

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 2 月 9 日 (09.02.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/013859 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
- (74) 代理人: 河宮 治, 外(KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒
5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号
IMP ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/014119
- (22) 国際出願日: 2005 年 8 月 2 日 (02.08.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-230227 2004 年 8 月 6 日 (06.08.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財
団法人化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUN-
DATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RE-
SEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒8608568 熊本県熊
本市大窪一丁目 6 番 1 号 Kumamoto (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護
が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 米田 明広 (META,
Akihiro) [JP/JP]; 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺
1 3 1 4 番地 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池
研究所内 Kumamoto (JP). 中原 洋 (NAKAHARA, Yo)
[JP/JP]; 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番
地 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所
内 Kumamoto (JP). 樋口 浩文 (HIGUCHI, Hirofumi)
[JP/JP]; 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番
地 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内
Kumamoto (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロピア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: YEAST PROMOTER

(54) 発明の名称: 酵母プロモーター

(57) Abstract: It is intended to provide a DNA fragment having a potent promoter activity in a yeast. Namely, a DNA fragment having a transcriptional promoter activity for a yeast which has the full-length DNA sequence represented by SEQ ID NO:1 or a partial sequence involving the 3' -terminal side thereof, or a DNA sequence being hybridizable with the full-length DNA sequence represented by SEQ ID NO:1 or a partial sequence involving the 3' -terminal side thereof and sustaining the transcriptional promoter activity of the full-length or partial sequence as described above; an expression plasmid comprising a recombinant DNA fragment which has the above-described DNA fragment and a foreign protein-encoding gene provided in the downstream thereof; a host cell such as a yeast cell having been transformed by the recombinant DNA fragment or the expression plasmid as described above; and a method of producing a foreign protein characterized by comprising culturing the host cell as described above and harvesting the foreign protein from the culture. Thus, it is possible to provide a potent promoter usable in a foreign gene expression system with the use of a yeast as the host.

(57) 要約: 酵母において強力なプロモーター活性を有する DNA 断片を提供する。酵母の転写プロモーター活性を有する DNA 断片であって、配列番号 1 に記載される DNA 配列の全部またはその 3' 側末を含む一部の配列、または配列番号 1 に記載される DNA 配列の全部またはその 3' 側末を含む一部の配列と相補的な配列にハイブリダイズしうる DNA 断片であって当該全部または一部の配列の転写プロモーター活性を保持する配列を有する、DNA 断片; 前記 DNA 断片と、その下流に外来タンパク質をコードする遺伝子とを含んでなる組換え DNA 断片より構成される発現プラスミド; 前記組換え DNA 断片または前記発現プラスミドにより形質転換された酵母等の宿主細胞; 及び前記宿主細胞を培養し、培養物から外来タンパク質を得ることを特徴とする外来タンパク質の生産方法に関する。本発明によれば、酵母を宿主とする異種遺伝子発現系において利用できる、強力なプロモーターが提供される。

WO 2006/013859 A1

明 細 書

酵母プロモーター

技術分野

- [0001] 本発明は新規な酵母プロモーターに関する。より具体的には、転写プロモーター活性をもつ新規なDNA配列、この配列を含む発現ベクター、および組換えタンパク質、例えば異種タンパク質生産のためのその使用に関する。また、本発明は、このDNA配列を含む組換え細胞にも関する。

背景技術

- [0002] 近年、遺伝子工学の技術を酵母に応用することにより、医薬品や食品などの有用タンパク質を大量に生産する酵母株の作出が試みられている。異種タンパク質を生産するため、それに対応する異種遺伝子をサッカロミセス属の酵母、特にサッカロマイセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*、以下、「*S. cerevisiae*」と略記する) に導入する技術は知られている。*S. cerevisiae*細胞内で異種遺伝子(ゲノムDNA、cDNAを含む)を発現させる時、その上流に酵母内で発現可能な「プロモーター」を連結させることが必要である。
- [0003] プロモーターとしては目的とするタンパク質を酵母内で大量に発現させることが望まれており、現在までいくつかの強力なプロモーターが見出されている。例えば、*S. cerevisiae*のプロモーターとして、強い発現量を示すことが知られている3-ホスホグリセレートキナーゼ(PGK1)遺伝子プロモーター(非特許文献1)や翻訳伸長因子(TEF1)のプロモーター(非特許文献2)などが、酵母での異種遺伝子の発現に使用されている。

