

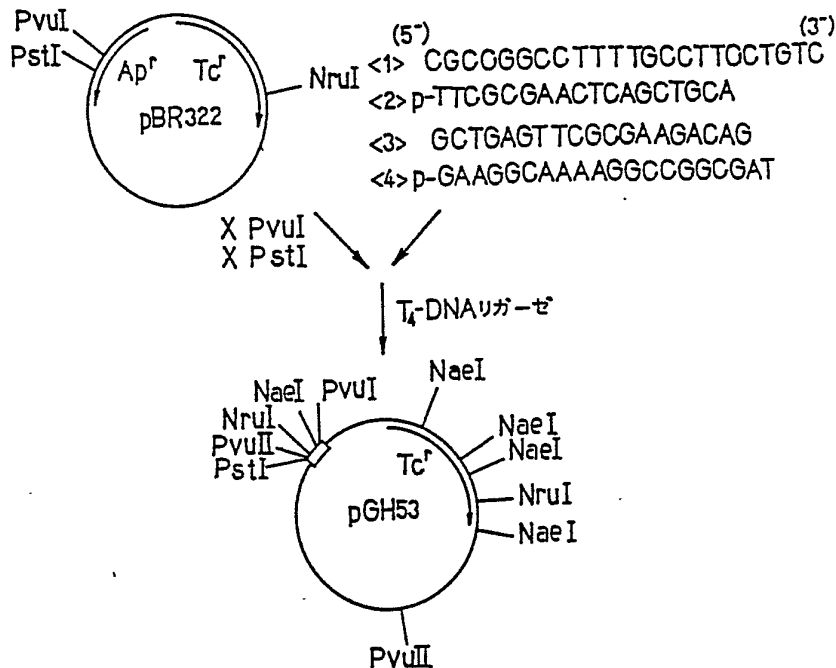


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類⁴ C12N 15/00, 1/20, C12P 21/00 // (C12N 1/20, C12R 1:19) (C12P 21/00, C12R 1:19)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 86/ 03779</p> <p>(43) 国際公開日 1986年7月3日 (03. 07. 86)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP85/00696 (22) 国際出願日 1985年12月19日 (19. 12. 85) (31) 優先権主張番号 特願昭59-271206 (32) 優先日 1984年12月21日 (21. 12. 84) (33) 優先権主張国 JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) アース製薬株式会社 (EARTH CHEMICAL COMPANY, LIMITED) [JP/JP] 〒678-01 兵庫県赤穂市坂越3218-12 Hyogo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/ 出願人 (米国についてのみ) 大貝秀雄 (OHGAI, Hideo) [JP/JP] 〒678-11 兵庫県赤穂市有年横尾652-14 Hyogo, (JP) 百田 裕 (MOMOTA, Hiroshi) [JP/JP] 〒678-01 兵庫県赤穂市坂越3218-12 Hyogo, (JP) 熊倉 武 (KUMAKURA, Takeshi) [JP/JP] 〒678-02 兵庫県赤穂市上飯屋南22-19 Hyogo, (JP) 梶房典行 (KAJIFUSA, Noriyuki) [JP/JP] 〒678-01 兵庫県赤穂市坂越3218-12 Hyogo, (JP) 北沢利記 (KITAZAWA, Toshiki) [JP/JP] 〒678-01 兵庫県赤穂市坂越1331 Hyogo, (JP) 王子田和秀 (OSHIDEN, Kazuhide) [JP/JP] 〒891-04 鹿児島県指宿市東方8075 Kagoshima, (JP)</p>	<p>松代愛三 (MATSUSHIRO, Aizo) [JP/JP] 〒565 大阪府吹田市青山台4丁目15番12号 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541 大阪府大阪市東区平野町2丁目10番地 沢の鶴ビル Osaka, (JP) (81) 指定国 AU, CH (欧州特許), DK, FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), KR, NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title: POLYPEPTIDE SECRETION-CAUSING VECTOR, MICROORGANISMS TRANSFORMED BY SAID VECTOR, AND PROCESS FOR PREPARING POLYPEPTIDE USING SAID MICROORGANISMS

(54) 発明の名称 ポリペプチド分泌発現ベクター、該ベクターで形質転換した微生物及び該微生物によるポリペプチドの製造



(57) Abstract

A vector containing a signal peptide-coding DNA base sequence to be directly bound to an intended polypeptide-coding DNA base sequence, a polypeptide secretion-causing vector prepared by introducing an intended polypeptide-coding DNA into the above vector, microorganisms transformed by said vector, and a process for preparing an intended polypeptide by culturing said microorganisms.

(57) 要約

本発明は、シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列と目的ポリペプチドをコードするDNA塩基配列とを直接連結させて目的ポリペプチドを分泌発現させるための、シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列を含むポリペプチド分泌発現用ベクター、該ベクターに目的ポリペプチドをコードするDNA塩基配列を導入した目的ポリペプチド分泌発現ベクター、該発現ベクターで形質転換させた微生物及び該微生物を培養する目的ポリペプチドの製造法に係わる。

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	FR	フランス	ML	マリ
AU	オーストラリア	GA	ガボン	MR	モーリタニア
BB	バルバドス	GB	イギリス	MW	マラウイ
BE	ベルギー	HU	ハンガリー	NL	オランダ
BR	ブラジル	IT	イタリア	NO	ノルウエー
BG	ブルガリア	JP	日本	RO	ルーマニア
CF	中央アフリカ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SD	スーダン
CG	コンゴ	KR	大韓民国	SE	スウェーデン
CH	スイス	LI	リヒテンシュタイン	SN	セネガル
CM	カメルーン	LK	スリランカ	SU	ソビエト連邦
DE	西ドイツ	LU	ルクセンブルグ	TD	チャード
DK	デンマーク	MC	モナコ	TG	トーゴ
FI	フィンランド	VG	マダガスカル	US	米国

- 1 -

明 細 書

ポリペプチド分泌発現ベクター、該ベクター
で形質転換した微生物及び該微生物によるポ
リペプチドの製造

5 技 術 分 野

本発明はポリペプチド分泌発現用ベクター、該ベクター
で形質転換した微生物及び該微生物によるポリペプチ
ドの製造に関する。

背 景 技 術

- 10 遺伝子工学的手法を用いて、インターフェロン、成長
ホルモン等を始めとする様々なポリペプチドを大腸菌、
枯草菌、酵母等の宿主細胞の利用により製造する方法は
既に確立されている。しかしながら確立された方法とい
えども未だ幾つかの未解決の問題点を有しており、天然
15 品と全く同一のポリペプチドを製造することは必ずしも
容易ではない。上記問題点の中で最も重要なもののひと
つとしては、ポリペプチドのN末端を、天然品と同一の
構造とするのが困難なことを挙げる事ができる。即ち、
之等のポリペプチドをコードする遺伝子を宿主細胞内で
20 直接発現させるとき、遺伝子からポリペプチドへの翻訳
は、通常開始コドン（ATG）から始まるため、発現さ

- 2 -

れるポリペプチドのN末端は、ホルミルメチオニン残基となつてしまう。天然型ポリペプチドのN末端がホルミルメチオニンである場合は少なく、他のN末端を有するポリペプチドの製造にはこの方法は利用できない。上記

5 ホルミルメチオニン残基は、シアノゲンプロマイドを用いた化学反応によりポリペプチドから除去することができるが、ポリペプチドがN末端以外にもメチオニン残基を有する場合、上記方法ではポリペプチド鎖自体が該個所で切断されてしまい、やはり目的のポリペプチドは製

10 造できない。

また目的ポリペプチドをコードする遺伝子を、他のポリペプチドをコードする遺伝子と結合させて、融合ポリペプチドとして発現させる方法も知られている。この方法では、得られる融合ポリペプチドからの目的ポリペ

15 チドの分離は、トリプシン等の酵素による処理やシアノゲンプロマイド等を用いた化学的処理によつている。しかしながらこの方法においても目的のポリペプチド鎖内に使用する酵素又は化学薬品の標的となるアミノ酸が存在すれば、その個所でペプチド鎖が切断され、結局目的

20 ポリペプチドは製造はできない。また、上記方法により融合ポリペプチドからの目的ポリペプチドの分離が可能

- 3 -

な場合といえども、目的ポリペプチドの単離のためには、通常菌体粗抽出液から融合ポリペプチドを分離する工程及び融合ポリペプチドを切断した反応組成物から目的ポリペプチドを分離する工程の2回の精製操作が必要となり、その操作及び工程自体煩雑となり、しかも目的物の収率の低下は避けられない。

以上のように、天然型と全く同一のポリペプチドを遺伝子工学的手法で入手することは、従来非常に困難であり、この天然型と全く同一のポリペプチドを宿主細胞から直接製造できる改良された方法の研究開発が、斯界で

要望されている現状にある。

本発明は、上記斯界で要望されている天然型と全く同一のポリペプチドを宿主細胞から直接製造できる改良された方法を提供することを目的とする。また本発明は、

該方法の実施のための新しいベクター及び該ベクターを保有する微生物を提供することをもその目的としている。

発 明 の 開 示

本発明によれば、シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列と目的ポリペプチドをコードするDNA塩基配列とを直接連結させて目的ポリペプチドを分泌発現させるための、シグナルペプチドをコードするDNA

- 4 -

- 塩基配列を含むことを特徴とするポリペプチド分泌発現用ベクター、シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列と目的ポリペプチドをコードするDNA塩基配列とが直接連結されてなる融合ポリペプチドをコードする
- 5 DNA塩基配列を含む上記ベクター、該ベクターで形質転換された微生物及び該微生物を培養して分泌されるポリペプチドを採取するポリペプチドの製造法が提供される。

- 本明細書において、アミノ酸、核酸塩基、その他に関して略号で表示する場合はIUPAC、IUBの規定或いは当該分野における慣用記号に従うものとし、その例を次に挙げる。
- 10

- | | |
|----------------|---------------|
| Ser; セリン | Leu; ロイシン |
| Arg; アルギニン | Cys; システイン |
| 15 Gln; グルタミン | Ile; イソロイシン |
| Pro; プロリン | Val; バリン |
| His; ヒスチジン | Met; メチオニン |
| Ala; アラニン | Phe; フェニルアラニン |
| Gly; グリシン | Asp; アスパラギン酸 |
| 20 Asn; アスパラギン | |
| A ; アデニン | T ; チミン |

- 5 -

G ; グアニン C ; シトシン

シグナルペプチドとは、細胞内で生産されたポリペプチドを細胞外に分泌する働きをするアミノ酸配列である。一般に微生物に限らず全ての細胞の生産するポリペプチドには、細胞内に留まつてその働きをなすものと、細胞外に分泌されるものがある。この細胞外に分泌されるポリペプチドでは、まず、そのN末端に十数個乃至数十個のアミノ酸配列からなるシグナルペプチドが付加された前駆体として細胞内に生産され、次いで該前駆体はその有するシグナルペプチドの作用により該シグナルペプチドを介して細胞膜を通過すると同時にシグナルペプチダーゼの作用によりシグナルペプチドが切り離され、その結果一切の不要アミノ酸を持たない目的ポリペプチドのみが細胞外に分泌される（以下、このように細胞外に分泌される目的ポリペプチドを「成熟ポリペプチド」という）。例えば、大腸菌のβラクタマーゼは、菌体内でβラクタマーゼ前駆体、即ちβラクタマーゼと23個のアミノ酸からなるシグナルペプチドとの融合蛋白質として生産された後、該シグナルペプチドの作用により細胞膜を通過してペリプラズム、即ち細胞膜と外膜との間の空間に分泌され、その際、シグナルペプチドは、シグナ

- 6 -

ルペプチダーゼにより切断され、ペリプラズム内には成熟ポリペプチド、即ち活性型の β ラクタマーゼが蓄積されることが知られている (J . G . Sutcliffe, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A , 75, 3737 - 3741 (1978)) 。

本発明者らは、上記シグナルペプチドの特性に着目し、該シグナルペプチドを利用して、目的とする外来蛋白質をシグナルペプチドとの融合ポリペプチドとして宿主細胞内で生産させることにより、外来蛋白質を細胞外に成熟ポリペプチドとして分泌させ、かくして目的ポリペプチドを容易に製造入手し得るとの着想から鋭意研究を重ねた。その結果、実際に宿主細胞内に導入することによつて、目的ポリペプチドを成熟ポリペプチドとして細胞外に分泌させ得る新しいベクター (プラスミド) 及び該ベクターのためのポリペプチド分泌発現用ベクターの構築に成功すると共に、このベクターの利用による目的ポリペプチドの製造に成功した。

本発明のポリペプチド分泌発現用ベクターは、目的ポリペプチドをコードするDNA塩基配列を直接連結できるように設計されたシグナルペプチドをコードするDNA塩基配列を保有している。従つて該ベクターには、

