(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2011-190210
(P2011-190210A)
(43)公開日　平成23年9月29日(2011.9.29)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 14/78	(2006.01)	C07K	14/78		4B024
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	ZNA	4B050
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B064
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47		4B065
C12N 9/02	(2006.01)	C12N	9/02		4H045

審査請求 未請求　請求項の数 22　ＯＬ　（全 86 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-57483(P2010-57483)
(22)出願日　平成22年3月15日(2010.3.15)

(71)出願人　000002093
住友化学株式会社
東京都中央区新川二丁目２７番１号
(71)出願人　000002912
大日本住友製薬株式会社
大阪府大阪市中央区道修町２丁目６番８号
(71)出願人　591071104
株式会社高研
東京都文京区後楽１丁目４番１４号
(74)代理人　100113000
弁理士　中山　亨
(74)代理人　100151909
弁理士　坂元　徹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】グリシン繰り返し配列タンパク質を産生する形質転換体

(57)【要約】
【課題】本発明により、医薬品、工業製品、化粧品、食品等として商業的に一層価値がある高性能な多用途素材となるようなグリシン繰り返し配列タンパク質を、本来の物性が損なわれない状態で生産する形質転換体等が提供すること。
【解決手段】下記（１）～（３）の全てのタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドが微生物細胞内に導入されて得られることを特徴とする形質転換体等。
（１）シクロスポリンＡに結合性を有するシクロフィリン系タンパク質
（２）プロリン水酸化酵素
（３）下記の特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質
＜特性（Ａ）＞
グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖が、連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列を有する。
＜特性（Ｂ）＞
グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖の連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列にイミノ酸が含まれている。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記（１）～（３）の全てのタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドが微生物細胞内に導入されて得られることを特徴とする形質転換体。
（１）シクロスポリンＡに結合性を有するシクロフィリン系タンパク質
（２）プロリン水酸化酵素
（３）下記の特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質
＜特性（Ａ）＞
グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖が、連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列を有する。
＜特性（Ｂ）＞
グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖の連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列にイミノ酸が含まれている。
【請求項２】
請求項１記載の形質転換体が、前記（１）～（３）の全てのタンパク質をその細胞内に産生していることを特徴とする形質転換体。
【請求項３】
前記シクロフィリン系タンパク質が、シクロフィリンＢであることを特徴とする請求項１又は２記載の形質転換体。
【請求項４】
前記シクロフィリン系タンパク質が、シクロフィリンＣであることを特徴とする請求項１又は２記載の形質転換体。
【請求項５】
前記シクロフィリン系タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドが、酵母由来のプロモーターの下流に連結されていることを特徴とする請求項１～４のいずれかの請求項記載の形質転換体。
【請求項６】
請求項１又は２記載の形質転換体が、更に下記（４）のタンパク質をその細胞内に産生していることを特徴とする形質転換体。
（４）リジン水酸化酵素
【請求項７】
前記リジン水酸化酵素が、リジルヒドロキシラーゼ１又はリジルヒドロキシラーゼ３から選択される少なくとも１種類のリジン水酸化酵素であることを特徴とする請求項６記載の形質転換体。
【請求項８】
請求項１又は２記載の形質転換体が、更に下記（５）のタンパク質をその細胞内に産生していることを特徴とする形質転換体。
（５）Ｈｓｐ４７
【請求項９】
前記プロリン水酸化酵素が、プロリル－４－ヒドロキシラーゼであることを特徴とする請求項１又は２記載の形質転換体。
【請求項１０】
前記プロリン水酸化酵素が、プロリル－４－ヒドロキシラーゼのαサブユニット及びプロリル－４－ヒドロキシラーゼのβサブユニットからなる酵素であることを特徴とする請求項９記載の形質転換体。
【請求項１１】
前記プロリル－４－ヒドロキシラーゼのβサブユニットが酵母αファクターの分泌シグナルとの融合体であることを特徴とする請求項１０記載の形質転換体。
【請求項１２】
前記プロリル－４－ヒドロキシラーゼのαサブユニットが、α１サブユニット、α２サ

ブユニット又はα３サブユニットであることを特徴とする請求項１０記載の形質転換体。
【請求項１３】
前記プロリン水酸化酵素のタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドの少なくとも１つが、酵母由来のプロモーターの下流に連結されていることを特徴とする請求項１～１２のいずれかの請求項記載の形質転換体。
【請求項１４】
前記特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質が、コラーゲンＴｙｐｅＩ～ＴｙｐｅＸＸＩＸから選択される少なくとも１種類のコラーゲンであることを特徴とする請求項１～１３のいずれかの請求項記載の形質転換体。
【請求項１５】
前記特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質が、コラーゲンＴｙｐｅＩ、コラーゲンＴｙｐｅＩＩ、コラーゲンＴｙｐｅＩＩＩから選択される少なくとも１種類のコラーゲンであることを特徴とする請求項１～１３記載のいずれかの請求項記載の形質転換体。
【請求項１６】
前記微生物細胞が、真核生物細胞であることを特徴とする請求項１～１５のいずれかの請求項記載の形質転換体。
【請求項１７】
前記真核生物細胞が、酵母細胞であることを特徴とする請求項１６記載の形質転換体。
【請求項１８】
前記酵母細胞が、メタノール資化性酵母細胞であることを特徴とする請求項１７記載の形質転換体。
【請求項１９】
前記メタノール資化性酵母細胞が、Komagataella pastorisであることを特徴とする請求項１８記載の形質転換体。
【請求項２０】
請求項１～１９のいずれかの請求項記載の形質転換体が産生して得られうることを特徴とする前記特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質。
【請求項２１】
微生物細胞内に、下記（１）～（３）の全てのタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを導入する第一工程、
第一工程により得られる形質転換体を培養することによりグリシン繰り返し配列タンパク質を産生させる第二工程、
第二工程で産生されたグリシン繰り返し配列タンパク質を回収する第三工程、
を含むことを特徴とするグリシン繰り返し配列タンパク質の取得方法。
（１）シクロスポリンＡに結合性を有するシクロフィリン系タンパク質
（２）プロリン水酸化酵素
（３）下記の特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質
＜特性（Ａ）＞
グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖が、連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列を有する。
＜特性（Ｂ）＞
グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖の連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列にイミノ酸が含まれている。
【請求項２２】
請求項２１記載の取得方法により取得されたグリシン繰り返し配列タンパク質。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、グリシン繰り返し配列タンパク質を産生する形質転換体、及び、グリシン繰

り返し配列タンパク質の取得方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
グリシン繰り返し配列を有する一群のタンパク質が生体内に存在し、生体の組織構造維持、細胞間接着、創傷治療等で重要な役割を果たしていることが知られている。これらの一群のタンパク質はイミノ酸（具体的には例えば、プロリン又はヒドロキシプロリン）の含量が高いこと、また、特異的な３重螺旋構造を有することで特徴づけられており、コラーゲンと総称されている。
コラーゲンは、皮膚、腱、軟骨、靭帯、血管及び骨等に代表される様々な生体組織中に含まれている。コラーゲンは引っ張り強度が高く、それ故に、コラーゲンが含まれる生体組織は、機械的なストレスに対して高い強度を有している。
コラーゲンに代表される天然または人工のグリシン繰り返し配列タンパク質は、優れた物理的性質を有すると共に様々な生理活性を有していることから、医薬品、工業製品、化粧品又は食品の利用性が存在しており、商業的に価値のある多用途素材である。
商業的に製造されているグリシン繰り返し配列タンパク質は、主に天然型のコラーゲンであり、動物の皮、腱、骨等から精製して生産されている。
【０００３】
コラーゲンは、ほぼ全ての多細胞動物中に存在しており、高等動物体では、体内に存在するタンパク質のうちの約３０％を占めている。高等動物では２０種類以上のコラーゲンが存在することが知られている。生体内における存在量が多いコラーゲンとしては、ＴｙｐｅＩコラーゲン、ＴｙｐｅＩＩコラーゲン、及び、ＴｙｐｅＩＩＩコラーゲンを挙げることができる。ＴｙｐｅＩコラーゲンは、骨、腱、及び、皮膚中に含まれる主要な線維状コラーゲンであり、２つのα１（Ｉ）鎖と１つのα２（Ｉ）鎖とからなるヘテロトリマー分子である。ＴｙｐｅＩＩコラーゲンは、軟骨、硝子体に含まれるコラーゲンであり、３つの同じα１（ＩＩ）鎖からなるホモトリマー分子である。ＴｙｐｅＩＩＩコラーゲンは、皮膚及び血管に含まれるコラーゲンであり、３つの同じα１（ＩＩＩ）鎖からなるホモトリマー分子である。尚、ＴｙｐｅＩコラーゲン、ＴｙｐｅＩＩコラーゲン、ＴｙｐｅＩＩＩコラーゲンは、例えば、非特許文献１、非特許文献４、及び、非特許文献５に記載された方法によって、生体組織から精製される。
【０００４】
物理的性質、生理活性が向上したグリシン繰り返し配列タンパク質を製造する技術として、自然界に存在しない人工のグリシン繰り返し配列を有するタンパク質を製造する技術が開発されており、非特許文献１では化学合成されたペプチドを３重螺旋構造化したのち、化学的に重合させるグリシン繰り返し配列タンパク質の製造方法、特許文献２では化学合成されたペプチドの自己集合を利用して３重螺旋化したポリマーを製造する技術が開示されている。しかしながら、化学合成を用いる方法は原料が高価であり、また、多段階の工程を要するため、安価な原料を用いる簡易な製造方法が求められていた。
グリシン繰り返し配列タンパク質を安価な原料を用いて製造する技術として、遺伝子組換え細胞を用いる製造方法が開発されている。非特許文献６では、酵母細胞内でＴｙｐｅＩコラーゲン前駆体とプロリン水酸化酵素とを産生させて、プロリン残基が水酸化されたＴｙｐｅＩコラーゲンを製造している。一方、特許文献１では、酵母細胞内でＴｙｐｅＩコラーゲン前駆体又はＴｙｐｅＩＩＩコラーゲン前駆体とプロリン水酸化酵素とを産生させて、プロリン残基が水酸化されたＴｙｐｅＩコラーゲン又はＴｙｐｅＩＩＩコラーゲンを製造している。また、特許文献３では自然界に存在しない人工のグリシン繰り返し配列タンパク質を、遺伝子組換え細胞を用いて製造する方法が開示されている。しかしながら、より効率的に高機能なグリシン繰り返し配列タンパク質を生産する方法が求められていた。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００５】

【非特許文献１】谷原雅夫監修、コラーゲンの製造と応用展開、ISBN：978-4-7813-0071-3、シーエムシー出版
【非特許文献２】Volume Editors: Brinckmann, J., Notbohm, H., Muller, P.K. Collagen primer in Structure, Processing and Assembly, Topics in Current Chemistry Vol. 247, 2005
【非特許文献３】Gelse, K., Poschl, E., Aigner, T., Collagens－structure, function, and biosynthesis, Advanced Drug Delivery Reviews 55:1531-1546（2003）
【非特許文献４】Miller et al., Methods In Enzymology, 82:33-64（1982）, アカデミックプレス（Academic Press）
【非特許文献５】Byers et al., Biochemistry 13:5243-5248（1974）
【非特許文献６】P.David Toman et al., J. Biol. Chem., Vol.275, No.30, July28, p23303-23309（2000）
【特許文献】
【０００６】
【特許文献１】Kivirikki, Kari I., WO9738710（1997）
【特許文献２】小出隆規 特願２００５－２７３５３
【特許文献３】Shane Crawford Weber, Arthur Herman Herz. US5710252(1998)
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
医薬品、工業製品、化粧品、食品等として商業的に一層価値がある高性能な多用途素材となるようなグリシン繰り返し配列タンパク質を、本来の物性が損なわれない（具体的には例えば、グリシン繰り返し配列タンパク質が有する親水性に係る物性の変化を低下させ、より親油性の高い、本来グリシン繰り返し配列タンパク質が有する性質に近い）状態で生産する形質転換体を見出し、見出された新規形質転換体を用いてグリシン繰り返し配列タンパク質を取得する方法等の開発が求められていた。
【課題を解決するための手段】
【０００８】
本発明者は、かかる状況のもと鋭意検討した結果、本発明に至った。
即ち、本発明は、
１．下記（１）～（３）の全てのタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドが微生物細胞内に導入されて得られることを特徴とする形質転換体。
（１）シクロスポリンＡに結合性を有するシクロフィリン系タンパク質
（２）プロリン水酸化酵素
（３）下記の特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質
＜特性（Ａ）＞
グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖が、連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列を有する。
＜特性（Ｂ）＞
グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖の連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列にイミノ酸（具体的には例えば、プロリン又はヒドロキシプロリン）が含まれている。
２．前項１記載の形質転換体が、前記（１）～（３）の全てのタンパク質をその細胞内に産生していることを特徴とする形質転換体。
３．前記シクロフィリン系タンパク質が、シクロフィリンＢであることを特徴とする前項１又は２記載の形質転換体。
４．前記シクロフィリン系タンパク質が、シクロフィリンＣであることを特徴とする前項１又は２記載の形質転換体。
５．前記シクロフィリン系タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドが、酵母由来のプロモーターの下流に連結されていることを特徴とする前項

１～４のいずれかの前項記載の形質転換体。
６．前項１又は２記載の形質転換体が、更に下記（４）のタンパク質をその細胞内に産生していることを特徴とする形質転換体。
（４）リジン水酸化酵素
７．前記リジン水酸化酵素が、リジルヒドロキシラーゼ１
又はリジルヒドロキシラーゼ３から選択される少なくとも１種類のリジン水酸化酵素であることを特徴とする前項６記載の形質転換体。
８．前項１又は２記載の形質転換体が、更に下記（５）のタンパク質をその細胞内に産生していることを特徴とする形質転換体。
（５）Ｈｓｐ４７
９．前記プロリン水酸化酵素が、プロリル－４－ヒドロキシラーゼであることを特徴とする前項１又は２記載の形質転換体。
１０．前記プロリン水酸化酵素が、プロリル－４－ヒドロキシラーゼのαサブユニット及びプロリル－４－ヒドロキシラーゼのβサブユニットからなる酵素であることを特徴とする前項９記載の形質転換体。
１１．前記プロリル－４－ヒドロキシラーゼのβサブユニットが酵母αファクターの分泌シグナルとの融合体であることを特徴とする前項１０記載の形質転換体。
１２．前記プロリル－４－ヒドロキシラーゼのαサブユニットが、α１サブユニット、α２サブユニット又はα３サブユニットであることを特徴とする前項１０記載の形質転換体。
１３．前記プロリン水酸化酵素のタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドの少なくとも１つが、酵母由来のプロモーターの下流に連結されていることを特徴とする前項１～１２のいずれかの前項記載の形質転換体。
１４．前記特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質が、コラーゲンＴｙｐｅＩ～ＴｙｐｅＸＸＩＸから選択される少なくとも１種類のコラーゲンであることを特徴とする前項１～１３のいずれかの前項記載の形質転換体。
１５．前記特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質が、コラーゲンＴｙｐｅＩ、コラーゲンＴｙｐｅＩＩ、コラーゲンＴｙｐｅＩＩＩから選択される少なくとも１種類のコラーゲンであることを特徴とする前項１～１３記載のいずれかの前項記載の形質転換体。
１６．前記微生物細胞が、真核生物細胞であることを特徴とする前項１～１５のいずれかの前項記載の形質転換体。
１７．前記真核生物細胞が、酵母細胞であることを特徴とする前項１６記載の形質転換体。
１８．前記酵母細胞が、メタノール資化性酵母細胞であることを特徴とする前項１７記載の形質転換体。
１９．前記メタノール資化性酵母細胞が、Komagataella pastorisであることを特徴とする前項１８記載の形質転換体。
２０．前項１～１９のいずれかの前項記載の形質転換体が産生して得られうることを特徴とする前記特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質。
２１．微生物細胞内に、下記（１）～（３）の全てのタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを導入する第一工程、
　第一工程により得られる形質転換体を培養することによりグリシン繰り返し配列タンパク質を産生させる第二工程、
　第二工程で産生されたグリシン繰り返し配列タンパク質を回収する第三工程、
を含むことを特徴とするグリシン繰り返し配列タンパク質の取得方法。
（１）シクロスポリンＡに結合性を有するシクロフィリン系タンパク質
（２）プロリン水酸化酵素
（３）下記の特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質
＜特性（Ａ）＞

グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖が、連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列を有する。
＜特性（Ｂ）＞
グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖の連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列にイミノ酸（具体的には例えば、プロリン又はヒドロキシプロリン）が含まれている。
２２．前項２１記載の取得方法により取得されたグリシン繰り返し配列タンパク質。
等を提供するものである。
【発明の効果】
【０００９】
本発明により、医薬品、工業製品、化粧品、食品等として商業的に一層価値がある高性能な多用途素材となるようなグリシン繰り返し配列タンパク質を、本来の物性が損なわれない（具体的には例えば、グリシン繰り返し配列タンパク質が有する親水性に係る物性の変化を低下させ、より親油性の高い、本来グリシン繰り返し配列タンパク質が有する性質に近い）状態で生産する形質転換体、及び、当該形質転換体を用いてグリシン繰り返し配列タンパク質を取得する方法等が提供可能となる。
【図面の簡単な説明】
【００１０】
【図１】図１は、プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、及び、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット導入プラスミドの作製工程のフローチャートである。
【図２】図２は、シクロフィリン系タンパク質発現カセット導入プラスミドの作製工程のフローチャートである。
【図３】図３は、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα１発現カセット及びヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα２発現カセット発現カセット導入プラスミド作製工程のフローチャートである。
【図４】図４は、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα１のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット、並びに、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα２のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット導入プラスミド作製工程のフローチャートである。
【図５】図５は、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα１のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット、並びに、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα２のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット導入プラスミド作製工程のフローチャートである。
【００１１】
【図６】図６は、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩＩＩ発現カセット導入プラスミド作製工程のフローチャートである。
【図７】図７は、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩＩ発現カセット導入プラスミド作製工程のフローチャートである。
【図８】図８は、プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、及び、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット導入プラスミドの模式図である。
【図９】図９は、シクロフィリン系タンパク質発現カセット導入プラスミドの模式図である。
【図１０】図１０は、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩ発現カセット導入プラスミドの模式図である。

【００１２】
【図１１】図１１は、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα１のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット、並びに、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα２のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット導入プラスミドの模式図である。
【図１２】図１２は、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα１のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット、並びに、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα２のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット導入プラスミドの模式図である。
【図１３】図１３は、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩＩＩ発現カセット導入プラスミドの模式図である。
【図１４】図１４は、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩＩ発現カセット導入プラスミドの模式図である。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
本明細書に記載される発明は記載されている特定の方法論、プロトコール、及び、試薬に限定されず、可変であると考えられる。また、本明細書で用いる用語は単に特定の実施形態を記載するためのものであり、本発明の範囲を何ら限定するものではないと考えられる。
特に断りの無い限り、本明細書で用いる全ての技術用語、及び、化学用語は、本発明が属する技術分野の熟練者に共通に理解されているものと同じ意味を持つ。本発明を実施又は試験する上で、本明細書に記載されているものと同様又は同等の方法、及び、材料のいずれを用いてもよいが、以下、好ましい方法、装置、及び、材料を記載する。
【００１４】
本発明形質転換体は、下記（１）～（３）の全てのタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドが微生物細胞内に導入されて得られることを特徴とする。
（１）シクロスポリンＡに結合性を有するシクロフィリン系タンパク質
（２）プロリン水酸化酵素
（３）下記の特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質
＜特性（Ａ）＞
グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖が、連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列を有する。
＜特性（Ｂ）＞
グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖の連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列にイミノ酸（具体的には例えば、プロリン又はヒドロキシプロリン）が含まれている。
【００１５】
シクロフィリン系タンパク質は、免疫抑制剤シクロスポリンＡと複合体を形成するタンパク質の総称である。ヒトを含む高等動物ではシクロフィリン系タンパク質として、シクロフィリンＡ～Ｈの８種類のタンパク質が存在することが知られている。本発明形質転換体の作製に用いるシクロフィリン系タンパク質としては、特に限定は無いが、好ましくはシクロフィリンＢ又はシクロフィリンＣ、より好ましくはシクロフィリンＢを挙げることができる。また、前記シクロフィリン系タンパク質が由来する生物種としては、特に限定されないが、動物由来のシクロフィリン系タンパク質、好ましくは恒温動物由来のシクロ

フィリン系タンパク質、より好ましくは哺乳動物由来のシクロフィリン系タンパク質、さらに好ましくはヒト由来のシクロフィリン系タンパク質を挙げることができる。

【００１６】

具体的には、前記シクロフィリン系タンパク質として、例えば、配列番号７４で示されるアミノ酸配列を有するヒトシクロフィリンＢ、配列番号７５で示されるアミノ酸配列を有するヒトシクロフィリンＣ、これらのアミノ酸配列においてアミノ酸の欠失、置換又は付加がなされたシクロフィリン系タンパク質を挙げることができる。また、これらのアミノ酸配列と相同性を有するシクロフィリン系タンパク質、例えば、異種生物由来のオーソログに由来するアミノ酸配列を有するタンパク質であっても良い。ヒトシクロフィリンＢオーソログ遺伝子に由来するアミノ酸配列としては、イヌシクロフィリンＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿８５２３８９）、チンパンジーシクロフィリンＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿００１１７４１６１）、ウシシクロフィリンＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿７７６５７７）、ラットシクロフィリンＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿０７１９８１）、マウスシクロフィリンＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿０３５２７９）、ニワトリシクロフィリンＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿９９０７９２）等、また、ヒトシクロフィリンＣのオーソログ遺伝子に由来するアミノ酸配列としては、イヌシクロフィリンＣ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿５３８６０１）、ウシシクロフィリンＣ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿００１０７０３７８）、ラットシクロフィリンＣ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿００１００４２１５）、マウスシクロフィリンＣ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿０３２９３４）等を挙げることができる。さらに、これらのオーソログのアミノ酸配列においてアミノ酸の欠失、置換又は付加がなされたシクロフィリン系タンパク質であってもよい。

【００１７】

また、前記シクロフィリン系タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドとしては、具体的には例えば、配列番号７６で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号７７で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号７８で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号７９で示される塩基配列を有するポリヌクレオチドを挙げることができ、より好ましくは配列番号７６で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号７８で示される塩基配列を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。また、これらのポリヌクレオチドの塩基配列の一部の塩基の欠失、置換又は付加が導入されてなるポリヌクレオチド、部分的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、さらに、これらのポリヌクレオチドの塩基配列と相同性を有する塩基配列を有するポリヌクレオチド、例えば、異種生物由来のオーソログ遺伝子に由来する塩基配列を有するポリヌクレオチドであっても良い。ヒトシクロフィリンＢのオーソログ遺伝子に由来する塩基配列としては、具体的には例えば、イヌシクロフィリンＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿８４７２９６）、チンパンジーシクロフィリンＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿００１１７４１６１）、ウシシクロフィリンＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿１７４１５２）、ラットシクロフィリンＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿０２２５３６）、マウスシクロフィリンＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿０１１１４９）、ニワトリシクロフィリンＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿２０５４６１）等、また、ヒトシクロフィリンＣのオーソログ遺伝子に由来する塩基配列としてはイヌシクロフィリンＣ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿５３８６０１）、ウシシクロフィリンＣ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００１０７６９１０）、ラットシクロフィリンＣ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００１００４２１５）、マウスシクロフィリンＣ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００８９０８）等を挙げることができる。さらに、これらの塩基配列を有するポリヌクレオチドの塩基配列の一部の塩基が欠失、置換又は付加が導入されてなるポリヌクレオチド、部分的な塩基配列を有するポリヌクレオチドであってもよい。

【００１８】

本発明形質転換体の作製に用いるプロリン水酸化酵素をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドとしては、例えば、プロリル－４－ヒドロキシラーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。プロリル－４－ヒドロキシラーゼは、Ｇｌｙ－Ｘａａ－Ｙａａ繰り返し配列のＹａａ部位にあるプロリン残基の４位を水酸化し、４－ヒドロキシプロリンに変換する反応を触媒する酵素である。グリシン繰り返し配列タンパク質は特徴的な３重螺旋構造を形成する。Ｙａａ部位にあるプロリン残基を水酸化することにより、グリシン繰り返し配列タンパク質の３重螺旋構造の安定性が向上する。前記プロリル－４－ヒドロキシラーゼの由来は特に限定されないが、動物由来のプロリル－４－ヒドロキシラーゼ、好ましくは高等動物由来のプロリル－４－ヒドロキシラーゼ、より好ましくはヒト由来のプロリル－４－ヒドロキシラーゼを用いることができる。

前記プロリル－４－ヒドロキシラーゼとしてはαサブユニット、及び、βサブユニットからなるプロリン水酸化酵素を用いることができ、αサブユニットとして、例えば、α１サブユニット、α２サブユニット、α３サブユニット、好ましくは、α１サブユニットを用いることができる。

【００１９】

具体的には、前記プロリル－４－ヒドロキシラーゼαサブユニットとして、例えば、配列番号８０で示されるアミノ酸配列を有するヒトプロリル-4-ヒドロキシラーゼα１サブユニット（Ｐ４Ｈα１）、配列番号８１で示されるアミノ酸配列を有するヒトプロリル－４－ヒドロキシラーゼα２サブユニット（Ｐ４Ｈα２）、配列番号８２で示されるアミノ酸配列を有するヒトプロリル－４－ヒドロキシラーゼα３サブユニット（Ｐ４Ｈα３）、また、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット（Ｐ４Ｈβ）として、例えば、配列番号８３で示されるアミノ酸配列を有するヒトＰ４Ｈβを挙げることができる。さらに、これらのアミノ酸配列においてアミノ酸の欠失、置換又は付加がなされたタンパク質、また、これらのアミノ酸配列と相同性を有するタンパク質、例えば、異種生物由来のオーソログに由来するアミノ酸配列を有するタンパク質であっても良い。ヒトＰ４Ｈα１のオーソログ遺伝子に由来するアミノ酸配列としては、イヌＰ４Ｈα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿８６２２５７）、チンパンジーＰ４Ｈα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿００１１４１０４３）、ウシＰ４Ｈα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿００１０６９２３８）、ラットＰ４Ｈα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿７４２０５９）、マウスＰ４Ｈα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿０３５１６０）、ニワトリＰ４Ｈα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿４２１５８３）、ヒトＰ４Ｈα２のオーソログ遺伝子に由来するアミノ酸配列としては、イヌＰ４Ｈα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿８６０６３７）、チンパンジーＰ４Ｈα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿００１１６２２２２）、ウシＰ４Ｈα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿００１０２９４６５）、ラットＰ４Ｈα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿３４０７９９）、マウスＰ４Ｈα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿０３５１６１）、ニワトリＰ４Ｈα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿００１００６１５５）、ヒトＰ４Ｈα３のオーソログ遺伝子に由来するアミノ酸配列としては、イヌＰ４Ｈα３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿８５１７１８）、チンパンジーＰ４Ｈα３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿００１１７４８９６）、ウシＰ４Ｈα３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿００１００１５９８）、ラットＰ４Ｈα３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿９４２０７０）、マウスＰ４Ｈα３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿７９６１３５）、ニワトリＰ４Ｈα３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿４１７２４８）、ヒトＰ４Ｈβのオーソログ遺伝子に由来するアミノ酸配列としては、イヌＰ４Ｈβ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿５４０４８８）、チンパンジーＰ４Ｈβ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿００１１６４３９６）、ウシＰ４Ｈβ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿７７６５６０）、ラットＰ４Ｈβ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿０３７１３０）、マウスＰ４Ｈβ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿０３５１６２）、ニワトリＰ４Ｈβ（ＮＣＢ

Ｉａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿４２００９５）を挙げることができる。さらに、これらのオーソログのアミノ酸配列においてアミノ酸の欠失、置換又は付加がなされたプロリル－４－ヒドロキシラーゼであってもよい。

【００２０】

また、前記プロリル－４－ヒドロキシラーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドとしては、具体的には例えば、ヒトＰ４Ｈα１のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する配列番号８４で示されるポリヌクレオチド、ヒトＰ４Ｈα２のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する配列番号８５で示されるポリヌクレオチド、ヒトＰ４Ｈα３のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する配列番号８６で示されるポリヌクレオチド、ヒトＰ４Ｈβのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する配列番号８７で示されるポリヌクレオチドを挙げることができ、より好ましくは、配列番号８４で示されるポリヌクレオチド、配列番号８７で示されるポリヌクレオチドを挙げることができる。また、これらのポリヌクレオチドの塩基配列の一部の塩基の欠失、置換又は付加が導入されてなるポリヌクレオチド、部分的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、さらに、これらのポリヌクレオチドの塩基配列と相同性を有する塩基配列を有するポリヌクレオチド、例えば、異種生物由来のオーソログ遺伝子に由来する塩基配列を有するポリヌクレオチドであっても良い。ヒトＰ４Ｈα１のオーソログ遺伝子に由来する塩基配列としては、イヌＰ４ＨＡ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿８５７１６４）、チンパンジーＰ４ＨＡ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿００１１４１０４３）、ウシＰ４ＨＡ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００１０７５７７０）、ラットＰ４ＨＡ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿１７２０６２）、マウスＰ４ＨＡ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿０１１０３０）、ニワトリＰ４ＨＡ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿４２１５８３）、ヒトＰ４Ｈα２のオーソログ遺伝子に由来する塩基配列としては、イヌＰ４ＨＡ２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿８５５５４４）、チンパンジーＰ４ＨＡ２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿００１１６２２２２）、ウシＰ４ＨＡ２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００１０３４２９３）、ラットＰ４ＨＡ２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿３４０７９８）、マウスＰ４ＨＡ２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿０１１０３１）、ニワトリＰ４ＨＡ２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００１００６１５５）、ヒトＰ４Ｈα３のオーソログ遺伝子に由来する塩基配列としては、イヌＰ４ＨＡ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿８４６６２５）、チンパンジーＰ４ＨＡ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿００１１７４８９６）、ウシＰ４ＨＡ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００１００１５９８）、ラットＰ４ＨＡ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿１９８７７５）、マウスＰ４ＨＡ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿１７７１６１）、ニワトリＰ４ＨＡ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿４１７２４８）、ヒトＰ４Ｈβのオーソログ遺伝子に由来する塩基配列としては、イヌＰ４ＨＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿５４０４８８）、チンパンジーＰ４ＨＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿００１１６４３９６）、ウシＰ４ＨＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿１７４１３５）、ラットＰ４ＨＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿０１２９９８）、マウスＰ４ＨＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿０１１０３２）、ニワトリＰ４ＨＢ（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿４２００９５）を挙げることができる。さらに、これらの塩基配列を有するポリヌクレオチドの塩基配列の一部の塩基が欠失、置換又は付加が導入されてなるポリヌクレオチド、部分的な塩基配列を有するポリヌクレオチドであってもよい。

【００２１】

本発明におけるグリシン繰り返し配列を有するタンパク質としては、下記の特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質であれば特に限定はないが、具体的には例えば、ＴｙｐｅＩコラーゲン～ＴｙｐｅＸＸＩＸコラーゲンから選択される少なくとも１種類のコラーゲン等を挙げることができ、好ましくは、線維形成型コラーゲン（Fibril-forming collagen：ＴｙｐｅＩコラーゲン、ＴｙｐｅＩＩコラーゲン、ＴｙｐｅＩ

ＩＩコラーゲン、ＴｙｐｅＶコラーゲン、ＴｙｐｅＸＩコラーゲン、ＴｙｐｅＸＸＩＶコラーゲン、ＴｙｐｅＸＸＶＩＩコラーゲン）、より好ましくは、ＴｙｐｅＩコラーゲン、ＴｙｐｅＩＩコラーゲン、ＴｙｐｅＩＩＩコラーゲンを挙げることができる。また、これらのコラーゲンの部分的な領域からなるグリシン繰り返し配列タンパク質等も挙げることができる。また、コラーゲンの由来は特に限定されないが、例えば、動物由来のコラーゲン、好ましくは高等動物由来のコラーゲン、さらに好ましくはヒト由来のコラーゲンを挙げることができる。

＜特性（Ａ）＞

グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖が、連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列を有する。

＜特性（Ｂ）＞

グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖の連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列にイミノ酸（具体的には例えば、プロリン又はヒドロキシプロリン）が含まれている。

因みに、特性（Ａ）におけるGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列の繰り返し数としては、例えば、２５回以上３６２回以下を挙げることができる。また、特性（Ｂ）におけるGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列に含まれるイミノ酸の含有率としては、例えば、１９．８％以上３８．７％以下を挙げることができる。

【００２２】

具体的には、前記ＴｙｐｅＩコラーゲンとして、例えば、配列番号８８で示されるアミノ酸配列を有するヒトＴｙｐｅＩα１コラーゲン前駆体（ＨｓＴｙｐｅＩα１）及び配列番号８９で示されるアミノ酸配列を有するヒトＴｙｐｅＩα２コラーゲン前駆体（ＨｓＴｙｐｅＩα２）、前記ＴｙｐｅＩＩコラーゲンとして、例えば、配列番号９０で示されるアミノ酸配列を有するヒトＴｙｐｅＩＩα１コラーゲン前駆体（ＨｓＴｙｐｅＩＩα１）、前記ＴｙｐｅＩＩＩコラーゲンとして、例えば、配列番号９１で示されるアミノ酸配列を有するヒトＴｙｐｅＩＩＩα１コラーゲン前駆体（ＨｓＴｙｐｅＩＩＩα１）を挙げることができる。さらに、これらのアミノ酸配列においてアミノ酸の欠失、置換又は付加がなされたタンパク質、また、これらのアミノ酸配列と相同性を有するタンパク質、例えば、異種生物由来のオーソログに由来するアミノ酸配列を有するタンパク質であっても良い。ヒトＴｙｐｅＩα１のオーソログ遺伝子に由来するアミノ酸配列としては、イヌＴｙｐｅＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿００１００３０９０）、チンパンジーＴｙｐｅＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿００１１６９３２０）、ウシＴｙｐｅＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿００１０２９２１１）、ラットＴｙｐｅＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿２１３４４０）、マウスＴｙｐｅＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿０３１７６８）、ヒトＴｙｐｅＩα２のオーソログ遺伝子に由来するアミノ酸配列としては、イヌＴｙｐｅＩα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿００１００３１８７）、チンパンジーＴｙｐｅＩα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿５１９２０７）、ウシＴｙｐｅＩα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿７７６９４５）、ラットＴｙｐｅＩα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿４４５８０８）、マウスＴｙｐｅＩα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿０３１７６９）、ヒトＴｙｐｅＩＩα１のオーソログ遺伝子に由来するアミノ酸配列としては、イヌＴｙｐｅＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿００１００６９５２）、チンパンジーＴｙｐｅＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿５０９０２６）、ラットＴｙｐｅＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿０３７０６１）、マウスＴｙｐｅＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿１１２４４０）、ニワトリＴｙｐｅＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿９８９７５７）、ヒトＴｙｐｅＩＩＩα１のオーソログ遺伝子に由来するアミノ酸配列としては、イヌＴｙｐｅＩＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿８５１００９）、チンパンジーＴｙｐｅＩＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿００１１６３６６５）、ウシＴｙｐｅＩＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿００１０７０２９

９）、ラットＴｙｐｅＩＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿１１４４７４）、マウスＴｙｐｅＩＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿０３４０６０）、ニワトリＴｙｐｅＩＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿４２１８４７）を挙げることができる。さらに、これらのオーソログのアミノ酸配列においてアミノ酸の欠失、置換又は付加がなされたタンパク質であってもよい。

尚、酵母内で前記グリシン繰り返し配列タンパク質が産生され、当該酵母内に産生されたプロリン水酸化酵素が存在する場合には、当該酵素によって、グリシン繰り返し配列タンパク質中のプロリン残基が水酸化されたグリシン繰り返し配列タンパク質が産生される。尚、グリシン繰り返し配列タンパク質中のプロリン残基の水酸化率は、公知のアミノ酸組成分析法により測定することができる。また、グリシン繰り返し配列タンパク質の線維形成能は、例えば、以下のような方法により測定することができる。具体的には例えば、精製したグリシン繰り返し配列タンパク質を、塩濃度１×Ｄ－ＰＢＳ（－）、ｐＨ７．３～７．４に再調整した後、３７℃に保温することにより、グリシン繰り返し配列タンパク質分子が再配向して溶液が白濁する。当該白濁現象をグリシン繰り返し配列タンパク質の線維形成能とみなすことができる。従って、当該性質を利用して、濃度０．０５％のグリシン繰り返し配列タンパク質溶液を、塩濃度１×Ｄ－ＰＢＳ（－）、ｐＨ７．３～７．４で３７℃に保温し、そのときの吸光度を経時的に測定することにより、線維形成能を測定することができる。

【００２３】

また、前記コラーゲンの部分的な領域からなるグリシン繰り返し配列タンパク質としては、具体的には例えば、配列番号９２で示されるアミノ酸配列を有する、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα１のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド（ＨｓＴｙｐｅＩα１Ｎ６０Ｃ１５）前駆体、配列番号９３で示されるアミノ酸配列を有する、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα２のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド（ＨｓＴｙｐｅＩα２Ｎ６０－Ｃ１５）前駆体、配列番号９４で示されるアミノ酸配列を有する、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα１のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド（ＨｓＴｙｐｅＩα１Ｎ２７－Ｍ５２２－Ｃ１５）前駆体、配列番号９５で示されるアミノ酸配列を有する、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα２のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド（ＨｓＴｙｐｅＩα２Ｎ２７－Ｍ５２２－Ｃ１５）前駆体、配列番号９６で示されるアミノ酸配列を有する、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα１のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド（ＨｓＴｙｐｅＩα１Ｎ２７－Ｍ５２２Ｘ２－Ｃ１５）前駆体、配列番号９７で示されるアミノ酸配列を有する、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα２のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド（ＨｓＴｙｐｅＩα２Ｎ２７－Ｍ５２２ｘ２－Ｃ１５）前駆体を挙げることができる。

【００２４】

本発明形質転換体の作製に用いるグリシン繰り返し配列タンパク質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドとしては、具体的には例えば、配列番号９８で示される前記ヒトＴｙｐｅＩα１コラーゲン前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号９９で示される前記ヒトＴｙｐｅＩα１コラーゲン前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号１００で示される前記ヒトＴｙｐｅＩα２コラーゲン前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポ

リヌクレオチド、配列番号１０１で示される前記ヒトＴｙｐｅＩα２コラーゲン前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号１０２で示される前記ヒトＴｙｐｅＩＩα１コラーゲン前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号１０３で示される前記ヒトＴｙｐｅＩＩα１コラーゲン前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号１０４で示される前記ヒトＴｙｐｅＩＩＩα１コラーゲン前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号１０５で示される前記ヒトＴｙｐｅＩＩＩα１コラーゲン前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを挙げることができ、より好ましくは、配列番号９８で示される前記ヒトＴｙｐｅＩα１コラーゲン前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号１００で示される前記ヒトＴｙｐｅＩα２コラーゲン前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号１０２で示される前記ヒトＴｙｐｅＩＩα１コラーゲン前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号１０４で示される前記ヒトＴｙｐｅＩＩＩα１コラーゲン前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。また、これらのポリヌクレオチドの塩基配列の一部の塩基の欠失、置換又は付加が導入されてなるポリヌクレオチド、部分的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、さらに、これらのポリヌクレオチドの塩基配列と相同性を有する塩基配列を有するポリヌクレオチド、例えば、異種生物由来のオーソログ遺伝子に由来する塩基配列を有するポリヌクレオチドであっても良い。

【００２５】

ヒトＴｙｐｅＩα１のオーソログ遺伝子に由来する塩基配列としてはイヌＴｙｐｅＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００１００３０９０）、チンパンジーＴｙｐｅＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿００１１６９３２０）、ウシＴｙｐｅＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００１０３４０３９）、ラットＴｙｐｅＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿２１３４４０）、マウスＴｙｐｅＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００７７４２）、ヒトＴｙｐｅＩα２のオーソログ遺伝子に由来する塩基配列としてはイヌＴｙｐｅＩα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００１００３１８７）、チンパンジーＴｙｐｅＩα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿５１９２０７）、ウシＴｙｐｅＩα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿１７４５２０）、ラットＴｙｐｅＩα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿０５３３５６）、マウスＴｙｐｅＩα２（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００７７４３）、ヒトＴｙｐｅＩＩα１のオーソログ遺伝子に由来する塩基配列としてはイヌＴｙｐｅＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００１００６９５１）、チンパンジーＴｙｐｅＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿５０９０２６）、ラットＴｙｐｅＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿０１２９２９）、マウスＴｙｐｅＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿０３１１６３）、ニワトリＴｙｐｅＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿２０４４２６）、ヒトＴｙｐｅＩＩＩα１のオーソログ遺伝子に由来する塩基配列としては、イヌＴｙｐｅＩＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿８４５９１６）、チンパンジーＴｙｐｅＩＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿００１１６３６６５）、ウシＴｙｐｅＩＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００１０７６８３１）、ラットＴｙｐｅＩＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿０３２０８５）、マウスＴｙｐｅＩＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿００９９３０）、ニワトリＴｙｐｅＩＩＩα１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿４２１８４７）を挙げることができる。さらに、これらの塩基配列を有するポリヌクレオチドの塩基配列の一部の塩基が欠失、置換又は付加が導入されてなるポリヌクレオチド、部分的な塩基配列を有するポリヌクレオチドであってもよい。

【００２６】

また、前記コラーゲンの部分的な領域からなるグリシン繰り返し配列タンパク質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドとしては、具体的には例えば、配列番号１０６

で示されるＨｓＴｙｐｅＩα１Ｎ６０Ｃ１５前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号１０７で示されるＨｓＴｙｐｅＩα２Ｎ６０－Ｃ１５前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号１０８で示されるＨｓＴｙｐｅＩα１Ｎ２７－Ｍ５２２－Ｃ１５前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号１０９で示されるＨｓＴｙｐｅＩα２Ｎ２７－Ｍ５２２－Ｃ１５前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号１１０で示されるＨｓＴｙｐｅＩα１Ｎ２７－Ｍ５２２Ｘ２－Ｃ１５前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号１１１で示されるＨｓＴｙｐｅＩα２Ｎ２７－Ｍ５２２ｘ２－Ｃ１５前駆体のアミノ酸配列をコードする塩基配列有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

【００２７】

前記の「本発明形質転換体」は、更に「リジン水酸化酵素」のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドが追加的に導入されて得られるもの、即ち、下記（１）～（４）のすべてのタンパク質を産生する形質転換体であってもよい。

（１）シクロスポリンＡに結合性を有するシクロフィリン系タンパク質

（２）プロリン水酸化酵素

（３）下記の特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質

（４）リジン水酸化酵素

＜特性（Ａ）＞

グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖が、連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列を有する。

＜特性（Ｂ）＞

グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖の連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列にイミノ酸（具体的には例えば、プロリン又はヒドロキシプロリン）が含まれている。

このような形質転換体は、アミノ酸配列中のリジン残基が水酸化されたグリシン繰り返し配列タンパク質を効率よく産生する能力を有している。勿論、このような形質転換体は、線維形性能が高く、かつ、安定性の高いグリシン繰り返し配列タンパク質を産生することができる。具体的には例えば、上記（１）～（４）のすべてのタンパク質を産生する形質転換体では、Ｇｌｙ－Ｘａａ－Ｙａａ繰り返し配列のＹａａに位置する全リジン残基のうち２０％以上が水酸化されているグリシン繰り返し配列タンパク質を産生することができ、好ましくは全リジン残基のうち４０％以上が水酸化されているグリシン繰り返し配列タンパク質を産生することができる。

リジン残基が水酸化されたグリシン繰り返し配列タンパク質は、線維形性能が高く、かつ、３重螺旋構造がより安定化されたグリシン繰り返し配列タンパク質であり、このため、医薬品、工業製品、化粧品、食品等として商業的に一層価値がある高性能な多用途素材となるようなグリシン繰り返し配列タンパク質ということができる。

【００２８】

本発明における「リジン水酸化酵素」としては、例えば、リジルヒドロキシラーゼ１、リジルヒドロキシラーゼ３等を挙げることができる。

また、「リジン水酸化酵素」の由来は特に限定されないが、例えば、高等動物由来であることが好ましく、ヒト由来であることが更に好ましい。

リジルヒドロキシラーゼ１、及び、リジルヒドロキシラーゼ３は、ホモダイマーを形成する酵素であり、グリシン繰り返し配列タンパク質の螺旋構造部分に存在するＧｌｙ－Ｘａａ－Ｙａａ繰り返し配列のＹａａに位置するリジンのδ位を水酸化する。

前記リジン水酸化酵素としては、具体的には例えば、配列番号１１３で示されるアミノ酸配列を有するヒトリジルヒドロキシラーゼ（ＬＨ１）、配列番号１１５で示されるアミノ酸配列を有するヒトリジルヒドロキシラーゼ３（ＬＨ３）を挙げることができる。さらに、これらのアミノ酸配列においてアミノ酸の欠失、置換又は付加がなされたタンパク質、また、これらのアミノ酸配列と相同性を有するタンパク質、例えば、異種生物由来のオ

ーソログに由来するアミノ酸配列を有するタンパク質であっても良い。ヒトＬＨ１のオーソログ遺伝子に由来するアミノ酸配列としては、イヌＬＨ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿８６５４７０）、チンパンジーＬＨ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿００１１４２９３７）、ウシＬＨ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿７７６５７３）、ラットＬＨ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿４４６２７９）、マウスＬＨ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿０３５２５２）、ニワトリＬＨ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿００１００５６１８）、ヒトＬＨ３のオーソログ遺伝子に由来するアミノ酸配列としては、イヌＬＨ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿８５８４１３）、チンパンジーＬＨ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿００１１５３９７９）、ウシＬＨ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿８８７２５４）、ラットＬＨ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿８３５２０２）、マウスＬＨ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿０３６０９２）等を挙げることができる。さらに、これらのオーソログのアミノ酸配列においてアミノ酸の欠失、置換又は付加がなされたリジン水酸化酵素であってもよい。

【００２９】

本発明形質転換体の作製に用いることができる「リジン水酸化酵素」のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドとしては、例えば、リジルヒドロキシラーゼ１（ＬＨ１）をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、及び、リジルヒドロキシラーゼ３（ＬＨ３）をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。前記リジルヒドロキシラーゼ１をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドとしては、具体的には例えば、配列番号１１４で示されるヒトＬＨ１のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号１１６で示されるヒトＬＨ３のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。また、これらのポリヌクレオチドの塩基配列の一部の塩基に欠失、置換又は付加が導入されてなるポリヌクレオチド、部分的な塩基配列を有するポリヌクレオチド、さらに、これらのポリヌクレオチドの塩基配列と相同性を有する塩基配列を有するポリヌクレオチド、例えば、異種生物由来のオーソログに由来する塩基配列を有するポリヌクレオチドであっても良い。ヒトＬＨ１のオーソログに由来する塩基配列としては、イヌＰＬＯＤ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿８６０３７７）、チンパンジーＰＬＯＤ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿００１１４２９３７）、ウシＰＬＯＤ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿１７４１４８）、ラットＰＬＯＤ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿０５３８２７）、マウスＰＬＯＤ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿０１１１２２）、ニワトリＰＬＯＤ１（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００１００５６１８）、ヒトＬＨ３のオーソログ遺伝子に由来する塩基配列としては、イヌＰＬＯＤ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿８５３３２０）、チンパンジーＰＬＯＤ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿００１１５３９７９）、ウシＰＬＯＤ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿８８２１６１）、ラットＰＬＯＤ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿１７８１０１）、マウスＰＬＯＤ３（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿０１１９６２）等を挙げることができる。さらに、これらのオーソログに由来する塩基配列を有する遺伝子の塩基配列の一部の塩基が欠失、置換又は付加が導入されてなる遺伝子、部分的な塩基配列を有する遺伝子であってもよい。

【００３０】

尚、前記のリジン水酸化酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドは、例えば、酵母由来のプロモーター、具体的には例えば、アルコールオキシダーゼ１プロモーター等の下流に連結されていることが好ましい。

【００３１】

前記の「本発明形質転換体」は、更に「Ｈｓｐ４７」のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドが追加的に導入されて得られるもの、即ち、下記（１）～（３）、及び、（５）のすべてのタンパク質を産生する形質転換体であってもよい。

（１）シクロスポリンＡに結合性を有するシクロフィリン系タンパク質

（２）プロリン水酸化酵素
（３）下記の特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質
（５）Ｈｓｐ４７
＜特性（Ａ）＞
グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖が、連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列を有する。
＜特性（Ｂ）＞
グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖の連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列にイミノ酸（具体的には例えば、プロリン又はヒドロキシプロリン）が含まれている。

このような形質転換体は、中性糖含有量がより少ない中性糖修飾後タンパク質を効率よく製造する能力を有している。勿論、このような酵母は、中性糖由来のグリシン繰り返し配列タンパク質が有する親水性に係る物性の変化を低下させ、より親油性の高い、本来グリシン繰り返し配列タンパク質が有する性質に近いグリシン繰り返し配列タンパク質を産生することができる。このようなグリシン繰り返し配列タンパク質は、３重螺旋構造がより安定化されたグリシン繰り返し配列タンパク質であり、このため、医薬品、工業製品、化粧品、食品等として商業的に一層価値がある高性能な多用途素材となるようなグリシン繰り返し配列タンパク質ということができる。

【００３２】

「Ｈｓｐ４７」はヒートショックプロテイン４７（Heat shock protein 47）と一般的に呼ばれている、小胞体内腔に局在するストレス応答タンパク質である。

本発明における「Ｈｓｐ４７」としては、その由来は特に限定されないが、例えば、高等動物由来であることが好ましく、ヒト由来であることが更に好ましい。具体的には例えば、配列番号１１７で示されるアミノ酸配列を有するヒトＨｓｐ４７を挙げることができる。また、これらのアミノ酸配列にアミノ酸配列の欠失、置換又は付加がなされたタンパク質、これらのアミノ酸配列と相同性を有するタンパク質、例えば、異種生物由来のオーソログに由来するアミノ酸配列を有するタンパク質であっても良い。ヒトＨｓｐ４７のオーソログに由来するアミノ酸配列としては、イヌＨｓｐ４７（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿５４２３０５）、チンパンジーＨｓｐ４７（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＰ＿００１１７４９７９）、ウシＨｓｐ４７（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿００１０３９５２８）、ラットＨｓｐ４７（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿０５８８６９）、マウスＨｓｐ４７（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿０３３９５５）、ニワトリＨｓｐ４７（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＰ＿９９０６２２）等を挙げることができる。さらに、これらのオーソログのアミノ酸配列にアミノ酸配列の欠失、置換又は付加がなされたタンパク質であってもよい。

