

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年6月21日(21.06.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/110641 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 21/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/044879
- (22) 国際出願日: 2017年12月14日(14.12.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-242650 2016年12月14日(14.12.2016) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人山口大学(YAMAGUCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田1677-1 Yamaguchi (JP). JXTGエネルギー株式会社(JXTG NIPPON OIL & ENERGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒1008162

東京都千代田区大手町一丁目1番2号 Tokyo (JP).

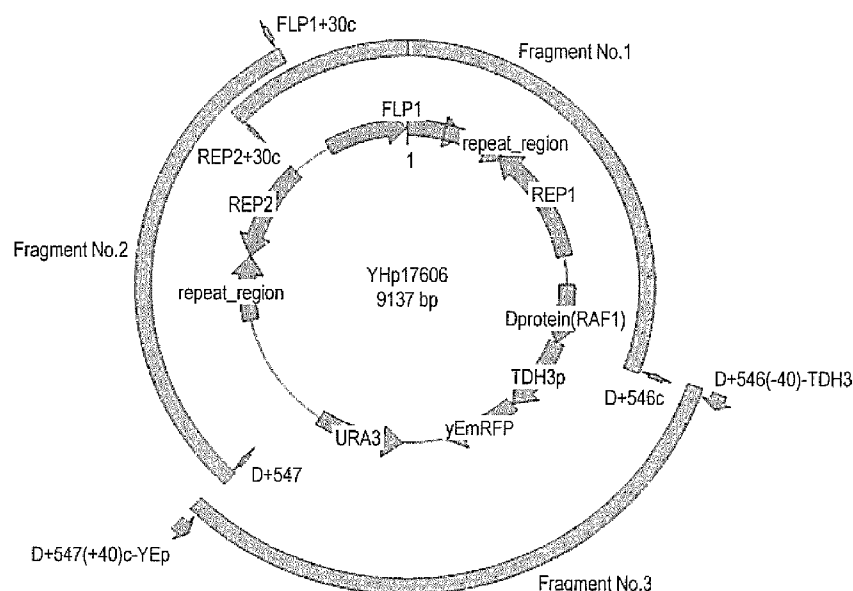
(72) 発明者: 赤田 倫治(AKADA Rinji); 〒7558611 山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内 Yamaguchi (JP). 星田 尚司(HOSHIDA Hisashi); 〒7558611 山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内 Yamaguchi (JP). 美澄 幸恵(MISUMI Yukie); 〒7558611 山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内 Yamaguchi (JP). 松田 整(MATSUDA Hitoshi); 〒1008162 東京都千代田区大手町一丁目1番2号 JXTGエネルギー株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所(HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都

(54) Title: METHOD FOR OVEREXPRESSING PROTEIN IN YEAST

(54) 発明の名称: 酵母でタンパク質を過剰発現させる方法

【図1】



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a method for stably causing high expression of a protein in yeast, and relates specifically to a protein production method including a step for culturing a yeast transformant in which a 2 μm plasmid is reconstructed in a yeast not maintaining the 2 μm plasmid, the reconstructed 2 μm plasmid containing a gene that codes for a desired protein.

(57) 要約: 本発明は、酵母においてタンパク質を安定して高発現させる方法を提供することを目的とし、具体的には、2μmプラスミドを保持していない酵母において2μmプラスミドを再構成した酵母形質転換体を培養する工程を含み、前記再構成した2μmプラスミドは目的タンパク質をコードする遺伝子を含有する、タンパク質の生産方法に関する。

[続葉有]



WO 2018/110641 A1



港区愛宕二丁目５－１ 愛宕グリーンヒルズ
MOR I タワー３２階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- － 国際調査報告（条約第21条(3)）
- － 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

明 細 書

発明の名称：酵母でタンパク質を過剰発現させる方法

技術分野

[0001] 本発明は、例えば、酵母でタンパク質を過剰発現させることによりタンパク質を生産する方法に関する。

背景技術

[0002] これまでに酵母宿主による遺伝子工学的なタンパク質の高発現は、様々な方法で行われてきた。例えば、高発現プロモーターの開発や、プラスミドベクターの開発等が挙げられる。

[0003] 特に、高発現における多コピープラスミドの影響は強く、episomalプラスミド、又は、YE_pプラスミドと呼ばれるプラスミド群は、高い発現を示してきた(非特許文献1)。しかしながら、プラスミドは、不安定で、宿主から一定の割合で失われるので、代替の方法として、染色体へ挿入して発現させることもよく行われる。しかしながら、染色体への挿入は、方法が煩雑であり、またコピー数が高く、さらに安定性の高い発現方法が求められている。

