

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011 年 8 月 18 日(18.08.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/099243 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/000439
- (22) 国際出願日: 2011 年 1 月 27 日(27.01.2011)
- (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 2010-026679 2010 年 2 月 9 日(09.02.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人山口大学(YAMAGUCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田 1 6 7 7-1 Yamaguchi (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 赤田 倫治 (AKADA, Rinji) [JP/JP]; 〒7558611 山口県宇部市常盤台 2 丁目 1 6-1 国立大学法人山口大学工学部内 Yamaguchi (JP). 星田 尚司(HOSHIDA, Hisashi) [JP/JP]; 〒7558611 山口県宇部市常盤台 2 丁目 1 6-1 国立大学法人山口大学工学部内 Yamaguchi (JP). 井手 政充 (IDE, Masamitsu) [JP/JP]; 〒7558611 山口県宇部市常盤台 2 丁目 1 6-1 国立大学法人山口大学工学部内 Yamaguchi (JP).
- (74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号若林ビル 3 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, 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 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2011/099243 A1

(54) Title: TARGET GENE EXPRESSION METHOD USING A SPECIFIC PROMOTER DERIVED FROM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN *KLUYVEROMYCES MARXIANUS*

(54) 発明の名称: サッカロマイセス・セレビシエ由来の特定のプロモーターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いる目的遺伝子の発現方法

(57) Abstract: Provided is a method for expressing a target gene. In said method, a specific promoter derived from *Saccharomyces cerevisiae* (the TDH3 promoter, ILV5 promoter, or CWP2 promoter) is used in *Kluyveromyces marxianus*. Also provided is a method for manufacturing the product of a target gene.

(57) 要約: 本発明は、サッカロマイセス・セレビシエ由来の特定のプロモーターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いる、目的遺伝子の発現方法、及び、目的遺伝子産物の製造方法を提供するものである。サッカロマイセス・セレビシエ由来の特定のプロモーター (TDH3 プロモーター、ILV5 プロモーター、CWP2 プロモーター) を、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いることを特徴とする。

明 細 書

発明の名称：

サッカロマイセス・セレビシエ由来の特定のプロモーターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いる目的遺伝子の発現方法

技術分野

[0001] 本発明は、目的遺伝子の発現方法、及び、目的遺伝子産物の製造方法に関する。より詳細には、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の特定のプロモーターを、クルイベロマイセス・マルシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*) において用いる、目的遺伝子の発現方法、及び、目的遺伝子産物の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年の遺伝子組換え技術の進展とともに、様々な有用なタンパク質の生産を、大腸菌等の微生物を用いて行うことが可能となった。しかし、真核生物由来の異種タンパク質遺伝子を、大腸菌を宿主として発現させると、正常なプロセッシングや糖鎖の付加などの翻訳後の正常な修飾が行われないという問題があることが知られている。そのため、真核生物である酵母が、宿主として比較的利用されている。宿主酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ、ピキア・パストリス、ピキア・メタノリカ、シゾサッカロマイセス・ポンベ、ハンゼヌラ・アノマーラ、クリベロマイセス・ラクティスなどが知られている（例えば特許文献 1 参照）。

[0003] 異種タンパク質遺伝子を宿主にて発現させる際には、宿主内で機能するプロモーターの制御下にその異種タンパク質遺伝子を作動可能に配置した組換えポリヌクレオチドを宿主内に導入し、その形質転換体内においてその異種タンパク質を発現させる。プロモーターの転写活性は、異種タンパク質の発現効率を大きく左右する。そのため、転写活性の高いプロモーターが一般的に用いられている。例えば、宿主がサッカロマイセス・セレビシエである場合は、サッカロマイセス・セレビシエ由来の高転写活性プロモーターである

P G K 1 プロモーター、T E F 1 プロモーター、A D H 1 プロモーター、T P I 1 プロモーター、P Y K 1 プロモーター、E N O 1 プロモーター、P M A 1 プロモーター、A D H 1 プロモーター、T D H 3 プロモーター、I L V 5 プロモーター、C W P 2 プロモーターなどが用いられることがあった。

[0004] ところで、クルイベロマイセス・マルシアヌスは、耐熱性酵母である（例えば、非特許文献 1 及び 2）。通常の酵母でエタノール発酵をする場合、発酵熱によって発酵液の温度が上昇していくため、エタノール発酵を持続させるには発酵液を冷却しなければならなかった。そのため、エタノール発酵を工業的に行うには、大規模な冷却設備と、その冷却に要する多大なエネルギーコストが不可欠となる。しかし、クルイベロマイセス・マルシアヌスは 48℃もの高温でも増殖が可能であるため（非特許文献 3 及び 4）、そのような冷却設備やエネルギーコストを必要とせずに、効率的なエタノール発酵が可能となる。

[0005] 一般的に、プロモーターは、そのプロモーターが由来する生物種の細胞内において最も高いプロモーター活性を示し、他の生物種においては、プロモーター活性そのものを示さないか、あるいは、低下したプロモーター活性を示す。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献 1：特開 2008-29239 号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献 1：Bioresource Technology (2007) 98, 3367-3374

非特許文献 2：Appl. Microbiol. Biotechnol. (2008) 79, 339-354

非特許文献 3：Applied and Environmental Microbiology (2008) 74, 7514-7521

非特許文献 4：Appl. Microbiol. Biotechnol. (2010) 85, 861-867

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、サッカロマイセス・セレビシエ由来の特定のプロモーターを、クルイペロマイセス・マルシアヌスにおいて用いる、目的遺伝子の発現方法、及び、目的遺伝子産物の製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明者らは、鋭意研究を行った結果、サッカロマイセス・セレビシエ由来の特定のプロモーター（TDH3プロモーター、ILV5プロモーター、CWP2プロモーター）を、クルイペロマイセス・マルシアヌスにおいて用いると、意外なことに、元来の宿主であるサッカロマイセス・セレビシエにおいて用いた場合よりも目的遺伝子が高発現することを見い出した。
- [0010] さらに、サッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーターは、サッカロマイセス・セレビシエにおいてはガラクトース誘導的な発現を全く示さないことが知られているが、本発明者らは、このプロモーターをクルイペロマイセス・マルシアヌスにおいて用いると、非常に意外なことに、ガラクトース誘導的な発現を示すことを見い出した。
- [0011] 本発明者らは、以上の知見に基づいて、本発明を完成するに至った。
- [0012] すなわち、本発明は、（１）サッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーター、ILV5プロモーター、CWP2プロモーター、及び、それらの変異体からなる群から選択されるプロモーターを、クルイペロマイセス・マルシアヌスにおいて用いることを特徴とする目的遺伝子の発現方法や、（２）以下の（Ａ）記載の組換えポリヌクレオチド、又は、以下の（Ｂ）記載のベクターを、クルイペロマイセス・マルシアヌスに導入して得られる形質転換体を培養する工程を含むことを特徴とする上記（１）に記載の目的遺伝子の発現方法：（Ａ）サッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーター、ILV5プロモーター、CWP2プロモーター、及び、それらの変異体からなる群から選択されるプロモーターと、その制御下に作動可能に配置された目的遺伝子とを含む組換えポリヌクレオチド：（Ｂ）上記（Ａ）に記載の組換えポリヌクレオチドを含むベクター：や、（３）プロモータ

ーとしてサッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーターを用い、かつ、形質転換体の培養をガラクトース存在下で行うことを特徴とする上記（２）に記載の目的遺伝子の発現方法に関する。

[0013] また、本発明は、（４）サッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーター、ILV5プロモーター、CWP2プロモーター、及び、それらの変異体からなる群から選択されるプロモーターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いることを特徴とする目的遺伝子産物の製造方法や、（５）以下の（Ａ）記載の組換えポリヌクレオチド、又は、以下の（Ｂ）記載のベクターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスに導入して得られる形質転換体を培養する工程（Ｐ）と、培養して得られた形質転換体から目的遺伝子産物を回収する工程（Ｑ）とを含むことを特徴とする上記（４）に記載の目的遺伝子産物の製造方法：（Ａ）サッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーター、ILV5プロモーター、CWP2プロモーター、及び、それらの変異体からなる群から選択されるプロモーターと、その制御下に作動可能に配置された目的遺伝子とを含む組換えポリヌクレオチド：（Ｂ）上記（Ａ）に記載の組換えポリヌクレオチドを含むベクターや、（６）プロモーターとしてサッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーターを用い、かつ、形質転換体の培養をガラクトース存在下で行うことを特徴とする上記（５）に記載の目的遺伝子産物の製造方法や、（７）サッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーター、ILV5プロモーター、CWP2プロモーター、及び、それらの変異体からなる群から選択されるプロモーターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いることを特徴とする目的遺伝子の発現効率を上昇させる方法に関する。

発明の効果

[0014] 本発明の目的遺伝子の発現方法によると、目的遺伝子を高発現させることができる。また、本発明の目的遺伝子産物の製造方法によると、目的遺伝子産物を高効率で製造することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1] S c T D H 3 プロモーターの発現解析試験 1 (グルコース培地) の結果 (相対発現量 (RLU/ μ l)) を示す図である。

[図2] S c T D H 3 プロモーターの発現解析試験 1 (グルコース培地) の結果 (相対発現量 (RLU/OD $\cdot\mu$ l)) を示す図である。

[図3] S c T D H 3 プロモーターの発現解析試験 2 (ガラクトース培地) の結果 (相対発現量 (RLU/ μ l)) を示す図である。

[図4] S c T D H 3 プロモーターの発現解析試験 2 (ガラクトース培地) の結果 (相対発現量 (RLU/OD $\cdot\mu$ l)) を示す図である。

[図5] S c T D H 3 プロモーターの発現解析試験 3 (様々な糖培地) の結果 (相対発現量 (RLU/ μ l)) を示す図である。

[図6] S c T D H 3 プロモーターの発現解析試験 3 (様々な糖培地) の結果 (相対発現量 (RLU/OD $\cdot\mu$ l)) を示す図である。

[図7] サッカロマイセス・セレビシエ由来の様々なプロモーター (S c T D H 3 プロモーター、S c I L V 5 プロモーター、S c C W P 2 プロモーター) の発現解析試験の結果 (相対発現量 (RLU/OD $\cdot\mu$ l)) を示す図である。

発明を実施するための形態

[0016] 1. 本発明の目的遺伝子の発現方法

本発明の目的遺伝子の発現方法は、サッカロマイセス・セレビシエ由来の T D H 3 プロモーター、I L V 5 プロモーター、C W P 2 プロモーター、及び、それらの変異体からなる群から選択されるプロモーター (以下、まとめて「本発明におけるプロモーター」とも表示する。) を、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いることを特徴とする。本発明におけるプロモーターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いると、目的遺伝子を高発現させることができる。

[0017] 本発明の目的遺伝子の発現方法のより好適な態様としては、以下の (A) 記載の組換えポリヌクレオチド、又は、以下の (B) 記載のベクターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスに導入して得られる形質転換体を培養する

工程を含む。

(A) サッカロマイセス・セレビスエ由来のTDH3プロモーター、ILV5プロモーター、CWP2プロモーター、及び、それらの変異体からなる群から選択されるプロモーターと、その制御下に作動可能に配置された目的遺伝子とを含む組換えポリヌクレオチド：

(B) 上記(A)に記載の組換えポリヌクレオチドを含むベクター：

[0018] 上記(A)における、サッカロマイセス・セレビスエ由来のTDH3プロモーターとしては、配列番号1に示されるポリヌクレオチドを好適に例示することができ、サッカロマイセス・セレビスエ由来のILV5プロモーターとしては、配列番号2に示されるポリヌクレオチドを好適に例示することができ、サッカロマイセス・セレビスエ由来のCWP2プロモーターとしては、配列番号3に示されるポリヌクレオチドを好適に例示することができる。

[0019] 上記(A)におけるプロモーターの変異体とは、配列番号1～3のいずれかに示されるポリヌクレオチドの変異体であって、かつ、クルイペロマイセス・マルシアヌスにおいてプロモーター活性を有するポリヌクレオチドを意味する。かかるプロモーターの変異体としては、

(a) 配列番号1～3のいずれかに示されるポリヌクレオチドに対して80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有し、かつ、クルイペロマイセス・マルシアヌスにおいてプロモーター活性を有するポリヌクレオチド：

(b) 配列番号1～3のいずれかに示されるポリヌクレオチドにおいて、1若しくは2個以上のヌクレオチドが欠失、置換若しくは付加されたポリヌクレオチドからなり、かつ、クルイペロマイセス・マルシアヌスにおいてプロモーター活性を有するポリヌクレオチド：

(c) 配列番号1～3のいずれかに示されるポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつ、クルイペロマイセス・マルシアヌスにおいてプロモーター活性を有するポリヌ

クレオチド：

[0020] 上記（b）における「1若しくは2個以上のヌクレオチドが欠失、置換若しくは付加されたポリヌクレオチド」とは、例えば1～20個、好ましくは1～15個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個の任意の数のヌクレオチドが欠失、置換若しくは付加されたポリヌクレオチドを意味する。

