

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7623680号
(P7623680)

(45)発行日 令和7年1月29日(2025.1.29)

(24)登録日 令和7年1月21日(2025.1.21)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19 Z N A
C 1 2 P	21/00 (2006.01)	C 1 2 P	21/00 C
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31
C 1 2 N	15/81 (2006.01)	C 1 2 N	15/81 1 0 0 Z
C 1 2 N	15/57 (2006.01)	C 1 2 N	15/57
請求項の数 53 (全78頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-564317(P2020-564317)	(73)特許権者	516079198
(86)(22)出願日	令和1年5月17日(2019.5.17)		ボルト スレッズ インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2021-524227(P2021-524227 A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 1 4, サン フランシスコ マーケット
(43)公表日	令和3年9月13日(2021.9.13)		ストリート 2 2 6 1 スイート 5 4 4 7
(86)国際出願番号	PCT/US2019/032879		2 2 6 1 Market Street,
(87)国際公開番号	WO2019/222633		STE 5 4 4 7 San Franci
(87)国際公開日	令和1年11月21日(2019.11.21)		sco, CA 9 4 1 1 4 USA
審査請求日	令和4年4月22日(2022.4.22)	(74)代理人	100102978
(31)優先権主張番号	62/673,001		弁理士 清水 初志
(32)優先日	平成30年5月17日(2018.5.17)	(74)代理人	100160923
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 山口 裕孝
		(74)代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74)代理人	100142929
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 組換えタンパク質の分泌を改善するための S E C 改変株

(57)【特許請求の範囲】

- 【請求項 1】
- s e c 7 2 遺伝子が欠失している、ピキア・パストリス (P i c h i a p a s t o r i s) という微生物であって、
- 前記微生物が酵母由来の分泌シグナル配列を含む組換えタンパク質を発現し、
- 前記組換えタンパク質が絹タンパク質由来の少なくとも 1 つのブロックポリペプチド配列を含むか絹様タンパク質であり、かつ
- 前記分泌シグナル配列が、P E P 4 シグナル配列、C P Y + 4 シグナル配列、D A P 2 シグナル配列、及び M F α 1 シグナル配列から選択される、
- 前記微生物。
- 【請求項 2】
- 前記 s e c 7 2 遺伝子が、配列番号 1 と少なくとも 9 5 % 同一なポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の微生物。
- 【請求項 3】
- 前記 s e c 7 2 遺伝子が配列番号 1 を含む、請求項 1 に記載の微生物。
- 【請求項 4】
- 前記 s e c 7 2 遺伝子が前記微生物の遺伝子座 P A S _ c h r 2 - 1 _ 0 4 4 8 に存在する、請求項 1 に記載の微生物。
- 【請求項 5】
- 組換えで発現される S S H 1 トランスロコン複合体をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいず

れか 1 項に記載の微生物。

【請求項 6】

前記 S S H 1 トランスロコン複合体が、配列番号 4 と少なくとも 9 5 % 同一な第 1 のポリペプチド配列、配列番号 6 と少なくとも 9 5 % 同一な第 2 のポリペプチド配列、及び配列番号 8 と少なくとも 9 5 % 同一な第 3 のポリペプチド配列を含む、請求項 5 に記載の微生物。

【請求項 7】

前記 S S H 1 トランスロコン複合体が、配列番号 4 を含む第 1 のポリペプチド、配列番号 6 を含む第 2 のポリペプチド、及び配列番号 8 を含む第 3 のポリペプチドを含む、請求項 5 に記載の微生物。

10

【請求項 8】

組換えで発現されるトランスロコン複合体をさらに含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の微生物。

【請求項 9】

前記トランスロコン複合体が、組換え S S H 1 遺伝子、組換え S S S 1 遺伝子、及び組換え S B H 2 遺伝子から発現される、請求項 8 に記載の微生物。

【請求項 10】

前記 S S H 1 遺伝子が配列番号 3 を含む、請求項 9 に記載の微生物。

【請求項 11】

前記 S S H 1 遺伝子が、配列番号 3 と少なくとも 9 5 % 同一なポリヌクレオチド配列を含む、請求項 9 に記載の微生物。

20

【請求項 12】

前記 S S H 1 遺伝子が配列番号 5 を含む、請求項 9 に記載の微生物。

【請求項 13】

前記 S S H 1 遺伝子が、配列番号 5 と少なくとも 9 5 % 同一なポリヌクレオチド配列を含む、請求項 9 に記載の微生物。

【請求項 14】

前記 S B H 2 遺伝子が配列番号 7 を含む、請求項 9 に記載の微生物。

【請求項 15】

前記 S B H 2 遺伝子が、配列番号 7 と少なくとも 9 5 % 同一なポリヌクレオチド配列を含む、請求項 9 に記載の微生物。

30

【請求項 16】

前記微生物における前記 S S H 1 トランスロコンのレベルを、天然の生物によって発現される前記 S S H 1 トランスロコンのレベルを超えて増加させるための前記組換え S S H 1 遺伝子の発現が、前記微生物の増殖速度及び／または発酵能力を向上させる、請求項 9 に記載の微生物。

【請求項 17】

前記トランスロコン複合体が、S S H 1 タンパク質、S S S 1 タンパク質、及び S B H 2 タンパク質を含む、請求項 8 に記載の微生物。

【請求項 18】

前記 S S H 1 タンパク質が、配列番号 4 と少なくとも 9 5 % 同一なポリペプチド配列を含む、請求項 1 7 に記載の微生物。

40

【請求項 19】

前記 S S H 1 タンパク質が配列番号 4 を含む、請求項 1 7 に記載の微生物。

【請求項 20】

前記 S S S 1 タンパク質が、配列番号 6 と少なくとも 9 5 % 同一なポリペプチド配列を含む、請求項 1 7 に記載の微生物。

【請求項 21】

前記 S S S 1 タンパク質が配列番号 6 を含む、請求項 1 7 に記載の微生物。

【請求項 22】

50

前記 S B H 2 タンパク質が、配列番号 8 と少なくとも 95 % 同一なポリペプチド配列を含む、請求項 17 に記載の微生物。

【請求項 23】

前記 S B H 2 タンパク質が配列番号 8 を含む、請求項 17 に記載の微生物。

【請求項 24】

Y P S 1-1 プロテアーゼ及び Y P S 1-2 プロテアーゼの活性が、減弱または消失している、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の微生物。

【請求項 25】

前記 Y P S 1-1 プロテアーゼが、配列番号 10 と少なくとも 95 % 同一なポリペプチド配列を含む、請求項 24 に記載の微生物。

10

【請求項 26】

前記 Y P S 1-1 プロテアーゼが配列番号 10 を含む、請求項 24 に記載の微生物。

【請求項 27】

前記 Y P S 1-1 プロテアーゼが Y P S 1-1 遺伝子によりコードされる、請求項 24 に記載の微生物。

【請求項 28】

前記 Y P S 1-1 遺伝子が、配列番号 9 と少なくとも 95 % 同一なポリヌクレオチド配列を含む、請求項 27 に記載の微生物。

【請求項 29】

前記 Y P S 1-1 遺伝子が配列番号 9 を含む、請求項 27 に記載の微生物。

20

【請求項 30】

前記 Y P S 1-1 遺伝子が前記微生物の遺伝子座 P A S __ c h r 4 __ 0 5 8 4 に存在する、請求項 27 に記載の微生物。

【請求項 31】

前記 Y P S 1-2 プロテアーゼが、配列番号 12 と少なくとも 95 % 同一なポリペプチド配列を含む、請求項 24 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の微生物。

【請求項 32】

前記 Y P S 1-2 プロテアーゼが配列番号 12 を含む、請求項 24 に記載の微生物。

【請求項 33】

前記 Y P S 1-2 プロテアーゼが Y P S 1-2 遺伝子によりコードされる、請求項 24 に記載の微生物。

30

【請求項 34】

前記 Y P S 1-2 遺伝子が、配列番号 11 と少なくとも 95 % 同一なポリヌクレオチド配列を含む、請求項 33 に記載の微生物。

【請求項 35】

前記 Y P S 1-2 遺伝子が配列番号 11 を含む、請求項 33 に記載の微生物。

【請求項 36】

前記 Y P S 1-2 遺伝子が前記微生物の遺伝子座 P A S __ c h r 3 __ 1 1 5 7 に存在する、請求項 33 に記載の微生物。

【請求項 37】

前記 Y P S 1-1 遺伝子もしくは前記 Y P S 1-2 遺伝子またはその両方が、変異しているまたはノックアウトされている、請求項 24 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の微生物。

40

【請求項 38】

1 種以上のさらなるプロテアーゼの活性が減弱または消失している、請求項 24 ~ 37 のいずれか 1 項に記載の微生物。

【請求項 39】

前記絹様ポリペプチドが 1 つ以上の反復配列
 $\{GGY-[GPG-X_1]_{n1}-GPS-(A)_{n2}\}_{n3}$

(配列番号 13) を含み、

50

式中、

X 1 = S G G Q Q (配列番号 1 4) または G A G Q Q (配列番号 1 5) または G Q G P Y (配列番号 1 6) または A G Q Q (配列番号 1 7) または S Q であり、

n 1 は 4 ~ 8 であり、

n 2 は 6 ~ 2 0 であり、かつ

n 3 は 2 ~ 2 0 である、

請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 4 0】

前記絹様ポリペプチドが配列番号 2 1 によりコードされるポリペプチド配列を含む、請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 4 1】

前記分泌シグナル配列が、配列番号 8 4、配列番号 8 6、配列番号 8 8、及び配列番号 9 0 からなる群より選択される、請求項 1 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の微生物。

【請求項 4 2】

ピキア・パストリス (*P i c h i a p a s t o r i s*) という微生物であって、

前記微生物の配列番号 1 を含む s e c 7 2 遺伝子がノックアウトされており、

組換えで発現される配列番号 3 を含む S S H 1 遺伝子、組換えで発現される配列番号 5 を含む S S S 1 遺伝子、及び組換えで発現される配列番号 7 を含む S B H 2 遺伝子を含み、酵母由来の分泌シグナル配列及び配列番号 2 1 によりコードされるポリペプチドを含む絹様ポリペプチドを含む組換えで発現されるタンパク質を含み、かつ

前記分泌シグナル配列が、P E P 4 シグナル配列、C P Y + 4 シグナル配列、D A P 2 シグナル配列、及び M F α 1 シグナル配列から選択される、前記微生物。

【請求項 4 3】

請求項 1 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の微生物を含む、細胞培養物。

【請求項 4 4】

標準的な細胞培養条件下において、組換えで発現される S S H 1 トランスロコン複合体を含まない細胞培養物と比較して、株の増殖速度及び発酵能力が向上している、請求項 5 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の微生物を含む細胞培養物。

【請求項 4 5】

請求項 5 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の微生物を含む細胞培養物であって、

標準的な細胞培養条件下において、

機能性 s e c 7 2 遺伝子を含みかつ組換えで発現される S S H 1 トランスロコン複合体を含まない点以外は同一の微生物であって、それぞれの微生物が同一数の組換え絹様ポリペプチド遺伝子のコピーを有する、前記微生物の細胞培養物と比較して、前記組換えタンパク質の収量または比生産性が向上している、前記細胞培養物。

【請求項 4 6】

請求項 1 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の微生物を、前記組換えで発現されるタンパク質の発現に好適な条件下で、培地中で培養する工程、及び

前記微生物または前記培地から前記組換えタンパク質を単離する工程を含む、組換えタンパク質の製造方法。

【請求項 4 7】

前記組換えタンパク質が前記微生物から分泌され、かつ、前記組換えタンパク質を単離する工程が、前記分泌された組換えタンパク質を含む培地を回収することを含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記 s e c 7 2 遺伝子が欠失していない点以外は同一な微生物と比較して、前記微生物における前記組換えタンパク質の収量または比生産性が増加する、請求項 4 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 49】

前記組換えで発現されるSSH1トランスロコン複合体を含まない、及び前記sec72遺伝子が欠失していない点以外は同一な、微生物と比較して、前記微生物における前記組換えタンパク質の収量または比生産性が増加する、請求項46に記載の方法。

【請求項 50】

酵母由来の分泌シグナル配列を含む組換えで発現されるタンパク質の分泌を改善するように*Pichia pastoris*を改変する方法であって、

前記方法がSEC72タンパク質をコードする遺伝子をノックアウトする工程を含み、前記組換えで発現されるタンパク質が絹タンパク質由来の少なくとも1つのブロックポリペプチド配列を含むか絹様タンパク質を含み、かつ

前記分泌シグナル配列が、PEP4シグナル配列、CPY+4シグナル配列、DAP2シグナル配列、及びMFα1シグナル配列から選択される、前記方法。

【請求項 51】

前記*Pichia pastoris*を、組換えで発現されるSSH1トランスロコン複合体をコードする遺伝子を含むベクターで形質転換する工程をさらに含む、請求項50に記載の方法。

【請求項 52】

前記絹様ポリペプチドが、1つ以上の反復配列{GGY-[GPG-X₁]_{n1}-GPS-(A)_{n2}}_{n3}(配列番号13)を含み、

式中、

X₁=SGGQQ(配列番号14)またはGAGQQ(配列番号15)またはGQGPY(配列番号16)またはAGQQ(配列番号17)またはSQであり、

n₁は4～8であり、

n₂は6～20であり、かつ

n₃は2～20である、

請求項50に記載の方法。

【請求項 53】

前記組換えで発現されるタンパク質が、配列番号21によりコードされるポリペプチド配列を含む、請求項50に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年5月17日出願の米国仮出願第62/673,001号の優先権を主張し、上記出願の内容は参照によりその全体が本明細書に援用される。

【0002】

発明の分野

本開示は、細胞からのタンパク質もしくは代謝物の分泌を増強させるための株の最適化方法に関する。本開示はまた、それらの方法から得られる組成物にも関する。特に、本開示は、酵母細胞であって、該酵母細胞により発現される組換えタンパク質の分泌を増強するように選択または遺伝子操作された上記酵母細胞、及び有用な化合物を製造するための酵母細胞の培養方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

メチロトロフ酵母ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)は組換えタンパク質の産生に広く使用されている。*P. pastoris*は高い細胞密度に増殖し、厳密に制御されたメタノール誘導性の導入遺伝子発現を提供し、合成培地中に組換え

10

20

30

40

50

タンパク質を分泌する能力を有する。

【0004】

しかしながら、発現される組換えタンパク質のかなりの部分が細胞内に残存し、このことによって回収が困難になり、かつ細胞の増殖及び寿命に悪影響が及ぶ場合がある。さらに、組換えで発現されるタンパク質が分泌される前に細胞中で分解されることもあり、その結果、組換えで発現されるタンパク質の断片と低収量の完全長組換えタンパク質とが含まれるタンパク質混合物が生じる。したがって、*P. pastoris*における分泌を増強させる一方で、如何なる組換えタンパク質の生産性の低下も減弱させる、または該生産性を向上させる手段、及び遺伝子操作された株が必要とされている。

【0005】

したがって、組換えタンパク質を産生及び分泌する一方で、細胞の増殖及び生産性に及ぼす如何なる悪影響も低減する改変生物、及びこれらの生物の使用方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

いくつかの実施形態において、本明細書では、SEC72の活性が消失した、またはsec72遺伝子が欠失した*Pichia pastoris*という微生物であって、組換えタンパク質を発現する上記微生物が提供される。いくつかの実施形態では、上記微生物は、組換えで発現されるSSH1トランスロコン複合体をさらに含む。

【0007】

いくつかの実施形態では、SEC72は、配列番号1と少なくとも95%同一なポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上記SEC72は配列番号1を含む。いくつかの実施形態では、上記SEC72はsec72遺伝子によりコードされる。いくつかの実施形態では、上記sec72遺伝子は、配列番号2と少なくとも95%同一なポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上記sec72遺伝子は配列番号2を含む。いくつかの実施形態では、上記sec72遺伝子は上記微生物の遺伝子座PAS_c h r 2 - 1 _ 0 4 4 8に存在する。

【0008】

いくつかの実施形態では、上記SSH1トランスロコン複合体は、配列番号4と少なくとも95%同一な第1のポリペプチド配列、配列番号6と少なくとも95%同一な第2のポリペプチド配列、及び配列番号8と少なくとも95%同一な第3のポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上記SSH1トランスロコン複合体は、配列番号4を含む第1のポリペプチド、配列番号6を含む第2のポリペプチド、及び配列番号8を含む第3のポリペプチドを含む。

【0009】

いくつかの実施形態では、上記微生物は組換えで発現されるトランスロコン複合体をさらに含む。いくつかの実施形態では、上記トランスロコン複合体は、組換えSSH1遺伝子、組換えSSS1遺伝子、及び組換えSBH2遺伝子から発現される。

【0010】

いくつかの実施形態では、上記SSH1遺伝子は配列番号3を含む。いくつかの実施形態では、上記SSH1遺伝子は、配列番号3と少なくとも95%同一なポリヌクレオチド配列を含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、上記SSH1遺伝子は配列番号5を含む。いくつかの実施形態では、上記SSH1遺伝子は、配列番号5と少なくとも95%同一なポリヌクレオチド配列を含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、上記SBH2遺伝子は配列番号7を含む。いくつかの実施形態では、上記SBH2遺伝子は、配列番号7と少なくとも95%同一なポリヌクレオチド配列を含む。

10

20

30

40

50

【0013】

いくつかの実施形態では、上記微生物における上記SSH1トランスロコンのレベルを、天然の生物によって発現される上記SSH1トランスロコンのレベルを超えて増加させるための上記組換えSSH1遺伝子の発現は、上記微生物の増殖速度及び／または発酵能力を向上させる。

【0014】

いくつかの実施形態では、上記トランスロコン複合体は、SSH1タンパク質、SSS1タンパク質、及びSBH2タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、上記SSH1タンパク質は、配列番号4と少なくとも95%同一なポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上記SSH1タンパク質は配列番号4を含む。いくつかの実施形態では、上記SSS1タンパク質は、配列番号6と少なくとも95%同一なポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上記SSS1タンパク質は配列番号6を含む。いくつかの実施形態では、上記SBH2タンパク質は、配列番号8と少なくとも95%同一なポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上記SBH2タンパク質が配列番号8を含む。

10

【0015】

いくつかの実施形態では、上記微生物中のYPS1-1プロテアーゼ及びYPS1-2プロテアーゼの活性は減弱または消失している。

【0016】

いくつかの実施形態では、上記YPS1-1プロテアーゼは、配列番号10と少なくとも95%同一なポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上記YPS1-1プロテアーゼは配列番号10を含む。いくつかの実施形態では、上記YPS1-1プロテアーゼはYPS1-1遺伝子によりコードされる。いくつかの実施形態では、上記YPS1-1遺伝子は、配列番号9と少なくとも95%同一なポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上記YPS1-1遺伝子は配列番号9を含む。いくつかの実施形態では、上記YPS1-1遺伝子は上記微生物の遺伝子座PAS__chr4__0584に存在する。

20

【0017】

いくつかの実施形態では、上記YPS1-2プロテアーゼは、配列番号12と少なくとも95%同一なポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上記YPS1-2プロテアーゼは配列番号12を含む。いくつかの実施形態では、上記YPS1-2プロテアーゼはYPS1-2遺伝子によりコードされる。いくつかの実施形態では、上記YPS1-2遺伝子は、配列番号11と少なくとも95%同一なポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上記YPS1-2遺伝子は配列番号11を含む。いくつかの実施形態では、上記YPS1-2遺伝子は上記微生物の遺伝子座PAS__chr3__1157に存在する。

30

【0018】

いくつかの実施形態では、上記微生物の上記YPS1-1遺伝子もしくは上記YPS1-2遺伝子、またはその両方が変異しているかあるいはノックアウトされている。いくつかの実施形態では、上記微生物の1種以上のさらなるプロテアーゼの活性が減弱または消失している。

40

【0019】

いくつかの実施形態では、上記組換えタンパク質は、絹タンパク質由来の少なくとも1つのブロックポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上記組換えタンパク質は絹様ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、上記絹様ポリペプチドは1つ以上の反復配列

{GGY-[GPG-X₁]_{n1}-GPS-(A)_{n2}}_{n3}

(配列番号13)を含み、式中、X₁=SGGQQ(配列番号14)またはGAGQQ(配列番号15)またはGQGPy(配列番号16)またはAGQQ(配列番号17)また

50

は S Q であり、n 1 は 4 ~ 8 であり、n 2 は 6 ~ 2 0 であり、かつ n 3 は 2 ~ 2 0 である。いくつかの実施形態では、上記絹様ポリペプチドは配列番号 2 1 によりコードされるポリペプチド配列を含む。

【0020】

いくつかの実施形態では、上記組換えタンパク質は分泌シグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態では、上記分泌シグナルペプチドは、P E P 4 シグナル配列、C P Y + 4 シグナル配列、D A P 2 シグナル配列、及び M F α 1 シグナル配列からなる群より選択される。いくつかの実施形態では、上記分泌シグナルペプチドは、配列番号 8 4、配列番号 8 6、配列番号 8 8、及び配列番号 9 0 からなる群より選択される。

【0021】

また本明細書では、いくつかの実施形態に従って、*P i c h i a p a s t o r i s* という微生物であって、上記微生物の S E C 7 2 の活性が消失し、または配列番号 1 を含む s e c 7 2 遺伝子がノックアウトされ、組換えで発現される配列番号 3 を含む S S H 1 遺伝子、組換えで発現される配列番号 5 を含む S S S 1 遺伝子、及び組換えで発現される配列番号 7 を含む S B H 2 遺伝子を含み、配列番号 2 1 によりコードされるポリペプチドを含む絹様ポリペプチドを含む、上記微生物も提供される。

【0022】

また本明細書では、いくつかの実施形態に従って、本明細書に記載の組換え微生物を含む細胞培養物も提供される。

【0023】

また本明細書では、いくつかの実施形態に従って、標準的な細胞培養条件下において、組換えで発現される S S H 1 トランスロコン複合体を含まない細胞培養物と比較して、株の増殖速度及び発酵能力が向上した、本明細書に記載の組換え微生物を含む細胞培養物も提供される。

【0024】

また本明細書では、いくつかの実施形態に従って、本明細書に記載の組換え微生物を含む細胞培養物であって、標準的な細胞培養条件下において、機能性 s e c 7 2 遺伝子を含み、かつ組換えで発現される S S H 1 トランスロコン複合体を含まない点以外は同一の微生物であり、それぞれの微生物が同一数の組換え絹ポリペプチド遺伝子のコピーを有する上記微生物の細胞培養物と比較して、上記組換えタンパク質の収量または比生産性が向上した、上記細胞培養物も提供される。

【0025】

また本明細書では、いくつかの実施形態に従って、本明細書に記載の組換え微生物を、上記組換えで発現されるタンパク質の発現に好適な条件下、培地中で培養すること、及び上記微生物または上記培地から上記組換えタンパク質を単離することを含む、組換えタンパク質の製造方法も提供される。

【0026】

いくつかの実施形態では、上記組換えタンパク質は上記微生物から分泌され、かつ、上記組換えタンパク質を単離することは、上記分泌された組換えタンパク質を含む培地を回収することを含む。

【0027】

いくつかの実施形態では、上記 s e c 7 2 遺伝子が欠失していない点以外は同一な微生物と比較して、上記微生物における上記組換えタンパク質の収量または比生産性が増加する。

【0028】

いくつかの実施形態では、上記組換えで発現される S S H 1 トランスロコン複合体を含まない、及び上記 s e c 7 2 遺伝子が欠失していない点以外は同一な微生物と比較して、上記微生物における上記組換えタンパク質の収量または比生産性が増加する。

【0029】

また本明細書では、いくつかの実施形態に従って、組換えで発現されるタンパク質の分

10

20

30

40

50

泌が改善するように *Pichia pastoris* を改変する方法であって、SEC72タンパク質をコードする遺伝子をノックアウトすることを含む上記方法も提供される。いくつかの実施形態では、上記組換えで発現されるタンパク質の分泌が改善するように *Pichia pastoris* を改変する方法は、上記 *Pichia pastoris* を、組換えで発現されるSSH1トランスロコン複合体をコードする遺伝子を含むベクターで形質転換することをさらに含む。

【0030】

いくつかの実施形態では、上記組換えで発現されるタンパク質は絹様ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、上記絹様ポリペプチドが1つ以上の反復配列 {GGY-[GP G-X₁]_{n1}-GPS-(A)_{n2}]_{n3} (配列番号13) を含み、式中、X₁=SGGQQ (配列番号14) またはGAGQQ (配列番号15) またはGQGPY (配列番号16) またはAGQQ (配列番号17) またはSQであり、n1は4~8であり、n2は6~20であり、かつn3は2~20である。いくつかの実施形態では、上記組換えで発現されるタンパク質は、配列番号21によりコードされるポリペプチド配列を含む。

【0031】

[本発明1001]

SEC72の活性が消失しているかまたはsec72遺伝子が欠失している、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) という微生物であって、組換えタンパク質を発現する、前記微生物。

[本発明1002]

前記SEC72が、配列番号1と少なくとも95%同一なポリペプチド配列を含む、本発明1001の微生物。

[本発明1003]

前記SEC72が配列番号1を含む、本発明1001の微生物。

[本発明1004]

前記SEC72がsec72遺伝子によりコードされる、本発明1001の微生物。

[本発明1005]

前記sec72遺伝子が、配列番号2と少なくとも95%同一なポリヌクレオチド配列を含む、本発明1001の微生物。

[本発明1007]

前記sec72遺伝子が配列番号2を含む、本発明1001の微生物。

[本発明1008]

前記sec72遺伝子が前記微生物の遺伝子座PAS__chr2-1__0448に存在する、本発明1001の微生物。

[本発明1009]

組換えで発現されるSSH1トランスロコン複合体をさらに含む、先行本発明のいずれかの微生物。

[本発明1010]

前記SSH1トランスロコン複合体が、配列番号4と少なくとも95%同一な第1のポリペプチド配列、配列番号6と少なくとも95%同一な第2のポリペプチド配列、及び配列番号8と少なくとも95%同一な第3のポリペプチド配列を含む、本発明1009の微生物。

[本発明1011]

前記SSH1トランスロコン複合体が、配列番号4を含む第1のポリペプチド、配列番号6を含む第2のポリペプチド、及び配列番号8を含む第3のポリペプチドを含む、本発明1009の微生物。

[本発明1012]

組換えで発現されるトランスロコン複合体をさらに含む、先行本発明のいずれかの微生物。

[本発明1013]

前記トランスロコン複合体が、組換えSSH1遺伝子、組換えSSS1遺伝子、及び組換

10

20

30

40

50

え S B H 2 遺伝子から発現される、本発明 1012 の微生物。

[本発明 1014]

前記 S S H 1 遺伝子が配列番号 3 を含む、本発明 1013 の微生物。

[本発明 1015]

前記 S S H 1 遺伝子が、配列番号 3 と少なくとも 95 % 同一なポリヌクレオチド配列を含む、本発明 1013 の微生物。

[本発明 1017]

前記 S S H 1 遺伝子が配列番号 5 を含む、本発明 1013 の微生物。

[本発明 1018]

前記 S S H 1 遺伝子が、配列番号 5 と少なくとも 95 % 同一なポリヌクレオチド配列を含む、本発明 1013 の微生物。

[本発明 1020]

前記 S B H 2 遺伝子が配列番号 7 を含む、本発明 1013 の微生物。

[本発明 1021]

前記 S B H 2 遺伝子が、配列番号 7 と少なくとも 95 % 同一なポリヌクレオチド配列を含む、本発明 1013 の微生物。

[本発明 1023]

