

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-504390

(P2012-504390A)

(43) 公表日 平成24年2月23日(2012.2.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 9/88 (2006.01)	C 1 2 N 9/88 Z N A	4 B 0 5 0
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 105 頁)

(21) 出願番号	特願2011-529385 (P2011-529385)	(71) 出願人	500175602 ノボザイムス、インコーポレイティド アメリカ合衆国、カリフォルニア 956 16-4880、ディビス、ドリュー ア ベニュー 1445
(86) (22) 出願日	平成21年9月30日 (2009.9.30)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成23年5月27日 (2011.5.27)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/059107	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02010/039889	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 国際公開日	平成22年4月8日 (2010.4.8)	(74) 代理人	100117019 弁理士 渡辺 陽一
(31) 優先権主張番号	61/101, 276		
(32) 優先日	平成20年9月30日 (2008.9.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糸状菌細胞におけるポジティブ及びネガティブ選択遺伝子の使用方法

(57) 【要約】

本発明は、糸状菌細胞中においてポジティブ及びネガティブ選択遺伝子を使用して、糸状菌細胞中において遺伝子を欠失させ、破壊し、又は挿入する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

糸状菌細胞のゲノム内の遺伝子又はその一部を欠失させる方法であって、以下のステップ：

(a) 以下の：

(i) 発現されるとドミナント・ポジティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ドミナント・ポジティブ選択マーカークード配列を含んでなる第 1 ポリヌクレオチド；

(i i) 発現されるとネガティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ネガティブ選択マーカークード配列を含んでなる第 2 ポリヌクレオチド；

(i i i) 前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドの 5 ' 側に位置する第 1 反復配列、及び第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドの 3 ' 側に位置する第 2 反復配列、ここで、前記第 1 及び第 2 反復配列は同一の配列を含んでなる；並びに

10

(i v) 構成要素 (i)、(i i)、及び (i i i) の 5 ' 側に位置する第 1 フランキング配列、及び構成要素 (i)、(i i)、及び (i i i) の 3 ' 側に位置する第 2 フランキング配列、ここで、前記第 1 フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第 1 領域と同一であり、且つ、前記第 2 フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第 2 領域と同一であり、ここで、(1) 前記第 1 領域が前記糸状菌細胞の遺伝子又はその一部の 5 ' 側に位置し、且つ、前記第 2 領域が前記糸状菌細胞の遺伝子又はその一部の 3 ' 側に位置するか、(2) 前記第 1 及び第 2 領域の両方が前記糸状菌細胞の遺伝子内に位置しているか、或いは (3) 前記第 1 及び第 2 領域の一方が前記糸状菌細胞の遺伝子内に位置し、

20

を含んでなる核酸構築物を、前記糸状菌細胞内に導入し、ここで、前記第 1 及び第 2 フランキング配列が、それぞれ前記糸状菌細胞の第 1 及び第 2 領域と分子間相同組換えを受けて、遺伝子又はその一部を欠失させ、及び前記核酸構築物で置き換え；

(b) ポジティブ選択を適用することによって、ステップ (a) からドミナント・ポジティブ選択表現型を有する細胞を選択及び単離し；並びに

(c) ネガティブ選択を適用することによって、ステップ (b) のドミナント・ポジティブ選択表現型を有する細胞からネガティブ選択表現型を有する細胞を選択及び単離して、前記第 1 及び第 2 反復配列に分子内相同組換えを強制的に施し、前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドを欠失させること、

30

を含んでなる前記方法。

【請求項 2】

前記ドミナント・ポジティブ選択マーカークード配列が、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (h p t)、ホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (p a t)、プレオマイシン、ゼオシン、及びフレオマイシン耐性遺伝子 (b l e)、アセトアミダーゼ遺伝子 (a m d S)、ピリチアミン耐性遺伝子 (p t r A)、ピューロマイシン N アセチル - トランスフェラーゼ遺伝子 (p a c)、ネオマイシン カナマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (n e o)、アセチル C o A シンターゼ遺伝子 (a c u A)、D セリン・デヒドラターゼ遺伝子 (d s d A)、A T P スルフリラーゼ遺伝子 (s C)、ミトコンドリア A T P シンターゼ・サブユニット 9 遺伝子 (o l i C)、アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3 ' (I) (a p h (3 ') I) 遺伝子、並びにアミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3 ' (I I) (a p h (3 ') I I) 遺伝子から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 3】

前記ネガティブ選択マーカークード配列が、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k)、オロチジン 5 ' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (p y r G)、及びシトシン・デアミナーゼ遺伝子 (c o d A) から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、請求項 1 に記載の方法。

50

【請求項 4】

以下のステップ：(d)ステップ(c)の単離した細胞内へ対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入すること、をさらに含んでなる、請求項 1～3のいずれか 1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 及び第 2 反復配列が、前記第 1 フランキング配列又は第 2 フランキング配列のいずれかと同一である、請求項 1～4のいずれか 1項に記載の方法。

【請求項 6】

全遺伝子が完全に欠失され、外来 DNA を残さない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

糸状菌細胞のゲノム内の遺伝子又はその一部を欠失させるための核酸構築物であって、以下の：

(i) 発現されるとドミナント・ポジティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ドミナント・ポジティブ選択マーカークード配列を含んでなる第 1 ポリヌクレオチド；

(ii) 発現されるとネガティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ネガティブ選択マーカークード配列を含んでなる第 2 ポリヌクレオチド；

(iii) 前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドの 5' 側に位置する第 1 反復配列、及び前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドの 3' 側に位置する第 2 反復配列、ここで、前記第 1 及び第 2 反復配列は同一の配列を含んでなる；並びに

(iv) 構成要素(i)、(ii)、及び(iii)の 5' 側に位置する第 1 フランキング配列、及び構成要素(i)、(ii)、及び(iii)の 3' 側に位置する第 2 フランキング配列、ここで、前記第 1 フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第 1 領域と同一であり、且つ、前記第 2 フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第 2 領域と同一であり、ここで、(1)前記第 1 領域が前記糸状菌細胞の遺伝子又はその一部の 5' 側に位置し、且つ、前記第 2 領域が前記糸状菌細胞の遺伝子又はその一部の 3' 側に位置するか、(2)前記第 1 及び第 2 領域の両方が前記糸状菌細胞の遺伝子内に位置しているか、或いは(3)前記第 1 及び第 2 領域の一方が前記糸状菌細胞の遺伝子内に位置し、且つ、前記第 1 及び第 2 領域の他方が、前記糸状菌細胞の遺伝子の 5' 又は 3' 側に位置する；

を含んでなり、ここで、前記第 1 及び第 2 フランキング配列が、それぞれ前記糸状菌細胞の第 1 及び第 2 領域と分子間相同組換えを受けて、遺伝子又はその一部を欠失させ、及び前記核酸構築物で置き換え；そして前記第 1 及び第 2 反復配列が分子内相同組換えを受けて、前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドを欠失させる、前記核酸構築物。

【請求項 8】

前記ドミナント・ポジティブ選択マーカークード配列が、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(hpt)、ホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子(pat)、プレオマイシン、ゼオシン、及びプレオマイシン耐性遺伝子(ble)、アセトアミダーゼ遺伝子(amdS)、ピリチアミン耐性遺伝子(ptrA)、ピューロマイシン N アセチル・トランスフェラーゼ遺伝子(pac)、ネオマイシン カナマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(neo)、アセチル CoA シンターゼ遺伝子(acuA)、D セリン・デヒドラターゼ遺伝子(dsdA)、ATP スルフィラーゼ遺伝子(sC)、ミトコンドリア ATP シンターゼ・サブユニット 9 遺伝子(oliC)、アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3' (I) (aph(3')I) 遺伝子、並びにアミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3' (II) (aph(3')II) 遺伝子から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、請求項 7 に記載の核酸構築物。

【請求項 9】

前記ネガティブ選択マーカークード配列が、チミジンキナーゼ遺伝子(tk)、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子(pyrg)、及びシトシン・デアミナーゼ遺伝子(codA)から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、請求項

10

20

30

40

50

7に記載の核酸構築物。

【請求項10】

前記第1及び第2反復配列が、前記第1フランキング配列又は第2フランキング配列のいずれかと同一である、請求項7～9のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【請求項11】

請求項7～10のいずれか1項に記載の核酸構築物を含んでなる組換え糸状菌細胞。

【請求項12】

糸状菌細胞のゲノム内にポリヌクレオチドを導入する方法であって、以下のステップ：

(a)以下の：

(i)第1の対象ポリヌクレオチド；

10

(ii)発現されるとドミナント・ポジティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ドミナント・ポジティブ選択マーカークード配列を含んでなる第2ポリヌクレオチド；

(iii)発現されるとネガティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ネガティブ選択マーカークード配列を含んでなる第3ポリヌクレオチド；

(iv)前記第2及び第3ポリヌクレオチドの5'側に位置する第1反復配列、並びに前記第2及び第3ポリヌクレオチドの3'側に位置する第2反復配列、ここで、前記第1及び第2反復配列は同一の配列を含んでなり、且つ、前記第1の対象ポリヌクレオチドは前記第1反復の5'側に位置するか又は前記第2反復の3'側に位置する；並びに

(v)構成要素(i)(ii)、(iii)、及び(iv)の5'側に位置する第1フランキング配列、及び構成要素(i)、(ii)、(iii)、及び(iv)の3'側に位置する第2フランキング配列、ここで、前記第1フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第1領域と同一であり、且つ、前記第2フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第2領域と同一である；

20

を含んでなる核酸構築物を糸状菌細胞内に導入し、ここで、前記第1及び第2フランキング配列は、それぞれ前記糸状菌細胞のゲノムの第1及び第2領域と分子間相同組換えを受けて、前記核酸構築物を前記糸状菌細胞のゲノム内に導入し；

(b)ポジティブ選択を適用することによって、ステップ(a)からドミナント・ポジティブ選択表現型を有する細胞を選択し；並びに

(c)ネガティブ選択を適用することによって、ステップ(b)のドミナント・ポジティブ選択表現型を有する選択された細胞からネガティブ選択表現型を有する細胞を選択及び単離して、前記第1及び第2反復配列に分子内相同組換えを強制的に施し、前記第2及び第3ポリヌクレオチドを欠失させること、

30

を含んでなる、前記方法。

【請求項13】

前記ドミナント・ポジティブ選択マーカークード配列が、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(hpt)、ホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子(pat)、プレオマイシン、ゼオシン、及びプレオマイシン耐性遺伝子(ble)、アセトアミダーゼ遺伝子(amdS)、ピリチアミン耐性遺伝子(ptrA)、ピューロマイシン N アセチル・トランスフェラーゼ遺伝子(pac)、ネオマイシン カナマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(neo)、アセチルCoAシンターゼ遺伝子(acuA)、D セリン・デヒドラターゼ遺伝子(dsdA)、ATPスルフィラーゼ遺伝子(sC)、ミトコンドリアATPシンターゼ・サブユニット9遺伝子(oliC)、アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ3'(I)(aph(3')I)遺伝子、並びにアミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ3'(II)(aph(3')II)遺伝子から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、請求項12に記載の方法。

40

【請求項14】

前記ネガティブ選択マーカークード配列が、チミジンキナーゼ遺伝子(tk)、オロチジン 5'リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子(pyrg)、及びシトシン・デアミナーゼ遺伝子(codA)から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、請求項

50

12に記載の方法。

【請求項15】

前記第1及び第2反復配列が、前記第1フランキング配列又は第2フランキング配列のいずれかと同一である、請求項12～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

糸状菌細胞のゲノム内にポリヌクレオチドを導入するための核酸構築物であって、以下の：

(i) 第1の対象ポリヌクレオチド；

(ii) 発現されるとドミナント・ポジティブ選択表現型を糸状菌細胞に与える、ドミナント・ポジティブ選択マーカークード配列を含んでなる第2ポリヌクレオチド；

(iii) 発現されるとネガティブ選択表現型を糸状菌細胞に与える、ネガティブ選択マーカークード配列を含んでなる第3ポリヌクレオチド；

(iv) 前記第1及び第2ポリヌクレオチドの5'側に位置する第1反復配列、及び前記第1及び第2ポリヌクレオチドの3'側に位置する第2反復配列、ここで、前記第1及び第2反復配列が同一の配列を含んでなり、且つ、対象ポリペプチドをコードする前記第1ポリヌクレオチドは前記第1反復の5'側に位置するか又は前記第2反復の3'側に位置する；並びに

(v) 構成要素(i)、(ii)、(iii)、及び(iv)の5'側に位置する第1フランキング配列、及び構成要素(i)、(ii)、(iii)、及び(iv)の3'側に位置する第2フランキング配列、ここで、前記第1フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第1領域と同一であり、且つ、前記第2フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第2領域と同一である；

を含んでなり、ここで、前記第1及び第2フランキング配列は、それぞれ前記糸状菌細胞のゲノムの第1及び第2領域と分子間相同組換えを受けて、前記糸状菌細胞のゲノム内に前記核酸構築物を導入し；並びに前記第1及び第2反復配列は、分子内相同組換えを受けて、前記第2及び第3ポリヌクレオチドを欠失させることができる、前記核酸構築物。

【請求項17】

前記ドミナント・ポジティブ選択マーカークード配列が、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(hpt)、ホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子(pat)、プレオマイシン、ゼオシン、及びプレオマイシン耐性遺伝子(ble)、アセトアミダーゼ遺伝子(amdS)、ピリチアミン耐性遺伝子(ptrA)、ピューロマイシンNアセチル-トランスフェラーゼ遺伝子(pac)、ネオマイシンカナマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(neo)、アセチルCoAシンターゼ遺伝子(acuA)、Dセリン・デヒドラターゼ遺伝子(dsdA)、ATPスルフィラーゼ遺伝子(sC)、ミトコンドリアATPシンターゼ・サブユニット9遺伝子(oliC)、アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ3'(I)(aph(3')I)遺伝子、並びにアミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ3'(II)(aph(3')II)遺伝子から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、請求項16に記載の核酸構築物。

【請求項18】

前記ネガティブ選択マーカークード配列が、チミジンキナーゼ遺伝子(tk)、オロチジン5'リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子(pyrg)、及びシトシン・デアミナーゼ遺伝子(codA)から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、請求項16に記載の核酸構築物。

【請求項19】

前記第1及び第2反復配列が、前記第1フランキング配列又は第2フランキング配列のいずれかと同一である、請求項16～18のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【請求項20】

請求項16～19のいずれか1項に記載の核酸構築物を含んでなる組換え糸状菌細胞。

【請求項21】

10

20

30

40

50

ポリペプチドを製造する方法であって、以下のステップ：(a)ポリペプチドの産生を促す条件下、請求項1～6のいずれか1項に従って得た糸状菌細胞を培養し；及び(b)前記ポリペプチドを回収すること、を含んでなる前記方法。

【請求項22】

ポリペプチドを製造する方法であって、以下のステップ：(a)ポリペプチドの産生を促す条件下、請求項12～15のいずれか1項に従って得た糸状菌細胞を培養し；及び(b)前記ポリペプチドを回収すること、を含んでなる前記方法。

【請求項23】

以下の：(a)配列番号52の成熟ポリペプチドに対して好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、よりいっそう好ましくは少なくとも90%、よりいっそう好ましくは少なくとも95%の同一性、そして最も好ましくは少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるオロチジン 5'リン酸デカルボキシラーゼ；(b)好ましくは少なくとも中程度のストリンジェンシー条件下、より好ましくは少なくとも中程度のストリンジェンシー条件下、よりいっそう好ましくは少なくとも高ストリンジェンシー条件下、そして最も好ましくは非常に高いストリンジェンシー条件下で配列番号51の成熟ポリペプチド・コード配列又はその完全長の相補鎖にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされたオロチジン 5'リン酸デカルボキシラーゼ；そして(c)配列番号51の成熟ポリペプチド・コード配列に対して好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、よりいっそう好ましくは少なくとも90%、よりいっそう好ましくは少なくとも95%の同一性、そして最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドによってコードされたオロチジン 5'リン酸デカルボキシラーゼ、から成る群から選択される単離されたオロチジン 5'リン酸デカルボキシラーゼ。

10

20

【請求項24】

配列番号52、又はオロチジン 5'リン酸デカルボキシラーゼ活性を有するその断片を含んでなるか、又はそれから成る、請求項23に記載の単離されたオロチジン 5'リン酸デカルボキシラーゼ。

【請求項25】

請求項23又は24に記載のオロチジン 5'リン酸デカルボキシラーゼをコードする単離されたポリヌクレオチド。

30

【請求項26】

請求項23又は24に記載のオロチジン 5'リン酸デカルボキシラーゼを製造する方法であって、以下のステップ：前記オロチジン 5'リン酸デカルボキシラーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでなる核酸構築物を含んでなる宿主細胞を、そのポリペプチドの産生を促す条件下で培養すること、を含んでなる前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表の参照

本出願は、コンピューターが読み取り可能な形式で配列表を含んでいる。コンピューターが読み取り可能な当該形式を、本明細書中に援用する。

40

【0002】

発明の分野

本発明は、糸状菌細胞におけるポジティブ及びネガティブ選択遺伝子の使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

関連技術の説明

50

特定の表現型を発現する選択マーカー遺伝子は、遺伝子が導入された宿主細胞を特定し、単離するための発現ベクターの一部として組換えDNA技術において広く使用される。選択マーカー遺伝子の産物は、殺生物剤耐性若しくはウイルス耐性、重金属等に対する耐性を与えることができ、又は栄養要求性変異株に原栄養性を付与することもある。ポジティブ選択遺伝子は、導入遺伝子を保有する細胞を特定、及び/又は単離するために使用され、一方、ネガティブ選択遺伝子は、導入遺伝子を保有する細胞を排除するための手段を提供する。

【0004】

ポジティブ選択マーカー（例えば、特定の抗生物質に対する耐性）によって与えられる表現型と、それによる細胞/宿主における選択マーカー遺伝子の存在は、細胞/宿主の最終的な利用によっては望ましくないこともある（例えば、商品菌株におけるヒグロマイシンB耐性遺伝子）。このため、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) アセトアミダーゼ (*amdS*) 遺伝子などの双方向性選択マーカー遺伝子は、魅力的な代替手段の典型である。この *amdS* 遺伝子は、その遺伝子がポジティブ方向及びネガティブ方向の両方において優性であるという点で、優性の双方向性選択マーカーである。*amdS* 遺伝子の利点は、それが優性のネガティブ選択によって宿主生物から容易に欠失させる又は取り除くことができる点である。前記の選択は、フルオロアセタミドを含有する成長培地上で細胞を平板培養することによって達成される。フルオロアセタミドは、*amdS* 保有細胞によってフルオロ酢酸に代謝されるが、そのフルオロ酢酸が細胞に対して有毒である。*amdS* 遺伝子を失った細胞だけが、ネガティブ選択条件下で増殖可能である。しかしながら、選択マーカーとしての *amdS* の使用に伴う一つの重大な問題は、*amdS* が真菌界中に極めて広範に存在しているので、選択マーカーとして *amdS* 遺伝子を使用する前に、野生型宿主株の *amdS* 遺伝子の活性な内在性コピーのすべてを不活性化又は欠失させなければならない。比較的少数のその他の双方向性選択マーカー遺伝子しか利用できないが（例えば、*pyrG*、*sc*、*niaD*、及び *oliC*）、それらは利用前に栄養要求突然変異体の作出を必要とする不都合がある。そして、前記のその他の双方向性選択マーカー遺伝子は、未知の望ましくない突然変異を宿主ゲノム内に導入する可能性がある上、これらの系がすべての真菌で機能するとは限らない。一例を挙げれば、*pyrG* を双方向性選択マーカーとして無効にする一部のフサリウム菌株は、5 フルオロオロチン酸を代謝することができる。そのため、当該技術分野では、糸状菌においてポジティブ及びネガティブ表現型を使用するための新たな手法を必要としている。

【0005】

米国特許第 6 5 5 5 3 7 0 号明細書では、二機能性の選択性融合遺伝子の使用を開示している。

【0006】

当該技術分野ではさらに、その真菌が組換え株の作出に使用されたDNAを最小限の微量でしか含まない～全く含まないように、遺伝子操作された糸状菌内に導入された外来性DNA、例えば選択マーカーを取り除くための別の方法を提供する必要もある。そういったDNAを取り除くあらゆる技術が、当該技術分野において有益である。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、糸状菌細胞におけるポジティブ及びネガティブ選択遺伝子の使用方法を提供する。

【0008】

発明の概要

本発明は、糸状菌細胞のゲノム内の遺伝子又はその一部を欠失させる方法であって、以下のステップ：

(a) 以下の：

(i) 発現されるとドミナント・ポジティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ドミナント・ポジティブ選択マーカーコード配列を含んでなる第1ポリヌクレオチド；

10

20

30

40

50

(i i) 発現されるとネガティブ選択表現型を前記系状菌細胞に与える、ネガティブ選択マーカークード配列を含んでなる第 2 ポリヌクレオチド；

(i i i) 前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドの 5 ' 側に位置する第 1 反復配列、及び第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドの 3 ' 側に位置する第 2 反復配列、ここで、前記第 1 及び第 2 反復配列は同一の配列を含んでなる；並びに

(i v) 構成要素 (i)、(i i)、及び (i i i) の 5 ' 側に位置する第 1 フランキング配列、及び構成要素 (i)、(i i)、及び (i i i) の 3 ' 側に位置する第 2 フランキング配列、ここで、前記第 1 フランキング配列は前記系状菌細胞のゲノムの第 1 領域と同一であり、且つ、前記第 2 フランキング配列は前記系状菌細胞のゲノムの第 2 領域と同一であり、ここで、(1) 前記第 1 領域が前記系状菌細胞の遺伝子又はその一部の 5 ' 側に位置し、且つ、前記第 2 領域が前記系状菌細胞の遺伝子又はその一部の 3 ' 側に位置するか、(2) 前記第 1 及び第 2 領域の両方が前記系状菌細胞の遺伝子内に位置しているか、或いは (3) 前記第 1 及び第 2 領域の一方が前記系状菌細胞の遺伝子内に位置し、且つ、前記第 1 及び第 2 領域の他方が前記系状菌細胞の遺伝子の 5 ' 若しくは 3 ' 側に位置する；

を含んでなる核酸構築物を、前記系状菌細胞内に導入し、ここで、前記第 1 及び第 2 フランキング配列が、それぞれ前記系状菌細胞の第 1 及び第 2 領域と分子間相同組換えを受けて、遺伝子又はその一部を欠失させ、及び前記核酸構築物で置き換え；

(b) ポジティブ選択を適用することによって、ステップ (a) からドミナント・ポジティブ選択表現型を有する細胞を選択及び単離し；並びに

(c) ネガティブ選択を適用することによって、ステップ (b) のドミナント・ポジティブ選択表現型を有する選択された細胞からネガティブ選択表現型を有する細胞を選択及び単離して、前記第 1 及び第 2 反復配列に分子内相同組換えを強制的に施し、前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドを欠失させること、
を含んでなる前記方法に関する。

【 0 0 0 9 】

本発明はさらに、系状菌細胞のゲノム内に対象ポリヌクレオチドを導入する方法であって、以下のステップ：

(a) 以下の：

(i) 第 1 の対象ポリヌクレオチド；

(i i) 発現されるとドミナント・ポジティブ選択表現型を系状菌細胞に与えるドミナント・ポジティブ選択マーカークード配列を含んでなる第 2 ポリヌクレオチド；

(i i i) 発現されるとネガティブ選択表現型を系状菌細胞に与えるネガティブ選択マーカークード配列を含んでなる第 3 ポリヌクレオチド；

(i v) 前記第 2 及び第 3 ポリヌクレオチドの 5 ' 側に位置する第 1 反復配列、及び前記第 2 及び第 3 ポリヌクレオチドの 3 ' 側に位置する第 2 反復配列、ここで、前記第 1 及び第 2 反復配列は同一の配列を含んでなり、且つ、第 1 の対象ポリヌクレオチドは前記第 1 反復配列の 5 ' 側に位置するか又は前記第 2 反復配列の 3 ' 側に位置する；並びに

(v) 構成要素 (i)、(i i)、(i i i)、及び (i v) の 5 ' 側に位置する第 1 フランキング配列、及び構成要素 (i)、(i i)、(i i i)、及び (i v) の 3 ' 側に位置する第 2 フランキング配列、ここで、前記第 1 フランキング配列は前記系状菌細胞のゲノムの第 1 領域と同一であり、且つ、前記第 2 フランキング配列は前記系状菌細胞のゲノムの第 2 領域と同一である、

を含んでなる核酸構築物を、前記系状菌細胞内に導入し；ここで、前記第 1 及び第 2 フランキング配列は、それぞれ系状菌細胞のゲノムの第 1 及び第 2 領域と分子間相同組換えを受けて、前記核酸構築物を系状菌細胞のゲノム内に導入し；

(b) ポジティブ選択を適用することによって、ステップ (a) からドミナント・ポジティブ選択表現型を有する細胞を選択し；並びに

(c) ネガティブ選択を適用することによって、ステップ (b) のドミナント・ポジティブ選択表現型を有する選択された細胞からネガティブ選択表現型を有する細胞を選択及

10

20

30

40

50

び単離して、前記第1及び第2反復配列に分子内相同組換えを強制的に施し、前記第2及び第3ポリヌクレオチドを欠失させること、
を含んでなる方法にも関する。

【0010】

本発明はさらに、そういった核酸構築物、ベクター、及びかかる核酸構築物を含んでなる糸状菌細胞に関する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】 pJal504 [BamHI]の制限地図を示す。

【図2】 pJal504 [BglII]の制限地図を示す。

10

【図3】 pJal574の制限地図を示す。

【図4】 pWTY1449 02 01の制限地図を示す。

【図5】 pEJG61の制限地図を示す。

【図6】 pEmY21の制限地図を示す。

【図7】 pDM156.2の制限地図を示す。

【図8】 pEmY23の制限地図を示す。

【図9】 pWTY1470 19 07の制限地図を示す。

【図10】 pWTY1515 02 01の制限地図を示す。

【図11】 pJfyS1540 75 5の制限地図を示す。

20

【図12】 pJfyS1579 1 13の制限地図を示す。

【図13】 pJfyS1579 8 6の制限地図を示す。

【図14】 pJfyS1579 21 16の制限地図を示す。

【図15】 pAlLo1492 24の制限地図を示す。

【図16】 pJfyS1579 35 2の制限地図を示す。

【図17】 pJfyS1579 41 11の制限地図を示す。

【図18】 pJfyS1604 55 13の制限地図を示す。

【図19】 pJfyS1579 93 1の制限地図を示す。

【図20】 pJfyS1604 17 2の制限地図を示す。

【図21】 pEJG69の制限地図を示す。

【図22】 pEJG65の制限地図を示す。

30

【図23】 pMStr19の制限地図を示す。

【図24】 pEJG49の制限地図を示す。

【図25】 pEmY15の制限地図を示す。

【図26】 pEmY24の制限地図を示す。

【図27】 pDM257の制限地図を示す。

【図28】 pDM258の制限地図を示す。

【図29】 フサリウム・ベネナム amyA 欠失株の形質転換体のラクトースオキシダーゼ相対収率を示す。

【図30】 フサリウム・ベネナム amyA 欠失株の形質転換体のアルファアミラーゼ相対活性を示す。

40

【図31】 pJfyS1698 65 15の制限地図を示す。

【図32】 pJfyS1698 72 10の制限地図を示す。

【図33】 フサリウム・ベネナム alpA 欠失株の形質転換体のアルカリプロテアーゼ相対活性を示す。

【図34】 pJfyS1879 32 2の制限地図を示す。

【図35】 pJfyS111の制限地図を示す。

【図36】 pJfyS2010 13 5の制限地図を示す。

【図37】 pJfyS120の制限地図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

50

定義

選択マーカー：「選択マーカー」という用語は、本明細書中では、抗生物質耐性表現型を与えることができるか、（ドミナント・ポジティブ選択のために）独立栄養要求性を提供することができるか、又は（ネガティブ選択のために）毒性代謝物を活性化することができるタンパク質をコードする遺伝子と定義される。

【0013】

ドミナント・ポジティブ選択マーカー：「ドミナント・ポジティブ選択マーカー」という用語は、本明細書中では、糸状菌細胞内に形質転換されることによって、形質転換体のポジティブ選択を可能にする優性表現型を発現する遺伝子と定義される。

【0014】

ドミナント・ポジティブ選択表現型：「ドミナント・ポジティブ選択表現型」という用語は、本明細書中では、形質転換体のポジティブ選択を可能にする表現型と定義される。

【0015】

ネガティブ選択マーカー：「ネガティブ選択マーカー」という用語は、本明細書中では、糸状菌細胞内に形質転換されることによって、形質転換体のネガティブ選択（すなわち、排除）を可能にする表現型を発現する遺伝子と定義される。

【0016】

ネガティブ選択表現型：「ネガティブ選択表現型」という用語は、本明細書中では、形質転換体のネガティブ選択（すなわち、排除）を可能にする表現型と定義される。

【0017】

遺伝子：「遺伝子」という用語は、本明細書中では、細胞のゲノムのDNA領域と定義される。遺伝子は、通常、単一タンパク質又はRNAに相当する個別の遺伝形質を制御する。「遺伝子」という用語の中には、コード配列を含む機能単位全体、非コード配列、イントロン、プロモーター、及び発現を変更するタンパク質をコードするその他の調節配列が包含される。

【0018】

その一部：「その一部」という用語は、本明細書中では、例えばオープンリーディングフレーム（ORF）、プロモーター、イントロン配列、及びその他の調節配列などの遺伝子の機能単位全体；又はその一部の構成要素と定義される。

【0019】

第1及び第2ポリヌクレオチドの5'又は3'側に位置する：「第1及び第2ポリヌクレオチドの5'側に位置する」及び「第1及び第2ポリヌクレオチドの3'側に位置する」という用語は、本明細書中では、好ましくは第1及び第2ポリヌクレオチドから1000～5000bp以内、より好ましくは100～1000bp以内、よりいっそう好ましくは10～100bp以内、最も好ましくは1～10bp以内、そしてさらに最も好ましくはその直近と定義される。しかしながら、その位置は、5000bpよりさらに遠くてもよい。

【0020】

構成要素(i)、(ii)、及び(iii)の5'又は3'側に位置する：「構成要素(i)、(ii)、及び(iii)の5'側に位置する」及び「構成要素(i)、(ii)、及び(iii)の3'側に位置する」という用語は、本明細書中では、好ましくは構成要素(i)、(ii)、及び(iii)から1000～5000bp以内、より好ましくは100～1000bp以内、よりいっそう好ましくは10～100bp以内、最も好ましくは1～10bp以内、そしてさらに最も好ましくは直近と定義される。しかしながら、その位置は、5000bpよりさらに遠くてもよい。

【0021】

遺伝子又はその一部の5'又は3'側に位置する：「遺伝子又はその一部の5'側に位置する」及び「遺伝子又はその一部の3'側に位置する」という用語は、本明細書中では、好ましくは遺伝子又はその一部から1000～5000bp以内、より好ましくは100～1000bp以内、よりいっそう好ましくは10～100bp以内、最も好ましくは

10

20

30

40

50

1 ~ 10 bp 以内、そしてさらに最も好ましくは直近と定義される。しかしながら、その位置は、5000 bp よりさらに遠くてもよい。

【0022】

単離されたポリヌクレオチド：「単離されたポリヌクレオチド」という用語は、本明細書中では、源から単離されたポリヌクレオチドを指す。好ましい態様では、そのポリヌクレオチドは、アガロース電気泳動で測定した場合に、少なくとも1%純粋であり、好ましくは少なくとも5%純粋であり、より好ましくは少なくとも10%純粋であり、より好ましくは少なくとも20%純粋であり、より好ましくは少なくとも40%純粋であり、より好ましくは少なくとも60%純粋であり、より好ましくは少なくとも80%純粋であり、そして最も好ましくは少なくとも90%純粋である。

10

【0023】

実質的に純粋なポリヌクレオチド：「実質的に純粋なポリヌクレオチド」という用語は、本明細書中では、他の外来の又は望ましくないヌクレオチドを含まない、且つ、遺伝子操作されたタンパク質製造の中での使用に好適な形態のポリヌクレオチド調製物を指す。よって、実質的に純粋なポリヌクレオチドは、多くても10重量%、好ましくは多くても8重量%、より好ましくは多くても6重量%、より好ましくは多くても5重量%、より好ましくは多くても4重量%、より好ましくは多くても3重量%、より好ましくは多くても2重量%、最も好ましくは多くても1重量%、そしてさらに最も好ましくは多くても0.5重量%の天然又は組換えに付随する他のポリヌクレオチド物質しか含まない。しかしながら、実質的に純粋なポリヌクレオチドは、例えばプロモーターやターミネーターなどの天然に存在する5'及び3'非翻訳領域を含むこともある。実質的に純粋なポリヌクレオチドが、少なくとも90重量%純粋であることが好ましく、好ましくは少なくとも92重量%純粋であり、より好ましくは少なくとも94重量%純粋であり、より好ましくは少なくとも95重量%純粋であり、より好ましくは少なくとも96重量%純粋であり、より好ましくは少なくとも97重量%純粋であり、より好ましくは少なくとも98重量%純粋であり、最も好ましくは少なくとも99重量%純粋であり、そしてさらに最も好ましくは少なくとも99.5重量%純粋である。本発明のポリヌクレオチドは実質的に純粋な形態であること、すなわち、前記ポリヌクレオチド調製物は天然又は組換えに付随する他のポリヌクレオチド物質を事実上含まないことが好ましい。そのポリヌクレオチドは、ゲノム、cDNA、RNA、半合成、及び合成起源、又はそのいずれかの組み合わせのものであり得る。

20

30

【0024】

コード配列：本明細書中に使用されるとき、「コード配列」という用語はヌクレオチド配列を意味し、そしてそれがそのタンパク質産物のアミノ酸配列を直接指定する。コード配列の境界は、一般に、オープンリーディングフレームによって判断され、そしてそれは、通常、ATG開始コドン又は代替の開始コドン、例えばGTGやTTGなどで始まり、終止コドン、例えばTAAや、TAGや、TGAなどで終わる。コード配列は、DNA、cDNA、合成ヌクレオチド配列、及び組換えヌクレオチド配列、又はそのいずれかの組み合わせであり得る。

【0025】

cDNA：「cDNA」という用語は、本明細書中では、真核細胞から得られる成熟、つまり、スプライスされた、mRNA分子から逆転写によって調製できるDNA分子と定義される。cDNAは、対応するゲノムDNA内に通常存在しているイントロン配列を欠いている。最初の、一次RNA転写物は、成熟したスプライスされたmRNAとして現れる前の一連のステップによって処理される、mRNAへの前駆体である。これらのステップには、スプライシングと呼ばれる工程によるイントロン配列の欠失が含まれる。mRNAから得られるcDNAは、そのため、あらゆるイントロン配列を欠いている。

40

【0026】

核酸構築物：「核酸構築物」という用語は、本明細書中で使用される場合、天然に存在する遺伝子から単離されたか、又は修飾されなければ天然に存在しない様式で核酸断片を

50

含むように修飾されたか、又は合成されたものである、一本鎖又は二本鎖の核酸分子を指す。

【0027】

制御配列：「制御配列」という用語は、本明細書中では、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現に必要な全構成要素を含むように定義される。それぞれの制御配列は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にとって天然のものであっても、異質なものであってもよく、又は互いに天然のものであっても、異質なものであってもよい。そういった制御配列としては、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター、シグナルペプチド配列、及び転写ターミネーターが挙げられるが、これだけに限定されるものではない。少なくとも、制御配列には、プロモーター、並びに転写及び翻訳終止シグナルが含まれる。制御配列は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のコード領域と制御配列の連結を容易にする特定の制限部位を導入する目的でリンカーと共に提供され得る。

10

【0028】

作動できるように連結された：「作動できるように連結された」という用語は、本明細書中では、ポリヌクレオチド配列のコード配列に対して制御配列が、その制御配列がポリペプチドのコード配列の発現を指示するように適当な位置に配置された構造を意味する。

【0029】

発現：「発現」という用語には、これだけに限定されるものではないが、転写、転写後修飾、翻訳、翻訳後修飾、及び分泌を含めたポリペプチドの産生に関わるあらゆるステップが含まれる。

20

【0030】

発現ベクター：「発現ベクター」という用語は、本明細書中では、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含んでなり、且つ、発現を導く付加的なヌクレオチドに作動できるように連結されている線状又は環状DNA分子と定義される。

【0031】

導入：「導入」という用語とそのバリエーションは、本明細書中では、糸状菌細胞内へのDNAの移入と定義される。糸状菌細胞内へのDNAの導入は、当該技術分野で知られているいずれかの方法、例えば形質転換などで達成される。

【0032】

形質転換：「形質転換」という用語は本明細書中では、糸状菌細胞内に、単離されたDNAを、そのDNAが染色体の要素として又は自己複製染色体外ベクターとして維持されるように導入することと定義される。

30

【0033】

単離されたポリペプチド：「単離されたポリペプチド」という用語は、本明細書中では、源から単離されたポリペプチドを指す。好ましい態様では、そのポリペプチドは、SDS PAGEで測定した場合に、少なくとも1%純粋であり、好ましくは少なくとも5%純粋であり、より好ましくは少なくとも10%純粋であり、より好ましくは少なくとも20%純粋であり、より好ましくは少なくとも40%純粋であり、より好ましくは少なくとも60%純粋であり、より好ましくは少なくとも80%純粋であり、そして最も好ましくは少なくとも90%純粋である。

40

【0034】

実質的に純粋なポリペプチド：「実質的に純粋なポリペプチド」という用語は、本明細書中では、多くても10重量%、好ましくは多くても8重量%、より好ましくは多くても6重量%、より好ましくは多くても5重量%、より好ましくは多くても4重量%、より好ましくは多くても3重量%、より好ましくは多くても2重量%、最も好ましくは多くても1重量%、そしてさらに最も好ましくは多くても0.5重量%の天然又は組換えに付随する他のポリペプチド物質しか含まないポリペプチド調製物と定義される。そのため、実質的に純粋なポリペプチドは、その調製物中に存在するポリペプチド物質のうち少なくとも92重量%純粋であることが好ましく、好ましくは少なくとも94重量%純粋で

50

あり、より好ましくは少なくとも95重量%純粋であり、より好ましくは少なくとも96重量%純粋であり、より好ましくは少なくとも97重量%純粋であり、より好ましくは少なくとも98重量%純粋であり、より好ましくは少なくとも99重量%純粋であり、最も好ましくは少なくとも99.5重量%純粋であり、そしてさらに最も好ましくは100重量%純粋である。本発明のポリペプチドは実質的に純粋な形態であること、すなわち、前記ポリペプチド調製物は天然又は組換えに付随する他のポリペプチド物質を事実上含まないことが好ましい。これは、例えば、周知の組換え法又は古典的な精製法によりポリペプチドを調製することによって達成できる。

【0035】

発明の詳細な説明

本発明は、糸状菌細胞のゲノム内の遺伝子又はその一部を欠失させる方法であって、以下のステップ：(a)以下の：(i)発現されるとドミナント・ポジティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ドミナント・ポジティブ選択マーカークード配列を含んでなる第1ポリヌクレオチド；(ii)発現されるとネガティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ネガティブ選択マーカークード配列を含んでなる第2ポリヌクレオチド；(iii)前記第1及び第2ポリヌクレオチドの5'側に位置する第1反復配列、及び第1及び第2ポリヌクレオチドの3'側に位置する第2反復配列、ここで、前記第1及び第2反復配列は同一の配列を含んでなる；並びに(iv)構成要素(i)、(ii)、及び(iii)の5'側に位置する第1フランキング配列、及び構成要素(i)、(ii)、及び(iii)の3'側に位置する第2フランキング配列、ここで、前記第1フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第1領域と同一であり、且つ、前記第2フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第2領域と同一であり、ここで、(1)前記第1領域が前記糸状菌細胞の遺伝子又はその一部の5'側に位置し、且つ、前記第2領域が前記糸状菌細胞の遺伝子又はその一部の3'側に位置するか、(2)前記第1及び第2領域の両方が前記糸状菌細胞の遺伝子内に位置しているか、或いは(3)前記第1及び第2領域の一方が前記糸状菌細胞の遺伝子内に位置し、且つ、前記第1及び第2領域の他方が前記糸状菌細胞の遺伝子の5'若しくは3'側に位置する；を含んでなる核酸構築物を、前記糸状菌細胞内に導入し、ここで、前記第1及び第2フランキング配列が、それぞれ前記糸状菌細胞の第1及び第2領域と分子間相同組換えを受けて、遺伝子又はその一部を欠失させ、及び前記核酸構築物で置き換え；(b)ポジティブ選択を適用することによって、ステップ(a)からドミナント・ポジティブ選択表現型を有する細胞を選択及び単離し；並びに(c)ネガティブ選択を適用することによって、ステップ(b)のドミナント・ポジティブ選択表現型を有する選択された細胞からネガティブ選択表現型を有する細胞を選択及び単離して、前記第1及び第2反復配列に分子内相同組換えを強制的に施し、前記第1及び第2ポリヌクレオチドを欠失させること、を含んでなる前記方法に関する。

