

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5951924号

(P5951924)

(45) 発行日 平成28年7月13日 (2016. 7. 13)

(24) 登録日 平成28年6月17日 (2016. 6. 17)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 P 1/02 (2006. 01)	C 1 2 P 1/02 Z

請求項の数 17 (全 49 頁)

(21) 出願番号	特願2009-543235 (P2009-543235)	(73) 特許権者	500175602
(86) (22) 出願日	平成19年12月20日 (2007. 12. 20)		ノボザイムス、インコーポレイティド
(65) 公表番号	特表2010-514419 (P2010-514419A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア 956
(43) 公表日	平成22年5月6日 (2010. 5. 6)		16-4880、ディビス、ドリュー ア
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/088447		ベニユ 1445
(87) 国際公開番号	W02008/080017	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成20年7月3日 (2008. 7. 3)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成22年11月25日 (2010. 11. 25)	(74) 代理人	100077517
審査番号	不服2014-18242 (P2014-18242/J1)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成26年9月12日 (2014. 9. 12)	(74) 代理人	100087871
(31) 優先権主張番号	60/876, 895		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成18年12月21日 (2006. 12. 21)	(74) 代理人	100087413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二次的RNA干渉による糸状菌株における遺伝子発現の低減又は除去方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 株、アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) 株、又はトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 株において生物由来物質をコードする標的遺伝子の発現を低減又は除去するための方法であって、以下の：

(a) アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 株、アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) 株、又はトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 株のゲノムに、第一転写可能領域を含む第一ポリヌクレオチドと、第二転写可能領域を含む第二ポリヌクレオチドとに作用可能なように結合されたプロモーターを含む二本鎖転写可能核酸構築物を挿入する工程、ここで前記第一転写可能領域が、前記標的遺伝子に対してホモロジーを有し、第二転写可能領域は、前記標的遺伝子に対して有効なホモロジーを有さず、第二転写可能領域が、互いに対して逆向きに相補的な2つのセグメントを含み、そして第一及び第二転写可能領域が単一のmRNA分子として転写される、工程；並びに

(b) 二本鎖転写可能核酸構築物のRNA転写産物を産生する条件下で、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 株、アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) 株、又はトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 株を培養することにより、二次的RNA iのプロセスによりサイレンシングされる標的遺伝子の配列を含む低分子干渉RNA (siRNA) の産生を誘導する工程であって、

上記RNA転写産物は次にsiRNAに変換され、当該siRNAは標的遺伝子のR

N A 転写産物と相互作用して生物由来物質をコードする標的遺伝子の発現を低減するか又は除去する、工程

を含んでなる前記方法。

【請求項 2】

前記第一転写可能領域が、前記標的遺伝子の配列、又は前記標的遺伝子の配列に対して 90% の同一性を有する配列の全長配列又は断片であり、前記標的遺伝子に対応する少なくとも 19 の連続ヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第二転写可能領域が、少なくとも 19 のヌクレオチドを含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記第一及び第二ポリヌクレオチドが、150ヌクレオチド未満の介在配列により分離されている、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

互いに対して逆向きに相補的である前記 2 つのセグメントが、少なくとも 4 のヌクレオチドの結合配列により分離される、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記標的遺伝子の発現が、少なくとも 20% 低下する、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

20

生物由来物質をコードする標的遺伝子に対してホモロジーを有する第一転写可能領域を含む第一ポリヌクレオチド、及び標的遺伝子に対し有効なホモロジーを有さない第二転写可能領域を含む第二ポリヌクレオチドに作用可能なように結合されたプロモーターを含む二本鎖転写可能核酸構築物を含むアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 株、アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) 株、又はトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 株であって、ここで当該第二転写可能領域は互いに対して逆向きに相補的な 2 つのセグメントを含む第二転写可能領域を含み、そして当該第一及び第二転写可能領域は、単一の mRNA 分子として転写され、ここで二次的 RNAi のプロセスによりサイレンシングされる標的遺伝子の配列を含む低分子 RNA (siRNA) の産生が、二本鎖転写可能核酸構築物の RNA 転写産物を産生する条件下で、前記株を培養することにより誘導され、当該 RNA 転写産物は次に siRNA に変換され、当該 siRNA は、標的遺伝子の RNA 転写産物と相互作用して、生物由来物質をコードする標的遺伝子の発現を低減又は除去する、前記株。

30

【請求項 8】

前記第一転写可能領域が、前記標的遺伝子の配列、又は前記標的遺伝子の配列に対して 90% の同一性を有する配列の全長配列又は断片であり、前記標的遺伝子に対応する少なくとも 19 の連続ヌクレオチドを含む、請求項 7 に記載の株。

【請求項 9】

前記第二転写可能領域は、少なくとも 19ヌクレオチドを含む、請求項 7 又は 8 に記載の株。

40

【請求項 10】

前記第一及び第二ポリヌクレオチドが、150ヌクレオチド未満の介在配列により分離されている、請求項 7～9 のいずれか一項に記載の株。

【請求項 11】

互いに対して逆向きに相補的である前記 2 つのセグメントが、少なくとも 4 のヌクレオチドの結合配列により分離される、請求項 7～10 のいずれか一項に記載の株。

【請求項 12】

前記標的遺伝子の発現が、少なくとも 20% 低下する、請求項 7～11 のいずれか一項に記載の株。

【請求項 13】

50

生物由来物質の産生方法であって、以下の：

(a) 目的の生物由来物質の産生を促進する条件下でアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 株、アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) 株、又はトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 株を培養する工程であって、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 株、アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) 株、又はトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 株が、不所望な生物由来物質をコードする標的遺伝子に対してホモロジーを有する第一転写可能領域を含む第一ポリヌクレオチド、及び当該標的遺伝子に対して有効なホモロジーを有さない第二転写可能領域を含む第二ポリヌクレオチドに作用可能なように結合したプロモーターを含む二本鎖転写可能核酸構築物を含み、

ここで当該第二転写可能領域が、互いに対して逆向きに相補的な二つのセグメントを含み、そして当該第一及び第二転写可能領域は、単一の mRNA 分子として転写され、当該二本鎖転写可能核酸構築物の RNA 転写産物は、上記 RNA 転写産物を産生する条件下で、前記株を培養することにより産生され、当該 RNA 転写産物は次に、二次的 RNA i のプロセスによりサイレンシングされる上記標的遺伝子の配列を含む低分子干渉 RNA (siRNA) に変換され、当該低分子干渉 RNA は、標的遺伝子の RNA 転写産物と相互作用して、不所望な生物学的な物質をコードする標的遺伝子の発現の低減又は除去し；そしてアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 株、アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) 株、又はトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 株が、上記目的の生物由来物質をコードする第三のポリヌクレオチドを含む；そして

(b) 上記目的の生物由来物質を、上記培養培地から回収するを含む生物由来物質の生産方法。

【請求項 14】

前記第一転写可能領域が、前記標的遺伝子の配列、又は前記標的遺伝子の配列に対して 90% の同一性を有する配列の全長配列又は断片であり、前記標的遺伝子に対応する少なくとも 19 の連続ヌクレオチドを含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記第一及び第二ポリヌクレオチドが、150 未満の介在配列により分離されている、請求項 13 又は 14 に記載の方法。

【請求項 16】

互いに対して逆向きに相補的である前記 2 つのセグメントが、少なくとも 4 の結合配列により分離される、請求項 13 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記標的遺伝子の発現が、少なくとも 20% 低下する、請求項 13 ～ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糸状菌株の 1 以上の遺伝子の発現を低減又は除去する方法に関する。

【0002】

配列表についての参照

本出願は、コンピューターが読み取り可能な形態の配列表を含む。当該コンピューターが読み取り可能な形態は、本明細書に援用される。

【背景技術】

【0003】

関連技術の記載

糸状菌株は、商業的価値を有する生物由来物質 (biological substance) の生産のために広く用いられる。しかしながら、生物由来物質を多く発現しそして分泌するという所望の特徴を有する糸状菌株は、良好な発酵に最も望ましい特徴を必ずしも有しているわけではない。生物由来物質の産生は、当該生物由来物質を分解する他の物質、例えば酵素、又は

10

20

30

40

50

当該生物由来物質の回収及び精製を複雑にしようる当該生物由来物質と一緒に精製される他の物質の産生を伴うことがある。

【0004】

これらの問題の一の解決法は、不所望の物質の生産に関わる遺伝子(1又は複数)を不活性化することである。不活性化は、当該技術分野に周知の方法を用いて、遺伝子(1又は複数)を欠失するか又は妨害することにより達成することができる。しかしながら、幾つの場合において、遺伝子の不活性化は、ゲノムの相同領域への標的化が乏しいために難しいこともある。不活性化は、意図した標的遺伝子に対して必ずしも特異的ではないランダムな突然変異誘導により達成することができ、そして他の変異がしばしば宿主生物に導入される。他の場合では、当該遺伝子及びその産物は、糸状菌株の生存に必須であることもある。複数の遺伝子が、欠失又は妨害により不活性化される場合、その手順はかなり煩わしく、そして時間がかかることもある。高度に相同な遺伝子ファミリーのメンバーが存在する場合、全てのメンバーの欠失又は妨害は、極めて退屈かつ困難であることもある。

【0005】

近年、さまざまな形態のエピジェネティック遺伝子制御が記載されてきた(Selker, 1997, Trends Genet. 13: 296-301; Matzke and Matzke, 1998, Cell. Mol. Life. Sci. 54: 94-103)。これらのプロセスは、マイクロRNA(Morel et al., 2000, Curr. Biol. 10: 1591-1594; Bailis and Forsburg, 2002, Genome Biol. 3, Reviews 1035; Grewal and Moazed, 2003, Science 301: 798-802)を介してメッセンジャーRNAのレベルを調節することにより遺伝子発現に影響する(Hammond and Baulcombe, 1996, Plant Mol. Biol. 32: 79-88; Xisong Ke et al., 2003, Current Opinion in Chemical Biology 7: 516-523)。

【0006】

ショウジョウバエ(*Drosophila*)及び線虫(*Caenorhabditis elegans*)の遺伝的研究に基づき、(植物における)転写後の遺伝子サイレンシングとしても知られているRNA干渉(RNAi)は、相同RNAの分解を標的化するタンパク質-RNAエフェクターヌクレアーゼ複合体の集合によって遺伝子発現をサイレンシングすることに関与することが理解される(Hannon, 2002, Nature 418: 244-251)。二本鎖RNA(dsRNA)を低分子干渉RNA(siRNA)へとプロセッシングすることは、ダイサーとして知られている酵素ファミリーにより達成される(Bernstein et al., 2001, Nature 409: 363)。dsRNAを特異的に切断するエンドヌクレアーゼのRNase IIIファミリーのメンバーであるダイサーは、dsRNAを20~25ヌクレオチドのsiRNAに切断することに関与する(Elbashir et al., 2001, Nature 411: 494)。これらのsiRNAは次に、RNA誘導性サイレンシング複合体(RISC)と会合する(Elbashir et al., 2001, Genes and Dev. 15: 188; Nykanen et al., 2001, Cell 107: 300; Hammond et al., 2001, Science 293: 1146)。十分に理解されてはいないが、RISCは、アンチセンス断片の由来元であるmRNAを標的とし、続いてmRNAのエンド及びエキソヌクレアーゼ切断は、当該遺伝子の発現を効果的にサイレンシングする。RNAiは、植物、線虫、昆虫、哺乳動物、及び糸状菌において示された(Matzke and Matzke, 1998, supra; Kennerdell et al., 2000, Nat. Biotechnol. 18: 896-8; Boshier et al., 1999, Genetics 153: 1245-56; Voorhoeve and Agami, 2003, Trends Biotechnol. 21: 2-4; McCaffrey et al., 2003, Nat. Biotechnol. 21: 639-44; WO 03/050288; WO 01/49844; WO 98/53083; 及びWO 05/056772)。

【0007】

拡散としても知られている二次的RNAi(Transitive RNAi)は、特定の遺伝子を超えたサイレンシングシグナルの移動を指す。植物では、二次的サイレンシングは、二本鎖RNAによる遺伝子サイレンシングの標的とされたmRNAの上流及び下流の両方で生じることが発見された(Fabian et al., 2002, Plant cell 14: 857-867; Garcia-Perez et al., 2004, The Plant Journal 38: 594-602; Vaistij et al., 2002, The Plant Cell 14: 857-867; Van Houdt et al., 2003, Plant Physiol. 131: 245-253)。線虫では、二次的RNAiは、標的dsRNAの上流の転写産物をサイレンシングするものとして記載され

た(Alder et al., 2003, RNA J. 9: 25-32; Hannon, 2002, Nature 418: 244-251; Sijen et al., 2001, Cell 107: 465-476)。線虫では、二次的RNA iの記載により、おそらくRNA-依存性RNAポリメラーゼ(RdRP)及びダイサー活性の結果として、dsRNA標的由来のsiRNAに加えて、5'隣接配列とホモロジーを有する第二次siRNA (secondary siRNA) が生成するということが示唆される(Bleys et al., 2006, RNA J. 12: 1633-1639; Petersen et al., 2005, Plant Molecular Biology 58: 575-583)。二次的RNA iは、昆虫及び哺乳動物においてユビキタスなものではない(Chi et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 6343-6346; Hoa et al., 2003, Insect Biochemistry and Molecular Biology 33: 949-957; Roignam et al., 2003, RNA J. 9: 299-308)。

10

【0008】

二次的RNA iは、幾つかの点で慣用のRNA iとは異なっている。二本鎖RNAは、RNA iと二次的RNA iの両方の誘導物質として作用するが、RNA i単独ではRdRPを必要としない一方、二次的RNA iはRdRPを必要とするようである。結果として、二次的RNA iを示す生物において、遺伝子サイレンシングは、二本鎖RNAの境界により限定されず、そして遺伝子サイレンシングは、隣接配列へと拡張することができる。しかしながら、二次的RNA iを欠く生物では、遺伝子サイレンシングは、二本鎖の領域内に限定される。

【0009】

株の開発及び改良、機能的ゲノム学、及び糸状菌株の遺伝子操作法において、1以上の遺伝子の発現を低減又は除去する代替方法を提供することは、当該技術分野において利点となる。

20

【発明の概要】

【0010】

本発明は、糸状菌株の1以上の遺伝子の発現を低減又は除去する方法に関する。

【0011】

本発明は、糸状菌株において生物由来物質をコードする標的遺伝子の発現を低減又は除去する方法であって、以下の：

(a) 糸状菌株のゲノムに、生物由来物質をコードする標的遺伝子に対してホモロジーを有する第一転写可能領域を含む第一ポリヌクレオチド、及び標的遺伝子に対して有効なホモロジーを有さない第二転写可能領域を含む第二ポリヌクレオチドに作用可能なように結合されたプロモーターを含む二本鎖転写可能核酸構築物を挿入し；ここで第二転写可能領域は、逆向きに互いに相補的な2つの断片を含み、そして第一及び第二転写可能領域は、単一のmRNA分子として転写される

30

(b) 二次的RNA iのプロセスによりサイレンシングされる標的遺伝子の配列を含む低分子干渉RNA (siRNA)の生産を、二本鎖転写可能核酸構築物のRNA転写産物を産生する条件下で糸状菌を培養することにより誘導し、ここで当該二本鎖転写可能核酸構築物は次にsiRNAに変換され、当該siRNAは、標的遺伝子のRNA転写産物と相互作用して、生物由来物質をコードする標的遺伝子の発現を低減するか又は除去する

を含む方法に関する。

40

【0012】

本発明は、生物由来物質をコードする標的遺伝子にホモロジーを有する第一転写可能領域を含む第一ポリヌクレオチド、及び標的遺伝子に対して有効なホモロジーを有さない第二転写可能領域を含む第二ポリヌクレオチドに作用可能なように結合されたプロモーターを含む二本鎖転写可能核酸を含む糸状菌株にも関し、ここで、当該第二の転写可能領域は、互いに対して逆向きに相補的である2つの断片を含み、そして第一及び第二転写可能領域は、単一のmRNA分子として転写され、ここで、二次的RNA iのプロセスによりサイレンシングされる標的遺伝子の配列を含む低分子干渉RNA (siRNA)の生産は、siRNAに変換される二本鎖転写可能核酸構築物のRNA転写産物を産生する条件下で、糸状菌株を培養することにより誘導されて、当該siRNAは生物由来物質をコードする標的遺伝

50

子の発現を低下又は除去する。

【0013】

本発明はさらに、目的の生物由来物質を生成する方法であって、以下の：

(a) 生物由来物質の産生につながる条件下で糸状菌株を培養し、ここで当該糸状菌株が、不所望の生物由来物質をコードする標的遺伝子に対してホモロジーを有する第一転写可能領域を含む第一ポリヌクレオチド、及び標的遺伝子に対して有効なホモロジーを有さない第二転写可能領域を含む第二ポリヌクレオチドに作用可能なように結合されたプロモーターを含む二本鎖転写可能核酸構築物を含み、ここで当該第二転写可能領域が、逆向きに互いに対して相補的である2つの断片を含み、かつ当該第一及び第二転写可能領域は、単一のmRNA分子として転写され、ここで二本鎖転写可能核酸構築物のRNA転写産物は、糸状菌を培養することにより産生され、当該転写産物は次に、二次的RNAiのプロセスによりサイレンシングされる標的遺伝子の配列を含む低分子干渉RNA(siRNA)へと変換され、当該siRNAは、標的遺伝子のRNA転写産物と相互作用して、不所望な生物由来物質をコードする標的遺伝子の発現を低減するか又は除去し；そしてここで当該糸状菌株は、生物由来物質をコードする第三のポリヌクレオチドを含み；そして

(b) 培養培地から生物由来物質を回収する

を含む方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、糸状菌における二次的RNA干渉の模式図を示す。

【図2】図2は、pCW098の制限酵素地図を示す。

【図3】図3は、pCW099の制限酵素地図を示す。

【図4】図4は、pEFer14の制限酵素地図を示す。

【図5】図5は、pDM261の制限酵素地図を示す。

【図6】図6は、pDM266の制限酵素地図を示す。

【図7】図7は、pAmFs031の制限酵素地図を示す。

【図8】図8は、pAL01の制限酵素地図を示す。

【図9】図9は、pAL02の制限酵素地図を示す。

【0015】

「二次的RNA干渉」：「二次的RNA干渉」又は「二次的RNAi」という語句は、特定の遺伝子を越えたサイレンシングシグナルの移動として本明細書で定義される。二次的RNAiでは、二本鎖RNA(dsRNA)は、新たなdsRNAの合成のために、テンプレートとして機能することができ、当該新たなdsRNAから得られ、標的配列とホモロジーを有するsiRNAは、mRNAに沿った新たな配列のサイレンシングの伸張又は拡張をもたらす。

【0016】

「低分子干渉RNA」：「低分子干渉RNA」又は「siRNA」という語句は、20～25ヌクレオチド長のRNA断片、つまり二本鎖RNAのダイサーに媒介される切断の生成物、として定義される。

【0018】

互いに対して逆向きに相補的な2つの断片：「互いに対して逆向きに相補的な2つの断片」という語句は、他のDNAと適合して、全体としてワトソンクリック塩基対を構成し、かつ当該塩基対を形成できる幾つかのDNA鎖又はDNA片として定義される。

【0019】

二次的にサイレンシングされる標的配列：「二次的にサイレンシングされる標的配列」は、本明細書において、遺伝子サイレンシングの目標であるdsRNA配列であって、隣接配列からのsiRNA伸張の結果生じるdsRNA配列として定義される。

【0020】

同一性：2つのアミノ酸配列の間の、又は2つのヌクレオチド配列の間の関連性が、「同一性」というパラメーターにより記載される。

【0021】

本発明の目的のために、2つのアミノ酸配列の間の同一性の程度は、EMBOSSパッケージ(EMBOSS: 欧州分子生物学オープンソフトウェアスイート、Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16: 276-277)(好ましくはバージョン3.0.0以降)のNeedleプログラムに組み込まれたNeedleman-Wunschアルゴリズム(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)を用いて決定される。使用される任意選択のパラメーターは、ギャップオープンペナルティー: 10、ギャップイクステンションペナルティー: 0.5、及びEBL0SUM62(EMBOSS、EBL0SUM62バージョン)置換マトリックスである。Needle標識「最長同一性(-nobrief optionを用いて得られる)」の出力は、同一性割合として用いられ、かつ以下のように計算される:

$$(\text{同一残基} \times 100) / (\text{アライメント長} - \text{アライメントにおける合計ギャップ数})$$

【0022】

本発明の目的では、2つのデオキシリボヌクレオチド配列の間の同一性の程度は、EMBOSSパッケージ(EMBOSS: 欧州分子生物学オープンソフトウェアスイート、Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16: 276-277)(好ましくはバージョン3.0.0以降)のNeedleプログラムに組み込まれたNeedleman-Wunschアルゴリズム(Needleman and Wunsch, 1970、前掲)を用いて決定される。使用される任意選択のパラメーターは、ギャップオープンペナルティー: 10、ギャップイクステンションペナルティー: 0.5、及びEDNAFULL(NCBI NUC 4.4のEMBOSSバージョン)置換マトリックスである。Needle標識「最長同一性(-nobrief optionを用いて得られる)」の出力は、同一性割合として用いられ、かつ以下のように計算される:

$$(\text{同一デオキシヌクレオチド} \times 100) / (\text{アライメント長} - \text{アライメントにおける合計ギャップ数})$$