【００３３】

本発明形質転換体の作製に用いることができる「Ｈｓｐ４７」のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドとしては、具体的には例えば、配列番号１１８で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド等を挙げることができる。このようなＨｓｐ４７ポリヌクレオチドは、その塩基配列の一部の塩基の欠失、置換又は付加が人為的に導入されてなる遺伝子であってもよく、また、Ｈｓｐ４７のアミノ酸配列に欠失、置換又は付加がなされたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドであってもよい。また、これらのポリヌクレオチドと相同性を有するポリヌクレオチド、例えば、異種生物由来のオーソログに由来する塩基配列を有するポリヌクレオチドであっても良い。ヒトＨｓｐ４７のオーソログに由来する塩基配列としてはイヌＨｓｐ４７（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿５４２３０５）、チンパンジーＨｓｐ４７（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＸＭ＿００１１７４９７９）、ウシＨｓｐ４７（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００１０４６０６３）、ラットＨｓｐ４７（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿０１７１７３）、マウスＨｓｐ４７（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿００９８２５）、ニワトリＨｓｐ４７（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ、ＮＭ＿２０５２

９１）等を挙げることができる。さらに、これらのオーソログに由来する塩基配列を有するポリヌクレオチドの塩基配列の一部の塩基が欠失、置換又は付加が導入されてなるポリヌクレオチド、部分的な塩基配列を有するポリヌクレオチドであってもよい。

【００３４】

尚、前記のＨｓｐ４７のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドは、例えば、酵母由来のプロモーター、具体的には例えば、アルコールオキシダーゼ１プロモーター等の下流に連結されていることが好ましい。

【００３５】

本発明形質転換体は、下記（１）～（３）のタンパク質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを、宿主細胞に導入することで作製することができる。前記ポリヌクレオチドはｃＤＮＡのクローニング、化学合成オリゴヌクレオチドを用いたアッセンブリＰＣＲ、遺伝子工学的な手法により作製することができる。また、市販のｃＤＮＡ等のクローンを入手して用いることもできる。

（１）シクロスポリンＡに結合性を有するシクロフィリン系タンパク質

（２）プロリン水酸化酵素

（３）下記の特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質

＜特性（Ａ）＞

グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖が、連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列を有する。

＜特性（Ｂ）＞

グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖の連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列にイミノ酸（具体的には例えば、プロリン又はヒドロキシプロリン）が含まれている。

【００３６】

前記ポリヌクレオチドを、例えば、細胞内で前記ポリヌクレオチドを効率的に発現させる機能を有するプロモーター、ターミネーター、シグナル配列等と連結して発現カセットとし、構築した発現カセットを宿主細胞に導入することで前記ポリヌクレオチドを効率的に発現する形質転換体を作製することができる。

前記発現カセットは、通常の遺伝子工学的手法を用いて、前記ポリヌクレオチドをプロモーターの下流、ターミネーターの上流に連結し、必要に応じてアミノ末端のシグナル配列を置き換えることで構築することができる。

前記発現カセットの構築に利用される宿主・ベクター系としては、特に限定されないが、例えば、宿主として細菌（例えば、Escherichia属、Bacillus属、Pseudomonas属）、ベクターとしてバクテリオファージ、プラスミド又はコスミドを用いる宿主・ベクター系、又は、宿主として酵母（例えば、Saccharomyces属）、ベクターとしてエピソーム性プラスミド、ＡＲＳ－ＣＥＮ型プラスミドを用いる宿主・ベクター系等を挙げることができ、好ましくは、宿主としてEschericha属、ベクターとしてプラスミドを挙げることができる。

【００３７】

前記プロモーターとしては、本発明形質転換体の作製に用いる宿主の細胞内で機能するプロモーターであれば特に限定はないが、特定の栄養源、基質によりその転写活性が誘導される誘導型プロモーターを好適に用いることができる。

前記プロモーターとしては、具体的には例えば、ガラクトース代謝酵素遺伝子（ＧＡＬ１、ＧＡＬ１０）、抑制性酸性フォスファターゼ遺伝子（ＰＨＯ５）、グリセリンアルデヒド３リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（ＴＤ）、フォスフォグリセリン酸キナーゼ遺伝子（ＰＧＫ）、アルコールオキシダーゼ遺伝子（ＡＤＨ１、ＡＯＸ１、ＡＯＸ２、ＭＯＸ、ＡＯＤ１）、ギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（ＦＤＨ１、ＦＭＤ１）、ジヒドロキシアセトンシンターゼ遺伝子（ＤＡＳ）、ペルオキシソーム膜タンパク質合成遺伝子（ＰＥＲ３）、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子（ＦＬＤ１）等の遺伝子のプロモーターを挙げることができる。また、前記ターミネーターとしては、本発明形質転換体を作製するた

めに用いる宿主の細胞内で機能するターミネーターであれば有効に利用できるが、例えば、アルコールオキシダーゼ遺伝子（ＡＯＸ１）、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＦＬＤ１）のターミネーターを挙げることができる。また、前記シグナル配列としては、例えば、酵母αファクターのプレプロ配列、酵母インベルターゼのシグナル配列、酵母酸性フォスファターゼのシグナル配列等を挙げることができる。

【００３８】

本発明形質転換体は、前記ポリヌクレオチドを有するプラスミドを用いて宿主の細胞を形質転換することで調製できる。発現カセットとなった前記ポリヌクレオチドを有するプラスミドを用いることで、前記ポリヌクレオチドを効率的に発現する形質転換体を作製することができる。

本発明形質転換体の作製に用いる宿主・ベクター系としては、例えば、宿主として細菌（例えば、Escherichia属、Bacillus属、Pseudomonas属）、ベクターとしては、バクテリオファージ、プラスミド又はコスミドを用いる宿主・ベクター系、宿主としては、酵母（例えば、Saccharomyces属）、ベクターとしては、エピソーム性プラスミド、ＡＲＳ－ＣＥＮ型プラスミドを用いる宿主・ベクター系、宿主としては、酵母（例えば、Komagataella属、Saccharomyces属、Hansenula属、Pichia属、Candida属、Ogataea属）、ベクターとしては、染色体組み込み型プラスミドを用いる宿主・ベクター系、宿主としては、糸状菌（Aspergillus属、Trichoderma属）、ベクターとしては、染色体組み込み型プラスミドを用いる宿主・ベクター系を挙げることができ、好ましくは、宿主としては、真核微生物（酵母、糸状菌）を挙げることができる。

【００３９】

さらに、本発明形質転換体の作製に用いる宿主としては、より好ましくは、酵母を挙げることができ、例えば、サッカロマイセス・セルビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、コマガタエラ・パストリス（Komagataella pastoris）、ハンゼヌラ・ポリモルファ（Hansenula polymorpha）、ピキア・メタノリカ（Pichia methanolica）、カンジダ・ボイディニ（Candida Boidini）、オガタエア・ミヌタ（Ogataea minuta）を挙げることができる。サッカロマイセス・セルビシエ（Saccharomyces cerevisiae）を宿主とする場合には、ベクターとしては、染色体組み込み型プラスミド（ＹＩｐ型）、酵母内在性プラスミド２μｍ ＤＮＡ複製開始領域を有するプラスミド（ＹＥｐ型）、及び、染色体由来の自己複製領域を有するプラスミド（ＹＣｐ型）を挙げることができ、これらのプラスミドに大腸菌で複製可能な複製起点が組み込まれてシャトルベクターとなったプラスミドを用いることで、前記ポリヌクレオチドが組み込まれたプラスミドを容易に構築することができる。また、コマガタエラ・パストリス（Komagataella pastoris）、ハンゼヌラ・ポリモルファ（Hansenula polymorpha）、ピキア・メタノリカ（Pichia methanolica）、カンジダ・ボイディニ（Candida Boidini）、オガタエア・ミヌタ（Ogataea minuta）を宿主とする場合には、ベクターとしては、染色体組み込み型プラスミドを挙げることができ、大腸菌で複製可能な複製起点が組み込まれてシャトルベクターとなったプラスミドを用いることで前記ポリヌクレオチドが組み込まれたプラスミドを容易に構築することができる。さらに好ましくは、メタノール資化性酵母であるコマガタエラ・パストリス（Komagataella pastoris）、ハンゼヌラ・ポリモルファ（Hansenula polymorpha）、ピキア・メタノリカ（Pichia methanolica）、カンジダ・ボイディニ（Candida Boidini）、オガタエア・ミヌタ（Ogataea minuta）を宿主として、染色体組み込み型プラスミドをベクターとして用いることができる。具体的には、コマガタエラ・パストリス（Komagataella pastoris）を宿主として好適に用いることができ、ベクターとしては、ｐＡＯ８１５、ｐＰＩＣ９Ｋ等の市販のプラスミド、また、ベクターの構成要素である相同的組換え領域、マーカー、プロモーター、ターミネーター等を組み込んで作製したプラスミドを好適に用いることができる。

【００４０】

染色体組み込み型のプラスミドは、プラスミド上に宿主の染色体の塩基配列と相同な塩基配列を有する相同的組換え領域を有しており、この領域で宿主の染色体上に組み込まれ

るため、宿主の細胞内で安定的に保持される。相同的組換え領域としては、特に限定されないが、例えば、アミノ酸合成系遺伝子、核酸合成系遺伝子、ribosome ＤＮＡ、Ｔｙ因子（Transposon of Yeast element）等を挙げることができる。また、マーカーとしては、宿主の細胞内に導入されることにより形質の変化を引き起こす遺伝子を挙げることができ、例えば、アミノ酸合成系遺伝子、核酸合成系遺伝子、抗生物質耐性遺伝子等を挙げることができる。具体的には、前記アミノ酸合成系遺伝子としては、例えば、ＬＥＵ２、ＨＩＳ４、ＡＲＧ４、ＴＲＰ１、前記核酸合成系遺伝子としては、例えば、ＵＲＡ３、ＡＤＥ２等を挙げることができる。また、抗生物質耐性遺伝子としては、例えば、ゼオシン、ブラストサイジンＳ、ジェネティシン、Ｇ４１８、クロラムフェニコール、ブレオマイシン等の抗生物質に対して耐性を付与する遺伝子を挙げることができる。また、前記アミノ酸合成系遺伝子、前記核酸合成系遺伝子は、アミノ酸合成系遺伝子、核酸合成系遺伝子等が欠損している宿主と組み合わせて宿主の欠損変異を補完することにより、形質転換体を選抜するマーカーとして使用することができる。また、染色体組み込み型のプラスミドが宿主の染色体に組み込まれた形質転換体を選抜するための目印としてマーカーを用いることができる。

【００４１】

前記ポリヌクレオチドが組み込まれたプラスミドを宿主の細胞内に導入する方法としては、特に限定はないが、宿主として細菌（例えば、Escherichia属、Bacillus属、Pseudomonas属）を用いる場合には、例えば、塩化カルシウム法、スフェロプラスト法、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法等を挙げることができる。宿主として酵母（例えば、Komagataella属、Saccharomyces属、Hansenula属、Candida属、Ogataea属）を用いる場合には、例えば、リチウム法、スフェロプラスト法、エレクトロポレーション法等を挙げることができる。宿主として糸状菌（Aspergillus属、Trichoderma属）を用いる場合には、プロトプラスト－ＰＥＧ法、プロトプラスト－エレクトロポレーション法等を挙げることができる。

【００４２】

本発明形質転換体は、下記（１）～（３）の全てのタンパク質をその細胞内で産生することで特徴づけられる。

（１）シクロスポリンＡに結合性を有するシクロフィリン系タンパク質

（２）プロリン水酸化酵素

（３）下記の特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質

＜特性（Ａ）＞

グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖が、連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列を有する。

＜特性（Ｂ）＞

グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖の連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列にイミノ酸（具体的には例えば、プロリン又はヒドロキシプロリン）が含まれている。

【００４３】

本発明形質転換体を、通常の微生物学的手法に従って培養することで上記（１）～（３）の全てのタンパク質を産生させることができる。本発明形質転換体の培養に用いられる培地は、当該技術分野で既知の培地を用いることができ、培養は通常の微生物学的手法に準じた方法により実施できる。

前記培地としては、特に限定されず、合成培地及び天然培地のいずれの培地でも用いることができるが、例えば、前記合成培地として、炭素源（例えば、各種糖類、グリセロール、メタノール）、窒素源（例えば、尿素、アンモニア水、アンモニウム塩又は硝酸塩）の他、無機塩（例えば、Ｍｇ、Ｃａ、Ｆｅ、Ｎａ、Ｋ、Ｍｎ、Ｃｏ、Ｍｏ、Ｂ、Ｚｎ、Ｉ又はＣｕ等の無機塩）、微量栄養素（例えば、各種ビタミン、各種アミノ酸、又はヌクレオチド）等を含有するものを用いることができる。また、前記天然培地としては、培地成分として、前記合成培地の成分に加えて、例えば、イーストエキストラクト、ペプトン、

カゼイン等を含有する培地を用いることができる。さらに、本発明形質転換体の作製に用いた前記発現カセットに誘導型プロモーターが用いられている場合には、誘導型プロモーターを活性化する栄養源、基質等（例えば、ガラクトース、ラクトース、シュクロース、メタノール、ＩＰＴＧ等）を培地に添加することでプロモーターを活性化することができる。

【００４４】

本発明形質転換体がメタノール資化性酵母である場合は、メタノール含有培地を用いることで効率的に上記（１）～（３）の全てのタンパク質を産生させることができる。具体的には、MM培地（１．３４％Ｙｅａｓｔ Ｎｉｔｒｏｇｅｎ Ｂａｓｅ、４ｘ１０$^{-5}$％ビオチン、０．５％メタノール）、ＢMM培地（１００mMリン酸カリウム緩衝液ｐＨ６．０、１．３４％Ｙｅａｓｔ Ｎｉｔｒｏｇｅｎ Ｂａｓｅ、４ｘ１０$^{-5}$％ビオチン、０．５％メタノール）、ＢａｓａｌＳａｌｔ培地（Ｐｉｃｈｉａ Ｐｒｏｔｏｃｏｌ、ＩＳＢＮ：０－８９６０３－４２１－６ Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ）、ＦＭ２２培地（Ｐｉｃｈｉａ Ｐｒｏｔｏｃｏｌ、ＩＳＢＮ：０－８９６０３－４２１－６ Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ）等を用いることができる。培地のｐＨは、中性若しくは弱塩基性、又は、弱酸性、具体的にはｐＨ３～８に調製した培地を用いることができ、より好ましくはｐＨ４～７に調製した培地を用いることができる。

【００４５】

培養形式は液体培養が好ましく、培養温度は１５℃～４０℃であることが好ましい。培養時間は１～１０００時間であることが好ましく、また、培養は振盪、又は、攪拌条件下で実施することが好ましく、空気、酸素の通気下において実施することができる。また、培養操作法としては回分培養法、半回分培養法又は連続培養法により実施することが好ましく、また、培養期間中に、必要に応じて、高濃度の培地成分を流加することができる。

尚、必要に応じて、前記培養（本培養）に先立って前培養を行うことができる。前培養用の培地としては、特に限定されないが、例えば、ＹＮＢ培地（０．６７％Ｙｅａｓｔ Ｎｉｔｒｏｇｅｎ Ｂａｓｅ、４ｘ１０$^{-5}$％ビオチン、２％グルコース）、ＹＰＤ培地（１％イーストエキストラクト、２％ペプトン、２％グルコース）、ＢＭＧＹ培地（１％イーストエキストラクト、２％ペプトン、１００mMリン酸カリウム緩衝液ｐＨ６．０、１．３４％Ｙｅａｓｔ Ｎｉｔｒｏｇｅｎ Ｂａｓｅ、４ｘ１０$^{-5}$％ビオチン、１％メタノール）等を用いることができる。前培養の培養条件は特に限定されないが、培養時間は１０～１００時間、培養温度は１５℃～４０℃であることが好ましい。前培養は振盪、又は、攪拌条件下で実施することが好ましく、空気、酸素の通気下において実施することがでる。また、培養操作法としては回分培養法が好ましい。

【００４６】

上記（１）～（３）の全てのタンパク質の産生は、通常の生化学的手法及びタンパク質工学な手法により検出することができ、例えば、イムノアッセイによる方法を用いることができる。具体的には、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、及び、イムノビーズ捕捉アッセイ、ウェスタンブロッティング等を用いることができ、好ましくは、ウェスタンブロッティングを用いることができる。

【００４７】

本発明は、本発明形質転換体が産生して得られうることを特徴とするグリシン繰り返し配列タンパク質（本発明タンパク質）を含む。本発明形質転換体を用いることにより中性糖含量が少ない、グリシン繰り返し配列タンパク質が得られうる。また、本発明タンパク質は医薬品、工業製品、化粧品、食品等として商業的に一層価値がある（具体的には例えば、中性糖由来のグリシン繰り返し配列タンパク質が有する親水性に係る物性の変化を低下させ、より親油性の高い、本来グリシン繰り返し配列タンパク質が有する性質に近い）高性能な多用途素材である。

【００４８】

グリシン繰り返し配列タンパク質に含まれる、中性糖の定量は、通常の生化学的な手法により行うことができる。具体的には、フェノール硫酸法、液体クロマトグラフィーによ

る単糖組成分析等を行うことで中性糖を定量することができる。
また、グリシン繰り返し配列タンパク質の線維形成能は、例えば、以下のような方法により測定することができる。具体的には例えば、精製したグリシン繰り返し配列タンパク質を、塩濃度１×Ｄ－ＰＢＳ（－）、ｐＨ７．３～７．４に再調整した後、３７℃に保温することにより、グリシン繰り返し配列タンパク質分子が再配向して溶液が白濁する。当該白濁現象をグリシン繰り返し配列タンパク質の線維形成能とみなすことができる。従って、当該性質を利用して、濃度０．０５％のグリシン繰り返し配列タンパク質溶液を、塩濃度１×Ｄ－ＰＢＳ（－）、ｐＨ７．３～７．４で３７℃に保温し、そのときの吸光度を経時的に測定することにより、線維形成能を測定することができる。