【0036】

一態様では、外来DNAを全く残すことなく、前記の全遺伝子が完全に欠失される。

【0037】

本発明はまた、糸状菌細胞のゲノム内に対象ポリヌクレオチドを導入する方法であって、以下のステップ：(a)以下の：(i)第1の対象ポリヌクレオチド；(ii)発現されるとドミナント・ポジティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与えるドミナント・ポジティブ選択マーカークード配列を含んでなる第2ポリヌクレオチド；(iii)発現されるとネガティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与えるネガティブ選択マーカークード配列を含んでなる第3ポリヌクレオチド；(iv)前記第2及び第3ポリヌクレオチドの5'側に位置する第1反復配列、及び前記第2及び第3ポリヌクレオチドの3'側に位置する第2反復配列、ここで、前記第1及び第2反復配列は同一の配列を含んでなり、且つ、第1の対象ポリヌクレオチドは前記第1反復配列の5'側に位置するか又は前記第2反復配列の3'側に位置する；並びに(v)構成要素(i)、(ii)、(iii)、及び(iv)の5'側に位置する第1フランキング配列、及び構成要素(i)、(ii)、(iii)、及び(iv)の3'側に位置する第2フランキング配列、ここで、前記第1フランキ

10

20

30

40

50

ング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第1領域と同一であり、且つ、前記第2フランキン
 グ配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第2領域と同一である、を含んでなる核酸構築物を、
 前記糸状菌細胞内に導入し；この場合、前記第1及び第2フランキンング配列は、それぞれ
 糸状菌細胞のゲノムの第1及び第2領域と分子間相同組換えを受けて、前記核酸構築物を
 前記糸状菌細胞のゲノム内に導入し；(b) ポジティブ選択を適用することによって、ス
 テップ(a) からドミナント・ポジティブ選択表現型を有する細胞を選択し；そして(c)
) ネガティブ選択を適用することによって、ステップ(b) のドミナント・ポジティブ選
 択表現型を有する選択された細胞からネガティブ選択表現型を有する細胞を選択及び単離
 して、前記第1及び第2反復配列に分子内相同組換えを強制的に施し、前記第2及び第3
 ポリヌクレオチドを欠失させること、を含んでなる前記方法に関する。

10

【0038】

本発明では、完全な又は最小限に特徴付けられた遺伝子欠失又は挿入を受ける能力を任
 意の糸状菌に与える二機能性選択系を記載する。これは、ゲノム内に組み込むDNA断片
 を形質転換し、そしてDNA断片上にあるフランキンングDNA配列と宿主の対応するゲノ
 ム配列の間の二重交差事象によって遺伝子欠失又は遺伝子挿入が引き起こされた結果と
 して達成される。分子内の組換えは、直列反復配列の間に生じ、間にはさまれている配列の
 欠失をもたらし、その結果、宿主ゲノム内の標的遺伝子が欠失されるか、対象ポリペプチ
 ドをコードするポリヌクレオチドを挿入するか、又はポリヌクレオチドを遺伝子内に挿入
 し、そして残留DNAを残さないか又は1回の反復を残す。

20

【0039】

一態様では、二重マーカー系は、ハイグロマイシンBに対して感受性があり、且つ、5
 フルオロデオキシウリジンに対して耐性がある、あらゆる糸状菌に普遍的な系を提供
 する。本発明は、ハイグロマイシンBに対して感受性があり、且つ、5フルオロデオ
 キシウリジンに対して耐性を有する任意の糸状菌株が、(1) 1若しくは2以上の(数個
 の)完全な又は最小限に特徴付けられた遺伝子欠失を有する菌株を作出すること、又は(2)
 糸状菌細胞内に1若しくは2以上(数個)の遺伝子を導入すると同時に、その糸状菌
 細胞内に形質転換DNAを残さないか若しくは最小限しか残さないこと、を目的とした二
 重ポジティブ及びネガティブ選択カセットを保有するベクターを用いた形質転換のための
 候補となることを可能にする。

30

【0040】

ドミナント・ポジティブ及びネガティブ選択マーカー

本発明の方法には、任意のドミナント・ポジティブ選択マーカーを使用できる。

【0041】

一態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカーは、ハイグロマイシン・ホスホトラン
 スフェラーゼ遺伝子(hpt)、ホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺
 伝子(pat)、プレオマイシン、ゼオシン、及びフレオマイシン耐性遺伝子(ble/
 ble⁰)、アセトアミダーゼ遺伝子(amdS)、ピリチアミン耐性遺伝子(ptrA)
)、ピューロマイシンNアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(pac)、アセチル
 CoAシンターゼ遺伝子(acuA/facA)、Dセリン・デヒドラターゼ(dsd
 A)、ATPスルフィラーゼ遺伝子(sC)、ミトコンドリアATPシンターゼ・サブユ
 ニット9遺伝子(oliC)、アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ3'(I)
 (aph(3')I)遺伝子、及びアミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ3'(II)
 (aph(3')II)遺伝子から成る群から選択される遺伝子のコード配列によ
 ってコードされる。

40

【0042】

別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカーは、ハイグロマイシン・ホスホト
 ランスフェラーゼ遺伝子(hpt)のコード配列によってコードされる。別の態様では、
 ドミナント・ポジティブ選択マーカーは、ホスフィノトリシン・アセチルトランスフェ
 ラーゼ遺伝子(pat)のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・
 ポジティブ選択マーカーは、プレオマイシン、ゼオシン、及びフレオマイシン耐性遺伝子

50

(b l e / b l e O) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、アセトアミダーゼの遺伝子 (a m d S) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、ピリチアミン耐性遺伝子 (p t r A) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、ピューロマイシン N アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (p a c) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、アセチル C o A シンターゼ遺伝子 (a c u A / f a c A) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、D セリン・デヒドラターゼ (d s d A) 遺伝子のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、A T P スルフィラーゼ遺伝子 (s C) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、ミトコンドリア A T P シンターゼ・サブユニット 9 遺伝子 (o l i C) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3 ' (I) (a p h (3 ') I) 遺伝子のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3 (I I) ' (a p h (3 ') I I) 遺伝子のコード配列によってコードされる。

10

【 0 0 4 3 】

ポジティブ選択マーカ―は、あらゆる利用可能な供給源から得ることができる。例えば、ハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ (E C 2.7.1.119; UniProtKB/Wwiss-Prot P09979) をコードするハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (h p t) は、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス (*Streptomyces hygroscopicus*) (Zalacina et al., 1986, Nucleic Acids Research 14: 1565-1581) 及び E . コリ (*E. coli*) (Lino et al., 2007, Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 63: 685-688) から得ることができる。ホスフィノトリシン N アセチルトランスフェラーゼ (E C 2.3.1.183; UniProtKB/Swiss-Prot P16426) をコードするホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (p a t 又は b a r) は、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス (White et al., 1990, Nucleic Acids Research 18: 1062; and Thompson et al., 1987, EMBO J. 6: 2519-2523) 及びストレプトマイセス・ピリドクロモゲネス (*Streptomyces viridochromogenes*) (Lutz et al., 2001, Plant Physiol. 125: 1585-1590; and Strauch et al., 1988, Gene 63: 65-74) から得ることができる。

20

30

【 0 0 4 4 】

例えば、 b l e (UniProtKB/Swiss-Prot P13081) 及び b l e O (UniProtKB/Swiss-Prot P67925) によってコードされるブレオマイシン耐性タンパク質 (B R P) は、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumonia*) (Mazodier et al., 1985, Nucleic Acids Research 13: 195-205) 及びパチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) (Oskam et al., 1991, Plasmid 26: 30-39) からそれぞれ得ることができる。アセトアミダーゼ遺伝子 (a m d S) (E C 3.5.1.4; UniProtKB/Swiss-Prot P08158) は、エメリセラ・ニデュランス (*Emericella nidulans*) (アスペルギルス・ニデュランス) (Corrick et al., 1987, Gene 53: 63-71) 、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 、及びペニシリウム・クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*) (E P 7 5 8 0 2 0) から得ることができる。ミトコンドリア・チアゾール生合成酵素 (UniProtKB/Swiss-Prot Q9UUZ9) をコードするピリチアミン耐性遺伝子 (p t r A 又は t h i A) は、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) (Kubodera et al., 2000, Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 1416-1421) から得ることができる。

40

【 0 0 4 5 】

ピューロマイシン N アセチルトランスフェラーゼ (N C B I 受入番号 C A B 4 2 5 7 0) をコードする p a c 遺伝子は、E . コリ (W O 1 9 9 8 / 1 1 2 4 1) から得ることができる。アセチル C o A シンターゼ遺伝子 (a c u A / f a c A ; E C 6.2.1.1) は、アスペルギルス・ニガー (UniProt A2QK81) 、エメリセラ・ニデュランス (アスペルギル

50

ス・ニデュランス) (UniProt P16928) (Papadopoulou and Sealy-Lewis, 1999, FEMS Microbiology Letters 178: 35-37; 及び Sandeman and Hynes, 1989, Mol. Gen. Genet. 218: 87-92)、及びフィコマイセス・ブレイクスリーアヌス (Phycomyces blakesleeanus) (UniProtKB/Swiss-Prot Q01576) (Garre et al., 1994, Mol. Gen. Genet. 244: 278-286) から得ることができる。D セリン・デヒドラターゼ (EC 4.3.1.18; UniProtKB/Swiss-Prot A1ADP3) をコードする dsdA 遺伝子は、E . コリ (Johnson et al., 2007, J. Bacteriol. 189: 3228-3236) から得ることができる。ATP スルフリラーゼ (NCBI 受入番号 AAN04497) をコードする sc 遺伝子は、アスペルギルス・ニガー (Varadarajulu and Puneekar, 2005, Microbiol. Methods. 61: 219-224) から得ることができる。ミトコンドリア ATP シンターゼ・サブユニット 9 (oliC) 遺伝子 (UniProtKB/Swiss-Prot P16000) は、エメリセラ・ニデュランス (アスペルギルス・ニデュランス) (Ward and Turner, 1986, Mol. Gen. Genet. 205: 331-338) から得ることができる。アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3' (I 及び II) (aph(3') I 及び II) 遺伝子 (EC 2.7.1.95; Interpro IPR002575) は、バチルス・サーキュランス (Bacillus circulans) 及びストレプトマイセス・グリセウス (Streptomyces griseus) (それぞれ、Sarwar and Akhtar, 1991, Biochem. J. 273: 807; 及び Trower and Clark, 1990, N.A.R. 18: 4615) から得ることができる。

10

【0046】

本発明の方法には、あらゆるネガティブ選択マーカースを使用できる。

【0047】

20

一態様では、ネガティブ選択マーカースは、チミジンキナーゼ遺伝子 (tk)、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (pyrG)、及びシトシン・デアミナーゼ遺伝子 (codA) から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる。

【0048】

別の態様では、ネガティブ選択マーカースは、チミジンキナーゼ遺伝子 (tk) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ネガティブ選択マーカースは、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (pyrG) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ネガティブ選択マーカースは、シトシン・デアミナーゼ遺伝子 (codA) のコード配列によってコードされる。

30

【0049】

ネガティブ選択マーカースは、あらゆる利用可能な供給源から得ることができる。例えば、チミジンキナーゼ遺伝子 (tk) (EC 2.7.1.21; UniProtKB/Swiss-Prot P03176) は、ヒト単純ヘルペスウイルス 1 (McKnight, 1980, Nucleic Acids Research 8: 5949-5964) から得ることができる。オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (pyrG) (EC 4.1.1.23; UniProtKB/Swiss-Prot P07817) は、アスペルギルス・ニガー (Wilson et al., 1988, N.A.R. 16: 2339) から得ることができる。シトシン・デアミナーゼ (codA) 遺伝子 (EC 3.5.4.1; UniProtKB/Swiss-Prot CODA_ECOLI) は、E . コリ (菌株 K12) (Danielsen et al., 1992, Molecular Microbiology 6: 1335-1344) から得ることができる。

40

【0050】

核酸構築物では、ポジティブ及びネガティブ選択マーカースをコードするポリヌクレオチドは、例えば、それらが第1及び第2ポリヌクレオチド又は第2及び第3ポリヌクレオチドと指定されているかどうかに関係なく、互いに対していずれかの順序であり得る。加えて、ポジティブ及びネガティブ選択マーカースをコードするポリヌクレオチドは、同じ方向であっても、反対方向であってもよい。

【0051】

別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカースは、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (hpt) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカースは、チミジンキナーゼ遺伝子 (tk) のコード配列によってコードされる。

50

別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカーは、ホスフィノトリシン・アセチル
トランスフェラーゼ遺伝子 (p a t) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティ
ブ選択マーカーは、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k) のコード配列によってコードされる
。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカーは、プレオマイシン、ゼオシン、
及びフレオマイシン耐性遺伝子 (b l e / b l e O) のコード配列によってコードされ、
且つ、ネガティブ選択マーカーは、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k) のコード配列によ
ってコードされる。

【 0 0 5 2 】

別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカーは、アセトアミダーゼ遺伝子 (a
m d S) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカーは、チミジン
キナーゼ遺伝子 (t k) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント
・ポジティブ選択マーカーは、ピリチアミン耐性遺伝子 (p t r A) のコード配列によ
ってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカーは、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k) の
コード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカーは
、ピューロマイシン N アセチル トランスフェラーゼ遺伝子 (p a c) のコード配列
によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカーは、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k
) のコード配列によってコードされる。

10

【 0 0 5 3 】

別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカーは、アセチル C o A シンターゼ遺
伝子 (a c u A / f a c A) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マ
ーカーは、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k) のコード配列によってコードされる。別の態
様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカーは、D セリン・デヒドラターゼ (d s d
A) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカーは、チミジンキナ
ーゼ遺伝子 (t k) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポ
ジティブ選択マーカーは、A T P スルフリラーゼ遺伝子 (s C) のコード配列によってコ
ードされ、且つ、ネガティブ選択マーカーは、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k) のコード
配列によってコードされる。

20

【 0 0 5 4 】

別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカーは、ミトコンドリア A T P シンタ
ーゼ・サブユニット 9 遺伝子 (o l i C) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガ
ティブ選択マーカーは、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k) のコード配列によってコードさ
れる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカーは、アミノグルコシド・ホス
ホトランスフェラーゼ 3 ' (I) (a p h (3 ') I) 遺伝子のコード配列によってコード
され、且つ、ネガティブ選択マーカーは、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k) のコード配
列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカーは、アミ
ノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3 ' (I I) (a p h (3 ') I I) 遺伝子の
コード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカーは、チミジンキナーゼ遺
伝子 (t k) のコード配列によってコードされる。

30

【 0 0 5 5 】

別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカーは、ハイグロマイシン・ホスホト
ランスフェラーゼ遺伝子 (h p t) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ
選択マーカーは、オロチジン 5 ' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (p y r G) のコ
ード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカーは
、ホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (p a t) のコード配列によ
ってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカーは、オロチジン 5 ' リン酸デカルボ
キシラーゼ遺伝子 (p y r G) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミ
ナント・ポジティブ選択マーカーは、プレオマイシン、ゼオシン、及びフレオマイシン耐
性遺伝子 (b l e / b l e O) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選
択マーカーは、オロチジン 5 ' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (p y r G) のコード
配列によってコードされる。

40

50

【0056】

別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、アセトアミダーゼ遺伝子 (amdS) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカ―は、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (pyrG) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、ピリチアミン耐性遺伝子 (ptrA) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカ―は、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (pyrG) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、ピューロマイシン N アセチル トランスフェラーゼ遺伝子 (pac) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカ―は、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (pyrG) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、アセチル CoA シンターゼ遺伝子 (acuA / facA) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカ―は、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (pyrG) のコード配列によってコードされる。

10

【0057】

別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、D セリン・デヒドラターゼ (dsdA) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカ―は、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (pyrG) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、ATP スルフリラーゼ遺伝子 (sc) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカ―は、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (pyrG) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、ミトコンドリア ATP シンターゼ・サブユニット 9 遺伝子 (oliC) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカ―は、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (pyrG) のコード配列によってコードされる。

20

【0058】

別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3' (I) (aph(3')I) 遺伝子のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカ―は、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (pyrG) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3' (II) (aph(3')II) 遺伝子のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカ―は、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (pyrG) のコード配列によってコードされる。

30

【0059】

別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (hpt) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカ―は、シトシン・デアミナーゼ遺伝子 (codA) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、ホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (pat) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカ―は、シトシン・デアミナーゼ遺伝子 (codA) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、プレオマイシン、ゼオシン、及びフレオマイシン耐性遺伝子 (ble / bleO) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカ―は、シトシン・デアミナーゼ遺伝子 (codA) のコード配列によってコードされる。

40

【0060】

別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、アセトアミダーゼ遺伝子 (amdS) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカ―は、シトシン・デアミナーゼ遺伝子 (codA) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカ―は、ピリチアミン耐性遺伝子 (ptrA) のコード

50

配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカは、シトシン・デアミナーゼ遺伝子 (cod A) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカは、ピューロマイシン N アセチル トランスフェラーゼ遺伝子 (pac) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカは、シトシン・デアミナーゼ遺伝子 (cod A) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカは、アセチル Co A シンターゼ遺伝子 (acu A / fac A) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカは、シトシン・デアミナーゼ遺伝子 (cod A) のコード配列によってコードされる。

【0061】

別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカは、D セリン・デヒドラーゼ (dsd A) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカは、シトシン・デアミナーゼ遺伝子 (cod A) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカは、ATP スルフィラーゼ遺伝子 (sC) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカは、シトシン・デアミナーゼ遺伝子 (cod A) のコード配列によってコードされる。

【0062】

別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカは、ミトコンドリア ATP シンターゼ・サブユニット 9 遺伝子 (oli C) のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカは、シトシン・デアミナーゼ遺伝子 (cod A) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカは、アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3' (I) (aph (3') I) 遺伝子のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカは、シトシン・デアミナーゼ遺伝子 (cod A) のコード配列によってコードされる。別の態様では、ドミナント・ポジティブ選択マーカは、アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3' (II) (aph (3') II) 遺伝子のコード配列によってコードされ、且つ、ネガティブ選択マーカは、シトシン・デアミナーゼ遺伝子 (cod A) のコード配列によってコードされる。

【0063】

本発明はさらに、以下の：(a) 配列番号 52 の成熟ポリペプチドに対して、好ましくは少なくとも 70%、より好ましくは少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 85%、よりいっそう好ましくは少なくとも 90%、よりいっそう好ましくは少なくとも 95% の同一性、そして最も好ましくは少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ、(b) 好ましくは少なくとも中程度のストリンジェンシー条件下、より好ましくは少なくとも中程度のストリンジェンシー条件下、よりいっそう好ましくは少なくとも高いストリンジェンシー条件下、そして最も好ましくは非常に高いストリンジェンシー条件下で配列番号 51 の成熟ポリペプチド・コード配列又はその完全長の相補鎖にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされたオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ；及び(c) 配列番号 51 の成熟ポリペプチド・コード配列に対して好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 85%、よりいっそう好ましくは少なくとも 90%、よりいっそう好ましくは少なくとも 95% の同一性、そして最も好ましくは少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドによってコードされたオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ、から成る群から選択される単離されたオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼに関する。

【0064】

好ましい態様では、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼは、配列番号 52、若しくはオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ活性を有する配列番号 52 の断片を含んでなるか又はそれから成る。別の好ましい態様では、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼは、配列番号 52 を含んでなるか又はそれから成る。

【 0 0 6 5 】

本発明はまた、以下の：(a) 配列番号 5 2 の成熟ポリペプチドに対して、好ましくは少なくとも 7 0 %、より好ましくは少なくとも 7 5 %、より好ましくは少なくとも 8 0 %、より好ましくは少なくとも 8 5 %、よりいっそう好ましくは少なくとも 9 0 %、よりいっそう好ましくは少なくとも 9 5 % の同一性、そして最も好ましくは少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；(b) 好ましくは少なくとも中程度のストリンジエンシー条件下、より好ましくは少なくとも中程度のストリンジエンシー条件下、よりいっそう好ましくは少なくとも高いストリンジエンシー条件下、そして最も好ましくは非常に高いストリンジエンシー条件下で配列番号 5 1 又はその完全長の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含んでなるオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼをコードするポリヌクレオチド；及び(c) 配列番号 5 1 の成熟ポリペプチド・コード配列に対して好ましくは少なくとも 8 0 %、より好ましくは少なくとも 8 5 %、よりいっそう好ましくは少なくとも 9 0 %、よりいっそう好ましくは少なくとも 9 5 % の同一性、そして最も好ましくは少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなるオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼをコードするポリヌクレオチド、から成る群から選択される、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチドに関する。

10

20

【 0 0 6 6 】

好ましい態様では、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 5 1、又はオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ活性を有する断片をコードする配列番号 5 1 の部分配列を含んでなるか又はそれから成る。別の好ましい態様では、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 5 1 を含んでなるか又はそれから成る。

【 0 0 6 7 】

ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを単離するか又はクローニングするために使用される技術は、当該技術分野で知られていて、ゲノム DNA からの単離、cDNA からの調製、又はその組み合わせを包含する。そういったゲノム DNA からの本発明のポリヌクレオチドのクローニングは、例えば、周知のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 又は共有している構造上の特徴を有するクローニング DNA 断片を検出するために発現ライブラリーの抗体スクリーニングを使用することによって、達成できる。例えば、Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York を参照のこと。その他の核酸増幅手法、例えばリガーゼ連鎖反応 (LCR)、連結活性化転写 (LAT) 及びヌクレオチド配列ベースの増幅 (NASBA) などを使用することもできる。

30

【 0 0 6 8 】

配列番号 5 1 のヌクレオチド配列；又はその部分配列；並びに配列番号 5 2 のアミノ酸配列；又はその断片は、当該技術分野で周知の方法に従って異なる属又は種の菌株からオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼをコードする DNA を同定及びクローニングするための核酸プローブを設計するために使用され得る。特に、そういったプローブは、対象属又は種のゲノム DNA 又は cDNA 中の対応する遺伝子を同定及び単離するために、標準的なサザンブロッティング手法に付随するそれらとのハイブリダイゼーションに使用される。そういったプローブは、全配列よりかなり短い、少なくとも 1 4、好ましくは少なくとも 2 5、より好ましくは少なくとも 3 5、最も好ましくは少なくとも 7 0 ヌクレオチドの長さであるべきである。しかしながら、核酸プローブは、少なくとも 1 0 0 ヌクレオチドの長さであることが好ましい。例えば、核酸プローブは、少なくとも 2 0 0 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 3 0 0 ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 4 0 0 ヌクレオチド、又は最も好ましくは少なくとも 5 0 0 ヌクレオチドの長さであり得

40

50

る。さらに長いプローブ、例えば好ましくは少なくとも600ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも700ヌクレオチド、よりいっそう好ましくは少なくとも800ヌクレオチド、又は最も好ましくは少なくとも900ヌクレオチドの長さがある核酸プローブ、が使用され得る。DNA及びRNAプローブの両方を使用できる。通常、プローブは、対応遺伝子を検出するために（例えば³²P、³H、³⁵S、ビオチン、又はアビジンで）標識される。そういったプローブは、本発明に含まれる。

【0069】

そのため、菌株から調製されたゲノムDNA又はcDNAライブラリーを、先に記載のプローブにハイブリダイズする、つまりオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼをコードするDNAについてスクリーニングすることもできる。そういった他の菌株からのゲノムDNA又は他のDNAは、アガロース若しくはポリアクリルアミドゲル電気泳動、又は他の分離技法によって分離することもできる。ライブラリーからのDNA又は分離されたDNAは、ニトロセルロース又は他の好適な担体物質に移され、そしてその上に固定され得る。配列番号1と相同であるクローン若しくはDNA、又はその部分配列を同定するためには、前記担体物質がサザンプロットに使用されることが好ましい。

10

【0070】

本発明の目的のために、ハイブリダイゼーションは、非常に低い～非常に高いストリンジェンシー条件下、ヌクレオチド配列が配列番号51又はその部分配列に相当する標識された核酸プローブにハイブリダイズすることを意味する。これらの条件下で核酸プローブがハイブリダイズする分子は、例えばエックス線フィルムを使用することで検出されることができ

20

【0071】

好ましい態様では、核酸プローブは配列番号51である。別の好ましい態様では、核酸プローブは、配列番号52をコードするポリヌクレオチド配列又はその部分配列である。別の好ましい態様では、核酸プローブは、配列番号52をコードするポリヌクレオチド配列である。

【0072】

少なくとも100ヌクレオチドの長さのプローブに関して、非常に低い～非常に高いストリンジェンシー条件は、最適に12～24時間の標準的なサザンプロットティング手法に従った、5XSSPE、0.3%のSDS、200µg/mlの、剪断され且つ変性させたサケ精子DNA、並びに非常に低い及び低いストリンジェンシーのためには25%のホルムアミド、中程度及び中～高いストリンジェンシーのためには35%のホルムアミド、又は高い及び非常に高いストリンジェンシーのためには50%のホルムアミドのいずれかの中での42のプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションと定義される。

30

【0073】

少なくとも100ヌクレオチドの長さのプローブに関しては、担体物質は、最後に、好ましくは45にて（非常に低いストリンジェンシー）、より好ましくは50にて（低いストリンジェンシー）、より好ましくは55にて（中程度のストリンジェンシー）、より好ましくは60にて（中程度～高いストリンジェンシー）、よりいっそう好ましくは65にて（高いストリンジェンシー）、そして最も好ましくは70にて（非常に高いストリンジェンシー）、2xSSC、0.2%のSDSを使用してそれぞれ15分間で3回洗浄される。

40

【0074】

本発明はまた、かかるオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼを含んでなる核酸構築物、組換え発現ベクター、及び組換え系状菌細胞に関する。

【0075】

本発明はまた、以下のステップ：ポリペプチドの産生を促す条件下、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでなる核酸構築物を含んでなる宿主細胞を培養すること、を含んでなるオロチジン 5' リン酸デカルボキシ

50

ラーゼの産生方法に関する。好ましい態様では、当該宿主細胞は糸状菌細胞である。

【0076】

反復配列

糸状菌のゲノム内の遺伝子を欠失させるための本発明の方法では、ドミナント・ポジティブ選択マーカをコードする第1ポリヌクレオチド及びネガティブ選択マーカをコードする第2ポリヌクレオチドを含んでなる核酸構築物はさらに、前記第1及び第2ポリヌクレオチドの5'側に位置する第1反復配列、及び前記第1及び第2ポリヌクレオチドの3'側に位置する第2反復配列を含んでなる。

【0077】

糸状菌のゲノム内に対象ポリヌクレオチドを導入するための本発明の方法では、第1の対象ポリヌクレオチド、ドミナント・ポジティブ選択マーカをコードする第2ポリヌクレオチド、及びネガティブ選択マーカをコードする第3ポリヌクレオチドを含んでなる核酸構築物はまた、前記第2及び第3ポリヌクレオチドの5'側に位置する第1反復配列、並びに前記第2及び第3ポリヌクレオチドの3'側に位置する第2反復配列を含んでなり、ここで、第1の対象ポリヌクレオチドは、前記第1反復配列の5'側に位置するか、又は第2反復配列の3'側に位置するかのいずれかである。

10

【0078】

両方法のための反復配列は、ポジティブ及びネガティブ選択マーカをコードするポリヌクレオチドを欠失させるために第1及び第2反復配列が分子内相同組換えを受けることができるように同一の配列を含んでなることが好ましい。

20

【0079】

反復配列は、任意のポリヌクレオチド配列であり得る。一態様では、反復配列は、糸状菌細胞にとって天然の配列である。別の態様では、反復配列は、糸状菌細胞にとって外来(異種)の配列である。反復配列は、非コードポリヌクレオチド配列であっても、コードポリヌクレオチド配列であってもよい。別の態様では、反復配列は、糸状菌細胞にとって天然のポリヌクレオチド配列である。別の態様では、反復配列は、完全な遺伝子欠失、破壊、又は挿入を保証する3'フランキング配列又は5'フランキング配列のいずれかと同一である。

【0080】

ポジティブ及びネガティブ選択マーカのためのポリヌクレオチドを欠失させるために分子内相同組換えの可能性を高めるために、反復配列は、十分な数、例えば好ましくは20~10000塩基対、50~10000塩基対、100~10000塩基対、200~10000塩基対、より好ましくは400~10000塩基対、そして最も好ましくは800~10000塩基対など、の核酸を含むべきである。

30

【0081】

フランキング配列

糸状菌のゲノム内の対象遺伝子を欠失させるための本発明の方法では、ドミナント・ポジティブ選択マーカをコードする第1ポリヌクレオチド、ネガティブ選択マーカをコードする第2ポリヌクレオチド、第1反復配列、及び第2反復配列を含んでなる核酸構築物はさらに、先に述べたポリヌクレオチドの5'側に位置する第1フランキング配列、及び先に述べたポリヌクレオチドの3'側に位置する第2フランキング配列も含んでなる。

40

【0082】

対象遺伝子を欠失させるために、前記第1フランキング配列は、糸状菌細胞の遺伝子の5'末端に位置する第1領域と同一であり、且つ、前記第2フランキング配列は、遺伝子の3'末端に位置する第2領域と同一である。前記第1及び第2フランキング配列は、それぞれ糸状菌細胞のゲノムの第1及び第2領域との分子間相同組換えを受けて、遺伝子を欠失させ、そして核酸構築物で置き換える。

【0083】

糸状菌のゲノム内に対象ポリヌクレオチドを導入するための本発明の方法において、対象ポリヌクレオチド、ドミナント・ポジティブ選択マーカをコードする第2ポリヌクレ

50

オチド、ネガティブ選択マーカをコードする第3ポリヌクレオチド、第1反復配列、及び第2反復配列を含んでなる核酸構築物はまた、先に述べたポリヌクレオチドの5'側に位置する第1フランキンク配列、及び先に述べたポリヌクレオチドの3'側に位置する第2フランキンク配列を含んでなる。

【0084】

対象ポリヌクレオチドを導入するために、前記第1フランキンク配列は、糸状菌細胞のゲノムの第1領域と同一であり、且つ、前記第2フランキンク配列は、糸状菌細胞のゲノムの第2領域と同一である。前記第1及び第2フランキンク配列は、それぞれ糸状菌細胞のゲノムの第1及び第2領域との分子間相同組換えを受けて、糸状菌細胞のゲノム内に対象ポリヌクレオチドを含んでなる核酸構築物が導入される。

10

【0085】

一態様では、前記第1領域は、糸状菌細胞の遺伝子の5'側に位置し、且つ、前記第2領域は、糸状菌細胞の遺伝子の3'側に位置する。別の態様では、前記第1及び第2領域の両方が、糸状菌細胞の遺伝子内に位置している。別の態様では、前記第1及び第2領域のうち的一方が糸状菌細胞の遺伝子内に位置し、且つ、前記第1及び第2領域の他方が糸状菌細胞の遺伝子の5'又は3'側に位置する。

【0086】

別の態様では、前記第1及び第2反復配列は、前記第1フランキンク配列又は前記第2フランキンク配列のいずれかと同一である。

【0087】

正確な位置における組込みの可能性を高めるために、好ましくは、前記フランキンク配列は、十分な数、例えば、相同組換えを確実にするために十分な数の核酸、例えば100~1000塩基対、好ましくは400~1000塩基対、そして最も好ましくは800~1000塩基対の核酸を含むべきである。前記フランキンク配列は、糸状菌細胞のゲノム内の標的配列と同一であるいずれかの配列であり得る。さらに、前記フランキンク配列は、非コードヌクレオチド配列であっても、コードヌクレオチド配列であってもよい。

20

【0088】

ポリヌクレオチド

本発明の方法では、対象ポリヌクレオチドは任意のDNAであってもよい。当該DNAは、対象糸状菌細胞にとって天然であっても、異種(外来)のものであってもよい。

30

【0089】

前記ポリヌクレオチドは、対象の生物学的活性を有する任意のポリペプチドをコードし得る。前記ポリペプチドは、対象の糸状菌細胞にとって天然であっても、異種(外来)のものであってもよい。「異種のポリペプチド」という用語は、本明細書中では、糸状菌細胞にとって天然ではないポリペプチド; その天然ポリペプチドを変更するために構造修飾(例えば欠失、置換、及び/又は挿入)が加えられた天然ポリペプチド; 又は組換えDNA技術、例えばより強いプロモーター、によってポリペプチドをコードするDNAの操作の結果として発現が量的に変更された天然ポリペプチド、と定義される。前記ポリペプチドは、以下で触れるポリペプチド及びハイブリッド・ポリペプチドの天然由来の対立遺伝子変異及び遺伝子操作変異であってもよい。

40

【0090】

「ポリペプチド」という用語は、本明細書中では、特定の長さのコード化産物を指すことを意味せず、そのためペプチド、オリゴペプチド、及びタンパク質を含む。「ポリペプチド」という用語はまた、ハイブリッド・ポリペプチド及び融合ポリペプチドを含む。ポリペプチドはさらに、ポリペプチドの天然由来の対立遺伝子変異及び遺伝子操作変異が含まれる。

【0091】

一態様では、ポリペプチドは、抗体、抗原、抗微生物性ペプチド、酵素、増殖因子、ホルモン、免疫調節物質(immunodilator)、神経伝達物質、受容体、レポータータンパク

50

質、構造タンパク、及び転写因子である。

【0092】

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

10

【0093】

別の態様では、ポリペプチドは、アルブミン、コラーゲン、トロポエラスチン、エラスチン、又はゼラチンである。

【0094】

別の態様では、ポリペプチドは、ハイブリッド・ポリペプチドである。前記ハイブリッド・ポリペプチドは、少なくとも2つの異なるポリペプチドから得られる部分的な又は完全なポリペプチド配列の組み合わせを含んでなり、この場合、そのポリペプチドの1若しくは2以上が糸状菌細胞にとって異種であり得る。

20

【0095】

別の態様では、ポリペプチドは、当該ポリペプチド又はその断片のN末端若しくはC末端に、別のポリペプチドが融合されている融合ポリペプチドである。融合ポリペプチドは、一のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（又はその一部）を別のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（又はその一部）に融合することによって産生される。融合ポリペプチドを作り出す技術は、当該技術分野で知られており、そして、ポリペプチドをコードするコード配列を、それらがフレーム内に存在し、且つ、融合ポリペプチドの発現が、同一の1又は2以上のプロモーター、及びターミネーターの制御下にあるように、連結することを含む。

【0096】

対象ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、いずれかの原核生物、真核生物、又はその他の源から得ることもできる。本発明の目的のために、「から得られる」という用語は、所定の源に関連して本明細書中で使用される場合、ポリペプチドがその源、又はその源からの遺伝子が挿入された細胞によって産生されていることを意味するものとする。

30

【0097】

対象ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの単離又はクローニングに使用される技術は、当該技術分野で知られていて、そしてゲノムDNAからの単離、cDNAからの調製、又はその組み合わせを包含する。そういったゲノムDNAからの対象ポリヌクレオチドのクローニングは、例えば周知のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用することによって達成できる。例えばInnis et al., 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New Yorkを参照のこと。クローニング手順は、ポリペプチドをコードする核酸配列を含んでなる所望の核酸断片の切出しと単離、ベクター分子内へのその断片の挿入、そして前記核酸配列の複数のコピー又はクローンが複製される突然変異真菌細胞内への組換えベクターの組込みを伴うこともある。ポリヌクレオチドは、ゲノムのもの、cDNA、RNA、半合成、及び合成起源、又はそのいずれかの組み合わせのものであり得る。

40

【0098】

対象ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、好適な糸状菌細胞内におけるポリヌクレオチドの発現を提供するさまざまな方法により操作され得る。対象ポリペプチドを

50

コードするDNAのための核酸構築物及び組換え発現ベクターの構築は、本明細書中に記載したとおり実施できる。

【0099】

ポリヌクレオチドはさらに、制御配列、例えば対象遺伝子発現を操作するためのプロモーターであり得る。制御配列に関する制限されることのない例は、本明細書中に記載されている。

【0100】

ポリヌクレオチドはまた、糸状菌のゲノム内の遺伝子を破壊するために有用な任意の核酸分子であり得る。ポリヌクレオチドは、コーディング・ポリヌクレオチドであっても、非コーディング・ポリヌクレオチドであってもよい。ポリヌクレオチドは、以前に開示されたもの以外の別の選択マーカーをコードすることもできる。ポリヌクレオチドは、例えば先に記載したものなどのポリペプチドをコードすることもできる。ポリヌクレオチドは、単純に、遺伝子を破壊するために十分な長さの任意の核酸分子であり得る。

【0101】

ポリヌクレオチドは、先に開示した具体例によって範囲が限定されてはならない。なぜならば、これらの実施例は、本発明のいくつかの態様の例示として意図されているからである。

【0102】

核酸構築物

本発明はさらに、糸状菌細胞のゲノム内の遺伝子又はその一部を欠失させるための核酸構築物であって、以下の：(i)発現されるとドミナント・ポジティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ドミナント・ポジティブ選択マーカーコード配列を含んでなる第1ポリヌクレオチド；(ii)発現されるとネガティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ネガティブ選択マーカーコード配列を含んでなる第2ポリヌクレオチド；(iii)前記第1及び第2ポリヌクレオチドの5'側に位置する第1反復配列、及び前記第1及び第2ポリヌクレオチドの3'側に位置する第2反復配列、ここで、前記第1及び第2反復配列は同一の配列を含んでなる；並びに(iv)構成要素(i)、(ii)、及び(iii)の5'側に位置する第1フランキング配列、及び構成要素(i)、(ii)、及び(iii)の3'側に位置する第2フランキング配列、ここで、前記第1フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第1領域と同一であり、且つ、前記第2フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第2領域と同一であり、ここで、(1)前記第1領域が前記糸状菌細胞の遺伝子又はその一部の5'側に位置し、且つ、前記第2領域が前記糸状菌細胞の遺伝子又はその一部の3'側に位置するか、(2)前記第1及び第2領域の両方が前記糸状菌細胞の遺伝子内に位置しているか、或いは(3)前記第1及び第2領域の一方が前記糸状菌細胞の遺伝子内に位置し、且つ、前記第1及び第2領域の他方が、前記糸状菌細胞の遺伝子の5'又は3'側に位置する；を含んでなり、ここで、前記第1及び第2フランキング配列が、それぞれ前記糸状菌細胞の第1及び第2領域と分子間相同組換えを受けて、遺伝子又はその一部を欠失させ、及び前記核酸構築物で置き換え；そして前記第1及び第2反復配列が分子内相同組換えを受けて、前記第1及び第2ポリヌクレオチドを欠失させる、前記核酸構築物に関する。

【0103】

本発明はさらに、糸状菌細胞のゲノム内にポリヌクレオチドを導入するための核酸構築物であって、以下の：(i)第1の対象ポリヌクレオチド；(ii)発現されるとドミナント・ポジティブ選択表現型を糸状菌細胞に与える、ドミナント・ポジティブ選択マーカーコード配列を含んでなる第2ポリヌクレオチド；(iii)発現されるとネガティブ選択表現型を糸状菌細胞に与える、ネガティブ選択マーカーコード配列を含んでなる第3ポリヌクレオチド；(iv)前記第1及び第2ポリヌクレオチドの5'側に位置する第1反復配列、及び前記第1及び第2ポリヌクレオチドの3'側に位置する第2反復配列、ここで、前記第1及び第2反復配列が同一の配列を含んでなり、且つ、対象ポリペプチドをコードする前記第1ポリヌクレオチドは前記第1反復の5'側に位置するか又は前記第2反

復の 3' 側に位置する；並びに (v) 構成要素 (i)、(ii)、(iii)、及び (iv) の 5' 側に位置する第 1 フランキング配列、及び構成要素 (i)、(ii)、(iii)、及び (iv) の 3' 側に位置する第 2 フランキング配列、ここで、前記第 1 フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第 1 領域と同一であり、且つ、前記第 2 フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第 2 領域と同一である；を含んでなり、ここで、前記第 1 及び第 2 フランキング配列は、それぞれ前記糸状菌細胞のゲノムの第 1 及び第 2 領域と分子間相同組換えを受けて、前記糸状菌細胞のゲノム内に前記核酸構築物を導入し；並びに前記第 1 及び第 2 反復配列は、分子内相同組換えを受けて、前記第 2 及び第 3 ポリヌクレオチドを欠失させることができる、前記核酸構築物に関する。

