(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2019-88191
(P2019-88191A)
(43)公開日　令和1年6月13日(2019.6.13)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B064
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B065
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C	

審査請求 未請求　請求項の数 11　ＯＬ　（全 30 頁）

(21)出願番号　特願2016-56770(P2016-56770)
(22)出願日　平成28年3月22日(2016.3.22)

(71)出願人　000000044
ＡＧＣ株式会社
東京都千代田区丸の内一丁目５番１号
(74)代理人　100106909
弁理士　棚井　澄雄
(74)代理人　100064908
弁理士　志賀　正武
(74)代理人　100094400
弁理士　鈴木　三義
(74)代理人　100106057
弁理士　柳井　則子
(72)発明者　田中　崇之
東京都千代田区丸の内一丁目５番１号　旭硝子株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】誘導型プロモーター

(57)【要約】
【課題】シゾサッカロミセス属酵母を宿主とする形質転換体内で機能する、特定の物質を培養培地に添加することによって発現を誘導し得るプロモーター等の提供。
【解決手段】シゾサッカロミセス・ポンベのＳＰＡＣ２９Ｂ１２．１４ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．０９ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１３９９．０１ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．１２遺伝子のプロモーター、およびＳＰＡＣ１９Ｇ１２．０３遺伝子のプロモーターからなる群より選択されるプロモーターであって、該プロモーターと該プロモーターの下流に位置しかつ該プロモーターによって支配される外来構造遺伝子とを有する形質転換体において、アラントインおよびアラントイン酸からなる群より選択される１種以上により前記外来遺伝子の発現を誘導するプロモーターとして使用されるプロモーターである、誘導型プロモーター。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
シゾサッカロミセス・ポンベのＳＰＡＣ２９Ｂ１２．１４ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．０９ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１３９９．０１ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．１２遺伝子のプロモーター、およびＳＰＡＣ１９Ｇ１２．０３遺伝子のプロモーターからなる群より選択されるプロモーターであって、該プロモーターと該プロモーターの下流に位置しかつ該プロモーターによって支配される外来構造遺伝子とを有する形質転換体において、アラントインおよびアラントイン酸からなる群より選択される１種以上により前記外来遺伝子の発現を誘導するプロモーターとして使用されるプロモーターであることを特徴とする、誘導型プロモーター。
【請求項２】
前記ＳＰＡＣ２９Ｂ１２．１４ｃ遺伝子のプロモーターの領域が、
（１）配列番号１で表される塩基配列、
（２）配列番号１で表される塩基配列の部分配列であって、２６３０～３０２９番目の塩基からなる領域を含む塩基配列、または
（３）前記（１）または（２）の塩基配列とホモロジーが８０％以上である塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する塩基配列
からなる、請求項１に記載の誘導型プロモーター。
【請求項３】
前記ＳＰＡＣ１Ｆ７．０９ｃ遺伝子のプロモーターの領域が、
（１）配列番号２で表される塩基配列、
（２）配列番号２で表される塩基配列の部分配列であって、１００１～１５００番目の塩基からなる領域を含む塩基配列、または
（３）前記（１）または（２）の塩基配列とホモロジーが８０％以上である塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する塩基配列
からなる、請求項１に記載の誘導型プロモーター。
【請求項４】
前記ＳＰＡＣ１３９９．０１ｃ遺伝子のプロモーターの領域が、
（１）配列番号３で表される塩基配列、
（２）配列番号３で表される塩基配列の部分配列であって、１５３４～３０３３番目の塩基からなる領域を含む塩基配列、または
（３）前記（１）または（２）の塩基配列とホモロジーが８０％以上である塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する塩基配列
からなる、請求項１に記載の誘導型プロモーター。
【請求項５】
ＳＰＡＣ１Ｆ７．１２遺伝子のプロモーターの領域が、
（１）配列番号４で表される塩基配列、
（２）配列番号４で表される塩基配列の部分配列であって、２７５７～３０５６番目の塩基からなる領域を含む塩基配列、または
（３）前記（１）または（２）の塩基配列とホモロジーが８０％以上である塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する塩基配列
からなる、請求項１に記載の誘導型プロモーター。
【請求項６】
ＳＰＡＣ１９Ｇ１２．０３遺伝子のプロモーターの領域が、
（１）配列番号５で表される塩基配列、
（２）配列番号５で表される塩基配列の部分配列であって、１１０１～１５００番目の塩

基からなる領域を含む塩基配列、または
（３）前記（１）または（２）の塩基配列とホモロジーが８０％以上である塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する塩基配列
からなる、請求項１に記載の誘導型プロモーター。
【請求項７】
プロモーターと、該プロモーターの下流に位置しかつ該プロモーターによって支配される外来構造遺伝子とを有し、
前記プロモーターが、シゾサッカロミセス・ポンベのＳＰＡＣ２９Ｂ１２．１４ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．０９ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１３９９．０１ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．１２遺伝子のプロモーター、またはＳＰＡＣ１９Ｇ１２．０３遺伝子のプロモーターであることを特徴とする、発現カセット。
【請求項８】
プロモーターと、該プロモーターの下流に位置しかつ該プロモーターによって支配される外来構造遺伝子を導入するためのクローニングサイトと、シゾサッカロミセス属酵母内で機能しうるターミネーターとを有し、
前記プロモーターが、シゾサッカロミセス・ポンベのＳＰＡＣ２９Ｂ１２．１４ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．０９ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１３９９．０１ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．１２遺伝子のプロモーター、またはＳＰＡＣ１９Ｇ１２．０３遺伝子のプロモーターであることを特徴とする、クローニングベクター。
【請求項９】
シゾサッカロミセス・ポンベのＳＰＡＣ２９Ｂ１２．１４ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．０９ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１３９９．０１ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．１２遺伝子のプロモーター、またはＳＰＡＣ１９Ｇ１２．０３遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に位置しかつ該プロモーターによって支配される外来構造遺伝子と、ターミネーターを含む発現カセットを有することを特徴とするシゾサッカロミセス属酵母の形質転換体。
【請求項１０】
前記シゾサッカロミセス属酵母がシゾサッカロミセス・ポンベである、請求項９に記載の形質転換体。
【請求項１１】
請求項９または１０に記載の形質転換体を、アラントインおよびアラントイン酸からなる群より選択される１種以上を含有する培養液中で培養し、得られた菌体または培養液上清から、前記外来構造遺伝子がコードする蛋白質を取得することを特徴とする蛋白質の生産方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、シゾサッカロミセス（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属酵母内で機能する、特定の物質を培地に添加することによって発現を誘導し得るプロモーター、該プロモーターを含む発現カセットおよびクローニングベクター、該発現カセットを含む形質転換体、ならびに該形質転換体を培養して蛋白質を生産する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
シゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ、以下、「Ｓ．ポンベ」ということがある。）をはじめとするシゾサッカロミセス属酵母は、その様々な特徴から、より高等動物細胞に近い単細胞真核生物であると位置づけられ、外来構造遺伝子、特に高等動物由来遺伝子の発現用宿主として非常に有用な酵母であると考えられる。特にヒトを含む動物細胞由来の遺伝子の発現に適していることが知られて

いる。
【０００３】
生物の転写・翻訳系を利用して蛋白質を発現させる場合には、一般的に、異種蛋白質をコードする外来構造遺伝子の上流に、該外来構造遺伝子の転写を制御するプロモーターと、転写により得られたｍＲＮＡを解離させるターミネーターとを含む発現カセットを、宿主とする細胞に導入する。プロモーターには、常時発現を誘導する構成型プロモーターと、特定の培養条件により発現を誘導できる誘導型プロモーターとがある。誘導型プロモーターでは、培養工程と蛋白質生産工程とを分けられるため、宿主に対して毒性の高い蛋白質の生産も可能となり、また、宿主の代謝コントロールも可能であるため、特に低分子化合物の生産に有用である。
【０００４】
たとえば、植物を宿主とする形質転換体の作製に使用可能なプロモーターとしては、窒素源をアンモニウム塩から硝酸塩に変更して誘導するＮｉＲプロモーター（特許文献１参照。）、および窒素源を硝酸塩からアンモニアや尿素といった非硝酸塩に変更して誘導するＲｕＢｉｓＣｏプロモーター（特許文献２参照。）が報告されている。これに対して、シゾサッカロミセス属酵母を宿主とした場合に使用されている誘導型プロモーターとしては、エタノールや１－プロパノールで誘導されるｇｌｄ１プロモーターが報告されているが（非特許文献１参照。）、窒素源の違いにより誘導されるプロモーターは報告されていない。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００５】
【特許文献１】特表２００３－５１２８２１号公報
【特許文献２】特表２０１４－５１８６１１号公報
【非特許文献】
【０００６】
【非特許文献１】Matsuzawa et al., Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, vol.97, p.6835－6843.
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
本発明に係る目的は、シゾサッカロミセス属酵母を宿主とする形質転換体内で機能する、特定の物質を培養培地に添加することによって発現を誘導し得るプロモーター、該プロモーターを含む発現カセットおよびクローニングベクター、該発現カセットを含む形質転換体、ならびに該形質転換体を培養して蛋白質を生産する方法を提供することにある。
【課題を解決するための手段】
【０００８】
本発明者等は、Ｓ．ポンベが有する遺伝子の中にアラントインまたはアラントイン酸によってその発現が誘導される遺伝子が存在すること、および該遺伝子中のプロモーターがアラントインまたはアラントイン酸によって該構造遺伝子の発現を誘導する特性を有していること、を見出した。さらに、本発明者等は、この知見に基づき、該プロモーターを形質転換体の外来構造遺伝子の発現を制御する誘導型プロモーターとして使用しうることを見出し、本発明を完成するに至った。
【０００９】
すなわち、本発明は、以下［１］～［１１］を提供するものである。
［１］　シゾサッカロミセス・ポンベのＳＰＡＣ２９Ｂ１２．１４ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．０９ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１３９９．０１ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．１２遺伝子のプロモーター、およびＳＰＡＣ１９Ｇ１２．０３遺伝子のプロモーターからなる群より選択されるプロモーターであって、該プロモーターと該プロモーターの下流に位置しかつ該プロモーターによって支配される外来構造

遺伝子とを有する形質転換体において、アラントインおよびアラントイン酸からなる群より選択される１種以上により前記外来遺伝子の発現を誘導するプロモーターとして使用されるプロモーターであることを特徴とする、誘導型プロモーター。
［２］　前記ＳＰＡＣ２９Ｂ１２．１４ｃ遺伝子のプロモーターの領域が、
（１）配列番号１で表される塩基配列、
（２）配列番号１で表される塩基配列の部分配列であって、２６３０～３０２９番目の塩基からなる領域を含む塩基配列、または
（３）前記（１）または（２）の塩基配列とホモロジーが８０％以上である塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する塩基配列
からなる、前記［１］の誘導型プロモーター。
［３］　前記ＳＰＡＣ１Ｆ７．０９ｃ遺伝子のプロモーターの領域が、
（１）配列番号２で表される塩基配列、
（２）配列番号２で表される塩基配列の部分配列であって、１００１～１５００番目の塩基からなる領域を含む塩基配列、または
（３）前記（１）または（２）の塩基配列とホモロジーが８０％以上である塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する塩基配列
からなる、前記［１］の誘導型プロモーター。
［４］　前記ＳＰＡＣ１３９９．０１ｃ遺伝子のプロモーターの領域が、
（１）配列番号３で表される塩基配列、
（２）配列番号３で表される塩基配列の部分配列であって、１５３４～３０３３番目の塩基からなる領域を含む塩基配列、または
（３）前記（１）または（２）の塩基配列とホモロジーが８０％以上である塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する塩基配列
からなる、前記［１］の誘導型プロモーター。
［５］　ＳＰＡＣ１Ｆ７．１２遺伝子のプロモーターの領域が、
（１）配列番号４で表される塩基配列、
（２）配列番号４で表される塩基配列の部分配列であって、２７５７～３０５６番目の塩基からなる領域を含む塩基配列、または
（３）前記（１）または（２）の塩基配列とホモロジーが８０％以上である塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する塩基配列
からなる、前記［１］の誘導型プロモーター。
［６］　ＳＰＡＣ１９Ｇ１２．０３遺伝子のプロモーターの領域が、
（１）配列番号５で表される塩基配列、
（２）配列番号５で表される塩基配列の部分配列であって、１１０１～１５００番目の塩基からなる領域を含む塩基配列、または
（３）前記（１）または（２）の塩基配列とホモロジーが８０％以上である塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する塩基配列
からなる、前記［１］の誘導型プロモーター。
【００１０】
［７］　プロモーターと、該プロモーターの下流に位置しかつ該プロモーターによって支配される外来構造遺伝子とを有し、
　前記プロモーターが、シゾサッカロミセス・ポンベのＳＰＡＣ２９Ｂ１２．１４ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．０９ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１３９９．０１ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．１２遺伝子のプロモーター、またはＳＰＡＣ１９Ｇ１２．０３遺伝子のプロモーターであることを特徴とする、発現カセット。