【００４９】

本発明は、微生物細胞内に、下記（１）～（３）の全てのタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを導入する第一工程、
第一工程により得られる形質転換体を培養することによりグリシン繰り返し配列タンパク質を産生させる第二工程、
第二工程で産生されたグリシン繰り返し配列タンパク質を回収する第三工程、
を含むことを特徴とするグリシン繰り返し配列タンパク質の取得方法（本発明取得方法）を含む。
（１）シクロスポリンＡに結合性を有するシクロフィリン系タンパク質
（２）プロリン水酸化酵素
（３）下記の特性（Ａ）及び（Ｂ）を有するグリシン繰り返し配列タンパク質
＜特性（Ａ）＞
グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖が、連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列を有する。
＜特性（Ｂ）＞
グリシン繰り返し配列タンパク質におけるポリペプチド鎖の連続するGly-Xaa-Yaaの繰り返し配列にイミノ酸（具体的には例えば、プロリン又はヒドロキシプロリン）が含まれている。

【００５０】

第一工程は前記本発明形質転換体について記載した方法で実施することができる。第二工程は前記本発明形質転換体を用いて上記（１）～（３）のタンパク質を産生させる方法と同様の方法で実施することができる。
第三工程は、通常の生化学的手法に従って実施することができる。具体的には、第二工程で産生されたグリシン繰り返し配列タンパク質を、菌体、培養液上清から精製することで実施することができる。

【００５１】

前記精製を実施する方法としては、特に限定されないが、例えば、破砕・可溶化する工程と、分画・純化する工程を組み合わせることで実施することができる。具体的には、破砕・可溶化する工程には、例えば、超音波、ガラスビーズなどで物理的に破砕する方法、酵素、酸、アルカリ、界面活性剤等を用いて可溶化する方法、有機溶媒、バッファー等による溶媒抽出法等を用いることができる。また、分画・純化する工程には、例えば、塩析、溶媒沈殿、等電点沈殿等による沈殿形成法、イオン交換、ゲル濾過、疎水相互作用、アフィニティ等のカラムクロマトグラフィー、限外濾過、凍結乾燥、結晶化、透析等の方法を用いることができる。より具体的には、例えば、下記の（ａ）～（ｅ）の工程を有する方法を用いることができる。
（ａ）ガラスビーズを用いて菌体を破砕する工程、
（ｂ）得られた破砕液にタンパク質分解酵素を添加してタンパク質を分解する工程、
（ｃ）分解された破砕液を遠心分離することにより、上清を回収する工程、
（ｄ）回収された上清を種々のｐＨ条件下で塩析して純化する工程、
（ｅ）塩析により回収された沈殿を溶解して脱塩・除粒子する工程、

【００５２】

本発明取得方法により取得されたグリシン繰り返し配列タンパク質は、医薬品、工業製品、化粧品、食品等として商業的に一層価値がある高性能な（具体的には例えば、中性糖由来のグリシン繰り返し配列タンパク質が有する親水性に係る物性の変化を低下させ、より親油性の高い、本来グリシン繰り返し配列タンパク質が有する性質に近い）多用途素材である。このようなグリシン繰り返し配列タンパク質は、例えば、免疫学上での低抗原性誘導という潜在的な可能性からも好まれるであろう。

【実施例】

【００５３】

以下、実施例を挙げてさらに詳細に本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

遺伝子のクローニング、プラスミドの構築の方法は「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」（1989），Cold Spring Harbor Laboratory Press，ISBN 0-87969-309-6、「Current Protocols in Molecular Biology」(1987)，John Wiley & Sons，Inc．ISBN 0-471-50338-X等に記載されている方法を参考として引用できる。以下に、クローニング等の工程の詳細を説明する。

【００５４】

実施例１　（クローニング）

【００５５】

（１－１）　ヒスチジノールデヒドロゲナーゼをコードするＤＮＡのクローニング（pHIS4-TOPOの構築）

下記オリゴヌクレオチド１及び２を合成した。アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）より市販のコマガタエラ　パストリス（Komagataella pastoris）　NRRL Y-11430（ATCC76273）を購入した。下記オリゴヌクレオチド１及び２をプライマーとし、ATCC76273のゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ（HIS4）をコードするＤＮＡを増幅した。尚、前記ゲノムＤＮＡはGenomic-tip 100/G（QIAGEN）及びGenomic DNA Buffer Set（QIAGEN）を用いて調製した。

(a)オリゴヌクレオチド１：GATCTCCTGATGACTGACTCACTGATAATA（配列番号１）

(b)オリゴヌクレオチド２：TAATTAAATAAGTCCCAGTTTCTCCATACG（配列番号２）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)ゲノムＤＮＡ溶液（１５ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(c)10×AccuPrime Pfx reaction mix（Invitrogen）　・・・５μｌ

(d)AccuPrime Pfx DNA polymerase（２．５Ｕ／μｌ、Invitrogen）　・・・０．５μｌ

(e)滅菌蒸留水　・・・４０．５μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９５℃にて２分間加熱した後、９５℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて２．５分間の伸長反応からなるサイクルを３５回行い、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約２．６ｋｂのＤＮＡをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。前記約２．６ｋｂのDNAをpCR-BluntII-TOPOプラスミド（Invitrogen）の「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（One Shot TOP10F’ Chemically Competent E.coli、Invitorgen）を形質転換した。尚、プラスミドへのクローニングにはZero-Blunt TOPO PCR cloning キット（Invitrogen）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からHIS4をコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pHIS4-TOPOと記すこともある。）を精製することにより、pHIS4-TOPOを得た。

【００５６】
（１－２）　アルギノスクシネートリアーゼをコードするＤＮＡのクローニング（pARG4-TOPOの構築）
下記オリゴヌクレオチド３及び４を合成した。下記オリゴヌクレオチド３及び４をプライマーとし、ATCC76273（実施例１（１－１）参照）のゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、アルギノスクシネートリアーゼ（ARG4）をコードするＤＮＡを増幅した。尚、前記ゲノムＤＮＡはGenomic-tip 100/G（QIAGEN）及びGenomic DNA Buffer Set（QIAGEN）を用いて調製した。
(a)オリゴヌクレオチド３：ACGAAAATATGGTACCTGCCCTCAC（配列番号３）
(b)オリゴヌクレオチド４：GTTCTATCTACCCGAGGAAACCGATACATA（配列番号４）
反応溶液の組成を以下に示す。
(a)ゲノムＤＮＡ溶液（１５ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ
(b)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(c)10×AccuPrime Pfx reaction mix（Invitrogen）　・・・５μｌ
(d)AccuPrime Pfx DNA polymerase（２．５Ｕ／μｌ、Invitrogen）　・・・０．５μｌ
(e)滅菌蒸留水　・・・４０．５μｌ
ＰＣＲは反応溶液を９５℃にて２分間加熱した後、９５℃にて１５秒間の変性反応、６５℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて２．５分間の伸長反応からなるサイクルを３５回行い、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。
前記ＰＣＲの結果得られた約２．２ｋｂのＤＮＡをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。前記約２．２ｋｂのDNAをpCR-BluntII-TOPOプラスミド（Invitrogen）の「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（One Shot TOP10F’ Chemically Competent E.coli、Invitrogen）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはZero-Blunt TOPO PCR cloning キット（Invitrogen）を用いた。
５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からARG4をコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pARG4-TOPOと記すこともある。）を精製することにより、pARG4-TOPOを得た。
【００５７】
（１－３）　アルコールデヒドロゲナーゼ１プロモーターのクローニング（pAOX1Pro+15aa-TOPOの構築）
下記オリゴヌクレオチド５及び６を合成した。下記オリゴヌクレオチド５及び６をプライマーとし、ATCC76273（実施例１（１－１）参照）のゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、アルコールデヒドロゲナーゼ１（AOX1）のプロモーターを増幅した。尚、前記ゲノムＤＮＡはGenomic-tip 100/G（QIAGEN）及びGenomic DNA Buffer Set（QIAGEN）を用いて調製した。
(a)オリゴヌクレオチド５：AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTT（配列番号５）
(b)オリゴヌクレオチド６：ATCCACCACCTAGAACTAGGATATCAAAC（配列番号６）
反応溶液の組成を以下に示す。
(a)ゲノムＤＮＡ溶液（１５ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ
(b)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(c)10×AccuPrime Pfx reaction mix（Invitrogen）　・・・５μｌ
(d)AccuPrime Pfx DNA polymerase（２．５Ｕ／μｌ、Invitrogen）　・・・０．５μｌ
(e)滅菌蒸留水　・・・４０．５μｌ
ＰＣＲは反応溶液を９５℃にて２分間加熱した後、９５℃にて１５秒間の変性反応、６２℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて１分間の伸長反応からなるサイ

クルを３５回行い、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。
前記ＰＣＲの結果得られた約１．０ｋｂのＤＮＡをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。前記約１．０ｋｂのDNAを、pCR-BluntII-TOPOプラスミド（Invitrogen）の「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（One Shot TOP10 F’ Chemically Competent E.coli、Invitrogen）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはZero-Blunt TOPO PCR cloning（Invitrogen）キットを用いた。
５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からAOX1プロモーターが挿入されたプラスミド（以下、pAOX1Pro+15aa-TOPOと記すこともある。）を精製することにより、pAOX1Pro+15aa-TOPOを得た。

【００５８】

（１－４）　ペルオキシソームマトリクスタンパク質プロモーターのクローニング（pCR-BII-PER3 Pro SacII-Psp1406Ⅰ(+)の構築）

下記オリゴヌクレオチド７及び８を合成した。下記オリゴヌクレオチド７及び８をプライマーとし、ATCC76273（実施例１（１－１）参照）のゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、ペルオキシソームマトリクスタンパク質（PER3）のプロモーターを増幅した。尚、前記ゲノムＤＮＡはGenomic-tip 100/G（QIAGEN）及びGenomic DNA Buffer Set（QIAGEN）を用いて調製した。

(a)オリゴヌクレオチド７：CTAAGGGTCTCACTGGTGTTTCAGC（配列番号７）
(b)オリゴヌクレオチド８：AGTTCCTTGCAACTGTAGTGGTCG（配列番号８）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)ゲノムＤＮＡ溶液（１５ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ
(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ
(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ
(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ（１Ｕ）
(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて70秒間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを３０回行い、その後、更に反応溶液を６８℃にて70秒間保持する条件で行った。
前記ＰＣＲの結果得られた約１．１ｋｂのＤＮＡをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。前記約１．１ｋｂのDNAを、pCR-BluntII-TOPOプラスミド（Invitrogen）の「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応には、Zero-Blunt TOPO PCR cloning キット（Invitrogen）を用いた。
５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からPER3プロモーターが挿入されたプラスミド（以下、pCR-BII-PER3 Pro(+)と記すこともある。）を精製することにより、pCR-BII-PER3 Pro(+)を得た。
下記オリゴヌクレオチド９及び１０を合成した。下記オリゴヌクレオチド９及び１０をプライマーとし、ｐCR-BII-PER3 Pro(+)プラスミドを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、PER3プロモーターの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド９：AACCGCGGCTCGTCACTATCGTCGTTG（配列番号９）

(b)オリゴヌクレオチド１０：CGAACGTTACCTGAAGATAGGTAAAAAAAAATTGC（配列番号１０）
反応溶液の組成を以下に示す。
(a)プラスミドＤＮＡ溶液（１ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ
(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ
(c)ＭｇＳＯ$_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ
(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ（１Ｕ）
(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ
ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて１分間の伸長反応からなるサイクルを５回行い、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて１分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２０回行い、その後、更に反応溶液を６８℃にて１分間保持する条件で行った。
前記ＰＣＲの結果得られた約１．０ｋｂのＤＮＡをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。前記約１．０ｋｂのDNAを、pCR-BluntII-TOPOプラスミド（Invitrogen）の「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはZero-Blunt TOPO PCR cloning キット（Invitrogen）を用いた。
５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からPER3プロモーターが挿入されたプラスミド（以下、pCR-BII-PER3 Pro SacII-Psp1406I(+)と記すこともある。）を精製することにより、pCR-BII-PER3 Pro SacII-Psp1406I(+)を得た。
【００５９】
（１－５）　アルコールデヒドロゲナーゼ２プロモーターのクローニング（pCR-BII-AOX2 Pro SacII-Psp1406I(-)の構築）
下記オリゴヌクレオチド１１及び１２を合成した。下記オリゴヌクレオチド１１及び１２をプライマーとし、ATCC76273（実施例１（１－１）参照）のゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、アルコールデヒドロゲナーゼ２（AOX2）のプロモーターの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを増幅した。尚、前記ゲノムＤＮＡはGenomic-tip 100/G（QIAGEN）及びGenomic DNA Buffer Set（QIAGEN）を用いて調製した。
(a)オリゴヌクレオチド１１：AACCGCGGCTAGTAGAACTTTGACATCTGCTA（配列番号１１）
(b)オリゴヌクレオチド１２：CGAACGTTTTGATTTGTTTGTGGGGATTTAG（配列番号１２）
反応溶液の組成を以下に示す。
(a)ゲノムＤＮＡ溶液（１５ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ
(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ
(c)ＭｇＳＯ$_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ
(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ（１Ｕ）
(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ
ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて７０秒間の伸長反応からなるサイクルを５回、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて７０秒間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを３０回行い、その後、更に反応溶液を６８℃にて７０秒間保持する条件で行った。
前記ＰＣＲの結果得られた約１．１ｋｂのＤＮＡをアガロースゲル電気泳動により分離

し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。前記約１．１ｋｂのDNAを、pCR-BluntII-TOPOプラスミド（Invitrogen）の「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはZero-Blunt TOPO PCR cloning キット（Invitrogen）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からAOX2プロモーターが挿入されたプラスミド（以下、pCR-BII-AOX2 Pro SacII-Psp1406I(-)と記すこともある。）を精製することにより、pCR-BII-AOX2 Pro SacII-Psp1406I(-)を得た。

【００６０】

（１－６）　ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼプロモーターのクローニング（pCR-BII-FLD1 Pro SacII-Psp1406I(-)の構築）

下記オリゴヌクレオチド１３及び１４を合成した。下記オリゴヌクレオチド１３及び１４をプライマーとし、ATCC76273（実施例１（１－１）参照）のゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ（FLD1）のプロモーターを増幅した。尚、前記ゲノムＤＮＡはGenomic-tip 100/G（QIAGEN）及びGenomic DNA Buffer Set（QIAGEN）を用いて調製した。

(a)オリゴヌクレオチド１３：GCAGTGTTGGCTAACGTCTATTCG（配列番号１３）
(b)オリゴヌクレオチド１４：ACTTCATGGGCTCTTGGAGGAAG（配列番号１４）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)ゲノムＤＮＡ溶液（１５ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ
(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ
(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ
(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ（１Ｕ）
(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて70秒間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを３０回行い、その後、更に反応溶液を６８℃にて70秒間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約１．３ｋｂのＤＮＡをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。前記約１．３ｋｂのDNAを、pCR-BluntII-TOPOプラスミド（Invitrogen）の「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応には、Zero-Blunt TOPO PCR cloning キット（Invitrogen）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からFLD1プロモーターが挿入されたプラスミド（以下、pCR-BII-FLD1 Pro(+)と記すこともある。）を精製することにより、pCR-BII-FLD1 Pro(+)を得た。

下記オリゴヌクレオチド１５及び１６を合成した。下記オリゴヌクレオチド１５及び１６をプライマーとし、pCR-BII-FLD1 Pro(+)プラスミドを鋳型としてＰＣＲを行い、FLD１プロモーターの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド１５：AACCGCGGCCTGAATACCGTAACATAGTGAC（配列番号１５）
(b)オリゴヌクレオチド１６：CGAACGTTTCAAGAATTGTATGAACAAGCAAAG（配列番号１６）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)プラスミドＤＮＡ溶液（１ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ
(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ
(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ
(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ（１Ｕ）
(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて１分間の伸長反応からなるサイクルを５回行い、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて１分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２０回行い、その後、更に反応溶液を６８℃にて１分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約０．９ｋｂのＤＮＡをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。前記約０．９ｋｂのDNAを、pCR-BluntII-TOPOプラスミド（Invitrogen）の「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはZero-Blunt TOPO PCR cloning キット（Invitrogen）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からFLD1プロモーターが挿入されたプラスミド（以下、pCR-BII-FLD1 Pro SacII-Psp1406I(-)と記すこともある。）を精製することにより、pCR-BII-FLD1 Pro SacII-Psp1406I(-)を得た。

【００６１】

（１－７）　アルコールデヒドロゲナーゼ１ターミネーターのクローニング（pAOX1 term-TOPOの構築）

下記オリゴヌクレオチド１７及び１８を合成した。下記オリゴヌクレオチド１７及び１８をプライマーとし、ATCC76273（実施例１（１－１）参照）のゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、アルコールデヒドロゲナーゼ１（AOX1）のターミネーターを増幅した。尚、前記ゲノムＤＮＡはGenomic-tip 100/G（QIAGEN）及びGenomic DNA Buffer Set（QIAGEN）を用いて調製した。