【0023】

cDNA: 「cDNA」という語句は、本明細書中では、真核細胞から得られた成熟型スプライス済みmRNA分子から逆転写することにより調製することができる(Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T, 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。cDNAは、ゲノムDNAに存在するイントロン配列を欠いている。最初の初期RNA転写産物は、成熟型スプライス済みmRNAが生成する前に一連のステップを通してプロセッシングされる前駆分子である。これらのステップは、スプライシングと呼ばれるプロセスによりイントロン配列を除去することを含む。mRNAから得られたcDNAは、その結果、全てのイントロン配列を欠失している。

【0024】

核酸構築物: 本明細書に使用される場合「核酸構築物」という語句は、天然遺伝子から単離されるか、又は改変されなければ天然には存在しない様式の核酸断片若しくは合成核酸断片を含む様に改変される核酸分子(一本鎖又は二本鎖のいずれであってもよい)を指す。核酸構築物という語句は、当該核酸構築物がコード配列の発現に必要な制御配列を含む場合、「発現カセット」という語句と同じ意味を有する。

【0025】

制御配列: 「制御配列」という語句は、本明細書において、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現に必須な全ての成分を含むように定義される。各制御配列は、当該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して元来のもの又は外来のものであってもよいし、又は互いに元来のもの又は外来のものであってもよい。かかる制御配列として、リーダー配列、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター、シグナルペプチド配列、及び転写ターミネーターが挙げられるが、これらに限定されることはない。最小の場合でも、制御配列は、プロモーター及び転写終結シグナル及び翻訳終結配列を含む。制御配列を、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のコード領域にライゲーションする制御配列のライゲーションを促進する特異的制限部位を導入するためのリンカーが制御配列に提供されてもよい。

【0026】

プロモーター：「プロモーター」という語句は、本明細書において、RNAポリメラーゼに結合し、そしてポリメラーゼを、下流の正しい生物由来物質をコードする核酸配列の転写開始部位に仕向けて、転写を開始させるDNA配列として定義される。RNAポリメラーゼは、コード領域の適切なDNA鎖に相補的なメッセンジャーRNAの組み立てを効率的に触媒する。「プロモーター」という語句には、mRNAに転写された後に、翻訳のために、(プロモーターと翻訳開始部位)との間に5'非コード領域、エンハンサーなどのシス-作用転写制御エレメント、及び転写因子と相互作用できる他のヌクレオチド配列を含むことが理解されたい。

【0027】

10

変異プロモーター：「変異プロモーター」という語句は、本明細書において、元のプロモーターの1又は複数のヌクレオチドの置換、欠失、及び／又は挿入を含むヌクレオチド配列を有するプロモーターとして定義され、ここで当該変異プロモーターは、対応する元のプロモーターよりも高いか又は低いプロモーター活性を有する。「変異プロモーター」という語句は、天然突然変異、並びに当該技術分野において周知の方法、例えば従来の突然変異誘導、部位特異的突然変異誘導、及びDNAシャッフリングなどを用いて得られるインビトロで作成された変異を包含する。

【0028】

ハイブリッドプロモーター：「ハイブリッドプロモーター」という語句は、本明細書において、2以上のプロモーターの部分であって、融合して2以上のプロモーターの融合物である配列を生成する部分として定義され、コード配列に作用可能なように結合された場合に、コード配列のmRNAへの転写を媒介するものとして定義される。

20

【0029】

タンデムプロモーター：「タンデムプロモーター」という語句は、本明細書において、タンデムに配置され、コード配列のmRNAへの転写を媒介するためにコード配列に作用可能なように結合した2以上のプロモーター配列として定義される。

【0030】

作用可能なように結合：「作用可能なように結合する」という語句は、本明細書において、ポリヌクレオチド配列のコード配列に対して適切な位置に配置されて、その結果制御配列が、ポリペプチドのコード配列の発現を仕向ける配置を指す。

30

【0031】

コード配列：本明細書に使用される場合、「コード配列」という語句は、そのタンパク質のアミノ酸配列を直接特定するヌクレオチド配列を意味する。コード配列の境界は、一般的に、オープンリーディングフレームにより決定され、オープンリーディングフレームは通常、ATG開始コドンで始まるか、又はGTG及びTTGなどの代替開始コドンで始まり、そして停止コドン、例えばTAA、TAG、及びTGAなどで終わる配列である。コード配列は、ゲノムDNA、cDNA、合成DNA、又は組み替えヌクレオチド配列であってもよい。

【0032】

発現：「発現」という語句は、転写、転写後修飾、翻訳、翻訳後修飾、及び分泌を含むポリペプチド産生に関与する任意のステップを含むが、それに限られるものではない。

40

【0033】

発現ベクター：「発現ベクター」という語句は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む直線状又は環状DNA分子として本明細書において定義され、そしてその発現を提供するさらなるヌクレオチドに作用可能なように結合する。

【0034】

宿主細胞：「宿主細胞」という語句は、本明細書に使用される場合、本発明のポリヌクレオチドを含む核酸構築物又は発現ベクターで形質転換、トランスフェクション、形質導入を受け入れることができる任意の細胞型を含む。

【発明を実施するための形態】

50

【0035】

本発明は、糸状菌株において生物由来物質をコードする標的遺伝子の発現を低減又は除去する方法であって、以下の：

(a)生物由来物質をコードする標的遺伝子に対してホモロジーを有する第一転写可能領域を含む第一ポリヌクレオチド、及び標的遺伝子に対して有効なホモロジーを有さない第二転写可能領域を含む第二ポリヌクレオチドに作用可能なように結合するプロモーターを含む二本鎖転写可能核酸構築物を糸状菌株のゲノムに挿入し、ここで、当該第二転写可能領域は、互いに対して逆向きに相補的な2個の断片を含み、かつ第一及び第二転写可能領域は、単一のmRNA分子として転写され；そして

(b)次にsiRNAに変換される二本鎖転写可能核酸構築物のRNA転写産物を産生する条件下で糸状菌株の培養をすることによって、二次的RNAiのプロセスによりサイレンシングされる標的遺伝子の配列を含む低分子干渉RNA(siRNA)の産生を誘導し、当該siRNAは、標的遺伝子のRNA転写産物と相互作用して、生物由来物質をコードする標的遺伝子の発現を低減するか又は除去する

を含む方法に関する。

【0036】

図1は、二次的RNA干渉を示す。形質転換体は、3'において標的遺伝子とはホモロジーを有さない逆反復が隣接した標的断片から構成される転写産物を生産する。IRのフォールディング及びアニーリングにより産生された二本鎖RNA(dsRNA)は、ダイサーによりプロセッシングされて、IRとホモロジーを有するsiRNAを生成する。テンプレートとして転写産物を用い、siRNAの一部は、RNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRP)により、標的配列に入り込むIRの5'境界を越えて伸張される。連続伸張は、標的によりコードされるdsRNAを産生し、RNAiを開始した。

【0037】

本発明の方法は、糸状菌株において、株開発及び改良、機能ゲノミクス、及び遺伝子操作経路のための新たな機会を提供する。例えば、本方法は、遺伝子操作及び遺伝子操作経路を用いた糸状菌株の開発のツールとして、又は時間が掛かるアプローチでありかつ成功率が変化する遺伝子ノックアウトの代替法として使用することができる。遺伝子は、遺伝子ノックアウトなどの当該技術分野において知られている標準的方法による不活性化に対し抵抗性であることもある。本発明の方法は、このような遺伝子の発現を低減又は除去するための解決方法を提供する。遺伝子ノックアウトは、部位特異的遺伝子置換による。この方法の真菌における効率は、染色体遺伝子座、置換構築物及びゲノムにより共有されるDNA配列、及び／又は共有ホモロジーの長さにより影響をうける。記載された二次的遺伝子サイレンシングの実現は、逆方向反復から構成される第二配列の上流の標的配列の一部をクローニングすることによりのみ依るものである。当該方法は、特定の糸状菌株における高度に発現された遺伝子を低減又は除去するために特に有用でありかつ有効であり、これは例えば生産宿主として生物を開発する際にかなり重要である。この能力は、本発明の方法の長所を示している。当該方法は、互いに対して高度に相同である複数の遺伝子、特に同一ファミリーの遺伝子又は生合成経路又は代謝経路におけるホモログ遺伝子、の発現を低減するか又は除去するのに有用である。本方法は、生物由来物質の発現を如何ようにも低下させるように操作できるのでさらに有用である。この変動性は、生物由来物質をコードする遺伝子の完全なノックアウトが特定の糸状菌株に対して致命的となる場合、例えば目的の生合成経路へと流れ込む二次的経路において、特に重要である。

【0038】

本発明の方法では、標的遺伝子とホモロジーを有する第一転写可能領域を含む。第二ポリヌクレオチドは、標的遺伝子に対して有効なホモロジーを有さない第二転写可能領域を含み、ここで第二転写可能領域は、互いに対して逆向きに相補的である2つの断片を含む。

【0039】

生物由来物質をコードする標的遺伝子に対してホモロジーを有する第一転写可能領域を

含む第一ポリヌクレオチド、及び標的遺伝子に対して有効なホモロジーを有さない第二転写可能領域を含む第二ポリヌクレオチドは、二本鎖転写可能核酸構築物において、第一及び第二ポリヌクレオチドにほとんどホモロジーを有さないか又は全くホモロジーを有さないヌクレオチド配列であるポリヌクレオチド介在配列により分離されてもよいし、分離されていなくてもよい。二本鎖転写可能核酸構築物のポリヌクレオチド配列は、ゲノムの配列、cDNA、RNA、半合成、合成複製起点、又はその任意の組み合わせであってもよい。

【0040】

好ましい態様では、第一ポリヌクレオチド及び第二ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド介在配列により分離される。介在配列は、好ましくは、150未満のヌクレオチド、より好ましくは100未満のヌクレオチド、より好ましくは60未満のヌクレオチド、より好ましくは40未満のヌクレオチド、さらにより好ましくは20未満のヌクレオチド、そして最も好ましくは10未満のヌクレオチドからなる。

10

【0041】

より好ましい態様では、第一及び第二ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド介在配列により分離されない。

【0042】

介在配列は、第一又は第二ポリヌクレオチドにホモロジーを有さない任意のヌクレオチド配列でありうるし、そして好ましくは、不所望の標的／組み換えを最小化するために糸状菌株のゲノムの配列にホモロジーをほとんど有さないか又は全く有さない。

20

【0043】

プロモーター

プロモーター配列は、第一相同転写可能領域に対して元来のものであるか、又は外来(異種)であってもよいし、そして糸状菌株に対して元来のものであるか又は外来のものであってもよい。本発明の方法では、プロモーターは、元来のプロモーター、異種プロモーター、突然変異プロモーター、ハイブリッドプロモーター、又はタンデムプロモーターであってもよい。

【0044】

本発明の方法において有用なプロモーターの例としては、アスペルギルス・オリゼー(*Aspergillus oryzae*) TAKAアミラーゼ、リゾムコール・ミーハイ(*Rhizomucor miehei*)アスパラギン酸プロテイナーゼ、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)中性 α アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー酸安定 α -アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー又はアスペルギルス・アワモリ(*Aspergillus awamori*)グルカミラーゼ(*glaA*)、リゾムコール・ミーハイ・リパーゼ、アスペルギルス・オリゼー・アルカリプロテアーゼ、アスペルギルス・オリゼー・トリオースリン酸イソメラーゼ、アスペルギルス・ニジュランズ(*Aspergillus nidulans*)アセトアミダーゼ、フサリウム・ベネナツム(*Fusarium venenatum*)アミログルコシダーゼ(WO 00/56900)、フサリウム・ベネナツム ダリア(WO 00/56900)、フサリウム・ベネナツム・キン(WO 00/56900)、フサリウム・オキシスポルム(*Fusarium oxysporum*)トリプシン様プロテアーゼ(WO 96/00787)、トリコデルマ・レセイ(*Trichoderma reesei*) β -グルコシダーゼ、トリコデルマ・レセイ セロバイオヒドロラーゼI、トリコデルマ・レセイ セロビオヒドロラーゼII、トリコデルマ・レセイ エンドグルカナーゼI、トリコデルマ・レセイ エンドグルカナーゼII、トリコデルマ・レセイ エンドグルカナーゼIII、トリコデルマ・レセイ エンドグルカナーゼIV、トリコデルマ・レセイ エンドグルカナーゼV、トリコデルマ・レセイ キシラナーゼI、トリコデルマ・レセイ キシラナーゼII、トリコデルマ・レセイ β キシロシダーゼの遺伝子から得られるプロモーター、及びNA2-tpiプロモーター(アスペルギルス・ニガー中性 α -アミラーゼ様の遺伝子及びアスペルギルス・オリゼー トリオースホスフェートイソメラーゼ由来のプロモーターのハイブリッド)；並びにそれらの変異、切り詰め、及びハイブリッドプロモーターを含む。

30

40

【0045】

50

好ましい態様では、プロモーターは、NA-2-t p i プロモーターである。別の好ましい態様では、プロモーターは、TAKA/NA2-t p i リーダーハイブリッドプロモーターである。

【0046】

相同転写可能領域

「標的遺伝子に対してホモロジーを有する転写可能領域」という語句は、標的遺伝子のオープンリーディングフレームに相同であるヌクレオチド配列、又はその一部として定義され、そしてRNA、例えばncRNA(非コードRNA)、tRNA(トランスファーRNA)、rRNA(リボソーマルRNA)、miRNA(マイクロRNA)、又はmRNA(メッセンジャーRNA)に翻訳され、適切な調節配列の制御の下に置かれた場合、これらは生物由来物質、例えばポリペプチドに翻訳されることもあるし、又は翻訳されないこともある。転写可能領域の境界は、一般的に、mRNAの5'末端においてオープンリーディングフレームのすぐ上流に位置する転写開始部位により、そしてmRNAの3'末端においてオープンリーディングフレームのすぐ下流に位置する転写終結配列により一般的に決定されている。相同な転写可能領域は、ゲノムDNA、cDNA、半合成、合成、及び組み替え核酸配列を含むが、これらに限定されるわけではない。

10

【0047】

本発明の方法では、標的遺伝子に相同な転写可能領域は、標的遺伝子の対応領域に同一であってもよいし、それらのホモログであってもよい。

【0048】

標的遺伝子の発現低下又は不活性化を達成するために必要とされる標的遺伝子の対応領域とホモログとの間の同一性の程度は、標的遺伝子に依るようである。全体の標的遺伝子に対してホモログのヌクレオチド配列が小さくなればなるほど、配列間の同一性の程度は、好ましくはかなり高いか又は同一であるべきである。全体の標的遺伝子に対してホモログのヌクレオチド配列が大きくなればなるほど、配列間の同一性の程度は、低くなりうる。

20

【0049】

本発明の方法において、標的遺伝子の対応配列に対するホモログのヌクレオチド配列の同一性の程度は、少なくとも65%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも97%である。本発明の目的では、2つの核酸配列の間の同一性の程度は、本明細書に定義されるように決定される。

30

【0050】

或いは、さまざまなストリンジェンシー条件下で、互いに対してハイブリダイズするホモログと標的遺伝子の対応領域の能力は、標的遺伝子の発現の不活性化又は低下に必要とされる関連性の程度の指標を提供することもできる。しかしながら、ホモログと標的遺伝子の対応領域との間でハイブリダイゼーションを達成するために必要とされるストリンジェンシー条件が低くなればなるほど、標的遺伝子の発現の不活性化又は低下は、有効ではなくなってくるようである。

40

【0051】

好ましい態様では、ホモログと標的遺伝子の対応する領域は、低いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする。より好ましい態様では、ホモログ及び標的遺伝子の対応する領域は、中程度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする。さらにより好ましい態様では、ホモログと標的遺伝子の対応領域は、中～高程度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする。最も好ましい態様では、ホモログと標的遺伝子の対応する領域は、高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする。さらに最も好ましい態様では、ホモログと、標的遺伝子の対応領域は、かなり高いストリンジェンシー条件下でハイブリッド形成する。

【0052】

50

少なくとも100ヌクレオチド長のプローブでは、かなり低い～かなり高いストリンジェンシー条件は、 $5 \times \text{SSPE}$ 、 $0.3\% \text{SDS}$ 、 $200 \mu\text{g/ml}$ のせん断かつ変性されたサケ精子DNA、及びかなり低いストリンジェンシー及び低いストリンジェンシーでは25%のホルムアミド、中程度及び中～高ストリンジェンシーでは35%ホルムアミド、又は高及びかなり高いストリンジェンシーでは50%ホルムアミド中において 42°C でのハイブリダイゼーション前及びハイブリダイゼーション時、それに続き好ましくは12～24時間標準サザンブロット法を行うこととして定義される。

【0053】

少なくとも100ヌクレオチド長のプローブでは、キャリア物質は、最終的に、好ましくは少なくとも 45°C (かなり低いストリンジェンシー)、より好ましくは少なくとも 50°C (低いストリンジェンシー)、より好ましくは少なくとも 55°C (中程度のストリンジェンシー)、より好ましくは少なくとも 60°C (中～高程度のストリンジェンシー)、さらにより好ましくは少なくとも 65°C (高いストリンジェンシー)、そして最も好ましくは少なくとも 70°C (かなり高いストリンジェンシー)で $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.2\% \text{SDS}$ 用いて15分間、3回洗浄した。

【0054】

約70のヌクレオチド長に対する約15ヌクレオチドのプローブでは、ストリンジェンシー条件は、Bolton and McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48: 1390)に従った計算を用いて計算された T_m から約 $5 \sim 10^\circ\text{C}$ 低い温度で 0.9M NaCl 、 0.09M Tris-HCl pH7.6、 6mM EDTA 、 $0.5\% \text{NP-40}$ 、 $1 \times$ デンハート溶液、 1mM リン酸ナトリウム、 1mM リン酸二水素ナトリウム、 0.1mM ATP 、及び 0.2mg/ml の酵母RNA中において、ハイブリダイゼーション前、ハイブリダイゼーション時、及びハイブリダイゼーション後において洗浄し、それに続き好ましくは12～24時間標準サザンブロット法を行うこととして定義される。

【0055】

約70ヌクレオチド長に対する約15ヌクレオチドのプローブでは、キャリア物質は、15分間、 $6 \times \text{SSC} + 0.1\% \text{SDS}$ で1回洗浄し、そして $6 \times \text{SSC}$ を用いて、計算された T_m から $5^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 低い温度で15分間2回洗浄した。

【0056】

第一相同領域は、好ましくは、少なくとも19ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも40ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも60ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも80ヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも100ヌクレオチド、そしてもっとも好ましくは少なくとも200ヌクレオチドからなる。第一相同領域は、遺伝子のオープンリーディングフレーム全体、又はそのホモログからなりうる。

【0057】

非相同転写可能領域

二本鎖転写可能核酸構築物は、標的遺伝子又は宿主ゲノムに対して有効なホモロジーを有さない第二転写可能領域を含み、ここで当該第二転写可能領域は、逆向きに互いに対して相補的な2つの断片を含む。

【0058】

好ましい態様では、第二転写可能領域は、任意の遺伝子の任意の転写可能部分、例えば遺伝子の5'-非翻訳領域、コード配列、又は3'-非翻訳領域であり、これらは標的遺伝子又は宿主ゲノムにたいして有効なホモロジーを有さないものである。

【0059】

より好ましい態様では、第二転写可能領域は、標的遺伝子又は宿主ゲノムに対して有効なホモロジーを有さない遺伝子のコード配列に対応する。

【0060】

別のより好ましい態様では、第二転写可能領域は、標的遺伝子又は宿主ゲノムに対して有効なホモロジーを有さない遺伝子の5'非翻訳領域に対応する。

【0061】

別のより好ましい態様では、第二転写可能領域は、標的遺伝子又は宿主ゲノムに対して有効なホモロジーを有さない遺伝子の3'非翻訳領域に対応する。

【0062】

もっとも好ましい態様では、第二転写可能領域は、標的遺伝子又は宿主ゲノムに対してホモロジーを有さない非内在性遺伝子の一部であり、例えば大腸菌(*E. coli*)のハイグロマイシン抵抗性遺伝子である。

【0063】

第二転写可能領域は、好ましくは少なくとも19のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも40のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも60のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも80のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも100のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも250のヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも500のヌクレオチド、もっとも好ましくは少なくとも750のヌクレオチド、そしてさらにもっとも好ましくは少なくとも1000のヌクレオチドからなる。