前記微生物における前記 S S H 1 トランスロコンのレベルを、天然の生物によって発現される前記 S S H 1 トランスロコンのレベルを超えて増加させるための前記組換え S S H 1 遺伝子の発現が、前記微生物の増殖速度及び／または発酵能力を向上させる、本発明 1013 の微生物。

[本発明 1024]

前記トランスロコン複合体が、S S H 1 タンパク質、S S S 1 タンパク質、及び S B H 2 タンパク質を含む、本発明 1012 の微生物。

[本発明 1025]

前記 S S H 1 タンパク質が、配列番号 4 と少なくとも 95 % 同一なポリペプチド配列を含む、本発明 1024 の微生物。

[本発明 1026]

前記 S S H 1 タンパク質が配列番号 4 を含む、本発明 1024 の微生物。

[本発明 1027]

前記 S S S 1 タンパク質が、配列番号 6 と少なくとも 95 % 同一なポリペプチド配列を含む、本発明 1024 の微生物。

[本発明 1028]

前記 S S S 1 タンパク質が配列番号 6 を含む、本発明 1024 の微生物。

[本発明 1029]

前記 S B H 2 タンパク質が、配列番号 8 と少なくとも 95 % 同一なポリペプチド配列を含む、本発明 1024 の微生物。

[本発明 1030]

前記 S B H 2 タンパク質が配列番号 8 を含む、本発明 1024 の微生物。

[本発明 1031]

Y P S 1-1 プロテアーゼ及び Y P S 1-2 プロテアーゼの活性が、減弱または消失している、先行本発明のいずれかの微生物。

[本発明 1032]

前記 Y P S 1-1 プロテアーゼが、配列番号 10 と少なくとも 95 % 同一なポリペプチド配列を含む、本発明 1031 の微生物。

[本発明 1033]

前記 Y P S 1-1 プロテアーゼが配列番号 10 を含む、本発明 1031 の微生物。

[本発明 1034]

前記 Y P S 1-1 プロテアーゼが Y P S 1-1 遺伝子によりコードされる、本発明 1031 の微生物。

10

20

30

40

50

[本発明1035]

前記Y P S 1-1遺伝子が、配列番号9と少なくとも95%同一なポリヌクレオチド配列を含む、本発明1034の微生物。

[本発明1037]

前記Y P S 1-1遺伝子が配列番号9を含む、本発明1034の微生物。

[本発明1038]

前記Y P S 1-1遺伝子が前記微生物の遺伝子座P A S __ c h r 4 __ 0584に存在する、本発明1034の微生物。

[本発明1039]

前記Y P S 1-2プロテアーゼが、配列番号12と少なくとも95%同一なポリペプチド配列を含む、先行本発明のいずれかの微生物。

10

[本発明1040]

前記Y P S 1-2プロテアーゼが配列番号12を含む、本発明1031の微生物。

[本発明1041]

前記Y P S 1-2プロテアーゼがY P S 1-2遺伝子によりコードされる、本発明1031の微生物。

[本発明1042]

前記Y P S 1-2遺伝子が、配列番号11と少なくとも95%同一なポリヌクレオチド配列を含む、本発明1041の微生物。

[本発明1044]

20

前記Y P S 1-2遺伝子が配列番号11を含む、本発明1041の微生物。

[本発明1045]

前記Y P S 1-2遺伝子が前記微生物の遺伝子座P A S __ c h r 3 __ 1157に存在する、本発明1041の微生物。

[本発明1046]

前記Y P S 1-1遺伝子もしくは前記Y P S 1-2遺伝子またはその両方が、変異しているまたはノックアウトされている、本発明1031~1045のいずれかの微生物。

[本発明1047]

1種以上のさらなるプロテアーゼの活性が減弱または消失している、本発明1031~1046のいずれかの微生物。

30

[本発明1048]

前記組換えタンパク質が、絹タンパク質由来の少なくとも1つのブロックポリペプチド配列を含む、先行本発明のいずれかの微生物。

[本発明1049]

前記組換えタンパク質が絹様ポリペプチドを含む、先行本発明のいずれかの微生物。

[本発明1050]

前記絹様ポリペプチドが1つ以上の反復配列
{GGY-[GPG-X₁]_{n1}-GPS-(A)_{n2}}_{n3}

を含み、

40

式中、

X₁=S G G Q QまたはG A G Q QまたはG Q G P YまたはA G Q QまたはS Qであり、

n₁は4~8であり、

n₂は6~20であり、かつ

n₃は2~20である、

本発明1049の微生物。

[本発明1051]

前記絹様ポリペプチドが配列番号21によりコードされるポリペプチド配列を含む、本発明1049の微生物。

[本発明1052]

50

前記組換えタンパク質が分泌シグナルペプチドを含む、先行本発明のいずれかの微生物。
[本発明1053]

前記分泌シグナルペプチドが、PEP4シグナル配列、CPY+4シグナル配列、DAP2シグナル配列、及びMF α 1シグナル配列からなる群より選択される、本発明1052の微生物。

[本発明1054]

前記分泌シグナルペプチドが、配列番号84、配列番号86、配列番号88、及び配列番号90からなる群より選択される、本発明1052の微生物。

[本発明1055]

ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) という微生物であって、
前記微生物のSEC72の活性が消失しているか、または配列番号1を含むsec72遺伝子がノックアウトされており、

組換えで発現される配列番号3を含むSSH1遺伝子、組換えで発現される配列番号5を含むSSS1遺伝子、及び組換えで発現される配列番号7を含むSBH2遺伝子を含み、かつ

配列番号21によりコードされるポリペプチドを含む絹様ポリペプチドを含む、
前記微生物。

[本発明1056]

本発明1001～1055のいずれかの微生物を含む、細胞培養物。

[本発明1057]

標準的な細胞培養条件下において、組換えで発現されるSSH1トランスロコン複合体を含まない細胞培養物と比較して、株の増殖速度及び発酵能力が向上している、本発明1009～1055のいずれかの微生物を含む細胞培養物。

[本発明1058]

本発明1009～1055のいずれかの微生物を含む細胞培養物であって、
標準的な細胞培養条件下において、

機能性sec72遺伝子を含みかつ組換えで発現されるSSH1トランスロコン複合体を含まない点以外は同一の微生物であって、それぞれの微生物が同一数の組換え絹ポリペプチド遺伝子のコピーを有する、前記微生物
の細胞培養物と比較して、前記組換えタンパク質の収量または比生産性が向上している、
前記細胞培養物。

[本発明1059]

本発明1001～1055のいずれかの微生物を、前記組換えで発現されるタンパク質の発現に好適な条件下で、培地中で培養する工程、及び

前記微生物または前記培地から前記組換えタンパク質を単離する工程
を含む、組換えタンパク質の製造方法。

[本発明1060]

前記組換えタンパク質が前記微生物から分泌され、かつ、前記組換えタンパク質を単離する工程が、前記分泌された組換えタンパク質を含む培地を回収することを含む、本発明1059の方法。

[本発明1061]

前記sec72遺伝子が欠失していない点以外は同一な微生物と比較して、前記微生物における前記組換えタンパク質の収量または比生産性が増加する、本発明1059の方法。

[本発明1062]

前記組換えで発現されるSSH1トランスロコン複合体を含まない、及び前記sec72遺伝子が欠失していない点以外は同一な、微生物
と比較して、前記微生物における前記組換えタンパク質の収量または比生産性が増加する、
本発明1059の方法。

[本発明1063]

組換えで発現されるタンパク質の分泌を改善するように *Pichia pastoris*

10

20

30

40

50

sを改変する方法であって、SEC72タンパク質をコードする遺伝子をノックアウトする工程を含む、前記方法。

[本発明1064]

前記*Pichia pastoris*を、組換えで発現されるSSH1トランスロコン複合体をコードする遺伝子を含むベクターで形質転換する工程をさらに含む、本発明1063の方法。

[本発明1065]

前記組換えで発現されるタンパク質が絹様ポリペプチドを含む、本発明1063の方法。

[本発明1066]

前記絹様ポリペプチドが、1つ以上の反復配列 $\{GGY-[GPG-X_1]_{n1}-GPS-(A)_{n2}\}_{n3}$ を含み、

式中、

$X_1 = SGGQQ$ または $GAGQQ$ または $GQGPY$ または $AGQQ$ または SQ であり、

$n1$ は4~8であり、

$n2$ は6~20であり、かつ

$n3$ は2~20である、

本発明1063の方法。

[本発明1067]

前記組換えで発現されるタンパク質が、配列番号21によりコードされるポリペプチド配列を含む、本発明1063の方法。

前述の及び他の目的、特徴、ならびに利点は、添付の図面で例示する、本発明の個々の実施形態の以下の説明から明らかとなるが、これらの図面において、異なる視図を通して同様の参照符号は同一の部分を目指す。図面は必ずしも一定の縮尺で描かれているわけではなく、むしろ本発明のさまざまな実施形態の原理を例示することに重点が置かれている。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】分泌複合体SEC、SEC61、SEC63、及びSSH1における遺伝子の分類を示す図である。また、*S. cerevisiae* (*S. cerevisiae*) と *P. pastoris* のトランスロコン複合体の間の相同性の値も示す。

【図2】SEC72ホモロジーアームが隣接する酵母選択マーカを含むSEC72欠失のためのベクターのプラスミドマップである。

【図3】SSH1複合体を含むタンパク質をコードする過剰発現のためのベクターのプラスミドマップである。プロモーター、オープンリーディングフレーム(ORF)、及びSBH2、SSS1、及びSSH1用のターミネーター、ならびに酵母選択マーカを含む。

【図4-1】図4Aは、標的プロテアーゼ遺伝子欠失のためのホモロジーアームと共に用いるノーセオスリシンマーカを含むベクターのプラスミドマップである。

【図4-2】図4Bは、ノーセオスリシン耐性マーカに隣接する所望のプロテアーゼ遺伝子を標的指向化するホモロジーアームを有する、プロテアーゼノックアウトのためのカセットを示す図である。図4Cは、ノーセオスリシン耐性マーカに隣接する所望のプロテアーゼ遺伝子を標的指向化するホモロジーアームを有する、プロテアーゼノックアウトのためのカセットを示す図である。

【図5】分泌シグナル及びFLAGタグを含む、絹様ポリペプチドを発現するためのオープンリーディングフレーム(ORF)を含むベクターのプラスミドマップである。上記ORFはpGCW14プロモーター及びtAOX1ターミネーターに作動可能に連結している。上記ベクターは、形質転換が成功した細胞を選択するための選択マーカも含む。

【図6】酵素結合免疫吸着測定法(すなわち、ELISA)により測定した、2X、4X、または6Xコピーの18Bを発現する野生型(WT)株及び $\Delta sec72$ (Δ) 株により発現される、組換え18B絹様ポリペプチドの分泌を示す図である。

【図7】野生型(WT)株及び $\Delta sec72$ (Δ) 株により発現され、ELISAにより測定したPEP4(sc)、CPY+4(sc)、DAP2(sc)、またはMF α 1(

10

20

30

40

50

s c) シグナルペプチドを含む組換えタンパク質の分泌を示す図である。(s c)は*S. cerevisiae*由来のシグナルペプチドを示す。

【図8】野生型(WT)株及び Δ sec72(Δ)株により発現され、ELISAにより測定した、長い絹ポリペプチド、アルギオペ・ブルエンニチ(*Argiope brunni*)大瓶状腺スピドロイン2(すなわち、AbMaSp2)(106kDa)、及びラトロデクツス・ヘスペルス(*Latrodectus hesperus*)大瓶状腺スピドロイン1(すなわち、LhMaSp1(55kDa))の分泌を示す図である。

【図9A】野生型(WT)株、 Δ sec72(Δ)株、pTHI11の制御下においてsec72を過剰発現する株、及びDAMP(Decreased Abundance by mRNA Perturbation(mRNA摂動による存在量の減少))によりSEC72がノックダウンされた株によって発現され、ELISAにより測定した組換え18B絹様ポリペプチドの分泌を示す図である。

10

【図9B】野生型(WT)株、SEC63複合体(すなわち、sec62、sec63、及びsec66)由来の非SEC72タンパク質を過剰発現する株、及びsec72を過剰発現する株によって発現され、ELISAにより測定した組換え18B絹様ポリペプチドの分泌を示す図である。

【図10A】WT株からの倍率変化としての、 Δ sec72株における参照に対して正規化した発現を示す図である。網掛けは範囲を示し、中央の線はn=3の生物学的な繰り返し実験(Δ sec72のn=2を除く)間の中央値を表す。

20

【図10B】中心化した、対数スケールでの、参照に対して正規化した発現データの、主成分空間上への投影図(左図=PC1対PC3、右図=PC2対PC3)を示す。株の遺伝子型により繰り返し実験データを色分けし、これにより、遺伝子型間の変動に比較して、遺伝子型内の変動が低いことが示される。

【図11】WT株及び Δ sec72株について観測された増殖速度、及びそれぞれの増殖速度のSSH1トランスロコン複合体またはSEC61を過剰発現するように改変した株の増殖速度との比較を示す図である。

【図12A】 Δ sec72株(4x、 Δ sec72)及びSSH1トランスロコン複合体を過剰発現する Δ sec72株(4x、 Δ sec72、2N SSH1)と比較した、4(4x)または6(4+2x)コピーの18Bを発現する野生型(WT)株の、グルコースの関数としての18Bの産生(収量)を示す図である。

30

【図12B】各株の比生産性(バイオマス当りの産生物)を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0033】

詳細な説明

本発明のさまざまな実施形態の詳細を以下の説明に記載する。本発明の他の特徴、目的、及び利点は、説明及び図面から、ならびに特許請求の範囲から明らかとなる。

【0034】

定義

本明細書中で別段の定義がない限り、本発明との関連で使用される科学用語及び技術用語は当業者が共通して理解する意味を持つものとする。さらに、文脈に別段の必要性がない限り、単数形の用語には複数形が含まれるものとし、複数形の用語には単数形が含まれるものとする。用語「a」及び「an」には、文脈上別段の指示がない限り、複数の指示対象が含まれる。一般に、本明細書に記載する生化学、酵素学、分子細胞生物学、微生物学、遺伝学ならびにタンパク質及び核酸化学ならびにハイブリダイゼーションとの関連で使用される術語及びそれらに関する技術は、当該技術分野で周知の一般的に使用されるものである。

40

【0035】

別段の指示がない限り、以下の用語は以下の意味を持つものと理解されるべきである。

【0036】

50

用語「ポリヌクレオチド」または「核酸分子」とは、少なくとも10塩基長ある、ヌクレオチドの重合体形態を指す。かかる用語には、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNAもしくは合成DNA）及びRNA分子（例えば、mRNAまたは合成RNA）、ならびに非天然型ヌクレオチド類似体、非天然ヌクレオシド間結合、またはその両方を含有するDNAもしくはRNAの類似体が含まれる。核酸は、どのような形態学的コンホメーションにあってもよい。例えば、核酸は、一本鎖、二本鎖、三本鎖、四重鎖、部分的二本鎖、分岐鎖、ヘアピン状、環状、またはパドロックドコンホメーションであってもよい。

【0037】

別段の指示がない限り、「配列番号」という一般形式で本明細書に記載のあらゆる配列についての一例として、「配列番号1を含む核酸」とは、少なくとも一部に、(i) 配列番号1に記載の配列を有するか、または(ii) 配列番号1に相補的な配列を有する核酸を指す。二者択一は文脈により決定される。例えば、核酸がプローブとして使用されている場合は、プローブは所望の標的に相補的でなければならないという要件により二者択一が決定される。

10

【0038】

用語「組換え型」とは、生体分子、例えば、遺伝子またはタンパク質であって、(1) その天然に生じる環境から除かれているもの、(2) 自然界ではその遺伝子が見られるポリヌクレオチドの全部または一部に会合していないもの、(3) 自然界では連結していないポリヌクレオチドに作動可能に連結されているもの、または(4) 自然界では生じないものを指す。「組換え型」という用語は、クローン化DNA分離物、化学合成ポリヌクレオチド類似体、または、異種系により生物学的に合成されたポリヌクレオチド類似体、ならびにかかる核酸によりコードされるタンパク質及び／またはmRNAに関して用いてもよい。

20

【0039】

生物ゲノムの内在性核酸配列（またはその配列によりコードされるタンパク質産物）の発現が変化するように、この内在性核酸配列に隣接して異種配列が置かれている場合、その内在性核酸配列は本明細書では「組換え型」とみなされる。この場合、異種配列は、その異種配列がそれ自体内在性（同一宿主細胞またはその子孫由来）または外因性（異なる宿主細胞またはその子孫由来）であるか否かにかかわらず、天然では内在性核酸配列に隣接していない配列である。例として、プロモーター配列は、宿主細胞のゲノムに存在する遺伝子の天然プロモーターを（例えば、相同組換えにより）置換して、この遺伝子の発現パターンが変化するようにすることができる。ここで、この遺伝子は、天然ではそれに隣接している配列の少なくともいくつかの配列から分離されているため「組換え型」と考えられるであろう。

30

【0040】

核酸もまた、それが、ゲノム中の対応する核酸に対する、天然では生じない何らかの改変を含有する場合に「組換え型」とみなされる。例えば、内在性コード配列は、それが人為的に、例えば、人の介入などによって導入された挿入、欠失または点変異を含有する場合は「組換え型」とみなされる。「組換え核酸」には、宿主細胞染色体内の非相同部位に組み込まれた核酸、及びエピソームとして存在する核酸構築体も含まれる。

40

【0041】

本明細書で使用する場合、参照核酸配列の「縮重バリエント」という語句は、標準的遺伝暗号に従って翻訳され、参照核酸配列から翻訳されるアミノ酸配列と同一なアミノ酸配列を提供することができる核酸配列を包含する。用語「縮重オリゴヌクレオチド」または「縮重プライマー」は、必ずしも配列は同一ではないが1つ以上の特定セグメント内部で互いに相同な標的核酸配列とハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを意味するために使用される。

【0042】

核酸配列において「配列同一性(%)」または「同一な」という用語は、2つの配列中

50

の残基で、一致度が最大となるよう整列させた場合に同じになるものを指す。配列同一性を比較する長さは、少なくとも約9ヌクレオチド、通常は少なくとも約20ヌクレオチド、より一般的には少なくとも約24ヌクレオチド、一般的には少なくとも約28ヌクレオチド、より一般的には少なくとも約32ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約36以上のヌクレオチドの領域にわたる場合がある。ヌクレオチド配列同一性を測定するために使用できる当該技術分野で公知の異なるアルゴリズムが多数ある。例えば、ポリヌクレオチド配列は、Wisconsin Package バージョン10.0 (Genetics Computer Group (GCG)、Madison、Wis) に同梱のプログラムであるFASTA、GapまたはBestfitを使用して比較することができる。FASTAは、問い合わせ配列と検索配列の間で最も重複している領域のアラインメント及び配列同一性(%)を提供する。Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990) (参照によりその全体が本明細書に援用される)。例えば、核酸配列間の配列同一性(%)は、参照により本明細書に援用されるGCG バージョン6.1で提供されるとおり、FASTAをそのデフォルトのパラメータ(文字列サイズは6、またスコア行列のファクターはNOPAM)で使用するか、またはGapをそのデフォルトのパラメータを使用して決定することができる。別法として、配列はコンピュータプログラムのBLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)、Gish and States, Nature Genet. 3:266-272 (1993)、Madden et al., Meth. Enzymol. 266:131-141 (1996)、Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)、Zhang and Madden, Genome Res. 7:649-656 (1997))、特にblastpまたはtblastn (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997))を使用して比較することができる。

【0043】

核酸またはその断片に言及した際の「実質的な相同性」または「実質的な類似性」という用語は、ヌクレオチドの適切な挿入または欠失を用いて別の核酸(またはその相補鎖)と至適に整列させた場合に、上述のようなFASTA、BLASTまたはGapなどの周知の配列同一性アルゴリズムのいずれかで測定したヌクレオチド配列同一性が、ヌクレオチド塩基の少なくとも約75%、80%、85%、好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%または99%においてあることを示す。

【0044】

本発明の核酸(ポリヌクレオチドとも呼ばれる)には、RNA、cDNA、ゲノムDNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方、ならびに上記の合形成態及び混合ポリマーが含まれる場合がある。それらは、当業者に容易に理解されるように、化学的または生化学的に改変されてもよく、また非天然または誘導体化されたヌクレオチド塩基を含有してもよい。かかる改変としては、例えば、標識、メチル化、類似体を用いた1つ以上の天然に生じるヌクレオチドの置換、ヌクレオチド間改変、例えば、非荷電結合(例えば、メチルホスホナート、ホスホトリエステル、ホスホルアミダート、カルバメート等)、荷電結合(例えば、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート等)、ペンダント部分(例えば、ポリペプチド)、インターカレーター(例えば、アクリジン、プソラレン等)、キレート剤、アルキル化剤、及び結合の改変(例えば、アルファアノマー型核酸等)などが挙げられる。また、水素結合及び他の化学的相互作用を介して指定配列に結合する能力においてポリヌクレオチドを模倣する合成分子も挙げられる。かかる分子は当該技術分野で公知であり、例えば、分子骨格にあるリン酸結合がペプチド結合で置換されるものなどが含まれる。他の改変としては、例えば、リボース環が架橋部分または他の構造、例えば、「ロックド」核酸に見られる改変などを含有している類似体を挙げることができる。

【0045】

「変異した」という用語は、核酸配列に適用する場合、ある核酸配列内のヌクレオチドが参照核酸配列と比較した場合に挿入、欠失または変更されていることを意味する。ある遺伝子座において単一の変異（点変異）を行ってよく、また複数のヌクレオチドについて単一遺伝子座における挿入、欠失または変更を行ってもよい。さらに、ある核酸配列内で任意の数の遺伝子座において1つ以上の変異を行ってよい。核酸配列は、当該技術分野で公知の任意の方法で変異させてよく、これには、「エラーブローンPCR」（PCR産物の全長にわたり高率の点変異が得られるようDNAポリメラーゼの複製忠実度が低い条件下でPCRを実施する方法であり、例えば、Leung et al., *Technique*, 1:11-15 (1989) 及び Caldwell and Joyce, *PCR Methods Applic.* 2:28-33 (1992) を参照のこと）、及び「オリゴヌクレオチド指定突然変異」（対象の任意のクローン化DNAセグメントにおいて部位特異的変異の発生を可能にする方法であり、例えば、Reidhaar-Olson and Sauer, *Science* 241:53-57 (1988) を参照のこと）など変異誘発技術が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0046】

本明細書で使用する場合、用語「減弱させる」とは一般に機能的欠失を指し、これには、変異、部分的欠失もしくは完全欠失、挿入、または遺伝子配列、もしくは遺伝子配列の転写を制御する配列に対して行われる他の変更が含まれ、これにより遺伝子産物の産生を低減もしくは阻害するかまたは遺伝子産物を非機能的にする。いくつかの例では、機能的欠失はロックアウト変異として表される。減弱には、核酸配列を変化させること、遺伝子をより活性が低いプロモーターの制御下に置くこと、下方制御させること、対象遺伝子を標的とする干渉RNA、リボザイムもしくはアンチセンスの配列を発現させることによるアミノ酸配列の変更、または当該技術分野で公知の他の任意の技術を介したアミノ酸配列の変更も含まれる。一例では、フィードバック阻害または産物でも反応体でもない組成物によって生じる阻害に対する特定酵素の感受性（経路非特異的フィードバック）を低くして、酵素活性が化合物の存在による影響を受けないようにする。他の場合において、活性が低くなるよう変化させた酵素を減弱しているといってもよい。

【0047】

本明細書で使用する場合、用語「欠失」とは、核酸分子から1つ以上のヌクレオチドを、またはタンパク質から1つ以上のアミノ酸を除去し、その両側の領域が互いに連結されていることを指す。

【0048】

本明細書で使用する場合、用語「ロックアウト」とは、発現または活性のレベルがゼロまで低下させられている遺伝子を指すことが意図される。いくつかの例では、遺伝子は、そのコード配列の一部または全部を欠失させることによりロックアウトされる。他の例では、遺伝子は、1つ以上のヌクレオチドをそのオープンリーディングフレーム内に導入し、それによりナンセンスタンパク質産物の翻訳、そうでない場合は非機能性タンパク質産物の翻訳をもたらすことによりロックアウトされる。

【0049】

本明細書で使用する場合、用語「ベクター」とは、それに連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指すことが意図される。ベクターの一種は「プラスミド」であり、これは一般に、環状二本鎖のDNAループで、その中にさらなるDNAセグメントを連結することができるものを指すが、直鎖状二本鎖分子、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による増幅から生じるもの、または環状プラスミドの制限酵素での処理から生じるものなども含まれる。他のベクターとしては、コスミド、細菌人工染色体（BAC）及び酵母人工染色体（YAC）が挙げられる。ベクターのもう一種はウイルスベクターであり、ウイルスベクターにおいては、さらなるDNAセグメントがウイルスゲノム内に連結されていてもよい（下記で詳述）。特定のベクターは、それが導入されている宿主細胞での自己複製能がある（例えば、宿主細胞で機能する複製起点を有するベクター）。他のベクターは、宿主細胞内に導入される際にその宿主細胞のゲノムに組み込まれる場合

があるため、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、特定の好ましいベクターは、それらが作動可能に連結されている遺伝子の発現を導くことができる。かかるベクターを本明細書では「組換えで発現されるベクター」（または単に「発現ベクター」）と呼ぶ。

【0050】

「作動可能に連結された (Operatively linked)」または「作動可能に連結された (operably linked)」発現制御配列とは、その発現制御配列が対象遺伝子に隣接して、かかる対象遺伝子を制御する連結、ならびにトランスに作用するかまたは離れて作用して対象遺伝子を制御する発現制御配列を指す。

【0051】

用語「発現制御配列」とは、それが作動可能に連結されたコード配列の発現に影響を与えるために必要なポリヌクレオチド配列を指す。発現制御配列は、核酸配列の転写、転写後事象及び翻訳を制御する配列である。発現制御配列には、転写開始、転写終結、プロモーター及びエンハンサーの適切な配列；効率的なRNAプロセッシングシグナル、例えば、スプライシング及びポリアデニル化のシグナルなど；細胞質mRNAを安定化させる配列；翻訳効率を高める配列（例えば、リボソーム結合部位）；タンパク質安定性を高める配列；及び必要に応じ、タンパク質の分泌を高める配列が含まれる。かかる制御配列の性質は宿主生物に応じて異なり、原核生物では、かかる制御配列には一般にプロモーター、リボソーム結合部位、及び転写終結配列が含まれる。用語「制御配列」には、最低でも、発現にその存在が不可欠とされる全構成成分が含まれることが意図され、存在していると都合がよい追加の構成成分、例えば、リーダー配列及び融合パートナー配列などが含まれていてもよい。

【0052】

用語「調節エレメント」とは、核酸分子の転写または翻訳に影響を与える任意の要素を指す。これらには、例として、調節タンパク質（例えば、転写因子）、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、RNAi分子、アンチセンスRNA分子、マイクロRNA及びRNAアプタマーが含まれるが、これに限定されない。調節エレメントは宿主生物にとって内在性であってよい。調節エレメントは宿主生物にとって外因性であってよい。調節エレメントは、合成により発生した調節エレメントであってよい。

【0053】

本明細書で使用する場合、用語「プロモーター」、「プロモーターエレメント」、または「プロモーター配列」とは、対象のヌクレオチド配列に連結させた場合に、その対象ヌクレオチド配列のmRNAへの転写を制御することができるDNA配列を指す。プロモーターは一般的に、必ずその位置というわけではないが、そのプロモーターによってmRNAへの転写が制御される対象ヌクレオチド配列の5'（すなわち、上流）に位置し、RNAポリメラーゼ及び転写開始用の他の転写因子が特異的に結合する部位を提供する。プロモーターは宿主生物にとって内在性であってよい。プロモーターは宿主生物にとって外因性であってよい。プロモーターは、合成により発生した調節エレメントであってよい。