［８］　プロモーターと、該プロモーターの下流に位置しかつ該プロモーターによって支配される外来構造遺伝子を導入するためのクローニングサイトと、シゾサッカロミセス属酵母内で機能しうるターミネーターとを有し、
　前記プロモーターが、シゾサッカロミセス・ポンベのＳＰＡＣ２９Ｂ１２．１４ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．０９ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１３９９．０１ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．１２遺伝子のプロモーター、またはＳＰＡＣ１９Ｇ１２．０３遺伝子のプロモーターであることを特徴とする、クローニングベクター。
［９］　シゾサッカロミセス・ポンベのＳＰＡＣ２９Ｂ１２．１４ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．０９ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１３９９．０１ｃ遺伝子のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．１２遺伝子のプロモーター、またはＳＰＡＣ１９Ｇ１２．０３遺伝子のプロモーターと、該プロモーターの下流に位置しかつ該プロモーターによって支配される外来構造遺伝子と、ターミネーターを含む発現カセットを有することを特徴とするシゾサッカロミセス属酵母の形質転換体。
［１０］　前記シゾサッカロミセス属酵母がシゾサッカロミセス・ポンベである、前記［９］の形質転換体
［１１］　前記［９］または［１０］の形質転換体を、アラントインおよびアラントイン酸からなる群より選択される１種以上を含有する培養液中で培養し、得られた菌体または培養液上清から、前記外来構造遺伝子がコードする蛋白質を取得することを特徴とする蛋白質の生産方法。

【発明の効果】
【００１１】
　本発明に係る誘導型プロモーターを発現させる目的の蛋白質をコードする外来構造遺伝子のプロモーターとして用いることにより、シゾサッカロミセス属酵母において、アラントインおよびアラントイン酸からなる群より選択される１種以上を誘導剤として目的の蛋白質の発現を誘導させられる。
　本発明に係る発現カセットおよびクローニングベクターを用いることにより、外来構造遺伝子由来の蛋白質をアラントインまたはアラントイン酸により発現誘導し得るシゾサッカロミセス属酵母の形質転換体を容易に作製できる。

【図面の簡単な説明】
【００１２】
【図１】単座組込み用ベクターｐＳＬ６ＡＬ９ｐ（１．５）の構造を模式的に示した図である。
【図２】単座組込み用ベクターｐＳＬ６ＡＬ１４ｐ（１．５）の構造を模式的に示した図である。
【図３】実施例２において、各形質転換体のＯＤ$_{660}$当りのＧＦＰ蛍光強度の結果を示した図である。
【図４】実施例３において、各形質転換体のＯＤ$_{660}$当りのＧＦＰ蛍光強度の結果を示した図である。
【図５】実施例４において、各形質転換体のＯＤ$_{660}$当りのＧＦＰ蛍光強度の結果を示した図である。
【図６】実施例５において、各形質転換体のＯＤ$_{660}$当りのＧＦＰ蛍光強度の結果を示した図である。
【図７】実施例６において、各形質転換体のＯＤ$_{660}$当りのＧＦＰ蛍光強度の結果を示した図である。
【図８】実施例７において、各形質転換体のＯＤ$_{660}$当りのＧＦＰ蛍光強度の結果を示した図である。
【図９】実施例８において、アラントイン濃度の異なる各培養培地における各形質転換体のＯＤ$_{660}$当りのＧＦＰ蛍光強度の結果を示した図である。
【図１０】実施例９において、硫安濃度の異なる各培養培地における各形質転換体のＯＤ

$_{660}$当りのＧＦＰ蛍光強度の結果を示した図である。
【図１１】実施例１０において、各培養培地における各形質転換体のＯＤ$_{660}$当りのＧＦＰ蛍光強度の結果を示した図である。
【図１２】実施例１１において、各培養培地における各形質転換体のＯＤ$_{660}$当りのＧＦＰ蛍光強度の結果を示した図である。
【図１３】実施例１２において、各形質転換体におけるＥＧＦＰのｍＲＮＡの相対量（ｈＣＭＶ株のアラントイン添加前のＥＧＦＰのｍＲＮＡ量を１とする。）を算出した結果を示した図である。
【図１４】実施例１３において、各形質転換体のＯＤ$_{660}$当りのＧＦＰ蛍光強度の結果を示した図である。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
［誘導型プロモーター］
本発明に係る誘導型プロモーターは、Ｓ．ポンベのＳＰＡＣ２９Ｂ１２．１４ｃ遺伝子（以下、「ＡＬ８遺伝子」と称することがある。）のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．０９ｃ遺伝子（以下、「ＡＬ９遺伝子」と称することがある。）のプロモーター、ＳＰＡＣ１３９９．０１ｃ遺伝子（以下、「ＡＬ１２遺伝子」と称することがある。）のプロモーター、ＳＰＡＣ１Ｆ７．１２遺伝子（以下、「ＡＬ１３遺伝子」と称することがある。）のプロモーター、およびＳＰＡＣ１９Ｇ１２．０３遺伝子（以下、「ＡＬ１４遺伝子」と称することがある。）のプロモーターからなる群より選択されるプロモーターである。各遺伝子の予測されている機能を表１に示す。なお、Ｓ．ポンベの各遺伝子の塩基配列は、European Bioinformatics Instituteが提供するウエブサイトのＳ．ポンベの遺伝子配列データベース（PomBase;http://www.pombase.org/）に登録されている。
【００１４】
【表１】

遺伝子名		Annotation
AL8	SPAC29B12.14c	purine transporter (predicted)
AL9	SPAC1F7.09c	allantoicase (predicted)
AL12	SPAC1399.01c	membrane transporter (predicted)
AL13	SPAC1F7.12	aldose reductase YakC
AL14	SPAC19G12.03	chitin deacetylase Cda1

【００１５】
これらの５種の遺伝子のプロモーターは、いずれも、アラントインおよびアラントイン酸からなる群より選択される１種以上により、該プロモーターの下流に位置しかつ該プロモーターによって支配される外来構造遺伝子の発現を誘導するプロモーターとして使用される。すなわち、本発明に係る誘導型プロモーターを用いた発現カセットを導入した形質転換体は、アラントインおよびアラントイン酸をいずれも含有しない培養用培地から、アラントインとアラントイン酸の少なくとも一方を含有する生産用培地へ置換する、または培養用培地にアラントインとアラントイン酸の少なくとも一方を添加することによって、該プロモーターによって支配される外来構造遺伝子の発現が誘導される。
【００１６】
ＡＬ８遺伝子のプロモーター領域は、ＡＬ８遺伝子のＯＲＦ（オープンリーディングフレーム）の５’末端の上流１～３０２９ｂｐの領域（配列番号１）に存在する。本発明において用いられるＡＬ８遺伝子のプロモーターとしては、ＡＬ８遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域であって、少なくとも該ＯＲＦの５’末端の上流１～４００ｂｐの領域（配列番号１中、２６３０～３０２９番目の塩基からなる領域）を含む領域を用いることが好ましく、ＡＬ８遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～３０２９ｂｐの領域の全領域または該領域の部分領域であって該ＯＲＦの５’末端の上流１～４００ｂｐの領域を含む領域

を用いることがより好ましく、ＡＬ８遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～２５００ｂｐの領域（配列番号１中、５３０～３０２９番目の塩基からなる領域）の全領域または該領域の部分領域であって該ＯＲＦの５’末端の上流１～４００ｂｐの領域を含む領域を用いることがさらに好ましく、ＡＬ８遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～９００ｂｐの領域（配列番号１中、２１３０～３０２９番目の塩基からなる領域）の全領域または該領域の部分領域であって該ＯＲＦの５’末端の上流１～４００ｂｐの領域を含む領域を用いることがよりさらに好ましく、ＡＬ８遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～７００ｂｐの領域（配列番号１中、２３３０～３０２９番目の塩基からなる領域）の全領域または該領域の部分領域であって該ＯＲＦの５’末端の上流１～５００ｂｐの領域（配列番号１中、２５３０～３０２９番目の塩基からなる領域）を含む領域を用いることが特に好ましい。

【００１７】

本発明に係る誘導型プロモーターには、ＡＬ８遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域からなる核酸断片に加えて、該核酸断片に、アラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性が失われないような変異を導入したものも含まれる。該変異は、配列番号１で表される塩基配列のうち、２６３０～３０２９番目の塩基からなる領域以外の領域、好ましくは、２５３０～３０２９番目の塩基からなる領域以外の領域に導入されていることが好ましい。たとえば、配列番号１で表される塩基配列、もしくは該塩基配列の部分配列であって２６３０～３０２９番目の塩基からなる領域を含む塩基配列の１以上の塩基、好ましくは１～数十個、より好ましくは１～十数個、さらに好ましくは１～９個、よりさらに好ましくは１～数個の塩基が欠失、置換、もしくは付加された塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する核酸断片も、本発明に係る誘導型プロモーターに含まれる。配列番号１で表される塩基配列もしくは該塩基配列の部分配列とのホモロジー（配列同一性）が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％以上である塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する領域も、本発明に係る誘導型プロモーターに含まれる。

【００１８】

ＡＬ９遺伝子のプロモーター領域は、ＡＬ９遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～１５００ｂｐの領域（配列番号２）に存在する。本発明において用いられるＡＬ９遺伝子のプロモーターとしては、ＡＬ９遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域であって、少なくとも該ＯＲＦの５’末端の上流１～５００ｂｐの領域（配列番号２中、１００１～１５００番目の塩基からなる領域）を含む領域を用いることが好ましく、ＡＬ９遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～１５００ｂｐの領域の全領域または該領域の部分領域であって該ＯＲＦの５’末端の上流１～５００ｂｐの領域を含む領域を用いることがより好ましく、ＡＬ９遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～１２００ｂｐの領域（配列番号２中、３０１～１５００番目の塩基からなる領域）の全領域または該領域の部分領域であって該ＯＲＦの５’末端の上流１～８００ｂｐの領域（配列番号２中、７０１～１５００番目の塩基からなる領域）を含む領域を用いることがさらに好ましい。

【００１９】

本発明に係る誘導型プロモーターには、ＡＬ９遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域からなる核酸断片に加えて、該核酸断片に、アラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性が失われないような変異を導入したものも含まれる。該変異は、配列番号２で表される塩基配列のうち、１００１～１５００番目の塩基からなる領域以外の領域に導入されていることが好ましい。たとえば、配列番号２で表される塩基配列、もしくは該塩基配列の部分配列であって１００１～１５００番目の塩基からなる領域を含む塩基配列の１以上の塩基、好ましくは１～数十個、より好ましくは１～十数個、さらに好ましくは１～９個、よりさらに好ましくは１～数個の塩基が欠失、置換、もしくは付加された塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する核酸断片も、本発明に係る誘導型プロモーターに含まれる。配列番号２で表される塩基配列もしくは該塩基配列の部分配列とのホモロジーが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％以上である塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する領域も、本発明に係る誘導型プロモーターに含まれる。

【００２０】

ＡＬ１２遺伝子のプロモーター領域は、ＡＬ１２遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～３０３３ｂｐの領域（配列番号３）に存在する。本発明において用いられるＡＬ１２遺伝子のプロモーターとしては、ＡＬ１２遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域であって、少なくとも該ＯＲＦの５’末端の上流１～１５００ｂｐの領域（配列番号３中、１５３４～３０３３番目の塩基からなる領域）を含む領域を用いることが好ましく、ＡＬ１２遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～３０３３ｂｐの領域の全領域または該領域の部分領域であって該ＯＲＦの５’末端の上流１～１５００ｂｐの領域を含む領域を用いることがより好ましく、ＡＬ１２遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～３０３３ｂｐの領域の全領域または該領域の部分領域であって該ＯＲＦの５’末端の上流１～１６００ｂｐの領域（配列番号３中、１４３４～３０３３番目の塩基からなる領域）を含む領域を用いることがさらに好ましく、ＡＬ１２遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～２３００ｂｐの領域（配列番号３中、７３４～３０３３番目の塩基からなる領域）の全領域または該領域の部分領域であって該ＯＲＦの５’末端の上流１～１９００ｂｐの領域（配列番号３中、１１３４～３０３３番目の塩基からなる領域）を含む領域を用いることがよりさらに好ましい。

【００２１】

本発明に係る誘導型プロモーターには、ＡＬ１２遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域からなる核酸断片に加えて、該核酸断片に、アラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性が失われないような変異を導入したものも含まれる。該変異は、配列番号３で表される塩基配列のうち、１５３４～３０３３番目の塩基からなる領域以外の領域、好ましくは、１１３４～３０３３番目の塩基からなる領域以外の領域に導入されていることが好ましい。たとえば、配列番号３で表される塩基配列、もしくは該塩基配列の部分配列であって１５３４～３０３３番目の塩基からなる領域を含む塩基配列の１以上の塩基、好ましくは１～数十個、より好ましくは１～十数個、さらに好ましくは１～９個、よりさらに好ましくは１～数個の塩基が欠失、置換、もしくは付加された塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する核酸断片も、本発明に係る誘導型プロモーターに含まれる。配列番号３で表される塩基配列もしくは該塩基配列の部分配列とのホモロジーが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％以上である塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する領域も、本発明に係る誘導型プロモーターに含まれる。