- 7 -

そのシグナルペプチドをコードするDNA塩基配列に直接目的ポリペプチドをコードするDNA塩基配列を連結させることができ、かくして得られる発現ベクターは、これを宿主細胞に導入して形質転換させることにより、

5 該宿主細胞の培養によつて細胞外又はペリプラズムに目的ポリペプチドを成熟ポリペプチドとして分泌生産させることができる。

以下、本発明ベクターの製造技術につき詳述する。

本発明ベクターの必須構成要件とするシグナルペプチドをコードするDNA塩基配列としては、従来より知ら

10 れているシグナルペプチドのそれをいずれも利用することができる。該シグナルペプチドの代表的具体例としては、例えば大腸菌のβラクタマーゼのそれを例示することができる。該シグナルペプチドは、下記式(1)に示

15 すアミノ酸配列を有している。

Met-Ser-Ile-Gln-His-Phe-Arg-Val-
Ala-Leu-Ile-Pro-Phe-Phe-Ala-Ala-
Phe-Cys-Leu-Pro-Val-Phe-Ala

(1)

20 また、該シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列は、各アミノ酸に対応する以下のDNA塩基配列から

- 8 -

任意に選択することができる。尚、下記DNAは、メチル化等の常法に従い修飾された塩基をも含むものとする。

Met; A T G

Ser; T C T、T C C、T C A、T C G、A G T、

5 A G C

I le; A T T、A T C、A T A

G ln; C A A、C A G

H is; C A T、C A C

P he; T T T、T T C

10 A r g; A G A、A G G、C G T、C G C、C G A、

C G G

V al; G T T、G T C、G T A、G T G

A la; G C T、G C C、G C A、G C G

L eu; T T A、T T G、C T T、C T C、C T A、

15 C T G

P ro; C C T、C C C、C C A、C C G

C ys; T G T、T G C

上記DNA塩基配列のうちで、特に好ましく選択された組合せとしては、下記式(2)に示すものを例示でき

20 る。

A T G A G T A T T C A A C A T T T C C G T G T C

- 9 -

G C C C T T A T T C C C T T T T T T G C G G C C
T T T T G C C T T C C T G T C T T C G C G

(2)

また本発明ベクターに保有されるシグナルペプチドを
5 コードするDNA塩基配列は、上記の如き具体的DNA
塩基配列を基本として、その3'側付近、即ちこれに目
的ポリペプチドが連結される側付近、好ましくはその
10塩基以内に、又はこれに更に10塩基以内のDNA
配列を付加してこの付加部分に、制限酵素認識配列を含
ませるものとする。これは上記シグナルペプチドをコー
ドするDNA塩基配列と、目的ポリペプチドをコードす
るDNA塩基配列とを直接連結させるために必須のもの
である。しかしてこの制限酵素認識配列を認識する酵素
としては、公知の制限酵素のいずれでもよいが、好まし
15 くは5塩基以上の塩基配列を認識するものがよく、この
酵素に応じて上記3'側付近のDNA塩基配列は、任意
に変化させることができる。

例えば、上記具体的例示のβラクタマーゼのシグナル
ペプチドを例にとり詳述すれば、そのC端のアミノ酸で
20 あるAlaをコードする塩基配列として、GCCを選択し
た場合、更にこれにGGCの塩基配列を連結させれば、

- 10 -

この G C C G G C の 6 塩基配列は、制限酵素 NaeI により認識される。該シグナルペプチドをコードする DNA 塩基配列は、NaeI によりその中央で切断され、かくして 3' 末端が G C C (シグナルペプチドの C 端アミノ酸 Ala に対応する) である DNA が得られ、該 DNA にはその直後に目的ポリペプチドをコードする任意の DNA 塩基配列を直接連結させることができる。

また例えば、上記シグナルペプチド C 端の 2 つのアミノ酸配列を構成する Phe - Ala をコードする塩基配列として、T T C G C G を選択する場合、その 3' 側に更にアデニン塩基 (A) を連結させて得られる 7 塩基配列 (T T C G C G A) のうち、T C G C G A は制限酵素 NruI により認識され、この中央で切断され、これにより得られる DNA 塩基配列は、その 3' 末端が T T C G となる。シグナルペプチドをコードする DNA 塩基配列として、この塩基配列を利用するときには、これと連結すべき目的ポリペプチドをコードする DNA 塩基配列の 5' 側に、更に C T、C C、C A 又は C G の 2 塩基配列を付加することにより、所望の融合ポリペプチドをコードする DNA 塩基配列が得られる。

更に例えば、上記シグナルペプチドをコードする

- 11 -

DNA塩基配列の3'側に、AACTCAGCTGの10塩基配列を連結させれば、この配列中の6塩基配列(CAGCTG)は、PvuIIにより認識され、その中央で切断される。かくして得られるDNA塩基配列は、シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列の3'側に、
5 更にAACTCAGの7塩基配列が結合されたものであり、この7塩基配列のうち、最初の3塩基配列AACはAsnをコードしており、次の3塩基配列TCAはSerをコードしており、最後のグアニン(G)は、Ala、Gly、
10 Val、Asp又はGlnをコードするコドンの第1塩基である。従つてこれを、シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列として用いるときには、例えばβウロガストロン等のようにN末端アミノ酸がAsn-Ser-AspであるポリペプチドをコードするDNA塩基配列からその
15 の5'側の7塩基配列(例えばAACTCAG)を除いたDNA塩基配列を結合させることによつて所望の融合ポリペプチド(βウロガストロンとシグナルペプチドとの融合ポリペプチド)をコードするDNA塩基配列を容易に形成させることができる。

20 従つて、本発明ベクターの構成要素とするシグナルペプチドをコードするDNA塩基配列としては、前記に具

- 1 2 -

体的に例示したDNA塩基配列の他に、例えばこれに更に10個以内のDNA塩基配列を付加させたものをも、好ましいものとして利用することができる。その一具体例は、上記した10塩基配列を付加させた下記式(3)

5 に示すDNA塩基配列を有するものである。

```
A T G A G T A T T C A A C A T T T C C G T G T C
G C C C T T A T T C C C T T T T T T G C G G C C
T T T T G C C T T C C T G T C T T C G C G A A C
T C A G C T G (3)
```

10 本発明における上記シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列又はこれを含む塩基配列は、従来公知の各種の方法、例えばこれを含有する微生物、それから単離されたプラスミド等、好ましくは例えばpBR322等から制限酵素等を利用して切断単離する方法、その

15 DNA塩基配列に従い化学合成する方法、之等の方法の組合せ等により容易に製造することができる。また上記シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列と、目的ポリペプチドをコードするDNA塩基配列との連結乃至結合手段も、従来公知の各種方法、例えばT₄DNAリ

20 ガーゼ等を用いる酵素反応等に従うことができる。

上記のごとくして得られるシグナルペプチドをコード

- 13 -

- するDNA塩基配列を含む本発明ベクターは、該DNA塩基配列を、例えばプラスミド、ウイルスDNA、コスミド（例えばpJB8、Ish-Horowicz, D and Burke, J. F., *Nucleic Acids Res.*, 9, 2989 (1981)）等の従来より外来遺伝子のクローニングに用いられている各種のベクターに組込むことにより得られる。このDNA塩基配列の組込みのために好適な起源ベクターの具体例としては、上記したプラスミドpBR322の他、例えば以下のものを例示できる。
- 10 ○プラスミドpTUB4（バチルス・ズブチリス由来のα-アミラーゼのシグナルペプチド、H. Yamazaki et al., *J. Bacteriol.*, 156, 327-337 (1983)）、
 - 15 ○プラスミドpHC5（エシエリヒア コリー由来のマルトース結合蛋白のシグナルペプチド、H. Bedouelle et al., *Nature*, 285, 78-81 (1980)）、
 - プラスミドpSN518（エシエリヒア コリー由来のリン酸結合蛋白のシグナルペプチド、K. Magota et al., *J. Bacteriol.*, 157, 909-917
 - 20 (1984)）、
 - プラスミドpJP12（エシエリヒア コリー由来の

- 14 -

リン酸制限下に誘導される外膜蛋白のシグナルペプチド、
N. Overbeeke et al., J. Mol. Biol., 163,
513-532 (1983) 等。

上記起源ベクターへのシグナルペプチドをコードする
5 DNA塩基配列の導入操作は、従来よりこの種外来遺伝
子をベクターに組込む際に用いられているこれら操作に
従うことができる。その例は、前述した通りである。

また上記のごとくして得られる本発明のシグナルペプ
チドをコードするDNA塩基配列を含むポリペプチド分
10 泌発現用ベクターは、これを実際に宿主細胞に導入して
目的ポリペプチドを分泌発現させるためには、これに目
的ポリペプチドをコードするDNA塩基配列をさらに導
入しなければならないことは勿論のこと、他にプロモ
ーター、リボゾーム結合部位、翻訳停止シグナル、転写終
15 結因子等の転写調節因子や翻訳調節因子等を含んでい
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、この場合には該起源ベクタ
ー、例えばpBR322由来の β ラクタマーゼの調節因
子等をそのまま用いることができる。これに限定される
20 ことなく、従来公知の他の微生物又はウイルス由来の各
種DNAもまた通常これらの調節因子を含んでおり、従

- 15 -

つてこれらを用いることもできる。その例としては、例えば大腸菌ラクトースオペロン、トリプトファンオペロン、 λ ファージの P L 等のプロモーター、 β ガラクトシダーゼの S D 配列等のリボゾーム結合部位、 λ ファージの t L¹ 等の転写終結因子等を例示できる。また翻訳停止シグナルとしては、T A A、T A G 及び T G A の 3 通りの塩基配列を利用できる。更に上記調節因子は、これらを含む D N A より常法に従い取り出した後、必要なものを適当なベクターに通常の方法に従い導入することも
5
10 できる。

特に好ましい上記調節因子と、シグナルペプチドとを保有する本発明ベクターの一具体例としては、p B R 3 2 2 を起源ベクターとして構築された p G H 5 4 及び p G H 5 5 を例示できる。これらのプラスミドの中で
15 p G H 5 4 は、 β ラクタマーゼのプロモーター及びリボゾーム結合部位に続いて β ラクタマーゼのシグナルペプチドをコードする D N A 塩基配列を有し、この塩基配列の 3' 末端に N r u I 及び P v u II の制限酵素認識配列を有するものである。その特性は、その製造概略操作と共に
20 第 1 図に示した通りである。

第 1 図より、p G H 5 4 は図示された制限酵素開裂地

- 16 -

図により特徴付けられる。また該 p G H 5 4 の大きさは、
1. 0 % アガロースゲル電気泳動による測定の結果、約
3. 9 K b である。このプラスミド p G H 5 4 を保有す
る大腸菌 H B 1 0 1 株は、通商産業省工業技術院微生物
5 工業技術研究所に「H B 1 0 1 (p G H 5 4)」なる
表示で、寄託されており、その寄託番号は微工研条寄第
6 7 9 号 (F E R M B P - 6 7 9) である。

また p G H 5 5 は、 β ラクタマーゼのプロモーター及
びリボゾーム結合部位に続いて β ラクタマーゼのシグナ
10 ルペプチドをコードする D N A 塩基配列を有している点
において p G H 5 4 と共通するが、該 p G H 5 4 におけ
る第 2 の P v u II 制限サイトを含まぬ約 0. 6 4 k b の D N A
を欠くものであり、第 1 の P v u II 制限サイトをシグナル
ペプチドをコードする D N A 塩基配列の 3' 末端付近に
15 有している。その特性は、その製造概略操作と共に第 2
図に示した通りである。

第 2 図より、p G H 5 5 は図示された制限酵素開裂地
図により特徴付けられ、その大きさは、上記方法に従い
測定した結果、約 3. 3 k b である。このプラスミド
20 p G H 5 5 を保有する大腸菌 H B 1 0 1 株は、通商産業
省工業技術院微生物工業技術研究所に「H B 1 0 1

- 17 -

(p G H 5 5) 」なる表示で寄託されており、その寄託番号は徹工研条寄第680号 (F E R M B P - 6 8 0) である。

上記各種の調節因子を含み、且つシグナルペプチドを
5 コードするDNA塩基配列とこれに直接結合された目的
ポリペプチドをコードするDNA塩基配列とを有する本
発明のポリペプチド分泌発現ベクターは、上記した本発
明ベクターと同様にして構築され、本発明はかかる成熟
ポリペプチド分泌発現ベクターをも提供するものである。

10 本発明のこの成熟ポリペプチド分泌発現ベクターに、
シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列と連結さ
れて融合ポリペプチドをコードするDNA塩基配列とし
て保有されるポリペプチド及びそのDNA塩基配列とし
ては、任意のポリペプチド及びそれをコードするDNA
15 塩基配列がいずれも利用できる。上記ポリペプチドの例
としては、例えば表皮細胞増殖促進因子、ソマトスタチ
ン、インシュリン、G I P、R - M S A、サイモシン
 β_4 、成長ホルモン、成長ホルモン放出因子等のホルモ
ン及び成長因子類、インターフェロン、インターロイキン
20 ン2、腫瘍壊死因子等のリンフォカイン免疫調節物質類、
血清アルブミン、プラスミノーゲンアクティベーター、