(a)オリゴヌクレオチド１７：CCTTAGACATGACTGTTCCTCAGTTC（配列番号１７）
(b)オリゴヌクレオチド１８：GCACAAACGAACGTCTCACTTAAT（配列番号１８）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)ゲノムＤＮＡ溶液（１５ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ
(b)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(c)10×AccuPrime Pfx reaction mix（Invitrogen）　・・・５μｌ
(d)AccuPrime Pfx DNA polymerase（２．５Ｕ／μｌ、Invitrogen）　・・・０．５μｌ
(e)滅菌蒸留水　・・・４０．５μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９５℃にて２分間加熱した後、９５℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて３０秒間の伸長反応からなるサイクルを３５回行い、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約０．３ｋｂのＤＮＡをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。前記約０．３ｋｂのDNAを、pCR-BluntII-TOPOプラスミド（Invitrogen）の「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（One Shot TOP10 F’ Chemically Cometent E.coli、Invitrogen）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはZero-Blunt TOPO PCR cloning キット（Invitrogen）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌

を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からAOX1ターミネーターが挿入されたプラスミド（以下、pAOX1 term-TOPOと記すこともある。）を精製することにより、pAOX1 term-TOPOを得た。

【００６２】

（１－８）　アルコールデヒドロゲナーゼ１遺伝子の３’側下流ノンコーディング領域のクローニング（pAOX1-3'-TOPOの構築）

下記オリゴヌクレオチド１９及び２０を合成した。下記オリゴヌクレオチド１９及び２０をプライマーとし、ATCC76273（実施例１（１－１）参照）のゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、アルコールデヒドロゲナーゼ１（AOX1）遺伝子の３’側下流ノンコーディング領域を増幅した。尚、前記ゲノムＤＮＡはGenomic-tip 100/G（QIAGEN）及びGenomic DNA Buffer Set（QIAGEN）を用いて調製した。

(a)オリゴヌクレオチド１９：TCGAGTATCTATGATTGGAAGTATGGGAAT（配列番号１９）

(b)オリゴヌクレオチド２０：GATCTTGAGATAAATTTCACGTTTAAAATC（配列番号２０）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)ゲノムＤＮＡ溶液（１５ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(c)10×AccuPrime Pfx reaction mix（Invitrogen）　・・・５μｌ

(d)AccuPrime Pfx DNA polymerase（２．５Ｕ／μｌ、Invitrogen）　・・・０．５μｌ

(e)滅菌蒸留水　・・・４０．５μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９５℃にて２分間加熱した後、９５℃にて１５秒間の変性反応、５８℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて５０秒間の伸長反応からなるサイクルを３５回行い、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約０．８ｋｂのＤＮＡをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。前記約０．８ｋｂのDNAを、pCR-BluntII-TOPOプラスミド（Invitrogen）の「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（One Shot TOP10 F’ Chemically Competent E.coli、Invitrogen）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはZero-Blunt TOPO PCR cloning キット（Invitrogen）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からＡＯＸ１　３’側下流ノンコーディング領域が挿入されたプラスミド（以下、pAOX1-3'-TOPOと記すこともある。）を精製することにより、pAOX1-3'-TOPOを得た。

【００６３】

（１－９）　αファクターをコードするＤＮＡのクローニング（pαfactor-TOPOの構築）

下記オリゴヌクレオチド２１及びオリゴヌクレオチド２２を合成した。製品評価技術基盤機構（NITE）より市販のサッカロマイセス　セルビシエ（Saccharomyces　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）　S288C（NBRC1136）を購入した。下記オリゴヌクレオチド２１及び２２をプライマーとし、NBRC1136のゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、αファクターをコードするＤＮＡを増幅した。尚、前記ゲノムＤＮＡはGenomic-tip 100/G（QIAGEN）及びGenomic DNA Buffer Set（QIAGEN）を用いて調製した。

(a)オリゴヌクレオチド２１：TCAAACAAGAAGATTACAAACTATCAATTTCA（配列番号２１）

(b)オリゴヌクレオチド２２：GTACGAGCTAAAAGTACAGTGGGAACAAA（配列番号２２）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)ゲノムＤＮＡ溶液（１５ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ（１Ｕ）
(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ
ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて３分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて１分間の伸長反応からなるサイクルを１０回、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて１分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２５回行い、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。
前記ＰＣＲの結果得られた約０．６ｋｂのＤＮＡをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。前記約０．６ｋｂのDNAを、pCR-BluntII-TOPOプラスミド（Invitrogen）の「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（One Shot TOP10 F’ Chemically Cometent E.coli、Invitrogen）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはZero-Blunt TOPO PCR cloning キット（Invitrogen）を用いた。
５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からαファクターをコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pα factor-TOPOと記すこともある。）を精製することにより、pα factor-TOPOを得た。
【００６４】
（１－１０）　ヒトコラーゲンTypeIα1をコードするＤＮＡのクローニング（pBlue-HsCOL1A1の構築）
下記オリゴヌクレオチド２３及び２４を合成した。Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ（東洋紡）を用いてオリゴヌクレオチドの５’末端にリン酸基を付加した後、下記オリゴヌクレオチド２３及び２４をプライマーとし、Human brain cDNA（東洋紡）を鋳型としてＰＣＲを行うことにより、ヒトコラーゲンTypeIα1をコードするＤＮＡを増幅した。
(a)オリゴヌクレオチド２３：CAGCCACAAAGAGTCTACATGTCTAGG（配列番号２３）
(b)オリゴヌクレオチド２４：AGGTTGGGATGGAGGGAGTT（配列番号２４）
反応溶液の組成を以下に示す。
(a)ｃＤＮＡ溶液　・・・５μｌ
(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ
(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ
(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD -plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ
(g)滅菌蒸留水　・・・２９μｌ
ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９８℃にて２０秒間の変性反応、５８℃にて１０秒間のアニーリング反応、及び、７４℃にて５分間の伸長反応からなる反応サイクルを３５回行った。
前記ＰＣＲの結果得られた約４．５ｋｂのＤＮＡをMagExtractor PCR&Gel cleanup（東洋紡）を用いて精製した。
pBluescriptII KS(+)プラスミド（Stratagene）を制限酵素EcoRVにて切断し、アルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸化した後MagExtractor PCR&Gel cleanup（東洋紡）を用いて精製した。
前記約４．５ｋｂのＤＮＡ及び前記プラスミドをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation high（東洋紡）を用いた。
５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌

を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、MagExtractor plasmid （東洋紡）を用いて、培養菌体からヒトコラーゲンTypeIα1をコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pBlue-HsCOL1A1と記すこともある。）を精製することによりpBlue-HsCOL1A1を得た。

【００６５】

（１－１１）　ヒトコラーゲンTypeIα2をコードするＤＮＡのクローニング（pUC18-HsCOL1A2の構築）

Human Neonatal Dermal Fibroblasts由来のTotal RNAをCell Applications, Incより入手した。ReverTra Plus（東洋紡）を用いcDNAを合成した。下記オリゴヌクレオチド２５及び２６を合成した。下記オリゴヌクレオチド２５及び２６をプライマーとし、前記cDNAを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、ヒトコラーゲンTypeIα2をコードするＤＮＡを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド２５：GCCAAGCTTGCATGCTCAGCTTTGTGGATACGCGGAC（配列番号２５）
(b)オリゴヌクレオチド２６：CGGTACCCGGGGATCCTTATTTGAAACAGACTGGGCCAATGTCC（配列番号２６）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)ｃＤＮＡ溶液　・・・５μｌ
(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ
(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ
(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD -plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ
(g)滅菌蒸留水　・・・２９μｌ

ＰＣＲは反応溶液を94℃にて２分間加熱した後、９８℃にて１０秒間の変性反応、６８℃にて６分間のアニーリング及び伸長反応からなる反応サイクルを３０回行った。増幅された約４．１ｋｂのＤＮＡをアガロースゲル電気泳動で分離した後、MagExtractor PCR&Gel cleanup（東洋紡）を用いてゲルから抽出・精製した。得られたDNAを制限酵素SphI及びBamHIで切断した後、MagExtractor PCR&Gel cleanup（東洋紡）を用いて精製した。

pUC18プラスミド（東洋紡）を制限酵素SphI及びBamHIで切断した後、MagExtractor PCR&Gel cleanup（東洋紡）を用いて精製した。

前記約４．１ｋｂのＤＮＡ及び前記プラスミドをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation high（東洋紡）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、MagExtractor plasmid （東洋紡）を用いて、培養菌体からヒトコラーゲンTypeIα2をコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pUC18-HsCOL1A2と記すこともある。）を精製することによりpUC18-HsCOL1A2を得た。

【００６６】

（１－１２）　ヒトコラーゲンTypeIIIα1をコードするＤＮＡのクローニング（pUC19-HsCOL3A1の構築）

下記オリゴヌクレオチド２７及び２８を合成した。Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ（東洋紡）を用いてオリゴヌクレオチドの５’末端にリン酸基を付加した後、下記オリゴヌクレオチド２７及び２８をプライマーとし、Human brain cDNA（東洋紡）を鋳型としてＰＣＲを行うことにより、ヒトコラーゲンTypeIIIα1をコードするＤＮＡを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド２７：GGCTGAGTTTTATGACGGGC（配列番号２７）
(b)オリゴヌクレオチド２８：GACAAGATTAGAACAAGAGG（配列番号２８）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)ｃＤＮＡ溶液　・・・５μｌ
(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ
(c)ＭｇＳＯ$_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ
(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD -plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ
(g)滅菌蒸留水　・・・２９μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９８℃にて２０秒間の変性反応、５８℃にて１０秒間のアニーリング反応、及び、７４℃にて５分間の伸長反応からなる反応サイクルを３５回行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約４．６ｋｂのＤＮＡをMagExtractor PCR&Gel cleanup（東洋紡）を用いて精製した。

pUC19プラスミド（東洋紡）を制限酵素SmaIにて切断しMagExtractor PCR&Gel cleanup（東洋紡）を用いて精製した後、アルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸化し、再度、MagExtractor PCR&Gel cleanup（東洋紡）を用いて精製した。

前記約４．６ｋｂのＤＮＡ及び前記プラスミドをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation high（東洋紡）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、MagExtractor plasmid （東洋紡）を用いて、培養菌体からヒトコラーゲンTypeIα1をコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、当該プラスミドをpUC19-HsCOL3A1と記すこともある。）を精製することにより、pUC19-HsCOL3A1を得た。

【００６７】

（１－１３）　ゼオシン耐性カセットの作製及びクローニング（pUC57-ZeoRの構築）

配列番号１１２で示したゼオシン耐性カセットを、アッセンブリPCR法で作製した。作製したDNAをpUC57プラスミドのEcoRＶサイトにクローニングした。当該プラスミドをpUC57-ZeoRと記す。

【００６８】

（１－１４）　約２４ｋＤａのシクロスポリンＡ結合タンパク質をコードする合成DNAの作製及びクローニング（pUC57-YCyPBの構築）

配列番号１１３で示した約２４ｋＤａのシクロスポリンＡ結合タンパク質（シクロフィリンＢ）をコードするDNAを、アッセンブリPCR法で作製した。作製した合成DNAをpUC57プラスミドのEcoRＶサイトにクローニングした。当該プラスミドをpUC57-YCyPBと記す。

【００６９】

（１－１５）　約２３ｋＤａのシクロスポリンＡ結合タンパク質をコードする合成DNAの作製及びクローニング（pUC57-YCyPCの構築）

配列番号７８で示した約２３ｋＤａのシクロスポリンＡ結合タンパク質（シクロフィリンＣ）をコードするDNAを、アッセンブリPCR法で作製した。作製した合成DNAをpUC57プラスミドのEcoRＶサイトにクローニングした。当該プラスミドをpUC57-YCyPCと記す。

【００７０】

（１－１６）　ヒトTypeIα1コラーゲンをコードする合成DNAの作製及びクローニング（pUC57-YHsCOL1A1の構築）

配列番号９８で示したヒトTypeIα1コラーゲンをコードする合成DNAを、アッセンブリPCR法で作製した。作製した合成DNAをpUC57プラスミドのEcoRＶサイトにクローニングした。当該プラスミドをpUC57-YHsCOL1A1と記す。

【００７１】

（１－１７）　ヒトTypeIα2コラーゲンをコードする合成DNAの作製及びクローニング（pUC57-YHsCOL1A2の構築）

配列番号１００で示したヒトTypeIα2コラーゲンをコードする合成DNAを、アッセンブリPCR法で作製した。作製した合成DNAをpUC57プラスミドのEcoRVサイトにクローニングした。当該プラスミドをpUC57-YHsCOL1A2と記す。

【００７２】

（１－１８）　ヒトTypeIIα1コラーゲンをコードする合成DNAの作製及びクローニング（pUC57-YHsCOL2A1の構築）

配列番号１０２で示したヒトTypeIIα1コラーゲンをコードする合成DNAを、アッセンブリPCR法で作製した。作製した合成DNAをpUC57プラスミドのEcoRVサイトにクローニングした。当該プラスミドをpUC57-YHsCOL2A1と記す。

【００７３】

実施例２　（発現カセット導入プラスミドの構築）

（２－１）　プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット（Ｐ４Ｈα１）発現カセット、及び、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット（Ｐ４Ｈβ）発現カセット導入プラスミド（pEXP-A-P4HBsig(-)A1rev）の作製

【００７４】

（２－１－１）　pSN003の構築

下記オリゴヌクレオチド２９及び３０を合成した。下記オリゴヌクレオチド２９及び３０をプライマーとし、ｐAOX1Term－TOPO（実施例（１－７）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、AOX１ターミネーターの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド２９：TCGACTAGTTTAGACATGACTGTTCCTCAGTTCAA（配列番号２９）

(b)オリゴヌクレオチド３０：AACTGCAGGCACAAACGAACGTCTCACTTA（配列番号３０）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)プラスミドＤＮＡ溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ

(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ（１Ｕ）

(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて１分間の伸長反応からなるサイクルを２５回行い、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約０．３ｋｂのＤＮＡを制限酵素SpeI及びPstIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pBluescriptII SK(+)プラスミド（Stratagene）を制限酵素SpeI及びPstIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約０．３ｋｂのＤＮＡ及び前記プラスミドをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からAOX1ターミネーターの両端に制限酵素認識配列が付加されたＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pSN003と記すこともある。）を精製することにより、pSN003を得た。

【００７５】

（２－１－２）　pSN004の構築

pAOX1Pro+15aa-TOPO（実施例（１－３）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52Iにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、AOX1プロモーターを含む約１．０ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pSN003（実施例（２－１－１）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52Iにて切断しアルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸化したのち、MinElute Reaction Cleanup Kit（QIAGEN）を用いて精製した。

前記約１．０ｋｂのＤＮＡ及び前記プラスミドをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からAOX1プロモーターを含む約１．０ｋｂのＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pSN004と記すこともある。）を精製することにより、pSN004を得た。

【００７６】

（２－１－３）　pSN005の構築

オリゴヌクレオチド３１及び３２を合成した。

(a)オリゴヌクレオチド３１：TATTCGAAACGCATATGTGACCGGCAGACTAGTGG（配列番号３１）

(b)オリゴヌクレオチド３２：CCACTAGTCTGCCGGTCACATATGGGTTTCGAATA（配列番号３２）

下記組成の溶液を調製し、当該溶液を９８℃で５分間、５０℃にて５０分間、３７℃にて１時間保持した。

(a)オリゴヌクレオチド３１（５０ｐｍｏｌ／μｌ）　５μｌ
(b)オリゴヌクレオチド３２（５０ｐｍｏｌ／μｌ）　５μｌ
(c)Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（１００ｍＭ）　１０μｌ
(d)$MgCl_2$　（１００ｍＭ）　１０μｌ
(e)ジチオスレイトール（１０ｍＭ）　１０μｌ
(f)滅菌蒸留水　６０μｌ

前記オリゴヌクレオチド３１とオリゴヌクレオチド３２とがアニールしたＤＮＡを、制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断した。その後、前記混合溶液をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（２５：２４：１）にて抽出し、次いでエタノール沈殿を行うことによって、ＤＮＡ（リンカー１）を精製した。

また、pSN004（実施例（２－１－２）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて約４．３ｋｂのＤＮＡを分離・精製した。

前記ＤＮＡ（リンカー１）及び約４．３ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からＤＮＡ（リンカー１）が挿入されたプラスミド（以下、pSN005と記すこともある。）を精製することにより、pSN005を得た。