【0104】

対象ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、ドミナント・ポジティブ選択マーカー、又はネガティブ選択マーカーは、その発現をもたらすためのさまざまな方法により操作され得る。それがベクター内に挿入される前のそういったポリヌクレオチドの配列の操作は、発現ベクターによっては望ましいか又は必要であることもある。組換え DNA 法を利用するポリヌクレオチド配列を修飾するための技術は、当該技術分野で周知である。

【0105】

制御配列は、適当なプロモーター配列、つまり対象ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現するように糸状菌細胞によって認識されるヌクレオチド配列であり得る。プロモーター配列は、ポリペプチドの発現を媒介する転写制御配列を含む。プロモーターは、突然変異、切り詰め型、及びハイブリッド・プロモーターを含めた最適な糸状菌細胞において転写活性を示すいずれかのヌクレオチド配列であり得、そしてその糸状菌細胞にとって同種又は異種のいずれであっても細胞外又は細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得ることもできる。

【0106】

糸状菌細胞における本発明の核酸構築物の転写を指示するための好適なプロモーターの例は、アスペルギルス・オリゼの T A K A アミラーゼ、リゾムコール・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) のアスパラギン酸プロテイナーゼ、アスペルギルス・ニガーの中性アミラーゼ、アスペルギルス・ニガーの酸安定性アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー又はアスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*) のグルコアミラーゼ (g l a A)、リゾムコール・ミエヘイのリパーゼ、アスペルギルス・オリゼのアルカリプロテアーゼ、アスペルギルス・オリゼのトリオースリン酸イソメラーゼ、アスペルギルス・ニデュランスのアセトアミダーゼ、フサリウム・ベネナツムのアミログルコシダーゼ (W O 0 0 / 5 6 9 0 0)、フサリウム・ベネナツムの amy A、フサリウム・ベネナツムの D a r i a (W O 0 0 / 5 6 9 0 0)、フサリウム・ベネナツムの Q u i n n (W O 0 0 / 5 6 9 0 0)、フサリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*) のトリプシン様プロテアーゼ (W O 9 6 / 0 0 7 8 7)、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) のグルコシダーゼ、トリコデルマ・リーセイのセロビオヒドロラーゼ I、トリコデルマ・リーセイのセロビオヒドロラーゼ II、トリコデルマ・リーセイのエンドグルカナーゼ I、トリコデルマ・リーセイのエンドグルカナーゼ II、トリコデルマ・リーセイのエンドグルカナーゼ III、トリコデルマ・リーセイのエンドグルカナーゼ IV、トリコデルマ・リーセイのエンドグルカナーゼ V、トリコデルマ・リーセイのキシラナーゼ I、トリコデルマ・リーセイのキシラナーゼ II、トリコデルマ・リーセイのキシロシダーゼ、並びに N A 2 t p i プロモーター (アスペルギルス・ニガーの中性アミラーゼとアスペルギルス・オリゼのトリオースリン酸イソメラーゼ遺伝子からのプロモーターのハイブリッド) の遺伝子から得られるプロモーター；そしてその突然変異、切り詰め型、及びハイブリッド・プロモーターである。

【0107】

制御配列はまた、好適な転写ターミネーター配列、つまり糸状菌細胞によって認識されて転写が終結される配列であり得る。ターミネーター配列は、ポリペプチドをコードする

10

20

30

40

50

ヌクレオチド配列の3'末端に作動できるように連結される。最適な糸状菌細胞において機能的であるあらゆるターミネーターが、本発明に使用され得る。

【0108】

糸状菌細胞のための好ましいターミネーターは、アスペルギルス・オリゼのTAKAアミラーゼ、アスペルギルス・ニガールのグルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニデュランスのアントラニル酸シンターゼ、アスペルギルス・ニガールのグルコシダーゼ、及びフサリウム・オキシスポラムのトリプシン様プロテアーゼの遺伝子から得られる。

【0109】

制御配列はまた、好適なリーダー配列、つまり糸状菌細胞による翻訳に重要であるmRNAの非翻訳領域であり得る。リーダー配列は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の5'末端に作動できるように連結される。最適な糸状菌細胞において機能的なあらゆるリーダー配列が、本発明に使用され得る。糸状菌細胞のための好ましいリーダーは、アスペルギルス・オリゼのTAKAアミラーゼ及びアスペルギルス・ニデュランスのトリオースリン酸イソメラーゼ遺伝子から得られる。

【0110】

制御配列はまた、ポリアデニル化配列、つまりヌクレオチド配列の3'末端に作動できるように連結され、そして転写された場合、転写mRNAにポリアデノシン残基を付加するシグナルとして糸状菌細胞によって認識される配列であり得る。最適な糸状菌細胞において機能的なあらゆるポリアデニル化配列が、本発明に使用され得る。

【0111】

糸状菌細胞のための好ましいポリアデニル化配列は、アスペルギルス・オリゼのTAKAアミラーゼ、アスペルギルス・ニガールのグルコアミラーゼ、アスペルギルス・ニデュランスのアントラニル酸シンターゼ、フサリウム・オキシスポラムのトリプシン様プロテアーゼ、及びアスペルギルス・ニガールのグルコシダーゼの遺伝子から得られる。

【0112】

制御配列はまた、ポリペプチドのアミノ末端に連結されたシグナルペプチドをコードし、且つ、コードされたポリペプチドを細胞の分泌経路に向かわせるシグナルペプチド・コード配列であり得る。ヌクレオチド配列のコード配列の5'末端は、分泌されたポリペプチドをコードするコード配列のセグメントを有する翻訳リーディングフレームの中に天然に連結されたシグナルペプチド・コード配列を本来含み得る。あるいは、コード配列の5'末端は、コード配列にとって外来のものであるシグナルペプチド・コード配列を含むこともできる。外来シグナルペプチド・コード配列は、そのコード配列がシグナルペプチド・コード配列を天然に含まない場合に必要とされることもある。あるいは、外来シグナルペプチド・コード配列は、ポリペプチドの分泌を高めるために、天然シグナルペプチド・コード配列を単純に置き換えることもできる。しかしながら、発現されるポリペプチドを最適な糸状菌細胞の分泌経路に向かわせる、すなわち培地中に分泌させる、あらゆるシグナルペプチド・コード配列が、本発明に使用され得る。

【0113】

糸状菌細胞のための有効なシグナルペプチド・コード配列は、アスペルギルス・オリゼのTAKAアミラーゼ、アスペルギルス・ニガールの中性アミラーゼ、アスペルギルス・ニガールのグルコアミラーゼ、リゾムコール・ミエヘイのアスパラギン酸プロテイナーゼ、ヒューミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*) のセルラーゼ、ヒューミコラ・インソレンスのエンドグルカナーゼV、及びヒューミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*) のリパーゼの遺伝子から得られるシグナルペプチド・コード配列である。

【0114】

制御配列はさらに、ポリペプチドのアミノ末端に配置されたプロペプチドをコードするプロペプチド・コード配列であり得る。得られたポリペプチドは、プロ酵素又はプロポリペプチド(又は場合によって、チモーゲン)としても知られている。プロペプチドは、一般に不活性であり、そしてプロペプチドの触媒的又は自己触媒的開裂によってプロポリペプチドから成熟活性ポリペプチドに変換されることができ。プロペプチド・コード配列

10

20

30

40

50

は、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) のアルカリプロテアーゼ (a p r E)、バチルス・ズブチリスの中性プロテアーゼ (n p r T)、サッカロマイセス・セレビスシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) のアルファ因子、リゾムコール・ミエヘイのアスパラギン酸プロテイナーゼ、及びマイセリオフトラ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*) のラッカーゼ (W O 9 5 / 3 3 8 3 6) の遺伝子から得ることもできる。

【 0 1 1 5 】

シグナルペプチドとプロペプチド配列の両方がポリペプチドのアミノ末端に存在している場合、プロペプチド配列がポリペプチドのアミノ末端の次に配置され、そしてシグナルペプチド配列がプロペプチド配列のアミノ末端の次に配置される。

【 0 1 1 6 】

また、糸状菌細胞の増殖に応じたポリペプチドの発現の調節を可能にする調節配列を加えることが望まれることもある。調節系の例は、調節化合物の存在を含めた化学的又は物理的な刺激に対応して遺伝子の発現がオンにされたり、オフにされたりするものである。酵母では、A D H 2 系又は G A L 1 系が使用され得る。糸状菌では、T A K A の アミラーゼ・プロモーター、アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ・プロモーター、及びアスペルギルス・オリゼのグルコアミラーゼ・プロモーターが、調節配列として使用され得る。調節配列のその他の例は、遺伝子増幅を可能にするものであり得る。真核生物系では、これらの調節配列としては、メトトレキサートの存在下で増幅されるジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子、及び重金属で増幅されるメタロチオネイン遺伝子が挙げられる。これらの場合では、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、調節配列と作動できるように連結されているであろう。

【 0 1 1 7 】

発現ベクター

本発明はまた、本発明の核酸構築物を含んでなる組換え発現ベクターに関連する。組換え発現ベクターは、都合よく組換え D N A 手順にかけることができ、且つポリヌクレオチド配列の発現を引き起こすことができる任意のプラスミドであり得る。最適なベクターは、通常、ベクターが導入される糸状菌細胞とそのベクターの適合性による。ベクターは、第 1 及び第 2 フランキング配列が糸状菌細胞の第 1 及び第 2 領域との効果的な分子間相同組換えを受けるように、線状であることが好ましい。

【 0 1 1 8 】

本発明の組換え発現ベクターを構築するのに使用される手順は、当業者にとって周知である (例えば Sambrook et al., 1989、前掲を参照のこと)。

【 0 1 1 9 】

糸状菌細胞

本発明はさらに、本発明の核酸構築物を含んでなる組換え糸状菌細胞に関する。

【 0 1 2 0 】

本発明の方法では、糸状菌細胞は、任意の糸状菌細胞であり得る。「糸状菌細胞」という用語は、複製中に起こる突然変異に起因する親細胞と同一でない、親細胞のあらゆる子孫を含む。

【 0 1 2 1 】

「糸状菌」は、(Hawksworth et al., In, Ainsworth and Bisby 's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK によって定義されるように) 下位区分である真菌類と卵菌類のすべての糸状体を包含する。糸状菌は一般に、キチン、セルロース、グルカン、キトサン、マンナン、及び他の複合多糖体から構成される菌糸体壁によって特徴づけられる。栄養成長は、菌糸伸長によってであり、そして炭素代謝は絶対好気性である。対照的に、酵母、例えばサッカロマイセス・セレビスシエによる栄養成長は、単細胞葉状体の発芽によってであり、そして炭素代謝は発酵性であり得る。

【 0 1 2 2 】

一態様では、糸状菌細胞は、アクレモニウム (*Acremonium*)、アスペルギルス (*Asperg*

10

20

30

40

50

illus)、アウレオバシジウム (Aureobasidium)、ブジャカンデラ (Bjerkandera)、セリポリオプシス (Ceriporiopsis)、クリソスポリウム (Chrysosporium)、コプリヌス (Coprinus)、コリオラス (Coriolus)、クリプトコッカス (Cryptococcus)、フィリバシジウム (Filibasidium)、フサリウム (Fusarium)、ヒューミコラ (Humicola)、マグナポルセ (Magnaporthe)、ムコール (Mucor)、マイセリオフトラ (Myceliophthor)、ネオカリマスチックス (Neocallimastix)、ニューロスボラ (Neurospora)、パエシロマイセス (Paecilomyces)、ペニシリウム (Penicillium)、ファネロカエテ (Phanerochaete)、フレビア (Phlebia)、ピロマイセス (Piromyces)、プレウロツス (Pleurotus)、シゾフィラム (Schizophyllum)、タラロマイセス (Talaromyces)、サーモアスカス (Thermoascus)、チエラビア (Thielavia)、トリボクラジウム (Tolypocladium)、トラメテス (Trametes)、又はトリコデルマ (Trichoderma) 細胞である。

10

【 0 1 2 3 】

より好ましい態様では、糸状菌細胞は、アスペルギルス・アワモリ (Aspergillus awamori)、アスペルギルス・フミガタス (Aspergillus fumigatus)、アスペルギルス・フォエチダス (Aspergillus foetidus)、アスペルギルス・ジャポニクス (Aspergillus japonicus)、アスペルギルス・ニデュランス (Aspergillus nidulans)、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) 又はアスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae) 細胞である。別のより好ましい態様では、糸状菌細胞は、フサリウム・バクトリジオイデス (Fusarium bactridioides)、フサリウム・セラリス (Fusarium cerealis)、フサリウム・クロックウェレンズ (Fusarium crookwellense)、フサリウム・クルモラム (Fusarium culmorum)、フサリウム・グラミネアラム (Fusarium graminearum)、フサリウム・グラミンム (Fusarium graminum)、フサリウム・ヘテロスボラム (Fusarium heterosporum)、フサリウム・ネグンジ (Fusarium negundi)、フサリウム・オキシスポラム (Fusarium oxysporum)、フサリウム・レチキュラタム (Fusarium reticulatum)、フサリウム・ロゼウム (Fusarium roseum)、フサリウム・サムブシウム (Fusarium sambucinum)、フサリウム・サルコクロウム (Fusarium sarcochroum)、フサリウム・スポロトリキオイデス (Fusarium sporotrichioides)、フサリウム・スルフレウム (Fusarium sulphureum)、フサリウム・トルロサム (Fusarium torulosum)、フサリウム・トリコセシオイデス (Fusarium trichothecioides)、又はフサリウム・ベネナツム (Fusarium venenatum) 細胞である。

20

30

【 0 1 2 4 】

別のより好ましい態様では、糸状菌細胞は、ブジャカンデラ・アツスタ (Bjerkandera adusta)、セリポリオプシス・アネイリナ (Ceriporiopsis aneirina)、セリポリオプシス・カレギエア (Ceriporiopsis caregiea)、セリポリオプシス・ギルベセンス (Ceriporiopsis gilvescens)、セリポリオプシス・パンノシクタ (Ceriporiopsis pannocinta)、セリポリオプシス・リプロサ (Ceriporiopsis rivulosa)、セリポリオプシス・スブルファ (Ceriporiopsis subrufa)、セリポリオプシス・スベルミスボラ (Ceriporiopsis subvermispora)、クリソスポリウム・ケラチノフィラム (Chrysosporium keratinophilum)、クリソスポリウム・ルクノウェンス (Chrysosporium lucknowense)、クリソスポリウム・トロピカム (Chrysosporium tropicum)、クリソスポリウム・メルダリウム (Chrysosporium merdarium)、クリソスポリウム・イノプス (Chrysosporium inops)、クリソスポリウム・パニコラ (Chrysosporium pannicola)、クリソスポリウム・クイーンズランジカム (Chrysosporium queenslandicum)、クリソスポリウム・ゾナタム (Chrysosporium zonatum)、コプリヌス・シネレウス (Coprinus cinereus)、コリオラス・ヒルスタス (Coriolus hirsutus)、ヒューミコラ・インソレンス (Humicola insolens)、ヒューミコラ・ラヌギノサ (Humicola lanuginosa)、ムコール・ミエヘイ (Mucor miehei)、マイセリオフトラ・サーモフィラ (Myceliophthora thermophila)、ニューロスボラ・クラサ (Neurospora crassa)、ペニシリウム・プルプロゲナム (Penicillium purpurogenum)、ファネロカエテ・クリソスポリウム (Phanerochaete chrysosporium)、フレビア・ラディエタ (Phlebia radiata)、プレウロタス・エリンギ (Pleurotus eryngii)、チエ

40

50

ラビア・テレストリス (*Thielavia terrestris*)、トラメテス・ピロサ (*Trametes villosa*)、トラメテス・ベルシコル (*Trametes versicolor*)、トリコデルマ・ハルジアナム (*Trichoderma harzianum*)、トリコデルマ・コニンギ (*Trichoderma koningii*)、トリコデルマ・ロンギブラキアツム (*Trichoderma longibrachiatum*)、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*)、又はトリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) 細胞である。

【0125】

最も好ましい態様では、糸状菌細胞は、フサリウム・ベネナツム細胞である。別の最も好ましい態様では、糸状菌細胞は、フサリウム・ベネナツム NRRL 30747 である。別の最も好ましい態様では、糸状菌細胞は、フサリウム・ベネナツム ATCC 20334 である。

10

【0126】

別の最も好ましい態様では、糸状菌細胞は、アスペルギルス・ニガー細胞である。

【0127】

別の最も好ましい態様では、糸状菌細胞は、アスペルギルス・オリゼ細胞である。

【0128】

別の最も好ましい態様では、糸状菌細胞は、トリコデルマ・リーセイ細胞である。

【0129】

糸状菌細胞は、プロトプラスト形成、そのプロトプラストの形質転換、そしてそれ自体公知の様式による細胞壁の再生を伴う工程によって形質転換され得る。アスペルギルス及びトリコデルマ細胞の形質転換のための好適な手法は、EP 238023 及び Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474 に記載されている。フサリウム属を形質転換するための適切な方法は、Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 及び WO 96 / 00787 によって記載されている。

20

【0130】

製造方法

本発明はさらに、対象ポリペプチドを製造する方法であって、以下のステップ：(a) 前記ポリペプチドの産生を促す条件下、本明細書中に記載したように得た糸状菌細胞を培養し；及び (b) そのポリペプチドを回収すること、を含んでなる方法に関する。

【0131】

本発明の製造法では、細胞は、当該技術分野で周知の方法を使用したポリペプチドの製造に好適な栄養培地中で培養される。例えば、細胞は、好適な培地中、且つ、前記ポリペプチドを発現及び / 又は単離することを可能にする条件下で実施される実験室用又は産業用発酵槽内での、振盪フラスコ培養、及び小規模又は大規模発酵（連続、バッチ、供給バッチ、又は固体状態発酵を包含する）によって培養され得る。培養は、炭素及び窒素源、及び無機塩を含んでなる好適な栄養培地中、当該技術分野で知られている手法を用いておこなわれる。好適な培地は、商業的供給業者から入手可能であるか、又は（例えば、American Type Culture Collection のカタログ中に）公開されている組成に従って調製され得る。ポリペプチドは、栄養培地中に分泌される場合、培地から直接回収され得る。ポリペプチドは、培地中に分泌されない場合、細胞溶解物から回収できる。

30

40

【0132】

ポリペプチドは、そのポリペプチドに特異的な当該技術分野で知られている方法を使用することで検出され得る。これらの検出法は、特異的抗体の使用、酵素生成物の形成、又は酵素基質の消失を包含し得る。例えば、酵素アッセイは、ポリペプチドの活性を測定するために使用され得る。

【0133】

得られたポリペプチドは、当該技術分野で知られている方法を使用することによって回収され得る。例えばポリペプチドは、これだけに限定されるものではないが、遠心分離、濾過、抽出、噴霧乾燥、留去、又は沈殿を含めた従来手法によって栄養培地から回収され得る。

50

【0134】

対象ポリペプチドは、実質的に純粋なポリペプチドを得るために、これだけに限定されるものではないが、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、疎水性、クロマトフォーカシング、及びサイズ排除）、電気泳動手法（例えば、分取用等電点電気泳動）、示差溶解性（例えば、硫酸沈殿）、SDS PAGE、又は抽出を含めた当該技術分野で知られているさまざまな手法によって精製され得る（例えば、Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989を参照のこと）。

【0135】

本発明は次の実施例によってさらに説明されるが、それらの実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

10

【実施例】

【0136】

材料

バッファー及び基質として使用される化学物質は、少なくとも試薬グレードの市販の製品であった。すべてのプライマー及びオリゴヌクレオチドは、MWG Biotech, Inc., High Point, NC, USAによって供給された。

【0137】

真菌株

フサリウム・ベネナツム株 WTY 842 1 11 は、米国特許第 7368271 号明細書に記載されている。フサリウム・ベネナツム株 EmY 1154 46 4.3 は、フサリウム・ベネナツム株 WTY 842 1 11 の tri5、amdS+、pyrG 誘導体である。フサリウム・ベネナツム株 WTY 1449 03 03 は、フサリウム・ベネナツム株 WTY 842 1 11 の tri5、amdS+、bar+、tk+ 形質転換体である。フサリウム・ベネナツム株 WTY 1449 09 01 は、フサリウム・ベネナツム株 WTY 1449 03 03 の tri5、amdS+、bar+、tk 取り除き誘導体である。現在、フサリウム・ベネナツム (Yoder and Christianson, 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 62-80; O'Donnell et al., 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 57-67) として再分類されているフサリウム株 A3/5 を、Anthony Trinci 博士 (University of Manchester, Manchester, England) から入手した。この株の寄託物は、フサリウム株 ATCC 20334 として American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA から、又はフサリウム株 NRRL 30747 として Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, Peoria, IL, USA から入手できる。トリコデルマ・リーセイ Rut C30 は、Montenecourt and Eveleigh, 1979, Adv. Chem. Ser. 181: 289-301 によって記載されている。

20

30

【0138】

培地及び溶液

LB プレートは、1 リットルあたり、10 g のトリプトン、5 g の酵母抽出物、5 g の NaCl、及び 15 g の Bacto 寒天から構成された。

【0139】

NZY 上部アガロースは、1 リットルあたり、5 g の NaCl、5 g の酵母抽出物、10 g の NZ アミン、2 g の MgSO₄、及び 7 g のアガロースから構成された。

40

【0140】

M400 培地は、1 リットルあたり、50 g のマルトデキストリン、2 g の MgSO₄・7H₂O、2 g の KH₂PO₄、4 g のクエン酸、8 g の酵母抽出物、2 g の尿素、0.5 g の CaCl₂、及び 0.5 ml の AMG 微量金属溶液 (pH 6.0) から構成された。

【0141】

AMG 微量金属溶液は、1 リットルあたり、14.3 g の ZnSO₄・7H₂O、2.5 g の CuSO₄・5H₂O、0.5 g の NiCl₂、13.8 g の FeSO₄、8.5 g の

50

MnSO₄、及び3.0gのクエン酸から構成された。

【0142】

2XYT培地は、1リットルあたり、16gのトリプトン、10gの酵母抽出物、5gのNaCl、及び5gのBacto寒天から構成された。

【0143】

YP培地は、1リットルあたり、10gの酵母抽出物及び20gのBactoペプトンから構成された。

【0144】

YPG_{2%}培地は、1リットルあたり、10gの酵母抽出物、20gのBactoペプトン、及び20gのグルコースから構成された。

【0145】

YPG_{5%}培地は、1リットルあたり、10gの酵母抽出物、20gのBactoペプトン、及び50gのグルコースから構成された。

【0146】

RA培地は、1リットルあたり、50gのコハク酸、12.1gのNaNO₃、1gのグルコース、及び20mlの50×Vogel's塩溶液(C不含、NaNO₃不含)から構成された。

【0147】

RA+ウリジン培地は、1リットルあたり、50gのコハク酸、12.1gのNaNO₃、1gのグルコース、及び20mlの50×Vogel's塩溶液(C不含、NaNO₃不含)から構成された。RA培地の濾過滅菌後、濾過滅菌したウリジンを10mMの終濃度まで加えた。

RA+BASTA(商標)培地は、1リットルあたり、50gのコハク酸、12.1gのNaNO₃、1gのグルコース、及び20mlの50×Vogel's塩溶液(C不含、NaNO₃不含)から構成された。RA培地の濾過滅菌後に、濾過滅菌したBASTA(商標)(グルホシネート、Hoechst Schering AgrEvo, Frankfurt, Germany)を、250mg/mlの通常原液を使用して6mg/mlの終濃度まで加えた。

【0148】

50×Vogel's塩溶液(C不含、NaNO₃不含)は、1リットルあたり、250gのKH₂PO₄、10gのMgSO₄・7H₂O、5gのCaCl₂・2H₂O、2.5mlのビオチン液、及び5mlのVogel's微量元素溶液から構成された。

【0149】

ビオチン原液は、100mlの50%エタノール中、5mgのビオチンから構成された。

【0150】

Vogel's微量元素溶液は、100mlあたり、5gのクエン酸、5gのZnSO₄・7H₂O、1gのFe(NH₄)₂(SO₄)₂・6H₂O、0.25gのCuSO₄・5H₂O、0.05gのMnSO₄・H₂O、0.05gのH₃BO₃、及び0.05gのNa₂MoO₄・2H₂Oから構成された。

【0151】

PDAプレートは、1リットルあたり、39gのポテトデキストロース寒天(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)から構成された。

【0152】

PDA+1Mのショ糖プレートは、1リットルあたり、39gのポテトデキストロース寒天(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)及び342gのショ糖から構成された。

【0153】

VNO₃RLMTプレートは、1リットルあたり、20mlの50×Vogel's塩溶液(25mMのNaNO₃)、273.33gのショ糖、及び15gのLMTアガロース(Sigma, St. Louis, MO, USA)から構成された。

【0154】

10

20

30

40

50

50 × V o g e l s 塩溶液 (25 m M の NaNO_3) は、1 リットルあたり、125 g のクエン酸ナトリウム、250 g の KH_2PO_4 、106.25 g の NaNO_3 、10 g の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5 g の $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2.5 ml のビオチン原液、及び5 ml の V o g e l s 微量元素溶液から構成された。

【0155】

V N O ₃ R L M T B A S T A (商標) プレートは、1 リットルあたり、20 ml の 50 × V o g e l s 塩溶液 (25 m M の NaNO_3)、273.33 g のショ糖、及び15 g の L M T アガロースから構成された。オートクレーブ処理そして冷却後に、B A S T A (商標) を 6 m g / m l の終濃度まで加えた。

【0156】

C O V E 塩溶液は、1 リットルあたり、26 g の KCl 、26 g の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、76 g の KH_2PO_4 、50 ml の C O V E 微量元素から構成された。

【0157】

C O V E 微量元素溶液は、1 リットルあたり、0.004 g の $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、0.4 g の $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.2 g の $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.7 g の $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.8 g の $\text{Na}_2\text{MoO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、10 g の $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ から構成された。

【0158】

T r M M 培地は、20 ml の C O V E 塩溶液、0.6 g の CaCl_2 、6 g の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、30 g のショ糖、及び25 g の A g a r N o b l e から構成された。

【0159】

T r M M G は、20 ml の C O V E 塩溶液、0.6 g の CaCl_2 、6 g の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、25 g の A g a r N o b l e から構成され、オートクレーブ処理そして冷却後に、40 ml の 50 % グルコースを加えた。

【0160】

S T C は、0.8 M のソルビトール、2.5 m M の T r i s p H 8、及び5 m M の CaCl_2 から構成された。

【0161】

T r S T C は、1 M のソルビトール、10 m M の T r i s p H 8、及び10 m M の CaCl_2 から構成された。

【0162】

P E G は、50 % の P E G 4000、10 m M の T r i s p H 7.5、及び10 m M の CaCl_2 から構成された。

【0163】

S T C は、0.8 M のソルビトール、25 m M 又は50 m M の T r i s p H 8、及び50 m M の CaCl_2 から構成された。

【0164】

S P T C は、40 % のポリエチレングリコール4000、0.8 M のソルビトール、25 又は50 m M の T r i s p H 8、及び50 m M の CaCl_2 から構成された。

【0165】

S Y 50 培地 (p H 6.0) は、1 リットルあたり、50 g のショ糖、2.0 g の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10 g の KH_2PO_4 、2.0 g の K_2SO_4 、2.0 g のクエン酸、10 g の酵母抽出物、2.0 g の尿素、0.5 g の $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、及び5 ml の 200 × A M G 微量金属溶液 (ニッケル不含) から構成された。

【0166】

200 × A M G 微量金属溶液 (ニッケル不含) は、1 リットルあたり、3.0 g のクエン酸、14.3 g の $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.5 g の $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、13.8 g の $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、及び8.5 g の $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ から構成された。

【0167】

20 × S S C は、0.3 M のクエン酸ナトリウム p H 7 及び3 M の塩化ナトリウムか

10

20

30

40

50

ら構成された。

【0168】

DNA配列決定

DNA配列決定は、ABI PRIZM (登録商標) 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) でおこなった。

【0169】

実施例1：フサリウム・ベネナツム WTY 842 1 11 の5 フルオロ デオキシウリジン (FdU) に対する感受性試験

チミジンキナーゼ遺伝子 (tk) がネガティブ選択マーカーとして有用であるためには、真菌は、かなり高濃度のヌクレオシド類似体5 フルオロ デオキシウリジン (FdU) に対して非感受性でなければならない。フサリウム・ベネナツム WTY 842 1 11 の FdU に対する感受性の程度を確認するために、フサリウム・ベネナツム WTY 842 1 11 の1週齢の培養物を、-140 にて保存されていた10%のグリセロール・ストックから取り出した株のコロニー形成した寒天プラグを VNO₃RLMT プレート上に播種し、そして CheX All Instant Seal Sterilization Pouch (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 内で 26 ~ 28 にて7日間インキュベートすることによって調製した。7日後に、1週齢の培養物から、プラグを必要最小限以下で切り出し、6穴プレート内のさまざまな濃度の FdU (0 ~ 500 μM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を添加した VNO₃RLMT 培地上に面を下にして置いた。そのプレートを開口した ZIPLOC (登録商標) バッグ (S.C. Johnson Home Storage, Inc., Racine, WI, USA) 内で 26 ~ 28 にて14日間インキュベートし、その後、それぞれの FdU 濃度における増殖の程度を記録した。

【0170】

フサリウム・ベネナツム WTY 842 1 11 は、試験したすべての FdU 濃度において非感受性であることがわかったが、100 μm より高い濃度にて、50 μM 以下の濃度と比較して増殖がわずかに減少した。

【0171】

実施例2：プラスミド pJal574 の構築

プラスミド pDV8 (米国特許第 6806062 号明細書) は、アスペルギルス・ニデュランスのグリセルアルデヒド - 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (gpdA) プロモーターの 1.0 kb の XhoI / BglII 断片と、三機能性アスペルギルス・ニデュランスのインドールグリセロールリン酸シンターゼ、ホスホリボシルアントラニル酸イソメラーゼ、及びグルタミンアミドトランスフェラーゼ (trpC) 転写ターミネーターを保有する 1.8 kb の BamHI / HindIII 断片の間に挿入された 1.2 kb の BglII / BamHI 断片として単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ (HSV1 TK; tk) の遺伝子 (DNA 配列については配列番号 37 及び推定アミノ酸配列については配列番号 38) を保有する。プラスミド pDV8 を、BamHI で消化し、フェノール クロロホルム抽出し、エタノール沈殿し、次にクレノウポリメラーゼ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を使用して隙間を埋めた。消化したプラスミドを、製造業者のプロトコールに従って QUICK LIGATION (商標) Kit (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) を使用して再連結し、MINE LUTE (登録商標) Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) で処理し、そして得られた連結反応産物を製造業者の取扱説明書に従って TOPO (登録商標) Blunt Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用して PCR (登録商標) 4 Blunt TOPO (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 内にクローニングした。クローニング反応物を、製造業者の指示に従って ONE SHOT (登録商標) 化学的コンピテント TOP10 細胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 内に形質転換した。プラスミド DNA を、8つの得られた形質転換体から BIOROBOT (登録商標) 9600 (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) を使用して抽出し、そして XhoI / BamHI と XhoI / HindIII を使用した制限消化によってスクリーニングし

た。正しい制限消化パターンを有する2つの形質転換体からのプラスミドDNAのDNA配列決定で、両方とも所望の配列を保有していたことを確認した。一方をpJal504 [BamHI]と命名した(図1)。

【0172】

プラスミドpJal504 [BamHI]を、BglIIで消化し、フェノールクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿し、次にクレノウポリメラーゼを使用して隙間を埋めた。消化したプラスミドを、製造業者のプロトコールに従ってQUICK LIGATION (商標) Kitを使用して再連結し、MINELUTE (登録商標) Reaction Cleanup Kitで処理し、そして得られた連結反応物を製造業者の取扱説明書に従ってTOPO (登録商標) Blunt Cloning Kitを使用してpCR (登録商標) 4 Blunt TOPO (登録商標) 内にクローニングした。クローニング反応物を、製造業者の指示に従ってONE SHOT (登録商標) 化学的コンピテントTOP10細胞内に形質転換した。プラスミドDNAを、8つの得られた形質転換体からBIOROBOT (登録商標) 9600を使用して抽出し、そしてXhoI/BglIIとXhoI/HindIIIを使用した制限消化によってスクリーニングした。正しい制限消化パターンを有する2つの形質転換体からのプラスミドDNAのDNA配列決定で、両方とも所望の配列を保有していたことを確認した。一方をpJal504 [BglII] (図2)と命名した。Puntら(1990, Gene 3: 101-109)は、364bpのA.ニデュランスのgpdAプロモーターをプロモーターの強度に影響を与えることなく欠失できることを以前から示していた。これらの著者の観察に基づいて、以下に示したプライマー番号172450を、A.ニデュランスgpdAプロモーターを切り詰め、ベクターのサイズを削減するように設計した。

10

20

【0173】

【化1】

プライマー172450:

5'-

GACGAATTCTCTAGAAGATCTCTCGAGGAGCTCAAGCTTCTGTACAGTGACCGGTGACT

C-3' (配列番号1)

30

【0174】

下線を引いた配列は、gpdAプロモーター配列に相当する。残りの配列は、以下の制限部位: EcoRI、XbaI、BglII、XhoI、及びHindIIIを保有するハンドルである。

【0175】

アスペルギルス・ニデュランスtrpCターミネーターを切り詰めるために(再びベクターサイズを削減するために)、以下に示したプライマー番号172499を、EcoRIハンドルを保有するように設計した。

40

【0176】

【化2】

プライマー172499:

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

【0177】

50

下線を引いた配列は、trpCターミネーター配列に相当する。プライマー172499及び172450を使用した増幅で、364bpだけプロモーターを、及び239bpだけtrpCターミネーター配列を切り詰める。

【0178】

鋳型としてpJal504 [BglII]を使用し、上記の2つのプライマーを用いてPCRを実施して、切り詰めバージョンのA・ニデュランスgpdAプロモーター、HSV1 TK遺伝子のコード配列、及び切り詰めバージョンのA・ニデュランスtrpCターミネーターから構成された2.522kbの断片を製造した。

【0179】

増幅反応は、5µlの10×バッファー (Promega Corporation, Madison, WI, USA)、0.4µlの0.25mM dNTPs、1.25µlのプライマー172450 (100ng/µl)、1.25µlのプライマー172499 (100ng/µl)、0.5µlのpJal504 [BglII] (100ng/µl)、2µlのPfu DNAポリメラーゼ (Promega Corporation, Madison, WI, USA) (2.5U/µl)、及び39.6µlの滅菌蒸留水で構成された。増幅反応物を、95℃にて45秒間を1サイクル；そしてそれぞれ95℃にて45秒間、57℃にて45秒間、及び72℃にて5分間を28サイクルのためにプログラムしたROBOCYCLER (登録商標) (Stratagene, La Jolla, CA, USA)を使ってインキュベートした。最後の伸長を72℃にて10分間実施した。

10

【0180】

増幅反応物を、50mMのTris 50mMのホウ酸 1mMのEDTA二ナトリウム (TBE) バッファー中、低融点アガロースゲルを使用して1%アガロースゲル電気泳動にかけた。2522bpの断片をゲルから切り出し、そしてQIAQUICK (登録商標) Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)を使用して抽出した。そして、ゲルから精製したDNAを、製造業者の取扱説明書に従ってTOPO (登録商標) Blunt Cloning Kitを使用してPCR (登録商標) 4 Blunt TOPO (登録商標) に挿入した。クローニング反応物を、製造業者の指示に従ってONE SHOT (登録商標) 化学的コンピテントTOP10細胞内に形質転換した。プラスミドDNAを、8つの得られた形質転換体からBIOROBOT (登録商標) 9600を使用して抽出し、そしてEcoRI及びBglIIを使用した制限消化によってスクリーニングした。正しい制限消化パターンを有する2つの形質転換体からのプラスミドDNAのDNA配列決定で、両方とも所望の配列を保有していたことを確認した。一方をpJal574 (図3)と命名した。

20

30

【0181】

実施例3：プラスミドpWTY1449 02 01の構築

プラスミドpJal574を、製造業者の推奨するプロトコールに従ってコンピテントE・コリスCS110細胞 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 内に形質転換した。プラスミドDNAを、BIOROBOT (登録商標) 9600を使用して24個の得られた形質転換体から抽出し、次にEcoRI及びBglIIを使用する分析消化にかけた。続くDNA配列分析が正しい配列を持つクローンの識別をもたらし、そのクローンをpWTY1449 02 01 (図4)と命名した。

40

【0182】

実施例4：プラスミドpEJG61の構築

barcodeの方向を逆にした (すなわち、ヌクレオチド5901~5210がamdSプロモーターをコードし、ヌクレオチド5209~4661がbarcode配列をコードし、そしてヌクレオチド4660~4110がアスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ (AMG) ターミネーターをコードする) ことを除いて、プラスミドpEJG61 (図5)を、米国特許第7368271号明細書に記載のとおり構築した。

【0183】

実施例5：フサリウム・ベネナムWTY842 01 11の孢子とプロトプラスト

50

の製造

フサリウム・ベネナツム WTY 842 01 11 の孢子を製造するために、実施例 1 に記載の新鮮な寒天培養（約 1 週齢）から採取した 16 個の寒天プラグ（約 1 cm × 1 cm）を、2.8 L フェルンバッハフラスコ内の 500 ml の RA 培地中に植え付け、そして 150 rpm で振盪しながら 26.5 にて 24 時間インキュベートし、続けて 28.5 にてさらに 12 時間インキュベートした。次に培養物を、0.45 μm の濾紙を通してさせる 1 リットル用濾過ユニットの底部に入っている無菌のプラスチック製漏斗により無菌の MIRACLOTH（商標）（CalBiochem, San Diego, CA, USA）を通して濾過した。フィルターにより回収した孢子を、500 ml の滅菌蒸留水によって洗浄し、次に 10 ml の滅菌蒸留水中に再懸濁し、そして血球計を使用してカウントした。濃度を、 $2 \times 10^8 / \text{ml}$ に調整した。

10

【0184】

新たに産生された孢子を、それぞれ 1 ml の新しい孢子（ $2 \times 10^8 / \text{ml}$ ）を含む 100 ml の YPG_{5%} 培地の入った 4 つの 500 ml バッフル付き振盪フラスコの植え付けに使用した。振盪フラスコを、150 rpm で振盪しながら 23.5 にて 15 時間インキュベートしたが、これは発芽体が約 3 ~ 5 孢子長の長さになるまでの時間である。1 M の MgSO₄ 中、1 ml あたり 5 mg の NOVOZYME（商標）234（Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark）（濾過滅菌済み）20 ml を、無菌の 50 ml 試験管 8 本の中に等分した。次に、発芽体を、無菌の漏斗により無菌の MIRACLOTH（商標）を通して濾過し、そして無菌の 100 ml の滅菌蒸留水、続いて 100 ml の 1 M MgSO₄ で

20

すすいだ。無菌のスパチュラを使用して、すすいだ発芽体を、1 M の MgSO₄ 中、NOVOZYME（商標）234 が入った試験管内に緩やかにこすり落とし、そして緩やかに混合した。留具に挟んだ試験管を、それらの傍らにおいて 90 rpm で振盪しながら 29 にて最長 1 時間インキュベートした。30 ml の 1 M ソルビトールを、各試験管に加え、そしてその試験管を、Sorvall RT6000B スウィングバケット遠心分離機（Thermo-Fischer Scientific, Waltham, MA, USA）により室温（約 24 ~ 28）にて $377 \times g$ 、10 分間遠心分離した。上清をデカンテーションして捨てた後、ペレットを、1 ml の 1 M ソルビトール中に緩やかに再懸濁した。次に、30 ml の 1 M ソルビトールを加え、そして試験管を数回、緩やかに反転した。それらを、室温にて $377 \times g$ 、5 分間遠心分離し、そしてペレットを 1 ml の 1 M ソルビトール中に緩やかに再懸濁した。試験管の数回のゆるやかな反転の後に、30 ml の 1 M ソルビトールを加え、そして試験管を緩やかに混合した。この時点で、100 μl のアリコートを入れた EPPENDORF（登録商標）チューブに加えた。残りの懸濁液を、室温（約 24 ~ 28）にて $377 \times g$ 、5 分間遠心分離した。上清を取り除き、そしてペレットを、プロトプラストの終濃度が 1 ml あたり 5×10^7 となるように STC : SPTC : DMSO (9 : 1 : 0.1) 中に再懸濁した。プロトプラストを、同時形質転換のために速やかに使用した。