- [0004] 非特許文献1: Ogdenら、1986, *Mol. Cell. Biol.*, 6(12), p. 4335-4343

非特許文献2: Cottrelleら、1985, *J. Biological Chemistry*, 260(5), p. 3090-3096

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明の目的は、酵母を宿主とする異種遺伝子発現系において利用可能な従来のプロモーターよりさらに強力なプロモーターを提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者らは、上記課題を解決すべく、*S. cerevisiae*の遺伝子発現状況について鋭意検討をした結果、*S. cerevisiae*染色体から強力なプロモーターを含むDNA断片を取得することに成功し、本発明を完成するに至った。
- [0007] すなわち、本発明は、酵母の転写プロモーター活性を有するDNA断片であって、配列番号1に記載されるDNA配列の全部またはその3'側末を含む一部の配列、または配列番号1に記載されるDNA配列の全部またはその3'側末を含む一部の配列と相補的な配列にハイブリダイズしうるDNA配列であって当該全部または一部の配列の転写プロモーター活性を保持する配列を有する、DNA断片に関する。本発明はまた、前記DNA配列と、その下流に位置する外来遺伝子とを含んで構成される発現プラスミドに関する。さらに、本発明は、前記発現プラスミドによる形質転換により取得された形質転換体に関する。さらにまた、本発明は、前記形質転換体を培養し、ついで培養物から外来タンパク質を回収することを特徴とする外来タンパク質の生産方法に関する。
- [0008] すなわち、本発明は、下記のA)～K)の発明を含むものである。
- A) 酵母の転写プロモーター活性を有するDNA断片であって、配列番号1に記載されるDNA配列の全部またはその3'側末を含む一部の配列、または配列番号1に記載されるDNA配列の全部またはその3'側末を含む一部の配列と相補的な配列にハイブリダイズしうるDNA配列であって当該全部または一部の配列の転写プロモーター活性を保持する配列を有する、DNA断片。
- [0009] B) 当該DNA配列の一部が、少なくとも配列番号1のDNA配列の3'末から650bpまでのDNA配列(配列番号6;配列番号1のDNA配列中、751番目から1400番目に相当)を含む配列である、上記A)に記載のDNA断片。
- [0010] C) 当該DNA配列の一部が、少なくとも配列番号1のDNA配列の3'末から820bpまでのDNA配列(配列番号5;配列番号1のDNA配列中、581番目から1400番目に相当)を含む配列である、上記A)またはB)に記載のDNA断片。
- [0011] D) 当該DNA配列の一部が、少なくとも配列番号1のDNA配列の3'末から950bpまでのDNA配列(配列番号4;配列番号1のDNA配列中、451番目から1400番目に

相当)を含む配列である、上記A)～C)のいずれかに記載のDNA断片。

[0012] E) 当該DNA配列の一部が、少なくとも配列番号1のDNA配列の3'末から1100bpまでのDNA配列(配列番号3;配列番号1のDNA配列中、301番目から1400番目に相当)を含む配列である、上記A)～D)のいずれかに記載のDNA断片。

[0013] F) 当該DNA配列の一部が、少なくとも配列番号1のDNA配列の3'末から1258bpまでのDNA配列(配列番号2;配列番号1のDNA配列中、143番目から1400番目に相当)を含む配列である、上記A)～E)のいずれかに記載のDNA断片。

[0014] G) 上記A)～F)のいずれかに記載のDNA断片と、その下流に外来タンパク質をコードする遺伝子とを含んでなる組換えDNA断片。

[0015] H) 上記G)に記載の組換えDNA断片を含む発現プラスミド。

[0016] I) 上記G)に記載の組換えDNA断片または上記H)に記載の発現プラスミドによって形質転換された宿主細胞。

[0017] J) 宿主細胞が酵母である、上記I)に記載の宿主細胞。

[0018] K) 上記I)またはJ)に記載の宿主細胞を培養し、ついで培養物から外来タンパク質を回収することを含む、外来タンパク質の生産方法。

発明の効果

[0019] 本発明によるDNA断片は酵母内での高いプロモーター活性を有する配列を含んでいる。従って、本発明によるDNA断片を外来遺伝子とともに連結したプラスミドを宿主、とりわけ酵母に導入することによって、外来遺伝子を高発現レベルで発現させることができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1-1]プラスミドpKHA030の構築図。

[図1-2]プラスミドpKHA030の構築図(続き)。

[0021] [図2]NCE102プロモーターを断片化した際の各領域を示す図。

[0022] [図3]NCE102プロモーターと他のプロモーターを用いたrHSA発現量に関するロケット免疫電気泳動の結果を示す図。

[0023] [図4]NCE102プロモーターと他のプロモーターのHSA-mRNA量比を示す図。

[0024] [図5]NCE102プロモーター断片化によるHSA-mRNA量比を示す図。

発明を実施するための最良の形態

- [0025] 本発明のプロモーター活性を有するDNA断片は配列番号1に示したDNA配列の全部またはその3'側末を含む一部の配列で表される。このDNA断片は酵母においてNCE102遺伝子の読み枠の上流に位置し、プロモーター領域を含むものである。
- [0026] 本発明によるプロモーター活性を有するDNA断片は、配列番号1で表される配列に加えて、少なくとも配列番号1のDNA配列の3'末から650bpまでのDNA配列(配列番号6)を含む配列である。さらに好ましくは、本発明によるプロモーター活性を有するDNA断片は、少なくとも配列番号1のDNA配列の3'末から820bpまでのDNA配列(配列番号5)を含む配列である。
- [0027] さらに、本発明によるプロモーター活性を有するDNA断片としては、配列番号1に記載されるDNA配列またはその3'側末を含む一部の配列と相補的な配列にハイブリダイズしうるDNA配列であって当該全部または一部の配列の転写プロモーター活性を保持する配列も含まれる。このような配列には、配列番号1の全部またはその3'側末を含む一部の配列中の塩基のいずれかについて欠失、置換、および付加、並びにこれらの組み合わせが存在するが、そのプロモーター活性を保持する配列も包含される意味に解釈されるべきである。
- [0028] 本明細書において「ハイブリダイズしうるDNA配列」とはストリンジェントな条件下においてハイブリダイズしうるDNA配列を意味する。
- [0029] なお、本明細書において「プロモーター」とは、宿主細胞中で構造遺伝子に連結したとき、その構造遺伝子に関して、そのプロモーターが存在しない条件下の転写、翻訳、もしくは、mRNAの安定性を増大させる任意のDNA配列を意味する。また、「外来遺伝子」とは、その遺伝子が特定生物に由来するか否かを問わず、自然界では特定のプロモーターと機能的に共存していない任意の遺伝子を意味する。さらに、本明細書では、「DNA」、「遺伝子」、および「遺伝子DNA」という用語を実質的に同義のものとして用いることとする。
- [0030] 本発明の上記酵母プロモーターを含むDNA断片は慣用されている核酸合成の手法により全合成することができる。
- [0031] 本発明によるプロモーターを含むDNA断片の下流に連結した外来遺伝子(以下、