【0064】

互いに対して逆向きに相補的である2つの断片は、ポリヌクレオチドリンカーにより分離することができる。当該リンカーは好ましくは、少なくとも4のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも20のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも40のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも60のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも80のヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも100のヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも250のヌクレオチド、そしてさらに最も好ましくは少なくとも500のヌクレオチドからなる。

【0065】

標的遺伝子

標的遺伝子は、代謝産物(以下、「生物由来物質」と呼ぶ)の生合成に関与する生物学的活性を有するポリペプチドをコードする生物学的活性又は任意の遺伝子であってもよい。生物由来物質は、RNA(例えば、ncRNA、rRNA、tRNA、miRNA、又はmRNA)であってもよい。生物由来物質は、生物学的活性を有するペプチドであってもよい。生物学的活性を有する物質は、糸状菌株にもともとあるものであってもよいし、又は当該株に対して異種であるか又は外来のモノであってもよい。外来又は異種物質は、細胞に対して生来の物質であるか；又は構造的な修飾がなされて生来の物質を変化させた物質である。

【0066】

好ましい態様では、生物由来物質は、生物学的活性を有するポリペプチドである。ポリペプチドは、生物学的活性を有する任意のポリペプチドであってもよい。「ポリペプチド」という語句は、本明細書中において、エンコードされた生成物の特定の長さをさすことを意味し、その結果ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、及びタンパク質を包含する。「ポリペプチド」という語句は、コードされた生成物を形成するように組み合わせられた2以上のポリペプチドを包含する。ポリペプチドは、ハイブリッドポリペプチドを含み、当該ポリペプチドは、少なくとも2の異なるポリペプチドから得られた部分又は完全なポリペプチドを含み、ここで1以上は、真菌細胞に対して異種である。ポリペプチドは、さらに、天然アレル及び上記ポリペプチドとハイブリッドするポリペプチドの遺伝子操作バリエーションを含む。

【0067】

好ましい態様では、ポリペプチドは抗体、抗原、抗菌ペプチド、酵素、増殖因子、ホルモン、免疫調節因子、神経伝達因子、受容体、レポータータンパク質、構造タンパク質、及び転写因子である。

【0068】

より好ましい態様では、ポリペプチドは、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、又はリガーゼである。最も好ましい態様では

、ポリペプチドは、アセチルキシラン、エステラーゼ、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、フェルラ酸エステラーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、グルコセレブロシダーゼ、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、インベルターゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、マンノシダーゼ、ムタナーゼ、オキシダーゼ、ペクチン分解酵素、ペルオキシダーゼ、ホスホリパーゼ、フィターゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、タンパク質分解酵素、リボヌクレアーゼ、トランスグルタミナーゼ、ウロキナーゼ、又はキシラナーゼである。

【0069】

10

別の好ましい態様では、ポリペプチドは、アルブミン、コラーゲン、トロポエラスチン、エラスチン又はゼラチンであるか；又はそれらのバリエーション又はハイブリッドである。

【0070】

生物由来物質は、選択可能なマーカーの製品であってもよい。選択可能なマーカーは、遺伝子産物が殺生物剤又はウイルス抵抗性、重金属抵抗性、原栄養性から栄養要求性などを与える遺伝子である。選択可能なマーカーは、a m d S (アセトアミダーゼ)、a r g B (オルチンカルバモイルトランスフェラーゼ)、b a r (ホスフィノスリシン・アセチルトランスフェラーゼ)、h y g B (ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ)、n i a D (硝酸レダクターゼ)、p y r G (オロチジン-5'-ホスフェート・デカルボキシラーゼ)、s c C (硫酸アデニルトランスフェラーゼ)、t r p C (アントラニル・シンターゼ)、並びにそれらの同等物を含むが、それらに限定されるものではない。

20

【0071】

標的遺伝子を単離することが、本発明の実施において必須であることもある。遺伝子を単離又はクローニングするために使用される技術は、当該技術分野に知られており、そしてゲノムDNAからの単離、c DNAからの調製、又はそれらの組み合わせを含む。かかるゲノムDNAからの遺伝子のクローニングは、周知のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて行うことができる。例えば、Innis ら、1990、PCRプロトコル：A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York.を参照のこと。クローニング法は、生物由来物質をコードする遺伝子を含む所望の核酸断片を切り出し、そして単離し、当該断片をベクター分子に挿入し、そして組み替えベクターを糸状菌細胞に取り込ませることに関することもある。ここで核酸配列の複数コピー又はクローンが複製されるであろう。核酸配列は、ゲノム、c DNA、RNA、半合成、合成起源であってもよいし、又はそれらの任意の組み合わせであってもよい。

30

【0072】

好ましい態様では、標的遺伝子の発現は、少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、さらにより好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%、そしてさらに最も好ましくは100%低減される。

【0073】

40

5'非翻訳領域、コード配列、又は3'非翻訳領域内の標的配列を使用することが望ましい場合、これらの領域のうちの任意の1の内側に逆方向反復で構築された遺伝子サイレンシングベクターは、さらにサイレンシングベクター内に存在するコード配列に相同である遺伝子のサイレンシングをさらに可能にすることもある。その結果、生物内の遺伝子のホモログをサイレンシングすることが望まれる場合、5'非翻訳領域、コード配列、又は3'非翻訳領域内に相同性を有する二次的発現標的配列を含むサイレンシングベクターの構築物は、構築物中のコード配列と配列相同性を示す1以上の遺伝子の発現の除去又は低下を可能にすることもある。「相同性」又は「相同性の」という語句は、通常、幾つかの共通する祖先構造を有し、そして活性領域における高度の配列類似性を示す配列を指す。

【0074】

50

好ましい態様では、干渉RNAは、標的遺伝子の1以上のホモログのRNA転写産物と相互作用して、標的遺伝子の1以上のホモログの発現を低減するか又は除去する。

【0075】

より好ましい態様では、標的遺伝子の1以上のホモログの発現は、少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、さらにより好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%、そしてさらに最も好ましくは100%低下する。

【0076】

糸状菌株

生物学的構造をコードする標的遺伝子にホモロジーを有する第一転写可能領域を含む第一ポリヌクレオチド、及び標的遺伝子に有効なホモロジーを有さない第二転写可能領域を含む第二ポリヌクレオチドに作用可能なように結合されたプロモーターを含む二本鎖転写可能核酸構築物を含む糸状菌株に関する。ここで、当該第二転写可能領域は、互いに逆向きに相補的である2つの断片を含み、そして第一及び第二転写可能領域は1のmRNA分子として転写される。ここで二次的RNAiのプロセスによりサイレンシングされる標的遺伝子の配列を含む低分子干渉RNA(siRNA)の産生は、二本鎖転写可能核酸構築物のRNA転写産物を産生する条件下で、糸状菌株を培養することにより誘導され、低分子干渉RNAは、標的遺伝子のRNA転写産物と相互作用して、生物由来物質をコードする標的遺伝子の発現を低下又は除去する。

【0077】

糸状菌株は、本発明の方法において有用である任意の糸状菌株であってもよい。「糸状菌」は、(Hawksworthら、Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, 8th edition, 1995, CAB International University Press, Cambridge, UKにより定義されるように)真菌類及び卵菌類亜門の全ての糸状菌株を含む。糸状菌は、キチン、セルロース、グルカン、キトサン、マンナン、及び他の複合体多糖類から構成される菌壁(mycelial wall)により特徴付けられる。栄養増殖は、菌糸伸張によっており、そして炭素異化は、偏性好気性である。対照的に、サッカロマイシス・セルビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)などの酵母による栄養増殖は、単細胞性葉状体の発芽によっており、そして炭素異化は、発酵性である。

【0078】

好ましい態様では、糸状菌株は、アクレモニウム(*Acremonium*)属、アスペルギルス(*Aspergillus*)属、オーレオバシディウム(*Aureobasidium*)属、ジェルカンデラ(*Bjerkandera*)属、セリポリオプシス(*Ceriporiopsis*)属、クリソスポリウム(*Chrysosporium*)属、ヒトヨタケ(*Coprinus*)属、カワラタケ(*Coriolus*)属、クリプトコッカス(*Cryptococcus*)属、フィリバシジウム(*Filibasidium*)属、フサリウム(*Fusarium*)属、フミコラ(*Humicola*)属、マグナポルテ(*Magnaporthe*)属、ケカビ(*Mucor*)属、マイセリオソラ(*Myceliophthora*)属、ネオカリマスティクス(*Neocallimastix*)属、ニューロスポラ(*Neurospora*)属、ペシロマイセス(*Paecilomyces*)属、ペニシリウム(*Penicillium*)属、ファネロカエテ(*Phanerochaete*)属、フェルビア(*Phlebia*)属、ピロマイシス(*Piromyces*)属、ヒラタケ(*Pleurotus*)属、スエヒロタケ(*Schizophyllum*)属、タラロマイシス(*Talaromyces*)属、サーモアスキス(*Thermoascus*)属、チエラビア(*Thielavia*)属、トリポクラジウム(*Tolypocladium*)属、トラメテス(*Trametes*)属、又はトリコデルマ(*Trichoderma*)属である。

【0079】

より好ましい態様では、糸状菌株は、アスペルギルス・アワモリ(*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・フミガーツフ(*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・フォエチズ(*Aspergillus foetidus*)、アスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・ニジュラス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、又はアスペルギルス・オリゼー(*Aspergillus oryzae*)株である。別の最も好ましい態様では、糸状菌株は、フサリウム・バクトリジオイデス(*Fusarium bac*

10

20

30

40

50

oides)、フサリウム セレアリス(*Fusarium cerealis*)、フサリウム クロオクウェレンス(*Fusarium crookwellense*)、フサリウム クルモルム(*Fusarium culmorum*)、フサリウム グラミネアルム(*Fusarium graminearum*)、フサリウム グラミヌム(*Fusarium graminum*)、フサリウム ヘテロスポルム(*Fusarium heterosporum*)、フサリウム ネグンジ(*Fusarium negundi*)、フサリウム オキシスポルム(*Fusarium oxysporum*)、フサリウム レチクラツム(*Fusarium reticulatum*)、フサリウム ロソイム(*Fusarium roseum*)、フサリウム サンブシヌム(*Fusarium sambucinum*)、フサリウム サルコクロウム(*Fusarium sarcochroum*)、フサリウム スポロトリキオイデス(*Fusarium sporotrichioides*)、フサリウム スルフロイム(*Fusarium sulphureum*)、フサリウム トルロスム(*Fusarium torulosum*)、フサリウム トリコテシオイデス(*Fusarium trichothecioides*)、又はフサリウム ベネナツム(*Fusarium venenatum*)株である。別の最も好ましい態様では、糸状菌株は、ブジェルカンデラ アズスタ(*Ceriporiopsis aneirina*)、セリポリオブシス アネイリナ(*Ceriporiopsis aneirina*)、セリポリオブシス カレギエア(*Ceriporiopsis caregiea*)、セリポリオブシス ギルベセンス(*Ceriporiopsis gilvescens*)、セリポリオブシス パンノドンタ(*Ceriporiopsis pannodnta*)、セリポリオブシス リブロサ(*Ceriporiopsis rivulosa*)、セリポリオブシス スブルファ(*Ceriporiopsis subrufa*)、セリポリオブシス スッベルミスポラ(*Ceriporiopsis subvermispora*)、クリソスポリウム ケラチノフィルム(*Chrysosporium keratophilum*)、クリソスポリウム ルックノウェンス(*Chrysosporium lucknowense*)、クリソスポリウム トロピクム(*Chrysosporium tropicum*)、クリソスポリウム メルダリウム(*Chrysosporium merdarium*)、クリソスポリウム イノプス(*Chrysosporium inops*)、クリソスポリウム パンニコラ(*Chrysosporium pannicola*)、クリソスポリウム ケエンズランジクム(*Chrysosporium queenslandicum*)、クリソスポリウム ゾナツム(*Chrysosporium zonatum*)、コプリヌス シネロイス(*Coprinus cinereus*)、コリオルス ヒルスツス(*Coriolus hirsutus*)、フミコラ インソレンス(*Humicola insolens*)、フミコラ ラヌギノサ(*Humicola lanuginosa*)、ムコル ミエヘイ(*Mucor miehei*)、マイセリオソラ テルモフィラ(*Myceliophthora thermophila*)、ニューロスポラ クラッサ(*Neurospora crassa*)、ペニシリウム プルプロゲヌム(*Penicillium purpurogenum*)、ファネロカエト クリソスポリウム(*Phanerochaete chrysosporium*)、フレビア ラジアタ(*Phlebia radiata*)、プロイロツス エリンギイ(*Pleurotus eryngii*)、チエラビア テレストリス(*Thielavia terrestris*)、トラメテス ビロサ(*Trametes villosa*)、トラメテス ベルシコロール(*Trametes versicolor*)、トリコデルマ ハルジアヌム(*Trichoderma harzianum*)、トリコデルマ コニンギイ(*Trichoderma koningii*)、トリコデルマ ロンギブラキアツム(*Trichoderma longibrachiatum*)、トリコデルマ レエセイ(*Trichoderma reesei*)、又はトリコデルマ ビリド(*Trichoderma iride*)株である。

【0080】

最も好ましい態様では、アスペルギルス・オリゼー株は、受託番号 I F O 4 1 7 7 のアスペルギルス・オリゼー株である。別の最も好ましい態様では、フサリウム・ベネナツム株は、フサリウム・ベネナツム A 3 / 5 (もともとフサリウム・グラミネアルム(*Fusarium graminearum*) ATCC 20334として寄託されており、そして Yoder and Christianson, 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 62-80 及び O'Donnell et al., 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 57-67により、フサリウム・ベネナツム(*Fusarium venenatum*)として近年再分類された株である)、並びに現在知られている株名にかかわらず、フサリウム・ベネナツムの分類学的等価株である。別の最も好ましい態様では、フサリウム・ベネナツム株は、WO 97 / 26330に開示されるフサリウム・ベネナツム A 3 / 5 又はフサリウム・ベネナツム A T C C 2 0 3 3 4 の形態学的変異株である。別の最も好ましい態様では、トリコデルマ・リーセイ(*Trichoderma reesei*)株は、トリコデルマ・リーセイ。A T C C 56765である。別の最も好ましい態様では、アスペルギルス・ニガー株は、アスペルギルス・ニガー(Bo-1 (DSM 12665))である。別の最も好ましい態様では、アスペルギルス・ニガー株は、アスペルギルス・ニガー B o - 1 (D S M 1 2 6 6 5) である。別の最も好ましい態様では、アスペルギルス・ニガー株は、WO 2 0 0 4 / 0 9 0 1 5 5 に開示

10

20

30

40

50

されるアスペルギルス・ニガー B o - 1 (D S M 1 2 6 6 5) の変異株である。

【 0 0 8 1 】

糸状菌株は、プロトプラスト形成、プロトプラストの形質転換、及び細胞壁の再生を含むプロセスにより、それ自体知られている様式で形質転換されうる。アスペルギルス及びトリコデルマ株の形質転換の適した方法は、E P 2 3 8 0 2 3 及び Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81 : 1470-1474 に記載されている。フサリウム株を形質転換する適切な方法は、Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 及び W O 96/00787 により記載されている。酵母は、Becker and Guarente, In Abel son, J.N. and Simon, M. I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; and Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920 により記載される方法を用いて形質転換されてもよい。

【 0 0 8 2 】

不所望な生物由来物質をコードする標的遺伝子の発現を低下又は除去することは、標的生物由来物質に対して特異的である当該技術分野に既知の方法を用いて検出されてもよい。これらの検出方法は、特異的抗体、高速液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動酵素生成物の形成、酵素基質の消失、S D S - P A G E、又は例えば胞子の色などの表現系の消失又は出現を用いることを含んでもよい。例えば、酵素アッセイは、酵素活性を決定するために使用されてもよい。酵素活性を測定する方法は、多くの酵素について当業者知られている(例えば、D. Schomburg and M. Salzmänn (共著), Enzyme Handbook, Springer-Varlag, New York, 1990)。

【 0 0 8 3 】

生成方法

本発明は、目的の生物由来物質を生産する方法であって、

(a) 目的の生物由来物質の産生に寄与する条件下で糸状菌株を培養し、ここで当該糸状菌株は、不所望の生物由来物質をコードする標的遺伝子に相同性を有する第一転写可能領域を含む第一ポリヌクレオチド及び標的遺伝子に対して有効な相同性を有さない第二転写可能領域を含む第二ポリヌクレオチドに作用可能なように結合されたプロモーターを含む二本鎖転写可能核酸構築物を含み、ここで当該第二転写可能領域は、互いに対して逆向きに相補性である2つの断片を含み、そして第一及び第二転写可能領域は、単一のmRNA分子として転写され、ここで二本鎖転写可能核酸構築物のRNA転写産物は、RNA転写産物を産生する条件下で糸状菌株を培養することにより産生され、当該転写産物は次に二次的RNAiのプロセスによりサイレンシングされる標的遺伝子の配列を含む低分子干渉RNA(s i RNA)に変換され、当該s i RNAが、標的遺伝子のRNA転写産物と相互作用して、不所望の生物由来物質をコードする標的遺伝子の発現を低減又は除去し、そしてここで当該糸状菌株が、目的の生物由来物質をコードする第三のポリヌクレオチドを含み、そして

(b) 目的の生物由来物質を培養培地から回収すること

を含む。

【 0 0 8 4 】

目的の生物由来物質は、本明細書に記載される任意の生物由来物質であってもよい。好ましい態様では、目的の生物由来物質は、生物学的活性を有するポリペプチドである。当該物質は、糸状菌株に生来の物質、又は外来の物質であってもよい。不所望の生物由来物質をコードする標的遺伝子の発現を低減又は除去することは、目的の生物由来物質の発現増加を導くことができる。不所望の生物由来物質は、目的の生物由来物質の生成又は発現に直接影響することができる。例えば、不所望の生物由来物質は、目的の生物由来物質を攻撃するプロテアーゼである場合があり、それにより、生成された目的の生物由来物質の量を低下させることがある。プロテアーゼの発現を低下又は除去することにより、より多くの目的の生物由来物質が発現されそして産生されるであろう。あるいは、不所望の生物

由来物質は、(1又は複数の)細胞プロセス、例えば転写因子又は分泌経路、を、目的の生物由来物質と共有し、それにより、產生される目的の生物由来物質の量が低下する場合もある。不所望の生物由来物質の発現を低下又は除去することにより、1又は複数の細胞プロセス、例えば発現制御転写要素、のより多くが目的の生物由来物質に利用できるようになり、それにより発現されそして產生される目的の生物由来物質の量を増加させる。さらに、不所望の生物由来物質は、目的の生物由来物質を、特定の適用、例えば食品加工における酵素、に使用することを妨げる目的の生物由来物質に混入する毒素であることもある。

【0085】

本発明の生成方法では、糸状菌株は、当該技術分野において既知の方法を用いて目的の生物由来物質の產生に適した栄養培地中で培養される。例えば、当該株は、生物由来物質が発現し及び／又は単離することを可能にする適切な培地及び条件下において、攪拌フラスコ培養、及び研究室又は工業用発酵槽における小規模又は大規模発酵(連続培養、回分培養、流加培養、又は固体培養)により培養されてもよい。培養は、炭素及び窒素源、及び無機塩を含む適切な栄養培地で、当該技術分野に知られている方法を用いて行われる。適切な培地は、商業的供給元から利用できるか、又は(例えば、米国培養細胞系統保存機関のカタログに)公表された組成にしたがって調製されてもよい。生物由来物質が栄養媒地中に分泌される場合、培地から直接回収することができる。生物由来物質が分泌されない場合、細胞ライセートから回収することができる。

【0086】

目的の生物由来物質は、生物由来物質に対して特異的である当該技術分野に知られている方法を用いて検出されてもよい。これらの検出方法は、特定の抗体、高速液体クロマトグラフィー、キャピラリークロマトグラフィー、酵素生成物の形成、酵素の基質の消失、又はSDS-PAGEの使用を含む。例えば、酵素の活性を測定するために酵素アッセイが使用されてもよい。酵素活性のための方法は、多くの酵素について当業者に知られている(例えば、D. Schomburg and M. Saizmann (共著), Enzyme Handbook, Springer-Verlag, New York, 1990)。

【0087】

生成した目的の生物由来物質は、当該技術分野において知られている方法を用いて単離されてもよい。例えば、目的のポリペプチドは、例えば非限定的に、遠心、ろ過、抽出、スプレー乾燥、蒸発又は沈殿を含む慣用方法により培養培地から単離されてもよい。単離されたポリペプチドは、次にさらに、例えば非限定的にクロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー、疎水性、クロマト分画、及びサイズ排除)、電気泳動手法(例えば、調製等電点電気泳動(IEF)、示差溶解度(例えば硫酸アンモニウム沈殿)、又は抽出(例えば、Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York 1989を参照のこと)を含む当業者に周知のさまざまな方法によりさらに精製されてもよい。目的の代謝生成物は、例えば抽出、沈殿、又は示差溶解度により、又は当該技術分野に知られている任意の方法により培養培地から単離されてもよい。単離された代謝生成物が、代謝生成物に適した方法を用いてさらに精製されてもよい。

