

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007年11月22日 (22.11.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/132949 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/060478

(22) 国際出願日: 2007年5月16日 (16.05.2007)

(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2006-136993 2006年5月16日 (16.05.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP). キリンファーマ株式会社 (KIRIN PHARMA KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1508011 東京都渋谷区神宮前六丁目26番1号 Tokyo (JP). 第一三共株式会社 (DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 千葉靖典 (CHIBA, Yasunori) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 地神芳文 (JIGAMI, Yoshifumi) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 黒田康介 (KURODA, Kosuke) [JP/JP]; 〒3700013 群馬県高崎市萩原町100番地1 キリンファーマ株式会社 生産技術研究所内 Gunma (JP). 小林和男 (KOBAYASHI, Kazuo) [JP/JP]; 〒3700013 群馬県高崎市萩原町100番地1 キリンファーマ株式会社 生産技術研究所内 Gunma (JP). 市川公久 (ICHIKAWA,

Kimihisa) [JP/JP]; 〒1408710 東京都品川区広町1丁目2番58号第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 野中浩一 (NONAKA, Koichi) [JP/JP]; 〒9718185 福島県いわき市泉町下川字大剣389-4 第一三共株式会社内 Fukushima (JP). 鈴木健之 (SUZUKI, Takeshi) [JP/JP]; 〒9718185 福島県いわき市泉町下川字大剣389-4 第一三共株式会社内 Fukushima (JP).

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HIGH SECRETION PRODUCTION METHOD OF PROTEIN

(54) 発明の名称: タンパク質の高分泌生産方法

(57) Abstract: It is intended to provide a high secretion production means for a protein, particularly a protein whose structure is complicated such as an antibody in a host cell such as yeast. According to the invention, a transformed yeast having an activated HAC1 gene and RRBPI gene and a high secretion production method of an exogenous protein in which the transformed host cell is used and an O-type sugar chain specific to a host cell such as yeast is suppressed are provided.

(57) 要約: 本発明は、酵母などの宿主細胞において、タンパク質、特に抗体などの構造が複雑なタンパク質を高分泌生産する手段を提供することを課題とする。本発明によれば、活性型HAC1遺伝子とRRBPI遺伝子を有する形質転換酵母、該形質転換宿主細胞を用い、かつ酵母などの宿主細胞に特有のO型糖鎖を抑制することによって外来タンパク質を高分泌生産する方法が提供される。



WO 2007/132949 A1

明 細 書

タンパク質の高分泌生産方法

技術分野

本発明は、主に酵母におけるタンパク質の高分泌生産方法に関する。

背景技術

医薬品用途のタンパク質の遺伝子組換え技術による生産には、これまで宿主として主に動物細胞、大腸菌が用いられている。大腸菌は、目的タンパク質を低コストで生産することが可能であるが、糖鎖修飾に代表される修飾を行うことが出来ず、封入体（Inclusion body）中に不活化状態のタンパク質として生成するため、可溶化プロセスが必要で、複雑なタンパク質の生産には不向きである。一方、動物細胞は、目的タンパク質を活性化タンパク質として生産することができるが、細胞育種・培養に時間を要し、設備、材料費を含め、非常に高コストでの生産を余儀なくされる。

タンパク質の中でも特に抗体は古くから医薬品として利用されてきたが、ヒト以外の他起源由来のものであったため、投与された抗体自身に対する抗体が産生され、複数回の投与ができず、その利用が制限されてきた。近年、抗原結合部位以外のアミノ酸配列をヒト抗体由来の配列に置換したヒト型抗体が作製されるようになったこと、更にマウスにヒト抗体遺伝子を導入したヒト抗体生産マウスが作出されるようになったことから、抗体の医薬品としての利用が急速に広まってきた。現在これらの抗体は、ハイブリドーマや抗体をコードする遺伝子を導入したCHO細胞などの培養細胞によって生産されているが、コスト、生産性、安全性などの点で問題が多い。

近年、これらの欠点を補う意味で酵母を用いて医薬品用途のタンパク質生産を行うことが検討されているが、実用化された例はほとんどない。特に、複雑な構造を有する抗体については、Fab、単鎖抗体（ScFv）等を発現させた例（Biosci. Biotechnol. Biochem. 64:2138-2144(2000)）はあるが、抗体全長では生産性は非常に低い（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8678-8682(1988)）。また最近、哺乳類型のN結合型糖鎖を生産する酵母（*Pichia pastoris*）を利用して抗体を生産させた例（Nature Biotechnology. 24: 210-

215(2006)) が報告されるが、収率・収量については言及がない。このように、酵母での抗体の高生産は困難であるが、原因としては、酵母には十分な分泌能力がないこと、プロテアーゼによる分解などが挙げられる。

これらの問題を解決する手段の一つとして、プロテアーゼ破壊株を用いる方法が提案されており (Enzyme and Microbial Technology. 26:671-677 (2000)、Protein Expr. Purif. 20: 485-491(2000)、Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:628-631(2002))、発明者らもまた、プロテアーゼの一種である、プロテアーゼA(PEP4)、プロテアーゼB(PRB1)、ヤブシン (YPS1) 遺伝子の破壊株を用いて抗体の分解を抑制させる方法を開発している (W02003/091431)。一方、遺伝子導入によるタンパク質生産性向上の例として、BiP(KAR2)/PDI等の小胞体上でタンパク質の3次元構造形成を助ける分子シャペロン群の一部を共発現させることによってScFvの生産性を向上させる方法が報告されているが(Nat. Biotechnol. 16: 773-777(1998))、1本鎖の抗体断片を生産しているにすぎない。

また、誘導型プロモーターまたは構成的プロモーターが多く開発され、外来タンパク質の生産に利用されている。しかしながら、細胞において外来タンパク質をコードする遺伝子を強力なプロモーターを用いて高発現させた場合、またはフォールディングしにくいタンパクを生産させた場合、小胞体 (ER) 内でアグリゲーションを起こし、細胞内に蓄積されることがある。さらに、分泌タンパク質及び膜タンパク質は、タンパク質へ翻訳されると直ちに小胞体へ取り込まれ、一定の修飾を受けた後にゴルジ装置へ送られるが、このとき、何らかの理由で未熟な (unfoldな) タンパク質が小胞体へ蓄積してしまうことがある。このような状態を「小胞体ストレス」と呼ぶ。小胞体ストレスの原因としては、小胞体内で起こる修飾 (糖鎖、ジスルフィド結合の付加) の障害、小胞体からの輸送の低下などが挙げられる。哺乳類の細胞は、このような小胞体ストレスに対抗する手段として、「Unfold Protein Response (UPR)」という機構を備えており、例えば、転写抑制、分子シャペロンの誘導によるフォールディング促進、変性タンパクの分解、アポトーシスによる細胞死によって、小胞体に蓄積したタンパク質を保護する。

このUPRを制御する遺伝子として、動物細胞では、IRE1 α -XBP1の系、PERK-eIF-2 α 系、ATF6系の系が知られている。また、酵母においては、Ire1p-Hac1pの系のみが存在することが知られており、Ire1p-Hac1pは、次のようなメカニズムでUPRに関与している (図1参照)。まず、Ire1pは、通常、BiP (抗体重鎖結合タンパク) と結合しているが、アンフォ

ールド・タンパク質 (Unfold Protein: UFP) が生成された場合、BiPはこのUFPと結合する。BiPと解離したIre1pは自己リン酸化、2量体化により活性化し、エンドヌクレアーゼ活性を発揮する。一方、HAC1遺伝子は、通常、不活化された状態にあるが、エンドヌクレアーゼ活性を有するIre1pは、HAC1遺伝子から転写されたmRNAをスプライシングし、活性型Hac1pを生成する (Cell. 87 : 405-413(1996)、Cell. 90 : 1031-1039(1997)、The EMBO Journal. 18 : 3119-3132(1999))。この活性型Hac1pは核に移行し、転写因子として作用し、UPRと称する一連の反応、関連した糖鎖付加、タンパクフォールディング、タンパク分解 (ER-associated degradation: ERAD)、タンパクソーティング、脂質代謝などに関連した様々なタンパク質をコードする遺伝子の発現を促進する (Cell. 101 : 249-258(2000))。

活性型Hac1pを利用した外来タンパク質生産性の向上についての取り組みでは、糸状菌 *Trichoderma reesei* の活性型Hac1pをコードする遺伝子を *S. cerevisiae* に導入することにより異種タンパク質である α -アミラーゼ、及び内在性タンパク質であるインベルターゼを分泌向上させた例がある (Appl. Environ. Microbiol. 69:2065-2072(2003))。しかしながら単一のタンパク質である α -アミラーゼやインベルターゼは、元々分泌しやすいタンパク質として知られているものであり、生産量も2倍程度の向上しかみられない。また最近 *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) を用いて、活性型HAC1遺伝子を単独で導入した株において、抗体断片であるFabを生産したという報告がある (Biotechnology and Bioengineering. 94:353-361)。しかしながら活性型HAC1遺伝子の導入のみでは、1.3倍程度の生産性向上しか認められていない。

一方、哺乳類由来のRRBP1 (リボソーム結合タンパク 1、リボソームレセプター、p180タンパク) 遺伝子を単独で酵母に導入することにより、タンパク質 (Bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI)) を約5倍分泌させた例 (The Journal of Cell Biology. 146:273-284(1999)) が知られている。RRBP1遺伝子は、リボソームに結合するタンパクをコードする遺伝子として当初イヌから単離された (Nature. 346 : 540-544(1990))。RRBP1は分子量が180kDaでN末側に10アミノ酸残基が54回繰り返す特異な構造を持ち、この領域がリボソームと結合する。RRBP1は膜構造の増大、mRNAの安定化に関与することが知られている (The Journal of Cell Biology. 130:29-39 (1995)、The Journal of Cell Biology. 156:993-1001(2002))。しかしながら、上記のBPTIでの成功例は分子量が6500と

非常に小さいペプチドでのものであり、一般的に他の高分子量のタンパク質、更には抗体のような軽鎖、重鎖という異なったタンパク質の会合体タンパクに適応できるとは限らない。

酵母やカビでは、PMT (Protein O-mannosyltransferase) 遺伝子が酵母やカビ特有のO型糖鎖形成に関与することが知られている。このPMT遺伝子産物は、ER膜に局在し、分泌タンパク質のセリン (Ser)、スレオニン (Thr) のヒドロキシル残基にマンノースを付加する活性（以下、PMT活性と称する）を有する。PMTにより糖鎖付加を受けたタンパクの一部はマンノプロテインとして酵母の細胞壁の主構成成分となっており、PMT活性を極度に低減させた場合は、細胞壁が減弱化し細胞自体の生育に影響を与えることが知られている。

PMT 遺伝子に関し、*Saccharomyces cerevisiae* (S.cerevisiae) においては、PMT1, 2, 3, 4, 5, 6, 7の7遺伝子の存在が認められている (Biochim. Biophys. Acta., 1426:297-307 (1999))。PMT遺伝子は、PMT1ファミリー、PMT2ファミリー、PMT4ファミリーの3種に分類され、PMT1pとPMT2pはヘテロ2量体を形成し、PMT4pはホモ2量体を形成し活性を発現していることが知られている。アミノ酸配列の相同性などからPMT5pはPMT1pを、PMT3pはPMT2pを相補すると言われている。PMT6pはPMT2pおよびPMT3pと相同性が高いが、どのような複合体で活性を発現しているのかは知られていない。また各々のPMTタンパクには基質となるタンパクに選択性があることが知られている。

また、その他の出芽酵母のPMT遺伝子としては、*Candida albicans*ではS.cerevisiaeのPMT1, 2, 4, 5, 6遺伝子と相同性の高い5遺伝子 (Mol. Microbiol., 55: 546-560 (2005))、*Cryptococcus neoformans*では少なくともS.cerevisiaeのPMT4遺伝子と相同性の高い遺伝子が (Eukaryot. Cell, 6: 222-234 (2007))、分裂酵母の*Schizosaccharomyces pombe*では、同じくPMT1, 2, 4遺伝子と相同性の高い3遺伝子 (oma1, 2, 4)が見出されている (Mol. Microbiol., 57: 156-170 (2005))。更に本発明においてメタノール資化性酵母である*Ogataea minuta* (O. minuta)においては、S.cerevisiaeのPMT1, 2, 4, 5, 6遺伝子と相同性の高い5遺伝子の存在が確認された。

またカビにおいてもPMT遺伝子は見出されている。*Aspergillus nidulans*ではPmtA遺伝子他2遺伝子が、また*Trichoderma reesei*ではS.cerevisiaeのPMT2遺伝子と相同性の高いPmt1遺伝子が見出されている (Curr. Genet., 43: 11-16 (2003))。

PMT活性はペプチドの疎水的な領域に作用し、ペプチドの親水性を上げ、ER内腔でのペ

プチドの凝集を抑制する効果があると言われている。ところが外来タンパク質を生産した場合、PMT活性は時として不要なO型糖鎖を付加し、タンパク複合体の形成不全、活性の低下等を引き起こす可能性がある。特に抗体等の多量体タンパクにとっては、その会合体形成（抗体の場合、軽鎖と重鎖の会合体形成）を阻害する可能性がある。

特許第3630424号、および特表平8-509867に、PMT遺伝子改変によるO型糖鎖付加抑制による組換えタンパクの製造法が提案されているが、抗体の軽鎖・重鎖会合体形成に関する記述はない。

またO型糖鎖形成に関与するPMT1、PMT2遺伝子破壊株を用いて、O型糖鎖の付加を抑制し、抗体軽鎖、重鎖分子の会合を1.5倍程度、促進する例が示されている（WO2002/046437）。しかしながらこのデータはRIラベルしたアミノ酸を用いたパルス・ラベル実験の結果であり、培養プロセス全体を見た結果ではない。また、糖鎖付加抑制の程度は低く、しかも抗体の生産性については逆に低下している。

上記、HAC1遺伝子はUPRを誘導するが、UPRで誘導される遺伝子群の中には、酵母特有のO型糖鎖を付加するPMT遺伝子も存在することが知られている（Cell. 101: 249-258(2000)）。従ってHAC1遺伝子を導入したのみでは、抗体などの多量体タンパクを高品質で高生産することはできないと考えられる。

以上のように、酵母におけるタンパク質の高分泌生産方法については、様々な方法が提示されているが、未だに実用化レベルを達成する方法はほとんど存在しない。特に抗体をはじめとする高分子量のタンパク質、会合体タンパクを効率的に生産する方法は見出されていない。一般的に細胞に遺伝子導入・遺伝子破壊等で1つの形質を導入した場合、細胞は何らかのストレスを受けるため、他の修飾が行われたり、逆の作用が生まれる場合もある。例えば、タンパク質の高発現を行った場合、UPRが活性化された状態になるが、結果的に糖鎖修飾、プロテアソームやERAD（ER associated Degradation）による分解などの負の要素が働く。よって抗体のような複雑な構造をとるタンパク質の高分泌生産は、たとえば単独の遺伝子を導入するといったような、ただ1つの方法で達成されるものではなく、また従来の方法をいくつか単に組み合わせることで、必ずしも相乗的に効果が得られるものではない。

従って、本発明の課題は、酵母などの宿主細胞において、タンパク質、特に抗体などの構造が複雑なタンパク質を高分泌生産する手段を提供することにある。

発明の開示

そこで本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* においてタンパク質の高分泌生産に関わる遺伝子である、活性型 HAC1 (小胞体ストレス時に Ire1p により mRNA がスプライシングを受け、誘導される転写因子である Hac1 タンパク質) 遺伝子、及び RRP1 (リボソーム結合タンパク 1、リボソームレセプター、p180 タンパク) 遺伝子を共発現させることにより、抗体の分泌生産性を 10 倍近く向上できることを見出した。更に抗体などのヘテロ多量体の会合を阻害する、酵母特有のタンパク質への O 型糖鎖付加に関与する Protein O-mannosyltransferase (PMT) の活性を抑制することによって、更なる生産性の向上が実現できることを見出した。

またタンパク質の高分泌生産に関わる遺伝子である、活性型 HAC1 遺伝子を発現させ、更に抗体などのヘテロ多量体の会合を阻害する、酵母特有のタンパク質への O 型糖鎖付加に関与する Protein O-mannosyltransferase (PMT) の活性を抑制することによって、相乗的な生産性の向上が実現できることを見出した。

本発明はかかる知見により完成されたものである (図 2 参照)。

即ち、本発明は以下の発明を包含する。

〔1〕 活性型 HAC1 遺伝子と RRP1 遺伝子を有する形質転換宿主細胞。

〔2〕 以下の (1) の活性型 HAC1 遺伝子と (2) の RRP1 遺伝子を有する、〔1〕に記載の形質転換宿主細胞。

(1) 下記の (a) ~ (d) から選択される活性型 HAC1 遺伝子：

(a) 配列番号 23 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子

(b) 配列番号 23 に示すアミノ酸配列と少なくとも 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Unfolded Protein Response (UPR) を活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(c) 配列番号 23 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ UPR を活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(d) 配列番号 22 に示す塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ UPR を活性化させる機能を有するタンパク質

をコードする遺伝子

(2) 下記の (e) ~ (h) から選択されるRRBP1遺伝子:

(e) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP 1 をコードする遺伝子

(f) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP 1 のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(g) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP 1 のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(h) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP 1 遺伝子の塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

[3] 以下の (1) の活性型HAC1遺伝子と (2) のRRBP1遺伝子を有する、[1]に記載の形質転換細胞。

(1) 下記の (i) ~ (l) から選択される活性化HAC1遺伝子:

(i) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または*Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子

(j) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または*Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(k) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または*Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(l) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または*Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(2) 下記の (e) ~ (h) から選択されるRRBP1遺伝子:

(e) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP 1 をコードする遺伝子

(f) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP 1 のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(g) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP 1 のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(h) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP 1 遺伝子の塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

〔4〕 宿主細胞が真核細胞である、〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の形質転換宿主細胞。

〔5〕 真核細胞が酵母である、〔4〕に記載の形質転換宿主細胞。

〔6〕 酵母がメタノール資化性酵母である、〔5〕に記載の形質転換宿主細胞。

〔7〕 メタノール資化性酵母が*Ogataea minuta*である、〔6〕に記載の形質転換宿主細胞。

〔8〕 酵母が*Saccharomyces cerevisiae*である、〔5〕に記載の形質転換宿主細胞。

〔9〕 外来タンパク質をコードする遺伝子を導入した、〔1〕から〔8〕のいずれかに記載の形質転換宿主細胞。

〔10〕 外来タンパク質が多量体タンパク質である、〔9〕に記載の形質転換宿主細胞。

〔11〕 多量体タンパク質がヘテロ多量体である、〔10〕に記載の形質転換宿主細胞。

〔12〕 ヘテロ多量体が抗体またはその機能的断片である、〔11〕に記載の形質転換宿主細胞。

〔13〕 〔9〕から〔12〕のいずれかに記載の形質転換宿主細胞を培地に培養し、培養物から目的タンパク質を採取することを特徴とする、タンパク質の製造方法。

〔14〕 培養をProtein O-mannosyltransferase (PMT)活性を抑制する条件下で行うことを特徴とする、〔13〕に記載の製造方法。

〔15〕 Protein O-mannosyltransferase (PMT)活性の抑制が、培地にPMT活性阻害剤を添加することにより行われる、〔14〕に記載の製造方法。

〔16〕 メタノール資化性酵母の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子。

〔17〕下記の (a) から (d) のいずれかの遺伝子。

(a) 配列番号23に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子

(b) 配列番号23に示すアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつUnfolded Protein Response (UPR)を活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(c) 配列番号23に示すアミノ酸列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(d) 配列番号22に示す塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

〔18〕〔17〕に記載の遺伝子を含む発現ベクター。

〔19〕pOMexPGHy/Hac1である、〔18〕に記載の発現ベクター。

〔20〕活性型HAC1遺伝子とRRBP1遺伝子を含む発現ベクター。

〔21〕活性型HAC1遺伝子が、〔17〕に記載の遺伝子である、〔20〕に記載の発現ベクター。

〔22〕活性型HAC1遺伝子が、*Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または *Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子、またはそれらの相同遺伝子である、〔20〕に記載の発現ベクター。

〔23〕YE p351GAP-II-aHAC1/p180である、〔20〕に記載のベクター。

〔24〕RRBP1遺伝子が、ヒト若しくはイヌ由来のRRBP1遺伝子、またはそれらの相同遺伝子である、〔20〕に記載の発現ベクター。

〔25〕〔18〕から〔24〕のいずれかに記載の発現ベクターを導入した形質転換宿主細胞。

〔26〕活性型HAC1遺伝子を含む発現ベクター、及びRRBP1遺伝子を含む発現ベクターを導入した形質転換宿主細胞。

〔27〕活性型HAC1遺伝子を含む発現ベクターが〔18〕または〔19〕に記載の発現ベクターである、〔26〕に記載の形質転換宿主細胞。

〔28〕活性型HAC1遺伝子が、*Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または

*Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子、またはそれらの相同遺伝子である、〔26〕に記載の形質転換宿主細胞。

〔29〕RRBP1遺伝子が、ヒト若しくはイヌ由来のRRBP1遺伝子、またはそれらの相同遺伝子である、〔26〕に記載の形質転換細胞。

〔30〕以下の行程を含む、形質転換された宿主細胞の製造方法。

(A) 宿主細胞に対して、活性型HAC1遺伝子を導入する行程

(B) 宿主細胞に対して、RRBP1遺伝子を導入する行程

〔31〕活性型HAC1遺伝子が、以下のいずれかの遺伝子である、〔30〕に記載の製造方法：

(1) 〔17〕に記載の遺伝子

(2) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または*Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子

(3) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または*Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(4) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または*Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(5) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または*Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

〔32〕RRBP1遺伝子が以下のいずれかの遺伝子である、〔30〕に記載の製造方法：

(1) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP1をコードする遺伝子

(2) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP1のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列で表され、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(3) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP1のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ

酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列で表され、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(4) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP 1 遺伝子の塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

〔33〕 宿主細胞が真核細胞である、〔30〕から〔32〕のいずれかに記載した製造方法。

〔34〕 真核細胞が酵母である、〔33〕に記載の製造方法。

〔35〕 酵母がメタノール資化性酵母である、〔34〕に記載の製造方法。

〔36〕 メタノール資化性酵母が*Ogataea minuta*である、〔35〕に記載の製造方法。

〔37〕 酵母が*Saccharomyces cerevisiae*である、〔34〕に記載の製造方法。

〔38〕 下記の (a) から (d) のいずれかの遺伝子。

(a) 配列番号70に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子

(b) 配列番号70に示すアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつUnfolded Protein Response (UPR)を活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(c) 配列番号70に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(d) 配列番号69に示す塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

〔39〕 〔38〕に記載の遺伝子を含む発現ベクター。

〔40〕 pOMexPGHy/PpHac1である、〔39〕に記載の発現ベクター。

〔41〕 O型糖鎖合成を抑制する条件下で、活性型HAC1遺伝子及び/又はRRBP1遺伝子と外来タンパク質をコードする遺伝子とを導入した形質転換細胞を培地に培養し、培養物から目的タンパク質を採取することを特徴とする、タンパク質の製造方法。

〔42〕 O型糖鎖合成の抑制が、PMT遺伝子を分断することにより行われる、〔41〕に記載のタンパク質の製造方法。

〔43〕O型糖鎖合成の抑制が、PMT活性阻害剤を培地に添加することにより行われる、〔41〕に記載のタンパク質の製造方法。

〔44〕O型糖鎖合成の抑制が、PMT遺伝子を分断し、かつ、PMT活性阻害剤を培地に添加することにより行われる、〔41〕に記載のタンパク質の製造方法。

〔45〕PMT活性阻害剤が、5-[[3,4-(1-phenylmethoxy)phenyl]methylene]-4-oxo-2-thioxo-3-thiazolidineacetic acid または {(5Z)-4-oxo-5-[3-(1-phenylethoxy)-4-(2-phenylethoxy)benzylidene]-2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl}acetic acidである、〔43〕または〔44〕に記載のタンパク質の製造方法。

〔46〕活性型HAC1遺伝子を導入し、PMT遺伝子を分断した形質転換宿主細胞。

〔47〕宿主細胞が、*Ogataea minuta*である、〔46〕に記載の形質転換細胞。

図面の簡単な説明

図1は、*O. minuta* 活性型HAC1遺伝子の取得法、及び構造を示した図である。

図2は、本発明の技術内容の概要を示した図である。

図3は、*O. minuta* 活性型HAC1遺伝子発現ベクター (pOMexPGHy/Hac1)、ヒトRRBP1遺伝子発現ベクター (pOMexGP1A/p180)、ヒト抗体遺伝子発現ベクター (pOMexGAT-G/Ab) の構造を示した図である。

図4は、*O. minuta* 活性型HAC1遺伝子、ヒトRRBP1遺伝子を導入した抗体生産酵母株の培養上清中に分泌された抗体のウエスタン解析結果を示した図である。

図5は、*O. minuta* 活性型HAC1遺伝子、ヒトRRBP1遺伝子を導入した抗体生産酵母株の抗体分泌量の測定結果を示したグラフである。

図6は、O型糖鎖形成が抑制された条件下で培養した*O. minuta* 活性型HAC1遺伝子、ヒトRRBP1遺伝子を導入した抗体生産酵母株の培養上清中に分泌された抗体のウエスタン解析結果を示した図である。

図7は、*S. cerevisiae* 活性型HAC1発現ベクター (YE_p351GAP-II-aHAC1)、ヒトRRBP1遺伝子発現ベクター (YE_p351GAP-II-p180)、ヒト抗体遺伝子発現ベクター (YE_p352 GAP-II-alfHc/alfLc)、活性型HAC1及びRRBP1遺伝子共発現ベクター (YE_p351GAP-II-aHAC1/p180) を示した図である。

図8Aは、*S. cerevisiae* 活性型HAC1遺伝子、ヒトRRBP1遺伝子発現ベクターを導入し

た抗体生産酵母株の抗体分泌生産能を比較したグラフである。図 8 B は 0 型糖鎖形成が抑制された条件で、*S. cerevisiae* 活性型 HAC1 遺伝子、ヒト RRB P1 遺伝子発現ベクターを導入した抗体生産酵母株の抗体分泌生産能を比較したグラフである。図 8 C は、PMT 阻害剤添加・無添加の条件で、*S. cerevisiae* 活性型 HAC1 遺伝子、ヒト RRB P1 遺伝子発現ベクターを導入した抗体生産酵母株の抗体分泌生産能（絶対値）を比較したグラフである。

図 9 は、コドンを変換した合成抗体遺伝子を導入した抗体生産株での抗体の生産についてのウエスタン解析結果を示した図である。

図 10 は、各酵母由来の活性化 HAC1 遺伝子導入抗体生産株の培養上清のウエスタン解析結果を示した図である。

図 11 は、各酵母由来の活性化 HAC1 遺伝子導入抗体生産株の分泌抗体の生産量を示した図である。

図 12 は、PMT1 遺伝子または PMT2 遺伝子分断抗体生産株、および活性化 HAC1 遺伝子導入抗体生産株の培養上清のウエスタン解析結果を示した図である。