「プロモーター連結外来遺伝子」ということがある)を酵母に導入することにより、外来遺伝子の発現が本発明によるプロモーターによって制御されている酵母を取得することができる。

- [0032] このプロモーター連結外来遺伝子を酵母に導入する方法としては、例えばHinnenら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929-1933, 1978)の文献に記載された方法を用いることができる。具体的には、プロモーター連結外来遺伝子をベクターに組み込んでこれを酵母に導入する方法、直接酵母に導入する方法等が挙げられる。
- [0033] 本発明によれば、プロモーター遺伝子を含むDNA断片と、その下流に位置する外来遺伝子とを連結してなるDNA断片を含むDNAがベクターに連結された発現プラスミドが提供される。
- [0034] 発現プラスミド構築のために用いられるベクターとしては、例えばHinnenらの文献に記載されている酵母の2 μ m DNAを基本としたベクター、また一般的な酵母用のベクターであるYRp系(酵母染色体のARS配列を複製起点とする酵母用マルチコピーベクター)、YEp系(酵母の2 μ m DNAの複製起点を持つマルチコピーベクター)、YCp系(酵母染色体のARS配列を複製起点として持ち、かつ酵母染色体のセントロメアのDNA配列を持つ酵母用シングルコピーベクター)、YIp系(酵母の複製起点を持たない酵母染色体組み込み用ベクター)などを挙げることができる。
- [0035] 連結される外来遺伝子は特に限定されるものではないが、例えば、ヒト血清アルブミン(以下、「rHSA」と略記することがある)遺伝子などを用いることができる。連結される外来遺伝子はそれにコードされている遺伝子産物の発現を目的とすることに限定されず、アンチセンスRNAによる発現制御もその目的に含まれる。
- [0036] 発現プラスミドには、形質転換体選択のためのマーカー遺伝子(例えば、LEU2遺伝子)、形質転換する宿主の種類に応じたターミネーター(例えば、ADH1遺伝子のターミネーター)などを連結することができる。
- [0037] 発現プラスミドによる宿主酵母の形質転換法としては、例えば電気穿孔法が挙げられるが、これに限定されるものではない。
- [0038] 発現プラスミドによって形質転換される宿主酵母としては、例えば*S. cerevisiae*が挙げられるが、これに限定されるものではない。

[0039] また、本発明による形質転換体を培養することによって、外来タンパク質を発現させ、当該外来タンパク質を製造することができる。発現することができる外来タンパク質としては、例えばヒト血清アルブミン、免疫グロブリンなどの医療分野で有用な物質などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0040] 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はそれらの実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例

[0041] 《実施例1：プロモーターのクローニングとrHSA発現プラスミドの構築》

S. cerevisiae S288C株ゲノムDNAを鋳型、合成DNA (HA023) : ATAGCGGCCGC AGAATGCAATGCGGCTTTTGTTTG (配列番号11) および合成DNA (HA024) : TATGGGATTATATTGTTATTAGGTATGCTTTGAGA (配列番号12) をプライマーとして、Pwo DNAポリメラーゼ(ロッシュ社)を用いたPCR (1st PCR) を行った。1st PCRは、94℃で15秒間、47℃で30秒間、72℃で45秒間の3ステップからなるサイクルを30回繰り返し、最後に72℃で5分間保温する条件で行った。この1st PCRにより、アガロースゲル電気泳動上約0.83kbpの大きさと考えられる位置に確認される1st PCR産物を切り出した。

[0042] 合成DNA (HA005) : ATGAAGTGGGTTTTCATCGTCTCCATTTTGTTCTTGTCTCCTCTGCTTACTCTA (配列番号13) と合成DNA (HA006) : GATCTAGAGTAAGCAGAGGAGAACAAGAACAATGGAGACGATGAAAACCCACTTCAT (配列番号14) を混合し、96℃で10分間保温した後、室温まで冷却しアニーリングを行った。

[0043] アニーリングを行った合成DNAリンカーHA005/HA006と1st PCR産物を平滑末端にてライゲーションし、次いで、このライゲーション反応液を鋳型、合成DNA (HA030) : ATCCAAAGATCTAGAGTAAGCAGAGGAGAACAAGAAC (配列番号15) および合成DNA (HA039) : AAGGAAAAAAGCGGCCGCAGAATGCAATGCGGCTTTTGTTTG (配列番号16) をプライマーとするPCR (2nd PCR) を行った。2nd PCRは、94℃で15秒間、53℃で30秒間、72℃で45秒間の3ステップからなるサイクルを30回繰り返し、最後に72℃で2分間保温する条件で行った。この2nd PCRにより、アガロースゲル

