

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7700046号
(P7700046)

(45)発行日 令和7年6月30日(2025.6.30)

(24)登録日 令和7年6月20日(2025.6.20)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	Z N A
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47	
請求項の数 14 (全59頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2021-563177(P2021-563177)	(73)特許権者	514009867	
(86)(22)出願日	令和2年4月24日(2020.4.24)		インボッシブル フーズ インコーポレイ	
(65)公表番号	特表2022-531140(P2022-531140		テッド	
	A)		アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォル	
(43)公表日	令和4年7月6日(2022.7.6)		ニア州, レッドウッド シティ, サギノー	
(86)国際出願番号	PCT/US2020/029946		ドライブ 4 0 0	
(87)国際公開番号	WO2020/219972	(74)代理人	100092783	
(87)国際公開日	令和2年10月29日(2020.10.29)		弁理士 小林 浩	
審査請求日	令和5年4月20日(2023.4.20)	(74)代理人	100120134	
(31)優先権主張番号	62/838,770		弁理士 大森 規雄	
(32)優先日	平成31年4月25日(2019.4.25)	(74)代理人	100196966	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 植田 渉	
前置審査		(72)発明者	ロイ チョウドリー, ビスワジョイ	
			アメリカ合衆国 9 4 4 0 3 カリフォル	
			ニア州, サン マテオ フローレス スト	
			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ヘム含有タンパク質の作製のための株および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、アミノレブリン酸シンターゼ (A L A S) タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第1の外因性核酸構築物であって、前記A L A Sタンパク質が、配列番号29のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記A L A Sタンパク質が少なくとも第1のヘム反応性モチーフ (H R M) および第2のH R Mを含み、前記A L A Sが前記第1のH R M内の突然変異および前記第2のH R M内の突然変異を含み、前記第1のH R M内の前記突然変異が、配列番号29内の残基12におけるセリン、アラニン、フェニルアラニン、又はヒスチジンへの突然変異に対応し、前記第2のH R M内の前記突然変異が、配列番号29内の残基39におけるセリン、アラニン、フェニルアラニン、又はヒスチジンへの突然変異に対応し、前記A L A Sタンパク質が、グリシンおよびスクシニルC o Aからアミノレブリン酸への転換を触媒する、第1の外因性核酸構築物；および

(b) ヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第2の外因性核酸構築物を含む細胞であって、

前記ヘム結合性タンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列を含む前記第2の外因性核酸構築物が、前記第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されているか、または第2のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、細胞。

【請求項2】

真菌細胞、細菌細胞、藻類細胞、植物細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、または酵母細胞である、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】

前記酵母細胞が、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 細胞である、請求項 2 に記載の細胞。

【請求項 4】

前記第 1 の H R M が、配列番号 3 3 ～ 3 6 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を有する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 5】

前記第 2 の H R M が、配列番号 3 3 ～ 3 6 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を有する、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 6】

前記 A L A S タンパク質が前記第 1 の H R M 内の前記突然変異および前記第 2 の H R M 内の前記突然変異を含むことを除き、前記 A L A S タンパク質が配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 7】

前記 A L A S タンパク質が前記第 1 の H R M 内の前記突然変異および前記第 2 の H R M 内の前記突然変異を含むことを除き、前記 A L A S タンパク質が配列番号 2 9 のアミノ酸配列からなる、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 8】

前記ヘム結合性タンパク質が、グロビン、チトクローム、チトクローム c オキシダーゼ、リグニナーゼ、カタラーゼ、およびペルオキシダーゼからなる群から選択される、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 9】

前記ヘム結合性タンパク質がレグヘモグロビンである、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 1 0】

前記ヘム結合性タンパク質が、配列番号 1 ～ 2 7 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 1 1】

前記ヘム結合性タンパク質が、配列番号 1 ～ 2 7 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 1 2】

請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載の細胞内でヘム結合性タンパク質を作製する方法であって、

前記第 1 の外因性核酸構築物を発現させるステップ；および

前記第 2 の外因性核酸構築物を発現させるステップを含む、方法。

【請求項 1 3】

前記第 1 の外因性核酸構築物を欠く、又は第 1 の H R M 内における突然変異を欠く対応する方法を少なくとも 5 % を超える力価で、前記ヘム結合性タンパク質を作製する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

メタノールの添加の非存在下で実行される、請求項 1 2 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

10

20

30

40

50

本出願は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、2019年4月25日に出願された米国仮出願第62/838,770号に対する優先権を主張する。

【0002】

電子的に提出されたテキストファイルについての記載

本明細書と共に電子的に提出されるテキストファイル：ファイル名を38767-0158W01.txtとし、記録日を2020年4月24日とし、ファイルサイズを69キロバイトとする、コンピュータで読取り可能なフォーマットによる、配列表のコピーの内容は、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる。

【0003】

技術分野

本開示は、一般に、DNA構築物と、このようなDNA構築物を使用して、細胞（例えば、酵母細胞（例えば、メタノール資化酵母細胞））を遺伝子操作する方法とに関する。

【背景技術】

【0004】

ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などの細胞は、一般に、組換えタンパク質の発現のために使用される。本明細書では、細胞（例えば、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) 細胞、トリコデルマ属 (*Trichoderma*) 細胞、または酵母細胞（例えば、メタノール資化酵母細胞）などの真菌細胞）内で、1つまたは複数のタンパク質を効率的に発現させるのに使用されうる構築物が提供される。

【発明の概要】

【0005】

本文献は、ヘム結合性タンパク質の発現の増大を付与しうる、アミノレブリン酸シンターゼ (ALAS) 内の突然変異の同定に、少なくとも部分的に基づく。本明細書で記載される、突然変異ALASタンパク質は、例えば、ピキア属 (*Pichia*) における、ヘム結合性タンパク質の効率的な発現のために使用されうる。

【0006】

本明細書の一態様では、第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、アミノレブリン酸シンターゼ (ALAS) タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ALASが、第1のヘム反応性モチーフ (HRM) 内の第1の突然変異を含む、第1の外因性核酸構築物、および第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されているか、または第2のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、ヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第2の外因性核酸構築物を含む、メタノール資化酵母細胞が提供される。

【0007】

実施は、以下の特色のうちの1つまたは複数を含む。メタノール資化酵母細胞は、ピキア属 (*Pichia*) 細胞、カンジダ属 (*Candida*) 細胞、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*) 細胞、またはトルロプシス属 (*Torulopsis*) 細胞でありうる。メタノール資化酵母細胞は、ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*) 細胞、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 細胞、カンジダ・ボイジニー (*Candida boidinii*) 細胞、またはハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) 細胞でありうる。メタノール資化酵母細胞は、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 細胞でありうる。第1の突然変異は、システインからセリンへの突然変異でありうる。第1の突然変異は、システインからアラニンへの突然変異でありうる。ALASは、第2のHRM内の第2の突然変異を含む。第2の突然変異は、システインからセリンへの突然変異でありうる。第2の突然変異は、システインからアラニンへの突然変異でありうる。第1の外因性核酸構築物は、配列番号28内の核酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む。第1の外因性核酸構築物は、配列番号28内の核酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列を含む。ALASタンパク質は、配列番号29内のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ALASタンパク質は、配列番号29内のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列を含みうる。ヘム結合性タンパク質は、グロビン、チトクローム、チトクロームcオキシダーゼ、リグニナーゼ、カタラーゼ、およびペルオキシダーゼからなる群から選択されうる。ヘム結合性タンパク質は、アンドログロビン、クロロクルオリン、サイトグロビン、エリスロクルオリン、フラボヘモグロビン、グロビンE、グロビンX、グロビンY、ヘモグロビン、ヒストグロビン、レグヘモグロビン、ミオグロビン、ニューログロビン、非共生型ヘモグロビン、プロトグロビン、および切断型ヘモグロビンからなる群から選択されうる。ヘム結合性タンパク質は、非共生型ヘモグロビンでありうる。ヘム結合性タンパク質は、レグヘモグロビンでありうる。ヘム結合性タンパク質は、配列番号1〜27のうちのいずれか一つのアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含みうる。メタノール資化酵母細胞は、転写因子をコードするヌクレオチド配列を含む第3の核酸構築物をさらに含んでもよく、第3の核酸構築物は、第1のプロモーターエレメント、第2のプロモーターエレメント、または第3のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている。第1のプロモーターエレメントは、転写因子に対する認識配列を含みうる。第2の外因性核酸構築物は、第2のプロモーターエレメントに作動可能に連結されていてもよく、第2のプロモーターエレメントは、転写因子に対する認識配列を含む。第3の核酸構築物は、第3のプロモーターエレメントに作動可能に連結されていてもよく、第3のプロモーターエレメントは、転写因子に対する認識配列を含む。メタノール資化酵母細胞は、ヘムの生合成に関与するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第4の核酸構築物をさらに含んでもよく、第4の核酸構築物は、第1のプロモーターエレメント、第2のプロモーターエレメント、第3のプロモーターエレメント、または第4のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている。ヘムの生合成に関与するタンパク質は、ALAデヒドラターゼ、ボルホビリノーゲンデアミナーゼ、UPG IIIシンターゼ、UPG IIIデカルボキシラーゼ、CPGオキシダーゼ、PPGオキシダーゼ、およびフェロキラーゼからなる群から選択されうる。第1の外因性核酸構築物は、異種核酸構築物でありうる。第2の外因性核酸構築物は、異種核酸構築物でありうる。ヘム結合性タンパク質は、外因性ヘム結合性タンパク質でありうる。ヘム結合性タンパク質は、異種ヘム結合性タンパク質でありうる。

【0008】

本明細書の別の態様では、メタノール資化酵母細胞内でヘム結合性タンパク質を作製する方法であって、第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、アミノレブリン酸シンターゼ (ALAS) タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ALASが、第1のヘム反応性モチーフ (HRM) 内の第1の突然変異を含む、第1の外因性核酸構築物を発現させるステップ、およびヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第2の外因性核酸構築物を発現させるステップを含み、ヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第2の外因性核酸構築物が、第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されているか、または第2のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、方法が提供される。

【0009】

実施は、以下の特徴のうちの1つまたは複数を有しうる。ALASは、第2のHRM内の、第2の突然変異を含みうる。方法は、第1の外因性核酸構築物を欠く対応する方法を少なくとも5%を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製しうる。方法は、第1の外因性核酸構築物を欠く対応する方法を少なくとも10%を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製しうる。方法は、第1の外因性核酸構築物を欠く対応する方法を少なくとも15%を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製しうる。方法は、第1の外因性核酸構築物を欠く対応する方法を少なくとも20%を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製しうる。方法は、第1の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも5%を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製しうる。方法は、第1の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも10%を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製しうる。方法は、第1の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも15%を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製しうる。方法は、第1の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも20%を超える

10

20

30

40

50

力価で、ヘム結合性タンパク質を作製しうる。方法は、第1の突然変異および第2の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも5%を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製しうる。方法は、第1の突然変異および第2の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも10%を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製しうる。方法は、第1の突然変異および第2の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも15%を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製しうる。方法は、第1の突然変異および第2の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも20%を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製しうる。方法は、メタノールの添加の非存在下で実行されうる。メタノール資化酵母細胞は、ピキア属 (*Pichia*) 細胞、カンジダ属 (*Candida*) 細胞、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*) 細胞、またはトルロプシス属 (*Torulopsis*) 細胞でありうる。メタノール資化酵母細胞は、ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*) 細胞、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 細胞、カンジダ・ボイジニー (*Candida boidinii*) 細胞、またはハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) 細胞でありうる。メタノール資化酵母細胞は、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 細胞でありうる。第1の突然変異は、システインからセリンへの突然変異でありうる。第1の突然変異は、システインからアラニンへの突然変異でありうる。第2の突然変異は、システインからセリンへの突然変異でありうる。第2の突然変異は、システインからアラニンへの突然変異でありうる。第1の外因性核酸構築物は、配列番号28内の核酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含みうる。第1の外因性核酸構築物は、配列番号28内の核酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する核酸配列を含みうる。ALA Sタンパク質は、配列番号29内のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含みうる。ALA Sタンパク質は、配列番号29内のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含みうる。ヘム結合性タンパク質は、グロビン、チトクローム、チトクロームcオキシダーゼ、リグニナーゼ、カタラーゼ、およびペルオキシダーゼからなる群から選択されうる。ヘム結合性タンパク質は、アンドログロビン、クロロクルオリン、サイトグロビン、エリスロクルオリン、フラボヘモグロビン、グロビンE、グロビンX、グロビンY、ヘモグロビン、ヒストグロビン、レグヘモグロビン、ミオグロビン、ニューログロビン、非共生型ヘモグロビン、プロトグロビン、および切断型ヘモグロビンからなる群から選択されうる。ヘム結合性タンパク質は、非共生型ヘモグロビンでありうる。ヘム結合性タンパク質は、レグヘモグロビンでありうる。異種ヘム結合性タンパク質は、配列番号1~27のうちのいずれか一つのアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含みうる。方法は、転写因子をコードするヌクレオチド配列を含む第3の核酸構築物を発現させるステップをさらに含んでもよく、この場合、第3の核酸構築物は、第1のプロモーターエレメント、第2のプロモーターエレメント、または第3のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている。第1のプロモーターエレメントは、転写因子に対する認識配列を含みうる。第2の外因性核酸構築物は、第2のプロモーターエレメントに作動可能に連結されていてもよく、第2のプロモーターエレメントは、転写因子に対する認識配列を含む。第3の核酸構築物は、第3のプロモーターエレメントに作動可能に連結されていてもよく、第3のプロモーターエレメントは、転写因子に対する認識配列を含む。方法は、ヘムの生合成に関与するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第4の核酸構築物を発現させるステップをさらに含んでもよく、第4の核酸構築物は、第1のプロモーターエレメント、第2のプロモーターエレメント、第3のプロモーターエレメント、または第4のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている。ヘムの生合成に関与するタンパク質は、ALAデヒドラターゼ、ボルホビリノーゲンデアミナーゼ、UPG I I Iシンターゼ、UPG I I Iデカルボキシラーゼ、CPGオキシダーゼ、PPGオキシダーゼ、およびフェロキラーゼからなる群から選択されうる。第1の外因性核酸構築物は、異種核酸構築物でありうる。第2の外因性核酸構築物は、異種核酸構築物でありうる。ヘム結合性タンパク質は、外因性ヘム結合性タンパク質でありうる。ヘム結合性タンパク質は、異種ヘム結合性タンパク質でありうる。

【0010】

10

20

30

40

50

本明細書の別の態様では、第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、アミノレブリン酸シンターゼ (A L A S) タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、A L A Sが、第1のヘム反応性モチーフ (H R M) 内の第1の突然変異、および第2のH R M内の第2の突然変異を含む、第1の外因性核酸構築物、ならびにレグヘモグロビンをコードするヌクレオチド配列を含む第2の外因性核酸構築物に作動可能に連結されているか、または第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、レグヘモグロビンをコードするヌクレオチド配列を含む第2の外因性核酸構築物を含む、ピキア・パストリス (Pichiapastoris) 細胞が提供される。

【0011】

実施は、以下の特徴のうちの1つまたは複数を含みうる。第1の突然変異は、システインからセリンへの突然変異でありうる。第2の突然変異は、システインからセリンへの突然変異でありうる。

【0012】

本明細書の別の態様では、レグヘモグロビンを作製する方法であって、第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、アミノレブリン酸シンターゼ (A L A S) タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、A L A Sが、第1のヘム反応性モチーフ (H R M) 内の第1の突然変異および第2のH R M内の第2の突然変異を含む、第1の外因性核酸構築物を発現させるステップ、ならびにレグヘモグロビンをコードするヌクレオチド配列を含む第2の外因性核酸構築物を発現させるステップを含み、レグヘモグロビンをコードするヌクレオチド配列を含む第2の外因性核酸構築物が、第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されているか、または第2のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、方法が提供される。

【0013】

実施は、以下の特徴のうちの1つまたは複数を含む。方法は、第1の外因性核酸構築物を欠く対応する方法を少なくとも5%を超える力価で、レグヘモグロビンを作製しうる。方法は、第1の外因性核酸構築物を欠く対応する方法を少なくとも10%を超える力価で、レグヘモグロビンを作製しうる。方法は、第1の外因性核酸構築物を欠く対応する方法を少なくとも15%を超える力価で、レグヘモグロビンを作製しうる。方法は、第1の外因性核酸構築物を欠く対応する方法を少なくとも20%を超える力価で、レグヘモグロビンを作製しうる。方法は、第1の突然変異および第2の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも5%を超える力価で、レグヘモグロビンを作製しうる。方法は、第1の突然変異および第2の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも10%を超える力価で、レグヘモグロビンを作製しうる。方法は、第1の突然変異および第2の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも15%を超える力価で、レグヘモグロビンを作製しうる。方法は、第1の突然変異および第2の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも20%を超える力価で、レグヘモグロビンを作製しうる。方法は、メタノールの添加の非存在下で実行されうる。

【0014】

本明細書の別の態様では、配列番号29に対して少なくとも90%の配列同一性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第1の外因性核酸構築物を含み、核酸が、配列番号29の12位に対応する位置においてセリン残基をコードし、核酸が、配列番号29の39位に対応する位置においてセリン残基をコードし、核酸が、第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 細胞が提供される。

【0015】

実施は、以下の特徴のうちの1つまたは複数を含みうる。ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 細胞は、配列番号1~27のうちのいずれかに対して少なくとも90%の配列同一性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されているか、または第2のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている第2の外因性核酸構築物をさらに含む。ピキア・パストリス (Pic

10

20

30

40

50

hia pastoris) 細胞は、配列番号 4 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、第 1 のプロモーターエレメントに作動可能に連結されているか、または第 2 のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、第 2 の外因性核酸構築物をさらに含む。

【0016】

そうでないことが規定されない限りにおいて、本明細書で使用される、全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により、一般に理解される意味と同じ意味を有する。本発明の実施では、本明細書で記載される方法および材料と同様であるか、または同等である方法および材料が使用されうるが、下記では、適切な方法および材料について記載される。本明細書で言及される、全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照によりそれらの全体において組み込まれる。齟齬が生じる場合は、定義を含む本明細書に従う。加えて、材料、方法、および例は、例示的なものであるに過ぎず、限定的であることを意図するものではない。

【0017】

本開示の 1 つまたは複数の実施形態の詳細については、付属の図面および下記の記載に明示される。本開示の、他の特徴、目的、および利点は、記載および図面、ならびに特許請求の範囲から明らかであろう。特許請求の範囲における、「～を含むこと」という語は、特許法における標準的な慣行に従い、「～から本質的になること」または「～からなること」で置き換えられうる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図 1】ヘムの生合成経路に関与するステップを描示する概略図を提示する図である。

【図 2】ヘム b の構造を提示する図である。

【図 3】ヘミンの構造を提示する図である。

【図 4-1】例示的なヘム結合性タンパク質（配列番号 1～27）の配列を提示する図である。

【図 4-2】図 4-1 の続きである。

【図 4-3】図 4-1 の続きである。

【図 4-4】図 4-1 の続きである。

【図 4-5】図 4-1 の続きである。

【図 4-6】図 4-1 の続きである。

【図 4-7】図 4-1 の続きである。

【図 4-8】図 4-1 の続きである。

【図 4-9】図 4-1 の続きである。

【図 4-10】図 4-1 の続きである。

【図 4-11】図 4-1 の続きである。

【図 4-12】図 4-1 の続きである。

【図 4-13】図 4-1 の続きである。

【図 4-14】図 4-1 の続きである。

【図 4-15】図 4-1 の続きである。

【図 4-16】図 4-1 の続きである。

【図 4-17】図 4-1 の続きである。

【図 4-18】図 4-1 の続きである。

【図 4-19】図 4-1 の続きである。

【図 4-20】図 4-1 の続きである。

【図 5】突然変異 ALAS の例示的な構築物の略図を提示する図である。

【図 6-1】野生型 ALAS の核酸配列（配列番号 28）およびアミノ酸配列（配列番号 29）を提示する図である。

【図 6-2】図 6-1 の続きである。

【図 7-1】例示的な突然変異体 ALAS の核酸配列（配列番号 30）およびアミノ酸配

10

20

30

40

50

列（配列番号 31）を提示する図である。

【図 7-2】図 7-1 の続きである。

【図 8-1】配列番号 32~66 の配列を提示する図である。

【図 8-2】図 8-1 の続きである。

【図 8-3】図 8-1 の続きである。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本文献は、タンパク質産生のための材料および方法に関する。特に、本文献は、ヘムおよびヘム結合性タンパク質の作製のための材料および方法に関する。

【0020】

ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などのメタノール資化酵母は、一般に、組換えタンパク質を作製するのに使用される。ピキア属 (*Pichia*) 株は、典型的に、唯一の炭素供給源としてのメタノールを使用して、増殖することが可能である。「ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)」という用語も、依然として使用されており、任意の適切なコマガテラ属 (*Komagataella*) 種を指す場合があるが、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) は、コマガテラ・ファフィー (*Komagataella phaffii*)、コマガテラ・パストリス (*Komagataella pastoris*)、またはコマガテラ・シュードパストリス (*Komagataella pseudopastoris*) などのコマガテラ属 (*Komagataella*) 種として再分類されていることが理解されるであろう。一般に、*P. pastoris* の実験室株は、コマガテラ・ファフィー (*Komagataella phaffii*) である。

【0021】

ヘムに結合するタンパク質は、とりわけ、チトクローム、カタラーゼ、ミオグロビン、およびヘモグロビンを含む。アミノレブリン酸シンターゼ (ALAS) は、ヘムの生合成（ヘム b の生合成経路の略図についての図 1 を参照されたい）における第 1 段階を触媒する酵素 (EC 2.3.1.37) であり、グリシンおよびスクシニル CoA からアミノレブリン酸への転換を触媒する。ALAS は、ヘム生合成のこの段階のために、ミトコンドリアへと移行する。アミノレブリン酸は、他の酵素（例えば、ALA デヒドラターゼ (ALAD)、ポルホビリノーゲンデアミナーゼ (PBGD)、ウロポルフィリノーゲン III シンターゼ (UPG3S)、ウロポルフィリノーゲン III デカルボキシラーゼ (UPG3D)、コプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (COPROX)、プロトポルフィリノーゲン IX オキシダーゼ (PROTOX)、および／またはフェロキラーゼ (FC)) により、ヘム b (図 2) へと転換される。場合によって、ALAS の作用は、ヘムの生合成経路について、律速的でありうる。他のヘム（例えば、ヘム o、ヘム a、ヘム c）は、ヘム b に対する酵素の作用を介して作られうる。ヘミン (図 3) は、プロトポルフィリン IX（例えば、ヘム b のプロトポルフィリン）と、第二鉄 (+3 酸化状態) 鉄および塩化物リガンドとの複合体である。

【0022】

本明細書で使用される、「ヘム生合成経路の中間体」とは、デルタアミノレブリン酸 (d-ALA)、ポルホビリノーゲン、ヒドロキシメチルピラン、ウロポルフィリノーゲン III、コプロポルフィリノーゲン III、プロトポルフィリノーゲン IX、またはプロトポルフィリン IX のうちの 1 つまたは複数を指す。一部の実施形態では、ヘム生合成経路の中間体は、デルタアミノレブリン酸 (d-ALA)、ポルホビリノーゲン、ヒドロキシメチルピラン、ウロポルフィリノーゲン III、コプロポルフィリノーゲン III、プロトポルフィリノーゲン IX、およびプロトポルフィリン IX からなる群から選択されうる。一部の実施形態では、ヘム生合成経路の中間体は、ポルホビリノーゲン、ヒドロキシメチルピラン、ウロポルフィリノーゲン III、コプロポルフィリノーゲン III、プロトポルフィリノーゲン IX、またはプロトポルフィリン IX からなる群から選択されうる。

【0023】

一部の ALAS タンパク質の、ミトコンドリアへの移行は、ALAS タンパク質内に含まれる、1 つまたは複数のヘム調節性モチーフ (HRM; 場合によって、また、ヘム反

10

20

30

40

50

応性モチーフとも呼ばれる)により影響されうる。多くのHRMは、C-Pモチーフを含み、システインは、ヘムに対する、主軸のリガンドであることが多い。一部の実施形態では、HRMは、R/L/N/A/C/S/H/I/G/Q-C-P-L/V/I/F/C-L/M/P/V(配列番号32)の配列を有する(例えば、HRMは、A-C-P-F-V(配列番号33)、H-C-P-V-V(配列番号34)、I-C-P-F-M(配列番号35)、またはG-C-P-V-V(配列番号36);例えば、図8を参照されたい)の配列を有する)。一部の生物が、それらのA L A S配列内に、3つのHRMを有するのに対し、他の生物(例えば、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)などのメタノール資化酵母)は、2つのHRMを有する。一般に、HRMは、HRMが、タンパク質配列内のどこで生じるのかに応じて、HRM1、HRM2、HRM3などと呼ばれる、例えば、タンパク質配列内で最初に生じる(N末端からC末端へと読み取られる)HRMは、HRM1と呼ばれるであろう。HRM内のシステインの突然変異(例えば、セリンまたはアラニンへの)は、A L A Sの、ミトコンドリアへの移行を増大させうる(例えば、それらの各々が、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Gonzalez-Dominguez, et al., *Yeast*. 2001 Jan 15;18(1):41-8. (PubMed ID (PMID) 11124700; Munakata et al., *J Biochem*. 2004 Aug;136(2):233-8. (PMID 15496594); Dailey et al, *Biochem J*. 2005 Mar 1;386(Pt 2):381-6. (PMID 15482256)を参照されたい)。いかなる特定の理論にも束縛されずに述べると、野生型A L A SのHRMに結合するヘムは、A L A Sの、ミトコンドリアへの移行を、負のフィードバック様式で阻害すると考えられる。ヘムはまた、一部のA L A Sタンパク質の分解にも関与すると考えられる(例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Kubota, et al., *J Biol Chem*. 2016 Sep 23;291(39):20516-29. doi: 10.1074/jbc.M116.719161. Epub 2016 Aug 5. (PMID 27496948)を参照されたい)。

【0024】

「第1のHRM」は、タンパク質配列の任意の部分におけるHRMであることが可能であり;「第1のHRM」は、タンパク質配列内で最初に生じるHRM(HRM1)でありうるが、必ずしもこれではないことが理解されよう。一部の実施形態では、第1のHRMはHRM1であり、第2のHRMはHRM2である。一部の実施形態では、第1のHRMはHRM1であり、第2のHRMはHRM3である。一部の実施形態では、第1のHRMはHRM2であり、第2のHRMはHRM1である。一部の実施形態では、第1のHRMはHRM2であり、第2のHRMはHRM3である。一部の実施形態では、第1のHRMはHRM3であり、第2のHRMはHRM1である。一部の実施形態では、第1のHRMはHRM3であり、第2のHRMはHRM2である。