[0004] ところで、YE_pプラスミドは、ほとんどの酵母が自然状態で保持している2 μ m(2マイクロメートル)プラスミド(非特許文献2)の複製機構を利用し、その複製起点(2 μ m origin)の部分だけをプラスミドに組み込んだものである。これは、細胞内で多コピー化し、維持される(YE_pプラスミドは2 μ mプラスミドを保持する株でないと安定に保持されない)ので頻繁に利用されている(非特許文献3)。特に、選択マーカー遺伝子の発現量を、プロモーター領域を削除することで減らした場合、高いコピー数にならない限り選択増殖ができないので、高コピー数が維持できることが知られている(leu2-dマーカー；非特許文献4)。しかしながら、この場合、選択能を与えて増殖させる必要があるので、培地として選択培地を使用することとなり、実際には増殖が遅くなる。また、YE_pプラスミドの安定性は完全ではなく、ある程度の頻度で酵母細胞から抜けてしまうので、安定性が十分とは言えない(非特許文献5)。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1 : Jane C. Schneider, Methods in Enzymology, 1991年, Vol. 194, pp. 373-388

非特許文献2 : Futcher AB, Yeast, 1988年, Vol. 4, No. 1, pp. 27-40

非特許文献3 : Chen Y, FEMS Yeast Res., 2012年, Vol. 12, No. 5, pp. 598-607

非特許文献4 : Erhart E, J Bacteriol., 1983年, Vol. 156, No. 2, pp. 625-35

非特許文献5 : Schwartz LS, Biotechnol Bioeng., 1988年, Vol. 32, No. 6, pp. 733-40

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、上述した実情に鑑み、酵母においてタンパク質を安定して高発現させる方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、2 μ mプラスミドを保持していない酵母細胞(例えば、協会7号酵母 : K7株)に、目的タンパク質をコードする遺伝子を含む2 μ mプラスミド全体を再構成するようにその断片を使って形質転換することで、当該形質転換体が非常に高く、且つ安定した目的タンパク質の発現を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は以下を包含する。

(1) 2 μ mプラスミドを保持していない酵母において2 μ mプラスミドを再構成した酵母形質転換体を培養する工程を含み、前記再構成した2 μ mプラスミドは目的タンパク質をコードする遺伝子を含む、タンパク質の生産方法。

(2) 2 μ mプラスミドを保持していない酵母が協会7号酵母又はその誘導株で

ある、(1)記載の方法。

[0009] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2016-242650号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、酵母において目的のタンパク質を安定して高発現させることができ、当該タンパク質の生産効率を大幅に向上させることができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]プラスミドYHp17606のマップである。

[図2]プラスミドYCp21477のマップである。

[図3]プラスミドYEpGAP-Cherryのマップである。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明に係るタンパク質の生産方法(以下、「本方法」と称する)は、2 μ mプラスミドを保持していない酵母において2 μ mプラスミドを再構成した酵母形質転換体を培養する工程を含む。当該再構成した2 μ mプラスミドは目的タンパク質をコードする遺伝子を含有し、酵母形質転換体の培養により、再構成した2 μ mプラスミドから目的タンパク質をコードする遺伝子が安定して高発現され、目的タンパク質を生産することができる。

[0013] 2 μ mプラスミドを保持していない酵母(以下、「cir0株」と称する)としては、例えばサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)に属する酵母株である協会7号酵母又はその誘導株(変異株を含む:例えば、RAK2359株(a/a ura3 Δ ::LYS4/ura3 Δ ::LYS4 his3/his3 lys4/lys4, Ano et al., Bio sci. Biotechnol. Biochem. 73, 633, 2009)、BY1847株((SH1847, NA87-11 A-H [cir0]) MAT α ho trp1 his3 leu2-3,112 pho3-1 pho5-1 can1[cir0])、並びにBY21887株((YAT285, R-2-5D 1-36) MAT α ade1 leu2 [cir0] cyh)、およびその他多くの清酒酵母、泡盛酵母(Nakazato et al., Jour. Agri. Sci. Tokyo Univ. of Agric., 47 (3), 226-230, 2002)等が挙げられる。協会7号酵母(清酒酵母 協会7号)は、例えば日本醸造協会から市販されている。

[0014] また、目的タンパク質をコードする遺伝子としては、いかなるタンパク質やペプチドをコードする遺伝子であってもよい。

[0015] 本方法では、先ずcir0株において2 μ mプラスミドを再構成した酵母形質転換体を準備する。例えば、2 μ mプラスミド全体及び目的タンパク質をコードする遺伝子を、1つ若しくは複数の(例えば、3つ若しくはそれ以上の)断片又は環状プラスミドとして作製し、当該1つ若しくは複数の断片又は環状プラスミドをcir0株に導入する。目的タンパク質をコードする遺伝子は、制御配列(例えば、プロモーター、ターミネーター等)に機能的に連結されていることが好ましい。

[0016] また、上述した断片又は環状プラスミドを導入する方法としては、酵母の形質転換方法として知られている従来公知のいかなる手法をも適用することができる。具体的には、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等の方法で実施可能であるが、これに限定されない。

[0017] 次いで、本方法では、再構成した2 μ mプラスミド(以下、「YHp(yeast hyper-copy plasmid)」と称する)を有する酵母形質転換体を、従来公知の酵母の培養条件下で培養する。例えば、培地としてYPD培地(1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%グルコース)を用いて、27~33℃及びpH5~7下で振盪培養又は静置培養を行う。

[0018] 培養後、得られた培養物をそのまま目的タンパク質として使用してもよく、あるいは培養物から目的タンパク質を単離又は精製してもよい。

実施例

[0019] 以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

[0020] 以下の実施例において使用するプライマー、酵母(サッカロミセス・セレビシエ)の菌株及びプラスミドをそれぞれ表1~3に示す。

[0021]