【0054】

本明細書に記載の組換え遺伝子を発現させるために有用なプロモーターには、構成的プロモーター及び誘導性／抑制性プロモーターの両方が含まれる。本発明の遺伝子操作された生物において複数の組換え遺伝子を発現させる場合、かかる異なる遺伝子は、異なるプロモーターによっても、また別々のオペロン中の同一プロモーターによっても制御することができ、また2つ以上の遺伝子の発現を、オペロンの一部としての単一プロモーターにより制御してもよい。

【0055】

本明細書で使用する場合、用語「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）とは、組換えベクターが導入されている細胞を指すことが意図される。かかる用語により、特定の対象細胞だけではなく、かかる細胞の子孫も指すことが意図されることを理解されるべきである。変異または環境の影響により継代とともに特定の改変が起こり得るため、かかる子孫は事実、親細胞と同一ではない場合があるが、それでも本明細書で使用する用語「

宿主細胞」の範囲内に含まれる。組換え宿主細胞は単離された細胞であっても培養で増殖させた細胞株であってもよく、または生きている組織もしくは生物中に存在している細胞であってもよい。

【0056】

本明細書で使用する場合、用語「野生型」（すなわち、「WT」）とは、議論の対象である改変がなされていない比較用の株を指す。野生型は天然株、未改変株を指すのではなく、選択された改変がなされていない株を指す。例えば、組換え絹ポリペプチドを発現するように改変された2つのバージョンの組換え株であって、一方がsec72 KOである上記組換え株を比較する場合には、上記KO株はΔsec72株と呼ばれる場合がある一方、もう一方のバージョンは「WT」と呼ばれる。

10

【0057】

本明細書で使用する場合、用語「ペプチド」とは、短いポリペプチド、例えば、一般的に約50アミノ酸長より短い、より一般的には約30アミノ酸長より短いものを指す。本明細書で使用する用語は、類似体ならびに構造機能を模倣することで生物学的機能を模倣する模倣物を包含する。

【0058】

用語「ポリペプチド」は、天然に生じるタンパク質と天然に生じないタンパク質の両方、ならびにその断片、変異体、誘導体及び類似体を包含する。ポリペプチドはモノマーでもポリマーでもよい。さらに、ポリペプチドは、各々が1つ以上の別個の活性を有する多数の異なるドメインを含んでよい。

20

【0059】

「単離されたタンパク質」または「単離されたポリペプチド」という用語は、その起源または誘導体源という点で、（1）その天然の状態ではそれに付随する天然の会合成分と会合していないタンパク質またはポリペプチド、（2）自然界では見られない純度で存在するタンパク質またはポリペプチドであり、その場合、純度は、他の細胞物質の存在に関して判定可能である（例えば、同一種由来の他のタンパク質を含まない）、（3）異なる種から得た細胞が発現するタンパク質またはポリペプチド、または（4）自然界では生じないタンパク質またはポリペプチド（例えば、自然界に見られるポリペプチドの断片であるか、または自然界では見られないアミノ酸類似体もしくはアミノ酸誘導体または標準ペプチド結合以外の結合が含まれているもの）である。したがって、化学的に合成されたポリペプチド、または天然での起源となる細胞とは異なる細胞系で合成されたポリペプチドは、その天然での会合成分から「単離されている」。ポリペプチドまたはタンパク質は、当該技術分野で周知のタンパク質精製技術を使用して単離することにより、天然での会合成分を実質的に含まないようにしてもよい。このように定義した場合、「単離された」とは、そのように記載されたタンパク質、ポリペプチド、ペプチドまたはオリゴペプチドが必ずしもその天然の環境から物理的に除かれている必要はない。

30

【0060】

用語「ポリペプチド断片」とは、完全長ポリペプチドと比較して欠失を有する、例えば、アミノ末端及び／またはカルボキシ末端などの欠失を有するポリペプチドを指す。好ましい実施形態では、ポリペプチド断片は、その断片のアミノ酸配列が天然に生じる配列での対応する位置と同一な連続配列である。断片は一般的に、少なくとも5、6、7、8、9または10アミノ酸長、好ましくは少なくとも12、14、16または18アミノ酸長、より好ましくは少なくとも20アミノ酸長、より好ましくは少なくとも25、30、35、40または45アミノ酸、よりさらに好ましくは少なくとも50または60アミノ酸長、よりさらに好ましくは少なくとも70アミノ酸長である。

40

【0061】

あるタンパク質をコードする核酸配列が、第2のタンパク質をコードする核酸配列と類似の配列を有する場合、そのタンパク質は第2のタンパク質に対し「相同性」を有するかまたは「相同」である。あるいは、あるタンパク質が第2のタンパク質に対する相同性を有するのは、その2つのタンパク質が「類似の」アミノ酸配列を有する場合である。（し

50

たがって、「相同タンパク質」という用語は、2つのタンパク質が類似のアミノ酸配列を有することを意味すると定義される）。本明細書で使用する場合、2つのアミノ酸配列領域間の相同性（特に、予測される構造類似性に関して）は、機能における類似性を意味すると解釈される。

【0062】

タンパク質またはペプチドに関して「相同」を使用する場合、同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換が異なることが多いと認識される。「保存的アミノ酸置換」は、あるアミノ酸残基が、化学的性質（例えば、電荷または疎水性）が類似する側鎖（R基）を持つ別のアミノ酸残基により置換されているものである。一般に、保存的アミノ酸置換ではタンパク質の機能特性は実質的に変化しない。2つ以上のアミノ酸配列が保存的置換により互いに異なっている場合、配列同一性（%）または相同性の程度を上方修正してその置換の保存的性質について補正してよい。こうした修正を行う手段は当業者に周知である。例えば、Pearson, 1994, *Methods Mol. Biol.* 24:307-31及び25:365-89（参照により本明細書に援用される）を参照のこと。

【0063】

20種の従来のアミノ酸及びそれらの略語は慣例に従う。参照により本明細書に援用される *Immunology-A Synthesis* (Golub and Gren eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass., 2nd ed. 1991) を参照のこと。20種の従来のアミノ酸の立体異性体（例えば、D-アミノ酸）、非天然型アミノ酸、例えば、 α -, α -二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸など、及び他の非従来型アミノ酸も本発明のポリペプチドの適切な構成成分である場合がある。非従来型アミノ酸の例には、4-ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン酸、 ϵ -N, N, N-トリメチルリジン、 ϵ -N-アセチルリジン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリジン、N-メチルアルギニン、ならびに他の類似のアミノ酸及びイミノ酸（例えば、4-ヒドロキシプロリン）が含まれる。本明細書で使用するポリペプチド表記では、標準的使用及び慣例に従って左側末端はアミノ末端に対応し、右側末端はカルボキシ末端に対応する。

【0064】

以下の6群はそれぞれ、互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する：1) セリン（S）、スレオニン（T）；2) アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）；3) アスパラギン（N）、グルタミン（Q）；4) アルギニン（R）、リジン（K）；5) イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アラニン（A）、バリン（V）、及び6) フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）。

【0065】

配列同一性（%）とも呼ばれることがあるポリペプチドの配列相同性は一般的に、シークエンス解析ソフトウェアを使用して測定される。例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group (GCG)、University of Wisconsin Biotechnology Center, 910 University Avenue, Madison, Wis. 53705を参照のこと。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含めて、さまざまな置換、欠失及び他の改変に対して割り当てられた相同性尺度を使用して類似配列を一致させる。例えば、GCGには、「Gap」及び「Bestfit」などのプログラムが同梱されており、それらをデフォルトのパラメータでを使用して、密接に関連するポリペプチド同士、例えば、異なる種の生物に由来する相同ポリペプチド同士などの配列相同性または配列同一性を、または野生型タンパク質とその変異タンパク質の間の配列相同性または配列同一性を決定することができる。例えば、GCG バージョン6.1を参照のこと。

【0066】

異なる生物由来の配列を多数含むデータベースと特定のポリペプチド配列とを比較する

際に有用なアルゴリズムはBLASTというコンピュータプログラム (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)、Gish and States, Nature Genet. 3:266-272 (1993)、Madden et al., Meth. Enzymol. 266:131-141 (1996)、Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)、Zhang and Madden, Genome Res. 7:649-656 (1997))、特に、blastpまたはtblastn (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)) である。

【0067】

BLASTpの好ましいパラメータは、期待値：10（デフォルト）；フィルター：seg（デフォルト）；ギャップを開くコスト：11（デフォルト）；ギャップを伸長するコスト：1（デフォルト）；最大アラインメント：100（デフォルト）；文字列サイズ：11（デフォルト）；表示件数：100（デフォルト）；ペナルティ行列：BLOWSUM62である。

【0068】

BLASTpの好ましいパラメータは、期待値：10（デフォルト）；フィルター：seg（デフォルト）；ギャップを開くコスト：11（デフォルト）；ギャップを伸長するコスト：1（デフォルト）；最大アラインメント：100（デフォルト）；文字列サイズ：11（デフォルト）；表示件数：100（デフォルト）；ペナルティ行列：BLOWSUM62である。相同性を比較するポリペプチド配列の長さは一般に、少なくとも約16アミノ酸残基、通常少なくとも約20残基、より一般には少なくとも約24残基、一般的に少なくとも約28残基、好ましくは約35残基より多くなる。多数の異なる生物に由来する配列を含むデータベースを検索する場合、アミノ酸配列を比較することが好ましい。アミノ酸配列を使用したデータベース検索は、blastp以外の当該技術分野で公知のアルゴリズムにより測定することができる。例えば、ポリペプチド配列は、GCGバージョン6.1のプログラムであるFASTAを使用して比較することができる。FASTAは、問い合わせ配列と検索配列の間で最も重複している領域のアラインメント及び配列同一性(%)を提供する。Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990)（参照により本明細書に援用されるものとする）。例えば、アミノ酸配列間の配列同一性(%)は、参照により本明細書に援用されるGCGバージョン6.1で提供されるFASTAをそのデフォルトのパラメータで使用する決定することができる（文字列サイズは2、またスコア行列はPAM250）。

【0069】

本明細書全体及び請求項を通して、「含む(comprise)」という語句、または「含む(comprises)」もしくは「含む(comprising)」などの変形は、記述されている整数または整数群が包含されることを意味し、他のいかなる整数または整数群も除外されないことを意味することを理解されるであろう。

【0070】

例示的な方法及び材料を以下に記載するが、本明細書に記載の方法及び材料と類似または同等のものも本発明を実施する際に使用可能であり、当業者には明らかとなるであろう。本明細書で言及される刊行物及び他の参考文献はいずれも、参照によりその全体が援用される。矛盾がある場合は、定義も含め、本明細書が優先する。材料、方法、及び例は例示にすぎず、限定的ではないことが意図される。

【0071】

概要

本明細書では、酵母株（例えば、P. pastoris）における組換えで発現されるタンパク質の分泌及び生産性を改善する組換え株及び上記分泌及び生産性の改善方法が提供される。

【0072】

分泌されることになるタンパク質は、最初に小胞体の膜を通過する必要がある（ER転座）。複数の標的経路が伸長を行うリボソームまたは完全に翻訳されたタンパク質をER膜へとリクルートし、それらのポリペプチド鎖は、トランスロコンと呼ばれる孔形成タンパク質複合体を介して侵入する。*S. cerevisiae*及び*P. pastoris*を含む酵母は、2種のトランスロコン、SEC61複合体及びSSH1複合体を発現する。それぞれの複合体は核となる三量体複合体から構成されるが、SEC61トランスロコンは四量体SEC63複合体とも結合する。図1は、それぞれのこれらのトランスロコン複体内に含まれるタンパク質サブユニットを示す。

【0073】

SEC72はSEC63複合体の必須ではない構成因子をコードするが、SEC72の欠失（ $\Delta sec72$ ）により一部の分泌前駆体の蓄積が生じる。驚くべきことに、本明細書において、本発明者らは、 $\Delta sec72$ 株の組換え絹ポリペプチドの分泌が改善されたことを明らかにしている。

10

【0074】

いくつかの実施形態では、上記株は、*sec72*遺伝子（配列番号1）が欠失するように改変される。本発明者らが本明細において説明し、明らかにしたように、タンパク質を分泌するためにER中に移行させるための補助因子であるSEC72（配列番号2）を発現する*sec72*を欠失させると、ベンチスケールでのブロックモデルアッセイにおいて予想外に絹の分泌を促進する（最大+75%）。このことは、発現レベル、シグナル配列、及び異なる絹全体にわたって当てはまる。

20

【0075】

いくつかの実施形態では、*sec72*の欠失は、例えば図2に示すように、酵母選択マーカーに隣接する、*sec72*に対する5'ホモロジーアーム及び*sec72*に対する3'ホモロジーアームを有するプラスミドを用いて実現される。 $\Delta sec72$ を欠失させることにより、間接的に分泌を促進することができる転写適応（transcriptional adaptation）が誘発された。*sec72*遺伝子及びSEC72タンパク質の配列を表1に示す。

【0076】

（表1）*sec72*オープンリーディングフレーム及びSEC72タンパク質の配列

30

40

50

種類	配列番号	配列
<i>sec72</i> (PAS_chr2-1_0448) ORF 配列 (5' から 3')	1	atgctaccatttttcgtacgacgtgagctcaaagaaactgaaagtcacaggtgactacgcagacttagaatatgacatacagcagctgaacaccttgagcggagagatcctggccaataaagcagatgttccttctccaccaagt aaggagtcgtttgacaagaaattgtcccatggctcagaaattacacgagtcggtgtatccaacataaagacaggcaagtatcctgaggctatc aaattgttgacgacgggtcttgaaatggttaacagaaggcccaagtac gagagttttcagatgacgttgagtgaatgacgatctttattgtcact agagctgacgcttacatgatgaatggagactttgaaggggcattcaat gatgcagatttactggtaacgctcctgccatccattccagataattac attagaagaggggtagcccttttcaagatggggagatacgttgatgca aaaaacaattttgagagaggactttcatttgaccagataatgcaaaa ttgaagaaggagttagattttgtgctgaagaagatcgacgaggagaat ggagagttatag
SEC72 (PAS_chr2-1_0448) タンパク質 配列	2	MLPFSYDVSSKKLKVTGDYADLEYDIQQNLNLSGEILANKADVSPSPS KESFDKKLSHMAQKLHESAVSNIKTGKYPEAIKLLTTGLEMVNRRPKY ESFQMTLSEMTIFIVTRADAYMMNGDFEGAFNDADLLVTLPLSPDNY IRRGVALFKMGRYVDAKNNFERGLSFDPDPAKLKKELDVFLKKIDEEN GEL

10

20

【0077】

いくつかの観測を行ったケースでは、*sec72* の欠失により株の増殖が遅くなり、 $\Delta sec72$ 株の発酵産生スクリーニングはグルコースの蓄積との闘いであった。したがって、本明細書では、いくつかの実施形態によれば、SSH1 トランスロコン複合体を含むタンパク質を組換えで過剰発現する株も提供される。本明細書において明らかなように、 $\Delta sec72$ 菌株における SSH1 トランスロコン複合体の過剰発現は、株の増殖速度及び発酵能力を向上させた一方、分泌の改善を維持した。組み換え絹様ブロックポリペプチドを発現する遺伝子（すなわち、18B）を4コピーしかもたないこの欠失－過剰発現の組み合わせの株の試験では、6コピーの絹様ブロックポリペプチドを発現する遺伝子（すなわち、18B）をもつ株に対して、同様の力価及び比生産性の向上（+18%）が示された。

30

【0078】

いくつかの実施形態では、SSH1 トランスロコン複合体は、組換え SBH2、SSS1、及び SSH1 をコードする遺伝子を含むプラスミド（図3）を挿入することにより、宿主細胞において過剰発現される。これらの遺伝子及び発現されたタンパク質の配列を表2に示す。

40

【0079】

（表2）SSH1 トランスロコン複合体のサブユニットのためのオープンリーディングフレーム及びタンパク質の配列

50

種類	配列 番号	配列
<i>SSH1</i> (PAS_chr1- 4_0629)	3	atggcgggggttgcgtttttttagacattgcaagaccatttgtcagctgg atcccggaagttgaacttccttatgaaaactggggggttcgatgaaaag ctgatttactcatttttccactgctgccatctatttgattctgtccctg cctatatacgggtgtcaaatcctctgaagtcgtggaccagttcccat ttgcgttctgccttagggagtgagaagggaacattgctggagcttggg ttactgcctgtgattacttcggcatttatcttgcagttgttggctggt tggaaagttttcaaagtaaaccttgatctggttagtgacagaatattg

10

20

30

40

50

ORF 配列		ttccaaacttttgcaaaagatcacttcagtcggttatcagcatcgtatat gctgttctctcacatcttgactactttactccaggtgtgtccact gataacgctcttggtggtcccaatttctgatcatcttacagatagtggtg gtcaacttcttggttactctactcgttgaagtcattgacaaggattac ggatcttcttcaggagctctattgttgcttgcggtttattccgccacc aacttcgtttttggcacgattggtcttagcaccgtcaacacctccaga tcgaacgaatctattggtgctctgattcaattattccgcaatttgagc tctaaaccaattggtgttgccatatatgactccttcttcagagtaaac cttcctaacttgactcaattttatctggtggtggtggtggtggtggtg tgtctgttcttgataatgcaagatacgaagtaccaattaagccaaac aaggttcgtgccatggcctcagcttacccaatcaagctacttttcaat ggttcttttgccacttctgtacacgtggactgtgctgtacaacctgaac cttattggtttctttgtcttcaagcttacccaacttttctcttttaggg aacttcaaagtggaaccattcggaacaactactacgaattacatct ggactgctgtattttattgactcctactttcaacgctgaagctggactt ttacccaatgttgctaagccatttgttttcatgtccttctatgttggg gttagcactttctttgctagatcgtggtccaacattaacgggtcgtca ggcaaggacattgccaagtttttcaaggctcaaggaatctcattgtta ggaaaagagatgcctctgtgtctaaagagtttaacaccctagttcct gttgccttctgcctctggagctttcctattgtcttttccagttgccgtc gctgagttattgggtggctctggtgttccaacctctatcggaatcggt cttttgagtgtttggctattttgaaactgttttgcaagaatggcaa cagctctggaggtgcctcacagttctccaatacttccagacttcttag	10
SSH1 (PAS_chr1-4_0629) タンパク質配列	4	MAGLRFLDIARPFVSWIPEVELPYENWGFDEKLIYSFFTAIIYLILSL PIYGVKSSEVDPVPHLRSALGSEKGTLLLELGLLPVITSAFILQLLAG WKVFKVNFDLVSDRILFQTLQKITSVVISIVYAVLLTFCDYFTPGVST DNVLWSQFLIILQIVVNFVLTLLVEVIDKDYGFSSGALLLLAVYSAT NFVFGTIGLSTVNTSRSNESIGALIQLFRLNLSKPIGVAIYDSFFRVN LPNLTQFYLGAIIICVCLFLNNARYEVFIKPNKVRAMASAYPIKLLFN GSLPLLYTWTVLNLYNLIGFFVFKLTNFSLLGNFKVDPFGNNYIEITS GLLYLLTPTFNAEAGLLPNVAKPFVFIAFYVGVSFFFARSWSNINGSS GKDIAKFFKAQGISLLGKRDAVSKEFNTLVPVASASGAFLLSFPVAV AELLGGSGVPTSIGIGLLSGLAILETVLQEWQQSGGASQFSQYFQTS	20
SSS1 (PAS_chr1-1_0023) ORF 配列	5	atgtcccaaaaagtcaccgacgtccctctggaatttggttaaggaaggt tccaaattcatctctaaaatgtactaaacctctcagaaggagtactta aagatagtaagagctgttgagttgggttttttaatgatggcggtggtt ggttacgttggtcaagctcattcatattccaatcagatatttgattggt taa	30
SSS1 (PAS_chr1-1_0023) タンパク質配列	6	MSQKVTDVPLEFVKEGSKFISKCTKPSQKEYLKIVRAVGVGFLMMGVV GYVVKLIHIPIRYLIV	40

SBH2 (PAS_chr2- 2_0210) ORF 配列	7	atggtaagtgtccagtttgatgagtgcagaatggttccaagttttaga ccagttactaatattttaagtcacagcaattccaggaggacagagaa cgtagctaaaagaagagcagcaacttgataagaaacaggatgaac caacctccgccagatctgccggtgctggagggttcttcgtctaccatgc taaagttgtacacagacgagggccaagggttgaaagttgatcctttaa ttgttcttggttcttgctggtggtttcattttcagtgtcattgggttgc acgttggtgctaagctgacaggaaagttgatcaactaa
SBH2 (PAS_chr2- 2_0210) タンパク質 配列	8	MSTAI PGGQRTLAKRRAANLDDKQDEPT SARSAGAGGSSSTMLKLYTD EAQGLKVDPLIVLVAVGFI FSVIGLHVVAKLTKGLIN

10

【0080】

プロテアーゼノックアウト

いくつかの実施形態では、*Pichia pastoris*におけるプロテアーゼ活性を減弱させるために、これらの酵素をコードする遺伝子は活性が低下もしくは消失するように不活性化または変異導入されている。これは、その遺伝子自体への変異もしくは挿入を介して、または遺伝子の調節エレメントの改変を介して行うことができる。これは、標準的な酵母の遺伝学的技法によって実現可能である。かかる技法の例としては二重相同組換えによる遺伝子置換が挙げられ、この二重相同組換えにおいては、不活性化すべき遺伝子に隣接する相同領域が、選択マーカー遺伝子（抗生物質耐性遺伝子または酵母株の栄養要求性を相補する遺伝子など）に隣接するベクターにクローニングされる。いくつかの実施形態では、図4Aに示すノーセオスリシン選択プラスミドをベースプラスミドとして使用することができ、耐性カセットに隣接するホモロジーアーム（HA）（図4B及び図4C）を使用することができ、上記ホモロジーアームはノックアウトすべき所望のプロテアーゼを特異的に標的とする。プロテアーゼノックアウトの説明及び組換えタンパク質の分解を阻害するように宿主細胞を改変する方法は、米国出願第15／724,196号及びPCT出願第PCT／US2017／054997号に提示され、上記出願のそれぞれは、その全体が参照により本明細書に援用される。

20

30

【0081】

別法として、上記相同領域をPCR増幅し、オーバーラップPCRで選択マーカー遺伝子に連結することができる。その後、当該技術分野で公知の方法、例えば、電気穿孔法によりかかるDNA断片を*Pichia pastoris*に形質転換する。その後、選択的条件下で増殖させる形質転換体を、標準的な技法、例えば、ゲノムDNAのPCRまたはサザンブロットにより遺伝子破壊事象について分析する。代替的実験では、単一相同組換えにより遺伝子不活性化を実現することができ、その場合、例えば、遺伝子のORFの5'末端を、やはり選択マーカー遺伝子を含有するプロモーター不含ベクター上にクローニングする。かかるベクターが、標的遺伝子相同断片でのみベクターを切断する制限酵素を用いた消化によって線状になった時点で、かかるベクターを*Pichia pastoris*に形質転換する。標的遺伝子部位への組み込みは、ゲノムDNAのPCRまたはサザンブロットにより確認される。この方法では、ベクター上にクローニングされた遺伝子断片の複製がゲノム内で実現し、それにより標的遺伝子座の2コピー、すなわち、ORFが不完全なために（発現したとしても）短縮された不活性なタンパク質を発現する第1のコピー、及び転写を誘導するプロモーターがない第2のコピーが生じる。

40

【0082】

別法として、トランスポゾン変異誘発を使用して標的遺伝子を不活性化する。かかる変

50

異体のライブラリーは、PCRで標的遺伝子内の挿入事象についてスクリーニングを行うことができる。

【0083】

遺伝子操作／ノックアウトを行った株の機能的表現型（すなわち、欠損）は、当該技術分野で公知の技法を使用して評価することができる。例えば、遺伝子操作株のプロテアーゼ活性の欠損は、当該技術分野で公知の多種多様な方法のいずれを使用しても確認することができ、特に、発色プロテアーゼ基質の加水分解活性アッセイ、選択プロテアーゼに対する基質タンパク質のバンドシフトなどがある。

【0084】

本明細書に記載するプロテアーゼ活性の減弱をノックアウト変異以外の機構によって達成することができる。例えば、核酸配列を変化させること、遺伝子をより活性が低いプロモーターの制御下に置くこと、下方制御させること、対象遺伝子を標的とする干渉RNA、リボザイムもしくはアンチセンスの配列を発現させることによるアミノ酸配列の変更、または当該技術分野で公知の他の任意の技術などによるアミノ酸配列の変更によって、所望のプロテアーゼを減弱させることができる。好ましい株では、PAS__chr4__0584（YPS1-1）及びPAS__chr3__1157（YPS1-2）（例えば、配列番号10及び12を含むポリペプチド）にてコードされるプロテアーゼのプロテアーゼ活性は、上記方法のいずれかで減弱される。いくつかの態様では、本発明は、YPS1-1遺伝子及びYPS1-2遺伝子（例えば、配列番号9及び配列番号11に記載の）が不活性化されたメチロトロフ酵母菌株、特に*Pichia pastoris*株を対象とする。いくつかの実施形態では、プロテアーゼをコードするさらなる遺伝子を本明細書で提供する方法に従ってノックアウトし、当該の株により発現される所望のタンパク質産物のプロテアーゼ活性をさらに低下させてもよい。