【0088】

生物由来物質をコードするポリヌクレオチド

目的の生物由来物質をコードする単離されたポリヌクレオチド配列は、任意の原核生物、真核生物、又は他のソースから得ることができる。本発明の目的では、所定のソースと組み合わせて本明細書において使用される「得られる」という語句は、生物由来物質が当該ソースにより產生されるか、又は当該ソース由来の遺伝子が挿入された細胞により產生されるということを意味するものとする。

【0089】

目的の生物由来物質をコードするポリヌクレオチドを単離又はクローニングするために使用される技術は、当該技術分野に知られており、そしてゲノムDNAからの単離、cDNAからの調製、又はそれらの組み合わせを含む。かかるゲノムDNA由来のポリヌクレ

10

20

30

40

50

オチドのクローニングは、例えば、周知のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いることにより行うことができる。例えば、Innis et al., 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New Yorkを参照のこと。クローニング法は、生物由来物質をコードするポリヌクレオチドを含む所望の核酸断片を切り出し、そして単離し、当該断片をベクター分子に挿入し、そして核酸配列の複数のコピー又はクローンを複製する突然変異糸状菌細胞に当該組換えベクターを取り込ませることに関する。ポリヌクレオチドは、ゲノム、cDNA、RNA、半合成、合成起源、又はそれらの任意の組み合わせであってもよい。

【0090】

核酸構築物

目的の生物由来物質をコードする単離ポリヌクレオチドは、糸状菌株中の核酸構築物に含まれてもよい。核酸構築物は、調節配列に適合する条件下で糸状菌株中においてヌクレオチド配列の発現を仕向ける少なくとも1のプロモーター及び1以上の調節配列に作用可能なように結合する目的の生物由来物質をコードするヌクレオチド配列を含む。発現は、非限定的に、転写、転写後修飾、翻訳、翻訳後修飾、及び分泌を含む目的の生物由来物質の産生に關与する任意のステップを含むことが理解されたい。

【0091】

目的の生物由来物質をコードする単離ポリヌクレオチドは、生物由来物質の発現を提供するさまざまな方法でさらに操作されてもよい。ベクター中への挿入前にヌクレオチド配列を操作することは、発現ベクターに応じて望ましいこともあるし又は必須であることもある。組み換えDNA法を利用するヌクレオチド配列の改変のための技術は、当該技術分野において周知である。

【0092】

ポリヌクレオチドは、1以上の生来の調節配列を含んでもよいし、又は1以上の生来の調節配列は、宿主細胞中におけるコード配列の発現を改善するために当該ヌクレオチドに対して外来である1以上の調節配列で置き換えられてもよい。かかる調節配列は、リーダー配列、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター、シグナルペプチド配列、及び転写終結配列を含むがそれらに限定されるものではない。最低でも、調節配列は、プロモーターと転写停止シグナル及び翻訳停止シグナルを含む。目的の生物由来物質をコードするヌクレオチド配列のコード領域と調節配列とのライゲーションを容易にする特異的な制限酵素部位を導入するために、調節配列にリンカーを取り付けることもある。

【0093】

調節配列は、適切なプロモーター配列、生物由来物質をコードするポリヌクレオチド配列を発現するために宿主細胞により認識されるヌクレオチド配列、であってもよい。プロモーター配列は、生物由来物質の発現を仲介する転写調節配列を含む。プロモーターは、変異、切り詰め、そしてハイブリッド型のプロモーターを含む、選択した宿主細胞において転写活性を示す任意のヌクレオチド配列であってもよく、そして宿主細胞に対して同種又は異種のいずれかである細胞外又は細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得られることもある。

【0094】

糸状菌宿主株において核酸構築物の転写を仕向ける適切なプロモーターの例は、アスペルギルス・オリゼーTAKAアミラーゼ、リゾムコール・ミーハイアスパラギン酸プロテイナーゼ、アスペルギルス・ニガー中性 α -アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー酸安定 α -アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー又はアスペルギルス・アワモリ・グルコアミラーゼ(glaA)、リゾムコール・ミーハイ・リパーゼ、アスペルギルス・オリゼー・アルカリプロテアーゼ、アスペルギルス・オリゼー・トリオースリン酸イソメラーゼ、アスペルギルス・ニジュラスアセトアミダーゼ、フサリウム・ベナツム・アミログルコシダーゼ(WO 00/56900)、フサリウム・ベネガツム・ダリア(WO 00/56900)、フサリウム・ベネナツム・キン(WO 00/56900)、フサリウム・オキシスポルム・トリプシン様プロテアーゼ(WO 96/00787)、トリコデルマ・リーセイ・ β -グルコシダーゼ、トリコデルマ・リーセイ・セ

10

20

30

40

50

ッロバイオヒドロラーゼ I、トリコデルマ・リーセイ・セロバイオヒドロラーゼ I I、トリコデルマ・リーセイ・エンドグルカナーゼ I、トリコデルマ・リーセイ・エンドグルカナーゼ I I、トリコデルマ・リーセイ・エンドグルカナーゼ I I I、トリコデルマ・リーセイ・エンドグルカナーゼ I V、トリコデルマ・リーセイ・エンドグルカナーゼ V、トリコデルマ・リーセイ・キシラナーゼ I、トリコデルマ・リーセイキシラナーゼ I I、トリコデルマ・リーセイ・ β -キシロシダーゼ、及び NA 2-t p i プロモーター(アスペルギルス・ニガー中性 α -アミラーゼとアスペルギルス・オリゼートリオースリン酸イソメラーゼの遺伝子から得られるプロモーターのハイブリッド)の遺伝子から得られるプロモーター；並びにそれらの突然変異、切り詰め型、及びハイブリッドプロモーターである。

【0095】

調節配列は、適切な転写ターミネーター配列、宿主細胞により認識されて転写を終結させる配列、であってもよい。ターミネーター配列は、生物由来物質をコードする核酸配列の 3'末端に作用可能な様に結合される。選択された糸状菌株において機能的である任意のターミネーターが、本発明において使用されてもよい。

【0096】

糸状菌株についての好ましいターミネーターは、アスペルギルス・オリゼー T A K A アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー・グルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニジュランス アンスラニレート・シンターゼ、アスペルギルス・ニガー・ α -グルコシダーゼ、及びフサリウム・オキシスポルム・トリプシン様プロテアーゼについての遺伝子から得られる。

【0097】

調節配列は、適切なリーダー配列、糸状菌株による翻訳に重要である m R N A の非翻訳領域、であってもよい。リーダー配列は、生物由来物質をコードする核酸配列の 5'末端に作用可能なように結合される。選択された糸状菌株において機能的である任意のリーダー配列が本発明において使用されてもよい。

【0098】

糸状菌株についての好ましいリーダーは、アスペルギルス・オリゼー T A K A アミラーゼ、アスペルギルス・ニジュランス・トリオース・ホスフェート・イソメラーゼ、フサリウム・ベネナツム・トリプシン、及びフサリウム・ベネナツム・グルコアミラーゼの遺伝子から得られる。

【0099】

調節配列は、ポリアデニル化配列、転写された場合に転写 m R N A にポリアデノシン残基を加えるシグナルとして宿主細胞により認識される核酸配列の 3'末端に作用可能なように結合される配列であってもよい。選択された糸状菌株において機能的である任意のポリアデニル化配列は、本発明において使用されてもよい。

【0100】

糸状菌株についての好ましいポリアデニル化配列は、アスペルギルス・オリゼー T A K A アミラーゼ、アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニジュランスのアンスラニレート・シンターゼ、フサリウム・オキシスポルム・トリプシン様プロテアーゼ、及びアスペルギルス・ニガー・ α -グルコシダーゼから得られる。

【0101】

調節配列は、ポリペプチドのアミノ末端に結合したアミノ酸配列をコードし、エンコードされたポリペプチドを細胞の分泌経路に仕向けるシグナルペプチドをコードする領域であってもよい。核酸配列のコード配列の 5'末端は、分泌ポリペプチドをコードするコード領域の断片と読み込み枠においてもともと結合されているシグナルペプチドをコードする領域をそもそも含む。或いは、コード配列の 5'末端は、コード配列に対して外来であるシグナルペプチドをコードする領域を含んでもよい。外来のシグナルペプチドをコードする領域は、コード配列がもともとシグナルペプチドコード領域を含まない場合に必要とされる場合がある。あるいは、外来シグナルペプチドコード領域は、ポリペプチドの分泌を高めるために、単に天然シグナルペプチドコード領域と置き換えられてもよい。しかしながら、発現されたポリペプチドを、選択された真菌宿主細胞の分泌経路に仕向ける任意

10

20

30

40

50

のシグナルペプチドコード領域が、本発明で使用されてもよい。

【0102】

糸状菌株に対する有効なシグナルペプチドコード領域は、アスペルギルス・オリゼーのTAKAアミラーゼ、アスペルギルス・ニガーの中性アミラーゼ、アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ、リゾムコール・ミーハイのアスパラギン酸プロテイナーゼ、フミコラ・インソーレンスのセルラーゼ、及びフミコラ・ラヌギノーサリパーゼから得られるシグナルペプチドコード領域である。

【0103】

調節配列は、ポリペプチドのアミノ末端に位置するアミノ酸配列をコードするプロペプチドコード領域であってもよい。得られたポリペプチドは、プロ酵素又はプロポリペプチド(又は幾つかの場合酵素前駆体)として知られている。プロポリペプチドは、一般的に不活性であり、そしてプロポリペプチドから、プロペプチドを触媒的に又は自己触媒的に切断することにより成熟活性ポリペプチドに変換することができる。プロペプチドコード領域は、サッカロマイシス・セルビシエの α 因子、リゾムコール・ミーハイのアスパラギン酸プロテイナーゼ、及びマイセリオソラ テルモフィラのラッカーゼ(WO 95/33836)の遺伝子から得ることができる。

【0104】

シグナルペプチド領域及びプロペプチド領域の両方が、ポリペプチドのアミノ末端に位置する場合、プロペプチド領域は、ポリペプチドのアミノ末端の次に位置しており、そしてシグナルペプチド領域は、プロペプチド領域のアミノ末端の次に位置する。

【0105】

糸状菌株の増殖に対して生物由来物質の発現の調節を可能にする調節配列を加えることが望ましいこともある。調節システムの例は、化学又は物理的刺激、例えば調節化合物の存在に応答して、遺伝子発現をオン又はオフにすることができるシステムである。糸状菌株ではTAKA α -アミラーゼプロモーター、アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼプロモーター、アスペルギルス・オリゼーのグルコアミラーゼプロモーター、及びフサリウム・ベネナツムのグルコアミラーゼプロモーターが調節配列として使用されてもよい。調節配列の他の例は、遺伝子の増幅を可能にする配列である。真核生物のシステムでは、メトトレキサートの存在下で増幅されるジヒドロフォレート・レダクターゼ遺伝子、及び重金属で増幅されるメタロチオネイン遺伝子を含む。これらの場合、目的の生物由来物質をコードするヌクレオチド配列は、調節配列に作用可能なように結合される。

【0106】

発現ベクター

目的の生物由来物質をコードするポリヌクレオチドは、プロモーター、生物由来物質をコードするヌクレオチド配列、及び転写終結シグナル及び翻訳終結シグナルを含む組み換え発現ベクターに含まれてもよい。本明細書に記載される様々な核酸及び調節配列は、組み合わされて、制限酵素部位にポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を挿入又は置換することを可能にする1以上(幾つかの)便利な制限酵素部位を含みうる組み換え発現ベクターをもたらす。或いは、ポリヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列又は当該配列を含む核酸構築物を、発現に適したベクターに挿入することにより、ポリヌクレオチド配列を発現できる。発現ベクターを作成する際に、コード配列をベクター中に位置させ、その結果コード配列は、発現に適した調節配列に作用可能なように結合する。

【0107】

組み換え発現ベクターは、組換えDNA法にうまくかけることができ、かつヌクレオチド配列の発現をもたらすことができる任意のベクター(例えば、プラスミド又はウイルス)であってもよい。ベクターの選択は、典型的に、当該ベクターを導入する宿主細胞と、ベクターとの適合性に左右されよう。ベクターは、直線状又は閉じた環状プラスミドであってもよい。

【0108】

ベクターは、自己複製ベクター、つまり、複製が染色体複製とは独立している染色体外

10

20

30

40

50

要素として存在するベクター、例えばプラスミド、染色体外要素、ミニクロモソーム、又は人工染色体であってもよい。ベクターは、自己増殖を確実にさせるようにするための任意の手段を含んでもよい。或いは、当該ベクターは、宿主細胞に導入される場合、ゲノムに組み込まれ、そしてベクターが組み込まれた染色体と一緒に複製されるベクターであってもよい。さらに、単一のベクター又はプラスミド、又は2以上のベクター又はプラスミドであって、一緒になって宿主細胞のゲノムに導入される全DNAを含むもの、或いはトランスポゾンが使用されてもよい。

【0109】

ベクターは、好ましくは、形質転換された細胞、トランスフェクションされた細胞、形質導入された細胞、又は同様の細胞の簡単な選別を許容する1以上の(幾つかの)選択可能マーカーを含む。選択可能マーカーは、遺伝子産物が殺生物剤又はウイルス抵抗性、重金属抵抗性、原栄養性から栄養要求性を与える遺伝子である。糸状菌宿主細胞において使用するための選択可能なマーカーとしては、amdS(アセトアミダーゼ)、argB(オルチニン・カルバモイルトランスフェラーゼ)、bar(ホスフィノスリシン・アセチルトランスフェラーゼ)、hph(ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ)、niaD(硝酸レダクターゼ)、pyrG(オロチジン-5'-ホスフェート・デカルボキシラーゼ)、sC(サルフェート・アデニルトランスフェラーゼ)、及びtrpC(アントラニトレート・シンターゼ)、並びにそれらの同等物が挙げられるが、それらに限られるものではない。アスペルギルス細胞に使用するのに好ましいものは、アスペルギルス・ニジュランス又はアスペルギルス・オリゼーのamdS及びpyrG遺伝子であり、そしてストレプトマイセス・ハイグロスコピクス(*Streptomyces hygroscopicus*)のbar遺伝子である。

【0110】

ベクターは、好ましくは、宿主細胞ゲノム中へのベクターの組み込みを許容するか、又はゲノムからは独立して細胞中でベクターの自己複製を可能にする要素を含む。

【0111】

宿主細胞ゲノムへの組み込みについて、ベクターは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列、又は相同組換え若しくは非相同組換えによりゲノム中への組み込みをするためのベクターの任意の他の要素によってもよい。或いは、ベクターは、染色体の正確な位置において宿主細胞のゲノム中に相同組換えによる組換えを仕向ける追加のヌクレオチド配列を含んでもよい。正確な位置への組み込む可能性を増加させるために、組み込み要素は、好ましくは、相同組換えの可能性を高めるために対応する標的配列に対して高い同一性を有する十分な数の核酸、例えば100~10000塩基対、好ましくは400~10000塩基対、そして最も好ましくは800~10000塩基対を含む。組み込み要素は、宿主細胞のゲノムにおいて標的配列と同一性である任意の配列であってもよい。さらに、組み込み要素は、非コード又はコードヌクレオチド配列であってもよい。他方、ベクターは、非相同組換えにより宿主細胞のゲノムに組み込まれてもよい。

【0112】

自立複製について、問題の宿主細胞においてベクターが自立的に複製することを可能にする複製起点をベクターがさらに含んでもよい。複製起点は、細胞内で機能する自己複製を媒介する任意のプラスミド・レプリケーターであってもよい。「複製起点」又は「プラスミドレプリケーター」という語句は、in vivoにおいてプラスミド又はベクターの複製を可能にするヌクレオチド配列として定義される。

【0113】

糸状菌細胞において有用な複製起点の例は、AMA1及びANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98: 61 - 67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Research 15: 9163-9175; WO 0024883)である。AMA1遺伝子の単離及び当該遺伝子を含むプラスミド又はベクターの構築は、WO 00/24883に開示される方法に従って達成することができる。

【0114】

2以上のコピーのポリヌクレオチドは、遺伝子産物の産生を増加するために、宿主細胞に挿入されてもよい。ポリヌクレオチドのコピー数の増加は、配列の少なくとも1の追加

コピーを、宿主細胞ゲノムに組み込むことにより、又は当該ポリヌクレオチドを有する増幅可能な選択可能マーカーを含めることにより、得ることができる。ここで選択可能マーカー遺伝子の増幅されたコピーを含み、それによりポリヌクレオチドの追加のコピー数を含む細胞は、細胞を適切な選択薬剤の存在下で細胞を培養することにより選択される。

【0115】

上記要素をコンストラクトにライゲーションするために使用される方法は、当業者に周知である(例えば、Sambrookら、1989、前掲)を参照のこと。)

【0116】

本発明は、以下の実施例によりさらに記載される。当該実施例は本発明の範囲を制限するものとして解釈すべきでない。

【実施例】

【0117】

amdS オーバーレイアガーは、1 Lあたり、20 mlのCOVE塩溶液、273.8 gのスクロース、8 gのNobleアガー、10 mMのアセトアミド、及び15 mM・CsCl、pH 5.0から構成された。

【0118】

AMG微量金属溶液は、1 Lあたり、14.3 gの $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2.5 gの $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、0.5 gの $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 、13.8 gの $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、8.5 gの $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、及び3.0 gのクエン酸から構成された。

【0119】

セルロース誘導培地は、1 Lあたり、20 gのAlbocel-天然セルロース繊維(J. RettenmaierUSA LP)、10 gのトウモロコシ浸漬固体(corn steep solid)、1.45 gの $(NH_4)_2SO_4$ 、2.08 gの KH_2PO_4 、0.28 gの $CaCl_2$ 、0.42 gの $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.42 mlのトリコデルマ・リーセイ(Trichoderma Ressei)の微量金属溶液、及び2滴のプルロン酸(pluronic acid)から構成された。pHは、オートクレーブ前に、10 NのNaOHで6.0に調節した。

【0120】

COVE選択プレートは、1リットルあたり、342.3 gのスクロース、20 mlのCOVE塩溶液、10 mMのアセトアミド、15 mMの $CsCl_2$ 、及び25 g又は30 gのNobleアガーから構成された。

【0121】

COVE2プレートは、1リットルあたり、26 gのKCl、26 gの $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、76 gの KH_2PO_4 、及び50 mlのCOVE微量金属溶液から構成された。

【0122】

COVE塩溶液は、1リットルあたり、26 gのKCl、26 gの $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、76 gの KH_2PO_4 、及び50 mlのCOVE微量金属溶液から構成された。

【0123】

COVE微量金属溶液は、1リットルあたり0.04 gの $NaB_4O_7 \cdot 10H_2O$ 、0.4 gの $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、1.2 gの $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.7 g又は1 gの $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、0.8 gの $Na_2MoO_2 \cdot 2H_2O$ 、及び10 gの $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ から構成された。

【0124】

COVE A塩溶液は、1リットルあたり26 gのKCl、26 gの $MgSO_4$ 、76 gの KH_2PO_4 、及び50 mlのCOVE A希元素溶液から構成された。

【0125】

COVE A希元素溶液は、1リットル当たり、0.04 gの $NaB_4O_7 \cdot 10H_2O$ 、0.4 gの $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、0.8 gの $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.8 gの $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、0.8 gの $Na_2MoO_2 \cdot 2H_2O$ 、10 gの $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、及び10 gのクエン酸から構成された。

【0126】

10

20

30

40

50

COVE A-尿素+アセトアミド選択プレートは、1リットル当たり、20 mlのCOVE A塩溶液、220 gのソルビトール、10 gのグルコース、10 mMアセトアミド、及び30 gのバクトラガー、pH 5.2から構成された。

【0127】

M410は、1リットル当たり、50 gのマルトース、50 gのグルコース、2 gのMgSO₄・7H₂O、2 gのKH₂PO₄、4 gのクエン酸、8 gの酵母抽出物、2 gの尿素、0.5 mlのAMG微量元素溶液、及び0.5 gのCaCl₂、pH 6.0から構成された。

【0128】

最小培地は、1リットルあたり、6 gのNaNO₃、0.52 gのKCl、1.52 gのKH₂PO₄、1 mlのCOVE希元素溶液、10 gのグルコース、0.5 gのグルコース、0.5 gのMgSO₄・7H₂O、及び0.004 gのD-ビオチンから構成された。

10

【0129】

最小培地アガーは、1リットルあたり、6 gのNaNO₃、0.52 gのKCl、1.52 gのKH₂PO₄、1 mlのCOVE希元素溶液、20 gのNobleアガー、10 gのグルコース、0.5 gのMgSO₄・7H₂O、及び0.004 gのD-ビオチンから構成された。