【００２２】

ＡＬ１３遺伝子のプロモーター領域は、ＡＬ１３遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～３０５６ｂｐの領域（配列番号４）に存在する。本発明において用いられるＡＬ１３遺伝子のプロモーターとしては、ＡＬ１３遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域であって、少なくとも該ＯＲＦの５’末端の上流１～３００ｂｐの領域（配列番号４中、２７５７～３０５６番目の塩基からなる領域）を含む領域を用いることが好ましく、ＡＬ１３遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～３０５６ｂｐの領域の全領域または該領域の部分領域であって該ＯＲＦの５’末端の上流１～３００ｂｐの領域を含む領域を用いることがより好ましく、ＡＬ１３遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～３０５６ｂｐの領域の全領域または該領域の部分領域であって該ＯＲＦの５’末端の上流１～１０００ｂｐの領域（配列番号４中、２０５７～３０５６番目の塩基からなる領域）を含む領域を用いることがさらに好ましく、ＡＬ１３遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～２５００ｂｐの領域（配列番号４中、５５７～３０５６番目の塩基からなる領域）の全領域または該領域の部分領域であって該ＯＲＦの５’末端の上流１～１５００ｂｐの領域（配列番号４中、１５５７～３０５６番目の塩基からなる領域）を含む領域を用いることがよりさらに好ましい。

【００２３】

本発明に係る誘導型プロモーターには、ＡＬ１３遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域からなる核酸断片に加えて、該核酸断片に、アラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性が失われないような変異を導入したものも含まれる。該変異は、配列番号４で表される塩基配列のうち、２７５７～３０５６番目の塩基からなる領域以外の領域、好ましくは、２０５７～３０５６番目の塩基からなる領域以外の領域に導入されていることが好ましい。たとえば、配列番号４で表される塩基配列、もしくは該塩基配列の部分配列であって２７５７～３０５６番目の塩基からなる領域を含む塩基配列の１以上の塩基、好ましくは１～数十個、より好ましくは１～十数個、さらに好ましくは１～９個、よりさらに好ましくは１～数個の塩基が欠失、置換、もしくは付加された塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する核酸断片も、本発明に係る誘導型プロモーターに含まれる。配列番号４で表される塩基配列もしくは該塩基配列の部分配列とのホモロジーが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％以上である塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する領域も、本発明に係る誘導型プロモーターに含まれる。

【００２４】

ＡＬ１４遺伝子のプロモーター領域は、ＡＬ１４遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～１５００ｂｐの領域（配列番号５）に存在する。本発明において用いられるＡＬ１４遺伝子のプロモーターとしては、ＡＬ１４遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域であって、少なくとも該ＯＲＦの５’末端の上流１～４００ｂｐの領域（配列番号５中、１１０１～１５００番目の塩基からなる領域）を含む領域を用いることが好ましく、ＡＬ１４遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～１５００ｂｐの領域の全領域または該領域の部分領域であって該ＯＲＦの５’末端の上流１～４００ｂｐの領域を含む領域を用いることがより好ましく、ＡＬ１４遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～５００ｂｐの領域（配列番号５中、１００１～１５００番目の塩基からなる領域）の全領域または該領域の部分領域であって該ＯＲＦの５’末端の上流１～４００ｂｐの領域を含む領域を用いることがさらに好ましい。

【００２５】

本発明に係る誘導型プロモーターには、ＡＬ１４遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域からなる核酸断片に加えて、該核酸断片に、アラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性が失われないような変異を導入したものも含まれる。該変異は、配列番号５で表される塩基配列のうち、１１０１～１５００番目の塩基からなる領域以外の領域に導入されていることが好ましい。たとえば、配列番号５で表される塩基配列、もしくは該塩基配列の部分配列であって１１０１～１５００番目の塩基からなる領域を含む塩基配列の１以上の塩基、好ましくは１～数十個、より好ましくは１～十数個、さらに好ましくは１～９個、よりさらに好ましくは１～数個の塩基が欠失、置換、もしくは付加された塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する核酸断片も、本発明に係る誘導型プロモーターに含まれる。配列番号５で表される塩基配列もしくは該塩基配列の部分配列とのホモロジーが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％以上である塩基配列からなり、かつアラントインまたはアラントイン酸により発現を誘導するプロモーター活性を有する領域も、本発明に係る誘導型プロモーターに含まれる。

【００２６】

なお、「ＯＲＦの５’末端」とは、開始メチオニンの１塩基目のアデニンであり、「ＯＲＦの５’末端の上流１ｂｐの塩基」とは、開始メチオニンの１塩基目のアデニンの上流側隣の塩基である。

【００２７】

［クローニングベクター］

本発明に係るクローニングベクターは、本発明に係る誘導型プロモーターと、該誘導型プロモーターの下流に位置しかつ該誘導型プロモーターによって支配される外来構造遺伝

子を導入するためのクローニングサイトと、シゾサッカロミセス属酵母を宿主とする形質転換体内で機能しうるターミネーターとを有する。本発明に係るクローニングベクターは、外来構造遺伝子がコードする蛋白質（以下、外来蛋白質ということがある。）を発現させるためにシゾサッカロミセス属酵母に導入される発現ベクターを作製するためのクローニングベクターとして使用できる。

【００２８】

本発明に係るクローニングベクターが備えるクローニングサイトは、クローニングベクター中、該クローニングサイトにのみ存在する制限酵素部位である。本発明に係るクローニングベクターが備えるクローニングサイトは制限酵素部位を１のみ有していてもよく、２以上の制限酵素部位を有するマルチクローニングサイトであってもよい。該マルチクローニングサイトとしては、公知のクローニングベクターが備えるマルチクローニングサイトをそのまま使用でき、また、公知のマルチクローニングサイトを適宜改変したものを使用できる。その他、本発明に係るクローニングベクターは、クローニングサイト内の下流端側領域、もしくは該クローニングサイトの下流に、終始コドンを備えていてもよい。

【００２９】

形質転換体内で機能するターミネーターとしては、シゾサッカロミセス属酵母が本来有するターミネーターやシゾサッカロミセス属酵母が本来有しないターミネーターを使用できる。なお、ターミネーターはベクター内に２種以上存在していてもよい。シゾサッカロミセス属酵母が本来有するターミネーターとしては、たとえば、シゾサッカロミセス属酵母のｉｎｖ１遺伝子のターミネーター、ｎｍｔ１遺伝子のターミネーター、ｉｈｃ２遺伝子のターミネーター（以下、ｉｈｃ２ターミネーター）等が挙げられる。また、シゾサッカロミセス属酵母が本来有しないターミネーターとしては、たとえば、ヒトリポコルチンＩ（ｈＬＰＩ）遺伝子のターミネーター（以下、ＬＰＩターミネーター）、ＳＶ４０ターミネーター等が挙げられる。ターミネーターとしては、形質転換体においてその活性が高いことより、ｉｈｃ２ターミネーターまたはＬＰＩターミネーターが好ましい。

【００３０】

本発明に係るクローニングベクターは、プロモーターの下流であり、かつクローニングサイトの上流には５’－非翻訳領域が含まれていることが好ましく、クローニングサイトの下流には３’－非翻訳領域が含まれていることが好ましい。また、本発明に係るクローニングベクターは、クローニングサイトに外来構造遺伝子が導入された発現ベクターと識別するためのマーカーを有することが好ましい。該マーカーとしては、たとえば、アンピシリン耐性遺伝子等、大腸菌内で機能し得る薬剤耐性遺伝子等が挙げられる。さらに、本発明に係るクローニングベクターは、形質転換体を選択するためのマーカーを有することが好ましい。該マーカーとしては、たとえば、オロチジン５’－リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子（ｕｒａ４遺伝子）、イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（ｌｅｕ１遺伝子）等の栄養要求性相補マーカーが挙げられる。

【００３１】

本発明に係るクローニングベクターは、環状ＤＮＡ構造または線状ＤＮＡ構造を有するベクターである。後述の発現カセットがシゾサッカロミセス属酵母の細胞内で染色体外遺伝子として保持される形質転換体を作製する場合には、本発明に係るクローニングベクターは、シゾサッカロミセス属酵母内で複製されるための配列、即ち、自律複製配列（Autonomously Replicating Sequence: ARS）を含むベクターであることが好ましい。一方で、後述の発現カセットがシゾサッカロミセス属酵母の染色体中に組み込まれた形質転換体を作製する場合には、本発明に係るクローニングベクターは、線状ＤＮＡ構造であり、かつＡＲＳを有していないものであることが好ましい。

たとえば、後述の発現カセットがシゾサッカロミセス属酵母の染色体中に組み込まれた形質転換体を作製する場合には、本発明に係るクローニングベクターは、線状ＤＮＡからなるベクターであってもよく、発現カセットを宿主へ導入する際に、線状ＤＮＡに切り開くための制限酵素部位を備える環状ＤＮＡ構造のベクターであってもよい。本発明に係るクローニングベクターがＡＲＳを有する場合、ＡＲＳ部分を削除して線状ＤＮＡ構造の発

現カセットとした後、またはＡＲＳ部分を開裂させることによりＡＲＳの機能を失活させた線状ＤＮＡ構造の発現カセットとした後、宿主へ導入できる。

【００３２】

本発明に係るクローニングベクターは、外来構造遺伝子がコードする蛋白質を宿主に発現させるための発現ベクターを作製するために用いられる公知のクローニングベクターが備えるプロモーター領域を、本発明に係る誘導型プロモーターに置換することによって作製できる。本発明に係るクローニングベクターを構築するための具体的操作方法としては、公知の方法を使用できる。たとえば、文献［J. Sambrook et al.,"Molecular Cloning 2nded.", Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)］に記載されている操作方法を使用できる。その他、ＰＣＲによる酵素的な増幅法や化学合成法で構築してもよい。

【００３３】

［発現カセット］

本発明に係る発現カセットは、本発明に係る誘導型プロモーターと、該誘導型プロモーターの下流に位置しかつ該誘導型プロモーターによって支配される外来構造遺伝子とを有する。該発現カセットを宿主細胞に導入することによって、該外来構造遺伝子がコードする蛋白質の発現をアラントインまたはアラントイン酸によって誘導可能な形質転換体を作製できる。

【００３４】

該発現カセットは、外来構造遺伝子の下流にシゾサッカロミセス属酵母内で機能するターミネーターを有することが好ましい。該ターミネーターとしては、クローニングベクターで用いられるものが用いられる。該発現カセットは、さらに、前記の５’－非翻訳領域、３’－非翻訳領域、栄養要求性相補マーカー等を有していてもよい。

【００３５】

該発現カセットが有する外来構造遺伝子は、蛋白質をコードする構造遺伝子であれば特に限定されるものではなく、宿主とするシゾサッカロミセス属酵母が元々有している遺伝子と同種のものであってもよく、異種生物由来の構造遺伝子であってもよい。

【００３６】

該発現カセットが有する外来構造遺伝子は、蛋白質をコードするものである限り、野生型の構造遺伝子であってもよく、野生型の構造遺伝子を改変した遺伝子であってもよく、人工的に合成された遺伝子であってもよい。野生型以外の構造遺伝子としては、たとえば、野生型の複数の蛋白質を融合させたキメラ蛋白質をコードする遺伝子、野生型の蛋白質のＮ末端またはＣ末端にその他のペプチド等が結合した蛋白質をコードする遺伝子等が挙げられる。該その他のペプチドとしては、分泌シグナル、特定の細胞内小器官への移行シグナル等のシグナル、Ｈｉｓタグ、ＦＬＡＧタグ等のタグ等が挙げられる。

【００３７】

本発明に係るクローニングベクターのクローニングサイトに外来構造遺伝子を挿入することにより、本発明に係る発現カセットを有する、外来構造遺伝子を発現するための発現ベクターを作製できる。クローニングサイトへの外来構造遺伝子の導入は、クローニングベクターの作製と同様に公知の方法を使用できる。

【００３８】

［形質転換体］

本発明に係る形質転換体は、本発明に係る発現カセットを有することを特徴とする。発現カセットを染色体外に有する形質転換体は、発現カセットを含むベクター（発現ベクター）を染色体外に保持させる。該発現ベクターは、通常、前記ＡＲＳを有する環状ＤＮＡ構造を有する。一方、発現カセットを染色体に有する形質転換体は、前記ＡＲＳを有しない、線状ＤＮＡ構造の発現カセットを含む染色体を有する。

【００３９】

（宿主）

本発明に係る形質転換体の宿主は、シゾサッカロミセス属酵母である。本発明に用いるシゾサッカロミセス属酵母は野生型であってもよく、用途に応じて特定の遺伝子を欠失ま

たは失活させた変異型であってもよい。特定の遺伝子を欠失または失活させる方法としては、公知の方法を用いることができる。具体的には、Ｌａｔｏｕｒ法（Ｎｕｃｒｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ、２００６年、第３４巻第ｅ１１号、および国際公開第２００７／０６３９１９号等に記載）を用いることにより遺伝子を欠失させられる。また、変異剤を用いた突然変異分離法（酵母分子遺伝学実験法、１９９６年、学会出版センター）や、ＰＣＲを利用したランダム変異法（ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｐｐｌ．、１９９２年、第2巻、ｐ．２８－３３。）等により遺伝子の一部に変異を導入することにより、該遺伝子を失活させられる。特定遺伝子を欠失または失活させたシゾサッカロミセス属酵母宿主としては、たとえば、国際公開第２００２／１０１０３８号、国際公開第２００７／０１５４７０号等に記載されている。