【0085】

（表3）*P. pastoris*における欠失のために標的とされるプロテアーゼに対するオープンリーディングフレームヌクレオチド配列及びポリペプチド配列

10

20

30

40

50

種類	配列番号	配列
PAS_chr4_0584 (YPSI-1) ORF 配列 (5'から3')	9	atgttgaaggatcagttcttgttatgggttgctttgatagcgagcgtaccggtttc cggcgtgatggcagctcctagcgagtcgggcataaacacggttgaaaaacgagatg ccaaaaacgttgttggcgttcaacagttggacttcagcgttctgaggggtgattcc ttcgaagtgccctctcagagaaacgtgcctcggcttgtagggagagatgacacgct agaagctgagctaatacaaccagcaatcattctacttgtcacgactgaaagttggat cacatcaagcggatattggaatcctagtggaacacaggtacctctgatttatgggta atggactcggtaaaacccatactgcagtagccgttcccgcgtgaagagagataaca cgtagagaagatcgccgaatgggacccatcaatctcaagaaaaatgaaacttctc agaataaaaaattttgggattggctcgttggaaactagcactagtctctcctccacc gccacggcaactggtagtggttagtggttagtggttagtggttagtggttagtggtg tgccacagcgtatcggttaagttctgcacaggcaacattggattgctctacgtatg gaacgttttgatcacgctgattcctcgacgttccatgacaataatacagacttttcc atctcatacgtgataccacttttgcctcaggaatctggggttatgacgacgtcat tatcgacggcatagaggtaaaagaactttccttcgcggttgacacatgaccaatt cctctatttgggtgttaggtattggactgaaaggcctagaatccacatatgctagt gcatcttcggtcagtgaaatgtatcagtatgacaatttgcagccaagatgggtcac cgatgggtgatcaacaaaaatgcatactccttgtacttgaactccaaggacgcct caagtgggtccatcctccttggaggtgtggatcatgaaaaatattcgggacaattg ttgacagttccagtcatacaacacactcgttccagtggttacagagaggcaattcg tttacaattacttttaaatggaatagatgtgaaaaagggttctgaccagggaaactc ttttacaaggagatttgcctgattattggactcgtgagctacgctaacgtatgct ccttcttctgttttaaatcaattggccggaacctggcggtcctatgattcgtc aagacaagcttataccattcgttgtgttcttgcacagataccacttctcgtgtat tcaattttgggggtgctacagtggaagtttccctgtacgatctacagattgcaaca tattacacgggggaagtgccacgcaatgtcttattggaatattcagctcgtggaag tgatgagtttgtgctcggtgataccttcttgaggtcagcctacgtggtttacgatc ttgatgggcttgaagtgtcgttgcaccaagccaacttcaacgaaaccgattctgat gttgaggctattacctccagtgtaacctccgctactcgtgcacccgatacagttc tacatggtctggttctgccagcgggtacagtttaccttcggttcagatggaatccg gtgctgtcttcagctccaaactcttctggatcgaatatgggttcctcttctcatcg tcctcttcatcgtcctcgacttccagtgagacgaagaaggaggagctccgccaa caggggtcccttcagctaccttctctctggttggtagttattctcggcgtgtgta tagtatag
PAS_chr4_0584 (YPSI-1) ポリペプチド 配列	10	MLKDQFLLWV ALIASVPVSG VMAAPSES GH NTVEKRDAKN VVG VQQLDFS VLRGDSFESA SSENVPRLVR RDDTLEAELI NQSFYLSRL KVGSHQADIG ILVDTGSSDL WVMDSVNPYC SSRSRVKRDI HDEKIAEWD P INLKKNETSQ NKNFWDWL VG TSTSSPSTAT ATGSGSGSGS GSGSGSAATA VSVSSAQATL DCSTYGTFDH ADSSTFHDNN TDFFI SYADT TFASGIWGYD DVIIDGIEVK ELSFVADMT NSSIGVLGIG LKGLESTYAS ASSVSEMYQY DNLPKMTVD GLINKNAYSL YLNSKDASSG SILFGGVDHE KYSQQLLTVP VINTLASSGY REAIRLQITL NGIDVKKGSD QGTLLQGRFA ALLDSGATLT YAPSSVLNSI GRNLGGSYDS SRQAYTIRCV SASDTTSLVF NFGGATVEVS LYDLQIATYY TGGSATQCLI GIFSSGSDEF VLGDTF LRSA YVVDLDGLE VSLAQANFNE TDS DVEAITS SVPSATRASG YSSTWSGSAS GTVYTSVQME SGAASSNS GSNMGSSSSS SSSSSSTSSG DEEGSSANR VPFSYLSLCL VVILGVCIV
PAS_chr3_1157 (YPSI-2) ORF 配列 (5'から3')	11	atgatcatcaaccacttggtattgacagccctcagcattgcactagcaagtgcgca actccaatcgcttttcaaggcctaacaagttgccattcaaaaagtttatcattccaa cgacccaaaggaccgttttaattaagagagatgactacgagtcctcgacttgagac acatcggagtctgttacctgcagagatccaaattggatctgacgaaactgaaatt gaggtcattgtcgacactggttctgccgacttggtgggtcatcgattccgacgctgc cgtctgtgagttatcctacgatgagattgagggccaatagcttttctcggcttctg ccaaattcatggacaagatagctcctccatcacaagagctcctggatgggctgagtg gagtttggatttgcctcgtatggtgaaatttctcaatacctagccgataaaatctgg acgtgttttcgaaaagagaggaaaatcaacaagatttcaacattaacctgacgagc ctgtgtgtgaacagtttgggttcttctgattctagtttctccgacactttccaaagc

10

20

30

40

50

		aacaattcagcttttggattgcttaccttgatggaaccactgctaacggaacttg ggtcagggacacagtcgcgcagcttggccatcagccaaacagagtttgcct tagtcaacatcacagataactacatgggaatccttgggtctcggtcctgctacccaa caaaccaccaatagtaacccaattgcagcaaacagatttacttatgatgggtgtgtg ggattcattgcggtcccaaggatttatcaattcagcatcgtttctgtttacttgt ctccagatgaagataacgagcacgacgaattcagcgacggagaaattttatttgggt gctattgatagggccaagatagacggggcatttagacttttcccatatgtcaatcc ttacaaaccagtttaccctcgatcaatatacttctcactgttacagtgtccacaattg cgggtgtcttcgtcagatgaaactctcattattgaaagacgtcctcgtttggcatta atcgatacaggtgccaccttctcctatttggccaacctaccattgattcgtttagc gttttccatccatggaggtcttgaatatgttctcaattgggactatttgtcattc gtacaagttctctgtctgttggctagaaataaggtgattgagttcaagtttggtgaa gacgttgtgatccaatcccagtttctgatcatctattggacgtctcaggcctttt tactgatggccaacaatactcgcatttaactgtacgtgaaagtcttgacggacttt ccattctaggtgatacattcatcaaactcgccctacttattctttgacaatgaaaac agccagctgggtattgggtcagatcaacgtcactgatgacgaggatattgaggtgggt cgggtgatttctactattgaacgagaccagcctactcctctacttgggtctagcgatt tacctcatgaaacacccactagggctttgagtactgcttcagggggaggccttgggt accggaataaacacggccacaagtcgtgcaagttctcgttccacatctggctctac ttcacgaacttcttctacatctggctctgcttctgggtacttcttcaggtgcattct ctgctactcaaaatgacgaaacatccactgatcttggagctccagctgcattctta agtgcaacgccatgtcttttggccatcttgctgctcatgtttag
PAS_chr3_1157 (YPS1-2) ポリペプチド配列	12	MIINHLVLTA LSIALANDYE SLDLRHIGVL YTAEIQIGSD ETEIEVIVDT GSADLWVIDS DAAVCELSYD EIEANSFSSA SAKFMDKIAP PSQELLDGLS EFGFALDGEI SQYLADKSGR VSKREENQQD FNINRDEPVC EQFGSFDSSS SDTFQSNNSA FGIAYLDGTT ANGTWVRDTV RIGDFAISQQ SFALVNITDN YMGILGLGPA TQQTNSNPI AANRFTYDGV VDSLRSQGF I NSASFVSYLS PDEDNEHDEF SDGEILFGAI DRAKIDGPF LFPYVNPYKP VYPDQYTSYV TVSTIAVSSS DETLIERRP RLALIDTGAT FSYLPTYPLI RLAFSIHGGF EYVSQGLGLFV IRTSSLSVAR NKVIEFKFGE DVVIQSPVSD HLLDVSGFLT DGQQYSALTV RESLDGLSIL GDTFIKSAYL FFDNENSQLG IGQINVTDE DIEVVGDFTI ERDPAYSSTW SSDLPHETPT RALSTASGGG LGTGINTATS RASSRSTSGS TSRTSSTSGS ASGTSSGASS ATQNDTSTD LGAPAASLSA TPCLFAILL ML

10

20

30

【0086】

組換え株の製造

本明細書は、例えば、組換え遺伝子を送達するベクターもしくはノックアウトするベクターを使用するかまたは所望の内在性遺伝子を減弱させる他の方法などで、株を形質転換して活性を低下させる方法を提供する。これらのベクターは、複製起点及び選択マーカー（一般的に抗生物質耐性であるが他の多くの方法が可能）を含有するベクター骨格、または標的細胞の染色体内への組み込みを可能にする線状断片という形態をとっていてもよい。ベクターは、選択した生物及び挿入方法に対応していなければならない。

【0087】

一旦ベクター要素が選択されたら、多くの異なる方法でベクターの構築を実施することができる。一実施形態では、DNA合成サービスを利用して、全ベクターを個々に作製する方法を使用してもよい。

【0088】

一旦それぞれのベクターのDNA（挿入及び操作に必要なさらなる要素を含む）が得られたら、それをアセンブルする必要がある。可能なアセンブリ方法は多数あり、これには、制限酵素クローニング、平滑末端ライゲーション、及びオーバーラップアセンブリ [例えば、Gibson, D. G., et al., *Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nature methods*, 6 (5), 343-345 (2009)]

40

50

、及びGeneArt Kit (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/geneart_seamless_cloning_and_assembly_man.pdf)を参照のこと]が含まれるが、これに限定されない。オーバーラップアセンブリは、要素のすべてが正しい位置に確実にアセンブルされ、いかなる望ましくない配列も導入されない方法を提供する。

【0089】

上記で作製されたベクターは、標準の分子生物学技術、例えば、分子クローニングなどを使用して標的細胞に挿入することができる。一実施形態では、標的細胞は、所望産物の産生に必要とされる遺伝子をすでに含有するようすでに遺伝子操作されているかまたは選択されているが、これを、以降のベクターの挿入中または挿入後に行ってもよい。

【0090】

生物及びライブラリー要素の種類（プラスミドまたはゲノムの挿入）に応じて、DNAを含むベクターを挿入して細胞内に組み込むいくつかの公知の方法を使用してよい。これらの方法としては、例えば、局所環境からDNAを取り込んで複製することができる微生物の形質転換、電気穿孔法もしくは化学的手段による形質転換、ウイルスもしくはファージを用いた形質導入、2つ以上の細胞の接合（mating）、または異なる細胞からの接合（conjugation）を挙げることができる。

【0091】

細菌細胞に組換えDNAを導入するいくつかの方法が当該技術分野で公知であり、それらには、形質転換、形質導入、及び電気穿孔法（Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y.を参照のこと）が挙げられるが、これに限定されるものではない。形質転換用の市販のキット及び細菌宿主細胞の非限定的な例としては、NovaBlue Singles（商標）（EMD Chemicals Inc., NJ, USA）、Max Efficiency（登録商標）DH5α（商標）、One Shot（登録商標）BL21（DE3）E. coli細胞、One Shot（登録商標）BL21（DE3）pLys E. coli細胞（Invitrogen Corp., Carlsbad, Calif., USA）、XL1-Blueコンピテントセル（Stratagene, CA, USA）が挙げられる。電気穿孔法用の市販のキット及び細菌宿主細胞の非限定的な例としては、Zappers（商標）エレクトロコンピテントセル（EMD Chemicals Inc., NJ, USA）、XL1-Blueエレクトロポレーション-コンピテントセル（Stratagene, CA, USA）、ElectroMAX（商標）A. tumefaciens LBA4404細胞（Invitrogen Corp., Carlsbad, Calif., USA）が挙げられる。

【0092】

真核細胞に組換え核酸を導入するいくつかの方法が当該技術分野で公知である。例示的な方法としては、トランスフェクション、電気穿孔法、リポソームによる核酸送達、宿主細胞へのマイクロインジェクション（Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y.を参照のこと）が挙げられる。真核細胞に組換え核酸をトランスフェクションするための市販のキット及び試薬の非限定的な例としては、Lipofectamine（商標）2000、Optifect（商標）試薬、リン酸カルシウムトランスフェクションキット（Invitrogen Corp., Carlsbad, Calif., USA）、GeneJammer（登録商標）トランスフェクション試薬、LipoTAXI（登録商標）トランスフェクション試薬（Stratagene, CA, USA）が挙げられる。別法として、組換え核酸は、バキュロウイルスベクターの使用により昆虫細胞（例えば、sf9、sf21、High Five（商標））内に導入されてもよい。

10

20

30

40

50

【0093】

各クローンを別々に試験できるよう形質転換された細胞を単離する。一実施形態では、これは、形質転換された細胞だけが生き残って再生することを保証する選択薬剤を含有する（または欠いている）培地の1つ以上のプレートで塗抹培養することにより行う。この特定薬剤は、抗生物質（ライブラリーが抗生物質耐性マーカーを含有する場合）、代謝物欠如（栄養要求性の相補用）、または他の選択手段であってよい。細胞は増殖して個々のコロニーとなり、その各々が単一クローンを含有する。

【0094】

タンパク質、代謝物、もしくは他の産物の所望の産生に関して、プロテアーゼ活性の低下に関して、増殖に関して、または分泌活性の増加に関して、コロニーのスクリーニングを行う。一実施形態では、産物の産生力価または産生効率が最も高い（または十分に高い）組換え細胞がスクリーニングにより特定される。これには、分解産物の比率の低下または細胞から分泌され、かつ細胞培養物から回収される所望ポリペプチドの総量の増加が含まれる。

【0095】

このアッセイは、個々のクローンをマルチウェル培養プレート中、1ウェル当たり1クローンで増殖させることにより実施可能である。一旦細胞が適切なバイオマス密度に達した後、それらをメタノールで誘導する。ある時間の経過後、一般的には24～72時間の誘導後、遠心分離機で回転させて細胞をペレット状にし、上清を除去することによって培養物を採取する。その後、それぞれの培養物の上清を試験して、所望の分泌量が達成されているかを判定してもよい。

【0096】

絹の配列

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の改変株は絹様ポリペプチド配列を組換えで発現する。いくつかの実施形態では、上記絹様ポリペプチド配列は、1）絹ポリペプチド配列由来の反復ドメインを混合して一致させることにより生成したブロック共重合体ポリペプチド組成物、及び／または2）組換えで発現された、大きさが、工業的に拡張可能な微生物から分泌させることによって有用な繊維を形成するのに十分に大きい（約40kDa）ブロック共重合体ポリペプチドである。公開されているクモ糸ポリペプチドのアミノ酸配列のほぼすべてに由来する配列を含め、絹の反復ドメイン断片を遺伝子操作した大きい（約40kDa～約100kDa）ブロック共重合体ポリペプチドは、本明細書に記載の改変微生物で発現させることができる。いくつかの実施形態では、絹ポリペプチド配列は、繊維形成能のある、高発現かつ高分泌のポリペプチドを産生するよう一致させ、設計される。いくつかの実施形態では、宿主改変株におけるプロテアーゼ遺伝子のノックアウトまたはプロテアーゼ活性の低下により、絹様ポリペプチドの分解が抑制される。いくつかの実施形態では、sec72のノックアウト及びSSH1トランスロコン複合体の過剰発現によって分泌が改善する一方、増殖における欠点が軽減され、当該株の増殖が維持されるかまたは向上する。

【0097】

本明細書では、いくつかの実施形態において、絹ポリペプチド配列空間全体にわたる絹ポリペプチドドメインを網羅的に組み合わせて混合することにより遺伝子操作したブロック共重合体を発現及び分泌させる組成物が提供され、上記ブロック共重合体は分解が最小限である。本明細書のいくつかの実施形態では、分解が最小限の拡張可能な生物（例えば、酵母、真菌類、及びグラム陽性菌）におけるブロック共重合体の分泌方法が提供される。いくつかの実施形態では、上記ブロック共重合体ポリペプチドは、0以上のN末端ドメイン（NTD）、1つ以上の反復ドメイン（REP）、及び0以上のC末端ドメイン（CTD）を含む。上記実施形態のいくつかの態様では、ブロック共重合体ポリペプチドは、100個を超えるアミノ酸の単鎖ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、上記ブロック共重合体ポリペプチドは、参照によりその全体が援用される国際公開公報第WO／2015／042164号、‘‘Methods and Compositions for

10

20

30

40

50

r Synthesizing Improved Silk Fibers' 'に開示のブロック共重合体ポリペプチドの配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なドメインを含む。

【0098】

数種の天然クモ糸がこれまでに同定されている。自然に出糸されたクモ糸の各種の機械的性質は、そのクモ糸の分子組成と密接な関係があると考えられている。例えば、Garb, J. E., et al., Untangling spider silk evolution with spidroin terminal domains, BMC Evol. Biol., 10:243 (2010)、Bittencourt, D., et al., Protein families, natural history and biotechnological aspects of spider silk, Genet. Mol. Res., 11:3 (2012)、Rising, A., et al., Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications, Cell. Mol. Life Sci., 68:2, pg. 169-184 (2011)、及びHumenik, M., et al., Spider silk: understanding the structure-function relationship of a natural fiber, Prog. Mol. Biol. Transl. Sci., 103, pg. 131-85 (2011)を参照のこと。例えば：

【0099】

ブドウ状 (AcSp) 絹糸は、適度に高い強度と適度に高い伸縮性とが組み合わされた結果、靱性が高い傾向がある。AcSp絹糸は、しばしばポリセリンとGPXのモチーフが組み込まれている大きいブロック (「集合体の反復」) サイズを特徴とする。管状 (TuSpまたは円筒状) 絹糸は、直径が大きく、中程度の強度と高い伸縮性を有する傾向がある。TuSp絹糸は、そのポリセリンとポリスレオニンの含量、及び短いポリアラニン配列を特徴とする。大瓶状 (MaSp) 絹糸は、高い強度と中程度の伸縮性を有する傾向がある。MaSp絹糸は、2つのサブタイプであるMaSp1及びMaSp2のいずれか1つである。MaSp1絹糸は一般にMaSp2絹糸より低伸縮性であり、ポリアラニン、GX、及びGGXのモチーフを特徴とする。MaSp2絹糸は、ポリアラニン、GGX、及びGPXのモチーフを特徴とする。小瓶状 (MiSp) 絹糸は、中程度の強度と中程度の伸縮性を有する傾向がある。MiSp絹糸は、GGX、GA、及びポリAのモチーフを特徴とし、しばしば約100のアミノ酸からなるスペーサーエレメントを含有する。鞭毛状 (Flag) 絹糸は、非常に高い伸縮性と中程度の強度を有する傾向がある。Flag絹糸は通常、GPG、GGX、及び短いスペーサーのモチーフを特徴とする。

【0100】

それぞれの絹糸種の性質は種ごとに異なる場合があり、ライフスタイルが異なるクモ (例えば、動き回らずに巣を張る造網性のクモと、徘徊して捕食するクモ) または進化的に古い方のクモは、上記説明とは異なる絹を産生する場合がある (クモの多様性及び分類についての記載に関しては、Hormiga, G., and Griswold, C. E., Systematics, phylogeny, and evolution of orb-weaving spiders, Annu. Rev. Entomol. 59, pg. 487-512 (2014)、及びBlackledge, T. A. et al., Reconstructing web evolution and spider diversification in the molecular era, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 106:13, pg. 5229-5234 (2009)を参照のこと)。しかしながら、天然絹タンパク質の反復ドメインに対する配列類似性及び／またはアミノ酸組成類似性を有する合成ブロック共重合体ポリペプチドを使用して、天然絹繊維に対応する性質を再現する一貫した

絹様繊維を商業規模で製造することが可能である。

【0101】

いくつかの実施形態では、推定絹配列の一覧は、例えば、「spidroin」、「fibroin」、「MaSp」などの関連用語をGenBankで検索して収集することができ、それらの配列を、別個に取り組んだ配列決定により得たさらなる配列と一緒にプールすることができる。その後、配列をアミノ酸に翻訳して重複エントリをフィルタリングし、手作業で各ドメイン（NTD、REP、CTD）に分割する。いくつかの実施形態では、候補アミノ酸配列を、*Pichia*（コマガテラ（*Komagataella*））*pastoris*での発現用に最適化されたDNA配列に逆翻訳する。DNA配列をそれぞれ発現ベクターにクローニングし、*Pichia*（*Komagataella*）*pastoris*に形質転換する。いくつかの実施形態では、発現及び分泌の成功を示した各種の絹ドメインはその後、組み合わせ様式でアSEMBルされ、繊維形成能のある絹分子が構築される。

10

【0102】

絹ポリペプチドは特徴的に、反復ドメイン（REP）に非反復領域（例えば、C末端ドメイン及びN末端ドメイン）が隣接して構成される。一実施形態では、C末端ドメイン及びN末端ドメインのいずれも75～350アミノ酸長である。上記反復ドメインは階層構造を示す。上記反復ドメインは一連のブロック（反復単位とも呼ばれる）を含む。上記ブロックは、絹の反復ドメイン全体にわたり、ときに完全に、ときに不完全に（準反復ドメインを構成）繰り返される。ブロックの長さ及び組成は、異なる絹の種類間、また異なる種間で変化する。表1は、選択した種及び絹種のブロック配列例の一覧であり、さらなる例が、Rising, A. et al., Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications, Cell Mol. Life Sci., 68:2, pg 169-184 (2011)、及びGatesy, J. et al., Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences, Science, 291:5513, pg. 2603-2605 (2001)に記載されている。場合によっては、ブロックを通常パターンで並べ、絹配列の反復ドメインに複数回（通常2～8回）出現する、より大きなマクロリピートを形成してよい。反復ドメインまたはマクロリピートの内側で繰り返されるブロックと、反復ドメイン内で繰り返されるマクロリピートとを間隔エレメントで分離してよい。いくつかの実施形態では、ブロック配列はグリシンに富む領域と、それに続くポリA領域とを含む。いくつかの実施形態では、短い（約1～10）アミノ酸モチーフがブロック内に複数回出現する。本発明の目的上、円順列とは関係なく、異なる天然絹ポリペプチドに由来するブロックを選択することができる（すなわち、同定されたブロックが他の点において絹ポリペプチド間で類似する場合に円順列のため整列しないことがある）。したがって、例えば、SGAGG（配列番号23）という「ブロック」は本発明の目的上、GSGAG（配列番号24）と同一であり、またGSGAGA（配列番号25）と同一であり、それらはいずれも互いに円順列にすぎない。所与の絹配列について選択された特定順列は、他の何よりも利便性によって決定されてもよい（通常、Gで開始）。NCBIデータベースから得た絹配列は、ブロック及び非反復領域に分割することができる。

20

30

40

【0103】

（表4）ブロック配列の試料

50

		YGPGGEGPGGAGGPYGPGGAGGPYGPGGAGGPYGPGGEGGPYGP (配列番号 34)
ラトロデクツス・ヘスペルス (<i>Latrodectus hesperus</i>)	AcSp	GINVDSDIGSVTSLILSGSTLQMTIPAGGDDLGGYPPGGFPAGAQP GGAPVDFGGPSAGGDVAAKLARSLASTLASSGVFRAAFNSRVSTPVA VQLTDALVQKIASNLGLDYATASKLRKASQAVSKVRMGSDTNAYALA ISSALAEVLSSSGKVADANINQIAPQLASGIVLGVSTTAPQFGVDLS SINVNLDISNVARNMQASIQGGPAPITAEGPDPFGAGYPGGAPTDLG LDMGAPSDGSRGGDATAKLLQALVPALLKSDVFRAIYKRGTRKQVVQ YVTNSALQQAASSLGLDASTISQLQTKATQALSSVSADSDSTAYAKA FGLAIAQVLGTSGQVNDANVNQIGAKLATGILRGSSAVAPRLGIDLS (配列番号 35)
アルギオペ・トリファスシアタ (<i>Argiope trifasciata</i>)	AcSp	GAGYTGPSGPSTGPSGYPGPLGGGAPFGQSGFGGSAGPQGGFGATGG ASAGLISRVANALANTSTLRTVLRGTGVSQQIASSVVQRAAQLASTL GVDGNLRAFVAVSRLEPAGSDTSAYAQAFFSALFNAGVLNASNID TLGSRVLSALLNGVSSAAQGLGINVDSGSVQSDISSSSSFLSTSSSS ASYSQASASSTS (配列番号 36)
ウロボルス・ディヴェルサス (<i>Uroborus diversus</i>)	AcSp	GASAAADIATAIAASVATSLQSNGLVTASNVSQLSNQLASYVSSGLSS TASSLGIQLGASLGAGFGASAGLSASTDISSSVEATSASTLSSSASS TSVVSSINAQLVPALAQTAVLNAAFSNINTQNARI AE LLTQQVGRQ YGLSGSDVATASSQIRSAIYSVQQGSASSAYVSAIVGFLITALSSRG VNASNSSQIASSLATAILQFTANVAPQFGISIPTSAVQSDLTISQ SLTAISSQTSSSVDSSTSAFGGISGPGSPSPYGPQPSGPTFGPGPSL SGLTGFTATFASSFKSTLASSTQFQLIAQSNLDVQTRSSLISKVLIN ALSSLGISASVASSIAASSSQSLLSVSA (SEQ ID NO: 37)
エウプロスセノプス・オーストラリス (<i>Euprosthenops australis</i>)	MaSp1	GGQGGQGQGRYQGAGSSAAAAAAAAAAAAAAAA (配列番号 38)
テトラグナタ・カウアイエンシス (<i>Tetragnatha kauaiensis</i>)	MaSp1	GGLGGGQGAGQGQGQAGQGGYGSGLGAGQGASAAAAAAAA (配列番号 39)
アルギオペ・オウランティア (<i>Argiope aurantia</i>)	MaSp2	GGYGPAGQGQPGSQGPGSGGQGGPGGLGPYGPSAAAAAAAA (配列番号 40)
デイノピス・スピノサ (<i>Deinopis spinosa</i>)	MaSp2	GPGGYGGPGQGQPGQGQYGPQTGQQQGQPSGQQGPAGAAAAAAAA (配列番号 41)
ネフィラ・クラヴァタ (<i>Nephila clavata</i>)	MaSp2	GPGGYGLGQQGPGQGQPGQGQGPAGYGPSGLSGPGGAAAAAAAA (配列番号 42)

【0104】

本発明特定の実施形態による、ブロック及び／またはマクロリピートドメイン由来の繊維形成ブロック共重合体ポリペプチドは、参照により援用される国際公開公報第WO／2015／042164号に記載されている。GenBankなどのタンパク質データベースから得た天然絹配列、または新規に行った配列決定により得た天然絹配列はドメイン（N末端ドメイン、反復ドメイン、及びC末端ドメイン）により破壊される。合成後に集合させて繊維を構築するために選択されるN末端ドメイン及びC末端ドメインの配列としては、天然アミノ酸配列情報及び本明細書に記載の他の改変が挙げられる。反復ドメインを反復配列に分解するが、この反復配列は、重要なアミノ酸情報を獲得する代表的ブロック（通常は1～8で、絹の種類による）を含有する一方で、アミノ酸をコードするDNAの大きさを、容易に合成可能な断片まで縮小する。いくつかの実施形態では、適切に形成されたブロック共重合体ポリペプチドは、少なくとも1つの反復配列を含む少なくとも1つの反復ドメインを含み、任意選択で、N末端ドメイン及び／またはC末端ドメインを隣接

10

20

30

40

50

させる。

【0105】

いくつかの実施形態では、反復ドメインは少なくとも1つの反復配列を含む。いくつかの実施形態では、反復配列は150～300アミノ酸残基である。いくつかの実施形態では、反復配列は複数のブロックを含む。いくつかの実施形態では、反復配列は複数のマクロリピートを含む。いくつかの実施形態では、ブロックまたはマクロリピートは複数の反復配列全体において分割される。

【0106】

いくつかの実施形態では、反復配列は、DNAアセンブリ要件を満たすため、グリシンで開始され、かつ、フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）、システイン（C）、ヒスチジン（H）、アスパラギン（N）、メチオニン（M）、またはアスパラギン酸（D）で終わることはできない。いくつかの実施形態では、いくつかの反復配列は、天然配列と比べて変化させることができる。いくつかの実施形態では、反復配列は、ポリペプチドのC末端へのセリン付加などにより変化させることができる（F、Y、W、C、H、N、M、またはDでの終止を回避するため）。いくつかの実施形態では、反復配列は、不完全ブロックに別のブロック由来の相同配列を充てんして改変することができる。いくつかの実施形態では、反復配列は、ブロックまたはマクロリピートの順序を再構成して改変することができる。

【0107】

いくつかの実施形態では、非反復のN末端及びC末端のドメインを合成用を選択することができる。いくつかの実施形態では、N末端ドメインは、リーディングシグナル配列、例えば、SignalPにより同定されたものなどの除去によるものであり得る（Peterson, T. N., et. al., SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions, Nat. Methods, 8:10, pg. 785-786 (2011)。