[0021] 上記（c）における「ストリンジントな条件下」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い、具体的には、80%以上、好ましくは85%以上の同一性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより同一性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である65℃、1×SSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム）、0.1%SDS、又は0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件を挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラークローニング第2版等に記載されている方法に準じて行うことができる。上記（c）における「ストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド」としては、プローブとして使用するポリヌクレオチドと一定以上の同一性を有するポリヌクレオチドが挙げることができ、例えば80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有するポリヌクレオチドを好適に例示することができる。

[0022] 上記の配列番号1～3のいずれかに示されるポリヌクレオチドは、例えば、鋳型としてサッカロマイセス・セレビシエのゲノムDNAを用い、該ヌクレオチド配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマーに用いるPCR反応によって、または該ヌクレオチド配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いるハイブリダイゼーションによっても得ることができる。なお、染色体DNAは、常法（例えば、特開2008-2

37024号公報)に開示された方法により取得できる。

[0023] オリゴヌクレオチドの合成は、例えば、市販されている種々のDNA合成機を用いて常法に従って合成できる。また、PCR反応は、アプライドバイオシステムズ社 (Applied Biosystems) 製のサーマルサイクラー Gene Amp PCR System 2400を用い、Taq DNAポリメラーゼ (タカラバイオ社製) やKOD-Plus (東洋紡績社製) などを使用して常法に従って行なうことができる。

[0024] また、前述のポリヌクレオチドの変異体は、化学合成、遺伝子工学的手法、突然変異誘発などの当業者に既知の任意の方法により作製することもできる。具体的には、配列番号1~3のいずれかに示されるポリヌクレオチドに対し、変異原となる薬剤と接触作用させる方法、紫外線を照射する方法、遺伝子工学的な手法等を用いて、これらポリヌクレオチドに変異を導入することにより、ポリヌクレオチドの変異体を取得することができる。遺伝子工学的手法の一つである部位特異的変異誘発法は特定の位置に特定の変異を導入できる手法であることから有用であり、モレキュラークロニング第2版、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)等に記載の方法に準じて行うことができる。

[0025] 本発明におけるプロモーターは、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいてプロモーター活性を有する。あるポリヌクレオチドがクルイベロマイセス・マルシアヌスにおいてプロモーター活性を有するかどうかは、例えばそのポリヌクレオチドの下流にレポーター遺伝子を作動可能に連結した組換えポリヌクレオチドを作製する工程、その組換えポリヌクレオチドをクルイベロマイセス・マルシアヌスに形質転換して形質転換酵母を得る工程、その形質転換酵母におけるそのレポーター遺伝子の発現の程度を測定する工程を含む周知のレポーターアッセイ等により容易に確認することができる。

[0026] 本発明の目的遺伝子の発現方法における「高発現」や、後述の本発明の目的遺伝子産物の製造方法における「高効率」には、本発明におけるプロモーターの下流に、分泌型ルシフェラーゼLuc遺伝子を作動可能に連結した

組換えポリヌクレオチドをクルイベロマイセス・マルシアヌスに導入して得られた形質転換体を、YPD液体培地（1質量%酵母エキス、2質量%ポリペプトン、2質量%グルコース）にて28℃、48時間振盪培養したときの培養液中の分泌型ルシフェラーゼCLucの相対発現量（RLU/OD・ μ l）が、10000以上、好ましくは12000以上、より好ましくは14000以上、さらに好ましくは16000以上、より好ましくは18000以上であることを好適に含む。また、上記の「高発現」や、「高効率」は、上記培養液中の分泌型ルシフェラーゼCLucの相対発現量（RLU/ μ l）が、30万以上、好ましくは45万以上、より好ましくは60万以上、さらに好ましくは75万以上であることも、好適に含む。

[0027] 本発明の目的遺伝子の発現方法における「高発現」や、後述の本発明の目的遺伝子産物の製造方法における「高効率」の他の例としては、本発明におけるプロモーターの下流に、分泌型ルシフェラーゼCLuc遺伝子を作動可能に連結した組換えポリヌクレオチドをクルイベロマイセス・マルシアヌスに導入して得られた形質転換体を、YPD液体培地（1質量%酵母エキス、2質量%ポリペプトン、2質量%グルコース）にて28℃、48時間振盪培養したときの培養液中の分泌型ルシフェラーゼCLucの相対発現量（RLU/OD・ μ l）が、上記組換えポリヌクレオチドをサッカロマイセス・セレビシエに導入して得られた形質転換体を、YPD液体培地（1質量%酵母エキス、2質量%ポリペプトン、2質量%グルコース）にて28℃、48時間振盪培養したときの培養液中の分泌型ルシフェラーゼCLucの相対発現量（RLU/OD・ μ l）に対して、割合として、3倍以上、好ましくは4倍以上、より好ましくは5倍以上、さらに好ましくは7倍以上、より好ましくは15倍以上、さらに好ましくは25倍以上、さらに好ましくは50倍以上であることを好適に含む。

[0028] 本発明の目的遺伝子の発現方法における「高発現」や、後述の本発明の目的遺伝子産物の製造方法における「高効率」のさらなる他の例としては、本発明におけるプロモーターの下流に、分泌型ルシフェラーゼCLuc遺伝子を

作動可能に連結した組換えポリヌクレオチドをクルイベロマイセス・マルシアヌスに導入して得られた形質転換体を、Y P G a l 液体培地（1 質量%酵母エキス、2 質量%ポリペプトン、2 質量%ガラクトース）にて28℃、48時間振盪培養したときの培養液中の分泌型ルシフェラーゼC L u c の相対発現量（R L U / O D ・ μ l）が、上記組換えポリヌクレオチドをクルイベロマイセス・マルシアヌスに導入して得られた形質転換体を、Y P D 液体培地（1 質量%酵母エキス、2 質量%ポリペプトン、2 質量%グルコース）にて28℃、48時間振盪培養したときの培養液中の分泌型ルシフェラーゼC L u c の相対発現量（R L U / O D ・ μ l）に対して、割合として、3倍以上、好ましくは4倍以上であることを好適に含む。

[0029] 本発明におけるポリヌクレオチドとしては、相補的な二本鎖ポリヌクレオチドを好適に例示することができ、中でも相補的な二本鎖DNAを特に好適に例示することができる。

[0030] 上記（A）の組換えポリヌクレオチドの「本発明におけるプロモーターの制御下に作動可能に配置された目的遺伝子」とは、本発明のプロモーターに転写因子が結合することにより、その目的遺伝子の発現が誘導されるように、本発明のプロモーターと、その目的遺伝子とが連結されていることを意味する。上記「目的遺伝子」としては、任意の遺伝子であればよいが、なんらかの有用なタンパク質をコードする有用タンパク質遺伝子を好適に例示することができる。有用タンパク質遺伝子としては、セルラーゼ遺伝子、アミラーゼ遺伝子等の糖化酵素遺伝子や、ウイルスワクチンタンパク質の遺伝子を好適に例示することができる。