【００７７】

（２－１－４）　pSN015の構築

下記オリゴヌクレオチド３３及び３４を合成した。下記オリゴヌクレオチド３３及び３４をプライマーとし、pαfactor-TOPO（実施例（１－９）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、αファクター遺伝子のシグナル配列及びプロ配列をコードするDNAの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド３３：GGTTCGAAACGATGAGATTTCCTTCAATTTTTACT（配列番号３３）
(b)オリゴヌクレオチド３４：TCGACTAGTAGCTTCAGCCTCTCTTTTATCC（配列番号３４）
反応溶液の組成を以下に示す。
(a)プラスミド溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ
(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ
(c)ＭｇＳＯ$_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ
(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ
(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ
ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて３分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて１分間の伸長反応からなるサイクルを１０回、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて１分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを１５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。
前記ＰＣＲの結果得られた約０．３ｋｂのＤＮＡを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。
pSN005（実施例（２－１－３）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断した後、約４．２ｋｂのDNAをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。
前記約０．３ｋｂのＤＮＡ及び前記約４．２ｋｂのDNAをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。
５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からαファクター遺伝子のシグナル配列及びプロ配列をコードするDNAの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pSN015と記すこともある。）を精製することにより、pSN015を得た。
【００７８】
（２－１－５）　pSN020の構築
ヒトプロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット（P4Hβ）のｃＤＮＡクローン(Clone ID:3848651)をInvitrogenより購入した。下記オリゴヌクレオチド３５及び３６を合成した。下記オリゴヌクレオチド３５及び３６をプライマーとし、P4HβのｃＤＮＡクローンを鋳型としてPCRを行うことにより、シグナル配列のないＰ４Ｈβをコードするの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを増幅した。
(a)オリゴヌクレオチド３５：TTACTAGTGACGCCCCCGAGGAGGA（配列番号３５）
(b)オリゴヌクレオチド３６：TTACTAGTTTACAGTTCATCTTTCACAGCTTTCTG（配列番号３６）
反応溶液の組成を以下に示す。
(a)プラスミド溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ
(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ
(c)ＭｇＳＯ$_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ
(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ
(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ
ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて３分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて２分間の伸長反応からなるサイクルを１０回、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて２分間のアニーリン

グ及び伸長反応からなるサイクルを１５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約１．５ｋｂのＤＮＡを制限酵素SpeIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pSN015（実施例（２－１－４）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素SpeIにて切断しアルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸化した後、MinElute Reaction Cleanup Kit（QIAGEN）を用いて精製した。

前記約１．５ｋｂのＤＮＡ及び前記プラスミドをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high JM109、東洋紡製）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応には、Ligation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からシグナル配列のないP4Hβをコードするの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pSN020と記すこともある。）を精製することにより、pSN020を得た。

【００７９】

（２－１－６）　pP4Hbsig(-)rev-TOPOの構築

下記オリゴヌクレオチド３７及び３８を合成した。下記オリゴヌクレオチド３７及び３８をプライマーとし、pSN020と命名されたプラスミド（実施例（２－１－５）参照）を鋳型としてPCRを行うことにより、αファクターシグナル及びプロ配列を有するプロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニットの発現カセットの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド３７：AACCGCGGTCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAA（配列番号３７）

(b)オリゴヌクレオチド３８：AACCCGGGGCACAAACGAACGTCTCACTTAATCTT（配列番号３８）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)プラスミド溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ

(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ

(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて３分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて３．５分間の伸長反応からなるサイクルを１０回、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて３．５分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを１５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約３．０ｋｂのＤＮＡをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。前記約３．０ｋｂのDNAを、pCR-BluntII-TOPOプラスミド（Invitrogen）の「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high JM109、東洋紡製）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはZero-Blunt TOPO PCR cloning キット（Invitrogen）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からαファクターシグナル及びプロ配列を有するプロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニットの発現カセットの両端に制限酵

素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pP4HBsig(-)rev－TOPOと記すこともある。）を精製することにより、pP4HBsig(-)rev－TOPOを得た。

【００８０】

（２－１－７）　pSN007の構築

オリゴヌクレオチド３９及び４０を合成した。

(a)オリゴヌクレオチド３９：TATTCGAAACGACGCGTGTCAGCTAGCACTAGTGC（配列番号３９）

(b)オリゴヌクレオチド４０：GCACTAGTGCTAGCTGACACGCGTCGTTTCGAATA（配列番号４０）

下記組成の溶液を調製し、当該溶液を９８℃で５分間、５０℃にて５０分間、３７℃にて１時間保持した。

(a)オリゴヌクレオチド３９（５０ｐｍｏｌ／μｌ）　５μｌ

(b)オリゴヌクレオチド４０（５０ｐｍｏｌ／μｌ）　５μｌ

(c)Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（１００ｍＭ）　１０μｌ

(d)$MgCl_2$　（１００ｍＭ）　１０μｌ

(e)ジチオスレイトール（１０ｍＭ）　１０μｌ

(f)滅菌蒸留水　６０μｌ

前記オリゴヌクレオチド３９とオリゴヌクレオチド４０とがアニールしたＤＮＡを、制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断した。その後、前記混合溶液をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（２５：２４：１）にて抽出し、次いでエタノール沈殿を行うことによって、ＤＮＡ（リンカー３）を精製した。

また、pSN004（実施例（２－１－２）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて約４．２ｋｂのＤＮＡを分離・精製した。

前記ＤＮＡ（リンカー３）及び前記４．２ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からＤＮＡ（リンカー３）が挿入されたプラスミド（以下、pSN007と記すこともある。）を精製することにより、pSN007を得た。

【００８１】

（２－１－８）　ｐＳＮ０１７の構築

ヒトプロリル－4－ヒドロキシラーゼα１サブユニット（Ｐ４Ｈα１）のｃＤＮＡクローン(Clone ID:4797051)をInvitrogenより購入した。下記オリゴヌクレオチド４１及び４２を合成した。下記オリゴヌクレオチド４１及び４２をプライマーとし、P4Hα１のｃDNAクローンを鋳型としてPCRを行うことにより、P4Hα1をコードするDNAの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド４１：TATTCGAAACGATGATCTGGTATATATTAATTATA（配列番号４１）

(b)オリゴヌクレオチド４２：TTGCTAGCTCATTCCAATTCTGACAACGTACAAGG（配列番号４２）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)プラスミド溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ

(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ

(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて３分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて２分間の伸長反応からなるサイクルを１０回、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて２分間のアニーリン

グ及び伸長反応からなるサイクルを１５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約１．６ｋｂのＤＮＡを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pSN007（実施例（２－１－７）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断した後、約４．２ｋｂのDNAをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約１．６ｋｂのＤＮＡ及び前記約４．２ｋｂのDNAをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡製）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応には、Ligation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からP4Hα1をコードするDNAの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pSN017と記すこともある。）を精製することにより、pSN017を得た。

【００８２】

（２－１－９）　pP4HA1-SmaI-TOPOの構築

下記オリゴヌクレオチド４３及び３８を合成した。下記オリゴヌクレオチド４３及び３８をプライマーとし、pSN017（実施例（２－１－８）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてPCRを行うことにより、プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセットの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド４３：AACCCGGGTCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAA（配列番号４３）

(b)オリゴヌクレオチド３８：AACCCGGGGCACAAACGAACGTCTCACTTAATCTT（配列番号３８）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)プラスミド溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ

(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ

(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて３分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて３．５分間の伸長反応からなるサイクルを１０回、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて３．５分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを１５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約２．８ｋｂのＤＮＡをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。前記約２．８ｋｂのDNAを、pCR-BluntII-TOPOプラスミド（Invitrogen）の「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high JM109、東洋紡製）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはZero-Blunt TOPO PCR cloning キット（Invitrogen）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からプロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセットの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、と記すこともある。）を精製することにより、pP4HA1-SmaI-TOPOを得た

。

【００８３】

（２－１－１０）　pSN023の構築

下記オリゴヌクレオチド４４及び４５を合成した。下記オリゴヌクレオチド４４及び４５をプライマーとし、pARG4-TOPO（実施例（１－２）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてPCRを行うことにより、ARG4をコードするDNAの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド４４：AACTCGAGACGAAAATATGGTACCTGCCCT（配列番号４４）

(b)オリゴヌクレオチド４５：CCATCGATACAGAGGTATCATCCAATGATTCC（配列番号４５）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)プラスミド溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ

(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ

(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて３分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて２分間の伸長反応からなるサイクルを１０回、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて２分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを１５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約２．２ｋｂのＤＮＡを制限酵素XhoI及びClaＩにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pBluescriptII SK（＋）（Stratagene）プラスミドを制限酵素XhoI及びClaＩにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約２．２ｋｂのＤＮＡ及び前記プラスミドをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡製）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応には、Ligation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からARG4をコードするDNAの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pSN023と記すこともある。）を精製することにより、pSN023を得た。

【００８４】

（２－１－１１）　pEXP-A-P4Hbsig(-)revの構築

pP4Hbsig(-)rev-TOPO（実施例（２－１－６）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素SacII及びCfr9Iにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約３．０ｋｂのαファクターシグナル及びプロ配列を有するプロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニットの発現カセットの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pSN023（実施例（２－１－１０）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素SacI及びCfr9Iにて切断した後、約５．２ｋｂのDNAをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約３．０ｋｂのＤＮＡ及び前記約５．２ｋｂのDNAをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high JM109、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からαファクターシグナル及びプロ配列を有するプロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニットの発現カセットの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-A-P4Hbsig(-)revと記すこともある。）を精製することにより、pEXP-A-P4Hbsig(-)revを得た。

【００８５】

（２－１－１２）　pEXP-A-P4Hbsig(-)A1revの構築

pP4HA1-SmaⅠ-TOPO（実施例（２－１－９）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Cfr9Iにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約２．８ｋｂのプロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセットの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pEXP-A-P4Hbsig(-)rev（実施例（２－１－１１）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Cfr9Iにて切断し、アルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸化した後、MinElute Reaction Cleanup Kit（QIAGEN）を用いて精製した。

前記約３．０ｋｂのＤＮＡ及び前記プラスミドをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high JM109、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からプロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセットの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-A-P4Hbsig(-)A1revと記すこともある。）を精製することにより、pEXP-A-P4Hbsig(-)A1revを得た。

【００８６】

（２－２）　FK506結合タンパク質発現カセット導入プラスミドの作製

【００８７】

（２－２－１）　pTS011の構築

ヒートショックプロテイン４７（Hsp47）のcDNAクローン(Clone ID:3030138)をInvitrogenより購入した。下記オリゴヌクレオチド４６及び４７を合成した。下記オリゴヌクレオチド４６及び４７をプライマーとし、HSP47のｃＤＮＡクローンを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、HSP47をコードするDNAの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド４６：TATTCGAAACGATGCGCTCCCTCCTGCTTCTC（配列番号４６）

(b)オリゴヌクレオチド４７：TTACTAGTTATAACTCGTCTCGCATCTTGTCACC（配列番号４７）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)cDNA溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ

(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ

(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて３分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて１．５分間の伸長反応からなるサイクルを５回、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて１．５分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２０回、その後、更に反応溶液を６８℃にて１．５分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約１．３ｋｂのＤＮＡを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pSN005（実施例（２－１－３）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断した後、約４．２ｋｂのDNAをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約１．３ｋｂのＤＮＡ及び約４．２ｋｂのDNAをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からHSP47をコードするDNAの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pTS011と記すこともある。）を精製することにより、pTS011を得た。

【００８８】

（２－２－２）　pEXP-A-HSP47native signalの構築

pTS011（実施例（２－２－１）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeＩにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約１．３ｋｂのHSP47をコードするDNAの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

ｐEXP-A-P4Hbsig(-)rev（実施例（２－１－１１）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeＩにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により約６．３ｋｂのDNAを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約１．３ｋｂのＤＮＡ及び前記約６．３ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からHSP47をコードするDNAの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-A-HSP47native signalと記すこともある。）を精製することにより、pEXP-A-HSP47native signalを得た。

【００８９】

（２－２－３）　pEXP-A-HSP47native signal ZeoR2revの構築

下記オリゴヌクレオチド４８及び４９を合成した。下記オリゴヌクレオチド４８及び４９をプライマーとし、ｐＵＣ５７－ＺｅｏＲ（実施例（１－１３）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、ゼオシン耐性カセットの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド４８：TTATCGATCCCACACACCATAGCTTCA（配列番号４８）

(b)オリゴヌクレオチド４９：TGATCGATAGCTTGCAAATTAAAGCCTTC（配列番号４９）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)cDNA溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ

(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ

(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて１．５分間の伸長反応からなるサイクルを５回、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて１．５分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２０回、その後、更に反応溶液を６８℃にて１．５分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約１．２ｋｂのＤＮＡを制限酵素ClaIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により約１．２ｋｂのDNAを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pEXP-A-HSP47native signal（実施例（２－２－２）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素ClaIにて切断した後、アルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸化した後、MinElute Reaction Cleanup Kit（QIAGEN）を用いて精製した。

前記約１．２ｋｂのＤＮＡ及び前記プラスミドをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリン及び２５μｇ／ｍｌのゼオシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からゼオシン耐性カセットの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-A-HSP47native signal ZeoR2revと記すこともある。）を精製することにより、pEXP-A-HSP47native signal ZeoR2revを得た。

【００９０】

（２－２－４）　pEXP-A-CyPB ZeoRの構築

pUC57-YCyPB（実施例（１－１４）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約０．７ｋｂのシクロフィリンＢをコードするＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pEXP-A-HSP47native signal ZeoR2rev（実施例（２－２－３）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により約６．４ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約０．７ｋｂのＤＮＡ及び前記約６．４ｋｂのDNAをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からシクロフィリンＢをコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-A-CyPB ZeoRと記すこともある。）を精製することにより、pEXP-A-CyPB ZeoRを得た。

【００９１】

（２－２－５）　pEXP-A-CyPC ZeoRの構築

pUC57-YCyPC（実施例（１－１５）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約０．６ｋｂのシクロフィリンＣをコードするＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pEXP-A-HSP47native signal ZeoR2rev（実施例（２－２－３）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により約６．４ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約０．６ｋｂのＤＮＡ及び前記約６．４ｋｂのDNAをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からシクロフィリンＣをコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-A-CyPC ZeoRと記すこともある。）を精製することにより、pEXP-A-CyPC ZeoRを得た。

【００９２】

（２－２－６）　pEXP-A-PER3 Pro-CyPB ZeoRの構築

pCR-BII-PER3 Pro SacII-Psp1406I(+)（実施例（１－４）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Psp1406I及びSacIIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により約１．０ｋｂのPER3プロモーターの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pEXP-A-CyPB ZeoR（実施例（２－２－４）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSacIIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約７．３ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約１．０ｋｂのＤＮＡ及び前記約７．３ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からPER3プロモーターの両端に制限酵素認識配列が付加されたＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-A-PER3 Pro-CyPB ZeoRと記すこともある。）を精製することにより、pEXP-A-PER3 Pro-CyPB ZeoRを得た。

【００９３】

（２－２－７）　pEXP-A-AOX2 Pro-CyPB ZeoRの構築

pCR-BII-AOX2 Pro SacII-Psp1406I(－)（実施例（１－５）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Psp1406I及びSacIIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により約１．１kbのAOX2プロモーターの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pEXP-A-CyPB ZeoR（実施例（２－２－４）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSacIIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約７．３ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約１．１ｋｂのＤＮＡ及び前記約７．３ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からAOX2プロモーターの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-A-AOX2 Pro-CyPB ZeoRと記すこともある。）を精製することにより、pEXP-A-AOX2 Pro-CyPB ZeoRを得た。

【００９４】

（２－２－８）　pEXP-A-FLD1 Pro-CyPB ZeoRの構築

pCR-BII-FLD1 Pro SacII-Psp1406I(+)（実施例（１－６）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Psp1406I及びSacIIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により約０．９ｋｂのFLD1プロモーターの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを分離し、MinEl

ute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。
pEXP-A-CyPB ZeoR（実施例（２－２－４）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSacIIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約７．３ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。
前記約０．９ｋｂのＤＮＡ及び前記約７．３ｋｂのDNAをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。
５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からＦＬＤ１プロモーターの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-A-FLD１ Pro-CyPB ZeoRを記すこともある。）を精製することにより、pEXP-A-FLD1 Pro-CyPB ZeoRを得た。
【００９５】
（２－３） ヒトコラーゲンTypeIα1発現カセット、及び、ヒトコラーゲンTypeIα2発現カセット導入プラスミド（pEXP-HA-YHsCOL1A2-1A1）の作製
【００９６】
（２－３－１） pSN001の構築
下記オリゴヌクレオチド５０及び５１を合成した。下記オリゴヌクレオチド５０及び５１をプライマーとし、pHIS4-TOPO（実施例（１－１）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてPCRを行うことにより、HIS4の両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを増幅した。
(a)オリゴヌクレオチド５０：GGAAGCTTGATCTCCTGATGACTGACTCACTG（配列番号５０）
(b)オリゴヌクレオチド５１：CCCTGCAGTAATTAAATAAGTCCCAGTTTCTCCA（配列番号５１）
反応溶液の組成を以下に示す。
(a)プラスミド溶液（１０ｎｇ／μｌ） ・・・１μｌ
(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ） ・・・５μｌ
(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ） ・・・２μｌ
(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ） ・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡） ・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡） ・・・１μｌ
(g)滅菌蒸留水 ・・・３３μｌ
ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて３分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて２分間の伸長反応からなるサイクルを５回、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて２分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２０回、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。
前記ＰＣＲの結果得られた約２．６ｋｂのＤＮＡを制限酵素HindIII及びPstIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。
pBluescriptII SK（＋）プラスミド（Stratagene）を制限酵素HindIII及びPstIにて切断した後、約３．０ｋｂのDNAをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。
前記約２．６ｋｂのＤＮＡ及び前記約３．０ｋｂのDNAをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡製）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応には、Ligation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。
５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からHIS4の両端に制限酵素認識配列が付