【0130】

PDAプレートは、1リットルあたり39 gのDIFCO（登録商標）ポテトデキストロースシュガー(Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, USA)から構成された。

20

【0131】

PEGは、60%PEG 4000 (Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA)、10 mM CaCl₂、及び10 mM Tris-HCl、pH 6.5から構成され、フィルター滅菌された。

【0132】

SPCは、40%PEG 4000、50 mMのCaCl₂、及び0.8 Mソルビトール、pH 4.5～5.5から構成され、フィルター滅菌された。

【0133】

20×SSCは、1リットルあたり、175.3 gのNaCl及び88.2 gのクエン酸ナトリウムpH 7.0から構成された。

30

【0134】

0.5×SSCは、1リットルあたり、4.38 gのNaCl及び2.2 gのクエン酸ナトリウムpH 7.0から構成された。

【0135】

STCは、1 Mのソルビトール、10 mMのCaCl₂、及び10 mMのTris-HCl、pH 6.5から構成され、フィルター滅菌された。

【0136】

トリコデルマ リーセイ(Trichoderma reesei)微量元素溶液は、1リットルあたり、216 gのFeCl₃・6H₂O、58 gのZnSO₄・7H₂O、27 gのMnSO₄・H₂O、10 gのCuSO₄・5H₂O、2.4 gのH₃BO₃、及び336 gのクエン酸から構成された。

40

【0137】

YPGは、1リットル当たり、10 gの酵母抽出物(Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)、20 gのBACTO（登録商標）ペプトン(Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, USA)、及び20 gのグルコースから構成された。

【0138】

上に記載される要素をライゲーションして、組換え発現ベクターを構築するために使用される方法は、当業者に周知である(例えば、上記Sambrook et al., 1989、を参照のこと)。

【0139】

50

本発明はさらに、以下の実施例により記載されており、これらは本発明の範囲を制限するものとして解釈すべきではない。

【0140】

実施例1：プラスミド pCW098 の構築

プラスミド pCW098 は、TAKA／Na²-tpi リーダーハイブリッド・プロモーター(米国特許第6,461,837号)、大腸菌(*Escherichia coli*)のハイグロマイシン抵抗性遺伝子の一部から作成された逆反復(hyg IR)、アスペルギルス ニガー(*Aspergillus niger*)アミログルコシダーゼ(AMG)ターミネーター(Hata et al., 1991, Agric. Biol. Chem. 55: 941-949, 及びアスペルギルス・ニジュランズ(*Aspergillus nidulans*) pyrG 遺伝子(Ballance and Turner, 1985, Gene 36: 321-331)を選択可能マーカーとして含むように構築された。

10

【0141】

大腸菌aph(4)(hyg B)遺伝子(Kasterら, 1983 上記)に由来する二本鎖RNA(dsRNA)を発現するために、逆反復の半分のうちの1つ、aph(4)遺伝子のオープンリーディングフレーム内の199塩基対、を、以下に記載するようにNot I制限酵素部位を有するセンス鎖プライマー及び5' Sma I 又はXma I 制限部位を有するアンチセンスプライマーを用いてPCR増幅した：

【化1】

プライマー cwhygnot.1 (センス)：

5'-gcgccgcGCGATGTTTCGGGGATTCCCAATACGAGGTC-3' (配列番号1)

プライマー cwhygsma.1a (アンチセンス)：

5'-ccccggGCATCATCGAAATTGCCGTCAACCAAGCTC-3' (配列番号2)

20

hyg Bのコード配列部分を大文字で示す。

【0142】

増幅反応液(50 µl)は、1×THERMOPO L(商標)反応緩衝液(New England Biolabs, Beverly, MA, USA)、0.4 mM dNTPs、100 ngのpSma i155(WO 05/074647)、50 pmolのセンスプライマー、50 pmolのアンチセンスプライマー、及び5ユニットのTaq DNAポリメラーゼ(New England Biolabs, Beverly, MA, USA)から構成された。反応液を、94℃で30秒、55℃で30秒、そして72℃で1分(最終伸張では7分)を各30サイクルとプログラムされたEPPENDORF (登録商標) MASTER CYCLER (登録商標) 5333 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)中でインキュベートした。

30

【0143】

214 bpのPCR産物を、TAE緩衝液(1リットルあたり4.84 gのTris塩基、1.14 mlの水酢酸、及び2 mlの0.5 M EDTA pH 8.0)中の1%アガロースゲル電気泳動により精製し、そしてさらにQiaQuick (登録商標) Gel抽出キット(QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)を用いてさらに精製した。214 bpのPCR産物を、TOPO (登録商標) TAクローニングキットを用いてpCR2.1-TOPO (登録商標)とライゲーションし、そして製品説明書にしたがってONE SHOT (登録商標) TOP10 化学処理コンピテント大腸菌セルに形質転換した。幾つかの形質転換体からえたプラスミドDNAを、BIOROBOT (登録商標) 9600 (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)を用いて精製し、そしてDNAシーケンスにより分析して、所望のhyg Bインサートを含むプラスミドを同定した。予期されるDNA配列を有する1のプラスミドをMP#3と名づけた。

40

【0144】

100塩基対のスペーサーを含む逆反復のうちの半分のうちのもう一方は、以下に示さ

50

れる 5' P a c 制限部位を有するセンス鎖プライマーと、5' S m a I 又は X m a I 制限酵素部位を有するアンチセンスプライマーを用いて増幅された；h y g B 配列を大文字で示す：

【化 2】

プライマー cwhygpac. 2 (センス)：

5'-ttaattaaGCGATGTTTCGGGGATTCCCAATACGAGGTC-3' (配列番号 3)

プライマー cwhygsma. 2a (アンチセンス)：

5'-cccgaggATCGGTCCAGACGGCCGCGCTTCTGCGGGC-3' (配列番号 4)

10

【0145】

増幅反応液(50 µl)は、1×THERMOPOL(商標)反応緩衝液、0.4 mMの d NTP、100 ngの p S M a i l 55、50 pmolのセンスプライマー、50 pmolのアンチセンスプライマー、及び5ユニットのTaq DNAポリメラーゼから構成された。反応液を、94℃で30秒、55℃で30秒、及び72℃で1分(最終伸張7分)で各々30サイクルにてプログラムされたEPPENDORF(登録商標)MASTER CYCLER(登録商標)中でインキュベートした。

【0146】

20

314 bpのPCR産物を、TAE緩衝液中の1%アガロースゲル電気泳動により精製し、そしてQIAQUICK(登録商標)ゲル抽出キットを用いてさらに精製した。314 bpのPCR産物を、製品説明書に従いTOPO(登録商標)TAクローニングキットを用いてpCR2.1-TOPO(登録商標)とライゲーションし、そしてONE SHOT(登録商標)TOP10化学処理コンピテント大腸菌セルに形質転換した。幾つかの形質転換体由来するプラスミドDNAを、BIOROBOT(登録商標)9600を用いて精製し、そしてDNAシーケンスにより分析して、所望のh y g Bインサートを含む形質転換体を同定した。予測されたDNA配列を有する1のプラスミドは、MP#9と名づけられた。

【0147】

30

MP#3をNot I及びXma Iで切断した。MP#9をPac I及びXma Iで切断した。両方のh y g B DNA断片を、TAE緩衝液中の1%アガロースゲル電気泳動により精製し、そしてQIAQUICK(登録商標)ゲル抽出キットを用いて抽出した。断片を、Not I/Pac Iで切断済みのベクターpAIl o 2(WO05/056772、実施例21)にライゲーションしてp c W 0 9 8(図2)を作成した。

【0148】

実施例2：プラスミドpCW099の構築

プラスミドpCW099を、TAKA/NA2-tpiリーダーハイブリッドプロモーター、アスペルギルス・オリゼーのwA遺伝子の断片(全長ゲノムDNA配列について配列番号5、及び推定のアミノ酸配列について配列番号6)、大腸菌h y g B逆反復(h y g I R)、アスペルギルス・ニガーのアミログルコシダーゼ(AMG)ターミネーター、及びアスペルギルス・ニジュランスのp y r G遺伝子を選択可能マーカーとして含むように構築した。

40

【0149】

アスペルギルス・オリゼーのwA遺伝子(DNA配列について配列番号7、及び推定のアミノ酸配列について配列番号8)の176 bp断片は、プラスミド+アスペルギルスオリゼー株P2-5.1(WO05/056772、実施例27及び28)からレスキューされたwAフランキング配列から、以下に示すプライマーcwwanco.lcorr(センス)及びcwwanot.la(アンチセンス)を用いてPCR増幅された。センスプライマーは、5'-末端でNco I部位を有し、そしてアンチセンスプライマーは、5'-末端にNot I部位を有するように作成さ

50

れた。

【化 3】

プライマー cwwanco.1corr (センス) :

5'-ccatggAGCACTTCGATTGCATTAG-3' (配列番号 9)

プライマー cwwanot.1a (アンチセンス) :

5'-gcggccgcAGAACGAACGCAGGTTTTATAC-3' (配列番号10)

wA 配列を大文字で示す。

【0150】

増幅反応液(50 μl)は、1×THERMOPOL(商標)反応緩衝液、0.4 mMの dNTP、100 ngのアスペルギルス・オリゼー P2-5.1 DNA(WO05/056772)、50 pmolのプライマーcwwanco.1forr、50 pmolのプライマーcwwanot.1a、及び5ユニットのTaq DNAポリメラーゼから構成された。反応液を、94℃で30秒、55℃30秒、72℃で1分(7分の最終伸張)で各30サイクルにてプログラムされたEPPEENDORF(登録商標)MASTERCYCLER(登録商標)5333中でインキュベートした。

【0151】

188 bpのPCR産物を、TAE緩衝液中の1%アガロースゲル電気泳動により精製し、そしてQIAQUICK(登録商標)ゲル抽出キットを用いてさらに精製した。188 bpのPCR産物を、TOPO(登録商標)タクローニングキットを用いてPCR2.1-TOPO(登録商標)とライゲーションし、そして製品説明書にしたがってONESHOT(登録商標)TOP10化学処理コンピテント大腸菌セル中に形質転換した。幾つかの形質転換体から得たプラスミドDNAを、BIOROBOT(登録商標)9600を用いて精製し、そしてDNA配列により分析して、所望のwAインサートを含むことを同定した。予期されたDNA配列を有する1のプラスミドは、MP#10と名づけられた。

【0152】

MP#10 DNAを、NcoIとNotIで切断し、そしてTAE緩衝液中で1%アガロースゲル電気泳動により精製した。wA断片を、QIAQUICK(登録商標)ゲル抽出キットを用いて抽出した。精製された断片は、NcoI/NotIにより切断されたpCW098にライゲーションして、pCW099を作成した(図3)。

【0153】

実施例3：プラスミドpEFer14の構築

TAKA/NA2-tpiリーダーハイブリッドプロモーター、アスペルギルス・オリゼーのwA遺伝子の176 bp断片、大腸菌hygB逆反復(hygIR)、アスペルギルス・ニガーのアミログルコシダーゼ(AMG)ターミネーター、及びアスペルギルス・ニジュランスの全長amdS遺伝子を選択マーカーとして含むようにプラスミドpEFer14を構築した。

【0154】

NcoI及びPacIで切断されたプラスミドpCW099を、TAE緩衝液中の1%アガロースゲル電気泳動により精製した。176 bpのwA断片とhygB逆反復を含む698 bp断片を、製品説明書に従ってULTRAFREE(登録商標)DACラムを用いて抽出した(Millipore, Billerica, MA, USA)。精製された断片を、NcoI/PacIで切断されたpAILo1(WO 05/056772、実施例1)にライゲーションして、pEFer14を作成した(図4)。

【0155】

実施例4：プラスミドpDM261の構築

プラスミドpDM261を、TAKA/NA2-tpiリーダーハイブリッドプロモー

10

20

30

40

50

ター、大腸菌 *hygB* 逆反復 (*hygIR*)、アスペルギルス・ニガー・アミログルコシダーゼ (*AMG*) ターミネーター、及び全長アスペルギルス・ニジュランス *amdS* 遺伝子を選択マーカーとして含むように構築した。

【0156】

NcoI 及び *PacI* で切断したプラスミド *pCW098* を、*TAE* 緩衝液中で 1% アガロースゲル電気泳動により精製した。*hygB* 逆反復を含む 527bp 断片を、*ULTRAFREE* (登録商標) *DA*-カラムを用いて抽出した。精製された断片を、*NcoI* / *PacI* で切断された *pAILo1* にライゲーションして、*pDM261* を作成した (図 5)。

【0157】

10

実施例 5：プラスミド *pDM266* の構築

プラスミド *pDM266* を、*TAKA/NA2-tpi* リーダーハイブリッドプロモーター、アスペルギルス・オリゼー *wA* 遺伝子の 499bp 断片、大腸菌 *hygB* 逆反復 (*hygIR*)、アスペルギルス・ニガーアミログルコシダーゼ (*AMG*) ターミネーター、及びアスペルギルス・ニジュランス全長 *amdS* 遺伝子を選択マーカーとして含むように構築した。

【0158】

wA 遺伝子の 499bp 断片を、以下に示すプライマー *wA500FWD* (センス) と *wA500REV* (アンチセンス) を用いて、アスペルギルス・オリゼー *A1560* 株 (*IFO4177*) のゲノム DNA から増幅した。センスプライマーは、5' 末端に *NcoI* 部位を有するように作成され、そしてアンチセンスプライマーは、5' 末端に *NotI* 部位を有するように作成された。製品説明書に従って、*DNEASY* (登録商標) *Plant Maxi* キット (*QIAGEN Inc.*, *valencia, CA, USA*) を用いてアスペルギルス・オリゼー *A1560* 株 (*IFO4177*) を調製した。

20

【化 4】

プライマー *wA500FWD* (センス) :

5'-ccatggGCGCTCAAAAACAACATCAAC-3' (配列番号11)

プライマー *wAREV* (アンチセンス) :

5'-gcgggccgcAGAACGAACGCAGGTTTAT-3' (配列番号12)

30

wA 配列を大文字で示す。

【0159】

増幅反応液 (50 μ l) は、1 $\times$ *THERMOPOL* (商標) 反応緩衝液、0.2 mM *dNTPs*、100 ng のアスペルギルス・オリゼー・*A1560* 株のゲノム DNA、50 pmol のプライマー (*wA500FWD*)、50 pmol のプライマー (*wA500REV*)、及 2.5 ユニットの *Taq DNA* ポリメラーゼから構成された。反応液を、94 $^{\circ}$ C で 30 秒、55 $^{\circ}$ C で 30 秒、そして 72 $^{\circ}$ C で 30 秒 (最終伸張では 10 分) を各 30 サイクルとプログラムされた *EPPENDORF* (登録商標) *MASTERCYCLES* (登録商標) 5333 (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*) 中でインキュベートした。

40

【0160】

513bp の PCR 産物を、*TAE* 緩衝液中の 1% アガロースゲル電気泳動により精製し、そしてさらに *ULTRAFREE* (登録商標) *DA* カラムを用いて精製した。*wA* 断片を *TOPO* (登録商標) *TA* クローニングキットを用いて *PCR2.1-TOPO* (登録商標) とライゲーションし、そして製品説明書にしたがって *ONE SHOT* (登録商標) *TOP10* 化学処理コンピテント大腸菌セルに形質転換した。幾つかの形質転換体から得たプラスミド DNA を、*BIOROBOT* (登録商標) 9600 (*QIAGEN Inc.*, *Valencia, CA, USA*) を用いて精製し、そして DNA シーケンスにより分析して、所望の *wA* イン

50

サートを含むプラスミドを同定した。予期されるDNA配列を有する1のプラスミドをMP#8と名づけた。

【0161】

MP#8 DNAを、NcoI及びNotIで切断し、そしてTAE緩衝液中で1%アガロースゲル電気泳動により精製した。wA断片を、ULTRAFREE (登録商標) D Aカラムを用いて抽出した。精製された断片を、NcoI/NotIで切断されたpDM261にライゲーションして、pDM266を作成した(図6)。

【0162】

pDM266中の499bpのwA断片(wA遺伝子の2607-3106の塩基対)は、pCW099及びpEfer14中の176bpのwA断片と同一の3'末端を有する。

10

【0163】

実施例6：アスペルギルス・オリゼーの形質転換及び形質転換体の分析

アスペルギルス・オリゼーJAL250株(WO98/11203)を、20mMのウリジンを添加したPDAプレート上で7日間、34℃で増殖させた。5mlの0.01%TWEEN (登録商標) 80(Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)を加え、滅菌された植菌用ループを用いてプレートの表面を掻き取り、そして5mlピペットを用いて孢子懸濁液を回収することにより孢子を回収した。約 $2 \sim 5 \times 10^7$ 孢子を、500mlの攪拌フラスコに入れた100mlのYPG培地に加え、そして16~18時間30~34℃及び140rpmでインキュベートした。滅菌0.2 μ m500mlEXPRESS (登録商標) フィルターユニットを用いて菌糸体を回収した。増殖培地から菌糸体をろ過して取り除き、そして100mlの0.7M KClで2回洗浄した。菌糸体を、20mlのプロトプラスト溶液[5mg/ml GLUCANEX (商標)(Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark) + 0.5mg/ml キチナーゼ(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)を入れた0.7MのKCl]に再懸濁した。菌糸体を、125mlの攪拌フラスコに移し、そして34℃、80rpmで30~90分間インキュベートした。プロトプラストをMIRACLOTH (登録商標) で覆われた滅菌漏斗(Calbiochem, San Diego, CA, USA)を通して滅菌50mlのポリプロピレンチューブに注いだ。プロトプラストを、Sorvall RT6000D遠心機中にて室温、1303 $\times$ gで20分間遠心した。上清を捨て、そしてプロトプラストを20mlのSTC中に再懸濁した。プロトプラストを上記のように遠心し、そして20mlのSTC中で再懸濁した。20 μ lの量を取り、そしてSTCで希釈した。プロトプラストは、ヘモサイトメーターを用いて計数した。プロトプラストを、上に記載されるように遠心し、そして適切な体積のSTC中に再懸濁して、 2×10^7 プロトプラスト/mlを得た。

20

30

【0164】

5 μ gのpEfer14、pDM261、又はpDM266 DNAを、100 μ lのアスペルギルス・オリゼーJAL250プロトプラストに加えた。室温で30分間インキュベートした後に、プロトプラスト/DNA混合物は、STCで9mlに調整され、3つのアリコートに分割し、そして20mMウリジン及び1%のマルトースを添加した3個の150mmCOVEプレートに撒いた。次にプレートを34℃でインキュベートした。アセドアミド上での増殖は、各発現プラスミドに存在するamdS遺伝子の発現を必要とする。

40

【0165】

4日のインキュベートの後に、成熟孢子の色が明らかになる前に、プラスミドpEfer14、pDM261、及びpDM266を用いて得られる25又は30の初期形質転換体を、20mMウリジン及び1%マルトースを添加したCOVE2プレート上にストリークした。pDM261の形質転換体から得られた全てのコロニーが、均一な暗緑色であった。対照的に、pEfer14又はpDM266の形質転換体から得たコロニーは、淡黄色~暗緑色の範囲で孢子の色が多様であった。形質転換体は、20mMウリジン及び1%マルトースを添加したCOVE2プレートに孢子をストリークし、そして次に単離されたコロニーを拾い上げて、同じ培地のプレートに入れることにより精製した。全てのプレー

50

トを、34℃でインキュベートした。

【0166】

結果を表1に示す。30の孢子精製されたpDM266(499bp wA)形質転換体の40%は、野生型より明るい孢子色を示した。30孢子の精製pEFer14(176bp wA)形質転換体の30%は、野生型よりも明るい孢子色を示した。25の孢子精製されたpDM261(wAなし)形質転換体のうちの100%が、野生型孢子色を示した。

【0167】

【表1】

表1

プラスミド	転写可能領域	明るい色の割合 (%)	野生型の割合 (%)	スクリーニング数
pEFer14	176 bp wA, hyg IR	30	70	30
pDM266	499 bp wA, hyg IR	40	60	30
pDM261	hyg IR	0	100	25

【0168】

pDM266及びpEFer14形質転換体の明るい孢子色を示す結果は、二次的RNAiによるwA遺伝子の抑制と一致する表現形を示した。

【0169】

実施例7：wA遺伝子がサイレンシングされたアスペルギルス・オリゼーの形質転換体のサザンブロット分析

サザンブロット分析を行い、実施例6から得られた6の形質転換体(以下の表2に挙げられる)における様々な孢子の色が、遺伝子破損の結果ではないことを立証した。ミュータントアスペルギルス・オリゼーP2-5.1(WO 2005/056772)は、wA遺伝子の破損を含んだ。