[0031] 上記（B）記載の本発明におけるベクターは、上記の本発明における組換えポリヌクレオチドを含む。本発明におけるベクターを用いると、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて、本発明における組換えポリヌクレオチドを保持したり、目的遺伝子を発現させるためにクルイベロマイセス・マルシアヌスを形質転換したりすることができる。本発明におけるベクターは、直鎖状であってもよいし、環状であってもよい。クルイベロマイセス・マル

シアヌスは、直鎖状のベクターであっても染色体上において高頻度で組換えを生じさせることができ、その結果、形質転換することができる。また、環状のベクターの場合、さらに自己複製配列を含んでいれば、該ベクターはクルイベロマイセス・マルシアヌス細胞内にて自律複製し、酵母細胞内で保持され、その結果、形質転換することができる。

[0032] 上記ベクターは、クルイベロマイセス・マルシアヌス細胞内で目的遺伝子を発現させることが可能であるものである限り特に制限されず、環状のプラスミドベクターとしては、例えばpKD1等を好適に例示することができる。

[0033] 本発明における形質転換体は、本発明における組換えポリヌクレオチド、又は、本発明におけるベクターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスに導入することにより得られる。本発明における形質転換体は、その細胞内で目的遺伝子を高発現することができる。

[0034] 本発明における組換えポリヌクレオチド、又は、本発明におけるベクターの酵母への導入方法としては、特に制限されず、ウイルスベクターを利用する方法、特異的受容体を利用する方法、細胞融合法等の生物学的方法；エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法、超音波遺伝子導入法等の物理的方法；リポフェクション法、リン酸カルシウム共沈殿法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の化学的方法；などの公知の方法を例示することができ、中でも簡便であって汎用性が高い点でリポフェクション法を好適に例示することができる。また、本発明における組換えポリヌクレオチド、又は、本発明におけるベクターがその酵母へ導入されたかどうかは、目的遺伝子として、又は、目的遺伝子に加えて、マーカー遺伝子を本発明における組換えポリヌクレオチドや本発明におけるベクターにマーカー遺伝子を挿入しておき、形質転換体におけるそのマーカー遺伝子の発現を確認するなどして容易に確認することができる。

[0035] 本発明の目的遺伝子の発現方法のより好適な態様としては、前述したように、本発明における形質転換体を培養する工程を含むことを特徴とする。「

本発明における形質転換体を培養する方法」としては、その形質転換体が増殖し得る限り特に制限されないが、例えばその形質転換体が増殖可能な温度条件下（例えば25～50℃、好ましくは25～40℃、より好ましくは28～33℃）、YPD培地（1質量%酵母エキス、2質量%ポリペプトン、2質量%グルコース）にて、適当な時間（例えば1～10日間、好ましくは1～5日間、より好ましくは1～3日間）、振盪培養する方法を好適に例示することができる。なお、本発明におけるプロモーターのうち、サッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーターを用いた場合は、目的遺伝子をより顕著に高発現させ得ることから、糖源として、グルコースに代えて、ガラクトースを用いることが好ましい。すなわち、本発明におけるプロモーターのうち、サッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーターを用いた場合は、得られた形質転換体の培養を、ガラクトース存在下で行うことが好ましい。

[0036] 2. 本発明の目的遺伝子産物の製造方法

本発明の目的遺伝子産物の製造方法は、本発明におけるプロモーターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いることを特徴とする。本発明におけるプロモーターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いると、目的遺伝子産物を高効率で製造することができる。

[0037] 本発明の目的遺伝子産物の製造方法のより好適な態様としては、以下の（A）記載の組換えポリヌクレオチド、又は、以下の（B）記載のベクターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスに導入して得られる形質転換体を培養する工程（P）と、培養して得られた形質転換体から目的遺伝子産物を回収する工程（Q）とを含む。

（A）サッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーター、ILV5プロモーター、CWP2プロモーター、及び、それらの変異体からなる群から選択されるプロモーターと、その制御下に作動可能に配置された目的遺伝子とを含む組換えポリヌクレオチド：

（B）上記（A）に記載の組換えポリヌクレオチドを含むベクター：

[0038] 本発明の目的遺伝子産物の製造方法のより好適な態様における工程（P）は、前述の本発明の目的遺伝子の発現方法のより好適な態様における工程と同じである。また、上記工程（Q）における「培養して得られた形質転換体から目的遺伝子産物を回収する」方法としては、目的遺伝子産物を回収し得る限り特に制限されず、クロマトグラフィーを利用した方法、タグを利用した方法などの公知の方法を例示することができる。

[0039] 3. 本発明の目的遺伝子の発現効率を上昇させる方法

本発明の目的遺伝子の発現効率を上昇させる方法は、本発明におけるプロモーターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いることを特徴とする。本発明におけるプロモーターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いると、目的遺伝子の発現効率を向上させることができる。本発明の目的遺伝子の発現効率を上昇させる方法における好適な態様としては、前述の本発明の目的遺伝子の発現方法における好適な態様と同様の態様を例示することができる。

実施例 1

[0040] [サッカロマイセス・セレビシエからのプロモーターの単離]

公知の配列情報に基づき、サッカロマイセス・セレビシエからのTDH3プロモーター（ScTDH3プロモーター）、ILV5プロモーター（ScILV5プロモーター）、CWP2プロモーター（ScCWP2プロモーター）をそれぞれ単離した。ScTDH3プロモーターの配列は配列番号1に示され、ScILV5プロモーターの配列は配列番号2に示され、ScCWP2プロモーターの配列は配列番号3に示される。

実施例 2

[0041] [ScTDH3プロモーターの発現解析試験1（グルコース培地）]

サッカロマイセス・セレビシエ由来のScTDH3プロモーターが、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて目的遺伝子を発現させることができるかどうかを調べるために、以下のような発現解析試験を行った。

[0042] まずは以下の2つの形質転換体を、公知の形質転換法により、作製した。

(1) *S c T D H 3* プロモーターの下流に、分泌型ルシフェラーゼ *C L u c* 遺伝子を作動可能に連結した *S c T D H 3 p - C L u c* をサッカロマイセス・セレビシエに導入して得られた比較例形質転換体 1 (*S c T F S c T D H 3 p - C L u c*)。

(2) 上記の *S c T D H 3 p - C L u c* をクルイベロマイセス・マルシアヌスに導入して得られた実施例形質転換体 1 (*K m T F S c T D H 3 p - C L u c*)。