[表1]

表1. 使用するプライマー

プライマー名	配列番号	配列
2micro2816c(D+546c)	1	gaacacagatagatattgaaacctgtataa
2micro2899(Rep2+30c)	2	cagattctggcgtttcaatgtgtccat
2micro3329c(FLP1+30c)	3	atgccacaatttggtatattatglaaaaca
2micro2817(D+547)	4	taataatagctagcgtttacggaagac
D+547(+40)c-YEpURA3-230c	5	gatgaattgaaaagctctgitaacctataatataatagctagcgtttacggaagacaagtatgla
D+546(-40)-TDH3-698	6	agtttccctgaaacacagatagatattgaaacctgtataaATAAAAAACACGCTTTTTCAGTTCGAGTTT
URA3-223(-40)-TDH3-698	7	ATCAAAAGAAGGTTAATGTGGCTGTGGTTTCAGGGTCCATAataaaaaaacacgcttttcaagttcagttatcat
URA3+881(+40)c-YEpURA3-230	8	TTTTCGTCATTATAGAAATCATTACGACCGAGATTCCCGGtgagggttaacaagagcttttcaattcatic
KanMX-334	9	GTCAAGGAGGGTATTCIGGG
URA3+771c	10	ttccagcctgtttctgttaacgt
KanMX+200c	11	ATCTCATCTGTAAACATCATTGGC
ScURA3+881(30)	12	gcactgtgcgggtatttcacaccgcataGG
pKS716URA3+881(+31)-TDH3-698	13	gcactgtgcgggtatttcacaccgcataGGATAAAAAACACGCTTTTTCAGTTCGAGTTTATCATATCA
URA3+650	14	GAGACCCACATCATCCACGGTTCTAT
D+546(-40)-ScHIS3-205	15	agtttccctgaaacacagatagatattgaaacctgtataaATTACTCTTGGCCCTCCTCTAGTACACTCTA
D+547(+40)c-ScHIS3+663c	16	CTCCACCCAAAGGTGTTCTTATGTAGtaataatagctagcgtttacggaagacaagtatgla
TDH3-698(50)	17	ATAAAAAACACGCTTTTTCAGTTCGAGTTTATCATATCAATCACTGCCAT
TDH3+545c	18	GTAACCCGTACATGCCCAAAATAGG

[表2]

表2. 使用する菌株

菌株名	特徴	出典
BY4704	2 μ m プラスミド保有株	Brachmann, et al., Yeast, 14, 115, 1998
RAK2359	協会 7 号	Ano et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 73, 633, 2009
RAK3599	HIS3 保有株	Nonklang et al., Appl. Environ. Microbiol. 74, 7514, 2008

[0023] [表3]

表3. 使用するプラスミド

プラスミド名	特徴	出典
YEpGAP-Cherry	赤色蛍光タンパク質 yEmRFP 発現用プラスミド	Keppler-Rss, et al., Genetics, 179, 705, 2008
pKS716	YCp プラスミド	Hoshida et al., Yeast, 31, 29, 2014

[0024] 1. 赤色蛍光タンパク質発現YHpプラスミドの作製とK7株の要求性変異株 (RAK2359) への導入

1-1. PCRによるDNAフラグメントの作製

2 μ mプラスミドに赤色蛍光タンパク質yEmRFP遺伝子を組み込む目的で、以下の表4に示すテンプレート及びプライマーを用いてPCRを行った。

[0025] [表4]

No.	テンプレート*	プライマー1	プライマー2
1	BY4704 酵母株由来 染色体 DNA	配列番号:1 2micro2816c(D+546c)	配列番号:2 2micro2899(REP2+30c)
2	BY4704 酵母株由来 染色体 DNA	配列番号:3 2micro3329c(FLP1+30c)	配列番号:4 2micro2817(D+547)
3	YEpGAP-Cherry plasmid DNA	配列番号:5 D+547(+40)c-YEpURA3-230c	配列番号:6 D+546(-40)-TDH3-698

*BY4704 酵母株由来染色体 DNA: Brachmann, et al., Yeast, 14, 115, 1998

YEpGAP-Cherry plasmid DNA: Keppler-Rss, et al., Genetics, 179, 705, 2008

[0026] 上記のPCR(PrimeSTAR GXL(TAKARA-bio社製)、98℃ 10sec、60℃ 15sec、68℃ 2min、30サイクル)により、3つのフラグメントを増幅し、この3つのフラグメントを協会7号酵母(K7酵母)の要求性変異株RAK2359(a/a ura3 Δ ::LYS4/ura3 Δ ::LYS4 his3/his3 lys4/lys4, Ano et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 73, 633, 2009)に導入する。

hem. 73, 633, 2009)に以下の方法で導入した。

[0027] 1 – 2. 遺伝子導入

2 mLのYPD培地(1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%グルコース)にRAK2359株を植菌し、30℃で一晩振盪培養した(前培養)。