【0108】

いくつかの実施形態では、N末端ドメイン配列、反復配列、またはC末端ドメイン配列は、アゲレノプシス・アペルタ（*Agelenopsis aperta*）、アリアチプス・グロサス（*Aliatypus gulosus*）、アフォノペルマ・シーマニー（*Aphonopelma seemanni*）、アプトスチチュス種（*Aptostichus* sp.）AS217、アプトスチチュス種AS220、アラネウス・ディアデマツス（*Araneus diadematus*）、アラネウス・ゲムモイデス（*Araneus gemmoides*）、アラネウス・ヴェントリコサス（*Araneus ventricosus*）、アルギオペ・アモエナ（*Argiope amoena*）、アルギオペ・アルゲンタタ（*Argiope argentata*）、アルギオペ・ブルエンニチ（*Argiope bruennichi*）、アルギオペ・トリファスシアタ（*Argiope trifasciata*）、アチポイデス・リヴェルシ（*Atypoides riversi*）、アヴィキュラリア・ジュルエンシス（*Avicularia juruensis*）、ボスリオシルツム・カリフォルニカム（*Bothriocyrtum californicum*）、デイノピス・スピノサ（*Deinopis spinosa*）、ディグエチア・カニチエス（*Diguetia canities*）、ドロメデス・テネブロサス（*Dolomedes tenebrosus*）、エウアグルス・キシセウス（*Euagrus chisoseus*）、エウプロスセノプス・オーストラリス（*Euprosthenops australis*）、ガステラキャンタ・マンモサ（*Gasteracantha mammosa*）、ヒポキルス・トレルリ（*Hypocheilus thorelli*）、ククルカニア・ヒベルナリス（*Kukulcania hibernalis*）、ラトロデクツス・ヘスペルス（*Latrodectus hesperus*）、メガヘクスラ・フルヴァ（*Megahexura fulva*）、メテペイラ・グランディオサ（*Metepeira grandiosa*）、ネフィラ・アンチポディアナ（*Nephila antipodiana*）、ネフィラ・クラヴァタ（*Nep*

10

20

30

40

50

hila clavata)、ネフィラ・クラヴィペス (*Nephila clavipes*)、ネフィラ・マダガスカリエンシス (*Nephila madagascariensis*)、ネフィラ・ピリペス (*Nephila pilipes*)、ネフィレンギス・クルエンタタ (*Nephilengys cruentata*)、パラウィキシア・ビストリアタ (*Parawixia bistrata*)、ペウセチア・ヴィリダンス (*Peucetia viridans*)、プレクトレウリス・トリスチス (*Plectreurys tristis*)、ポエシロセリア・レガリス (*Poecilotheria regalis*)、テトラグナタ・カウアイエンシス (*Tetragnatha kawaiensis*)、またはウロボルス・ディヴェルサス (*Uloborus diversus*) に由来し得る。

10

【0109】

いくつかの実施形態では、絹ポリペプチドヌクレオチドコード配列は、アルファ接合因子ヌクレオチドコード配列に作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態では、絹ポリペプチドヌクレオチドコード配列は、別の内在性または異種の分泌シグナルコード配列に作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態では、絹ポリペプチドヌクレオチドコード配列は、3 X FLAGヌクレオチドコード配列に作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態では、絹ポリペプチドヌクレオチドコード配列は、6～8のHis残基(配列番号107)などの他のアフィニティータグに作動可能に連結される。絹ポリペプチドヌクレオチドのコード配列を宿主細胞に送達するためのベクターの例を図5に示すが、図5は、分泌シグナル及びFLAGタグを含む、絹様ポリペプチドを発現するためのオープンリーディングフレーム(ORF)を含むベクターのプラスミドマップを表している。上記ORFはpGCW14プロモーター及びtAOX1ターミネーターに作動可能に連結されている。ベクターはまた、形質転換に成功した細胞を選択するための選択マーカーも含む。

20

【0110】

いくつかの実施形態では、上記絹ポリペプチドは全長クモ糸ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、上記全長クモ糸ポリペプチドは、大瓶状腺スピドロイン1(MaSp1)または大瓶状腺スピドロイン2(MaSp2)である。

【0111】

絹様ポリペプチド

いくつかの実施形態では、本明細書に開示するP. *pastoris*株は絹様ポリペプチドを発現するよう改変されている。好ましい実施形態の絹様ポリペプチドの製造方法は、参照により本明細書に援用されるWO2015/042164、特に第114段落～第134段落に提示されている。WO2015/042164には、Argiope bruennichi種由来などのMaSp2由来の組換えクモ糸タンパク質断片配列に基づく合成タンパク質性共重合体が開示されている。2～20個の反復単位を含む絹様ポリペプチドが記載されており、上記ポリペプチドにおいて、各反復単位の分子量は約20kDaより大きい。上記共重合体の各反復単位内には、多数の「準反復単位」に組織化されている約60を超えるアミノ酸残基がある。いくつかの実施形態では、本開示に記載のポリペプチドの反復単位の、MaSp2引き綱絹タンパク質の配列に対する配列同一性は、少なくとも95%である。

30

【0112】

いくつかの実施形態では、絹様ポリペプチドの各「反復単位」は、2～20個の「準反復」単位(すなわち、 n_3 は2～20である)を含む。準反復は正確な反復である必要はない。各反復は連鎖状の準反復で構成されていてもよい。式1は、本開示及び参照により援用されるWO2015/042164に従った反復単位の組成を示す。各絹様ポリペプチドは、1つ以上の式1によって規定される反復単位を有していてもよい。

{GGY-[GPG-X]₁]-GPS-(A)_{n2} }_{n3}. (配列番号 13) (式1)

40

【0113】

組成の可変要素X₁(「モチーフ」と呼ばれる)は、以下の式2に示すアミノ酸配列の

50

いずれか 1 つに従い、 X_1 は各準反復単位内で無作為に変動する。

$X_1 = \text{SGGQQ}$ (配列番号 14) または GAGQQ (配列番号 15) または GQGPY (配列番号 16) または

AGQQ (配列番号 17) または SQ (式 2)

【0114】

再び式 1 に言及すると、式 1 で

“GGY-[GPG- X_1] n_1 -GPS” (配列番号 18)

で表される準反復単位の組成要素は、「第 1 の領域」と呼ばれる。準反復単位は、一部は、その準反復単位内で第 1 の領域が 4 ～ 8 回繰り返されて形成される。すなわち、 n_1 の値は、単一の準反復単位内で繰り返される第 1 領域単位の数を示し、かかる n_1 の値は 4、5、6、7、または 8 のいずれか 1 つである。「(A) n_2 」(配列番号 19) で表される組成要素（すなわち、ポリ A 配列）は「第 2 の領域」と呼ばれ、それぞれの準反復単位内でアミノ酸配列「A」を n_2 回繰り返すことにより形成される（配列番号 19）。すなわち、 n_2 の値は、単一準反復単位内で繰り返される第 2 の領域の単位の数を示し、上記 n_2 の値は、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 のいずれか 1 つである。いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドの反復単位の、式 1 及び 2 に記載の準反復を含有する配列に対する配列同一性は、少なくとも 95 % である。いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドの反復単位の、式 1 及び 2 に記載の準反復を含有する配列に対する配列同一性は、少なくとも 80 %、または少なくとも 90 %、または少なくとも 95 %、または少なくとも 99 % である。

【0115】

さらなる実施形態では、3 つの「長い」準反復には、3 つの「短い」準反復単位が続く。短い準反復単位は、 $n_1 = 4$ または 5 のものである。長い準反復単位は、 $n_1 = 6$ 、7 または 8 のものと定義される。いくつかの実施形態では、短い準反復のいずれも、反復単位の各準反復単位内の同一の位置に同一の X_1 モチーフを有する。いくつかの実施形態では、6 つの準反復単位のうち 3 つ以下の準反復単位が同一の X_1 モチーフを共有する。

【0116】

さらなる実施形態では、反復単位は、反復単位内で同一の X_1 を続けて 3 回以上出現させて用いない準反復単位で構成される。さらなる実施形態では、反復単位は準反復単位で構成され、ここで、準反復のうち少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 の準反復は、反復単位の単一準反復単位内で同一の X_1 を続けて 3 回以上用いない。

【0117】

したがって、いくつかの実施形態において、本明細書では、低分解性の絹様ポリペプチドを組換えで発現して、細胞培養物から単離された産物に存在する完全長ポリペプチドの量を増大させる酵母菌株が提供される。いくつかの実施形態では、絹様ポリペプチドを発現する菌株は、PAS__chr4__0584 ノックアウト及び PAS__chr3__1157 ノックアウトを含む *P. pastoris* 株である。いくつかの実施形態では、絹様ポリペプチドを発現する菌株は、sec72 ノックアウト及び／または過剰発現された SSH1 トランスロコン複合体を含む *P. pastoris* 株である。

【0118】

(表 5) 18 B ベクター

10

20

30

40

50

種類	配列番号	5' から3' 配列
8B絹様 ポリペプチド コード配列	20	ggtggttacg gtccaggcgc ttggtcaacaa ggtccaggaa gtggtggttca acaaggacct 60 ggcggtcaag gacctacgg tagtgccaa caaggtccag gtggagcagg acagcagggt 120 ccggaggcc aaggacctta cggaccaggt gctgctgctg ccgctgctgc cgctgcccga 180 ggttacggtc caggagccgg acaacagggt ccagggtggag ctggacaaca aggtccagg 240 tcacaaggtc ctggtggaca aggtccatc ttggtcagcag ggtccctggtg ctggtcaaca gggaccagg 300 agtcaaggac ctggttcagg ttggtcagcag ggtccaggag gacagggtcc ttacggccct 360 tctgccgtg cagcagcagc cgtgccga ggaggtatcg gacctggtgc tggacaacga 420 tctcaaggac caggagcaga aggtccttat ggacctggcg ctggccaaca aggacctggt 480 tctcagggtc caggttcagg aggccaaaca ggtccaggag ttcaaggacc atacggacca 540 tccgctgcg cagctgcagc aggttcagg ttggtcaggt ggatatggc caggagccgg acaacagggt 600 cctgggtcac aaggtccagg atctggtggt caacaggac caggcgcca gggaccttat 660 ggtccaggag ccgctgcagc agcagcagct gttggaggtt acggtccctgg tgcggtcaa 720 caaggcccg gatctcaggg tcttggtatc ggaggacaac aaggtcctgg aggtcagggt 780 ccatacggac cttcagcagc agctgctgct gcagccgctg gtgtcaggag gtccagcagg ccctggtgct 840 ggtcaacaa gaccgggttc tcagggtccg ggttcaggag gtccagcagg cctggtgga 900 caaggacctt atggacctag tgcggctgca gcagctgccg ccgcaaggtg ttacggteca 960 tacggtagtg gccacaagg aggaagtgtc ggtcaacaa gacctggcgg tcaaggacct 1020 ccttacggac caggtgctgc tccagggtga gcaggacag aggttcggg agccaagg 1080 gccggacaac aggttccagg tgctgccgc gctgccgctg ccggaggtta cggttccagg 1140 ggacaaggtc cctacggtcc tggagctgga caacaaggtc caggatcaca aggtcctggt 1200 tcagggtggtc agcagggtcc tgggtgctgt caacagggtc caggtagtca aggacctggt 1260 gcaggcgtg ccgagggagg atacggacct ggtgctggac gcccttctgc cgctgcagca 1320 ggacaaggtc cttatggacc ttgctgctgc caacaaggac aacgatctca aggaccagg 1380 tcaggaggcc acaaggccc aggaggtcaa ggaccatacg gaccatccg tgcggcagct 1440 gcagctgctg caggtggata tggcccagg gccggacaac aggttctggt ttcaaaagg 1500 ccaggatctg gtggtcaaca gggaccagg cctggtggac cttatggtcc aggaccgct 1560 gcaggcagcag cagctgttgg aggttacggc cctggtgccg gtcaacaagg cccaggatct 1620 cagggtcctg gatctggagg acaacaagg cctggaggtc aggttccata cggaccttca 1680 gcaggcagctg ctgctgcagc cgctgggtgt tatggacctg gtgctggtca acaaggacct 1740 ggttctcagg gtccgggttc aggaggtcag cagggtccctg gtggacaagg acctatgga 1800 cctagtgcgg ctgcagcagc tgccgcgca ggtggttacg gtccaggcgc tgggtcaaca 1860 ggtccaggaa gtggtggtca acaaggacct gggtgtcaag gacctacgg tagtggccaa 1920 caagggtccag gtggagcagg acagcagggt ccgggaggcc aaggacctta cggaccagg 2040

10

20

30

40

50

		gctgctgctg ccgcccgtgc cgctgcccga ggttacgggtc caggagcccg acaacagggt 2100 ccaggtggag ctggacaaca aggtcccagga tcacaagggtc ctggtggaca aggtccatag 2160 ggtcctggtg ctggtcaaca gggaccagggt agtcaagggtc ctggttcagg tggtagcagc 2220 ggtccaggag gacagggtcc ttacggccct tctgcccgtg cagcagcagc cgctgcccga 2280 gggagatagc gacctggtgc tggacaacga tctcaaggac caggagacga aggtccttat 2340 ggacctggcg ctggccaaca aggacctggt tctcagggtc caggttcagg aggccaaaca 2400 ggccaggag gtcaaggacc atacggacca tccgctgcgg cagctgcagc tgcctgcagg 2460 ggatatggcc caggagccgg acaacagggt cctgggtcac aaggtccagg atctggtggt 2520 caacagggtc caggccggca gggaccttat ggtcccaggag ccgctcagc agcagcagct 2580 ttggagggtt acggccctgg tgcccgtcaa caaggccagc gatctcaggg tccctggatct 2640 ggaggacaac aaggtcctgg aggtcagggt ccatacggac cttcagcagc agctgctgct 2700 gcagccgctg gtggttatgg acctggtgct ggtcaacaag gaccgggttc tcagggtccg 2760 ggttcaggag gtcagcaggg ccctggtgga caaggacctt atggacctag tgcggctgca 2820 gcagctgccc ccgca 2835
18B ポリペプチド 配列	21	GGYGPGAGQGGSGGQGGGQGGPYGSGGQGGGAGQGGGQGGPYGPGAAAAAAG GYGPAGQGGGAGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGGGQGGPYGP SAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGGGQGGPYGP SAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGGGQGGPYGP QGSGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGGGQGG QGPYPAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPYGSGGQGGGAGQGGGQGG PYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGG SGGQGGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGG SGGQGGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGG AAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGG GSQGGSGGQGGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPYGSQ QGGAGQGGGSGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPY GPGAGQGGGSGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPY GPGAGQGGGSGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPY QQGGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPYGPGAAAAA AAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPYGPGAAAAA
細様 ポリペプチド の反復配列	22	GGYGPGAGQGGSGGQGGGQGGPYGSGGQGGGAGQGGGQGGPYGPGAAAAAAG GYGPAGQGGGAGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGGQGGPYGP SAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPYGP SAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPYGP QGSGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGG QGPYPAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGG PYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGG SGGQGGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGG SGGQGGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGPYGPGAGQGGGSGGQGG AAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGG GSQGGSGGQGGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPYGSQ QGGAGQGGGSGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPY GPGAGQGGGSGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPY GPGAGQGGGSGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPY QQGGGQGGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPYGPGAAAAA AAGGYGPGAGQGGGSGGQGGGSGGQGGPYGPGAAAAA

10

20

30

【0119】
等価物及び範囲

当業者であれば、本明細書に記載の本発明に従った特定の実施形態の多くの等価物を認識するであろうし、または慣用の範囲の実験を用いて該等価物を確認することができるであろう。本発明の範囲は、上記の「発明を実施するための形態」に限定されることを意図するものではなく、その範囲は添付の特許請求の範囲に記載されるとおりである。

【0120】

特許請求の範囲において、「a」、「an」、及び「the」などの冠詞は、それに反する指示があるかまたは文脈から別段であることが明らかでない限り、1つまたは2つ以上を意味する場合がある。ある群の1つ以上の構成要素の間に「または」が含まれる特許

40

50

請求の範囲または発明を実施するための形態は、その群の構成要素の1つ、2つ以上、もしくは全部が、所与の製品もしくはプロセス中に存在する、該製品もしくはプロセス中で使用されている、または該製品もしくはプロセスに他の点に関連していれば、それに反する指示があるかまたは文脈から別段であることが明らかでない限り、要件を満たすものとみなされる。本発明は、上記群の正確に1つの構成要素が、所与の製品もしくはプロセス中に存在する、該製品もしくはプロセス中で使用されている、または該製品もしくはプロセスに他の点に関連している実施形態を含む。本発明は、上記群の構成要素の1つ以上、もしくは全部が所与の製品もしくはプロセス中に存在する、該製品もしくはプロセス中で使用されている、または該製品もしくはプロセスに他の点に関連している実施形態を含む。

【0121】

用語「含む (comprising)」は、非制限的でありかつ許容することを意図するが、さらなる要素またはステップを含むことが必須ではないことにも留意されたい。したがって、本明細書で用語「含む (comprising)」が使用される場合、用語「からなる (consisting of)」も包含され開示される。

【0122】

範囲が与えられている場合は端点が含まれる。さらに、別段の指示がない、または文脈及び当業者の理解から別段であることが明らかでない限り、範囲として表される値は、本発明のさまざま実施形態において記載される範囲内の任意の特定の値または部分範囲を、文脈から明らかに別段の指示がなされない限り、当該の範囲の下限の10分の1の単位までとることができることを理解されたい。

【0123】

すべての引用の出所、例えば、参考文献、刊行物、データベース、データベースエントリ、及び本明細書で引用した技術は、たとえ引用中に明示的な記述がない場合であっても、参照により本出願に援用される。引用の出所の記述と本出願で矛盾がある場合は、本出願の記述が優先するものとする。

【0124】

小見出し及び表の題名は限定することを意図しない。

【実施例】

【0125】

以下は、本発明を実施するための具体的な実施形態の例である。これらの例は、例証することのみを目的として提供されるものであり、本発明の範囲を何ら限定するものではない。使用する数字（例えば、量、温度など）に関して正確さを保証するべく努めたが、実験上の何がしかの誤差及び偏差は当然のことながら許容されるべきものである。

【0126】

本発明の実施には、別段の指示がない限り、当技術分野の技術の範囲内のタンパク質化学、生化学、組換えDNA技法、及び薬理学の従来方法が使用される。かかる技法は文献において十分に説明されている。例えば、T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, 1993)、A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.), Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B (1992) を参照されたい。

【0127】

実施例 1： 18Bを発現する組換え酵母の製造

以下のようにして *P. pastoris* の株を、18B 絹様ポリペプチドを組換えで発現するように改変した。

【0128】

最初に、以降の編集及び工学的操作を容易にするため、*P. pastoris* の菌株を形質転換して KU70 機能を抑止した。*Pichia pastoris* (コマガテラ・ファフィ (*Komagataella phaffii*)) 株の HIS+ 誘導体である GS115 (NRRL Y15851) を、ゼオシン耐性マーカーに隣接するホモロジーアームからなり、KU70 座位を標的とする DNA カセットを用いて電気穿孔した。配列を表 12 に記載する。ゼオシンを添加した YPD 寒天プレート上に形質転換体を播種した。その結果 KU70 機能が抑止された。

10

【0129】

その後、この株を、絹様ポリペプチドをコードする組換え遺伝子を発現するよう改変した。*Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) 株の HIS+ 誘導体である GS115 (NRRL Y15851) を、絹様ポリペプチド (「18B」) (配列番号 21) の発現及び分泌が生じるよう組換えベクター (配列番号 20) を用いて形質転換した。形質転換は、参照により本明細書に援用される PMID 15679083 に記載の電気穿孔法により実現した。

【0130】

各ベクターは、組換えベクター中に絹様タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列と、それに隣接するプロモーター (pGCW14) 及びターミネーター (tAOX1 pA シグナル) とを有する 18B 発現カセットを含む。上記組換えベクターはさらに、細菌及び酵母の形質転換体を選択するための優性耐性マーカー、ならびに細菌の複製起点を含んでいた。第 1 の組換えベクターは、*Pichia pastoris* ゲノム中の AOX2 座位の 3' に隣接するよう 18B ポリヌクレオチド配列の組み込みを誘導する標的指向化領域を含んでいた。第 1 のベクターの耐性マーカーは G418 (別名ジェネティシン) に対する耐性を付与した。第 2 の組換えベクターは、*Pichia pastoris* ゲノム中の TEF1 座位の 3' に隣接するよう 18B ポリヌクレオチド配列の組み込みを誘導する標的指向化領域を含んでいた。第 2 のベクターの耐性マーカーはハイグロマイシン B に対する耐性を付与した。

20

【0131】**実施例 2：組換え Δsec72 株の製造**

18B を発現するように改変した細胞を、sec72 (配列番号 1) を標的指向化した 5' 及び 3' ホモロジーアームを有する DNA カセットを含むベクターで形質転換した。図 2 のプラスミドマップに示すように、上記ホモロジーアームは酵母選択マーカーに隣接し、sec72 遺伝子中に挿入されると、sec72 遺伝子をノックアウトする。酵母選択培地を添加した YPD 寒天プレート上に形質転換体を播種し、30℃で 48 時間インキュベートした。

【0132】**実施例 3：SSH1 トランスロコン複合体を過剰発現する組換え Δsec72 株の製造**

40

18B (配列番号 21) を発現するように改変した *P. pastoris* (Δsec72) 細胞を、SSH1 トランスロコン複合体を過剰発現させるためのベクターで形質転換した。上記ベクターのプラスミドマップを図 3 に示す。上記ベクターは、SSH1 (配列番号 3)、SSS1 (配列番号 5)、及び SBH2 (配列番号 7) のオープンリーディングフレームを含む。各オープンリーディングフレームは、プロモーター及びターミネーターに作動可能に連結されている。酵母選択培地を添加した YPD 寒天プレート上に形質転換体を播種し、30℃で 48 時間インキュベートした。

【0133】**実施例 4：プロテアーゼ二重ノックアウト株の製造**

ΔΔプロテアーゼ株 (すなわち、二重プロテアーゼノックアウト) を生成させるために

50

、選択した酵母株を、ノーセオスリシン耐性マーカーに隣接する約1150bpのホモロジーアームを有するDNAカセットを含むベクターで形質転換した。上記ノーセオスリシン耐性マーカーを含むプラスミドマップを図4Aに示し、配列を表13に記載する。それぞれの標的に対して用いるホモロジーアームを表8に記載のプライマーで増幅させ、ノーセオスリシン耐性プラスミドに挿入した。ホモロジーアームをノーセオスリシンプラスミドに挿入して、図4B及び図4Cに示すように、標的プロテアーゼに対する3'及び5'ホモロジーアームに挟まれたノーセオスリシン耐性マーカーを含むカセットを作製した。図4Bには、ホモロジーアーム(HA1及びHA2)に挟まれた耐性カセット(Nour耐性カセット)を示す。図4Cには、*Saccharomyces cerevisiae* (pILV5)由来のILV5遺伝子由来のプロモーター、ストレプトマイセス・ノウルセイ(*Streptomyces noursei*) (nat)由来のノーセオスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、及び*Saccharomyces cerevisiae*由来のCYC1遺伝子由来のポリAシグナルを含む、ノーセオスリシンマーカーの詳細を示す。

【0134】

YPS1-1(配列番号77)を標的指向化したホモロジーアームを有するベクターを用いて改変酵母株を形質転換した。ノーセオスリシンを添加したYPD寒天プレート上に形質転換体を播種し、30℃で48時間インキュベートした。

【0135】

(表6) *P. pastoris*株での欠失のために標的とされるプロテアーゼ

プロテアーゼ 遺伝子の記号	プロテアーゼ OFR配列 (配列番号)	プロテアーゼ ポリペプチド 配列 (配列番号)
PAS_chr4_0584 (YPS1-1)	9	10
PAS_chr3_1157 (YPS1-2)	11	12

【0136】

ダブルノックアウトを生じさせるため、上記で製造した単一プロテアーゼノックアウト株からノーセオスリシン耐性を消失させた。YPS1-2(配列番号80)を標的指向化したホモロジーアームを有するベクターを用いて単一プロテアーゼノックアウト株を形質転換した。ノーセオスリシンを添加したYPD寒天プレート上に形質転換体を播種し、30℃で48時間インキュベートした。

【0137】

実施例5: $\Delta sec72$ が組み込みコピー数全体にわたってMF α -18B分泌を改善

2、4、または6コピーの、MF α 1(sc)プレプロリーダー配列を含む18B(AbMaSp2 79kDa)を発現するように改変した*Pichia pastoris*株を、実施例1に記載の技法を用いて調製した。

【0138】

上記のそれぞれの $\Delta sec72$ 株を実施例2に記載の技法を用いて調製した。2X、4X、及び6X 18B発現株のそれぞれについて $\Delta sec72$ 株及びWT株を調製した。2X、4X、及び6Xの18B発現株のそれぞれについて、WT株及び $\Delta sec72$ 株(すなわち、SEC72KO株)からのMF α -18Bの分泌をELISAで測定し、その結果を図6に示す。

【0139】

図6を参照して、「絹コピー」は、各株におけるMF α 1(sc)プレプロリーダー配列を用いた18B(AbMaSp2 79kDa)用の発現カセットの数である。上記18Bは、ELISA検出用に3xFLAGエピトープでC末端にタグ付けされている。エ

ラーバーは、 $n \geq 4$ の生物学的な繰返し実験間の平均値の標準誤差を示す。この結果は、*sec72*遺伝子を欠失させることにより、組み込みコピー数（すなわち、2X、4X、及び6Xの絹コピー）全体にわたってMF α -18Bの分泌が改善されることを示している。

【0140】

実施例6：*Δsec72*は非MF α シグナルからの分泌を改善

P. *pastoris*株を実施例1に従って改変して、それぞれが異なる分泌シグナル、すなわち、PEP4(sc)、CPY+4(sc)、DAP2(sc)、及びMF α 1(sc)を含む4種の異なる絹ポリペプチドを発現させた。それぞれの完全リーダー配列は、表示したシグナルペプチドとMF α 1(sc)プロペプチド(*S. cerevisiae*オーソログの系統名：YPL187W)から構成されるハイブリッドである。(sc)は当該シグナルペプチドが*S. cerevisiae*由来であることを示す。PEP4(sc)、CPY+4(sc)、及びDAP2(sc)を用いてポリペプチドを組換えで発現する株は、それぞれ単一の発現カセット（すなわち、1絹コピー）を含む。MF α 1(sc)を組換えで発現する株は、2つの発現カセット（すなわち、2つの絹コピー）を含む。WT株と*Δsec72*株からの分泌を比較するために、上記のそれぞれの*Δsec72*株を実施例2に記載の技法を用いて調製した。DAP2(sc)を含む*Δsec72*株については、実施例4に記載のように、当該の株をさらに改変して、YPS1-1及びYPS1-2プロテアーゼをノックアウトした。WT株及び*Δsec72*株からの各分泌シグナルによるポリペプチドの分泌をELISAによって測定し、その結果を図7に示す。

【0141】

上記の結果は、*sec72*遺伝子を欠失させることによってMF α 1(sc)ではないシグナルペプチドを含むポリペプチドの分泌を改善することを示している。エラーバーは $n \geq 4$ の生物学的な繰返し実験間の平均値の標準誤差を示す。

【0142】

(表7A) MF α 1(sc) ペプチド配列

	配列	配列番号
MF α 1(sc) プロペプチド ヌクレオチド コード配列 (5' から3')	gctccagtcaacactacaacagaagatga aacggcacaaattccggctgaagctgtca tcggttactcagatttagaagggtatttc gatggtgctgttttgccattttccaacag cacaataacgggttattgtttataaata ctactattgccagcattgctgctaaagaa gaaggggtatctctcgagaaaagagaggc tgaa	105
MF α 1(sc) プロペプチド ポリペプチド 配列	APVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDF DVAVLFPFSNSTNNGLLFINTTIASIAAKE EGVSLEKREAE	106