【００４０】

さらに宿主となるシゾサッカロミセス属酵母には、形質転換体を選択するためのマーカーを有するものを用いることが好ましい。たとえば、ある遺伝子が欠落していることにより特定の栄養成分が生育に必須である宿主を使用することが好ましい。目的遺伝子配列を含むベクターにより形質転換をして形質転換体を作製する場合、ベクターにこの欠落している遺伝子（栄養要求性相補マーカー）を組み込んでおくことにより、形質転換体は宿主の栄養要求性が消失する。この宿主と形質転換体の栄養要求性の相違により、両者を区別して形質転換体を得られる。

たとえば、ｕｒａ４遺伝子が欠失または失活してウラシル要求性となっているシゾサッカロミセス属酵母を宿主とし、ｕｒａ４遺伝子を有する発現ベクターにより形質転換した後、ウラシル要求性が消失したものを選択することにより、発現ベクターが組み込まれた形質転換体を得られる。

【００４１】

宿主として用いるシゾサッカロミセス属酵母としては、前記で挙げられた種のものを利用できる。前記シゾサッカロミセス属酵母のうち、種々の有用な変異株が利用できることから、Ｓ．ポンベが好ましい。本発明で用いるＳ．ポンベの菌株としては、たとえばＡＴＣＣ３８３９９（ｌｅｕ１⁻３２、ｈ⁻）またはＡＴＣＣ３８４３６（ｕｒａ４⁻２９４、ｈ⁻）等が挙げられ、これらは、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）から入手できる。

【００４２】

（形質転換方法）

本発明に係る発現カセットを含む発現ベクターを用いて、宿主であるシゾサッカロミセス属酵母を形質転換する。形質転換方法は、公知のシゾサッカロミセス属酵母の形質転換方法をいずれも用いることができる。そのような形質転換方法としては、たとえば、酢酸リチウム法［K. Okazaki et al., Nucleic Acids Res., 18, 6485-6489 (1990)］、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、ガラスビーズ法など従来周知の方法や、特開２００５－１９８６１２号公報記載の方法などを挙げられる。また、市販の酵母形質転換用キットを用いてもよい。

【００４３】

形質転換を行った後、通常は得られた形質転換体を選抜する。選抜方法としては、たとえば、以下に示す方法が挙げられる。前記栄養要求性マーカーにより形質転換体を選択できる培地によりスクリーニングし、得られたコロニーから複数を選択する。その他、それら選抜した形質転換体に対してパルスフィールドゲル電気泳動法によるゲノム解析を行うことにより、染色体に組み込まれたベクターの数や発現カセットの数を調べられる。

【００４４】

（培養方法）

本発明に係る形質転換体を、アラントインおよびアラントイン酸を含有しない培養培地中で培養することにより、本発明に係る発現カセット中の外来構造遺伝子を発現させることなく、該形質転換体を培養できる。

【００４５】

本発明に係る形質転換体は、天然のシゾサッカロミセス属酵母と同様に培養できる。
本発明に係る形質転換体の培養のための培養液には、公知の酵母培養培地を用いることができ、シゾサッカロミセス属酵母が資化しうる炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、シゾサッカロミセス属酵母の培養を効率良く行えるものであればよい。培養液としては、天然培地を用いてもよく、合成培地を用いてもよい。
【００４６】
炭素源としては、たとえば、グルコース、フルクトース、スクロース等の糖が挙げられる。
窒素源としては、たとえば、アンモニア、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム等の無機酸または無機酸のアンモニウム塩、ペプトン、カザミノ酸が挙げられる。
無機塩類としては、たとえば、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムが挙げられる。
具体的には、ＹＰＤ培地等の栄養培地（M.D.Rose et al.,"Methods In Yeast Genetics",Cold Spring Harbor LabolatoryPress(1990)）またはＭＢ培地等の最少培地（K.Okazaki et al.,Nucleic AcidsRes.,18,6485-6489(1990)）等を使用できる。
【００４７】
培養には公知の酵母培養方法を用いることができ、たとえば振盪培養、攪拌培養等により行える。
また、培養温度は、２３～３７℃であることが好ましい。また、培養時間は適宜決定できる。
また、培養は、回分培養であってもよく、連続培養であってもよい。
【００４８】
［蛋白質の生産方法］
本発明に係る蛋白質の生産方法は、本発明に係る発現カセットを含む形質転換体を、アラントインおよびアラントイン酸からなる群より選択される１種以上を含有する培養液中で培養し、得られた菌体または培養液上清から、該発現カセット中の外来構造遺伝子がコードする蛋白質を取得することを特徴とする。アラントインまたはアラントイン酸により、本発明に係る誘導型プロモーターに転写因子が結合し、該誘導型プロモーターの下流にある外来構造遺伝子の転写が開始し、該外来構造遺伝子がコードする蛋白質が発現する。
【００４９】
培養工程から蛋白質の生産工程への移行は、たとえば、該形質転換体の培養培地を、アラントインとアラントイン酸の少なくとも一方を含有する培養培地に置換することによって行える。また、形質転換体の培養培地に、アラントインまたはアラントイン酸を添加することによっても行える。培養培地中のアラントインまたはアラントイン酸の濃度は、本発明に係る誘導型プロモーターによる発現誘導が可能な濃度であれば特に限定されるものではない。たとえば、培養培地中のアラントインまたはアラントイン酸の濃度を０．１～５０ｍＭにすることによって、蛋白質を発現させられる。
【００５０】
蛋白質を生産させる際の培養培地は、アラントインまたはアラントイン酸を含有し、かつ酵母の培養に適した培養培地であれば特に限定されるものではなく、栄養培地と合成最小培地のいずれであってもよい。本発明に係る蛋白質の生産方法においては、アラントイン等による発現誘導がより効率よく行えることから、アライントインおよびアラントイン酸以外の窒素源を含まない培養培地を用いることが好ましい。
【００５１】
培養条件は、生産させる目的の外来蛋白質の種類等を考慮して適宜設定できる。たとえば、１６～４２℃、好ましくは２５～３７℃で、８～１６８時間、好ましくは４８～９６時間行う。振盪培養と静置培養のいずれも可能だが、必要に応じて撹拌や通気を加えてもよい。
【００５２】
培養終了後、超音波破砕や機械的破砕により、菌体から目的の外来蛋白質を含む細胞抽

出液を調製し、該細胞抽出液から外来蛋白質を単離・精製法できる。また、外来蛋白質が細胞外に分泌される場合は、培養液上清から外来蛋白質を単離・精製法できる。これらの生産された蛋白質を取得するための単離・精製法としては、公知の、塩析または溶媒沈澱法等の溶解度の差を利用する方法、透析、限外濾過またはゲル電気泳動法等の分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィ等の荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィ等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィ等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法等の等電点の差を利用する方法等が挙げられる。

【００５３】

単離・精製した蛋白質の確認方法としては、公知のウエスタンブロッティング法または活性測定法等が挙げられる。精製された蛋白質は、アミノ酸分析、アミノ末端分析、一次構造解析などによりその構造を明らかにできる。

【実施例】

【００５４】

以下、実施例等を示して本発明を詳細に説明する。ただし、本発明は以下の記載によっては限定されない。

【００５５】

［実施例１］

Ｓ．ポンベを、硫安を窒素源とする培養培地とアラントインを窒素源とする培養培地でそれぞれ培養し、各遺伝子の発現量を比較して、アラントインによって発現が誘導される遺伝子をスクリーニングした。

【００５６】

Ｓ．ポンベの野生株ＡＲＣ０３２（遺伝子型：ｈ⁻）を、試験管内の５ｍＬの硫安含有ＥＭＭ培地［ＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地（ＭＰ　ＢＩＯＭＥＤＩＣＡＬＳ社製、米国）に硫安４０ｍＭを添加した培地］に植菌し、３２℃で一晩前培養を行った。次いで、前培養液を、硫安含有ＥＭＭ培地、またはＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地にアラントイン２０ｍＭを添加したアラントイン含有ＥＭＭ培地に植菌し、３２℃で１～３日間培養した。培養開始から１日経過後、２日経過後、および３日経過後の菌体のＲＮＡを抽出し、ＤＮＡマイクロアレイ法により各遺伝子のｍＲＮＡ量を測定した。硫安含有ＥＭＭ培地で培養した場合に対するアラントイン含有ＥＭＭ培地で培養した場合のｍＲＮＡの相対量（相対発現量）を算出したところ、培養１日目、２日目、および３日目の少なくともいずれかにおいて、ＡＬ８遺伝子、ＡＬ９遺伝子、ＡＬ１２遺伝子、ＡＬ１３遺伝子、およびＡＬ１４遺伝子の相対発現量が５以上であった。該結果から、これらの５つの遺伝子のプロモーターが、アラントインによって発現を誘導する誘導型プロモーターであることがわかった。

【００５７】

［実施例２］

実施例１でスクリーニングした５つの遺伝子のプロモーターに制御されたＥＧＦＰ遺伝子を導入したＳ．ポンベの形質転換体を、硫安を窒素源とする培養培地とアラントインを窒素源とする培養培地でそれぞれ培養し、ＥＧＦＰ蛋白質の発現量を比較した。

【００５８】

＜ＥＧＦＰ発現ベクターの製造＞

（ｐＳＬ６ｈＣＭＶｐＥＧＦＰ）

公知の単座組込み用ベクターｐＳＬ６（Alimjan et al., Appl Microbiol Biotechnol, 2010, vol.85, pp.667－677）のマルチクローニングサイトに、ＥＧＦＰをコードする構造遺伝子を挿入したＧＦＰ発現ベクターｐＳＬ６ｈＣＭＶｐＥＧＦＰを製造した。ｐＳＬ６ベクターは、ｈＣＭＶプロモーターおよびＬＰＩターミネーターの間にマルチクローニングサイトを備え、Ｓ．ポンベのｌｅｕ１遺伝子座に外来遺伝子を組込む単座組込み用ベクターである。

具体的には、まずＥＧＦＰをコードする人工合成遺伝子（配列番号６）を鋳型とし、５

’末端にＮｃｏＩの制限酵素認識部位を備えるフォワードプライマー（配列番号７）および５’末端にＸｂａＩの制限酵素認識部位を備えるリバースプライマー（配列番号８）とを用いたＰＣＲによって、ＥＧＦＰ遺伝子のＯＲＦ全長の５’末端にＮｃｏＩの制限酵素認識部位を、３’末端にＸｂａＩの制限酵素認識部位を有するＰＣＲ産物（ＥＧＦＰフラグメント）を得た。

該ＥＧＦＰフラグメントを制限酵素ＮｃｏＩおよびＸｂａＩで二重消化し、またｐＳＬ６を制限酵素ＡａｒＩおよびＸｂａＩで二重消化し、両者をライゲーションして続く大腸菌ＤＨ５αへの形質転換後、プラスミドを得た。該プラスミドをＥＧＦＰ発現ベクターｐＳＬ６ｈＣＭＶｐＥＧＦＰとした。

【００５９】

（ｐＳＬ６ＡＬ９ｐ（１．５）ＥＧＦＰ）

ｐＳＬ６ベクターのｈＣＭＶプロモーターを、Ｓ．ポンベのＡＬ９遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～１５００ｂｐの領域と置換したｐＳＬ６ＡＬ９ｐ（１．５）ベクターを作製し、ｐＳＬ６ＡＬ９ｐ（１．５）のマルチクローニングサイトに、ＥＧＦＰをコードする構造遺伝子を挿入して、ＥＧＦＰの発現がＡＬ９遺伝子由来のプロモーターにより制御されたＥＧＦＰ発現ベクターｐＳＬ６ＡＬ９ｐ（１．５）ＥＧＦＰを作製した。

【００６０】

具体的には、Ｓ．ポンベの野生株（ＡＲＣ０３２株）由来のゲノムＤＮＡを鋳型とし、５’末端にＳｐｅＩの制限酵素認識部位を備えるフォワードプライマー（配列番号９）および５’末端にＰｃｉＩの制限酵素認識部位を備えるリバースプライマー（配列番号１０）を用いたＰＣＲによって、ＡＬ９遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１ｂｐから１５００ｂｐの領域（配列番号２）の５’末端にＳｐｅＩ、３’末端にＰｃｉＩの制限酵素認識部位を有するＰＣＲ産物（ＡＬ９ｐ（１．５）フラグメント）を得た。