[0043] これらの両形質転換体を、それぞれ Y P D 液体培地 (1 質量%酵母エキス、2 質量%ポリペプトン、2 質量%グルコース) にて 28℃で振盪培養した。その培養液を経時的にサンプリングして、培養液 1 μ l 中の分泌型ルシフェラーゼ *C L u c* の相対発現量 ($R L U / \mu l$)、及び、培養液の O D 600 を測定した。培養開始直後、培養開始から 24 時間経過後、48 時間経過後、72 時間経過後、96 時間経過後、120 時間経過後、及び、144 時間経過後における測定結果 (相対発現量 ($R L U / \mu l$))) を図 1 に示す。なお、図 1 のグラフは、各種の形質転換体につき、3 クローンずつの平均値で示した。また、上記相対発現量 ($R L U / \mu l$) の値を、培地の O D 600 の測定値で割って算出した値 (相対発現量 ($R L U / O D \cdot \mu l$))) で表した結果を図 2 に示す。図 1 及び図 2 の結果から分かるように、実施例形質転換体 1 は、比較例形質転換体 1 に比べて、早期かつ顕著な高発現性を示した。特に、実施例形質転換体 1 は、比較例形質転換体 1 と比較して、培養開始直後から高発現性を示し、培養開始から 48 時間経過後には、実施例形質転換体 1 は、比較例形質転換体 1 に比べて、割合として、139 倍以上もの相対発現量 ($R L U / \mu l$) (66 倍以上もの相対発現量 ($R L U / O D \cdot \mu l$))) を示した。実施例形質転換体 1 のこの「早期かつ顕著な高発現性」は、目的遺伝子産物等の単位時間当たりの製造効率を飛躍的に高めることとなるので、顕著な効果といえる。

[0044] 以上のように、サッカロマイセス・セレビシエ由来の *T D H 3* プロモーター (*S c T D H 3* プロモーター) は、サッカロマイセス・セレビシエにおい

て用いた場合に比べて、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いた場合に、早期かつ顕著な高発現性を示した。一般的に、プロモーターは、そのプロモーターが由来する生物種の細胞内において最も高いプロモーター活性を示し、他の生物種においては、プロモーター活性そのものを示さないか、あるいは、低下したプロモーター活性を示すことを考慮すると、本発現解析試験の結果は意外であった。なお、本明細書中の「活性量」は「相対発現量」と同義である。

実施例 3

[0045] [ScTDH3 プロモーターの発現解析試験 2 (ガラクトース培地)]

実施例形質転換体 1 の早期かつ顕著な高発現性が、他の種類の糖を用いた場合にも得られるかどうか確認するために、上記実施例 2 における発現解析試験において、YPD 液体培地に代えて、YPGal 液体培地（1 質量%酵母エキス、2 質量%ポリペプトン、2 質量%ガラクトース）を用いたこと以外は同じ方法で、発現解析を行った。その結果を図 3 に示す。また、その発現解析で得られた相対発現量（RLU/ μ l）の値を、培地の OD600 の測定値で割って算出した値（相対発現量（RLU/OD・ μ l））で表した結果を図 4 に示す。図 3 及び図 4 の結果から分かるように、グルコース培地に代えてガラクトース培地を用いると、実施例形質転換体 1 は、より顕著な高発現性を示した。例えば、実施例形質転換体 1 は、ガラクトース培地条件下では、グルコース培地条件下に比べて、培養開始から 48 時間経過後には 4.9 倍以上もの相対発現量（RLU/ μ l）（5.1 倍以上もの相対発現量（RLU/OD・ μ l））を示し、120 時間経過後には 4.9 倍以上もの相対発現量（RLU/ μ l）（4.8 倍以上もの相対発現量（RLU/OD・ μ l））を示した。ScTDH3 プロモーターは、サッカロマイセス・セレビシエにおいてガラクトース誘導性を全く示さないことからすると、本発現解析試験の結果はきわめて意外であった。

なお、ガラクトース培地条件下における実施例形質転換体 1 は、比較例形質転換体 1 に比べて、培養開始から 48 時間経過後には 833 倍以上もの相

対発現量 ($RLU/\mu l$) (607 倍以上もの相対発現量 ($RLU/OD \cdot \mu l$)) を示し、 120 時間経過後には 86 倍以上もの相対発現量 ($RLU/\mu l$) (72 倍以上もの相対発現量 ($RLU/OD \cdot \mu l$)) を示した。

実施例 4

[0046] [ScTDH3 プロモーターの発現解析試験 3 (様々な糖培地)]

上記の実施例形質転換体 1 が、様々な糖培地を用いた場合にどのような発現性を示すかどうかを調べるために、実施例形質転換体 1 を用いた発現解析試験を行った。その発現解析試験の方法としては、上記実施例 2 における発現解析試験において、YPD 液体培地中のグルコースに代えて、ガラクトース、フルクトース、又は、マンノースを同質量用いたこと以外は同じ方法を用いた。なお、YPD 液体培地中のグルコースに代えてガラクトースを同質量用いた培地は YPGal 液体培地となる。今回の発現解析において、培養開始から 48 時間経過後に測定した相対発現量 ($RLU/\mu l$) の結果を図 5 に示す。また、その発現解析で得られた相対発現量 ($RLU/\mu l$) の値を、培地の OD_{600} の測定値で割って算出した値 (相対発現量 ($RLU/OD \cdot \mu l$)) で表した結果を図 6 に示す。

[0047] 図 5 及び図 6 の結果から分かるように、フルクトースやマンノースを用いた場合は、グルコースを用いた場合と同程度の相対発現量を示した。ガラクトースを用いた場合にのみ、他の糖を用いた場合と比較して、約 5 倍以上もの相対発現量 ($RLU/\mu l$) (約 4.5 倍以上もの相対発現量 ($RLU/OD \cdot \mu l$)) を示した。この結果から、ScTDH3 プロモーターをクリイペロマイセス・マルシアヌスにおいて用いたときのガラクトース誘導性は、ガラクトースに特異的な誘導性であることが示された。

実施例 5

[0048] [サッカロマイセス・セレビシエ由来の様々なプロモーターの発現解析試験]

ScTDH3 プロモーター以外の、サッカロマイセス・セレビシエ由来のプロモーターでも同様の効果が得られるかどうかを調べるために、以下のよ

うな発現解析試験を行った。

[0049] 以下の4つの形質転換体を、公知の形質転換法により、作製した。

(3) ScILV5プロモーターの下流に、分泌型ルシフェラーゼCLuc遺伝子を作動可能に連結したScILV5p-CLucをサッカロマイセス・セレビスエに導入して得られた比較例形質転換体2 (ScTF ScILV5p-CLuc)。