【0143】

(表7B) 絹分泌シグナル

10

20

30

40

50

分泌シグナル	配列	配列番号
PEP4 ヌクレオチド コード配列 (5' から3')	atgttcagcttgaaagcattattgccatt ggccttggtgttggtcagcgccaaccaag ttgctgca	83
PEP4 ポリペプチド配列	MFSLKALLPLALLLVSANQVAA	84
PRC1, 変異体 (すなわち, CPY+4) ヌクレオチド コード配列 (5' から3')	atgaaagcattcctgttggttactactttt actaggcctgtccactacactcgctaagg ca	85
PRC1, 変異体 (すなわち, CPY+4) ポリペプチド配列	MKAFLLLLLLLGLSTTLAKA	86
DAP2 ヌクレオチド コード配列 (5' から3')	atggaaggtggcgaagaagaagttgagcg cattcctgatgaacttttcgatacaaaaa agaagcatttggttagataagctcataagg gtcgggaataatccttggtactcctgatatg gggactgttttggttgctaaaaagtatt	87
DAP2 ポリペプチド配列	MEGGEEEVERIPDELFDTKKKHLLDKLIR VGIIILVLLIWGTVLLKSI	88
MF(α) 1, バリエーション ヌクレオチド コード配列 (5' から3')	atgagatttccttcaatttttactgctgt tttattcgcagcatcctccgcattagct	89
MF(α) 1, バリエーション ポリペプチド配列	MRFPSIFTAVLFAASSALA	90

【0144】

実施例7：Δsec72はより長い絹及び別個の絹配列の分泌を改善

P. pastoris株を、長い絹ポリペプチドArgioppe bruennichi (Ab) MaSp2 (106 kDa) (配列番号43)、Latrodectus hesperus (Lh) MaSp1 (55 kDa) (配列番号44)を発現するように、実施例1に従って改変した。Ab MaSp2 106 kDa (別名24B)は、Ab MaSp2 79 kDa (18B)のより長いコンカテマーである。Lh MaSp1 55 kDaは別の類別のスピドロインとは別個の配列である。

【0145】

10

20

30

40

50

WT株及びΔsec72株からの分泌を比較するために、それぞれのΔsec72株を実施例2に記載の技法を用いて調製した。実施例4に記載のように、LhMaSpl(55kDa)を含む株をさらに改変して、YPS1-1及びYPS1-2プロテアーゼをノックアウトした。WT株及びΔsec72株からの長い絹ポリペプチドの分泌をELISAによって測定、その結果を図8に示す。エラーバーは $n \geq 4$ の生物学的な繰り返し実験間の平均値の標準誤差を示す。

【0146】

Argioppe bruennichi MaSp2タンパク質アミノ酸配列(配列番号43)：

MNWSIRLLALGFFVLSTQTVFAVGQAATPWENSQLAEDFINSFLRFIAQS GAFSPNQLDD
MSSIGDTLTKTAIEKMAQSRKSSKSKLQALNMAFASMAEIAVAEQGGLSLEAKTNAIANA
LASAFLETTGTFVNQQFVSEIKSLIYMIAQASSNEISGSAAAAGGGSGGGSGGGYGGQ
ASASASAAAAYGSAPQGAGGPAPQGGPSQQGPVSGQPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQQGP
GSQGPSSGGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQG
PGSGGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPS
AAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQ
GPGSGGQQGPGGQGPYGSQGGQGPAGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQQG
PGGAGQQGPGSQGPGGQGPYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAG
GYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAGGYGPG
AGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQG
PGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAG
GGYGPGAGQQGPGSGGQQGPGGQGPYGSQGGQGPAGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAG
GYGPGAGQQGPGAGQQGPGSQGPGGQGPYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGP
SAAAAAAGGYGPGAGQRSQGPGGQGPYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGP
SAAAAAAGPGAGRQGPSSQGPSSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAGPGARRQGPSSQ
GPGSGGQQGPGGQGPYGSQGGQGPAGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQQG
PGGAGQQGPGSQGPGGQGPYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAG
GYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGS
GGQGGPGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAA
AAAAAGGYGPGAGQQGPGSGGQQGPGGQGPYGSQGGQGPAGQQGPGGQGPYGPGAAAA
AAAAGGYGPGAGQQGPGAGQQGPEGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAGGY
GPGAGQQGPGSGGQGPSSGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGG
QQGPGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSGGQQGPGGQGPYGSQGGQGPAGQQ
GPGGQGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQQGPGAGQQGPGSQGPGGQGPYGPGAGQQGP
GSQGPSSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGSQGP
SGGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGP
AAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQ
GPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSGGQQGPGGQPYGS
QQQGPGGAGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQQGPGGAGQQGPGSQGPGGQ
PYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGS
GGQGGPGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSGGQQGPGGQGPYGSQGGQPGGAG
QQGPGGQGPYGGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAGPGARRQ
GPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGSQGGQPGGAGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAGGYGPG
AGQQGPGGAGQQGPGSQGPGGQGPYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAA
AAAAAGGYGPGAGQQGPGSGGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQQGPG
SQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPY
GPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSGGQQGPGGQGPYGSQGGQPGGAGQQGPGGQGPYGP
GAAAAAAGGYGPGAGQQGPGGAGQQGPGSQGPGGQGPYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQ
QGPGGQGPYGPSAAAAAAGPGAGRQGPSSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAG
PGARRQGPSSQGPGSGGQQGPGGQGPYGSQGGQPGGAGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAG
GGYGPGAGQQGPGSGGQQGPGSQGPGGQGPYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGSQGPY
PSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAG
QQGPGSGGQQGPGGQGPYGSQGGQPGGAGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQ
QGPSSQGPGSGGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPG
SQGPGSGGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPY
GPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGA
GQQGPGSGGQQGPGGQGPYGSQGGQPGGAGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAGGYGPGAG
QQGPGGAGQQGPGSGGQGPYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAA
AAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPGAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQG
PGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPS
AAAAAAGGYGPGAGQQGPGSGGQQGPGGQGPYGSQGGQPGGAGQQGPGGQGPYGPGAA
AAAAAAGGYGPGAGQQGPGGAGQQGPGSQGPGGQGPYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQG
GGQGPYGPSAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAG
GYGPGAGQQGPGSSQAPVASAAASRLSSPQASARVSSAVSTLVSSGPTS PAALSNAISSVV
SQVSASNPGLSGCDVLVQALLEIVSALVHILGSSSIGQINYAASSQYQMVGNSSVAQALG

10

20

30

40

50

【0147】

Latrodectus hesperus MaSp1タンパク質アミノ酸配列（配列番号44）：

MTWSTRLLALSFLVLTQSLYALAQANTPWSSKANADAFINSFISAASNTGSFSQDQMED
 MSLIGNTLMAAMDNMGGRITPSKLQALDMAFASSVAEIAASEGGDLGVTTNAIADALTSA
 FYQTTGVVNSRFISEIRSLIGMFAQASANDVYASAGSSGGGGYGASSASASASAAAPSG
 VAYQAPAQAQISFTLRGQQPVSYGQGGAGPGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYG
 QGGAGQGGSGAAAAAAAAAGGTGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQ
 GGTGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGYGQGGSGAAAAAAAAAGGAGQGG
 QGGYGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGYGRGGAGQGGAAAAAAAAAGAGQG
 YGGQGGAGQGGSGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGSGAAAAAAAAAGGAGQGGQ
 YGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAA
 AGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGG
 GAAAAAAAAAGGAGQGGYGGRGGAGQGGAAAAAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAA
 AGQGGQGGYGGRGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAA
 AAAAAAGGAGQGGYGGRGGAGQGGAAAAAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGG
 AGQGGQGGDYGRGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAA
 AAASAAAGGAGQGGYGGRGGAGQGGAAAAAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAG
 QGGQGGYGGRGGYGQGGAGQGGAGAAAAATAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAAAA
 AAAAAAGGAGQGGYGGRGGAGQGGAAAAAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQ
 GGGQGGYGGRGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAAAA
 AAAAGGAGQGGYGGRGGAGQGGAGAAAAAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAASRGAGQGGQGG
 YGRGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAAAAAAAAAGG
 AGQGGYGGRGGAGQGGAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGGR
 YGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAAAAAAAAAGGAGQ
 GGYGRGGAGQGGAAAAAAAAAGSGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGGR
 GGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAAAAAAAAAGGA
 GQGGYGGRGGAGQGGAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGGRGG
 YGQGGAGQGGAGTAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAAAAAAAAAGGAGQGG
 YGRGGAGQGGAGAAAAAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGGR
 GYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGASQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGG
 GYGRGGAGQGGAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGRGGQGGYGGRGGYGQ
 GGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGTQGGAAAAAAAAAGGAGQGGYG
 RGGAGQGGAAAAAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGGRGGYG
 QGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAAAAAAAAAGGAG
 QGGYGGRGGAGQGGAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGGRGGY
 GQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAAAAAAAAAGGAGQGG
 YGRGGAGQGGAAAAAAAAAGSGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGGRGG
 YGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAAAAAAAAAGGAG
 GGAGQGGYGGRGGAGQGGAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYG
 RGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGNGQGGAGQGGAAAAAAAAAGGAG
 QGGYGGRGGAGQGGAAAAAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYG
 RGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGASQGGQGGYGQGGDYGQGGAGQGGAAAAAAAAAGGAG
 QGGYGGRGGAGQGGAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGRGGQGGYGGRGGY
 GQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAAAAAAAAAGGAGQGG
 YGRGGAGQGGAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGRGGQGGYGGRGGYGQ
 GAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAAAAAAAAAVGGAGQGGYGR
 GGAGQGGAAAAAAAAAGSGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGGGGYG
 QGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGY
 GRGGAGQGGAAATGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGGRGGYGQGG
 AGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAAAAAAAAAGGAGQGGYGRGG
 AGQGGAAAAAAAAAGAGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGGRGGYGQGG
 AGQGGAGAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAAAAAAAAAGGAGQGGYGGYGQGG
 GGAGAAAAASGPGQIYYGPQSVAPAAAAASALAAPATSARISSHASALLSNGPTNPAS
 ISNVISNAVSQISSNPASACDVLVQALLELVLTALLTIIGSSNIGSVNYDSSGQYAQVV
 TQSVQNAFA

10

20

30

40

【0148】

実施例8：SEC72を欠失させると分泌が改善するが、ノックダウンでも過剰発現でも改善なし

P. *pastoris*株を、18B絹様ポリペプチドを発現する組換え遺伝子を含む4コピーのDNAカセットを含むように、実施例1に従って改変した。 $\Delta sec72$ 株は実施例2に記載の技法を用いて調製した。実施例4に記載のように、これらの株をさらに

50

改変して、Y P S 1-1 及び Y P S 1-2 プロテアーゼをノックアウトした。

【0149】

この株から、T H I 1 1 プロモーター (p T H I 1 1) に作動可能に連結された組換え s e c 7 2 遺伝子を含むベクターを用いて形質転換することにより、s e c 7 2 を過剰発現する株を調製した。p T H I 1 1 は、ビタミンであるチアミンを含まない最少培地中で抑制解除される。過去の R N A s e q 及びプロモーター融合の研究から、p T H I 1 1 は、チアミンを含まないブロック及びタンク最少培地中で最も強力なプロモーターの1つである。

【0150】

さらに、18B絹様ポリペプチドを発現する4コピーの組換え遺伝子を発現するように改変した P . p a s t o r i s 株から、s e c 7 2 をノックアウトする代わりに、マーカーカセットで遺伝子の3' U T R を破壊する転写ノックダウン方法である D A m P (d e c r e a s e d a b u n d a n c e b y m R N A p e r t u r b a t i o n (m R N A 摂動による量の減少))を用いて、S E C 7 2 の発現をノックダウンした。

【0151】

W T 株、 Δ s e c 7 2 株、組換えで過剰発現された s e c 7 2 (p T H I 1 1 に作動可能に連結されている)を有する Δ s e c 7 2 株、及び s e c 7 2 ノックダウン株からの18B絹様ポリペプチドの分泌を E L I S A によって測定し、その結果を図9Aに示す。

【0152】

上記 Δ s e c 7 2 表現型は、s e c 7 2 の誘導性対立遺伝子により補完されれば元に戻る。同様に、S E C 7 2 のノックダウンは、W T と比較して絹の分泌に測定可能な影響を与えなかった。したがって、分泌は s e c 7 2 を欠失させることによって改善されるが、s e c 7 2 のノックダウンや過剰発現によっては改善されない。

【0153】

実施例9：S E C 6 3 複合体の化学量論に対する他の乱れは絹の分泌に影響せず

P . p a s t o r i s 株を、18B絹様ポリペプチドを発現する組換え遺伝子を含む4コピーのDNAカセットを含むように、実施例1に従って改変した。 Δ s e c 7 2 株は実施例2に記載の技法を用いて調製した。

【0154】

Δ s e c 7 2 表現型が S E C 7 2 の除去の直接的な効果であるか、または S E C 6 3 複合体の化学量論を乱すことの間接的な効果であるかを試験するために、p T H I 1 1 を用いて、3種の非 S E C 7 2 複合体メンバー (S E C 6 2、S E C 6 3、及び S E C 6 6) を同時に過剰発現させた (s e c 6 2、s e c 6 3、及び s e c 6 6 を有する3種が鎖状に連結した発現カセットを含むベクターを用いて上記株を形質転換することによって)。さらに、p T H I 1 1 を用いて、S E C 7 2 を過剰発現させた。E L I S A を用いて各株からの18Bの分泌を測定し、 Δ s e c 7 2 株と比較し、その結果を図9Bに示す。

【0155】

化学量論的变化 (S E C 6 2、S E C 6 3、及び S E C 6 6 の過剰発現、または S E C 7 2 の過剰発現) のいずれも、絹の分泌に測定可能な影響を与えなかった。エラーバーは $n \geq 3$ の生物学的な繰り返し実験間の平均値の標準誤差を示す。

【0156】

実施例10：R T q P C R によりトランスクリプトレベルを始めとする Δ s e c 7 2 に対する転写適応を示す。

Δ s e c 7 2 株を実施例2に記載の技法を用いて調製した。増殖後に m R N A を単離し、選択したマーカーに対して R T q P C R を実施し、 Δ s e c 7 2 に対する転写適応を分析した。

【0157】

最少培地中の「W T」株 R M s 7 1 からの倍率変化としての参照に対して正規化した発現 (A L G 9 または A C T 1) を図10Aに示す。網掛けは範囲を示し、中央の線は $n = 3$ の生物学的な繰り返し実験 (Δ s e c 7 2 の $n = 2$ を除く) 間の中央値を表す。S S H

10

20

30

40

50

1 転写レベルは3つの摂動すべてにわたって4～8倍に増加する。 $\Delta sec72$ はSEC61トランスロコン成分の発現を $1/2 \sim 1/4$ に減少させる。

【0158】

図10Bは、中心化した、対数スケールでの、参照に対して正規化した発現データの、主成分空間上への投影図（左図＝PC1対PC3、右図＝PC2対PC3）を示す。株の遺伝子型により繰り返し実験データを色分けし、これにより、遺伝子型間の変動に比較して、遺伝子型内の変動が低いことが示される。負荷係数を調べると、PC1に沿ったほとんどの変動は強力なSSA3の抑制によって駆動され、PC3に沿ったほとんどの変動はSEC61トランスロコン複合体の抑制によって駆動されることが明らかになった。これらの3PCは元の20次元由来の変動の99%を再構築する。

10

【0159】

実施例11：SSH1の過剰発現により $\Delta sec72$ 絹分泌株の増殖速度が改善

SSH1はER転座においても機能するが、*S. cerevisiae*の増殖及びSEC63複合体との相互作用の欠如に対するその非必須性においてSEC61とは異なる。SSH1は転座基質の優先傾向を示す場合もあるが、それらの優先傾向はSEC61の優先傾向と広範に重なり合う。

【0160】

SSH1の過剰発現が $\Delta sec72$ 株の増殖を促進することができるかどうかを試験するために、*P. pastoris* $\Delta sec72$ 株を実施例2に記載の技法を用いて調製した。SEC61及びSSH1複合体（SSS1、SBH2、及びSEC61またはSSH1の1つ）の制御配列ならびにコード配列を、PCRによって組み込みプラスミド上でアセンブルした。結果として生じる組み込みによって、遺伝子コピー数のSEC61またはSSH1複合体の1つが複製される。*P. pastoris* ($\Delta sec72$)細胞を、実施例3に記載のように、SSH1トランスロコン複合体の過剰発現のためのベクターで形質転換した。同様に、*P. pastoris* ($\Delta sec72$)細胞を、SEC61の過剰発現用のためのベクターで形質転換した。実施例4に記載のように、選択した株（図11において「 $\Delta\Delta$ 」で示す）をさらに改変して、YPS1-1及びYPS1-2プロテアーゼをノックアウトした。

20

【0161】

YPD中での前培養物を最少培地（RMml7）中、1:1600で希釈した。OD600を、希釈後19時間で開始した8時間の指数関数的増殖期間にわたって6つの時点で記録した。増殖速度を見積もるための線形モデルフィット $\log(OD600)$ 対時間及び $n=6$ の生物学的な繰り返し実験間の勾配の標準誤差。各株について測定した増殖を図11に示す。倍加時間は増殖速度の逆数として表示する。推定値の相反変換に起因してエラーバーは非対称である。

30

【0162】

SEC61及びSSH1の複製は、SEC72絹産生株のより速い倍加を促進する（図11、左側）。この効果は、細胞内に蓄積した絹の負荷を減少させることに起因する可能性がある。ただし、 $\Delta sec72$ は顕著な増殖障害をきたし、この増殖障害はSSH1の複製によって一部が復旧するが、SEC61の複製では復旧しない（図11、右側）。

40

【0163】

実施例12：SSH1の複製により $\Delta sec72$ 株の発酵能力が向上

実施例1に従って、*P. pastoris*株を、18B絹様ポリペプチドを発現する組換え遺伝子を含む4コピーまたは6コピーのDNAカセットを含むように改変した。 $\Delta sec72$ 株は、実施例2に記載の技法を用いて、4コピーのDNAカセットを発現する組換え細胞から調製した。また、得られた*P. pastoris* ($\Delta sec72$)細胞の一部の、実施例3に記載のように、SSH1トランスロコン複合体の過剰発現のためのベクターで形質転換も行った。それぞれの株からの18Bの分泌をELISAを用いて測定し、その結果を図12A及び図12Bに示す。

【0164】

50

図 1 2 A において、各曲線は独立した流加発酵を表している。印を付けた点は、ブロス中に分泌された絹タンパク質の濃度（「1 8 B 力価」、y 軸）を始めとする分析対象に採取した試料である。供給プログラムは時変であることから、x 軸は累積グルコース供給量である。網掛けは、同一の株のすべての実験範囲を示している。 $\Delta s e c 7 2$ 欠失株は非常に多様な能力を示す。この株において S S H 1 が複製される場合（「2 N S S H 1」）、能力が向上し、かつばらつきが減少する。4 つの絹発現力セットしかもたない $\Delta s e c 7 2$ 2 N S S H 1 株の絹分泌量が、6 つの絹発現力セットをもつ参照株の分泌量の範囲に近づく。

【0 1 6 5】

比生産性（バイオマスに対する産生物の比）を各株の培養物について測定し、図 1 2 B に示す。 $\Delta s e c 7 2$ のバックグラウンドの増殖がより遅く、バイオマスの生成が少なくなり、それらのメトリクスがより高発現の最高力価の株のメトリクスを越えて上昇する。 $\Delta s e c 7 2$ 株の変動性が高いために、まとめたデータでは上位 $n = 2$ の実験のみを示している。エラーバーは平均値の標準誤差である。

【0 1 6 6】

他の実施形態

使用されている語句は限定する語句ではなく説明する語句であり、添付の特許請求の範囲に記載の範囲内で本発明の真の範囲及び趣旨から逸脱することなく、そのより広い態様において変更を行ってよいことを理解されるべきである。

【0 1 6 7】

本発明は、いくつかの記載実施形態に関してかなり長く、かなり詳細に説明されているが、かかる個々の詳細もしくは実施形態の任意のもの、または特定の実施形態の任意のものに限定されるべきであるということを意図するものではなく、逆に、先行技術に照らして添付の特許請求の範囲の可能な限り最も広い解釈を得るため、かかる特許請求の範囲を基準にして解釈されるべきであり、そのため、本発明の意図される範囲が有効に包含されるべきである。

【0 1 6 8】

本明細書で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許及び他の参考文献は参照によりその全体が援用される。矛盾がある場合は、定義も含め、本明細書が優先する。さらに、項目見出し、材料、方法、及び例は例示にすぎず、限定的ではないことが意図される。

【0 1 6 9】

配列

（表 8）プロテアーゼ O R F を標的化指向する 5' 及び 3' のホモロジーアーム（H A）のフォワード（F）及びリバース（R）プライマー

種類	配列番号	5' から 3' 配列
KO_PAS_chr4_0584_5' H A F	45	TACTACAGGCTGGCTGTTCC
KO_PAS_chr4_0584_5' H A R	46	CTCACTTAATCTTCTGTACTCTGAAGAAGTCCAACCTGTTGAACGCC
KO_PAS_chr4_0584_3' H A F	47	AGAAGTTGATTGAGACTTTCAACGAGGGTCCCCTTCAGCTACCTTT
KO_PAS_chr4_0584_3' H A R	48	TCCCTGCTAAGCCCTAATCG
KO_PAS_chr3_1157_5' H A F	49	CTCTGATTGCACGAGAAGGC
KO_PAS_chr3_1157_5' H A R	50	CTCACTTAATCTTCTGTACTCTGAAGTGAAAGGCGATTGGAGTTGC
KO_PAS_chr3_1157_3' H A F	51	AGAAGTTGATTGAGACTTTCAACGAGCTGGCTCTGCTTCTGGTACT
KO_PAS_chr3_1157_3' H A R	52	GATGTTGAGGCGGGCATAAG

【0 1 7 0】

（表 9）改変した配列を増幅させるためのフォワード及びリバースプライマー

10

20

30

40

50

		taogcatgtaacattatactgaaaaaccttgcttgagaaggtttttggagcgtcgaaggtctttaatttggaaagcttaaaccttctgtatag catacattataaccttgttatgcggccgcagatctaacaatccaaagagaaaggttgaatgaaacctttttggccatccgacatccacag gaggttatagagctgtatgcgtgtaaaaaatagtttaaaatctctctgaaagtatgttagtccatgtaatttgcctatgaatcgatacgc taattcgatgctgaacggatgcttactggcatgcattattcattaccatctaaagtgcgcacaacccagtaaatgcagtgaggg aagcttccctgtaaacctgctgtccctttaggaccatgcccaacgatacaatcgcgatacatctatcaatgtccctttccat ctatctatgcaagtaatgacagactctgttaactctgaagattctgattctgtgtaattctgtaaaatcatagaggtgactgagcctcacaagt gaccttttggcccccacacagatttaattttactgccccataagtaacagcaacgttaacgcacacactccaataaggagaaaaactttgatg accaatccaaatccaaatctcttttgcagactggaaatcgttacgggaatcatcagtgaacccaagctagtagtactcaatagtagtag gttcatcccccaagccgaccaaattttccaataatcagaaataaataaattgaatacaacaataaggattcgcgcgactggatttttaagtcc caacctgaatttccctttccacttaagtggacccaaaaagtcacgcaatcaacctacaaactcaaaacttttgaagagatcatcgatt taactgaagatatcgagataaatacatgtgcccgcatctacatcatcttctacccagttccctccagcacacagaaatcagagcca tcataagccaacaacaacagcacaaagtgcgcatatcttccaagggaacacctctccaatcatactcagatgatgaagacgaa gatttgcaaaattgttaggtccaaattgttcagcagcctctaggaattatgcaggaactttcaacgccccctgcaacatactccatt ttgacggttcaaacacgaatgaacaagccagatggctggacttcgagataaaaagtattgttagataatcttccaatcttgcagttca tgctcagtcgaataattatggagatcaataggttcaatttccactttgggcaatttaacagagaaagttaaaacctgcaggcgctcgg tcgttcggctgcggcgagcgtatcagctcactcaaaaggcgttaacggttatccacagaaatcagggtataacgcaggaaaaaacat gtgacaaaaagccagcaaaagccaggaacccgttaaaaaagccgcttgcgtgcttttccataggctccgccccctgacagagcat cacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaaacccgacaggaataaaagataccagggcgtttccccctggaagctccctcgtc gctcctctgttccgacctgcgcttaacggataacctgtccgcttctccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctg taggtatctcagttcgtgtaggtcgttcgctcaagctgggtgtgtgcagaaaccccttcagcccgaccgtgcgcttatcc ggtaaactatcgtcttgagtccaacccgttaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggatagcagagcgaggt atgtaggcgtgtctacagagttcttgaaagtgttgccctaaactacggtacactagagaacagtaatttggtactcgcgtctgtgaa gccagttaccttcggaaaaagadtgtgtagctcttgatccggcaaaacaaacccgctggtagcgggtgttttttggtttgcgaagcag cagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaaagatcctttgatcttttctacgggtgtctgacgtcagtggaacgaaaaactcaagtt aagggaatttttggctatgagattatcaaaaaaggaatttcaactagaatttcaaatcaaaaatgaagtttlaaaatcaactcaaaagt atatgagtaaaacttggctgacagttaccaatgcttaatacagtgaggcacctatctcagcgaactgtcttatttcttcacatagtt gcctgactccccgtcgtgataaactacgatacgggaggttaccatctggcccaagtgcgcaatgataccgcgcgacccacgt cacccgctccagatttatcagcaataaacacgacccgcgggaagggccgagcgcagaaadtggctcgtcaactttaaccgctccatcca gtctataattgttgcgggaagctagadtgaagttagtccgcagtttaatagttttgcgaactgttggccattgtctacagggcatcgtg gtgtcacgctcgtcgttttggatggcttcaattcagctccggttcccaacgaaccaagggagttacatgatcccccatgtttgtgcaaaa aagcggttagctcctcgtcctccgatacgttgcagaagtaagttggccgcaggttcatcactcatggttatggcagcactgcgataaa ttctcttactgtcatcctcgttaagatgcttttctgtgactggtagtactcaacaaagtcatcttgagaaatagtgtatgcggcga ccgagttgctcttcccggcgtcaatacgggataataacccgccaatagcagaactttaaaagtgcctcatcatgggaaaaacttctt cgggcaaaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcagttgaacccaactcgtgacccaactgatacttcagatcttt tactttcacacagcgtttctcgtgtgagcaaaaaacaggaagcaaaaatgccgcaaaaaagggaaataaggggcagacaggaatgttgaata ctcatcctcttcccttttcaattattgaagcatattatcagggttatttgcctcatgcgcatatatttgaattgtatttagaaaa ataaacaataataggggttccgcgcacatttccccgaaaaagtgcacct

10

20

30

40

50

40

(ヌクレオチド配列)		gcaattccaagtgaagccagttccaacaaatttttgtaatatattagagcaacttcaattgtgtgcgttgaaagtaaaatgcgaacaaattta agagataattctcgaaacccgacttcaaacgccaatatgatgtgcggcacacaaataagcgttcataatccgctgggtgactttctcgct ttaaaaaattatccgaaaaaattttgacggctagctcagctcctaggtacgttagctaaagaggagaaaaatggctaactgacctc tgctgtccgggttctgacgcgtcgtgacgttgctgggtgctgtgagttctggaccgacgtctcgtgacttcgtgacttcgttgag gacgacttcgctgggttctgacgaggttaacctgttcaatctgcttcaggacccaggttctccggacacacccctggctt gggtttgggttcgttggttcggacgaactgacgtgaatggctgaagtgtttctacaaactccgtgacgcttccgtccggctat gaccgaaatcgggtgaacacgcgtgggttcgtgagttcgtctgcgtgacccgctggtaacctgcttcaactcgttgcgaagacacag gactaacacgtccgacggcgccacgggtcccgagccctcgagatccgtcccccctttcccttctgcgatatactgtaattagttatg tcacgcttacattcacgccccccccacatccgcttaacgagaaaggaggttagacacacctgaagtcagggtccctatttatt tttttatagttatgttagttaagaacgtttatttatatttcaaaattttttcttctgtacagacgctgtacgcatgtaacat tatactgaaaaaccttgcttgagagaaggttttgggacgctcgaaggcttttaatttgcgaagct
SEC72 K0用 酵母選択 マーカー (Sh ble) (タンパク質 配列)	95	MAKLTSAVPVLRTARDVAGAVEFWTDRLGFSRDFVEDDFAGVVRDDVTLFI SAVQDQVVVPDNTLAWVVRGLDEL YAEWSEVVSTNFRD ASGPAMTEIGEQQPWGREFALRDPAGNCVHFVAEEQD