該ＡＬ９ｐ（１．５）フラグメントを制限酵素制限酵素ＳｐｅＩおよびＰｃｉＩで二重消化し、またｐＳＬ６を制限酵素ＢｌｎＩおよびＡａｒＩで二重消化してｈＣＭＶプロモーター部分を取り除き、両者をライゲーションして続く大腸菌ＤＨ５αへの形質転換後、プラスミドを得た。該プラスミドを単座組込み用ベクターｐＳＬ６ＡＬ９ｐ（１．５）とした。ｐＳＬ６ＡＬ９ｐ（１．５）は、ＡＬ９遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１ｂｐから１５００ｂｐの領域とＬＰＩターミネーターとの間にマルチクローニングサイトを備え、Ｓ．ポンベのｌｅｕ１遺伝子座に外来遺伝子を組込む単座組込み用ベクターである。図１に、単座組込み用ベクターｐＳＬ６ＡＬ９ｐ（１．５）の構造の模式図を示す。

続いて、ｐＳＬ６ＡＬ９ｐ（１．５）を制限酵素ＡａｒＩおよびＸｂａＩで二重消化し、前記で得られた制限酵素ＮｃｏＩおよびＸｂａＩで二重消化したＥＧＦＰフラグメントを混合して両者をライゲーションし、続く大腸菌ＤＨ５αへの形質転換後、プラスミドを得た。該プラスミドをＥＧＦＰ発現ベクターｐＳＬ６ＡＬ９ｐ（１．５）ＥＧＦＰとした。

【００６１】

（ｐＳＬ６ＡＬ１４ｐ（１．５）ＥＧＦＰ）

ｐＳＬ６ベクターのｈＣＭＶプロモーターを、Ｓ．ポンベのＡＬ１４遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～１５００ｂｐの領域と置換したｐＳＬ６ＡＬ１４ｐ（１．５）ベクターを作製し、ｐＳＬ６ＡＬ１４ｐ（１．５）のマルチクローニングサイトにＥＧＦＰをコードする構造遺伝子を挿入して、ＥＧＦＰの発現がＡＬ１４遺伝子由来のプロモーターにより制御されたＥＧＦＰ発現ベクターｐＳＬ６ＡＬ１４ｐ（１．５）ＥＧＦＰを作製した。

【００６２】

具体的には、Ｓ．ポンベの野生株（ＡＲＣ０３２株）由来のゲノムＤＮＡを鋳型とし、５’末端にＢｌｎＩの制限酵素認識部位を備えるフォワードプライマー（配列番号１１）および５’末端にＮｃｏＩの制限酵素認識部位を備えるリバースプライマー（配列番号１２）を用いたＰＣＲによって、ＡＬ１４遺伝子のＯＲＦの上流１ｂｐから１５００ｂｐの領域（配列番号５）の５’末端にＢｌｎＩ、３’末端にＮｃｏＩの制限酵素認識部位を有

するＰＣＲ産物（ＡＬ１４ｐ（１．５）フラグメント）を得た。
該ＡＬ１４ｐ（１．５）フラグメントを制限酵素制限酵素ＢｌｎＩおよびＮｃｏＩで二重消化し、またｐＳＬ６を制限酵素ＢｌｎＩおよびＡａｒＩで二重消化してｈＣＭＶプロモーター部分を取り除き、両者をライゲーションし、続く大腸菌ＤＨ５αへの形質転換後、プラスミドを得た。該プラスミドを単座組込み用ベクターｐＳＬ６ＡＬ１４ｐ（１．５）とした。ｐＳＬ６ＡＬ１４ｐ（１．５）は、ＡＬ１４遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流１～１５００ｂｐの領域とＬＰＩターミネーターとの間にマルチクローニングサイトを備え、Ｓ．ポンベのｌｅｕ１遺伝子座に外来遺伝子を組込む単座組込み用ベクターである。図２に、単座組込み用ベクターｐＳＬ６ＡＬ１４ｐ（１．５）の構造の模式図を示す。
続いて、ｐＳＬ６ＡＬ１４ｐ（１．５）を制限酵素ＡａｒＩおよびＸｂａＩで二重消化し、前記で得られた制限酵素ＮｃｏＩおよびＸｂａＩで二重消化したＥＧＦＰフラグメントを混合して両者をライゲーションし、続く大腸菌ＤＨ５αへの形質転換後、プラスミドを得た。該プラスミドをＥＧＦＰ発現ベクターｐＳＬ６ＡＬ１４ｐ（１．５）ＥＧＦＰとした。

【００６３】
（宿主）
宿主として、Ｓ．ポンベのロイシン要求株ＡＲＣ００１（遺伝子型：ｈ⁻、ｌｅｕ１－３２）を用いた。

【００６４】
（形質転換体の製造）
ＡＲＣ００１株をＹＥＳ(０．５％酵母エキス、３％グルコース、０．２５ｍｇ／ｍＬ　ＳＰサプリメント)培地で１．０～２．０×10^7細胞数／ｍＬになるまで生育させた。生育させた菌体を集菌して洗浄した後、２．０×10^9細胞数／ｍＬになるように０．１Ｍ　酢酸リチウム（ｐＨ５．０）に懸濁した。その後、ＡＲＣ００１株の懸濁液１００μＬに各ＥＧＦＰ発現ベクターを制限酵素ＮｏｔＩで消化したもの約１μｇをそれぞれ加え、更に５０％（ｗ／ｖ）ポリエチレングリコール（ＰＥＧ４０００)水溶液をそれぞれに２６０μＬ加えてよく撹拌した後、３２℃で３０分間インキュベートし、４３μＬのＤＭＳＯを添加した後に更に４２℃で５分間インキュベートした。遠心分離処理によりＰＥＧ４０００を除去し、洗浄した後の菌体を１５０μＬの滅菌水に懸濁し、最少寒天培地に塗布した。各菌体を塗布した寒天培地を３～５日培養した後、形質転換体を得た。ｐＳＬ６ＡＬ９ｐ（１．５）ＥＧＦＰ、ｐＳＬ６ＡＬ１４ｐ（１．５）ＥＧＦＰ、およびｐＳＬ６ｈＣＭＶｐＥＧＦＰを導入した形質転換体を、それぞれＡＬ９株、ＡＬ１４株、およびｈＣＭＶ株とした。

【００６５】
（ギャップリペアクローニング法による形質転換体の製造）
ＥＧＦＰの発現がＡＬ８遺伝子由来のプロモーターにより制御されたＥＧＦＰ発現カセット、ＥＧＦＰの発現がＡＬ１２遺伝子由来のプロモーターにより制御されたＥＧＦＰ発現カセット、およびＥＧＦＰの発現がＡＬ１３遺伝子由来のプロモーターにより制御されたＥＧＦＰ発現カセットは、ギャップリペアクローニング法を応用してＳ．ポンベのｌｅｕ１遺伝子座に組込んだ。ギャップリペアクローニング法とは、酵母が有する組換え修復機構を利用し、末端に２０～３０ｂｐの相同領域を有するＤＮＡ断片間での相同組換えを酵母細胞内で引き起こして、ＤＮＡ断片を連結する方法である。

【００６６】
具体的には、ｐＳＬ６ｈＣＭＶｐＥＧＦＰを鋳型とし、配列番号１３の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号１４の塩基配列からなるリバースプライマーの組み合わせ、および配列番号１５の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号１６の塩基配列からなるリバースプライマーの組み合わせを用いたＰＣＲによって、それぞれｌｅｕ１遺伝子の一部を含むＰＣＲ産物（ｌｅｕ１フラグメント）およびＥＧＦＰ遺伝子とＬＰＩターミネーターとｔｏｐ２遺伝子の一部とを含むＰＣＲ産物（ＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメント）を得た。

一方、Ｓ．ポンベの野生株（ＡＲＣ０３２株）由来のゲノムＤＮＡを鋳型とし、５’末端にｌｅｕ１フラグメントの３’末端との相同領域２４ｂｐを備えるフォワードプライマー（配列番号１７）および５’末端にＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントの５’末端との相同領域２４ｂｐを備えるリバースプライマー（配列番号１８）を用いたＰＣＲによって、ＡＬ８遺伝子のＯＲＦの上流１ｂｐから３０２９ｂｐの領域（配列番号１）の５’末端にｌｅｕ１フラグメントの３’末端との相同領域２４ｂｐ、３’末端にＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントの５’末端との相同領域２４ｂｐを有するＰＣＲ産物（ＡＬ８ｐ（３．０）フラグメント）を得た。同様に、配列番号１９の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマー、および配列番号２１の塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号２２の塩基配列からなるリバースプライマーを用いたＰＣＲによって、ＡＬ１２遺伝子のＯＲＦの上流１ｂｐから３０３３ｂｐの領域（配列番号３）の５’末端にｌｅｕ１フラグメントの３’末端との相同領域２４ｂｐ、３’末端にＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントの５’末端との相同領域２４ｂｐを有するＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（３．０）フラグメント）およびＡＬ１３遺伝子のＯＲＦの上流１ｂｐから３０５６ｂｐの領域（配列番号４）の５’末端にｌｅｕ１フラグメントの３’末端との相同領域２４ｂｐ、３’末端にＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントの５’末端との相同領域２４ｂｐを有するＰＣＲ産物（ＡＬ１３ｐ（３．０）フラグメント）を得た。

前述の（形質転換体の製造）において、各ＥＧＦＰ発現ベクターを制限酵素ＮｏｔＩで消化したものを添加する代わりに、ここで得られた各ＰＣＲ産物を添加する事により形質転換体を得た。ｌｅｕ１フラグメント、ＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントおよびＡＬ８ｐ（３．０）フラグメントを添加して得られた形質転換体をＡＬ８株、ｌｅｕ１フラグメント、ＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントおよびＡＬ１２ｐ（３．０）フラグメントを添加して得られた形質転換体をＡＬ１２株、およびｌｅｕ１フラグメント、ＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントおよびＡＬ１３ｐ（３．０）フラグメントを添加して得られた形質転換体をＡＬ１３株とした。

【００６７】

（ＥＧＦＰ発現量の比較）

前記で得られた各形質転換体および非ＥＧＦＰ生産株であるＳ．ポンベの野生株（ＡＲＣ０３２株）をそれぞれ試験管内の５ｍＬのＹＥＳ培地に植菌し、３２℃で一晩前培養を行った。次いで、前培養液を、ＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地に硫安４０ｍＭを添加した硫安含有培地、ＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地に硫安２ｍＭを添加した窒素源飢餓培地、またはＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地に硫安１０ｍＭとアラントイン２０ｍＭを添加したアラントイン含有培地に植菌し、３２℃で３日間培養した。ただし、野生株とｈＣＭＶ株は、硫安含有培地でのみ培養した。培養終了時点における各培養液の菌体密度（OD_{660}）およびＧＦＰ蛍光強度（励起波長４９０ｎｍ、蛍光波長５３０ｎｍ）をＭＴＰ－８１０Ｌａｂ（コロナ電気社製、日本）により測定して、各形質転換体および宿主株のOD_{660}当りのＧＦＰ蛍光強度（ＧＦＰ／OD_{660}、細胞当りのＥＧＦＰ生産量を反映）を算出した。結果を図３に示す。

【００６８】

図中、「４０ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$」は硫安含有培地の結果を、「２ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$」は窒素飢餓培地の結果を、「１０ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$＋２０ｍＭ　Ａｌｌａｎｔｏｉｎ」はアラントイン含有培地の結果をそれぞれ示す。ＡＬ８株、ＡＬ９株、ＡＬ１２株、ＡＬ１３株、およびＡＬ１４株は、窒素源飢餓培地ではＥＧＦＰの発現誘導がみられなかったが、アラントイン含有培地ではＥＧＦＰの発現誘導が観察された。一方、いずれの株においても、硫安含有培地におけるＥＧＦＰの発現誘導レベルは、各々のアラントイン含有培地におけるＥＧＦＰの発現誘導レベルより低かった。該結果から、この５つの遺伝子のプロモーターが、アラントインにより発現を誘導する誘導型プロモーターであることが確認された。また、ＡＬ８株、ＡＬ９株、ＡＬ１２株、およびＡＬ１４株は、硫安含有培地におけるＥＧＦＰの発現量が宿主株と同程度であったが、ＡＬ１３株