(4) 上記のScILV5p-CLucをクルイベロマイセス・マルシアヌスに導入して得られた実施例形質転換体2 (KmTF ScILV5p-CLuc)。

(5) ScCWP2プロモーターの下流に、分泌型ルシフェラーゼCLuc遺伝子を作動可能に連結したScCWP2p-CLucをサッカロマイセス・セレビスエに導入して得られた比較例形質転換体3 (ScTF ScCWP2p-CLuc)。

(6) 上記のScCWP2p-CLucをクルイベロマイセス・マルシアヌスに導入して得られた実施例形質転換体3 (KmTF ScCWP2p-CLuc)。

[0050] ScTDH3プロモーターを用いた比較例形質転換体1及び実施例形質転換体1に加えて、上記の比較例形質転換体2～3及び実施例形質転換体2～3を用いて、上記実施例2における発現解析試験と同様の発現解析試験を行った。培養開始から48時間経過後に測定した相対発現量 (RLU/OD・ μ l)の結果を図7に示す。なお、図7には、左から順に、比較例形質転換体1、実施例形質転換体1、比較例形質転換体2、実施例形質転換体2、比較例形質転換体3、実施例形質転換体3の結果を示す。

[0051] 図7の結果から分かるように、実施例形質転換体1は、比較例形質転換体1に比べて18倍以上の相対発現量 (RLU/OD・ μ l)を示し、実施例形質転換体2は、比較例形質転換体2に比べて7倍以上の相対発現量 (RLU/OD・ μ l)を示し、実施例形質転換体3は、比較例形質転換体3に比べて4倍以上の相対発現量 (RLU/OD・ μ l)を示した。また、実施例

形質転換体2の相対発現量（40882RLU/OD・ μ l）、及び、実施例形質転換体3の相対発現量（29324RLU/OD・ μ l）は、いずれも、実施例形質転換体1の示した相対発現量（28251RLU/OD・ μ l）より高かった。

- [0052] 以上のように、サッカロマイセス・セレビシエ由来のILV5プロモーター（ScILV5プロモーター）、CWP2プロモーター（ScCWP2プロモーター）も、サッカロマイセス・セレビシエにおいて用いた場合に比べて、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いた場合に、顕著な高発現性を示した。

産業上の利用可能性

- [0053] 本発明は、目的遺伝子の高発現や、目的遺伝子産物の高効率での製造の分野において特に有用に利用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] サッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーター、ILV5プロモーター、CWP2プロモーター、及び、それらの変異体からなる群から選択されるプロモーターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いることを特徴とする目的遺伝子の発現方法。
- [請求項2] 以下の（A）記載の組換えポリヌクレオチド、又は、以下の（B）記載のベクターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスに導入して得られる形質転換体を培養する工程を含むことを特徴とする請求項1に記載の目的遺伝子の発現方法：
- （A） サッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーター、ILV5プロモーター、CWP2プロモーター、及び、それらの変異体からなる群から選択されるプロモーターと、その制御下に作動可能に配置された目的遺伝子とを含む組換えポリヌクレオチド；
- （B） 上記（A）に記載の組換えポリヌクレオチドを含むベクター。
- [請求項3] プロモーターとしてサッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーターを用い、かつ、形質転換体の培養をガラクトース存在下で行うことを特徴とする請求項2に記載の目的遺伝子の発現方法。
- [請求項4] サッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーター、ILV5プロモーター、CWP2プロモーター、及び、それらの変異体からなる群から選択されるプロモーターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いることを特徴とする目的遺伝子産物の製造方法。
- [請求項5] 以下の（A）記載の組換えポリヌクレオチド、又は、以下の（B）記載のベクターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスに導入して得られる形質転換体を培養する工程（P）と、培養して得られた形質転換体から目的遺伝子産物を回収する工程（Q）とを含むことを特徴とする請求項4に記載の目的遺伝子産物の製造方法：
- （A） サッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーター、ILV5プロモーター、CWP2プロモーター、及び、それらの変異

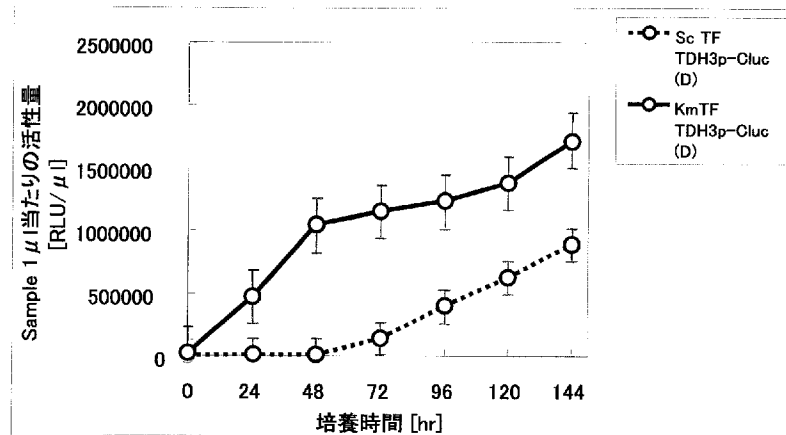
体からなる群から選択されるプロモーターと、その制御下に作動可能に配置された目的遺伝子とを含む組換えポリヌクレオチド：

(B) 上記 (A) に記載の組換えポリヌクレオチドを含むベクター。

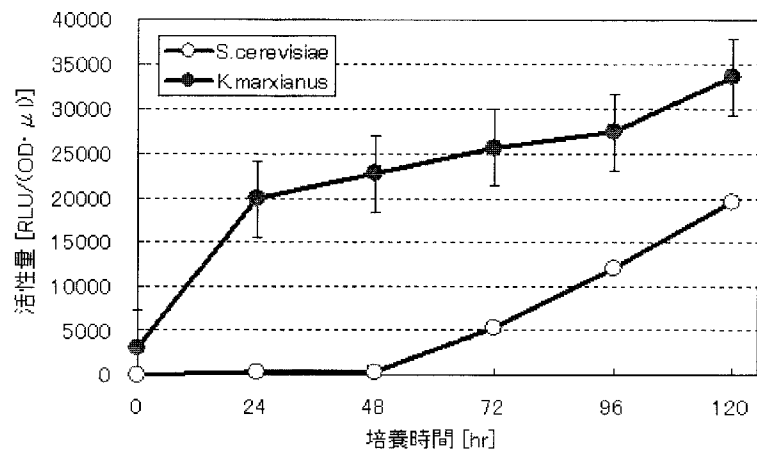
[請求項6] プロモーターとしてサッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーターを用い、かつ、形質転換体の培養をガラクトース存在下で行うことを特徴とする請求項5に記載の目的遺伝子産物の製造方法。