【0172】
(表11) SSH1複合体過剰発現ベクター

10

20

30

40

種類	配列 番号	配列 (5' から3')
完全プラスミド	96	ccagccaggacagaaaaatgcctcgacttcgctgctgcccaagggttgccgggtgacgcacacccgtggaacgggatgaaggcacgaaacc cagtggaacataaagcctgttcggttcgtaagctgtaatgcaagtgcgtgtaagctgacgcaactggtccagaaccttgaccgaaacg cagcgggtggtaacggcgagtcggcggttttcattggccttgcctggttttgcctggtacagtcctatgcctcggggcgcattccaaagc agcaagcgcgttacgcgcgtgggtcgatgttgatgttatggagcagcaacgatgttacgcagcagggtcagtcgccctaaacaaaag ttaaacaatcatgaggaagcgggtgatcgccgaagtatcgactcaactatcagagtagttggcgtcatcgagcgcctatctcgaacc

10

20

30

40

50

40

30

[illegible]

		tgaagtcctaggtccctatttattttttatagtattatgaattaaagaacgttatttatatttcaaaattttcttttttttctgtg acagacgctgtacgcatgtaacattatatactgaataacotgtctgagaagttttgggacgctcgaagctttaaattttgcaagctg cgaaataactcgtatagcatatccttggttattacagcggcgcgaatttttatctgattgaataaagaatgatcttcttgag atcgttttggtctgcggtaatctcttgctgaaacgaaaaaacccctgcaggcggtttttcgaaagttctctgagctacc aaactttgaaccgaggttaactggcttgaggagcgaagtcacaaaaactgtcccttcagtttagccctaaaccggcgcatgaact caagactaactcctcaaatcaattaccagtggtctgcagtggtgtcttcgatctgtcttcgggttggaactcaagacgatag ttacccgataaggcgcagcgtcggaactgaacgggggttcgtgatacacagtcagctggagcgaactgcctacccggaaactgag tgtcagggcgtggaatgagcaaacggcgccataacagcgggaatgacacggttaaacggaaagcaggaagcagcgcagcag gagcccgagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttgcacacactgatttgagcgtcagatttcgtgatgctt gtcagggggcgagcctatggaaaaacggcttgcgcggccctcactcctcttaagtattctcctggcatcttcocaggaa atctcggccctctgttaagccatttcgcctgcgcgaagtcgaacacgcagctagcagtcagtgagcgaagcgaagcgaata tctctgtatcacatactctgtacgcacggcgtgcagcctttttctcctgccacatgaagcacttcactgacacccctcatcagtcg cacatagtagcagatatacactcgcgtagcgtgatgtccggcggtgcgacgtc
SBH2 プロモーター	97	caactttctgcgcaccaatctcctttccattcaaatctctatacaacaaggcaggcttcgttcgctgagtgaagtgttgcaaaagcca aaccacgaaaaaccattgtcaaaaatggtagtgaaggcataagggcaaaaggcagctaaactttgtcataacgctcaaaagtgc tcttttttttgcaaaaaggatgttcttttatcacaaatagcagtgggaaatgacatcttcatacttcgtcatcaaatccatc gagttctgaaatccaaaggtttctgtgtgggataagcattcattctttgagcaggtgcctctggcttcctcctctagatgaa atttgccatcgttaggaggtgagtatgggaaaacgttgactgttgctcaatccaaaggatcaacgttgacactcggattgcggttc tgaggagacagcagcattataccgtggtgacccgggttacgcgcgagaggtatgctgtcgtgtgttgtagacagaagacgcata ccagacgctgcgagtgacatgcagaaattgaagggcgacgttgcatcccatattgtgtgcatacaagaacttggtgttctcag tcaattgtctcagctccatgtgataatgtgttcaactgtttcaaatgttcgaatcggtaggcgtggtctatcacgacaagctgtggcta ctatctaaagtggaagtaacggaaacacattgatgacacaggaattgacaggcgtgcataccccaataaacaattagtcgagat ttcaaccaattacgtaaagcgtcaaccccttttttgcaacacgtatcgcgaaagtcaggtgaaaccccttcattatcccaaa gtcgaccggaagctttaacaacatccata
SSS1 プロモーター	98	agacaaagtggagagtggaacaaattcttgatgttaattcgttaagatccttaacaaaatctttagcaaaaactgaaaagtgaagactacg atagggaatttacttgaaaaatatattcaagttttgtcagaatacccactccataattaacgacattattgtccttagaactattacg taccactgtgtgatatattactagatgagttggaaaaggttatgtttagtgggcttccctggatttgaaagaagaagataacga ggaagaagatgaagtctcgctcctatcgaaaaaaaacacagagatactgataattcagacgagtggcctcctgataccgataccag aaacaggtgacgaagaacgaagtgaaatactgaaacagagtcagaagaggaacccgatacaactctctcgcggaagaagaacg gctctgtggaaaaacaaagatggagattatccatgaaactcttatcgacaaaattactcactcctttgtctctatggaagaaagatac ctcaaataaacattaaaaatgaaatccaaagcagtcgttctgtgataccaaagactcggcaaaatgaaaagttaaaatgtaccgaa agcctaaacccaaaaccccttctcaggtgtctacgaacacgttatcgaacacagatcaaatataaaaagggttaaaagcagtcaca ggtgaagacgacgatgaactcaagacgaagacgaagtacgagtacgaggtcatctcggagagtgaagctgataactctgatga

		agaagaagatgaagaaatgggaatggcttttggaactatctagaatacacatagttaaaccacatcatcagggaataaacaattttctcgtatttgcattcccaacacctcgaccgagctgttcagttcgacctttaccacagttctttaactcccatcttgatctcctaaataacctacacaa
SSH1 プロモーター	99	ttctgaacgggtctttgagctgtctgtgcatcaaacatatcttcatctgttagttgtattgtttttatcacctaggagtgccatcctctggatggctgtcttgcaacttattagccactccaaaaatgccgggtctgggagatgacccgagacccattgacacccatatcagagtatcgagactcctctgtttccagttcttgcattgggaatttcataaattctcctattcttacctgttccatcagtgtttgtgttccacctcatctgttcgacaaatggtttaactgttccaataaatcaaccttatcaaaactttatcagaaaaatctcttgtcacgggccaataccggcaccaaagtctataccatatattgattttgtcaggatcgttagagaaaogactctttaaactttcttataaaaggctcatcgataccaacaacatctgcctttttggaaaccgaagtgtctcacgttacccacccaaaactccgtcgacagatgctctgggacgctgttccagatttcagggtcatcctcatcccatattgttctcatctgttgtaaaaatgggatacagtgatatattgaagggaattggttatgaagacctacctgagaaaaataattattatgcgccatccgacatccagaaaaattgatgaagattggctattgttgacggtttcttgatccccaaaaaaaacaaagaaatgctgcgtcctagttttgttcaaaagaatgggttctgtgctatgccattccccaccacaaagagctgtccccatcccataaagtgtgctgactgattatgttgcaaatccagtgctgtgattaccctccaacatcgacggaatttcggcaatggctgggaaaccccaattctcttgggtccgtcccatcaaaactctgaagtcatcttcaacacccaaactcaacagctatcatagaaaaat
SBH2 ターミネーター	100	gacctatatttaaacagggtttcatcatctgtactatatttacaaagtcacactgcgttttaggtatatactataaagacattcaagaagcacatccacaacttgtgcaagtctctgtcaaaatgtactagatgctgttttcagaaacatccctgcggttttgaggagattcctgaaattccccagtcctctctctgttagaggtctcttgagttcttgtgaatgctgaattggggttcttacctcaattctctatttagtgggaaatgtcttccccacaaattatttgcaatgggataccggcaactttactttgttccaacttatgtcccatctgaactttccgtcacggttgtcaacttgaacgtcgaaatgagctcagttatttcggtgacagtgctcagattcttttacttgatgttttatactgaaaagtagcgtgaatttgatatggtgcgataaattttgtggccagg
SSS1 ターミネーター	101	aagtttaggtttgaatacaaatgtgtatgcttaattatattcacttcgttttcattgatttttgcataccctgttgctggttaatcatctctatcgtgatccctctcaagtgcaccctcaaatagaagacaaacttatggaggtgtactaccacaaatcatcagtttgacgtttcttagtttcgtgtatcgtgcataccaaatttcagttcttccgtagtgttttgagcagtaggtttttaccogtctcttctttaaactcttgatatgagcaacttatacaacctcttataccacagctgaaggagaagcggtgtgtgtgttctctgttcagaaatcgccccagaaactgtggatcctgctgtgcaagattgaaaagcagaaaagagatggaagagagagaagcaagctcttaagagaggtcagcaagcccagggaagctcgggaaaggcgaagaatttagtcatgctaccacagataggtttgagaccaaaccagtaaaagctcccc

10

20

30

40

50

SSH1 ターミネーター	102	gtttagaataccttgaagactatccagacattccaccgcacacctcaatttaacctttacatcacatcacatattctatatagaggagagt tccattgctggtactgaacccacacacactctctttataccctacaaactcttgcctccaaactcaaggcgtcatctcgtgctcggtta tagacaataatggtaacccagtcacattcaaaagtgtcttttttgatatccatgatgaatttgggcattatattgaagttcgaactg ttttcctggcaacttttagctgtttgatgatcggtttgatataatttcacaccttgaggttatacagtagtggtttctccccaggtggtatc gtaaaaacctgggaaggattgtgtcaa
SSH1過剰発現 遺伝子用酵母 選択マーカー (Nat) (ヌクレオチド)	103	ttcagtaagtctttgtttctttgttgccagtggtgagccattttgacctcgtgaaagtttcttttagaatagtttgtttccagagggcc aaacattccaccctgtagtaagtgaagcgtggaagacccaagactggcctaaatcaggtataagttcgcagcactggcaggtgat ctttgaaaagtttctactagcagataagatccagtagtcatgcatatggaacaatgtacodgtggtgatactaagaacgcgtccctac taaccttcgcatctgttggccagttgtttgatcgatcaacgtgacaaagtttgcgattccgcgtgaagcatgcatacccaaggga cgctgttgaattccaagtggccagttccaaacaattttgtatattatagagcattctcattgtgttgccgttgaaaagtaaaaagc gaacaaattaaagagataaattctcgaaacccgacttcaaacgcacaatgatgtgcggcacacaaataagcgtttcataatccgctgggt gactttctcgttttaaaaaattatccgaaaaaatttttgacgggtagctcagtcctaggtacgttagcattaaagagagaaaaatg actactcttgatgacacagcctacagataataggacatcagttccgggtgacgcagaggtctatcgaaagccttggacggttcatcaac tactgatacgggtgttagagtcacccgtcacaggtgatggcttcaaccttgagagaggttccctgtagacccaccttaacgaaaagttt tccctgatgacgaaatcggtatgacgagttctgatcgtggtgaggaacggtgacctgattccagaacatttgcgcatacggagatgat ggtgacctggctggctgttgggtgctcctacagcggatggaatcgtagactcagttgaggacatcgaaatttgcaacctgaaca tcgtggtcacgggtgttggctgcgtgactgatggactggcaacagagtttgcctagaaaaagagagccggacatttgggttagaag tgaccaatgtcaacgcctcctgctattcacgcataataggcgaatgggttccactttgtgcggtcttgactgcttctgtatgacgga actgcttctgatggtgaacacgtcttttaccatgagtagtccatgacgcacgtcccgagcggcgccacgggtccacggcctcg gagatccgtccccccttttcccttctgcatatcatgataatgataatgtagtattgtcagccttaccattcaacgcctccccacacatccgctcta accgaaaagggaaggagtagacaacctgaagtctgaggtccctattttttttagttatttttagttatttaagaacgtttatttat atttcaaaatttttcttctgtacagacgcgtgtacgcatgtaacattatataactgaaaaaccttgccttgagaaggttttttgggac gctcgaaaggcctttaatttgcaagct
SSH1過剰発現 遺伝子用Y酵母 選択マーカー (Nat) (アミノ酸)	104	MTTLDDTAXPYRTSYPGDAEALDGSFTTDTFVRVTATGDTGFTLREVVDPPPLTKVFPDDESDDSDAGEDGDPDSRTFVAYGD DGDLAGFVVVSYSGWNRRLTVEDIEVAPHRHGHVGGRALMGLATFARERAGHLMLEVTNVNAPAIHAYRRMGFTLCGLDITALYD GTASDGEQALYMSMPCP

10

20

30

40

【0173】

(表12) P. pastorisにおけるKU70欠失用のHAアームを有するゼオシンカセット

[illegible]

10

20

30

40

種類	配列番号	5' から3' 配列
プラスミド配列	68	cttcagagtaacagaagattaaagtgaagagaattctaccgttcgtatagcatataacagaagttatttcagtaaatgtctctggtttctttgtgcagtggtgagccatttttgacttcgtgaaagtctcttttagaataagttgttccagaggccaaacattccaccgtagtaaaagtccaagcgtaggaagacccaagactggcataaatacaggtataagttgcgagcactggcaggtgatactgaaagtctctactagcagataaagatccagtagtcataatgcataatggcaacaaatgtaccgttggtatctaagaacgcgtcctataaaccttcgcattcgtccagtttggttgttatcgatcaacgtgacaaaggtttgcgattccgcgtgaagcatgcatatacccaaaggccctgttgcaattccaagtgaagccagttcccaacaaatctttgtaataatttagagcaccttcattgtgtgcgttgaaagttaaaatgcgaacaaatgaagataaattcgaacacgcgacttcaacgcgaatatgtgcggcacacaataagcgttcataatccgcgtgggtgaactttctcgttttaaaaaattatccgaaaaaattttttgacggctagctcagtcctcctaggtacgctagcattaaagaggaagaaaatgactactcttgatgacacagcctacagatatagagacatcaggttccgggtgacgcagggctatcgaagcctggagcgttcatctactatcacgtgttagagtcaacgtacaggtgatggctcaccttgagagagaggtccctgtagaccacccttaacgaaagtctccctgatgacgaatcggatgacgagttctgatgctggtgaggcgtgacctgatccagaaacattttgcgatacggagatgatggtgacctggtgacctttgtggtggtgctctacagcgatggaatcgtgactcacagttgaggacatcgaaagtgcacctgaacatcggtgcacggtgttggtgcgtgcactgatggactggcaacagagtttgcctagagaaagagagcggagacatttgggttagaagtgaccaaagtcaacgctcctgctattcacgcataataggcgaatgggtttcaccttggcggctcttgactgctttgatgacgggaaactgcttctgatggtgaaacagctcttacatgagtatgccaatgccaatagcacgtccgacggcgccacgggtcccgagatcccggtccccctctctaaaccgaaaggaggttagacaacctgaagtcctaggtccctatttttttttagttatgttagtataagaacgttatttatatttcaaatttttttttttttctgtacagacgcgtgacgcatgtaacatatatactgaaaaaccttgcgttgagaaggttttgggacgcctcgaaaggcttttaatttgcgaagctataaacttcgtatagcatataccttgttatgcggccgcaagaagtgtgattggactttcaacgag
AOX1 pAターミネーター	69	cttcagagtaacagaagattaaagtgaaga
Lox71 F	70	taccgttcgtatagcatatacattatacgaagtttat
pILV5	71	tteagtaaatgttttgtttttttttgttcagtggtgagccatttttgacttcgtgaaagtctcttttagaataagttgtttccagggccaaacattccaccgttagtaaaagtccaagcgttaggaagaccagactggcataaaatcagggtataagttgcgagcactggcaggtgatcttctgaaagtcttctactagcagataaagatccagtagtcataatggcaacaaatgtaccgttggtggaacctgaagaaacggtccctactaaccttcgcatttcgttgggtccagtttggtttatcgatcaacgtgacaaaggtttgtcgtattccggtaaagcatgcatatacccaaaggacgcctgttgcaattccaagtgaagccagttcccaacaaatctttgtaataatttagagcacctcattgtgtgcgttgaaagtataatgcgaacaaatgaagagataatctcgaaacccgcgacttcaaacgcgcaaatatgattgtgcgggcacacaataagcgtttcatatccgttcgggtgactttctcgttttaaaaaattatccgaaaaaattt
pproRBS	72	ttaaaagaggagaaaa

10

20

30

40

50

nat (ノーセオスリシン 耐性)	73	atgactactcttggatgacacagcctacagatatagacatcagttccgggtgacgcagaggctatcgaagccttggacgg ttcatttcaactactgatacgggtgttttagagtcacgcgtacaggtgatggcttcaccttgagagaggttcctgtagacccac ccttaacgaaagtcttccctgatgacgaaatcggatgacgagttctgatgctggtaggacggtagccctgattccagaaaca tttgcgcatacggagatgatggtagacctggctgttgggtgctctacagcggatggaaatcgttagactcaagtt tgaggacatcgaaagttagcactgaacatcgtggtcaccggtgttgggtcgtgcactgatgggacggcaacacagagtttgccta gagaaagaggagccggacatttgggttagaagtgaacaaatgtcaacgctcctgctattcacgcataataggcgaatgggt ttcaactttgtgcggctcttgatactgctttgtatgacggaaactgcttctgagtgggtgaacaaagctctttacatgagtatgcc atgtccatag
CYC1 ターミネーター	74	caagtcgcagcggcgccacgggtcccagggctccagagatccgtcccccttttcccttctcgatatcatgtaattagttta tgtcaacgtttacattcaacgccccctccccacacatccgctcttaaccgaaaggaaggagttagaacaacctgaagtcaggctc cctattttattttttatagttatgttagttattaaagacgttatattatatttcaaatctttctttttctgtacagacg cgtgtacgcgatgtaacatttatatactgaaaaccttgccttgagaagggttttgggacgcctcgaaggcttttaatttgcaagct ataacttcgtatagcatatcatattaccttcttat
LoxKR3 F	75	
HSP82	76	gcgccgcgaagaagtgtgattgagacttttcaacgag

10

20

30

40

【0175】
(表14) P. pastorisにおけるYPS1-1及びYPS1-2プロテアーゼ
欠失用のHAアームを有する例示的ノーセオスリシンカセット

種類	配列番号	5' から3' 配列
PAS chr4_0584 (YPSI-I) を標的とするホセロジームを有するノーセオスリシンカセット	77	tactacaggctggttctctcgcatggtgtttaattgtcctgaactgggttttctogtttatctcgggtattaccggagagccaccttgactgtaagggaacgatactggaactaagagagtaaatggaaaaggcaacagcgtttctggcgaaaccttaataatcaatgacggttacgaggttactctctaaagccagctcttatttctgaagcgagtcgaacgcttactttaaagggccagggacctaattatgacatcogatttttgacgagcgaggcggttcattaaagaaatggaggagttgaggaacctctggtggatatgagaacagatactcaattattcaggaaaccgatgaacacccagagatccgggttgccctgtttcttccattgctttaaaataaatggcaacttttgatgtgctagactgctgaggatatacggtactcaggaagatctggaattctaaattattaaagtttcagcaattggtgttacaaatgttgcatgaagcacagtggcatgactccagacatggtcttttgcaacgggaagttagctcagaagccgaccttcgaagacgacatagtttgtgatgatattgacgcttatgccagggggtgtgatgtctcagattattgttacgcgccaaagcaattactccagaactttagaataattcatggcaagattgtacaccttacaacgagcgtgggtctatgtataatattctcgaaattttggaccgtttttccgatttaaggtttttagctccattgcgcaacccccgcctccagactccttcgttatccgcaattcagcatggacaggttcacaaaaataaaatttcttgatatgggtccacttcaacatgcgctaccctgtaggaaaaaaagagaaacataaatatgcgcgaaacagaaaaacgtaatgtactgttctatatataaaactgttcagatcaatcataaattctcgaatttccgaactttccgctcagccagattttatttcgtaaaagacgcatcattggctctatgttgaaaggatcagttctgttatgggttgctttgatagcgagcgtaaccgggtgatggcagctcctagcgagtcgggcataaacggttgaaaaaacgagatgccaaaaacgttgttggcgttcaacagttgggacttcttccagagttacagagatttaagtgagagaattctaccgttctgtatatagcatatatata

10

20

30

40

50

	cgaagtatttcagtaagtcttctgtttcttctgttgcagtggtgagccatttgcactctcgaaagtcttctttagaataagt tgtttccagaggccaaaattccaccgttagtaagtgcagcgttagaagaccaaagactggcataaaatcaggtataaagt tcgagcactggcagtgactcttctgaaagtcttactagcagataagacccagtagtcataatggcaacatgtaccg tgggataagaacggtctactaaccttcgcattcttggctcgttggcttgcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtc gatcccgctaaagcgtacccaaagacccgttggcaattccaaatgagccagtcocaaacaattcttgaataattaga gcaattcatgtgtgtgcttgaagtaaaatggaacaaaataagagataactcgaacccgcgacttcaaacgcccaata tgaagtgcggcacacaataaaggttcataccgttgcgttgcgttctgcgttttaaaaaattatccgaaaaaaattttgacg gctagctcagtcctaggtacgttagcattaaagaggagaaaaatgactactcttgatgacacagctacagatataggacat caggtccgggtgacgcagaggtatcgaaagcttggacggtctactactgatacgggtgtttagagtcacccgtcacag gtgagtgcttcaacttgagagaggttcttcgtagaccaccccttaacgaaagtttccctgatgacgaattcggatgacgag ctgatgctggtgagcaggtgacctgattccagaaacatttgtcgcatacggagatgatggtgacctggtgcttgggtg tgggtgcttcacagcggatggaatcgttagactcacagttgagacatacgaagtgcacctgaacaactcgtggtaacggttgg gtcgtgcactgatggactgcaacagagtttctagagaaagaggcggacaatttgggttagaagtgaaccaatgtca acggtcctgctattcacgcataagggcaattgggttcacttggcgtcttgatactgcttggatgacggaaactgctt ctgatggtgaacaagcttttaacatgagtgcctatgccaatgtccatgcaagcggcggccacgggtcccagcctcgga gacggtccccctttctctgtcgatcatgtaattagttatgtaacgcttcaacttcagcctccccccacacatccgct ctaaccgaaaagggaagggttagacaaactggaagttaggtccctattattttttttatagttatgttagtataaagaacg ttatttataattcaaatttttttttttgtacagacggtgtaacgtatgaacattatactgaaaaaccttgccttgag aagggtttggagcgtcgaaagcttaatttgcagactataacttctgtagcatacatattacatttcttgcggcgca agaagtgattgagacttcaacgaggtcccccttcagctccctcaactcctcaataaaacaacataccagctccgcgcat gtatagtaataaagggctacattggatggacttcaacattcctcaataaaacaacataccagctccgcgcatccgcgcat cgcatcttcacattcgcgctccttcttagttctttgaaatcatcaatcgtcgcgcgtctacatcagagcaggaatt tatctttgcctccccaaaaattgccctcgtcaaatagattctttgaaactctgactattttgcctaaatagggttt tgttagttttttctcaaaagccaaaagaactctatttagattcatccagaaaaaatctttttctcaacccatttcgaagt gcggtggagcacagacataaaaagatgactacggttcaactacagggccagcagaggtcacccctgcgcgcatattctactg gaattcaacgagtgcctcgcagcatgcagtgatcgagctaaagcaagcaagggggaattaatatccccacatgagtgg aatccatcaactaatgagcaattcgcacgggaagagagagacaccccccaacataccaatccatcgatcatccagaaatca tcgaacatagctactcaaaagtcocgctcaggaaaacgcagactcgcgcgcgtatccaggaactagtaggctgcctttgat acbtgcgaacggtgtcgtcagaacaggttgaccagtaacgggaaggtcctggatgatattatagggccaaatattaaagg acttccgaagaagacgataccgaattccgcgcagagacacagagaccagaagaacattatgatcccgtaattacttctac gcagacgacacaaattccagaagtgctaaatacaaaacacagacgccccataacactcttagaacttccgacagtgaaacgt gtgggtcctctatcgttgcaaggttcgggataccagataatgcgacgattactataatcgtactcatataaactaaccc acaagcatgtccctcagcgtcatcagctccatgatcaagaacagatagggttcagcggga	
PAS chr4 0584 ホモロジーマーΔ1	tactacaggtggtgttctcgcagtggtgtttaatgtctgcactgggttttctgtttatcgggtattaccggagaccacttgg actgtaagggaacgatactggaataagagagtaattgcgaaggcacaacgcttctctggcgaacctaatcaatgacggttaac gagtttactactctaaagccagctctattttctagagcagatcaacgcttacttaaaaggccagggacacctaattatgac atcgattttgacgcagcagcagcgttctataaagaaatggaggatggaggaacctcgttgggataagaaacagatactca tattcaggagaccga tgaaacacccagagatccgggttgcgttcttctccctatgccttataaaataaaatgggcacgttctgattc tattcaggagaccga tgaaacacccagagatccgggttgcgttcttctccctatgccttataaaataaaatgggcacgttctgattc	78

		ctagactgacctgagggaatacaggtacaggaagatcttgaatctaaattattaaagtgttcagcaatttgggttacaattgttgcataagcagtgacctcagacacagtgctcttgcacagacatggtcttgcacaggaagtagctcagaaagcgcagccttcgaagacacacatagttgatgattgacgcttatgccaggggtgattgctagattattgtacacgccaagcaattactccagaacttccgaattcatggaagattgctacactcaacagagagctgggcttatctataattctcggaattttggacgcgttttcagattaaggttttagctccattgcgcacccccgcctccagatccttcgttatccagcatccagacaggttcaaaaaataaatttcttgatatgggtccactcaaacctgcctaccttgaggaataaaagagacataaaatatgcgcgaacagaaaaacgttaagtactgttctatatataaaactgttcagatacaatcaaaattctcagtttcaaaactttccgctcagccagattttatcgtaaagaaacgcatacttggctctatgttgaaggatcagttcttggcttgccttgcatagcagagctacccgggtgagtgagctcctagcgagtcgggcaacacggttgaaaaacgagatgcacaaaacgttgttgaggttcaacagtttgactt
PAS_chr4_0584 ホモロジーム2	79	ggtcacctcaagctaccttctctgttggtagttattctcggcgtgtgtagtagtatataaaagggcctacattggataggcttcaacattctcctaataaaacataccaacatcgcgcatctccgcatctccgcatctcacaatttcgcgctgccttccttaggttcttgaatcatcatcaatcgtcgcgtctacatcagagcaggaacttatcttgccttccccaaaaattgccactcgtcaaatagatttttgaatccttgaactatttttgcctaaatagggttttggtagttttcttcaaaagccaaaaaagaaacttatttagattcatccagaaaaaatcttttctcaacccattcgaagtgcgtggagcacagacataaaagatgactaccgttcaacctacagggccagacagagtcacccctgcgcatacttcaatggaattcaacgagtctcctcgcagcatgcagtgatcgagctaaagcatgaacggggttaatatatccacctcagtggaatccacctaatgagcaatgcaccacgggaagagagacaccccccaaatccaatccatcgcatcatccagaaatcatcgaaatagtaactcaagtcccgctcaggaaaaacccgagactcagcccgcatccagagactagtaggcctgcctttgtatccctgcacacgggtcgtcagaacaggttgacccagtcacagggaaaggatcctggatgattattataggcccaatcattaaggacacttcgaagaacgacataccgaatccgcagagacacacagagaagaacattatgatcacctggaattacttgcagcagacacacaaatccagaaagtgcataacaaaaacacagacgccccaaatacacactctagaaactccgacagtgaaagtgtgggtccttattcgttgcaacgttccggatctaccagataaagccgacgattactatctatatctgatgtactcaataacacaaagcaattgcccctcagcgtcatcacgtccatgatcaagaacacgattagggttagcagggga
PAS_chr3_1157 (YPSI-2)を 標的とする ホモロジーム を有する ノーゼオスリン カセット	80	gccttctcgtgcaatcagagctgttgaaagagagaagaggggcacacgcgaagctggtgttcaattgtgtgaattgaocggatatacaacctgctggagtgatagagagctggttcgtgacggagacggctcttatgatgcgattagacgacgtgttcagtttggtccgcgaacgcgtaaaaattatacaaccttgaccagatactatgatacattggaattcccaagaacagctagatacgtggaagaaacagagatactatgatagggaacgtaaagacttttccgaagtgtgagtttgggtgagggccagcgggtggggaggtggtgcgaatgtagatatagtaagcaaacacacagcgcgcgaagtcttcaacgagagcggcgtgggtcttgacgcaacgttaatactacacagtgtagcttgcgcgaacccgctcgacatttgcatacttgatactatgttgagacaccaatctcgtactattgcggcaacacagctgtaaatgtgactaaataaagctgatgaaggatgcagggcgtcgtaactatgttgcgcaacgttaattgttgcgcatccaaggtgaatgccggcacccatgacccctcttgcgtagtactataaaccgcgaggggtaccccttgccttctgcgcgagactaacgtcataacgtatatccacaatgtaactagtaagcccccgaaaaactcaatccccagaaacgtctaacgcctcctagtcatcgatacccatcgcactactgcactggcccccttaactgcgtgactcattctacttaacccgcctaagcttcgccccacatgcctgcgttttgcgaagtactgacgagtttgggttacatctctctattataaactactagatttcaacattcttccaccactcttgccaatgatcatcaacccattgggttgcacgcgttcagctagcaagtgcggaactcccaactcgccttctcacttccagtagacagagattaaagtgcagagaattctt