30

【0185】

実施例 6 : フサリウム・ベネナツム WTY 842 01 11 内への pEJG61 及び pWTY1449 01 02 の同時形質転換

40

2 ml の新たに製造したフサリウム・ベネナツム WTY 842 01 11 プロトプラスト（ $5 \times 10^7 / \text{ml}$ ）を、80 μl（それぞれ 40 μl）の体積の中にそれぞれ 50 μg の環状 pEJG61 及び pWTY1449 02 01 の入った 50 ml 無菌遠心分離管に加えた。プロトプラストと DNA を、緩やかに混合し、次に 30 分間氷上でインキュベートした。100 μl の SPTC をゆっくり加え、そして緩やかに混合した。試験管を室温（26）にて 10 分間インキュベートした。8 ml の SPTC をゆっくり加え、そして緩やかに攪拌することによって混合した。次に、試験管を室温（26）にて 10 分間インキュベートした。次に、反応物を、10 本の無菌の 50 ml 試験管に分けた（1 ml / 試験管）。次に、35 ml の VNO₃RLMT 培地（上部アガロース）を、1 本の

50

試験管に一度で加え、そして緩やかに3回反転することによって混合した。次に、それぞれの試験管の内容物を、1mlあたり12mgのBASTA(商標)を添加した35mlのVNO₃RLMT培地が入っている事前に注ぎ込んでおいたプレート上に注ぎ入れた。そのプレートをChexAll Instant Seal Sterilization Pouches内に3~4日間保存し、その後、ポリ袋に移してさらに7~8日間保存した。プレート上に生じたコロニーを、VNO₃RLMT BASTA(商標)プレート上で継代培養した。推定形質転換体を、フサリウム・ベネナムWTY1449 03 01~29と命名した。

【0186】

実施例7：BASTA(商標)耐性形質転換体の表現型分析

フサリウム・ベネナム形質転換体WTY1449 03 01~29を、3種類の追加培地上でスクリーニングした：(1)異なる濃度のFdU(0~500μM)を添加したVNO₃RLMT培地；(2)VNO₃RLMT BASTA(商標)；及び(3)VNO₃RLMT BASTA(商標) FdU(後者には0~500μmのFdUを添加した)。プレートを、開口したポリ袋内、周囲温度(約26℃)にて最長15日間インキュベートした。推定形質転換体の40パーセントが、(表現型上)同時形質転換体であり、すなわち、推定形質転換体の40パーセントが、VNO₃RLMT BASTA(商標)上で増殖できたが、異なる濃度のFdUを添加したVNO₃RLMT培地又は異なる濃度のFdUを添加したVNO₃RLMT BASTA(商標)培地では増殖できなかった。

【0187】

実施例8：推定bar+、tk+同時形質転換体の遺伝子型分析

5つの表現型上のbar+、tk+同時形質転換体(実施例7)について、4つの小プラグを、VNO₃RLMT+BASTA(商標)培地上で増殖した7日齢の(実施例1に記載の)培養物から切り取り、そして25mlのM400培地の入った125mlバフフル付き振盪フラスコ内に植え付けて、DNA抽出のためにバイオマスを製造した。振盪フラスコを、150rpmで振盪しながら28℃にて4日間インキュベートした。次に、バイオマスを、無菌のMIRACLOTH(商標)を通して集菌した。バイオマスを、200mlの滅菌蒸留水によって十分にすすぎ、手袋をはめた手で絞り、そして清潔で長いピンセットを使用して液体窒素中に浸した。凍ったバイオマスは、すぐに処理したか、又は無菌の50mlプラスチック試験管内で-80℃にて一時保存した。凍ったバイオマスを乳鉢と乳棒で粉砕した後に、ゲノムDNAを、最初の溶解薬インキュベーションを(製造業者によって示された10分間から)90分まで延長したことを除いて、製造業者の指示に従ってDNEASY(登録商標)Plant Maxi Kit(QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)を使用して抽出した。DNAを、NANODROP(登録商標)ND 1000分光光度計(Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, USA)を使用して定量化した。次に、8μgのDNAを含む各ストックからのアリコート、SPEEDVAC(登録商標)Concentrator(Thermo-Electron Corp., Waltham, MA, USA)を使用して濃縮乾固し、その後、60μlの10mM Tris pH 8.0をそれぞれのサンプルに加え、そして混合した。

【0188】

各株から8μgのDNAを、EcoRIで消化し、そして選択された株をさらにBamHIで消化した。EcoRI反応は、1×EcoRIバッファー、8μgのDNA、65単位のEcoRI、及び100μlの最終容量までの滅菌蒸留水で構成された。37℃にての10時間のインキュベーション後に、ローディングバッファー(40%のショ糖、5mMのEDTA、0.025%のブロムフェノールブルー、0.025%のキシレン・シアンール)を加え、そしてサンプルを4枚の1%アガロースゲルに添加し、それをTBEバッファー中、60ボルトにてにて5時間泳動した。BamHI制限消化は、1×NEBバッファー3(New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA)、8μgのDNA、65単位のBamHI、1mlあたり100μgのウシ血清アルブミン、及び100μlの最終容量までの滅菌蒸留水で構成された。37℃にて10時間のインキュベーション後に、

10

20

30

40

50

ローディングバッファーを加え、そしてサンプルを1%のアガロースゲル上に添加し、それをTBEバッファー中、60ボルトにて5時間泳動した。

【0189】

エチジウムブロマイド染色及び脱染に続いて、以下のとおりゲルからHYBOND(商標)Nナイロン膜(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)を使用して、サザンプロットを調製した。脱プリン反応を、緩やかに振盪しながら0.25NのHCl中、26にて10分間おこない、続いて滅菌蒸留水中、26にて5分間洗浄した。洗浄の後に、緩やかに振盪しながら、0.5NのNaOH/1.5MのNaClを使用して、26にて15分間(第1反応)そして20分間(第2反応)の2回の変性反応を続けた。もう1回の洗浄を、緩やかに振盪しながら滅菌蒸留水中、24~26にて2分間続けた。最後の洗浄の後に、緩やかに振盪しながら、1.5MのNaCl、0.5MのTris pH7.5、及び0.001MのEDTAを使用した24~26にてそれぞれ30分間の2回の中和反応を続けた。次に、膜をTURBO BLOTTER(商標)Kit(Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)を使用して、10×SSC中、24~26にて一晩プロットした。膜を、振盪しながら、2×SSC中、24~26にて5分間洗浄した。次に、膜を24~26にて10分間風乾し、(120mJ/cm²の総線量を発生する自動設定により)STRATALINKER(商標)(Stratagene, La Jolla, CA, USA)を使用してUV架橋し、そして最後に真空炉により80にて1時間焼成した。

【0190】

以下に示す、bar及びtk遺伝子特異的プローブを作り出すためのプライマーを、Vector NTI R(登録商標)ソフトウェア(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を使用して設計した。

bar 遺伝子順方向プライマー-996023番:

5' CGAGTGTAAACTGGGAGTTG 3' (配列番号3)

bar 遺伝子逆方向プライマー-996024番:

5' GAGCAAGCCCAAGATGAGAAC 3' (配列番号4)

tk 遺伝子順方向プライマー-998744番:

5' GCGGATTTGGTCGTAATCCAG 3' (配列番号5)

tk 遺伝子逆方向プライマー-998745番:

5' TCTTCGACCGCCATCCCATC 3' (配列番号6)

【0191】

bar及びtk遺伝子のDIG標識プローブを、製造業者のプロトコールに従ってPCR DIG Probe Synthesis Kit(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA)を使用して製造した。サイクル後に、反応物を、氷上に置き、微量遠心管でしばらく遠心分離し、次に1%のアガロースゲル上に添加した。TBEバッファー中での電気泳動後に、予測されるサイズのバンドを切り出し、そしてMINELUITE(登録商標)Gel Extraction Kitを使用してゲルから精製した。

【0192】

フィルターを、ガラスの試験管内、35mlのDIG Easy Hyb(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA)で42にて3時間、プレハイブリダイズし、その後、そのDIG Easy Hybを取り除き、(5分間煮沸し、その後氷上に置いた)10µlの標識プローブを加えた7.5mlの新しいDIG Easy Hybと置き換えた(すなわち、PCR反応から生じたゲルから精製したDNAの約30%を使用した)。ハイブリダイゼーションを、ハイブリダイゼーション・オープン内で42にて12時間実施した。5分間の2回のハイブリダイゼーション後洗浄を、2×SSC、0.1%のSDS中、室温して実施し、続いて15分間の2回の洗浄を0.2×SSC、0.1%のSDS中、65にて実施した。その後の洗浄及び検出を、製造業者により推奨されたとおり、DIG Wash and Block Set、抗ジゴキシゲニンAP Fab断片、及びCDP Star化学発光基質(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA)を使用して行った。表現型分析(実施例7)及びサザン分析(本実施例

)によって真の bar^+ 、 tk^+ 同時形質転換体であると確認されたフサリウム・ベネナツム株の1つを、フサリウム・ベネナツム WTY 1449 03 03 と命名した。

【0193】

実施例9：フサリウム・ベネナツム WTY 1449 03 03 bar^+ 、 tk^+ 同時形質転換体からの tk 遺伝子の取り除き

フサリウム・ベネナツム株 WTY 1449 03 03 の孢子形成を、RA + BASTA (商標) 培地中、実施例5に記載のとおり誘発した。続いて、孢子を、FdUを添加した培地上での増殖についてスクリーニングしたが、増殖には tk 遺伝子の欠失を引き起こさなくてはならない。この株の新しい培養物から切り出された4本のプラグを用いた25 mlのRA培地の植菌から、 1.06×10^8 の孢子を得た。この孢子ストックを、直径15 mmのFdU添加 VNO_3RLMT プレート及び無添加 VNO_3RLMT プレート(後者は生存率を評価するため)の両方に播種するための希釈系列を作製するのに使用した。孢子($100 \sim 1 \times 10^7$)を、複製したプレート上に広げ、そしてChexAll Instant Seal Sterilization Pouches内で約26にて5日間インキュベートした。

10

【0194】

(実施例8に記載の bar 及び tk プローブを使用した)サザン解析を、5つの選択されたコロニーに対して実施した。前記コロニーは、実施例7に記載の手法を用いて25 μ MのFdU上で継代培養したときでも増殖できた。その結果は、単一孢子単離物の5つすべてで tk 遺伝子が取り除かれていたことを明らかにした。1つの株を、フサリウム・ベネナツム WTY 1449 09 01 と命名した。

20

【0195】

実施例10：ウリジン添加が tk を保有する形質転換体のFdU感受性表現型を無効にすることの確認

$pyrG$ 欠失株における使用のための遺伝子欠失系を最適化するために、成長培地へのウリジンの添加が tk^+ 株のFdU感受性の機構を妨げるか否かを判定することは重要であった。前記 $pyrG$ 欠失株は生存のためにウリジン添加を必要とする。

【0196】

このために、 bar^+ 、 tk^+ 株のフサリウム・ベネナツム WTY 1449 03 03 を、(実施例1に記載のとおり) VNO_3RLMT BASTAプレート上で再生させ、実施例5に記載のとおり孢子を産生するように誘発した。集菌及び洗浄後に、孢子を、50 μ MのFdU及びさまざまな濃度(0.1 ~ 1 mM)のウリジンを含むFdU添加 VNO_3RLMT プレートに播種した(直径14 cmのプレートあたり50000個の孢子)。これらのプレートを、ChexAll Instant Seal Sterilization Pouches内、28にて6日間インキュベートし、その後、それらを増殖について評価した。

30

【0197】

ウリジンなしのFdU添加 VNO_3RLMT プレート上で増殖が観察されなかったが、 tk^+ 株の大きな増殖は、すべての濃度(0.1 ~ 1 mM)のウリジン及びFdU添加 VNO_3RLMT にて起こった。この状況では、FdU含有培地上で tk^- 株と tk^+ を区別するのは難しいか又は不可能である。その結果、FdU及びウリジン添加培地上で tk^+ と tk^- 株を識別することを可能にするであろういずれかの組み合わせが存在するのであれば、判定するためにウリジン及びFdU濃度を最適化する必要があった(実施例15及び16)。

40

【0198】

実施例11：pEmY21の作出

E. コリのハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ(hpt)遺伝子(DNA配列は配列番号7及び推定アミノ酸配列は配列番号8)を、プラスミドpPHTI (Cummins et al., 1999, Current Genetics 36: 371-382)から以下のプライマーを使用して増幅した：

50

【 0 1 9 9 】

【 化 3 】

順方向プライマー：

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

逆方向プライマー：

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

10

【 0 2 0 0 】

下線を引いた配列によって表される制限酵素部位 B s t B I (順方向プライマー) 及び E c o 4 7 I I I (逆方向プライマー) を、クローニングのためにプライマー内に設計した。

【 0 2 0 1 】

(h p t 遺伝子を増幅するための) P C R 反応を、100 μ l の全量中、1 × T h e r m o P o l バッファー (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA)、200 μ M の d N T P s、50 p m o l の順方向及び逆方向プライマー、100 p g の p P H T 1、1 単位の V e n t (登録商標) D N A ポリメラーゼ (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA)、及び滅菌蒸留水で構成された。増幅反応を、95 °C にて2分間を1サイクル；それぞれ95 °C にて1分間、51 °C にて1分間、及び72 °C にて2分間を25サイクル；そして72 °C にて7分間を1サイクルのためにプログラムした R O B O C Y C L E R (登録商標) を使用して実施した。

20

【 0 2 0 2 】

P C R 産物を、40 m M の T r i s 塩基 20 m M の酢酸ナトリウム 1 m M の E D T A 二ナトリウム (T A E) バッファー中での1%アガロースゲル電気泳動によって分離した。1.8 k b の断片を、ゲルから切り出して、そして Q I A Q U I C K (登録商標) G e l E x t r a c t i o n K i t を使用してアガロースから抽出した。次に、ゲルから精製断片を、T O P O (登録商標) B l u n t C l o n i n g K i t を使用して p C R (登録商標) B l u n t I I T O P O (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 内にクローニングした。得られたプラスミドを p E m Y 1 0 と命名した。

30

【 0 2 0 3 】

次に、E c o R I 部位を、以下に示したプライマーを使用して、製造業者の取扱説明書に従って Q U I K C H A N G E (登録商標) S i t e D i r e c t e d M u t a g e n e s i s K i t (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を使用して p E m Y 1 0 の h p t 遺伝子のコード配列から取り出した、ここで、小文字は標的 E c o R I 部位の非変異ヌクレオチドを表し、及び下線を引かれた文字は変異ヌクレオチドを表す。得られたプラスミドを p B K 3 と命名した。

【 0 2 0 4 】

40

【 化 4 】

順方向プライマー：

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

逆方向プライマー：

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

50

【0205】

E c o R I 部位を含まない得られた h p t 遺伝子を、以下に示した順方向及び逆方向プライマーを使用して p B K 3 から P C R 増幅した。

【0206】

【化5】

順方向プライマー：

5'-GGggtaccTTCATTTAAACGGCTTCAC-3' (配列番号13)

逆方向プライマー：

5'-GGggtaccCGACCAGCAGACGGCCC-3' (配列番号14)

10

【0207】

下線部分は、クローニング用の導入した K p n I 部位を表す。

【0208】

アスペルギルス・オリゼ p y r G 遺伝子の一部を、同方向の反復を作製するために使用し、そして以下のプライマーを使用して p S O 2 (W O 9 8 / 1 2 3 0 0) から P C R 増幅した：

20

【0209】

【化6】

反復1：

順方向プライマー：

5'-TCCcccggTCTCTGGTACTCTTCGATC-3' (配列番号15)

逆方向プライマー：

5'-GGggtaccCGACCAGCAGACGGCCC-3' (配列番号16)

30

反復2：

順方向プライマー：

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

逆方向プライマー：

5'-TCCcccggCGACCAGCAGACGGCCC-3' (配列番号18)

【0210】

下線部分は、クローニング用の導入した制限部位 S m a I (c c c g g g) 又は K p n I (g g t a c c) を表す。

40

【0211】

3つの断片 (h p t 、 反復番号1、及び反復番号2) を、1 x T h e r m o P o l バッファー、200 μ M の d N T P s 、 0 . 2 5 μ M の各プライマー、50 ng の鋳型DNA、及び1単位の V e n t (登録商標) DNA ポリメラーゼで構成された別々の反応 (それぞれ 5 0 μ l) で増幅した。増幅反応を、9 5 ° C にて2分間を1サイクル；それぞれ 9 5 ° C にて1分間、6 1 ° C にて1分間、及び 7 2 ° C にて2分間を30サイクル；そして 7 2 ° C にて7分間を1サイクルのためにプログラムした R O B O C Y C L E R (登録商標) を使用して実施した。

【0212】

50

PCR産物を、TAEバッファー中での1.5%アガロースゲル電気泳動によって分離した。約2 kbの増幅したhpt断片及び約0.2 kbの反復断片を、ゲルから切り出し、そしてMINELUITE (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。2つのpyrG反復断片を、KpnIで消化し、仔ウシ腸ホスファターゼ (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) で脱リン酸化し、そして製造業者の取扱説明書に従ってMINELUITE (登録商標) Reaction Cleanup Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) で処理した。次に、反復番号1及びhptを保有する断片を、QUICK LIGATION (商標) Kitを使用して一つに連結し、MINELUITE (登録商標) Reaction Cleanup Kitで処理し、そして製造業者の取扱説明書に従ってTOPO (登録商標) Blunt Cloning Kitを使用してpCR (登録商標) Blunt II TOPO (登録商標) 内にクローニングした。配列分析で、反復番号1及びhpt断片が一つに連結した1つのクローンを確認した。このプラスミドをpEmY18と命名した。

10

【0213】

第2反復をpEmY18内にクローニングするために、プラスミドpEmY18をEcoRVで消化し、そしてその消化物をTAEバッファー中での1%アガロースゲル電気泳動によって精製した。5.6 kbp断片を、ゲルから切り出し、そして、QIAQUICK (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。0.2 kbの反復2断片 (先に記載) と消化したpEmY18を、QUICK LIGATION (商標) Kitを使用して一つに連結した。連結混合物を、SOLOPACK (登録商標) Gold Supercompetent Cells (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を形質転換するのに使用した。配列分析で、3つの構成要素 (反復番号1、hpt、及び反復番号2) が所望の順序及び方向で存在し、且つ、PCRエラーのないプラスミドを同定した。得られたプラスミドをpEmY20と命名した。

20

【0214】

続くEcoRIでのpEmY20の消化が単一断片を遊離するのを確実にするために、製造業者の取扱説明書に従ってQUICK CHANGE (登録商標) Site Directed Mutagenesis Kit、並びに以下に示した順方向及び逆方向プライマーを使用して、EcoRI部位を移動した。得られたプラスミドを、配列検定後に、pEmY21 (図6) と命名した。

30

【0215】

順方向プライマー：

5' GGGTACCCCAAGGGCQTATTTCTGCAGATGGG 3' (配列番号19)

逆方向プライマー：

5' CCCATCTGCAGAATACGCCCTTGGGGTACCC 3' (配列番号20)

【0216】

実施例12：フサリウム・ベネナムのオロチジン5' - リン酸デカルボキシラーゼ (pyrG) 遺伝子を組み込んだゲノムDNA断片を保有するプラスミドpDM156.2の構築

40

ニューロスポラ・クラサのオロチジン5' - リン酸デカルボキシラーゼ (pyr4) 遺伝子 (DNA配列は配列番号21及び推定アミノ酸配列は配列番号22) のプローブを、以下に記載したプライマーを使用したPCR組み込みジゴキシゲニン標識デオキシウリジントリホスファターゼ (dUTP) によって調製した。

【0217】

プライマー (センス)：

5' GTCAGGAACAACGACAGCCACAC 3' (配列番号23)

プライマー (アンチセンス)：

5' AGGCAGCCCTTGGACGACAT 3' (配列番号24)

50

【0218】

プラスミド pFB6 (Buxton et al, 1983, Molecular and General Genetics 190: 403-405) を HindIII で消化し、そしてその消化物を、TAEバッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動によって精製した。1.1 kbのpyr4断片を切り出し、そして製造業者の示したプロトコールに従ってQIAQUICK (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。

【0219】

増幅反応 (50 µl) は、1 × Taq DNAポリメラーゼ・バッファー (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA)、5 µlのPCR DIG Labeling Mix (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)、10 ngの1.1 kb HindIII pyr4断片、10 pmolのセンス・プライマー、10 pmolのアンチセンス・プライマー、及び1単位のTaq DNAポリメラーゼ (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) で構成された。反応を、95 にて3分間を1サイクル、続いてそれぞれ95 にて30秒間、55 にて1分間、及び72 にて1分間を35サイクルのためにプログラムしたROBOCYCLER (登録商標) を使ってインキュベートした。最後の伸長を、72 にて5分間実施した。

10

【0220】

増幅反応産物を、TAEバッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動によって精製した。約0.78 kbのジゴキシゲニン (DIG) 標識プローブを、ゲルから切り出し、そしてQIAQUICK (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。

20

【0221】

フサリウム・ベネナム株 A3/5 の染色体DNAライブラリーを作製し、そしてWO 99/60137 に記載のラムダ・ベクターEMBL4内にクローニングした。

【0222】

DIG標識プローブを、ラムダ・ベクターEMBL4内にクローニングしたフサリウム・ベネナム A3/5 DNAのゲノムライブラリーをスクリーニングするために使用した。ファージを、E. コリ K802 細胞 (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) と共にNZY上部アガロースを含むLBプレート上で平板培養した。ブランク・リフトを、Sambrookらの技術 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition; J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatis; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) を使用してHYBOND (商標) Nナイロン膜に対しておこなった。DNAを、UV STRATALINKER (商標) を使用したUV架橋によって膜に結合させた。次に、フィルターに、0.78 kbのDIG標識N. クラサpyr4プローブをハイブリダイズさせた。pyrGクローンのハイブリダイゼーション及び検出を、GENIUS (商標) System User's Guide (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) に従って、5 × SSC、35%のホルムアミド、0.1%のL ラウロイルサルコシン、0.02%のSDS、及び1%のブロック試薬 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) で構成されたハイブリダイゼーション溶液を用いて42 にて実施した。使用されるDIG標識プローブの濃度は、ハイブリダイゼーション溶液1 mlあたり2.5 ngであった。ハイブリダイズしているDNAを、アルカリホスファターゼ複合抗ジゴキシゲニン抗体 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を用いて免疫学的に検出し、Lumiphos 530、化学発光基質 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を用いて可視化した。DNA調製物を、Lambda Midi Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) を使用して推定ポジティブラムダ・クローンから作製した。

30

40

【0223】

先に同定したクローンからのラムダDNAを、EcoRIで消化し、そしてTAEバッファー中での1%アガロースゲル電気泳動にかけた。3.9 kbの断片を切り出し、そしてQIAEX Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) を使用してアガロースから抽出した。次に、その断片を、pUC118 (Viera and Me

50

ssing, 1987, Methods in Enzymology 153: 3-11) の E c o R I 部位内にクローニングし、そして O N E S H O T (登録商標) T O P 1 0 コンピテント細胞を、2 μ l のクローニング反応物で形質転換した。8つの得られた形質転換体からのプラスミドDNAを、DNA配列決定で分析した。所望の配列を有する1つのクローンを選択し、そして p D M 1 5 6 . 2 (図7) と命名した。p y r G 断片は、コード領域全体に加えて、1 . 3 k b のプロモーター及び1 . 5 k b のターミネーターを保有していた。

【0224】

実施例13：フサリウム・ベネナツム p y r G 欠失ベクター p E m Y 2 3 の作出

フサリウム・ベネナツム p y r G コード配列 (2678bp、DNA配列は配列番号51、及び推定アミノ酸配列は配列番号52) を、E c o R V 及び S t u I での消化によって p D M 1 5 6 . 2 (実施例12) から切り出し、そして、4398bpの残ったベクターを、製造業者の指示に従って Q I A Q U I C K (登録商標) G e l E x t r a c t i o n K i t を使用してゲルから精製した。p E m Y 2 1 の S m a I 断片を単離し、そして、Q I A Q U I C K (登録商標) G e l E x t r a c t i o n K i t を使用してゲルから精製し、そして2つのゲルから精製した断片を、製造業者の取扱説明書に従って Q U I C K L I G A T I O N (商標) を使用して一つに連結し、そして M I N E L U T E (登録商標) R e a c t i o n C l e a n u p K i t を用いて処理し、そして2 μ l の得られた連結反応物を、製造業者の指示に従って O N E S H O T (登録商標) 化学的コンピテント T O P 1 0 細胞の形質転換に使用した。

【0225】

プラスミドDNAを、B I O R O B O T (登録商標) 9600を使用して8つの得られた形質転換体から抽出した。これらのDNAを挿入方向についてスクリーニングし、エラーの不存在について配列決定し、そして正しい挿入配列を持つ1つのクローンを選択し、p E m Y 2 3 (図8) と命名した。

【0226】

実施例14：p y r G 欠失株 E m Y 1 1 5 4 4 6 4 . 3 の作出

プラスミド p E m Y 2 3 を、E c o R I 及び X m n I で消化し、そして3 . 6 k b のDNA断片を単離するために T A E バッファリング中での1%アガロースゲル電気泳動にかけた。3 . 6 k b の断片を、製造業者の指示に従って Q I A Q U I C K (登録商標) G e l E x t r a c t i o n K i t を使用してゲルから精製し、そして以下の2つの相違点を除き、実施例6に記載のとおりフサリウム・ベネナツム W T Y 8 4 2 1 1 1 のプロトプラストの形質転換に使用した：第1に、1タイプの形質転換DNAだけを使用した(3 . 6 k b の E c o R I X m n I 消化 p E m Y 2 3 断片)；及び、第2に、形質転換体を、1mMのウリジン及び1mlあたり0 . 125mgのハイグロマイシンB (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) を添加した V N O ₃ R L M T 上で選択し、10個の形質転換体を、25mlの無添加 M 4 0 0 液体培地中、さらに V N O ₃ R L M T + 1mMのウリジン(増殖に関するポジティブ対照)、V N O ₃ R L M T + 1mMのウリジン+1mlあたり0 . 125mgのハイグロマイシンB(形質転換に関するポジティブ対照)、無添加 V N O ₃ R L M T (p y r G 欠失に関するスクリーン)による表現型スクリーンによるスクリーニングのために選択した。ウリジン原栄養性の候補は、液体培地により3日以内に、そしてプレート・ベースの表現型スクリーンによって7日以内に同定できた。更なるスクリーニング及び孢子精製のために選ばれた候補の1つを E m Y 1 1 5 4 4 6 4 と命名した。(寒天培地が10mMのウリジンを添加した V N O ₃ R L M T であったことを除いて、実施例21に記載のとおり得られた)この株から得られた孢子精製した単離物を、先に記載したものと同じスクリーニング・プロトコールにかけ、そして2つの単一孢子単離物を、親株との比較のためのサザンハイブリダイゼーション分析のために選択した。これらの孢子精製した株を、フサリウム・ベネナツム E m Y 1 1 5 4 4 6 4 . 3 及び E m Y 1 1 5 4 4 6 4 . 5 と命名した。

【0227】

p y r G の存在及び h p t の不存在のためのフサリウム・ベネナツム W T Y 8 4 2 1

11 (対照株)、つまり、一次形質転換体フサリウム・ベネナツム EmY 1154 464、及び単一孢子単離体フサリウム・ベネナツム EmY 1154 464.3と EmY 1154 464.5から、ゲノムDNAを実施例8に記載の通りに調製した。各株からの8µgのDNAを、StuI及びMfeIで消化した。StuI反応は、1×NEBバッファー2 (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA)、8µgのDNA、65単位のStuI、及び100µlの全量までの滅菌蒸留水で構成された。37にて10時間のインキュベーション後に、ローディングバッファー(40%のショ糖、5mMのEDTA、0.025%のブロムフェノールブルー、0.025%のキシレン・シアノール)を加え、そしてサンプルを2枚の1%アガロースゲルに添加し、そしてそれをTBEバッファー中、60ボルトにて5時間泳動した。MfeI制限消化は、1×NEBバッ

10

20

30

40

50

【0228】

エチジウムブロマイド染色及び脱染に続いて、サザンプロットを以下のとおりHYBOND (商標) Nナイロン膜を使用してゲルから調製した。脱プリン反応を、緩やかに振盪しながら0.25NのHCl中、26にて10分間おこない、続いて滅菌蒸留水中、26にて5分間洗浄した。洗浄の後に、緩やかに振盪しながら0.5NのNaOH/1.5MのNaClを使用した26にて15分間(第1反応)及び20分間(第2反応)の2回の変性反応が続いた。もう一回の洗浄を、緩やかに振盪しながら滅菌蒸留水中、26にて2分間続けた。最後の洗浄後に、それぞれ緩やかに振盪しながら1.5MのNaCl、0.5MのTris pH7.5、及び0.001MのEDTAを使用した26にて30分間の2回の中和反応が続いた。次に、TURBO BLOTTER (商標) Kitを使用して、10×SSC中、26にて一晚、膜をプロットした。振盪しながら2×SSC中、26にて5分間、膜を洗浄した。次に、膜を、26にて10分間風乾し、(120mJ/cm²の総線量を発生する自動設定により)STRATALINKER (商標)を使用してUV架橋し、そして最後に真空炉内で80にて1時間焼成した。

【0229】

以下に示すpyrG及びhpt遺伝子特異的プローブを製造するためのプライマーを、Vector NTIRソフトウェア (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用して設計した。

【0230】

フサリウム・ベネナツム pyrG 順方向プライマー:

5' GCCATGCGATCCAGCGTTTGAATCC 3' (配列番号25)

フサリウム・ベネナツム pyrG 順方向プライマー:

5' GCGTCCGCAACTGACGATGGTCCCTC 3' (配列番号26)

E. コリ hpt 順方向プライマー:

5' CAGATACCACAGACGGCAAGC 3' (配列番号27)

E. コリ hpt 逆方向プライマー:

5' GGGCAGTTCGGTTTCAGG 3' (配列番号28)

【0231】

pyrG及びhpt遺伝子のDIG標識プローブを、製造業者のプロトコールに従ってPCR DIG Probe Synthesis Kitを使用して製造した。サイクル後に、反応物を、氷上に置き、微量遠心管でしばらく遠心分離し、次に1%アガロースゲル上に添加した。TBEバッファー中での電気泳動後に、予測されるサイズのバンドを、切り出し、そしてMINEUTE (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してゲルから精製した。フィルターを、ガラスの試験管内、35mlのDIG Easy Hyb中で42にて3時間プレハイブリダイズし、その後、そのEasy Hybを取り除き、(5分間煮沸し、その後氷上に置いた)10µlの標識プローブ(PCR反

応からのゲルから精製したDNAの約30%)を加えた7.5mlの新しいDIG Easy Hybと置き換えた。ハイブリダイゼーションを、ハイブリダイゼーション・オープン内で42℃にて12時間実施した。5分間の2回のハイブリダイゼーション後洗浄を、 $2 \times SSC$ 、0.1%のSDS中、室温して実施し、続いて15分間の2回の洗浄を $0.2 \times SSC$ 、0.1%のSDS中、65℃にて実施した。その後の洗浄及び検出を、製造業者により推奨されたとおり、DIG Wash and Block Set、抗ジゴキシゲニンAP Fab断片、及びCDP-Star化学発光基質を使用して行った。

【0232】

サザンハイブリダイゼーションの結果は、フサリウム・ベネナツムEmY1154464、及びその2つの単一孢子単離体EmY1154464.3及びEmY1154464.5がpyrG欠失事象を維持し、且つ、hpt遺伝子を保有していたことを明らかにした。

10

【0233】

実施例15：ウリジン及びFdU添加培地上でのpyrG欠失フサリウム・ベネナツム株EmY1154464.3の孢子の発芽効率

ウリジン及びFdU添加培地上でのpyrG欠失フサリウム・ベネナツム株EmY1154464.3からの孢子の発芽効率を試験した。フサリウム・ベネナツムEmY1154464.3の孢子を、10mMのウリジンを添加したRA培地を使用して実施例5に記載の通りに製造した。200 μ lの体積中の50個の孢子を、0、25、又は50 μ MのFdU及び0、0.01、0.05、0.1、又は0.25mMのウリジンを添加した45枚のVNO₃RLMTプレート(直径14cm)にそれぞれ等分した。FdU及びウリジンのそれぞれの組み合わせの三重反復のプレートを準備し、そしてHex All Instant Seal Sterilization Pouches内、26℃にて10日間インキュベートした。

20

【0234】

0.01mMのウリジン濃度において、フサリウム・ベネナツムEmY1154464.3の孢子は、25又は50 μ MのFdUの存在下で発芽できなかったが、その一方で、それらは、同じ培地上のFdU不存在下では容易に発芽した。しかしながら、0.1mMのウリジン濃度において、pyrG欠失株の孢子は、(FdU不存在下、75%の頻度と比べて)25及び50 μ MのFdUの存在下で約50%の頻度で発芽できた。

30

【0235】

実施例16：

低ウリジン濃度におけるFdU添加最少培地上でのtk+株とtk-株の区別

非常に低いウリジン濃度が、tk+株においてFdUに対する耐性を与えるか否かについて判定するために、再構築実験を実施した。tk+株のフサリウム・ベネナツムWTY144933とtk-株のフサリウム・ベネナツムのWTY144991を使用した。それぞれの株の孢子を誘発し、そしてプレートあたり50個の孢子(フサリウム・ベネナツムWTY144991)又は直径14cmのプレートあたり50000個の孢子(フサリウム・ベネナツムWTY144933)を播種した。加えて、WTY144933とWTY144991孢子、それぞれ50個と50000個の組み合わせを混合し、そして播種した。すべてのプレートには、50 μ MのFdUを添加したVNO₃RLMTを入れた。プレート内のウリジン濃度は、1、0.5、0.25、又は0.1mMであった。各処置を、三重反復試験で実施した。

40

【0236】

tk+株は、それが増殖しなかったウリジンを欠く培地を除いて、すべてのプレート上で一定の曇りとして増殖した。tk-株は、ウリジンのすべての濃度において、及びウリジンを欠く培地上で良好に増殖した。混合プレート上では、結果は、tk+とtk-株の純粋なプレートの結果を組み合わせたものであった。それぞれのウリジン含有プレートにおいて、異なるtk-コロニーが、tk+株の曇った背景にある増殖の上に重ねられた。

【0237】

50

t k + と t k - 胞子が混合物を播種したプレート上に現れたコロニーを、50 μM の F d U (ウリジンなし) を添加した V N O₃ R L M T 培地の新しいプレートに継代培養した。同数のサンプルをさらに、背景にあった増殖 (混合プレート 1 枚あたり 3 つのコロニー) から V N O₃ R L M T + 50 μM の F d U (ウリジンなし) に継代培養した。加えて、コロニーと背景にある増殖を、純粋な t k - プレートと純粋な t k + プレートから V N O₃ R L M T + 50 μM の F d U (ウリジンなし) のプレートに継代培養した。(1) 混合プレート上の背景にある増殖 (推定 F d U 感受性、t k + 株) が、ウリジン不存在下、予想される表現型 (F d U に対する感受性) を続けて表すか否か ; 及び (2) 推定 F d U 耐性、t k コロニーが、これらの条件下で普通に増殖するか否か、を評価するために、これを行った。インキュベーション後に、t k + 株が 50 μM の F d U 存在下、ウリジン欠乏培地上で全く増殖できなかったが、その一方で、t k - 株が 50 μM の F d U の存在下ウリジン欠乏培地上で正常に増殖することが明らかになった。t k + の背景にある曇りが、ウリジンを含む混合プレート上で増殖したにもかかわらず、t k - 株が容易に区別でき、そして主張した二重選択技術が必要とされている場合に、t k + 株が混入している危険性なしに 0.1 mM のウリジンを添加した F d U 含有培地からウリジン不含培地に容易に継代培養できた。

10

20

30

40

50

【0238】

(ウリジンの添加が F d U の阻害作用を無効にすると公表した記載、例えば Sachs et al., 1997, Nucleic Acids Research 25: 2389-2395 とは逆に) t k 遺伝子が、ウリジン添加増殖条件下、ネガティブ選択マーカーとしてうまく利用できるという結果を実証した。

【0239】

実施例 17 : プラスミド p W T Y 1 4 7 0 1 9 0 7 の構築

(フサリウム・ベネナムのトリコジエンシンターゼ (t r i 5) 遺伝子 (DNA 配列については配列番号 29 及び推定アミノ酸配列については配列番号 30) の 5' 及び 3' フランキング配列を保有する) プラスミド p J R o y 4 0 (米国特許第 7 3 3 2 3 4 1 号明細書) を、5' t r i 5 遺伝子フランキング配列の一部の増幅のための鋳型として使用した。PCR 反応には、50 μl の最終容量中、200 μM の d N T P s、1 × T a q D N A ポリメラーゼ・バッファー、125 pg の p J R o y 4 0 D N A、50 pmol の以下に示すそれぞれのプライマー、及び 1 単位の T a q D N A ポリメラーゼが含まれた。

【0240】

【化 7】

順方向プライマー :

5'-GGGAGATCITCGTTATCTGTGCC-3' (配列番号31)

逆方向プライマー :

5'-GGGAGATCITTAGTAGTCGGCATTGAAAC-3' (配列番号32)

(下線を引かれたヌクレオチドは、導入された BgI I I 部位を表している)

【0241】

増幅反応を、95 にて 3 分間を 1 サイクル ; それぞれ 95 にて 30 秒間、52 にて 45 秒間、及び 72 にて 2 分間を 10 サイクル ; それぞれ 95 にて 30 秒間、52 にて 45 秒間、及び 72 にて 5 分間を 20 サイクル ; 72 にて 7 分間を 1 サイクルのためにプログラムした R O B O C Y C L E R (登録商標) を使ってインキュベートした。

【0242】

PCR 産物を、T B E バッファーを使用した 1.5% アガロースゲル電気泳動によって分離した。約 600 bp の断片を、ゲルから切り出し、そして M I N E L U T E (登録商標) G e l E x t r a c t i o n K i t を使用してアガロースから抽出した。断片を、

TOPO (登録商標) TAクローニングKit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用してpCR (登録商標) 2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 内に挿入し、そしてONE SHOT (登録商標) TOP10コンピテント細胞を2 μ lのクローニング反応物で形質転換した。8つの得られた形質転換体からのプラスミドDNAを、EcoRI及びBglIIで別々の反応で消化し、そして、正しい制限消化パターンを有する3つの形質転換体の挿入物を、DNA配列決定によって確認した。所望の配列を持つ1つのクローンを選択し、そしてpWTY1470 09 05と命名した。

【0243】

tr i 5 遺伝子の5'反復を保有する608bpのBglII断片を、BglIIで消化し、TBEバッファーを使用した1.0%アガロースゲル電気泳動によって精製し、ゲルから切り出し、そしてMINE LUTE (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出することによってpWTY1470 09 05から遊離させた。

10

【0244】

プラスミドpJRoy40を、BglIIを用いた消化によって線状化し、その後、製造業者の取扱説明書に従ってシュリンプ・アルカリホスファターゼ (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) を使用して脱リン酸化し、そしてQIAQUICK (登録商標) PCR Purification Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) を使用して精製した。線状化したpJRoy40及びゲルから精製したBglII断片を、製造業者の取扱説明書に従ってT4 DNAリガーゼ (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) を使用して一つに連結した。E. coli SURE (登録商標) 化学的コンピテント細胞 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) の形質転換を、製造業者の指示に従って実施した。1つの形質転換体が、所望のベクターを含むこと、すなわち、tr i 5 の5'及び3'フランキンク配列、それに加えて5'フランキンク配列の一部の反復を保有していることをDNA配列決定によって確認した。得られたプラスミドを、pWTY1470 19 07 (図9) と命名した。

20

【0245】

実施例18：プラスミドpWTY1515 02 01の構築

プラスミドpWTY1470 19 07を、製造業者の取扱説明書に従ってQUICK CHANGE (登録商標) Site Directed Mutagenesis Kitを使用して、且つ、以下に示した順方向及び逆方向プライマーを使用して試験管内突然変異誘発にかけた。

30

【0246】

順方向プライマー：

5' CAAGTAAACAGACGCGACAGCTTGCAAAATCTTCGTT
ATCTGTG 3' (配列番号33)

逆方向プライマー：

5' CACAGATAACGAAGATTTTGCAAGCTGTCTGCGTCTG
TTACTTG 3' (配列番号34)

【0247】

突然変異誘発は、1779bpのBglII部位を取り去り、そして独特で、且つ、チミジンキナーゼ (tk) 及びハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ (hpt) 遺伝子カセットを保有する断片を挿入するためのその後の操作で使用可能な2386bpのBglII部位を提供した。突然変異誘発反応を、製造業者の示したプロトコールに従って、キットで供給されたE. コリXL10 GOLD (登録商標) Ultracompetent細胞 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を形質転換するのに使用した。

40

【0248】

配列分析によって確認される先に示した突然変異を保有する1つの形質転換体を、pWTY1515 02 01 (図10) と命名し、そして実施例19の骨格として使用した。