- 18 -

アポリポプロテイン等の血液構成物質、B型肝炎ウイルス表面抗原等のワクチン用抗原蛋白質等を例示できる。之等の各種ポリペプチドをコードするDNA塩基配列は、それらの起源とする細胞等から通常の方法に従い抽出単離してもよく、之等ポリペプチドのアミノ酸配列に従い化学合成することもできる。

上記ポリペプチド及び／又はそのDNA配列の具体例を次に示す。

○ソマトスタチン

Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe
5' AATTCATGGCTGGTTGTAAGAACTTCTTT
GTACCGACCAACATTCTTGAAGAAA

Trp Lys Thr Phe The Ser Cys
TGGAAGACTTTCACTTCGTGTTGATAG
ACCTTCTGAAAGTGAAGCACAACCTATCCTAG 5'

○プロインシュリン

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu
TTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTG

Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg
GTGGAAGCTCTCTACCTAGTGTGCGGGGAACGA

Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu
GGCTTCTTCTACATACCCAAGACCCGCCGGGAG

- 19 -

Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu
GCAGAGGACCTGCAGGTGGGGCAGGTGGAGCTG

Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro
GGCGGCGGCCCTGGTGCAGGCAGCCTGCAGCCC

Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly
TTGGCCCTGGAGGGCTCCCTGCAGAAGCGTGGC

Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser
ATTGTGGAACAATGCTGTACCAGCATCTGCTCC

Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
CTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAAC

(Nature , Vol. 282, 29, November 1979)

○B型肝炎ウイルス表面抗原

ATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGGAGCTA
CTGTGGAGTTACTCTCTCGTTTTTGCCTTCTGAC
TTCTTTCCTTCCGTACGAGATCTTCTAGATACCG
CCGCAGCTCTGTATCGGGATGCCTTAGAGTCTCC
TGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACTCAGG
CAAGCAATTCTTTGCTGGGGAGACTTAATGACTC
TAGCTACCTGGGTGGGTACTAATTTAGAAGATCC

- 20 -

AGCATCTAGGGACCTAGTAGTCAGTTATGTCAAC
ACTAATGTGGGCCTAAAGTTCAGACAATTATTGT
GGTTTCACATTTCTTGTCTCACTTTTGGGAAGAGA
AACGGTTCTAGAGTATTTGGTGTCTTTTGGAGTG
TGGATTGCGCACTCCTCCAGCTTATAGACCACCAA
ATGCCCCTATCCTATCAACGCTTCCGGAGACTAC
TGTTGTTAGACGACGAGGCAGGTCCCCTAGAAGA
AGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGATCTCAAT
CGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGAATC
TCAATGTTAG

○B型肝炎ウイルス表面抗原

ATGGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCC
TGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTCTTGTTGAC
AAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCG
TGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAACTA
CCGTGTGTCTTGGCCAAAATTGCGCAGTCCCCAAT
CTCCAATCACTCACCAACCTCCTGTCCTCCAAC

- 2 1 -

TGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTT
TTATCATCTTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCT
CATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGT
ATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCAT
CAACCACCAGCACGGGATCCTGCAGAACCTGCAC
GACTCCTGCTCAAGGAATCTCTATGTATCCCTCC
TGTTGCTGTACAAAACCTTCGGATGGAAACTGCA
CCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGG
AAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTC
TCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTCAGT
GGTTCGTAGGGCTTTCCTCCCATTTGTTTGGCTTTC
AGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGT
CTGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTTTACCGCTGT
TACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGCATACATTTA
A

○表皮細胞増殖因子 (Epidermal Growth Factor)

H-Asn-Ser-Tyr-Pro-Gly-Cys-Pro-Ser-Ser-Tyr-
Asp-Gly-Tyr-Cys-Leu-Asn-Gly-Gly-Val-Cys-Met-

- 2 2 -

His-Ile-Glu-Ser-Leu-Asp-Ser-Tyr-Thr-Cys-Asn-
Cys-Val-Ile-Gly-Tyr-Ser-Gly-Asp-Arg-Cys-Gln-
Thr-Arg-Asp-Leu-Arg-Trp-Trp-Glu-Leu-Arg-OH

(C. R. Savage, Jr., T. Inagami, S. Cohen, J. Biol. Chem., 247, 7612 (1972); C. R. Savage, Jr., J. H. Hash, S. Cohen, J. Biol. Chem., 248, 7669 (1973))

○GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide)

H-Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-
Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-Arg-Gln-Gln-Asp-
Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Gln-Lys-Gly-
Lys-Lys-Ser-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln-
OH

(J. C. Brown, Can. J. Biochem., 49, 255 (1971); J. C. Brown et al, 同上., 49, 867 (1971); H. Yajima et al, J. Am. Chem. Soc., 97, 5593 (1975))

○成長ホルモン放出因子 (Growth Hormone-Releasing Factor)

H-Val-His-Leu-Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala-OH

(A. V. Shally et al J. Biol. Chem., 246, 6647 (1971); D. F. Veber et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 235 (1971))

- 23 -

○ソマトスタチン (Somatostatin)

H-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe
-Thr-Ser-Cys-OH

(A. V. Schally et al, Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp.
Biol., 34, 584 (1975); A. V. Schally et al,
Biochemistry, 15, 509 (1976))

○R-MSA (A Polypeptide with Multiplication-Stimulating Activity)

H-Ala-Tyr-Arg-Pro-Ser-Glu-Thr-Leu-Cys-Gly-
Gly-Glu-Leu-Val-Asp-Thr-Leu-Gln-Phe-Val-Cys-
Ser-Asp-Arg-Gly-Phe-Tyr-Phe-Ser-Arg-Pro-Ser-
Gly-Arg-Ala-Asn-Arg-Arg-Ser-Arg-Gly-Ile-Val-
Glu-Glu-Cys-Cys-Phe-Arg-Ser-Cys-Asp-Leu-Ala-
Leu-Leu-Glu-Thr-Tyr-Cys-Ala-Thr-Pro-Ala-Lys-
Ser-Glu-OH

(H. Marquart, G. J. Todaro, J. Biol. Chem., 256,
6859 (1981))

○ソマトスタチン-28 (Somatostatin-28)

H-Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-

- 24 -

Arg-Glu-Arg-Lys-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-
Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH

(F. Esch et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,
77, 6827 (1980); N. Ling et al, Biochem. Biophys.
Res. Commun., 95, 945 (1980))

○サイモシン β_4 (Thymosin β_4)

Ac-Ser-Asp-Lys-Pro-Asp-Met-Ala-Glu-Ile-Glu-
Lys-Phe-Asp-Lys-Ser-Lys-Leu-Lys-Lys-Thr-Glu-
Thr-Gln-Glu-Lys-Asn-Pro-Leu-Pro-Ser-Lys-Glu-
Thr-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser-
OH

(T. L. K. Low et al, Proc. Natl. Acad. Sci.
U. S. A., 78, 1162 (1981))

上記ポリペプチドのDNA塩基配列と、シグナルペプチドのDNA塩基配列との連結は、例えばシグナルペプチドのDNA塩基配列を保有する本発明のポリペプチド分泌発現用ベクターに、上記ポリペプチドのDNA塩基配列を、前述した方法に従い、例えば制限酵素を用いる酵素反応及びT₄ DNAリガーゼを用いる酵素反応を利

- 25 -

用して導入することにより実施できる。また、予め上記ポリペプチドとシグナルペプチドとの融合ポリペプチドのDNA塩基配列を化学合成した後、このDNA塩基配列を、前記シグナルペプチドのDNA塩基配列の導入と同様に、ベクターに導入することによつても行なうことができる。

かくして融合ポリペプチドをコードするDNA塩基配列を保有する本発明のポリペプチド分泌発現ベクターを得ることができる。これは、上記融合ポリペプチドをコードするDNA塩基配列の前にプロモーター及びリボソーム結合部位を有し、且つ上記塩基配列を構成する目的ポリペプチドのDNA塩基配列の直後に翻訳停止シグナルを有しており、適当な宿主細胞に導入することにより、該細胞を形質転換してポリペプチド分泌発現型とすることができる。

上記ポリペプチド分泌発現ベクターの好ましい一具体例としてはpUG201を例示できる。該pUG201は、 β ラクタマーゼのプロモーター、リボソーム結合部位、 β ラクタマーゼのシグナルペプチドのDNA塩基配列、 β ウロガストロン（目的ポリペプチド）のDNA塩基配列及びその翻訳停止シグナルが正確にこの順序で配

- 26 -

列されたDNA塩基配列を有している。その配列は、後記実施例において第4表として示した通りである。該ベクター（プラスミド）pUG201を保有する大腸菌HB101株は、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に「HB101（pUG201）」なる表示で寄託されており、その寄託番号は微工研条寄第681号（FERM BP-681）である。

本発明のポリペプチド分泌発現ベクターの宿主細胞への導入は、公知の各種方法に従って行なうことができ、用いられる宿主細胞としても特に限定はなく、公知の各種のものでよい。この宿主細胞として利用されるものとしては、例えば大腸菌等のグラム陰性細菌、枯草菌等のグラム陽性細菌、放線菌、酵母等を例示できる。これらの内で特にHB101株を初めとする大腸菌K12株由来の菌株は好ましい。之等の宿主細胞はいずれも菌体外分泌成分、外膜構成成分等の、細胞の正常な機能維持に必要なポリペプチドの分泌のための機構としてシグナルペプチダーゼを有しており、また各種微生物由来のシグナルペプチダーゼの基質特異性には殆んど差のないことが知られている（D. Perlman and H. O. Halvorsen, *J. Mol. Biol.*, 167, 391（1983））。

- 27 -

上記宿主細胞への導入方法の具体例としては、例えば宿主細胞を低温で塩化カルシウムを含む水溶液中で処理し、該溶液中にベクターを添加する方法（E.

Lederberg, S. Cohen, J. Bacteriol., 119,

5 1072 (1974)) を例示できる。

上記のようにして本発明ベクターを導入して形質転換した細胞を培養するときには、細胞内で融合ポリペプチドが生産され、続いて細胞外又はペリプラズムに成熟ポリペプチドが分泌蓄積される。即ち、まず、ベクター中の融合ポリペプチドをコードする遺伝子から、ベクター中の転写調節因子並びに宿主細胞中の諸因子の作用で mRNA が生産される。次いで、mRNA から翻訳調節因子並びに宿主細胞中の諸々因子の作用で融合ポリペプチドが生産される。更にここで生産される融合ポリペプチドは、シグナルペプチドの作用により、細胞外又はペリプラズムに分泌され、同時にシグナルペプチダーゼの作用により、融合ポリペプチドからシグナルペプチドが切り離されるのである。その結果、シグナルペプチドも、また他の如何なる不要なアミノ酸配列をも含まない成熟ポリペプチドが細胞外又はペリプラズムに分泌、蓄積される。

- 28 -

かくして分泌、蓄積された成熟ポリペプチドは、これを常法に従い分離することができ、また更に精製することができる。この分離、精製操作としては例えば培養上澄又は浸透圧シヨツク法により調整したペリプラズム画
5 分から、ゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等を適宜組合せた方法を採用することができる。特に本発明に従い得られる目的ポリペプチドは、分泌されたものであるため、その分離、精製が比較的容易である利点がある。
10

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に詳しく説明するため実施例を挙げる。尚、各例において用いられている各方法及び操作は、特に明記しない限り、以下の通り行なわれたものである。

15 1. 制限酵素によるDNAの切断操作

DNAの水溶液（又は緩衝液溶液）或いは粉末に、下記第1表に示した各緩衝液の濃縮液及び水を混和し、次いで制限酵素を加え、37℃の水浴中で3時間静置して反応させる。制限酵素の標準的使用量は、DNA 1 μ g
20 に対して1ユニットであり、最終液量は10 μ lとなるようにする。

- 29 -

第 1 表

組 成 (m M)	低 塩 濃 度 緩 衝 液	中 塩 濃 度 緩 衝 液	高 塩 濃 度 緩 衝 液
塩化ナトリウム	0	50	100
トリス塩酸 (p H 7 . 5)	10	10	50
塩化マグネシウム	10	10	10
ジチオスレイトール	1	1	1

2. フェノール抽出法

酵素反応の終了後、酵素を失活させ反応を停止させるためにこの抽出法を行なった。即ち、反応液に、その液量の半量となるTE飽和フェノール(1mM EDTAを含む10mMトリス塩酸(pH8.0)緩衝液をフェノールに飽和させたもの)を加えて充分混和した後、同じく半量のクロロホルムを加えて更に混和し、次いで遠心分離してDNAの含まれる緩衝液層を取る。更に0.1倍量の3M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)と2倍量の冷エタノールとを加えて混和して、-20℃で1時間以上放置してDNAを沈澱として回収することによりフェノールを完全に除去する。