【0025】

一部の実施形態では、核酸内の突然変異は、挿入、欠失、または置換でありうる。一部の実施形態では、核酸内の突然変異は、置換(例えば、グアノシンからシトシンへの突然変異)でありうる。一部の実施形態では、コード配列(例えば、タンパク質をコードする)内の置換は、サイレント突然変異(例えば、同じアミノ酸がコードされる)でありうる。一部の実施形態では、コード配列内の置換は、非同義突然変異(例えば、ミスセンス突然変異またはナンセンス突然変異)でありうる。一部の実施形態では、コード配列内の置換は、ミスセンス突然変異(例えば、異なるアミノ酸がコードされる)でありうる。一部の実施形態では、コード配列内の置換は、ナンセンス突然変異(例えば、早発終止コドンがコードされる)でありうる。一部の実施形態では、核酸内の突然変異は、欠失でありうる。突然変異は、例えば、CRISPR、TALEN、および/または亜鉛フィンガーヌクレアーゼを使用して、内因性核酸を変更するのに使用されることが理解されるであろう。

【0026】

一部の実施形態では、タンパク質配列内の突然変異は、挿入、欠失、または置換でありうる。タンパク質をコードする核酸内の突然変異は、タンパク質配列内の突然変異を引き起こしうるということが理解されるであろう。一部の実施形態では、タンパク質配列内の突然変

10

20

30

40

50

異は、置換（例えば、システインから、セリンへの突然変異、システインからアラニンへの突然変異、システインからバリンへの突然変異、システインからロイシンへの突然変異、システインからイソロイシンへの突然変異、システインからグリシンへの突然変異、システインからフェニルアラニンへの突然変異、システインからトレオニンへの突然変異、システインからメチオニンへの突然変異、システインからトリプトファンへの突然変異、システインからチロシンへの突然変異、システインからアスパラギンへの突然変異、システインからグルタミンへの突然変異、システインからプロリンへの突然変異、システインからアルギニンへの突然変異、システインからヒスチジンへの突然変異、システインからリシンへの突然変異、システインからアスパラギン酸への突然変異、またはシステインからグルタミン酸への突然変異）である。一部の実施形態では、タンパク質配列内の突然変異は、欠失でありうる。

10

【0027】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるA L A Sタンパク質は、少なくとも1つのHRM；例えば、第1のHRM、第2のHRM、第3のHRM、第4のHRM、第5のHRMなどにおける突然変異を含みうる。

【0028】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるA L A Sタンパク質は、少なくとも1つのHRM内の（例えば、第1のHRM内の）突然変異を含みうる。一部の実施形態では、本明細書で記載されるA L A Sタンパク質は、単一のHRM内の（例えば、第1のHRM内または第2のHRM内の）突然変異を含みうる。一部の実施形態では、本明細書で記載されるA L A Sタンパク質は、少なくとも1つのHRM（例えば、第1のHRM）のシステインにおける突然変異を含みうる。一部の実施形態では、本明細書で記載されるA L A Sタンパク質は、単一のHRM（例えば、第1のHRMまたは第2のHRM）のシステインにおける突然変異を含みうる。

20

【0029】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるA L A Sタンパク質は、少なくとも2つのHRM（例えば、第1のHRMおよび第2のHRM）における突然変異を含みうる。一部の実施形態では、本明細書で記載されるA L A Sタンパク質は、2つのHRM（例えば、第1のHRMおよび第2のHRM）の各々における突然変異を含みうる。一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異と、第2のHRM内の突然変異とは、同じでありうる（例えば、いずれも、システインからセリンまたはアラニンへの突然変異である）。一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異と、第2のHRM内の突然変異とは、異なりうる（例えば、1つは、システインからセリンへの突然変異であり、1つは、システインからアラニンへの突然変異である）。一部の実施形態では、本明細書で記載されるA L A Sタンパク質は、少なくとも2つのHRM（例えば、第1のHRMおよび第2のHRM）のシステインにおける突然変異を含みうる。一部の実施形態では、本明細書で記載されるA L A Sタンパク質は、2つのHRM（例えば、第1のHRMおよび第2のHRM）の各々のシステインにおける突然変異を含みうる。一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異と、第2のHRM内の突然変異とは、同じでありうる（例えば、いずれも、システインからセリンまたはアラニンへの突然変異である）。一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異と、第2のHRM内の突然変異とは、異なりうる（例えば、1つは、システインからセリンへの突然変異であり、1つは、システインからアラニンへの突然変異である）。

30

40

【0030】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるA L A Sタンパク質は、少なくとも3つのHRM（例えば、第1のHRM、第2のHRM、および第3のHRM）における突然変異を含みうる。一部の実施形態では、本明細書で記載されるA L A Sタンパク質は、3つのHRM（例えば、第1のHRM、第2のHRM、および第3のHRM）の各々における突然変異を含みうる。一部の実施形態では、本明細書で記載されるA L A Sタンパク質は、少なくとも3つのHRM（例えば、第1のHRM、第2のHRM、および第3のHRM）

50

のシステインにおける突然変異を含みうる。一部の実施形態では、本明細書で記載される A L A S タンパク質は、3つの H R M（例えば、第1の H R M、第2の H R M、および第3の H R M）の各々のシステインにおける突然変異を含みうる。一部の実施形態では、第1の H R M、第2の H R M、および第3の H R Mの各々における突然変異は、同じでありうる（例えば、いずれも、システインからセリンまたはアラニンへの突然変異である）。一部の実施形態では、3つの H R Mのうちの1つまたは2つにおける突然変異は、異なりうる。

【0031】

一部の実施形態では、置換（異なるアミノ酸への突然変異）は、H R M内のアミノ酸（例えば、システイン）の置換でありうる。一部の実施形態では、第1の H R M内の突然変異は、第1の H R M内のアミノ酸（例えば、システイン）の置換でありうる。一部の実施形態では、第2の H R M内の突然変異は、第2の H R M内のアミノ酸（例えば、システイン）の置換でありうる。一部の実施形態では、第3の H R M内の突然変異は、第3の H R M内のアミノ酸（例えば、システイン）の置換でありうる。置換は、任意の適切な置換でありうる。一部の実施形態では、異なるアミノ酸は、アルギニン、ヒスチジン、リシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、セレノシステイン、グリシン、プロリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンからなる群から選択されうる。一部の実施形態では、異なるアミノ酸は、アルギニン、ヒスチジン、リシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、セレノシステイン、グリシン、プロリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンからなる群から選択されうる。一部の実施形態では、異なるアミノ酸は、非極性脂肪族アミノ酸（例えば、グリシン、プロリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、またはバリン）、芳香族アミノ酸（例えば、フェニルアラニン、トリプトファン、またはチロシン）、極性非帯電アミノ酸（例えば、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミン）、または正帯電アミノ酸（アルギニン、ヒスチジン、またはリシン）から選択される。一部の実施形態では、異なるアミノ酸はセリンである。一部の実施形態では、異なるアミノ酸はアラニンである。一部の実施形態では、異なるアミノ酸はフェニルアラニンである。一部の実施形態では、異なるアミノ酸はアスパラギン酸である。一部の実施形態では、異なるアミノ酸はヒスチジンである。

【0032】

驚くべきことに、その2つの H R Mの各々において、システインからセリンへの突然変異を伴う A L A S タンパク質を、外因性ヘム結合性タンパク質と共に共発現させると、外因性ヘム結合性タンパク質の力価は、著明に増大しうる。

【0033】

一般に、「力価」とは、溶液中の物質の量の測定である。本明細書で使用される、ヘム結合性タンパク質の「力価」とは、そうでないことが指定されない限りにおいて、ヘムに結合されている場合であれ、そうでない場合であれ、全ポリペプチド量を指す。タンパク質の力価は、高速液体クロマトグラフィー（H P L CまたはU P L C）、液体クロマトグラフィー—質量分析（L C—M S）、酵素免疫測定アッセイ（E L I S A）、酵素活性測定、原子吸光分光法などの鉄測定技法、L C—M S、または紫外光および／もしくは可視光分光法など、適切な方法により測定されうる。

【0034】

本明細書で記載される突然変異など、A L A S内の突然変異は、ヘムの産生を増大させるのに使用されうる。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質の力価は、増大しうる。一部の実施形態では、レグヘモグロビン（L e g H）の力価は、増大しうる。本開示の材料および方法は、ヘムの産生を増大させるのに有用でありうる。

【0035】

本明細書で記載される材料および方法は、多くの業界において、適用を有しうる。例えば、ヘムタンパク質は、食品中で使用されうる。別の例として述べると、ヘムタンパク質

(例えば、ヘモグロビン、チトクローム P 4 5 0) は、調査研究目的 (例えば、薬物代謝について研究する) のために作製されうる。ヘムタンパク質はまた、産業において (例えば、洗浄用の洗剤、パルプの漂白、リグニンの分解などの使用のための、カタラーゼ、ラッカーゼ、および／またはペルオキシダーゼ) も使用されうる。ヘムタンパク質についての、別の潜在的な適用は、生体触媒作用 (例えば、チトクローム P 4 5 0、リポキシゲナーゼ、および／またはラッカーゼは、医薬用化学物質および日用品用化学物質の作製に使用されうる) である。一部のヘムタンパク質は、治療剤として (例えば、一酸化窒素シンターゼまたは血液交換剤の一部として) 使用されうる。場合によって、ヘムタンパク質は、電子工学的目的のために (例えば、再生可能電気の生産のために) 使用されうる。別の例として述べると、ヘム療法は、ヘムを産生できないことから生じる、8 つの遺伝性疾患からなる群である、急性ポルフィリン症を伴う患者のための処置選択肢でありうる。

10

【0036】

本明細書では、細胞 (例えば、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) 細胞、トリコデルマ属 (*Trichoderma*) 細胞、または酵母細胞 (例えば、メタノール資化酵母細胞) などの真菌細胞) を遺伝子操作して、突然変異体 A L A S を作製することを可能とする核酸構築物 (場合によってまた、核酸分子とも呼ばれる) が提供される。加えて、本明細書では、細胞 (例えば、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) 細胞、トリコデルマ属 (*Trichoderma*) 細胞、または酵母細胞 (例えば、メタノール資化酵母細胞) などの真菌細胞) を遺伝子操作して、ヘム結合性タンパク質の発現を増大させることを可能とする核酸構築物が提供される。一部の実施形態では、本明細書では、細胞 (例えば、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) 細胞、トリコデルマ属 (*Trichoderma*) 細胞、または酵母細胞 (例えば、メタノール資化酵母細胞) などの真菌細胞) を遺伝子操作して、誘導性分子の非存在下で、誘導的プロモーターからの、ヘム結合性タンパク質の発現を増大させることを可能とする核酸構築物が提供される。

20

【0037】

本明細書では、細胞の遺伝子操作を可能とする核酸構築物が提供される。細胞は、任意の適切な細胞でありうる。例えば、細胞は、細菌細胞 (例えば、大腸菌 (*E. coli*) 細胞、枯草菌 (*B. subtilis*) 細胞、またはラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) 細胞)、真菌細胞、藻類細胞、植物細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞でありうる。一部の実施形態では、細胞は、真菌細胞でありうる。一部の実施形態では、細胞は、糸状菌細胞でありうる。一部の実施形態では、細胞は、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) 細胞またはトリコデルマ属 (*Trichoderma*) 細胞でありうる。一部の実施形態では、細胞は、酵母細胞でありうる。酵母細胞の非限定例は、ピキア属 (*Pichia*) (例えば、ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*))、カンジダ属 (*Candida*) (例えば、カンジダ・ボイジニー (*Candida boidinii*)) 細胞、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*) (例えば、ハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)) 細胞、トルロプシス属 (*Torulopsis*) 細胞、およびサッカロミセス属 (*Sacharomyces*) (例えば、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)) 細胞を含む。一部の実施形態では、細胞は、メタノール資化酵母細胞でありうる。メタノール資化酵母細胞の非限定例は、ピキア属 (*Pichia*) 細胞、カンジダ属 (*Candida*) 細胞、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*) 細胞、およびトルロプシス属 (*Torulopsis*) 細胞を含む。一部の実施形態では、細胞は、ピキア属 (*Pichia*) 細胞、またはサッカロミセス属 (*Sacharomyces*) 細胞でありうる。一部の実施形態では、細胞は、真核細胞である。一部の実施形態では、細胞は、真菌細胞である。一部の実施形態では、細胞は、植物細胞である。一部の実施形態では、細胞は、藻類細胞である。一部の実施形態では、細胞は、酵母細胞である。一部の実施形態では、細胞は、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 細胞である。一部の実施形態では、細胞は、メタノール資化酵母細胞である。本明細書では、ピキア属 (*Pichia*) 種 (例えば、P. パストリス (*P. pastoris*)) を使用する方法が例示されるが、ピキア属 (*Pichia*) の他の種、またはカンジダ属 (*Candida*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*)、ピキア属 (*Pichia*)、およびトルロプシス属 (*Torulop*

30

40

50

sis)のうちのいずれかに由来する種など、他の細胞も使用されうる。メタノール資化酵母種の非限定例は、ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、カンジダ・ボイジニー (*Candida boidinii*)、およびハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)を含む。

【0038】

したがって、一態様では、本文献は、タンパク質を発現させるための材料および方法を提供する。一部の実施形態では、本文献は、A L A Sタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、第1の核酸構築物を含む細胞（例えば、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)細胞、トリコデルマ属 (*Trichoderma*)細胞、または酵母細胞（例えば、メタノール資化酵母細胞）などの真菌細胞）を提供する。一部の実施形態では、第1の核酸は、A L A Sタンパク質をコードし、第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、A L A Sタンパク質は、少なくとも1つのHRM（例えば、1、2、3つ、またはこれを超えるHRM）を含む。一部の実施形態では、A L A Sタンパク質は、少なくとも2つのHRM（例えば、2、3つ、またはこれを超えるHRM）を含む。一部の実施形態では、A L A Sタンパク質は、少なくとも3つのHRM（例えば、3つまたはこれを超えるHRM）を含む。一部の実施形態では、A L A Sタンパク質は、第1のHRM内の突然変異（場合によって、また、「第1のHRM内の、第1の突然変異」とも呼ばれる）を含む。一部の実施形態では、A L A Sタンパク質は、第2のHRM内の突然変異（場合によって、また、「第2のHRM内の、第2の突然変異」とも呼ばれる）を含む。一部の実施形態では、A L A Sタンパク質は、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含む。一部の実施形態では、第1のHRMは、HRM1である。一部の実施形態では、第2のHRMは、HRM2である。一部の実施形態では、A L A Sタンパク質は、第3のHRM内の突然変異（場合によって、また、「第3のHRM内の、第3の突然変異」とも呼ばれる）を含む。一部の実施形態では、A L A Sタンパク質は、第1のHRM内の突然変異、第2のHRM内の突然変異、および第3のHRM内の突然変異を含む。

【0039】

一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異は、置換である。一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異は、システインの置換である。一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異は、システインからセリンへの突然変異である。一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異は、システインからアラニンへの突然変異である。一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異は、システインからフェニルアラニンへの突然変異である。一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異は、システインからアスパラギン酸への突然変異である。一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異は、システインからヒスチジンへの突然変異である。

【0040】

一部の実施形態では、第2のHRM内の突然変異は、置換である。一部の実施形態では、第2のHRM内の突然変異は、システインの置換である。一部の実施形態では、第2のHRM内の突然変異は、システインからセリンへの突然変異である。一部の実施形態では、第2のHRM内の突然変異は、システインからアラニンへの突然変異である。一部の実施形態では、第2のHRM内の突然変異は、システインからフェニルアラニンへの突然変異である。一部の実施形態では、第2のHRM内の突然変異は、システインからアスパラギン酸への突然変異である。一部の実施形態では、第2のHRM内の突然変異は、システインからヒスチジンへの突然変異である。

【0041】

一部の実施形態では、第3のHRM内の突然変異は、置換である。一部の実施形態では、第3のHRM内の突然変異は、システインの置換である。一部の実施形態では、第3のHRM内の突然変異は、システインからセリンへの突然変異である。一部の実施形態では、第3のHRM内の突然変異は、システインからアラニンへの突然変異である。一部の実施形態では、第3のHRM内の突然変異は、システインからフェニルアラニンへの突然変

異である。一部の実施形態では、第3のHRM内の突然変異は、システインからアスパラギン酸への突然変異である。一部の実施形態では、第3のHRM内の突然変異は、システインからヒスチジンへの突然変異である。

【0042】

一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異は、配列番号29内の残基12における突然変異に対応する。一部の実施形態では、第2のHRM内の突然変異は、配列番号29内の残基39における突然変異に対応する。一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異は、配列番号29内の残基12における、システインからセリンへの突然変異に対応する、システインからセリンへの突然変異である。一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異は、配列番号29内の残基12における、システインからアラニンへの突然変異に対応する、システインからアラニンへの突然変異である。一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異は、配列番号29内の残基12における、システインからフェニルアラニンへの突然変異に対応する、システインからフェニルアラニンへの突然変異である。一部の実施形態では、第1のHRM内の突然変異は、配列番号29内の残基12におけるシステインからヒスチジンへの突然変異に対応する、システインからヒスチジンへの突然変異である。一部の実施形態では、第2のHRM内の突然変異は、配列番号29内の残基39におけるシステインからセリンへの突然変異に対応する、システインからセリンへの突然変異である。一部の実施形態では、第2のHRM内の突然変異は、配列番号29内の残基39における、システインからアラニンへの突然変異に対応する、システインからアラニンへの突然変異である。一部の実施形態では、第2のHRM内の突然変異は、配列番号29内の残基39における、システインからフェニルアラニンへの突然変異に対応する、システインからフェニルアラニンへの突然変異である。一部の実施形態では、第2のHRM内の突然変異は、配列番号29内の残基39における、システインからヒスチジンへの突然変異に対応する、システインからヒスチジンへの突然変異である。

【0043】

一部の実施形態では、第1の核酸は、配列番号28のヌクレオチド35位におけるグアノシンからシトシンへの突然変異に対応する突然変異を含む。一部の実施形態では、第1の核酸は、配列番号28のヌクレオチド34位におけるチミンからグアノシンへの突然変異、および配列番号28のヌクレオチド35位におけるグアノシンからシトシンへの突然変異に対応する突然変異を含む。一部の実施形態では、第1の核酸は、配列番号28のヌクレオチド116位におけるグアノシンからシトシンへの突然変異に対応する突然変異を含む。一部の実施形態では、第1の核酸は、配列番号28のヌクレオチド115位におけるチミンからグアノシンへの突然変異、および配列番号28のヌクレオチド116位におけるグアノシンからシトシンへの突然変異に対応する突然変異を含む。システインからセリンへの突然変異は、本明細書で具体的に開示されるヌクレオチド以外のヌクレオチドにおける突然変異により達せられうることが理解されよう。システインからアラニンへの突然変異は、本明細書で具体的に開示されるヌクレオチド以外のヌクレオチドにおける突然変異により達せられうることが理解されよう。一部の実施形態では、第1の核酸構築物は、配列番号30を含む。一部の実施形態では、ALASタンパク質は、配列番号31の配列を有する（例えば、図7を参照されたい）。

【0044】

本明細書で使用される、「作動可能に連結されている」とは、プロモーター、または他の発現エレメント（複数可）が、核酸コード配列に対して、コード配列の発現（例えば、インフレームの）を方向付けるか、または調節するように配置されることを意味する。

【0045】

参照タンパク質配列と異なるタンパク質配列内の（例えば、配列番号29などの参照ALASタンパク質配列と比較して、異なる生物のALASタンパク質配列内の）、「対応する」アミノ酸位置（または置換）は、目的のタンパク質配列の間で、配列アライメントを実施することにより同定されうる。場合によって、タンパク質アライメントでは、ギャップが存在することが理解されるであろう。同様に、参照核酸配列と異なる核酸配列（例

10

20

30

40

50

例えば、配列番号 28 など、参照 A L A S 核酸配列と比較して、異なる生物の A L A S 核酸配列) 内の、「対応する」核酸位置 (または置換) は、目的の核酸配列の間で、配列アライメントを実施することにより同定されうる。場合によって、核酸アライメントには、ギャップが存在することが理解されるであろう。本明細書で使用された、参照配列「と比べた」、ヌクレオチド位置またはアミノ酸位置は、参照配列内の、対応するヌクレオチド位置またはアミノ酸位置でありうる。

【0046】

本明細書で記載される方法において使用される核酸分子は、典型的に、DNA であるが、適切な状況下では、RNA 分子も使用されうる。本明細書で使用される、「外因性」とは、例えば、同じ生物もしくは異なる生物に由来する細胞へと導入された、任意の核酸配列、または合成により作出された核酸 (例えば、コドン最適化核酸配列) を指す。例えば、外因性核酸は、メタノール資化酵母の、異なる属または種へと導入された、1つの微生物 (例えば、メタノール資化酵母の、1つの属または種) に由来する核酸でありうるが；外因性核酸はまた、対応する天然核酸配列の存在にもかかわらず、さらなるコピーとして、メタノール資化酵母へと、組換えにより導入された、メタノール資化酵母に由来する核酸の場合もあり、メタノール資化酵母へと、組換えにより導入された、メタノール資化酵母に由来する核酸であって、メタノール資化酵母に天然の配列と比較して、1つまたは複数の突然変異、挿入、または欠失を含有する核酸の場合もある。例えば、P. パストリス (P. pastoris) は、A L A S をコードする内因性核酸を含有するが；P. パストリス (P. pastoris) の A L A S 核酸のさらなるコピー (例えば、組換えにより、P. パストリス (P. pastoris) へと導入された) は、外因性であると考えられる。同様に、「外因性」タンパク質は、外因性核酸によりコードされるタンパク質である。

【0047】

一部の場合に、外因性核酸は、異種核酸でありうる。本明細書で使用される、「異種」核酸とは、生物に天然ではない、任意の核酸配列を指す (例えば、異種核酸は、メタノール資化酵母の、異なる属または種へと導入された、1つの微生物 (例えば、コドン最適化されているのであれ、コドン最適化されていないのであれ、メタノール資化酵母の、1つの属または種) に由来する核酸でありうる)。同様に、「異種」タンパク質は、異種核酸によりコードされるタンパク質である。

【0048】

核酸分子は、その任意の部分 (例えば、プロモーター配列またはコードされるタンパク質の配列) が、宿主生物に対して外因性である場合に、宿主生物に対して、外因性であると考えられる。核酸分子は、その任意の部分 (例えば、プロモーター配列またはコードされるタンパク質の配列) が、宿主生物に対して異種である場合に、宿主生物に対して、異種であると考えられる。

【0049】

一部の実施形態では、本文献は、本明細書で開示される、第1の核酸構築物、およびヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、第2の核酸構築物を含む細胞 (例えば、アスペルギルス属 (Aspergillus) 細胞、トリコデルマ属 (Trichoderma) 細胞、または酵母細胞 (例えば、メタノール資化酵母細胞) などの真菌細胞) を提供する。一部の実施形態では、第2の核酸は、ヘム結合性タンパク質をコードし、第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、第2の核酸は、ヘム結合性タンパク質をコードし、第2のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、外因性ヘム結合性タンパク質でありうる。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、異種ヘム結合性タンパク質でありうる。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、グロビン (P f a m データベース内の P F 0 0 0 4 2)、チトクローム (例えば、チトクローム P 4 5 0、チトクローム a、チトクローム b、チトクローム c)、チトクローム c オキシダーゼ、リグニナーゼ、カタラーゼ、およびペルオキシダーゼからなる群から選択されうる。一部の実施形態では、グロビンは、アンドログロビン、クロロクルオリン、サイトグロビン、エリスロクルオリ

10

20

30

40

50

ン、フラボヘモグロビン、グロビンE、グロビンX、グロビンY、ヘモグロビン（例えば、ベータヘモグロビン、アルファヘモグロビン）、ヒストグロビン、レグヘモグロビン、ミオグロビン、ニューログロビン、非共生型ヘモグロビン、プロトグロビン、および切断型ヘモグロビン（例えば、HbN、HbO、Glb3、シアノグロビン）からなる群から選択されうる。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、非共生型ヘモグロビンでありうる。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、レグヘモグロビンでありうる。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、ダイズレグヘモグロビン（LegH）でありうる。LegHについての参照アミノ酸配列は、図4に、配列番号4として提示されている。LegHは、ヘムに結合するタンパク質であり、415nmにおける特徴的吸収、および顕著に異なる赤色を結果としてもたらす。LegHタンパク質（また、LGB2としても公知である）は、天然では、ダイズの根粒中に見出される（例えば、UniProtKB受託番号：P02236を参照されたい）。また、それらの各々が、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、国際公開第2014/110539号パンフレットおよび国際公開第2014/110532号パンフレットも参照されたい。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、配列番号1~27（図4）のうちのいずれかに明示されたアミノ酸配列に対して、少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）同一であるアミノ酸配列を有しうる。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、配列番号1~27のうちのいずれかに明示されたアミノ酸配列を有しうる。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質ヘムを、補因子として使用する。本明細書で使用される、「補因子」とは、酵素の触媒に直接関与する、分子またはイオンである。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、酵素の場合もあり、そうでない場合もある。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、ヘム生合成経路の一部の場合もあり、そうでない場合もある。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、ALASの場合もあり、そうでない場合もある。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、フェロキラーゼの場合もあり、そうでない場合もある。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、コプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの場合もあり、そうでない場合もある。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、ALAD、PBGD、UPG3S、UPG3D、COPROX、PROTOX、またはFCの場合もあり、そうでない場合もある。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、配列番号1~27内のアミノ酸配列のうちのいずれかと、少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%）同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質は、細菌由来のヘム結合性タンパク質、酵母由来のヘム結合性タンパク質、藻類由来のヘム結合性タンパク質、真菌由来のヘム結合性タンパク質、または植物由来のヘム結合性タンパク質である。

【0050】

本明細書で使用される、「細菌由来のタンパク質」、「酵母由来のタンパク質」、「藻類由来のタンパク質」、「真菌由来のタンパク質」、または「植物由来のタンパク質」とは、タンパク質の直接的供給源を指し、タンパク質が、細菌、酵母、藻類、真菌、または植物のそれぞれにおいて、天然で発現されるのかどうかとは無関係に、細菌、酵母、藻類、真菌、または植物のそれぞれにおいて産生される、任意のタンパク質を意味しうる。

【0051】

本明細書では、ALASタンパク質を作製する方法が提供される。本明細書ではまた、本明細書で記載される細胞（例えば、アスペルギルス属（*Aspergillus*）細胞、トリコデルマ属（*Trichoderma*）細胞、または酵母細胞（例えば、メタノール資化酵母細胞）などの真菌細胞）のうちのいずれかを使用して、ALASタンパク質を作製する方法も提供される。本明細書ではまた、本明細書で記載される核酸構築物のうちのいずれかを使用して、ALASタンパク質を作製する方法も提供される。一部の実施形態では、本明細書では、第1のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸構築物を発現させるステップを含む方法が提供される。一部の実施形態で