[0028] 前培養液1mLをYPD培地9mLに植菌し、30℃で5h振盪培養した(本培養)。

本培養液10mL全量を3000rpmで1分間遠心して上清を捨て、滅菌水10mLで洗浄した。次いで、酵母菌を滅菌水200 μ Lに懸濁後、形質転換液(60%ポリエチレングリコール3350 : 2400 μ L、4M酢酸リチウム : 100 μ L、10mg/mLキャリアDNA : 200 μ L)を500 μ L加えてコンピテントセルとした。

[0029] コンピテントセル100 μ LにDNAフラグメント各2 μ Lを加えて十分に混合し、42℃、30分インキュベートした。インキュベート後、酵母を含む形質転換液を全量ウラシル欠損(–U)寒天培地(0.17% Yeast Nitrogen Base、0.5%硫酸アンモニウム、2%グルコース、0.0024% adenine sulfate、0.1% L-Histidine HCl、0.2% L-Leucine、0.1% L-Lysine HCl、0.1% L-Methionine、0.1% L-Tryptophan、2%寒天)に塗布した。30℃で2~3日培養し、形質転換体YHp(K7)(RAK17606)を得た。

[0030] YHp(K7)(RAK17606)株が含有するプラスミドYHp17606のマップを図1に示す。図1において、各略語は以下の通りである。FLP1 : 部位特異的組換え酵素、repeat_region : リピート配列領域、REP1 : 複製遺伝子1、Dprotein : RAF1遺伝子、TDH3p : 恒常的高発現プロモーター、yEmRFP : 赤色蛍光タンパク質yEmRFP遺伝子、URA3 : ウラシル要求性相補遺伝子、REP2 : 複製遺伝子2、D+546c : 配列番号1のプライマー、REP2+30c : 配列番号2のプライマー、FLP1+30c : 配列番号3のプライマー、D+547 : 配列番号4のプライマー、D+547(+40)c–YEp : 配列番号5のプライマー、D+546(–40)–TDH3 : 配列番号6のプライマー。また、表4に示す各DNAフラグメントは、プラスミドYHp17606における以下の領域に相当する。DNAフラグメント1 : REP2の開始部分からFLP1-repeat_region–REP1–Dprotein (D+546c)まで、DNAフラグメント2 : URA3の開始部分 (D+547) からrepeat_region–REP2–FLP1の開始部分を含むところまで、DNAフラグ

メント3 : TDH3p-yEmRFP-URA3まで。

[0031] 2. 赤色蛍光タンパク質発現遺伝子断片のK7株の要求性変異株 (RAK2359) のゲノムへの導入

2-1. PCRによるDNAフラグメントの作製

K7の要求性変異株(RAK2359)のゲノムに赤色蛍光タンパク質yEmRFP遺伝子を組み込む目的で、以下の表5に示すテンプレート及びプライマーを用いてPCRを行った。

[0032] [表5]

No.	テンプレート*	プライマー1	プライマー2
1	RAK17606 酵母株由来 染色体 DNA	配列番号:7 URA3-223(-40)-TDH3-698	配列番号:8 URA3+881(+40)c-YEpURA3-230

[0033] 上記第1節と同様の方法でPCR及びフラグメントのRAK2359株への導入を行い、形質転換体Genome(K7)を得た。

[0034] 3. 赤色蛍光タンパク質発現YCpプラスミドの作製とK7株の要求性変異株 (RAK2359) への導入

3-1. PCRによるDNAフラグメントの作製

シングルコピープラスミドであるが安定に保持されるYCpプラスミドに赤色蛍光タンパク質yEmRFP遺伝子を組み込む目的で、以下の表6に示すテンプレート及びプライマーを用いてPCRを行った。

[0035] [表6]

No.	テンプレート*	プライマー1	プライマー2
1	pKS716 plasmid DNA	配列番号:9 KanMX-334	配列番号:10 URA3+771c
2	pKS716 plasmid DNA	配列番号:11 KanMX+200c	配列番号:12 ScURA3+881(30)
3	RAK17606 酵母株由来 染色体 DNA	配列番号:13 pKS716URA3+881(+31)-TDH3-698	配列番号:14 URA3+650

*pKS716 plasmid DNA: Hoshida et al., Yeast, 31, 29, 2014

[0036] 第1節と同様の方法でPCR及びフラグメントのRAK2359株への導入を行い、

形質転換体YCp(K7) (RAK21477) を得た。

[0037] YCp(K7) (RAK21477) 株が含有するプラスミドYCp21477のマップを図2に示す。図2において、各略語は以下の通りである。KmARS7(201-260) : 酵母*Kluyveromyces marxianus*の自律複製起点、EcoliOri : *E. coli* プラスミドの複製起点、MCS : マルチクローニングサイト、TDH3p:恒常的高発現プロモーター、yEmRFP : 赤色蛍光タンパク質yEmRFP遺伝子、URA3 : ウラシル要求性相補遺伝子、CEN6/ARSH4 : セントロメア6/自律複製起点H4、KanMX : カナマイシン耐性薬剤選択マーカー遺伝子、KanMX-334 : 配列番号9のプライマー、URA3+771c : 配列番号10のプライマー、KanMX+200c : 配列番号11のプライマー、ScURA3+881(30) : 配列番号12のプライマー、pKS716URA3+881(+31)-TDH3-698 : 配列番号13のプライマー、URA3+650 : 配列番号14のプライマー。また、表6に示す各DNAフラグメントは、プラスミドYCp21477における以下の領域に相当する。DNAフラグメント1 : KanMXの矢印開始部分の少し手前から矢印方向へKanMX-CEN6/ARSH4-URA3の矢印途中まで、DNAフラグメント2 : KanMXの矢印途中からKmARS7-E. coli ori-TDH3pの矢印開始部分手前のScURA3+881(30)まで、DNAフラグメント3 : TDH3p-yEmRFP-URA3の矢印途中まで。