50

【0249】

実施例19：tri5欠失ベクターpJfyS1579 21 16の製造

E. コリ・ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ (hpt) 遺伝子カセットを、ADVANTAGE (登録商標) GC Genomic PCR Kit (Clonetechnology, Palo Alto, CA, USA)、並びに以下に示した遺伝子特異的な順方向及び逆方向プライマーを使用してプラスミドpEmY23からPCR増幅した。逆方向プライマーの下線部分は、クローニングのためのBglII部位である。

【0250】

【化8】

順方向プライマー：

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

逆方向プライマー：

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

【0251】

PCR反応は、50 µlの最終容量中、DNA鋳型として362 ngのpEmY23、200 µMのdNTP、1.1 mMの酢酸マグネシウム、0.4 µMのプライマー、1 × GC Reactionバッファー (Clonetechnology, Palo Alto, CA, USA)、0.5 MのGC Melting (Clonetechnology, Palo Alto, CA, USA)、及び1 × GC Genomic Polymerase Mix (Clonetechnology, Palo Alto, CA, USA)を含んでいた。

【0252】

増幅反応物を、95 °Cにて2分間を1サイクル；それぞれ94 °Cにて30秒間及び66 °Cにて3分間を25サイクル；そして66 °Cにて3分間を1サイクル；そして4 °Cにて保持のためにプログラムしたEPENDORF (登録商標) MASTER CYCLER (登録商標) (Eppendorf, Munich, Germany)を使ってインキュベートした。

【0253】

PCR産物を、TAEバッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動によって分離した。約1.9 kbの断片を、ゲルから切り出し、そしてMINIELUTE (登録商標) Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)を使用してアガロースから抽出した。その断片を、製造業者の取扱説明書に従ってTOPPO (登録商標) TA Cloning Kitを使用してPCR (登録商標) 2.1内にクローニングした。ONE SHOT (登録商標) TOP10コンピテント細胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を、2 µlのTOPPO (登録商標) TA反応物で形質転換した。8つの形質転換体からのプラスミドDNAの配列分析では、予想した配列からの逸脱が全くなかったことを確認し、そしてそのプラスミドをpJfyS1540 75 5 (図11)と命名した。

【0254】

hpt挿入物を、BamHI及びBglIIでの消化によってpJfyS1540 75 05から遊離させ、そしてTAEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動によって精製した。1.9 kbの断片を、切り出し、そしてMINIELUTE (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。Rapid DNA Ligation Kitを、空のBglII線状化tri5欠失ベクターpWTY1515 02 01 (実施例18)に前記断片を連結するのに使用したが、前記ベクターは仔ウシ腸ホスファターゼを使用して脱リン酸化しておいた。E. coli SURE (登録商標) 化学的コンピテント細胞を連結反応物で形質転換し、そして24の得られた形質転換体からのプラスミドDNAを、EcoRIを用いた制限消化によって分析して挿

10

20

30

40

50

入物の方向を確認した。所望の方向で挿入物を保有する形質転換体の1つを選択し、そして p J f y S 1 5 7 9 1 1 3 (図 1 2) と命名した。

【 0 2 5 5 】

鋳型として p W T Y 1 4 4 9 2 1 を使用し、さらに以下に示した遺伝子特異的順方向及び逆方向プライマーを使用して、単純ヘルペスウイルスのスチミジンキナーゼ (t k) 遺伝子 (D N A 配列については配列番号 3 7 及び推定アミノ酸配列については配列番号 3 8) を P C R 増幅した。太字の配列は、導入された B g l I I I 部位を表す。

【 0 2 5 6 】

【 化 9 】

10

順方向プライマー：

5'-GCCGACTACTAGATCGACCGGTGACTCTTTCTGGCATGCG-3' (配列番号39)

逆方向プライマー：

5'-CAGATAACGAAGATCTGAGAGTTCAAGGAAGAAACAGTGC-3' (配列番号40)

【 0 2 5 7 】

P C R 反応には、50 μ l の最終容量中、1 × H E R C U L A S E (登録商標) 反応バッファー (Stratagene, La Jolla, CA, USA)、200 μ M の d N T P s、55 n g の p W T Y 1 4 4 9 2 1、0.2 μ M のプライマー、2% の D M S O、及び 2.5 単位の H E R C U L A S E (登録商標) D N A ポリメラーゼ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) が含まれた。

20

【 0 2 5 8 】

増幅反応物を、95 にて1分間を1サイクル；それぞれ94 にて30秒間、60 にて30秒間、及びの68 にて2分45秒間を25サイクル；そして68 にて2分45秒間を1サイクル；そして4 にて保持のためにプログラムした E P P E N D O R F (登録商標) M A S T E R C Y C L E R (登録商標) を使ってインキュベートした。

【 0 2 5 9 】

P C R 産物を、T A E バッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動によって分離した。約 2.8 k b の断片を、ゲルから切り出し、そして M I N I E L U T E (登録商標) G e l E x t r a c t i o n K i t を使用して精製した。その断片を、T O P O (登録商標) T A C l o n i n g K i t を使用して p C R (登録商標) 2.1 内にクローニングした。O N E S H O T (登録商標) T O P 1 0 コンピテント細胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を、2 μ l の T O P O (登録商標) T A 反応物で形質転換した。形質転換体の1つからのプラスミド D N A の配列分析では、グリシンからアラニンへのアミノ酸変化をもたらす t k コード配列内の突然変異 (C 1 6 2 1 G) を同定した。この突然変異を、製造業者の取扱説明書に従って Q U I K C H A N G E (登録商標) I I X L S i t e D i r e c t e d M u t a g e n e s i s K i t (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を使用して、さらに以下に示した順方向及び逆方向プライマーを使用して補正した。小文字は所望の変化を示す。16個のクローンの配列分析が、p J f y S 1 5 7 9 8 6 (図 1 3) と命名したものの選択をもたらした。

30

40

【 0 2 6 0 】

順方向プライマー：

5' C C C T G T T T C G G G g C C C C G A G T T G C T G G 3' (配列番号 4 1)

逆方向プライマー：

5' C C A G C A A C T C G G G G c C C C G A A A C A G G G 3' (配列番号 4 2)

50

【0261】

プラスミド pJfyS1579 08 06 を、BamHI 及び BglII で消化して 2.8 kb の tk 断片を遊離し、そしてその断片を先に記載した通りに精製した。この断片を、BglII で線状化し、そして仔ウシ腸ホスファターゼによって処理しておいた pJfyS1579 1 13 に QUICK LIGATION (商標) Kit を使用して連結し、そして製造業者のプロトコールに従って E. coli SURE (登録商標) 化学的コンピテント細胞を形質転換するのに使用した。得られたプラスミドを、pJfyS1579 21 16 (図14) と命名し、そして tri5 欠失カセットとして使用した。

【0262】

実施例 20 : フサリウム・ベネナムの形質転換手法

以下の実施例に記載したそれぞれの欠失カセット 100 µg を、BstZ171 / BamHI (実施例 21) 又は NotI (実施例 24、26、37、及び 39) のいずれかで消化した。それぞれの消化反応物を TAE バッファー中、1% アガロースゲル電気泳動によって精製し、そして DNA バンドを QIAQUICK (登録商標) Gel Extracti on Kit を使用して抽出した。得られた精製 DNA を、10% 反応容量の 3M 酢酸ナトリウム pH 5 の添加と、それに続く 2.5 倍量の氷冷エタノール (94%) の添加、そして氷上で 20 分間のインキュベーションによるエタノール沈殿によって 1.5 ml 微量遠心管内で濃縮した。次に、その管を、EPPENDORF (登録商標) 5424 ベンチトップ遠心分離機 (Eppendorf, Hamburg, Germany) を使って 15000 × g にて 10 分間遠心分離した。上清を捨て、そしてペレットを、1 ml の氷冷 70% エタノールで洗浄し、そして 15000 × g にて 5 分間遠心分離した。上清を捨て、そしてペレットを風乾させた。次に、ペレットを、70 µl の 10 mM Tris pH 8 バッファー中に再懸濁した。得られた DNA 含有溶液の濃度を、NANODROP (登録商標) 1000 分光光度計 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) を使用して測定した。

【0263】

適当な受容株のプロトプラストを、以下の方法で製造した。VNO₃RLMT 培地を含む 7 日齢の培養物の 15 × 1 cm² の寒天プラグを、2.8 L フェルンバツハフラスコ内、500 ml の RA 培地 (実施例 21) 又は 10 mM のウリジンを添加した RA 培地 (実施例 24、26、37、及び 39) に植菌し、そしてそのフラスコを 150 rpm で振盪しながら 28 にて 36 時間インキュベートすることによって、最初に孢子を得た。孢子培養物を、無菌の MIRACLOTH (商標) を通して濾過し、そして孢子を MILLIPORE (登録商標) STERICUP (登録商標) 0.2 µm フィルターユニット (Millipore, Bellerica, MA, USA) 上に捕捉した。その孢子を、200 ml の無菌のガラス蒸留水によって洗浄し、そして 10 ml の無菌のガラス蒸留水中に再懸濁した。

【0264】

1 ml の孢子溶液を、5% のグルコースを添加した 100 ml の YP 培地 (実施例 21) 又は 5% のグルコースと 10 mM のウリジンを添加した YP 培地 (実施例 24、26、37、及び 39) の植菌のために使用した。植菌した培地を、150 rpm で振盪しながら 17 にて 16 時間インキュベートした。培養物を、MIRACLOTH (商標) を通して濾過して菌糸を回収し、そしてそれを、無菌のスパチュラを使用して 50 ml のポリプロピレン管に移した。菌糸を、20 ml のプロトプラスト化溶液 (1 ml あたり 1 M MgSO₄ 中、1 ml あたり 5 mg の NOVOSYME (商標) 234 及び 5 mg の GLUCANEX (商標) (ともに Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark 製) を含む) 中に再懸濁し、そしてそれを 50 ml のポリプロピレン管に移した。その試験管を、90 rpm で振盪しながら 29.5 にて 1 時間インキュベートし、そして 30 ml の 1 M ソルビトールを加えた。そして、その試験管を、Sorvall RT6000B スウィングバケット遠心分離機 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) を使用して 800 × g で 10 分間遠心分離した。上清を捨て、そしてプロトプラストペレットを、30 ml の 1 M ソルビトールで 2 回洗浄した。試験管を、800 × g で 5 分間遠心分離し、そし

10

20

30

40

50

て上清を捨てた。プロトプラストを、1 ml あたり 5×10^7 の濃度にてフィルター滅菌した 9 : 1 : 0 . 1 (v / v) S T C : S P T C : D M S O 溶液中に再懸濁し、そして N A L G E N E (商標) C r y o 1 F r e e z i n g C o n t a i n e r (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, USA) を使用して制御された速度の冷凍にて -80 にて冷凍した。

【0265】

氷上でプロトプラストを解凍し、そして4本の1.4 ml 試験管それぞれに $200 \mu\text{l}$ のプロトプラストを加えることによって、形質転換を達成した。 $5 \mu\text{g}$ の DNA ($10 \mu\text{l}$ 未満) を、最初の3本に加え、そして4本目にはDNAを加えなかった。次に、 $750 \mu\text{l}$ の S P T C を各試験管に加え、そして試験管を6回緩やかに反転した。試験管を、室温にて30分間インキュベートし、そして6 ml の S T C を各試験管に加えた。各形質転換物を、3つの部分に分割し、1 ml あたり $125 \mu\text{g}$ のハイグロマイシン (実施例 21) を添加した VNO_3 R L M T 培地、又は1 ml あたり $125 \mu\text{g}$ のハイグロマイシン及び 10mM のウリジン (実施例 24、26、37、及び39) を添加した VNO_3 R L M T 培地の入った直径 150mm のプレートに加え、そして室温にて7日間インキュベートした。

【0266】

実施例 21 : t r i 5 フサリウム・ベネナツム株 J f y S 1 6 0 4 4 7 0 2 の構築

フサリウム・ベネナツム A 3 / 5 プロトプラストを、実施例 20 に記載の方法を使用して B s t Z 1 7 1 / B a m H I 線状化 p J f y S 1 5 7 9 2 1 1 6 で形質転換した。形質転換体を、1 ml あたり $125 \mu\text{g}$ のハイグロマイシン B を含む VNO_3 R L M T プレート上で選択した。7日後に、123個の形質転換体のうちの48個を、同じ培地が入った新しいプレートに継代培養した。次に、8つの形質転換体を、以下の通りにサザン解析によって分析した。先に記載したように得られた7日齢の形質転換体からの4本の1 cm 寒天プラグを 25ml の M 4 0 0 培地に植菌することによって、これらの株の真菌バイオマスを製造した。培養物を、 150rpm で振盪しながら 28 にて3日間インキュベートした。寒天プラグを取り出し、そして培養物を、M I R A C L O T H (商標) を通して濾過した。集菌したバイオマスを液体窒素で凍らせ、そして乳鉢と乳棒を使用して、菌糸を粉砕した。

【0267】

65 での溶解薬インキュベーションの時間を10分から1.5時間まで延長したことを除いて、製造業者の取扱説明書に従って D N E A S Y (登録商標) P l a n t M a x i K i t を使用して、ゲノム DNA を単離した。

【0268】

$2 \mu\text{g}$ のゲノム DNA を、 $50 \mu\text{l}$ の反応容量中、16単位の S p h I と22単位の D r a I で 37 にて22時間消化した。消化物を、T A E バッファー中、 1.0% アガロースゲル電気泳動にかけた。DNAを、 0.25M の H C l で処理することによってゲル内で断片化し、 1.5M の N a C l 0.5M の N a O H で変性させ、 1.5M の N a C l 1M の T r i s p H 8 で中和し、次に T U R B O B L O T T E R (商標) K i t を使用して $20 \times \text{SSC}$ 中、N Y T R A N (登録商標) S u p e r c h a r g e ナイロン膜 (とともに Whatman, Kent, UK 製) に移した。DNAを、U V S T R A T A L I N K E R (商標) を使用して膜に UV 架橋し、そして 20ml の D I G E a s y H y b 中、 42 にて1時間プレハイブリダイズした。

【0269】

t r i 5 遺伝子の3'フランキング配列のための P C R プローブを、以下の順方向及び逆方向プライマーを使用して製造した。

順方向プライマー :

5' G T G G G A G G A T C T G A T G G A T C A C C A T G G G C 3' (配列番号 43)

10

20

30

40

50

逆方向プライマー：

5' CCGGGTTTCGTTCCGAACGATCTTTACAAGG 3' (配列番号44)

【0270】

プローブを、製造業者の取扱説明書に従ってPCR Dig Probe Synthesis Kitを使用して製造した。プローブを、TAEバッファー中、1.2%アガロースゲル電気泳動によって精製し、プローブに相当するバンドを、切り出し、そしてMINELUTE (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。プローブを、5分間煮沸し、そして10mlのDIG Easy Hybに加えてハイブリダイゼーション溶液を作製した。ハイブリダイゼーションを、42℃にて15~17時間実施した。次に、膜を、2×SSC+0.1%のSDS中、室温にて5分間、高ストリンジェンシー条件下で洗浄し、続いて0.1×SSC+0.1%のSDS中、それぞれ65℃にて15分間、2回洗浄した。プローブ 標的ハイブリッドを、製造業者の取扱説明書に従って化学発光法 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) によって検出した。

【0271】

サザン解析によって測定されるように、tr i 5 遺伝子座内に単一コピーで欠失カセットを保有する形質転換体の1つであるフサリウム・ベネナム J f y S 1 5 7 9 4 3 2 3 を、VNO₃RLMT培地の入った7日齢プレートから無菌のつまようじを使用して4本の1cm²プラグを切り出し、そしてそれらを25mlのRA培地の入った125mlバッフル付き振盪フラスコに移すことによって孢子形成させた。そのフラスコを、150rpmで振盪しながら28℃にて48時間インキュベートした。孢子培養物を、無菌のMIRACLOTH (商標)を通して濾過し、そして50mlポリプロピレン管内に回収した。血球計を使用して孢子の濃度を測定し、(1ml中)10⁵個の孢子を、50μMのFdUを添加したVNO₃RLMT培地の入った150mmのプレートに移し、そして28℃にて4日間インキュベートした。孢子単離物を、無菌のつまようじを使用して選り出し、10μMのFdUを添加したVNO₃RLMT培地の入った新しいプレートに移し、そして24~28℃にて7日間増殖させた。

【0272】

ゲノムDNAを7つの孢子単離物から抽出し、そして先に記載したようにサザン分析を実施してゲノムからのカセットの正しい切り出しを確実にした。サザンプロットによって分析したすべての孢子単離物が、予想されるように1回の反復を残しながらカセットを切り出していた。1つの孢子単離物は、先の段落に記載の通りに菌株において孢子形成を誘導することによって一度孢子精製し、孢子濃度を、血球計を使用して決定し、そして1mlあたり40個の孢子に希釈した。1mlの希釈した孢子溶液を、VNO₃RLMT培地の入った150mmプレート内に播種し、そしてそのプレートを28℃にて4日間インキュベートした。孢子単離物を、VNO₃RLMT培地の入った新しいプレートに継代培養し、そして、フサリウム・ベネナム J f y S 1 6 0 4 1 7 0 2 (tr i 5) と命名した1つの孢子単離物を、p y r G 遺伝子の欠失のための出発株として使用した。

【0273】

実施例22：チミジンキナーゼ (t k) ネガティブ選択マーカーとハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ (h p t) ポジティブ選択マーカーを保有する汎用欠失ベクターの構築

チミジンキナーゼ (t k) とハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ (h p t) マーカーの両方を保有する汎用欠失ベクターを、その後の欠失プラスミドの組立てを容易にするために構築した。欠失の標的とした遺伝子の5'及び3'領域のためのフランキング配列は、Pme I又はAsc I (5'フランキング配列のため)及びSbf I又はSwa I (3'フランキング配列のため)でのベクターの消化の後に、そのベクターに容易に連結できる。

【0274】

10

20

30

40

50

フサリウム・ベネナツム *pyrG* 遺伝子の 5' フランキング領域から得られた直列反復配列を PCR 増幅するために、以下に示したプライマー 50 pM を、50 μ l の全量中、50 ng の pDM156.2、1 \times Pfx Amplification Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、6 μ l の 10 mM dNTPs の混合物、2.5 単位の PLATINUM (登録商標) Pfx DNA ポリメラーゼ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、及び 1 μ l の 50 mM MgSO₄ を含む 2 回の PCR 反応に使用した。

【0275】

プライマー：

反復番号 1

センス・プライマー：

5' GTTTAAACGGCGCGCC CGACAAAACAAGGCTACTG
CAGGCAGG 3' (配列番号 45)

アンチセンス・プライマー：

5' TTGTCGCCCGGG AATACTCCA ACTAGGCCTTG 3'
(配列番号 46)

反復番号 2

センス・プライマー：

5' AGTATTCCCGGG CGACAAAACAAGGCTACTGCA 3'
(配列番号 47)

アンチセンス・プライマー：

5' ATTTAAATCCTGCAGG AATACTCCA ACTAGGCCTT
G 3' (配列番号 48)

【0276】

増幅反応物を、以下の通りにプログラムした EPPENDORF (登録商標) MASTER CYCLER (登録商標) を使ってインキュベートした。反復番号 1 に関しては：98 にて 2 分間を 1 サイクル；そしてそれぞれ 94 にて 30 秒間、55 にて 30 秒間、及び 68 にて 1 分間を 5 サイクル。この後に、それぞれ 94 にて 30 秒間、59 にて 30 秒間、及び 68 にて 1 分間を 35 サイクルが続いた。反復番号 2 に関しては、サイクリング・パラメーターは、以下の通りであった：98 にて 2 分間を 1 サイクル；そしてそれぞれ 94 にて 30 秒間、55 にて 30 秒間、及び 68 にて 1 分間を 5 サイクル。この後に、それぞれ 94 にて 30 秒間、56 にて 30 秒間、及び 68 にて 1 分間を 35 サイクルが続いた。35 サイクルの後、両反応物 (すなわち、反復番号 1 及び番号 2) を、68 にて 10 分間インキュベートし、その後さらに処理されるまで 10 に冷やした。

【0277】

両反応からの PCR 産物を、TAE バッファーを使用した 0.8% GTG アガロース (Cambrex Bioproducts, East Rutherford, NJ, USA) ゲル電気泳動によって分離した。反復番号 1 及び反復番号 2 について、約 0.26 kb の断片を、ゲルから切りだし、そして製造業者の取扱説明書に従って Ultrafree (登録商標) DA スピンカップ (Millipore, Bellerica, MA, USA) を使用して精製した。そして、10 μ l のそれぞれの精製反復を、50 μ l の全量中に 1 \times Pfx Amplification バッファー、6 μ l の 10 mM dATP、dTTP、dGTP、及び dCTP の混合物、2.5 単位の PLATINUM (登録商標) Pfx DNA ポリメラーゼ、及び 1 μ l の 50 mM MgSO₄ を含む シングル・オーバーラップ PCR 反応に使用した。

【0278】

増幅反応を、98 にて 2 分間を 1 サイクル；そしてそれぞれ 94 にて 30 秒間、50 にて 30 秒間、及び 68 にて 1 分間を 5 サイクルのためにプログラムした EPPENDORF (登録商標) MASTER CYCLER (登録商標) を使ってインキュベートした。次に、反応物を、事前に暖めておいた 50 μ l の最終容量中に、50 pM の反復番号 1 のためのセンス・プライマー及び 50 pM の反復番号 2 のためのアンチセンス・プラ

10

20

30

40

50

イマー、1×Pfx Amplificationバッファー、6μlの10mM dNTPs、2.5単位のPLATINUM（登録商標）Pfx DNAポリメラーゼ、及び1μlの50mM MgSO₄を含む溶液と混合した。

【0279】

新たな100μlの増幅反応物を、それぞれ94にて30秒間、58にて30秒間、及び68にて1分間を35サイクルのためにプログラムしたEPPENDORF（登録商標）MASTERCYCLER（登録商標）を使ってインキュベートした。35サイクルの後に、反応物を68にて10分間インキュベートし、次にさらに処理されるまで10にて冷やした。（反復組立部品を保有する）0.5kbのPCR産物を、先に記載したように0.8%GTGアガロースゲル電気泳動によって単離した。

10

【0280】

プラスミドpCR4（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を、汎用欠失ベクターの構築のためのベクター骨格の源として使用した。pCR4 DNAの不必要な部分を取り除くために、2.5μgのプラスミドpTter61C（WO2005/074647）を、BspLU11I及びBstXIで連続して消化した。次に、消化したベクターを、Antarcticホスファターゼ（New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA）で処理した。3.1kbの消化した骨格を、先に記載したように0.8%GTGアガロースゲル電気泳動によって単離した。次に、精製した反復組立部品を、Rapid Ligation Kit（Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA）を用いて精製したベクター骨格に連結した。連結反応は、75ngの精製したベクター骨格と3μlの精製した反復組立部品から成った。1μlのこの連結反応物を、製造業者の提案したプロトコルを使用して化学的コンピテントSOLOPACK（登録商標）Supercompetent細胞（Stratagene, La Jolla, CA, USA）の形質転換に使用した。24個の形質転換体を、NcoI/PmeI制限消化によって分析した。24個の形質転換体のうちの23個が、予想した制限消化パターンを有していた。クローンpFvRs番号10を、配列決定のために無作為に選択して、PCRで誘発されたエラーがないことが確認した。配列決定解析では、クローンpFvRs番号10内の反復組立部品が予想した配列を持っていることが示され、そのため、これをフサリウム・ベネナム汎用ベクターの骨格として選択し、そしてpAllo1492 24（図15）と命名した。

20

【0281】

ハイグロマイシン・ホストランスフェラーゼ（hpt）遺伝子を保有しているカセットを、以下に示した遺伝子特異的な順方向及び逆方向プライマーを使用してpEmY23からPCR増幅した。下線を引いた配列はXmaI部位を表し、そして太字はBglII部位を表す。それぞれの5'末端の4つの「a」が、PCR産物の末端のその後の消化を可能にする。

30

【0282】

【化10】

順方向プライマー：

5'-aaaaccgggCCTTCATTTAAACGGCTTCACGGGC-3'（配列番号49）

逆方向プライマー：

5'-aaaaccggg**AGATCT**ACGCCCTTGGGGTACCCAATATTC-3'（配列番号50）

40

【0283】

増幅反応物は、50μlの最終容量中、60ngのpEmY23、200μmのdNTPs、1mMの酢酸マグネシウム、0.4μMのプライマー、1×Pfx Amplificationバッファー、0.5MのGC Me1t、及び2.5単位のPLATINUM

50

UM (登録商標) P f x ポリメラーゼを含んでいた。反応物を、95 にて2分間を1サイクル;それぞれ94 にて30秒間、60 にて30秒間、及び68 にて1分50秒を10サイクル;そして68 にて7分間を1サイクルとそれに続いて4 にて保持するためにプログラムしたE P P E N D O R F (登録商標) M A S T E R C Y C L E R (登録商標)を使ってインキュベートした。

【0284】

PCR産物を、TAEバッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動によって分離した。約1.8 kbの断片を、ゲルから切り出し、そして、MINIELUTE (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。その後、ゲルから精製したPCR産物を、XmaIで消化し、1%アガロースゲル上で泳動し、そして前述の通りに再びゲルから精製した。QUICK LIGATION (商標) Kitを使用して、hpt PCR産物を(仔ウシ腸ホスファターゼで処理しておいた) XmaI線状化pAllo1492 24に連結した。得られたプラスミドを、pJfyS1579 35 2 (図16)と命名し、そしてチミジンキナーゼ遺伝子の挿入のための受容プラスミドとして使用した。

10

【0285】

単純ヘルペスウイルスtkカセットの源はプラスミドpJfyS1579 08 06 (実施例19)であったので、挿入物をBamHI及びBglIIでの消化によってそこから遊離させた。消化産物を、TAEバッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動によって分離し、そして2.8 kbのtk遺伝子挿入物に相当する断片を、切り出し、そしてMINIELUTE (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。QUICK LIGATION (商標) Kitを使用して、tk遺伝子カセットを、(仔ウシ腸ホスファターゼで処理しておいた) BglII線状化pJfyS1579 35 02に連結した。得られたプラスミドを、pJfyS1579 41 11 (図17)と命名し、そしてこれをpyrG、amyA、alpA、及びdps1欠失ベクターの構築の出発点として使用した。

20

【0286】

実施例23: pyrG欠失ベクターpJfyS1604 55 13の製造

フサリウム・ベネナムA3/5のpyrG遺伝子(DNA配列については配列番号51及び推定アミノ酸配列については配列番号52)の3'フランキング配列を、EXPAND (登録商標) High Fidelity PCR システム (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA)、並びに以下に示した遺伝子特異的な順方向及び逆方向プライマーを使用して増幅した。下線部分は、クローニング用の導入したSbfI部位であり、イタリック体で印字されている部分は、形質転換前にプラスミドのPCR (登録商標) 2.1部分を取り除くためのその後の消化用の導入したNotI部位である。

30

【0287】

【化11】

順方向プライマー:

5'-aaaaaacctgcaggATCCTGCGCGGACTCTTGATTATTT-3' (配列番号53)

逆方向プライマー:

5'-aaaaaacctgcaggccgccaATTCCATTCTGTAGCTGAGTATA-3' (配列番号54)

40

【0288】

増幅反応には、50 µlの最終容量中、125 ngのフサリウム・ベネナムA3/5ゲノムDNA、200 µMのdNTP、0.4 µMのプライマー、5 mMのMgCl₂を含む1 × EXPAND (登録商標) バッファー (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA)、及び2.5単位のEXPAND (登録商標) DNAポリメラーゼ (

50

Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) が含まれた。増幅反応物を、95 にて2分間を1サイクル；それぞれ94 にて30秒間、54 にて30秒間、及び72 にて1分間を10サイクル；そしてそれぞれ94 にて30秒間、54 にて30秒間、及び72 にて1分10秒間を20サイクルのためにプログラムしたEPPENDORF (登録商標) MASTER CYCLER (登録商標) を使ってインキュベートした。

【0289】

PCR産物を、TAEバッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動によって分離し、0.7kb断片を、切り出し、そしてMINELUTE (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。

10

【0290】

0.7kbのPCR産物を、SbfIで消化し、TAEバッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動によって精製した。約0.7kbの断片を、ゲルから切り出し、Ultrafree (登録商標) DAスピニングカップを使用してさらに精製した。0.7kbの断片を、QUICK LIGATION (商標) Kitを使用して(SbfIで消化し、そして仔ウシ腸ホスファターゼを使用して脱リン酸化しておいた) pJfyS15794111に連結し、そして連結反応混合物を、製造業者のプロトコールに従って、E. coli SURE (登録商標) 化学的コンピテント細胞の形質転換に使用した。得られたプラスミドをpJfyS16043513と命名した。

20

【0291】

5' pyrGフランキング配列を、EXPAND (登録商標) High Fidelity PCRシステム、並びに以下に示した遺伝子特異的な順方向及び逆方向プライマーを使用してpEmY23 (実施例13) から増幅した。下線部分はクローニング用の導入したPmeI部位であり、イタリック体で印字された部分は、真菌形質転換前にラクタマーゼ遺伝子を取り除くためのその後の消化用の導入したNotI部位である。

【0292】

【化12】

順方向プライマー：

5'-aaaaaagtttaaacgcgccgcCTGTTGCCTTTGGGCCAATCAATG-3' (配列番号55)

逆方向プライマー：

5'-aaaaaagtttaaacCTAGTTGGAGTATTGTTTGTCTT-3' (配列番号56)

30

【0293】

増幅反応には、20ngのpEmY23、200μMのdNTP、0.4μMのプライマー、15mMのMgCl₂を含む1×EXPAND (登録商標) バッファー、及び2.5単位のEXPAND (登録商標) DNAポリメラーゼが含まれた。

40

【0294】

増幅反応物を、95 にて2分間を1サイクル；それぞれ94 にて30秒間、53 にて30秒間、及び72 にて40秒間を10サイクル；そしてそれぞれ94 にて30秒間、53 にて30秒間、及び72 にて40秒間(次のサイクル毎に10秒間を追加する)を20サイクルのためにプログラムしたEPPENDORF (登録商標) MASTER CYCLER (登録商標) を使ってインキュベートした。

【0295】

PCR産物を、MINELUTE (登録商標) PCR Purification Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) を使用して精製した。精製したPCR産物を、PmeIで消化し、そしてTAEバッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動によ

50

て分離した。約 0.5 kb の断片を、ゲルから切り出し、そして M I N E L U T E (登録商標) G e l E x t r a c t i o n K i t を使用してアガロースから抽出した。0.5 kb の断片を、P m e I 消化し、且つ、仔ウシ腸ホスファターゼで処理した p J f y S 1 6 0 4 3 5 1 3 に Q U I C K L I G A T I O N (商標) K i t を使用して連結した。連結反応には、20 μ l の反応容量中、50 ng のベクター、20 ng の挿入物、1 x Q U I C K L I G A T I O N (商標) 反応バッファー (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA)、及び 10 単位の Q u i c k T 4 D N A リガーゼが含まれた。反応物を、室温にて 5 分間インキュベートし、そして、2 μ l の連結反応物を、製造業者の取扱説明書に従って E . c o l i S U R E (登録商標) 化学的コンピテント細胞の形質転換に使用した。配列分析を使用して、所望の方向で挿入物を含んでいる形質転換体を同定し、PCR エラーの不存在を確認した。得られたプラスミドを p J f y S 1 6 0 4 5 5 1 3 (図 18) と命名し、そして p y r G 遺伝子欠失カセットとして使用した。

【0296】

実施例 24 : t r i 5 p y r G フサリウム・ベネナツム株 J f y S 1 6 4 3 1 8 2 の製造

実施例 20 に記載の手法に従っての N o t I 消化し、且つ、ゲルから精製した p J f y S 1 6 0 4 5 5 1 3 で形質転換したフサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 0 4 1 7 2 (t r i 5) の 5 1 個の推定形質転換体を、無菌のつまようじを使って形質転換プレートから 1 ml あたり 125 μ g のハイグロマイシン B と 10 mM のウリジンを添加した V N O ₃ R L M T 培地の入った新しいプレートに移し、そして 24 ~ 28 にて 7 日間培養した。次に、形質転換体を、ウリジン (10 mM) を含むものと含まないものの 2 枚の V N O ₃ R L M T プレートのそれぞれにプラグを移すことによって表現型的に分析した。ウリジンを含まないプレート上で増殖しないか又はわずかな増殖しか示さない 9 つの形質転換体を、サザン解析によって分析した。9 つの形質転換体のそれぞれからのゲノム DNA を、実施例 21 に記載の通りに抽出し、そしてそれぞれの 2 μ g を 28 単位の M f e I 及び 14 単位の D r a I で消化した。p y r G 遺伝子の 3' フランキング配列に対する PCR プローブを、以下の順方向及び逆方向プライマーを使用して実施例 21 に記載の方法に従って製造した：

【0297】

順方向プライマー：

5' G G A T C A T C A T G A C A G C G T C C G C A A C 3' (配列番号 57)

逆方向プライマー：

5' G G C A T A G A A A T C T G C A G C G C T C T C T 3' (配列番号 58)

【0298】

サザン解析では、9 つのウリジン栄養要求性変異株のうち 2 つが単一コピーで欠失カセットを保有した一方、残りがカセットの異所性組込みを持続していたことを示した。1 つの形質転換体、フサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 0 4 8 5 5 に、10 mM のウリジンを含む R A 培地中で実施例 5 に記載の通りに孢子形成させ、そして 10⁵ 個の孢子を、50 μ M の F d U と 0.1 mM のウリジンを添加した V N O ₃ R L M T 培地の入った 150 mm プレート上に播種した。獲得した孢子単離物を、10 μ M の F d U 及び 0.1 mM のウリジンを添加した V N O ₃ R L M T 培地の入った新しいプレートに継代培養し、そしてその後、サザン解析によって分析して、ゲノムからの正しい切り出しを確実にした。

【0299】

分析した株では、すべて正確にカセットが切り出されたので、1 つの株、フサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 4 3 1 0 3 に、前段落に記載の通りに孢子形成させた。孢子濃度を、血球計を使用して測定し、そして原液を 40 個の孢子 / ml の濃度に希釈した。1 ml を、10 mM のウリジンを添加した V N O ₃ R L M T 培地の入った 150 mm プレート上に播種した。得られた孢子コロニーを、10 mM のウリジンを添加した V N O ₃ R L M T 培地の入った新しいプレートに継代培養し、そして 1 つの孢子単離物、フサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 4 3 1 8 2 (t r i 5 p y r G) を、フサリウム・

ベネナツム アミラーゼ A 遺伝子 (amy A) の欠失のための株として使用した。

【 0 3 0 0 】

実施例 2 5 : amy A 欠失ベクター p J f y S 1 6 0 4 1 7 2 の製造

フサリウム・ベネナツム amy A 遺伝子 (DNA 配列については配列番号 5 9 及び推定アミノ酸配列については配列番号 6 0) の完全欠失のための上流及び下流のフランキング配列情報を得るために、GENOME WALKER (商標) Universal Kit (Clonetech, Palo Alto, CA, USA) を使用した。キットを用いて製造したそれぞれのフサリウム・ベネナツム A 3 / 5 ゲノム DNA ライブラリーを、以下に示した 5 ' 遺伝子特異的プライマーと 5 ' ネステッド・プライマーを使用した 5 ' フランキング配列のための 2 ラウンドの PCR にかけた。以下に示した 3 ' 遺伝子特異的プライマーと 3 ' ネステッド・プライマーを使用して、3 ' フランキング配列を得た。

10

【 0 3 0 1 】

5 ' 遺伝子特異的プライマー :

5 ' G A G G A A T T G G A T T T G G A T G T G T G T G G A A T A 3 ' (配列番号 6 1)

5 ' ネステッド・プライマー :

5 ' G G A G T C T T T G T T C C A A T G T G C T C G T T G A 3 ' (配列番号 6 2)

3 ' 遺伝子特異的プライマー :

5 ' C T A C A C T A A C G G T G A A C C C G A G G T T C T 3 ' (配列番号 6 3)

20

3 ' ネステッド・プライマー :

5 ' G C G G C A A A C T A A T G G G T G G T C G A G T T T 3 ' (配列番号 6 4)

【 0 3 0 2 】

一次 PCR 反応には、50 μ l の反応容量中に、1 x HERCULASE (登録商標) Reaction バッファー、2 μ l のそれぞれの染色体 DNA ライブラリー (キットに記載の通りに製造された)、200 nM のキットで供給された AP 1 (アダプター・プライマー 1)、200 nM の遺伝子特異的プライマー (前記)、200 μ M の dNTPs、及び 2 . 5 単位の HERCULASE (登録商標) DNA ポリメラーゼが含まれた。

30

【 0 3 0 3 】

一次増幅を、それぞれ 9 4 にて 2 5 秒間及び 7 2 にて 3 分間を 7 サイクル、それぞれ 9 4 2 5 秒間及び 6 7 にて 3 分間を 3 2 サイクル、そして 6 7 にて 7 分間を 1 サイクルのためにプログラムした E P P E N D O R F (登録商標) M A S T E R C Y C L E R (登録商標) を使って実施した。

【 0 3 0 4 】

二次 PCR 反応には、50 μ l の反応容量中、1 x HERCULASE (登録商標) Reaction バッファー、1 μ l のそれぞれの一次 PCR 反応物 (前記)、200 nM のキットで供給された AP 2 (アダプター・プライマー 2)、200 nM の遺伝子特異的なネステッド・プライマー (前記)、200 μ M の dNTPs、及び 2 . 5 単位の HERCULASE (登録商標) DNA ポリメラーゼが含まれた。

40

【 0 3 0 5 】

二次増幅は、それぞれ 9 4 にて 2 5 秒間及び 7 2 にて 3 分間を 5 サイクル、それぞれ 9 4 にて 2 5 秒間及び 6 7 にて 3 分間を 2 0 サイクル、そして 6 7 にて 7 分間を 1 サイクルのためにプログラムした E P P E N D O R F (登録商標) M A S T E R C Y C L E R (登録商標) を使って実施した。

【 0 3 0 6 】

PCR 産物を、TAE バッファーを使用した 1 % アガロースゲル電気泳動によって分離した。約 0 . 7 k b の断片を、ゲルから切り出し、そして製造業者の取扱説明書に従って MINIELUTE (登録商標) Gel Extraction Kit を使用して精製し

50

た。PCR産物を、先に記載した対応するネステッド・プライマーとキットで供給されたプライマー2を使用して直接配列決定した。得られた配列を、空の欠失ベクター pJfyS1579 41 11への挿入のための amyA 遺伝子の5'フランキンク配列の1 kbの領域と3'フランキンク配列の0.7 kbの領域を増幅するためのプライマーを設計するのに使用した。

【0307】

amyA 3'フランキンク配列を、以下に示した順方向及び逆方向プライマーを使用してフサリウム・ベネナム A3 / 5 ゲノムDNAからPCR増幅した。

【0308】

【化13】

10

順方向プライマー：

5'-AAAAAacctgcaggTAATGGGTGGTCGAGTTTAAAAGTA-3' (配列番号65)

逆方向プライマー：

5'-AAAAAacctgcaggccgccgCTTTAAGCATCATTTTTGACTACGCAC-3' (配列番号66)

【0309】

下線を引いた文字は、その後のラクタマーゼ欠失のための NotI 部位を表し、イタリック体で印字された文字は、ベクタークローニングのための SbfI 部位を表す。

【0310】

増幅反応には、1 x HERCULASE (登録商標) Reaction バッファー、120 ng のゲノムDNA 鋳型、400 nM のプライマー、200 μM の dNTPs、及び2.5 単位の HERCULASE (登録商標) DNA ポリメラーゼが含まれた。

【0311】

増幅反応を、95 °C にて2分間を1サイクル；それぞれ94 °C にて30秒間、55 °C にて30秒間、及び72 °C にて1分間を10サイクル；そしてそれぞれ94 °C にて30秒間、55 °C にて30秒間、及び72 °C にて1分10秒間を20サイクルのためにプログラムした EPPENDORF (登録商標) MASTER CYCLER (登録商標) を使ってインキュベートした。

【0312】

PCR産物を、TAE バッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動によって分離した。約0.7 kbの断片を、ゲルから切り出し、そしてMINI ELUTE (登録商標) Gel Extraction Kit を使用してアガロースから抽出した。PCR断片を、SbfI で消化して、粘着末端を作り出した。この断片を、SbfI で線状化し、そして仔ウシ腸ホスファターゼで処理した汎用欠失ベクター pJfyS1579 41 11 内に挿入した。連結反応には、20 μl の反応容量中、80 ng のベクター、80 ng の挿入物、1 x QUICK LIGATION (商標) Reaction バッファー、及び10 単位の Quick T4 DNA リガーゼが含まれた。1.5 μl の体積の連結反応を、製造業者の取扱説明書に従って100 μl の E. coli SURE (登録商標) 化学的コンピテント細胞の形質転換に使用した。クローンを、EcoRI を用いた制限解析 (restriction analysis) と配列分析を使用して挿入方向に関してスクリーニングし、そしてPCRエラーがないクローンを同定した。このプラスミドを、pJfyS1579 93 1 (図19) と命名し、そして5' amyA フランキンク配列の挿入のための受容プラスミドとして使用した。