は、硫安含有培地でもＥＧＦＰの発現が観察され、非誘導条件における発現抑制が他の４つのプロモーターよりも弱かった。

【００６９】

［実施例３］

ｈＣＭＶプロモーターと置換するＡＬ８遺伝子のＯＲＦの上流側の領域の範囲を段階的に短くすることにより、ＡＬ８遺伝子のプロモーター領域を検討した。

【００７０】

Ｓ．ポンベの野生株（ＡＲＣ０３２株）由来のゲノムＤＮＡを鋳型とし、５’末端にｌｅｕ１フラグメントの３’末端との相同領域２４ｂｐを備えるフォワードプライマーおよび５’末端にＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントの５’末端との相同領域２４ｂｐを備えるリバースプライマーを用いたＰＣＲによって、５’末端にｌｅｕ１フラグメントの３’末端との相同領域２４ｂｐ、３’末端にＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントの５’末端との相同領域２４ｂｐを有するＡＬ８遺伝子のプロモーター領域の各ＰＣＲ産物を得た。具体的には、ＡＬ８遺伝子のプロモーター長が０．３ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～３０２ｂｐの領域、すなわち、配列番号１中、２７２８～３０２９番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ８ｐ（０．３）フラグメント）を配列番号２３の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号１８の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、０．４ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～４００ｂｐの領域、すなわち、配列番号１中、２６３０～３０２９番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ８ｐ（０．４）フラグメント）を配列番号２４の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号１８の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、０．５ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～５００ｂｐの領域、すなわち、配列番号１中、２５３０～３０２９番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ８ｐ（０．５）フラグメント）を配列番号２５の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号１８の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、０．６ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～６００ｂｐの領域、すなわち、配列番号１中、２４３０～３０２９番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ８ｐ（０．６）フラグメント）を配列番号２６の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号１８の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、０．７ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～７００ｂｐの領域、すなわち、配列番号１中、２３３０～３０２９番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ８ｐ（０．７）フラグメント）を配列番号２７の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号１８の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、０．８ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～８００ｂｐの領域、すなわち、配列番号１中、２２３０～３０２９番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ８ｐ（０．８）フラグメント）を配列番号２８の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号１８の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、０．９ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～９００ｂｐの領域、すなわち、配列番号１中、２１３０～３０２９番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ８ｐ（０．９）フラグメント）を配列番号２９の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号１８の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、１．０ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～１０００ｂｐの領域、すなわち、配列番号１中、２０３０～３０２９番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ８ｐ（１．０）フラグメント）を配列番号３０の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号１８の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、１．５ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～１５００ｂｐの領域、すなわち、配列番号１中、１５３０～３０２９番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ８ｐ（１．５）フラグメント）を配列番号３１の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号１８の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、２．０ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～２０００ｂｐの領域、すなわち、配列番号１中、１０３０～３０２９番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ８ｐ（２．０）フラグメント）を配列番号３２の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号１８の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、および２．５ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～２５００ｂｐの領域、すなわち、配列番号１中、５３０～３０２９番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ８

ｐ（２．５）フラグメント）を配列番号３３の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号１８の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、それぞれＰＣＲを行い、各ＰＣＲ産物を得た。

【００７１】

前記で得られたＰＣＲ産物それぞれをｌｅｕ１フラグメントおよびＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントと混合し、実施例２と同様にギャップリペアクローニング法にてＡＲＣ００１株に導入して形質転換体を作製した。作製した各形質転換体と実施例２で作製したＡＬ８株（プロモーター長：３．０ｋｂｐ）を、試験管内の５ｍＬのＹＥＳ培地に植菌し、３２℃で一晩前培養を行った。次いで、該前培養液を、ＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地に硫安４０ｍＭを添加した硫安含有ＥＭＭ培地、またはＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地にアラントイン２０ｍＭを添加したアラントイン含有ＥＭＭ培地に植菌し、３２℃で３日間培養し、培養液のOD_{660}当りのＧＦＰ蛍光強度（ＧＦＰ／OD_{660}）を算出した。結果を図４に示す。図中、「$(NH_4)_2SO_4$」は硫安含有ＥＭＭ培地の結果を、「Ａｌｌａｎｔｏｉｎ」はアラントイン含有ＥＭＭ培地の結果をそれぞれ示す。ｈＣＭＶプロモーター領域を、ＡＬ８遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域のうちの０．３ｋｂｐのみで置換した形質転換体では、硫安含有ＥＭＭ培地とアラントイン含有ＥＭＭ培地でＥＧＦＰの発現量に差がなく、アラントインによる誘導型プロモーター活性は失われていたが、その他の形質転換体では、アラントイン含有ＥＭＭ培地のほうがＥＧＦＰの発現量が多く、アラントインによる発現誘導が観察された。また、誘導型プロモーター活性は、プロモーター長が０．５ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～５００ｂｐの領域）で最大となり、それ以上プロモーター長を長くしても、活性は低下する傾向にあった。

【００７２】

［実施例４］

ｈＣＭＶプロモーターと置換するＡＬ９遺伝子のＯＲＦの上流側の領域の範囲を段階的に短くすることにより、ＡＬ９遺伝子のプロモーター領域を検討した。

【００７３】

Ｓ．ポンベの野生株（ＡＲＣ０３２株）由来のゲノムＤＮＡを鋳型とし、５’末端にｌｅｕ１フラグメントの３’末端との相同領域２４ｂｐを備えるフォワードプライマーおよび５’末端にＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントの５’末端との相同領域２４ｂｐを備えるリバースプライマーを用いたＰＣＲによって、５’末端にｌｅｕ１フラグメントの３’末端との相同領域２４ｂｐ、３’末端にＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントの５’末端との相同領域２４ｂｐを有するＡＬ９遺伝子のプロモーター領域の各ＰＣＲ産物を得た。具体的には、ＡＬ９遺伝子のプロモーター長が０．４ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～４００ｂｐの領域、すなわち、配列番号２中、１１０１～１５００番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ９ｐ（０．４）フラグメント）を配列番号３４の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号３５の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、０．５ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～５０３ｂｐの領域、すなわち、配列番号２中、９９８～１５００番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ９ｐ（０．５）フラグメント）を配列番号３６の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号３５の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、１．０ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～１００５ｂｐの領域、すなわち、配列番号２中、４９６～１５００番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ９ｐ（１．０）フラグメント）を配列番号３７の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号３５の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、それぞれＰＣＲを行い、各ＰＣＲ産物を得た。

【００７４】

前記で得られたＰＣＲ産物それぞれをｌｅｕ１フラグメントおよびＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントと混合し、実施例２と同様にギャップリペアクローニング法にて、ＡＲＣ００１株に導入して形質転換体を作製した。作製した各形質転換体と実施例２で作製したＡＬ９株（プロモーター長：１．５ｋｂｐ）について、実施例３と同様にして、

硫安含有ＥＭＭ培地とアラントイン含有ＥＭＭ培地でそれぞれ培養し、培養液のＯＤ$_{660}$当りのＧＦＰ蛍光強度（ＧＦＰ／ＯＤ$_{660}$）を算出した。結果を図５に示す。ｈＣＭＶプロモーター領域を、ＡＬ９遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域のうちの０．４ｋｂｐのみで置換した形質転換体では、硫安含有ＥＭＭ培地とアラントイン含有ＥＭＭ培地でＥＧＦＰの発現量に差がなく、アラントインによる誘導型プロモーター活性は失われていたが、その他の形質転換体では、アラントイン含有ＥＭＭ培地のほうがＥＧＦＰの発現量が多く、アラントインによる発現誘導が観察された。また、誘導型プロモーター活性は、プロモーター長が０．５～１．５ｋｂｐで概ね変わらなかったが、１．０ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～１０００ｂｐの領域）で最大となった。

【００７５】

［実施例５］

ｈＣＭＶプロモーターと置換するＡＬ１２遺伝子のＯＲＦの上流側の領域の範囲を段階的に短くすることにより、ＡＬ１２遺伝子のプロモーター領域を検討した。

【００７６】

Ｓ．ポンベの野生株（ＡＲＣ０３２株）由来のゲノムＤＮＡを鋳型とし、５’末端にｌｅｕ１フラグメントの３’末端との相同領域２４ｂｐを備えるフォワードプライマーおよび５’末端にＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントの５’末端との相同領域２４ｂｐを備えるリバースプライマーを用いたＰＣＲによって、５’末端にｌｅｕ１フラグメントの３’末端との相同領域２４ｂｐ、３’末端にＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントの５’末端との相同領域２４ｂｐを有するＡＬ１２遺伝子のプロモーター領域の各ＰＣＲ産物を得た。具体的には、ＡＬ１２遺伝子のプロモーター長が１．４ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～１４００ｂｐの領域、すなわち、配列番号３中、１６３４～３０３３番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（１．４）フラグメント）を配列番号３８の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、１．５ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～１５００ｂｐの領域、すなわち、配列番号３中、１５３４～３０３３番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（１．５）フラグメント）を配列番号３９の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、１．６ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～１６００ｂｐの領域、すなわち、配列番号３中、１４３４～３０３３番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（１．６）フラグメント）を配列番号４０の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、１．７ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～１７００ｂｐの領域、すなわち、配列番号３中、１３３４～３０３３番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（１．７）フラグメント）を配列番号４１の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、１．８ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～１８００ｂｐの領域、すなわち、配列番号３中、１２３４～３０３３番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（１．８）フラグメント）を配列番号４２の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、１．９ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～１９００ｂｐの領域、すなわち、配列番号３中、１１３４～３０３３番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（１．９）フラグメント）を配列番号４３の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、２．０ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～２００４ｂｐの領域、すなわち、配列番号３中、１０３０～３０３３番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（２．０）フラグメント）を配列番号４４の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、２．１ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～２１００ｂｐの領域、すなわち、配列番号３中、９３４～３０３３番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（２．１）フラグメント）を配列番号４５の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、２．２ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～２２００ｂｐの領域、すなわち、配列番号３中、８３４～３０３３番

目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（２．２）フラグメント）を配列番号４６の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、２．３ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～２３００ｂｐの領域、すなわち、配列番号３中、７３４～３０３３番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（２．３）フラグメント）を配列番号４７の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、２．４ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～２４００ｂｐの領域、すなわち、配列番号３中、６３４～３０３３番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（２．４）フラグメント）を配列番号４８の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、２．５ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～２５００ｂｐの領域、すなわち、配列番号３中、５３４～３０３３番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（２．５）フラグメント）を配列番号４９の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、２．７ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～２７００ｂｐの領域、すなわち、配列番号３中、３３４～３０３３番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（２．７）フラグメント）を配列番号５０の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、２．８ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～２８００ｂｐの領域、すなわち、配列番号３中、２３４～３０３３番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（２．８）フラグメント）を配列番号５１の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、２．９ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～２９００ｂｐの領域、すなわち、配列番号３中、１３４～３０３３番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１２ｐ（２．９）フラグメント）を配列番号５２の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、それぞれＰＣＲを行い、各ＰＣＲ産物を得た。

【００７７】

前記で得られたＰＣＲ産物それぞれをｌｅｕ１フラグメントおよびＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントと混合し、実施例２と同様にギャップリペアクローニング法にて、ＡＲＣ００１株に導入して形質転換体を作製した。作製した各形質転換体と実施例２で作製したＡＬ１２株（プロモーター長：３．０ｋｂｐ）について、実施例３と同様にして、硫安含有ＥＭＭ培地とアラントイン含有ＥＭＭ培地でそれぞれ培養し、培養液のOD_{660}当りのＧＦＰ蛍光強度（ＧＦＰ／OD_{660}）を算出した。結果を図６に示す。ｈＣＭＶプロモーター領域を、ＡＬ１２遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域のうちの１．４ｋｂｐのみで置換した形質転換体では、硫安含有ＥＭＭ培地とアラントイン含有ＥＭＭ培地でＥＧＦＰの発現量に差がなく、アラントインによる誘導型プロモーター活性は失われていたが、その他の形質転換体では、アラントイン含有ＥＭＭ培地のほうがＥＧＦＰの発現量が多く、アラントインによる発現誘導が観察された。また、誘導型プロモーター活性は、プロモーター長が１．９ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～１９００ｂｐの領域）で最大となったが、ばらつきが大きかった。また、プロモーター長が２．１～３．０ｋｂｐでは、誘導型プロモーター活性は概ね変わらなかった。

【００７８】

［実施例６］

ｈＣＭＶプロモーターと置換するＡＬ１３遺伝子のＯＲＦの上流側の領域の範囲を段階的に短くすることにより、ＡＬ１３遺伝子のプロモーター領域を検討した。

【００７９】

Ｓ．ポンベの野生株（ＡＲＣ０３２株）由来のゲノムＤＮＡを鋳型とし、５’末端にｌｅｕ１フラグメントの３’末端との相同領域２４ｂｐを備えるフォワードプライマーおよび５’末端にＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントの５’末端との相同領域２４ｂｐを備えるリバースプライマーを用いたＰＣＲによって、５’末端にｌｅｕ１フラグメントの３’末端との相同領域２４ｂｐ、３’末端にＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントの５’末端との相同領域２４ｂｐを有するＡＬ１３遺伝子のプロモーター領域の各Ｐ

ＣＲ産物を得た。具体的には、ＡＬ１３遺伝子のプロモーター長が０．２ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～２０６ｂｐの領域、すなわち、配列番号４中、２８５１～３０５６番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１３ｐ（０．２）フラグメント）を配列番号５３の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２２の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、０．３ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～３００ｂｐの領域、すなわち、配列番号４中、２７５７～３０５６番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１３ｐ（０．３）フラグメント）を配列番号５４の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２２の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、０．４ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～４００ｂｐの領域、すなわち、配列番号４中、２６５７～３０５６番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１３ｐ（０．４）フラグメント）を配列番号５５の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２２の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、０．５ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～５０３ｂｐの領域、すなわち、配列番号４中、２５５４～３０５６番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１３ｐ（０．５）フラグメント）を配列番号５６の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２２の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、１．０ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～１０３３ｂｐの領域、すなわち、配列番号４中、２０２４～３０５６番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１３ｐ（１．０）フラグメント）を配列番号５７の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２２の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、２．０ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～２００１ｂｐの領域、すなわち、配列番号４中、１０５６～３０５６番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１３ｐ（２．０）フラグメント）を配列番号５８の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号２２の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、それぞれＰＣＲを行い、各ＰＣＲ産物を得た。