図 13 は、PMT1 遺伝子または PMT2 遺伝子分断抗体生産株、および活性化 HAC1 遺伝子導入抗体生産株の分泌抗体の生産量を示した図である。

図 14 は、PMT4 遺伝子分断抗体生産株および活性化 HAC1 遺伝子導入抗体生産株の培養上清のウエスタン解析結果を示した図である。

図 15 は、PMT4 遺伝子分断抗体生産株および活性化 HAC1 遺伝子導入抗体生産株の分泌抗体の生産量を示した図である。

図 16 A は、PMT5 遺伝子または PMT6 遺伝子破壊抗体生産株の培養上清のウエスタン解析結果を示した図である。図 16 B は、PMT5 遺伝子または PMT6 遺伝子破壊抗体生産株の分泌抗体の生産量を示した図である。

図 17 は、PMT2 遺伝子または PMT4 遺伝子を分断し、かつ活性化 HAC1 遺伝子導入した抗体生産株を用い、PMT 阻害剤 (1c) を添加して培養した培養上清のウエスタン解析結果を示した図である。

図 18 A は、PMT2 遺伝子分断し、かつ活性化 HAC1 遺伝子導入した抗体生産株を用い、PMT 阻害剤 (1c) を添加して培養した培養上清の分泌抗体の生産量を示した図である。図 18 B は、PMT4 遺伝子分断し、かつ活性化 HAC1 遺伝子導入した抗体生産株を用い、PMT 阻害剤 (1c) を添加して培養した培養上清の分泌抗体の生産量を示した図である。

図19は、種々のPMT阻害剤（ロダニン-3-酢酸誘導体）を添加して培養した培養上清のウェスタン解析結果を示した図である。

図20は、種々のPMT阻害剤（ロダニン-3-酢酸誘導体）を添加して培養した培養上清の分泌抗体の生産量を示した図である。

以下、本発明を詳細に説明する。本願は、2006年5月16日に出願された日本国特許出願2006-136993号の優先権を主張するものであり、該特許出願の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

本発明は、以下の2つの構成要素より構成される。すなわち

A. タンパク質高分泌生産に関する遺伝子の導入

B. 酵母（およびカビ）に特有のO型糖鎖付加の抑制

を組み合わせることにより、タンパク質高分泌生産に関して相乗的な効果を得ることができる。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明によれば、タンパク質高分泌生産に用いる遺伝子、該遺伝子を含む発現ベクター、該発現ベクターを導入した形質転換宿主細胞、該形質転換宿主細胞を用いるタンパク質の製造方法が提供される。

1. タンパク質高分泌生産に用いる遺伝子

(1) HAC1遺伝子

本発明において、タンパク質高分泌生産に用いる遺伝子の一つは、HAC1遺伝子である。HAC1遺伝子は、ゲノム上では不活性型のHAC1遺伝子として存在するが、小胞体ストレス時にHAC1遺伝子により転写されるmRNAがIre1pによりスプライシングを受け、転写因子であるHAC1タンパク質（Hac1p）をコードするmRNAに変換し、翻訳されるHac1pがUnfolded Protein Response（UPR）を活性化させる。本発明においては、活性型HAC1遺伝子はHAC1タンパク質（Hac1p）をコードする（mRNAに相補的な）cDNAと定義する。

従って本発明の効果をより高めるためには、活性型HAC1遺伝子を用いることが好ましいが、不活性型HAC1遺伝子の導入によっても、ある程度の効果を得ることができる。

以下、実際にUPRを機能させるHac1pをコードする活性型HAC1遺伝子について述べる。

HAC1 p はN末端より、各生物で高度に保存されたDNA結合ドメイン、ロイシン・ジッパ一領域、更にC末端側の Ire1pにより mRNAがスプライシングされ、新たに付加される未知の活性領域により構成される。

本発明に用いる活性型HAC1遺伝子としては、活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子であれば特に制限はされないが、例えば、本発明において新規に取得された *Ogataea minuta* (*O. minuta*)に由来する配列番号23に示すアミノ酸配列、または *Pichia pastoris* (*P. pastoris*)に由来する配列番号70に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAが挙げられる。また、当該DNAと機能的に同等な相同DNAであってもよい。

例えば、相同DNAとしては、配列番号23または配列番号70に示すアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつUnfolded Protein Response (UPR)を活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子；配列番号23または配列番号70に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子；配列番号22または配列番号69に示す塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子が含まれる。

上記の「配列番号23または配列番号70に示すアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列」は、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列である。タンパク質のホモロジー検索は、例えば、日本DNAデータベース (DNA Databank of JAPAN (DDBJ))等を対象に、FASTAやBLASTなどのプログラムを用いて行うことができる。

上記の「配列番号23または配列番号70に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸」における「数個」の数は特には限定されないが、数個の数は特には限定されないが、例えば20個以下、好ましくは10個以下、より好ましくは7個以下、さらに好ましくは5個以下程度を意味する。

また、上記の「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、相同性が高いDNA、すなわち配列番号22または配列番号69に示す塩基配列と少なくとも80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の相同性を有する塩基配列からなるDNAの相補鎖がハ

ハイブリダイズし、それより相同性が低いDNAの相補鎖がハイブリダイズしない条件が挙げられる。より具体的には、ナトリウム濃度が150～900mM、好ましくは600～900mMであり、温度が60～68℃、好ましく65℃での条件をいう。

上記の変異（欠失、置換、および／または付加）の導入は、Kunkel法若しくはGapped duplex法等の当該技術分野で公知の手法、またはこれに準ずる方法により行うことができ、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutant-K（タカラバイオ社製）若しくはMutant-G（タカラバイオ社製））、タカラバイオ社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットなどが利用できる。

上記の「UPRを活性化させる機能」とは、unfolded proteinの蓄積に対する小胞体（ER）の一連の防御反応（例えば、転写抑制、分子シャペロンの誘導によるフォールディング促進、変性タンパクの分解、アポトーシスによる細胞死など）を活性化させる機能をいい、

「UPRを活性化させる機能を有する」とは、該機能が、配列番号23または配列番号70に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子が有する機能と実質的に同等であることをいう。

また、活性型HAC1遺伝子は*O. minuta*および*P. pastoris*以外のメタノール資化性酵母でもよく、たとえば、*Hansenulla polymorpha* (*Pichia angusta*)、*Pichia methanolica*、*Candida boidinii*由来の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。また、他の酵母、カビなど他の生物種由来の活性型HAC1遺伝子であってもよい。たとえば、*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)由来の活性型HAC1タンパク質（GENBANK登録番号：NP_116622）をコードする遺伝子（YFL031W, 同登録番号：D26506からIre1pによりスプライシングを受けたDNA）、*Trichoderma reesei*由来の活性型HAC1タンパク質（同登録番号：CAC88374）をコードする遺伝子（同登録番号：AJ413272）、*Aspergillus nidulans*由来の活性型HacAタンパク質（同登録番号：CAC88375）をコードする遺伝子（同登録番号：AJ413273）等が挙げられる。

なお、上記の*S. cerevisiae*由来、*Trichoderma reesei*由来、*Aspergillus nidulans*由来の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列をそれぞれ配列番号39、41、43に、また対応するアミノ酸配列をそれぞれ配列番号40、42、44に示す。

また、今回単離された*Ogataea minuta*および*Pichia pastoris*由来の活性型HAC1遺伝子は、*Saccharomyces cerevisiae*以外の酵母において初めて単離されたものであり、このこ

とから、酵母全般、例えばメタノール資化性酵母全般においても同種の遺伝子の存在が強く示唆される。従って、これらの遺伝子もまた本発明において用いる活性型HAC1遺伝子に包含されるものとする。

さらに、UPRを活性化する転写因子であれば、上記の活性型HAC1遺伝子に代替して用いることが可能であり、例えば、動物細胞やその他の種由来のHAC1ホモログであるXBP-1遺伝子（ヒト由来遺伝子はGENBANK登録番号：NM_005080に記載）がIre1pによりスプライシング受け活性化された遺伝子等が挙げられる。また、HAC1(XBP-1)の活性化をとまなうIre1の人為的活性化も同UPRの活性化に対応するものなので、活性型HAC1遺伝子の導入と同等であると考えられる。さらにまた、活性化されていないHAC1遺伝子そのものを強制的に発現させても前述のように活性型HAC1の導入と同等の効果が得られる可能性を有すると考えられる。

活性型HAC1遺伝子の取得法については、UPRを誘導した状態であれば、いかなる方法でも取得可能である。例えばフォールディングが困難なタンパク質をコードする遺伝子を高発現させた細胞、ツニカマイシン等の糖鎖修飾阻害剤、DTT、過酸化水素水等の酸化還元剤やUPR誘導剤にて処理した細胞よりmRNAを取得し、これよりcDNAを合成することで取得することができる。またすでに開示されている配列を元に、DNA合成機を用いてその一部または全長を合成することで取得することもできる。

(2) RRBP1遺伝子

本発明において、タンパク質高分泌生産に用いるもう一つの遺伝子としては、RRBP1遺伝子が挙げられる。RRBP1遺伝子は、リボソーム結合タンパク 1 と呼ばれるタンパク質をコードする遺伝子で、別名、hES、ES130、ES/130、DKFZp586A1420遺伝子とも呼ばれる。哺乳類のRRBP1遺伝子はN末の膜貫通領域、それに引き続く塩基性アミノ酸に富んだ領域、10アミノ酸残基より構成される54回のリピート領域、C末側の領域より構成される。

本発明に用いるRRBP1遺伝子としては、リボソーム結合タンパク 1 をコードする遺伝子であれば特に制限はされないが、例えば、ヒト由来のRRBP1遺伝子（KIAA1398タンパクをコードする、GENBANK登録番号：AB037819）、イヌ由来のRRBP1遺伝子（リボソーム受容体p180をコードする、GENBANK登録番号：X87224）が挙げられる。また、上記遺伝子と機能的に同等である限り、その相同遺伝子であってもよい。ヒト由来のRRBP1遺伝子、イヌ由来のRRBP1遺伝子の塩基配列をそれぞれ配列番号 4 5、 4 7 に、また対応するアミノ酸配

列をそれぞれ配列番号 46、48 にそれぞれ示す。

相同遺伝子としては、例えば、ヒト由来またはイヌ由来のRRBP1のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子；ヒト由来またはイヌ由来のRRBP1のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子；ヒト由来またはイヌ由来のRRBP1遺伝子の塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子遺伝子が含まれる。なお、相同性の程度、ストリンジントな条件、変異導入法は前記と同様である。

上記相同遺伝子具体的としては、例えば、マウス (Accession No. XM_622097, XM_91338, XM_991888)、ラット (Accession No. XM_230637)、アフリカツメガエル (Xenopus) (Accession No. NM_001005671)、ゼブラフィッシュ (Danio) (Accession No. NM_199431) 由来のRRBP1遺伝子が挙げられる。

RRBP1遺伝子もまた、公知の一般手法によって取得することが可能である。例えばRRBP1遺伝子を発現している細胞からmRNAを調製し、更にcDNAを合成することで得られる。

本発明において、タンパク質高分泌生産に用いる上記遺伝子や後記の高分泌発現の対象となる外来タンパク質をコードする遺伝子（以下、これらの遺伝子を「目的遺伝子」という）は、mRNAを調製し、逆転写酵素でcDNAを合成する一般的な方法により取得することができる。上記の一般的な手法としては、例えば、目的遺伝子が発現している細胞や組織に由来するcDNAライブラリーを、当該遺伝子断片をもとにして合成したDNAプローブを用いてスクリーニングすることにより単離することができる。mRNAの調製は、当該技術分野において通常用いられる手法により行うことができる。例えば、上記細胞又は組織を、グアジニン試薬、フェノール試薬等で処理して全RNAを得、その後、オリゴ(dT)セルロースカラムやセファロース 2Bを担体とするポリU-セファロース等を用いたアフィニティーカラム法により、あるいはバッチ法によりポリ(A)+RNA (mRNA) を得る。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりポリ(A)+RNAをさらに分画してもよい。次いで、得られたmRNAを鋳型として、オリゴdTプライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖cDNAを合成し、該一本鎖cDNAからDNA合成酵素 I、DNAリガーゼ及びRnaseH等を用いて二本鎖cDNAを合成する。合成

した二本鎖cDNAをT4DNA合成酵素によって平滑化後、アダプター（例えば、EcoRIアダプター）の連結、リン酸化等を経て、 λ gt11等の λ ファージに組み込んでin vivoパッケージングすることによってcDNAライブラリーを作製する。また、 λ ファージ以外にもプラスミドベクターを用いてcDNAライブラリーを作製することもできる。その後、cDNAライブラリーから目的のDNAを有する株（ポジティブクローン）を選択すればよい。

また、また目的遺伝子をゲノムDNAから単離する場合、あるいは、プロモーター、ターミネーター領域を含む断片の単離は、一般的手法（Molecular Cloning(1989), Methods in Enzymology 194(1991)）に従い、採取源となる生物の細胞株よりゲノムDNAを抽出し、目的遺伝子を選別することにより行う。ゲノムDNAの抽出は、例えば、Cryer らの方法（Methods in Cell Biology, 12, 39-44 (1975)）およびP. Philippsenらの方法（Methods Enzymol., 194, 169-182 (1991)）に従って行うことができる。例えば、採取源が酵母の場合は、酵母のプロトプラストを調製して、当該プロトプラストから、通常公知のDNA抽出法、高塩濃度下での細胞残さ除去後のアルコール沈殿法、フェノールやクロロホルム抽出後のアルコール沈殿法等の常法を用いて行えばよい。

目的遺伝子の取得は、例えばPCR法（PCR Technology. Henry A. Erlich, Atackton press(1989)）によって行うこともできる。PCR法を用いた目的遺伝子の増幅には、プライマーとして20～30merの合成1本鎖DNAを、鋳型としてゲノムDNAを用いる。増幅された遺伝子は塩基配列を確認した後、用いる。

一方、配列未知の目的遺伝子を含む断片の取得は、(a) 常法により遺伝子ライブラリーを作製し、(b) 作製された遺伝子ライブラリーから所望のクローンを選択し、当該クローンを増幅する、ことにより行うことができる。遺伝子ライブラリーは、採取源となる生物の細胞株から常法により得た染色体DNAを適当な制限酵素によって部分消化して断片化し、得られた断片を適当なベクターに連結し、該ベクターを適当な宿主に導入することによって調製することができる。また、細胞よりmRNAを抽出し、ここからcDNAを合成後、適当なベクターに連結し、該ベクターを適当な宿主に導入することによっても調製することができる。この際用いられるベクターとしては、通常公知の遺伝子ライブラリー調製用ベクターとして知られるプラスミドを用いることができ、またファージベクター又はコスミド等も広く用いることができる。形質転換又は形質導入を行う宿主は、上記ベクターの種類に応じたものを用いればよい。

目的遺伝子断片を保持したクローンの選択は、上記遺伝子ライブラリーから、目的遺伝子に特有の配列を含む標識プローブを用いるコロニー・ハイブリダイゼーション法、プライマー・ハイブリダイゼーション法等によって行う。

また目的遺伝子を化学的に全合成することもできる。例えば相補的な2対のオリゴヌクレオチドを作製しこれらをアニールさせる方法や、数本のアニールされたDNAをDNAリガーゼにより連結する方法、または一部相補的な数本のオリゴヌクレオチドを作製しPCRによりギャップを埋める方法等により、遺伝子を合成することができる。

遺伝子のDNA配列の決定等は通常の方法、例えばジデオキシ法 (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463-5467 (1977)) 等により行うことができる。更に上記DNA塩基配列の決定は、市販のシーケンスキット等を用いることによっても容易に行い得る。

2. 発現ベクター

本発明のベクターは、上記の活性型HAC1遺伝子、RRBP1遺伝子をそれぞれ単独で含むベクター、あるいは、活性型HAC1遺伝子とRRBP1遺伝子の両遺伝子を含むベクターが提供される。活性型HAC1遺伝子、RRBP1遺伝子を宿主細胞内で発現させるために、各遺伝子を単独で含むベクターをそれぞれ用いて形質転換してもよく、また、両遺伝子を含む一つのベクターを用いて形質転換してもよい。また、同発現ベクターに外来タンパク質をコードする遺伝子を含んでもよい。あるいは、外来タンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターを別に調製してもよく、別に調製した場合は、各ベクターを宿主細胞にコトランスフェクト（共導入）する。

外来タンパク質をコードする遺伝子としては、特に限定はされないが、例えば、 α -アミラーゼ遺伝子、 α -ガラクトシダーゼ遺伝子等の各種酵素遺伝子、また医薬上有用な生理活性タンパク質であるインターフェロン α 、インターフェロン γ 等の各種インターフェロン遺伝子、IL1、IL2等の各種インターロイキン遺伝子、エリスロポエチン (EPO) 遺伝子、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 遺伝子等の各種サイトカイン遺伝子、成長因子遺伝子等が挙げられる。これらの遺伝子はいかなる手法によって得られるものでもよい。

本発明は特に疎水性の高いタンパク質、複合体を形成するような分泌生産が困難なタンパク質に対して有効であり、よって、上記の外来タンパク質には、多量体タンパク質、例

えば、抗体またはその機能的断片であるヘテロ多量体が含まれる。

活性型HAC1遺伝子、RRBP1遺伝子、及び外来タンパク質をコードする遺伝子は、発現制御領域を適宜付加してタンパク質発現ユニットとして発現ベクターを構築してもよい。タンパク質発現ユニットは、転写の読み枠の方向に、少なくともプロモーター領域、上記遺伝子、転写ターミネーター領域を有するものである。ここで使用し得るプロモーターとしては、誘導発現プロモーターであっても、構成発現プロモーターであってもよい。誘導発現プロモーターとしては、例えばメタノール資化性酵母におけるメタノール代謝に関わる、アルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子プロモーター、ジヒドロキシアセトン・シンターゼ (DAS) 遺伝子プロモーター、ギ酸脱水素酵素 (FDH) 遺伝子プロモーター等が挙げられる。また他の誘導プロモーターとしては銅誘導 (CUP) プロモーター等も用いることができる。構成発現プロモーターとしては、例えばグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (TDH、GAP) 遺伝子、ホスホグリセロキナーゼ (PGK) 遺伝子、トリオースリン酸イソメラーゼ (TPI) 遺伝子、エノラーゼ (ENO) 遺伝子、アクチン (ACT) 遺伝子、シトクロムc (CYC) 遺伝子、トレハロース合成酵素 (TPS) 遺伝子、アルコール脱水素酵素 (ADH) 遺伝子等のプロモーターなどが挙げられる。また転写ターミネーターは、プロモーターからの転写に対して転写終結を起こす活性を有する配列であればよく、プロモーターの遺伝子と同じまたは異なる遺伝子のものであってもよい。

外来タンパク質を高分泌生産させるためには強力なプロモーターを用いることが必要であるが、高活性なプロモーターを用いてフォールドしにくいタンパク質や、分泌されにくいタンパク質の生産を試みた場合、かえって分泌不全が起こることがある。これは、タンパク質の生産が、翻訳が行われるリボソーム、フォールディング・分泌が行われる小胞体のキャパシティを越えることにより、過剰に生産されたタンパクが細胞内で変性し、蓄積、ユビキチン化され、プロテオソームにて分解するような状況になるためである。従って、生成するタンパク質が変性しアグリゲーションを起こさない、または生産されたタンパク質が分泌能のキャパシティを越えない程度の発現量を達成できるプロモーターを適宜採択するか、あるいは活性を弱めるなどの調整を行って使用することが好ましい。多量体タンパク質の中でも、ヘテロ多量体を形成する分子は上記の影響を受けやすく、特に抗体のような分子は重鎖、軽鎖が2分子ずつ会合したヘテロ4量体であるため、適切に会合させるためには発現度は重要な因子である。また、活性型HAC1遺伝子の発現が強すぎる場合、細

胞にストレスがかかりすぎてかえって増殖を阻害することもあるので上記と同様にプロモーター活性の調整、最適化が必要である。

また、本発明の発現ベクターには、形質転換体を選抜するための選択マーカーを含めることができる。例えば、酵母用発現ベクターには、His1、His2、His3、His4、His5、His6、Leu2、Alg1、Alg2、Alg3、Trp1、Lys2、Ade1、Ade2、Ura3、Ura5遺伝子等から選ばれる栄養要求性マーカー遺伝子を用いることができる。

また、選択マーカーとしては、上記の栄養要求性マーカーのみならず、セルレニン、オーレオバシジン、ゼオシン、カナバニン、シクロヘキシミド、ハイグロマイシン、ブラストシジン、テトラサイクリン、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン、ネオマイシンなどの薬剤に対して耐性を付与する薬剤耐性マーカーなどを使用することで、形質転換体の選抜を行うことも可能である。また、エタノール等に対する溶剤耐性や、グリセロールや塩等に対する浸透圧耐性、銅等の金属イオン耐性等を付与する遺伝子をマーカーにすることで、形質転換体の選抜を行うことも可能である。

3. 形質転換宿主細胞

本発明の形質転換宿主細胞は、前記1. の遺伝子を有する形質転換宿主細胞、あるいは前記2. 発現ベクターを導入した形質転換宿主細胞である。

形質転換させる宿主細胞としては、真核細胞、好ましくは酵母である。酵母としては、*Ogataea minuta*、*Pichia pastoirs*、*Hansenulla polymorpha* (*Pichia angusta*)、*Candida boidinii*等のメタノール資化性酵母株、あるいは*Saccharomyces cerevisiae*、*Kluyveromyces lactis*、*Yarrowia lipolytica*、*Shizosaccharomyces pombe*等の酵母株が挙げられる。より具体的には、*Ogataea minuta*株として*Ogataea minuta* YK3株 ($\Delta och1 \Delta pep4 \Delta prb1 \Delta yps1 \Delta ura3 \Delta ade1$)、*Saccharomyces cerevisiae* として *Saccharomyces cerevisiae* BY4741株 (MATa $\Delta his3 \Delta leu2 \Delta met15 \Delta ura3$) 等を用いることができるが、これらに限定はされない。

さらに、本発明は分泌に必須であるERを補強した宿主細胞を得ることを目的としているため、動物細胞やその他の細胞にも適用可能である。

本発明において、宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、導入遺伝子が宿主内にて安定に存在し、かつ適宜発現させることができる方法であればいかなる方法でもよく、

一般的に用いられている方法、例えば、リン酸カルシウム法 (Ito et al., Agric. Biol. Chem., 48, 341 (1984))、エレクトロポレーション法 (Becker, D.M. et al. (1990) Methods. Enzymol., 194, 182-187)、スフェロプラスト法 (Creggh et al., Mol. Cell. Biol., 5, 3376 (1985))、酢酸リチウム法 (Itoh, H. (1983) J. Bacteriol. 153, 163-168)、リポフェクション法等が挙げられる。

4. タンパク質の製造方法

本発明におけるタンパク質の製造は、上記の形質転換宿主細胞を公知の方法により培養し、その培養物から採取し、精製することにより行うことができる。「培養物」とは、培養上清のほか、培養細胞、培養菌体、または細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。

形質転換宿主細胞を培地に培養する方法は、その宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

形質転換宿主細胞が酵母などの微生物の場合は、培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、該微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンスチープリカー等が用いられる。無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。また、培地には、選択マーカーの種類に応じ、オーレオバシジン、アンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を適宜添加するか、あるいは、栄養要求性を相補する遺伝子 (Leu, Ura, Trp等) によって供給可能となるアミノ酸を除いてもよい。

形質転換宿主細胞の培養は、例えば酵母の場合、培地のpHは4~7に調整するのが適当である。また、培養温度は15~32℃、好ましくは28℃前後である。抗体のように立体構造が複雑なタンパク質を発現する場合、細胞内でそのフォールディングをより効率的に行うた

めに、低温で培養することが好ましい場合もある。培養時間は、24～1000時間程度であり、培養は静置、振とう、攪拌、通気下の回分培養または連続培養等により実施することができる。

上記の培養物（培養液、培養菌体）から外来タンパク質遺伝子の発現産物の確認は、SDS-PAGE、ウェスタン解析、ELISA等により行うことができる。

また生産されたタンパク質を単離精製するためには、通常のタンパク質の単離、精製法を用いればよい。培養後、目的タンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により破碎することにより、目的タンパク質を採取する。また、目的タンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、有機溶媒による抽出等により目的タンパク質を採取し、必要に応じて各種クロマトグラフィー（疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー法、イオン交換クロマトグラフィー等）、分子篩を用いたゲルろ過法、ポリアクリルアミドゲル等を用いる電気泳動法などの手法を単独あるいは組み合わせて用いて単離精製すればよい。

上記の培養法、精製法は一例であって、これらに限定されるものではない。なお、精製された遺伝子産物が有するアミノ酸配列の確認は、公知のアミノ酸分析、例えばエドマン分解法による自動アミノ酸配列決定法等により行うことができる。

5. O型糖鎖の抑制方法（またはPMT活性の抑制方法）

本発明において、宿主細胞として酵母を用いる場合、上記の培養をProtein O-mannosyltransferase (PMT)活性を抑制する条件下で行うことがより好ましい。

哺乳類でのO型糖鎖の形成は、主にゴルジ体に存在するPeptide O-GalNAc transferaseによってGalNAcが付加されることにより行われる。この糖鎖付加は、タンパク質のフォールディング後に起こる。これに対し、酵母およびカビでのO型糖鎖の形成は、PMT遺伝子がコードするProtein-O-mannosyltransferase (PMT)によってタンパク質のセリンまたはトレオニン残基にマンノースが付加されることにより始まる。この付加反応をPMT活性という。このマンノース付加は、細胞中の小胞体（ER）においてタンパク質のフォールディングと並行して行われるため、哺乳類由来のタンパク質発現では本来起こらない部位に不要

な糖鎖が付加されることがある。その結果、不要な修飾に起因する、会合体の形成不全、活性の低下をもたらす。

従って、培養をProtein O-mannosyltransferase (PMT)活性を抑制する条件下で行うことによって、不要なO型糖鎖形成を抑制でき、ひいては、タンパク質同士の会合を促進し、タンパク質が本来有する物性・活性を保持することが可能となる。本発明における活性型 HAC1遺伝子及び／又はRRBP遺伝子の導入によるタンパク質の高分泌生産の効果は、UPRにより増大するO型糖鎖形成をPMT活性の抑制によって制御することによって、更に相乗的な効果を生むことができる。