[0038] 4. 赤色蛍光タンパク質発現YEpプラスミド(YEpGAP-Cherry)の作製とK7株の要求性変異株 (RAK2359) への導入

先ず、赤色蛍光タンパク質発現YEpプラスミド(YEpGAP-Cherry)を安定的にK7の要求性変異株 (RAK2359) に保持させるために、2 μ mプラスミド全体を含むYHpHIS3プラスミドをK7の要求性変異株 (RAK2359) に保持させる目的で以下の表7に示すテンプレート及びプライマーを用いてPCRを行った。

[0039]

[表7]

No.	テンプレート*	プライマー1	プライマー2
1	RAK17606 酵母株由来 染色体 DNA	配列番号:1 2micro2816c(D+546c)	配列番号:2 2micro2899(REP2+30c)
2	RAK17606 酵母株由来 染色体 DNA	配列番号:3 2micro3329c(FLP1+30c)	配列番号:4 2micro2817(D+547)
3	RAK3599 酵母株由来 染色体 DNA	配列番号:15 D+546(-40)-SchIS3-205	配列番号:16 D+547(+40)c-SchIS3+663c

*RAK3599 酵母株由来染色体 DNA: Nonklang et al., Appl. Environ. Microbiol. 74, 7514, 2008

[0040] 第1節と同様の方法でPCR及びフラグメントのRAK2359株への導入を行い、ウラシル欠損（-U）寒天培地の代わりにヒスチジン欠損（-H）寒天培地（0.17% Yeast Nitrogen Base、0.5%硫酸アンモニウム、2%グルコース、0.0024% adenine sulfate、0.2% L-Leucine、0.1% L-Lysine HCl、0.1% L-Methionine、0.1% L-Tryptophan、0.1% Uracil、2%寒天）を用いて形質転換体YHpHIS3(K7)を得た。

[0041] 次に、YEpGAP-Cherryを組み込む目的で、以下の表8に示すテンプレート及びプライマーを用いてPCRを行った。

[0042] [表8]

No.	テンプレート*	プライマー1	プライマー2
1	YEpGAP-Cherry plasmid DNA	配列番号:17 TDH3-698(50)	配列番号:14 URA3+650
2	YEpGAP-Cherry plasmid DNA	配列番号:10 URA3+771c	配列番号:18 TDH3-545c

[0043] 第1節と同様の方法でPCR及びフラグメントのYHpHIS3(K7)株への導入を行い、形質転換体YEp with YHp (K7)を得た。

[0044] プラスミドYEpGAP-Cherryのマップを図3に示す。図3において、各略語は以下の通りである。TDH3p:恒常的高発現プロモーター、yEmRFP:赤色蛍光タンパク質yEmRFP遺伝子、URA3:ウラシル要求性相補遺伝子、2 micro ori:2 μ mプラスミドの複製起点、AmpR:アンピシリン耐性選択マーカー遺伝子、E. coli ori:E.coliプラスミドの複製起点、TDH3-698(50):配列番号17のプ

ライマー、URA3+650 : 配列番号 14 のプライマー、URA3+771c : 配列番号 10 のプライマー、TDH3-545c : 配列番号 18 のプライマー。また、表 8 に示す各 DNA フラグメントは、プラスミド YEpGAP-Cherry における以下の領域に相当する。DNA フラグメント 1 : TDH3p の矢印開始部分から yEmRFP-URA3 の途中まで、DNA フラグメント 2 : URA3 の途中から 2micro ori-AmpR-E.coli ori-TDH3p の途中まで。

[0045] 5. 赤色蛍光タンパク質発現 YEp プラスミド (YEpGAP-Cherry) の作製と BY4741 株への導入

第 4 節で作製したプラスミド YEpGAP-Cherry のフラグメントを、第 1 節と同様の方法で BY4741 株 (2 μ m プラスミドを保持する株、Brachmann, et al., Yeast, 14, 115, 1998) へ導入し、形質転換体 YEpGAP-Cherry (BY4741) を得た。

[0046] 6. 作製した株の評価

第 1 節～第 5 節で得られた遺伝子導入酵母を YPD 寒天培地 (1% 酵母エキス、2% ポリペプトン、2% グルコース、2% 寒天) 上でシングルコロニーにして、ランダムに選んだ 3 個のシングルコロニーを赤色蛍光測定し、平均値を求めた。

