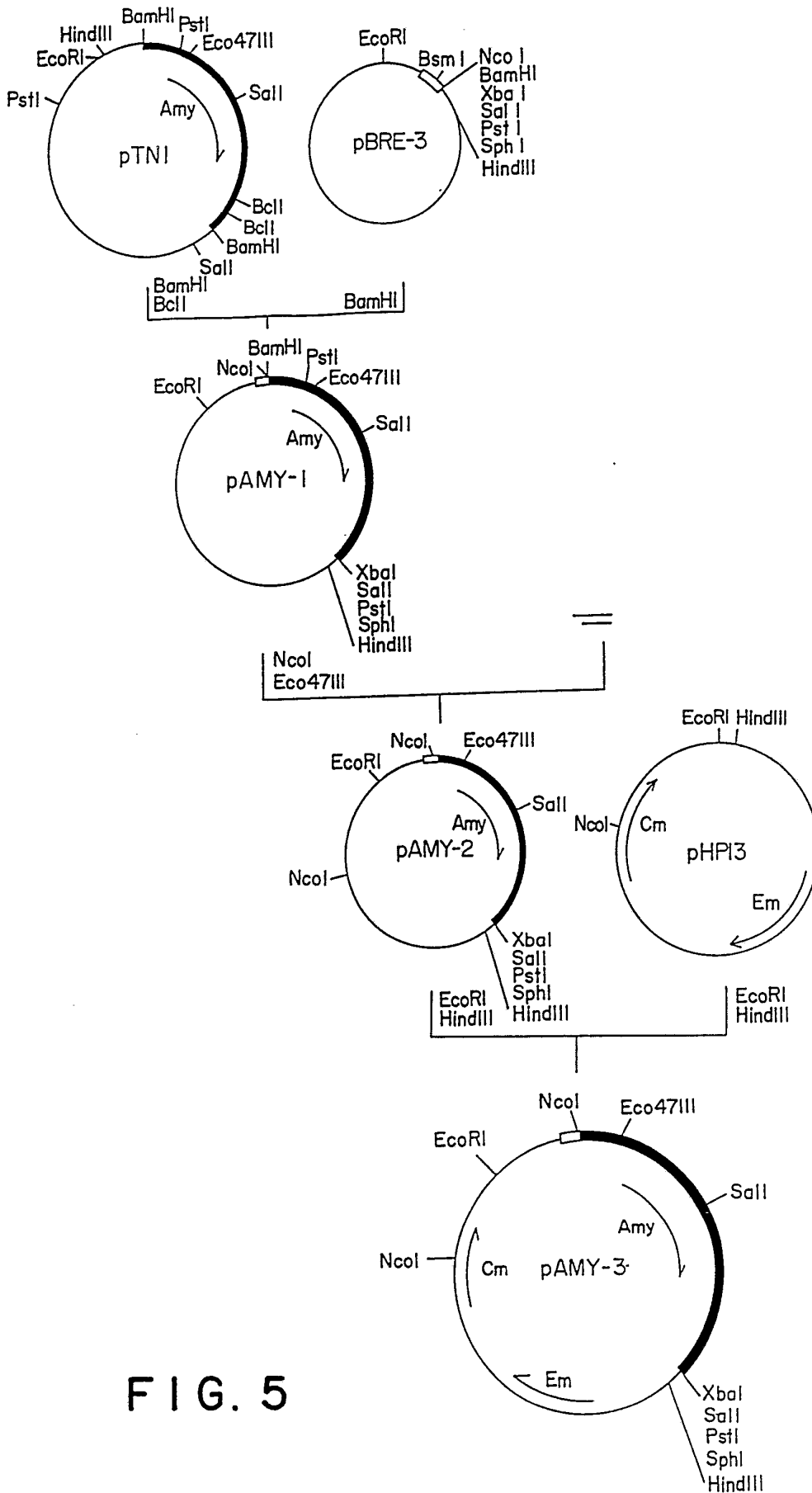


FIG. 5

6/10

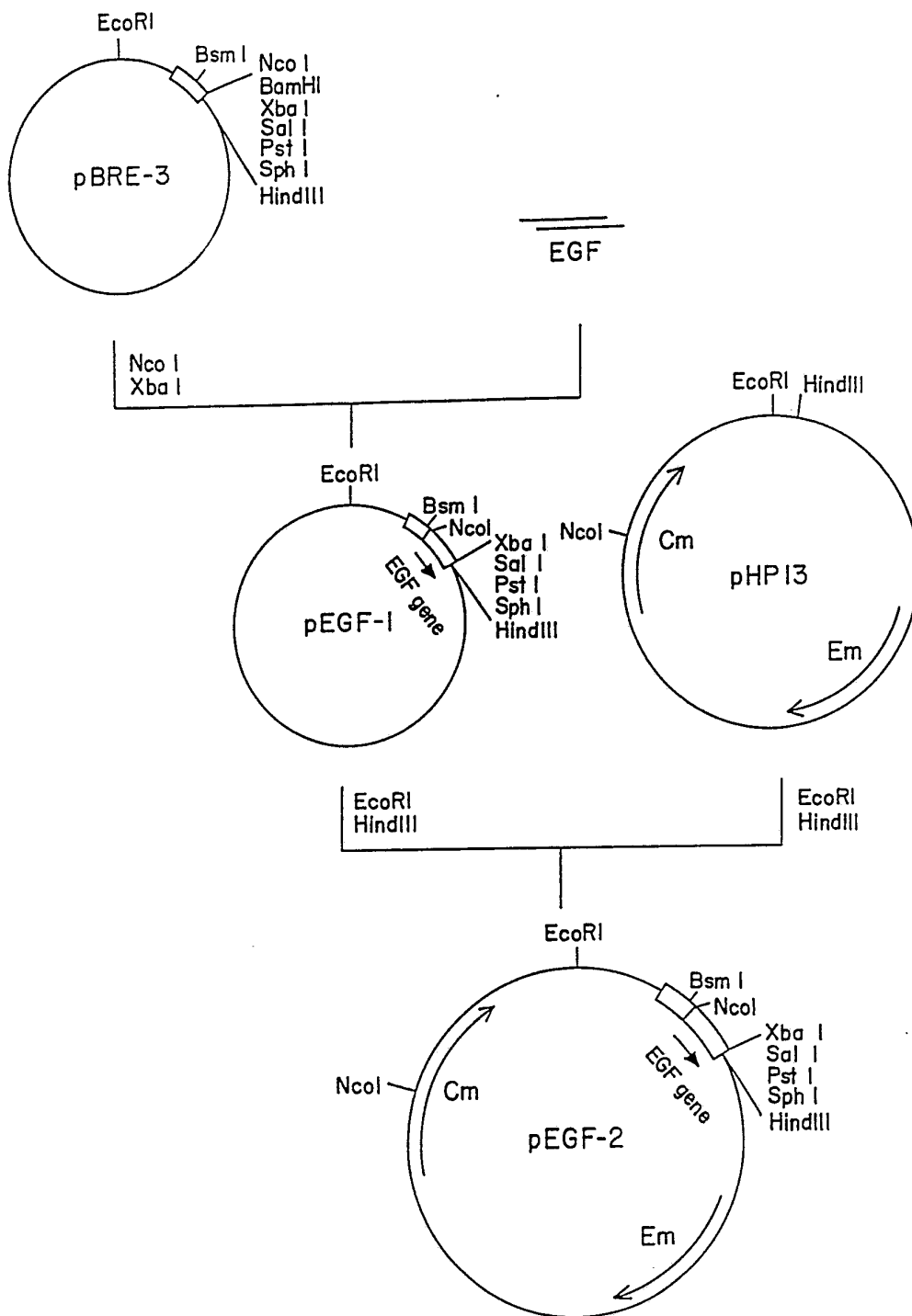


FIG. 6

7/10

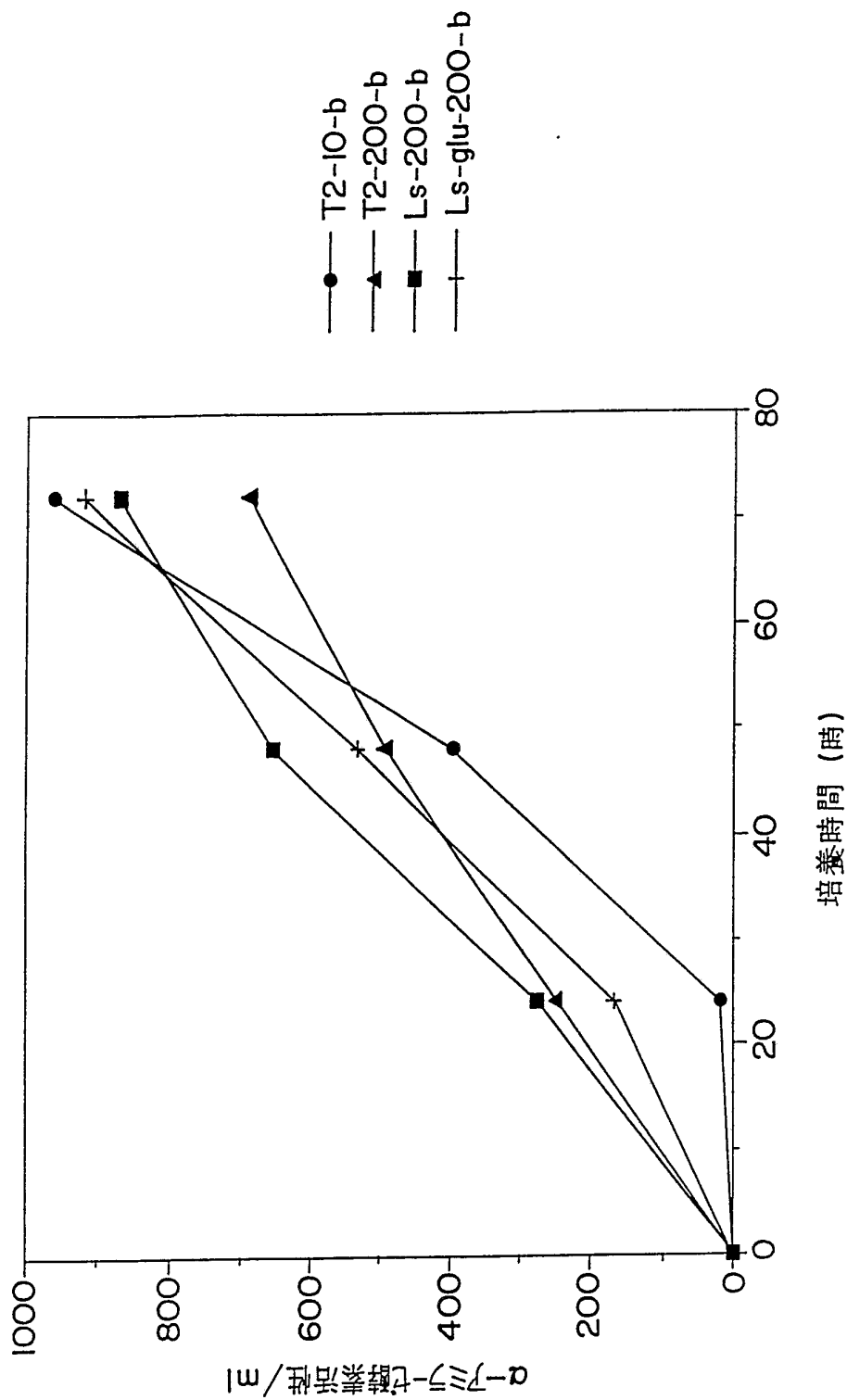


FIG. 7

8/10

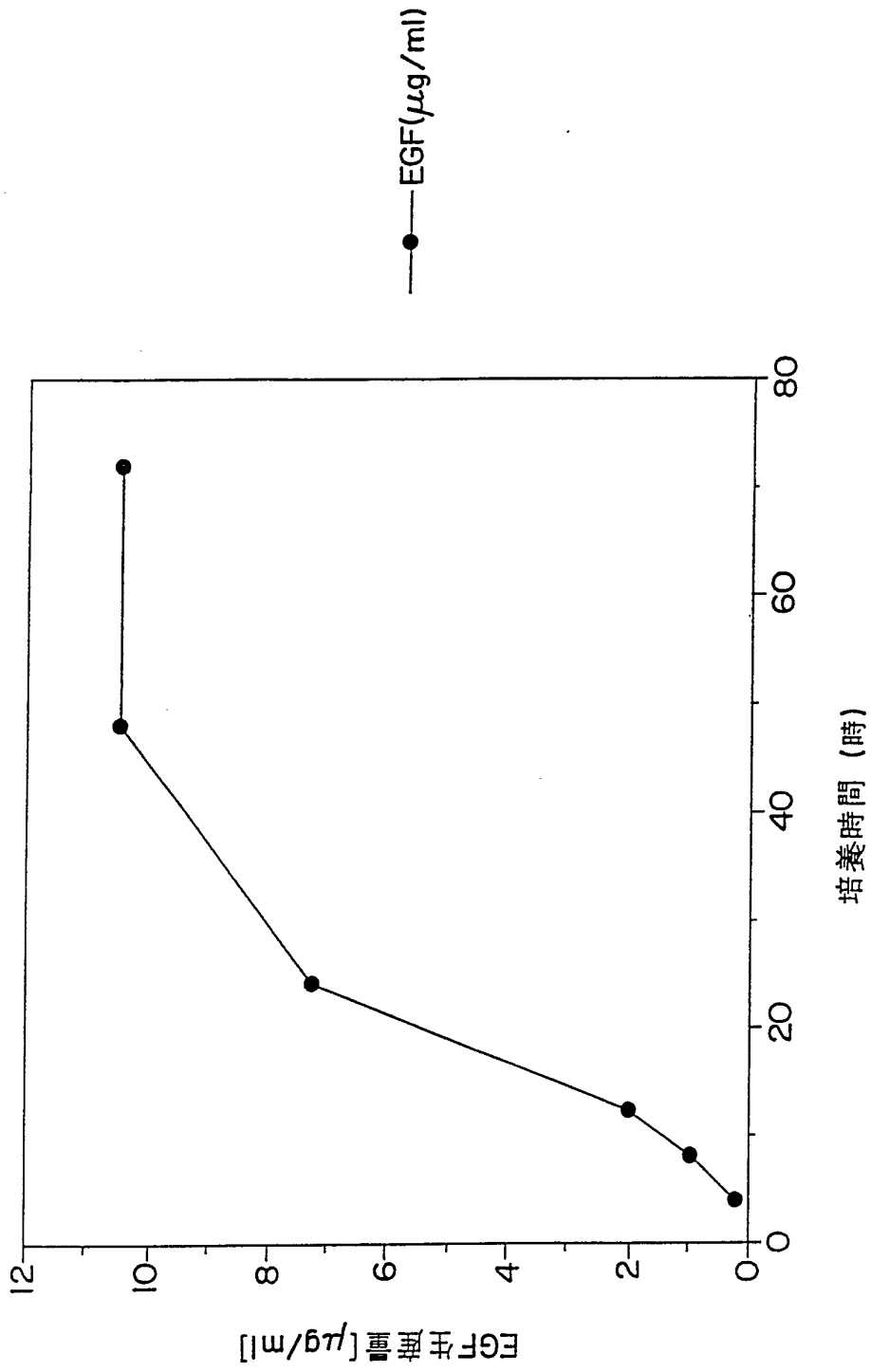


FIG. 8

9/10

	10	20	30	40	50	60
<u>Nco I</u>						
	CCATGGCAACAACATCAACAGGAAATTCGGCACGATTTGTGAACCAGCACCTGTGCGGCT					
	MetAlaThrThrSerThrGlyAsnSerAlaArgPheValAsnGlnHisLeuCysGlySer					
	70	80	90	100	110	120
	CCCACCTAGTGGAAAGCTCTCTACCTGGTGTGCGGGGAGCGAGGCTTCTTCTACACACCCA					
	HisLeuValGluAlaLeuTyrLeuValCysGlyGluArgGlyPhePheTyrThrProLys					
	130	140	150	160	170	180
	AGACCCGCCGGGAGGCAGAGGACCCTCAGGTGGGGCAGGTGGAGCTGGGCGGGGGCCCTG					