は、A L A Sタンパク質の力価は、第1のHRM内の突然変異を含むA L A Sタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物を欠く対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、150%、160%、180%、200%、220%、240%、250%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、A L A Sタンパク質の力価は、第1のHRM内の突然変異を含まないA L A Sタンパク質をコードする核酸を発現させる対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、150%、160%、180%、200%、220%、240%、250%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、本明細書では、方法であって、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含むA L A Sタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸構築物を発現させるステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、A L A Sタンパク質の力価は、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含むA L A Sタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物を欠く対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、150%、160%、180%、200%、220%、240%、250%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、A L A Sタンパク質の力価は、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含まないA L A Sタンパク質をコードする核酸を発現させる対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、150%、160%、180%、200%、220%、240%、250%、またはこれを超えて）増大しうる。

【0052】

本明細書では、テトラピロールまたはその誘導体を作製する方法が提供される。本明細書ではまた、本明細書で記載される細胞（例えば、アスペルギルス属（*Aspergillus*）細胞、トリコデルマ属（*Trichoderma*）細胞、または酵母細胞（例えば、メタノール資化酵母細胞）などの真菌細胞）のうちのいずれかを使用して、テトラピロールまたはその誘導体を作製する方法も提供される。本明細書ではまた、本明細書で記載される核酸構築物のうちのいずれかを使用して、テトラピロールまたはその誘導体を作製する方法も提供される。一部の実施形態では、本明細書では、テトラピロールまたはその誘導体を作製する方法であって、第1のHRM内の突然変異を含むA L A Sタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸構築物を発現させるステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、テトラピロールまたはその誘導体の力価は、第1のHRM内の突然変異を含むA L A Sタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物を欠く対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、150%、160%、180%、200%、220%、240%、250%、280%、300%、320%、340%、350%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、テトラピロールまたはその誘導体の力価は、第1のHRM内の突然変異を含まないA L A Sタンパク質をコードする核酸を発現させる対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、150%、160%、180%、200%、220%、240%、250%、280%、300%、320%、340%、350%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、本明細書では、テトラピロールまたはその誘導体を作製する方法であって、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の第2の突然変異を含むA L A Sタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含

10

20

30

40

50

む第1の核酸構築物を発現させるステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、テトラピロールまたはその誘導体の力価は、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物を欠く対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、150%、160%、180%、200%、220%、240%、250%、280%、300%、320%、340%、350%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、テトラピロールまたはその誘導体の力価は、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含まないALASタンパク質をコードする核酸を発現させる対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、150%、160%、180%、200%、220%、240%、250%、280%、300%、320%、340%、350%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、テトラピロールまたはその誘導体は、クロリン（例えば、クロロフィル）またはその誘導体である。一部の実施形態では、テトラピロールまたはその誘導体は、プレコリン、コプレコリン、コリン（例えば、ビタミンB12）、またはこれらの誘導体である。一部の実施形態では、テトラピロールまたはその誘導体は、ポルフィリンまたはその誘導体である。一部の実施形態では、テトラピロールまたはその誘導体は、ヘムまたはその誘導体である。一部の実施形態では、テトラピロールまたはその誘導体は、ヘムBである。一部の実施形態では、テトラピロールまたはその誘導体は、ヘム（例えば、ビリルビンまたはその誘導体）の代謝産物である。

【0053】

本明細書では、ヘム生合成経路の中間体、ヘム（例えば、ヘムB、ヘムo、ヘムa、ヘムc）、コリン（例えば、ビタミンB12）、クロロフィル、またはこれらの誘導体を作製する方法が提供される。本明細書ではまた、本明細書で記載される細胞（例えば、アスペルギルス属（*Aspergillus*）細胞、トリコデルマ属（*Trichoderma*）細胞、または酵母細胞（例えば、メタノール資化酵母細胞）などの真菌細胞）のうちのいずれかを使用して、ヘム生合成経路の中間体、ヘム、コリン、クロロフィル、またはこれらの誘導体を作製する方法も提供される。本明細書ではまた、本明細書で記載される核酸構築物のうちのいずれかを使用して、ヘム生合成経路の中間体、ヘム、コリン、クロロフィル、またはこれらの誘導体を作製する方法も提供される。一部の実施形態では、本明細書では、ヘム生合成経路の中間体、ヘム、コリン、クロロフィル、またはこれらの誘導体を作製する方法であって、第1のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、第1の核酸構築物を発現させるステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、ヘム生合成経路の中間体、ヘム、コリン、クロロフィル、またはこれらの誘導体の力価は、第1のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物を欠く対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、150%、160%、180%、200%、220%、240%、250%、280%、300%、320%、340%、350%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、ヘム生合成経路の中間体、ヘム、コリン、クロロフィル、またはこれらの誘導体の力価は、第1のHRM内の突然変異を含まないALASタンパク質をコードする核酸を発現させる対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、150%、160%、180%、200%、220%、240%、250%、280%、300%、320%、340%、350%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、本明細書では、ヘム生合成経路の中間体、ヘム、コリン、クロロフィル、またはこれらの誘導体を作製する方法であって、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸構築物を発現させるステップを含

む方法が提供される。一部の実施形態では、ヘム生合成経路の中間体、ヘム、コリン、クロロフィル、またはこれらの誘導体の力価は、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物を欠く対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、150%、160%、180%、200%、220%、240%、250%、280%、300%、320%、340%、350%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、ヘム生合成経路の中間体、ヘム、コリン、クロロフィル、またはこれらの誘導体の力価は、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含まないALASタンパク質をコードする核酸を発現させる対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、150%、160%、180%、200%、220%、240%、250%、280%、300%、320%、340%、350%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、ヘム生合成経路の中間体、ヘム、またはその誘導体は、ヘムである。一部の実施形態では、ヘム生合成経路の中間体、ヘム、またはその誘導体は、ヘムBである。

【0054】

本明細書では、ヘム（例えば、ヘムB、ヘムo、ヘムa、ヘムc）またはその誘導体を作製する方法が提供される。本明細書ではまた、本明細書で記載される細胞（例えば、アスペルギルス属（*Aspergillus*）細胞、トリコデルマ属（*Trichoderma*）細胞、または酵母細胞（例えば、メタノール資化酵母細胞）などの真菌細胞）のうちのいずれかを使用して、ヘムまたはその誘導体を作製する方法も提供される。本明細書ではまた、本明細書で記載される核酸構築物のうちのいずれかを使用して、ヘムまたはその誘導体を作製する方法も提供される。一部の実施形態では、本明細書では、ヘムまたはその誘導体を作製する方法であって、第1のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸構築物を発現させるステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、ヘムまたはその誘導体の力価は、第1のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物を欠く対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、150%、160%、180%、200%、220%、240%、250%、280%、300%、320%、340%、350%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、ヘムまたはその誘導体の力価は、第1のHRM内の突然変異を含まないALASタンパク質をコードする核酸を発現させる対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、150%、160%、180%、200%、220%、240%、250%、280%、300%、320%、340%、350%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、ヘムまたはその誘導体を作製する方法であって、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、第1の核酸構築物を発現させるステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、ヘムまたはその誘導体の力価は、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物を欠く対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%

10

20

30

40

50

、90%、100%、120%、140%、150%、160%、180%、200%、220%、240%、250%、280%、300%、320%、340%、350%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、ヘムまたはその誘導体は、ヘムBである。

【0055】

本明細書では、ヘム結合性タンパク質を作製する方法が提供される。本明細書ではまた、本明細書で記載される細胞（例えば、アスペルギルス属（*Aspergillus*）細胞、トリコデルマ属（*Trichoderma*）細胞、または酵母細胞（例えば、メタノール資化酵母細胞）などの真菌細胞）のうちのいずれかを使用して、ヘム結合性タンパク質を作製する方法も提供される。本明細書ではまた、本明細書で記載される核酸構築物のうちのいずれかを使用して、ヘム結合性タンパク質を作製する方法も提供される。一部の実施形態では、本明細書では、第1のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸構築物を発現させるステップ、ならびにヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸構築物を発現させるステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、本明細書では、第1のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸構築物を発現させるステップ、ならびにヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸構築物を発現させるステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、本明細書では、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸構築物を発現させるステップ、ならびにヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸構築物を発現させるステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、本明細書では、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸構築物を発現させるステップ、ならびにヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸構築物を発現させるステップを含む方法が提供される。本明細書で記載される方法のうちのいずれかについての一部の実施形態では、方法は、ヘム結合性タンパク質の力価の増大を可能とする。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質の力価は、第1のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物を欠く対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質の力価は、第1のHRM内の突然変異を含まないALASタンパク質をコードする核酸を発現させる対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、ヘム結合性タンパク質の力価は、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含まないALASタンパク質をコードする核酸を発現させる、対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、またはこれを超えて）増大しうる。

【0056】

本明細書では、テトラピロール結合性タンパク質を作製する方法が提供される。本明細書ではまた、本明細書で記載される細胞（例えば、アスペルギルス属（*Aspergillus*）細胞、トリコデルマ属（*Trichoderma*）細胞、または酵母細胞（例えば、メタノール資化酵母細胞）などの真菌細胞）のうちのいずれかを使用して、テトラピロール結合性タンパク質を作製する方法も提供される。本明細書ではまた、本明細書で記載される核酸構築物のうちのいずれかを使用して、テトラピロール結合性タンパク質を作製する方法も提供される。一部の実施形態では、本明細書では、第1のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸構築物を発現させるステップ、ならびにテトラピロール結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸構築物を発現させるステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、本明細書では、第1のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸構築物を発現させるステップ、ならびにテトラピロール結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸構築物を発現させるステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、本明細書では、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸構築物を発現させるステップ、ならびにテトラピロール結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸構築物を発現させるステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、本明細書では、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸構築物を発現させるステップ、ならびにテトラピロール結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸構築物を発現させるステップを含む方法が提供される。本明細書で記載される方法のうちのいずれかについての一部の実施形態では、方法は、テトラピロール結合性タンパク質の力価の増大を可能とする。一部の実施形態では、テトラピロール結合性タンパク質の力価は、第1のHRM内の突然変異を含むALASタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物を欠く対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、テトラピロール結合性タンパク質の力価は、第1のHRM内の突然変異を含まないALASタンパク質をコードする核酸を発現させる対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、テトラピロール結合性タンパク質の力価は、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含まないALASタンパク質をコードする核酸を発現させる対応する方法と比較して、少なくとも5%（例えば、少なくとも6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、またはこれを超えて）増大しうる。一部の実施形態では、テトラピロールは、クロリン（例えば、クロロフィル）またはその誘導体である。一部の実施形態では、テトラピロールは、プレコリン、コプレコリン、コリン（例えば、ビタミンB12）、またはこれらの誘導体である。一部の実施形態では、テトラピロールは、ポルフィリンまたはその誘導体である。一部の実施形態では、テトラピロールは、ヘムまたはその誘導体である。一部の実施形態では、テトラピロール

10

20

30

40

50

は、ヘムBである。一部の実施形態では、テトラピロールは、ヘム（例えば、ビリルビンまたはその誘導体）の代謝産物である。

【0057】

本明細書で使用される、「対応する方法」とは、同定される差を除き、全ての点で、参照方法と、本質的に同一な方法である。例えば、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含まないALASタンパク質をコードする核酸を発現させる、対応する方法は、対応する方法が、第1のHRM内の突然変異および第2のHRM内の突然変異を含まないALASタンパク質をコードする核酸を発現させることを除き、全ての側面（例えば、細胞の遺伝子組成、培養の温度および回数など）において同じであろう。

【0058】

細胞（例えば、アスペルギルス属（*Aspergillus*）細胞、トリコデルマ属（*Trichoderma*）細胞、または酵母細胞（例えば、メタノール酸化酵母細胞）などの真菌細胞）の遺伝子操作は、典型的に、組換え核酸分子（また、核酸構築物とも呼ばれる）の、細胞への導入を含む。本明細書で記載される通り、組換え核酸分子は、典型的に、少なくとも1つのプロモーターエレメント（例えば、誘導的プロモーターエレメントまたは構成的プロモーターエレメント）に作動可能に連結されている、タンパク質（例えば、ヘムの生合成に関与するタンパク質、ヘム結合性タンパク質、または転写因子）をコードする外因性核酸を含む。一部の実施形態では、組換え核酸分子は、同じプロモーターエレメント、または別個のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、2つまたはこれを超えるタンパク質コード配列の直鎖状配列（例えば、第1のタンパク質をコードする第1の核酸に作動可能に連結されている、第1のプロモーター、および第2のタンパク質をコードする第2の核酸に作動可能に連結されている、第2のプロモーター、または第1のタンパク質をコードする第1の核酸、および第2のタンパク質をコードする第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーター）を含みうる。場合によって、タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、少なくとも1つのプロモーターを含む、組換え核酸分子は、カセットと呼ばれうる。

【0059】

組換え核酸は、発現エレメントを含みうる。発現エレメントは、核酸コード配列の発現を方向付け、調節する核酸配列を含む。発現エレメントの1つの例は、プロモーター配列である。発現エレメントはまた、核酸の発現を調節する、イントロン、エンハンサー配列、応答エレメント、または誘導エレメントも含みうる。発現エレメントは、細菌由来、酵母由来、昆虫由来、哺乳動物由来、またはウイルス由来であることが可能であり、ベクターは、異なる由来のエレメントの組合せを含有しうる。

【0060】

核酸は、任意の数の増幅技法（例えば、PCR Primer: A Laboratory Manual, 1995, Dieffenbach & Dveksler, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; および米国特許第4,683,195号明細書; 同第4,683,202号明細書; 同第4,800,159号明細書; および同第4,965,188号明細書を参照されたい）を、適切なオリゴヌクレオチド（例えば、プライマー）対と共に使用して検出されうる。元のPCR方法に対する、いくつかの改変が開発されており、選択された核酸を検出するのに使用されうる。

【0061】

メタノールの利用は、典型的に、アルコールオキシダーゼの作用を介する、メタノールの、ホルムアルデヒドへの転換により誘発される。ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）は、アルコールオキシダーゼの2つの遺伝子である、AOX1およびAOX2を含有する。アルコールオキシダーゼ活性が低減された株（「メタノール利用緩徐型」株またはMutS株）は、AOX1プロモーターから発現される組換えタンパク質を、アルコールオキシダーゼ活性が低減されていない株より多く作製しうる。両方のAOX遺伝子において突然変異し、アルコールオキシダーゼ活性を完全に欠く株は、メタノールを代謝することが可能ではないが、メタノールにより、AOX1プロモーターからの発現に向けて、なお

10

20

30

40

50

も誘導されうる。これらの株は、他の炭素供給源を、増殖のために使用するが、メタノールの添加時に、A O X 1 プロモーターから、異種タンパク質をなおも発現させる能力を保持する。これらの株は、メタノールを代謝しない（「メタノール利用マイナス」株または M u t ー株）であるため、タンパク質発現の誘導に要求されるメタノールは、はるかに少量であり、これらの突然変異を保有する株は、大スケールの発酵におけるメタノールのフィーディングと関連する問題を回避する。例えば、Chiruvolu et al., 1997, Enzyme Microb. Technol., 21:277-83を参照されたい。

【0062】

適切な転写因子、および転写因子をコードする核酸（例えば、転写因子をコードする、外因性核酸）は、例えば、P. パストリス (P. pastoris) に由来する M x r 1 を含む。代表的な、K. パストリス (K. pastoris) の、M x r 1 の核酸配列が、例えば、G e n B a n k 受託番号：D Q 3 9 5 1 2 4 において見出されうる一方、代表的な、K. パストリス (K. pastoris) の、M x r 1 のタンパク質配列は、例えば、G e n B a n k 受託番号：A B D 5 7 3 6 5 において見出されうる。一部の実施形態では、転写因子は、K. ファフィー (K. phaffii) （例えば、U n i P a r c 受託番号：U P I 0 0 0 1 A 4 D 1 8 B を参照されたい）に由来する M i t 1 配列である。適切な転写因子はまた、においても見出されうる。ハンゼヌラ・ポリモルファ (Hansenula polymorpha) （例えば、A d r 1 配列；例えば、核酸配列についての、G e n B a n k 受託番号：A E O I 0 2 0 0 0 0 5、塩基：8 5 8 8 7 3 ~ 8 6 2 3 5 2、およびアミノ酸配列についての、G e n B a n k 受託番号：E S X 0 1 2 5 3 を参照されたい）、およびカンジダ・ボイジニー (Candida boidinii) （例えば、T r m 1 配列；例えば、核酸配列についての G e n B a n k 受託番号：A B 3 6 5 3 5 5、およびアミノ酸配列についての G e n B a n k 受託番号：B A F 9 9 7 0 0 を参照されたい；ならびに T r m 2 配列；例えば、核酸配列についての G e n B a n k 受託番号：A B 5 4 8 7 6 0、およびアミノ酸配列についての G e n B a n k 受託番号：B A J 0 7 6 0 8 を参照されたい）である。

【0063】

M x r 1 などの転写因子は、通常、低レベルで発現されうる。一部の実施形態では、外因性核酸（例えば、転写因子）を、誘導的であるプロモーターの制御の下に置くことが所望される。

【0064】

ピキア属 (Pichia) におけるメタノール調節性転写因子は、A O X 1 プロモーターに結合することが可能であり、M x r 1 と協同的に作用して、A O X 1 プロモーターからの転写を活性化させうる。一部の実施形態では、2つのメタノール調節性転写因子（例えば、M x r 1 および M i t 1）は、メタノール誘導性プロモーターエレメントに作動可能に連結されうる。

【0065】

細胞（例えば、アスペルギルス属 (Aspergillus)、トリコデルマ属 (Trichoderma) 細胞などの真菌細胞、または酵母細胞（例えば、メタノール資化酵母細胞））を遺伝子操作する場合に使用されうる、いくつかの誘導的プロモーターが存在する。適切なメタノール誘導性プロモーターは、p A O X 1 （例えば、K. パストリス (K. pastoris) の A O X 1 のためのプロモーター（例えば、G e n B a n k 受託番号：U 9 6 9 6 7 . 1 のためのプロモーターを参照されたい）などの p A O X 1、または参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、2019年4月17日に出版された、米国特許仮出願第 6 2 / 8 3 5 , 3 3 8 号において記載されているプロモーター）のほか、他のメタノール誘導性プロモーター、またはこれに由来するプロモーターエレメントを含む。これらは、限定せずに述べると、p A O X 2 プロモーター（例えば、K. ファフィー (K. phaffii)、または K. パストリス (K. pastoris) に由来する p A O X 2 プロモーター（例えば、G e n B a n k 受託番号：X 7 9 8 7 1 . 1 を参照されたい））、例えば、カンジダ・ボイジニー (Candida boidinii) に由来する、アルコールオキシダーゼ (A O D 1) プロモーター（例えば、G e n B a n k 受託番号：E 0 6 1 4 7 . 1 を参照されたい）、ハンゼヌラ・ポリ

モルファ (*Hansenula polymorpha*) に由来するアルコールオキシダーゼ (MOX) プロモーター (例えば、GenBank 受託番号: AJ313360.1 を参照されたい)、ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*) に由来する MOD1 プロモーターもしくは MOD2 プロモーター (例えば、Raymond et al., 1998, Yeast, 14:11-23; および Nakagawa et al., 1999, Yeast, 15:1223-30 を参照されたい)、P. パストリス (*P. pastoris*) に由来する DHAS プロモーター (例えば、GenBank 受託番号: FJ752551 についてのプロモーターを参照されたい) もしくはこれに由来するプロモーターエレメント、K. パストリス (*K. pastoris*) に由来する、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ (FLD1) プロモーター (例えば、GenBank 受託番号: KJ755994.1 を参照されたい)、または P. パストリス (*P. pastoris*) に由来する PEX8 プロモーター (例えば、Kranthi et al., 2010, Yeast, 27:705-11 を参照されたい) を含む。典型的に、これらのプロモーターは、メタノールにより誘導されうる。適切な構成的プロモーター、および構成的プロモーターエレメントは、限定せずに述べると、強力に構成的に転写される、転写伸長因子である EF-1 α の遺伝子 (TEF1) に由来する、P. パストリス (*P. pastoris*) プロモーター (またはこの部分) を含む。限定せずに述べると、K. パストリス (*K. pastoris*) に由来する、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プロモーター (例えば、GenBank 受託番号: U62648.1 についてのプロモーターを参照されたい)、K. ファフィー (*K. phaffii*) に由来する、潜在的なグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカータンパク質である、GCW14p (PAS__chr1-4__0586) に由来するプロモーター (例えば、GenBank 受託番号: XM__002490678 についてのプロモーターを参照されたい)、および K. パストリス (*K. pastoris*) に由来する、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子 (PGK1) に由来するプロモーター (例えば、GenBank 受託番号: AY288296 を参照されたい) を含む、他の適切な構成的プロモーター (またはこれらに由来するプロモーターエレメント) もまた、使用されうる。プロモーターの選出しは、発現系により影響されることが理解されよう。例えば、K. ファフィー (*K. phaffii*) における発現のためには、K. ファフィー (*K. phaffii*) のプロモーターが選出されうるが、C. ボイジニー (*C. boidinii*) における発現のためには、C. ボイジニー (*C. boidinii*) のプロモーターが選出されうる。しかし、場合によって、1つの生物 (例えば、K. ファフィー (*K. phaffii*)) に由来するプロモーターは、別の生物 (例えば、C. ボイジニー (*C. boidinii*))、または K. パストリス (*K. pastoris*)) において使用されるのに適切でありうる。さらに、誘導的 (例えば、メタノール誘導性) プロモーターと、構成的プロモーター (またはこれらに由来するプロモーターエレメント) とは、これらに作動可能に連結された核酸のうちのいずれかの発現を、さらに増大させるように組み合わせることが注目される。

【0066】

本明細書で記載されている通りにコードされるタンパク質のうちのいずれかは、誘導的プロモーターエレメント (例えば、メタノール誘導性プロモーターエレメント) または構成的プロモーターエレメントに作動可能に連結されうる。誘導的プロモーターおよびこれに由来するエレメントについては、上記で論じられている。構成的プロモーター、および構成的プロモーターエレメントは、当技術分野で公知である。例えば、一般に使用される、P. パストリス (*P. pastoris*) に由来する構成的プロモーターは、強力に、構成的に転写される、転写伸長因子である EF-1 α の遺伝子 (TEF1) に由来するプロモーターまたはその部分である。しかし、限定せずに述べると、K. パストリス (*K. pastoris*) に由来する、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プロモーター (例えば、GenBank 受託番号: U62648.1 についてのプロモーターを参照されたい)、K. ファフィー (*K. phaffii*) に由来する、潜在的なグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカータンパク質である、GCW14p (PAS__chr1-4__0586) に由来するプロモーター (例えば、GenBank 受託番号: XM__002490678 についてのプロモーターを参照されたい)、または K. パストリス (

10

20

30

40

50

K. pastoris) に由来する、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子 (PGK1) に由来するプロモーター (例えば、GenBank 受託番号: AY288296 についてのプロモーターを参照されたい) を含む、他の構成的プロモーター、またはこれらに由来するプロモーターエレメントも、使用されうる。

【0067】

一部の実施形態では、本明細書における細胞 (例えば、アスペルギルス属 (Aspergillus) 細胞、トリコデルマ属 (Trichoderma) 細胞、または酵母細胞 (例えば、メタノール資化酵母細胞) などの真菌細胞) のうちのいずれかは、第1のプロモーターエレメント、第2のプロモーターエレメント、または第3のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、第3のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第3の核酸構築物をさらに含みうる。一部の実施形態では、本明細書における細胞 (例えば、アスペルギルス属 (Aspergillus) 細胞、トリコデルマ属 (Trichoderma) 細胞、または酵母細胞 (例えば、メタノール資化酵母細胞) などの真菌細胞) のうちのいずれかは、第1のプロモーターエレメント、第2のプロモーターエレメント、第3のプロモーターエレメント、または第4のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、第4のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第4の核酸構築物をさらに含みうる。一部の実施形態では、第3のタンパク質は、転写因子でありうる。一部の実施形態では、第4のタンパク質は、転写因子でありうる。一部の実施形態では、本明細書におけるプロモーターエレメント (例えば、第1のプロモーターエレメント、第2のプロモーターエレメント、第3のプロモーターエレメント、または第4のプロモーターエレメント) のうちのいずれかは、転写因子に対する、1つまたは複数の認識配列を含有しうる。したがって、一部の実施形態では、フィードバックループは、転写因子が、転写因子のさらなるコピーの発現のほか、ALA およびヘム結合性タンパク質のうちの1つまたは複数の発現を駆動するように構築されうる。一部の実施形態では、転写因子は、Mxr1 (例えば、参照によりその全体において組み込まれる、米国特許第9,938,327号明細書を参照されたい) でありうる。一部の実施形態では、第3のタンパク質は、ヘムの生合成に関与するタンパク質でありうる。一部の実施形態では、第4のタンパク質は、ヘムの生合成に関与するタンパク質でありうる。一部の実施形態では、ヘムの生合成に関与するタンパク質は、 δ -アミノレブリン酸デヒドラターゼ (ALAD)、ポルホビリノーゲンデアミナーゼ (PBGD)、ウロポルフィリノーゲン III シンターゼ (UPG3S)、ウロポルフィリノーゲン III デカルボキシラーゼ (UPG3D)、コプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (COPROX)、プロトポルフィリノーゲン IX オキシダーゼ (PROTOX)、および/またはフェロキラーゼ (FC) からなる群から選択されうる。一部の実施形態では、ヘムの生合成に関与するタンパク質は、 δ -アミノレブリン酸デヒドラターゼ (ALAD)、ポルホビリノーゲンデアミナーゼ (PBGD)、ウロポルフィリノーゲン III シンターゼ (UPG3S)、ウロポルフィリノーゲン III デカルボキシラーゼ (UPG3D)、コプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (COPROX)、および/またはプロトポルフィリノーゲン IX オキシダーゼ (PROTOX) からなる群から選択されうる。

【0068】

サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) におけるかつての研究は、ALA デヒドラターゼおよびポルホビリノーゲンデアミナーゼを、ヘムの生合成における律速酵素として同定した (例えば、Hoffman et al., 2003, Biochem. Biophys. Res. Commun., 310(4):1247-53を参照されたい)。しかし、P. パストリス (P. pastoris) 内の、個別のヘム酵素の、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAP) プロモーターからの異種発現は、ヘムを含有する組換えタンパク質の発現と関連する限界を克服することに失敗した (Krainer et al., 2015, Microb. Cell Fact., 13;14:4を参照されたい)。ヘム生合成経路に関与する遺伝子のうちの1つまたは複数は、1つまたは複数の構成的プロモーター (例えば、参照によりその全体において組み込まれる、米国特許第9,938,327号明細書を参照されたい) から発現されることが理解されるが、P. パストリス (P. pastoris) 内の組換えヘム含有タンパク質の発現は、ヘム生合成