[請求項7] サッカロマイセス・セレビシエ由来のTDH3プロモーター、ILV5プロモーター、CWP2プロモーター、及び、それらの変異体からなる群から選択されるプロモーターを、クルイベロマイセス・マルシアヌスにおいて用いることを特徴とする目的遺伝子の発現効率を上昇させる方法。

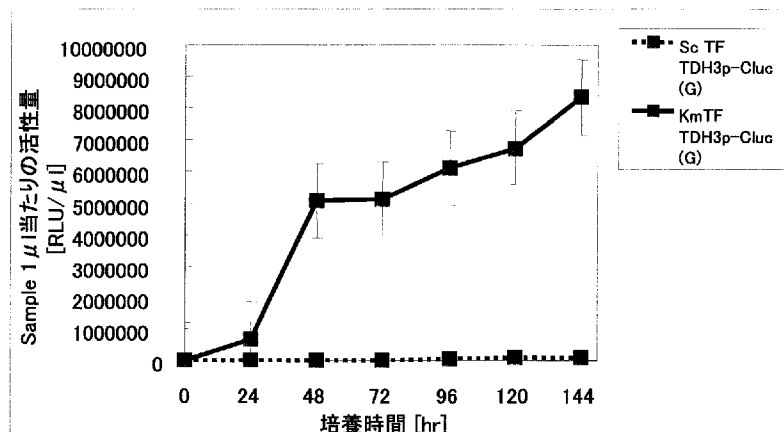
[図1]

グルコース
培地

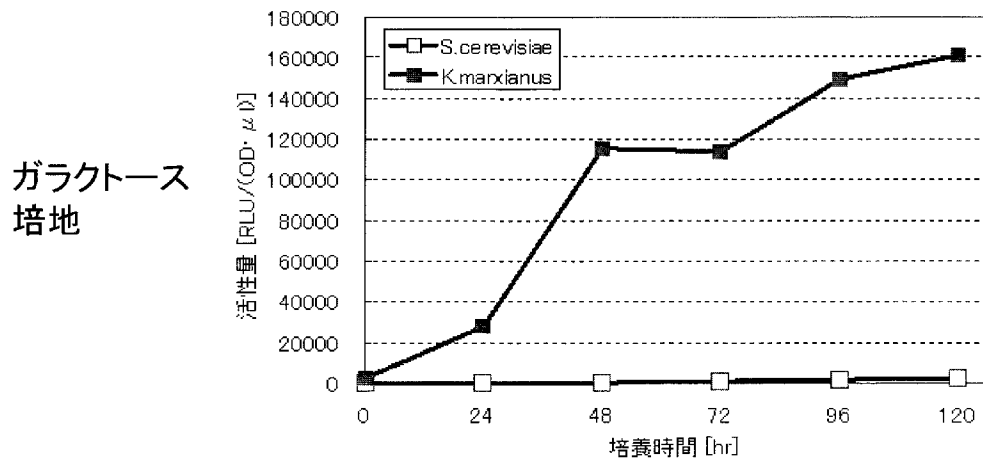
[図2]

グルコース
培地

[図3]

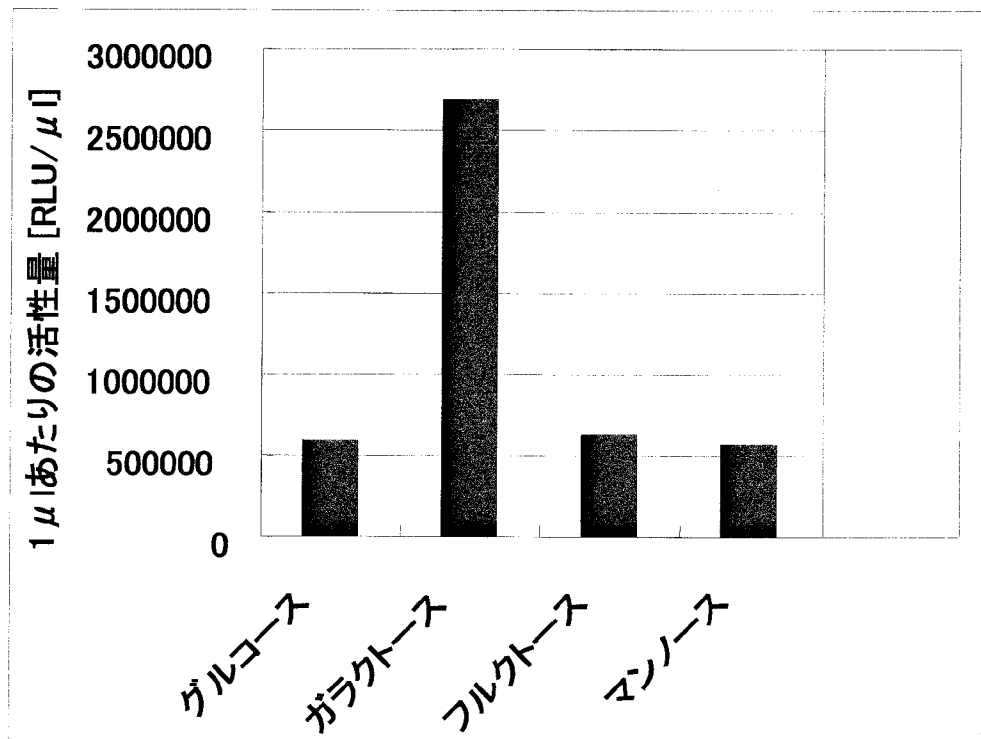
ガラクトース
培地

[図4]