	ThrArgArgGluAlaGluAspProGlnValGlyGlnValGluLeuGlyGlyGlyProGly					
	190	200	210	220	230	240
	GCGCAGGCAGCCTGCAGCCCTTGGCGCTGGAGGGGTCCCTGCAGAAGCGCGGCATCGTGG					
	AlaGlySerLeuGlnProLeuAlaLeuGluGlySerLeuGlnLysArgGlyIleValGlu					
	250	260	270	280	290	300
	AGCAGTGCTGCACCAGCATCTGCTCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAATAGT					
	GlnCysCysThrSerIleCysSerLeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCysAsn**					

CGAC

FIG. 9

10/10

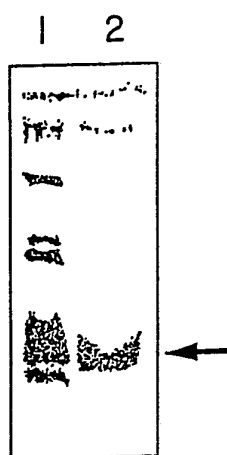


FIG. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/00626

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl ⁵ C12N15/75, C12P21/00// (C12N15/75, C12R:08), (C12P21/00, C12R1:08)		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C12N15/00-15/90, C12P21/00-21/06	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
Biosis Database, Chemical Abstracts Database (CA, REG) EMBL-GDB, GenBank, NBRF-PDB, Swiss-Prot		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	JP, A, 2-31682 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), February 1, 1990 (01. 02. 90), & EP, A, 326046	
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, No. 10, (1986) Yamagata H. et al. "Use of Bacillus-Brevis for Efficient Synthesis and Secretion of Human Epidermal Growth Factor" p.3589-3593	
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search August 5, 1991 (05. 08. 91)		Date of Mailing of this International Search Report August 19, 1991 (19. 08. 91)
International Searching Authority Japanese Patent Office		Signature of Authorized Officer

国際調査報告

国際出願番号PCT/JP91/00626

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C12N15/75, C12P21/00 (C12N15/75, C12R1:08), (C12P21/00, C12R1:08)		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C12N15/00-15/90, C12P21/00-21/06	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
Biosis Database, Chemical Abstracts Database (CA, REG) EMBL-GDB, GenBank, NBRF-PDB, Swiss-Prot		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	JP, A, 2-31682 (武田薬品工業株式会社), 1. 2月, 1990 (01. 02. 90), & EP, A, 326046	
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第86巻, 第10号, (1986) Yamagata H. et al. [Use of Bacillus-Brevis for Efficient Synth- esis and Secretion of Human Epidermal Growth Factor] P. 3589-3593	
※引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリーの文献		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	05. 08. 91	国際調査報告の発送日 19. 09. 91
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 清水初志	4B 8717