[0047] 24well プレーートの 1well 当たり 1mL 入れた YPD 培地 (1% 酵母エキス、2% ポリペプトン、2% グルコース) に遺伝子導入酵母を植菌し、30℃ で 24 時間振盪培養を行った。培養液を OD₆₅₀ が 0.16-0.26 になるように希釈し、96well プレーートに 100 μ L ずつ分注し、650nm (菌体による濁度) と 588-613nm (赤色) を 96well 光度計 Synergy (Biotek 社製) で測定した。

[0048] 結果を表 9 に示す。

表 9 から明らかなように、YHp プラスミドを用いた場合はゲノムに直接導入した場合の 50 倍以上、YEp プラスミドを用いた場合の 5～7 倍の発現を示した。

[0049]

[表9]

表9. Fluorescence intensity (588-613nm) of yeast strains containing yEmRFP				
strain	Average	±SD	OD650 range	Fold
YEpGAP-Cherry (BY4741)	4396	±501	0.21-0.26	10.7
YEp with YHp (K7)	3227	±2202	0.19-0.24	7.9
YHp (K7) (RAK17606)	22087	±2894	0.17-0.19	54.0
YCp (K7) (RAK21477)	290	±99	0.16-0.17	0.7
Genome (K7)	409	±95	0.18-0.20	1.0

Three independent strains were measured.

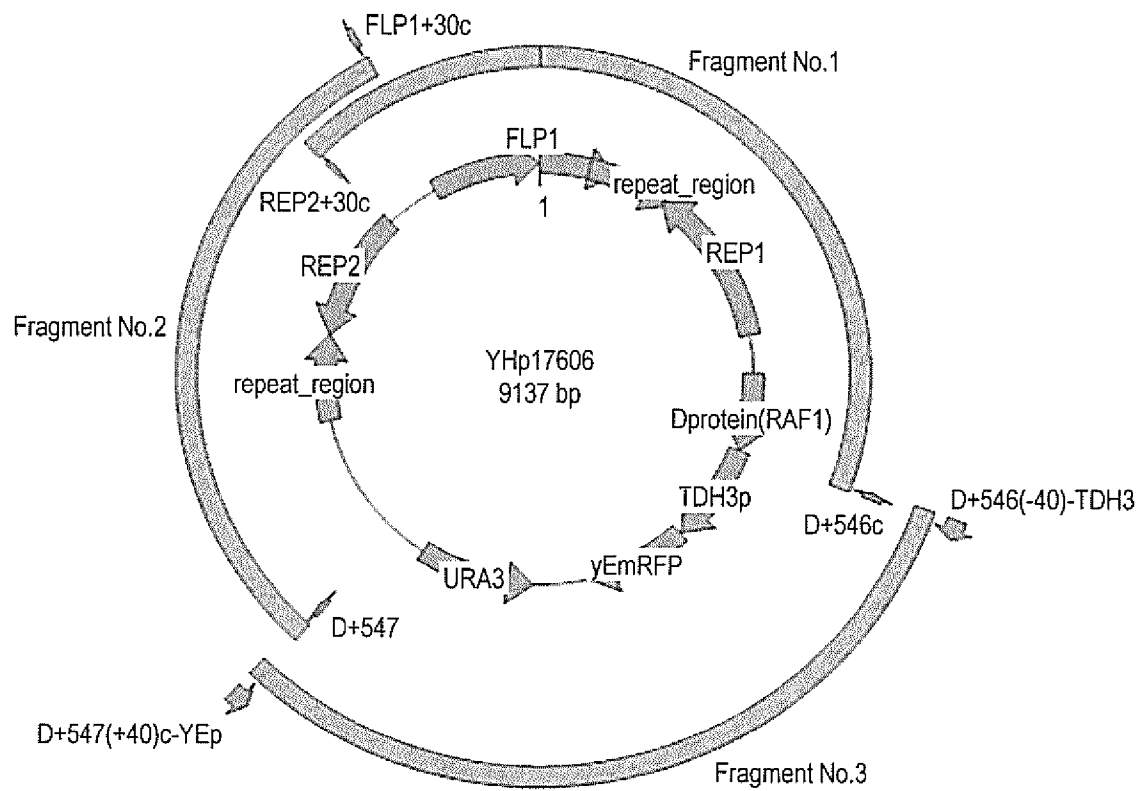
OD650 (cell growth) range were 0.16-0.26