ル電気泳動上約0.83kbpの大きさと考えられる位置に確認される2nd PCR産物を切り出した。

[0044] 精製2nd PCR産物を制限酵素NotIおよびBglIIで消化し、アガロースゲル電気泳動上約0.90kbpの大きさと考えられる位置に確認される消化反応産物を切り出した。

[0045] この消化反応産物を、rHSA発現プラスミドpDB2244(WO00/44772号公報)から誘導されたrHSA発現プラスミドpDB2305のPRB1プロモーターを含むNotI-BglII領域と置換することで、新規rHSA発現プラスミドpKHA030を得た。

[0046] 上述した本発明のプロモーターのクローニングとrHSA発現プラスミドの構築について図1に示した。

[0047] 《実施例2:プロモーターの塩基配列の決定》

実施例1でクローニングした領域の塩基配列は、pKHA030を鋳型、CEQ DTCS-Quick Start Kit(ベックマンコールター社)を用いたPCRを行い、CEQ2000XL塩基配列読み取り装置(ベックマンコールター社)を用いて、サンガーの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467, 1977)に従って決定した。

[0048] 《実施例3:プロモーター領域の改変》

本発明者らは、酵母*S. cerevisiae* S288C株ゲノムDNAにおける本発明のプロモーター領域(820bp)よりさらに580bpを加えた5'上流まで範囲を取り、この1400bpを5'上流側から断片化することを試みた。ここで、ゲノムDNA上での本発明プロモーターの遺伝子産物翻訳が始まる地点(AUGコドンのA)をゼロ点とし、これより上流に位置するプロモーター領域(820bp)を-820bpとする(配列番号5;配列番号1のDNA配列中、581番目から1400番目に相当)。以下の各DNA断片の調製を実施例1及び実施例2に示した方法と同様に行い(図2)、rHSA発現プラスミド(表1)をそれぞれ構築した:-1400bp(配列番号1のDNA配列;1番目から1400番目に相当);-1258bp(配列番号2;配列番号1のDNA配列中、143番目から1400番目に相当);-1100bp(配列番号3;配列番号1のDNA配列中、301番目から1400番目に相当);-950bp(配列番号4;配列番号1のDNA配列中、451番目から1400番目に相当);-650bp(配列番号6;配列番号1のDNA配列中、751番目から1400番目に相当);-500bp(配列番号7;配列番号1のDNA配列中、901番目から1400番目に相当);-350bp(配列番号8;配列番号1のDNA配列中、901番目から1400番目に相当);

号1のDNA配列中、1051番目から1400番目に相当) ; -200bp(配列番号9;配列番号1のDNA配列中、1201番目から1400番目に相当) ; -50bp(配列番号10;配列番号1のDNA配列中、1351番目から1400番目に相当) 及び-0bp。

[0049] [表1]

r H S A 発現プラスミド	N C E 1 0 2 プロモーター領域[b p]
p K H A 0 6 3	- 1 4 0 0
p K H A 0 6 5	- 1 2 5 8
p K H A 0 6 7	- 1 1 0 0
p K H A 0 6 9	- 9 5 0
p K H A 0 3 0	- 8 2 0
p K H A 0 7 1	- 6 5 0
p K H A 0 7 3	- 5 0 0
p K H A 0 7 5	- 3 5 0
p K H A 0 7 7	- 2 0 0
p K H A 0 7 9	- 5 0
p K H A 0 9 9	0

[0050] 《実施例4:酵母形質転換体の取得》

プラスミドpKHA030、および、実施例3にて構築したrHSA発現プラスミドを、Hinnenらの文献に記載の方法によって、*S. cerevisiae*株(*cir*⁰ a, *leu2-3*, *leu2-112*, *can1*, *pra1*, *yap3*, *hsp150*)に導入した。形質転換体を、ロイシンを欠いている緩衝最小寒天培地(アミノ酸・硫酸アンモニウム不含0.15%(w/v)酵母ニトロゲンベース、0.5%(w/v)硫酸アンモニウム、36mMクエン酸、126mMリン酸水素二ナトリウム、pH6.5、2%(w/v)スクロース、および1%(w/v)バクトアガー)上で選択した。

[0051] 《実施例5:rHSA分泌発現量の評価》

得られた形質転換体を緩衝最小液体培地(アミノ酸・硫酸アンモニウム不含0.15%(w/v)酵母ニトロゲンベース、0.5%(w/v)硫酸アンモニウム、36mMクエン酸、126mMリン酸水素二ナトリウム、pH6.5、2%(w/v)スクロース)10mLを含む50mLフラスコで30℃、200rpmで96時間培養し、rHSA発現量をロケット免疫電気泳動にて評価した。まず、培養液(N=5)の遠心分離を行い、それぞれ上清を回収した。これらの上清4μLを抗ヒトアルブミン抗体(シグマ社)を含む1.0%(w/v)アガロースゲルに供給し、電気泳動を行った。泳動後のゲルをクーマシーブリリアントブルー(R-250)で染色し、得られたロ

ケット様のピークの高さから各培養上清中のrHSA濃度を比較した。

- [0052] 図3に示すように、NCE102プロモーター(-820bp)を含むプラスミドpKHA030を導入した酵母のrHSA発現量は、PGK1プロモーター、TEF1プロモーターを含むプラスミドを導入した酵母のrHSA発現量より明らかに多かった。