- 30 -

3. DNAポリメラーゼI (クレノー断片) による

DNAのプラントエンド化方法

40 mM リン酸カリウム (pH 7.4)、6 mM 塩化
マグネシウム、1 mM β -メルカプトエタノール、

- 5 1 mM ATP 及び各 1 mM の dATP、dCTP、
dGTP 及び dTTP を含む水溶液中に、DNA を溶か
し、DNA 1 μ g に対して 1 ユニットとなる量の DNA
ポリメラーゼ I (クレノー断片、宝酒造(株)製) を加え、
12°C で 30 分間反応させる。

- 10 4. T₄ DNA リガーゼによる DNA 断片の結合 (環状
化) 操作

66 mM トリス塩酸 (pH 7.5)、6.6 mM 塩化
マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール 及び 1 mM
ATP に 0.01% の牛血清アルブミンを添加した水溶

- 15 液中で、DNA 断片と、その 1 μ g 当り 3 ユニットとな
る量の T₄ DNA リガーゼ (宝酒造(株)製) とを、12°C
で 5 時間以上反応させることにより DNA を結合 (環状
化) させる。

5. 形質転換方法

- 20 宿主細胞としては、大腸菌 K12 株由来の HB101
株を用いる。

- 3 1 -

HB 101 株を、LB 培地（1% バクトトリプトン、
0.5% バクトイーストエキス、0.5% 塩化ナトリウム）で、37℃ 下、610 nm の吸光度が 0.25 になる
まで増殖させ、培養液 40 ml を遠心分離（6000 回転
5 /分 × 10 分）して菌体を回収し、次いで氷冷する。こ
れを 0.1 M 塩化マグネシウム 20 ml で洗浄し、続いて
氷冷した 0.1 M 塩化カルシウム及び 0.05 M 塩化マ
グネシウム溶液 20 ml に懸濁させ、1 時間氷冷する。遠
心分離（6000 回転 /分 × 10 分）後、菌体を氷冷し
10 た 0.1 M 塩化カルシウム及び 0.05 M 塩化マグネシ
ウム溶液 2 ml に再懸濁させる。この懸濁液 0.2 ml に、
T₄ DNA リガーゼを用いて結合させた DNA 断片の反
応組成液 0.01 ml を加え、1 時間氷冷する。次いで
42.5℃ の水浴で 90 秒間加温し、LB 培地 2.8 ml
15 を加え、これを 37℃ の水浴中で 1 時間静置する。

次に、得られる形質転換株を以下の抗生物質耐性で選
択する。即ち、1.5% 寒天を含む LB 培地にアンピシ
リン 50 μg / ml 又はテトラサイクリン 20 μg / ml を
添加して調整した平板培地に、上記で得た反応組成液の
20 溶液各 0.3 ml ずつを拡げ、これを 37℃ で一晚培養し、
生育する大腸菌コロニーを分離する。

- 3 2 -

6. プラスミドの単離

- プラスミドを保有する菌株を、アンピシリン50 μ g / ml又はテトラサイクリン20 μ g / mlを添加したLB培地500 mlで、610 nmでの吸光度が約0.6になるまで37 $^{\circ}$ Cで振盪培養する。次いでクロラムフェニコール80 mgを加え、37 $^{\circ}$ Cで12~16時間振盪培養する。これを遠心分離(6000回転/分 \times 10分)して菌体を集め、0.85%塩化ナトリウム水溶液で洗浄する。菌体を20%蔗糖及び50 mMトリス塩酸(pH 8.0)溶液2.5 mlに懸濁させ、次に1%リゾチームを含む0.25 Mトリス塩酸(pH 8.0)溶液0.5 mlを加え、10分間氷冷する。更に0.25 M EDTA (pH 8.0) 1 mlを加え、10分間氷冷する。次に6 mMトリス塩酸(pH 8.0)、60 mM EDTA及び0.1%トリトンX-100の溶液4 mlを加える。これを超遠心(25000回転/分 \times 90分)して上清を採取する。この上清8.2 mlに塩化セシウム9.0 gを加えて溶かし、次いで1%エチジウムブロマイド溶液0.8 mlを加える。これを遠心分離(2000回転/分 \times 10分)して浮遊物を除き、溶液を超遠心(50000回転/分 \times 15時間)する。次いで紫外線

- 33 -

照射により蛍光を発するプラスミド部分を分離する。これを5 M塩化ナトリウム溶液で飽和したイソプロパノールで5～6回抽出してこれからエチジウムブロマイドを除去する。最後に10 mM トリス塩酸 (pH 8.0) 及び1 mM EDTA に対して透析して塩化セシウムを除去する。

7. オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドの合成は、下記に示す固相合成法 (固相リン酸トリエステル法) により行なつた (H. Ito et al, Nucleic Acids Research, 10, 1,755-1769 (1982))。

即ち、まず1%架橋ポリスチレン樹脂 S-X1 (200～400メツシュ、バイオドラボラトリーズ社製) をアミノメチル化したものと、5'-O-ジメトキシトリチルヌクレオシドのモノコハク酸エステルとを反応させて、ヌクレオシド担持樹脂を得る。次に、バーチエム社製DNA合成機を用いて以下の操作を行なう。

上記樹脂40mgを反応管に入れ、1M臭化亜鉛のジクロロメタン-イソプロパノール(85:15)溶液を用いて5'位のジメトキシトリチル基を脱離させる。次に完全に保護されたジヌクレオチド (C. Broka et al,

- 3 4 -

- Nucleic Acids Research, 8, 5461-5471
(1980)の方法により調製した)のトリエチルアン
モニウム塩50mgを加え、縮合剤(メシチレンスルホニ
ル-5-ニトロトリアゾール)を用いて縮合させる。以
5 上の操作を繰返して、順次鎖長をのばして、保護された
オリゴヌクレオチドを担持した樹脂を得る。尚、最後の
縮合工程では、必要に応じてジヌクレオチドの代りに、
前記文献に記載の方法により調製されるモノヌクレオチ
ドのトリエチルアンモニウム塩25mgを使用する。
- 10 次に0.5Mピリジンカルドキシメートのピリジン-
水(1:1)溶液を用いて、保護されたオリゴヌクレオ
チドを樹脂から脱離させる。これをセファデックスG-
50カラム(ファルマシア社製、2×100cm)で、更
に高速液体クロマトグラフィー(ポンプ;ウオーターズ
15 社製6000A型、検出器;440型ディテクター、カ
ラム;マイクロボンダーパックC18、溶出溶媒;(5
→40%)アセトニトリル-0.1M酢酸トリエチルア
ンモニウム水溶液)で精製する。次に80%酢酸により
脱保護反応を行ない、再度高速液体クロマトグラフィー
20 により単一ピークになるまで精製する。この高速液体ク
ロマトグラフィーの条件は、溶出溶媒として(5→25

- 35 -

%) アセトニトリル - 0.1 M 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液を用いる以外は、上記と同一とする。

8. DNA塩基配列の分析

DNA塩基配列の分析は、メシング (Messing) の方法 (M13法、Methods Enzymol., 101, 20 (1983)) に従い、以下のように行なった。即ち、まずDNA断片を制限酵素により切り出し、1%アガロースゲル電気泳動により分離する。このDNA断片をM13mp8RF (アマーシヤム社製) をベクターとしてクローニングする。得られる組換えファージDNAをマンデル (Mandel) とヒガ (Higa) の方法 (J. Mol. Biol., 53, 154 (1970)) により、大腸菌JM107株へ形質導入する。この菌体懸濁液0.2mlに、25mg/mlのイソプロピル-β-D-チオガラクトシド25μl及び20mg/mlの5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド40μlを加えた。次いでこの菌体懸濁液を加熱溶解させた後、50℃で保温したH-トツプアガー液 (1%バクトトリプトン、0.8%塩化ナトリウム及び0.5%寒天) 3mlを加え、1.5%寒天を加えて固化させた2×TY培地 (1.6%バクトトリプトン、1%酵母エキス及び

- 36 -

0.5%塩化ナトリウム)の平板に重層し、37℃で一晩培養する。DNA断片の挿入された組換えファージは無色のプラークを生じるのに対し、親株のM13mp8は青色のプラークを生じるので、目的の組換えファージは容易に選別できる。

次に単一の無色プラークをパスツールピペットにて取り出し、これとJM103株の培養液0.01mlとを、2×TY培地1mlに加え、約5時間、37℃で振盪培養して組換えファージを増殖させ、培養後、遠心にて菌体を除き、上清に20%ポリエチレングリコール6000の0.2mlを混合し、室温で15分以上静置した後、遠心にて沈澱するファージを集め、フェノール抽出によって、ファージから一本鎖DNAを抽出し、これを鋳型一本鎖DNAとして用いる。

15 鋳型一本鎖DNAプライマー(宝酒造(株)製、M13の15塩基プライマー)とのそれぞれ0.5pmolずつを混合し、60℃で20分間熱処理後、徐冷する。次にこの混合液に $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP(アマシヤム社製、400Ci/mmol)2 μl とDNAポリメラーゼI
20 (クレノー、宝酒造(株)製)2ユニットとを加え、十分に混合した後、その3.2 μl ずつを、下記第2表に示し

- 37 -

た4種のdNTP-ddNTP混合液のそれぞれ2 μ lを含む反応管に加える。室温で20分間反応させた後、チエース反応液(dATP、dCTP、dGTP及びdTTPの各1mM)の1 μ lをそれぞれに加え、更に

5 20分間反応させる。ホルムアミド停止液(95%v/vホルムアミド、0.1%キシレンシアノール及び0.1%ブロムフェノールブルー)を6 μ lずつ加え、95 $^{\circ}$ Cで3分間加熱した後、急冷する。次にサンプル2

10 り電気泳動(1800V、30mA、2~3時間)させる。泳動後、ゲルを濾紙(ワットマン3MM)に移し、ゲル乾燥器にて乾燥し、オートラジオグラムをとり、DNA塩基配列を解読する。

- 38 -

第 2 表

d NTP-ddNTP混合液組成 (μℓ)

	A	C	G	T
0.5mM dGTP	20	15	1	20
0.5mM dATP	1	15	20	20
0.5mM dTTP	20	15	20	1
100mM トリス塩酸 (pH 7.5) + 1mM EDTA	20	15	20	20
H ₂ O	45	45	50	30
	(ddA)	(ddC)	(ddG)	(ddT)
1.0mM ddNTP	15	15	10	30
T o t a l	121	120	121	121

但し第2表中、ddAはジデオキシアデノシンを、ddCはジデオキシシチジンを、ddGはジデオキシグアノシンを、またddTはジデオキシチミジンをそれぞれ示す。

9. アガロースゲル電気泳動

シュライフ (Schleif) とウエンシンク (Wensink) の手引書 ("Practical Methods in Molecular Biology" (1981), Springer-Verlag 社、pp

- 39 -

114-125)に記載の方法に従つて、アガロースゲル電気泳動及び泳動後のゲルからのDNA断片の分離を行なう。泳動用電源としては、アトー社製コンスターパワーS J 1065型を、泳動槽としては12×15cmの
5 プラスチック製水槽(白金電極付)を、アガロースとしてはアガロースI(同仁化学研究所製)を、また泳動用緩衝液としては40mMトリス塩酸(5mM酢酸ナトリウム及び1mM EDTA含有、pH7.9)をそれぞれ用いる。

10 10. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

上記手引書の第78-87頁及び第114-125頁に記載の方法に従い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動及び泳動後のゲルからのDNA断片の分離を行なう。泳動用電源としては、アトー社製コンスターパワーS J
15 1065型を、泳動槽としてはアトー社製S J 1060SD型を用いる。アクリルアミド溶液として、アクリルアミドとN, N'-メチレンビスアクリルアミド(29対1)との水溶液を、重合促進剤としてN, N, N', N'-テトラメチレンエチレンジアミンを、重合触媒として過硫酸アンモニウムをそれぞれ用いる。また泳動用
20 緩衝液として90mMトリス塩酸(90mM硼酸、

- 40 -

2. 5 mM EDTA含有、pH 8.3)を用いる。

実施例 1

成熟ポリペプチド分泌発現用ベクター-pGH54及び
pGH55の構築

5 (A) 中間体プラスミドpGH53の構築

① 大腸菌のβ-ラクタマーゼのシグナルペプチドの一部をコードするDNA塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの合成のために、以下の塩基配列を有する4種のオリゴヌクレオチドのそれぞれを、前記した固相リン酸ト

10 リエステル法により合成した。

<1> 5' - C G C C G G C C T T T T G C C T T C C
T G T C - 3'