[0050] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

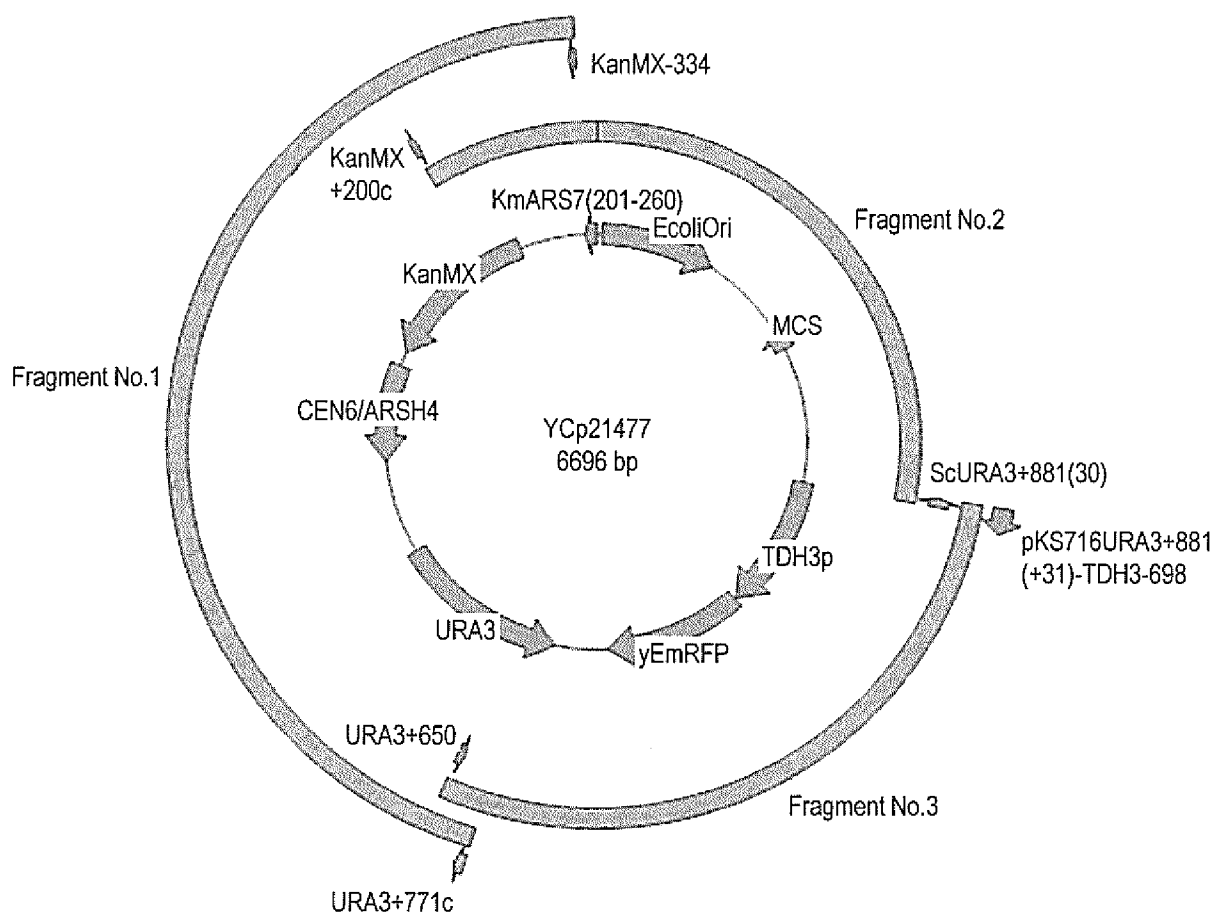
請求の範囲

- [請求項1] 2 μ mプラスミドを保持していない酵母において2 μ mプラスミドを再構成した酵母形質転換体を培養する工程を含み、前記再構成した2 μ mプラスミドは目的タンパク質をコードする遺伝子を含有する、タンパク質の生産方法。
- [請求項2] 2 μ mプラスミドを保持していない酵母が協会7号酵母又はその誘導株である、請求項1記載の方法。

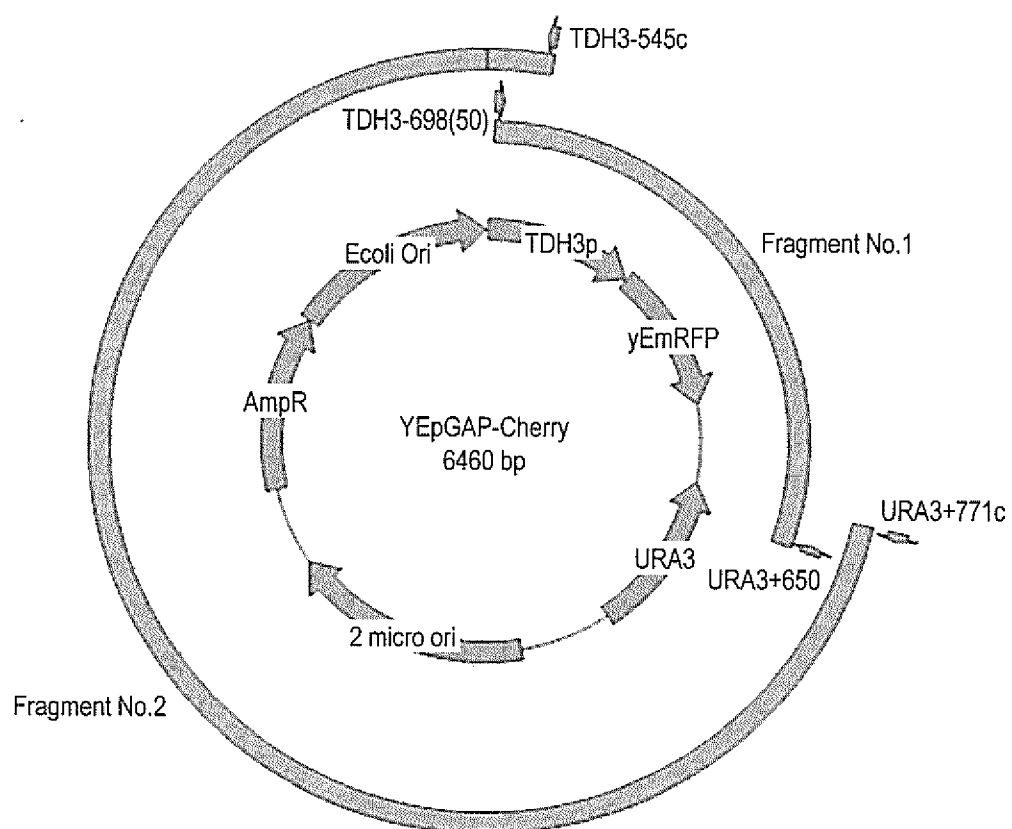
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/044879