5' amyA フランキンク配列を、以下に示した順方向及び逆方向プライマーを使用してPCR増幅した。

【0313】

50

下線を引いた塩基は、b l a 遺伝子欠失のための N o t I 部位を表し、そしてその他の小文字は、平滑末端ベクター部位内にクローニングするために断片が平滑末端であることを確実にするための P m e I 部位を表す。

【0314】

【化14】

順方向プライマー：

5'-AAAAAgtttaaacGCGGCCGCTTGATTATGGGATGACCCCAGACAAAGTGGT-3'

(配列番号67)

逆方向プライマー：

5'-AAAAAgtttaaacCCGCACGAGCGTGTTCCTTTTCATCTCG-3' (配列番号68)

10

【0315】

PCR増幅は、異なるサイクル・パラメーターを除いて、先に記載したものと同様であった。増幅反応を、95 にて2分間を1サイクル；それぞれ94 にて30秒間、55 にて30秒間、及び72 にて1分15秒を10サイクル；そしてそれぞれ94 にて30秒間、55 にて30秒間、及び72 にて1分15秒（次のサイクル毎に10秒追加する）を20サイクルのためにプログラムしたE P P E N D O R F（登録商標）M A S T E R C Y C L E R（登録商標）を使ってインキュベートした。

20

【0316】

PCR産物を、T A E バッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動によって分離した。約1 kbの断片を、ゲルから切り出し、そして、M I N I E L U T E（登録商標）G e l E x t r a c t i o n K i t を使用してアガロースから抽出した。1 kbの断片を、P m e I で消化して、平滑末端を作り出し、そして挿入物を、P m e I で消化した、仔ウシ腸ホスファターゼで脱リン酸化した p J f y S 1 5 7 9 9 3 1 内にクローニングした。

30

【0317】

連結反応には、20 μl の反応容量中、75 ng のベクター、100 ng の挿入物、1 × Q U I C K L I G A T I O N（商標）R e a c t i o n バッファー、及び10単位の Q u i c k T 4 D N A リガーゼが含まれた。5分間のインキュベーションの後に、2 μl の連結反応物を、製造業者の取扱説明書に従って100 μl の E . c o l i S U R E（登録商標）化学的コンピテント細胞を形質転換するのに使用した。配列分析を使用して、挿入物が正しい方向で存在すること、及びPCRエラーの不存在を確認した。同定された得られたベクターを、p J f y S 1 6 0 4 1 7 2（図20）と命名した。

40

【0318】

実施例26： t r i 5 p y r G a m y A フサリウム・ベネナツム株 J f y S 1 6 4 3 9 5 0 4 の製造

実施例20に記載の手法に従ってN o t I で消化し、ゲルから精製した p J f y S 1 6 0 4 1 7 0 2 で形質転換したフサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 4 3 1 8 0 2（ t r i 5 p y r G ）の5つの推定形質転換体を、無菌のつまようじを用いて、形質転換プレートから1 ml あたり125 μg のハイグロマイシンB及び10 mM のウリジンを添加した V N O ₃ R L M T 培地の入った新しいプレートに移し、そして24~28 にて7日間インキュベートした。サザン解析のために、2 μg のゲノムDNAを、25単位の S s p I で消化した。a m y A 遺伝子の5'フランキング配列に対するD I G プローブを、実施例21に記載の方法に従い、以下に示した順方向及び逆方向プライマーを使用して製造した。

50

【0319】

順方向プライマー：

5' GGATCATCATGACAGCGTCCGCAAC 3' (配列番号69)

逆方向プライマー：

5' GGCATAGAAATCTGCAGCGCTCTCT 3' (配列番号70)

【0320】

サザン解析を、実施例21に記載の通りに実施し、そしてその結果は、5つの形質転換体のうち2つが、欠失カセットの単一組込みを伴う置き換えられたコード配列を持っていたことを示した。フサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 4 3 7 3 0 2 と命名した一次形質転換体に、実施例5に記載の通りに孢子形成させ、そして 10^5 個の孢子を、 $50 \mu\text{M}$ の F d U と 0.1mM のウリジンを添加した VNO_3 R L M T 培地の入った直径 150mm のプレートに播種した。獲得した孢子単離物を、 $10 \mu\text{M}$ の F d U と 0.1mM のウリジンを添加した VNO_3 R L M T 培地の入った新しいプレートに継代培養されていた。

10

【0321】

2つのフサリウム・ベネナツム孢子単離物 (J f y S 1 6 4 3 8 3 0 2 及び J f y S 1 6 4 3 8 3 0 4) を、一回、孢子精製し、そして菌株 (J f y S 1 6 4 3 8 3 0 2 からの) J f y S 1 6 4 3 9 5 1 及び J f y S 1 6 4 3 9 5 2、並びに (J f y S 1 6 4 3 8 3 0 4 からの) J f y S 1 6 4 3 9 5 0 4 を得た。F d U プレートから選択された最初の孢子単離物、並びにそれらのそれぞれの一回孢子精製した単離物を、サザン解析によって分析して、ゲノムからの正しい切り出しを確実にした。分析した株のすべてで、正確にカセットを切り出せた。フサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 4 3 9 5 0 4 (t r i 5 p y r G a m y A) を、フサリウム・ベネナツムのアルカリプロテアーゼ A 遺伝子 (a l p A) の欠失のための株として使用した。

20

【0322】

実施例27：プラスミド p E J G 6 9 の構築

ミクロドチウム・ニバレ (*Microdochium nivale*) ラクトースオキシダーゼ (L O x) 遺伝子 (D N A 配列については配列番号71及び推定アミノ酸配列については配列番号72) を、以下に示した順方向と逆方向プライマーを使用して p E J G 3 3 (Xu et al., 2001, European Journal of Biochemistry 268: 1136-1142) から P C R 増幅した。

【0323】

【化15】

30

順方向プライマー：

5'-CCCGCATGCGTTCTGCATTTATCTTG-3' (配列番号73)

逆方向プライマー：

5'-GGGTTAATTAATTATTTGACAGGGCG-3' (配列番号74)

【0324】

下線部分は、クローニングのために導入された S p h I (順方向) 又は P a c I (逆方向) 部位を表す。

40

【0325】

P C R には、 $50 \mu\text{l}$ の最終容量中、 $200 \mu\text{M}$ の d N T P s、 $1 \mu\text{M}$ の各プライマー、 50ng の p E J G 3 3、 $1 \times$ P w o バッファー (Promega Madison, WI, USA)、及び $1 \mu\text{l}$ の P w o H o t S t a r t ポリメラーゼ (Promega, Madison, WI, USA) が含まれた。

【0326】

増幅反応を、95 にて2分間を1サイクル；それぞれ95 にて30秒間、55 にて45秒間、及び72 にて1分間を10サイクル；それぞれ95 にて30秒間、55

50

にて45秒間、及び72にて1分間（それぞれ次のサイクル毎に20秒の延長時間を加える）を20サイクル；そして50にて10分間を1サイクルのためにプログラムしたROBOCYCLER（登録商標）を使ってインキュベートした。

【0327】

PCR産物を、TAEバッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動によって分離した。約1.5kbの断片を、ゲルから切り出し、そして、QIAQUICK（登録商標）Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。

【0328】

ラクトース・オキシダーゼ遺伝子を、ポリメラーゼとバッファーをそれぞれTaq DNAポリメラーゼとTaq DNAポリメラーゼ・バッファーで置き換え、及び前記のゲルから精製したPCR産物を鋳型として使用したことを除いて、同じ条件を使用して再増幅し、そして先に記載したように精製した。PCR産物を、TOPO（登録商標）TA Cloning Kitを使用してpCR（登録商標）2.1内にクローニングし、そして配列決定して、PCRエラーの不存在を確認した。得られたエラーのないプラスミドを、SphIで消化し、T4 DNAポリメラーゼ（New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA）で処理し、QIAQUICK（登録商標）Nucleotide Removal Kit（QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA）を使用して精製し、そしてPacIで消化した。断片を、TAEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動によって精製し、そして約1.5kbの断片を、ゲルから切り出し、そしてQIAQUICK（登録商標）Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。

10

20

【0329】

プラスミドpEJG61を、BspLU11Iで消化し、製造業者の指示に従ってクレノウDNAポリメラーゼ（New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA）で処理し、次にPacIで消化した。消化したプラスミドを、TAEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動によって精製し、そして8kbの断片を切り出し、QIAQUICK（登録商標）Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。

【0330】

LOxコード配列を、製造業者の指示に従ってT4 DNAリガーゼを使用してBspLU11I及びPacIで消化したpEJG61に連結した。プラスミドを、配列分析によってスクリーニングしてPCRエラーの不存在を確実にし、そして、得られたプラスミドを同定し、そしてpEJG69（図21）と命名した。

30

【0331】

実施例28：プラスミドpEJG65の構築

プラスミドpEJG61（実施例4）を、BspLU11Iで消化し、クレノウDNAポリメラーゼで処理し、そしてPacIで消化した。消化したプラスミドを、TAEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動によって分離し、そして8.1kbの断片を、切り出し、そしてQIAQUICK（登録商標）Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。

【0332】

カンジダ・アンタルクチカ・リパーゼAコード配列（DNA配列については配列番号75及び推定アミノ酸配列については配列番号76）を、以下に示した順方向と逆方向プライマーを使用してpMT1229（WO94/01541）からPCR増幅した。

40

【0333】

順方向プライマー：

5' GCATGCGAGTGTCTTGC GC 3'（配列番号77）

逆方向プライマー：

5' TTAATTA ACTAAGGTGGTGTGATG 3'（配列番号78）

【0334】

PCR反応には、200µMのdNTPs、1µMの各プライマー、20ngのpMT1229、1×Pwoバッファー（Promega, Madison, WI, USA）、及び1µlのPwo

50

Hot Start ポリメラーゼ (Promega, Madison, WI, USA) が含まれた。

【0335】

増幅反応を、94 にて2分間を1サイクル；それぞれ94 にて30秒間、55 にて45秒間、及び72 にて1分間を10サイクル；それぞれ94 にて30秒間、55 にて45秒間、及び72 にて1分間（それぞれ次のサイクル毎に20秒の延長時間を加える）を17サイクル；そして72 にて10分間を1サイクルのためにプログラムしたROBOCYCLER（登録商標）を使ってインキュベートした。

【0336】

PCR産物を、TAEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動によって分離し、そして1.4 kbの断片を切り出し、そしてQIAQUICK（登録商標）Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。PCR断片を、TOPO（登録商標）TA Cloning Kitを使用してpCR（登録商標）2.1内にクローニングし、そして配列決定して、PCRエラーの不存在を確認した。

10

【0337】

遺伝子のコード配列内のSph I部位の存在により、カンジダ・アンタルクチカ・リパーゼAコード配列は、別々の消化によって2つの別個の断片としてpCR（登録商標）2.1から遊離させた。第1断片（1 kb）を遊離するために、プラスミドを、Sph Iで消化し、そしてT4 DNAポリメラーゼで処理した。ポリメラーゼを、75 にて10分間、熱不活性化し、そしてプラスミドをNhe Iで消化した。第2断片（0.4 kb）を、Nhe I / Pac I消化を用いてプラスミドから遊離させた。両消化物を、TAEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動にかけ、そしてSph I / Nhe I消化からの1 kbの断片とNhe I / Pac I消化からの0.4 kbの断片を、切り出し、そしてQIAQUICK（登録商標）Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。2つの断片を、消化したpEJG61にT4 DNAリガーゼを使用して連結した。連結反応には、1 x Ligation バッファー（New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA）、100 ngの前記1 kb断片、50 ngの0.4 kb断片、50 ngの消化したpEJG61、及び10単位のT4 DNAリガーゼが含まれた。反応物を、室温にて16時間インキュベートし、そして製造業者の取扱説明書に従って、E. coli XL10 GOLD（登録商標）Ultra competent細胞の形質転換に使用した。形質転換体を、配列分析によってスクリーニングし、所望のエラーを含まないコード配列を持つプラスミドを含む1つのクローンを同定し、そしてpEJG65（図22）と命名した。

20

30

【0338】

実施例29：プラスミドpMStr19の構築

フサリウム・オキシスポラム・ホスホリパーゼ遺伝子をpA2Ph10（WO1998/26057）からフサリウム・ベネナム発現ベクターpDM181（WO2000/56900）内にクローニングすることによって、プラスミドpMStr19を構築した。PCR増幅を使用して、簡便なDNA断片上のホスホリパーゼ遺伝子を単離した。

【0339】

フサリウム・オキシスポラム・ホスホリパーゼ遺伝子を、Pwo DNAポリメラーゼ（Roche Molecular Biochemicals, Basel, Switzerland）を用いた標準的な増幅条件と、以下に示したプライマーを用いた45 のアニーリング温度を使用して、pA2Ph10から特異的に増幅した。

40

【0340】

【化 1 6】

PLMStr10:

5'-TCAGATTTAAATATGCTTCTTCTACCACTCC-3' (配列番号79)

Swal

PLMStr11:

5'-AGTCTTAATTAAGCTAGTGAATGAAAT-3' (配列番号80)

10

【0341】

得られたDNA断片をゲルから精製し、そしてSwalで消化した。プラスミドpDM181もまた、Swalで消化し、そして脱リン酸化した。次に、DNA断片を一つに連結して、プラスミドpMStr18を作製した。

【0342】

連結混合物を使用して製造された、pMStr18の2つの別個のE・コリ形質転換体のホスホリパーゼ遺伝子、4番及び17番を、標準的なプライマーウォーキング法を使用して配列決定した。両遺伝子は、その遺伝子内の異なる位置に単一点変異を獲得していた。その突然変異は、NarI部位によって分離され、それがpMStr18を二回開裂する。そのため、NarIでpMStr18の4番とpMStr18の17番の両方を消化し、エラーを含まない断片を単離し、そしてそれらを一つに連結してpMStr19 (図23)を作製することによって、エラーを含まないホスホリパーゼ遺伝子をフサリウム発現ベクターpDM181内で組み立てた。pMStr19内のホスホリパーゼ配列を、標準的な方法を使用して確認した。

20

【0343】

実施例30：プラスミドpEJG49の構築

pSheB1 (WO2000/56900)の修飾によって、フサリウム・ベネナム発現ベクターpEJG49を製造した。修飾には：(a)部位特異的突然変異誘発によるpSheB1配列内の1つのBspLU11I部位の欠失；(b)850bpのフサリウム・オキシスポラムのトリプシン・プロモーターの欠失；(c)2kbのフサリウム・ベネナムのグルコアミラーゼ・プロモーターの挿入を助けるリンカーの連結によるBspLU11I部位の導入；及び(d)フサリウム・オキシスポラムのホスホリパーゼ遺伝子の導入、が含まれた。

30

【0344】

pSheB1配列内のBspLU11I部位の欠失は、以下の突然変異誘発プライマー対を用いて、製造業者の取扱説明書に従って、QUIKCHANGE (商標) Site Directed Mutagenesis Kitを使用して実行した：

【0345】

5' GCAGGAAGAACAAGTGAGCAAAAGGC 3' (配列番号81)

40

5' GCCTTTTGCTCACTTGTTCTTTCCTGC 3' (配列番号82)

【0346】

これは、pSheB1中間体1を作成した。

【0347】

930bpのフサリウム・オキシスポラムのトリプシン・プロモーターの欠失は、StuI及びPacIでpSheB1中間体1 (6971bp)を消化し、その消化産物をTBEバッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動にかけ、6040bpのベクター断片を切り出し、そしてQIAQUICK (登録商標) Gel Extraction K

50

itで切り出した断片を精製することによって達成された。新しいBsp Lu11I部位を導入するために、以下のプライマーを使用してリンカーを作出した：

【0348】

【化17】

5'-dcCTACATGTTTAAT-3' (配列番号83)

Bsp Lu11I

5'-dTAAACATGTAGG-3' (配列番号84)

10

【0349】

各プライマー(それぞれ2 μg)を、70℃にて10分間加熱し、次に1時間かけて室温まで冷ました。このリンカーを、StuI PacIで消化したpSheB1中間体1ベクター断片に連結し、そしてpSheB1中間体2を作成した。次に、ベクターpSheB1中間体2を、Bsp Lu11I及びPacIで消化した。消化したベクターを、TBEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動によって精製し、ゲルから切り出し、そしてQIAQUICK(登録商標)Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。

20

【0350】

フサリウム・オキシスポラムのホスホリパーゼ遺伝子断片をさらに、鋳型としてpMSTR19を使用してPCRによって製造した。以下のPCRプライマーを使用して、遺伝子の5'末端にSphI部位を、及び3'末端にPacI部位を導入した：

【0351】

【化18】

5'-GGGGGCATGCTTCTTCTACCACTCC-3' (配列番号85)

SphI

5'-GGGGTTAATTAAGAGCGGGCCTGGTTA-3' (配列番号86)

PacI

30

【0352】

PCR及び精製のための条件を、前述の通りに実施した。ホスホリパーゼ遺伝子断片を、製造業者の取扱説明書に従ってPCR(登録商標)TOPO(登録商標)内にクローニングした。次に、PCR(登録商標)TOPO(登録商標)ホスホリパーゼ・クローンを、SphIで消化し、そしてT4 DNAポリメラーゼで処理して、突出している3'末端を欠失させた。断片を、QIAQUICK(登録商標)Nucleotide Removal Kitを使用して精製し、そしてPacIで消化した。消化物を、TBEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動によって精製し、そして1 kbのバンドをゲルから切り出し、そしてQIAQUICK(登録商標)Gel Extraction Kitを使用して精製した。

40

【0353】

プラスミドpSheb1中間体2(前記)を、StuI及びBsp Lu11Iで消化し、そしてQIAQUICK(登録商標)Nucleotide Removal Kitを使用して精製した。次に、断片を、2 kbのStuI Bsp Lu11Iフサリウム・ベネナム・グルコアミラーゼ・プロモーター断片(WO2000/056900)に

50

連結した。pSheb1中間体3として知られるこのベクターを、BspL11Iで消化し、クレノウ・フラグメントによって処理して5'オーバーハングの隙間を埋め、PacIで消化し、そしてQIAQUICK(登録商標)Nucleotide Removal Kitを使用して精製した。次に、断片を、SphI、平滑末端PacIフサリウム・オキシスポラム・ホスホリパーゼ断片(前記)に連結した。pEJG49(図24)と命名した、得られたベクターは、フサリウム・ベネナム・グルコアミラーゼ・プロモーターの転写調節下、ホスホリパーゼ・レポーター遺伝子を保有していた。

【0354】

実施例31:プラスミドpEmY15の構築

部位特異的突然変異誘発を、発現プラスミドpEJG49からEcoRI及びNotI制限部位のそれぞれのうちの1つを欠失させ、そしてピアラホス耐性マーカ―(bar遺伝子)に隣接するこれらの制限部位を1つだけにするために使用した。突然変異誘発を、以下に示した順方向及び逆方向プライマー、並びにQUICKCHANGE(登録商標)Site Directed Mutagenesis Kitを使用して完了した。

【0355】

順方向プライマー:

5' cctgcatggccgcCgccgcCaattcttacaaccttc
caacagtg 3' (配列番号87)

逆方向プライマー:

5' ccactgttgaagggttgtaagaaattGgCGGCGGCGGCGG
ccatgcagg 3' (配列番号88)

大文字は所望の変化を示し、そして得られたプラスミドを、pEmY15(図25)と命名した。

【0356】

実施例32:プラスミドpEmY24の構築

発現プラスミドpEmY15のbar遺伝子をフサリウム・ベネナムのpyrG遺伝子で置き換えるために、以下のプロトコールを実施した。プラスミドpEmY15を、EcoRI及びNotIで消化し、そしてTAEバッファ―中、1%アガロースゲル電気泳動によって精製した。7.1kbの断片を切り出し、そしてQIAQUICK(登録商標)Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。

【0357】

pyrG遺伝子の2.3kbの断片を、以下に示した順方向及び逆方向プライマーを使用してpDM156.2からPCR増幅した。

【0358】

【化19】

順方向プライマー:

5'-ATAAGAATgCGGCCGCTCCAAGGAATAGAATCACT-3' (配列番号89)

逆方向プライマー:

5'-CGgaattcTGTCGTCGAATACTAAC-3' (配列番号90)

【0359】

太字の配列は、それぞれ順方向及び逆方向プライマーの導入したNotI部位及びEcoRI部位に相当する。

【0360】

増幅反応には、50µlの最終容量中、1×ThermoPolバッファ―、200µMのdNTPs、31ngのpDM156.2、1µMの各プライマー、及び1単位のV

10

20

30

40

50

ENT (登録商標) DNAポリメラーゼで構成された。

【0361】

反応を、95にて3分間を1サイクル；それぞれ95にて30秒間、55にて1分間、72にて3分間を30サイクル；そして72にて7分間を1サイクルのためにプログラムしたEPENDORF (登録商標) MASTERCYCLER (登録商標) を使ってインキュベートした。

【0362】

PCR産物を、TAEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動によって分離し、そして2.3kbの断片を切り出し、そしてMINEUTE (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。次に、断片を、EcoRI 及びNotIで消化し、そして消化反応物を、MINEUTE (登録商標) Reaction Cleanup Kitを使用して精製した。断片を、製造業者の取扱説明書に従ってT4 DNAリガーゼを使用して、NotI/EcoRIで消化したpEmY15に連結した。連結混合物を、製造業者の取扱説明書に従ってE.コリXL1 Blueサブクローニンググレード・コンピテント細胞 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 内に形質転換した。形質転換体を配列決定して、PCRエラーの不存在を確実にし、そして、エラーを含まないpyrG断片を含むプラスミドを同定した。得られたプラスミドを、pEmY24 (図26) と命名した。

10

【0363】

実施例33：プラスミドpDM257の構築

20

プラスミドpEmY24 (実施例32) を、AflII及びSnaBIで消化した。6.5kbの断片を、TAEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動によって精製し、ゲルから切り出し、そしてQIAQUICK (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。プラスミドpEJG65を、AflII及びSnaBIで消化した。3.3kbの断片を、TAEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動によって精製し、ゲルから切り出し、そしてQIAQUICK (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。

【0364】

2つの断片を、製造業者の取扱説明書に従ってT4 DNAリガーゼを使用して一つに連結した。連結混合物を、製造業者の取扱説明書に従ってE.コリXL1 Blueサブクローニンググレード・コンピテント細胞内に形質転換した。形質転換体を、配列分析によってスクリーニングし、そして所望の断片を持つプラスミドを含むクローンを同定した。得られたプラスミドを、pDM257 (図27) と命名した。

30

【0365】

実施例34：プラスミドpDM258の構築

プラスミドpDM257を、ScaI及びAflIIで消化し、TAEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動によって精製し、そして4.1kbの断片をゲルから切り出し、そしてQIAQUICK (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。プラスミドpEJG69をさらに、ScaI及びAflIIで消化し、TAEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動によって精製し、そして5.8kbの断片をゲルから切り出し、そして前述の通りにアガロースから抽出した。

40

【0366】

2つの断片を、製造業者の取扱説明書に従ってT4 DNAリガーゼを使用して一つに連結した。連結混合物を、製造業者の取扱説明書に従ってE.コリXL1 Blueサブクローニンググレード・コンピテント細胞内に形質転換した。形質転換体を、配列分析によってスクリーニングし、そして所望のプラスミドを同定し、pDM258 (図28) と命名した。

【0367】

実施例35：フサリウム・ベネナム株JfyS1643 95 04のラクトースオキシダーゼの発現

50

フサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 4 3 9 5 0 4 (t r i 5 p y r G a m y A) のプロトプラストを、実施例 5 に記載の通りに製造した。次に、プロトプラストを、実施例 2 0 に記載の手法に従って、ミクロドチウム・ニバレ・ラクトースオキシダーゼ発現ベクターを保有する p D M 2 5 8 で形質転換して、フサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 4 3 9 5 0 4 株の発現可能性を評価した。フラスコを 2 0 0 r p m で振盪しながら 2 8 ℃ にて 5 日間インキュベートしたことを除いて、実施例 2 1 に記載の通りに、形質転換体を振盪フラスコ内で培養した。

【 0 3 6 8 】

振盪フラスコ・ブロス、B I O M E K (登録商標) 3 0 0 0 (Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, USA) に関連した活性分析を使用してラクトースオキシダーゼ活性についてアッセイした。ラクトースオキシダーゼ・アッセイは、G l u c o s e O x i d a s e A s s a y P r o c e d u r e (K G l o x) (Megazyme, Wicklow, Ireland) の変法バージョンであった。培養上清を、0 . 1 M の M O P S バッファー p H 7 . 0 (サンプル・バッファー) 中に適切に希釈し、その後、希釈したサンプルの 0 倍から 1 / 3 倍 ~ 1 / 9 倍までの希釈系列に希釈した。ラクトースオキシダーゼ標準物質 (Novozymes A / S, Bagsvaerd, Denmark) を、サンプル・バッファー中に 0 . 0 5 6 m g / m l の濃度で始まり、0 . 0 0 7 m g / m l の濃度で終わる 2 倍ステップを使用して希釈した。標準物質を含めたそれぞれの希釈物の総量 2 0 μ l を、9 6 ウェル平底プレートに移した。1 0 0 μ l の P O D 溶液 (リン酸カリウム・バッファー p H 7 + p H i d r o k s i a n s 香酸及びアジ化ナトリウム中、ペルオキシダーゼ、4 A A、安定化剤) をそれぞれのウェルに加え、続いて 1 0 0 μ l のグルコース基質 (サンプル・バッファー中、0 . 5 M グルコース) を付加した。反応速度を、周囲温度 (約 2 6 ℃) にて合計 1 0 分間、5 1 0 n m にて計測した。サンプル濃度を、標準物質としてラクトースオキシダーゼを使用して作成した検量線からの推定によって決定した。最も多くラクトースオキシダーゼを産生する形質転換体を、2 リットル発酵槽における培養と分析のために選択した。

【 0 3 6 9 】

発酵培地 (p H 6) は、1 リットルあたり、2 0 g のダイズ粉、2 0 g のショ糖、2 . 0 g の M g S O ₄ · 7 H ₂ O、2 . 0 g の無水 K H ₂ P O ₄、2 . 0 g の K ₂ S O ₄、5 . 0 g の (N H ₄) ₂ S O ₄、1 . 0 g のクエン酸、0 . 5 m l の 2 0 0 × A M G 微量金属溶液 (ニッケルなし)、及び 2 0 % のマルトース・フィード (maltose feed) 含む 0 . 5 m l のブルニック酸で構成された。発酵を、2 9 . 0 ℃ で + / - 1 . 0 ℃、1 2 0 0 r p m、及び 1 . 0 v v m 通気にて実施したが、この場合、% D O は 3 0 % 超に維持した。

【 0 3 7 0 】

発酵ブロスを、B I O M E K (登録商標) 3 0 0 0 及び B I O M E K (登録商標) N X (Beckman Coulter, Inc, Fullerton CA, USA) に関連して A l p h a - A m y l a s e A s s a y K i t (Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland) を使用してアルファアミラーゼ活性についてアッセイした。発酵ブロスを、先に記載した通りに、ラクトースオキシダーゼ活性についてアッセイした。

【 0 3 7 1 】

得られた最高の形質転換体、フサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 4 3 9 5 0 4 は、2 リットル発酵槽内の欠失がないその他のフサリウム・ベネナツム形質転換体と同等のラクトースオキシダーゼ産生レベルを有したので (図 2 9)、a m y A 遺伝子の欠失が異種タンパク質産生にマイナスの影響を及ぼさないことを示した。しかしながら、欠失は、この菌株及びこの系統のその後の菌株すべての培養ブロス中でアルファアミラーゼ活性を無効にした (図 3 0)。この形質転換体は、現行の産生菌株と同等の異種タンパク質産生能を有し、且つ、発酵中の α アミラーゼ・レベルを減少させたので、フサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 4 3 9 5 0 4 宿主株を、アルカリプロテアーゼ A 遺伝子 (a l p A) の欠失について選択した。

【 0 3 7 2 】

実施例 3 6 : フサリウム・ベネナツム・アルカリプロテアーゼ A (a l p A) 欠失ベク

ター p J f y S 1 6 9 8 7 2 1 0 の製造

フサリウム・ベネナツム A 3 / 5 アルカリプロテアーゼ A (a l p A) 遺伝子 (D N A 配列については配列番号 9 1 及び推定アミノ酸配列については配列番号 9 2) の完全欠失に使用するための上流フランキンク配列を、 G E N O M E W A L K E R (商標) U n i v e r s a l K i t を使用して得た。キットを用いて作成された各ライブラリーを、以下に示した 5 ' 遺伝子特異的プライマー及び 5 ' ネステッド・プライマーを使用した、 5 ' フランキンク配列のための 2 ラウンドの P C R にかけた。

【 0 3 7 3 】

5 ' 遺伝子特異的プライマー :

5 ' G A G G A A T T G G A T T T G G A T G T G T G T G G A A T A 3 ' (配列番号 9 3) 10

5 ' ネステッド・プライマー :

5 ' G G A G T C T T T G T T C C A A T G T G C T C G T T G A 3 ' (配列番号 9 4)

【 0 3 7 4 】

B D G E N O M E W A L K E R (商標) U n i v e r s a l K i t で供給された N e s t e d A d a p t o r P r i m e r 及び 5 ' ネステッド・プライマーを使用して、P C R 産物から配列情報を得た。得られた配列を使用して、空の欠失ベクター p J f y S 1 5 7 9 4 1 1 1 内に挿入のための 5 ' a l p A フランキンク配列の 1 k b の領域を増幅するためのプライマーを設計した。 20

【 0 3 7 5 】

a l p A 5 ' フランキンク配列を、以下に示した領域特異的な順方向及び逆方向プライマーを使用してフサリウム・ベネナツム A 3 / 5 ゲノム D N A から P C R 増幅した。下線を引いた文字は、ベクターの p C R (登録商標) 2 . 1 部分のその後の欠失のための N o t I 部位を表し、イタリック体で印字された文字は、ベクター・クローニングのための A s c I 部位を表す。

【 0 3 7 6 】

【 化 2 0 】

順方向プライマー :

5'-aaaaaaggcgcgccgcccgcGTTACGGTGTTC AAGTACATCTTACA-3' (配列番号95)

逆方向プライマー :

5'-aaaaaaggcgcgccATTGCTATCATCAACTGCCTTTCTT-3' (配列番号96)

【 0 3 7 7 】

増幅反応には、 1 x H E R C U L A S E (登録商標) R e a c t i o n バッファー、 1 2 0 n g のゲノム D N A 、 4 0 0 n M のプライマー、 2 0 0 μ M の d N T P s 、 及び 2 . 5 単位の H E R C U L A S E (登録商標) D N A ポリメラーゼが含まれた。 40

【 0 3 7 8 】

増幅反応を、 9 5 にて 2 分間を 1 サイクル ; それぞれ 9 4 にて 3 0 秒間、 5 6 にて 3 0 秒間、 及び 7 2 にて 1 分 1 0 秒を 2 0 サイクル ; そして 7 2 にて 7 分間を 1 サイクルのためにプログラムした E P P E N D O R F (登録商標) M A S T E R C Y C L E R (登録商標) を使ってインキュベートした。

【 0 3 7 9 】

増幅反応物の一部 5 μ l を、 T A E バッファーを使用した 1 % アガロースゲル電気泳動によって可視化して、前記反応が所望の 1 k b のバンドを生じたことを確実にした。次に、挿入物を、製造業者の取扱説明書に従って T O P O (登録商標) T A C l o n i n g 50

Kitを使用して、増幅反応物からpCR（登録商標）2.1 TOPO（登録商標）内に直接クローニングした。形質転換体を、EcoRIを用いた制限解析によってスクリーニングして、挿入物の存在を確実にし、そして5つの正しい調製物を組み合わせた。挿入物を、AscIを用いた消化によって、pCR（登録商標）2.1から遊離させ、そしてその断片を、先に記載したようにアガロースゲル電気泳動によって精製した。挿入物を、QUICK LIGATION（商標）Kitを使用してAscIで線状化したpJfyS 1579 41 11内にクローニングし、そして連結混合物を、製造業者のプロトコールに従ってE. coli SURE（登録商標）化学的コンピテント細胞の形質転換に使用した。形質転換体を、配列分析によってスクリーニングして、PCRエラーの不存在を確実にした。エラーを含まないフランキング配列を含む1つのプラスミドを、pJfyS 1698 65 15（図31）と命名し、そして3'フランキング配列を挿入するために使用した。

【0380】

a1pA遺伝子の3'フランキング配列を、以下に示した領域特異的な順方向及び逆方向プライマーを使用してフサリウム・ベネナムA3/5ゲノムDNAから増幅した。下線を引いた文字は、その後のラクターゼ欠失のためのNotI部位を表し、イタリック体で印字された文字は、ベクター・クローニングのためのSbfI部位を表す。

【0381】

【化21】

順方向プライマー：

5'-aaaaacctgcaggGGATGTGTGTGGAATAGGATATG-3'（配列番号97）

逆方向プライマー：

5'-aaaaacctgcagggcggccgcCCTCAAGGTGGAGAAATAATCTGT-3'（配列番号98）

【0382】

PCR反応物には、1×HERCULASE（登録商標）Reactionバッファー、120ngのゲノムDNA鋳型、400nMのプライマー、200μMのdNTPs、及び2.5単位のHERCULASE（登録商標）DNAポリメラーゼが含まれた。

【0383】

増幅反応を、95にて2分間を1サイクル；それぞれ94にて30秒間、56にて30秒間、及び72にて1分10秒を20サイクル；そして72にて7分間を1サイクルのためにプログラムしたEPENDORF（登録商標）MASTERCYCLER（登録商標）を使ってインキュベートした。

【0384】

増幅反応物の一部5μlを、TAEバッファー中、1%アガロースゲル上で可視化して、反応で所望の1kbのバンドが生成されたことを確実にした。次に、直接的PCR反応から、1kbの挿入物を、TOPO（登録商標）TA Cloning Kitを使用してpCR（登録商標）2.1 TOPO（登録商標）内にクローニングした。得られたプラスミドを、配列決定して、正しい配列を含むコロニーを同定した。次に、断片を、SbfI消化によってこのプラスミドから遊離させ、そしてTAEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動によって精製した。1kbのバンドを切り出し、そしてMINELUTE（登録商標）Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。

【0385】

次に、この断片を、QUICK LIGATION（商標）Kitを使用して（仔ウシ腸ホスファターゼで処理した）SbfI線状化pJfyS 1698 65 15に連結し、そして連結混合物を、製造業者の取扱説明書に従ってE. coli SURE（登録商

10

20

30

40

50

標) 化学的コンピテント細胞の形質転換に使用した。形質転換体を、Not Iを用いた制限解析によってスクリーニングして、断片が正しい方向で挿入されていたことを確実にし、且つ、配列決定して、期待した配列から逸脱がないことを確実にした。得られたプラスミド p J f y S 1 6 9 8 7 2 1 0 (図 3 2) を、a l p A 遺伝子の欠失のために使用した。

【0386】

実施例 37: tri 5 pyr G amy A a l p A フサリウム・ベネナツム株 J f y S 1 7 6 3 1 1 0 1 の製造

実施例 20 に記載の手法に従って Not I で消化し、ゲルから精製した p J f y S 1 6 9 8 7 2 1 0 で形質転換したフサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 4 3 9 5 0 4 (tri 5 pyr G amy A) (実施例 26) の 3 つの形質転換体を、無菌のつまようじを用いて形質転換プレートから 1 m l あたり 1 2 5 μ g のハイグロマイシン B と 1 0 m M のウリジンを添加した V N O ₃ R L M T 培地の入った新しいプレートに移し、そして室温にて 7 日間インキュベートした。サザン解析のために、3 つの形質転換体のそれぞれからのフサリウム・ベネナツム・ゲノム DNA 2 μ g を、3 4 単位の S p h I で消化した。a l p A 遺伝子の 5 ' フランキング配列に対する D I G プローブを、実施例 21 に記載の方法に従って、以下に示した順方向及び逆方向プライマーを使用して製造した。

【0387】

順方向プライマー:

5 ' GC A C G T T A G G C T C A A G C C A G C A A G G 3 ' (配列番号 9 9)

逆方向プライマー:

5 ' G A G G C T C A T G G A T G T G G C G T T A A T G 3 ' (配列番号 1 0 0)

)

【0388】

実施例 21 に記載の通りに実施したサザン解析では、3 つの形質転換体のうちの 1 つが a l p A 遺伝子部位に欠失カセットの単一コピーを含んでいたことが示されたので、この形質転換体を、フサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 9 8 8 3 2 と命名した。

【0389】

フサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 9 8 8 3 2 に、実施例 5 に記載の通りに孢子形成させ、そして 1 0 ⁵ 個の孢子を、5 0 μ M の F d U と 0 . 1 m M のウリジンを添加した V N O ₃ R L M T 培地の入った直径 1 5 0 m m のプレートに播種した。獲得した孢子単離物を、1 0 μ M の F d U と 0 . 1 m M のウリジンを添加した V N O ₃ R L M T 培地の入った新しいプレートに継代培養した。得られた孢子単離物を、実施例 21 に記載の通りにサザン解析によって分析し、そしてカセットが正しく切り出された 1 つの孢子単離物を同定した。その単離物を、フサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 9 8 9 4 0 4 と命名した。フサリウム・ベネナツム J f y S 1 6 9 8 9 4 0 4 を、実施例 21 に記載の通りに、1 回、孢子精製し、そして 1 つの孢子単離物を、選び出し、そしてフサリウム・ベネナツム J f y S 1 7 6 3 1 1 0 1 (tri 5 pyr G amy A a l p A) と命名した。

【0390】

フサリウム・ベネナツム J f y S 1 7 6 3 1 1 0 1 のプロトプラストを製造し、そして実施例 5 及び 20 に記載の通りに、p D M 2 5 8 で形質転換した。形質転換体を実施例 35 に記載の通りに分析し、そして発酵プロスをアルカリプロテアーゼ活性についてアッセイした。P R O T A Z Y M E (登録商標) A K タブレット (Megazyme, Wicklow, Ireland) を、緩やかに攪拌しながら 2 . 0 m l の 0 . 0 1 % T R I T O N (登録商標) X 1 0 0 中に懸濁した。5 0 0 μ l のこの懸濁液及び P R O T A Z Y M E (登録商標) A K タブレットと共に供給された 5 0 0 μ l のアッセイ・バッファーを、E P P E N D O R F (登録商標) チューブ中で混合し、そして氷上に置いた。2 0 μ l の (0 . 0 1 % の T R I T O N (登録商標) X 1 0 0 中に希釈された) プロテアーゼ・サンプルを加えた。E P P E N D O R F (登録商標) チューブを E P P E N D O R F (登録商標) t h e r m

10

20

30

40

50

omixerに移すことによって、アッセイを開始した。前記EPPENDORF（登録商標）thermomixerは、アッセイ温度に設定されていた。EPPENDORF（登録商標）thermomixerを使って1300rpmにて15分間、チューブをインキュベートした。チューブを氷浴に戻すことによって、インキュベーションを終えた。次に、そのチューブを、氷冷遠心分離機により16000×gにて数分間遠心分離し、そして200μlの上清をマイクロタイプレートに移した。650nMの吸収度を、プロテアーゼ活性の尺度として読取った。

【0391】

amyA欠失と同様に、alpA遺伝子の欠失は、ラクトースオキシダーゼ発現に対してプラスの影響を及ぼさなかった。しかしながら、発酵上清中のアルカリプロテアーゼの弱い活性(side activity)は、10分の1に減少した(図33)。

10

【0392】

実施例38：dps1欠失ベクターpJfyS111の製造

フサリウム・ベネナム・デブシペプチド・シンターゼ(dpsI)遺伝子(DNA配列については配列番号101及び推定アミノ酸配列については配列番号102)の3'フランキング配列を、以下に示した順方向及び逆方向プライマーを使用してフサリウム・ベネナムJfyS1763 11 01ゲノムDNAからPCR増幅した。プライマー内の下線部分は、クローニング用の導入したSbfI部位を表し、イタリック体で印字された部分は、その後のラクタマーゼ欠失用の導入したNotI部位に相当する。ゲノムDNAを、DNEASY（登録商標）Plant Maxi Kitを使用して抽出した。

20

【0393】

【化22】

順方向プライマー：

5'-GACTAAGCCCTGCAGGTTGGTCTCAATCGTCGCGACAG-3' (配列番号103)

逆方向プライマー：

5'-AGTCTACCCCTGCAGGCGGCCGCTGGCATCGGTGGACGTAACACGC-3' (配列番号104)