<2> T T C G C G A A C T C A G C T G C A

<3> G C T G A G T T C G C G A A G A C A G

15 <4> G A A G G C A A A A G G C C G G C G A

T

上記オリゴヌクレオチド<2>及び<4>の5'端をそれぞれT₄ポリヌクレオチジルキナーゼ(BRL社製)を用いてリン酸化した。即ち、各々10μgのオリゴヌ
20 クレオチドを50mMトリス塩酸水溶液(10mM塩化マグネシウム、5mMジチオスレイトール、1mM

- 4 1 -

A T P を含む、p H 9 . 5) 5 0 μ ℓ に溶かし、これに T₄ ポリヌクレオチジルキナーゼ 5 ユニットを加え、3 7 ° C で 3 0 分間反応させ、フェノール抽出により反応を停止させた。

- 5 ② クローニングベクターとして、プラスミド p B R 3 2 2 (B o l i v a r e t a l , G e n e , 2 , 9 5 - 1 1 3 (1 9 7 7)) を利用した。

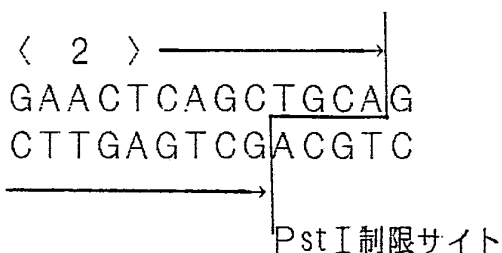
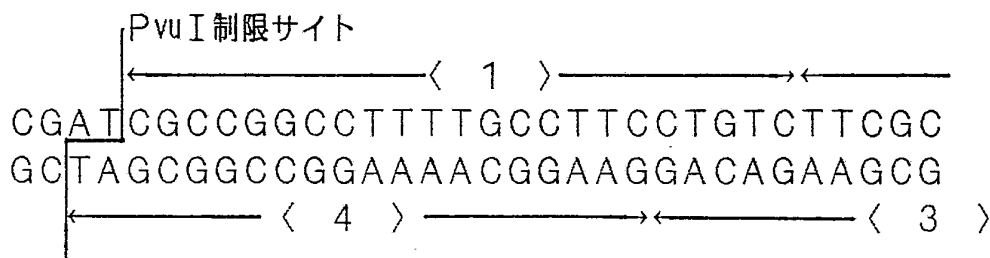
該プラスミド p B R 3 2 2 の 1 0 μ g を、制限酵素 P s t I (宝酒造(株)製) と P v u I (N E B 社製) とを用いて高塩濃度緩衝液中で切断し、1 . 0 % アガロースゲル電気泳動を行ない、約 4 . 2 4 k b の D N A 断片を分離した。

- ③ 上記②で得た D N A 断片を、上記①で調製されたリン酸化したオリゴヌクレオチド < 2 > 及び < 4 > 並びに
15 リン酸化していないオリゴヌクレオチド < 1 > 及び < 3 > のそれぞれ約 1 μ g ずつと合せて、T₄ D N A リガーゼで結合反応させた。反応終了後、この反応組成液で大腸菌 K - 1 2 株由来の H B 1 0 1 株を形質転換させた。得られたテトラサイクリン耐性を示す形質転換株の中から
20 1 株を選び、これからプラスミドを単離し、目的とする p G H 5 3 を得た。

一連の操作の概略は第1図に示す通りである。

第1図は起源ベクター pBR322 に合成オリゴヌクレオチド〈1〉、〈2〉、〈3〉及び〈4〉をクローニングしてプラスミド pGH53 を得る工程及びこれにより得られる pGH53 の特徴を示す図であり、図中□は合成オリゴヌクレオチド由来の塩基配列を示している。

得られた pGH53 は、1.0% アガロースゲル電気泳動の結果、4.3 Kb の大きさを有しており、その DNA 塩基配列を M13 法により分析した結果、pBR322 の PstI 及び PvuI の両制限サイト間が欠失し、代りに次に示すように、オリゴヌクレオチド〈1〉、〈2〉、〈3〉及び〈4〉が挿入されていることが確認された。



- 43 -

該 p G H 5 3 は、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に「H B 1 0 1 (p G H 5 3)」なる表示で微工研条寄第 6 7 8 号 (F E R M B P - 6 7 8) として寄託されている。

5 (B) 成熟ポリペプチド分泌発現用ベクター p G H
5 4 の構築

① 上記 (A) で得た p G H 5 3 の 1 0 μ g を制限酵素 N a e I (N E B 社製) 及び A v a I (宝酒造株製) を用いて中塩濃度緩衝液中で切断し、次いで 1 . 0 % アガロースゲル電気泳動を行なつて、約 2 . 2 2 kb の D N A 断片
10 《 A 》を分離した。

この断片は、合成オリゴヌクレオチド由来の D N A 配列の大部分とプラスミドの複製開始領域を含んでいる。

② p B R 3 2 2 を制限酵素 A v a I 及び H i n d Ⅲ (いずれも宝酒造株製) で、中塩濃度緩衝液を用いて切断し、
15 1 . 0 % アガロースゲル電気泳動を行なつて、約 1 . 4 0 kb の D N A 断片 《 B 》を得た。

この断片には、テトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーターの一部とテトラサイクリン耐性の構造遺伝子の全
20 てが含まれている。

③ p B R 3 2 2 の 2 0 μ g を制限酵素 F n u 4 H . I

- 4 4 -

(NEB社製)で低塩濃度緩衝液を用いて切断し、次いでS1ヌクレアーゼによりDNA断片末端の突出塩基を分解除去した。これはフェノール抽出後のDNAを、6 mM酢酸ナトリウム、40 mM塩化ナトリウム及び1
5 mM硫酸亜鉛緩衝液(pH4.5)1 mlに溶かし、これに2000ユニットのS1ヌクレアーゼ(BRL社製)を加えて20℃で30分間反応させることにより行なつた。次いで、フェノール抽出後の、DNAを制限酵素Hind IIIで中塩濃度緩衝液を用いて切断し、6%ポリア
10 クリルアミドゲル電気泳動を行ない、約0.28 kbのDNA断片《C》を得た。

この断片には、 β -ラクタマーゼのプロモーター、リボゾーム結合部位、シグナルペプチドをコードする遺伝子の一部の他、テトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーターの一部が含まれている。
15

④ 上記で得た3つの断片《A》、《B》及び《C》を、T₄DNAリガーゼを用いて結合させた。反応後、この反応組成液でHB101株を形質転換した。得られたテ
トラサイクリン耐性を示す形質転換株の中から1株を選
20 びプラスミドを単離した。かくしてpGH54を得た。

pGH54は、M13法による塩基配列分析の結果、

- 4 5 -

β ラクタマーゼのプロモーター及びリボゾーム結合部位に続いてシグナルペプチドをコードするDNA塩基配列を有し、この塩基配列の3'末端の上流側にNruI及び下流側にPvuIIのそれぞれの制限酵素認識配列を有していることが確認された。

一連の操作の概略は、第2図に示される通りである。

第2図はpGH53とpBR322とから本発明ポリペプチド分泌発現用ベクターpGH54を得る工程及び得られたベクターpGH54の特性を示す図であり、図中■はシグナルペプチドをコードする塩基配列を示す。

pGH54は、前記した通り約3.9Kbの大きさ及び第2図に示す制限酵素開裂地図により特徴付けられ、またM13法による塩基配列分析の結果、前記式(3)に示した塩基配列によりコードされる β ラクタマーゼシグナルペプチドの遺伝子を有することが確認された。

(C) 成熟ポリペプチド分泌発現用ベクターpGH55の構築

① pBR322のAvaI及びPvuII制限サイト間の塩基配列を欠失させたプラスミドであるpBRH02を次の操作により作成した。即ちpBR322の5 μ gを、中塩濃度緩衝液中で、制限酵素AvaI及びPvuII(いずれ

- 46 -

れも宝酒造(株)で切断し、フェノール抽出後、DNA
ポリメラーゼ I (クレノー断片、宝酒造(株)で切断断
片をプラントエンド化した。次に 1.0% アガロースゲ
ル電気泳動で約 3.72 kb の DNA 断片を分離し、この
5 断片を T₄ DNA リガーゼで環状化させた。反応終了後、
この反応組成液で HB101 株を形質転換し、得られる
アンピシリン耐性及びテトラサイクリン耐性を示す形質
転換株の中から一株を選択してプラスミドを単離し
pBRH02 を得た。得られた pBRH02 は、pBR
10 322 とは異なつて、AvaI でも PvuII でも切断されな
かつた。

② 上記①で得た pBRH02 の 5 μg を制限酵素 Pst
I 及び BamHI (いずれも宝酒造(株)を用いて中塩濃
度緩衝液中で切断し、次いで 1.0% アガロースゲル電
15 気泳動を行なつて、約 2.60 kb の DNA 断片《D》を
分離した。

この断片は、テトラサイクリン耐性遺伝子の一部及び
プラスミドの複製開始領域を含んでいる。

③ pGH54 の 10 μg を制限酵素 PstI 及び Bam
20 HI で、中塩濃度緩衝液を用いて切断し、次いで 1.0
% アガロースゲル電気泳動を行ない、約 0.66 kb の

- 47 -

DNA断片《E》を得た。

この断片には、 β -ラクタマーゼのプロモーター、リボゾーム結合部位、シグナルペプチドをコードする

DNA配列及びテトラサイクリン耐性遺伝子の一部が含まれている。

④ 上記で得た2つの断片《D》及び《E》を、T₄ DNAリガーゼを用いて結合させた。反応後、この反応組成液でHB101株を形質転換した。得られたテトラサイクリン耐性を示す形質転換株の中から1株を選びプラスミドを単離した。かくしてpGH55を得た。

一連の操作の概略は、第3図に示される通りである。

第3図はpBR322からpBRH02を得、このpBRH02とpGH54とから本発明ポリペプチド分泌発現用ベクターpGH55を得る工程及び得られるpGH55の特性を示す図である。

pGH55は、上記第3図に示される制限酵素開裂地図により特徴付けられ、1.0%アガロースゲル電気泳動の結果、約3.3Kbの大きさを有していた。また該pGH55は、M13法による塩基配列分析の結果、pGH54における第2のPvuII制限サイトを含む約0.64kbのDNAを欠く以外は、該pGH54と同様

- 48 -

であり、その第1のPvuII制限サイトは、シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列の3'末端の近傍に存在していることが確認された。

実施例 2

5 シグナルペプチド-βウロガストロン融合ポリペプチドをコードするDNA塩基配列を有する分泌発現ベクターの構築

(A) βウロガストロンをコードするDNA塩基配列の合成

10 この塩基配列は、グレゴリー(H. Gregory)により報告されたアミノ酸配列(Nature, 257, 325-327(1975))を参考にして、まずβウロガストロンをコードするDNA塩基配列の前後に開始コドン、終止コドン及び制限酵素認識部位を付加してなる下記第

15 3表に示すDNA塩基配列を構築することより行なった。このDNA塩基配列は、本発明者らにより既に特願昭59-137691号として特許出願されている。

- 49 -

第 3 表

5' AAT TCG AAG ATC TGC ATG AAT AGC
 3' GC TTC TAG ACG TAC TTA TCG

GAT TCT GAG TGC CCA CTG TCT CAC
 CTA AGA CTC ACG GGT GAC AGA GTG

GAT GGC TAT TGT CTG CAC GAC GGT
 CTA CCG ATA ACA GAC GTG CTG CCA

GTT TGC ATG TAC ATC GAA GCT TTG
 CAA ACG TAC ATG TAG CTT CGA AAC

GAT AAA TAC GCG TGT AAC TGT GTA
 CTA TTT ATG CGC ACA TTG ACA CAT

GTG GGT TAT ATC GGT GAA CGC TGT
 CAC CCA ATA TAG CCA CTT GCG ACA

CAA TAC CGT GAT CTG AAA TGG TGG
 GTT ATG GCA CTA GAC TTT ACC ACC

GAA TTG CGT TAA TAG TGA AGA TCT
 CTT AAC GCA ATT ATC ACT TCT AGA

G 3'
 CCT AG 5'

(B) βウロガストロンをコードするDNA塩基配列
 を保有するプラスミドの構築

① pBR322の10μgを、まず高塩濃度緩衝液中

- 50 -

で EcoR I (宝酒造機製) と BamH I とで切断し、次いで 1.0% アガロースゲル電気泳動を行なつて、約 3.99 kb の DNA 断片を単離した。

② 上記①で得た DNA 断片と、上記(A)で得たβウロガストロンをコードする DNA 塩基配列とを、T₄ DNA リガーゼで結合させた。反応後、反応組成物で HB 101 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性を示す形質転換株の中から一株を選びプラスミドを単離した。かくしてβウロガストロンをコードする DNA 塩基配列を pBR322 の EcoR I 及び BamH I 制限サイト間に挿入されたプラスミド pUG3 を得た。

このプラスミド pUG3 を保有する HB 101 株は、「HB 101 (pUG3)」なる表示で、微工研菌条第 543 号 (FERM BP-543) として寄託されている。