【0170】

【表2】

表2

株名	孢子の色
Jal250 (未形質転換)	野生型
DLM1610-45-pDM261#2	野生型
P2-5.1	白色
DLM1641-74-pEFer14#3	明るい色
DLM1641-74-pDM266#17	白色
DLM1641-74-pDM266#24	明るい色
DLM1641-74-pDM266#29	白色

【0171】

上記アスペルギルス・オリゼーの各々に由来するゲノムDNAは、製品説明書に従って、DNEASY(登録商標)Plant Maxi Kitを用いて調製した。2µgの各ゲノムDNAを、SapI及びClaIで一晩37℃にて切断した。切断されたゲノムDNAを、TAE緩衝液中の0.7%アガロースゲル電気泳動により17時間分画し、そして、製造者の推奨に従いTURBOBLOTTER(商標)(Schleicher & Schell, BioScience, Keene, NH, USA)を14～16時間用いてNYTRAN(商標)SuperCharged膜(Schleicher & Schuell BioScience, Keene, NH, USA)上にブロットした。

【0172】

最初に、膜を463bpのジオキシゲニン標識されたアスペルギルス・オリゼーwAプ

10

20

30

40

50

プローブとハイブリダイゼーションし、当該プローブは、以下のwA5primeFWD(センス)及びプライマーwA5primeREV(アンチセンス)を用いたPCRによりジオキシゲニン-11-dUTPを取り込むことにより合成された：

【化5】

プライマー wA5primeFWD (センス)：

5'-TACTACGGAGACCTTGGAAA-3' (配列番号13)

プライマー wA5primeREV (アンチセンス)：

5'-GCTCTTAGACAGCCTAGAAT-3' (配列番号14)

10

【0173】

増幅反応液(50 µl)は、1×THERMOPOL(商標)反応緩衝液、5 µlのPCR DIG 標識混合液(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)、10 ngのアスペルギルス・オリゼーJ a L 2 5 0ゲノムDNA(DNEASY (登録商標) Plant Maxi Kitを用いて調製)、10 pmolのプライマーsA5primeFWD、10 pmolのプライマーwA5primeREV、及び2.5ユニットのTaq DNAポリメラーゼから構成された。当該反応液を、95℃で30秒、52℃で30秒、そして72℃で1分(最終伸張では7分)を各30サイクルとプログラムされたEPPENDORF (登録商標) MASTERCYCLER (登録商標) 中でインキュベートした。PCR反応液を、TAE緩衝液中の0.8%アガロースゲル電気泳動により精製し、ここでジオキシゲニンの取り込みは、分子量の増加により示された。463bpの生成物のバンドをゲルから切り出し、そして製品説明書に従いMINELUTE (登録商標) Gel 抽出キット(QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)を用いて精製した。

20

【0174】

ハイブリダイゼーションを、DIG Easy Hyb緩衝液(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)中で42℃で15～17時間行った。次に膜を室温で5分間、2×SSC+0.1%SDS中において高度にストリンジェンシー条件下で2回洗浄し、続いて65℃で各15分間、0.5×SSC+0.1%SDS中で2回洗浄した。製品説明書に従って、プローブ標的のハイブリッドを化学発光アッセイ(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)により検出した。

30

【0175】

形質転換体について行われたサザンブロット分析により、全ての形質転換体において、ハイブリダイゼーションバンドが、P2-5.1における有意に小さいハイブリダイズされたバンドと比較して、全長wA遺伝子を含むアスペルギルス・オリゼー宿主株J a L 2 5 0のサイズと同じサイズであったことが明らかにされた。この結果により、非野生型の胞子の色が、遺伝子破損の結果ではないということが示された。

【0176】

実施例8：アスペルギルス・オリゼー形質転換体からのRNAの抽出

40

様々な胞子の色を示す6のアスペルギルス・オリゼー形質転換体(実施例6)を、20 mMのウリジン及び1%のマルトースを添加したCOVE2プレート上に撒き、そして34℃で7日間培養した。形質転換されていないアスペルギルス・オリゼーJ a L 2 5 0の胞子は、20 mMウリジンを添加されたPDAプレート上に撒き、そして34℃で7日間培養した。

【0177】

5 mlの0.01%TWEEN (登録商標) 80の添加に続き、各株の胞子は、滅菌ディスプレイスブルスプレッダーを用いてプレートの表面を掻きとることにより回収した(Bioscience, Rochester, NY, USA)。各胞子の懸濁液を、滅菌5 mlの血清用ピペットに取り、500 mlの攪拌フラスコ中の10 mMのウリジンと1%のマルトースの添加済み75

50

1 ml の最小培地 (pH 6.5) に加え、そして 22 ~ 24 時間 34 °C で 65 rpm で培養した。47 mm の硝酸セルロースファイバー (Whatman Inc., Florham Park, NJ, USA) を、滅菌 0.2 µm 250 ml・MF75 フィルターユニット (Nalgene, Rochester, NY, USA) 中のフィルター膜の上部に配置した。25 ~ 75 ml の各培養ブ罗斯の全てを、別の硝酸セルロースに配置し、そして吸引ろ過にかけて、フィルター上に菌糸体の薄層をもたらした。硝酸セルロースフィルター + 菌糸体を、10 mM ウリジン及び 1 % マルトースを添加した最小培地アガー (pH 6.5) 60 mm のペトリ皿に移した。アガープレートと、プラスチックバッグに配置し、密封し、そして 37 °C でインキュベートした。

【0178】

10
アスペルギルス・オリゼー J a L 250 対照において着色した分生子が出現し始めた際 (42 ~ 48 時間)、120 mg の菌糸体を、スパチュラを用いて各フィルターから掻き取り、そして各々を 1 ml の RNA PRO (登録商標) 溶液 (Q-Biogene, Irvine, CA, USA) を含む溶解マトリクス C チューブ (Q-biogene, Irvine, CA, USA) に各々移した。溶解マトリクス C チューブを、ねじ式キャップを締めて、ホモジェナイズの間に漏れることを予防した。サンプルチューブを 40 秒間、FASTPREP (商標) FP120 装置 (Q-Biogene, Irvine, CA, USA) においてスピード 6 で 40 秒間処理し、そして 2 分間氷上においた。サンプルチューブをスピード 6 で 40 秒間さらに処理し、そして氷上に 2 分間配置した。サンプルを 13,400 × g で EPPENDORF (登録商標) 5415 D 微小遠心管中で 4 °C で 5 分間遠心した。得られた上清を、1.7 ml の微小遠心管に移し、そして室温で 5 分間インキュベートした。300 µl のクロロホルムをサンプルチューブに加え、そして 10 秒間ボルテックスにかけた。室温で 5 分間インキュベートした後に、サンプルを、4 °C で 5 分間 EPPENDORF (登録商標) 5415 D 微小遠心機において 13,400 × g で遠心した。上相を 1.7 ml の微小遠心管に移した。500 µl の氷冷エタノールをサンプルチューブに加え、そして -20 °C で 30 分間インキュベートした。サンプルを 4 °C で 20 分間 EPPENDORF (登録商標) 5415 D 微小遠心機において 13,400 × g で遠心した。得られた上清を取り除き、そしてペレットを 75 % エタノールで洗浄した。エタノールを取り除き、そしてペレットを 5 分間室温で風乾した。ペレットを 100 µl のジエチルピロカルボネート (DEPC) 処理水中に懸濁し、続いて 50 µl の 8 M 塩化リチウム (VWR West Chester, PA, USA) を加えた。サンプルを -20 °C で 1 時間インキュベートした。インキュベートした後に、サンプルを、4 °C で 25 分間、EPPENDORF (登録商標) 5415 D 微小遠心機で 13,400 × g で遠心した。上清をサンプルチューブから取り除き、そして RNA ペレットを 70 % エタノールで洗浄した。エタノールを取り除き、そして RNA ペレットを 25 ~ 40 µl の DNase、RNase フリー水 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 中に再懸濁した。NANODROP (登録商標) 1000 分光光度計 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) を用いて RNA 濃度を定量した。

【0179】

実施例 9 : アスペルギルス・オリゼー RNA の DNase 処理

40
TURBO DNA-free (商標) キット (Ambion, Austin, TX, USA) を用いて、コンタミしているゲノム DNA を、アスペルギルスオリゼー RNA サンプル (実施例 8) から取り除いた。3 µg の抽出 RNA を、1 × TURBO DNase (商標) 緩衝液 (Ambion, Austin, TX, USA) と混合し、そして DNase、RNase フリー水を用いて 10 µl の体積に調節した。1 ユニットの TURBO DNase (商標) (Ambion, Austin, TX, USA) をサンプルに加え、そして 37 °C で 30 分間インキュベートした。別の 1 ユニットの TURBO DNase (商標) を加え、そしてサンプルを 37 °C で 1 時間インキュベートした。2 µl の DNase 不活性化試薬 (Ambion, Austin, TX, USA) を加えた。サンプルチューブの内容物を、室温で 2 分間のインキュベート時間の間に 3 回混合して、DNase 不活性化試薬を再分散させた。EPPENDORF (登録商標) 5415 D 微小遠心機中で 9300 × g で 2 分間遠心することによりペレット化した。各上清 9 µl を 0.65 ml 微小遠心管に移した。1 µl の DNase 処理した RNA を、NANODROP (登録商

10

20

30

40

50

標) 1000分光光度計を用いて計測して、RNA濃度を測定した。

【0180】

実施例10：アスペルギルス・オリゼーのトータルRNAサンプルからの第一鎖cDNAの合成

第一鎖cDNAを、Transcriptor First Strand cDNA合成キット(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)を用いて、抽出アスペルギルス・オリゼーRNAの各サンプル(実施例9)から合成した。1 μ gのDNase処理RNAを、1.2 nmolのランダムヘキサマープライマー(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)と混合し、そしてDEPC処理水で13 μ lの体積に調節した。サンプルを、65℃で10分間インキュベートし、そして氷上に配置した。13 μ lのサンプルを、1 $\times$ Transcriptor RT反応緩衝液(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)、20ユニットのプロテクターRNase阻害剤(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)、10 mMのデオキシヌクレオチド・ミックス、及び10ユニットのTranscriptor 逆転写酵素(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)と、最終体積は20 μ lに混合した。反応混合液を25℃で10分間、50℃で60分間、及び85℃で5分間インキュベートした。合成後、サンプルチューブを氷上に置いた。

10

【0181】

ゲノムDNAのコンタミの除去を確認し、そしてcDNAの完全性を調べるため、サンプルを、以下に示すイントロンに跨るwA及びアクチンのプライマーセットで増幅した。

20

【化6】

プライマー 2wAFWD (センス) :

5'-ATGCCTCGCAGCTTATAGGA-3' (配列番号15)

プライマー 2wAREV (アンチセンス) :

5'-CGCACTGATATACGGTTTGG-3' (配列番号16)

プライマー 2アクチンFWD (センス) :

5'-GGATCTCTACGGTAACATCGTCA-3' (配列番号17)

プライマー 2アクチンREV (アンチセンス) :

5'-GATCGGAGATGCCAGGGTA-3' (配列番号18)

30

【0182】

増幅反応液(50 μ l)は、1 $\times$ THERMOPOL(商標)反応緩衝液、0.4 mM dNTPs、2 μ lのテンプレートcDNAサンプル、50 pmolのプライマー2wAFWD、50 pmolのプライマー2wAREV、及び2.5ユニットのTaq DNAポリメラーゼから構成された。対照増幅反応液(50 μ l)は、1 $\times$ THERMOPOL(商標)反応緩衝液、0.4 mM dNTPs、10 ngのアスペルギルス オリゼー J a L 2 5 0 ゲノムDNA(DNEASY(登録商標) Plant Maxiキットを用いて調製)、50 pmolのプライマー2wAFWD、50 pmolのプライマー2wAREV、及び2.5ユニットのTaq DNAポリメラーゼから構成された。反応液を、95℃で30秒、50℃で30秒、そして72℃で1分(最終伸張では7分)を各30サイクルとプログラムされたEPENDORF(登録商標) MASTERCYCLER(登録商標)中でインキュベートした。PCR反応液を、TAE緩衝液中の0.8%アガロースゲル電気泳動により精製した。この結果は、cDNAテンプレートを用いたPCR反応が、ゲノムDNAをテンプレートとして用いて対照PCR反応よりも少ないアンプリコンをもたらしたことを示した。ゲノムDNAから作成されたPCRアンプリコンが、cDNAから作成された対応するアンプリコンより大きいであろう。その結果、cDNA調製は、検出可能な量のゲ

40

50

ノムDNAを含まない。

【0183】

実施例11：リアルタイムPCR(RT-PCR)による定常状態wAのmRNAアスペルギルスオリゼーの検出

形質転換体におけるアスペルギルス・オリゼーwA発現レベルの測定は、RT-PCRを用いて行った。実施例10に記載される様に各形質転換体から合成される相補的DNA(cDNA)をRT-PCR反応のテンプレートとして用いた。wA遺伝子は標的DNA配列として機能する一方、アスペルギルス・オリゼーのアクチン遺伝子(DNA配列について配列番号19、及び推定のアミノ酸配列について配列番号20)は、内部コントロール並びにレファレンスDNA配列として機能する。Universal Probe Library Assay Design Software Guide (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)に従って、プライマー及びその対応する単色の加水分解プローブが選択され、そして設計される。プローブは、最初に、エキソン-エキソンスプライス結合点の付近の所望の転写DNA配列に基づき選択される。次にプライマーセットは、同一のエキソン-エキソンスプライス結合点又はイントロンにまたがる標的を増幅するように設計された。以下のプローブ：

【化7】

ユニバーサル プローブ ライブラリー プローブ#131 (アクチン-レファレンス)

5'-CTGGTGGT-3'

ユニバーサル プローブ ライブラリー プローブ#134 (wA-標的)

5'-CCTCCTTC-3'

を選択した。以下のプライマー：

【化8】

プライマー 2wAFWD (センス)：

5'-ATGCCTCGCAGCTTATAGGA-3' (配列番号21)

プライマー 2wAREV (アンチセンス)：

5'-CGCACTGATATACGGTTTGG-3' (配列番号22)

プライマー 2アクチンFWD (センス)：

5'-GGATCTCTACGGTAACATCGTCA-3' (配列番号23)

プライマー 2アクチンREV (アンチセンス)：

5'-GATCGGAGATGCCAGGGTA-3' (配列番号24)

を用いた。

【0184】

相対定量的リアルタイムPCRアッセイを、LIGHTCYCLER (登録商標) 480 システム (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)を用いて行った。各RT-PCR反応(20 µl)は、1×LIGHTCYCLER (登録商標) 480 プローブマスターミックス (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)、200 nMセンスプライマー、200 nMアンチセンスプライマー、100 nMプローブ、及びさまざまな希釈度(つまり、未希釈、1：10、1：100、1：1000)のcDNAテンプレートから構成された。RT-PCR反応を、95℃で10秒の変性、及び60℃で30秒の増幅生成物の定量及び伸張について各45サイクルとプログラムされたLIGHTCYCLER (登録商標) 480 システムで行った。各サンプルを、384 ウェルプレート (Roche App

lied Science, Indianapolis, IN, USA)を用いて三回調製した。テンプレート cDNA を、PCR 品質の水で置き換えたネガティブコントロールを、推定の擬陽性結果を試験するために試験した。

【0185】

LIGHTCYCLER (登録商標) 480 システムから得たデータを、LIGHTCYCLER (登録商標) 480 相対定量ソフトウェア(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)を用いて分析した。相対定量法において、各サンプルは、最初のサンプル濃度の相違、ロードするサンプルのバリエーション、ピペット操作の誤差、又は cDNA 合成効率における不一致により引き起こされる品質及び量の差異を、非調節レファレンス遺伝子に対する標的遺伝子濃度を計算することにより是正した。標的遺伝子/レファレンス遺伝子の比は、測定されるだけでなく、標的及びレファレンス遺伝子の PCR 効率における任意の差異については是正するための較正機により正規化される。相対的定量分析の結果は、サンプルにおける標的 DNA 配列対レファレンス DNA 配列の比が、標準サンプルにおける同一の 2 つの配列の比、又は較正機により割られた正規化済の比として表された。

【0186】

標準曲線は、標的及びレファレンスの両方について、形質転換されていないアスペルギルス・オリゼー J a L 2 5 0 を標準サンプルとして用いることにより作成した。標準曲線は、それぞれ、標的及びレファレンスに対して 0.996 及び 0.995 の R^2 値をもたらした。Roche LIGHTCYCLER (登録商標) 480 相対定量ソフトウェアにより計算された PCR 効率値は、標的およびレファレンスに対して、それぞれ 1.757 (誤差 0.0449) 及び 1.907 (誤差 0.0287) であった。実施例 7 に列挙された株の全てにわたる mRNA の相対発現レベルを比較するために、リアルタイム PCR 反応は、上に記載されるように行った。データーを回収し、そして LIGHTCYCLER (登録商標) 480 相対定量ソフトウェアを用いて分析し、そして Roche LIGHTCYCLER (登録商標) 480 相対定量ソフトウェアマニュアル(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)に従って以前に作成された標準曲線と比較された。相対定量分析を用い、アスペルギルス・オリゼー D L M 1 6 1 0 - 4 5 - p D M 2 6 1 # 2 (野生型胞子色を有する形質転換体)における wA の mRNA の発現レベルは、形質転換されていないアスペルギルス・オリゼー J a L 2 5 0 株に匹敵した。アスペルギルス・オリゼー D L M 1 6 4 1 - 7 4 - p E F e r 1 4 # 3 及びアスペルギルス・オリゼー D L M 1 6 4 1 - 7 4 - p D M 2 6 6 # 2 4 (明るい色の胞子を有する形質転換体)における wA の mRNA の相対発現レベルは、野生型の胞子色を有する株における wA m r N A 発現レベルに比べて、それぞれ 67% 及び 62% の低下を示した。アスペルギルス・オリゼー D L M 1 6 4 1 - 7 4 - p D M 2 6 6 # 1 7 及びアスペルギルス・オリゼー D L M 1 6 4 1 - 7 4 - p D M 2 6 6 # 2 9 (白色の胞子を有する株)は、野生型の胞子の色を有する株に比べて、wA mRNA の 73% 及び 81% の低下を示した。

【0187】

実施例 12: プラスミド pAmFs031 の構築

二次的 RNA i 発現ベクターを、アスペルギルス・ニガー A T C C 1 0 1 5 ポリケチドシンターゼ遺伝子(cDNA 配列について配列番号 25 及び推定のアミノ酸配列について配列番号 26)の発現を抑制するために構築した。

TAKA/NA2-tpi リーダーハイブリッドプロモーター、アスペルギルス・ニガーのポリケチドシンターゼ遺伝子のオープンリーディングフレームの断片、大腸菌 hyg B 逆反復(hyg IR)、アスペルギルス・ニガー・アミログルコシダーゼ・ターミネーター、及び全長アスペルギルス・ニジュランス amd S 遺伝子(Kelly and Hynes, 1985, EMBO J. 4: 475-479)を選択可能なマーカーとして含むようにプラスミド pAmFs031 を構築した。アスペルギルス・ニガー・ポリケチドシンターゼ遺伝子が、糸状菌における分生子色素の産生に正に関与する他のポリケチドシンターゼに配列同一性を有するので、サイレンシングの標的として選択された。

【0188】

アスペルギルス・ニガーのポリケチドシンターゼのオープンリーディングフレーム(DNA配列について配列番号27、及び推定上のアミノ酸配列について配列番号28)内の502の塩基対断片を、5'NcoI制限部位を有するセンス鎖プライマー及び以下に示す5'NotI制限部位を有するアンチセンスプライマーを用いて、アスペルギルス・ニガーMBin120株(WO2004/090155)から単離されたゲノムDNAから増幅した。

【化9】

プライマー 56896F (センス) :

5'-ggggccatggTCAGCGCGGTAAGCTCTAAT -3' (配列番号29)

プライマー 56896R (アンチセンス) :

5'-ggggggcgccgcGTAAGGTTCCGCATTCTCTGG -3' (配列番号30)

10

ポリケチドシンターゼをコードする配列を大文字で示した。

【0189】

増幅反応液(50 µl)は、1×HERCULASE(商標)反応緩衝液(Stratagene, La Jolla, CA, USA)、0.2 mMのdNTP、128 ngのアスペルギルス・ニガーMBin120のゲノムDNA(DNEASY(登録商標) Plant Maxi Kitを用いて調製)、20 pmolのセンスプライマー、20 pmolのアンチセンスプライマー、及び2.5ユニットのHERCULASE ホットスタートDNAポリメラーゼ(Stratagene, La Jolla, CA, USA)から構成された。当該反応液を、94℃で30秒、55℃で30秒、そして72℃で1分(最終伸張では7分)を各30サイクルとプログラムされたEPPENDORF(登録商標) MASTER CYCLER(登録商標) 5333中でインキュベートした。