30

【0394】

増幅反応には、50μlの最終容量中、1×HERCULASE（登録商標）Reactionバッファー、400nMの各プライマー、200μMのdNTPs、100ngのゲノムDNA、及び1.5単位のHERCULASE（登録商標）DNAポリメラーゼが含まれた。

【0395】

増幅反応を、95にて2分間を1サイクル；それぞれ95にて30秒間、57にて30秒間、及び72にて1分20秒間を25サイクル；そして72にて7分間を1サイクルのためにプログラムしたEPPENDORF（登録商標）MASTERCYCLER（登録商標）を使ってインキュベートした。

40

【0396】

増幅反応物を、MINELUTE（登録商標）PCR Purification Kitを使用して精製した。次に、精製した反応を、SbfIで消化し、TAEバッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動にかけた。1kbのバンドをゲルから切り出し、そして、MINELUTE（登録商標）Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。次に、消化したベクターを、製造業者の提案したプロトコールに従ってQUICK LIGATION（商標）Kitを使用して、（仔ウシ腸ホスファターゼによって脱リン酸化された）SbfI消化pJfyS1579 41 11（実施例22）に連結した。得られたクローンを、（挿入物の存在と方向について確認するための

50

) E c o R I を用いた制限解析及び (P C R エラーの不存在を確実にするための) 配列分析によって分析し、そして得られたプラスミドを、 p J f y S 1 8 7 9 3 2 2 (図 3 4) と命名した。

【 0 3 9 7 】

d p s 1 遺伝子の 5' 末端のフランキング配列を得るために、 G E N O M E W A L K E R (商標) U n i v e r s a l K i t を、実施例 3 6 に記載の通りに、以下に示した遺伝子特異的プライマー及び遺伝子特異的ネステッド・プライマーと共に使用した。

【 0 3 9 8 】

遺伝子特異的プライマー：

5' G C T A T T G A G G G G A C T A T C T C C A T G A C T A C A 3' (配列番号 1 0 5) 10

遺伝子の特異的ネステッド・プライマー：

5' G C C T A C C A T C G A C A G C A G T A A G A T A T T C C 3' (配列番号 1 0 6)

【 0 3 9 9 】

5' d p s 1 フランキング配列を、以下で示した順方向及び逆方向プライマーを使用してフサリウム・ベネナツム J f y S 1 7 6 3 1 1 1 ゲノム DNA から増幅した。順方向プライマーの下線部分は、クローニング用の導入した A s c I 部位を表し、イタリック体で印字された部分は、その後の ラクタマーゼ欠失用の導入した N o t I 部位に相当する。増幅反応及びサイクル・パラメーターは、使用したプライマーが以下のものであったこと、使用したアニリング温度が 5 3 であつたこと、伸長時間が 1 分 1 5 秒間であつたことを除いて、先に記載したものと同一であつた。 20

【 0 4 0 0 】

【 化 2 3 】

順方向プライマー：

5'-ATGTGCTACAGGCGCGCCGCGGCGCGAGTTCCAACATGTCTTATTATCC-3'

(配列番号 107) 30

逆方向プライマー：

5'-TACTGTACCGGCGCGCCATCTGAGCCAAGAGACTCATTTCAT-3' (配列番号 108)

【 0 4 0 1 】

P C R 反応物を、 M I N E L U T E (登録商標) P C R P u r i f i c a t i o n K i t を使用して精製した。精製した反応物を、 A s c I で消化し、 T A E バッファーを使用した 1 % アガロースゲル電気泳動にかけた。 0 . 7 k b のバンドをゲルから切り出し、そして、先に記載したようにアガロースから抽出した。 0 . 7 k b のバンドを、 Q U I C K L I G A T I O N (商標) K i t を使用して (A s c I で消化し、そして仔ウシ腸ホスファターゼで脱リン酸化した) p J f y S 1 8 7 9 3 2 2 に連結した。得られたクローンを、配列分析によって分析して、 P C R エラーの不存在を確実にし、そして得られたプラスミドを、 p J f y S 1 1 1 (図 3 5) と命名し、そしてフサリウム・ベネナツム d p s 1 遺伝子の欠失のために使用した。 40

【 0 4 0 2 】

実施例 3 9 : t r i 5 p y r G a m y A a l p A d p s 1 フサリウム・ベネナツム株 J f y S 1 8 7 9 5 7 0 1 の製造

フサリウム・ベネナツム J f y S 1 7 6 3 1 1 0 1 プロトプラストを、実施例 2 0 に記載の手法に従って N o t I 消化し、ゲルから精製した p J f y S 1 1 1 で形質転換したときに、 7 7 個の形質転換体を獲得した。そのうち 4 8 個を、無菌のつまようじを用い 50

て、形質転換プレートから1mlあたり125µgのハイグロマイシンBと10mMのウリジンを添加したVNO₃RLMT培地の入った新しいプレートに移し、そして室温にて7日間インキュベートした。

【0403】

実施例21に記載の通りに得られた7日齢の形質転換体からの4本の1cm寒天プラグを、10mMのウリジンを添加したM400培地25mlに播種することによって、真菌バイオマスを生成した。培養物を、150rpmで振盪しながら28℃にて3日間インキュベートした。寒天プラグは取り除き、そして培養物を、MIRACLOTH(商標)を通して濾過した。集菌したバイオマスを液体窒素で凍らせ、そして菌糸を乳鉢と乳棒を使用して粉碎した。

10

【0404】

65の溶解薬インキュベーション時間を10分から1.5時間に延長したこと除いて、製造業者の取扱説明書に従ってDNEASY(登録商標)PlantMaxiKitを使用して、ゲノムDNAを単離した。

【0405】

2µgのゲノムDNAを、50µlの反応容量中、28単位のNcoI及びSpeIそれぞれを用いて37℃にて22時間、消化した。消化物を、TAEバッファー中、1.0%アガロースゲル電気泳動にかけた。DNAを、ゲル中、0.25MのHClで処理することによって断片化し、1.5MのNaCl 0.5MのNaOHで変性させ、1.5MのNaCl 1MのTris pH8で中和し、次にTURBOBLOTTER(商標)Kitを使用して20×SSC中、NYTRAN(登録商標)Superchargeナイロン膜に移し取った。DNAを、UVSTRATALINKER(商標)を使用して膜にUV架橋し、そして20mlのDIG Easy Hyb中、42℃にて1時間プレハイブリダイズした。

20

【0406】

dps1遺伝子の3'フランキング配列に対するDIGプローブを、実施例21に記載の方法に従って、以下に示した順方向及び逆方向プライマーを使用して製造した。

【0407】

順方向プライマー：

5' CTTGACTATTATCTCACGTTGTCAAG 3' (配列番号109)

30

逆方向プライマー：

5' TCAAGTGTTGTGTAATGTTGGAACA 3' (配列番号110)

【0408】

実施例21に記載の通りに実施したサザン解析は、8つの形質転換体のうち3つがdps1遺伝子座に単一コピーで欠失断片を含んでいたことを示した。1つを、フサリウム・ベネナツムJfyS1879_43_05と命名した。

【0409】

実施例5に記載の通りにフサリウム・ベネナツムJfyS1879_43_05に孢子形成させ、そして10⁵個の孢子を、50µMのFdUと0.1mMのウリジンを添加したVNO₃RLMT培地の入った直径150mmのプレートに播種した。獲得した孢子単離物を、50µMのFdUと0.1mMのウリジンを添加したVNO₃RLMT培地の入った新しいプレートに継代培養した。得られた孢子単離物を、実施例21に従ってサザン解析によって分析し、そして、カセットが正しく切り出された1つの孢子単離物を同定した。その単離物を、フサリウム・ベネナツムJfyS1879_52_3と命名した。フサリウム・ベネナツムJfyS1879_52_03を、実施例21に記載の通りに、1回、孢子精製し、1つの孢子単離物を、選び出し、そしてフサリウム・ベネナツムJfyS1879_57_01(tri5 pyrG amyA alpA dps1)と命名した。

40

50

【0410】

実施例40：トリコデルマ・リーセイhemA欠失ベクターpJfyS120の構築
 トリコデルマ・リーセイのアミノレプリン酸シンターゼ遺伝子を欠失させるために、3'
 'hemAフランキング配列を、以下に示した順方向及び逆方向プライマーを使用してト
 リコデルマ・リーセイRutC30ゲノムDNAからPCR増幅した。プライマーの下線
 部分は、クローニング用の導入したSbfI部位を表し、太字の部分は、その後のラ
 クタマーゼ欠失用の導入したNotII部位に相当する。

【0411】

【化24】

順方向プライマー (#064877)

5'-TATAGCGTACCTGCAGGTGTCATGCCCCGCGGCTTTGCCTTGA-3' (配列番号111)

逆方向プライマー (#064878)

5'-ATGCTGTACCTGCAGGCGGCCGCGCTCCCGATCATCATCCCTCCGAG-3'

(配列番号112)

10

【0412】

増幅反応物は、1×HERCULASE (登録商標) Reactionバッファー、4
 00nMの各プライマー、200μMのdNTPs、125ngのゲノムDNA、及び1
 .5単位のHERCULASE (登録商標) DNAポリメラーゼで構成された。反応を、
 95℃にて2分間を1サイクル；それぞれ95℃にて30秒間、57℃にて30秒間、及
 び72℃にて1分45秒間を25サイクル；そして72℃にて7分間を1サイクルのため
 にプログラムしたEPPENDORF (登録商標) MASTER CYCLER (登録商標
)を使ってインキュベートした。

20

【0413】

PCR産物を、TAEバッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動によって分離
 した。約1.5kbの断片をゲルから切り出し、そしてMINIELUTE (登録商標)
 Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。

30

【0414】

1.5kbの断片を、製造業者に従ってTOPO (登録商標) TA Cloning
 を使用してpCR (登録商標) 2.1内にクローニングし、そして配列決定して、PCR
 エラーの不存在を確実にした。断片を、SbfI消化によってpCR2.1から遊離させ
 、そしてTAEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動によって精製した。1.5k
 bのバンドを、切り出し、そしてMINIELUTE (登録商標) Gel Extract
 ion Kitを使用してアガロースから抽出した。消化した断片を、製造業者に従って
 QUICK LIGATION (商標) Kitを使用して、(事前にSbfIで消化し、
 そして仔ウシ腸ホスファターゼで脱リン酸化しておいた) 汎用欠失ベクターpJfyS1
 579 41 11 (実施例22)に連結した。得られたクローンを、配列分析によって
 分析して、挿入物の存在と方向を確認し、且つ、PCRエラーの不存在を確実にした。得
 られたプラスミドを、pJfyS2010 13 5 (図36)と命名した。

40

【0415】

5'hemAフランキング配列を、以下に示した順方向及び逆方向プライマーを使用し
 てトリコデルマ・リーセイRutC30ゲノムDNAから増幅した。プライマーの下線部
 分は、クローニング用の導入したAscI部位を表し、太字の部分は、その後のラ
 クタマーゼ欠失用の導入したNotII部位に相当する。

【0416】

【化 2 5】

順方向プライマー (#065245) :

5'-CATGGTTTAAACGGCGGGCGCGCCGCGGCCGCAATTCAGAGCATCACGGTTGAGGG

A-3' (配列番号113)

逆方向プライマー (#065246) :

5'-CTTGTTTTGTGCGGGCGCGCCACATGGCCTTGGATTGACGCAGGAC-3' (配列番号114)

10

【0417】

増幅反応を、先の3'フランキンク配列に関する先と同じ手法で実施した。反応物を、95℃にて2分間を1サイクル；それぞれ95℃にて30秒間、53℃にて30秒間、及び72℃にて1分15秒間を25サイクル；そして72℃にて7分間を1サイクルのためにプログラムしたEPPENDORF (登録商標) MASTERCYCLER (登録商標) を使ってインキュベートした。

【0418】

PCR産物を、TAEバッファーを使用した1%アガロースゲル電気泳動によって分離した。約1kbの断片をゲルから切り出し、そしてMINIELUTE (登録商標) Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。

20

【0419】

続いて、1kbの断片を、AscIで消化し、そして先に記載した通りにゲルから精製した。消化した断片を、製造業者に従ってQUICK LIGATION (商標) Kitを使用して、(事前にSbfIで消化し、そして仔ウシ腸ホスファターゼで脱リン酸化しておいた) pJfyS2010-135に連結した。得られたクローンを、配列分析によって分析して、PCRエラーの不存在を確実にし、そして得られたプラスミドを、pJfyS120 (図37) と命名した。プラスミドpJfyS120を、トリコデルマ・リーセイhemA遺伝子を欠失させるのに使用した。

【0420】

30

実施例41：トリコデルマ・リーセイ株RutC30のプロトプラストの製造

T.リーセイ株RutC30の新しい培養物を製造するために、プラグを、10%のグリセロール中に浸したかかる菌株のプラグを含む貯蔵物から新しいPDAプレートに移し、そして28℃にて7日間インキュベートした。胞子を、4mlの0.01% Tween (登録商標) 20中に無菌のスプレッダーを使用して回収し、そして350µlの胞子を、バツフル付き振盪フラスコ内の25mlのYPG_{2%}に植え付けるのに使用し、そして90rpmで振盪しながら28℃にて16時間インキュベートした。菌糸を、そのフィルター上にグレムリンを回収するMILLIPORE (登録商標) STERICUP (登録商標) 250ml 0.2µmフィルター・ユニットを通して培養物を濾過することによって回収した。菌糸を、約100mlの1.2Mソルビトールによって洗浄した。1MのMgSO₄及び0.36単位/mlのキチナーゼ (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) 中、5mg/mlのGLUCANEX (商標) (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) で構成された20mlのプロトプラスト化溶液中に、菌糸を再懸濁した。プロトプラスト化溶液を、125ml振盪フラスコ内、90rpmで振盪しながら34℃にて25分間インキュベートした。氷上でフラスコをインキュベートすることによって、反応を止めた。プロトプラストを円錐の底を有する50ml試験管に移し、そして30mlの氷冷1.2Mソルビトールを加えた。その試験管を、Sorvall RT6000Bスウィングバケット遠心分離機 (Thermo-Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) を使って377×g、室温 (約24~28℃) にて10分間遠心分離した。上清を捨て、そしてプロトプラストを、30mlの1.2Mソルビトールによって洗浄した。試験管での遠心分離を繰り返し、

40

50

そして上清を捨てた。ペレットを、1.2 Mソルビトール中に再懸濁し、そして10 μ lのサンプルを、血球計 (VWR, West Chester, PA) を使用してプロトプラストの濃度を測定するために取り出した。プロトプラストの入った試験管を、377 x gにて遠心分離し、そしてプロトプラストを、2 x 10⁸プロトプラスト/mlの終濃度にTrSTC中に再懸濁した。

【0421】

実施例42：トリコデルマ・リーセイ・アミノレブリン酸シンターゼ (hemA) 遺伝子の欠失

トリコデルマ・リーセイ RutC30プロトプラストを、以下に述べた例外を伴いながら実施例20に記載の通りにNotIで消化し、ゲルから精製した欠失ベクター pJfyS120で形質転換した。100 μ lのプロトプラストを、14 mlポリプロピレンチューブに移し、そしてそこに2 μ gのゲルから精製したpJfyS120を加えた。250 μ lのポリエチレングリコール4000を加え、そして6回反転することによって、そのチューブを緩やかに混合した。チューブを、34にて30分間インキュベートし、その後、3 mlのTrSTCを加えた。チューブの内容物を、1 Mのショ糖及び5 mMのアミノレブリン酸 (ALA) を含む2枚の150 mm PDAプレート上に播種し、そしてそれを、28にて16時間インキュベートした。PDA、100 μ g/mlのハイグロマイシンB、及び5 mMのALAを含む50に冷やした重層を、プレート上に注ぎ入れ、そして室温にて30分間冷ました。次に、そのプレートを28にて5日間インキュベートした。

【0422】

形質転換は、134個の形質転換体をもたらした。各形質転換体を、5 mMのALA及び25 μ g/mlのハイグロマイシンBを含む5 mlのPDAが入った6ウェル細胞培養プレートの1つのウェルに移し、そして28にて5日間インキュベートした。形質転換体から、添加したALAを含まないTrMM培地の入った別の6ウェルプレートに少量の胞子を削り落とすことによって、形質転換体をALA栄養要求性について試験した。次に、栄養要求性を示す3つの形質転換体を、5 mMのALAを含むPDAプレートに継代培養し、そして28にて5日間インキュベートした。サザン解析のためのゲノムDNAを製造するために、5日齢の形質転換体の4本の1 cm²プラグを、125 ml振盪フラスコ内、5 mMのALAを含む25 mlのYPG_{2%}培地に植菌し、4150 rpm、28にて8時間培養した。実施例8に記載したものと同一方法を使用して、ゲノムDNAを培養物から単離した。

【0423】

サザン解析のために、2 μ gのゲノムDNAを、50 μ lの反応容量中、33単位のNcoIで消化し、そしてTAEバッファ中、1%アガロース電気泳動にかけた。実施例8に記載の通りに、ゲル内のDNAを、脱プリン化し、変性させ、中和し、次にNYTRAN (登録商標) Supercharge膜に移し取った。DNAを、UV STRAT ALINKER (商標) を使用して膜にUV架橋し、そして20 mlのDIG Easy Hyb中、42にて1時間プレハイブリダイズした。

【0424】

hemA遺伝子の3'側面に対するプローブを、以下に示した順方向及び逆方向プライマーを用いて、製造業者の取扱説明書に従ってPCR Dig Probe Synthesis Kitを使用して製造した。

【0425】

順方向 (065764番)

5' GACGCATACAATAACAAGCATATGCTGTTGGTGTCT

3' (配列番号115)

逆方向 (065765番)

5' AAGGCGTCTGGAAACAGAAGCTGCT 3' (配列番号116)

)

10

20

30

40

50

【0426】

増幅反応物は、1×HERCULASE（登録商標）Reactionバッファー、400nMの各プライマー、200μMのDIG標識dUTP含有dNTPs、125ngのT・リーセイRutC30ゲノムDNA、及び1.5単位のHERCULASE（登録商標）DNAポリメラーゼで構成された。反応を、95℃にて2分間を1サイクル；それぞれ95℃にて30秒間、58℃にて30秒間、及び72℃にて45秒間を25サイクル；そして72℃にて7分間を1サイクルのためにプログラムしたEPENDORF（登録商標）MASTERCYCLER（登録商標）を使ってインキュベートした。

【0427】

プローブを、TAEバッファー中、1%アガロースゲル電気泳動によって精製し、そしてプローブに相当するバンドを切り出し、そしてMINELETE（登録商標）Gel Extraction Kitを使用してアガロースから抽出した。プローブを、5分間煮沸し、そして10mlのDIG Easy Hybに加えてハイブリダイゼーション溶液を調製した。ハイブリダイゼーションを、42℃にて15～17時間実施した。次に、膜を、高ストリンジェンシー条件下、2×SSC+0.1%のSDS中、室温にて5分間洗浄し、続いて0.1×SSC+0.1%のSDS中、それぞれ65℃にて15分間、2回洗浄した。プローブ 標的ハイブリッドを、製造業者の取扱説明書に従って化学発光法（Roche Diagnostics Indianapolis, IN, USA）によって検出した。

【0428】

3つの形質転換体のサザン解析は、3つのALA栄養要求性形質転換体すべてが、hemA遺伝子座に単一コピーで欠失カセットを含んでいることを示した。1つの形質転換体JfyS2010_52_65を、hpt及びtkマーカールを取り出すのに使用した。5mMのALAプレートを含む新しいPDAプレートに7日齢の培養物のプラグを移し、そして28℃にて7日間インキュベートすることによって、孢子の新しいプレートを製造した。無菌のスプレッダーを使用して、10mlの0.01% TWEENR20中に孢子を回収した。孢子の濃度を、血球計を使用して測定し、そして10⁶個の孢子を、1mMのALAと1μMのFdUを含むTrMM_G培地の入った150mmプレートに播種した。

【0429】

16個のFdU耐性孢子単離物を獲得し、そしてそれらの孢子単離物のうちの10個から、先に記載したようにDNAを抽出した。単離物を、先に記載したようにサザン解析によって分析し、そしてその結果は、10個の孢子単離物すべてで欠失カセットの反復の間のhpt/tk領域が切り出されたことを示した。1つのフサリウム・ベネナムの株JfyS2010_52_65_02（hemA、hpt⁻、tk⁻）を選択し、そして保管した。

【0430】

本発明を、以下の番号付けした段落によってさらに説明する：

[1]糸状菌細胞のゲノム内の遺伝子又はその一部を欠失させる方法であって、以下のステップ：

(a)以下の：

(i)発現されるとドミナント・ポジティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ドミナント・ポジティブ選択マーカールコード配列を含んでなる第1ポリヌクレオチド；

(ii)発現されるとネガティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ネガティブ選択マーカールコード配列を含んでなる第2ポリヌクレオチド；

(iii)前記第1及び第2ポリヌクレオチドの5'側に位置する第1反復配列、及び第1及び第2ポリヌクレオチドの3'側に位置する第2反復配列、ここで、前記第1及び第2反復配列は同一の配列を含んでなる；並びに

(iv)構成要素(i)、(ii)、及び(iii)の5'側に位置する第1フランキング配列、及び構成要素(i)、(ii)、及び(iii)の3'側に位置する第2フランキング配列、ここで、前記第1フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第1領

10

20

30

40

50

域と同一であり、且つ、前記第 2 フランキング配列は前記系状菌細胞のゲノムの第 2 領域と同一であり、ここで、(1) 前記第 1 領域が前記系状菌細胞の遺伝子又はその一部の 5' 側に位置し、且つ、前記第 2 領域が前記系状菌細胞の遺伝子又はその一部の 3' 側に位置するか、(2) 前記第 1 及び第 2 領域の両方が前記系状菌細胞の遺伝子内に位置しているか、或いは(3) 前記第 1 及び第 2 領域の一方が前記系状菌細胞の遺伝子内に位置し、且つ、前記第 1 及び第 2 領域の他方が前記系状菌細胞の遺伝子の 5' 若しくは 3' 側に位置する；

を含んでなる核酸構築物を、前記系状菌細胞内に導入し、ここで、前記第 1 及び第 2 フランキング配列が、それぞれ前記系状菌細胞の第 1 及び第 2 領域と分子間相同組換えを受けて、遺伝子又はその一部を欠失させ、及び前記核酸構築物で置き換え；

(b) ポジティブ選択を適用することによって、ステップ (a) からドミナント・ポジティブ選択表現型を有する細胞を選択及び単離し；並びに

(c) ネガティブ選択を適用することによって、ステップ (b) のドミナント・ポジティブ選択表現型を有する選択された細胞からネガティブ選択表現型を有する細胞を選択及び単離して、前記第 1 及び第 2 反復配列に分子内相同組換えを強制的に施し、前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドを欠失させること、
を含んでなる前記方法。

【 0 4 3 1 】

[2] 前記優性のドミナント・ポジティブ選択マーカーが、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (h p t)、ホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (p a t)、プレオマイシン、ゼオシン、及びフレオマイシン耐性遺伝子 (b l e)、アセトアミダーゼ遺伝子 (a m d S)、ピリチアミン耐性遺伝子 (p t r A)、ピュロマイシン N アセチル・トランスフェラーゼ遺伝子 (p a c)、ネオマイシンカナマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (n e o)、アセチル C o A シンターゼ遺伝子 (a c u A)、D セリン・デヒドラターゼ遺伝子 (d s d A)、A T P スルフィラーゼ遺伝子 (s C)、ミトコンドリア A T P シンターゼ・サブユニット 9 遺伝子 (o l i C)、アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3' (I) (a p h (3') I) 遺伝子、並びにアミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3' (I I) (a p h (3') I I) 遺伝子から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、段落 1 に記載の方法。

【 0 4 3 2 】

[3] 前記ネガティブ選択マーカーが、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k)、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (p y r G)、及びシトシン・デアミナーゼ遺伝子 (c o d A) から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、段落 1 に記載の方法。

【 0 4 3 3 】

[4] 前記ドミナント・ポジティブ選択マーカーが、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (h p t) のコード配列によってコードされる、段落 1 に記載の方法。

【 0 4 3 4 】

[5] 前記 h p t コード配列を、E . コリのハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子から得る、段落 4 に記載の方法。

【 0 4 3 5 】

[6] 前記ネガティブ選択マーカーが、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k) のコード配列によってコードされる、段落 1 に記載の方法。

【 0 4 3 6 】

[7] 前記 t k コード配列を、単純ヘルペスウイルス 1 型遺伝子から得る、段落 6 に記載の方法。

【 0 4 3 7 】

[8] 前記ドミナント・ポジティブ選択マーカーが、ハイグロマイシン・ホスホトラン

10

20

30

40

50

スフェラーゼ遺伝子 (h p t) のコード配列によってコードされ、且つ、前記ネガティブ選択マーカが、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k) のコード配列によってコードされる、段落 1 に記載の方法。

【 0 4 3 8 】

[9] 前記糸状菌細胞が、アクレモニウム、アスペルギルス、アウレオバシジウム、ブジャカンデラ、セリポリオプシス、クリソスポリウム、コプリヌス、コリオラス、クリプトコッカス、フィリバシジウム、フサリウム、ヒューミコラ、マグナボルセ、ムコール、マイセリオフトラ、ネオカリマスチックス、ニューロスボラ、パエシロマイセス、ペニシリウム、ファネロカエテ、フレビア、ピロマイセス、プレウロツス、シゾフィラム、タラロマイセス、サーモアスカス、チエラピア、トリボクラジウム、トラメテス、又はトリコ

10

【 0 4 3 9 】

[1 0] 前記糸状菌細胞が、p y r G 栄養要求性変異株である、段落 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 0 4 4 0 】

[1 1] (d) 対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、ステップ (c) の単離した細胞内に導入するステップをさらに含んでなる、段落 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 0 4 4 1 】

[1 2] 前記核酸構築物が、線状化した組換えベクター内に含まれている、段落 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【 0 4 4 2 】

[1 3] 前記第 1 領域が、遺伝子又はその一部の 5 ' 側に位置し、且つ、前記第 2 領域が、糸状菌細胞の遺伝子又はその一部の 3 ' 側に位置する、段落 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 0 4 4 3 】

[1 4] 前記第 1 及び第 2 領域の両方が、糸状菌細胞の遺伝子内に位置している、段落 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 0 4 4 4 】

[1 5] 前記第 1 及び第 2 領域のうち的一方が、遺伝子内に位置し、且つ、前記第 1 及び第 2 領域のもう一方が、糸状菌細胞の遺伝子の 5 ' 又は 3 ' 側に位置する、段落 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【 0 4 4 5 】

[1 6] 前記第 1 及び第 2 反復配列が、前記第 1 フランキング配列又は前記第 2 フランキング配列のいずれかと同一である、段落 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 0 4 4 6 】

[1 7] 全遺伝子が完全に欠失され、外来 DNA を残さない、段落 1 に記載の方法。

【 0 4 4 7 】

[1 8] 糸状菌細胞のゲノム内の遺伝子又はその一部を欠失させるための核酸構築物であって、以下の：

40

(i) 発現されるとドミナント・ポジティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ドミナント・ポジティブ選択マーカコード配列を含んでなる第 1 ポリヌクレオチド；

(i i) 発現されるとネガティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ネガティブ選択マーカコード配列を含んでなる第 2 ポリヌクレオチド；

(i i i) 前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドの 5 ' 側に位置する第 1 反復配列、及び前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドの 3 ' 側に位置する第 2 反復配列、ここで、前記第 1 及び第 2 反復配列は同一の配列を含んでなる；並びに

(i v) 構成要素 (i)、(i i)、及び (i i i) の 5 ' 側に位置する第 1 フランキング配列、及び構成要素 (i)、(i i)、及び (i i i) の 3 ' 側に位置する第 2 フランキング配列、ここで、前記第 1 フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第 1 領域

50

と同一であり、且つ、前記第 2 フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第 2 領域と同一であり、ここで、(1) 前記第 1 領域が前記糸状菌細胞の遺伝子又はその一部の 5 ' 側に位置し、且つ、前記第 2 領域が前記糸状菌細胞の遺伝子又はその一部の 3 ' 側に位置するか、(2) 前記第 1 及び第 2 領域の両方が前記糸状菌細胞の遺伝子内に位置しているか、或いは(3) 前記第 1 及び第 2 領域の一方が前記糸状菌細胞の遺伝子内に位置し、且つ、前記第 1 及び第 2 領域の他方が、前記糸状菌細胞の遺伝子の 5 ' 又は 3 ' 側に位置する；

を含んでなり、ここで、前記第 1 及び第 2 フランキング配列が、それぞれ前記糸状菌細胞の第 1 及び第 2 領域と分子間相同組換えを受けて、遺伝子又はその一部を欠失させ、及び前記核酸構築物で置き換え；そして前記第 1 及び第 2 反復配列が分子内相同組換えを受けて、前記第 1 及び第 2 ポリヌクレオチドを欠失させる、前記核酸構築物。

10

【 0 4 4 8 】

[1 9] 前記ドミナント・ポジティブ選択マーカが、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (h p t)、ホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (p a t)、プレオマイシン、ゼオシン、及びフレオマイシン耐性遺伝子 (b l e)、アセトアミダーゼ遺伝子 (a m d S)、ピリチアミン耐性遺伝子 (p t r A)、ピューロマイシン N アセチル - トランスフェラーゼ遺伝子 (p a c)、ネオマイシン カナマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (n e o)、アセチル C o A シンターゼ遺伝子 (a c u A)、D セリン・デヒドラターゼ遺伝子 (d s d A)、A T P スルフィラーゼ遺伝子 (s C)、ミトコンドリア A T P シンターゼ・サブユニット 9 遺伝子 (o l i C)、アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3 ' (I) (a p h (3 ') I) 遺伝子、並びにアミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3 ' (I I) (a p h (3 ') I I) 遺伝子から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、段落 1 8 に記載の核酸構築物。

20

【 0 4 4 9 】

[2 0] 前記ネガティブ選択マーカが、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k)、オロチジン 5 ' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (p y r G)、及びシトシン・デアミナーゼ遺伝子 (c o d A) から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、段落 1 8 に記載の核酸構築物。

【 0 4 5 0 】

[2 1] 前記ドミナント・ポジティブ選択マーカが、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (h p t) のコード配列によってコードされる、段落 1 8 に記載の核酸構築物。

30

【 0 4 5 1 】

[2 2] 前記 h p t コード配列を、E . コリのハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子から得る、段落 2 1 に記載の核酸構築物。

【 0 4 5 2 】

[2 3] 前記ネガティブ選択マーカが、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k) のコード配列によってコードされる、段落 1 8 に記載の核酸構築物。

【 0 4 5 3 】

[2 4] 前記 t k コード配列を、単純ヘルペスウイルス 1 型遺伝子から得る、段落 2 3 に記載の核酸構築物。

40

【 0 4 5 4 】

[2 5] 前記ドミナント・ポジティブ選択マーカが、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (h p t) のコード配列によってコードされ、且つ、前記ネガティブ選択マーカが、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k) のコード配列によってコードされる、段落 1 8 に記載の核酸構築物。

【 0 4 5 5 】

[2 6] 前記第 1 領域が、遺伝子又はその一部の 5 ' 側に位置し、且つ、前記第 2 領域が、糸状菌細胞の遺伝子又はその一部の 3 ' 側に位置する、段落 1 8 ~ 2 5 のいずれか 1

50

項に記載の核酸構築物。

【0456】

[27] 前記第1及び第2領域の両方が、糸状菌細胞の遺伝子内に位置している、段落18～25のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【0457】

[28] 前記第1及び第2領域のうち的一方が、遺伝子内に位置し、且つ、前記第1及び第2領域のもう一方が、糸状菌細胞の遺伝子の5'又は3'側に位置する、段落18～25のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【0458】

[29] 前記第1及び第2反復配列が、前記第1フランキング配列又は前記第2フランキング配列のいずれかと同一である、段落18～28のいずれか1項に記載の核酸構築物。

10

【0459】

[30] 段落18～29のいずれか1項に記載の核酸構築物を含んでなる組換えベクター。

【0460】

[31] 段落18～29のいずれか1項に記載の核酸構築物を含んでなる組換え糸状菌細胞。

【0461】

[32] 糸状菌細胞のゲノム内にポリヌクレオチドを導入する方法であって、以下のステップ：

20

(a) 以下の：

(i) 第1の対象ポリヌクレオチド；

(ii) 発現されるとドミナント・ポジティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ドミナント・ポジティブ選択マーカークード配列を含んでなる第2ポリヌクレオチド；

(iii) 発現されるとネガティブ選択表現型を前記糸状菌細胞に与える、ネガティブ選択マーカークード配列を含んでなる第3ポリヌクレオチド；

(iv) 前記第2及び第3ポリヌクレオチドの5'側に位置する第1反復配列、並びに前記第2及び第3ポリヌクレオチドの3'側に位置する第2反復配列、ここで、前記第1及び第2反復配列は同一の配列を含んでなり、且つ、前記第1の対象ポリヌクレオチドは前記第1反復の5'側に位置するか又は前記第2反復の3'側に位置する；並びに

30

(v) 構成要素(i)(ii)、(iii)、及び(iv)の5'側に位置する第1フランキング配列、及び構成要素(i)、(ii)、(iii)、及び(iv)の3'側に位置する第2フランキング配列、ここで、前記第1フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第1領域と同一であり、且つ、前記第2フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第2領域と同一である；

を含んでなる核酸構築物を糸状菌細胞内に導入し、ここで、前記第1及び第2フランキング配列は、それぞれ前記糸状菌細胞のゲノムの第1及び第2領域と分子間相同組換えを受けて、前記核酸構築物を前記糸状菌細胞のゲノム内に導入し；

(b) ポジティブ選択を適用することによって、ステップ(a)からドミナント・ポジティブ選択表現型を有する細胞を選択し；並びに

40

(c) ネガティブ選択を適用することによって、ステップ(b)のドミナント・ポジティブ選択表現型を有する選択された細胞からネガティブ選択表現型を有する細胞を選択及び単離して、前記第1及び第2反復配列に分子内相同組換えを強制的に施し、前記第2及び第3ポリヌクレオチドを欠失させること、を含んでなる、前記方法。

【0462】

[33] 前記ドミナント・ポジティブ選択マーカークード配列が、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(hpt)、ホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子(pat)、ブレオマイシン、ゼオシン、及びフレオマイシン耐性遺伝子(ble)

50

、アセトアミダーゼ遺伝子 (amdS)、ピリチアミン耐性遺伝子 (ptrA)、ピューロマイシン N アセチル-トランスフェラーゼ遺伝子 (pac)、ネオマイシン カナマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (neo)、アセチル CoA シンターゼ遺伝子 (acuA)、D セリン・デヒドラターゼ遺伝子 (dsdA)、ATP スルフィラーゼ遺伝子 (sC)、ミトコンドリア ATP シンターゼ・サブユニット 9 遺伝子 (oliC)、アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3' (I) (aph(3')I) 遺伝子、並びにアミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ 3' (II) (aph(3')II) 遺伝子から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、段落 32 に記載の方法。

【0463】

[34] 前記ネガティブ選択マーカが、チミジンキナーゼ遺伝子 (tk)、オロチニン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (pyrG)、及びシトシン・デアミナーゼ遺伝子 (codA) から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、段落 32 に記載の方法。

【0464】

[35] 前記ドミナント・ポジティブ選択マーカが、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (hpt) のコード配列によってコードされる、段落 32 に記載の方法。

【0465】

[36] 前記 hpt コード配列を、E コリのハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子から得る、段落 35 に記載の方法。

【0466】

[37] 前記ネガティブ選択マーカが、チミジンキナーゼ遺伝子 (tk) のコード配列によってコードされる、段落 32 に記載の方法。

【0467】

[38] 前記 tk コード配列を、単純ヘルペスウイルス 1 型遺伝子から得る、段落 37 に記載の方法。

【0468】

[39] 前記ドミナント・ポジティブ選択マーカが、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (hpt) のコード配列によってコードされ、且つ、前記ネガティブ選択マーカが、チミジンキナーゼ遺伝子 (tk) のコード配列によってコードされる、段落 32 に記載の方法。

【0469】

[40] 前記糸状菌細胞が、アクレモニウム、アスペルギルス、アウレオバシジウム、ブジャカンデラ、セリポリオプシス、クリソスポリウム、コプリヌス、コリオラス、クリプトコッカス、フィリバシジウム、フサリウム、ヒューミコラ、マグナボルセ、ムコール、マイセリオフトラ、ネオカリマスチックス、ニューロスボラ、パエシロマイセス、ペニシリウム、ファネロカエテ、フレビア、ピロマイセス、プレウロツス、シゾフィラム、タラロマイセス、サーモアスカス、チエラピア、トリボクラジウム、トラメテス、又はトリコデルマ細胞から成る群から選択される、段落 32 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0470】

[41] 前記糸状菌細胞が、pyrG 栄養要求性変異株である、段落 32 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0471】

[42] 前記核酸構築物が、線状化した組換えベクター内に含まれている、段落 32 ~ 41 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0472】

[43] 前記第 1 領域が、遺伝子又はその一部の 5' 側に位置し、且つ、前記第 2 領域が、糸状菌細胞の遺伝子又はその一部の 3' 側に位置する、段落 32 ~ 42 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0473】

[44] 前記第1及び第2領域の両方が、糸状菌細胞の遺伝子内に位置している、段落32～42のいずれか1項に記載の方法。

【0474】

[45] 前記第1及び第2領域のうち的一方が、遺伝子内に位置し、且つ、前記第1及び第2領域のもう一方が、糸状菌細胞の遺伝子の5'又は3'側に位置する、段落32～42のいずれか1項に記載の方法。

【0475】

[46] 前記第1及び第2反復配列が、前記第1フランキング配列又は前記第2フランキング配列のいずれかと同一である、段落32～45のいずれか1項に記載の方法。

10

【0476】

[47] 糸状菌細胞のゲノム内にポリヌクレオチドを導入するための核酸構築物であって、以下の：

(i) 第1の対象ポリヌクレオチド；

(ii) 発現されるとドミナント・ポジティブ選択表現型を糸状菌細胞に与える、ドミナント・ポジティブ選択マーカークード配列を含んでなる第2ポリヌクレオチド；

(iii) 発現されるとネガティブ選択表現型を糸状菌細胞に与える、ネガティブ選択マーカークード配列を含んでなる第3ポリヌクレオチド；

(iv) 前記第1及び第2ポリヌクレオチドの5'側に位置する第1反復配列、及び前記第1及び第2ポリヌクレオチドの3'側に位置する第2反復配列、ここで、前記第1及び第2反復配列が同一の配列を含んでなり、且つ、対象ポリペプチドをコードする前記第1ポリヌクレオチドは前記第1反復の5'側に位置するか又は前記第2反復の3'側に位置する；並びに

20

(v) 構成要素(i)、(ii)、(iii)、及び(iv)の5'側に位置する第1フランキング配列、及び構成要素(i)、(ii)、(iii)、及び(iv)の3'側に位置する第2フランキング配列、ここで、前記第1フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第1領域と同一であり、且つ、前記第2フランキング配列は前記糸状菌細胞のゲノムの第2領域と同一である；

を含んでなり、ここで、前記第1及び第2フランキング配列は、それぞれ前記糸状菌細胞のゲノムの第1及び第2領域と分子間相同組換えを受けて、前記糸状菌細胞のゲノム内に前記核酸構築物を導入し；並びに前記第1及び第2反復配列は、分子内相同組換えを受けて、前記第2及び第3ポリヌクレオチドを欠失させることができる、前記核酸構築物。

30

【0477】

[48] 前記ドミナント・ポジティブ選択マーカークード配列が、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(hpt)、ホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子(pat)、プレオマイシン、ゼオシン、及びフレオマイシン耐性遺伝子(ble)、アセトアミダーゼ遺伝子(amdS)、ピリチアミン耐性遺伝子(ptrA)、ピューロマイシン N アセチル・トランスフェラーゼ遺伝子(pac)、ネオマイシン カナマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(neo)、アセチルCoAシンターゼ遺伝子(acuA)、D セリン・デヒドラターゼ遺伝子(dsdA)、ATPスルフリラーゼ遺伝子(sC)、ミトコンドリアATPシンターゼ・サブユニット9遺伝子(oliC)、アミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ3'(I)(aph(3'))I)遺伝子、並びにアミノグルコシド・ホスホトランスフェラーゼ3'(II)(aph(3'))II)遺伝子から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、段落47に記載の核酸構築物。

40

【0478】

[49] 前記ネガティブ選択マーカークード配列が、チミジンキナーゼ遺伝子(tk)、オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子(pyrg)、及びシトシン・デアミナーゼ遺伝子(codA)から成る群から選択される遺伝子のコード配列によってコードされる、段落47に記載の核酸構築物。