酵母およびカビに特有のO型糖鎖付加を抑制する方法としては、例えば以下の2点が考えられる。またこれらの方法を組み合わせることもできる。

(1) 酵母およびカビに特有のO型糖鎖付加反応を行うPMT活性を抑制する条件下で培養及び生産を行う。

(2) 酵母およびカビに特有のO型糖鎖付加反応を行うPMT活性が抑制された細胞を用いる。

上記(1)のProtein O-mannosyltransferase (PMT)活性の抑制方法は、例えば、培地にPMT活性阻害剤(PMT阻害剤)を添加することにより行うことができる。PMT活性阻害剤としては、例えば、ロダニン-3-酢酸誘導体(Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14, p3975-3978 (2004)等を用いることができる。より具体的には、ロダニン-3-酢酸誘導体として、5-[[3,4-(1-phenylmethoxy)phenyl]methylene]-4-oxo-2-thioxo-3-thiazolidineacetic acid (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 14, p3975, (2004)中の化合物(1c)または{(5Z)-4-oxo-5-[3-(1-phenylethoxy)-4-(2-phenylethoxy)benzylidene]-2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl}acetic acid (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 14, p3975, (2004)中の化合物(5a)が挙げられる。上記PMT活性阻害剤(ロダニン-3-酢酸誘導体)は元々、抗菌剤として検討されたものであり、タンパク質の品質および生産性の向上のために検討されたものではなく、本発明において初めてその効果が見出された。PMTは酵母細胞壁を構成するマンノプロテインの生成に重要であり、PMT活性を低下させすぎた場合、酵母の生育に影響を与える。従って誘導発現系を用いる場合には、PMT活性阻害剤を、細胞の増殖後、外来タンパク質遺伝子の発現時に添加することがより効果的であり、O型糖鎖修飾が抑制された質の高い目的タンパ

ク質を最大限に生産できるであろう。

また、上記（２）のProtein O-mannosyltransferase (PMT)活性の抑制方法は、PMT遺伝子自体を破壊、または遺伝子の発現を抑制することによっても可能である。S. cerevisiaeにおいてPMTは、PMT1遺伝子（Genbank：L19169）、PMT2遺伝子（Genbank：L05146）、PMT3遺伝子（Genbank：X83797）、PMT4遺伝子（Genbank：X83798）、PMT5遺伝子（Genbank：X95644）及びPMT6遺伝子（Genbank：Z72984）の少なくとも6遺伝子によってコードされており、それぞれがホモ二量体（PMT4p）やヘテロ二量体（PMT1p/PMT2p）を形成して活性を有する。また糖タンパク質により作用するPMTが異なっていることが知られている。本発明においては、抗体へのO型糖鎖付加に関して、PMTタンパクに選択性があることを見出した。すなわち実施例に記載のようにPMT5またはPMT6遺伝子破壊株ではO型糖鎖付加抑制の効果はなかった。

上述のようにPMTは酵母の生育にとって重要な遺伝子であり、PMT遺伝子の破壊等、活性を消失、または極度に低下させた場合は、細胞壁が卑弱になるので、PMT遺伝子の破壊株の利用については注意を要する。必ずしも、W02002/046437に示されるようにPMT遺伝子を破壊することは有効でなく、時として生育阻害により外来タンパク質の生産に悪影響を与える場合があり、目的のタンパクのO型糖鎖の付加修飾を最低限に抑えるような、最適なPMT活性を有するPMT遺伝子の破壊あるいは発現抑制が求められる。PMT遺伝子を抑制する方法としては、例えばアンチセンスRNAやRNAiを利用する方法、プロモーターを減弱化させる方法等が示される。本発明の例では、プロモーターを減弱化させる方法として、PMT構造遺伝子部分とプロモーター領域にDNA断片を挿入し、遺伝子を分断（以下、遺伝子分断と称する場合がある。また遺伝子分断を行うためのプラスミドベクターを遺伝子分断ベクターと称する。）する方法を示している。またPMT活性は有しないがタンパクとして生成されるようなPMT遺伝子断片や活性に関与するアミノ酸残基に変異を加えた遺伝子を導入し、PMT活性を抑制する方法（ドミナント・ネガティブ）も利用できる。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。ただし、これらの実施例は本発明の技術的範囲をなんら限定するものではない。本発明の実施例で用いるプラスミド、制限酵素、DNA修飾酵素等は市販のものであり、常法に従って使用することができる。また、DNA

のクローニング、塩基配列の決定、宿主細胞の形質転換、形質転換宿主細胞の培養、得られる培養物からの酵素の採取、精製等に用いた操作についても当業者によく知られているものであるか、文献により知ることのできるものである。

〔実施例1〕 外来遺伝子発現プラスミドの構築

(1) G418耐性遺伝子をマーカーとしたA0X1遺伝子プロモーター、ターミネーターカセットとGAP遺伝子プロモーター、ターミネーターカセットからなる外来遺伝子発現タンデムベクターの構築

W02003/091431に記載のpOMex3G、及びpOMexGP1Uを材料に用いた。pOMex3GをXbaIで切断し、平滑末端処理後、SpeIリンカーを導入した。得られたベクターをpOMex3GXSと命名した。一方、pOMexGP1UをEcoT22Iで切断し、平滑末端処理後、ApaIリンカーを導入した。得られたベクターをpOMexGP1UTAと命名した。pOMexGP1UTAをHindIII-KpnIで消化し、平滑末端処理後単離したGAPプロモーター、ターミネーターを含む約2.0 kbの断片を、ApaIで消化し、平滑末端処理したpOMex3GXSに導入した。得られたベクターをpOMexGAT-Gと命名した。pOMexGAT-GはA0X1発現カセット内にSpeI-BamHIサイト、GAP発現カセット内にSalI-ApaIサイトを持つ、タンデムベクターである。

(2) ADE1遺伝子を選択マーカーとしたGAP遺伝子プロモーター及びターミネーターによる外来遺伝子発現ベクターの構築

W02003/091431に記載のpOMex4Aを材料に用いた。上記pOMexGP1UをEcoT22Iで処理し、平滑末端処理後、BamHIリンカーを導入した。得られたベクターをpOMexGP2Uと命名した。pOMexGP2UをSalIで処理し、平滑末端処理後、SpeIリンカーを導入した。得られたベクターをpOMexGP3Uと命名した。pOMexGP3UをHindIII-KpnIで消化し、GAP発現カセットを含む約2.0 kbの断片を単離した。この断片を、pOMex4AをHindIII-KpnIで処理し、単離したADE1マーカーを含む約5.0 kbの断片とライゲーションした。得られたベクターをpOMexGP1Aと命名した。pOMexGP1AはGAP発現カセット内にSpeI-BamHIサイトを持つ外来遺伝子発現ベクターである。

(3) ハイグロマイシンB耐性遺伝子を選択マーカーとしたホスホグリセリンキナーゼ(PGK1)プロモーター及びターミネーターによる外来遺伝子発現ベクターの構築

Ogataea minuta IF010746株よりホスホグリセリンキナーゼをコードするPGK1遺伝子の

取得、及びその塩基配列決定を行った。

(3-1) プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae (GENBANK登録番号 ; P00560) 及び *Candida maltosa* (GENBANK登録番号 ; P41757) 由来の保存されているアミノ酸配列RVDFNVPLD, EGKELPGVAに対応する塩基配列のDNA縮重プライマーを以下のように合成した。

PPG5: 5'-GN GTN GAY TTY AAY GTN CCN TTR GA-3' (配列番号 1)

PPG3: 5'-GY NAC DCC NGG YAA YTC YTT DCC YTC-3' (配列番号 2)

プライマーPPG5 (配列番号 1) はアミノ酸配列RVDFNVPLDに対応し、プライマーPPG3 (配列番号 2) はアミノ酸配列EGKELPGVAに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。0. minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPPG5、PPG3を用いて、PCR[94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分) ×25サイクル]を行った。増幅された約1.2kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定することで、プラスミドの挿入DNA断片に、*S. cerevisiae*及び*C. maltosa*由来のPGK1遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するクローンを選抜した。1.2kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

(3-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

0. minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動を行った。分離したDNAをHybond N+ナイロンメンブレン(アマシャム社)にトランスファーした。上記(1-3-1)で得られたDNA断片をAlkPhos DIRECT (アマシャム)を用いて標識し、サザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは、常法 (Molecular cloning 2nd edn., ed. Sambrook, J., et al., Cold Spring Harbor Laboratory U.S.A., 1989) に従って行った。その結果、約9.0 kbのBamHI断片にPGK1遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ゲノムライブラリーを作成した。0. minutaの染色体DNAをBamHIで切断し、アガロース電気泳動後、約9.0 kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をBamHIで切断したpUC118とライゲーションした後、Hanahanの方法 (Gene, 10, 63 (1980)) で大腸菌DH5α株に形質転換して、ライブラリーを作成した。約4000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニー・ハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた陽性クローンの中か

ら、PGK1遺伝子を保持したプラスミドpOMPGK1を選抜した。

(3-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMPGK1内のBamHI領域間塩基配列を、プライマーウォーキング法によって決定したところ、配列番号3に示す塩基配列を有していた。配列番号3の塩基配列には、4766番目から始まり、6016番目で終わる1254塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定される配列番号4に示すアミノ酸配列と*Saccharomyces cerevisiae*及び*Candida maltosa*由来のホスホグリセリンキナーゼとの相同性を調べたところ、それぞれ74%、81%であった。

(3-4) PGK1遺伝子プロモーターとターミネーターとを使った外来遺伝子発現カセットの構築

0. *minuta*のPGK1遺伝子プロモーターを含む断片とターミネーターを含む断片との間に外来遺伝子を導入する発現カセットを作製した。PGK1遺伝子プロモーターとターミネーターとの間にSpeI、BglIII、BamHI部位を導入するために、以下のプライマーを合成した。

OPGK-P-F : 5'-AAGCTTGACAATGTAGGAGATCATAAACACATCGTGC GCGTC-3' (配列番号5)

OPGK-P-R : 5'-GGATCCAGATCTCATATGACTAGTTGCTAGTTCTATGCCGGCGTTAGTGT TACTACTACGACAGCT-3' (配列番号6)

OPGK-T-F : 5'-GGATCCGTGGGATTTGCGTGATCTACGTAGTGGTTATTTT-3' (配列番号7)

OPGK-T-R : 5'-GGTACCGCAGTGAAAGGCGATGCCACCATGTGCAAGGAGTTC-3' (配列番号8)

上記pOMPGK1を鋳型とし、プライマーOPGK-P-F (配列番号5) とOPGK-P-R (配列番号6) を用いたPCR[94℃で30秒、55℃で1分、72℃で1分]×20サイクル、プライマーOPGK-T-F (配列番号7) とOPGK-T-R (配列番号8) を用いたPCR[94℃で30秒、55℃で1分、72℃で1分]×20サイクルを行った。それぞれ増幅された1.5 kb、1.0 kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。挿入DNA断片の塩基配列を決定し、正しい塩基配列を有するクローンを選抜した。1.5 kb、1.0 kbの挿入DNA断片はそれぞれ、HindIII-BamHI断片及びBamHI-KpnI断片として単離した。

WO2003/091431に記載のpOMex5HのBamHI-KpnI間に、上記1.0 kbのBamHI-KpnI断片を導入した。その後得られたプラスミドのHindIII-BamHI間に、上記1.5 kbのHindIII-BamHI断片を導入した。得られたプラスミドをpOMexPGHyと命名した。pOMexPGHyはPGK1遺伝子発現カセット内にSpeI、BglIII、BamHI部位を持つ外来遺伝子発現ベクターである。

〔実施例 2〕 抗体遺伝子発現ベクターの構築

*S. cerevisiae*由来のMF alpha1 (GENBANK登録番号 ; P01149)の分泌シグナル(以下aMF分泌シグナル)をクローニングするため下記のプライマー合成した。

Sp-aMFs-F : 5'-ACTAGTATGAGATTCCTTCAATTT-3' (配列番号9)

Sl-aMFs-F : 5'-GTCGACATGAGATTCCTTCAATTT-3' (配列番号10)

Xb-aMFs-R : 5'-AGCTTCAGCCTCTCTTTATCTAGAGA-3' (配列番号11)

前述と同じ方法で取得した*S. cerevisiae*のゲノムDNAを鋳型とし、プライマーSp-aMFs-F (配列番号9) とXb-aMFs-R (配列番号11) を用いたPCR[94℃で30秒、55℃で1分、72℃で30秒) ×20サイクル]、プライマーSl-aMFs-F (配列番号10) とXb-aMFs-R (配列番号11) を用いたPCR[94℃で30秒、55℃で1分、72℃で30秒) ×20サイクル]を行った。それぞれ増幅された約0.3 kb のDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。挿入DNA断片の塩基配列を確認し、得られたプラスミドを、それぞれTOP0aMFsSPとTOP0aMFsSLと命名した。

抗体遺伝子は、抗TRAILレセプター抗体遺伝子(W02002/094880)を用いた。軽鎖、及び重鎖遺伝子の両端に制限酵素サイトを導入するため、下記のプライマーを合成した。

Xb-KREAEA-Hc-F : 5'-TCTCTAGATAAAAGAGAGGCTGAAGCTCAGCTGCAGCTGCAGGAGTC-3' (配列番号12)

Hc-R-Bg : 5'-CCAGATCTGGATCCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGG-3' (配列番号13)

Xb-KREAEA-Lc-F : 5'-TCTCTAGATAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAAATTGTGTTGACACAGTC-3' (配列番号14)

Lc-R-Ap : 5'-AAAGGGCCCTCAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCT-3' (配列番号15)

これらDNAプライマーを用いてPCRにて軽鎖[94℃で30秒、55℃で1分、72℃で1分) ×20サイクル]、重鎖[94℃で30秒、55℃で1分、72℃で1分30秒) ×20サイクル]を増幅し、pCR2.1-TOPOにクローニングした。挿入DNA断片の塩基配列を確認し、得られたプラスミドをそれぞれTOP0Hc-TrailとTOP0Lc-Trailと命名した。TOP0aMFsSL からSalI-XbaI消化で単離したaMF分泌シグナルと、TOP0Lc-TrailよりXbaI-ApaI消化で単離した抗体軽鎖を、SalI-ApaIで消化したpOMexGAT-Gに3点ライゲーションで導入した。得られたプラスミドをpOMexGAT-G/Lと命名した。次にTOP0aMFsSPからSpeI-XbaI消化で単離した aMF分泌シグナ

ルと、TOPHc-TrailよりXbaI-BglIII消化で単離した抗体重鎖を、SpeI-BamHIで消化したpOMexGAT-G/Lに3点ライゲーションで導入した。得られたベクターをpOMexGAT-G/Abと命名した（図3）。pOMexGAT-G/Abは抗体重鎖と軽鎖の両発現ユニット保持した抗体発現ベクターである。

〔実施例3〕 0. minuta活性型HAC1遺伝子発現ベクターの構築

活性型HAC1遺伝子の取得は、細胞（0. minuta YK2-3株）をYPD培地で27℃にて12時間培養後、UPRを誘導すべく培地中に10 μ g/mlとなるようツニカマイシンを添加した。ツニカマイシン添加培地にて更に12時間培養を行い、集菌後、Yeastar RNA kit（ZYMO research）を用いてmRNAを調製した。

得られたmRNAをDNase I Amplification Grade（インビトロジェン）でDNase処理した。このmRNAよりSuper script III First-Strand Synthesis for RT（インビトロジェン）を用いてcDNAを合成した。このcDNAを以下に記載のDNAプライマーHAC1-1（配列番号16）及びHAC1-12（配列番号17）を用いたPCR[94℃で30秒、52℃で30秒、72℃で1分]×30サイクルにて増幅し、pCR2.1-TOPO（インビトロジェン）にクローニング後、PCRで増幅された2種類の遺伝子断片由来の塩基配列を確認した（配列番号18、19）。

HAC1-1 : 5'-ATGACTTCCTTTTCAGCACCGCATC-3'（配列番号16）

HAC1-12 : 5'-CAAAATTGCAAGCAAGTTAACCG-3'（配列番号17）

取得された2種類のcDNA断片のうち、1つはゲノム配列と一致したが、もう一方は一部欠損し、短くなっており、UPRによって活性化したIre1pによりスプライシングを受けたcDNA断片であった。活性化したHAC1のcDNAを取得するため、下記のDNAプライマーspeHAC1F（配列番号20）及びbglHAC1R（配列番号21）と上記活性化したHAC1のcDNAが存在すると考えられるcDNAプールを用いてPCR[94℃で30秒、55℃で1分、72℃で30秒]×20サイクルを行った。

speHAC1F : 5'-gactagtATGACTTCCTTTTCAGCACCG-3'（配列番号20）

bglHAC1R : 5'-cagatctTCATGACAAGAAATCATCGAAT-3'（配列番号21）

得られた約1kb断片は活性型HAC1遺伝子の開始コドンから終始コドンまでを含んでおり（配列番号22）、これは320アミノ酸からなる活性型HAC1pのアミノ酸配列に相当する（配列番号23）。これをSpeI-BglIII処理し、単離後、SpeI-BglIII処理を施したpOMexPGHyに導

入した。得られたベクターはpOMexPGHy/Hac1と命名した（図3）。このベクターは活性型HAC1遺伝子発現ユニットを保持している。

〔実施例4〕 ヒトRRBP1遺伝子発現ベクターの構築

RRBP1遺伝子については、かずさDNA研究所より分譲を受けたヒトRRBP1遺伝子（KIAA1398、GENBANK Accession No. AB037819）を用いた。この遺伝子に両端に制限酵素サイトを導入するため、下記のDNAプライマーp180 MSp-F、p180 UBg-R（配列番号24及び25）とヒトRRBP1遺伝子を用いてPCR[94℃で30秒、55℃で1分、72℃で5分×20サイクル]にて増幅した。

p180 MSp-F : 5'-ATACAATACAAAGTCGAGACTAGTATGGATATTTACGACACTCAAACCTT-3'（配列番号24）

p180 UBg-R : 5'-TCTATCCACACGGATCAGATCTTCAGACAGAGGTGCCCTCCTTTGAGCTG-3'（配列番号25）

得られた約4.5 kbの断片をSpeI-BamHI処理したpOMexGP1AにBD In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit（BD サイエンス）を用いて導入し、SpeIサイトからヒトRRBP1遺伝子の開始コドンにコードする領域を含む約500 bp、またBamHIサイトからヒトRRBP1遺伝子の終始コドンにコードする領域を含む約500 bpの配列を決定した。得られたベクターをpOMexGP1A/p180PCRと命名した。pOMexGP1A/p180PCRをNdeI-AscIで消化し、ヒトRRBP1遺伝子ORF中110 bpから4541 bpまでを含む断片を除去した。一方、かずさDNA研究所より分譲を受けたヒトRRBP1遺伝子をNdeI-AscIで消化して得られた、ORF中110 bpから4541 bpまでを含む断片を単離し、先のNdeI-AscIで消化したpOMexGP1A/p180PCRに導入した。得られたベクターをpOMexGP1A/p180と命名した（図3）。pOMexGP1A/p180はヒトRRBP1遺伝子発現用ベクターである。

〔実施例5〕 抗体発現酵母株（*O. minuta*）の作成

NotIで消化したベクターpOMexGAT-G/Abを用いて、エレクトロポレーションにより*O. minuta* YK-3株（ $\Delta och1 \Delta pep4 \Delta prb1 \Delta yps1 \Delta ura3 \Delta ade1$: W02003/091431に記載）を形質転換した。なおエレクトロポレーションの条件は、W02003/091431に記載のものを採用した。形質転換された細胞は50 μ g/mlのG418を含むYPD寒天プレート培地にて選択し、培養

後、ゲノムを抽出し、前述のDNAプライマーXb-KREAEA-Hc（配列番号12）とHc-R-Bg（配列番号13）を用いたPCRによって重鎖の導入を、Xb-KREAEA-Lc-F（配列番号14）とLc-R-Ap（配列番号15）を用いたPCRによって軽鎖の導入を確認した。重鎖、軽鎖両遺伝子の導入が確認された株を抗体生産株*O. minuta* A01株と命名した。

〔実施例6〕 活性型HAC1遺伝子及びRRBP1遺伝子を発現する抗体生産酵母株（*O. minuta*）の作成

実施例5にて育種した抗体生産株*O. minuta* A01株にSse8783Iで消化したpOMexGP1A/p180を上記のエレクトロポレーション法にて導入した。形質転換株はSD寒天プレート培地にてADE+株を選択し、培養後、ゲノムを抽出し、RRBP1遺伝子の導入を上記のp180 MSp-F（配列番号24）とp180 UBg-R（配列番号25）を用いたPCRにて確認することで取得した。得られた形質転換体を*O. minuta* AK2R株と命名した。同時にコントロールとしてSse8783Iで消化したpOMexGP1Aを用いて形質転換し、*O. minuta* AK2A株を得た。更に*O. minuta* AK2R株、*O. minuta* AK2A株にAor51HIで消化したpOMexPGHy-Hac1を上記エレクトロポレーション法によって導入した。形質転換株の活性化HAC1遺伝子の導入は、Hygromycineを50 μ g/mlとなるよう添加したYPD寒天プレート培地にて選択し、培養後、ゲノムを抽出し、上記のDNAプライマーspeHAC1F（配列番号20）とbglHAC1R（配列番号21）を用いたPCRにて確認した。得られた株を*O. minuta* AK3RH及び*O. minuta* AK3AH株と命名した。同時にコントロールとしてAor51HIで消化したpOMexPGHyをそれぞれ*O. minuta* AK2R株、*O. minuta* AK2A株に導入し、*O. minuta* AK3RHy株、*O. minuta* AK3AHy株を得た。

〔実施例7〕 形質転換酵母株（*O. minuta*）による抗体の分泌確認

O. minuta AK3RH、*O. minuta* AK3AH、*O. minuta* AK3RHy、*O. minuta* AK3AHy株をBYPMG培地[1%酵母エキス（Difco社）、2%ポリペプトン（Difco社）、1.5%メタノール、0.5%グリセロール、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)]を用いて、28℃、4日間培養した。培養液より培養上清を調製し、SDS-PAGEに供した後、分離されたタンパク質をPVDF膜にブロッティングし、ラベル化された抗ヒト抗体(anti-ヒトFc抗体、anti-ヒト κ 抗体)を用いてウェスタン解析を行ったところ、図4に示す通り、RRBP1遺伝子と活性型HAC1遺伝子導入株は、その他の株と比較して著量の抗体を分泌した。

〔実施例 8〕形質転換酵母株 (*O. minuta*) による分泌抗体の生産性

実施例 7 にて調製された培養液を ProteinA カラム (Poros A 50um 4.6mmD/50mmL、アプライドバイオシステムズ) を用いた HPLC [分離条件、平衡化緩衝液: 10mM リン酸緩衝液 (pH6.0)、溶出緩衝液: 10mM リン酸緩衝液 (pH3.4)、流速 4ml/min、検出: 波長 210nm] により、抗体生産量を測定した。スタンダードとして、動物細胞 (CHO) にて生産した抗体を用いた。OD600 = 1 当たりの抗体生産性を図 5 に示す。RRBP1 遺伝子のみが導入された *O. minuta* AK3RHy 株、及び活性型 HAC1 遺伝子のみ導入された *O. minuta* AK3AH 株の抗体分泌量は、コントロール株である *O. minuta* AK3AHy 株と比較して、増加する傾向にあった。しかしながら、活性型 HAC1 遺伝子と RRBP1 遺伝子を共発現させた *O. minuta* AK3RH 株の抗体生産量は、コントロール株である *O. minuta* AK3AHy 株はもとより、活性型 HAC1 遺伝子または RRBP1 遺伝子を単独で導入したものより顕著に高い抗体生産量を示した。以上から、活性型 HAC1 遺伝子と RRBP1 遺伝子の共発現は抗体の生産性に相乗効果以上の効果をもたらすことが確認できた。

〔実施例 9〕形質転換酵母株 (*O. minuta*) を用いた O 型糖鎖形成が抑制された条件での抗体の生産

O. minuta AK3RH 及び *O. minuta* AK3AHy を BYPG 培地 [1% 酵母エキス (Difco 社)、2% ポリペプトン (Difco 社)、0.5% グリセロール、0.1M リン酸緩衝液 (pH6.0)] で 2 日間培養後、0 μ M、1 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M、及び 50 μ M の PMT 阻害剤 (ロダニン-3-酢酸誘導体: 5-[[3,4-(1-phenylmethoxy)phenyl]methylene]-4-oxo-2-thioxo-3-thiazolidineacetic acid (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 14, p3975, (2004) 中の化合物 1c)) を添加した BYPM 培地 [1% 酵母エキス (Difco 社)、2% ポリペプトン (Difco 社)、1.5% メタノール、0.1M リン酸緩衝液 (pH6.0)] を用いて、28°C、2 日間培養した。培養液より培養上清を調製し、SDS-PAGE に供した後、分離されたタンパク質を PVDF 膜にブロッティングし、ラベル化された抗ヒト抗体 (anti-ヒト Fc 抗体) を用いてウエスタン解析を行った。その結果を、図 6 に示す。PMT 阻害剤添加濃度は 5 μ M が適当で、その場合、抗体の分泌量、会合体形成率が増大した。

〔実施例 10〕 抗体遺伝子発現ベクターの構築

*S. cerevisiae*由来のMF alpha1 (GENBANK登録番号 ; P01149)の分泌シグナル(以下aMF分泌シグナル)と抗TRAILレセプター抗体の軽鎖、及び重鎖を融合蛋白質として発現させるため、aMF分泌シグナル遺伝子と抗TRAILレセプター抗体遺伝子 (W02001/083560) を以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いたoverlap extension PCR法によって連結した。

aMF分泌シグナル-抗TRAILレセプター抗体の重鎖用

EcoALF : 5'-GGAATTCATGAGATTTCTTCAAT-3' (配列番号26)

AlfH02 : 5'-CTCCACCAGCTGTACTTCTCTTTTCTCGAGAGATA-3' (配列番号27)

AlfH03 : 5'-TATCTCTCGAGAAAAGAGAAGTACAGCTGGTGGAG-3' (配列番号28)

AlfH04 : 5'-GGTCGACTCATTTACCCGGGGACAG-3' (配列番号29)

aMF分泌シグナル-抗TRAILレセプター抗体の軽鎖用

EcoALF : 5'-GGAATTCATGAGATTTCTTCAAT-3' (配列番号26)

AlfL02 : 5'-TGGGTCATCTGAATGTCTCTTTTCTCGAGAGATA-3' (配列番号30)

AlfL03 : 5'-TATCTCTCGAGAAAAGAGACATTCAGATGACCCA-3' (配列番号31)

AlfL04 : 5'-GGTCGACCTAACACTCTCCCCTGT-3' (配列番号32)

aMF分泌シグナル遺伝子領域は、Y-DER Yeast DNA Extraction Reagent (PIERCE社) によって調製した *S. cerevisiae*のゲノムDNAを鋳型として増幅した。重鎖用として、プライマーEcoALF (配列番号26) とAlfH02 (配列番号27) を用いたPCR[95℃で10秒、55℃で30秒、68℃で60秒) ×30サイクル]を、軽鎖用として、プライマーEcoALF (配列番号26) とAlfL02 (配列番号30) を用いたPCR[95℃で10秒、55℃で30秒、68℃で60秒) ×30サイクル]を行い、それぞれ増幅された約0.26 kb の目的DNA断片を回収した。

抗体遺伝子領域は、抗TRAILレセプター抗体cDNA (W02001/083560) を鋳型として増幅した。重鎖用としてプライマーAlfH03 (配列番号28) とAlfH04 (配列番号29) を用いたPCR[95℃で10秒、55℃で30秒、68℃で90秒) ×30サイクル]を、軽鎖用として、プライマーAlfL03 (配列番号31) とAlfL04 (配列番号32) を用いたPCR[95℃で10秒、55℃で30秒、68℃で90秒) ×30サイクル]を行い、それぞれ増幅された約1.35 kb の重鎖領域と約0.65 kb の軽鎖領域の目的DNA断片を回収した。