20

【0190】

502 bpの得られたPCR生成物、及びpDM261を、NcoI及びNotIで切断し、TAE緩衝液中で0.75%アガロースゲル電気泳動により精製し、そしてさらに、PCR生成物についてMINELUITE(登録商標)キットを用いて、或いはプラスミドについてQIAQUICK(登録商標)ゲル抽出キットを用いてさらに精製した。FAST-LINK(商標)DNAライゲーションキット(Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA)を用いて、PCR産物をpDM261プラスミド断片とライゲーションし、そして製品説明書に従ってSURE(商標)II化学処理コンピテント大腸菌セル(Stratagene, La Jolla, CA, USA)に形質転換した。幾つかの形質転換体から得たプラスミドDNAを、BIOROBOT(登録商標)9600を用いて精製し、そしてDNAシーケンスにより分析して、所望のポリケチド合成インサートを風ムプラスミドを同定した。予期されるDNA配列を有する1のプラスミドをpAmFs031と名づけた(図7)。

30

【0191】

実施例13：アスペルギルス・ニガーの形質転換、及び形質転換体の分析

アスペルギルス・ニガーMBin120株を、PDAプレート上で34℃で14日間増殖させた。7 mlの0.01% TWEEN(登録商標) 20(Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)を加え、滅菌された植菌用ループを用いてプレートの表面を掻き取り、そして5 mlピペットを用いて孢子懸濁液を回収することにより孢子を回収した。1 Mスクロースを添加した25 mlのYPG培地を含む500 mlのガラス攪拌フラスコを、約 2.6×10^8 孢子で植菌し、そして28℃で15時間150 rpmでインキュベートした。滅菌0.2 µm 500 ml EXPRESS(商標)フィルターユニット(Millipore, Billerica, MA, USA)を用いて菌糸体を回収した。増殖培地から菌糸体をろ過して取り除き、そして150 mlの1 Mソルビトールで2回洗浄した。菌糸体を、1 mlあたり20 mgのGLUCANEX(商標)及び0.4 mgのキチナーゼ(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)を入れた1 Mのソルビトールを含む30 mlのプロトプラスト溶液に再懸濁し

40

50

た。菌糸体を、125 ml の攪拌フラスコに移し、そして34℃、100 rpmで45分間インキュベートした。プロトプラストをMIRACLOTH（登録商標）で覆われた滅菌漏斗(Calbiochem, San Diego, CA, USA)を通して滅菌50 mlのポリプロピレンチューブに注いだ。当該チューブを氷冷1 Mソルビトールで充填した。プロトプラストを、Sorvall RT6000D遠心機中にて室温、1303×gで5分間遠心した。上清を捨て、そしてプロトプラストを50 mlの1 Mソルビトール中に再懸濁した。プロトプラストをSorvall RT6000D遠心機で遠心し、そして10 mlのSTC中に再懸濁した。20 μlの量を取り出し、そしてSTCで希釈した。経も差異とメーターを用いてプロトプラストを計数した。プロトプラストをSorvall RT6000D遠心機で遠心し、そして適切な体積のPEG 4000 (Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA)中に再懸濁して、 2×10^7 プロトプラスト/mlを生成した。

10

【0192】

5 μgのpAmFs031又はpDM261のDNAを、100 μlのアスペルギルス・ニガー MBin120プロトプラストに加えた。氷上で30分間インキュベートした後に、1 mlのSPCをプロトプラスト/DNA溶液に加え、そしてゆっくり混合した。溶液を室温で30分間インキュベートした。次に、50℃に冷却した10 mlの溶解amdS上層アガーを、形質転換混合物に加え、そして150 mm COVEプレートに撒いた。次にプレートを34℃でインキュベートした。アセトアミド上での増殖は、各発現プラスミド上に存在するamdS遺伝子の発現を要求する。

20

【0193】

4日間のインキュベートの後に、pAmFs031及びpDM261の各々について10の初期形質転換体を得た。形質転換体を、1%マルトースを添加したCOVE A-尿素+アセトアミドのプレート上にストリークした。対照的に、pAmFs031形質転換体から得られたコロニーは、白色～暗茶色の範囲で孢子色が多様であった。形質転換体を、1%マルトースを添加したCOVE A-尿素+アセトアミドプレートに対して孢子をストリークすることにより形質転換体を精製し、そして次に単離されたコロニーを拾い上げて同じ培地のプレートに移した。株精製を、合計で4回繰り返した。全てのプレートを34℃でインキュベートした。

【0194】

精製されたpAmFs031形質転換体の10の孢子のうち3つは、野生型よりも明るい孢子の色を示した。精製されたpDM261(空ベクター)形質転換体の10の孢子の全てが、野生型の孢子の色を示した。pAmFs031形質転換体について明るい孢子の色を示すこれらの結果は、ポリケチドシンターゼ遺伝子の二次的RNAiに伴う抑制と一致する表現系を示す。

30

【0195】

実施例14：ポリケチドシンターゼがサイレンシングされたアスペルギルス・ニガー株及び対照アスペルギルス・ニガー株の増殖、及びトータルRNAの抽出

以下のアスペルギルス・ニガー株：白色孢子を有する2つのアスペルギルス・ニガーpAmFs031株(pAmFs031-W1及びpAmFs031-W2と名づける)、黒色の孢子を有する1のアスペルギルス・ニガーpAmFs031株(pAmFs031-B1と名づける)、及びpDM261で形質転換された1のアスペルギルス・ニガー株を、1%マルトースを添加したCOVE A-尿素+アセトアミドプレート上で7日間、34℃で増殖させた。形質転換されていない対照のアスペルギルス・ニガーMBin120は、PDAプレートで増殖させた。5 mlの0.01%TWEEN（登録商標）20を添加し、滅菌植菌用のループを用いてプレートの表面を掻きとり、そして10 mlのピペットで孢子の懸濁液を回収することにより、孢子を回収した。40 μlの孢子懸濁液を、10 mlのM410培地と混合し、そしてこの混合液の1 mlを24ウェルポリスチレン・マイクロタイタープレート(Corning Incorporated, Corning, NY, USA)の各ウェルに加えた。各株を別のマイクロタイタープレート中で増殖させて相互コンタミを避けた。プレートを湿度調節されたチャンバー内において4日間34℃でインキュベートし、この時点で真菌は

40

50

、ウェルにわたり菌糸体が増殖した連続マットを形成し、そして着色された分生子が全ての株について存在していた。

【0196】

RNAPRO（登録商標）ProRedキット(Q-Biogene, Irvine, CA, USA)を用いて菌糸体マットからトータルRNAを抽出した。マットをウェルから取り出し、そしてペーパータオルに配置して過剰量の培地を全て吸着させた。合計で200mgの各菌糸体マット組織を、1mlのRNAPRO（登録商標）溶液(Q-Biogene, Irvine, CA, USA)を含むFASTRNA（登録商標）ProRedチューブに移した。FASTPREP（商標）FP120装置を用いて、スピード6で菌糸体を40秒間ホモジェナイズした。各サンプルをSorvall MC12V微小遠心機内で4℃、5分間、13,400×gで遠心した。水相を1.7mlの微小遠心管に移した。サンプルを室温で5分間インキュベートしました。300μlのクロロホルムを加え、そしてサンプルを10秒間ボルテックスし、次に室温で5分間インキュベートした。サンプルをSorvall MC12V微小遠心機中で、13,400×gで5分間4℃にて遠心した。上相を新たな1.7ml微小遠心管に移した。上に記載されるようにサンプルを再びクロロホルムで抽出した。500μlの氷冷エタノールを加え、そしてサンプルを1時間-20℃で貯蔵した。サンプルを、4℃で20分間Sorvall MC12V微小遠心管の中で13400×gで遠心した。エタノールを取り出し、そしてペレットを75%エタノールで洗浄した。エタノールを取り除き、そしてペレットを5分間風乾した。RNAサンプルを100μlのDEPC処理水中に再懸濁した。50μlの8M・LiClを加え、そしてサンプルを1時間-20℃で貯蔵した。Sorvall MC12V微小遠心管中において25分間4℃で、13400×gで遠心した。LiClを取り除き、そして500μlの75%エタノールをペレットに加え、そして取り除いた。ペレット化サンプルを5分間風乾させた。RNAサンプルを30μlのDEPC処理水中に再懸濁した。RNA濃度を、NANODROP（登録商標）1000分光光度計を用いて計測した。サンプルを-80℃で貯蔵した。

【0197】

実施例15：第一鎖cDNA合成

実施例14に記載されたアスペルギルス・ニガー株の各々に由来するRNAサンプルを、TURBO DNase（商標）キット(Ambion, Inc., Austin, TX, USA)の試薬を用いてDNaseで処理してゲノムDNAを取り除いた。3μgのRNAを1μlのTURBO DNase（商標）緩衝液(Ambion, Inc., Austin, TX, USA)と混合し、そしてDEPC処理水で10μlの体積に調節した。0.5μlの量のTURBO DNase（商標）(Ambion, Inc., Austin, TX, USA)を加え、そしてサンプルを37℃で30分間インキュベートした。第二の0.5μlの量のTURBO DNase（商標）を加え、そしてサンプルを再び37℃で30分間インキュベートした。2μlの不活性化試薬(Ambion, Inc., Austin, TX, USA)を加え、そして室温での2分間のインキュベートの間にサンプルを3回混合した。サンプルをEPENDORF（登録商標）5415D微小遠心機において9300×gで2分間遠心した。9μlの上清を0.6ml微小遠心管に移した。RNA濃度を、NANODROP（登録商標）1000分光光度計を用いて計測した。サンプルを-80℃で貯蔵した。

【0198】

第一鎖cDNAを、Transcriptor Reverse Transcriptase First Strand cDNA合成キット(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)を用いて合成した。実施例14に記載される5のアスペルギルス・ニガー株の各々について、2μlのランダムヘキサマープライマー(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)と混合され、そしてDEPC処理水で13μlに調節された1～2μlの体積中にさまざまな量のDNase-処理RNA：300ng、600ng、900ng、及び1.2μgを用いて、実施例14に記載される5のアスペルギルス・ニガーの各々についての4つのライブラリーを作成した。サンプルを65℃で10分間インキュベートし、次に氷上に配置した。6.5μlの量のTranscriptor逆転写酵素

素マスターミックス(4 μ lのTranscriptor逆転写酵素緩衝液、0.5 μ lのProtector RNase阻害剤、及び2 μ lのdNTPミックス)をチューブに加え、続いて0.5 μ lの量のTranscriptor逆転写酵素を加えた。サンプルを氷から取り出し、そして25℃で10分間、55℃で60分間、そして次に85℃で5分間とプログラムされたEPENDORF(登録商標)MASTERCYCLER(登録商標)5333に移した。サンプルを-80℃で貯蔵した。

【0199】

実施例16：リアルタイムPCRによるアスペルギルス・ニガーのポリケチドシンターゼmRNAの検出

実施例14に記載されたアスペルギルス・ニガー株による、アスペルギルス・ニガーポリケチド・シンターゼの相対発現レベルを、RT-PCRにより定量した。トータルRNAを各株から抽出して、実施例15に記載されるように第一鎖cDNA合成についてのテンプレートとして機能させる。第一鎖cDNAは、RT-PCRのテンプレートとして機能する。アスペルギルス・ニガーのアクチン遺伝子を、レファレンス標準(つまり内部対照)として用いた。プローブ及びプライマーを、Roche Universal ProbeLibrary Design Center Software(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)を用いて設計した。以下のプライマー及びプローブ対が使用される：

【化10】

アスペルギルス・ニガー ポリケチド合成 フォワードプライマー (62488)：

5'-tcgtgaatcaggctcctagcc-3' (配列番号31)

アスペルギルス・ニガー ポリケチド合成 リバースプライマー (62489)：

5'-aaacaacccaattggtagatgc-3' (配列番号32)

Roche ユニバーサル プローブ ライブラリー プローブ#80 (04689038001)：

5'-cctggaga-3'

アスペルギルス・ニガー フォワードプライマー (62520)：

5'-atctgtacggcaacattgtca-3' (配列番号33)

アスペルギルス・ニガー リバースプライマー (62521)：

5'-ttctgcatacggtcggagat-3' (配列番号34)

Roche ユニバーサル プローブ ライブラリー プローブ#131 (04694155001)：

5'-ctggtggt-3'

【0200】

RT-PCRアッセイを、LIGHTCYCLER(登録商標)480システムを用い、そして上記Roche Universal ProbeLibrary Probesを用いて行った。当該プローブは、5'末端においてフルオレセインで、そして3'末端付近でダーククエンチャーダイで予め標識されていた。各反応混合物は、10 μ lのLIGHTCYCLER(登録商標)480プローブマスターミックス、0.1 μ MのRoche Universal Probe Library Probe、0.2 μ Mフォワードプライマー、0.2 μ Mリバースプライマー、及び2 μ lの第一鎖cDNA(さまざまな量のトータルRNAから、実施例15に記載される用に調製される)を合計体積20 μ lで含む。全てのRT-PCR反応を、384ウェルプレートで行った(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)。RT-PCR反応を、95℃で10分間、4.8℃/sを1サイクル；95℃で10秒、4.8℃/s；55℃で15秒、2.5℃/s；72℃で1秒、4.8℃/s(シングル収集モード)の定量分析モードを用いて45サイクルの増幅；そして40℃で10秒、2℃/sの冷却を1サイクルとなるようにプログラムされたLIGHTCYCLER(登録商標)480システムで行った。標的(ポリケチドシンターゼ遺

伝子)及びレファレンス(アクチン遺伝子)に対するPCR効率値及び標準曲線を作成するため、4つの連続希釈を、2のcDNAライブラリーから作成した。これらの連続希釈液の各々は、別々の反応において標的及びレファレンスのプローブ/プライマーセットの両方で、4回アッセイされた。標準曲線は、標的及びレファレンスに対してそれぞれ0.996及び0.998の R^2 値をもたらした。LIGHTCYCLER(登録商標)480相対定量ソフトウェアにより計算されるPCR効率値は、標的及びレファレンスに対して1.950(誤差0.0266)及び1.854(誤差0.0181)であった。全ての5のアスペルギルス・ニガー株についてポリケチドシンターゼmRNAの相対レベルと比べるために、3の希釈液を、cDNAライブラリーの各々について3回試験した。RT-PCR反応は、別々の反応で各希釈液及び複製物について標的及びレファレンスに対するプローブ/プライマーセットの両方を用いて行われた。これらのデータは、製品説明書に従ってLightcycler(登録商標)480相対定量ソフトウェアを用いて標準曲線と比較された。この分析方法を用い、処理されたサンプルの発現量は、未処理の対照サンプルと比較して計算された。処理されたサンプルの量は、未処理の対照サンプルの量により割られた標準曲線から決定された。こうして未処理サンプルは、1×サンプルと名づけられ、そして全ての他の量が、未処理サンプルに対してn倍の差異として表現された。次に処理されたサンプル量を内部対照であるアクチンに対して正規化して、各反応に加えられたトータルRNAの量における差異を表した。

10

【0201】

相対定量分析を用いて、アスペルギルス・ニガーのポリケチドシンターゼmRNAの相対発現レベルを、アスペルギルス・ニガーMBin120のpAmFs031-B1、アスペルギルス・ニガーのMBin120のpDM261、又は非形質転換アスペルギルス・ニガーMBin120株と比較して、pAmFs031-W1及びpAmFs031-W2株において有意に低下したかを決定した、これを観察された胞子の色の変化と関連させた。アスペルギルス・ニガーMBin120pAmFs031-W1及びアスペルギルス・ニガーMBin120pAmFs031-W2株は、「空ベクター」対照株に比べて、ポリケチド・シンターゼmRNAにおいて68%及び82%の低下を示した。実施例17に記載されるように、同じ株についてサザンブロットを行って、ポリケチドシンターゼ遺伝子全体の存在を確認し、そして転写の低下が、ポリケチドシンターゼ遺伝子自体の破損のため生じる可能性を除去した。

20

30

【0202】

サザンブロットによるアスペルギルス・ニガーポリケチドシンターゼ遺伝子の検出

以下のアスペルギルス・ニガー株(実施例16に記載される):非形質転換アスペルギルス・ニガーMBin120、アスペルギルス・ニガーMBin120のpAmFs031-W1、アスペルギルス・ニガーMBin120のpAmFs031-W2、アスペルギルス・ニガーMBin120のpAmFs031-B1、及びアスペルギルス・ニガーMBin120のpDM261から、DNEASY(登録商標)PlantMaxiキットを用いてゲノムDNAを抽出した。各株からの合計2 μ gのゲノムDNAを、HindIIIで17時間37℃で切断した。切断されたゲノムDNA及びDNA分子量マーカーDIG標識(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)を、TAE緩衝液中の0.7%アガロースゲルにロードし、そして22Vの電流を17時間かけた。20×SC転写緩衝液を用いてDNAをゲルからNYTRAN(商標)SuperCharged膜に転写した。紫外線照射を用いてDNAを膜に架橋させ、そして42℃で30分間DIG Easy Hyb溶液(Roche Applied, Science, Indianapolis, IN, USA)中で平衡化させた。DIG Easy Hyb溶液中に懸濁したDIG標識された434bpの20 μ l PCR産物で、42℃で18時間プローブした。434bpのDIG標識DNAプローブを、PCR DIGプローブ合成キット(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)及び以下に示すプライマー:

40

【化 1 1】

アスペルギルス・ニガー ポリケチドシンターゼ サザン フォワードプライマー (062849) :

5'-ttaattaatcggtcaatcgccgtgtcaga-3' (配列番号35)

アスペルギルス・ニガー ポリケチドシンターゼ サザン リバースプライマー (062850) :

5'-aatttccaacagggttaactccac-3' (配列番号36)

を用いて合成した。

10

【0203】

増幅反応液(50 μ l)は、1 $\times$ PCR緩衝液、5 μ lのPCR DIG Probe 合成ミックス、50 μ Mのセンスプライマー、50 μ Mのアンチセンスプライマー、及び2.6ユニットのExpand High Fidelityポリメラーゼ、及び50 ngのアスペルギルス・ニガーMBin120ゲノムDNA(上に記載されるように精製)から構成された。当該反応液を、94 $^{\circ}$ Cで30秒、55 $^{\circ}$ Cで30秒、そして72 $^{\circ}$ Cで1分(最終伸張では7分)を各30サイクルとプログラムされたEPENDORF(登録商標)MASTERCYCLER(登録商標)5333中でインキュベートした。プローブ配列は、アスペルギルス・ニガーポリケチドシンターゼ遺伝子のプロモーター(5'非翻訳領域)に相補的であり、その配列は、8.8 kbのHindIIIゲノムDNA断片内に含まれる。

20

【0204】

膜をプローブ化した後に、膜を、2 $\times$ SSC+0.1% SDSの低ストリンジェンシー緩衝液で室温にて5分洗浄し、続いてそれぞれ室温で15分間65 $^{\circ}$ Cにて0.5 $\times$ SSC+0.1% SDSの高ストリンジェンシー洗浄で2回洗浄した。ハイブリダイズしたDIG標識プローブと分子量マーカを、製品説明書に従って、DIG Luminescent Detectionキット(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)を用いて可視化した。プロットを、Biomax XARフィルム(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)にさらし、そしてKonica SRX-101Aフィルムプロセッサ(Konica Minolta Medical Imaging USA Inc., Wayne, NJ, USA)を用いて現像して、標識DNAを可視化した。結果により、全ての株が予期された8.8 kbのバンドを示したということが示され、全長遺伝子が、試験された全ての株において傷ついていないことが示唆された。

30

【0205】

実施例 18：トリコデルマ・リーセイの二次的RNAi発現ベクターpAL02の構築

二次的RNAi発現ベクターを、トリコデルマ・リーセイ β -キシロシダーゼ遺伝子の発現を抑制するために構築した(DNA配列について配列番号37及び推定のアミノ酸配列について配列番号38)。

二次的RNAiプラスミドpEvFz-14を、PacI及びMluIで切断して、ハイグロマイシン逆反復を単離した。527 bpの断片を、TAE緩衝液中の1.0%アガロースゲル電気泳動により分離し、そうしてゲルから切り出した。製品説明書に従って、QIAQUICK(登録商標)ゲル抽出キットを用いて断片を精製した。精製された断片を、Rapid Ligationキット(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)を用いてPacI及びMluIで切断されたpMJ09(WO 2005/056772)にライゲーションした。

40

【0206】

2 μ lのライゲーション混合物を用いて、製品説明書に従い、SURE(商標)化学処理コンピテント大腸菌セルに形質転換した。いくつかの形質転換体から得たプラスミドDNAを、BIOROBOT(登録商標)9600を用いて精製し、そしてPacI及びMluIで切断することにより分析した。制限酵素で切断された生成物を、TAE緩衝液中の1.0%アガロースゲル電気泳動により分離した。1の形質転換体を、DNA配列分析に