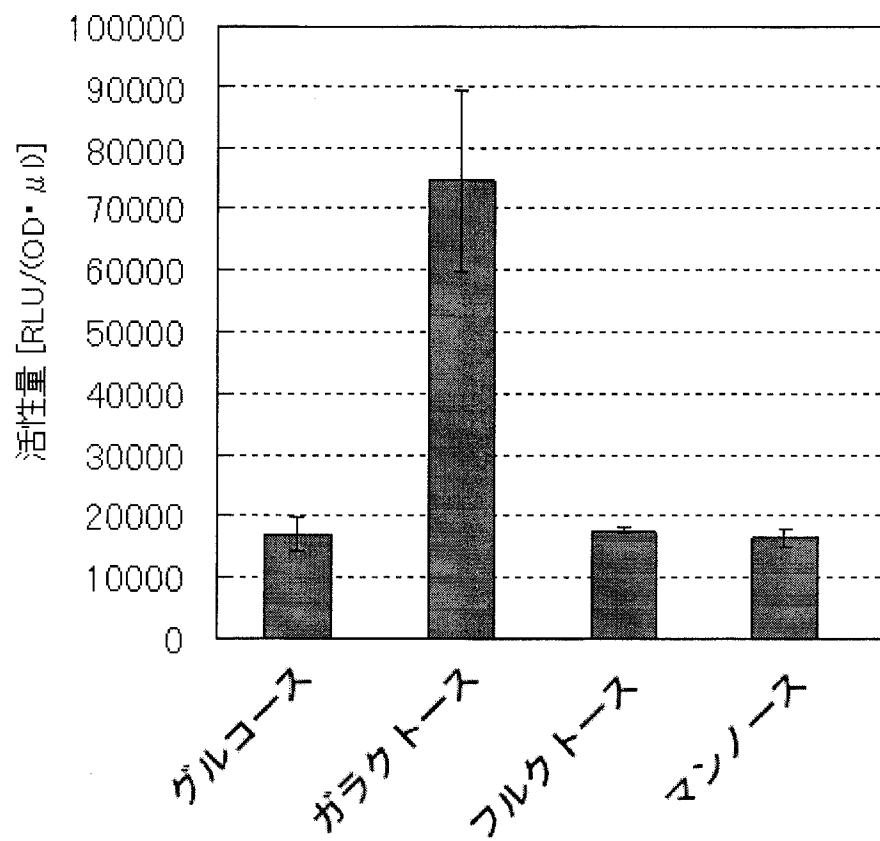


[図5]

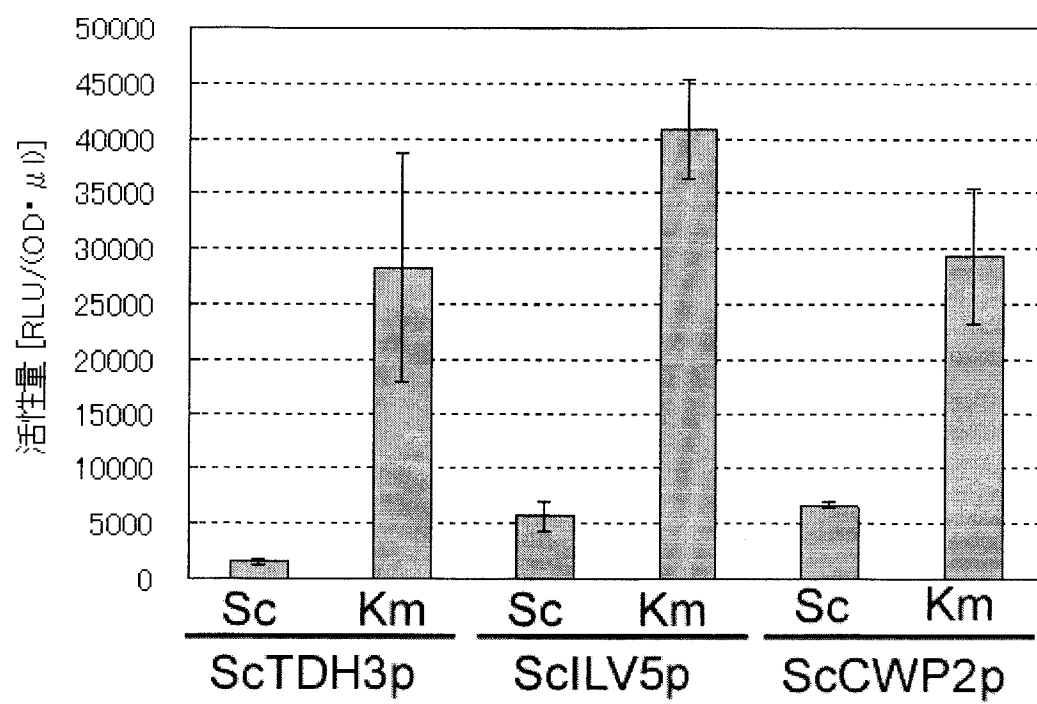
K. marxianus
ScTDH3p-yCLuc



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/000439

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00(2006.01) i, C12N15/09(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)

C12N15/00, C12N15/09

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)

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, CiNii, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	NONKLANG, S. et al., Construction of flocculent <i>Kluyveromyces marxianus</i> strains suitable for high-temperature ethanol fermentation, Biosci. Biotechnol. Biochem., 2009, Vol.73 No.5, pages 1090-1095.	1, 2, 4, 5, 7/3, 6
Y	WO 2009/116286 A1 (Yamaguchi University), 24 September 2009 (24.09.2009), entire text (Family: none)	1-7
Y	TESTE, M.-A. et al., Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , BMC Molecular Biology, October 2009, Vol.10:99, pages 1-15.	3, 6



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
16 February, 2011 (16.02.11)Date of mailing of the international search report
01 March, 2011 (01.03.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/000439

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FRIDEN, P. and SCHIMMEL, P., LEU3 of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> activates multiple genes for branched-chain amino acid biosynthesis by binding to a common decanucleotide core sequence, MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, July 1988, Vol.8 No.7, pages 2690-2697.	1, 2, 4, 5, 7
Y	HU, Y. et al., The <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Leu3 protein activates expression of GDH1, a key gene in nitrogen assimilation, MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, January 1995, Vol.15 No.1, pages 52-57.	1, 2, 4, 5, 7
Y	SMITS, G. J. et al., Role of cell cycle-regulated expression in the localized incorporation of cell wall proteins in yeast, Molecular Biology of the Cell, July 2006, Vol.17, pages 3267-3280.	1, 2, 4, 5, 7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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)

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)、PubMed、CiNii、WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	NONKLANG, S. et al., Construction of flocculent Kluyveromyces marxianus strains suitable for high-temperature ethanol fermentation, Biosci. Biotechnol. Biochem., 2009, Vol.73 No.5, pages 1090-1095.	1, 2, 4, 5, 7/ 3, 6
Y	W0 2009/116286 A1 (国立大学法人山口大学) 2009.09.24, 全文 (ファミリーなし)	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 6 . 0 2 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

0 1 . 0 3 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

白井 美香保

4 N

4 5 0 2

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	TESTE, M.-A. et al., Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , BMC Molecular Biology, October 2009, Vol.10:99, pages 1-15.	3, 6
Y	FRIDEN, P. and SCHIMMEL, P., LEU3 of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> activates multiple genes for branched-chain amino acid biosynthesis by binding to a common decanucleotide core sequence, MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, July 1988, Vol.8 No. 7, pages 2690-2697.	1, 2, 4, 5, 7
Y	HU, Y. et al., The <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Leu3 protein activates expression of GDH1, a key gene in nitrogen assimilation, MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, January 1995, Vol.15 No.1, pages 52-57.	1, 2, 4, 5, 7
Y	SMITS, G. J. et al., Role of cell cycle-regulated expression in the localized incorporation of cell wall proteins in yeast, Molecular Biology of the Cell, July 2006, Vol.17, pages 3267-3280.	1, 2, 4, 5, 7