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P21/00 (2006.01) i, C12N1/19 (2006.01) n, C12N15/09 (2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P21/00, C12N1/19, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/0084972 A1 (BARR, Philip J.) 21 April 2005,	1
Y	abstract, fig. 1, paragraphs [0034], [0050], [0076], examples & US 2009/0042278 A1 & WO 2005/014825 A2 & EP 1660661 A2	2
X	JP 8-41098 A (CIBA GEIGY AG) 13 February 1996, claims,	1
Y	embodiments & US 5861377 A, claims, examples & EP 662514 A1	2



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/044879

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	FUTCHER, A. B., The 2 μ m circle plasmid of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ., <i>Yeast</i> , 1988, vol. 4, pp. 27-40, in particular, applications: 2 μ m circle-based chimeric plasmids	1 2
X Y	JP 1-503275 A (DERUTA BAIOTEKUNOROJII LTD.) 09 November 1989, pp. 4, upper right column, lines 10-22 & US 5637504 A, column 3, lines 41-65 & GB 8708495 A & WO 1988/008027 A1 & EP 286424 A1	1 2
X Y	WO 2008/139591 A1 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) 20 November 2008, paragraphs [0032]-[0035] (Family: none)	1 2
Y	WO 2015/156369 A1 (ADEKA CORP.) 15 October 2015, paragraph [0036] & US 2017/0088824 A1, paragraph [0087] & EP 3130672 A1	2
A	CHINO, A. et al., Plasmid construction using recombination activity in the fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ., <i>PLoS ONE</i> , 2010, vol. 5, no. 3, e9652	1-2
P, X	美澄幸恵, 他, "YHp プラスミド:醸造酵母への 2 μ rn プラスミド再構成によるタンパク質高生産", 第 69 回日本生物工学会, 講演要旨集, [2017] 年 8 月 8 日発行, 第 202 頁, non-official translation (MISUMI, Sachie et al. YHp Plasmid: Protein Overproduction using 2 μ rn Plasmid Reconstruction on Brewer's Yeast. 69 th SBJ Annual Meeting, Proceedings, 08 August 2017, p. 202)	1-2
P, A	JP 2017-36223 A (YAMAGUCHI UNIVERSITY) 16 February 2017, entire text (Family: none)	1-2

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P21/00(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P21/00, C12N1/19, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	US 2005/0084972 A1 (BARR, Philip J) 2005.04.21, Abstract, Figure 1, [0034], [0050], [0076] and Examples & US 2009/0042278 A1 & WO 2005/014825 A2 & EP 1660661 A2	1 2
X Y	JP 8-41098 A (チバーガイギー アクチエンゲゼルシャフト) 1996.02.13, 特許請求の範囲、実施例 & US 5861377 A, claims and examples & EP 662514 A1	1 2

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.02.2018

国際調査報告の発送日

06.03.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川合 理恵

4 N

4046

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	FUTCHER, A. B., The 2 μ m circle plasmid of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ., Yeast, 1988, Vol. 4, pp. 27-40, 特に、 「Applications: 2 μ m circle-based chimeric plasmids」の項	1 2
X Y	JP 1-503275 A (デルタ バイオテクノロジー リミテッド) 1989.11.09, 第4頁右上欄第10-22行 & US 5637504 A, 第3カ ラム第41-65行 & GB 8708495 A & WO 1988/008027 A1 & EP 286424 A1	1 2
X Y	WO 2008/139591 A1 (財団法人科学及血清療法研究所) 2008.11.20, [0032]-[0035] (ファミリーなし)	1 2
Y	WO 2015/156369 A1 (株式会社ADEKA) 2015.10.15, [0036] & US 2017/0088824 A1, [0087] & EP 3130672 A1	2
A	CHINO, A., et al., Plasmid construction using recombination activity in the fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ., PLoS ONE, 2010, Vol. 5, Issue 3, e9652	1-2
P, X	美澄幸恵, 他, ” YH p プラスミド: 醸造酵母への 2 μ m プラスミ ド再構成によるタンパク質高生産”, 第69回日本生物工学会, 講 演要旨集, 2017年8月8日発行, 第202頁	1-2
P, A	JP 2017-36223 A (国立大学法人山口大学) 2017.02.16, 全文 (ファ ミリーなし)	1-2