次に、重鎖用aMF分泌シグナル領域と約1.35 kb の重鎖領域を鋳型として、プライマーEcoALF (配列番号26) とAlfH04 (配列番号29) を用いたPCR[95℃で10秒、55℃で30秒、

68℃で90秒) ×30サイクル]を行い、増幅された約1.6 kb の目的DNA断片を回収した。また、軽鎖用aMF分泌シグナル領域と約0.65 kb の軽鎖領域を鋳型として、プライマーEcoALF (配列番号26) とAlfL04 (配列番号32) を用いたPCR[95℃で10秒、55℃で30秒、68℃で60秒) ×30サイクル]を行い、増幅された約0.9 kb の目的DNA断片を回収した。それぞれ回収したDNA断片は、pCR2.1-TOP0にクローニングした。挿入DNA断片の塩基配列より、それぞれaMF分泌シグナル-抗体重鎖及びaMF分泌シグナル-抗体軽鎖が、in-frameで融合している遺伝子を有していることを確認した。得られたプラスミドは、それぞれTOP0-alfHcとTOP0-alfLcと命名した。プライマーEcoALF (配列番号26) に導入したEcoRI制限酵素部位とプライマーAlfH04 (配列番号29) とAlfL04 (配列番号32) に導入したSalI制限酵素部位を利用して、TOP0-alfHc とTOP0-alfLc から、EcoRI-SalI消化でaMF分泌シグナル-抗体重鎖とaMF分泌シグナル-抗体軽鎖をコードするDNA断片を回収した。

S. cerevisiaeにおいて抗体重鎖と抗体軽鎖を発現させるために、EcoRI-SalI消化で回収したaMF分泌シグナル-抗体重鎖とaMF分泌シグナル-抗体軽鎖をコードするDNA断片を大腸菌-酵母シャトルベクターYEp352 (Yeast 2, p163-167(1986)) に導入されたグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子 (TDH3、GAP) プロモーター-ターミネーターカセット中のEcoRI-SalI部位にライゲーションした。それぞれ得られたプラスミドをYEp352GAP-II-alfHcとYEp352GAP-II-alfLcと命名した。次に、GAPプロモーター-ターミネーターカセットの両末端にあるBamHI制限酵素部位を利用し、YEp352GAP-II-alfHcとYEp352GAP-II-alfLcから、それぞれ、BamHI-GAPプロモーター-aMF分泌シグナル-抗体重鎖-GAPターミネーター-BamHI (断片1)とBamHI-GAPプロモーター-aMF分泌シグナル-抗体軽鎖-GAPターミネーター-BamHI (断片2)をコードする遺伝子断片を回収した。断片1と断片2は、断片1または断片2を切り出した、YEp352GAP-II-alfHcまたはEp352GAP-II-alfLcのBamHI部位に3断片ライゲーションで導入した。得られたベクターをYEp352 GAP-II-alfHc/alfLcと命名した (図7)。制限酵素切断パターンよりYEp352 GAP-II-alfHc/alfLcには、断片1と断片2が順方向にタンデムに導入されていることを確認した。YEp352 GAP-II-alfHc/alfLcは、抗体重鎖と軽鎖の両発現ユニット保持した抗体発現ベクターである。

〔実施例11〕 S. cerevisiae活性型HAC1遺伝子発現ベクターの構築

*S. cerevisiae*のHAC1 前駆体 mRNAは、活性型IRE1のRNase活性によって252ヌクレオチドが除去され、HAC1 成熟体 mRNAとなる。このHAC1 成熟体 mRNAは、C末端の10アミノ酸残基が除去され、新たに18アミノ酸残基が付加された活性型HAC1に翻訳される (PNAS 97, p4660-4665 (2000))。そこで、以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いたoverlap extension PCR法によって活性型HAC1をコードする遺伝子を構築した。

HAC-Sac-ATG:5'-GGAGCTCATGGAAATGACTGATTTTG-3' (配列番号33)

HAC-internalR:5'-GAATTCAAACCTGACTGCGCTTCTGGATTACGCCAATTGTCAAG-3' (配列番号34)

HAC-internalF:5'-CTTGACAATTGGCGTAATCCAGAAGCGCAGTCAGGTTTGAATTC-3' (配列番号35)

HAC-Sma-STOP:5'-GCCCCGGGTCATGAAGTGATGAAGAAATC-3' (配列番号36)

Y-DER Yeast DNA Extraction Reagent (PIERCE社) によって調製した *S. cerevisiae*のゲノムDNAを鋳型とした。プライマーHAC-Sac-ATG (配列番号33) とHAC-internalR (配列番号34) を用いたPCR[95℃で10秒、55℃で30秒、68℃で60秒) ×30サイクル]と、プライマーHAC-internalF (配列番号35) とHAC-Sma-STOP (配列番号36) を用いたPCR[95℃で10秒、55℃で30秒、68℃で60秒) ×30サイクル]を行い、増幅された約0.66 kb (断片A) と約0.06 kb (断片B) の目的DNA断片をそれぞれ回収した。

次に、増幅した断片Aと断片Bを鋳型として、プライマーHAC-Sac-ATG (配列番号33) とHAC-Sma-STOP (配列番号36) を用いたPCR[95℃で10秒、55℃で30秒、68℃で60秒) ×30サイクル]を行い、増幅された約0.7 kb の目的DNA断片を取得した。回収したDNA断片は、pCR2.1-TOP0にクローニングした。挿入DNA断片の塩基配列より、238アミノ酸残基の活性型HAC1をコードしている遺伝子を有していることを確認した。得られたプラスミドは、TOP0-aHac1と命名した。プライマーHAC-Sac-ATG (配列番号33) に導入したSacI制限酵素部位とプライマーHAC-Sma-STOP (配列番号36) に導入したSmaI制限酵素部位を利用して、SacI-SmaI消化で活性型HAC1をコードしている遺伝子を回収した。

*S. cerevisiae*において活性型HAC1を発現させるために、SacI-SmaI消化で回収した活性型HAC1をコードしている遺伝子を大腸菌-酵母シャトルベクターYEp351 (Yeast 2, p163-167 (1986)) に導入されたグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子 (TDH3、GAP) プロモーター-ターミネーターカセット中のSacI-SmaI部位にライゲーションした。得られたプラスミドをYEp351GAP-II-aHAC1と命名した (図7)。このベクターは活性型HAC1遺伝子発現ユニットを保持している。

〔実施例 1 2〕 ヒトRRBP1遺伝子発現ベクターの構築

RRBP1 遺伝子については、かずさDNA研究所より分譲を受けたヒトRRBP1 遺伝子 (KIAA1398、GENBANK Accession No. AB037819) を用いた。この遺伝子の両端に制限酵素サイトを導入するため、以下に記載のオリゴヌクレオチドプライマーP180kpnatg、P180xbastop (配列番号37及び38) とヒトRRBP1遺伝子を用いたPCR[95℃で10秒、55℃で30秒、68℃で6分×30サイクル]にて増幅した。

P180kpnatg : 5' -GGGTACCATGGATATTTACGACACTC-3' (配列番号37)

P180xbastop : 5' -GTCTAGATCAGACAGAGGTGCCCTCC-3' (配列番号38)

得られた約4.7 kbの断片を回収し、pCR2.1-TOP0にクローニングした。挿入DNA断片の塩基配列より、挿入断片の両末端の約600bpが目的の塩基配列を正しく含んでいることを確認した。得られたプラスミドは、TOP0-P180と命名した。次に、TOP0-P180を制限酵素NdeIとHpaIによって消化し、KIAA1398の110bp-4524bpに相当する領域を含む断片を除去した。この除去領域に、KIAA1398の約4.4kbのNdeI-HpaI断片を導入し、TOP0-P180Nを構築し、大腸菌SCS110株 (Stratagene社) を使用して制限酵素XbaI部位を脱メチル化した。プライマーP180kpnatg (配列番号37) とP180xbastop (配列番号38) に導入したKpnI-XbaI制限酵素部位を利用して、RRBP1をコードしている遺伝子を含むKpnI-XbaI断片を回収した。

*S. cerevisiae*においてRRBP1を発現させるために、先に回収したKpnI-XbaI断片を大腸菌-酵母シャトルベクターYEp352 (Yeast 2, p163-167(1986)) に導入されたグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子 (TDH3、GAP) プロモーター-ターミネーターカセット中のKpnI-XbaI部位にライゲーションし、得られたプラスミドをYEp352GAP-II-p180と命名した。次に、YEp352GAP-II-p180を制限酵素PvuIで消化し、GAPプロモーター-RRBP1遺伝子-GAPターミネーターを含むPvuI断片を回収した。このPvuI断片を大腸菌-酵母シャトルベクターYEp351 (Yeast 2, p163-167(1986)) の複製必須領域、マーカー遺伝子を含むPvuI断片と連結し、YEp351GAP-II-p180を構築した (図7)。このベクターはRRBP1遺伝子発現ユニットを保持している。

〔実施例 1 3〕 活性型HAC1遺伝子及びRRBP1遺伝子共発現ベクターの構築

活性型HAC1遺伝子及びRRBP1遺伝子を*S. cerevisiae*に一つのベクターで導入するために、

活性型HAC1遺伝子及びRRBP1遺伝子共発現ベクターを構築した。実施例 1 1 で構築した YEp351GAP-II-aHAC1 を制限酵素HpaIで消化した。次に、実施例 1 2 で構築した YEp352GAP-II-p180 から GAP プロモーター-RRBP1 遺伝子-GAP ターミネーターを含む BamHI 断片を回収し、両末端を T4 DNA ポリメラーゼ（タカラバイオ社）で平滑化し、YEp351GAP-II-aHAC1 の HpaI 部位に導入した。得られたプラスミドを YEp351GAP-II-aHAC1/p180 と命名した（図 7）。塩基配列の解析によって、導入した GAP プロモーター-RRBP1 遺伝子-GAP ターミネーターを含む BamHI 断片の挿入方向を決定した。このベクターは、活性型HAC1遺伝子及びRRBP1遺伝子の発現ユニットを保持している。

〔実施例 1 4〕 抗体発現酵母株、ならびに活性型HAC1遺伝子とRRBP1遺伝子を発現する抗体発現酵母株 (*S. cerevisiae*) の構築

S. cerevisiae BY4741 株 (MATa Δ his3 Δ leu2 Δ met15 Δ ura3) のコンピテントセルは、Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit (ZYMO RESEARCH 社) によって調製した。*S. cerevisiae* BY4741 株を、5ml の YPAD 培地 [0.04% の アデニンを含む YPD 培地 (Sigma 社)] に接種し、終夜培養 (30°C、310rpm) によって得た菌体を使用した。実施例 1 0 から実施例 1 3 によって構築した発現ベクターは、Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit (ZYMO RESEARCH 社) によって *S. cerevisiae* BY4741 株に導入し、2% の寒天を含む ST 寒天培地 [2% の グルコース、0.04% の アデニン、0.3M の KC1 を含みウラシルとロイシンを欠失した Yeast Nitrogen Base and Ammonium sulfate 培地 (Sigma 社)] 上で増殖した形質転換体をそれぞれ抗体発現酵母株として選抜した。

抗体重鎖と軽鎖の発現ユニットを保持する YEp352 GAP-II-alfHc/alfLc は、宿主のウラシル要求変異を相補する URA3 マーカー遺伝子を有している。一方、YEp351 GAP-II (遺伝子が導入されていないコントロールベクター)、YEp351GAP-II-aHAC1 (活性型HAC1発現ベクター)、YEp351GAP-II-p180 (RRBP1発現ベクター)、YEp351GAP-II-aHAC1/p180 (活性型HAC1遺伝子及びRRBP1共発現ベクター) は、宿主のロイシン要求変異を相補する LEU2 マーカー遺伝子を有している。そこで、以下のように組み合わせて両ベクターが導入されたときのみ増殖できるように宿主に形質転換し、4種類の抗体発現酵母株を構築した。

S. cerevisiae T2K01 YEp352 GAP-II-alfHc/alfLc (URA3) YEp351 GAP-II (LEU2)

S. cerevisiae T2K02 YEp352 GAP-II-alfHc/alfLc (URA3) YEp351GAP-II-aHAC1 (LEU2)

S. cerevisiae T2K03 YEp352 GAP-II-alfHc/alfLc (URA3) YEp351GAP-II-p180 (LEU2)

S. cerevisiae T2K04 YEp352 GAP-II-alfHc/alfLc (URA3) YEp351GAP-II-aHAC1/p180 (LEU2)

〔実施例 15〕 形質転換酵母株 (*S. cerevisiae*) による抗体の生産性

実施例 14 で作製した *S. cerevisiae* T2K01、*S. cerevisiae* T2K02、*S. cerevisiae* T2K03、*S. cerevisiae* T2K04 株を、ST 培地を用いて 30℃、3 日間培養した。この培養液を終濃度 5% になるように YPAD 培地に接種し、30℃、3 日間培養した。培養液より培養上清を調製し酵母によって分泌生産された抗体を含む試料とした。分泌生産された抗体の定量的アッセイは、サンドイッチ ELISA 法によって行った。96 well プレートに抗 TRAIL レセプター抗体の抗原である TRAIL レセプター蛋白質を吸着させ、酵母試料を添加し、ペルオキシダーゼ標識ヒト IgG 特異的 Fc 抗体 (Peroxidase-Labeled Affinity Purified Antibody To Human IgG (Fc) (KPL 社)) と ABTS ペルオキシダーゼ基質 (KPL 社) を使用して検出した。スタンダードは、動物細胞 (NS0) で生産した抗体を用いた。

図 8 A に示すように、RRBP1 遺伝子のみが導入された *S. cerevisiae* T2K03 株は、コントロール株である *S. cerevisiae* T2K01 株とほとんど生産性は変わらなかった。しかしながら、活性型 HAC1 遺伝子のみが導入された *S. cerevisiae* T2K02 株では、コントロール株である *S. cerevisiae* T2K01 株の約 2 倍の生産性を示した。さらに、活性型 HAC1 遺伝子と RRBP1 遺伝子を共発現させた *S. cerevisiae* T2K04 株では、コントロール株である *S. cerevisiae* T2K01 株はもとより、活性型 HAC1 遺伝子または RRBP1 遺伝子を単独で導入したものより顕著に高い抗体生産量を示した (コントロールの約 7 倍)。活性型 HAC1 遺伝子と RRBP1 遺伝子の共発現は抗体の生産性に相乗効果以上の効果をもたらすことが確認された。

〔実施例 16〕 形質転換酵母株 (*S. cerevisiae*) を用いた O 型糖鎖形成が抑制された条件での抗体の生産性

実施例 14 で作製した *S. cerevisiae* T2K01、*S. cerevisiae* T2K02、*S. cerevisiae* T2K03、*S. cerevisiae* T2K04 株を、ST 培地を用いて 30℃、3 日間培養した。この培養液を終濃度 5% になるように 10 μ M の PMT 阻害剤 (ロダニン-3-酢酸誘導体: 5-[[3, 4-(1-phenylmethoxy)phenyl]methylene]-4-oxo-2-thioxo-3-thiazolidineacetic acid

(Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 14, p3975, (2004) 中の化合物1 c)) を初発添加したYPAD培地に接種し、30℃、3日間培養した。培養液より培養上清を調製し、酵母によって分泌生産された抗体を含む試料とした。実施例15と同様に、動物細胞(NS0)で生産した抗体をスタンダードとして使用したサンドイッチELISA法によって定量的アッセイを行った。

図8Bに示すように、活性型HAC1遺伝子が導入された*S. cerevisiae* T2K02株と、RRBP1遺伝子が導入された*S. cerevisiae* T2K03株では、明らかに、コントロール株である*S. cerevisiae* T2K01株より高い生産性を示した。さらに、活性型HAC遺伝子とRRBP1遺伝子を共発現させた*S. cerevisiae* T2K04株では、コントロール株である*S. cerevisiae* T2K01株はもとより、活性型HAC1遺伝子またはRRBP1遺伝子を単独で導入したものより顕著に高い抗体生産量を示した(コントロールの約8倍)。活性型HAC1遺伝子とRRBP1遺伝子の共発現による抗体生産への相乗効果は、O型糖鎖形成の抑制によってさらに効果が増大した。

〔実施例17〕*Ogataea minuta*プロテアーゼYPS1遺伝子破壊株($\Delta och1 \Delta yps1 \Delta ura3 \Delta ade1$)の作成

W02003/091431に記載のYPS1遺伝子破壊ベクターpDOMYP1をBamHIとClaIで切断して、W02003/091431に記載の*O. minuta* TK5-3株($\Delta och1 \Delta ura3 \Delta ade1$)に電気パルス法で形質転換を行った。これらの株のYPS1遺伝子が破壊されたことを確認するために、以下のプライマーを合成した。

DY5; 5' -CTCAAGGGCCTGGAGACTACG-3' (配列番号49)

DY3; 5' -CGGGATTCCCGAGTCGCTCACC-3' (配列番号50)

形質転換株から単離した染色体DNAを鋳型とし、プライマーDY5、DY3を用いて、PCR((94℃で30秒、60℃で1分、72℃で2分)×25サイクル)を行った。プラスミドがYPS1座に組み込まれた株からは、3.7kbの増幅DNA断片が検出された。選抜した株を*O. minuta* YK4株($\Delta och1 \Delta ura3 \Delta ade1 \Delta yps1::URA3$)と命名した。*O. minuta* YK4株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸(5-FOA)に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーDY5、DY3を用いたPCR((94℃で30秒、60℃で1分、72℃で3分)×25サイクル)を行った。URA3遺伝子が欠落した株から、1.2Kbの増幅DNA断片が検出された。この $\Delta och1 \Delta ura3 \Delta ade1 \Delta yps1$ 株を*O. minuta* YK5株と命名

した。

〔実施例 1 8〕 合成抗体遺伝子生産株 (*O. minuta*) の作成と抗体の生産

(1) 合成抗体遺伝子発現ベクターの構築

WO2003/091431記載のpOMexGP1UをSpeI切断、平滑末端処理後、ライゲーションさせた。得られたプラスミドのSalIサイトとEcoT22Iサイトを、それぞれSpeIサイト、BamHIサイトへリンカーチェンジした。得られたプラスミドをpOMexGP1U Δ Spと命名した。

抗体遺伝子は、抗TRAILレセプター抗体遺伝子(WO2002/094880)のアミノ酸配列より、*O. minuta*のコドン使用頻度を考慮した遺伝子をデザインし、人工合成を行った(タカラバイオ社)。軽鎖、及び重鎖遺伝子のN末端には、*S. cerevisiae* SUC2シグナルまたはChicken Lysozyme シグナルを付加し、更に両端に制限酵素サイト(5'側にXbaIサイト、3'側にBamHIサイト)の塩基配列を付加した(塩基配列番号51、53、55、57;アミノ酸配列番号52、54、56、58)。XbaI-BamHIで消化されたシグナルの異なる2種類の軽鎖遺伝子断片を実施例1(2)で作成されたベクターpOMexGP1Aへ導入し、得られたベクターをpOMexGPA/AbSUC、ならびにpOMexGPA/AbLysと命名した。XbaI-BamHIで消化されたシグナルの異なる2種類の重鎖遺伝子断片をベクターpOMexGP1U Δ SpのSpeI-BamHIサイトへ導入し、得られたベクターをpOMexGPU Δ Sp/AbSUCならびにpOMexGPU Δ Sp/AbLysと命名した。

pOMexPGHy(実施例1(3-4))を鋳型とし、DNAプライマーPGKHy-F(配列番号59)とPGKHy-R(配列番号60)を用いたPCR[94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分)×20サイクル]にて、ハイグロマイシンB耐性遺伝子を増幅した。

PGKHy-F; 5' -ATAGAACTAGCAACTAGATGAAAAAGCCTGAACTCAC-3' (配列番号59)

PGKHy-R; 5' -CAAATCCCACGGATCACTATTCCTTTGCCCTCGGAC-3' (配列番号60)

増幅した遺伝子断片をIn-fusionキット(BD Bioscience)を用いて、SpeI-BglIII消化したpOMexPGHy導入し、挿入断片の塩基配列を決定した。得られたプラスミドを鋳型とし、DNAプライマーPGKpUC-p(配列番号61)とPGKpUC-t(配列番号62)を用いたPCR[94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で2分)×20サイクル]にて、PGKプロモーター-ハイグロマイシンB耐性遺伝子-PGKターミネーターを含む遺伝子断片を増幅した。

PGKpUC-p; 5' -AATTCGAGCTCGGTACAGGGATACATGGGATACCAAAG-3' (配列番号61)

PGKpUC-t; 5' -GAGGATCCCCGGGTACCAGGGTCGATTTTCTTGGTCGA-3' (配列番号 6 2)

増幅した遺伝子断片をAsp718Iで消化したpUC118 (タカラバイオ社) へ、In-fusionキット (BD Bioscience) を用いて導入し、挿入断片の塩基配列を決定した。得られたプラスミドを、PGKHyg/pUC118と命名した。pOMexGP1U Δ Sp をHindIII-KpnIで消化し、GAPプロモーター-ターミネーターを含むカセットを単離し、HindIII-KpnI消化したPGKHyg/pUC118へ挿入した。得られたプラスミドをGAP/Hyg/pUC118と命名した。次に、pUC19 (タカラバイオ社) をNdeI-EcoRI消化、平滑末端処理後、ライゲーションすることで、pUC19内部に存在するNdeI-EcoRIの領域を除去した。このプラスミドを、HindIII-SacIで消化し、GAP/Hyg/pUC118から、HindIII-SacI消化で単離した、GAPプロモーター-ターミネーターと、PGKのプロモーター-ハイグロマイシンB耐性遺伝子-PGKターミネーターを持つ遺伝子断片を挿入した。得られたプラスミドを、pOMexHyと命名した。

XbaI-BamHで消化されたChicken Lysozymeシグナルが付加された抗体重鎖遺伝子断片を、SpeI-BamHI処理を施したpOMexHyへ導入し、得られたベクターをpOMexHy/AbLysと命名した。

(2) 抗体遺伝子発現酵母株の作成

NotIで消化した抗体発現ベクターpOMexGPA/AbLysとpOMexGPU Δ Sp/AbLysを用いて、エレクトロポレーションにより0. minuta YK5株 (Δ och1 Δ yps1 Δ ura3 Δ ade1) を形質転換した。なおエレクトロポレーションの条件は、W02003/091431に記載のものを採用した。形質転換された細胞はSD寒天プレート培地[2%グルコース、0.67%酵母ニトロゲンベース (Difco社)]にて選択した。単一コロニーをB2YP4G培地[1.34%酵母ニトロゲンベース (Difco社)、2%酵母エキス (Difco社)、4%ポリペプトン (Difco社)、4%グリセロール、0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.0)]を用いて、27℃、4日間培養した。培養液より培養上清を調製し、実施例7に記載の方法にてウエスタン解析を行い、抗体軽鎖および重鎖遺伝子が導入された抗体生産株を選択し、0. minuta AA1株と命名した。図9に示す通り、0. minuta AA1株は、実施例5で作成した0. minuta A01株と比較して、著量の抗体を分泌していた。

NotIで消化した抗体発現ベクターpOMexGPA/AbSUCとpOMexGPU Δ Sp/AbSUCをW02003/091431に記載の0. minuta TK5-3株 (Δ och1 Δ ura3 Δ ade1) に導入し抗体発現株0. minuta YY1を得た。エレクトロポレーション法ならびに、株の選択方法は上記と同様の方法を用いた。

〔実施例 19〕 *P. pastoris*の活性型HAC1遺伝子の取得と発現ベクターの構築

*P. pastoris*活性型HAC1遺伝子の取得は、細胞 (*P. pastoris* GS115株) より実施例 3 と同様の方法で取得した。実施例 3 の方法にて、*P. pastoris* GS115株よりcDNAを合成した。このcDNAを以下に記載のDNAプライマーHACp1-1 (配列番号 6 3) 及びHACp1-12 (配列番号 6 4) を用いたPCR[94℃で30秒、52℃で30秒、72℃で1分) ×30サイクル]にて増幅し、pCR2.1-TOPO (インビトロジェン) にクローニング後、PCRで増幅された2種類の遺伝子断片由来の塩基配列を確認した (配列番号 6 5、6 6)。

HACp1-1 : 5'-ATGCCCCGTAGATTCTTCTCATAAGACAGC-3' (配列番号 6 3)

HACp1-12 : 5'-CAAAGTCATTTAAATCAAATGCATTAGCGG-3' (配列番号 6 4)

取得された2種類のcDNA断片のうち、1つ (配列番号 6 5) はゲノム配列と一致したが、もう一方 (配列番号 6 6) は一部欠損し、短くなっており、UPRによって活性化したIre1pによりスプライシングを受けたcDNA断片であった。活性化したHAC1のcDNA全長を取得するため、下記のDNAプライマーspeHACp1F (配列番号 6 7) 及びbglHACp1R (配列番号 6 8) と上記活性化したHAC1のcDNAが存在すると考えられるcDNAプールを用いてPCR[94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分) ×20サイクル]を行った。

speHACp1F : 5'-gactagtATGCCCCGTAGATTCTTCTCATA-3' (配列番号 6 7)

bglHACp1R : 5'-cagatctCTATTCCTGGAAGAATACAAAGT-3' (配列番号 6 8)

得られた約1kb断片は*P. pastoris*由来活性型HAC1遺伝子の開始コドンから終始コドンまでを含んでおり (配列番号 6 9)、これは304アミノ酸からなる活性型HAC1pのアミノ酸配列に相当する (配列番号 7 0)。これをSpeI-BglIII処理し、単離後、SpeI-BglIII処理を施したpOMexPGHy (実施例 1 (3-4)) に導入した。得られたベクターはpOMexPGHy/PpHac1と命名した。このベクターは*P. pastoris*由来活性型HAC1遺伝子発現ユニットを保持している。

〔実施例 20〕 *S. cerevisiae*活性型HAC1遺伝子発現ベクターの構築

実施例 11 で作成された*S. cerevisiae*活性型HAC1遺伝子を含むTOP0-aHac1をテンプレートとして、DNAプライマーSchAC-XbaF (配列番号 7 1) とDNAプライマーSchAC-BamR (配列番号 7 2) を用いてPCR[94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分) ×20サイクル]で*S. cerevisiae*活性型HAC1遺伝子を増幅した。

ScHAC-XbaF : 5'-gtctagaATGGAAATGACTGATTTTGAAC-3' (配列番号 7 1)

ScHAC-BamR : 5'-cggatccTCATGAAGTGATGAAGAAATCAT-3' (配列番号 7 2)

これをXbaI-BamHI消化し、*S. cerevisiae*由来活性型HAC1をコードしている遺伝子を回収した。単離後、SpeI-BglIII処理を施したpOMexPGHy (実施例 1 (3-4)) に導入した。得られたベクターはpOMexPGHy/ScHac1と命名した。このベクターは*S. cerevisiae*由来活性型HAC1遺伝子発現ユニットを保持している。