- [0053] 《実施例6:HSA-mRNA転写量の評価》

実施例4にて得られた形質転換体を緩衝最小液体培地(アミノ酸・硫酸アンモニウム不含0.15%(w/v)酵母ニトロゲンベース、0.5%(w/v)硫酸アンモニウム、36mMクエン酸、126mMリン酸水素二ナトリウム、pH6.5、2%(w/v)スクロース)10mLを含む50mLフラスコで30℃、200rpmで培養し、72時間後の酵母菌体を回収した。回収した菌体からRNeasy Mini Kit(キアゲン社)を用いて全RNAを抽出し、同時にDNase処理も行った。

- [0054] 抽出した全RNAを鋳型とし、HSA遺伝子検出用の合成DNA(HA045):GTCCGAAGTCGCTCACAGATTCAA(配列番号17)と合成DNA(HA046):GCAGATTCGT CAGCAACACAAGTC(配列番号18)またはPGK1遺伝子検出用の合成DNA(HA062):GCGTGTCTTCATCAGAGTTGACTTC(配列番号19)と合成DNA(HA063):CCAAGTGAGAAGCCAAGACAACGTA(配列番号20)、QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit(キアゲン社)を用いて、ライトサイクラーシステム(ロッシュ社)による各プロモーターの転写活性を比較した。まず、50℃で20分間保温することで逆転写反応を行い、96℃で15分間の熱変性を行った。続けて、94℃で15秒間、53℃で20秒間、72℃で10秒間の3ステップからなるサイクルを40回繰り返し、HA045/HA046により増幅するHSA遺伝子断片と、HA062/HA063により増幅するPGK1遺伝子断片の増幅量を測定した。ここで、各サンプルにおけるHSA-cDNA量およびPGK1-cDNA量の絶対値は両者それぞれのmRNA量に等しいと仮定した。各プロモーターの転写活性は、HSA-mRNA量/PGK1-mRNA量の比(以下、「HSA-mRNA量比」と略記する)をとることで数値化した。

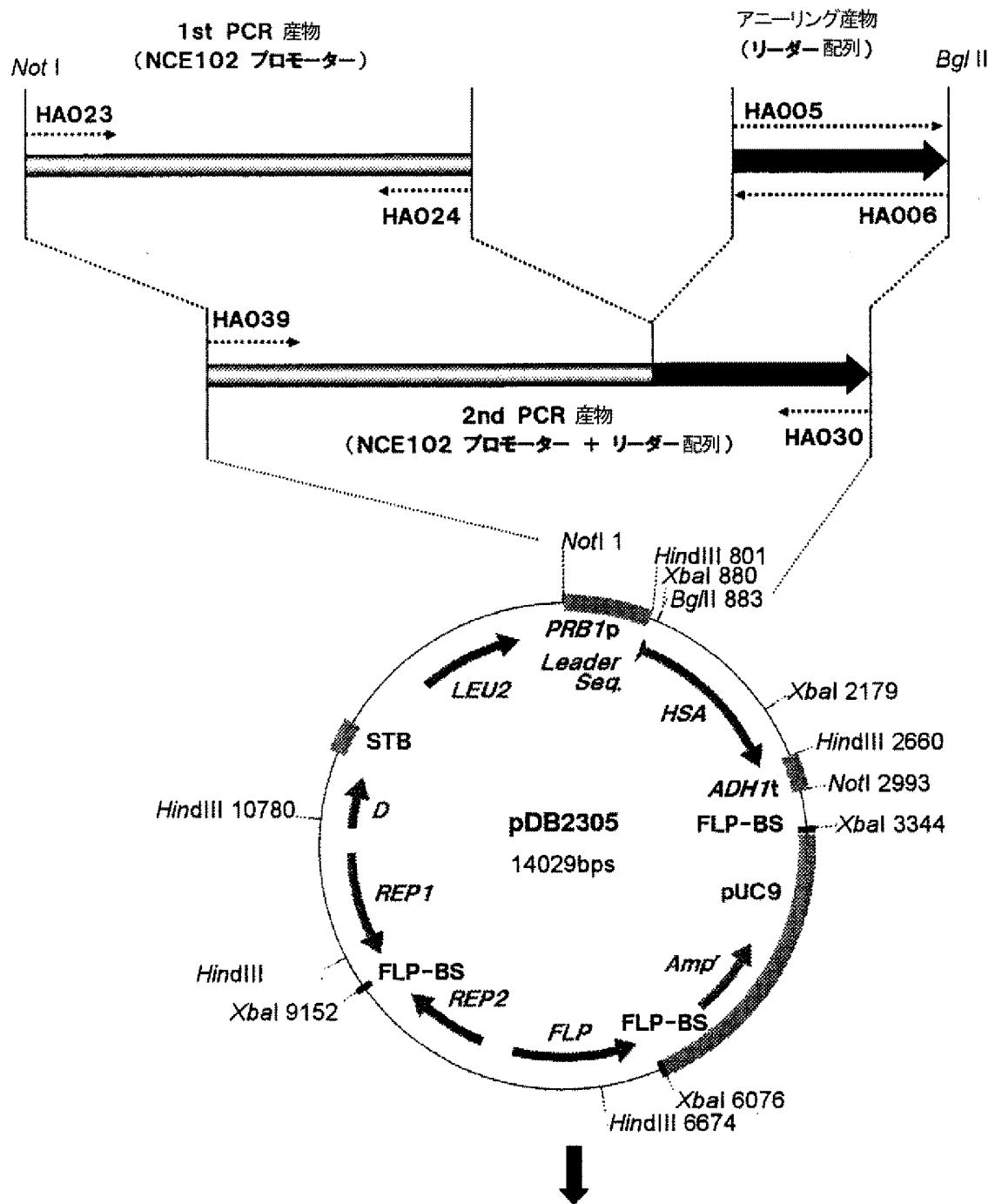
- [0055] NCE102プロモーター(-820bp)を含むプラスミドpKHA030を導入した酵母のHSA-mRNA量比は、PGK1プロモーター、TEF1プロモーターを含むプラスミドを導入した酵母のHSA-mRNA量比より、明らかに高かった(図4)。