10

20

30

40

50

経路の1つまたは複数の酵素を、メタノール誘導性プロモーターから共発現させることにより達成されうる。

【0069】

加えて、本明細書で記載されるプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、第1のタンパク質（例えば、ALASタンパク質）をコードする第1の核酸は、プロモーターエレメントに作動可能に連結されている、第2のタンパク質（例えば、ヘム結合性タンパク質）をコードする第2の核酸から、物理的に隔てられうる（すなわち、第1の核酸と、第2の核酸とは、完全に別個の分子でありうる）ことが注目される。代替的に、プロモーターエレメントに作動可能に連結されている、第1のタンパク質をコードする第1の核酸、およびプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、第2のタンパク質をコードする第2の核酸は、同じ核酸構築物内に組み入れられうる。一部の実施形態では、プロモーターエレメントに作動可能に連結されている、第1のタンパク質をコードする第1の核酸は、プロモーターエレメントに作動可能に連結されている、第2のタンパク質をコードする第2の核酸と連続しうる。当業者には、第2のタンパク質をコードする第2の核酸分子が、目的のタンパク質をコードする第1の核酸と連続する場合、単一のプロモーター、またはこれに由来するプロモーターエレメントは、遺伝子（例えば、第1のタンパク質、ならびに第2のタンパク質をコードする核酸）の両方または全ての転写を駆動するのに使用されうるということが察知されるであろう。

【0070】

当技術分野では、核酸を、細胞（例えば、アスペルギルス属（*Aspergillus*）、トリコデルマ属（*Trichoderma*）細胞などの真菌細胞、または酵母細胞（例えば、メタノール資化酵母細胞））へと導入する方法が公知であり、限定せずに述べると、形質導入、電気穿孔、バイオリスティック粒子送達、および化学的形質転換を含む。

【0071】

加えて、当技術分野ではまた、細胞（例えば、アスペルギルス属（*Aspergillus*）、トリコデルマ属（*Trichoderma*）細胞などの真菌細胞、または酵母細胞（例えば、メタノール資化酵母細胞））を培養する方法が公知である。例えば、*Pichia Protocols, Methods In Molecular Biology*, 389, Cregg, Ed., 2007, 2nd Ed., Humana Press, Incを参照されたい。一部の状況下では、本明細書で裏付けられる通り、メタノールは、1つまたは複数の、目的のタンパク質の、高レベルにおける、効率的な発現を得るのに要求されないが、メタノールを、培養培地へと導入または添加することが所望されうる。一部の状況下では（例えば、ヘムの生合成に関与する酵素（複数可）をコードする、1つまたは複数の核酸が発現される場合）、培養培地に、鉄、またはその薬学的に許容可能であるか、もしくは代謝的に許容可能な塩（またはGRAS塩）を補充することが所望されうる。

【0072】

本明細書で記載される、組換え核酸分子は、細胞（例えば、アスペルギルス属（*Aspergillus*）細胞、トリコデルマ属（*Trichoderma*）細胞、または酵母細胞（例えば、メタノール資化酵母細胞）などの真菌細胞）のゲノムへと、安定的に組み込まれる場合もあり、染色体外において、複製コンピテントプラスミドから発現される場合もある。当技術分野では、いずれを達成する方法も公知であり、使用されている。

【0073】

本明細書で提供される方法はまた、発現されたタンパク質を精製するステップも含みうる。本明細書で使用される、「エンリッチ」タンパク質とは、乾燥重量で、産生細胞（例えば、アスペルギルス属（*Aspergillus*）細胞、トリコデルマ属（*Trichoderma*）細胞、または酵母細胞（例えば、メタノール資化酵母細胞）などの真菌細胞）の質量の、少なくとも5%（例えば、少なくとも6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、またはこれを超える）を占めるか、または乾燥重量で、産生細胞溶解物（例えば、細胞壁素材または細胞膜素材を除く）の質量の、少なくとも10%（例えば、少なくとも15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、8

0%、90%、95%、または99%)を占めるタンパク質である。本明細書で使用される、「精製」タンパク質とは、天然では、これに付随する、細胞構成要素から分離または精製されているタンパク質である。典型的に、タンパク質は、それが、乾燥重量で、天然では、それが会合しているタンパク質、および自然発生の分子のうちの、少なくとも60% (例えば、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%)を含まない場合に、「精製されている」と考えられる。

【0074】

本明細書で使用される、核酸は、DNAおよびRNAを含む場合があり、1つまたは複数のヌクレオチド類似体または骨格修飾を含有する核酸を含みうる。核酸は、一本鎖の場合もあり、二本鎖の場合もあり、これは、通例では、その意図される使用に依存する。また、所与の配列と異なる、核酸およびポリペプチドも提供される。核酸およびポリペプチドは、所与の核酸配列またはポリペプチド配列に対して、少なくとも50%の配列同一性 (例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性)を有しうる。

【0075】

配列同一性パーセントの計算では、2つの配列がアライメントされ、2つの配列の間の、ヌクレオチドまたはアミノ酸残基の、同一なマッチの数が決定される。同一なマッチの数は、アライメントされる領域の長さ (すなわち、アライメントされるヌクレオチドまたはアミノ酸残基の数) で除せられ、100を乗じられて、配列同一性パーセント値に至る。アライメントされる領域の長さは、一方または両方の配列の部分~最短の配列の全長サイズでありうる。ことが察知されるであろう。また、単一の配列は、1つを超える他の配列とアライメントされる場合があり、このため、アライメントされる各領域にわたり、異なる配列同一性パーセント値を有しうることも察知されるであろう。

【0076】

配列同一性パーセントを決定するための、2つまたはこれを超える配列のアライメントは、核酸配列またはポリペプチド配列のアライメントが、それらの全長にわたって実行されること (グローバルアライメント) を可能とする、コンピュータープログラムである *ClustalW*、およびデフォルトのパラメーターを使用して実施されうる (Chenna et al., 2003, *Nucleic Acids Res.*, 31(13):3497-500)。*ClustalW*は、同一性、類似性、および差違が決定されうるように、クエリー配列と、1つまたは複数の対象配列との、最良のマッチを計算し、それらをアライメントする。配列アライメントを最大化するように、1つまたは複数の残基のギャップが、クエリー配列、対象配列、またはこれらの両方へと挿入されうる。核酸配列の、迅速な、対応のあるアライメントのためには、デフォルトのパラメーター (すなわち、ワードサイズ: 2; ウィンドウサイズ: 4; 評定方法: 百分率; *top diagonals* の数: 4; およびギャップペナルティ: 5) が使用される場合があり; 複数の核酸配列のアライメントのためには、以下のパラメーター: ギャップオープニングペナルティ: 10.0; ギャップ伸長ペナルティ: 5.0; および重量遷移: ありが使用されうる。ポリペプチド配列の、迅速な、対応のあるアライメントのためには、以下のパラメーター: ワードサイズ: 1; ウィンドウサイズ: 5; 評定方法: 百分率; *top diagonals* の数: 5; およびギャップペナルティ: 3が使用されうる。ポリペプチド配列の多重アライメントのためには、以下のパラメーター: 重み行列: *blosum*; ギャップオープニングペナルティ: 10.0; ギャップ伸長ペナルティ: 0.05; 親水性ギャップ: オン; 親水性残基: Gly、Pro、Ser、Asn、Asp、Gln、Glu、Arg、およびLys; および残基特異的ギャップペナルティ: オンが使用されうる。*ClustalW*は、例えば、インターネット上の、*Baylor College of Medicine Search Launcher* ウェブサイト、または *European Bioinformatics Institute* ウェブサイトにおいて作動されうる。

【0077】

変化が、核酸分子へと導入される場合があり、これにより、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列に変化をもたらす。例えば、変化は、突然変異誘発（例えば、部位指向突然変異誘発、PCR媒介突然変異誘発、トランスポゾン突然変異誘発、化学的突然変異誘発、UV突然変異誘発、または放射線誘導性突然変異誘発）を使用して、核酸コード配列へと導入される場合もあり、このような変化を有する核酸分子を化学合成することにより核酸コード配列へと導入される場合もある。このような核酸の変化は、1つまたは複数のアミノ酸残基において、保存的アミノ酸置換および／または非保存的アミノ酸置換をもたらす。「保存的アミノ酸置換」とは、1つのアミノ酸残基が、類似の側鎖を有する、異なるアミノ酸残基で置き換えられる置換（例えば、アミノ酸置換についての頻度表を提示する、Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(Suppl. 3):345-352を参照されたい）であり、非保存的置換とは、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有さないアミノ酸残基で置き換えられる置換である。核酸配列および／またはポリペプチド配列は、限定せずに述べると、発現（例えば、転写および／または翻訳）の増大、調節の緊密化、調節解除、異化代謝産物抑制の喪失、特異性、分泌、熱安定性、溶媒安定性、酸化安定性、プロテアーゼ耐性、触媒活性、および／または色の修飾など、1つまたは複数の特性を改善するように、本明細書で記載されている通りに修飾されうる。

10

【0078】

本明細書で使用される、「単離」核酸分子は、天然では、単離核酸分子が由来する生物のゲノム内の核酸の一方または両方の末端を挟む配列を含まない核酸分子（例えば、cDNA、またはPCRもしくは制限エンドヌクレアーゼ消化により作製されるゲノムDNA断片）である。このような、単離核酸分子は、一般に、操作の簡便のために、または下記でより詳細に論じられる、融合核酸分子を作出するように、ベクター（例えば、クローニングベクターまたは発現ベクター）へと導入される。加えて、単離核酸分子は、組換え核酸分子または合成核酸分子など、操作核酸分子を含みうる。

20

【0079】

本明細書で記載されるベクターは、宿主細胞へと（例えば、アスペルギルス属（*Aspergillus*）細胞、トリコデルマ属（*Trichoderma*）細胞、または酵母細胞（例えば、メタノール資化酵母細胞）などの真菌細胞）導入されうる。本明細書で使用される、「宿主細胞」とは、核酸が導入される、特定の細胞を指し、また、ベクターを保有する、このような細胞の子孫細胞も含む。宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞でありうる。例えば、核酸は、大腸菌（*E. coli*）などの細菌細胞内で発現される場合もあり、昆虫細胞、酵母細胞、または哺乳動物細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCOS細胞など）内で発現される場合もある。当業者には、他の適切な宿主細胞が公知である。当業者には、核酸を、宿主細胞へと導入するための、*in vivo*および*in vitro*の両方における、多くの方法が周知であり、限定せずに述べると、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレングリコール（PEG）形質転換、熱ショック、リポフェクション、マイクロインジェクション、およびウイルス媒介核酸導入を含む。

30

【0080】

核酸は、当技術分野において規定の技法を使用して単離されうる。例えば、核酸は、限定せずに述べると、組換え核酸技術、および／またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を含む任意の方法を使用して単離されうる。一般的なPCR技法については、例えば、PCR Primer: A Laboratory Manual, Dieffenbach & Dveksler, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995において記載されている。組換え核酸技法は、例えば、核酸を単離するのに使用されうる、制限酵素消化およびライゲーションを含む。単離核酸はまた、単一の核酸分子または一連のオリゴヌクレオチドとして化学合成される場合もある。

40

【0081】

ポリペプチドは、DEAEイオン交換、ゲル濾過、およびヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーなど、公知の方法により、天然の供給源（例えば、生物学的試料）から精製されうる。ポリペプチドはまた、例えば、発現ベクター内で、核酸を発現させることによ

50

り精製もされうる。加えて、精製ポリペプチドは、化学合成により得られうる。ポリペプチドの純度は、任意の適切な方法、例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC解析を使用して測定されうる。

【0082】

核酸（例えば、ポリペプチドをコードする核酸）を含有する構築物またはベクターもまた提供される。発現構築物または発現ベクターを含む構築物またはベクターは、市販されているか、または当技術分野において規定の、組換えDNA技法により作製されうる。核酸を含有する構築物またはベクターは、このような核酸に作動可能に連結された発現エレメントを有することが可能であり、選択用マーカー（例えば、抗生剤耐性遺伝子）をコードする配列などの配列をさらに含む。核酸を含有する構築物またはベクターは、キメラポリペプチドまたは融合ポリペプチド（すなわち、異種ポリペプチドに作動的に連結されたポリペプチドであり、これは、ポリペプチドのN末端またはC末端においてでありうる）をコードしうる。代表的異種ポリペプチドは、コードされるポリペプチドの精製において使用されうる、異種ポリペプチド（例えば、6×Hisタグ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST））を含む。

【0083】

核酸はまた、ハイブリダイゼーションを使用しても検出されうる。核酸間のハイブリダイゼーションについては、Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sections 7.37-7.57, 9.47-9.57, 11.7-11.8, and 11.45-11.57)において、詳細に論じられている。Sambrook et al.は、約100ヌクレオチド未満のオリゴヌクレオチドプローブに適するサザンブロット条件について開示している（11.45～11.46節）。100ヌクレオチド未満の長さの配列と、第2の配列との間のT_mは、11.46節に提示されている式を使用して計算されうる。加えて、Sambrook et al.は、約100ヌクレオチドを超えるオリゴヌクレオチドプローブに適するサザンブロット条件について開示する（9.47～9.54節を参照されたい）。100ヌクレオチドを超える長さの配列と、第2の配列との間のT_mは、Sambrook et al.の9.50～9.51節に提示されている式を使用して計算されうる。

【0084】

核酸を含有する膜が、プレハイブリダイズされ、ハイブリダイズされる条件の他、過剰量のプローブおよび非特異的に結合したプローブを除去するように、核酸を含有する膜が洗浄される条件は、ハイブリダイゼーションの厳密性において、著明な役割を果たしうる。このようなハイブリダイゼーションおよび洗浄は、適切な場合、中程度の厳密性または高厳密性の条件下で実施されうる。例えば、洗浄条件は、洗浄液中の塩濃度を低下させることにより、より厳密とされる場合もあり、かつ／または洗浄が実施される温度を上昇させることにより、より厳密とされる場合もある。例だけとして述べると、高厳密性の条件は、典型的に、0.2倍濃度のSSC中、65℃における、膜の洗浄を含む。

【0085】

加えて、ハイブリダイゼーション量の解釈は、例えば、標識付けされたオリゴヌクレオチドプローブの特異的活性、プローブがハイブリダイズした鋳型核酸上の、プローブ結合性部位の数、およびオートラジオグラフまたは他の検出媒質の露出量により影響されうる。当業者により、任意の数のハイブリダイゼーション条件および洗浄条件が、プローブ核酸分子の、固定化された標的核酸へのハイブリダイゼーションについて検討するのに使用されうるが、プローブの、標的核酸へのハイブリダイゼーションについて、同一なハイブリダイゼーション条件、洗浄条件、および曝露条件下で検討することが重要であることがたやすく察知されるであろう。好ましくは、標的核酸は、同じ膜上にある。

【0086】

ある核酸へのハイブリダイゼーションが、別の核酸へのハイブリダイゼーションの、少なくとも5倍（例えば、少なくとも6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、または100倍）である場合、核酸分子は、ある核酸とハイブリダイズするが、別の核酸

とハイブリダイズしないと見なされる。ハイブリダイゼーションの量は、膜上で直接定量される場合もあり、例えば、Phosphor ImagerまたはDensitometer (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) を使用して、オートラジオグラフにより定量される場合もある。

【0087】

ポリペプチドは、抗体を使用して検出されうる。抗体を使用して、ポリペプチドを検出するための技法は、酵素免疫測定アッセイ (ELISA)、ウェスタンブロット、免疫沈降、および免疫蛍光を含む。抗体は、ポリクローナル抗体の場合もあり、モノクローナル抗体の場合もある。ポリペプチドに対する特異的結合アフィニティーを有する抗体は、当技術分野で周知の方法を使用して作出されうる。抗体は、当技術分野で公知の方法を使用して、マイクロ滴定プレートなどの固体支持体へと接合されうる。ポリペプチドの存在下では、抗体-ポリペプチド複合体が形成される。

10

【0088】

検出 (例えば、増幅産物、ハイブリダイゼーション複合体、またはポリペプチドの検出) は、通例では、検出可能な標識を使用して達せられる。「標識」という用語は、直接的な標識ならびに間接的な標識の使用を包摂することが意図される。検出可能な標識は、酵素、補欠分子群、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射性物質を含む。

【0089】

本明細書では、選択のための配列を欠く (すなわち、選択用マーカーを欠く) 株を作出するのに使用されうる方法が記載される。これらの方法は、環状プラスミド DNA ベクターおよび直鎖状 DNA 配列の使用を含み; 環状プラスミド DNA ベクターは、選択マーカーおよび DNA の複製起点 (また、自己複製配列 (ARS) としても公知である) を含有し、直鎖状 DNA 配列は、相同組換えによる、ゲノム (例えば、ピキア属 (Pichia) ゲノム) への組み込みのための配列を含有する。加えて、直鎖状 DNA 分子は、限定せずに述べると、ALAS、ヘム結合性タンパク質、または第3のタンパク質 (例えば、転写因子、またはヘムの生合成に関与するタンパク質) など、1つまたは複数の、目的のタンパク質をコードする核酸配列を含みうる。

20

【0090】

細胞 (例えば、ピキア属 (Pichia) 細胞) は、両方の DNA 分子で形質転換され、形質転換体は、環状プラスミド上の、選択用マーカーの存在により選択されうる。次いで、形質転換体は、例えば、PCRを使用して、直鎖状 DNA 分子の、ゲノムへの組み込みについてスクリーニングされうる。マーカーを含まない直鎖状 DNA 分子が適正に組み込まれた形質転換体が同定されたら、細胞は、環状プラスミドについての選択の非存在下で増殖されうる。選択の非存在下では、マーカーを保有するプラスミドは、安定的に維持されないため、プラスミドは、選択が緩められた後に、しばしば、極めて急速に失われる。結果として得られる株は、選択のための異種配列の非存在下で、組み込まれた直鎖状 DNA を保有する。したがって、この手法は、組換えタンパク質収率に対して、ほとんど~全く影響を及ぼさずに、選択用マーカー (例えば、異種選択マーカー) を欠く株 (例えば、ピキア属 (Pichia) 株) を構築するのに使用されうる。

30

【0091】

本開示に従い、当技術分野の技術の範囲内にある、従来の分子生物学法、微生物学法、生化学法、組換え DNA 技法が援用されうる。このような技法については、文献において、十分に説明されている。以下の実施例では、本開示の材料および方法がさらに例示されるが、これは、特許請求の範囲において記載される方法および組成物の範囲を限定するものではない。

40

【0092】

以下の実施例では、本開示の材料および方法について、さらに記載されるが、これは、特許請求の範囲を限定するものではない。

【0093】

例示的实施形態

50

実施形態 1. 第 1 のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、アミノレブリン酸シンターゼ (A L A S) タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、A L A S が少なくとも第 1 のヘム反応性モチーフ (H R M) を含み、A L A S が第 1 の H R M 内の突然変異を含む、第 1 の外因性核酸構築物；および

ヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の外因性核酸構築物を含む細胞であって、

ヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の外因性核酸構築物が、第 1 のプロモーターエレメントに作動可能に連結されているか、または第 2 のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、細胞。

実施形態 2. 真菌細胞である、実施形態 1 に記載の細胞。

実施形態 3. アスペルギルス属 (*Aspergillus*) 細胞またはトリコデルマ属 (*Trichoderma*) 細胞である、実施形態 2 に記載の細胞。

実施形態 4. 酵母細胞である、実施形態 1 から 3 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 5. 酵母細胞が、メタノール資化酵母細胞である、実施形態 4 に記載の細胞。

実施形態 6. メタノール資化酵母細胞が、ピキア属 (*Pichia*) 細胞、カンジダ属 (*Candida*) 細胞、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*) 細胞、またはトルロプシス属 (*Torulopsis*) 細胞である、実施形態 5 に記載の細胞。

実施形態 7. メタノール資化酵母細胞が、ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*) 細胞、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 細胞、カンジダ・ボイジニー (*Candida boidinii*) 細胞、またはハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) 細胞である、実施形態 5 から 6 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 8. メタノール資化酵母細胞が、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 細胞である、実施形態 5 から 7 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 9. 第 1 の H R M 内の突然変異が、システインから異なるアミノ酸への突然変異である、実施形態 1 から 8 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 10. A L A S タンパク質が第 2 の H R M を含み、A L A S タンパク質が第 2 の H R M 内の突然変異を含む、実施形態 1 から 9 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 11. 第 2 の H R M 内の突然変異が、システインから異なるアミノ酸への突然変異である、実施形態 10 に記載の細胞。

実施形態 12. 異なるアミノ酸が、第 1 の H R M 内の突然変異および第 2 の H R M 内の突然変異について同じである、実施形態 10 または実施形態 11 に記載の細胞。

実施形態 13. 異なるアミノ酸が、第 1 の H R M 内の突然変異および第 2 の H R M 内の突然変異について同じではない、実施形態 10 または実施形態 11 に記載の細胞。

実施形態 14. A L A S タンパク質が第 3 の H R M を含み、A L A S タンパク質が第 3 の H R M 内の突然変異を含む、実施形態 10 から 13 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 15. 第 3 の H R M 内の突然変異が、システインから異なるアミノ酸への突然変異である、実施形態 14 に記載の細胞。

実施形態 16. 異なるアミノ酸が、第 1 の H R M 内の突然変異、第 2 の H R M 内の突然変異、および第 3 の H R M 内の突然変異について同じである、実施形態 15 に記載の細胞。

実施形態 17. 異なるアミノ酸が、アルギニン、ヒスチジン、リシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、セレノシステイン、グリシン、プロリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンからなる群から選択される、実施形態 9 から 16 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 18. 異なるアミノ酸が、非極性脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、極性非帯電アミノ酸、または正帯電アミノ酸から選択される、実施形態 9 から 16 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 19. 非極性脂肪族アミノ酸が、グリシン、プロリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリンからなる群から選択される、実施形態 18 に記載の細胞。

10

20

30

40

50

実施形態 20. 芳香族アミノ酸が、フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンからなる群から選択される、実施形態 18 に記載の細胞。

実施形態 21. 極性非帯電アミノ酸が、極性非帯電アミノ酸であるセリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミンからなる群から選択される、実施形態 18 に記載の細胞。

実施形態 22. 正帯電アミノ酸が、アルギニン、ヒスチジン、およびリシンからなる群から選択される、実施形態 18 に記載の細胞。

実施形態 23. 異なるアミノ酸がセリンである、実施形態 9 から 22 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 24. 異なるアミノ酸がアラニンである、実施形態 9 から 22 のいずれか一つに記載の細胞。

10

実施形態 25. 異なるアミノ酸がフェニルアラニンである、実施形態 9 から 22 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 26. 異なるアミノ酸がヒスチジンである、実施形態 9 から 22 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 27. 第 1 の HRM が HRM 1 である、実施形態 1 から 26 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 28. 第 2 の HRM が HRM 2 である、実施形態 10 から 27 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 29. 第 1 の HRM が HRM 2 である、実施形態 1 から 26 のいずれか一つに記載の細胞。

20

実施形態 30. 第 2 の HRM が HRM 1 である、実施形態 10 から 27 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 31. 第 1 の外因性核酸構築物が、配列番号 28 内の核酸配列に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、実施形態 1 から 30 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 32. 第 1 の外因性核酸構築物が、配列番号 28 内の核酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、実施形態 1 から 30 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 33. 第 1 の外因性核酸構築物が、配列番号 30 内の核酸配列を含む、実施形態 1 から 30 のいずれか一つに記載の細胞。

30

実施形態 34. ALAS タンパク質が、配列番号 29 内のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 から 32 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 35. ALAS タンパク質が、配列番号 29 内のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 から 32 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 36. ALAS タンパク質が、配列番号 31 内のアミノ酸配列を含む、実施形態 1 から 35 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 37. ヘム結合性タンパク質が、グロビン、チトクローム、チトクローム c オキシダーゼ、リグニナーゼ、カタラーゼ、およびペルオキシダーゼからなる群から選択される、実施形態 1 から 36 のいずれか一つに記載の細胞。

40

実施形態 38. ヘム結合性タンパク質が、アンドログロビン、クロロクルオリン、サイトグロビン、エリスロクルオリン、フラボヘモグロビン、グロビン E、グロビン X、グロビン Y、ヘモグロビン、ヒストグロビン、レグヘモグロビン、ミオグロビン、ニューログロビン、非共生型ヘモグロビン、プロトグロビン、および切断型ヘモグロビンからなる群から選択される、実施形態 1 から 36 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 39. ヘム結合性タンパク質が非共生型ヘモグロビンである、実施形態 1 から 36 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 40. ヘム結合性タンパク質がレグヘモグロビンである、実施形態 1 から 36

50

のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 4 1. ヘム結合性タンパク質が、配列番号 1 ~ 2 7 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1 から 4 0 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 4 2. 転写因子をコードするヌクレオチド配列を含む第 3 の核酸構築物をさらに含み、第 3 の核酸構築物が、第 1 のプロモーターエレメント、第 2 のプロモーターエレメント、または第 3 のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、実施形態 1 から 4 1 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 4 3. 第 1 のプロモーターエレメントが、転写因子に対する認識配列を含む、実施形態 4 2 に記載の細胞。

10

実施形態 4 4. 第 2 の外因性核酸構築物が、第 2 のプロモーターエレメントに作動可能に連結されており、第 2 のプロモーターエレメントが、転写因子に対する認識配列を含む、実施形態 4 2 または 4 3 に記載の細胞。

実施形態 4 5. 第 3 の核酸構築物が、第 3 のプロモーターエレメントに作動可能に連結されており、第 3 のプロモーターエレメントが、転写因子に対する認識配列を含む、実施形態 4 2 または 4 3 に記載の細胞。

実施形態 4 6. ヘムの生合成に関与するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第 4 の核酸構築物をさらに含み、第 4 の核酸構築物が、第 1 のプロモーターエレメント、第 2 のプロモーターエレメント、第 3 のプロモーターエレメント、または第 4 のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、実施形態 1 から 4 5 のいずれか一つに記載の細胞。

20

実施形態 4 7. ヘムの生合成に関与するタンパク質が、ALA デヒドラターゼ、ポルホビリノーゲンデアミナーゼ、UPG III シンターゼ、UPG III デカルボキシラーゼ、CPG オキシダーゼ、PPG オキシダーゼ、およびフェロキラーゼからなる群から選択される、実施形態 4 6 に記載の細胞。

実施形態 4 8. 第 1 の外因性核酸構築物が、異種核酸構築物である、実施形態 1 から 4 7 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 4 9. 第 2 の外因性核酸構築物が、異種核酸構築物である、実施形態 1 から 4 8 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 5 0. ヘム結合性タンパク質が、外因性ヘム結合性タンパク質である、実施形態 1 から 4 7 のいずれか一つに記載の細胞。

30

実施形態 5 1. ヘム結合性タンパク質が、異種ヘム結合性タンパク質である、実施形態 1 から 4 7 または 5 0 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 5 2. 細胞内でヘム結合性タンパク質を作製する方法であって、

第 1 のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、アミノレブリン酸シンターゼ (ALAS) タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ALAS が少なくとも第 1 のヘム反応性モチーフ (HRM) を含み、ALAS が第 1 の HRM 内の突然変異を含む、第 1 の外因性核酸構築物を発現させるステップ；および

ヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の外因性核酸構築物を発現させるステップ

40

を含み、ヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の外因性核酸構築物が、第 1 のプロモーターエレメントに作動可能に連結されているか、または第 2 のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、方法。

実施形態 5 3. 第 1 の外因性核酸構築物を欠く対応する方法を少なくとも 5 % を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製する実施形態 5 2 に記載の方法。

実施形態 5 4. 第 1 の外因性核酸構築物を欠く対応する方法を少なくとも 1 0 % を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製する実施形態 5 2 または実施形態 5 3 に記載の方法。

実施形態 5 5. 第 1 の外因性核酸構築物を欠く対応する方法を少なくとも 1 5 % を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製する実施形態 5 2 または実施形態 5 3 に記載の方

50

法。

実施形態 56. 第 1 の外因性核酸構築物を欠く対応する方法を少なくとも 20 % を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製する実施形態 52 または実施形態 53 に記載の方法。

実施形態 57. 第 1 の HRM 内の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも 5 % を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製する、実施形態 52 に記載の方法。

実施形態 58. 第 1 の HRM 内の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも 10 % を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製する、実施形態 52 に記載の方法。

実施形態 59. 第 1 の HRM 内の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも 15 % を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製する、実施形態 52 に記載の方法。

実施形態 60. 第 1 の HRM 内の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも 20 % を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製する、実施形態 52 に記載の方法。

実施形態 61. メタノールの添加の非存在下で実行される、実施形態 52 から 60 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 62. 細胞が、真菌細胞である、実施形態 52 から 61 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 63. 細胞が、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) 細胞またはトリコデルマ属 (*Trichoderma*) 細胞である、実施形態 62 に記載の方法。

実施形態 64. 細胞が、酵母細胞である、実施形態 62 から 63 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 65. 酵母細胞が、メタノール資化酵母細胞である、実施形態 64 に記載の方法。

実施形態 66. メタノール資化酵母細胞が、ピキア属 (*Pichia*) 細胞、カンジダ属 (*Candida*) 細胞、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*) 細胞、またはトルロプシス属 (*Torulopsis*) 細胞である、実施形態 65 に記載の方法。

実施形態 67. メタノール資化酵母細胞が、ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolic*a) 細胞、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 細胞、カンジダ・ボイジニー (*Candida boidinii*) 細胞、またはハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) 細胞である、実施形態 65 から 66 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 68. メタノール資化酵母細胞が、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 細胞である、実施形態 51 から 53 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 69. 第 1 の HRM 内の突然変異が、システインから異なるアミノ酸への突然変異である、実施形態 52 から 68 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 70. ALAS タンパク質が第 2 の HRM を含み、ALAS タンパク質が第 2 の HRM 内の突然変異を含む、実施形態 52 から 69 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 71. 第 1 の HRM 内および第 2 の HRM 内の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも 5 % を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製する、実施形態 70 に記載の方法。

実施形態 72. 第 1 の HRM 内および第 2 の HRM 内の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも 10 % を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製する、実施形態 70 に記載の方法。

実施形態 73. 第 1 の HRM 内および第 2 の HRM 内の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも 15 % を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製する、実施形態 70 に記載の方法。

実施形態 74. 第 1 の HRM 内および第 2 の HRM 内の突然変異を欠く対応する方法を少なくとも 20 % を超える力価で、ヘム結合性タンパク質を作製する、実施形態 70 に記載の方法。

実施形態 75. 第 2 の HRM 内の突然変異が、システインから異なるアミノ酸への突然変異である、実施形態 70 から 74 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 76. 異なるアミノ酸が、第 1 の HRM 内の突然変異および第 2 の HRM 内の

10

20

30

40

50

突然変異について同じである、実施形態 70 から 75 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 77. 異なるアミノ酸が、第 1 の HRM 内の突然変異および第 2 の HRM 内の突然変異について同じではない、実施形態 70 から 75 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 78. ALA S タンパク質が第 3 の HRM を含み、ALA S タンパク質が、第 3 の HRM 内の突然変異を含む、実施形態 70 から 77 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 79. 第 3 の HRM 内の突然変異が、システインから異なるアミノ酸への突然変異である、実施形態 78 に記載の細胞。

実施形態 80. 異なるアミノ酸が、第 1 の HRM 内の突然変異、第 2 の HRM 内の突然変異、および第 3 の HRM 内の突然変異について同じである、実施形態 79 に記載の細胞。

実施形態 81. 異なるアミノ酸が、アルギニン、ヒスチジン、リシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、セレノシステイン、グリシン、プロリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンからなる群から選択される、実施形態 69 から 80 のいずれか一つに記載の方法。

10

実施形態 82. 異なるアミノ酸が、非極性脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、極性非常電アミノ酸、または正帯電アミノ酸から選択される、実施形態 69 から 80 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 83. 非極性脂肪族アミノ酸が、グリシン、プロリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリンからなる群から選択される、実施形態 82 に記載の方法。

20

実施形態 84. 芳香族アミノ酸が、フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンからなる群から選択される、実施形態 82 に記載の方法。

実施形態 85. 極性非常電アミノ酸が、極性非常電アミノ酸であるセリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミンからなる群から選択される、実施形態 82 に記載の細胞。

実施形態 86. 正帯電アミノ酸が、アルギニン、ヒスチジン、およびリシンからなる群から選択される、実施形態 82 に記載の方法。

実施形態 87. 異なるアミノ酸がセリンである、実施形態 69 から 86 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 88. 異なるアミノ酸がアラニンである、実施形態 69 から 86 のいずれか一つに記載の方法。

30

実施形態 89. 異なるアミノ酸がフェニルアラニンである、実施形態 69 から 86 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 90. 異なるアミノ酸がヒスチジンである、実施形態 69 から 86 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 91. 第 1 の HRM が HRM 1 である、実施形態 52 から 90 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 92. 第 2 の HRM が HRM 2 である、実施形態 70 から 91 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 93. 第 1 の HRM が HRM 2 である、実施形態 52 から 90 のいずれか一つに記載の細胞。

40

実施形態 94. 第 2 の HRM が HRM 1 である、実施形態 70 から 91 のいずれか一つに記載の細胞。

実施形態 95. 第 1 の外因性核酸構築物が、配列番号 28 内の核酸配列に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、実施形態 52 から 94 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 96. 第 1 の外因性核酸構築物が、配列番号 28 内の核酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する核酸配列を含む、実施形態 52 から 95 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 97. 第 1 の外因性核酸構築物が配列番号 30 内の核酸配列を含む、実施形態

50

52から96のいずれか一つに記載の方法。

実施形態98．A L A Sタンパク質が、配列番号29内のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態52から97のいずれか一つに記載の方法。

実施形態99．A L A Sタンパク質が、配列番号29内のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態52から98のいずれか一つに記載の方法。

実施形態100．A L A Sタンパク質が配列番号31内のアミノ酸配列を含む、実施形態52から99のいずれか一つに記載の方法。

実施形態101．ヘム結合性タンパク質が、グロビン、チトクローム、チトクロームcオキシダーゼ、リグニナーゼ、カタラーゼ、およびペルオキシダーゼからなる群から選択される、実施形態52から100のいずれか一つに記載の方法。

10

実施形態102．ヘム結合性タンパク質が、アンドログロビン、クロロクルオリン、サイトクロビン、エリスロクルオリン、フラボヘモグロビン、グロビンE、グロビンX、グロビンY、ヘモグロビン、ヒストグロビン、レグヘモグロビン、ミオグロビン、ニューログロビン、非共生型ヘモグロビン、プロトグロビン、および切断型ヘモグロビンからなる群から選択される、実施形態52から100のいずれか一つに記載の方法。

実施形態103．ヘム結合性タンパク質が非共生型ヘモグロビンである、実施形態52から100のいずれか一つに記載の方法。

実施形態104．ヘム結合性タンパク質がレグヘモグロビンである、実施形態52から100のいずれか一つに記載の方法。

20

実施形態105．異種ヘム結合性タンパク質が、配列番号1～27のうちのいずれか一つのアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態52から100のいずれか一つに記載の方法。

実施形態106．転写因子をコードするヌクレオチド配列を含む第3の核酸構築物を発現させるステップをさらに含み、第3の核酸構築物が、第1のプロモーターエレメント、第2のプロモーターエレメント、または第3のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、実施形態52から105のいずれか一つに記載の方法。

実施形態107．第1のプロモーターエレメントが、転写因子に対する認識配列を含む、実施形態106に記載の方法。

30

実施形態108．第2の外因性核酸構築物が、第2のプロモーターエレメントに作動可能に連結されており、第2のプロモーターエレメントが、転写因子に対する認識配列を含む、実施形態107に記載の方法。

実施形態109．第3の核酸構築物が、第3のプロモーターエレメントに作動可能に連結されており、第3のプロモーターエレメントが、転写因子に対する認識配列を含む、実施形態107から108のいずれか一つに記載の方法。

実施形態110．ヘムの生合成に関与するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第4の核酸構築物を発現させるステップをさらに含み、第4の核酸構築物が、第1のプロモーターエレメント、第2のプロモーターエレメント、第3のプロモーターエレメント、または第4のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、実施形態52から109のいずれか一つに記載の方法。

40

実施形態111．ヘムの生合成に関与するタンパク質が、A L A デヒドラターゼ、ポリホピリノーゲンデアミナーゼ、U P G I I I シンターゼ、U P G I I I デカルボキシラーゼ、C P G オキシダーゼ、P P G オキシダーゼ、およびフェロキラーゼからなる群から選択される、実施形態110に記載の方法。

実施形態112．第1の外因性核酸構築物が異種核酸構築物である、実施形態52から111のいずれか一つに記載の方法。

実施形態113．第2の外因性核酸構築物が異種核酸構築物である、実施形態52から112のいずれか一つに記載の方法。

実施形態114．ヘム結合性タンパク質が外因性ヘム結合性タンパク質である、実施形

50

態 5 2 から 1 1 3 のいずれか一つに記載の方法。

実施形態 1 1 5 . ヘム結合性タンパク質が異種ヘム結合性タンパク質である、実施形態 5 2 から 1 1 1 または 1 1 4 のいずれか一つに記載の方法。

【実施例】

【0094】

[実施例 1]

ポリメラーゼ連鎖反応

Phusion Hi-fidelity PCR master mix (New England Biolabs、型番:M0531)、各々0.6 μMのフォワードプライマーおよびリバースプライマー、および10~50 ngの鋳型DNAを使用して、目的の遺伝子を、ゲノムDNA鋳型またはプラスミドDNA鋳型から増幅した。反応条件は、以下の通りであった:

【0095】

【表 1】

1 サイクル	初回変性	98℃	1 分間
25 サイクル	変性	98℃	10 秒間
	アニーリング	60℃	20 秒間
	伸長	72℃	1kb 当たり 30 秒間
1 サイクル	最終伸長	72℃	5 分間
	保持	4℃	永続

【0096】

ピキア・パストリス (Pichia pastoris) の ALAS 遺伝子 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) ウェブサイトでアクセスされる、KEGG 識別子: PAS_chr2-1_0716) は、ゲノムDNAに由来するプライマー (ATGGAGTTTGTCTCGCCCGTCAG; 配列番号 65)、および (CTACAATCTGACTCCTGATGAGGTTTC; 配列番号 66) を使用して増幅した。実施例では、wtALAS は、このALASの天然配列 (配列番号 28) を表す。

【0097】

[実施例 2]

ALAS のクローニングおよび突然変異誘発

NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (タカラバイオ株式会社、型番: 740609) を使用して、PCR 産物を精製し、製造元の推奨に従い、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific、型番: K280020) を使用して、pCR-Blunt II-TOPO ベクターにクローニングした。結果として得られるベクター (40 ng の精製プラスミド) 上において、2 つのプライマーセット (セット 1: CGTCAGTCCA TGAATGCCCTCTCCCTTTGTCTAGGTCAACTTC; 配列番号 37; および GAAGTTTGACCTGACAAAGGGAGAGGCATTTCATGGACTG ACG; 配列番号 38; セット 2: GCTGCTACTGCTAGTCATTCTCCC GTGGTTGGCCCTG; 配列番号 39; および CAGGGCCAACCAACGGG AGAATGACTAGCAGTAGCAGC; 配列番号 40)、および QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent、型番: 200521) を使用して、部位指向突然変異誘発を実行して、12 および 39 位におけるシステイン残基からセリン残基への突然変異を保有する mutALAS (配列番号 30) を創出した。実施例では、mutALAS は、そうでないことが

指定されない限り、とりわけ、これらの2つ突然変異を表す。反応条件は、以下の通りであった：

【0098】

【表2】

1 サイクル	初回変性	95℃	1 分間
18 サイクル	変性	95℃	50 秒間
	アニーリング	60℃	50 秒間
	伸長	68℃	11 分間
1 サイクル	最終伸長	68℃	7 分間
	保持	4℃	永続

10

【0099】

wt ALASを保有するベクター上において、それぞれ、プライマーセット1（配列番号37、配列番号38）、およびセット2（配列番号39、配列番号40）を使用する部位指向突然変異誘発により、単一のシステインからセリンへの突然変異である、C12SまたはC39Sを実施した。

【0100】

[実施例3]

20

ALAS（野生型、またはC12S突然変異、C39S突然変異）遺伝子組込みカセットの構築

ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）に由来するメタノール誘導性アルコールオキシダーゼ1（AOX1）プロモーターエレメント、および、翻訳終止シグナルの前に直接後続する、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）FDH1遺伝子に由来する転写終結配列の下で、遺伝子組込みが生じるように、wt ALASまたはmut ALASの組込みカセットをデザインした。直鎖状構築物は、プロモーターエレメントの3'側に続く、ALAS遺伝子（野生型または突然変異体）に続く、FDH1転写ターミネーターを含有した。この直後に、アシュビヤ・ゴシピー（*Ashbya gossypii*）に由来するpTEFプロモーターエレメント、アスペルギルス・ニデュランス（*Aspergillus nidulans*）に由来するアセトアミダーゼ遺伝子（amdS）、およびアシュビヤ・ゴシピー（*Ashbya gossypii*）に由来するTEFターミネーターを含有する選択カセットを後続させた。最後に、構築物は、プロモーターエレメントの5'側を含有した（例えば、図5を参照されたい）。

30

【0101】

重複PCRを使用して、直鎖状構築物[3' pAOX1-ALAS(wt/mut)-FDH1tt-pTEF-amdS-TEFtt-5' pAOX1]を創出した。直鎖状構築物を増幅するのに使用したプライマー：

【0102】

【表3】

重複 PCR	プライマー配列	配列番号
PCR1	AAACGCTGTCTTGGAACCTAATATGAC	41
	GACGGGCGACAAACTCCATCGTTTCGAATAATTAGTTG	42
PCR2	CAACTAATTATTCGAAACGATGGAGTTTGTCGCCCGTCAG	43
	AATTAAATACATTTCAACTACAATCTGACTCCTGATGAGGTTTCG	44
PCR3	CCTCATCAGGAGTCAGATTGTAGTTGAAATGTATTTAATTIG	45
	AAACTGTCAGTTTTGGGCCATTIG	46

40

【0103】

個々のPCR反応条件は、上記で指し示した通りに実施した。PCR産物は、NucL

50

eoSpin Gel and PCR Clean-Up (タカラバイオ株式会社、型番：740609)を使用して精製した。0.5 U Platinum Pfx DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific、型番：11708039)、1倍濃度の増幅緩衝液、0.3 mMのdNTP、および1 mMのMgCl₂を使用して、2部式PCR反応において、3つの精製PCR単位複製配列を、等モル比で混合することにより、最終的な重複PCRを実施した。PCR条件は、以下の通りであった：

第1部：

【0104】

【表4】

1 サイクル	初回変性	94℃	2 分間
15 サイクル	変性	94℃	15 秒間
	アニーリング	58℃	30 秒間
	伸長	68℃	5 分間
	保持	4℃	

10

【0105】

第1部の後、反応ミックスを、プライマーである、AAACGCTGTCTTGGAACCTAATATGAC (配列番号41)、およびAAACTGTCAGTTTTTGGGCCATTTTG (配列番号46) (0.3 uMの最終濃度)、ならびに1.5 U Pfx とスパイクし、第2部へと続行した。

20

【0106】

第2部：

【0107】

【表5】

1 サイクル	初回変性	94℃	2 分間
20 サイクル	変性	94℃	15 秒間
	アニーリング	58℃	30 秒間
	伸長	68℃	5 分間
	保持	4℃	永続

30

【0108】

例示的な突然変異体の核酸 (例えば、配列番号30) およびタンパク質 (例えば、配列番号31) の配列を、図7に提示する。

【0109】

自己複製ベクター (panARS) 内の、修飾pAOX1に続く、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) FDH1遺伝子に由来する転写終結配列下で、wtALASおよびmutALASの発現プラスミドを構築した。ベクターは、G418 (Geneticin) に対する耐性を付与した。製造元の推奨に従い、Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs、型番：E2611L) を使用して、インサートである、GFP、wtALAS、およびmutALASの、ベクター内のクローニングを実施した。

40

【0110】

[実施例4]

P. パストリス (P. pastoris) 形質転換コンピテント細胞の調製

P. パストリス (P. pastoris) (K. ファフィー (K. phaffii)) の選択株を、25 m

50

lのYPD培地中で、指数関数的増殖中期（約2OD）まで増殖させた。細胞を、930×gで、15分間にわたる遠心分離により回収した。細胞ペレットを、80%のYPDと、200mMのHEPES、pH 6.8とによる溶液2ml中に再懸濁させた。1MのDTT75μlを添加した。再懸濁された細胞ペレットを、100rpm、30℃で、25分間にわたり混合した。容量40mlの、氷冷滅菌水を、懸濁液へと添加し、細胞を、1125×gで15分間にわたる遠心分離により回収し、氷上に置いた。細胞ペレットを、40mlの氷冷水中に再懸濁させ、前出と同様に、2回にわたるさらなる洗浄ステップのために回収した。次いで、細胞ペレットを、1Mの氷冷ソルビトール20ml中に再懸濁させ、前出と同様に、遠心分離により回収した。最終細胞ペレットを、1Mの氷冷滅菌ソルビトール0.3ml中に懸濁させ、アリコート分割し、−80℃で凍結させた。

10

【0111】

[実施例5]

P. パストリス (P. pastoris) の形質転換

ゲノムへの組み込みのために、GenePulser (BioRad) を、1.15kVに設定した、ギャップ1mmのGenePulserキュベット (BioRad、型番：1652083) を使用して、100~300ngの直鎖化DNAにより、30μlのエレクトロコンピテントP. パストリス (P. pastoris) 細胞を形質転換した。1mlのYPD/1Mソルビトール (1:1vol/vol) を、細胞へと、すぐに添加した。30℃、100rpmで振盪しながら、3時間にわたり、細胞を回収した。100μlの回収混合物を、5mMのアセトアミドを含有する、酵母炭素ベースプレート (Teknova、型番：Y5216) 上に播種した。プレートを、30℃で、48時間にわたりインキュベートした。個々のクローンを、アセトアミドを含有する、酵母炭素ベースプレートへと画線接種して、単一のコロニーを得、単離されたコロニーを使用して、コロニーPCRまたはgDNA調製を行い、染色体および配列組み込み構築物への遺伝子の組み込みを確認した。

20

【0112】

電気穿孔および細胞の回収の後で、50~100μlの回収混合物を、300ug/mlのG418 (Geneticin) を含有するYPDプレート上に播種したことを除き、プラスミドDNAによる形質転換についても、ゲノム組み込みの場合と同じステップに従った。

【0113】

30

[実施例6]

株である、St2、St3、St5、およびSt6の構築

高収率親株 (St1) は、メタノール誘導性強力プロモーターpAOX1 (アルコールオキシダーゼ1) の下で、他のpAOX1駆動型のヘム酵素、炭素反応性転写因子であるMxR1、およびLegHの複数のコピーに加えて、既存の組換えALASを有した。低収率親LegH株 (St4) は、組換えMxR1、ALAS、およびアミノレブリン酸デヒドラターゼ (ALAD) を除く、他のヘム酵素を欠いた。

【0114】

コンピテントSt1細胞 (表1; 高LegH力価株) を、直鎖状カセットの各々 (wtALASおよびmutALASについての) で形質転換し、唯一の窒素供給源としてのアセトアミドを含有する寒天プレート上で増殖する、それらの能力に基づき、amdS選択カセットを含有する形質転換体を選択した。結果として得られる株 (それぞれ、wtALASおよびmutALASのためのカセットを組み込んだ、St2およびSt3; 表1) を精製し、単離し、pAOX1駆動型のwtALASまたはpAOX1駆動型のmutALASの存在を、コロニーPCRおよびシーケンシングにより検証した。同様に、コンピテントSt4細胞 (低LegH力価株) を、wtALASおよびmutALASのための直鎖状カセットで形質転換して、それぞれ、St5およびSt6を得た。

40

【0115】

50

【表 6】

表 1. ゲノム内に LegH が組み込まれた株

親	組換え wtALAS の余剰 1 コピーが付加された	組換え mutALAS の余剰 1 コピーが付加された
高 LegH 力価株 (株 St1)	株 St2	株 St3
低 LegH 力価株 (株 St4)	株 St5	株 St6

10

【0116】

[実施例 7]

ALAS 遺伝子コピー数解析

プローブベースの qPCR により、異なる株内の、ALAS 遺伝子コピー数を測定した。略述すると、real-time qPCR CFX96 machine (Bio-Rad) において、1 倍濃度の PrimeTime gene expression mastermix (Integrated DNA Technologies、型番: 1055770)、および PrimeTime qPCR Probe Assays により、ゲノム DNA (20 ng) を増幅した。qPCR の正規化は、アクチンに照らして実施した。二重デルタ Ct 解析法に従って、目的の遺伝子の、株間における相対コピー数を計算した。プライマー配列およびプローブ配列は、以下の通りであった：

20

【0117】

【表 7】

遺伝子	プライマー配列	配列番号	プローブ配列	配列番号
ALAS	GCTCTCCAACAGCAGA GATAC	47	6- FAM/AAGCCCAAA/Zen/CC TCCGACATTGCTA/3IABkF Q	51
	GTCCATACGGATCGGA GAAAC	48		
アクチン	AGCAACATCCCTGATT CCG	49	HEX/TCGCCGTAA/Zen/GT TCTTGGTT TAGACGTTC/3IABkFQ	52
	ATGCGTACCTTCAATC CTGG	50		

30

【0118】

操作株 (表 1) は、アクチンレベルに照らして正規化された ALAS についての qPCR により測定される通り、wtALAS または mutALAS の 1 コピーである、同一数の余剰 ALAS 遺伝子コピーを含有した。よって、結果として得られる株の表現型の、任意の差違 (例えば、St2 対 St3 および St5 対 St6) について、ALAS 遺伝子量を除外した。

40

【0119】

[実施例 8]

ヘム酵素遺伝子、MxR1 遺伝子、LegH 遺伝子、および Mb 遺伝子の、PCR による検出

pAOX1 駆動型の組換えヘム生合成経路酵素遺伝子、組換え MxR1 遺伝子、および組換え LegH 遺伝子についての PCR により、株の特徴付けを行った。PCR のためのフォワードプライマー配列は、pAOX1 に特異的な、TAGCGCAGTCTCTCTCTATCGCTTC (配列番号 53) であった。リバースプライマーは、下記に示される、各目的の遺伝子に特異的であった。

50

【0120】

【表8】

遺伝子	リバースプライマー	単位複製 配列の サイズ	配列 番号
5-アミノレブリン酸シンターゼ	CACTGGGTTGTGCACATTGG	1995 bp	54
デルタ-アミノレブリン酸デヒド ラターゼ	ACAATATTCTTCTCTGCCGC	1268 bp	55
ポルホビリノーゲンデアミナーゼ	TTGATCTCGTCAAGAATGCG	1358 bp	56
ウロポルフィリノーゲン III シン ターゼ	TAGGTGCCACAACCTTTTGGTTT C	1102 bp	57
ウロポルフィリノーゲンデカルボ キシラーゼ	GATCCAATGCGATGACATTCTT GT	1430 bp	58
コポルフィリノーゲン III オキシ ダーゼ	ACCTGCAATAACTCCTCTTCTCT G	1301 bp	59
プロトポルフィリノーゲンオキシ ダーゼ	CCACTGAGGGTAGCCGAATC	2027 bp	60
フェロキラターゼ	GGGCTCTGAAAAACTCTTTTGG	1486 bp	61
MxR1	GCATGTCTCAATAACAGATCTC GACGG	629 bp	62
LegH	AAGCCTCTTGTTTTTCTGTAAAT GCAC	382 bp	63
ウシ Mb	TGATGGCGTCCGAGATGAACTC	688 bp	64

【0121】

これらの反応液についての結果を、下記に示す。

【0122】

10

20

30

40

50

【表 9】

組換え遺伝子 (pAOX1 下)	St1	St2	St3	St4	St5	St6	St7
5-アミノレブリン酸シンターゼ	x	x	x	-	x	x	x
デルタ-アミノレブリン酸デヒド ラターゼ	x	x	x	x	x	x	x
ポルホビリノーゲンデアミナーゼ	x	x	x	-	-	-	x
ウロポルフィリノーゲン III シン ターゼ	x	x	x	-	-	-	x
ウロポルフィリノーゲンデカルボ キシラーゼ	x	x	x	-	-	-	x
コポルフィリノーゲン III オキシ ダーゼ	x	x	x	-	-	-	x
プロトポルフィリノーゲンオキシ ダーゼ	x	x	x	-	-	-	x
フェロキラターゼ	x	x	x	-	-	-	x
MxR1	x	x	x	-	-	-	x
LegH	x	x	x	x	x	x	-
Mb (ウシミオグロビン)	-	-	-	-	-	-	x

【0123】

[実施例 9]

株である、St4、St5、およびSt6の、シェークフラスコによる培養

株を、200rpmで振盪しながら、30℃で、増殖培地（1%グリセロールを補充した、1%酵母抽出物、2%ペプトン）へと終夜接種した。翌日、終夜、1%のメタノールおよび1%のデキストロースを補充したYP培地で、培養物を、0.5～0.7のOD600へと希釈した。培養物を、48時間にわたり増殖させ、約4000g、4℃で、15分間にわたる遠心分離により採取した。

【0124】

低LegH力価株である、St4は、St1と異なり、組換えALASの既存のコピーを有さなかった。mutALASのコピーの組込み（St6）は、LegH力価の、St5（wtALAS）と比較して、約30%の改善をもたらした。力価の計算は、実施例13で記載される、液体クロマトグラフィー法により測定されるLegH含量に基づく。

【0125】

相対LegH力価を、表2に示す：

【0126】

10

20

30

40

50

【表 10】

表 2

	St5	St6
相対 LegH 力価	1.00	1.32

【0127】

[実施例 10]