〔実施例 2 1〕*O. minuta*、*P. pastoris*、*S. cerevisiae*活性型HAC1遺伝子が導入された*O. minuta*株による抗体生産

(1) *O. minuta*、*P. pastoris*、*S. cerevisiae*活性型HAC1遺伝子が導入された*O. minuta*株の作成

実施例 1 8 にて育種した抗体生産株*O. minuta* AA1株に、Aor51HIで消化した*O. minuta*由来活性型HAC1遺伝子発現ベクターpOMexPGHy/Hac1、*P. pastoris*由来活性型HAC1遺伝子発現ベクターpOMexPGHy/PpHac1、および*S. cerevisiae*由来活性型HAC1遺伝子発現ベクターpOMexPGHy/ScHac1を上記エレクトロポレーション法によって導入した。各形質転換株の活性型HAC1遺伝子の導入は、ハイグロマイシンBを50 μ g/mlとなるよう添加したYPD寒天プレート培地にて選択し、培養後、ゲノムを抽出し、*O. minuta*由来活性型HAC1遺伝子発現ベクターpOMexPGHy/Hac1については、実施例 3 記載のDNAプライマーspeHAC1F (配列番号 2 0) とbglHAC1R (配列番号 2 1) を用いたPCRにて確認した。*P. pastoris*由来活性型HAC1遺伝子については、上記のDNAプライマーspeHACp1F (配列番号 6 7) とbglHACp1R (配列番号 6 8)、*S. cerevisiae*由来活性型HAC1遺伝子については、DNAプライマーScHAC-XbaF (配列番号 7 1) とScHAC-BamR (配列番号 7 2) を用いたPCR[94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分) ×30サイクル]にて確認した。得られた株を*O. minuta* AA2omH株、*O. minuta* AA2ppH株及び*O. minuta* AA2scH株と命名した。同時にコントロールとしてAor51HIで消化したpOMexPGHy を*O. minuta* AA1株に導入し、*O. minuta* AA2Hy株を得た。

(2) HAC1遺伝子導入抗体生産株による抗体の分泌確認

上記 (1) で作成されたHAC1遺伝子導入抗体生産株、*O. minuta* AA2omH株、*O. minuta* AA2ppH株、*O. minuta* AA2scH株ならびに*O. minuta* AA2Hy株を実施例 1 8 (2) に示した方法で培養し、非還元条件化でのウエスタン解析を行った。その結果、図 1 0 に示す通り、

0. minuta AA2omH株、0. minuta AA2ppH株、0. minuta AA2scH株は、上記（１）で作成したコントロールの0. minuta AA2Hy株と比較して、抗体分子への糖鎖の付加が見られ、抗体H2L2会合体の顕著な分泌促進効果は認められなかったが、宿主と異なる種由来のHAC1遺伝子を導入しても同様の生産効果が期待できると考えられた。

（３）HAC1遺伝子導入0. minuta抗体生産株による分泌抗体の生産性（TR-FRETを原理としたホモジニアス分析による定量）

12 μ l の 0.97 μ g/ml LANCE Eu-W1024 labeled anti-human IgG（PerkinElmer社）、8.3 μ g/ml Biotin-conjugated mouse anti-human IgG（BD Bioscience社）、16.7 μ g/ml Surelight APC streptavidin（PerkinElmer社）、10%ブロックエース（大日本製薬社）を含む20mM トリス塩酸緩衝液（pH7.2）を96ウェル・ハーフエリアプレート（CORNING社）に加え、上記（２）にて調製された培養液を適宜、10%ブロックエースを含む20mM トリス塩酸緩衝液（pH7.2）で希釈したサンプルを2 μ l 入れ攪拌した。室温、暗所で1時間反応後、EnVision（PerkinElmer社）を用いて、蛍光を測定した。665nm/615nmの値より会合抗体生産量を測定した。スタンダードとして、動物細胞（CHO）にて生産した抗体を用いた。図11に示す通り、活性化HAC1遺伝子が導入された0. minuta AA2omH株、0. minuta AA2ppH株、0. minuta AA2scH株にて、0. minuta AA2Hy株と比較して、顕著な抗体の分泌促進は認められなかったが、宿主と異なる種由来のHAC1遺伝子を導入しても同様の生産効果が期待できると考えられた。

（４）PMT阻害剤（1c）を用いたHAC1遺伝子が導入された0. minuta株による抗体生産

0. minuta AA2omH株、0. minuta AA2ppH株、0. minuta AA2scH株、および0. minuta AA2Hy株を5mlのB2YP4G培地に1白金耳、植菌し27℃、1日間培養後、OD600が10になるようにB2YP4G培地にて希釈し、実施例9に記載のPMT阻害剤（1c；原液濃度10mM）を2 μ Mとなるように添加した。更に27℃、3日間培養し、24時間毎にOD600を測定し、OD600の1増加につき0.04 μ MづつPMT阻害剤（1c）を添加した。培養液より培養上清を調製し、実施例21（３）に記載の方法にて、抗体生産量を測定した。その結果を、図11に示す。活性化HAC1遺伝子が導入された0. minuta AA2omH株、0. minuta AA2ppH株、0. minuta AA2scH株にて、PMT阻害剤を添加して培養することで、コントロールに当たる0. minuta AA2Hy株と比較して、抗体の分泌促進効果を認めた。

以上のように、異種のHAC1遺伝子を用いても、抗体の分泌促進効果を有することが認

められた。

〔実施例 2 2〕 *O. minuta* 由来PMT遺伝子の単離

O. minuta 由来PMT1遺伝子の取得は、*O. minuta* IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、DNAプライマーPM1-5（配列番号 7 3）、PM1-3（配列番号 7 4）を用いて、PCR[94℃で30秒、55℃で1分、72℃で2分）×25サイクル]を行った。

PM1-5 : 5'-ATGGCGGGCAAAAATCAGAAATCTAGCGCG-3'（配列番号 7 3）

PM1-3 : 5'-TTACAACTCGTCTTTGACTAGAGGCGGGGA-3'（配列番号 7 4）

増幅された約2.4kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、挿入断片の塩基配列（配列番号 7 5）を決定することで、プラスミドの挿入DNA断片に、*S. cerevisiae*由来のPMT1遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列（配列番号 7 6）をコードする塩基配列を有するクローンを選抜した。単離されたプラスミドをp0mPM1と命名した。

また*O. minuta* 由来PMT2遺伝子については、DNAプライマーPM2-5（配列番号 7 7）、PM2-3（配列番号 7 8）を用い、PMT4遺伝子については、DNAプライマーPM4-5（配列番号 7 9）、PM4-3（配列番号 8 0）を用い、PMT5遺伝子については、DNAプライマーPM5-5（配列番号 8 1）、PM5-3（配列番号 8 2）を用い、PMT6遺伝子については、DNAプライマーPM6-5（配列番号 8 3）、PM6-3（配列番号 8 4）を用い、PMT1遺伝子と同様の方法にて取得し、PMT2遺伝子（塩基配列：配列番号 8 5、アミノ酸配列：配列番号 8 6）、PMT4遺伝子（塩基配列：配列番号 8 7、アミノ酸配列：配列番号 8 8）、PMT5遺伝子（塩基配列：配列番号 8 9、アミノ酸配列：配列番号 9 0）および、PMT6遺伝子（塩基配列：配列番号 9 1、アミノ酸配列：配列番号 9 2）を含むプラスミドを、それぞれp0mPM2、p0mPM4、p0mPM5およびp0mPM6と命名した。

PM2-5 : 5'-ATGGGCGAACGTACGGGCAAAAGTGCCTC-3'（配列番号 7 7）

PM2-3 : 5'-CTAATCGGAAATTCTCCACGTGCTCAAGAG-3'（配列番号 7 8）

PM4-5 : 5'-ATGGGGCCCAAAATAAGACCGGCAAGAAA-3'（配列番号 7 9）

PM4-3 : 5'-CTATTTAGCAAAATGCAGTTTGATGTTGAG-3'（配列番号 8 0）

PM5-5 : 5'-ATGGACGAGAAAAACATCTCTGGCTTAGAA-3'（配列番号 8 1）

PM5-3 : 5'-CTACTCACTATAGACGGAGCAGTCGATCGA-3'（配列番号 8 2）

PM6-5 : 5'-ATGTCCGAGTCAGAGCTGAGAAACCGCAAA-3' (配列番号 8 3)

PM6-3 : 5'-CTAAGCTATACGCCAGGTGGAAACCCAGTT-3' (配列番号 8 4)

〔実施例 2 3〕 0. minuta の PMT 遺伝子分断または破壊ベクターの作成

(1) PMT 遺伝子分断ベクターの作成

(1-1) PMT1 遺伝子分断ベクターの作成

実施例 2 2 で得られた p0mPM1 を用いて、PMT1 遺伝子の部分配列を単離するため、以下の DNA プライマー PMT1hIII (配列番号 9 3)、PMT1Kp (配列番号 9 4) を用いて、PCR[94℃ で 30 秒、55℃ で 30 秒、72℃ で 2 分) × 15 サイクル]を行った。

PMT1hIII : 5'-caagcttGGACCTACAACACGTCCGAAGAA-3' (配列番号 9 3)

PMT1Kp : 5'-cggtaccGGTTTGATACCTTGGGTGGCACA-3' (配列番号 9 4)

増幅された約 1.6kb の DNA 断片を HindIII-KpnI で消化し回収した。次に pPICZ α (Invitrogen) を BglII 消化し、平滑末端処理後、HindIII リンカーを挿入、さらに BamHI 消化し、平滑末端処理後、KpnI リンカーを挿入した。得られたプラスミドを pZ-Hd-Kp と命名した。pZ-Hd-Kp を HindIII-KpnI で消化し、ゼオシン耐性遺伝子を含む 2.0kb の DNA 断片を単離後、上記 PCR にて増幅された PMT1 遺伝子部分配列を挿入した。挿入された PMT1 遺伝子の部分配列の塩基配列を決定した後、得られたプラスミドを p0mPM1dZ と命名した。p0mPM1dZ は 0. minuta PMT1 遺伝子の構造遺伝子 (CDS) 部分とプロモーター領域を分断し、PMT1 遺伝子の転写を抑制することができる。一方、実施例 1 8 にて作成した p0MexGPU Δ Sp を HindIII-KpnI で消化し、GAP プロモーターとターミネーターを含む遺伝子断片を回収後、上記 HindIII-KpnI で消化した、ゼオシン耐性遺伝子を含む 2.0kb の DNA 断片へ挿入した。得られたプラスミドを GAP/Z と命名した。

(1-2) PMT2 遺伝子分断ベクターの作成

実施例 2 2 で得られた p0mPM2 を用いて、PMT2 遺伝子の部分配列を単離するため、以下の DNA プライマー PMT2hIII (配列番号 9 5)、PMT2Kp (配列番号 9 6) を用いて、PCR[94℃ で 30 秒、55℃ で 30 秒、72℃ で 2 分) × 15 サイクル]を行った。

PMT2hIII : 5'-gaagcttACTACATAATTCGTGTACGTGTTC -3' (配列番号 9 5)

PMT2Kp : 5'-cggtaccGTCGCCGTATTGGTCAGCAATCTC -3' (配列番号 9 6)

増幅された約 1.5kb の DNA 断片を回収し、HindIII-KpnI で消化し回収した。得られた DNA

断片は、pZ-Hd-KpをHindIII-KpnI処理することで単離されたゼオシン耐性遺伝子を含む2.0kbのDNA断片に挿入後、挿入されたPMT2遺伝子の部分配列の塩基配列を決定した。得られたプラスミドをp0mPM2dZと命名した。p0mPM2dZは*O. minuta* PMT2遺伝子の構造遺伝子(CDS)部分とプロモーター領域を分断し、PMT2遺伝子の転写を抑制することができる。

(1-3) PMT4遺伝子分断ベクターの作成

実施例22で得られたp0mPM4を用いて、PMT4遺伝子の部分配列を単離するため、以下のDNAプライマーPMT4FHdinf(配列番号97)、PMT4RKpinf(配列番号98)を用いて、PCR[94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で2分]×15サイクルを行った。

PMT4FHdinf: 5'-GTCATGAGATCCaagctGATCCCTCAATGGAGATCTACT-3'(配列番号97)

PMT4RKpinf: 5'-GGTGTGTGGGGGATCgGGATGCAAATGGATGGCTCGAAC-3'(配列番号98)

得られた約1.5kbのDNA断片を、pZ-Hd-KpからHindIII-KpnI処理によって単離された、ゼオシン耐性遺伝子を含む2.0kbのDNA断片へ、In-fusionキット(BD Bioscience社)を用いて導入した。挿入されたPMT4遺伝子の部分配列の塩基配列を決定した後、得られたプラスミドをp0mPM4dZと命名した。

(2) PMT遺伝子破壊ベクターの作成

(2-1) PMT5遺伝子破壊ベクターの作成

WO2003/091431に記載の*O. minuta*のURA3構造遺伝子の前後に約0.8kbの反復配列を有する遺伝子断片を含むpROMU1をHindIII消化、平滑末端処理後、BamHIリンカーを挿入した。得られたベクターをBamHI-BglII消化し、反復配列ならびに*O. minuta*のURA3遺伝子を含む約3.3kbの断片を、BamHIで消化したpBluescriptKS-(Stratagene)に導入した。得られたベクターをrURApBKSと命名した。

O. minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、DNAプライマーPMT5maeF2(配列番号99)とPMT5maeR(配列番号100)を用いて、PCR[94℃で30秒、55℃で1分、72℃で2分]×25サイクルを行った。増幅された約1.5kbのDNA断片を回収し、BamHI-HindIIIで消化したrURApBKSへIn-fusionキット(BD Bioscience)を用いて導入し、挿入された遺伝子断片の塩基配列を決定した。得られたベクターをPMT5K/0/rURA3preと命名した。

O. minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、DNAプライマーPMT5ushiroF(配列番号101)とPMT5ushiroR(配列番号102)を用いて、PCR[94℃で30秒、55℃で1分、72℃で2分]×25サイクルを行った。増幅された約1.5kbのDNA断片を回収し、NotIで消化した

PMT5K/0/rURA3preへIn-fusionキット(BD Bioscience)を用いて導入し、挿入された遺伝子断片の塩基配列を決定した。得られたベクターをPMT5K/0/rURA3と命名した。

PMT5maeF2 : 5'-GACGGTATCGATAAGCTTGATGCGCGGCCCTCCGACCTT-3' (配列番号 9 9)

PMT5maeR : 5'-CTGGGGAAGCTCGGATCCGGCTCGAGGTCTTCGTTCAAG-3' (配列番号 1 0 0)

PMT5ushiroF : 5'-CTAGTTCTAGAGCGGCCAGGTGCGCTTTCAGGCAGCAG-3' (配列番号 1 0 1)

PMT5ushiroR : 5'-CACCGCGGTGGCGGCCAAGCTTGGGTACCGGCTCGCGTAG-3' (配列番号 1 0 2)

(2-2) PMT6遺伝子破壊ベクターの作成

0. minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、DNAプライマーPMT6inf5' armF (配列番号 1 0 3) とPMT6inf5' armR (配列番号 1 0 4) を用いて、PCR[94℃で30秒、55℃で2分、72℃で2分) ×25サイクル]を行った。増幅された約2.8kbのDNA断片を回収し、BamHIで消化した rURApBKSへIn-fusionキット(BD Bioscience)を用いて導入し、挿入された遺伝子断片の塩基配列を決定した。得られたベクターをPMT6K/0/rURA3preと命名した。

0. minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、DNAプライマーPMT6inf3' armF (配列番号 1 0 5) とPMT6inf3' armR2 (配列番号 1 0 6) を用いて、PCR[94℃で30秒、55℃で2分、72℃で2分) ×25サイクル]を行った。増幅された約2.5kbのDNA断片を回収し、NotI-SacIIで消化した PMT6K/0/rURA3preへIn-fusionキット(BD Bioscience)を用いて導入し、挿入された遺伝子断片の塩基配列を決定した。得られたベクターをPMT6K/0/rURA3と命名した。

PMT6inf5' armF : 5'-GCAGCCCGGGgatccACGAAACCACGTCCTACT-3' (配列番号 1 0 3)

PMT6inf5' armR : 5'-GGGGAAGCTcgatcGACTCATCTTGAAACGCA-3' (配列番号 1 0 4)

PMT6inf3' armF : 5'-AGTTCTAGAGCGGCCTTACCACCATTACATGCC-3' (配列番号 1 0 5)

PMT6inf3' armR2 : 5'-AATTGGAGCTCCACCGCGGCCCACTTACTCGACGCTAA-3' (配列番号 1 0 6)

〔実施例 2 4〕 PMT遺伝子が分断または破壊された0. minuta抗体生産株の作成と評価

(1) PMT遺伝子が分断された0. minuta抗体生産株の作成

実施例 1 8 にて育種した抗体生産株0. minuta YY1株に、実施例 2 3 にて作成されたPMT遺伝子分断ベクターについて、PMT1遺伝子分断ベクターについてはPstI、PMT2遺伝子分断ベクターについてはXhoI、PMT4遺伝子分断ベクターについてはHindIIIにて消化し、上記エレクトロポレーション法によって導入した。形質転換株のPMT遺伝子の分断の確認は、Zeocineを50 µg/mlとなるよう添加したYPD寒天プレート培地にて選択し、培養後、ゲノム

を抽出し、PMT1遺伝子については、Zeo1（配列番号107）とPMT1zeo1（配列番号109）の組み合わせと、Zeo2（配列番号108）とPMT1zeo2（配列番号110）の組み合わせのDNAプライマー、PMT2遺伝子については、Zeo1（配列番号107）とPMT2zeo1（配列番号111）の組み合わせと、Zeo2（配列番号108）とPMT2zeo2（配列番号112）の組み合わせのDNAプライマー、PMT4遺伝子については、Zeo1（配列番号107）とPMT4PCR3' armF（配列番号113）の組み合わせと、Zeo2（配列番号108）とPMT4PCR5' armR3（配列番号114）の組み合わせのDNAプライマーを用いたPCR[94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分]×30サイクル]にて分断ベクター導入による各PMT遺伝子の分断を確認した。

Zeo1 : 5'-GAACGGCACTGGTCAACTTGGCCAT-3'（配列番号107）

Zeo2 : 5'-CTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGA-3'（配列番号108）

PMT1zeo1 : 5'-GAATTCTAGCCGAGCATGAGCTA-3'（配列番号109）

PMT1zeo2 : 5'-CGTTCAGACTCTTGTTGATTTCCAC-3'（配列番号110）

PMT2zeo1 : 5'-GCTGTGCCACTGCACGCCTCGACTC-3'（配列番号111）

PMT2zeo2 : 5'-CTTGTCCTCTTGAATGGCGAGTG-3'（配列番号112）

PMT4PCR3' armF : 5'-GGAACACGCCAAACATCATG -3'（配列番号113）

PMT4PCR5' armR3 : 5'-CACAAGCAGAATCAGGCAC -3'（配列番号114）

得られた株をそれぞれ、0. minuta YY2P1株（PMT1遺伝子分断）、0. minuta YY2P2株（PMT2遺伝子分断）及び0. minuta YY2P4株（PMT4遺伝子分断）と命名した。同時にコントロールとしてSse8387I消化したGAP/Zを0. minuta YY1株に導入し、Zeocine耐性株を選択することで0. minuta YY2Z株を得た。

（2）PMT遺伝子が分断された0. minuta抗体生産株による分泌抗体の生産性

上記（1）で作成された各PMT遺伝子分断抗体生産株を実施例18（2）に示した方法で培養し、ウェスタン解析を行った。その結果、図12および図14に示す通り、PMT1遺伝子が分断された0. minuta YY2P1株、PMT2遺伝子が分断された0. minuta YY2P2株、およびPMT4遺伝子が分断された0. minuta YY2P4株では、上記（1）で作成した0. minuta YY2Z株と比較して、抗体会合体分泌量の若干の増加を確認した（図12：レーン3、レーン6、図14：レーン3）。

（3）PMT遺伝子が分断された0. minuta抗体生産株による分泌抗体の生産性（TR-FRETを原

理としたホモジニアス分析による定量)

実施例 2 1 (3) に記載の方法にて、上記 (2) にて調製された培養液中の抗体生産量を測定した。スタンダードとして、動物細胞 (CHO) にて生産した抗体を用いた。図 1 3 および図 1 5 に示す通り、PMT1 遺伝子が分断された 0. minuta YY2P1 株、PMT2 遺伝子が分断された 0. minuta YY2P2 株、および PMT4 遺伝子が分断された 0. minuta YY2P4 株では、上記 (1) で作成した 0. minuta YY2Z 株と比較して、抗体会合体分泌量の若干の増加を確認した (図 1 3 : YY2P1、YY2P2、図 1 5 : YY2P4)。

(4) PMT5 ならびに PMT6 破壊株の作成と評価

(4-1) 0. minuta PMT5 遺伝子破壊株 ($\Delta och1 \Delta yps1 \Delta ura3 \Delta ade1 \Delta pmt5$) の作成

実施例 2 3 (2-1) にて作成した PMT5 遺伝子破壊ベクター PMT5K/0/rURA3 を HindIII で消化後、実施例 1 7 にて作成した、*Ogataea minuta* YK5 株 ($\Delta och1 \Delta ura3 \Delta ade1 \Delta yps1$) へ、電気パルス法にて形質転換を行った。これらの株の PMT5 遺伝子が破壊されたことを確認するために、以下のプライマーを合成した。

gPMT5-5 : 5'-CGGTGACGACTTCGACTAGTCGAG-3' (配列番号 1 1 5)

gPMT5-2 : 5'-CGGTGCTGTTGGCGTCGTCATGGGTG-3' (配列番号 1 1 6)

gPMT5-3 : 5'-GGCGCGTTCCAATTCCACTCTGCTG-3' (配列番号 1 1 7)

gPMT5-4 : 5'-CGACGAGTCCTCTCACCAGGAGGTG-3' (配列番号 1 1 8)

形質転換株から単離した染色体 DNA を鋳型とし、プライマー gPMT5-5 (配列番号 1 1 5) と gPMT5-2 (配列番号 1 1 6) を用いて、PCR (94°C で 30 秒、60°C で 1 分、72°C で 2 分) × 25 サイクル) を行った。プラスミドが PMT5 座に組み込まれた株からは、4.9kb の増幅 DNA 断片が検出された。同様に、形質転換株から単離した染色体 DNA を鋳型とし、プライマー gPMT5-3 (配列番号 1 1 7) と gPMT5-4 (配列番号 1 1 8) を用いて、PCR (94°C で 30 秒、60°C で 1 分、72°C で 2 分) × 25 サイクル) を行った。プラスミドが PMT5 座に組み込まれた株からは、4.9kb の増幅 DNA 断片が検出された。選抜した株を 0. minuta YK6 株 ($\Delta och1 \Delta ura3 \Delta ade1 \Delta yps1 \Delta pmt5::URA3$) と命名した。

(4-2) 0. minuta PMT6 遺伝子破壊株 ($\Delta och1 \Delta yps1 \Delta ura3 \Delta ade1 \Delta pmt6$) の作成

実施例 2 3 (2-2) にて作成した PMT6 遺伝子破壊ベクター PMT6K/0/rURA3 を BamHI-NotI で消化後、実施例 1 7 にて作成した、0. minuta YK5 株 ($\Delta och1 \Delta ura3 \Delta ade1 \Delta yps1$) へ、電気パルス法にて形質転換を行った。これらの株の PMT6 遺伝子が破壊されたこ

とを確認するために、以下のプライマーを合成した。

PMT6 PCR3' armF : 5' -TGTGGGTGCGATCCTGAG-3' (配列番号 1 1 9)

PMT6 PCR3' armR : 5' -GCCGTCGTTGGAGCAAACT-3' (配列番号 1 2 0)

PMT6 PCR5' armF : 5' -GCATGTGCCACTGCTAAA-3' (配列番号 1 2 1)

PMT6 PCR5' armR : 5' -GACCAACTTTCCCGTGTA-3' (配列番号 1 2 2)

形質転換株から単離した染色体DNAを鋳型とし、プライマーPMT6 PCR3' armF (配列番号 1 1 9) とPMT6 PCR3' armR (配列番号 1 2 0) を用いて、PCR ((94℃で30秒、60℃で1分、72℃で2分) ×25サイクル) を行った。プラスミドがPMT6座に組み込まれた株からは、5.8kbの増幅DNA断片が検出された。同様に、形質転換株から単離した染色体DNAを鋳型とし、プライマーPMT6 PCR5' armF (配列番号 1 2 1) とPMT6 PCR5' armR (配列番号 1 2 2) を用いて、PCR ((94℃で30秒、60℃で1分、72℃で2分) ×25サイクル) を行った。プラスミドがPMT6座に組み込まれた株からは、6.3kbの増幅DNA断片が検出された。選抜した株を0. minuta YK7株 ($\Delta och1 \Delta ura3 \Delta ade1 \Delta yps1 \Delta pmt6::URA3$) と命名した。

(5) PMT5ならびにPMT6 遺伝子が破壊された0. minuta抗体生産株の作成

NotIで消化した抗体発現ベクターpOMexGPA/AbLys (実施例 1 8 (1) で作成) と Sse8387I で消化した抗体発現ベクターpOMexHy/AbLys (実施例 1 8 (1) で作成) を用いて、エレクトロポレーションにより0. minuta YK6株 ($\Delta och1 \Delta yps1 \Delta ura3 \Delta ade1 \Delta pmt5::rURA3$) ならびに0. minuta YK7株 ($\Delta och1 \Delta yps1 \Delta ura3 \Delta ade1 \Delta pmt6::rURA3$) を形質転換した。形質転換された細胞はハイグロマイシンBが50 μ g/mlとなるよう添加されたSD寒天プレート培地 (2%グルコース、0.67%酵母ニトロゲンベース [Difco社]) にて選択した。単一コロニーをB2YP4G培地 [1.34%酵母ニトロゲンベース (Difco社)、2%酵母エキス (Difco社)、4%ポリペプトン (Difco社)、4%グリセロール、0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.0)] を用いて、27℃、4日間培養した。培養液より培養上清を調製し、実施例 7 に記載の方法にてウェスタン解析を行い、抗体軽鎖および重鎖遺伝子が導入された抗体生産株を選択した。得られた株はそれぞれ、0. minuta AP5株 (PMT5遺伝子破壊株) ならび0. minuta AP6株 (PMT6遺伝子破壊株) と命名した。一方、コントロールとして、NotIで消化した抗体発現ベクターpOMexGPA/AbLysとSse8387Iで消化したpOMexHy/AbLysをエレクトロポレーションによって、0. minuta YK4株 ($\Delta och1 \Delta ura3 \Delta ade1 \Delta yps1::rURA3$) へ導入し、上記の方法と同様に抗体発現株を作成、選択した。得られた株は、0. minuta Acon株と命

名した。

(6) PMT5ならびにPMT6 遺伝子が破壊された*O. minuta*抗体生産株による分泌抗体の生産性

PMT5遺伝子破壊株である*O. minuta* AP5株、PMT6遺伝子破壊株である*O. minuta* AP6株、ならびに*O. minuta* Acon株を実施例18(2)に示した方法で培養し、非還元ウエスタン解析を行った。また培養液を実施例21(3)に記載の方法にて、抗体生産量を測定した。スタンダードとして、動物細胞(CHO)にて生産した抗体を用いた。その結果、図16に示すとおり、*O. minuta* AP5株、ならびに*O. minuta* AP6株とコントロールに当たる*O. minuta* Acon株とで抗体の会合体の生産性に大差はなかった。