(C) pUG201 の構築

上記(B)で得た pUG3 を制限酵素 Hinf I で切断して得られる DNA 断片を、pGH55 の PvuII 制限サイトに挿入して、シグナルペプチド-βウロガストロン融合ポリペプチドをコードする DNA 塩基配列を含む分泌発現ベクターである pUG201 を、以下の方法によ

- 5 1 -

り構築した。

① p U G 3 の 1 5 μ g を、高塩濃度緩衝液中で Hinf I (宝酒造(株)製) で切断し、フェノール抽出後、DNA ポリメラーゼ I (クレノー断片) で切断断片をプラント
5 エンド化した。次いで 6 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、約 0 . 4 3 kb の DNA 断片《F》を単離した。

この断片には、 β ウロガストロンをコードする DNA 塩基配列 (翻訳停止コドンを含む) のうち 5' 端の 7 塩
10 基を除く塩基配列が含まれていた。

② p G H 5 5 は、 β ラクタマーゼのシグナルペプチドをコードする DNA 塩基配列の後に、 β ウロガストロンの N 端領域をコードする最初の 7 個の DNA 塩基配列が直結し、且つその直後で制限酵素 Pvu II により切断され
15 るように構成された DNA 塩基配列を有するものであり、該 p G H 5 5 の 5 μ g を中塩濃度緩衝液中で、Pvu II で切断して、約 3 . 2 6 kb の DNA 断片《G》を得た。

この断片は、p G H 5 5 の全ての遺伝情報を有している。

20 ③ 上記①で得た断片《F》の約 1 μ g と上記②で得た断片《G》の約 0 . 5 μ g とを T₄ DNA リガーゼで結

- 5 2 -

合させた。反応後、この反応組成液でHB101株を形質転換し、得られるテトラサイクリン耐性の形質転換株の中から一株を選び、プラスミドpUG201を単離した。

5 一連の操作の概略は、第4図に示される通りである。

第4図は、pGH55とpUG3とからシグナルペプチドと目的ポリペプチド(βウロガストロン)との融合ポリペプチドをコードするDNA塩基配列を含む本発明ポリペプチド分泌発現ベクターpUG201を得る工程
10 及び得られるpUG201の特性を示す図であり、図中白ヌキの矢印はβウロガストロンの遺伝子を示す。

pUG201は、1.0%アガロースゲル電気泳動の結果、約3.7Kbの大きさを有していた。これをBamHI又はHindIIIで切断すると、それぞれ2種類の
15 DNA断片が得られることから、該pUG201にはβウロガストロン遺伝子が含まれていることが判り、また該断片の大きさを調べた結果より、目的のプラスミドであることが判った。更に、pUG201について、βラクタマーゼのプロモーター部分からβウロガストロン遺
20 伝子までを含むDNA断片の塩基配列を、M13法による塩基配列分析により調べた。その結果、該DNA塩基

- 53 -

配列は下記第4表の通りであり、pUG201がプロモーター、リボゾーム結合部位並びにβラクタマーゼのシグナルペプチドをコードする塩基配列及びβウロガストロンをコードする塩基配列（融合ポリペプチドをコードする塩基配列）が、正確にこの順序で配列されていることが確認された。また第4表にはDNA塩基配列に対応するアミノ酸配列も併記する。

上記pUG201は、これを大腸菌HB101に保有させ、この保有株を「HB101(pGH201)」なる表示で、通商産業省工業技術院微生物工業研究所に寄託されている。その寄託番号は、微工研条寄第681号（FERM BP-681）である。

第 4 表

TTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCT
AAGAACTTCTGCTTTCCCGGAGCACTATGCGGA

ATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGT
TAAAAATATCCAATTACAGTACTATTATTACCA

TTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAA
AACAACTCTGCAGTCCACCGTGAAAAGCCCCTTT

TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTA
ACACGCGCCTTGGGGATAAACAAATAAAAAGAT

----- プロモーター -----
 AATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACA
 TTATGTAAGTTTATACATAGGCGAGTACTCTGT

----- |
 ATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAA
 TATTGGGACTATTTACGAAGTTATTATAACTTT

----- リボソーム結合部位
 AAGGAAGAGT ATG AGT ATT CAA CAT
 TTCCTTCTCA TAC TCA TAA GTT GTA
Met Ser Ile Gln His

TTC CGT GTC GCC CTT ATT CCC TTT
 AAG GCA CAG CGG GAA TAA GGG AAA
Phe Arg Val Ala Leu Ile Pro Phe
 シ グ ナ ル ペ プ チ ド

TTT GCG GCC TTT TGC CTT CCT GTC
 AAA CGC CGG AAA ACG GAA GGA CAG
Phe Ala Ala Phe Cys Leu Pro Val

TTC GCG AAC TCA GAT TCT GAG TGC
 AAG CGC TTG AGT CTA AGA CTC ACG
Phe Ala Asn Ser Asp Ser Glu Cys

CCA CTG TCT CAC GAT GGC TAT TGT
 GGT GAC AGA GTG CTA CCG ATA ACA
Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys

βウログاستロンのポリペプチド

CTG CAC GAC GGT GTT TGC ATG TAC
 GAC GTG CTG CCA CAA ACG TAC ATG
Leu His Asp Gly Val Cys Met Tyr

- 5 5 -

ATC	GAA	GCT	TTG	GAT	AAA	TAC	GCG
TAG	CTT	CGA	AAC	CTA	TTT	ATG	CGC
Ile	Glu	Ala	Leu	Asp	Lys	Tyr	Ala

TGT	AAC	TGT	GTA	GTG	GGT	TAT	ATC
ACA	TTG	ACA	CAT	CAC	CCA	ATA	TAG
Cys	Asn	Cys	Val	Val	Gly	Tyr	Ile

GGT	GAA	CGC	TGT	CAA	TAC	CGT	GAT
CCA	CTT	GCG	ACA	GTT	ATG	GCA	CTA
Gly	Glu	Arg	Cys	Gln	Tyr	Arg	Asp

CTG	AAA	TGG	TGG	GAA	TTG	GGT	TAA
GAC	TTT	ACC	ACC	CTT	AAC	GCA	ATT
Leu	Lys	Trp	Trp	Glu	Leu	Arg	

TAGTGAAGATCTGGATC
ATCACTTCTAGACCTAG

実施例 3

p U G 2 0 1 を保有する大腸菌による成熟βウロガス
トロンの分泌発現

(A) p U G 2 0 1 を保有する H B 1 0 1 株の培養
下記組成の修正 E 培地を用いた。

< 修正 E 培地 (1 ℓ 当りの組成) >

硫酸マグネシウム・7水塩	0.2g
クエン酸・1水和物	2.0g
無水リン酸2カリウム	10.0g

- 56 -

リン酸水素アンモニウム・ナトリウム・

4水塩 3.5g

ブドウ糖 2.0g

カザミノ酸 1.0g

5 L-プロリン 0.23g

L-ロイシン 39.5mg

塩酸チアミン 16.85mg

テトラサイクリン・塩酸塩 20.0mg

10 pUG201株の前培養液1mlを、修正E培地200mlを含むフラスコに加え、37℃で24時間振盪培養した。

(B) 菌体からのペリプラズム画分と細胞内画分との抽出

上記(A)で得た培養液から遠心分離(6000回転
15 /分×10分)で菌体を集め、培養液の0.5倍量の洗浄緩衝液(10mMトリス塩酸及び30mM塩化ナトリウム、pH8.0)で菌体を洗浄した後、浸透圧ショック法(H. C. NeuとL. A. Heppel, J. B. C.,
240, 3685-3692(1965))に従い、ペ
20 リプラズム画分を抽出した。この抽出操作は、まず湿重量1gの菌体を20%蔗糖を含む30mMトリス塩酸緩

- 57 -

衝液 (pH 8.0) 80 ml に懸濁させ、0.25 M EDTA 水溶液 (pH 8.0) の 0.32 ml を加え、ロータリーシーカーで 24°C にて 180 回転/分で 10 分間攪拌した後、遠心分離 (9000 回転/分 × 5 10 分) して菌体を集め、次いでこの菌体を氷冷した水 80 ml に再懸濁させ、氷中に 10 分間静置して時々攪拌し、遠心分離 (9000 回転/分 × 10 分) により菌体と上澄とを分離することにより行なったものであり、得られた上澄がペリプラズム画分である。

10 次いで、上記ペリプラズム画分を抽出した後の菌体を、前記と同一の洗浄緩衝液で洗浄後、PBS (150 mM 塩化ナトリウムを含む 20 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0) 6 ml に懸濁させ、超音波破碎機 (大岳製作所製 5202 型) を用いて出力 100 W にて 30 秒ずつ 3 回 15 超音波破碎処理し、遠心分離 (18000 回転/分 × 20 分) して上澄を得た。これを細胞内画分とした。

(C) ラジオイムノアッセイによる β ウロガストロンの測定

上記 (B) で得たそれぞれの画分につき、以下の通り 20 β ウロガストロンの存在を、β ウロガストロン特異ラジオイムノアッセイにより検討した。ラジオイムノアッセ

- 58 -

イの方法は次の通りである。即ち、精製ヒトβウロガストロンを抗原として、家兎を免疫し抗血清を作成した。βウロガストロン300μgを蒸留水0.2mlに溶解後、50%ポリビニルピロリドン液1.5mlを加え室温で2時間攪拌した。コンプリート・フロインド・アジュバント2.0mlを加えて乳化し、家兎3匹の胸部に皮下注射した。2週間毎に免疫を4回くり返した後、さらに50μgの抗原を静注し、3日後に全採血を行ない、血清を分離した。

次にアッセイに用いる抗血清の希釈倍率を求めるタイトレーションカーブ、アッセイ条件を最適化するためインキュベーション時間、抗体結合標識抗原（バウンド）と遊離標識抗原（フリー）の分離方法等の検討を加え、下記測定条件を設定した。

即ち、0.5%ウシ血清アルブミン（BSA）、140mM塩化ナトリウム、25mM EDTA二ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液（pH7.4）を希釈液として用い、該希釈液400μl、測定試料又は標準ヒトβウロガストロン100μl及び抗ヒトβウロガストロン血清100μlを加えて4℃にて24時間インキュベートした後、¹²⁵I標識ヒトβウロガストロン

- 59 -

100 μ l (約 5000 cpm) を加えた。更に 4 $^{\circ}$ C にて
48 時間 インキュベートした後、第 2 抗体 (抗家兎 γ -
グロブリンヤギ血清) (1:20) 100 μ l、正常家
兎血清 (1:200) 100 μ l 及び 5% ポリエチレン
5 グリコールを含む 10 mM PBS 液 900 μ l を加え
て 4 $^{\circ}$ C にて 3 時間 インキュベートした。次に 3000
rpm で 30 分間遠心分離し、上清を除き沈澱物をカウ
ントした。標準ヒト β ウロガストロンより得られた標準曲
線より試料中のヒト β ウロガストロン免疫活性物の含量
10 を求めた。

上記結果を下記第 5 表に示す。また第 5 表には、
pUG201 を保有する HB101 株に代えて、同様に
して作成された pGH55 及び pUG3 のそれぞれで形
質転換された HB101 株を用いて同様にした結果を併
15 記する。

- 60 -

第 5 表

 β ウロガストロン免疫活性菌 株 ($\mu\text{g} / \ell$ 培養液)

	ペリプラズム画分	細胞内画分
HB 1 0 1		
(p G H 5 5)	< 0 . 0 3	< 0 . 0 3
HB 1 0 1		
(p U G 3)	< 0 . 0 3	< 0 . 0 3
HB 1 0 1		
(p U G 2 0 1)	2 6 3	0 . 6 2

上記第 5 表より、シグナルペプチドのみをコードする DNA 塩基配列を含むベクターを保有する大腸菌 (HB 1 0 1 (p G H 5 5)) 及び β ウロガストロンのみをコードする DNA 塩基配列を含むプラスミドを保有する大腸菌 (HB 1 0 1 (p U G 3)) では、それらの培養抽出液中に β ウロガストロンの免疫活性物質は実質的に検出されないが、シグナルペプチドと β ウロガストロンの融合ポリペプチドをコードする DNA 塩基配列を含み、その前にプロモーター及びリボソーム結合部位が連結された本発明の成熟ポリペプチド分泌発現ベクターを保有する大腸菌 (HB 1 0 1 (p U G 2 0 1)) では、その

- 61 -

培養抽出液中に顕著な β ウロガストロンの免疫活性が検出されることが明らかである。

また本発明ベクターで形質転換した上記微生物の培養では、 β ウロガストロンの免疫活性物質の殆んどすべて
5 (99.8%)が、ペリプラズムに分布していることも確認される。このことから、シグナルペプチドと β ウロガストロンとの融合ポリペプチドのDNA塩基配列を利用した本発明によれば、 β ウロガストロンは細胞膜を通過してペリプラズムに分泌されることが判る。

10 (D) ポリペプチドの精製

上記ペリプラズム抽出液中の β ウロガストロンの免疫活性物質を、ブチルトヨパール(東洋曹達株製)を用いた吸着クロマトグラフィー、CM-トヨパール(東洋曹達株式会社製)を用いたイオン交換クロマトグラフィー、
15 PepRPCカラム(ファルマシア社製)を用いた高速液体クロマトグラフィー操作により、それぞれ単一のポリペプチドになるまで精製した。

その結果、精製されたポリペプチドは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、SDS-ポリアクリルアミドゲル
20 電気泳動、アミノ酸分析、N末端分析のすべてにおいてヒト尿より単離精製された β ウロガストロンと同一物質

であることが確認された。

国際様式 INTERNATIONAL FORM

(特許手続上の微生物の寄託の国際的承認)
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNA-
TIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES
OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNA-
TIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified
at the bottom of this page.