[0056] また、NCE102プロモーターを断片化した場合は、図5に示すようにHSA-mRNA量比が変化し、-650bp(配列番号6;配列番号1のDNA配列中、751番目から1400番目に相当)より長い領域を用いた時にHSA-mRNA量比が高かった。

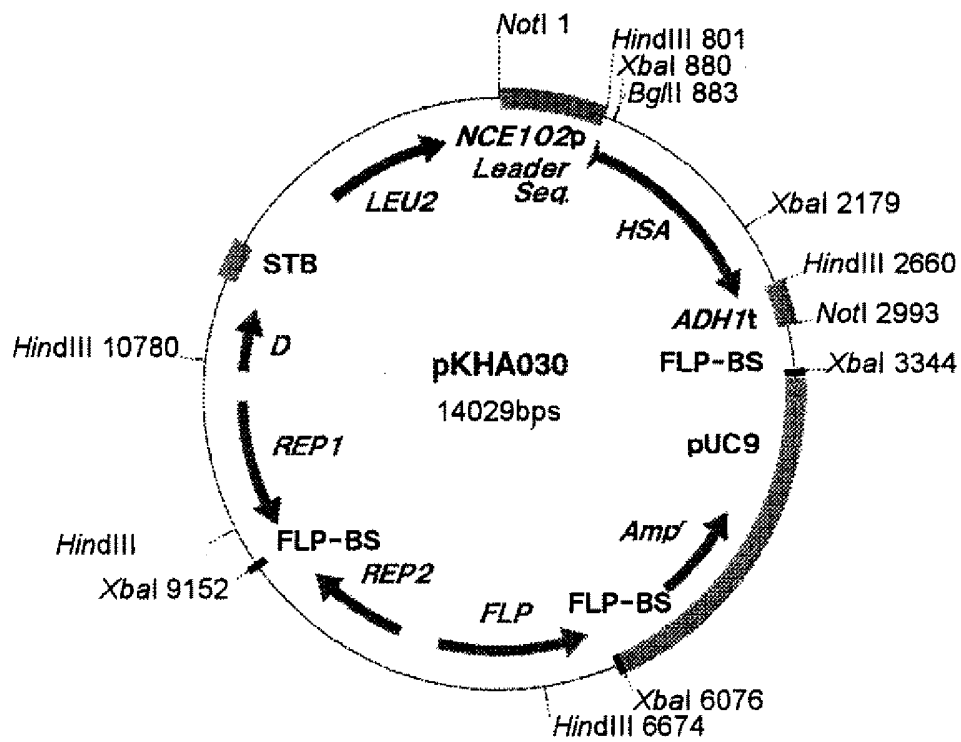
請求の範囲

- [1] 酵母の転写プロモーター活性を有するDNA断片であって、配列番号1に記載されるDNA配列の全部またはその3'側末を含む一部の配列、または配列番号1に記載されるDNA配列の全部またはその3'側末を含む一部の配列と相補的な配列にハイブリダイズしうるDNA配列であって当該全部または一部の配列の転写プロモーター活性を保持する配列を有する、DNA断片。
- [2] 当該DNA配列の一部が、少なくとも配列番号1のDNA配列の3'末から650bpまでのDNA配列(配列番号6)を含む配列である、請求項1に記載のDNA断片。
- [3] 当該DNA配列の一部が、少なくとも配列番号1のDNA配列の3'末から820bpまでのDNA配列(配列番号5)を含む配列である、請求項1または2に記載のDNA断片。
- [4] 当該DNA配列の一部が、少なくとも配列番号1のDNA配列の3'末から950bpまでのDNA配列(配列番号4)を含む配列である、請求項1から3のいずれかに記載のDNA断片。
- [5] 当該DNA配列の一部が、少なくとも配列番号1のDNA配列の3'末から1100bpまでのDNA配列(配列番号3)を含む配列である、請求項1から4のいずれかに記載のDNA断片。
- [6] 当該DNA配列の一部が、少なくとも配列番号1のDNA配列の3'末から1258bpまでのDNA配列(配列番号2)を含む配列である、請求項1から5のいずれかに記載のDNA断片。
- [7] 請求項1から6のいずれかに記載のDNA断片と、その下流に外来タンパク質をコードする遺伝子とを含んでなる組換えDNA断片。
- [8] 請求項7に記載の組換えDNA断片を含む発現プラスミド。
- [9] 請求項7に記載の組換えDNA断片または請求項8に記載の発現プラスミドによって形質転換された宿主細胞。
- [10] 宿主細胞が酵母である、請求項9に記載の宿主細胞。
- [11] 請求項9または10に記載の宿主細胞を培養し、ついで培養物から外来タンパク質を回収することを含む、外来タンパク質の生産方法。