〔実施例25〕PMT遺伝子が分断され、かつHAC1遺伝子が導入された*O. minuta*株の作成と評価

(1) PMT遺伝子が分断され、かつHAC1遺伝子が導入された*O. minuta*株の作成

実施例24(1)で作成された、*O. minuta* YY2P2株(PMT2遺伝子分断株)、*O. minuta* YY2P4株(PMT4遺伝子分断株)、および*O. minuta* YY2Z株(コントロール株)に、実施例3にて作成された*O. minuta*由来活性型HAC1遺伝子発現ベクターpOMexPGHy/Hac1をAor51HIで消化し、上記エレクトロポレーション法によって導入した。形質転換株の活性化HAC1遺伝子の導入は、ハイグロマイシンBを50 μ g/mlとなるよう添加したYPD寒天プレート培地にて選択し、培養後、ゲノムを抽出し、活性型HAC1遺伝子の導入を、実施例6の方法に従い、PCRにて確認した。得られた株を*O. minuta* YY3P2omH株(HAC1遺伝子導入PMT2遺伝子分断株)、*O. minuta* YY3P4omH株(HAC1遺伝子導入PMT4遺伝子分断株)、および*O. minuta* YY3ZomH株(HAC1遺伝子導入コントロール株)と命名した。同時にコントロールとしてAor51HIで消化したpOMexPGHyを*O. minuta* YY2Z株に導入し、*O. minuta* YY3ZHy株(ベクター導入コントロール株)を得た。

(2) PMT遺伝子が分断され、かつHAC1遺伝子が導入された*O. minuta*株による分泌抗体の生産性

上記(1)で作成された、HAC1遺伝子が導入された各PMT遺伝子分断抗体生産株を実施例18(2)に示した方法で培養し、ウエスタン解析を行った。その結果、図12および図14に示す。HAC1遺伝子が導入されたPMT2遺伝子分断株である、*O. minuta* YY3P2omH株

は、HAC1遺伝子単独導入株である*O. minuta* YY3ZomH株ならびに、PMT2分断株である*O. minuta* YY2P2株と比較して、著量の抗体を分泌していた（図12：レーン7）。また、HAC1遺伝子が導入されたPMT4遺伝子分断株である*O. minuta* YY3P4omH株は、HAC1遺伝子単独導入株である*O. minuta* YY3ZomH株ならびに、PMT4分断株である*O. minuta* YY2P4株と比較して、著量の抗体を分泌していた（図14：レーン6）。

また培養液を実施例8および実施例21（3）に記載の方法にて、抗体生産量を測定した。スタンダードとして、動物細胞（CHO）にて生産した抗体を用いた。その結果、図13および図15に示す。HAC1遺伝子が導入されたPMT2遺伝子分断株である*O. minuta* YY3P2omH株は、コントロールにあたる*O. minuta* YY3ZomH株（HAC1遺伝子単独導入株）、*O. minuta* YY2P2株（PMT2遺伝子分断株）および、*O. minuta* YY3ZHy株（ベクター導入コントロール株）と比較して、著量の会合抗体を分泌していた（図13：*O. minuta* YY3P2omH株）。また、HAC1遺伝子が導入されたPMT4遺伝子分断株である*O. minuta* YY3P4omH株は、コントロールにあたる*O. minuta* YY3ZomH株（HAC1遺伝子単独導入株）、*O. minuta* YY2P4株（PMT4遺伝子分断株）および、*O. minuta* YY3ZHy株（ベクター導入コントロール株）と比較して、著量の会合抗体を分泌していた（図15：*O. minuta* YY3P4omH株）。

〔実施例26〕PMT阻害剤（1c）を用いたPMT遺伝子が分断され、かつHAC1遺伝子が導入された*O. minuta*株による抗体生産

上記実施例25（1）で作成された、HAC1遺伝子が導入された各PMT遺伝子分断抗体生産株を5mlのB2YP4G培地に1白金耳、植菌し27℃、1日間培養後、OD600が10になるようにB2YP4G培地にて希釈し、実施例9に記載のPMT阻害剤（1c；原液濃度0.1、0.5、2.5、10mM）を0.016、0.08、0.4、2.0 μ Mとなるように添加した。更に27℃、3日間培養し、24時間毎にOD600を測定し、OD600の1増加につき0.00032、0.0016、0.008、0.04 μ MづつPMT阻害剤（1c）を添加した。培養液より培養上清を調製し、実施例18（2）に示した方法でウエスタン解析を行った。その結果を、図17に示す。更に実施例21（3）に記載の方法にて、分泌抗体の生産性を定量した。その結果を、図18に示す。*O. minuta* YY3P2omH株（HAC1遺伝子導入PMT2遺伝子分断株）では、PMT阻害剤濃度をOD600の1増加につき、0.008 μ M程度添加（原液濃度2.5mM）した場合に最も抗体の生産性が高く、*O. minuta* YY3P4omH株（HAC1遺伝子導入PMT4遺伝子分断株）ではPMT阻害剤をOD600の1増加に

つき0.04 μ M程度添加（原液濃度10mM）した場合が最も抗体の生産性が高かった。PMT遺伝子の発現抑制とPMT阻害剤の併用で、糖鎖付加が強力に抑制されていると考えられる。HAC1導入株の糖鎖付加を抑制するには、PMT遺伝子の発現抑制とPMT阻害剤の併用によるPMTタンパク質の活性阻害により、会合体抗体のさらなる高生産が期待できる。

〔実施例 27〕 PMT阻害剤 (5a) の評価

抗体遺伝子導入株である*O. minuta* YY1株を5mlのB2YP4G培地に1白金耳、植菌し27℃、1日間培養後、OD600が10になるようにB2YP4G培地にて希釈し、実施例 9 に記載のPMT阻害剤 (1c) とは異なったPMT阻害剤（{(5Z)-4-oxo-5-[3-(1-phenylethoxy)-4-(2-phenylethoxy)benzylidene]-2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl}acetic acid (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 14, p3975, (2004)中の化合物5a)）を1 μ M となるよう添加した。更に27℃、3日間培養し、24時間毎にOD600を測定し、OD600の1増加につき0.02 μ Mづつ添加した。培養液より培養上清を調製し、実施例 18 (2) に示した方法でウェスタン解析、及び実施例 21 (3) に記載の方法にて、分泌抗体の生産性を定量した。その結果を図 19 及び図 20 に示す。抗体会合体の生産性は、新たに検討したPMT阻害剤 (5a) を添加することによっても、増加する傾向にあり、実施例 9 に記載のPMT阻害剤 (1c) と同等の効果を持つと考えられた。

産業上の利用可能性

本発明によれば、通常のタンパク質のみならず、抗体などの構造が複雑なタンパク質をも酵母において高分泌生産することが可能となる。

請 求 の 範 囲

1. 活性型HAC1遺伝子とRRBP1遺伝子を有する形質転換宿主細胞。
2. 以下の（１）の活性型HAC1遺伝子と（２）のRRBP1遺伝子を有する、請求項１に記載の形質転換宿主細胞。

（１）下記の（a）～（d）から選択される活性型HAC1遺伝子：

- （a）配列番号23に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子
- （b）配列番号23に示すアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつUnfolded Protein Response（UPR）を活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子
- （c）配列番号23に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子
- （d）配列番号22に示す塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

（２）下記の（e）～（h）から選択されるRRBP1遺伝子：

- （e）ヒト由来またはイヌ由来のRRBP1をコードする遺伝子
- （f）ヒト由来またはイヌ由来のRRBP1のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子
- （g）ヒト由来またはイヌ由来のRRBP1のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子
- （h）ヒト由来またはイヌ由来のRRBP1遺伝子の塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

3. 以下の（１）の活性型HAC1遺伝子と（２）のRRBP1遺伝子を有する、請求項１に記載

の形質転換宿主細胞。

(1) 下記の (i) ~ (l) から選択される活性型HAC1遺伝子：

(i) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または*Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子

(j) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または*Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(k) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または*Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(l) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または*Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(2) 下記の (e) ~ (h) から選択されるRRBP1遺伝子：

(e) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP1をコードする遺伝子

(f) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP1のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(g) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP1のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(h) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP1遺伝子の塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

4. 宿主細胞が真核細胞である、請求項1から3のいずれかに記載の形質転換宿主細胞。

5. 真核細胞が酵母である、請求項4に記載の形質転換宿主細胞。

6. 酵母がメタノール資化性酵母である、請求項5に記載の形質転換宿主細胞。

7. メタノール資化性酵母が*Ogataea minuta*である、請求項 6 に記載の形質転換宿主細胞。
8. 酵母が*Saccharomyces cerevisiae*である、請求項 5 に記載の形質転換宿主細胞。
9. 外来タンパク質をコードする遺伝子を導入した、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の形質転換宿主細胞。
10. 外来タンパク質が多量体タンパク質である、請求項 9 に記載の形質転換宿主細胞。
11. 多量体タンパク質がヘテロ多量体である、請求項 10 に記載の形質転換宿主細胞。
12. ヘテロ多量体が抗体またはその機能的断片である、請求項 11 に記載の形質転換宿主細胞。
13. 請求項 9 から 12 のいずれかに記載の形質転換宿主細胞を培地に培養し、培養物から目的タンパク質を採取することを特徴とする、タンパク質の製造方法。
14. 培養をProtein O-mannosyltransferase (PMT)活性を抑制する条件下で行うことを特徴とする、請求項 13 に記載の製造方法。
15. Protein O-mannosyltransferase (PMT)活性の抑制が、培地にPMT活性阻害剤を添加することにより行われる、請求項 14 に記載の製造方法。
16. メタノール資化性酵母の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子。
17. 下記の (a) から (d) のいずれかの遺伝子。
 - (a) 配列番号23に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子
 - (b) 配列番号23に示すアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつUnfolded Protein Response (UPR)を活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子
 - (c) 配列番号23に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子
 - (d) 配列番号22に示す塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子
18. 請求項 17 に記載の遺伝子を含む発現ベクター。
19. pOMexPGHy/Hac1である、請求項 18 に記載の発現ベクター。
20. 活性型HAC1遺伝子とRRBP1遺伝子を含む発現ベクター。

21. 活性型HAC1遺伝子が、請求項17に記載の遺伝子である、請求項20に記載の発現ベクター。
22. 活性型HAC1遺伝子が、*Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または *Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子、またはそれらの相同遺伝子である、請求項20に記載の発現ベクター。
23. YEp351GAP-II-aHAC1/p180である、請求項20に記載のベクター。
24. RRBP1遺伝子が、ヒト若しくはイヌ由来のRRBP1遺伝子、またはそれらの相同遺伝子である、請求項20に記載の発現ベクター。
25. 請求項18から24のいずれかに記載の発現ベクターを導入した形質転換宿主細胞。
26. 活性型HAC1遺伝子を含む発現ベクター、及びRRBP1遺伝子を含む発現ベクターを導入した形質転換宿主細胞。
27. 活性型HAC1遺伝子を含む発現ベクターが請求項18または19に記載の発現ベクターである、請求項26に記載の形質転換宿主細胞。
28. 活性型HAC1遺伝子が、*Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または *Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子、またはそれらの相同遺伝子である、請求項26に記載の形質転換宿主細胞。
29. RRBP1遺伝子が、ヒト若しくはイヌ由来のRRBP1遺伝子、またはそれらの相同遺伝子である、請求項26に記載の形質転換細胞。
30. 以下の行程を含む、形質転換された宿主細胞の製造方法。
- (A) 宿主細胞に対して、活性型HAC1遺伝子を導入する行程
- (B) 宿主細胞に対して、RRBP1遺伝子を導入する行程
31. 活性型HAC1遺伝子が、以下のいずれかの遺伝子である、請求項30に記載の製造方法：
- (1) 請求項17に記載の遺伝子
- (2) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または *Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子
- (3) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または *Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(4) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または*Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(5) *Saccharomyces cerevisiae*、*Trichoderma reesei*、または*Aspergillus nidulans*の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

32. RRBP 1 遺伝子が以下のいずれかの遺伝子である、請求項30に記載の製造方法：

(1) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP 1 をコードする遺伝子

(2) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP 1 のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の同一性を有するアミノ酸配列で表され、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(3) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP 1 のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列で表され、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(4) ヒト由来またはイヌ由来のRRBP 1 遺伝子の塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつリボソーム結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

33. 宿主細胞が真核細胞である、請求項30から32のいずれかに記載した製造方法。

34. 真核細胞が酵母である、請求項33に記載の製造方法。

35. 酵母がメタノール資化性酵母である、請求項34に記載の製造方法。

36. メタノール資化性酵母が*Ogataea minuta*である、請求項35に記載の製造方法。

37. 酵母が*Saccharomyces cerevisiae*である、請求項34に記載の製造方法。

38. 下記の(a) から(d) のいずれかの遺伝子。

(a) 配列番号70に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子

(b) 配列番号70に示すアミノ酸配列と少なくとも70%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつUnfolded Protein Response (UPR)を活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(c) 配列番号70に示すアミノ酸列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

(d) 配列番号69に示す塩基配列またはそれと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつUPRを活性化させる機能を有するタンパク質をコードする遺伝子

39. 請求項38に記載の遺伝子を含む発現ベクター。

40. pOMexPGHy/PpHac1である、請求項39に記載の発現ベクター。

41. 0型糖鎖合成を抑制する条件下で、活性型HAC1遺伝子及び/又はRRBP1遺伝子と外来タンパク質をコードする遺伝子とを導入した形質転換細胞を培地に培養し、培養物から目的タンパク質を採取することを特徴とする、タンパク質の製造方法。

42. 0型糖鎖合成の抑制が、PMT遺伝子を分断することにより行われる、請求項41に記載のタンパク質の製造方法。

43. 0型糖鎖合成の抑制が、PMT活性阻害剤を培地に添加することにより行われる、請求項41に記載のタンパク質の製造方法。

44. 0型糖鎖合成の抑制が、PMT遺伝子を分断し、かつ、PMT活性阻害剤を培地に添加することにより行われる、請求項41に記載のタンパク質の製造方法。

45. PMT活性阻害剤が、5-[[3,4-(1-phenylmethoxy)phenyl]methylene]-4-oxo-2-thioxo-3-thiazolidineacetic acidまたは{(5Z)-4-oxo-5-[3-(1-phenylethoxy)-4-(2-phenylethoxy)benzylidene]-2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl}acetic acidである、請求項43または44に記載のタンパク質の製造方法。