50

【0479】

[50] 前記ドミナント・ポジティブ選択マーカが、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (h p t) のコード配列によってコードされる、段落47に記載の核酸構築物。

【0480】

[51] 前記ネガティブ選択マーカが、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k) のコード配列によってコードされる、段落47に記載の核酸構築物。

【0481】

[52] 前記ドミナント・ポジティブ選択マーカが、ハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (h p t) のコード配列によってコードされ、且つ、前記ネガティブ選択マーカが、チミジンキナーゼ遺伝子 (t k) のコード配列によってコードされる、段落47に記載の核酸構築物。

10

【0482】

[53] 前記 h p t コード配列を、E. コリのハイグロマイシン・ホスホトランスフェラーゼ遺伝子から得る、段落47に記載の核酸構築物。

【0483】

[54] 前記 t k コード配列を、単純ヘルペスウイルス1型遺伝子から得る、段落47に記載の核酸構築物。

【0484】

[55] 前記第1領域が、遺伝子又はその一部の5'側に位置し、且つ、前記第2領域が、糸状菌細胞の遺伝子又はその一部の3'側に位置する、段落47~54のいずれか1項に記載の核酸構築物。

20

【0485】

[56] 前記第1及び第2領域の両方が、糸状菌細胞の遺伝子内に位置している、段落47~54のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【0486】

[57] 前記第1及び第2領域のうち的一方が、遺伝子内に位置し、且つ、前記第1及び第2領域のもう一方が、糸状菌細胞の遺伝子の5'又は3'側に位置する、段落47~54のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【0487】

[58] 前記第1及び第2反復配列が、前記第1フランキング配列又は前記第2フランキング配列のいずれかと同一である、段落47~57のいずれか1項に記載の核酸構築物。

30

【0488】

[59] 段落47~58のいずれか1項に記載の核酸構築物を含んでなる組換えベクター。

【0489】

[60] 段落47~58のいずれか1項に記載の核酸構築物を含んでなる組換え糸状菌細胞。

【0490】

[61] ポリペプチドを製造する方法であって、以下のステップ：(a) ポリペプチドの産生を促す条件下、段落1~17のいずれか1項に従って得た糸状菌細胞を培養し；及び(b) 前記ポリペプチドを回収すること、を含んでなる前記方法。

40

【0491】

[62] 前記ポリペプチドが、糸状菌細胞にとって天然のものである、段落61に記載の方法。

【0492】

[63] 前記ポリペプチドが、ポリヌクレオチドによってコードされた外来(異種)ポリペプチドであり、そして前記ポリヌクレオチドが、前記糸状菌細胞内に導入されている、段落61に記載の方法。

50

【0493】

【64】ポリペプチドを製造する方法であって、以下のステップ：(a)ポリペプチドの産生を促す条件下、段落32～46のいずれか1項に従って得た糸状菌細胞を培養し；及び(b)前記ポリペプチドを回収する、を含んでなる前記方法。

【0494】

【65】前記ポリペプチドが、糸状菌細胞にとって天然のものである、段落65に記載の方法。

【0495】

【66】前記ポリペプチドが、ポリヌクレオチドによってコードされた外来(異種)ポリペプチドであり、そして前記ポリヌクレオチドが、前記糸状菌細胞内に導入されている、段落65に記載の方法。

10

【0496】

【67】以下の：(a)配列番号52の成熟ポリペプチドに対して、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、よりいっそう好ましくは少なくとも90%、よりいっそう好ましくは少なくとも95%の同一性、そして最も好ましくは少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ；(b)好ましくは少なくとも中程度のストリンジェンシー条件下、より好ましくは少なくとも中程度のストリンジェンシー条件下、よりいっそう好ましくは少なくとも高いストリンジェンシー条件下、そして最も好ましくは非常に高いストリンジェンシー条件下で配列番号51の成熟ポリペプチド・コード配列又はその完全長の相補鎖にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされたオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ；及び(c)配列番号51の成熟ポリペプチド・コード配列に対して好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、よりいっそう好ましくは少なくとも90%、よりいっそう好ましくは少なくとも95%の同一性、そして最も好ましくは少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドによってコードされたオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ、から成る群から選択される、単離されたオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ。

20

【0497】

【68】配列番号52、又はオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ活性を有するその断片を含んでなるか、又はそれから成る、段落67に記載の単離されたオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ。

30

【0498】

【69】段落67又は68に記載のオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【0499】

【70】配列番号51又はオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼ活性を有する断片をコードするその部分配列を含んでなる、又はそれから成る、段落69に記載の単離されたポリヌクレオチド。

40

【0500】

【71】段落69又は70に記載のポリヌクレオチドを含んでなる核酸構築物。

【0501】

【72】段落69又は70に記載のポリヌクレオチドを含んでなる組換え発現ベクター。

【0502】

【73】段落69又は70に記載のポリヌクレオチドを含んでなる組換え糸状菌細胞。

【0503】

【74】オロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでなる核酸構築物を含んでなる宿主細胞を、そのポリペプチドの産生を促す条件下

50

で培養するステップ：を含んでなる、段落 6 7 又は 6 8 に記載のオロチジン 5' リン酸デカルボキシラーゼを製造する方法。

【 0 5 0 4 】

本明細書中に記載され、そして請求した発明は、本明細書中に開示される具体的な態様によって範囲を限定されるものではない。何故ならば、それらの態様は本発明のいくつかの観点为例示するものであるからである。いずれの同等の態様が本願発明の範囲内にあることが意図される。実際、本明細書中に示し、そして記載したものに加え、本発明の様々な修飾形態が前述の説明から当業者に明らかになるであろう。そういった修飾形態もまた、添付の請求項の範囲内にあるものとする。抵触する場合には、定義を含めた本開示が調整するであろう。

10

【 図 1 】

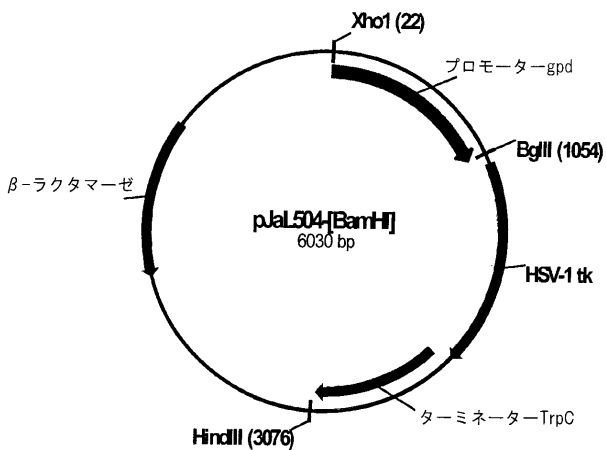


Fig. 1

【 図 2 】

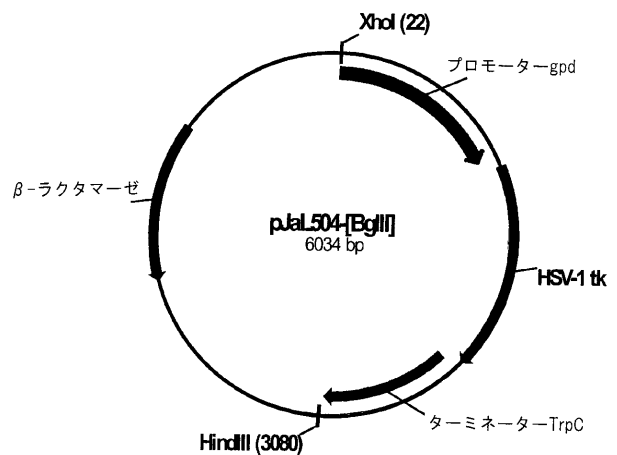


Fig. 2

【 図 3 】

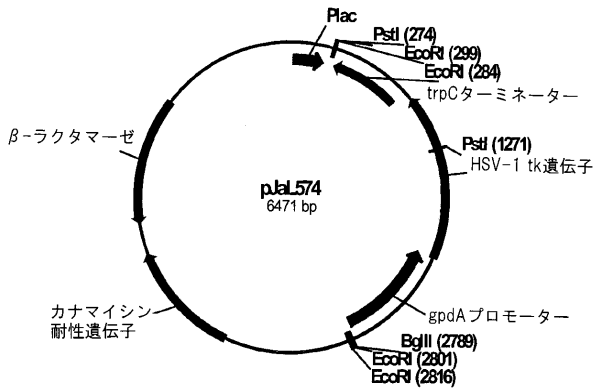


Fig. 3

【 図 4 】

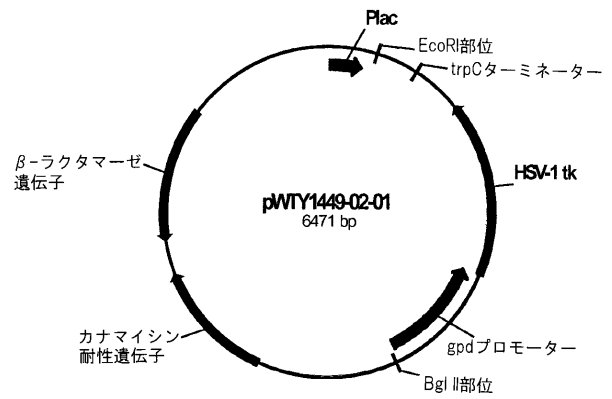


Fig. 4

【 図 5 】

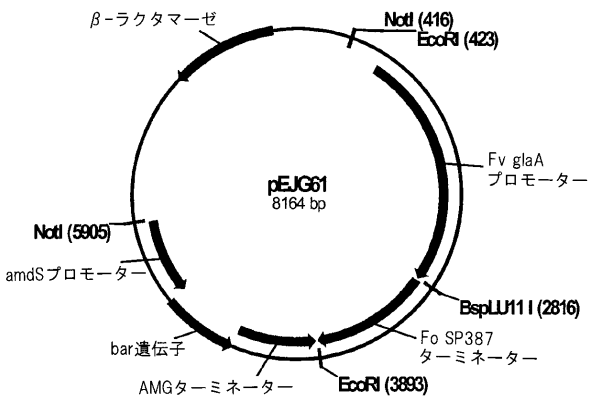


Fig. 5

【 図 6 】

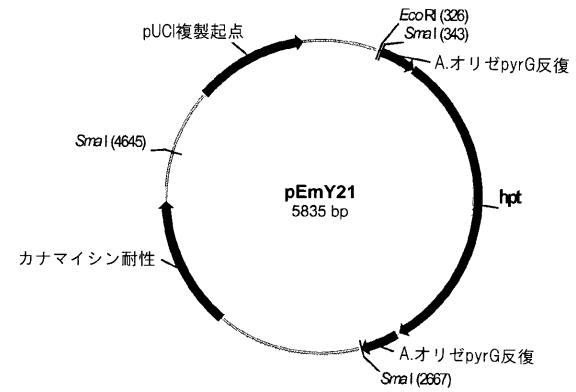


Fig. 6

【 図 7 】

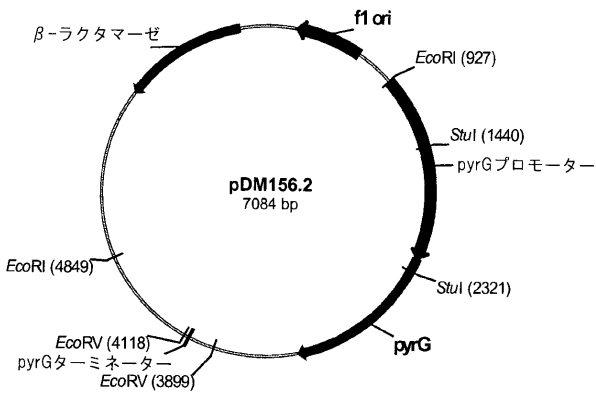


Fig. 7

【 図 8 】

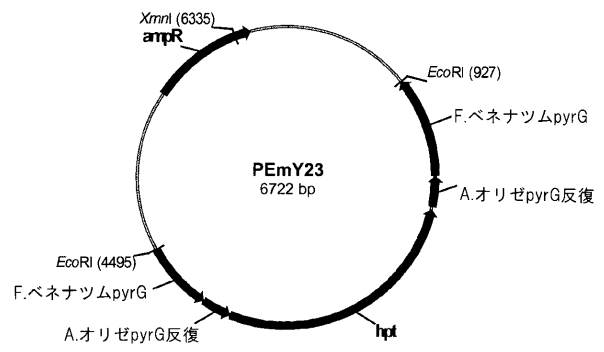


Fig. 8

【 図 9 】

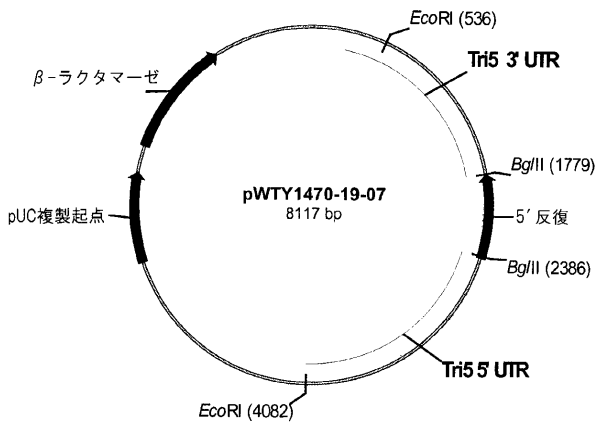


Fig. 9

【 図 10 】

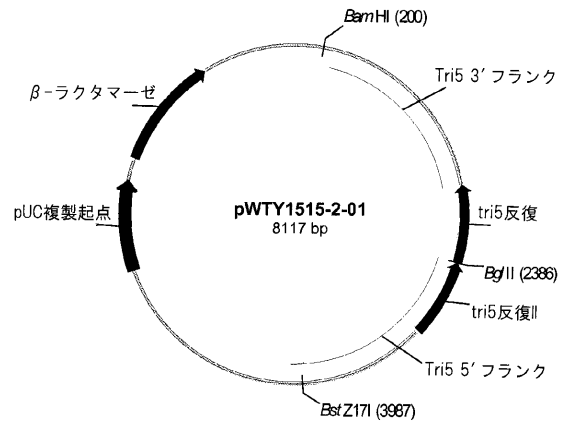


Fig. 10

【 図 1 1 】

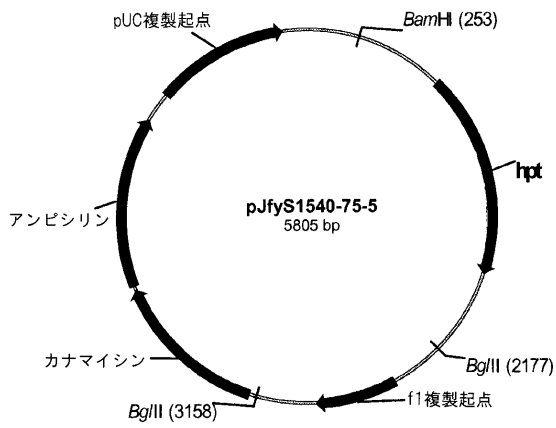


Fig. 11

【 図 1 2 】

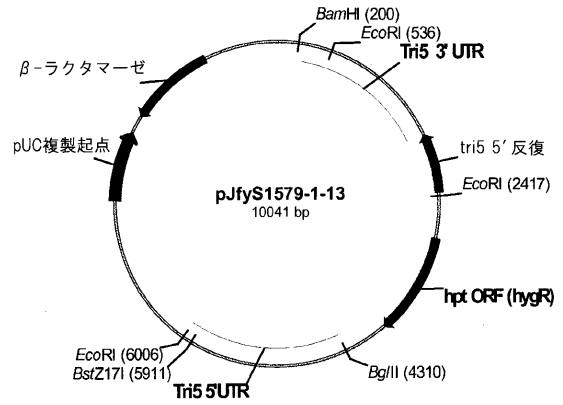


Fig. 12

【 図 1 3 】

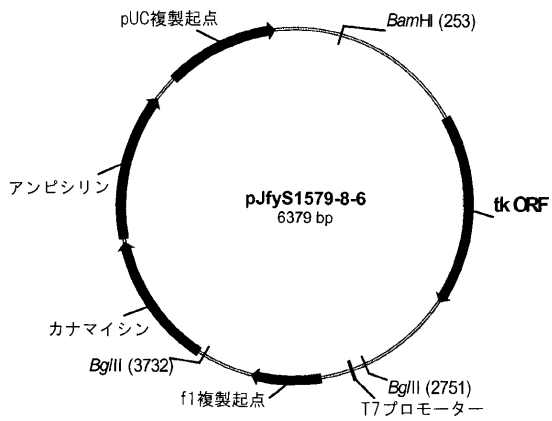


Fig. 13

【 図 1 4 】

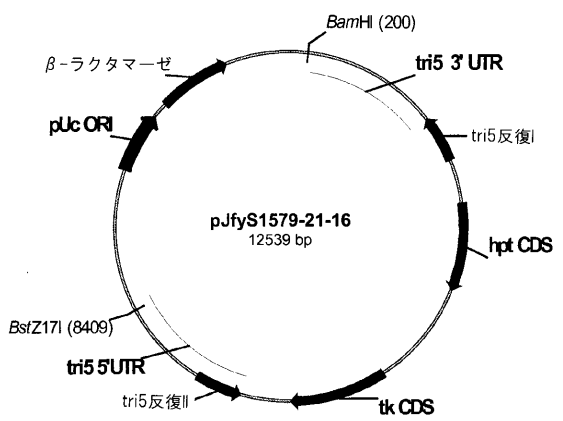


Fig. 14

【 図 1 5 】

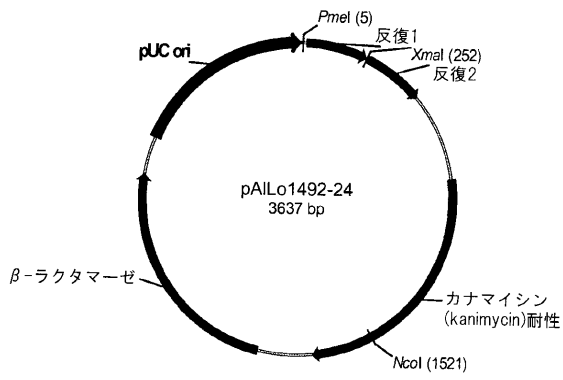


Fig. 15

【 図 1 6 】

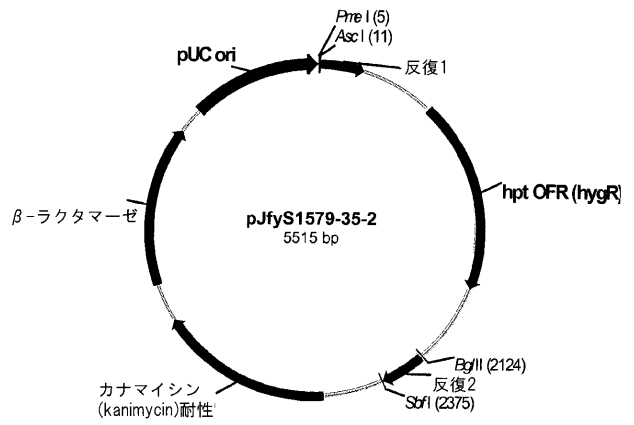


Fig. 16

【 図 1 7 】

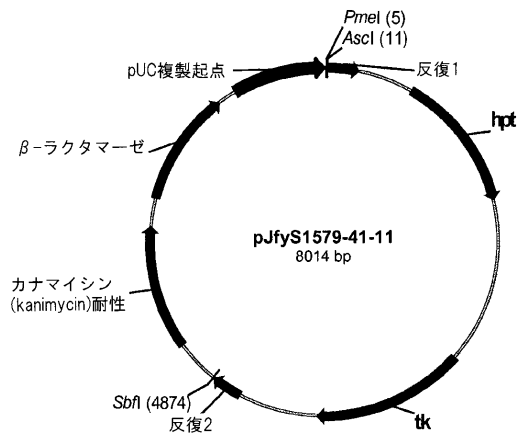


Fig. 17

【 図 1 8 】

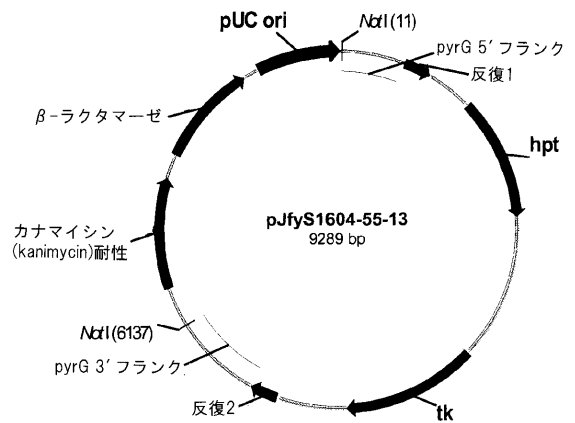


Fig. 18

【 図 1 9 】

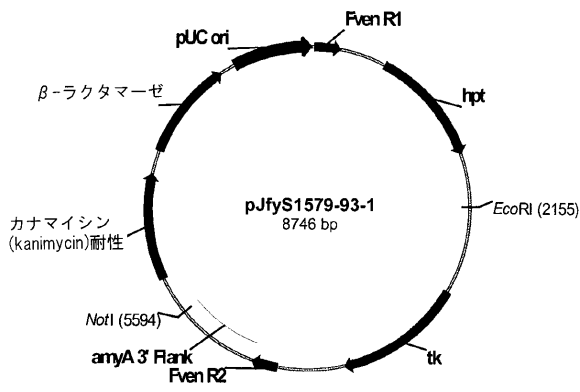


Fig. 19

【 図 2 0 】

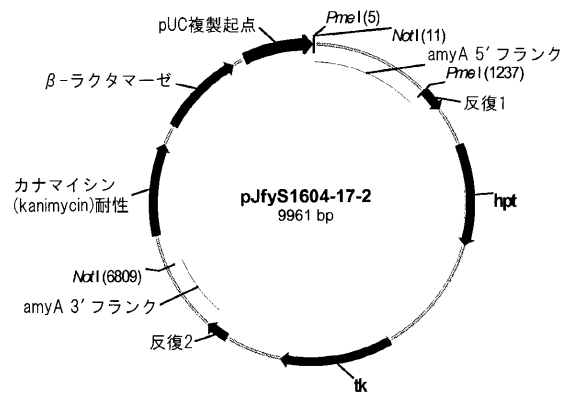


Fig. 20

【 図 2 1 】

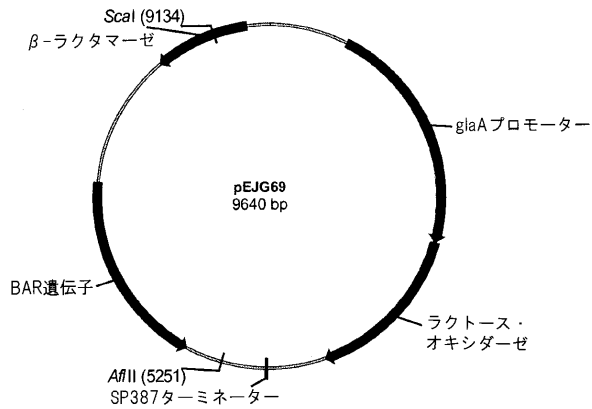


Fig. 21

【 図 2 2 】

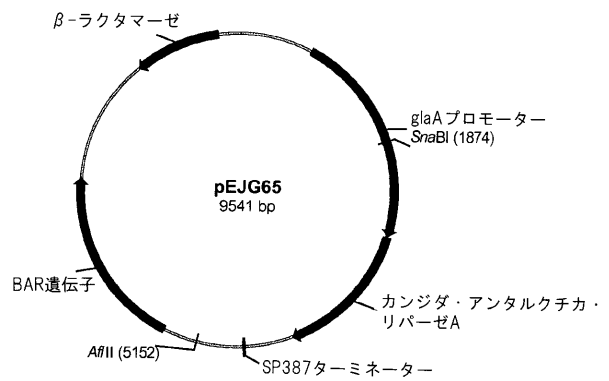


Fig. 22

【 図 2 3 】

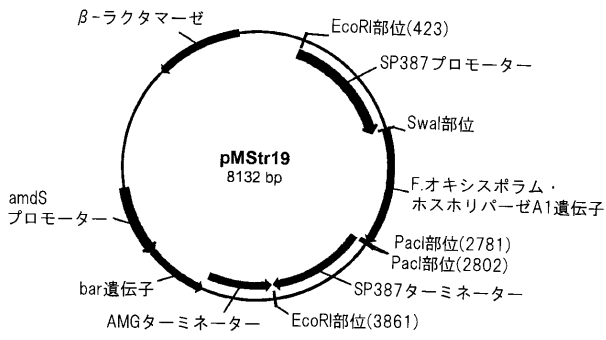


Fig. 23

【 図 2 4 】

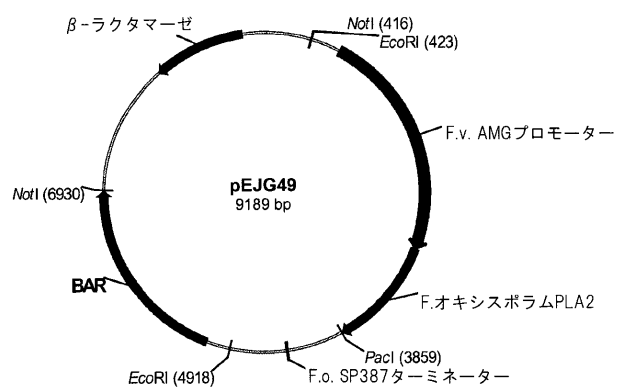


Fig. 24

【 図 2 5 】

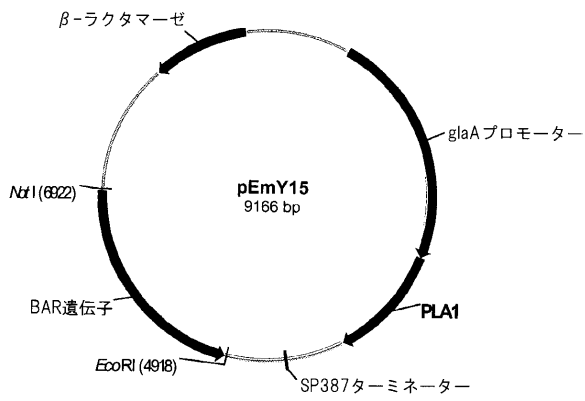


Fig. 25

【 図 2 6 】

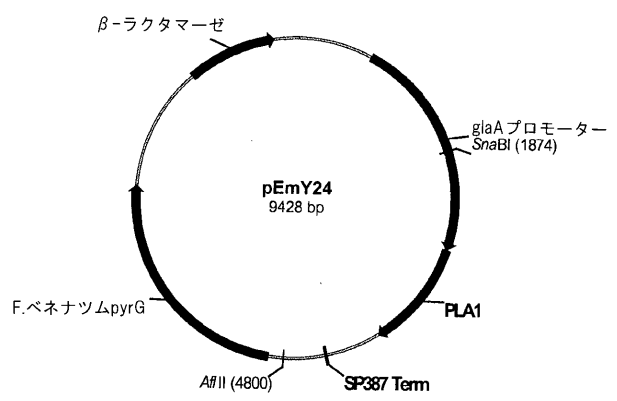


Fig. 26

【 図 2 7 】

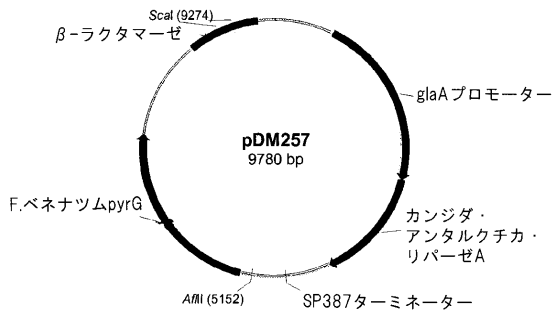


Fig. 27

【 図 2 8 】

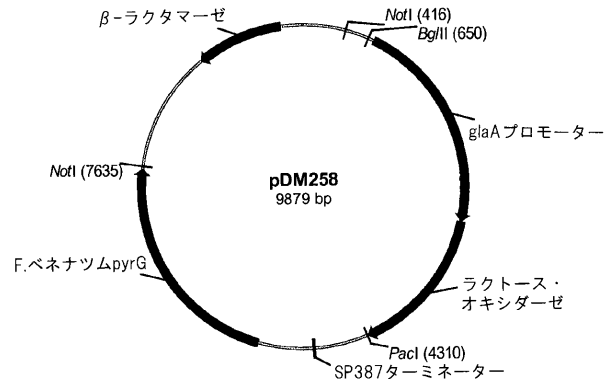


Fig. 28

【 図 2 9 】

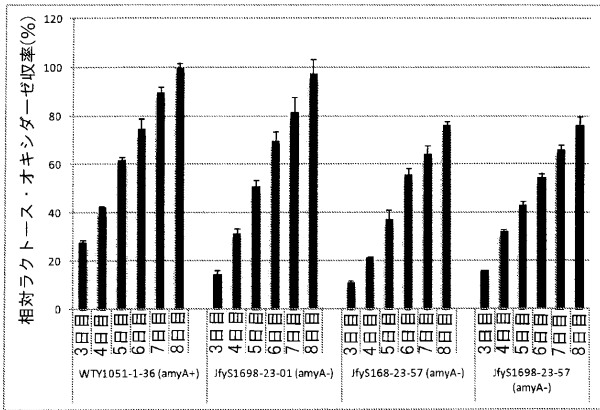


Fig. 29

【 図 3 0 】

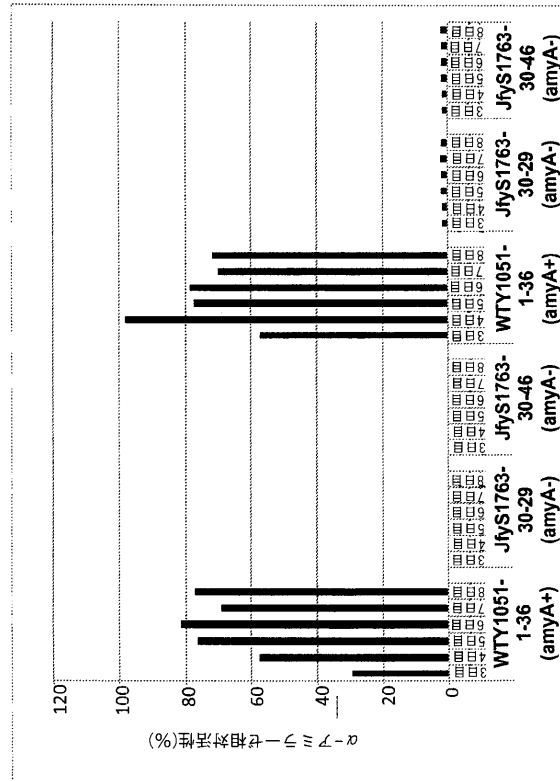


Fig. 30

【 図 3 1 】

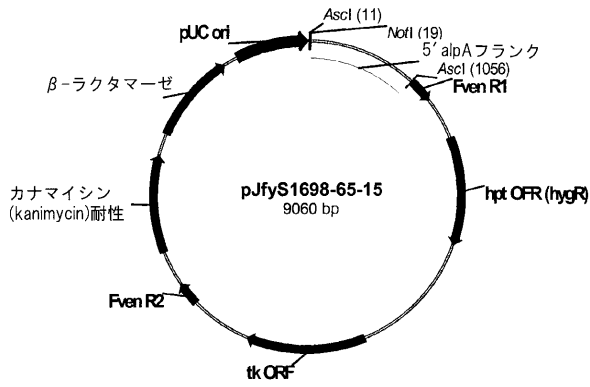


Fig. 31

【 図 3 2 】

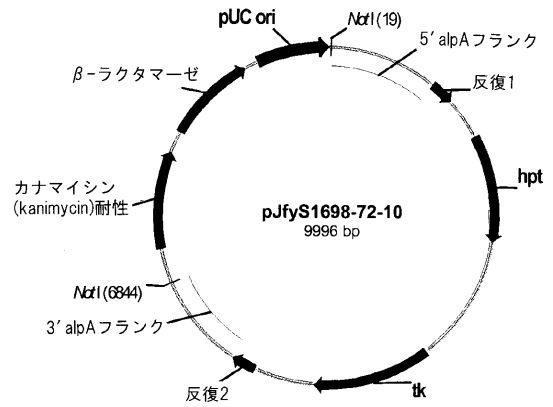


Fig. 32

【 図 3 3 】

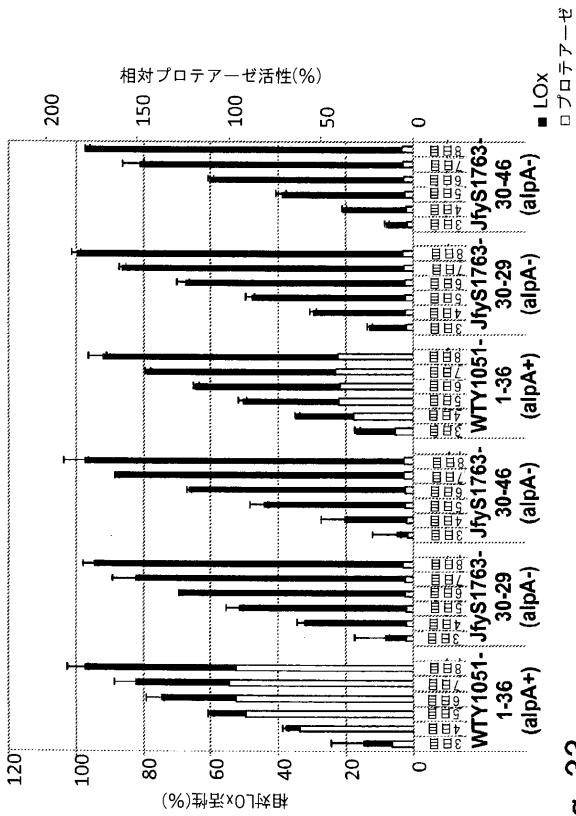


Fig. 33

【 図 3 4 】

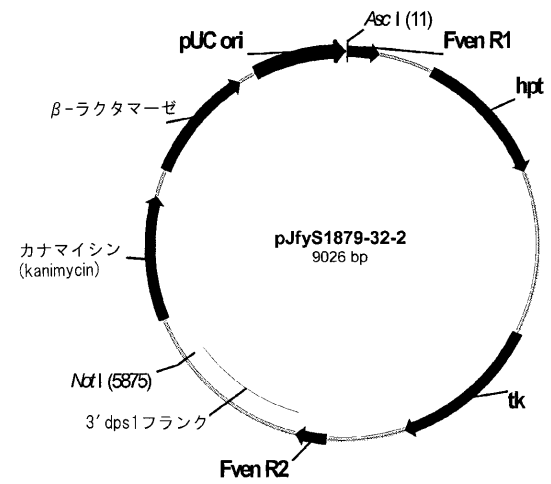


Fig. 34

【 図 3 5 】

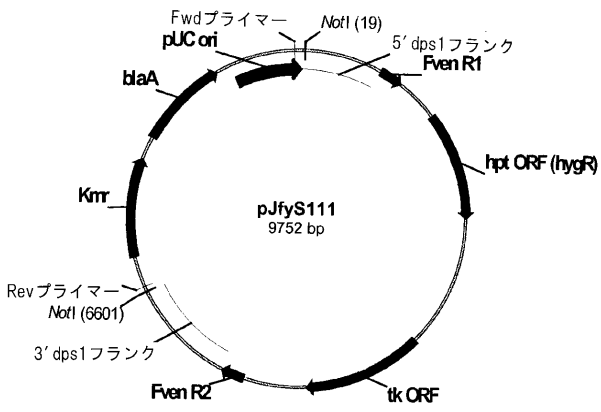


Fig. 35

【 図 3 6 】

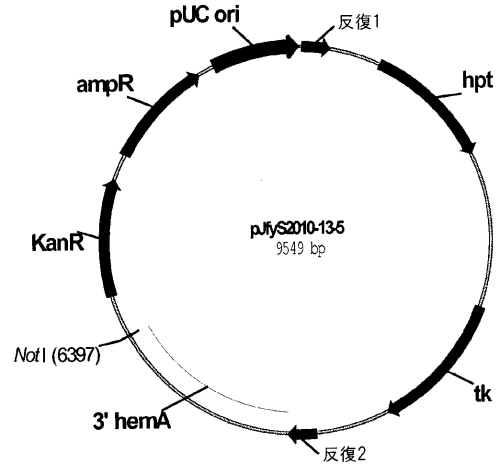


Fig. 36

【 図 3 7 】

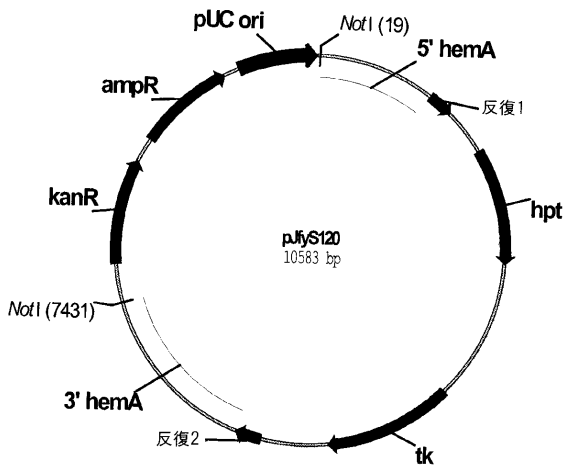


Fig. 37

【配列表】

2012504390000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/059107

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/80 C12N1/15		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 826 273 A1 (NODA INST FOR SCIENTIFIC RES [JP]) 29 August 2007 (2007-08-29) abstract paragraphs [0001], [0008], [0009], [0022], [0024], [0025] examples 1-6 figure 11	1-11,21
X A	US 2005/181509 A1 (KANG SEOGCHAN [US] ET AL) 18 August 2005 (2005-08-18) abstract paragraphs [0007], [0012], [0013], [0072] - [0074] example 2 ----- -/-	21 1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *B* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 December 2009		Date of mailing of the international search report 29/06/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Chavanne, Franz

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/059107

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAKAHASHI T ET AL: "Efficient gene disruption in the koji-mold <i>Aspergillus sojae</i> using a novel variation of the positive-negative method" MGG - MOLECULAR GENETICS AND GENOMICS, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 272, no. 3, 1 October 2004 (2004-10-01), pages 344-352, XP002371805 ISSN: 1617-4615	21
A	the whole document	I-11
X	BRAKS JOANNA A M ET AL: "Development and application of a positive-negative selectable marker system for use in reverse genetics in <i>Plasmodium</i> " NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 34, no. 5, 2006, XP009126920 ISSN: 0305-1048	1-11,21
X	MIHÁLY KONDRÁK ET AL: "Generation of Marker and Backbone-Free Transgenic Potatoes by Site-Specific Recombination and a Bi-Functional Marker Gene in a Non-Regular One-Border <i>Agrobacterium</i> Transformation Vector" TRANSGENIC RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 15, no. 6, 27 October 2006 (2006-10-27), pages 729-737, XP019454972 ISSN: 1573-9368	7-11,21
	the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/059107**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-11, 21

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2009/059107

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ASA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-11, 21

Method for deleting a gene in the genome of a filamentous fungal cell, nucleic acid construct used in said method, recombinant fungal cell comprising said construct, polypeptide production method using said filamentous fungal cell.

2. claims: 12-20, 22

Method for inserting a gene in the genome of a filamentous fungal cell, nucleic acid construct used in said method, recombinant fungal cell comprising said construct, polypeptide production method using said filamentous fungal cell.

3. claims: 23-26

orotidine-5'-phosphate decarboxylase of SEQ ID No.52, polynucleotide of SEQ ID No.51 encoding said orotidine-5'-phosphate decarboxylase, method for producing said orotidine-5'-phosphate decarboxylase.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2009/059107

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1826273	A1	29-08-2007 JP 2007222055 A	06-09-2007
		US 2009011508 A1	08-01-2009
US 2005181509	A1	18-08-2005 NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100164563

弁理士 佐々木 貴英

(72)発明者 ヨダー, ウェンディ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 6 1 6, デイビス, スクリップス ドライブ 4 3 6

(72)発明者 シャスキー, ジェフリー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 6 1 8, デイビス, ラメサ コート 2 2 0 5

Fターム(参考) 4B024 AA03 BA07 CA04 CA20 DA11 EA04 GA11 GA21 HA14

4B050 CC03 DD03

4B064 AG01 CA05 CA19 CC24

4B065 AA58X AA95X AB01 AC14 BA02 BA10 BB02 BB03 BB06 BB08

BB12 BB15 BB16 BB17 BB20 BB29 CA24 CA27 CA29