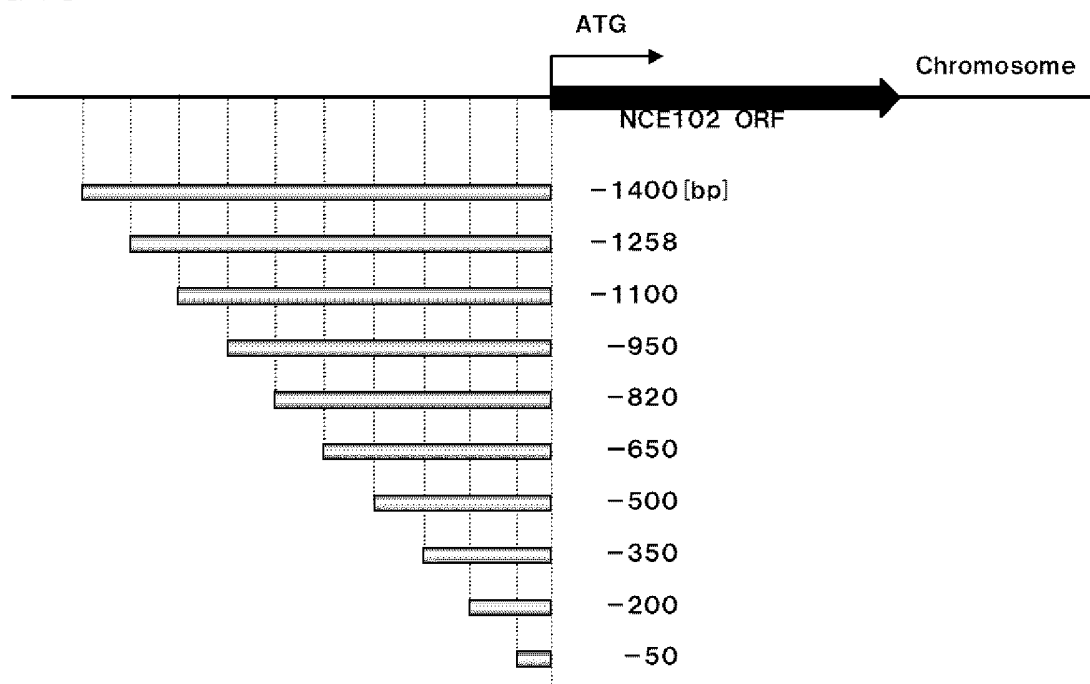
[図1-1]



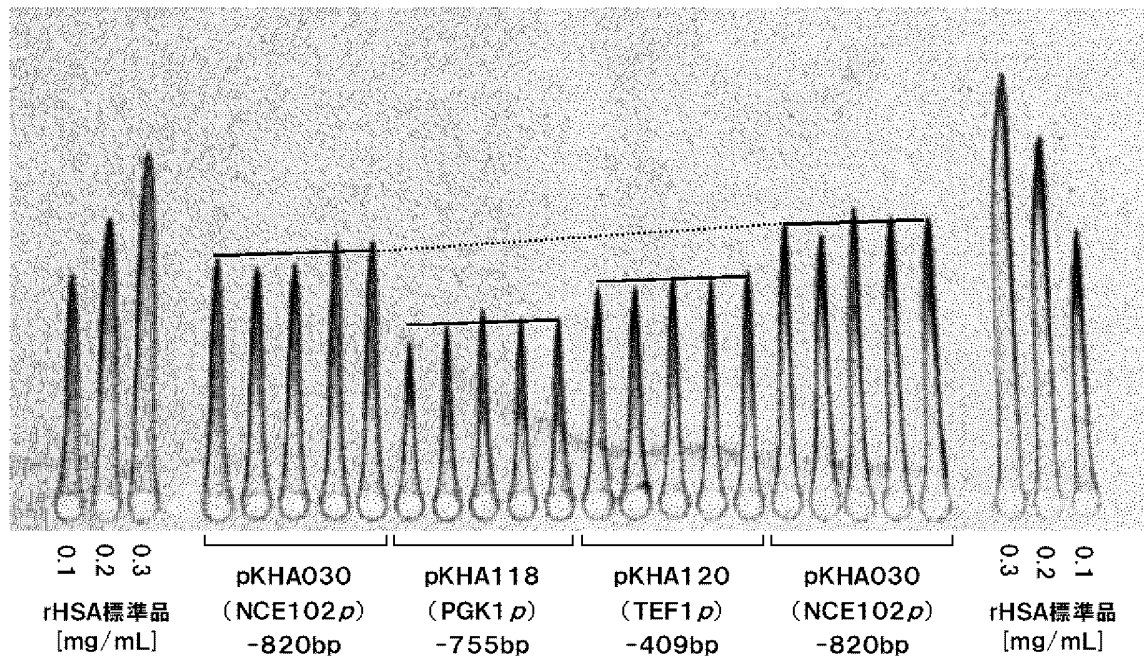
[図1-2]