46. 活性型HAC1遺伝子を導入し、PMT遺伝子を分断した形質転換宿主細胞。

47. 宿主細胞が、*Ogataea minuta*である、請求項46に記載の形質転換細胞。

図 1

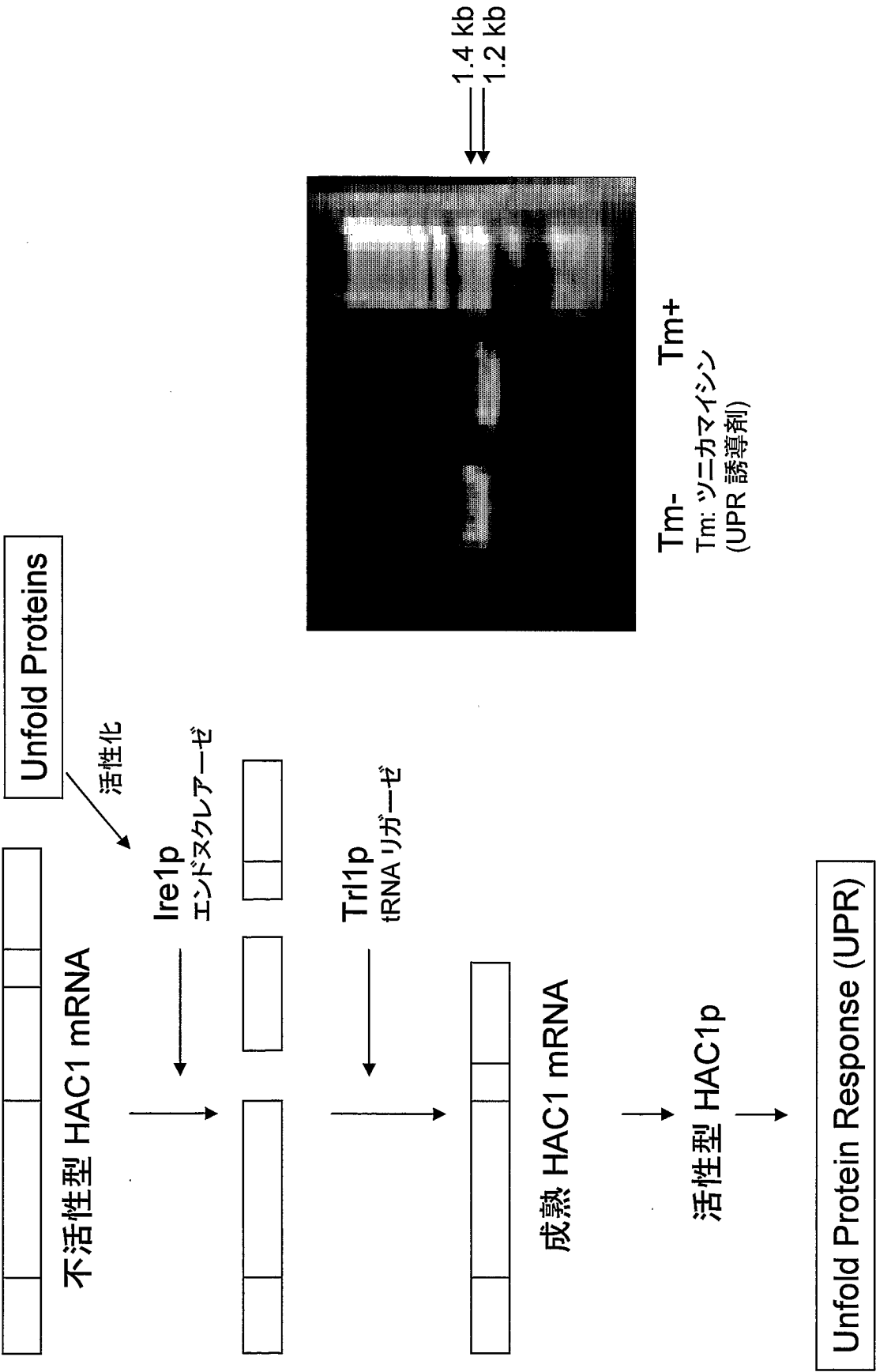


図 2

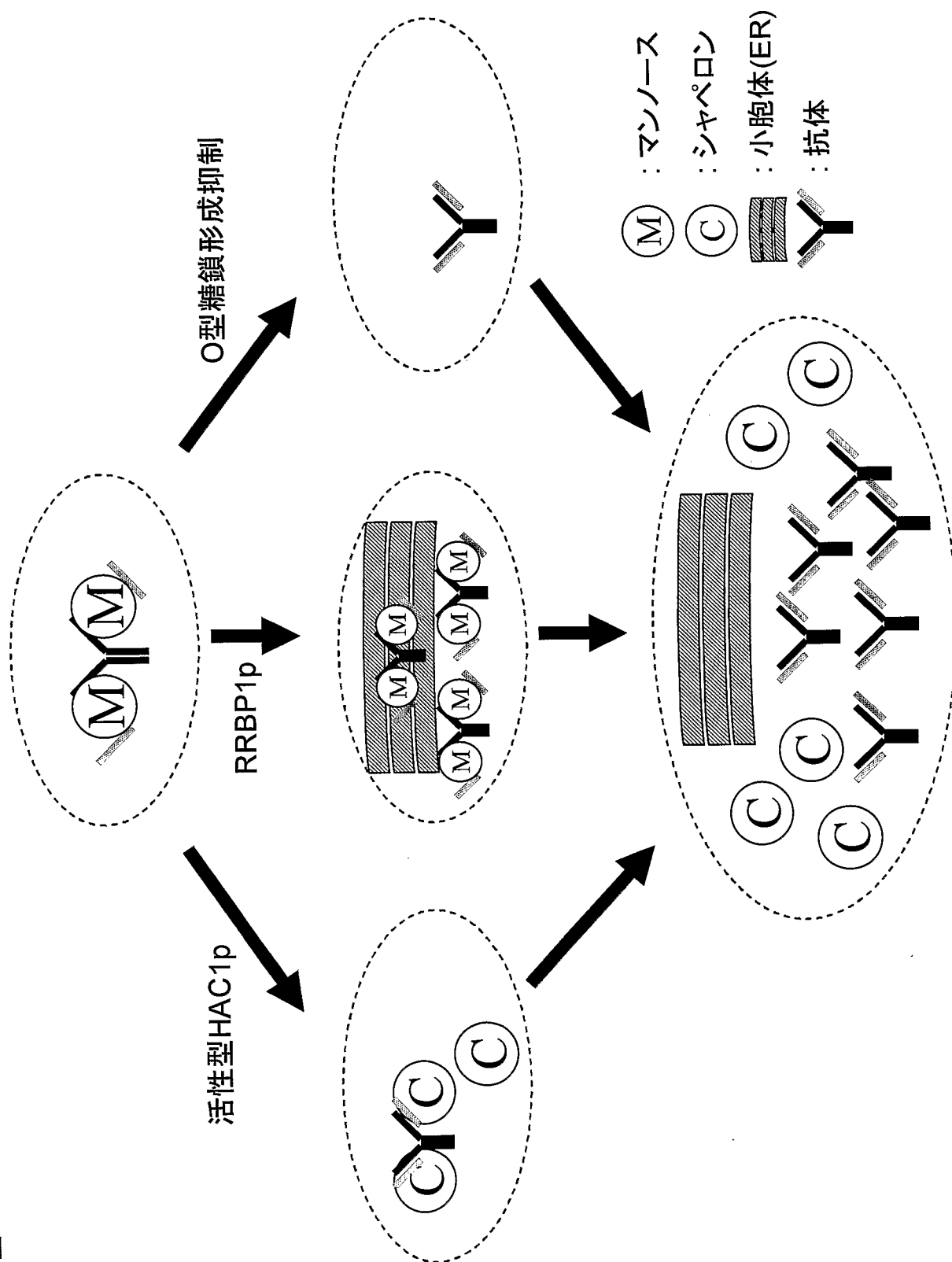


図 3

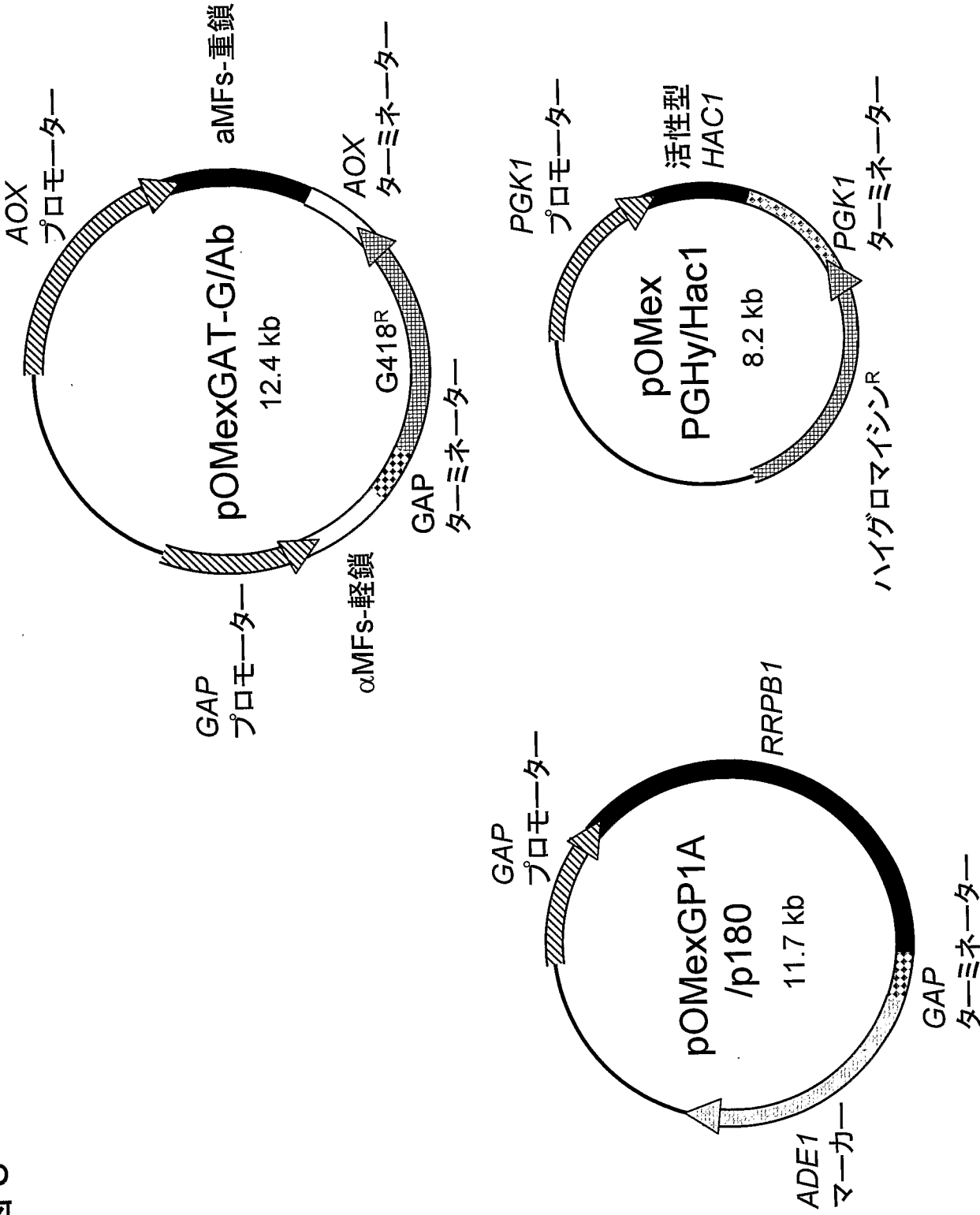


図 4

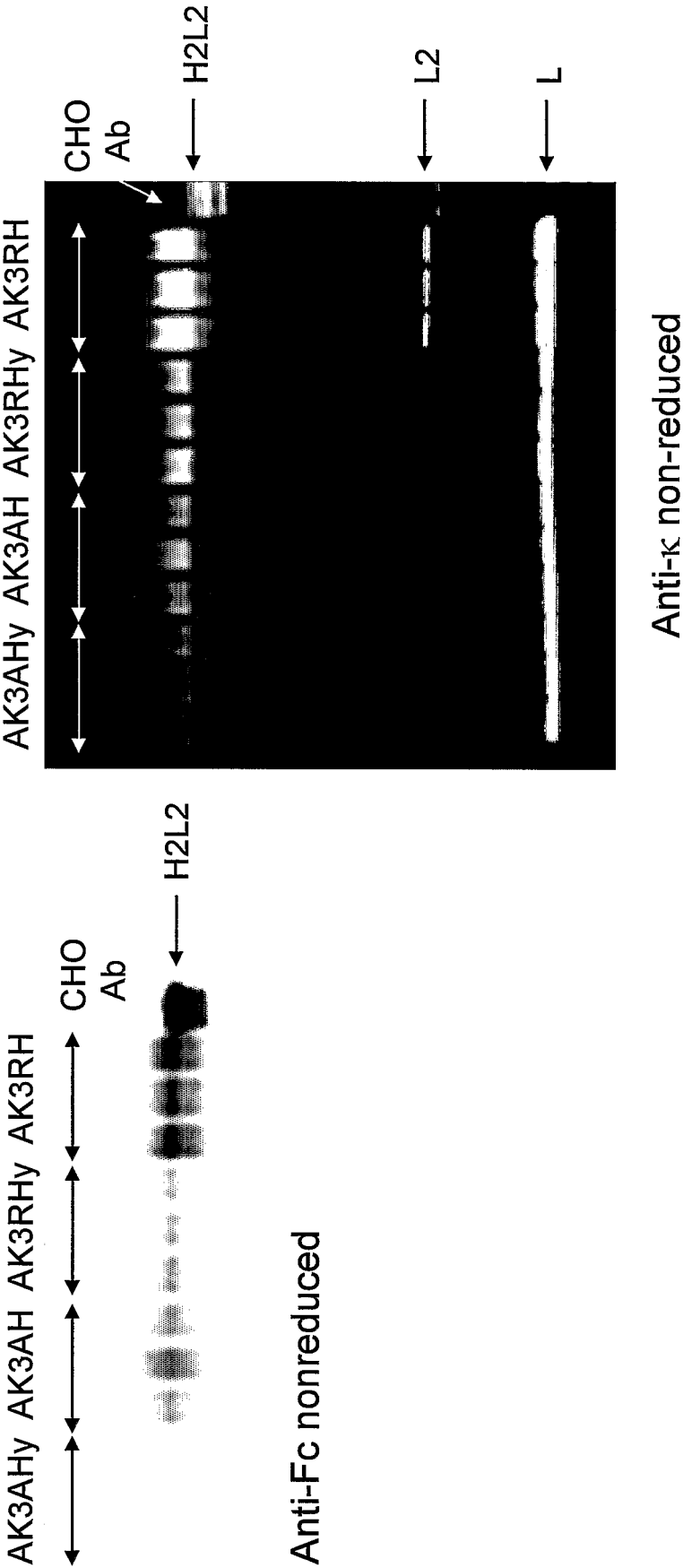


図 5

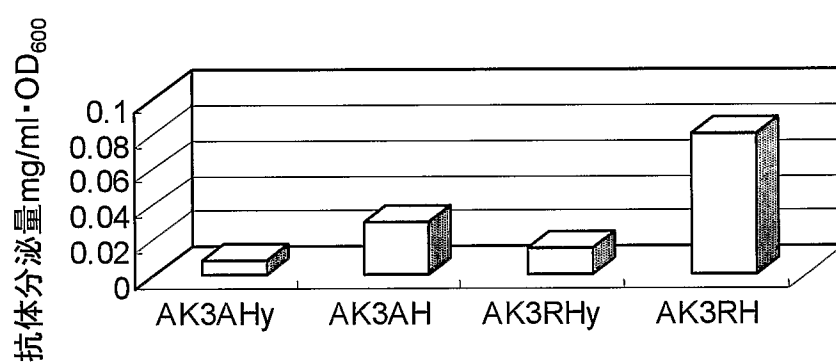


図 7

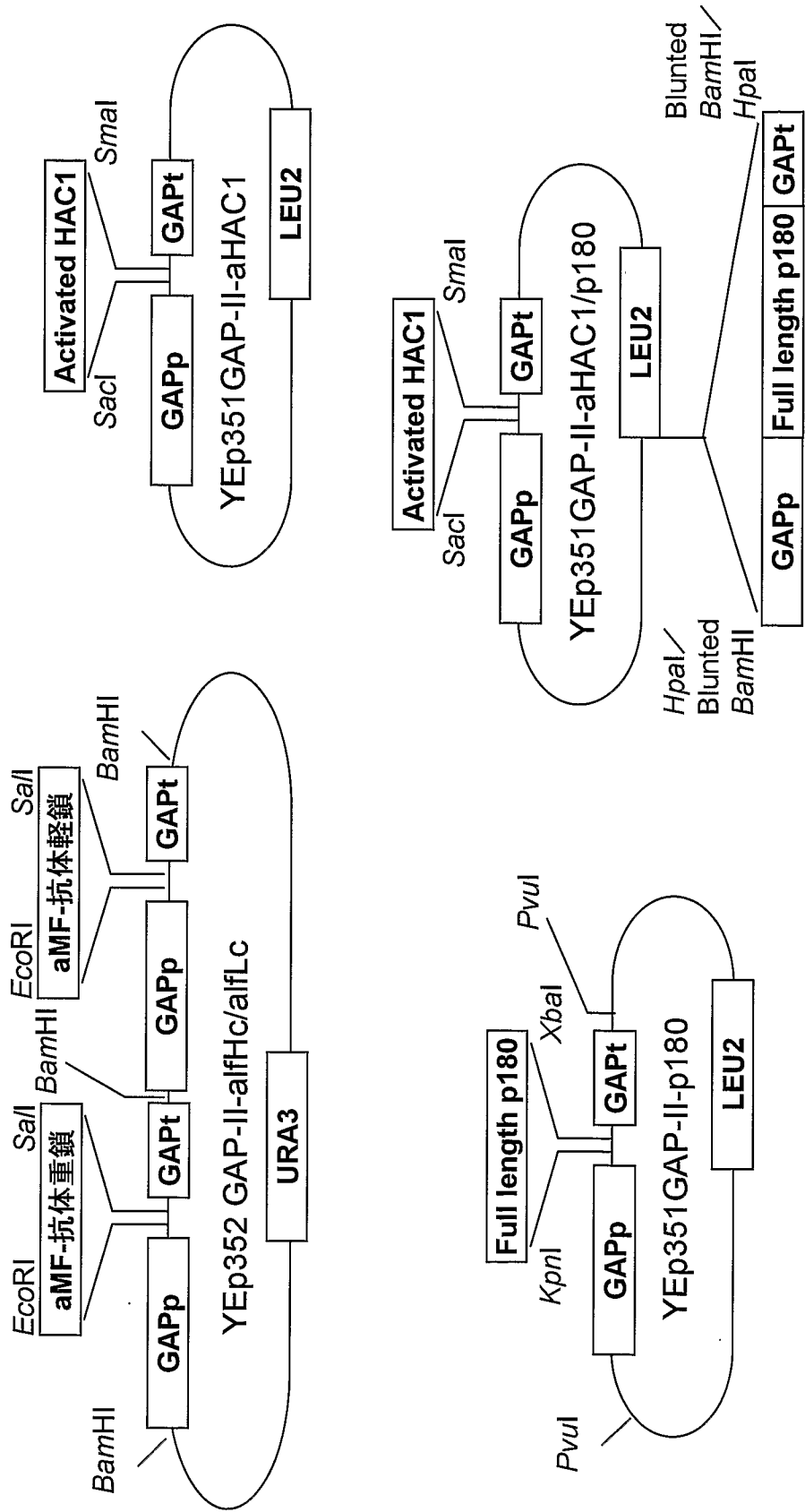
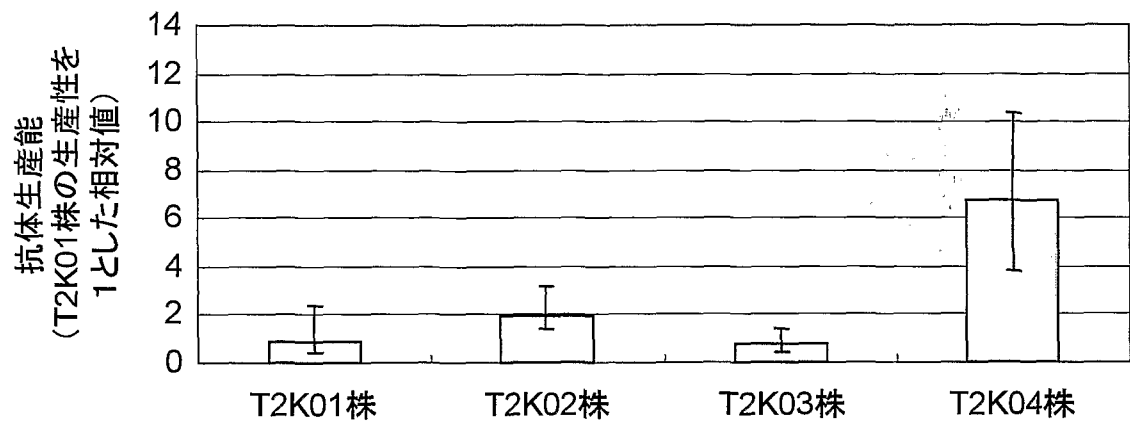
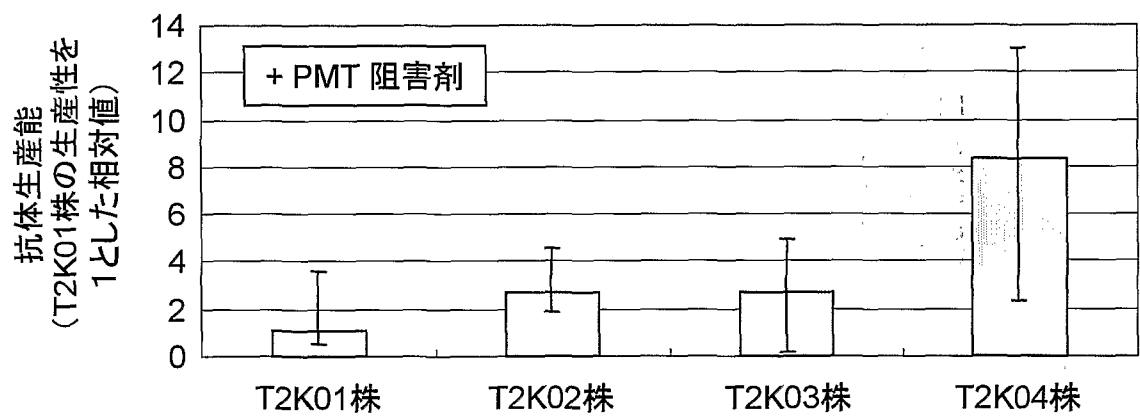