【００８０】

前記で得られたＰＣＲ産物それぞれをｌｅｕ１フラグメントおよびＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントと混合し、実施例２と同様にギャップリペアクローニング法にて、ＡＲＣ００１株に導入して形質転換体を作製した。作製した各形質転換体と実施例２で作製したＡＬ１３株（プロモーター長：３．０ｋｂｐ）について、実施例３と同様にして、硫安含有ＥＭＭ培地とアラントイン含有ＥＭＭ培地でそれぞれ培養し、培養液のOD_{660}当りのＧＦＰ蛍光強度（ＧＦＰ／OD_{660}）を算出した。結果を図７に示す。ｈＣＭＶプロモーター領域を、ＡＬ１３遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域のうちの０．２ｋｂｐのみで置換した形質転換体では、硫安含有ＥＭＭ培地とアラントイン含有ＥＭＭ培地でＥＧＦＰの発現量に差がなく、アラントインによる誘導型プロモーター活性は失われていたが、その他の形質転換体では、アラントイン含有ＥＭＭ有培地のほうがＥＧＦＰの発現量が多く、アラントインによる発現誘導が観察された。また、誘導型プロモーター活性は、プロモーター長により変動し、プロモーター長２．０ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～２０００ｂｐの領域）で活性が強く、かつ安定していた。

【００８１】

［実施例７］

ｈＣＭＶプロモーターと置換するＡＬ１４遺伝子のＯＲＦの上流側の領域の範囲を段階的に短くすることにより、ＡＬ１４遺伝子のプロモーター領域を検討した。

【００８２】

Ｓ．ポンベの野生株（ＡＲＣ０３２株）由来のゲノムＤＮＡを鋳型とし、５’末端にｌｅｕ１フラグメントの３’末端との相同領域２４ｂｐを備えるフォワードプライマーおよび５’末端にＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントの５’末端との相同領域２４ｂｐを備えるリバースプライマーを用いたＰＣＲによって、５’末端にｌｅｕ１フラグメントの３’末端との相同領域２４ｂｐ、３’末端にＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントの５’末端との相同領域２４ｂｐを有するＡＬ１４遺伝子のプロモーター領域の各ＰＣＲ産物を、次のようなプライマーの組合せで得た。具体的には、ＡＬ１４遺伝子のプロモーター長が０．３ｋｂｐ（ＯＲＦの５’末端の上流１～３００ｂｐの領域、すなわち、

配列番号５中、１２０１～１５００番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１４ｐ（０．３）フラグメント）を配列番号５９の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号６０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、０．４ｋｂ（ＯＲＦの５’末端の上流１～４００ｂｐの領域、すなわち、配列番号５中、１１０１～１５００番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１４ｐ（０．４）フラグメント）を配列番号６１の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号６０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、０．５ｋｂ（ＯＲＦの５’末端の上流１～５０５ｂｐの領域、すなわち、配列番号５中、９９６～１５００番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１４ｐ（０．５）フラグメント）を配列番号６２の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号６０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、１．０ｋｂ（ＯＲＦの５’末端の上流１～１０００ｂｐの領域、すなわち、配列番号５中、５０１～１５００番目の領域）のＰＣＲ産物（ＡＬ１４ｐ（１．０）フラグメント）を配列番号６３の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号６０の塩基配列からなるリバースプライマーの組合せで、それぞれＰＣＲを行い、各ＰＣＲ産物を得た。

【００８３】

前記で得られたＰＣＲ産物それぞれをｌｅｕ１フラグメントおよびＥＧＦＰ＋ＬＰＩｔ＋ｔｏｐ２フラグメントと混合し、実施例２と同様にギャップリペアクローニング法にて、ＡＲＣ００１株に導入して形質転換体を作製した。作製した各形質転換体と実施例２で作製したＡＬ１４株（プロモーター長：１．５ｋｂｐ）について、実施例３と同様にして、硫安含有ＥＭＭ培地とアラントイン含有ＥＭＭ培地でそれぞれ培養し、培養液のOD_{660}当りのＧＦＰ蛍光強度（ＧＦＰ／OD_{660}）を算出した。結果を図８に示す。ｈＣＭＶプロモーター領域を、ＡＬ１４遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域のうちの０．３ｋｂｐのみで置換した形質転換体では、硫安含有ＥＭＭ培地とアラントイン含有ＥＭＭ培地でＥＧＦＰの発現量に差がなく、アラントインによる誘導型プロモーター活性は失われていたが、その他の形質転換体では、アラントイン含有ＥＭＭ培地のほうがＥＧＦＰの発現量が多く、アラントインによる発現誘導が観察された。また、ＡＬ１４遺伝子のＯＲＦの５’末端の上流の領域のうちの０．４ｋｂｐで置換した発現ベクターでは、硫安含有ＥＭＭ培地とアラントイン含有ＥＭＭ培地の両方でプロモーター活性が向上しており、非誘導条件における発現抑制が弱まった。さらに、プロモーター長０．５～１．５ｋｂｐでは、誘導型プロモーター活性は概ね変わらなかった。

【００８４】

［実施例８］

実施例３においてＡＬ８ｐ（０．５）フラグメントを用いて作製した形質転換体（ＡＬ８（０．５）株）、実施例４においてＡＬ９ｐ（１．０）フラグメントを用いて作製した形質転換体（ＡＬ９（１．０）株）、実施例５においてＡＬ１２ｐ（２．５）フラグメントを用いて作製した形質転換体（ＡＬ１２（２．５）株）、実施例６においてＡＬ１３ｐ（２．０）フラグメントを用いて作製した形質転換体（ＡＬ１３（２．０）株）、および実施例２で作製したＡＬ１４株における、アラントイン濃度と発現誘導活性の関係を調べた。

【００８５】

具体的には、各形質転換体を、それぞれ、ＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地に硫安４０ｍＭを添加した硫安含有培地、またはＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地に硫安１０ｍＭとアラントインを０．８ｍＭ、４ｍＭ、もしくは２０ｍＭを添加したアラントイン含有培地で３２℃、２日間培養し、実施例２と同様にして、培養終了時点における培養液のOD_{660}当りのＧＦＰ蛍光強度（ＧＦＰ／OD_{660}）を算出した。結果を図９に示す。図中、「０ｍＭ」は硫安含有培地の結果を、「０．８ｍＭ」は硫安１０ｍＭとアラントイン０．８ｍＭを添加したアラントイン含有培地の結果を、「４ｍＭ」は硫安１０ｍＭとアラントイン４ｍＭを添加したアラントイン含有培地の結果を、「２０ｍＭ」は硫安１０ｍＭとアラントイン２０ｍＭを添加したアラントイン含有培地の結果を、それぞれ示す。図９に示すように、各誘導型プロモーターのプロモーター活性は、アラントイン濃

度が高いほど高くなる傾向が観察されたが、プロモーター活性の増大の程度は、アラントイン濃度増加量ほどの差はなかった。

【００８６】

［実施例９］

ＡＬ８（０．５）株、ＡＬ９（１．０）株、ＡＬ１２（２．５）株、ＡＬ１３（２．０）株、およびＡＬ１４株における、硫安濃度とアラントインによる発現誘導活性の関係を調べた。

【００８７】

具体的には、各形質転換体を、それぞれ、ＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地に硫安４０ｍＭを添加した硫安含有培地、ＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地にアラントイン２０ｍＭを添加したアラントイン含有培地、またはＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地にアラントイン２０ｍＭと硫安を２ｍＭ、１０ｍＭ、もしくは４０ｍＭを添加したアラントイン含有培地で３２℃、２日間培養し、実施例２と同様にして、培養終了時点における培養液のＯＤ$_{660}$当りのＧＦＰ蛍光強度（ＧＦＰ／ＯＤ$_{660}$）を算出した。結果を図１０に示す。図中、「ｗ／ｏ　Ａｌｌａ」は硫安含有培地の結果を、「０ｍＭ」はＥＭＭ培地にアラントイン２０ｍＭのみを添加したアラントイン含有培地の結果を、「２ｍＭ」は硫安２ｍＭとアラントイン２０ｍＭを添加したアラントイン含有培地の結果を、「１０ｍＭ」は硫安１０ｍＭとアラントイン２０ｍＭを添加したアラントイン含有培地の結果を、「５０ｍＭ」は硫安５０ｍＭとアラントイン２０ｍＭを添加したアラントイン含有培地の結果を、それぞれ示す。図１０に示すように、硫安濃度が高いほどアラントインによる発現誘導活性は低下する傾向にあったが、該発現誘導活性は高濃度の硫安（５０ｍＭ）の存在下であっても完全に抑制されることはなかった。

【００８８】

［実施例１０］

ＡＬ８（０．５）株、ＡＬ９（１．０）株、ＡＬ１２（２．５）株、ＡＬ１３（２．０）株、およびＡＬ１４株における、アラントイン以外の窒素源の存在下におけるアラントインによる発現誘導活性を調べた。

【００８９】

具体的には、各形質転換体を、それぞれ、ＹＰＤ培地、ＹＰＤ培地にアラントイン２０ｍＭを添加したアラントイン含有ＹＰＤ培地、ＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地に硫安４０ｍＭを添加した硫安含有ＥＭＭ培地、またはＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地にアラントイン２０ｍＭを添加したアラントイン含有ＥＭＭ培地で３２℃、２日間培養し、実施例２と同様にして、培養終了時点における培養液のＯＤ$_{660}$当りのＧＦＰ蛍光強度（ＧＦＰ／ＯＤ$_{660}$）を算出した。結果を図１１に示す。図１１（Ａ）および（Ｂ）は、それぞれ、培養後１日目および２日目の結果を示す。また、図中、「ＹＰＤ」はＹＰＤ培地の結果を、「ＹＰＤ＋Ａｌｌａ」はアラントイン含有ＹＰＤ培地の結果を、「ＥＭＭ＋ＮＨ$_4$」は硫安含有ＥＭＭ培地の結果を、「ＥＭＭ＋Ａｌｌａ」はアラントイン含有ＥＭＭ培地の結果を、それぞれ示す。図１１に示すように、ＹＰＤ培地のように多様な窒素源を含む培地であっても、アラントインを添加することによる発現誘導が確認できた。ＡＬ９（１．０）株およびＡＬ１４（１．０）株においては、培養２日目時点で、アラントイン含有ＹＰＤ培地のほうがアラントイン含有ＥＭＭ培地よりも高いＥＧＦＰ発現量を示した。一方、ＡＬ８（０．５）株、ＡＬ１２（２．５）株、およびＡＬ１３（２．０）株においては、ＹＰＤ培地にアラントインを添加した場合には、ＥＭＭ培地にアラントインを添加した場合よりも、誘導時のプロモーター活性が弱かった。

【００９０】

［実施例１１］

ＡＬ８（０．５）株、ＡＬ９（１．０）株、ＡＬ１２（２．５）株、ＡＬ１３（２．０）株、およびＡＬ１４株において、ＹＰＤ培地で培養後にアラントイン含有培地を添加する事により、発現誘導が起きるかを調べた。

【００９１】

具体的には、各形質転換体を、ＹＰＤ培地で３２℃、１日間培養した後、ＹＰＤ培地の３倍量のアラントイン含有ＥＭＭ培地を添加して、さらに３２℃、１日間の計２日間培養し、実施例２と同様にして、各培養終了時点における培養液の$ＯＤ_{６６０}$当りのＧＦＰ蛍光強度（ＧＦＰ／$ＯＤ_{６６０}$）を算出した。結果を図１２に示す。図中、「ＹＰＤ（１ｄ）」はＹＰＤ培地で１日間培養した結果を、「ＹＰＤ＋３×（ＥＭＭ＋Ａｌｌａ）（２ｄ）」はＹＰＤ培地で１日間培養後にＹＰＤ培地の３倍量のアラントイン含有ＥＭＭ培地を添加し、さらに１日間培養した培養２日目の結果を、それぞれ示す。図１２に示すように、ＹＰＤ培地中での培養により、培養１日目はＥＧＦＰの発現量が抑制されているが、アラントイン含有ＥＭＭ培地で希釈した後の培養２日目では、ＥＧＦＰの発現誘導が観察された。以上のように、ＡＬ８プロモーター等のアラントインによる発現誘導は、アラントイン以外の窒素源存在下でも起こるため、ＹＰＤ培地等の増殖用培地に培養後にアラントインを添加することによって、培地交換をせずとも発現誘導が可能であることが確認できた。

【００９２】

［実施例１２］

ＡＬ８（０．５）株、ＡＬ９（１．０）株、ＡＬ１２（２．５）株、ＡＬ１３（２．０）株、およびＡＬ１４株における、アラントイン添加による発現誘導に要する時間を調べた。対照として、実施例２で作製したｈＣＭＶ株を用いた。