寄託者 氏名(名称) アース製薬株式会社
あて名 兵庫県赤穂市坂越3218の12 殿

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) HB101 {pGH53}	(受託番号) 微工研条寄第 6 7 8 号 (FERM BP -6 7 8)
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、昭和 59 年 12 月 13 日(原寄託日)に受領した I 欄の微生物を 受託する。	
IV. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所 名 称: Fermentation Research Institute Agency of Industrial Science and Technology 所 長 大山次郎 Jiro Ooyama, Dr. DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県筑波郡谷田部町東 1 丁目 1 番 3 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Yatabe-machi Tsukuba-gun Ibaraki-ken 305, JAPAN	
昭和59年(1984)12月13日	

国際様式 INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

(特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約)

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い発行される

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

寄託者 氏名(名称) アース製薬株式会社
あて 名 兵庫県赤穂市坂越3218の12 殿

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) HB101 (pGH54)	(受託番号) 微工研条寄第 679 号 (FERM BP - 679)
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、昭和 59 年 12 月 13 日(原寄託日)に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所</p> <p>名称: Fermentation Research Institute Agency of Industrial Science and Technology</p> <p>所長 大山次郎 Jiro Ooyama, Dr. DIRECTOR GENERAL.</p> <p>あて名: 日本国茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番3 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Yatabe-machi Tsukuba-gun Ibaraki-ken 305, JAPAN</p>	
昭和 59 年 (1984) 12 月 13 日	

国際様式 INTERNATIONAL FORM

(特許手続上の微生物の寄託の国際的承認)
 に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い
 発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNA-
 TIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
 OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES
 OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
 DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNA-
 TIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified
 at the bottom of this page.

寄託者 氏名(名称) アース製薬株式会社
 あて名 兵庫県赤穂市坂越3218の12 殿

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) HB101 (pGH55)	(受託番号) 微工研条寄第 680 号 (FERM BP - 680)
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、昭和 59 年 12 月 13 日(原寄託日)に受領した I 欄の微生物を 受託する。	
IV. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所 Fermentation Research Institute 名称: Agency of Industrial Science and Technology 所長 大山次郎 Jiro Ooyama, Dr. DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番3 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Yatabe-machi Tsukuba-gun Ibaraki-ken 305, JAPAN	
昭和59年(1984)12月13日	

国際様式 INTERNATIONAL FORM

(特許手続上の微生物の寄託の国際的承認)
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNA-
TIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES
OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNA-
TIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified
at the bottom of this page.

寄託者 氏名 (名称) アース製薬株式会社
あて 名 兵庫県赤穂市坂越3218の12 殿

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) HB101 (pUG201)	(受託番号) 微工研条寄第 681 号 (FERM BP - 681)
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、昭和 59 年 12 月 13 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を 受託する。	
IV. 国際寄託当局	
<p style="text-align: center;">通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所</p> <p style="text-align: center;">Fermentation Research Institute Agency of Industrial Science and Technology</p> <p style="text-align: center;">名称: 所長 <u>大山次郎</u> Jiro Ooyama, Dr. DIRECTOR GENERAL.</p> <p style="text-align: center;">あて名: 日本国茨城県筑波郡谷田部町東 1 丁目 1 番 3 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Yatabe-machi Tsukuba-gun Ibaraki-ken 305, JAPAN</p>	
昭和 59 年 (1984) 12 月 13 日	

- 67 -

請 求 の 範 囲

- ① シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列と目的ポリペプチドをコードするDNA塩基配列とを直接連結させて目的ポリペプチドを分泌発現させるための、
- 5 シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列を含むことを特徴とするポリペプチド分泌発現用ベクター。
- ② シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列と共に該塩基配列の前にプロモーター及びリボソーム結合部位を有する特許請求の範囲第1項に記載のベクター。
- 10 ③ シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列に連結されるべき目的ポリペプチドをコードするDNA塩基配列の直後に翻訳停止シグナルを直接連結されるべくした特許請求の範囲第1項又は第2項に記載のベクター。
- 15 ④ 翻訳停止シグナルの後に更に転写終結因子が連結されてなる特許請求の範囲第3項に記載のベクター。
- ⑤ シグナルペプチドが大腸菌βラクタマーゼのものである特許請求の範囲第1～4項のいずれかに記載のベクター。
- 20 ⑥ プロモーター、リボソーム結合部位及び転写終結因子が大腸菌βラクタマーゼのものである特許請求の範

冊第 1 ~ 5 項のいずれかに記載のベクター。

⑦ p G H 5 4 である特許請求の範囲第 1 項に記載のベクター。

⑧ p G H 5 5 である特許請求の範囲第 1 項に記載のベクター。

⑨ シグナルペプチドをコードする DNA 塩基配列と目的ポリペプチドをコードする DNA 塩基配列とが直接連結されてなる融合ポリペプチドをコードする DNA 塩基配列を含むことを特徴とする特許請求の範囲第 1 ~ 9 項のいずれかに記載のベクター。

⑩ 目的ポリペプチドをコードする DNA 塩基配列が β ウロガストロンをコードするものである特許請求の範囲第 9 項に記載のベクター。

⑪ p U G 2 0 1 である特許請求の範囲第 9 項に記載のベクター。

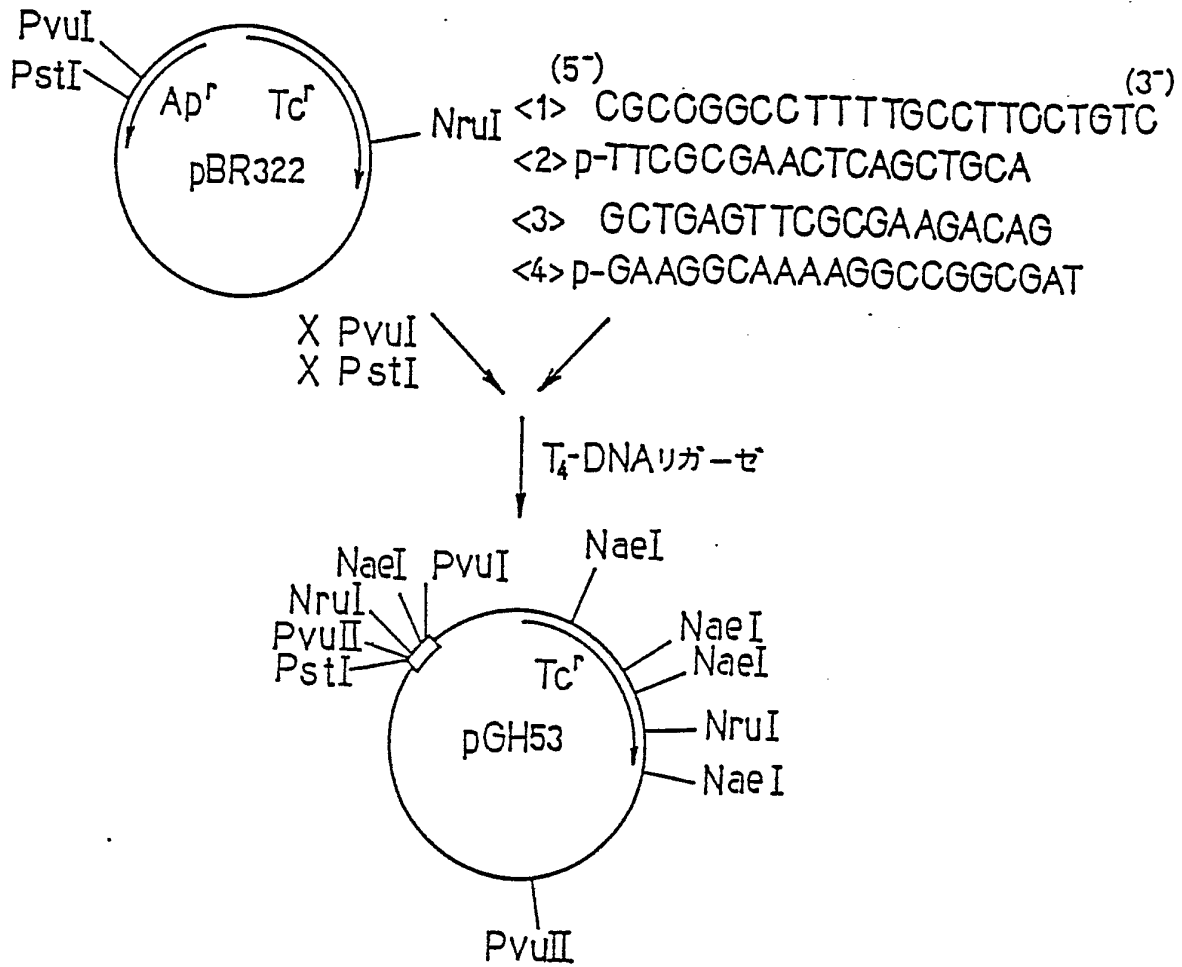
⑫ シグナルペプチドをコードする DNA 塩基配列と目的ポリペプチドをコードする DNA 塩基配列とが直接連結されてなる融合ポリペプチドをコードする DNA 塩基配列を含むベクターで形質転換された微生物。

⑬ 大腸菌である特許請求の範囲第 1 2 項に記載の微生物。

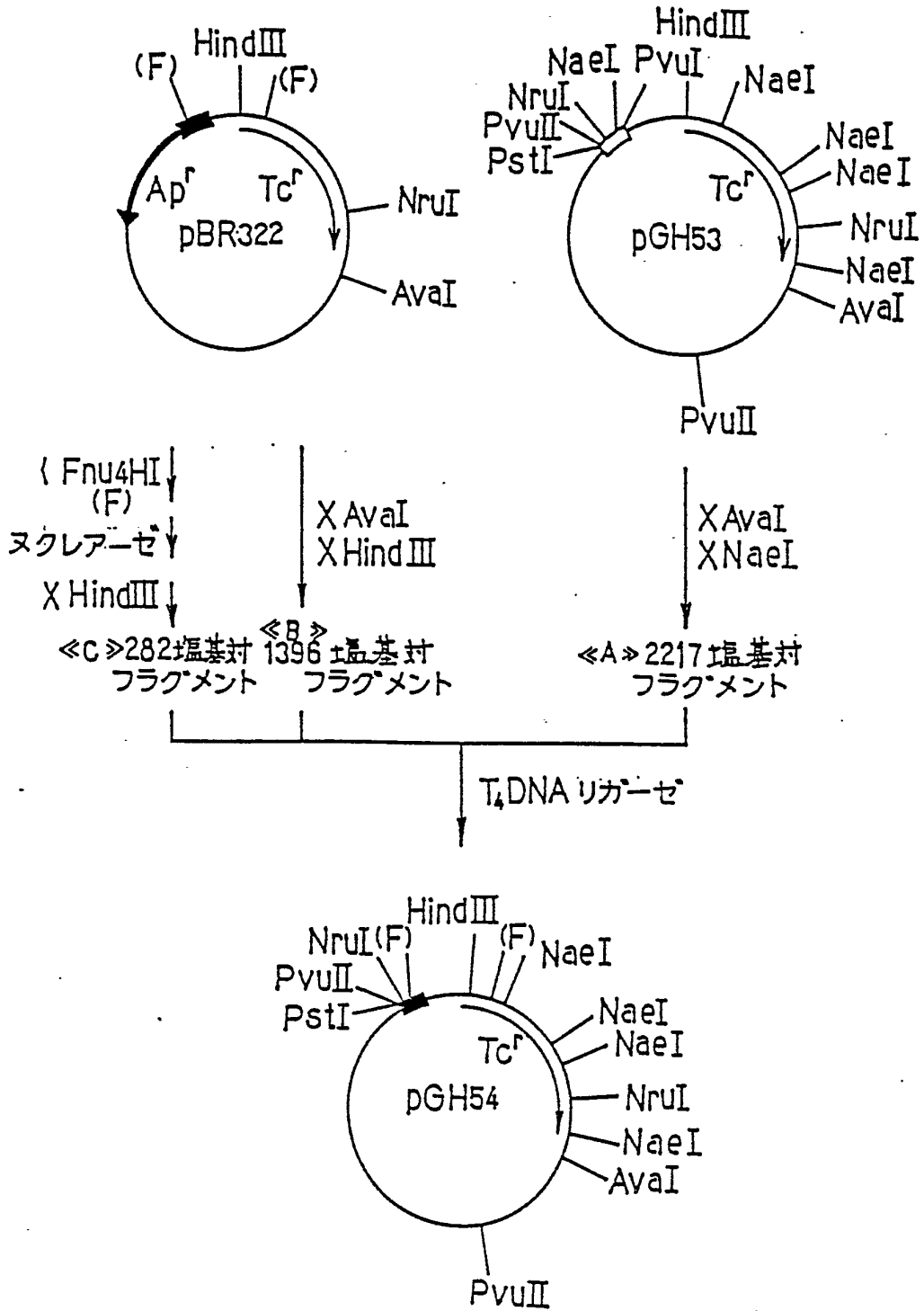
- 69 -

- ⑭ シグナルペプチドをコードするDNA塩基配列と目的ポリペプチドをコードするDNA塩基配列とが直接連結されてなる融合ポリペプチドをコードするDNA塩基配列を含むベクターで形質転換された微生物を培養して分泌されるポリペプチドを採取することを特徴とするポリペプチドの製造法。