株である、St1、St2、およびSt3の、2 L 培養

株である、St1、St2、およびSt3を、2 Lの発酵槽内、デキストロースを、主要炭素供給源として含有する培地中、30℃で増殖させた。メタノールは使用しなかった。既存の組換えALASを含有する、高LegH力価株（St1）のバックグラウンドにおいて、mutALASを過剰発現させるSt3は、LegH力価を、親St1に対して、>30%改善した。wtALAS（St2内）と比較した場合、mutALAS（St3内）は、LegH力価の、20%の改善を結果としてもたらした。力価の計算は、実施例13で記載される、液体クロマトグラフィー法により測定されるLegH含量に基づく。

【0128】

相対LegH力価を、表3に示す：

【0129】

【表 11】

表 3

	St1	St2	St3
相対 LegH 力価	1.00	1.10	1.37

【0130】

よって、両方のALAS HRMを突然変異させ、突然変異ALAS（mutALAS）を、LegH力価の異なるピキア属（Pichia）株において過剰発現させることは、LegH力価のさらなる改善をもたらした。さらに、これは、mutALASが、株の遺伝子組成（MxR1およびALAS以外のヘム酵素）、およびメタノールの存在に依存せずに、LegH力価を改善したことを示唆した。

【0131】

[実施例 11]

mutALASは、ヘムレベルを改善した

逆相高速液体クロマトグラフィーに基づく、全ヘムについての定量的アッセイは、mutALASを伴う株が、wtALASを含有する株より高レベルのヘムを蓄積することを指し示した。表4に、株St2（wtALAS）と対比した、株St3（mutALAS）におけるヘムの定量を示す。加えて、mutALASは、複数の株におけるヘムのローディングを増大させた。

【0132】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 4

	St2	St3
相対ヘム力価	1.00	2.7

【0 1 3 3】

[実施例 1 2]

mutALASによるALASタンパク質レベル

一般に、ヘムは、その固有のレベルを調節するように、ALASレベルを、フィードバック的に調節することが考えられる。タンパク質レベルでは、株を、デキストロースを伴う、2 Lの発酵槽内で増殖させる場合に、ショットガン質量分析により定量される通り、ALASレベルは、St3 (mutALAS) では、St2 (wtALAS) と比較して3倍であった (表 5)。

【0 1 3 4】

【表 1 3】

表 5

	St2	St3
相対 ALAS 力価	1.00	3.3

【0 1 3 5】

[実施例 1 3]

Legヘモグロビンの定量

細胞培養液試料を、ペレット化し (4000×g、4℃で、30分間にわたり)、デカントした。次いで、ペレット試料を、溶解緩衝液 (150 mMのNaCl、50 mMのリン酸カリウム、pH 7.4) で、4倍に希釈した。各再懸濁液300 uLずつを、細胞溶解のための、ウェル1つ当たり120 uLのビーズ (ジルコニウム／シリカビーズ (0.5 mm)) を伴う、96ウェル深底プレートへと分注した。Mini Bead Beaterで、3分間にわたり、溶解を行い、次いで、プレートを、氷上で、5分間にわたり冷却し、さらに2分間にわたるビーズによる破碎に従った。次いで、プレートを、スピンドウンした (4000×g、4℃で、30分間にわたり)。0.2 uMのフィルタープレート (4000×g、4℃で、60分間にわたり) を介して、上清を濾過した。

【0 1 3 6】

濾過された溶解物を、サイズ除外カラム (Acquity BEH SECカラム、200 Å、1.7 uM、4.6×150 mm) を伴うUHPLCへとロードした。方法パラメーター：1) 移動相：5 mMのNaCl、50 mMのリン酸カリウム (pH 7.4)；2) 流量：0.3 mL／分；3) 注射容量：10 uL；4) 試行時間：15分間；5) 試料トレイ温度：4℃である。検量線は、280 nmおよび415 nmにおける吸光度を使用して、精製LegH標準物質により作成した。定量は、バレー間ピーク積分法によるピーク面積を使用して行った。280 nmにおける吸光度は、存在するポリペプチド量に比例し、415 nmにおける吸光度は、存在するヘム量に比例する。ピークが、同じ溶出時間に、両方の波長で見られる場合、ヘムを含有するタンパク質が検出される。

【0 1 3 7】

[実施例 1 4]

mutALASは、ウシミオグロビンのレベルを改善した

L e g Hに加えて、ウシミオグロビンの産生について査定した。株であるS t 7は、ウシ (Bos taurus) (N M _ 1 7 3 8 8 1 . 2) のミオグロビンc D N Aを、p A O X 1下で組み込まれた、ヘム酵素およびM x R 1の組換えコピーを含有する株 (S t 7の特徴付けについては、実施例 8で記載された通りである) に組み込むことにより作出した。

【0138】

G F P (対照)、w t A L A S、およびm u t A L A Sの発現のための、3つの発現プラスミドを、実施例 3で記載された通りに構築した。実施例 5で記載された方法を使用して、表 6で示される通り、株であるS 7を、G F P、w t A L A S、およびm u t A L A Sのそれぞれを過剰発現させる、これらの3つのプラスミドで形質転換することにより、3つの株である、S t 8、S t 9、およびS t 10を作出した。G 4 1 8 1 m l当たりの増殖培地300 u gを補充したことを除き、実施例 9で記載された方法を使用して、形質転換体を増殖させることにより、w t A L A Sまたはm u t A L A Sのエピソーム内発現を得た。

【0139】

【表 1 4】

表 6

	プラスミドの発現	宿主株	宿主株の発現	得られた株
1	GFP	St7	Mb	St8
2	wtALAS			St9
3	mutALAS (C12S、C39S)			St10

【0140】

細胞をペレット化し、L C - M Sにより、ショットガンプロテオミクスを実施して、M bを定量した。株S t 8におけるミオグロビンレベル (G F P) に照らして正規化された場合、S t 9およびS t 10における平均ミオグロビンレベルは、表 7において示される通りであった。

【0141】

【表 1 5】

表 7

株	正規化ミオグロビンレベル
St8 (GFP)	1
St9 (wt ALAS)	1.60
St10 (mutALAS)	2.58

【0142】

[実施例 1 5]

他のアミノ酸への突然変異

システインからセリンへの突然変異に加えて、さらなる突然変異について査定した。遺伝子合成、および自己複製ベクター (p a n A R S) 内、修飾p A O X 1に続く、F D H

1 転写終結配列下におけるクローニングにより、mutALAS 変異体の発現プラスミドを構築した。さらに、実施例 5 で記載された方法を使用して、これらのプラスミドにより、株 St 1 を形質転換し、G 4 1 8 1 m l 当たりの増殖培地 3 0 0 u g を補充したことを除き、実施例 9 で記載された方法を使用して培養したところ、結果として得られる形質転換体は、LegH を産生した。これらの株により産生される LegH の力価を、実施例 1 3 で記載された方法により決定される、wtALAS により産生される LegH の力価に照らして正規化した。結果を、表 8 に示す：

【 0 1 4 3 】

【表 1 6】

表 8

変異体	正規化 LegH 力価倍数
C12、C39 (wtALAS)	1
C12S、C39S (mutALAS)	1.14
C12A、C39A	1.22
C12D、C39D	0.91
C12F、C39F	1.17
C12H、C39H	1.12

【 0 1 4 4 】

[実施例 1 6]

ピキア・パストリス (Pichia pastoris) における、単一のシステインからセリンへの突然変異体

P. パストリス (P. pastoris) における ALAS の二重突然変異体 (C 1 2 S、C 3 9 S) の査定に加えて、単一のシステインからセリンへの突然変異体もまた査定した。実施例 2 で記載された、部位指向突然変異誘発により、wtALAS 内に、単一の突然変異を創出した。wtALAS、mutALAS、および単一の ALAS 突然変異体 (C 1 2 S および C 3 9 S) の発現のための発現プラスミドを、実施例 3 で記載された通りに構築し、実施例 5 で記載された方法を使用して、これにより、株 St 1 を形質転換した。G 4 1 8 1 m l 当たりの増殖培地 3 0 0 u g を補充したことを除き、実施例 9 で記載された方法を使用して培養したところ、結果として得られる形質転換体は、LegH を産生した。これらの株により産生される LegH の力価を、実施例 1 3 で記載された方法により決定される、wtALAS により産生される LegH の力価に照らして正規化した。結果を、表 9 に示す：

【 0 1 4 5 】

【表 1 7】

表 9

変異体	正規化 LegH 力価倍数
C12、C39 (wtALAS)	1
C12S、C39S	1.27
C12S	1.03
C39S	1.01

【0146】

他の実施形態

本発明は、その詳細な記載と共に記載されているが、前出の記載は、付属の特許請求の範囲により規定される、本発明の範囲を例示することを意図するものであり、これを限定することを意図するものではないことが理解されるものとする。他の態様、利点、および改変も、以下の特許請求の範囲内にある。

本発明の様々な実施形態を以下に示す

1. 第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、アミノレブリン酸シンターゼ（ALAS）タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、前記ALASが少なくとも第1のヘム反応性モチーフ（HRM）を含み、前記ALASが前記第1のHRM内の突然変異を含む、第1の外因性核酸構築物；および

ヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第2の外因性核酸構築物を含む細胞であって、

前記ヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む前記第2の外因性核酸構築物が、前記第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されているか、または第2のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、細胞。

2. 真菌細胞であるか、または酵母細胞である、上記1に記載の細胞。

3. 酵母細胞が、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）細胞である、上記2に記載の細胞。

4. 前記第1のHRM内の前記突然変異が、システインから異なるアミノ酸への突然変異である、上記1から3のいずれかに記載の細胞。

5. 前記ALASタンパク質が第2のHRMを含み、前記ALASタンパク質が前記第2のHRM内の突然変異を含む、上記1から4のいずれかに記載の細胞。

6. 前記第2のHRM内の前記突然変異が、システインから異なるアミノ酸への突然変異である、上記5に記載の細胞。

7. 前記異なるアミノ酸が、前記第1のHRM内の前記突然変異および前記第2のHRM内の前記突然変異について同じである、上記5に記載の細胞。

8. 前記異なるアミノ酸が、前記第1のHRM内の前記突然変異および前記第2のHRM内の前記突然変異について同じではない、上記5に記載の細胞。

9. 前記異なるアミノ酸が、アルギニン、ヒスチジン、リシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、セレノシステイン、グリシン、プロリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンからなる群から選択される、上記4から8のいずれかに記載の細胞。

10. 前記異なるアミノ酸が、非極性脂肪族アミノ酸、芳香族アミノ酸、極性非帯電アミノ酸、または正常電アミノ酸から選択される、上記4から8のいずれかに記載の細胞。

11. 前記異なるアミノ酸がセリンである、上記4から9のいずれかに記載の細胞。

12. 前記異なるアミノ酸がアラニンである、上記4から9のいずれかに記載の細胞。

13. 前記異なるアミノ酸がフェニルアラニンである、上記4から9のいずれかに記載の細胞。

14. 前記異なるアミノ酸がヒスチジンである、上記4から9のいずれかに記載の細胞。

15. 前記第1の外因性核酸構築物が、配列番号28内の核酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む、上記1から14のいずれかに記載の細胞。

16. 前記ALASタンパク質が、配列番号29内のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、上記1から15のいずれかに記載の細胞。

17. 前記ヘム結合性タンパク質が、グロビン、チトクローム、チトクロームcオキシダーゼ、リグニナーゼ、カタラーゼ、およびペルオキシダーゼからなる群から選択される、上記1から16のいずれかに記載の細胞。

18. 前記ヘム結合性タンパク質がレグヘモグロビンである、上記1から16のいずれかに記載の細胞。

10

20

30

40

50

19. 前記ヘム結合性タンパク質が、配列番号1～27のうちのいずれか一つのアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、上記1から16のいずれかに記載の細胞。

20. 細胞内でヘム結合性タンパク質を作製する方法であって、

第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、アミノレブリン酸シンターゼ (ALAS) タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、前記ALASが少なくとも第1のヘム反応性モチーフ (HRM) を含み、前記ALASが前記第1のHRM内の突然変異を含む、第1の外因性核酸構築物を発現させるステップ；および

ヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第2の外因性核酸構築物を発現させるステップ

を含み、前記ヘム結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む前記第2の外因性核酸構築物が、前記第1のプロモーターエレメントに作動可能に連結されているか、または第2のプロモーターエレメントに作動可能に連結されている、方法。

21. 前記第1の外因性核酸構築物を欠く対応する方法を少なくとも5%を超える力価で、前記ヘム結合性タンパク質を作製する、上記20に記載の方法。

22. 前記第1の外因性核酸構築物を欠く対応する方法を少なくとも10%を超える力価で、前記ヘム結合性タンパク質を作製する、上記20または上記21に記載の方法。

23. 前記第1のHRM内の前記突然変異を欠く対応する方法を少なくとも5%を超える力価で、前記ヘム結合性タンパク質を作製する、上記20に記載の方法。

24. 前記第1のHRM内の前記突然変異を欠く対応する方法を少なくとも10%を超える力価で、前記ヘム結合性タンパク質を作製する、上記20に記載の方法。

25. メタノールの添加の非存在下で実行される、上記20から24のいずれかに記載の方法。

26. 前記第1のHRM内の前記突然変異が、システインから異なるアミノ酸への突然変異である、上記20から25のいずれかに記載の方法。

27. 前記ALASタンパク質が第2のHRMを含み、前記ALASタンパク質が前記第2のHRM内の突然変異を含む、上記20から26のいずれかに記載の方法。

28. 前記第1のHRM内および第2のHRM内の前記突然変異を欠く対応する方法を少なくとも5%を超える力価で、前記ヘム結合性タンパク質を作製する、上記26に記載の方法。

29. 前記第1のHRM内および第2のHRM内の前記突然変異を欠く対応する方法を少なくとも10%を超える力価で、前記ヘム結合性タンパク質を作製する、上記26に記載の方法。

30. 前記第2のHRM内の前記突然変異が、システインから異なるアミノ酸への突然変異である、上記27から29のいずれかに記載の方法。

31. 前記異なるアミノ酸が、前記第1のHRM内の前記突然変異および前記第2のHRM内の前記突然変異について同じである、上記30に記載の方法。

32. 前記異なるアミノ酸が、前記第1のHRM内の前記突然変異および前記第2のHRM内の前記突然変異について同じではない、上記30に記載の方法。

33. 前記異なるアミノ酸が、アルギニン、ヒスチジン、リシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、セレノシステイン、グリシン、プロリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンからなる群から選択される、上記26から32のいずれかに記載の方法。

34. 前記異なるアミノ酸がセリンである、上記26から33のいずれかに記載の方法。

35. 前記異なるアミノ酸がアラニンである、上記26から33のいずれかに記載の方法。

36. 前記異なるアミノ酸がフェニルアラニンである、上記26から33のいずれかに記載の方法。

37. 前記異なるアミノ酸がヒスチジンである、上記26から33のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

38. 前記第1の外因性核酸構築物が、配列番号28内の核酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む、上記20から37のいずれかに記載の方法。

39. 前記ALASタンパク質が、配列番号29内のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、上記20から38のいずれかに記載の方法。

40. 前記ヘム結合性タンパク質が、グロビン、チトクローム、チトクロームcオキシダーゼ、リグニナーゼ、カタラーゼ、およびペルオキシダーゼからなる群から選択される、上記20から39のいずれかに記載の方法。

41. 前記ヘム結合性タンパク質が、レグヘモグロビンである、上記20から39のいずれかに記載の方法。

42. 前記異種ヘム結合性タンパク質が、配列番号1~27のうちのいずれか一つのアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、上記20から39のいずれかに記載の方法。

【図面】

【図1】

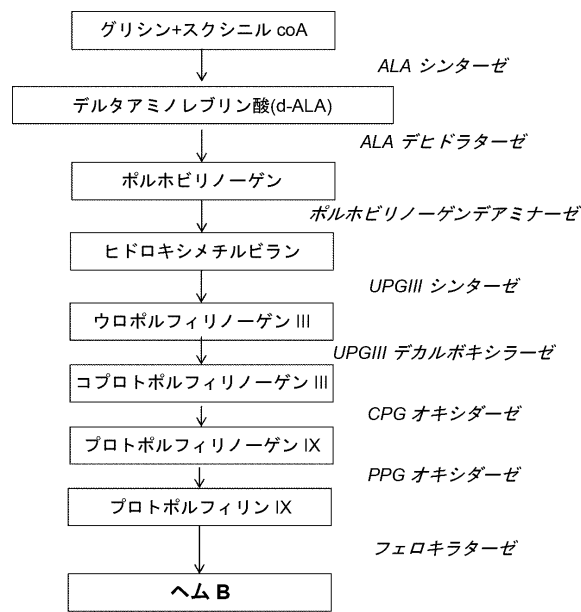


図1

【図2】

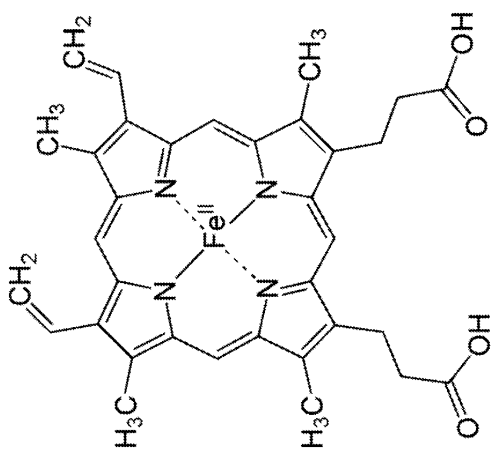


図2

10

20

30

40

50

【図 3】

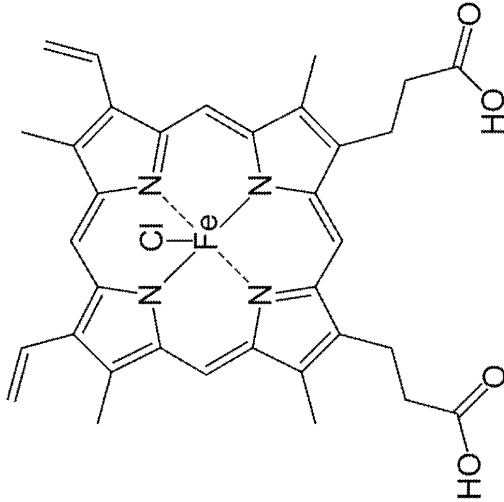


図 3

【図 4 - 1】

図 4

<110> Impossible Foods Inc.

<210> 1
<211> 161
<212> PRT
<213> 緑豆(Vigna radiata)

<400> 1
Met Thr Thr Thr Leu Glu Arg Gly Phe Thr Glu Glu Gln Glu Ala Leu
1 5 10 15
Val Val Lys Ser Trp Asn Val Met Lys Lys Asn Ser Gly Glu Leu Gly
20 25 30
Leu Lys Phe Phe Leu Lys Ile Phe Glu Ile Ala Pro Ser Ala Gln Lys
35 40 45
Leu Phe Ser Phe Leu Arg Asp Ser Thr Val Pro Leu Glu Gln Asn Pro
50 55 60
Lys Leu Lys Pro His Ala Val Ser Val Phe Val Met Thr Cys Asp Ser
65 70 75 80
Ala Val Gln Leu Arg Lys Ala Gly Lys Val Thr Val Arg Glu Ser Asn
85 90 95
Leu Lys Lys Leu Gly Ala Thr His Phe Arg Thr Gly Val Ala Asn Glu
100 105 110
His Phe Glu Val Thr Lys Phe Ala Leu Leu Glu Thr Ile Lys Glu Ala
115 120 125
Val Pro Glu Met Trp Ser Pro Ala Met Lys Asn Ala Trp Gly Glu Ala
130 135 140
Tyr Asp Gln Leu Val Asp Ala Ile Lys Tyr Glu Met Lys Pro Pro Ser
145 150 155 160
Ser

<210> 2
<211> 133
<212> PRT
<213> メチルアシディフィルム・インフェルノールム(Methyl acidiphilum infernorum)

<400> 2
Met Ile Asp Gln Lys Glu Lys Glu Leu Ile Lys Glu Ser Trp Lys Arg
1 5 10 15
Ile Glu Pro Asn Lys Asn Glu Ile Gly Leu Leu Phe Tyr Ala Asn Leu
20 25 30
Phe Lys Glu Glu Pro Thr Val Ser Pro Val Leu Phe Gln Asn Pro Ile Ser
35 40 45
Ser Gln Ser Arg Lys Leu Met Gln Val Leu Gly Ile Leu Val Gln Gly

【図 4 - 2】

50 55 60
Ile Asp Asn Leu Glu Gly Leu Ile Pro Thr Leu Gln Asp Leu Gly Arg
65 70 75 80
Arg His Lys Gln Tyr Gly Val Val Asp Ser His Tyr Pro Leu Val Gly
85 90 95
Asp Cys Leu Leu Lys Ser Ile Gln Glu Tyr Leu Gly Gln Gly Phe Thr
100 105 110
Glu Glu Ala Lys Ala Ala Trp Thr Lys Val Tyr Gly Ile Ala Ala Gln
115 120 125
Val Met Thr Ala Glu
130

<210> 3
<211> 139
<212> PRT
<213> アクイフェクス・アエオリクス(Aquifex aeolicus)

<400> 3
Met Leu Ser Glu Glu Thr Ile Arg Val Ile Lys Ser Thr Val Pro Leu
1 5 10 15
Leu Lys Glu His Gly Thr Glu Ile Thr Ala Arg Met Tyr Glu Leu Leu
20 25 30
Phe Ser Lys Tyr Pro Lys Thr Lys Glu Leu Phe Ala Gly Ala Ser Glu
35 40 45
Glu Gln Pro Lys Lys Leu Ala Asn Ala Ile Ile Ala Tyr Ala Thr Tyr
50 55 60
Ile Asp Arg Leu Glu Glu Leu Asp Asn Ala Ile Ser Thr Ile Ala Arg
65 70 75 80
Ser His Val Arg Arg Asn Val Lys Pro Glu His Tyr Pro Leu Val Lys
85 90 95
Glu Cys Leu Leu Gln Ala Ile Glu Glu Val Leu Asn Pro Gly Glu Glu
100 105 110
Val Leu Lys Ala Trp Glu Glu Ala Tyr Asp Phe Leu Ala Lys Thr Leu
115 120 125
Ile Thr Leu Glu Lys Lys Leu Tyr Ser Gln Pro
130 135

<210> 4
<211> 145
<212> PRT
<213> ダイズ(Glycine max)

<400> 4
Met Gly Ala Phe Thr Glu Lys Gln Glu Ala Leu Val Ser Ser Ser Phe
1 5 10 15
Glu Ala Phe Lys Ala Asn Ile Pro Gln Tyr Ser Val Val Phe Tyr Thr
20 25 30

図 4(続き)

【図 4 - 3】

Ser Ile Leu Glu Lys Ala Pro Ala Ala Lys Asp Leu Phe Ser Phe Leu
35 40 45
Ser Asn Gly Val Asp Pro Ser Asn Pro Lys Leu Thr Gly His Ala Glu
50 55 60
Lys Leu Phe Gly Leu Val Arg Asp Ser Ala Gly Gln Leu Lys Ala Asn
65 70 75 80
Gly Thr Val Val Ala Asp Ala Ala Leu Gly Ser Ile His Ala Gln Lys
85 90 95
Ala Ile Thr Asp Pro Gln Phe Val Val Val Lys Glu Ala Leu Leu Lys
100 105 110
Thr Ile Lys Glu Ala Val Gly Asp Lys Trp Ser Asp Glu Leu Ser Ser
115 120 125
Ala Trp Glu Val Ala Tyr Asp Glu Leu Ala Ala Ala Ile Lys Lys Ala
130 135 140
Phe
145

<210> 5
<211> 162
<212> PRT
<213> オオムギ(Hordeum vulgare)

<400> 5
Met Ser Ala Ala Glu Gly Ala Val Val Phe Ser Glu Glu Lys Glu Ala
1 5 10 15
Leu Val Leu Lys Ser Trp Ala Ile Met Lys Lys Asp Ser Ala Asn Leu
20 25 30
Gly Leu Arg Phe Phe Leu Lys Ile Phe Glu Ile Ala Pro Ser Ala Arg
35 40 45
Gln Met Phe Pro Phe Leu Arg Asp Ser Asp Val Pro Leu Glu Thr Asn
50 55 60
Pro Lys Leu Lys Thr His Ala Val Ser Val Phe Val Met Thr Cys Glu
65 70 75 80
Ala Ala Ala Gln Leu Arg Lys Ala Gly Lys Ile Thr Val Arg Glu Thr
85 90 95
Thr Leu Lys Arg Leu Gly Gly Thr His Leu Lys Tyr Gly Val Ala Asp
100 105 110
Gly His Phe Glu Val Thr Arg Phe Ala Leu Leu Glu Thr Ile Lys Glu
115 120 125
Ala Leu Pro Ala Asp Met Trp Gly Pro Glu Met Arg Asn Ala Trp Gly
130 135 140
Glu Ala Tyr Asp Gln Leu Val Ala Ala Ile Lys Gln Glu Met Lys Pro
145 150 155 160
Ala Glu

<210> 6

図 4(続き)

10

20

30

40

50

【図 4－4】

<211> 1153
<212> PRT
<213> イネいもち病菌(Magnaporthe oryzae)

<400> 6
Met Asp Gly Ala Val Arg Leu Asp Trp Thr Gly Leu Asp Leu Thr Gly
1 5 10 15
His Glu Ile His Asp Gly Val Pro Ile Ala Ser Arg Val Gln Val Met
20 25 30
Val Ser Phe Pro Leu Phe Lys Asp Gln His Ile Ile Met Ser Ser Lys
35 40 45
Glu Ser Pro Ser Arg Lys Ser Ser Thr Ile Gly Gln Ser Thr Arg Asn
50 55 60
Gly Ser Cys Gln Ala Asp Thr Gln Lys Gly Gln Leu Pro Pro Val Gly
65 70 75 80
Glu Lys Pro Lys Pro Val Lys Glu Asn Pro Met Lys Lys Leu Lys Glu
85 90 95
Met Ser Gln Arg Pro Leu Pro Thr Gln His Gly Asp Gly Thr Tyr Pro
100 105 110
Thr Glu Lys Lys Leu Thr Gly Ile Gly Glu Asp Leu Lys His Ile Arg
115 120 125
Gly Tyr Asp Val Lys Thr Leu Ala Met Val Lys Ser Lys Leu Lys
130 135 140
Gly Glu Lys Leu Lys Asp Asp Lys Thr Met Leu Met Glu Arg Val Met
145 150 155 160
Gln Leu Val Ala Arg Leu Pro Thr Glu Ser Lys Lys Arg Ala Glu Leu
165 170 175
Thr Asp Ser Leu Ile Asn Glu Leu Trp Glu Ser Leu Asp His Pro Pro
180 185 190
Leu Asn Tyr Leu Gly Pro Glu His Ser Tyr Arg Thr Pro Asp Gly Ser
195 200 205
Tyr Asn His Pro Phe Asn Pro Gln Leu Gly Ala Ala Gly Ser Arg Tyr
210 215 220
Ala Arg Ser Val Ile Pro Thr Val Thr Pro Pro Gly Ala Leu Pro Asp
225 230 235 240
Pro Gly Leu Ile Phe Asp Ser Ile Met Gly Arg Thr Pro Asn Ser Tyr
245 250 255
Arg Lys His Pro Asn Asn Val Ser Ser Ile Leu Trp Tyr Trp Ala Thr
260 265 270
Ile Ile Ile His Asp Ile Phe Trp Thr Asp Pro Arg Asp Ile Asn Thr
275 280 285
Asn Lys Ser Ser Ser Tyr Leu Asp Leu Ala Pro Leu Tyr Gly Asn Ser
290 295 300
Gln Glu Met Gln Asp Ser Ile Arg Thr Phe Lys Asp Gly Arg Met Lys
305 310 315 320
Pro Asp Cys Tyr Ala Asp Lys Arg Leu Ala Gly Met Pro Pro Gly Val
325 330 335
Ser Val Leu Leu Ile Met Phe Asn Arg Phe His Asn His Val Ala Glu
340 345 350