【００９３】

具体的には、各形質転換体をそれぞれ試験管内の５ｍＬの硫安含有ＥＭＭ培地に植菌し、３２℃で一晩前培養を行った。次いで、前培養液を、坂口フラスコ内の１００ｍＬのアラントイン含有ＥＭＭ培地に植菌し、３２℃で１日間培養した。アラントイン含有ＥＭＭ培地に植菌前（アラントイン含有ＥＭＭ培地に植菌後０分）、アラントイン含有ＥＭＭ培地に植菌してから１５分後、３０分後、６０分後、１２０分後、２４０分後、および１日後の各時点において、培養液の一部を採取し、定量的ＲＴ－ＰＣＲ（Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction）法によりＥＧＦＰのｍＲＮＡ量を測定した。ａｃｔ１遺伝子のｍＲＮＡを同様にして測定し、内部標準として用いた。

【００９４】

定量的ＲＴ－ＰＣＲは、具体的には、まず、Ｈｉｇｈ－Ｃａｐａｃｉｔｙ　ｃＤＮＡ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製、米国）を用いて、各形質転換体の培養菌体から抽出した各ＲＮＡサンプルよりｃＤＮＡを調製した。ａｃｔ１遺伝子の検出には、配列番号６４の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号６５の塩基配列からなるリバースプライマーを、ＥＧＦＰ遺伝子の検出には配列番号６６の塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号６７の塩基配列からなるリバースプライマーを用い、ＴＨＵＮＤＥＲＢＩＲＤ　ｑＰＣＲ　Ｍｉｘ（東洋紡社製、日本）とＭｘ３０００Ｐ　ＱＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製、米国）を用いて、各ｃＤＮＡサンプルを鋳型とした定量ＰＣＲを実施した。Ｍｘ３０００Ｐ　ＱＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍに付属のソフトウェアに従ってａｃｔ１遺伝子のｍＲＮＡ転写量を内部標準としたＥＧＦＰ遺伝子のｍＲＮＡ相対転写量を算出し、ｈＣＭＶ株のアラントイン含有ＥＭＭ培地に植菌前のＥＧＦＰのｍＲＮＡ量を１として各培養菌体のＥＧＦＰ遺伝子のｍＲＮＡ転写量を相対比較した。

【００９５】

図１３に、各形質転換体におけるＥＧＦＰのｍＲＮＡの相対量を算出した結果を示す。ＡＬ８（０．５）株、ＡＬ９（１．０）株、ＡＬ１２（２．５）株、ＡＬ１３（２．０）株、およびＡＬ１４株の全てにおいて、アラントイン添加後１５分でＥＧＦＰの転写が開始されており、ｇｌｄ１プロモーター等のＳ．ポンベ由来の従来の誘導型プロモーターと比べて非常に迅速な応答を示した。また、今回の条件では、アラントイン添加後数十分から数時間でｍＲＮＡ転写量はピークを示し、その後低下した。特にＡＬ１２株では、アラントイン添加後１日経過後のｍＲＮＡの減少量が顕著だった。

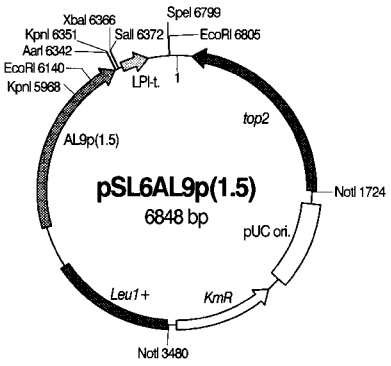
【００９６】

［実施例１３］

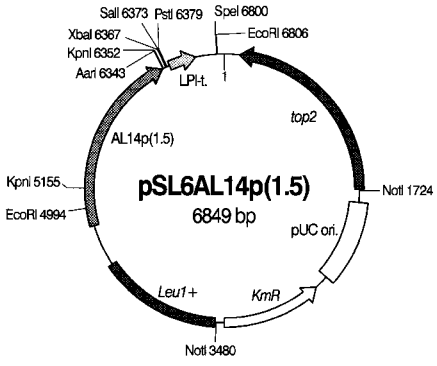
ＡＬ８（０．５）株、ＡＬ９（１．０）株、ＡＬ１２（２．５）株、ＡＬ１３（２．０）株、およびＡＬ１４株において、アラントイン酸によって発現誘導が起こるかを調べた。

具体的には、各形質転換体を、それぞれ、ＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地に硫安４０ｍＭを添加した硫安含有ＥＭＭ培地、ＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地にアラントイン２０ｍＭを添加したアラントイン含有ＥＭＭ培地、またはＥＭＭ　ｗ／ｏ　Ｎｉｔｏｒｇｅｎ培地にアラントイン酸２０ｍＭを添加したアラントイン酸含有ＥＭＭ培地で３２℃、１日間培養し、実施例２と同様にして、培養終了時点における培養液のOD_{660}当りのＧＦＰ蛍光強度（ＧＦＰ／OD_{660}）を算出した。結果を図１４に示す。図１４に示すように、全ての形質転換体において、アラントイン酸の添加によるＥＧＦＰの発現誘導が確認された。つまり、アラントイン酸は、アラントインと同様に、ＡＬ８遺伝子のプロモーター、ＡＬ９遺伝子のプロモーター、ＡＬ１２遺伝子のプロモーター、ＡＬ１３遺伝子のプロモーター、およびＡＬ１４遺伝子のプロモーターに対して、発現を誘導する誘導物質となり得ることがわかった。

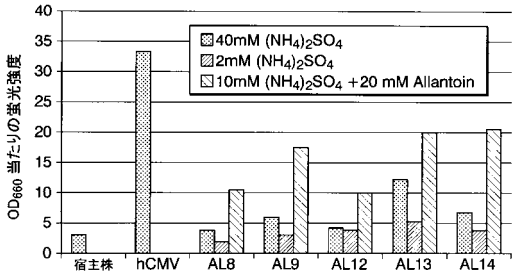
【図１】



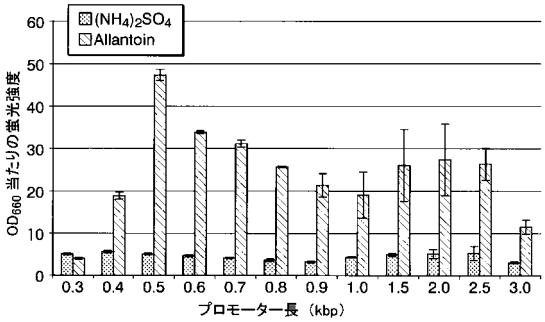
【図２】



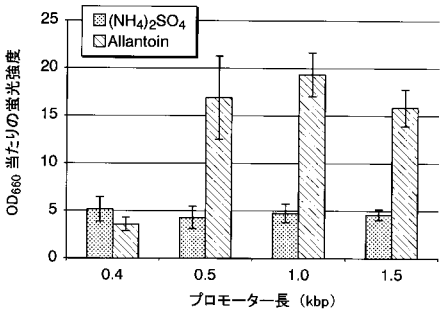
【図３】



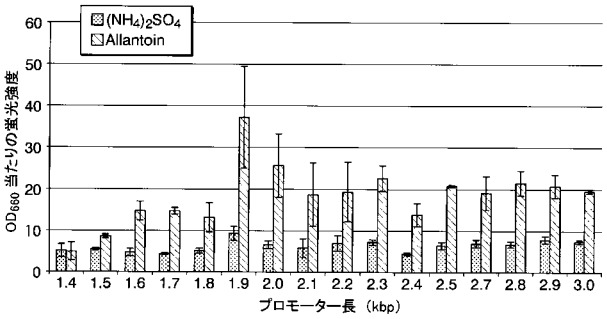
【図４】



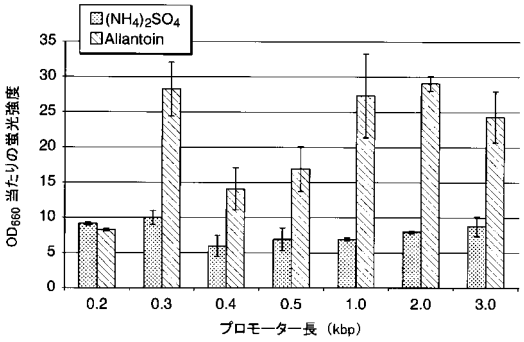
【図５】



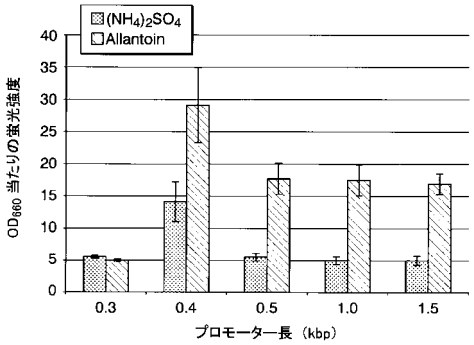
【図６】



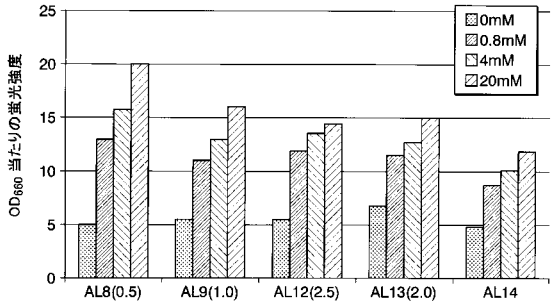
【図７】



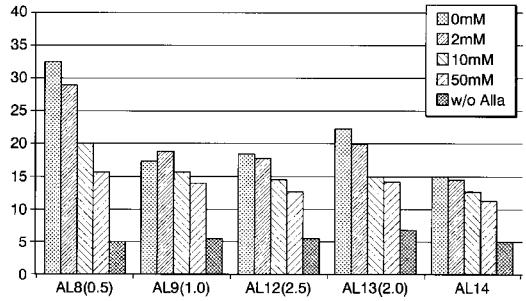
【図８】



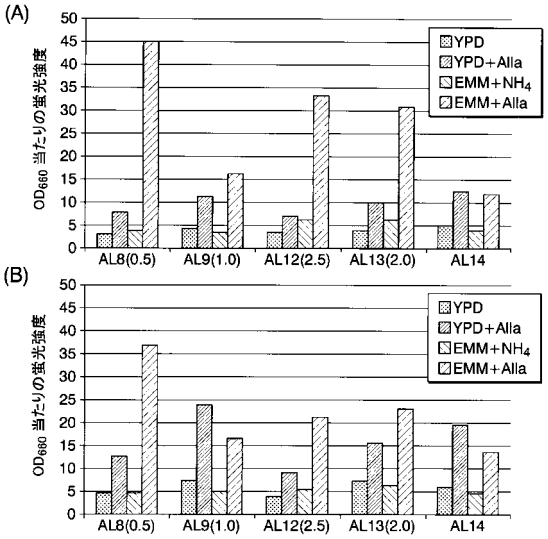
【図９】



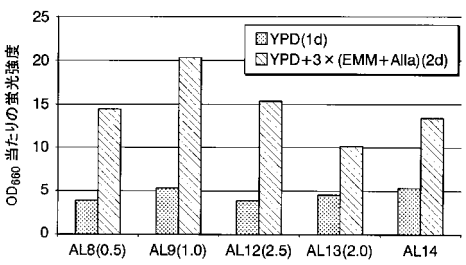
【図１０】



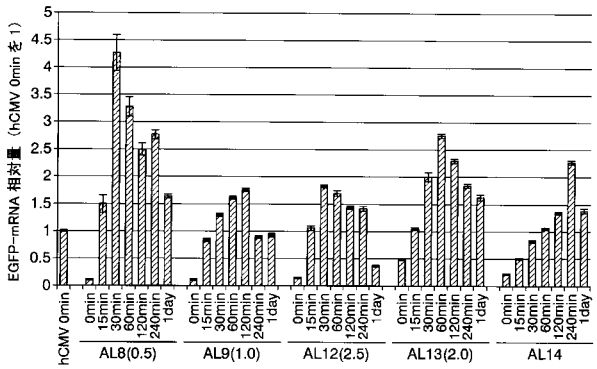
【図１１】



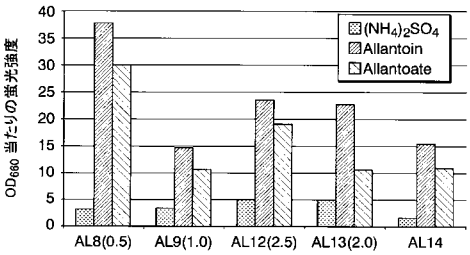
【図１２】



【図１３】



【図１４】



【配列表】

2019088191000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　小谷　哲也
東京都千代田区丸の内一丁目５番１号　旭硝子株式会社内

Ｆターム(参考) 4B064 AG01 CA06 CA19 CC24 CD12 DA01 DA10 DA11 DA13 DA16
DA20
4B065 AA72X AA72Y AB01 AC14 BA02 BD34 CA24