図 8

A



B



C

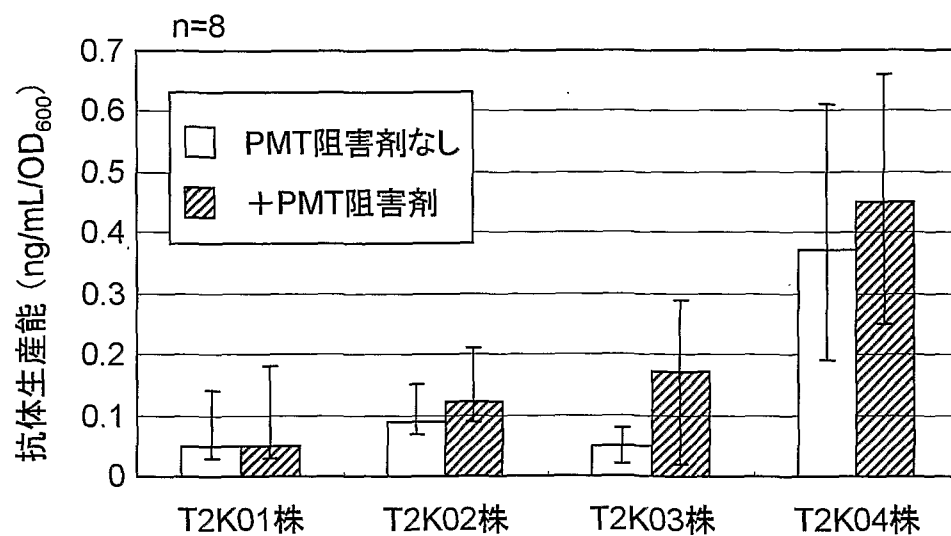


図 9

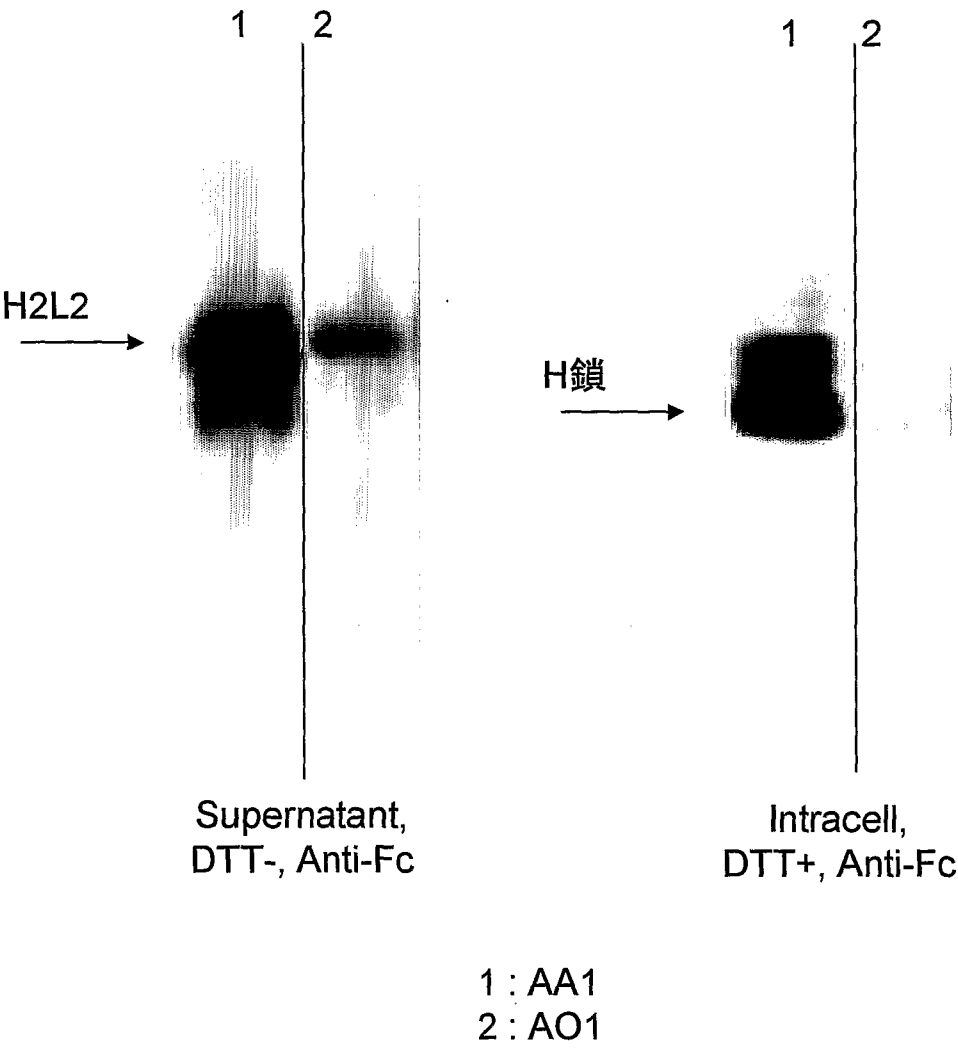


図 10

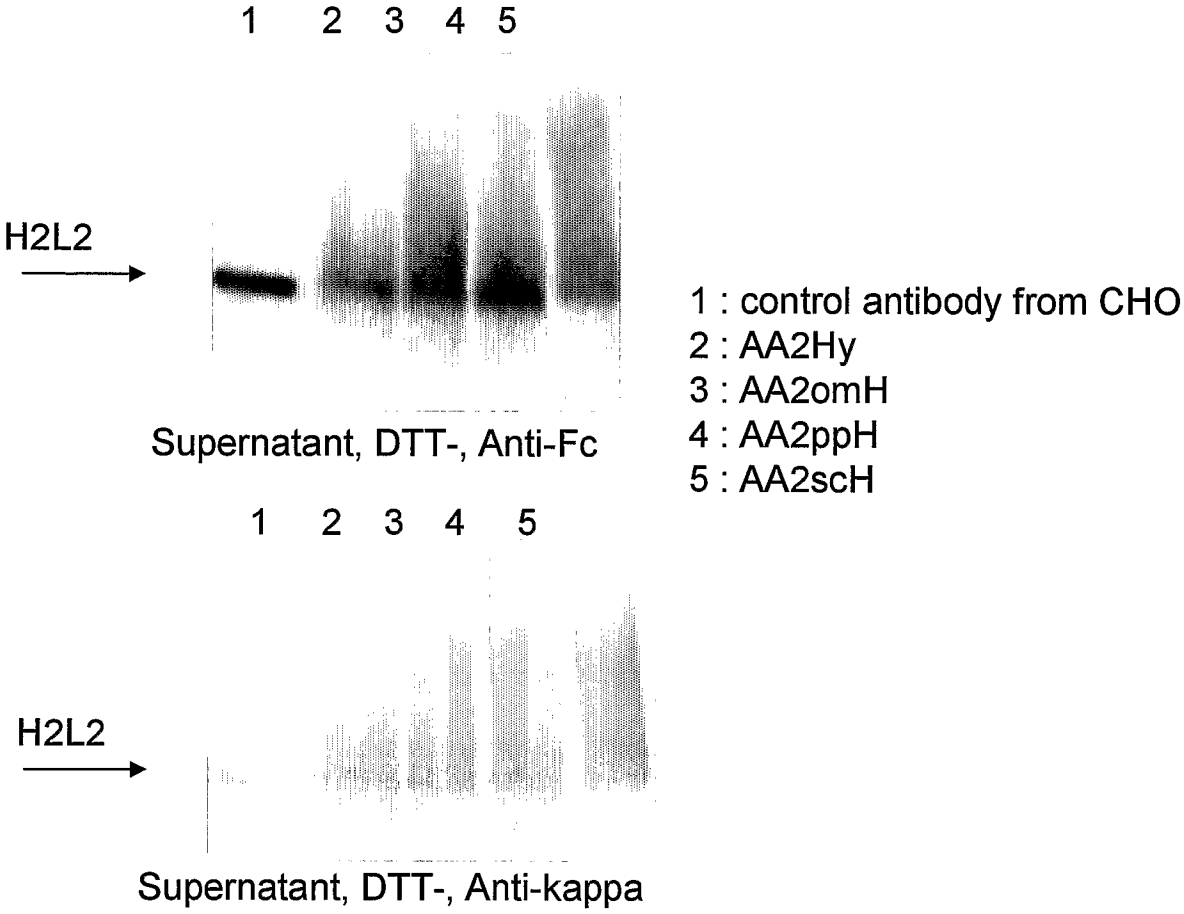


図 1 1

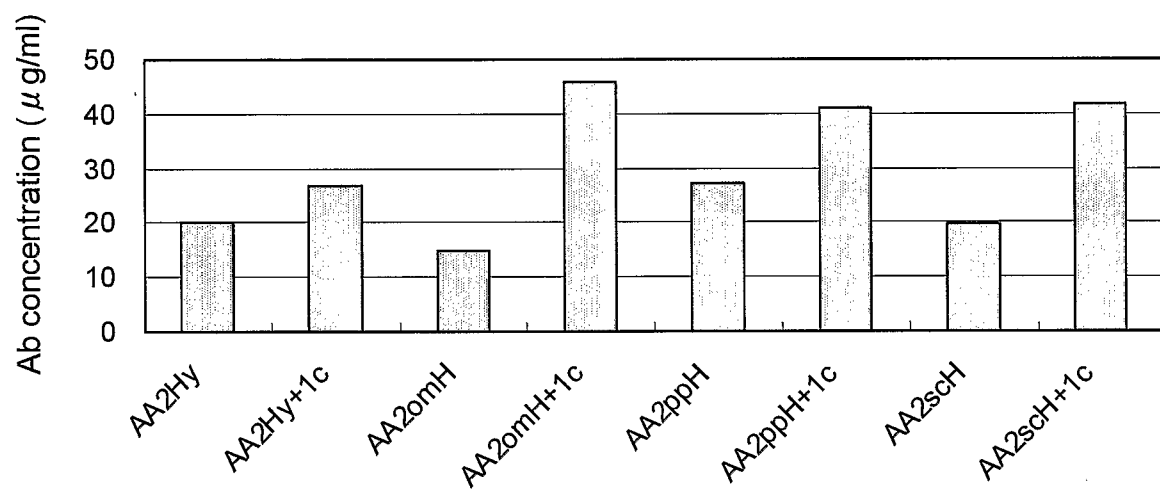


図 12

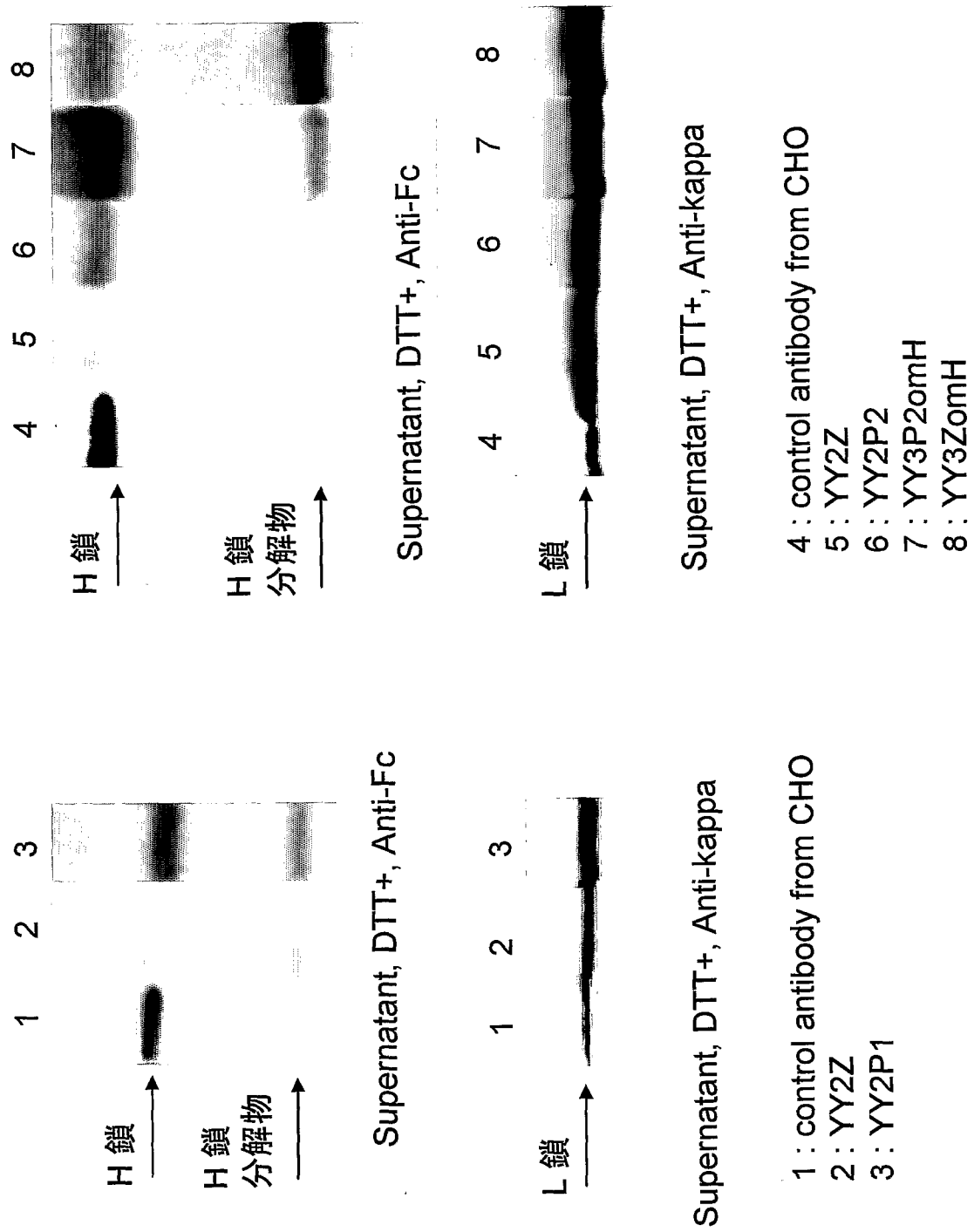


図 1 3

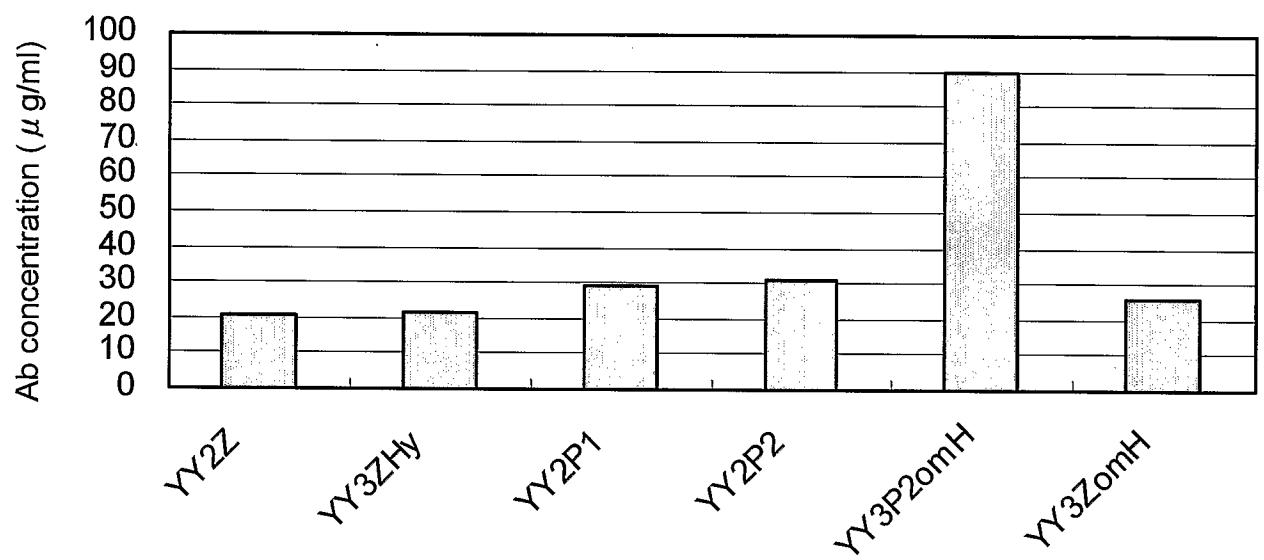


図 1 4

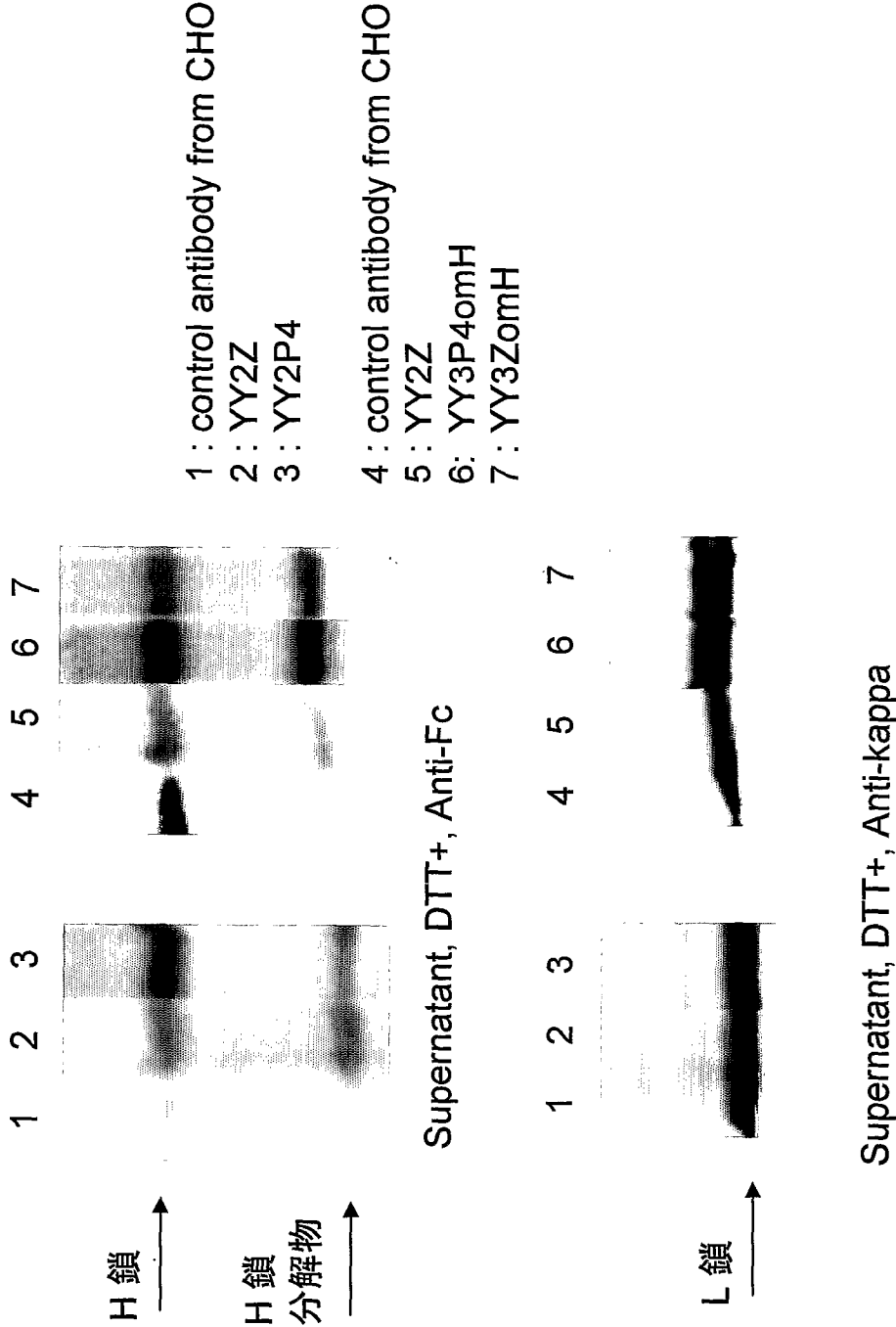


図 15

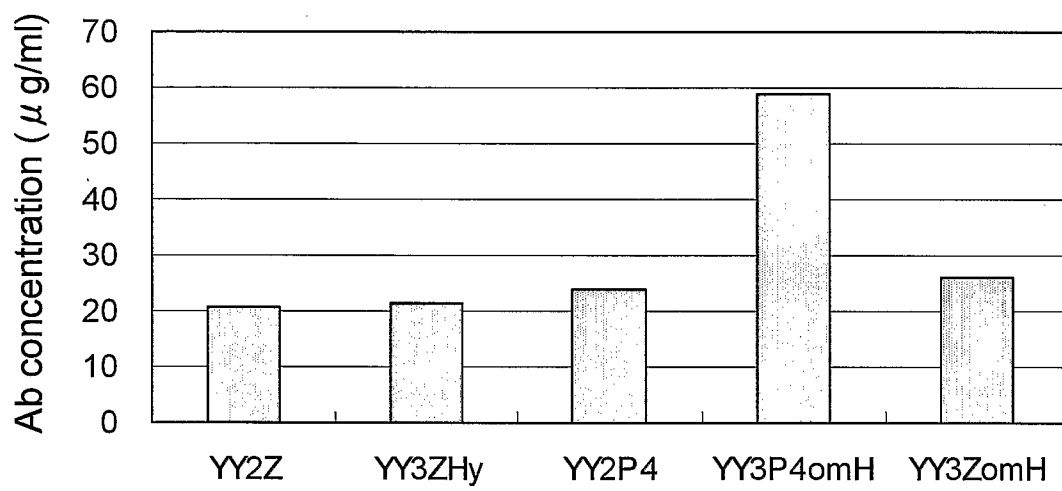
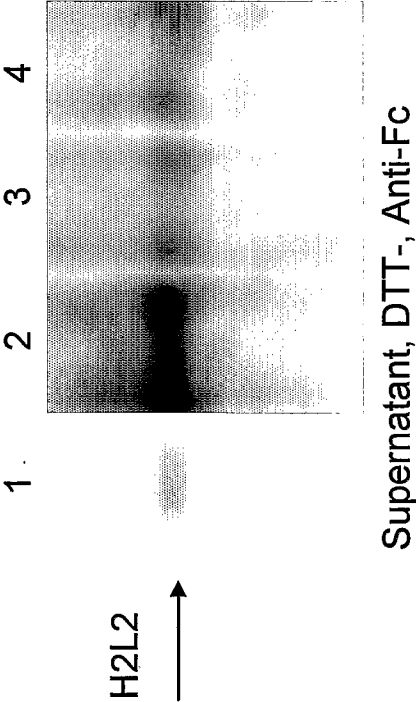


図 16

A



1 : control antibody from CHO
2 : Acon
3 : AP5
4 : AP6

B

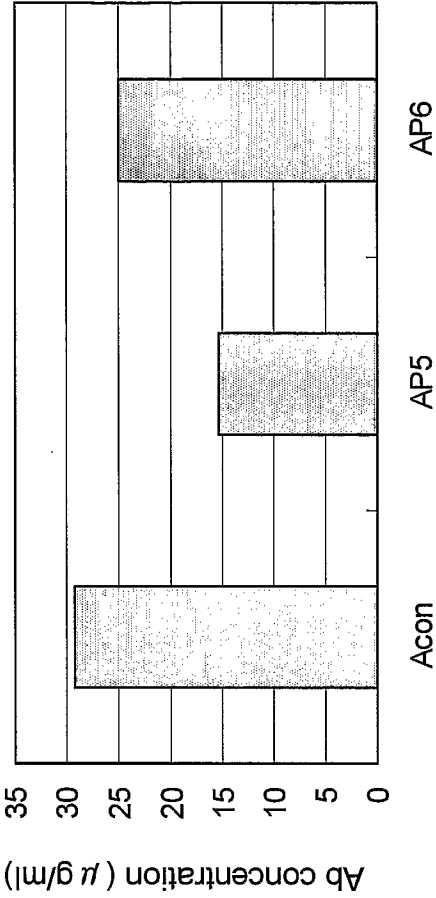
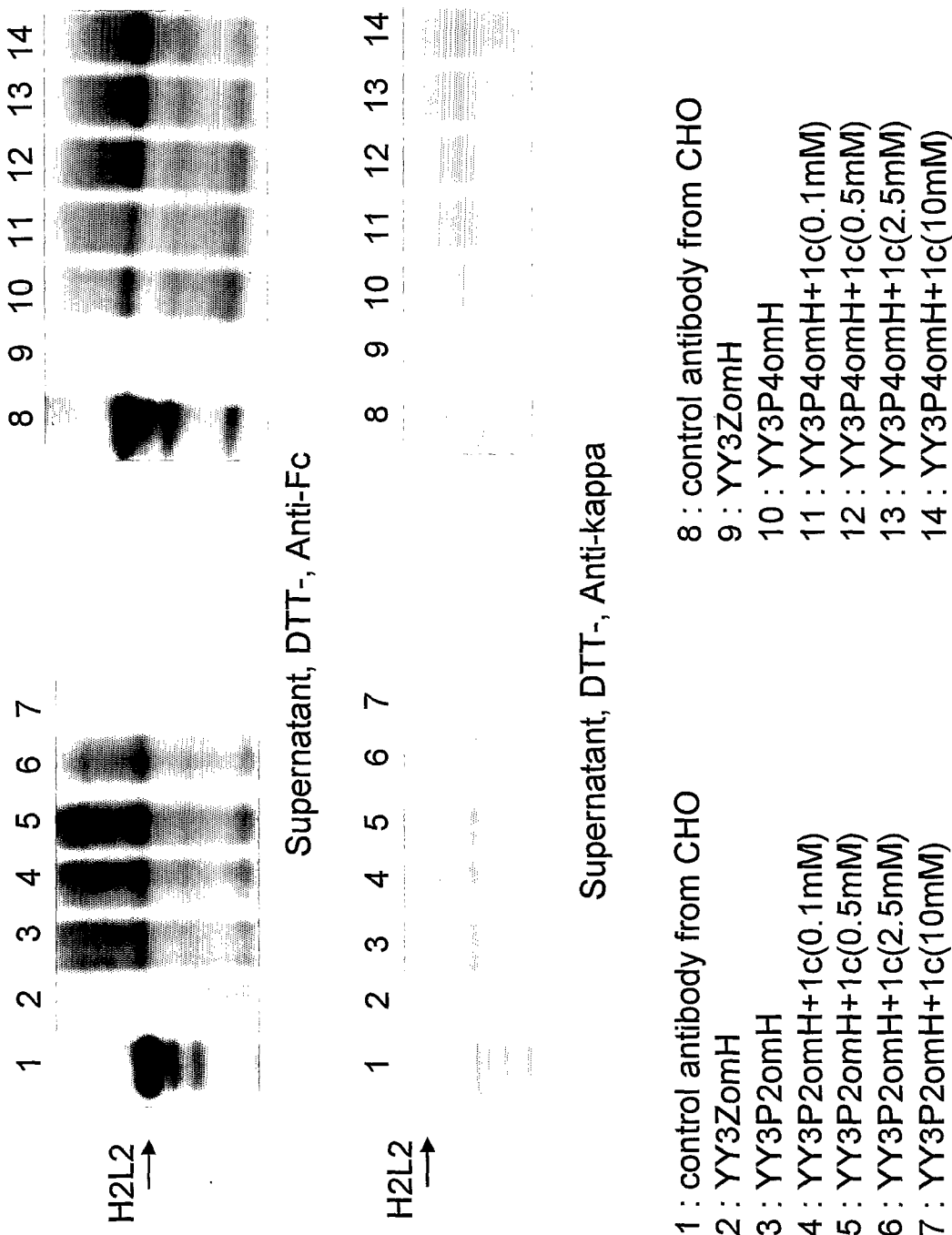
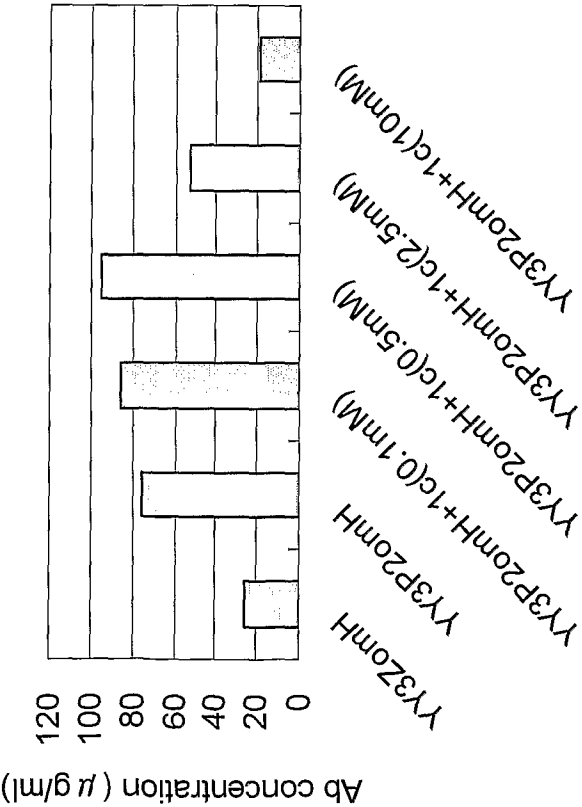


図 17



A



B

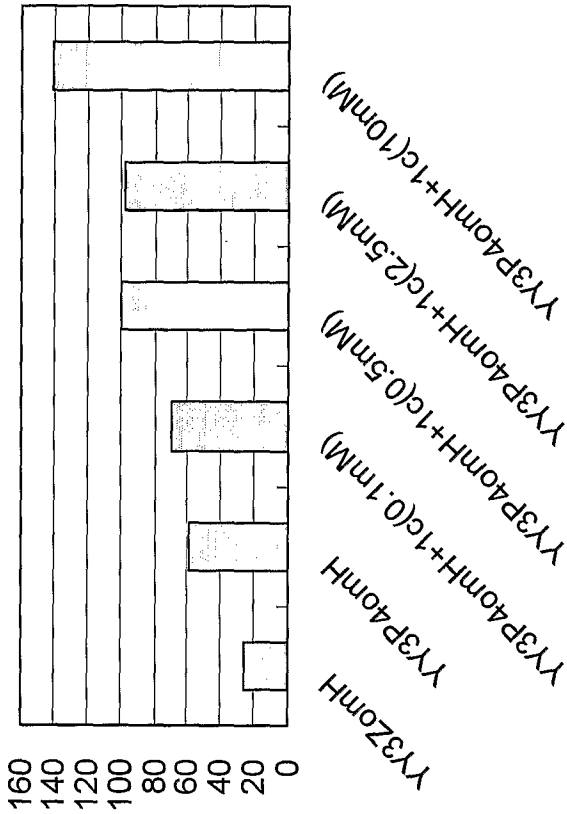


図 19

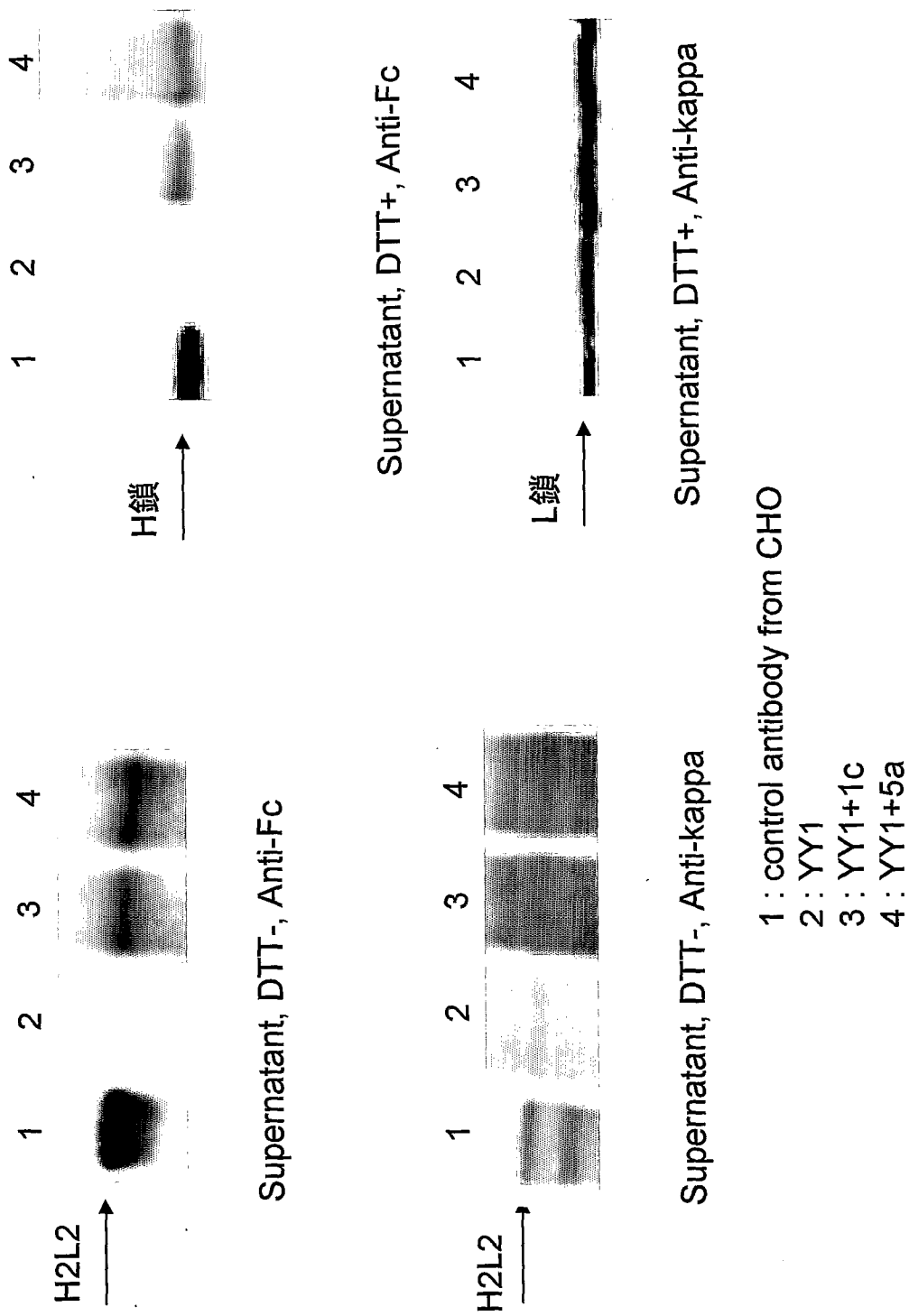
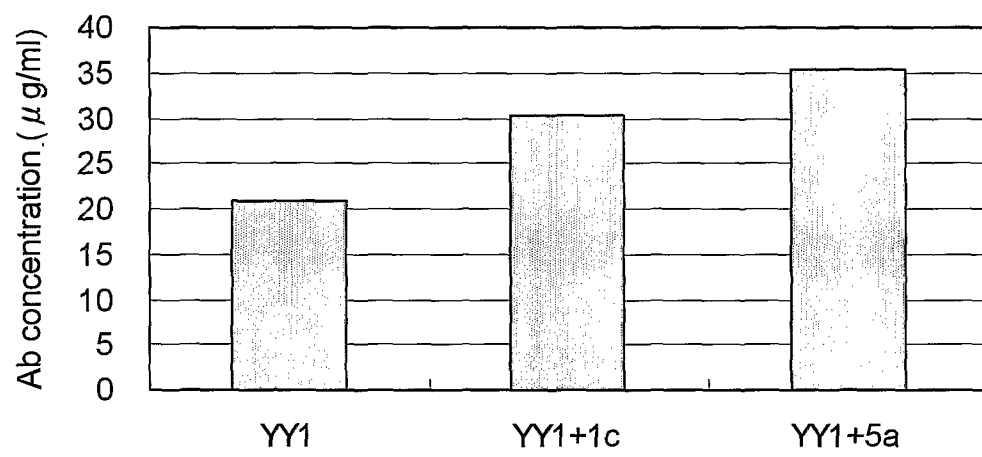


図 20



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/060478

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i

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)

C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12P21/02

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

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

MEDLINE /CAPlus/BIOSIS/WPIDS(STN), JSTPlus(JDream2), Uniprot/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	Gasser B., et al. 'Engineering of Pichia pastoris for improved production of antibody fragments', Biotechnol. Bioeng., 2006.06.05, vol.94, p.353-361.	1-15, 20-37
A	Valkonen M., et al. 'Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded-protein response pathway on protein production in the yeast Saccharomyces cerevisiae', Appl. Environ. Microbiol., 2003, vol.69, p.2065-2072.	1-15, 20-37
A	Becker F., et al. 'Expression of the 180-kD ribosome receptor induces membrane proliferation and increased secretory activity in yeast', J. Cell Biol., 1999, vol.146, p.273-284.	1-15, 20-37

☒ 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
08 August, 2007 (08.08.07)

Date of mailing of the international search report
21 August, 2007 (21.08.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/060478

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Wanker E.E., et al. 'Functional characterization of 180-kD ribosome receptor in vivo' J. Cell Biol., 1995, vol.130, p.29-39.	1-15,20-37
A	WO 2001/072783 A2 (GENENCOR INTERNATIONAL, INC.), 04 October, 2001 (04.10.01), & EP 1266018 A2 & US 2001/0034045 A1 & US 2004/0186070 A1	1-15,20-37
A	Saloheimo M., et al. 'Actiovation mechanisms of the HAC1-mediated unfolded protein response in filamentous fungi' Mol. Microbiol., 2003, vol.47, p.1149-1161.	1-15,20-37
A	Nojima H., et al. 'Hac1: a novel yeast bZIP protein binding to the CRE motif is a multicopy suppressor for cdc10 mutant of Schizosaccharomyces pombe' Nucleic. Acids Res., 1994, vol.22, p.5279-5288.	1-15,20-37
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. Q6BQC2, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?74659281:CAGE_DDBJ:506164 > 25-Oct-2004 uploaded, DUJON B., et al. Definition: Similarities with sp P41546 Saccharomyces cerevisiae HAC1 protein, retrieved on 7 Aug 2007	1-15,20-37
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. Q5AA52, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?74656449:CAGE_DDBJ:503330 > 10-MAY-2005 uploaded, DUNGAN J., et al. Definition: Hypothetical protein HAC1, retrieved on 7 Aug 2007	1-15,20-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/060478

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
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 out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

The invention according to claims 1-15, 20-37 relates to a transformed host cell having an activated HAC1 gene and RRBP1 gene.

The invention according to claims 16-19, 25, 46-47 relates to a gene encoding an activated HAC1 protein of methanol-assimilating yeast.

The invention according to claims 38-40 relates to a gene encoding a protein consisting of an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 70.

The invention according to claims 41-45 relates to a production method of a protein in which a transformed cell in which a RRBP1 gene and a gene encoding an exogenous protein are introduced is cultured under a condition of suppressing synthesis of an O-type sugar chain and a (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ 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 claims Nos.:

Claims 1-15, 20-37

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/060478

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

desired protein is collected from the culture.

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））</p> <p>Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i</p>												
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））</p> <p>Int.Cl. C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12P21/02</p>												
<p>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</p>												
<p>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）</p> <p>MEDLINE /CAPlus/BIOSIS/WPIDS(STN), JSTPlus(JDream2), Uniprot/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>P, A</td> <td>Gasser B., et al. 'Engineering of Pichia pastoris for improved production of antibody fragments', Biotechnol. Bioeng., 2006. 06.05, vol.94, p.353-361.</td> <td>1-15, 20-37</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Valkonen M., et al. 'Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded-protein response pathway on protein production in the yeast Saccharomyces cerevisiae', Appl. Environ. Microbiol., 2003, vol.69, p.2065-2072.</td> <td>1-15, 20-37</td> </tr> </tbody> </table>				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 請求の範囲の番号	P, A	Gasser B., et al. 'Engineering of Pichia pastoris for improved production of antibody fragments', Biotechnol. Bioeng., 2006. 06.05, vol.94, p.353-361.	1-15, 20-37	A	Valkonen M., et al. 'Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded-protein response pathway on protein production in the yeast Saccharomyces cerevisiae', Appl. Environ. Microbiol., 2003, vol.69, p.2065-2072.	1-15, 20-37
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 請求の範囲の番号										
P, A	Gasser B., et al. 'Engineering of Pichia pastoris for improved production of antibody fragments', Biotechnol. Bioeng., 2006. 06.05, vol.94, p.353-361.	1-15, 20-37										
A	Valkonen M., et al. 'Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded-protein response pathway on protein production in the yeast Saccharomyces cerevisiae', Appl. Environ. Microbiol., 2003, vol.69, p.2065-2072.	1-15, 20-37										
☒ 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。										
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの</p> <p>「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</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</p>		<p>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文献</p>										
<p>国際調査を完了した日</p> <p>0 8 . 0 8 . 2 0 0 7</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>2 1 . 0 8 . 2 0 0 7</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁（I S A / J P）</p> <p>郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<table border="1"> <tr> <td>特許庁審査官（権限のある職員）</td> <td>4 B</td> <td>3 9 5 8</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> <p>斎藤 真由美</p> <p>電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8</p> </td> </tr> </table>		特許庁審査官（権限のある職員）	4 B	3 9 5 8	<p>斎藤 真由美</p> <p>電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8</p>					
特許庁審査官（権限のある職員）	4 B	3 9 5 8										
<p>斎藤 真由美</p> <p>電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8</p>												

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 請求の範囲の番号
A	Becker F., et al. 'Expression of the 180-kD ribosome receptor induces membrane proliferation and increased secretory activity in yeast', J. Cell Biol., 1999, vol.146, p.273-284.	1-15, 20-37
A	Wanker E.E., et al. 'Functional characterization of 180-kD ribosome receptor in vivo' J. Cell Biol., 1995, vol.130, p.29-39.	1-15, 20-37
A	WO 2001/072783 A2 (GENENCOR INTERNATIONAL, INC.) 2001.10.4. & EP 1266018 A2 & US 2001/0034045 A1 & US 2004/0186070 A1	1-15, 20-37
A	Saloheimo M., et al. 'Actiovation mechanisms of the HAC1-mediated unfolded protein response in filamentous fungi' Mol. Microbiol., 2003, vol.47, p.1149-1161.	1-15, 20-37
A	Nojima H., et al. 'Hac1: a novel yeast bZIP protein binding to the CRE motif is a multicopy suppressor for cdc10 mutant of Schizosaccharomycese pombe' Nucleic. Acids Res., 1994, vol.22, p.5279-5288.	1-15, 20-37
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. Q6BQC2, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?74659281:CAGE_DDBJ:506164 > 25-Oct-2004 uploaded, DUJON B., et al. Definition: Similarities with sp P41546 Saccharomyces cerevisiae HAC1 protein, retrieved on 7 Aug 2007	1-15, 20-37
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. Q5AA52, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?74656449:CAGE_DDBJ:503330 > 10-MAY-2005 uploaded, DUNGAN J., et al. Definition: Hypothetical protein HAC1, retrieved on 7 Aug 2007	1-15, 20-37

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度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。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-15、20-37に係る発明は、活性型HAC1遺伝子とRRBP1遺伝子を有する形質転換宿主細胞に関するものである。

請求の範囲16-19、25、46-47に係る発明は、メタノール資化性酵母の活性型HAC1タンパク質をコードする遺伝子に関するものである。

請求の範囲38-40に係る発明は、配列番号70に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子に関するものである。

請求の範囲41-45に係る発明は、O型糖鎖合成を抑制する条件下でRRBP1遺伝子と外来タンパク質をコードする遺伝子とを導入した形質転換細胞を培養し、培養物から目的タンパク質を採取するタンパク質の製造方法に関するものである。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査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、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている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 1-15、20-37

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☒ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。