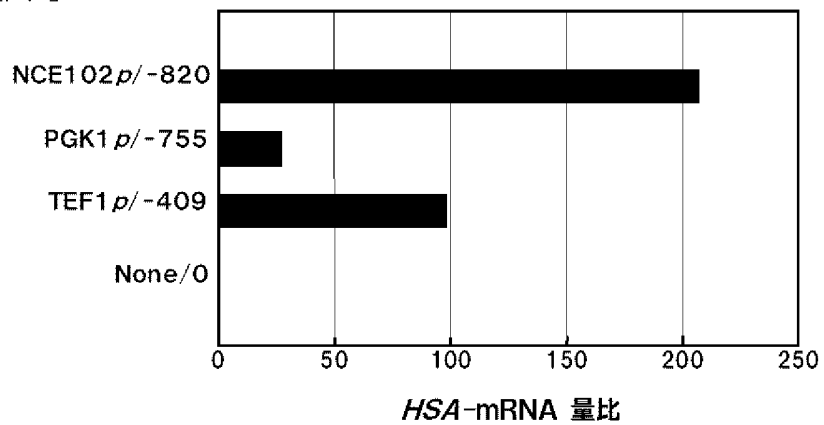
[図2]



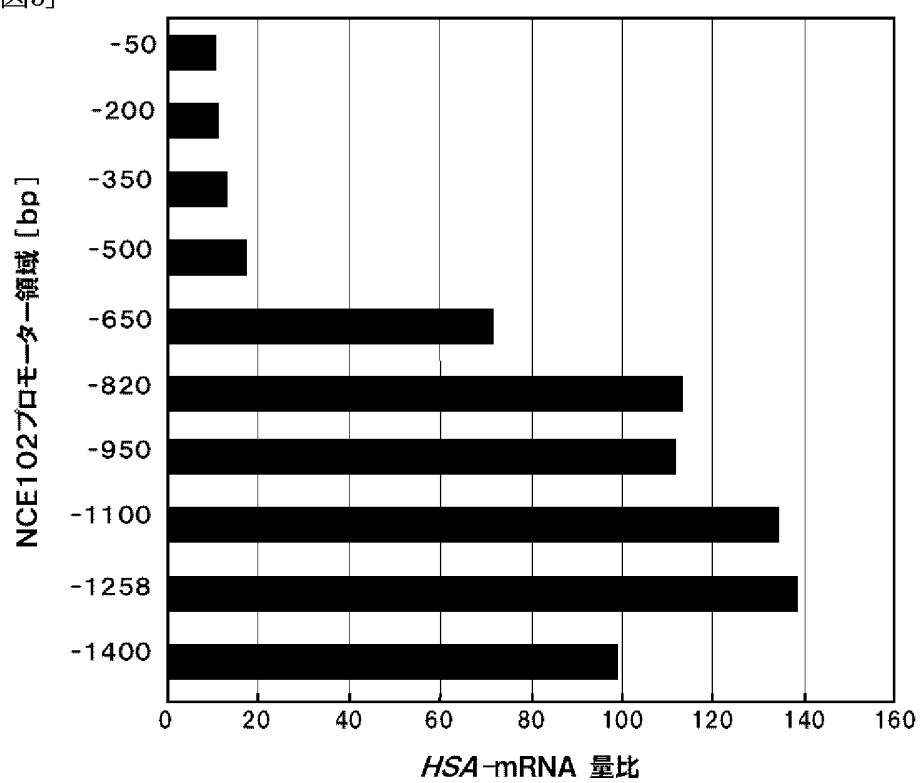
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/014119

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09 (2006.01), **C12N15/81** (2006.01), **C12N1/19** (2006.01), **C12P21/02** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09 (2006.01), **C12N15/81** (2006.01), **C12N1/19** (2006.01), **C12P21/02** (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/018792 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)), 06 March, 2003 (06.03.03), & US 2005/0112573 A1 & EP 1426439 A1	1-11
T	NCE 102 Protein of unknown function; contains transmembrane domains; involved in secretion of proteins that lack classical secretory signal sequences; component of the detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes (DIGs) [Saccharomyces cerevisiae] 18 October, 2005 (18.10.05), [online]; National Center for Biotechnology Information [retrieved on 24 October, 2005 (24.10.05)], Retrieved from: Entrez Gene, GeneID 856272	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 October, 2005 (24.10.05)

Date of mailing of the international search report
08 November, 2005 (08.11.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/014119

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CLEVES, A.E. et al., A new pathway for protein export in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ., J.Cell Biol. (1996), Vol.133, No.5, pages 1017 to 1026	1-11
A	JP 2003-265177 A (GEKKEIKAN SAKE, CO., LTD.), 24 September, 2003 (24.09.03), (Family: none)	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09 (2006.01), C12N15/81 (2006.01), C12N1/19 (2006.01), C12P21/02 (2006.01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09 (2006.01), C12N15/81 (2006.01), C12N1/19 (2006.01), C12P21/02 (2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2003/018792 A1 (独立行政法人産業技術総合研究所) 2003.03.06 & US 2005/0112573 A1 & EP 1426439 A1	1-11
T	NCE102 Protein of unknown function; contains transmembrane domains; involved in secretion of proteins that lack classical secretory signal sequences; component of the detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes (DIGs) [Saccharomyces cerevisiae] 2005.10.18 [online]; National Center for Biotechnology Information [retrieved on 2005.10.24] Retrieved from: Entrez Gene, GeneID 856272	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24.10.2005

国際調査報告の発送日

08.11.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 晴絵

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

3335

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	CLEVES, A. E. et. al., A new pathway for protein export in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , J. Cell Biol. (1996), Vol.133, No. 5, p.1017-1026	1 - 1 1
A	JP 2003-265177 A (月桂冠株式会社) 2003.09.24 (ファミリーなし)	1 - 1 1