10

20

30

40

[illegible]

		gtctccgcgaacgtaaaaattatcaacottgaccagatcattggaatacatggattccaaagaacagctagatcacgtgga taggaatacacagagatatcatgatagggaacgttaagagcttttttcgaaaagtgtgagttgtgtgagggccagcggtggg gaggtgggtgggagcctccttggcgaattagatatagtaagcaagacaaagagcgcggaagtccttcaacgagcgggc gttggtcttgtagcgaacgttaattgactacacagttgcagcttgcgcaacggtgcacattttgatcatcatcatatgt tgagacacctctcgactatttcggccaaccagctgaaatttgactaatcaaaagctgatgaaggtgcagggcgtcgctca atttttgattgatgcatttaattgtttgagccattcaaggtgaaatgcggccacacagacacctctctgtgagtacta taaaacccgagggcaggtacccttggcctctcgagactacacagtcatacgttatccacaatgtactagtaataagccc cggaatacttaataccacagaaagctaaacgcctctatgtcatcgataccattgcactactgcccattgccccctta cgtagcatatttcactactcccgctaaagtctcgccacatgctgctgtttgccaagatttactgacgagtttggtttac tcaatcctctattataactactagatttcaacatttccacacctctgccaatgatcatcaaccaccttgggtattgac agcctcagcattgcaactagcaagtcgcaactccaatcgcttttca
PAS_chr3_1157 ホモロジーマム2	82	ctggctctgcttctggtacttcttcagggtgcattcttctgctactcaaaaatgacgaacacatccactgatcttggagctccag ctgcatctttaagtgaacgcctatgctttttggccattctgtgctcatgtttagtagacatttttttttccactgagtttt tatgtactactgattacattgtgtagggttaattgatgtgcaactataataataatagtcacaaatgtctacagaggaaagtg caggttgccctggtggtttttcttattagcacaccttgaaacactcttacccttaacatccctcagccatgcttaattcgcc ataaaaataatcttcgaacttttttccattttatgctcataaagcttccctactgtcaccttataaaaagagcttttgcca ctaaagtgtcacaccagaaattgctcccgaatatcgtccaaacaaatgctaggatctgtggaaagtgtgacaaataatttga acaccttgagcttgaaacttccctgaagttaataatccaaggctccttccagaaagttaacccagtggaccttttgagaaact acatcactcaagaacttagtaaaaatttctggagttgcaaaagaattgattttccagccttggaattgggtaccacactgg aaaaaggtgatcttttgatcccagtctctcgctgagaaataaagggtgctaaatcctaaagatttagccgaacaaatgggctg ctgcatcccaagggtggatatcttaagacgttaattgcgaaggacaccttctctcagttcttttttaacacatcggttc tgacaagtgggtgatctgactgctgagagagcgatgactttgtgcacttcccttaggaaagggaacaaaaagtta tagtgagtttctctccaaaatatgccaacacctttccacgctggccattcttagaagtacacatcatcggtggtttttatt ccaatctgtatgaaaagctgggtcattgaaagttaagagtgaaattatttgggagactggggaacaaatttgggtgttttg cagtaggaatttgagcgttacgggtgagagcaaaaataaagactgacccatccacatttgtttgaggtctatgttaaaa tcaaccaaagatatataaggctcaatcagagttctactgaggagattgcagaaggggcaatcatttagatgaccaggcaagagctt tttccaagaaaatggcaaatggcgacgaatcggctgaagcttctggaaaagattccgtgagttatccattgagaggtaca ttgatacttatgcccgcctcaacatc

【0176】
(表15) 本明細書に開示の遺伝子及び配列に関する情報

10

20

30

40

<i>S. cerevisiae</i> オーソログの 標準名	<i>S. cerevisiae</i> オーソログの 系統名	<i>P. pastoris</i> (<i>K. phaffii</i>)遺伝子ID	<i>P. pastoris</i> (<i>K. phaffii</i>) ORF 座標(ストランド)	オープンリーディング フレーム(ORF) 配列番号	ペプチド 配列番号
SEC72	YLR292C	PAS_chr2-1_0448	chr2:827202- 827789(-)	1	2
SBH2	YER019C-A	PAS_chr2-2_0210	chr2:1994927- 1995252(+)	7	8
SSS1	YDR086C	PAS_chr1-1_0023	chr1:580942- 581136(+)	5	6
SSH1	YBR283C	PAS_chr1-4_0629	chr1:2584924- 2586363(-)	3	4
PEP4	YPL154C	n/a	n/a	83	84
PRC1, 変異体	YMR297W	n/a	n/a	85	86
DAP2	YHR028C	n/a	n/a	87	88
MF(α)1, バリエーション	YPL187W	n/a	n/a	89	90

【 0 1 7 7 】

(表 1 6) S S H 1 複合体遺伝子用のプロモーター及びターミネーターに関する情報

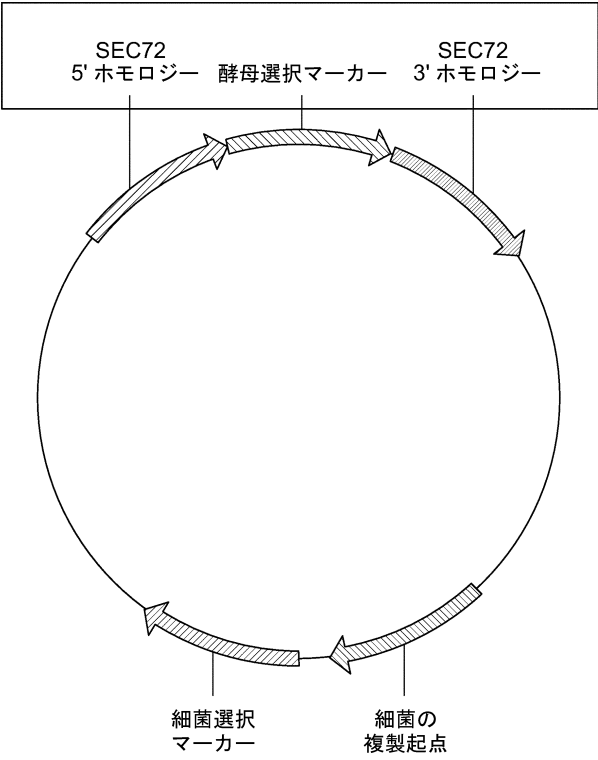
<i>S. cerevisiae</i> オーソログの 標準名	<i>S. cerevisiae</i> オーソログの 系統名	プロモーター/ ターミネーター	<i>P. pastoris</i> (<i>K. phaffii</i>) ORF 座標(ストランド)	ヌクレオチド 配列 配列番号
SBH2	YER019C-A	プロモーター	chr2:1994039- 1994926(+)	97
SBH2	YER019C-A	ターミネーター	chr2:1995253- 1995712(+)	100
SSS1	YDR086C	プロモーター	chr1:579989- 580941(+)	98
SSS1	YDR086C	ターミネーター	chr1:581137- 581628(+)	101
SSH1	YBR283C	プロモーター	chr1:2586364- 2587353(-)	99
SSH1	YBR283C	ターミネーター	chr1:2584553- 2584923(-)	102

【図面】

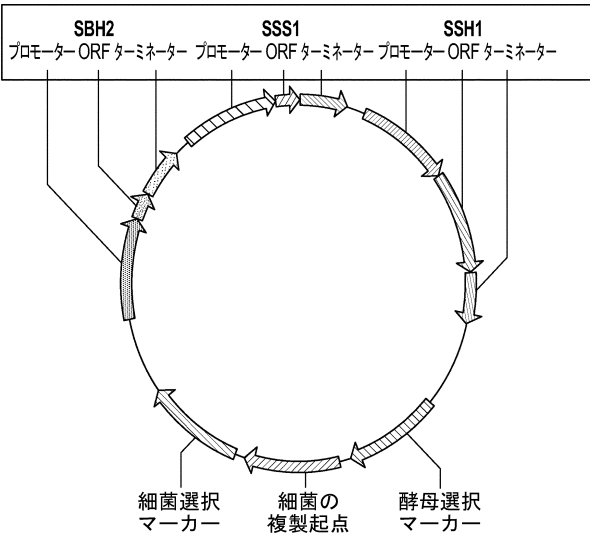
【図 1】

複合体メンバー		S. セレビジェ (<i>S. cerevisiae</i>)	P. パストリス (<i>P. pastoris</i>)	%ID (blastp)
SEC (7重体)	SEC61 (3重体)	SSH1	PAS_chr1-4_0629	39%
		SSS1	PAS_chr1-1_0023	52%
		SBH2*	PAS_chr2-2_0210	57%
	SEC63 複合体	SEC61	PAS_chr1-3_0202	70%
		SEC62	PAS_chr3_1014	35%
		SEC63	PAS_chr4_0395	38%
		SEC66	PAS_chr2-1_0433	41%
		SEC72	PAS_chr2-1_0448	29%

【図 2】

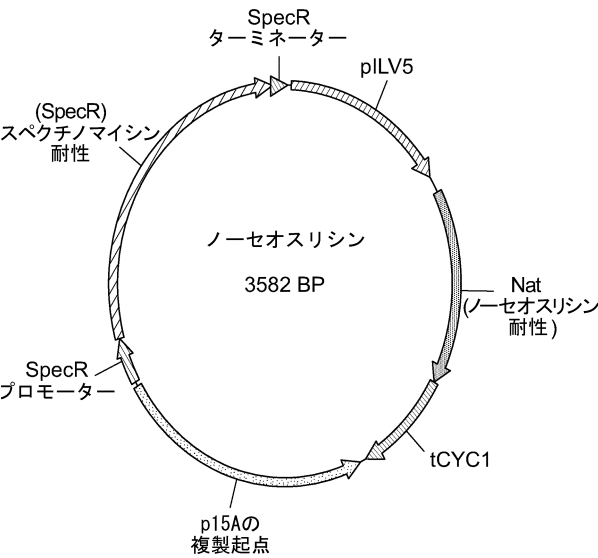


【図 3】



【図 4 - 1】

ノーセオスリシンマーカープラスミド



10

20

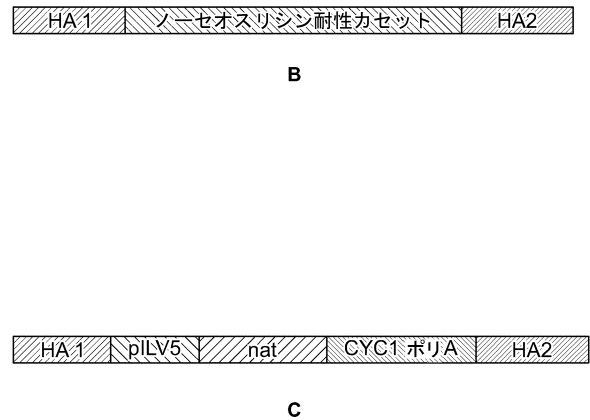
30

40

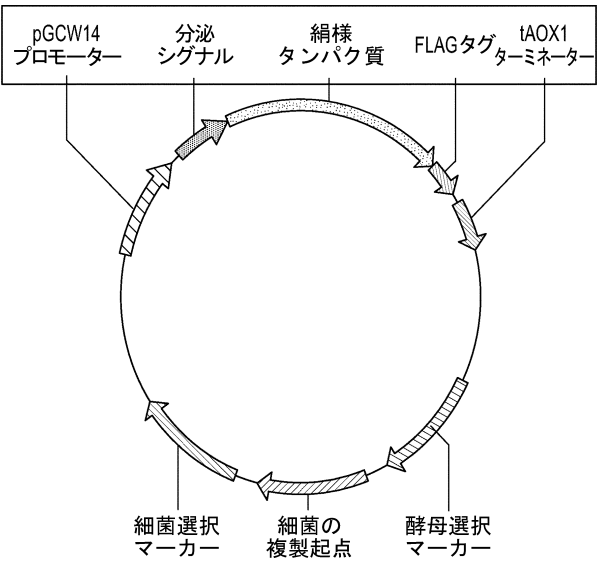
50

【図 4 - 2】

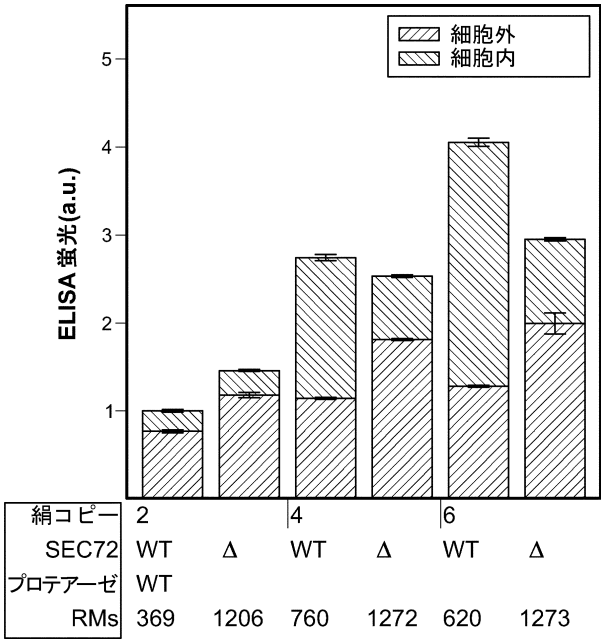
ノーセオスリシンマーカープラスミド中へのホモロジーアームの挿入



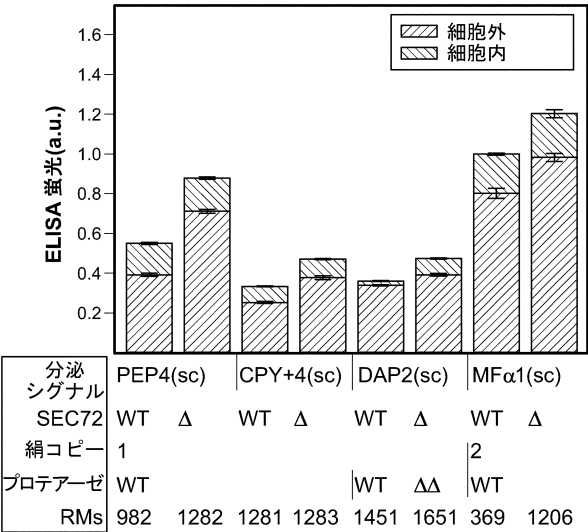
【図 5】



【図 6】



【図 7】



10

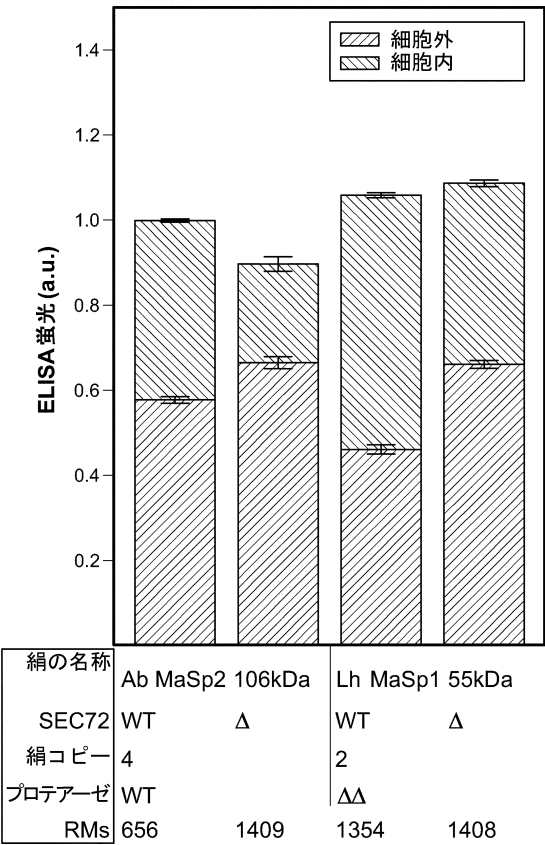
20

30

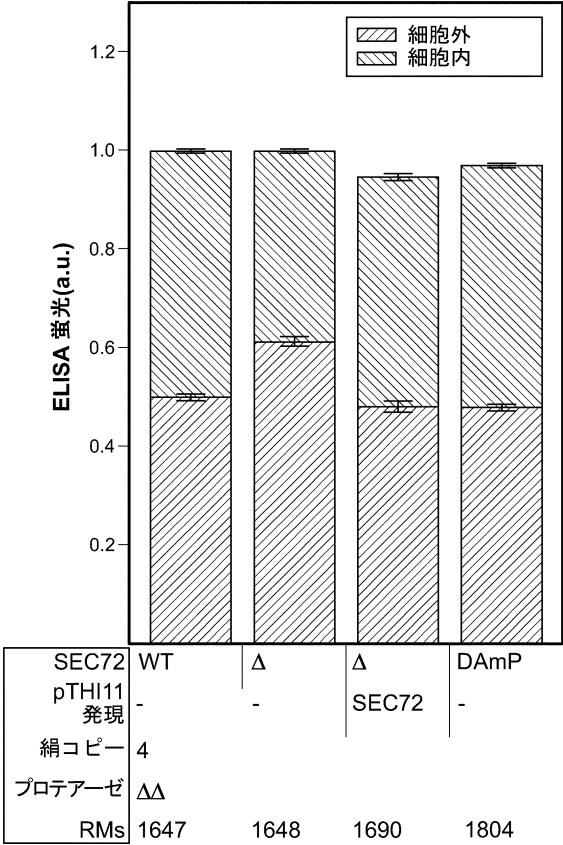
40

50

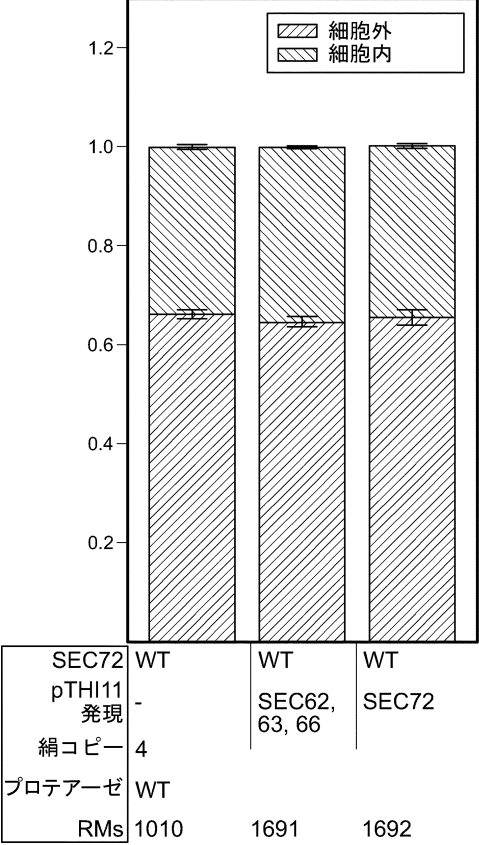
【図 8】



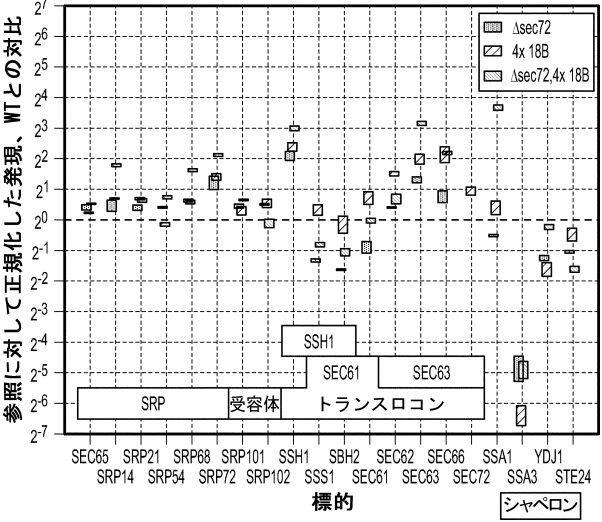
【図 9 A】



【図 9 B】



【図 10 A】



10

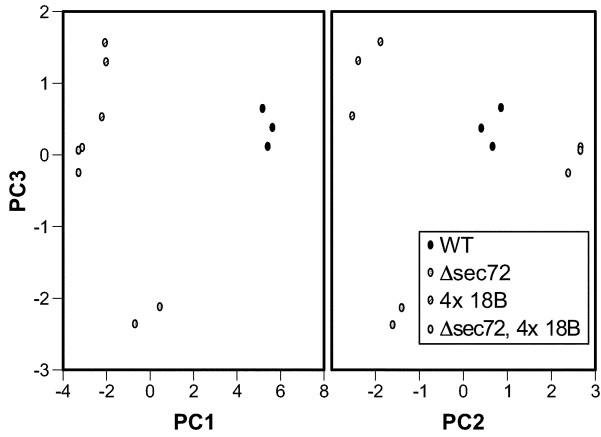
20

30

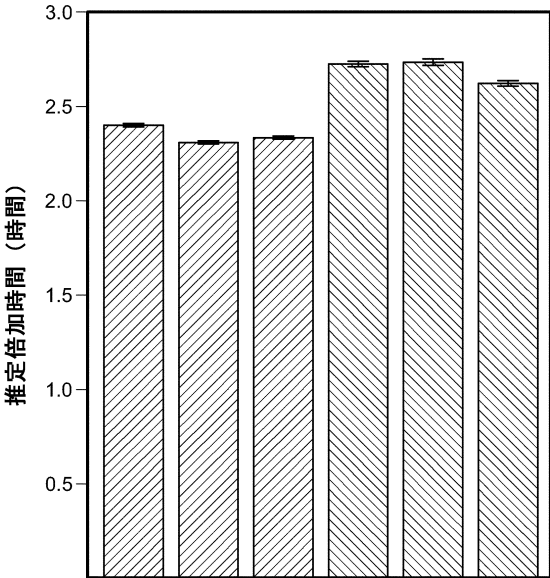
40

50

【図 1 0 B】

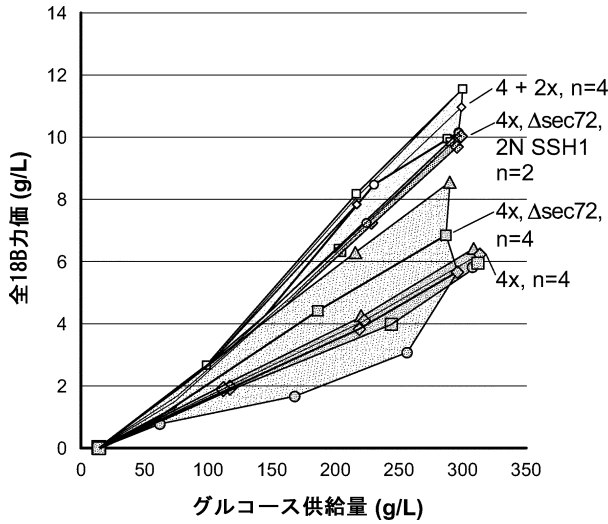


【図 1 1】

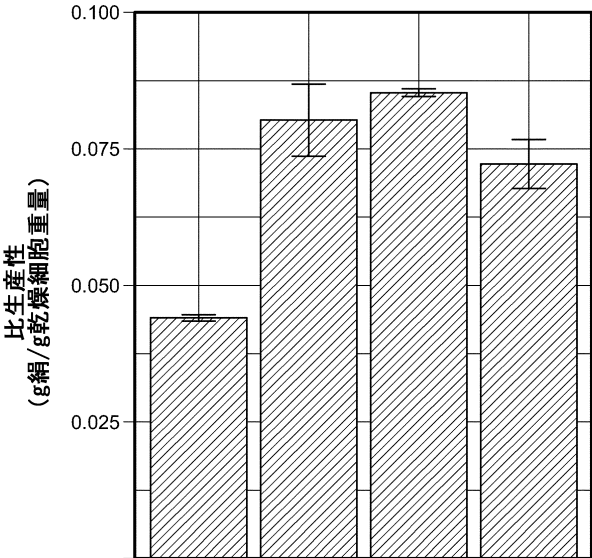


SEC72	WT			Δ		
複合体の複製	-	SEC61	SSH1	-	SEC61	SSH1
絹コピー			4			
プロテアーゼ	ΔΔ	WT	WT	ΔΔ		
RM	1647	1622	1623	1648	1652	1653

【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



SEC72	WT	Δ	Δ	WT
複合体の複製	-	-	SSH1	-
絹コピー	4			6
プロテアーゼ	ΔΔ			
RM	1616	1648	1653	1314

10

20

30

40

50

【配列表】
0007623680000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 K 14/39 (2006.01)
C 1 2 N 9/60 (2006.01)
C 0 7 K 14/435 (2006.01)

F I

C 0 7 K 14/39
C 1 2 N 9/60
C 0 7 K 14/435

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ステイブンス トーマス

アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル ホートン ストリート 5 8 5 8 ス
イト 4 0 0

審査官 坂崎 恵美子

(56)参考文献 米国特許第06228590 (US, B1)

米国特許出願公開第2018/0079788 (US, A1)

特表2012-518999 (JP, A)

特表2016-531845 (JP, A)

The Journal of Cell Biology, 1994年, Vol.126, No.4, p.935-943

Appl. Microbiol. Biotechnol., 1997年, Vol.47, p.33-39

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 1 9

C 1 2 P 2 1 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 3 1

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)