図 4(続き)

【図 4－5】

Asn Leu Ala Leu Ile Asn Glu Gly Gly Arg Phe Asn Lys Pro Ser Asp
355 360 365
Leu Leu Glu Gly Glu Ala Arg Glu Glu Ala Ala Trp Lys Lys Tyr Asp Asn
370 375 380
Asp Leu Phe Gln Val Ala Arg Leu Val Thr Ser Gly Leu Tyr Ile Asn
385 390 395 400
Ile Thr Leu Val Asp Tyr Val Arg Asn Ile Val Asn Leu Asn Arg Val
405 410 415
Asp Thr Thr Trp Thr Leu Asp Pro Arg Gln Asp Ala Gly Ala His Val
420 425 430
Gly Thr Ala Asp Gly Ala Glu Arg Gly Thr Gly Asn Ala Val Ser Ala
435 440 445
Glu Phe Asn Leu Cys Tyr Arg Trp His Ser Cys Ile Ser Glu Lys Asp
450 455 460
Ser Lys Phe Val Glu Ala Gln Phe Gln Asn Ile Phe Gly Lys Pro Ala
465 470 475 480
Ser Glu Val Arg Pro Asp Glu Met Trp Lys Gly Phe Ala Lys Met Glu
485 490 495
Gln Asn Thr Pro Ala Asp Pro Gly Gln Arg Thr Phe Gly Gly Phe Lys
500 505 510
Arg Gly Pro Asp Gly Lys Phe Asp Asp Asp Asp Leu Val Arg Cys Ile
515 520 525
Ser Glu Ala Val Glu Asp Val Ala Gly Ala Phe Gly Ala Arg Asn Val
530 535 540
Pro Gln Ala Met Lys Val Val Glu Thr Met Gly Ile Ile Gln Gly Arg
545 550 555 560
Lys Trp Asn Val Ala Gly Leu Asn Glu Phe Arg Lys His Phe His Leu
565 570 575
Lys Pro Tyr Ser Thr Phe Glu Asp Ile Asn Ser Asp Fro Gly Val Ala
580 585 590
Glu Ala Leu Arg Arg Leu Tyr Asp His Pro Asp Asn Val Glu Leu Tyr
595 600 605
Pro Gly Leu Val Ala Glu Glu Asp Lys Gln Pro Met Val Pro Gly Val
610 615 620
Gly Ile Ala Pro Thr Tyr Thr Ile Ser Arg Val Val Leu Ser Asp Ala
625 630 635 640
Val Cys Leu Val Arg Gly Asp Arg Phe Tyr Thr Thr Asp Phe Thr Pro
645 650 655
Arg Asn Leu Thr Asn Trp Gly Tyr Lys Glu Val Asp Tyr Asp Leu Ser
660 665 670
Val Asn His Gly Cys Val Phe Tyr Lys Leu Phe Ile Arg Ala Phe Pro
675 680 685
Asn His Phe Lys Gln Asn Ser Val Tyr Ala His Tyr Pro Met Val Val
690 695 700
Pro Ser Glu Asn Lys Arg Ile Leu Glu Ala Leu Gly Arg Ala Asp Leu
705 710 715 720
Phe Asp Phe Glu Ala Pro Lys Tyr Ile Pro Fro Arg Val Asn Ile Thr
725 730 735
Ser Tyr Gly Gly Ala Glu Tyr Ile Leu Glu Thr Gln Glu Lys Tyr Lys

図 4(続き)

【図 4－6】

740 745 750
Val Thr Trp His Glu Gly Leu Gly Phe Leu Met Gly Glu Gly Gly Leu
755 760 765
Lys Phe Met Leu Ser Gly Asp Asp Pro Leu His Ala Gln Gln Arg Lys
770 775 780
Cys Met Ala Ala Gln Leu Tyr Lys Asp Gly Trp Thr Glu Ala Val Lys
785 790 795 800
Ala Phe Tyr Ala Gly Met Met Glu Glu Leu Leu Val Ser Lys Ser Tyr
805 810 815
Phe Leu Gly Asn Asn Lys His Arg His Val Asp Ile Ile Arg Asp Val
820 825 830
Gly Asn Met Val His Val His Phe Ala Ser Gln Val Phe Gly Leu Pro
835 840 845
Leu Lys Thr Ala Lys Asn Pro Thr Gly Val Phe Thr Glu Gln Glu Met
850 855 860
Tyr Gly Ile Leu Ala Ala Ile Phe Thr Thr Ile Phe Phe Asp Leu Asp
865 870 875 880
Pro Ser Lys Ser Phe Pro Leu Arg Thr Lys Thr Arg Glu Val Cys Gln
885 890 895
Lys Leu Ala Lys Leu Val Glu Ala Asn Val Lys Leu Ile Asn Lys Ile
900 905 910
Pro Trp Ser Arg Gly Met Phe Val Gly Lys Pro Ala Lys Asp Glu Pro
915 920 925
Leu Ser Ile Tyr Gly Lys Thr Met Ile Lys Gly Leu Lys Ala His Gly
930 935 940
Leu Ser Asp Tyr Asp Ile Ala Trp Ser His Val Val Pro Thr Ser Gly
945 950 955 960
Ala Met Val Pro Asn Gln Ala Gln Val Phe Ala Gln Ala Val Asp Tyr
965 970 975
Tyr Leu Ser Pro Ala Gly Met His Tyr Ile Pro Glu Ile His Met Val
980 985 990
Ala Leu Gln Pro Ser Thr Pro Glu Thr Asp Ala Leu Leu Leu Gly Tyr
995 1000 1005
Ala Met Glu Gly Ile Arg Leu Ala Gly Thr Phe Gly Ser Tyr Arg Glu
1010 1015 1020
Ala Ala Val Asp Asp Val Val Lys Glu Asp Asn Gly Arg Gln Val Pro
1025 1030 1035 1040
Val Lys Ala Gly Asp Arg Val Phe Val Ser Phe Val Asp Ala Ala Arg
1045 1050 1055
Asp Pro Lys His Phe Pro Asp Pro Glu Val Val Asn Pro Arg Arg Pro
1060 1065 1070
Ala Lys Lys Tyr Ile His Tyr Gly Val Gly Pro His Ala Cys Leu Gly
1075 1080 1085
Arg Asp Ala Ser Gln Ile Ala Ile Thr Glu Met Phe Arg Cys Leu Phe
1090 1095 1100
Arg Arg Arg Asn Val Arg Arg Val Pro Gly Pro Gln Gly Glu Leu Lys
1105 1110 1115 1120
Lys Val Pro Arg Pro Gly Gly Phe Tyr Val Tyr Met Arg Glu Asp Trp
1125 1130 1135

図 4(続き)

【図 4－7】

Gly Gly Leu Phe Pro Phe Pro Val Thr Met Arg Val Met Trp Asp Asp
1140 1145 1150
Glu

<210> 7
<211> 330
<212> PRT
<213> フザリウム・オキシスポルム(Fusarium oxysporum)

<400> 7
Met Lys Gly Ser Ala Thr Leu Ala Phe Ala Leu Val Gln Phe Ser Ala
1 5 10 15
Ala Ser Gln Leu Val Trp Pro Ser Lys Trp Asp Glu Val Glu Asp Leu
20 25 30
Leu Tyr Met Gln Gly Gly Phe Asn Lys Arg Gly Phe Ala Asp Ala Leu
35 40 45
Arg Thr Cys Glu Phe Gly Ser Asn Val Pro Gly Thr Gln Asn Thr Ala
50 55 60
Glu Trp Leu Arg Thr Ala Phe His Asp Ala Ile Thr His Asp Ala Lys
65 70 75 80
Ala Gly Thr Gly Gly Leu Asp Ala Ser Ile Tyr Trp Glu Ser Ser Arg
85 90 95
Pro Glu Asn Pro Gly Lys Ala Phe Asn Asn Thr Phe Gly Phe Phe Ser
100 105 110
Gly Phe His Asn Pro Arg Ala Thr Ala Ser Asp Leu Thr Ala Leu Gly
115 120 125
Thr Val Leu Ala Val Gly Ala Cys Asn Gly Pro Arg Ile Pro Phe Arg
130 135 140
Ala Gly Arg Ile Asp Ala Tyr Lys Ala Gly Pro Ala Gly Val Pro Glu
145 150 155 160
Pro Ser Thr Asn Leu Lys Asp Thr Phe Ala Ala Phe Thr Lys Ala Gly
165 170 175
Phe Thr Lys Glu Glu Met Thr Ala Met Val Ala Cys Gly His Ala Ile
180 185 190
Gly Gly Val His Ser Val Asp Phe Pro Glu Ile Val Gly Ile Lys Ala
195 200 205
Asp Pro Asn Asn Asp Thr Asn Val Pro Phe Gln Lys Asp Val Ser Ser
210 215 220
Phe His Asn Gly Ile Val Thr Glu Tyr Leu Ala Gly Thr Ser Lys Asn
225 230 235 240
Pro Leu Val Ala Ser Lys Asn Ala Thr Phe His Ser Asp Lys Arg Ile
245 250 255
Phe Asp Asn Asp Lys Ala Thr Met Lys Lys Leu Ser Thr Lys Ala Gly
260 265 270
Phe Asn Ser Met Cys Ala Asp Ile Leu Thr Arg Met Ile Asp Thr Val
275 280 285
Pro Lys Ser Val Gln Leu Thr Pro Val Leu Glu Ala Tyr Asp Val Arg

図 4(続き)

10

20

30

40

50

【図 4－8】

290 295 300
Pro Tyr Ile Thr Glu Leu Ser Leu Asn Asn Lys Asn Lys Ile His Phe
305 310 315 320
Thr Gly Ser Val Arg Val Arg Ile Thr Asn Asn Ile Arg Asp Asn Asn
325 330 335
Asp Leu Ala Ile Asn Leu Ile Tyr Val Gly Arg Asp Gly Lys Lys Val
340 345 350
Thr Val Pro Thr Gln Gln Val Thr Phe Gln Gly Gly Thr Ser Phe Gly
355 360 365
Ala Gly Glu Val Phe Ala Asn Phe Glu Phe Asp Thr Thr Met Asp Ala
370 375 380
Lys Asn Gly Ile Thr Lys Phe Phe Ile Gln Glu Val Lys Pro Ser Thr
385 390 395 400
Lys Ala Thr Val Thr His Asp Asn Gln Lys Thr Gly Gly Tyr Lys Val
405 410 415
Asp Asp Thr Val Leu Tyr Gln Leu Gln Gln Ser Cys Ala Val Leu Glu
420 425 430
Lys Leu Pro Asn Ala Pro Leu Val Val Thr Ala Met Val Arg Asp Ala
435 440 445
Arg Ala Lys Asp Ala Leu Thr Leu Arg Val Ala His Lys Lys Pro Val
450 455 460
Lys Gly Ser Ile Val Pro Arg Phe Gln Thr Ala Ile Thr Asn Phe Lys
465 470 475 480
Ala Thr Gly Lys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Gly Phe Gln Ala Lys Thr
485 490 495
Met Phe Glu Glu Gln Ser Thr Tyr Phe Asp Ile Val Leu Gly Gly Ser
500 505 510
Pro Ala Ser Gly Val Gln Phe Leu Thr Ser Gln Ala Met Pro Ser Gln
515 520 525
Cys Ser
530

<210> 8
<211> 358
<212> PRT
<213> **フザリウム・グラミネアルム(Fusarium graminearum)**

<400> 8
Met Ala Ser Ala Thr Arg Gln Phe Ala Arg Ala Ala Thr Arg Ala Thr
1 5 10 15
Arg Asn Gly Phe Ala Ile Ala Pro Arg Gln Val Ile Arg Gln Gln Gly
20 25 30
Arg Arg Tyr Tyr Ser Ser Glu Pro Ala Gln Lys Ser Ser Ser Ala Trp
35 40 45
Ile Trp Leu Thr Gly Ala Ala Val Ala Gly Gly Ala Gly Tyr Tyr Phe
50 55 60
Tyr Gly Asn Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Lys Val Phe Asn Pro Ser
65 70 75 80

図 4(続き)

【図 4－9】

Lys Glu Asp Tyr Gln Lys Val Tyr Asn Glu Ile Ala Ala Arg Leu Glu
85 90 95
Glu Lys Asp Asp Tyr Asp Asp Gly Ser Tyr Gly Pro Val Leu Val Arg
100 105 110
Leu Ala Trp Trp His Ala Ser Gly Thr Tyr Asp Lys Glu Thr Gly Thr Gly
115 120 125
Gly Ser Asn Gly Ala Thr Met Arg Phe Ala Pro Glu Ser Asp His Gly
130 135 140
Ala Asn Ala Gly Leu Ala Ala Ala Arg Asp Phe Leu Gln Pro Val Lys
145 150 155
Glu Lys Phe Pro Trp Ile Thr Tyr Ser Asp Leu Trp Ile Leu Ala Gly
165 170 175
Val Cys Ala Ile Gln Glu Met Leu Gly Pro Ala Ile Pro Tyr Arg Pro
180 185 190
Gly Arg Ser Asp Arg Asp Val Ser Gly Cys Thr Pro Asp Gly Arg Leu
195 200 205
Pro Asp Ala Ser Lys Arg Gln Asp His Leu Arg Gly Ile Phe Gly Arg
210 215 220
Met Gly Phe Asn Asp Gln Glu Ile Val Ala Leu Ser Gly Ala His Ala
225 230 235 240
Leu Gly Arg Cys His Thr Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Gly Pro Trp Thr
245 250 255
Phe Ser Pro Thr Val Leu Thr Asn Asp Tyr Phe Arg Leu Leu Val Glu
260 265 270
Glu Lys Trp Gln Trp Lys Lys Trp Asn Gly Pro Ala Gln Tyr Glu Asp
275 280 285
Lys Ser Thr Lys Ser Leu Met Met Leu Pro Ser Asp Ile Ala Leu Ile
290 295 300
Glu Asp Lys Lys Phe Lys Pro Trp Val Glu Lys Tyr Ala Lys Asp Asn
305 310 315 320
Asp Ala Phe Phe Lys Asp Phe Ser Asn Val Val Leu Arg Leu Phe Glu
325 330 335
Leu Gly Val Pro Phe Ala Gln Gly Thr Glu Asn Gln Arg Trp Thr Phe
340 345 350
Lys Pro Thr His Gln Glu
355

<210> 9
<211> 122
<212> PRT
<213> **クラミドモナス・エウガメトス(Chlamydomonas eugametos)**

<400> 9
Met Ser Leu Phe Ala Lys Leu Gly Gly Arg Glu Ala Val Glu Ala Ala
1 5 10 15
Val Asp Lys Phe Tyr Asn Lys Ile Val Ala Asp Pro Thr Val Ser Thr
20 25 30
Tyr Phe Ser Asn Thr Asp Met Lys Val Gln Arg Ser Lys Gln Phe Ala

図 4(続き)

【図 4－10】

35 40 45
Phe Leu Ala Tyr Ala Leu Gly Gly Ala Ser Glu Trp Lys Gly Lys Asp
50 55 60
Met Arg Thr Ala His Lys Asp Leu Val Pro His Leu Ser Asp Val His
65 70 75 80
Phe Gln Ala Val Ala Arg His Leu Ser Asp Thr Leu Thr Glu Leu Gly
85 90 95
Val Pro Pro Glu Asp Ile Thr Asp Ala Met Ala Val Val Ala Ser Thr
100 105 110
Arg Thr Glu Val Leu Asn Met Pro Gln Gln
115 120

<210> 10
<211> 121
<212> PRT
<213> **テトラヒメナ・ピリフォルミス(Tetrahymena pyriformis)**

<400> 10
Met Asn Lys Pro Gln Thr Ile Tyr Glu Lys Leu Gly Gly Glu Asn Ala
1 5 10 15
Met Lys Ala Ala Val Pro Leu Phe Tyr Lys Lys Val Leu Ala Asp Glu
20 25 30
Arg Val Lys His Phe Phe Lys Asn Thr Asp Met Asp His Gln Thr Lys
35 40 45
Gln Gln Thr Asp Phe Leu Thr Met Leu Leu Gly Gly Pro Asn His Tyr
50 55 60
Lys Gly Lys Asn Met Thr Glu Ala His Lys Gly Met Asn Leu Gln Asn
65 70 75 80
Leu His Phe Asp Ala Ile Ile Glu Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Glu
85 90 95
Leu Gly Val Thr Asp Ala Val Ile Asn Glu Ala Ala Lys Val Ile Glu
100 105 110
His Thr Arg Lys Asp Met Leu Gly Lys
115 120

<210> 11
<211> 117
<212> PRT
<213> **ゾウリムシ(Paramecium caudatum)**

<400> 11
Met Ser Leu Phe Glu Gln Leu Gly Gly Gln Ala Ala Val Gln Ala Val
1 5 10 15
Thr Ala Gln Phe Tyr Ala Asn Ile Gln Ala Asp Ala Thr Val Ala Thr
20 25 30
Phe Phe Asn Gly Ile Asp Met Pro Asn Gln Thr Asn Lys Thr Ala Ala
35 40 45

図 4(続き)

【図 4－11】

Phe Leu Cys Ala Ala Leu Gly Gly Pro Asn Ala Trp Thr Gly Arg Asn
50 55 60
Leu Lys Glu Val His Ala Asn Met Gly Val Ser Asn Ala Gln Phe Thr
65 70 75 80
Thr Val Ile Gly His Leu Arg Ser Ala Leu Thr Gly Ala Gly Val Ala
85 90 95
Ala Ala Leu Val Glu Gln Thr Val Ala Val Ala Glu Thr Val Arg Gly
100 105 110
Asp Val Val Thr Val
115

<210> 12
<211> 147
<212> PRT
<213> **クロウジカビ(Aspergillus niger)**

<400> 12
Met Pro Leu Thr Pro Glu Gln Ile Lys Ile Ile Lys Ala Thr Val Pro
1 5 10 15
Val Leu Gln Glu Tyr Gly Thr Lys Ile Thr Thr Ala Phe Tyr Met Asn
20 25 30
Met Ser Thr Val His Pro Glu Leu Asn Ala Val Phe Asn Thr Ala Asn
35 40 45
Gln Val Lys Gly His Gln Ala Arg Ala Leu Ala Gly Ala Leu Phe Ala
50 55 60
Tyr Ala Ser His Ile Asp Asp Leu Gly Ala Leu Gly Pro Ala Val Glu
65 70 75 80
Leu Ile Cys Asn Lys His Ala Ser Leu Tyr Ile Gln Ala Asp Glu Tyr
85 90 95
Lys Ile Val Gly Lys Tyr Leu Leu Glu Ala Met Lys Glu Val Leu Gly
100 105 110
Asp Ala Cys Thr Asp Asp Ile Leu Asp Ala Trp Gly Ala Ala Tyr Trp
115 120 125
Ala Leu Ala Asp Ile Met Ile Asn Arg Glu Ala Ala Leu Tyr Lys Gln
130 135 140
Ser Gln Gly
145

<210> 13
<211> 165
<212> PRT
<213> **トウモロコシ(Zea mays)**

<400> 13
Met Ala Leu Ala Glu Ala Asp Asp Gly Ala Val Val Phe Gly Glu Glu
1 5 10 15
Gln Glu Ala Leu Val Leu Lys Ser Trp Ala Val Met Lys Lys Asp Ala

図 4(続き)

10

20

30

40

50

【図 4－１２】

20 25 30
Ala Asn Leu Gly Leu Arg Phe Phe Leu Lys Val Phe Glu Ile Ala Pro
35 40 45
Ser Ala Glu Gln Met Phe Ser Phe Leu Arg Asp Ser Asp Val Pro Leu
50 55 60
Glu Lys Asn Pro Lys Leu Lys Thr His Ala Met Ser Val Phe Val Met
65 70 75 80
Thr Cys Glu Ala Ala Ala Gln Leu Arg Lys Ala Gly Lys Val Thr Val
85 90 95
Arg Glu Thr Thr Leu Lys Arg Leu Gly Ala Thr His Leu Arg Tyr Gly
100 105 110
Val Ala Asp Gly His Phe Glu Val Thr Gly Phe Ala Leu Leu Glu Thr
115 120 125
Ile Lys Glu Ala Leu Pro Ala Asp Met Trp Ser Leu Glu Met Lys Lys
130 135 140
Ala Trp Ala Glu Ala Tyr Ser Gln Leu Val Ala Ala Ile Lys Arg Glu
145 150 155 160
Met Lys Pro Asp Ala
165

<210> 14
<211> 169
<212> PRT
<213> ジャボニカ米(*Oryza sativa* subsp. *japonica*)

<400> 14
Met Ala Leu Val Glu Gly Asn Asn Gly Val Ser Gly Gly Ala Val Ser
1 5 10 15
Phe Ser Glu Glu Gln Glu Ala Leu Val Leu Lys Ser Trp Ala Ile Met
20 25 30
Lys Lys Asp Ser Ala Asn Ile Gly Leu Arg Phe Phe Leu Lys Ile Phe
35 40 45
Glu Val Ala Pro Ser Ala Ser Gln Met Phe Ser Phe Leu Arg Asn Ser
50 55 60
Asp Val Pro Leu Glu Lys Asn Pro Lys Leu Lys Thr His Ala Met Ser
65 70 75 80
Val Phe Val Met Thr Cys Glu Ala Ala Gln Leu Arg Lys Ala Gly
85 90 95
Lys Val Thr Val Arg Asp Thr Thr Leu Lys Arg Leu Gly Ala Thr His
100 105 110
Phe Lys Tyr Gly Val Gly Asp Ala His Phe Glu Val Thr Arg Phe Ala
115 120 125
Leu Leu Glu Thr Ile Lys Glu Ala Val Pro Val Asp Met Trp Ser Pro
130 135 140
Ala Met Lys Ser Ala Trp Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Leu Val Ala Ala
145 150 155 160
Ile Lys Gln Glu Met Lys Pro Ala Glu
165

図 4(続き)

【図 4－１３】

<210> 15
<211> 160
<212> PRT
<213> シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)

<400> 15
Met Glu Ser Glu Gly Lys Ile Val Phe Thr Glu Glu Gln Glu Ala Leu
1 5 10 15
Val Val Lys Ser Trp Ser Val Met Lys Lys Asn Ser Ala Glu Leu Gly
20 25 30
Leu Lys Leu Phe Ile Lys Ile Phe Glu Ile Ala Pro Thr Thr Lys Lys
35 40 45
Met Phe Ser Phe Leu Arg Asp Ser Pro Ile Pro Ala Glu Gln Asn Pro
50 55 60
Lys Leu Lys Pro His Ala Met Ser Val Phe Val Met Cys Cys Glu Ser
65 70 75 80
Ala Val Gln Leu Arg Lys Thr Gly Lys Val Thr Val Arg Glu Thr Thr
85 90 95
Leu Lys Arg Leu Gly Ala Ser His Ser Lys Tyr Gly Val Val Asp Glu
100 105 110
His Phe Glu Val Ala Lys Tyr Ala Leu Leu Glu Thr Ile Lys Glu Ala
115 120 125
Val Pro Glu Met Trp Ser Pro Glu Met Lys Val Ala Trp Gly Gln Ala
130 135 140
Tyr Asp His Leu Val Ala Ala Ile Lys Ala Glu Met Asn Leu Ser Asn
145 150 155 160

<210> 16
<211> 147
<212> PRT
<213> エンドウ(*Pisum sativum*)

<400> 16
Met Gly Phe Thr Asp Lys Gln Glu Ala Leu Val Asn Ser Ser Trp Glu
1 5 10 15
Ser Phe Lys Gln Asn Leu Ser Gly Asn Ser Ile Leu Phe Tyr Thr Ile
20 25 30
Ile Leu Glu Lys Ala Pro Ala Ala Lys Gly Leu Phe Ser Phe Leu Lys
35 40 45
Asp Thr Ala Gly Val Glu Asp Ser Pro Lys Leu Gln Ala His Ala Glu
50 55 60
Gln Val Phe Gly Leu Val Arg Asp Ser Ala Ala Gln Leu Arg Thr Lys
65 70 75 80
Gly Glu Val Val Leu Gly Asn Ala Thr Leu Gly Ala Ile His Val Gln
85 90 95
Arg Gly Val Thr Asp Pro His Phe Val Val Val Lys Glu Ala Leu Leu

図 4(続き)

【図 4－１４】

100 105 110
Gln Thr Ile Lys Lys Ala Ser Gly Asn Asn Trp Ser Glu Glu Leu Asn
115 120 125
Thr Ala Trp Glu Val Ala Tyr Asp Gly Leu Ala Thr Ala Ile Lys Lys
130 135 140
Ala Met Thr
145

<210> 17
<211> 145
<212> PRT
<213> ササゲ(*Vigna unguiculata*)

<400> 17
Met Val Ala Phe Ser Asp Lys Gln Glu Ala Leu Val Asn Gly Ala Tyr
1 5 10 15
Glu Ala Phe Lys Ala Asn Ile Pro Lys Tyr Ser Val Val Phe Tyr Thr
20 25 30
Thr Ile Leu Glu Lys Ala Pro Ala Ala Lys Asn Leu Phe Ser Phe Leu
35 40 45
Ala Asn Gly Val Asp Ala Thr Asn Pro Lys Leu Thr Gly His Ala Glu
50 55 60
Lys Leu Phe Gly Leu Val Arg Asp Ser Ala Ala Gln Leu Arg Ala Ser
65 70 75 80
Gly Gly Val Val Ala Asp Ala Ala Leu Gly Ala Val His Ser Gln Lys
85 90 95
Ala Val Asn Asp Ala Gln Phe Val Val Val Lys Glu Ala Leu Val Lys
100 105 110
Thr Leu Lys Glu Ala Val Gly Asp Lys Trp Ser Asp Glu Leu Gly Thr
115 120 125
Ala Val Glu Leu Ala Tyr Asp Glu Leu Ala Ala Ile Lys Lys Ala
130 135 140
Tyr
145

<210> 18
<211> 154
<212> PRT
<213> ウシ(*Bos taurus*)