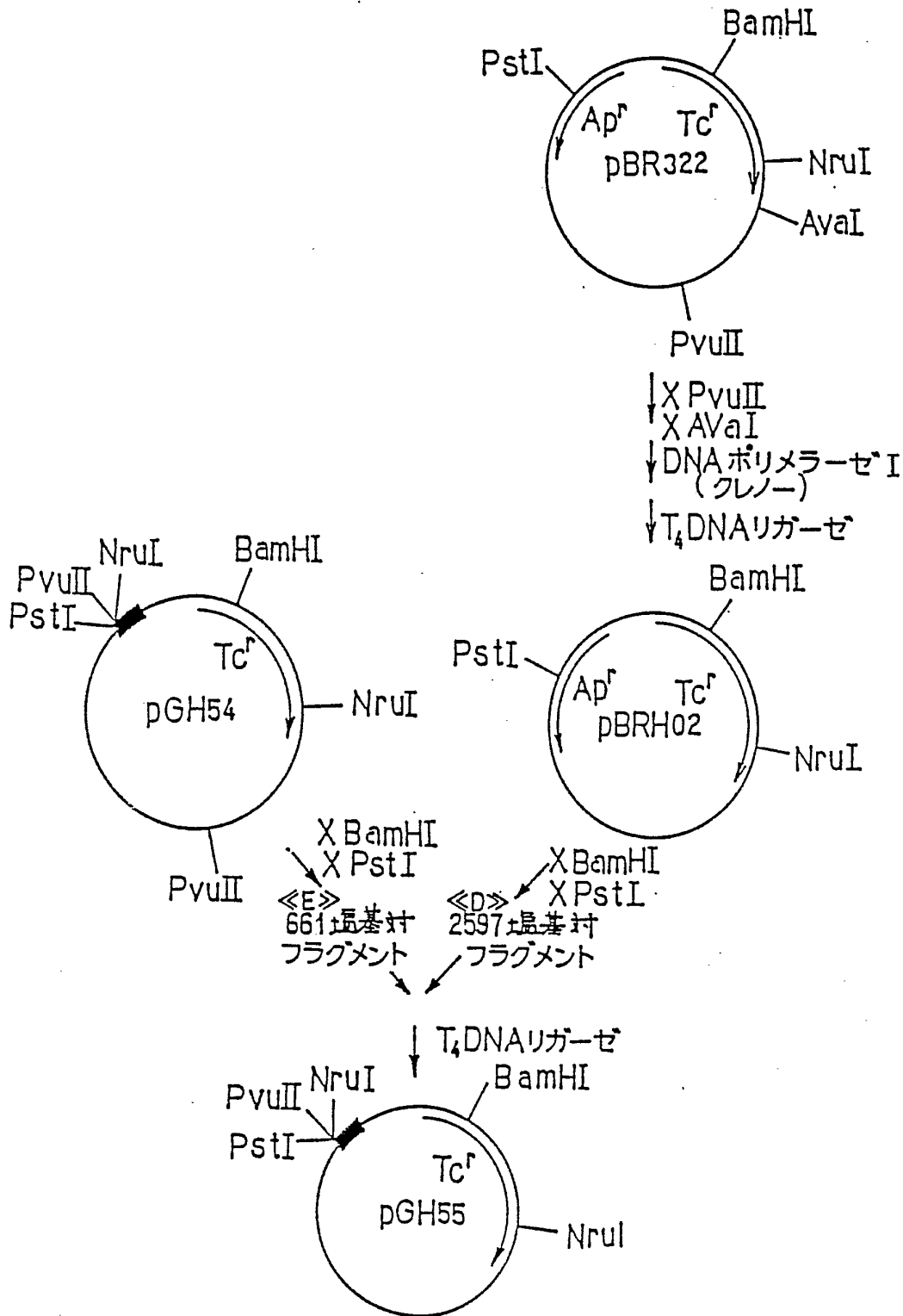
第 1 図 ^{- 1/4 -}



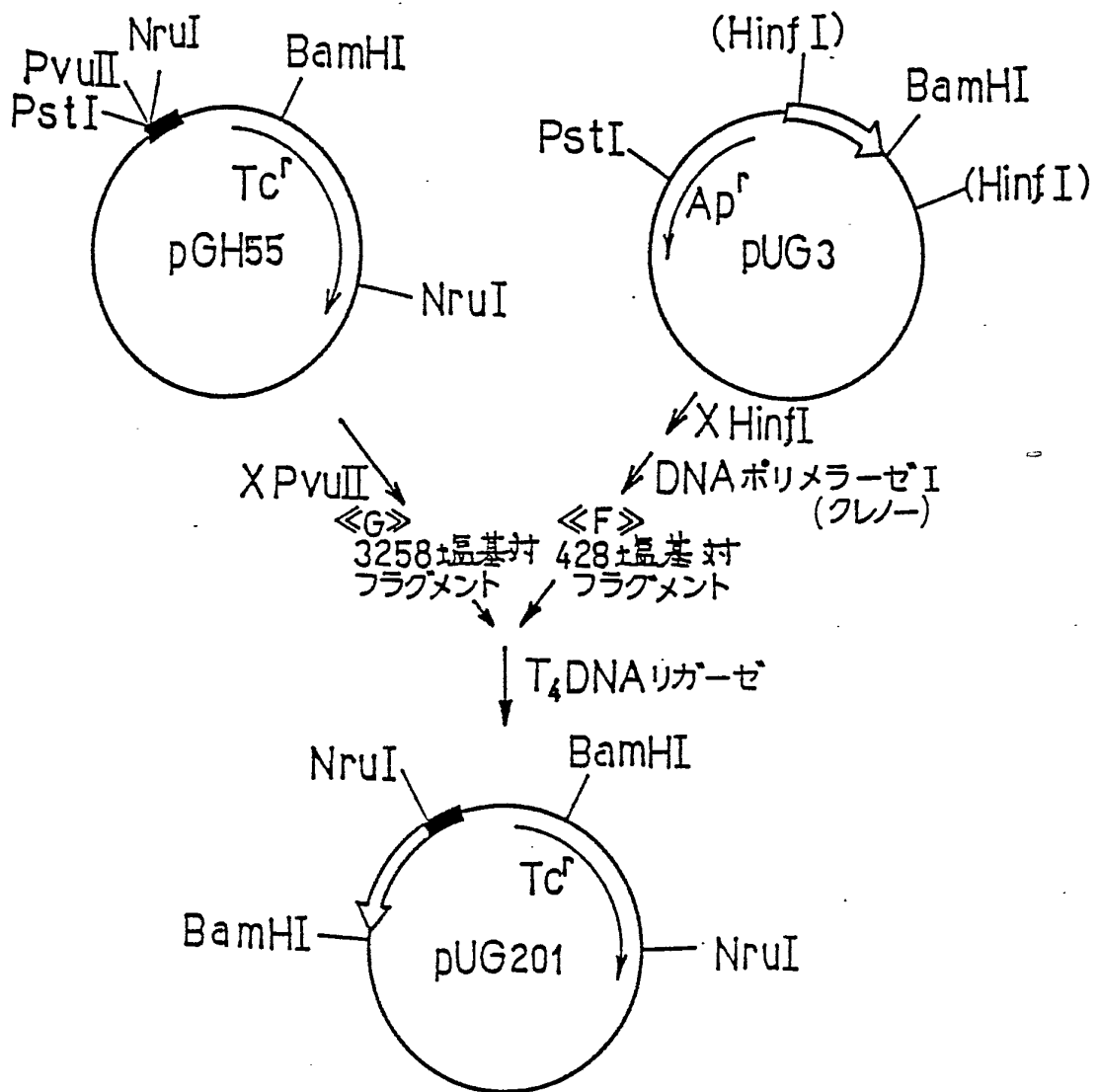
第 2 図 ^{-2/-}₄



第 3 図



第 4 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP85/00696

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ³		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl ⁴ C12N15/00, C12N1/20, C12P21/00 // (C12N1/20, C12R1:19) (C12P21/00, C12R1:19)		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁴		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C12N15/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT¹⁴		
Category ⁶	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
X	JP, A, 60-30687 (Wakinaga Seiyaku Kabushiki Kaisha) 16 February 1985 (16. 02. 85) & EP, A1, 133321	1 - 6
A	JP, A, 61-15691 (Earth Chemical Company, Limited) 23 January 1986 (23. 01. 86) & GB, AO, 8516591 & DK, AO, 291885 & SE, AO, 8503228	10
A	JP, A, 60-41488 (Genentech, Inc.) 5 March 1985 (05. 03. 85) & EP, A1, 127304 & AU, A1, 2721884 & DK, A, 204884	1, 14
A	JP, A, 59-205997 (Tyrone Corp.) 21 November 1984 (21. 11. 84) & AU, A1, 2723384 & DK, A, 204584 & EP, A2, 123228 & FI, A, 841524 & NO, A, 841613	1, 14
<p>* Special categories of cited documents:¹⁵</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 ²		Date of Mailing of this International Search Report ²
March 17, 1986 (17. 03. 86)		March 31, 1986 (31. 03. 86)
International Searching Authority ¹		Signature of Authorized Officer ²⁰
Japanese Patent Office		

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

A	JP, A, 59-198980 (Tyrone Corp.) 10 November 1984 (10. 11. 84) & DK, A, 92884 & EP, A2, 123289	1, 14
A	JP, A, 59-196093 (Tyrone Corp.) 7 November 1984 (07. 11. 84) & DK, A, 92784 & EP, A2, 121884	1, 14

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE¹⁰

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

1. Claim numbers....., because they relate to subject matter¹² not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim numbers....., because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out¹³, specifically:

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING¹¹

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP85 / 00696

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ⁴ C12N15/00, C12N1/20, C12P21/00 / (C12N1/20, C12B1:19) (C12P21/00, C12B1:19)		
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	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
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
X	JP, A, 60-30687 (湧永製薬株式会社) 16. 2月. 1985 (16. 02. 85) & EP, A1, 133321	1-6
A	JP, A, 61-15691 (アース製薬株式会社) 23. 1月. 1986 (23. 01. 86) & GB, A0, 8516591 & DK, A0, 291885 & SE, A0, 8503228	10
A	JP, A, 60-41488 (ジエネンテツク・インコーポ レイテツド) 5. 3月. 1985 (05. 03. 85) & EP, A1, 127304 & AU, A1, 2721884 & DK, A, 204884	1, 14
A	JP, A, 59-205997 (チロン・コーポレイション) 21. 11月. 1984 (21. 11. 84)	1, 14
*引用文献のカテゴリー		
<p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	17. 03. 86	国際調査報告の発送日 31. 03. 86
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 広 田 雅 紀
		4 B 7 1 1 5

第2ページから続く情報		
	<p>&AU, A1, 2723384 &DK, A, 204584 &EP, A2, 123228 &FI, A, 841524 &NO, A, 841613</p>	
A	<p>JP, A, 59-198980 (チロン・コーポレイション) 10.11月.1984 (10.11.84) &DK, A, 92884 &EP, A2, 123289</p>	1, 14
A	<p>JP, A, 59-196093 (チロン・コーポレイション) 7.11月.1984 (07.11.84) &DK, A, 92784 &EP, A2, 121884</p>	1, 14
<p>V. <input type="checkbox"/> 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見</p> <p>次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。</p>		
<p>VI. <input type="checkbox"/> 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見</p> <p>次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。 請求の範囲 _____</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。 請求の範囲 _____</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。</p> <p>追加手数料異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。</p>		