50

より、527bpのハイグロマイシン逆反復を有することを確認し、そしてpAL01と名づけた(図8)。

【0207】

テンプレートとして機能するトリコデルマ・リーセイ RutC30から得たゲノムDNAを用いて、トリコデルマ・リーセイ・β-キシロシダーゼコード領域(DNA配列について配列番号39及び推定のアミノ酸配列について配列番号40)の一部を含む500bpの断片を増幅するために、PCRを用いた。トリコデルマ・リーセイ RutC30から得たゲノムDNAを、製品説明書に従って、DNEASY(登録商標)PlantMaxiKitを用いて単離した。5'末端にNcoI部位を取り込むようにセンスプライマーを設計し、そして以下に示すようにMluI部位を5'末端に取り込むようにリバー

10

【化12】

センスプライマー：

5'-CCATGGTACGAGTTTGGCAGTGGTCT-3'(配列番号41)

アンチセンスプライマー：

5'-ACGCGTTTATGCGTCAGGTGTAGCAT-3'(配列番号42)

20

【0208】

増幅反応液(50μl)は、19×HERCULASE(商標)反応緩衝液(Stratagene, La Jolla, CA, USA)、0.8mMのdNTP、200ngのトリコデルマ・リーセイ RutC30のゲノムDNA(実施例7に記載されるように調製)、1ngのプライマー、及び2.5ユニットのHERCULASE ホットスタートDNAポリメラーゼ(Stratagene, La Jolla, CA, USA)から構成された。当該反応液を、92℃で2分間1サイクル；92℃で30秒、58℃で30秒、そして68℃で1分を各30サイクル；そして10分の最終伸張とプログラムされたEPENDORF(登録商標)MASTERCYCLES(登録商標)5333中でインキュベートした。反応性生物は、TAE緩衝液中の1.0%アガロースゲル電気泳動により単離し、ここで500bpのバンドをゲルから切り出し、そして製品説明書に従ってQIAQUICK(登録商標)ゲル抽出キットを用いて精製した。精製PCR断片を、NcoI及びMluIで切断し、そしてRapidLigationキットを用いて、すでにNcoIとMluIで切断されたpAL01にライゲーションした。ライゲーション混合物を用いて、製品説明書に従って、SURE(商標)化学処理コンピテント大腸菌セルを形質転換した。次に形質転換体を、コロニーPCRによりスクリーニングして、所望のβ-キシロシダーゼインサートを含む形質転換体を同定した。反応液(20μl)は、2μlの10×THERMOPOL(商標)反応緩衝液、0.4μlの10mMのdNTP、1μlの大腸菌形質転換体コロニーを50μlの脱イオン水に懸濁した溶液、及び1pmolのβ-キシロシダーゼ増幅プライマーから構成された。反応液は、94℃で2分間を1サイクル；94℃で30秒、55℃で30秒、及び72℃で30秒を各々17サイクル、そして最終伸張を5分間とプログラムされたEPENDORF(登録商標)MASTERCYCLES(登録商標)5333プログラム中でインキュベートした。増幅生成物を、TAE緩衝液中の1.0%アガロースゲル電気泳動により単離した。500bpのβ-キシロシダーゼ増幅生成物を含む幾つかの形質転換体から得たプラスミドDNAを、BIOROBOT(登録商標)9600を用いて精製し、そしてDNAシーケンスにより分析した。500bpのβ-キシロシダーゼ増幅生成物を含む1のプラスミドのDNA配列分析は、予期されたインサートを確認し、そしてpAL02と名づけた(図9)。

30

40

【0209】

実施例19：トリコデルマ・リーセイにおける、トリコデルマ・リーセイのβ-キシロシ

50

ダーゼ遺伝子の二次的RNA iの形質転換及び決定

5 μ gのpAL02を用いて、トリコデルマ・リーセイSaMe13、cbh1欠失株(WO2005/030926)を形質転換した。トリコデルマ・リーセイSaMe13の胞子を、成熟トリコデルマリーセイのCOVE2プレート上に20mlの0.01%TW EEN(登録商標)80を注ぐことにより回収し、そして胞子を、ペトリ皿スプレッダーで掻き取った。胞子混合物を20mlピペットで採取した。およそ $2 \sim 5 \times 10^7$ の胞子を、2%グルコースと10mMウリジンで添加した100mlのYP培地中でインキュベートし、そして27°C 90rpmで16時間インキュベートした。菌糸体を、500mlのSTERICUP(登録商標)フィルターユニット(Millipore, Burlington, MA, USA)を用いて回収し、そして2回100mlの脱イオン水で洗浄した。菌糸体を250mlの1.2Mソルビトールで2回洗浄した。洗浄した菌糸体を、20mlの1.2Mソルビトール、1mlあたり5mgのGLUCANEX(商標)及び1mlあたり0.5mgのキチナーゼに再溶解した。混合物を、34°Cで15~25分間90rpmでインキュベートした。フラスコを5分間氷の上に配置し、続いてMIRACLOTH(登録商標)を介してろ過した。プロトプラストを含むフィルターを、50mlのFALCON(登録商標)チューブ(VWR International, West Chester, PA, USA)に入れた。チューブを370 $\times$ gで10分間、Sorvall RT6000D遠心機内で遠心した。上清を捨て、そしてプロトプラストペレットを、25mlの1.2Mソルビトール中に再懸濁飼、そしてSorvall RT6000D遠心機中で10分間370gで遠心した。上清を捨て、そしてペレットを、1.2Mソルビトール25ml中に再懸濁した。10 μ lを取り、そしてチューブを上に記載されるように遠心し、その間にプロトプラストをヘモサイトメーターで計数した。上清を捨て、そして1mlのSTCあたり、 1×10^8 のプロトプラストの濃度でペレットを再懸濁した。

【0210】

100 μ lのプロトプラスト懸濁液、1~10 μ gのプラスミドDNAを含む10 μ lのSTC、及び250 μ lのポリエチレングリコールをゆっくり混合した。混合液を室温で30分間インキュベートした。3mlのSTCを加え、混合し、そして150mmのCOVEプレートに注いだ。プレートを28°Cで10~14日間インキュベートした。

【0211】

24の形質転換体、AL02-1-AL02-20、及びpAL01を含む4の対照形質転換が選択され、そして1のコロニーから得た胞子を、COVEプレートにストリークし、そして28°Cで5日間インキュベートした。これらのプレートから得た胞子を、25mlのセルロース誘導性培地を含む125mlののバッフル攪拌フラスコに植菌し、そして28°C及び200rpmで5日間培養した。培養ブrossの1mlのサンプルを、植菌後5日間で取り、EPPENDORF(登録商標)遠心機5415D中で10分間6000 $\times$ gで遠心し、そして上清を新たなEPPENDORF(登録商標)チューブに移した。2つのブrossサンプルを用いて、 β -キシロシダーゼ活性及び β -グルコシダーゼ活性を決定した。

【0212】

上記上清を、Coulter Biomek 3000、Biomek NX、及びORCAロボットアーム(Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, USA)を用いて、 β -キシロシダーゼ活性についてアッセイした。培養上清を、およそ0.1Mコハク酸、0.01%Tris-X-100、pH5.0(サンプル緩衝液)に希釈し、続いて0倍~1/3倍~1/9倍の希釈サンプルに連続希釈した。全体で20 μ lの各希釈液を96ウェルの平底プレートに移した。1mlの0.1Mコハク酸、pH5.0あたり1mgのパラ-ニトロフェニル- β -D-キシロピラノシドを含む200 μ lの基質溶液を各ウェルに加え、そして室温で45分間インキュベートした。インキュベート期間の完了の後に、50 μ lの1m $\cdot$ Tris緩衝液pH9を各ウェルに加えて反応を停止した。96ウェルプレートについて405nmの光学密度で終点を計測した。

【0213】

Coulter Biomek 3000、Biomek NX、及びORCAロボットアームを用いて、上記上清を、 β -グルコシダーゼ活性についてアッセイした。培養上清を、約0.1Mコハク酸、Triton X-100 pH 5.0 (サンプル緩衝液)中に希釈し、続いて0倍～1/3倍～1/9倍の希釈サンプルを連続希釈した。合計で20 μ lの各希釈液を、96ウェルの平底プレートに移した。1mlあたり1mgのパラ-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを含む200 μ lの基質溶液を、各ウェルに加え、そして次に室温で45分間インキュベートした。インキュベート期間の完了の際に、50 μ lの1MのTRIS緩衝液、pH 9を、各ウェルに加えて、反応を止めた。96ウェルプレートについて405 nmの光学密度で終点を計測した。サンプル活性を、以下の式を用いることにより測定した：

$$[(\{OD_{405} / \text{消滅係数}\} \times 1 \times 10^6) / \text{インキュベート時間}] / \text{サンプル体積}$$

[式中、消滅係数 = 17,749、インキュベート時間 = 45、及びサンプル体積 = 0.02]

【0214】

β -キシロシダーゼ活性アッセイから得られたODと、 β -グルコシダーゼアッセイから得られた活性との間の比を、BX/BGとして計算し、そして報告した。 β -グルコシダーゼはもともと生じるので、その活性は、形質転換体の間の増殖の際について正規化する手段として用いた。結果を以下の表3に示す：

【表3】

表3

サンプル	β -キシロシダーゼ ¹	β -グルコシダーゼ ²	タンパク質 ³	BX/BG比 ⁴
AL02 1	5.53 $\pm$ 1.10	965.63 $\pm$ 107.02	3.51 $\pm$ 0.48	0.006 $\pm$ 0.001
AL02 2	10.13 $\pm$ 2.38	857.73 $\pm$ 40.30	4.23 $\pm$ 0.51	0.012 $\pm$ 0.004
AL02 3	9.89 $\pm$ 1.60	1139.06 $\pm$ 37.99	2.54 $\pm$ 0.31	0.009 $\pm$ 0.002
AL02 4	2.94 $\pm$ 0.25	174.90 $\pm$ 45.20	1.38 $\pm$ 0.25	0.017 $\pm$ 0.007
AL02 5	15.67 $\pm$ 2.55	919.14 $\pm$ 39.01	3.56 $\pm$ 0.03	0.017 $\pm$ 0.004
AL02 6	15.04 $\pm$ 7.12	725.61 $\pm$ 225.20	4.58 $\pm$ 1.96	0.021 $\pm$ 0.004
AL02 7	4.78 $\pm$ 0.44	494.99 $\pm$ 69.17	3.29 $\pm$ 0.17	0.010 $\pm$ 0.003
AL02 8	3.87 $\pm$ 0.22	507.37 $\pm$ 262.44	3.25 $\pm$ 0.09	0.008 $\pm$ 0.005
AL02 9	9.70 $\pm$ 3.52	771.72 $\pm$ 35.46	4.25 $\pm$ 0.43	0.013 $\pm$ 0.005
AL02 10	3.25 $\pm$ 1.61	576.40 $\pm$ 202.08	2.45 $\pm$ 1.04	0.006 $\pm$ 0.001
AL02 11	3.47 $\pm$ 2.19	667.39 $\pm$ 159.68	2.21 $\pm$ 0.76	0.005 $\pm$ 0.003
AL02 13	7.27 $\pm$ 2.44	521.00 $\pm$ 66.65	3.40 $\pm$ 0.74	0.014 $\pm$ 0.004
AL02 14	5.75 $\pm$ 2.54	834.19 $\pm$ 414.42	4.54 $\pm$ 1.58	0.007 $\pm$ 0.000
AL02 15	10.58 $\pm$ 0.64	625.86 $\pm$ 427.59	5.51 $\pm$ 2.95	0.017 $\pm$ 0.015
AL02 16	1.80 $\pm$ 0.60	309.91 $\pm$ 39.37	4.51 $\pm$ 1.76	0.006 $\pm$ 0.002
AL02 17	7.31 $\pm$ 6.48	477.29 $\pm$ 370.17	6.75 $\pm$ 2.44	0.015 $\pm$ 0.003
AL02 18	6.04 $\pm$ 3.83	556.43 $\pm$ 143.08	4.69 $\pm$ 1.81	0.011 $\pm$ 0.005
AL02 19	1.64 $\pm$ 0.42	226.67 $\pm$ 24.94	2.49 $\pm$ 0.12	0.007 $\pm$ 0.001
AL02 20	3.55 $\pm$ 1.78	410.71 $\pm$ 261.33	3.91 $\pm$ 1.97	0.009 $\pm$ 0.001
AL03 ev	3.59 $\pm$ 0.78	320.76 $\pm$ 92.52	3.60 $\pm$ 1.36	0.011 $\pm$ 0.003

¹ β -キシロシダーゼ活性は、パラ-ニトロフェニル- β -D-キシロピラノシドを基質として使用して計測した。数値は、吸光度単位 $\pm$ 標準偏差(サンプルAL03 evを除きn = 2、AL03 evではn = 4)として表される。

² β -グルコシダーゼ活性は、p-ニトロフェニル- β -グルコピラノシドを基質として用いて計測した。数値は、加水分解された基質 μ mol/分/ml (培養ブロス) $\pm$ 標準偏差(サンプルAL03 evを除きn = 2、AL03 evではn = 4)として表される。

³ タンパク質濃度は、BCAアッセイ試薬を用いて測定した。数値は、mg/ml (培養ブロス) $\pm$ 標準偏差(サンプルAL03 evを除きn = 2、AL03 evではn = 4)として表される。

⁴ β -キシロシダーゼと β -グルコシダーゼ活性の比 $\pm$ 標準偏差(サンプルAL03 evを除きn = 2、AL03 evではn = 4)

およそ5/20の形質転換が、対照の36～55%の値を有するBX/BGを発現する

ようである。これらの結果により、二次的RNAiが、トリコデルマ・リーセイにおいて遺伝子発現をうまくノックダウンするために使用することができる。

【0215】

本出願に記載されそして特許請求される発明は、本明細書に開示した特定の実施態様により範囲を限定すべきではない。なぜなら、これらの実施態様は、本発明の幾つかの態様を例示するものとして意図されるものであるからである。任意の同等の実施態様は、本発明の範囲内であることが意図される。実際、本発明に示されそして記載される発明に加えて発明の様々な変更は、先の記載から当業者に明らかであろう。このような変更は、添付の特許性球の範囲の範囲内になることが意図される。訴訟においては、定義を含む本開示は、コントロールするであろう。

様々な文献が本明細書で引用されており、その開示は、その全てを本明細書に援用する。

10

【図1】

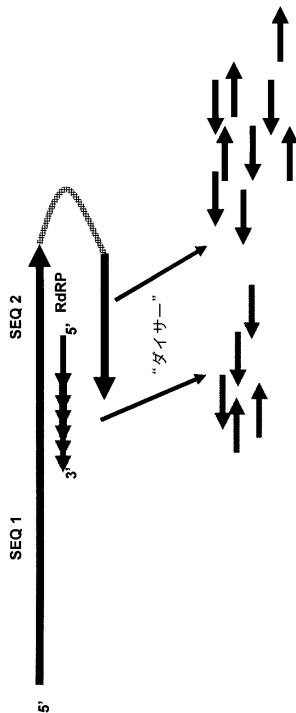


Fig. 1

【図2】

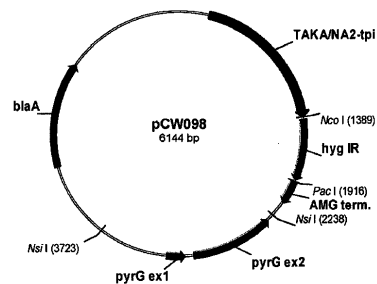


Fig. 2

【図 3】

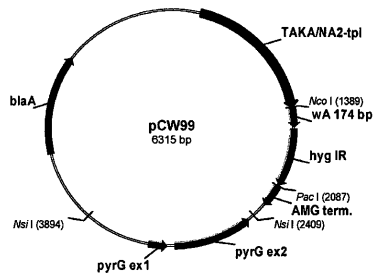


Fig. 3

【図 4】

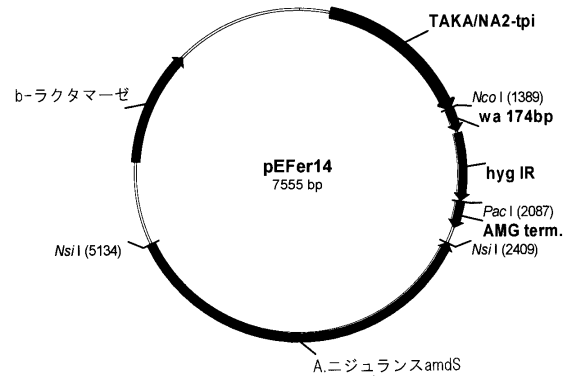


Fig. 4

【図 5】

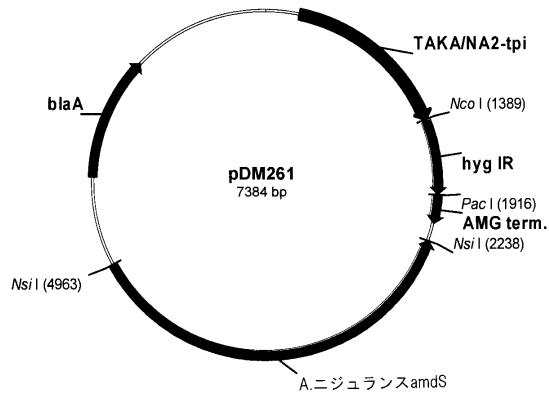


Fig. 5

【図 6】

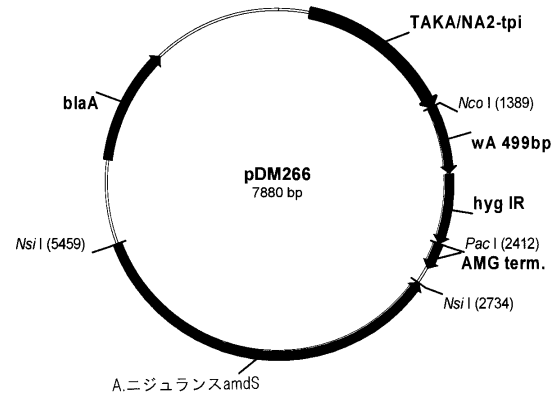


Fig. 6

【図 7】

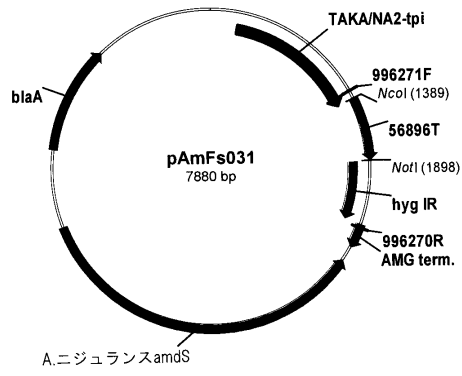


Fig. 7

【図 8】

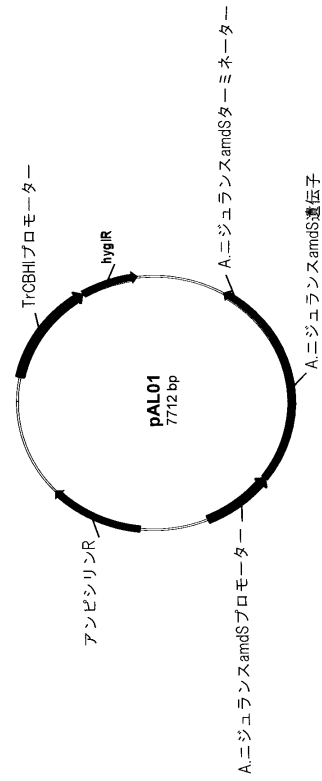


Fig. 8

【図 9】

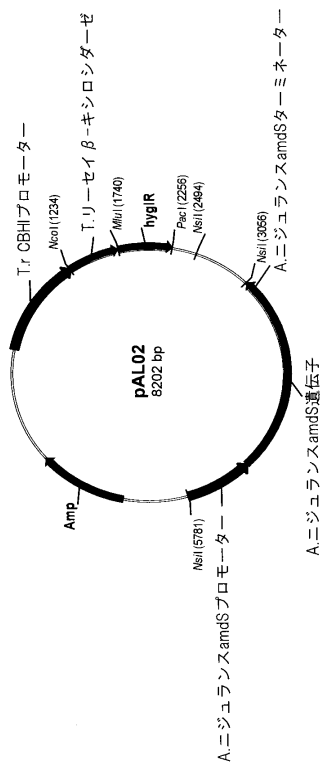


Fig. 9

【配列表】

0005951924000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100166165

弁理士 津田 英直

(72)発明者 ブロディ, ハワード

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95616, デイビス, エル セモンテ アベニュー 5136

(72)発明者 モイヤー, ドナ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95616, デイビス, カウエル ブールバード 5219

(72)発明者 フィッシャー, アマンダ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95616, デイビス, アロヨ コート 3310

合議体

審判長 中島 庸子

審判官 飯室 里美

審判官 長井 啓子

(56)参考文献 Plant J.、2003、第33巻、793-800ページ

RNA、2006年9月、第12巻、1633-1639ページ

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/WPIX (STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)