<400> 18
Met Gly Leu Ser Asp Gly Glu Trp Gln Leu Val Leu Asn Ala Trp Gly
1 5 10 15
Lys Val Glu Ala Asp Val Ala Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile Arg
20 25 30
Leu Phe Thr Gly His Pro Glu Thr Leu Glu Lys Phe Asp Lys Phe Lys
35 40 45

図 4(続き)

【図 4－１５】

His Leu Lys Thr Glu Ala Glu Met Lys Ala Ser Glu Asp Leu Lys Lys
50 55 60
His Gly Asn Thr Val Leu Thr Ala Leu Gly Gly Ile Leu Lys Lys Lys
65 70 75 80
Gly His His Glu Ala Glu Val Lys His Leu Ala Glu Ser His Ala Asn
85 90 95
Lys His Lys Ile Pro Val Lys Tyr Leu Glu Phe Ile Ser Asp Ala Ile
100 105 110
Ile His Val Leu His Ala Lys His Pro Ser Asp Phe Gly Ala Asp Ala
115 120 125
Gln Ala Ala Met Ser Lys Ala Leu Glu Leu Phe Arg Asn Asp Met Ala
130 135 140
Ala Gln Tyr Lys Val Leu Gly Phe His Gly
145 150

<210> 19
<211> 154
<212> PRT
<213> イノシシ(*Sus scrofa*)

<400> 19
Met Gly Leu Ser Asp Gly Glu Trp Gln Leu Val Leu Asn Val Trp Gly
1 5 10 15
Lys Val Glu Ala Asp Val Ala Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile Arg
20 25 30
Leu Phe Lys Gly His Pro Glu Thr Leu Glu Lys Phe Asp Lys Phe Lys
35 40 45
His Leu Lys Ser Glu Asp Glu Met Lys Ala Ser Glu Asp Leu Lys Lys
50 55 60
His Gly Asn Thr Val Leu Thr Ala Leu Gly Gly Ile Leu Lys Lys Lys
65 70 75 80
Gly His His Glu Ala Glu Leu Thr Pro Leu Ala Gln Ser His Ala Thr
85 90 95
Lys His Lys Ile Pro Val Lys Tyr Leu Glu Phe Ile Ser Glu Ala Ile
100 105 110
Ile Gln Val Leu Gln Ser Lys His Pro Gly Asp Phe Gly Ala Asp Ala
115 120 125
Gln Gly Ala Met Ser Lys Ala Leu Glu Leu Phe Arg Asn Asp Met Ala
130 135 140
Ala Lys Tyr Lys Glu Leu Gly Phe Gln Gly
145 150

<210> 20
<211> 154
<212> PRT
<213> ウマ(*Equus caballus*)

図 4(続き)

10

20

30

40

50

【図 4－１６】

<400> 20
Met Gly Leu Ser Asp Gly Glu Trp Gln Gln Val Leu Asn Val Trp Gly
1 5 10 15
Lys Val Glu Ala Asp Ile Ala Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile Arg
20 25 30
Leu Phe Thr Gly His Pro Glu Thr Leu Glu Lys Phe Asp Lys Phe Lys
35 40 45
His Leu Lys Thr Glu Ala Glu Met Lys Ala Ser Glu Asp Leu Lys Lys
50 55 60
His Gly Thr Val Val Leu Thr Ala Leu Gly Gly Ile Leu Lys Lys Lys
65 70 75 80
Gly His His Glu Ala Glu Leu Lys Pro Leu Ala Gln Ser His Ala Thr
85 90 95
Lys His Lys Ile Pro Ile Lys Tyr Leu Glu Phe Ile Ser Asp Ala Ile
100 105 110
Ile His Val Leu His Ser Lys His Pro Gly Asp Phe Gly Ala Asp Ala
115 120 125
Gln Gly Ala Met Thr Lys Ala Leu Glu Leu Phe Arg Asn Asp Ile Ala
130 135 140
Ala Lys Tyr Lys Glu Leu Gly Phe Gln Gly
145 150

<210> 21
<211> 152
<212> PRT
<213> タバコ(Nicotiana benthamiana)

<400> 21
Met Ser Ser Phe Thr Glu Glu Gln Glu Ala Leu Val Val Lys Ser Trp
1 5 10 15
Asp Ser Met Lys Lys Asn Ala Gly Glu Trp Gly Leu Lys Leu Phe Leu
20 25 30
Lys Ile Phe Glu Ile Ala Pro Ser Ala Lys Lys Leu Phe Ser Phe Leu
35 40 45
Lys Asp Ser Asn Val Pro Leu Glu Gln Asn Ala Lys Leu Lys Pro His
50 55 60
Ser Lys Ser Val Phe Val Met Thr Cys Glu Ala Ala Val Gln Leu Arg
65 70 75 80
Lys Ala Gly Lys Val Val Val Arg Asp Ser Thr Leu Lys Lys Leu Gly
85 90 95
Ala Thr His Phe Lys Tyr Gly Val Ala Asp Glu His Phe Glu Val Thr
100 105 110
Lys Phe Ala Leu Leu Glu Thr Ile Lys Glu Ala Val Pro Glu Met Trp
115 120 125
Ser Val Asp Met Lys Asn Ala Trp Gly Glu Ala Phe Asp Gln Leu Val
130 135 140
Asn Ala Ile Lys Thr Glu Met Lys
145 150

図 4(続き)

【図 4－１７】

<210> 22
<211> 132
<212> PRT
<213> 枯草菌(Bacillus subtilis)

<400> 22
Met Gly Gln Ser Phe Asn Ala Pro Tyr Glu Ala Ile Gly Glu Glu Leu
1 5 10 15
Leu Ser Gln Leu Val Asp Thr Phe Tyr Glu Arg Val Ala Ser His Pro
20 25 30
Leu Leu Lys Pro Ile Phe Pro Ser Asp Leu Thr Glu Thr Ala Arg Lys
35 40 45
Gln Lys Gln Phe Leu Thr Gln Tyr Leu Gly Gly Pro Leu Tyr Thr
50 55 60
Glu Glu His Gly His Pro Met Leu Arg Ala Arg His Leu Pro Phe Pro
65 70 75 80
Ile Thr Asn Glu Arg Ala Asp Ala Trp Leu Ser Cys Met Lys Asp Ala
85 90 95
Met Asp His Val Gly Leu Glu Gly Glu Ile Arg Glu Phe Leu Phe Gly
100 105 110
Arg Leu Glu Leu Thr Ala Arg His Met Val Asn Gln Thr Glu Ala Glu
115 120 125
Asp Arg Ser Ser
130

<210> 23
<211> 131
<212> PRT
<213> コリネ型細菌(Corynebacterium glutamicum)

<400> 23
Met Thr Thr Ser Glu Asn Phe Tyr Asp Ser Val Gly Gly Glu Glu Thr
1 5 10 15
Phe Ser Leu Ile Val His Arg Phe Tyr Glu Gln Val Pro Asn Asp Asp
20 25 30
Ile Leu Gly Pro Met Tyr Pro Pro Asp Asp Phe Glu Gly Ala Glu Gln
35 40 45
Arg Leu Lys Met Phe Leu Ser Gln Tyr Trp Gly Gly Pro Lys Asp Tyr
50 55 60
Gln Glu Gln Arg Gly His Pro Arg Leu Arg Met Arg His Val Asn Tyr
65 70 75 80
Pro Ile Gly Val Thr Ala Ala Glu Arg Trp Leu Gln Leu Met Ser Asn
85 90 95
Ala Leu Asp Gly Val Asp Leu Thr Ala Glu Gln Arg Glu Ala Ile Trp
100 105 110
Glu His Met Val Arg Ala Ala Asp Met Leu Ile Asn Ser Asn Pro Asp

図 4(続き)

【図 4－１８】

115 120 125
Pro His Ala
130

<210> 24
<211> 124
<212> PRT
<213> シネコシスティス属種(Synechocystis sp.)

<400> 24
Met Ser Thr Leu Tyr Glu Lys Leu Gly Gly Thr Thr Ala Val Asp Leu
1 5 10 15
Ala Val Asp Lys Phe Tyr Glu Arg Val Leu Gln Asp Asp Arg Ile Lys
20 25 30
His Phe Phe Ala Asp Val Asp Met Ala Lys Gln Arg Ala His Gln Lys
35 40 45
Ala Phe Leu Thr Tyr Ala Phe Gly Gly Thr Asp Lys Tyr Asp Gly Arg
50 55 60
Tyr Met Arg Glu Ala His Lys Glu Leu Val Glu Asn His Gly Leu Asn
65 70 75 80
Gly Glu His Phe Asp Ala Val Ala Glu Asp Leu Leu Ala Thr Leu Lys
85 90 95
Glu Met Gly Val Pro Glu Asp Leu Ile Ala Glu Val Ala Ala Val Ala
100 105 110
Gly Ala Pro Ala His Lys Arg Asp Val Leu Asn Gln
115 120

<210> 25
<211> 183
<212> PRT
<213> シネコッカス属種(Synechococcus sp.)

<400> 25
Met Asp Val Ala Leu Leu Glu Lys Ser Phe Glu Gln Ile Ser Pro Arg
1 5 10 15
Ala Ile Glu Phe Ser Ala Ser Phe Tyr Gln Asn Leu Phe His His His
20 25 30
Pro Glu Leu Lys Pro Leu Phe Ala Glu Thr Ser Gln Thr Ile Gln Glu
35 40 45
Lys Lys Leu Ile Phe Ser Leu Ala Ala Ile Ile Glu Asn Leu Arg Asn
50 55 60
Pro Asp Ile Leu Gln Pro Ala Leu Lys Ser Leu Gly Ala Arg His Ala
65 70 75 80
Glu Val Gly Thr Ile Lys Ser His Tyr Pro Leu Val Gly Gln Ala Leu
85 90 95
Ile Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Leu Ala Ala Asp Trp Thr Glu Gln Leu
100 105 110

図 4(続き)

【図 4－１９】

Ala Thr Ala Trp Val Glu Ala Tyr Asp Val Ile Ala Ser Thr Met Ile
115 120 125
Glu Gly Ala Asp Asn Pro Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Glu Leu Thr Phe
130 135 140
Tyr Glu Trp Leu Asp Leu Tyr Gly Glu Glu Ser Pro Lys Val Arg Asn
145 150 155 160
Ala Ile Ala Thr Leu Thr His Phe His Tyr Gly Glu Asp Pro Gln Asp
165 170 175
Val Gln Arg Asp Ser Arg Gly
180

<210> 26
<211> 118
<212> PRT
<213> インクラゲ(Nostoc commune)

<400> 26
Met Ser Thr Leu Tyr Asp Asn Ile Gly Gly Gln Pro Ala Ile Glu Gln
1 5 10 15
Val Val Asp Glu Leu His Lys Arg Ile Ala Thr Asp Ser Leu Leu Ala
20 25 30
Pro Val Phe Ala Gly Thr Asp Met Val Lys Gln Arg Asn His Leu Val
35 40 45
Ala Phe Leu Ala Gln Ile Phe Glu Gly Pro Lys Gln Tyr Gly Gly Arg
50 55 60
Pro Met Asp Lys Thr His Ala Gly Leu Asn Leu Gln Pro His Phe
65 70 75 80
Asp Ala Ile Ala Lys His Leu Gly Glu Arg Met Ala Val Arg Gly Val
85 90 95
Ser Ala Glu Asn Thr Lys Ala Ala Leu Asp Arg Val Thr Asn Met Lys
100 105 110
Gly Ala Ile Leu Asn Lys
115

<210> 27
<211> 136
<212> PRT
<213> バチルス・メガテリウム(Bacillus megaterium)

<400> 27
Met Arg Glu Lys Ile His Ser Pro Tyr Glu Leu Leu Gly Gly Glu His
1 5 10 15
Thr Ile Ser Lys Leu Val Asp Ala Phe Tyr Thr Arg Val Gly Gln His
20 25 30
Pro Glu Leu Ala Pro Ile Phe Pro Asp Asn Leu Thr Glu Thr Ala Arg
35 40 45
Lys Gln Lys Gln Phe Leu Thr Gln Tyr Leu Gly Gly Pro Ser Leu Tyr

図 4(続き)

10

20

30

40

50

【図 4-20】

[illegible]

【図 5】

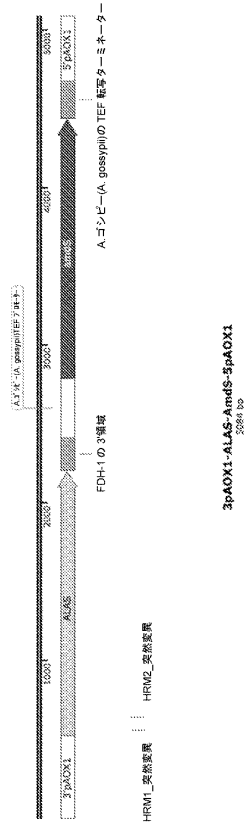


図 4(続き)

【図 6-1】

图 6

配列番号 28

atgaggtttg	tgcgcctgca	gllccatgaal	ggcgttcctg	tlgagctgac	aacltccatc	170
acagagcttg	agaggttgat	agccaaacgt	ttctcagctg	actagctgag	tcctgtccgc	180
gggtgtgtgt	cgcgtctctc	acagacgaac	tactactctc	aactctccac	agacgcgcac	190
ggccaaacgt	cgcagctatc	ttccagcagc	aaagaaagtg	ttcttcccat	ccgtatgaga	200
gagcagcttg	ccgctgttgc	ttcagacagc	attatgcagt	ccctctcgc	gataaagc	210
aaagatgaat	cttatctgtt	tttccatga	atccacacgt	tacgcacaga	gtttccctgc	220
gcacatcgag	agagacgaac	tgcacaaatc	accctgtctg	ttcatgaaga	ctaactgaga	230
atgttgagac	atcctatgaal	lalcacaaac	atagacagc	ccagacagac	glaacgttgc	240
ggcagcagag	gaactacaga	catctcagct	ctaacacagc	cgctctccac	tttgaaagc	250
ggctgcagtc	gcttgcacaa	ggagaaagc	ggctgtgtgt	ttctacatg	ttctcagct	260
gagcagcttg	ccgctgttgc	atcttgagac	gtgtgtgtgt	ctccacagac	gagcagctgc	270
cgctgcgaac	gctatctgac	gatatgtgtg	gtgtcctagt	ctcagacaga	gaagcagctc	280
ttccagacac	acaatttgaa	ggacatctgag	ctcagcttag	ctccagcag	caactgcagt	290
ctccaaactg	tcgctcttga	tgcaagttag	ttcatgtgtg	gatgtctgtg	tcacctgagt	300
aaaglllacc	attctcccaa	aaagatggac	ggccctccat	ttcttgagac	aaatcatgt	310
gagcagcttg	gagcagcttg	ggagcagc	ggagcagc	gagcagcttg	gagcagcttg	320
ttcacgtgtg	gaatgcgcac	ttccagctgtg	gttgacaaac	ttccatcatt	ggatgtgttc	330
gacatcagat	ctgtgtactg	ctggaaatgac	tttgttaact	gttttgatct	cggtgtgcgt	340
agctgcacac	taattgtctg	gttgaagctc	tatgcgcagc	gtttctattt	taactacaca	350
ctctctccgt	ctacatcagt	tgcacacccc	actctctctc	gaatgtctag	ggacacac	360
gagcagcttg	gctctcagac	gctctcagac	gctctcagac	gctctcagac	gctctcagac	370
ggtatctcag	ttctccacaa	gctctcagac	attgtctctc	gaggtgtg	gagcagcttg	380
gatgcacaga	agggcaccga	tatgttatga	acaaacaccc	gatttatgt	tcagagctgt	390
caatacctca	ctgtctgcct	cgctgaagac	cgcactacac	ttactctcac	tcaggtgcct	400
gaaacagaga	ttctctacac	gctctcagac	gctctcagac	atgtttttac	tgagcttaact	410
ttacacagca	tcacaaacac	gctctcagac	gctctcagac	aggggttgag	ttgacttaact	420
ctccactcag	ttgcacaccc	atgtgttgag	cagactgaaa	cgatccacag	atgcagctgt	430
tag						1683

配列番号 29

10	20	30	40	50
MEFVARQSMN	ACPFVIRSTT	HHLKKLAAMS	SLAATASHCP	VVGPALQQQR
60	70	80	90	100
YYSQSPKPAQ	AQTSDIATGI	KKDVSPIRMD	SNETAIFYJNG	MYESDLANKR
110	120	130	140	150
KDMSYRYFNN	INRLAKEFEK	AHRQTEDDKV	TWVCMSNDYL	MGRHPEIIKT
160	170	180	190	200
MKATMDKYGS	GAGGTRNTAG	HNHAANLRES	ELACLNKKEA	ALVFSSCFTA
210	220	230	240	250
NDAILSLLQG	KIKNLVPSDD	QSNHASMILG	VRNSKAKKHI	FKHNLNKLDL
260	270	280	290	300
SQLAQYFKST	PKLIAFESVY	SMCGSVAFIE	KICDLAKRYG	ALTFLDEVIA
310	320	330	340	350
VGMYPGPHQG	VAEHLDFDLH	LQSGIASPFS	VDKRTILDVR	DMITGTCGKS
360	370	380	390	400
FGTVGGVYAG	SANLIDWLRS	YAFGFIPTTT	LPPAIMAGTA	TSVRIVRADP
410	420	430	440	450

【圖 6-2】

EARIKQQLWT	RYVKDSFENL	GIPVIPNPSH	IVFVLVGNAA	DAKKASDMLM
460	470	480	490	500
NKHRIYVQAI	NYPTFVVGEE	RLRITFPGH	GKEICDQLIS	AVDDVFTEEN
510	520	530	540	550
LPRINKWQSQ	GGHCGVG DAN	YVFEPLWTQ	DQLSLTNQDL	HSNVHNPVIE
560				
QIETSSGVRL				

図 6(続き)

【図 7 - 1】

図 7

例示的な突然変異 ALAS 遺伝子および突然変異 ALAS タンパク質の配列

遺伝子配列(配列番号 30):

ATGGAGTTTGTGCGCCGTCAGTCCATGAATGCCTCTCCCTTTGTGAGTCAACTTCTACCCACC
ATTTGAAGAAGTTGGCAGCAACAGTTCTCTAGCTGCTACTGCTAGTCATTCTCCCGTGGTTGG
CCCTGCTCTCCAACAGCAGAGATACTACTCTCAACCTTCCAAGCCAGCCCAAGCCCAACCTCC
GACATTGCTACTGGGATCAAGAAGATGTTTCCGATCCGATATGGACTCTAATGAAACCGCTC
TTGATTACAATGGAATGATGAGTCTGATCTTGGCAATAAACGTAAAGATAACTCGTATCGTTA
TTTCAATAACATCAACCGCTAGCCAAGAGATTCCCAAGGCACATCGCCAGACCGAAGATGAC
AAGGTGACCGTCTGGTGCTCTAACGACTACTTAGGAATGGGTAGGCATCCTGAGATTATCAAAA
CCATGAAGGCTAACATGGACAAGTACGGTTCGGAGCAGGAGGAACTAGGAACATTGCAAGGTCA
TAACCAACGCGCTATCAATTGGAAAGCGAGTTGGCTTGCTTGAACAAGAAGGAAGCGGCTCTG
GTGTTTTTCATCATGTTTCATAGCTAACGATGCAATCATCTCGTTGTTGGGACAAAAATCAAAA
ATTTGGTCATTTTCTCTGACCACTGCAATCATGCTTCCATGATATTGGGTGTGCGTAACCTCAA
AGCGAAGAAGCACATCTTCAAGCAACAATTTGAAGGATCTGGAGTCGCACTTAGCTCAGTAC
CCCAAGTCGACTCCTAAACTGATCGCCTTCGAGTCAGTTTACTCTATGTGTGGATCTGTGGCTC
CCATTGAGAAGATTGGGATTGGCTAAAGGTACGGTGCCTCACCTTCTTGGATGAAGTTCA
TGCTGTTGGAATGTATGGTCTCATGGACAGGTGTAGCTGAGCATTTGGACTTTGATCTGCAT
TTACAGTCTGGGAATCGCCAGTCTTAGCGTGGTGGACAAACGCACCATATTGGATCGTGTGACAA
TGATTACTGGTACTTGGGAAAGTCATTTGGTACTCTTGGAGGTTACGTTGCTGGTAGTGCCAA
CCTAATTGATTGGTTAAGATCCTATGCGCCAGGTTTCATTTTCACTACCACACTTCTCTCGTGT
ATCATGGGTGGTACAGCCACTTCTGTTCTGATTGTTAGGGCCGACATTGAGGCCCGTATCAAGC
AACAGCTTAATACTCGTACGTCAAAGACTCATTTGAAACCTTGGTATTCCAGTCATTCCAAA
CCCAAGTCACATTGTTCTCTGTTCTAGTTGGAATGCTGCAGATGCCAAGAAGGCATCCGATATG
TTAATGAACAACACCGTATTTATGTTCAAGCTATTAACCTACCTACTGTGCTGTGCGTGAAG
AACGACTAAGGATTACTCCTACTCCAGGTTCATGGAAAGGAGATTGTSACCAAGCTGATCAGCGC
TCTCGACGATGTTTTTACTGAGCTTAATTACCAAGAATCAACAAATGGCAGTCCCAAGGTGGT
CATTTGCGGTGTTGGTGATGCTAATTACGTACCAGAACCCAACTGTGGACTCAGGACCAGCTCA
GCTTGACAAACCAAGACTTGCACTCCAATGTGCACAAACCCAGTGATTGAGCAGATGAAACCTC
ATCAGGAGTCAGATTGTGATG

【図 7 - 2】

突然変異コドン(野生型における TGT から、突然変異型における TCT への)は、二重下線を付された太字で指し示される。

タンパク質配列(配列番号 31):

MEFVARQSMNASPFVRSTSTHHLKLAANSSLAATASHSPVVGPAQQQRYYSQPSKPAQAQTS
DIATGIKKDVSPIRMDSNETAFDYNGMYESDLANKRKDNSYRYFNNINRLAKEFPKAHRQTEDD
KVTVWCSNDYLGMRHPEIIKTMKATMDKYSGAGGTRNIAGHNHAAINLESELACLNKKEAAL
VFSSCFIANDAIISLLGQKIRNLVIFSDQSNHASMILGVRNSKAKKHIFKHNNLKDLESQLAQY
FKSTPKLIAFESVYSMCGSVAPIEKICDLAKRYGALTFLDEVHAVGMYGPHQGVAEHLDFDLH
LQSGIASPSVVDKRTILDRVDMITGTCGKSFGTVGGYVAGSANLIDWLRSYAPGFIFTTTLPPA
IMAGTATSVRIVRADIEARIKQQLNTRYVKDSFENLGIPIVNPSPHIVPVLVGNAAADAKKASDM
LMNKHRIYVQAINYPYVPVGEERLRITPTPGHKEICDQLISAVDDVFTELNLPRINKWQSQGG
HCGVGDAYIVPEPNLWTQDQLSLTNQDLHSNVHNPVIEQIETSSGVRL

長さ: 560 aa
Mol wt: 61.5 kDa

wtALAS 内に存在する、2つのシステイン残基は、セリンへと突然変異させられた(二重下線を付された太字):C12S および C39S

10

20

図 7(続き)

【図 8 - 1】

図 8

配列番号 32

R/L/N/A/C/S/H/I/G/Q-C-P-L/V/I/F/C-L/M/P/V

配列番号 33

A-C-P-F-V

配列番号 34

I-I-C-P-V-V

配列番号 35

I-C-P-F-M

配列番号 36

G-C-P-V-V

配列番号 37

CGTCAGTCCATGAATGCCCTCCTCCCTTTGTCAGGTCAACTTC

配列番号 38

GAAAGTTGACCTGACAAAGGGAGAGGCATTATGGACTGACG

配列番号 39

GCTGCTACTGCTAGTCACTTCTCCCGTGGTTGGCCCTG

配列番号 40

CAGGGCCAACCAACGGGAGAATGACTAGCAGTAGCAGC

配列番号 41

AAACGCTGTCTTGGAACTAATATGAC

配列番号 42

GACGGGCGACAAACTCCATCGTTTCAATAAATTAGTTG

配列番号 43

CAACTAAATATTCGAAACGATGGAGTTTGTGCGCCGTCAG

配列番号 44

AATTAAATACATTTCAACTACAATCTGACTCCTGATGAGGTTTCG

配列番号 45

CCTCATCAGGAGTCAGATTGTAGTTGAAATGTATTAAATTTG

配列番号 46

AAACTGTGAGTTTGGGCCATTTG

【図 8 - 2】

配列番号 47

GCTCTCCAACAGCAGAGATAC

配列番号 48

GTCCATACGGATCGGAGAAAAC

配列番号 49

AGCAACATCCCTGATTCCG

配列番号 50

ATGCGTACCTTCAATCCTGG

配列番号 51

6-FAM/AAGCCAAA/Zen/CTCCGA CATTGCTA/3IABkFQ

配列番号 52

HEX/TCGCCGTAA/Zen/GTTCCTGGTT TAGACGTT/3IABkFQ

配列番号 53

TAGCGCAGTCTCTATCGCTTC

配列番号 54

CACIGGGTTGTGCACATTGG

配列番号 55

ACAATATCTTCTCTGCCGC

配列番号 56

TTGATCTCGTCAAGAATGCG

配列番号 57

TAGGTGCCACAACCTTTGGTTTC

配列番号 58

GATCCAATGCGATGACATTCTGT

配列番号 59

ACCTGCAATAACTCCTCTCTCTG

配列番号 60

CCACTGAGGGTAGCCGAATC

配列番号 61

GGGCTCTGAAAACTCTTTTGG

30

40

図 8(続き)

50

【図 8－3】

配列番号 62
GCATGTCCTCAATAACAGATCTCGACGG

配列番号 63
AAGCCTCTTGTTTTCTGTAAATGCAC

配列番号 64
TGATGGCGTCCGAGATGAACTC

配列番号 65
ATGGAGTTTGTCGCCCGTCAG

配列番号 66
CTACAATCTGACTCCTGATGAGGTTTC

10

20

図 8(続き)

【配列表】

0007700046000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/12

リート 2 8 3 1

(72)発明者 シャンカー, スミタ

アメリカ合衆国 9 4 0 3 0 カリフォルニア州, ミルブレー, エル カミーノ レアル 1 2 0 エ
ス. アpartment 1 1 5

審査官 進士 千尋

(56)参考文献

特開 2 0 0 5 - 3 3 3 9 0 7 (J P, A)

米国特許第 0 5 8 2 4 5 1 1 (U S, A)

Florian W KRAINER et al., Microbial Cell Factories, 2015年, 14:4, pp. 1-9

Accession No. CAY69365, DEFINITION 5-aminolevulinate synthase, catalyzes the first step i
n the heme biosynthetic pathway [Komagataella phaffii GS115], Database GenBank [online
, 2015年, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAY69365.1/>, [retrieved on 25-Apr-2
024]

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

U n i P r o t / G e n e S e q

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

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

P u b M e d