加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pSN001と記すこともある。）を精製することにより、pSN001を得た。

【００９７】

（２－３－２）　pSN002の構築

下記オリゴヌクレオチド５２及び５３を合成した。下記オリゴヌクレオチド５２及び５３をプライマーとし、pAOX1-３’-TOPO（実施例（１－８）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてPCRを行うことにより、AOX1 ３’側下流ノンコーディング領域の両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド５２：GCATCGATTCGAGTATCTATGATTGGAAGTATGG（配列番号５２）

(b)オリゴヌクレオチド５３：AAGGGCCCGATCTTGAGATAAATTTCACGTTTAAA（配列番号５３）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)プラスミド溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ

(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ

(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて３分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、５５℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて２分間の伸長反応からなるサイクルを５回、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて２分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２０回、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約０．８ｋｂのＤＮＡを制限酵素ClaI及びApaIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pSN001（実施例（２－３－１）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素ClaI及びApaIにて切断した後、約５．６ｋｂのDNAをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約０．８ｋｂのＤＮＡ及び前記約５．６ｋｂのDNAをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡製）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応には、Ligation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からAOX1 ３’側下流ノンコーディング領域の両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pSN002と記すこともある。）を精製することにより、pSN002を得た。

【００９８】

（２－３－３）　pSN006の構築

オリゴヌクレオチド５４及び５５を合成した。

(a)オリゴヌクレオチド５４：TATTCGAAACGCATATGGTACCGGCAGACTAGTGG（配列番号５４）

(b)オリゴヌクレオチド５５：CCACTAGTCGCCTAGGCGACATATGGTTTCGAATA（配列番号５５）

下記組成の溶液を調製し、当該溶液を９８℃で５分間、５０℃にて５０分間、３７℃にて１時間保持した。

(a)オリゴヌクレオチド５４（５０ｐｍｏｌ／μｌ）　５μｌ

(b)オリゴヌクレオチド５５（５０ｐｍｏｌ／μｌ）　５μｌ

(c)Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（１００ｍＭ）　１０μｌ

(d)$MgCl_2$　（１００ｍＭ）　１０μｌ

(e)ジチオスレイトール（１０ｍＭ）　１０μｌ

(f)滅菌蒸留水　６０μｌ

前記オリゴヌクレオチド５４とオリゴヌクレオチド５５とがアニールしたＤＮＡを、制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断した。その後、前記混合溶液をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（２５：２４：１）にて抽出し、次いでエタノール沈殿を行うことによって、ＤＮＡ（リンカー２）を精製した。

また、pSN004（実施例（２－１－２）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて約４．２ｋｂのＤＮＡを分離・精製した。

前記ＤＮＡ（リンカー２）及び前記約４．２ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からＤＮＡ（リンカー２）が挿入されたプラスミド（以下、pSN006と記すこともある。）を精製することにより、pSN006を得た。

【００９９】

（２－３－４）　pEXH002の構築

pSN006（実施例（２－３－３）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52I及びPstIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約１．３ｋｂのAOX1プロモーター及びAOX1ターミネーターを含むＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pSN002（実施例（２－３－１）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52I及びPstIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約６．３ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約１．３ｋｂのＤＮＡ及び前記約６．３ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からAOX1プロモーター及びAOX1ターミネーターを含むＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pEXH002と記すこともある。）を精製することにより、pEXH002を得た。

【０１００】

（２－３－５）　PTS001の構築

pUC57-YHsCOL1A1（実施例（１－１９）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約４．４ｋｂのヒトコラーゲンTypeIα1をコードするＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pSN006（実施例（２－３－３）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約４．２kbのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約４．４ｋｂのＤＮＡ及び前記約４．２ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からヒトコラーゲンTypeIα1をコードす

るＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、PTS001と記すこともある。）を精製することにより、PTS001を得た。

【０１０１】

（２－３－６）　pEXP-HA-YHsCOL1A1の構築

pTS001（実施例（２－３－５）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約５．３ｋｂのAOX1プロモーター、及び、ヒトコラーゲンTypeIα1をコードするＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pEXH002（実施例（２－３－４）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約６．６kbのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約５．３ｋｂのＤＮＡ及び前記約６．６ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からAOX1プロモーター、及び、ヒトコラーゲンTypeIα1をコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-HA-YHsCOL1A1と記すこともある。）を精製することにより、pEXP-HA-YHsCOL1A1を得た。

【０１０２】

（２－３－７）　pTS002の構築

pUC57-YHsCOL1A2（実施例（１－２０）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約４．１ｋｂのヒトコラーゲンTypeIα2をコードするＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pSN006（実施例（２－３－３）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約４．２kbのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約４．１ｋｂのＤＮＡ及び前記約４．２ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からヒトコラーゲンTypeIα2をコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pTS002と記すこともある。）を精製することにより、pTS002を得た。

【０１０３】

（２－３－８）　pYHsCOL1A2 Exp unit-Eco52Iの構築

下記オリゴヌクレオチド５６及び５７を合成した。下記オリゴヌクレオチド５６及び５７をプライマーとし、pTS002（実施例（２－３－７）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、ヒトコラーゲンTypeIα2発現カセットの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド５６：AACGGCCGTCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAA（配列番号５６）

(b)オリゴヌクレオチド５７：AACGGCCGGCACAAACGAACGTCTCACTTAATCTT（配列番号５７）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)プラスミド溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ
(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて３分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて６分間の伸長反応からなるサイクルを５回、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて６分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを１８回、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約５．４ｋｂのＤＮＡをアガロースゲル電気泳動により分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。前記約５．４ｋｂのDNAを、pCR-BluntII-TOPOプラスミド（Invitrogen）の「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡製）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはZero-Blunt TOPO PCR cloning キット（Invitrogen）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からヒトコラーゲンTypeIα2発現カセットの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pYHsCOL1A2 Exp unit-Eco52Iと記すこともある。）を精製することにより、pYHsCOL1A2 Exp unit-Eco52Iを得た。

【０１０４】

（２－３－９）　pEXP-HA-YHsCOL1A2-1A1の構築

pYHsCOL1A2 Exp unit-Eco52I（実施例（２－３－８）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52Iにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約５．４ｋｂのヒトコラーゲンTypeIα2発現カセットの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pEXP-HA-YHsCOL1A1（実施例（２－３－６）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52Iにて切断し、アルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸化した後、MinElute Reaction Cleanup Kit（QIAGEN）を用いて精製した。

前記約５．４ｋｂのＤＮＡ及び前記プラスミドをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からヒトコラーゲンTypeIα2発現カセットの両端に制限酵素認識配列が付加されたDNAが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-HA-YHsCOL1A2-1A1と記すこともある。）を精製することにより、pEXP-HA-YHsCOL1A2-1A1を得た。

【０１０５】

（２－４）　ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット、並びに、ヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット導入プラスミド（pEXP-HA-YHsCOL1A2-1A1 N60C15）の作製

【０１０６】

（２－４－１）　pAT021の構築

下記オリゴヌクレオチド５８及び５９を合成した。下記オリゴヌクレオチド５８及び５９をプライマーとし、pTS001（実施例（２－３－５）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行い、ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域の融合ポリペプチド発現カセット、並びに、ベクタープラスミドを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド５８：CGGCTTACCAGCCTCGC（配列番号５８）

(b)オリゴヌクレオチド５９：GGACCACCAGGGCCGC（配列番号５９）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)cDNA溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)ＭｇＳＯ$_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ

(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ

(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６８℃にて６分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて６分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約５．８ｋｂのＤＮＡをMinElute PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて精製した。得られたDNAの５’末端にＴ４ポリヌクレオチドキナーゼ（タカラバイオ）を用いてリン酸基を付加した後、アガロースゲル電気泳動により約５．８ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約５．８ｋｂのＤＮＡをセルフライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基発現、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセットを有するプラスミド（以下、pAT021と記すこともある。）を精製することにより、pAT021を得た。

【０１０７】

（２－４－２）　pEXP-HA-YHsCOL1A1 N60C15の構築

pAT021（実施例（２－４－１）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約２．５ｋｂのAOX1プロモーター、並びに、ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域の融合ポリペプチドをコードするＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pEXH002（実施例（２－３－４）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約６．６kbのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約２．５ｋｂのＤＮＡ及び前記約６．６ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Sp

in Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からAOX1プロモーター、並びに、ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域の融合ポリペプチドをコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-HA-YHsCOL1A1 N60C15と記すこともある。）を精製することにより、pEXP-HA-YHsCOL1A1 N60C15を得た。

【０１０８】

（２－４－３）　pYHsCOL1A2 N60C15 Exp unit-Eco52Iの構築

下記オリゴヌクレオチド６０及び６１を合成した。下記オリゴヌクレオチド６０及び６１をプライマーとし、pYHsCOL1A2 Exp unit-Eco52I（実施例（２－３－８）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行い、ヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット、並びに、ベクタープラスミドを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド６０：GGGTTTACCTGGGTGGCCG（配列番号６０）

(b)オリゴヌクレオチド６１：GGACCTCCTGGCCCACC（配列番号６１）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)cDNA溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ

(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ

(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６８℃にて６分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて６分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約６．１ｋｂのＤＮＡをMinElute PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて精製した。得られたDNAの５’末端にＴ４ポリヌクレオチドキナーゼ（タカラバイオ）を用いてリン酸基を付加した後、アガロースゲル電気泳動により約６．１ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約６．１ｋｂのＤＮＡをセルフライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセットを有するプラスミド（以下、pYHsCOL1A2 N60C15 Exp unit-Eco52Iと記すこともある。）を精製することにより、pYHsCOL1A2 N60C15 Exp unit-Eco52Iを得た。

【０１０９】

（２－４－４）　pEXP-HA-YHsCOL1A2-1A1 N60C15の構築

pYHsCOL1A2 N60C15 Exp unit-Eco52I（実施例（２－４－３）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52Iにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約２．３ｋｂのヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセットの両端に制限酵素認識配列が付加されたＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pEXH-HA-YHsCOL1A1 N60C15（実施例（２－４－２）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52Iにて切断し、アルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸化した後、MinElute Reaction Cleanup Kit（QIAGEN）を用いて精製した。

前記約２．３ｋｂのＤＮＡ及び前記プラスミドをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域、N末端側ヘリックス領域６０残基、C末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセットの両端に制限酵素認識配列が付加されたＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-HA-YHsCOL1A2-1A1 N60C15と記すこともある。）を精製することにより、pEXP-HA-YHsCOL1A2-1A1 N60C15を得た。

【０１１０】

（２－５）　ヒトコラーゲンＴｙｐｅⅠα１のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット、並びに、ヒトコラーゲンＴｙｐｅⅠα２のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット導入プラスミド（pEXP-HA-YHsCOL1A2-1A1 M500X2）の作製

【０１１１】

（２－５－１）　pAT017の構築

下記オリゴヌクレオチド６２及び６３を合成した。下記オリゴヌクレオチド６２及び６３をプライマーとし、pTS001（実施例（２－３－５）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、ヒトコラーゲンTypeIα1ヘリックス領域の中央５２２残基をコードするDNAを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド６２：GGTCCACAGGGTCCAGGAG（配列番号６２）

(b)オリゴヌクレオチド６３：ATCAGCTCCTGGTGATCCCTTTTC（配列番号６３）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)cDNA溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ

(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ

(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６８℃にて１分４０秒間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて１分４０秒間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約１．６ｋｂのＤＮＡをMinElute PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて精製した。得られたDNAの５’末端にＴ４ポリヌクレオチドキナーゼ（タカラバイオ）を用いてリン酸基を付加した後、アガロースゲル電気泳動により約１．６ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

下記オリゴヌクレオチド５９及び６４を合成した。下記オリゴヌクレオチド５９及び６４をプライマーとし、pTS001（実施例（２－３－５）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、AOX1プロモーター、ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域及びＮ末端側ヘリックス領域２７残基をコードするＤＮＡ、ヒトコラ

ーゲンＴｙｐｅＩα１のＣ末端ノンヘリックス領域及びＣ末端側ヘリックス領域１５残基をコードするＤＮＡ、AOX1ターミネーター、並びに、ベクタープラスミドからなる領域を増幅した。
(a)オリゴヌクレオチド５９：GGACCACCAGGGCCGC（配列番号５９）
(b)オリゴヌクレオチド６４：TGGTGGACCTTGAAAACCCTG（配列番号６４）
反応溶液の組成を以下に示す。
(a)cDNA溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ
(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ
(c)ＭｇＳＯ$_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ
(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ
(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ
ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６８℃にて６分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて６分間保持する条件で行った。
前記ＰＣＲの結果得られた約５．７ｋｂのＤＮＡをMinElute PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて精製した。得られたＤＮＡはアルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸した後、アガロースゲル電気泳動により約５．７ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。
前記約１．６ｋｂのＤＮＡ及び前記約５．７ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。
５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からヒトコラーゲンTypeIα1ヘリックス領域の中央５２２残基をコードするDNAが挿入されたプラスミド（以下、pAT017と記すこともある。）を精製することにより、pAT017を得た。
【０１１２】
（２－５－２）　pAT027の構築
下記オリゴヌクレオチド６５及び６６を合成した。下記オリゴヌクレオチド６５及び６６をプライマーとし、pBlue－HsCOL1A1（実施例（１－１０）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、ヒトコラーゲンTypeIα1ヘリックス領域の中央５２２残基をコードするDNAを増幅した。
(a)オリゴヌクレオチド６５：GGACCCCAGGGCCCCG（配列番号６５）
(b)オリゴヌクレオチド６６：ATCAGCACCAGGGGATCCTTTC（配列番号６６）
反応溶液の組成を以下に示す。
(a)cDNA溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ
(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ
(c)ＭｇＳＯ$_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ
(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ
(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ
ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６８℃にて１分４０秒間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて１分４０秒間保持する条件で行った。
前記ＰＣＲの結果得られた約１．６ｋｂのＤＮＡをMinElute PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて精製した。得られたDNAの５’末端にＴ４ポリヌクレオチドキナーゼ（タ

カラバイオ）を用いてリン酸基を付加した後、アガロースゲル電気泳動により約１．６ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

下記オリゴヌクレオチド６３及び５９を合成した。下記オリゴヌクレオチド６３及び５９をプライマーとし、pAT017（実施例（２－５－１）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、AOX1プロモーター、ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域及びＮ末端側ヘリックス領域２７残基をコードするDNA、ヒトコラーゲンTypeIα1のヘリックス領域の中央５２２残基をコードするDNA、ヒトコラーゲンTypeIα1のC末端ノンヘリックス領域及びC末端側ヘリックス領域１５残基をコードするDNA、AOX1ターミネーター、並びに、ベクタープラスミドからなるＤＮＡを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド６３：ATCAGCTCCTGGTGATCCCTTTTC（配列番号６３）

(b)オリゴヌクレオチド５９：GGACCACCAGGGCCGC（配列番号５９）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)cDNA溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ

(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ

(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６８℃にて７分４０秒間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて７分４０秒間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約７．３ｋｂのＤＮＡをMinElute PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて精製した。得られたDNAはアルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸した後、アガロースゲル電気泳動により約７．３ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約１．６ｋｂのＤＮＡ及び前記約７．３ｋｂのDNAをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からヒトコラーゲンTypeIα1ヘリックス領域の中央５２２残基をコードするDNAが挿入されたプラスミド（以下、pAT027と記すこともある。）を精製することにより、pAT027を得た。

【０１１３】

（２－５－３）　pEXP-HA-HsCOL1A1 M500X2の構築

pAT027（実施例（２－５－２）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約５．６ｋｂのAOX1プロモーター、並びに、ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域の中央５２２残基の２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域の融合ポリペプチドをコードするDNAからなるＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pEXH002（実施例（２－３－４）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約６．６kbのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約５．６ｋｂのＤＮＡ及び前記約６．６ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からAOX1プロモーター、並びに、ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域の中央５２２残基の２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域の融合ポリペプチドをコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-HA-HsCOL1A1 M500X2と記すこともある。）を精製することにより、pEXP-HA-HsCOL1A1 M500X2を得た。

【０１１４】

（２－５－４）　pAT018の構築

下記オリゴヌクレオチド６７及び６８を合成した。下記オリゴヌクレオチド６７及び６８をプライマーとし、pTS002（実施例（２－３－７）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、ヒトコラーゲンTypeIα2ヘリックス領域の中央５２２残基をコードするDNAを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド６７：GGGCCAGTTGGCGCAG（配列番号６７）

(b)オリゴヌクレオチド６８：TGCTTCTCCAGATGGTCCTTTCTC（配列番号６８）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)cDNA溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ

(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ

(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６８℃にて１分４０秒間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて１分４０秒間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約１．６ｋｂのＤＮＡをMinElute PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて精製した。得られたDNAの５’末端にＴ４ポリヌクレオチドキナーゼ（タカラバイオ）を用いてリン酸基を付加した後、アガロースゲル電気泳動により約１．６ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

下記オリゴヌクレオチド６１及び６９を合成した。下記オリゴヌクレオチド６１及び６９をプライマーとし、pTS002（実施例（２－３－７）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、AOX1プロモーター、ヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域及びＮ末端側ヘリックス領域２７残基をコードするDNA、ヒトコラーゲンTypeIα2のＣ末端ノンヘリックス領域及びＣ末端側ヘリックス領域１５残基をコードするDNA、AOX1ターミネーター、並びに、ベクタープラスミドからなるＤＮＡを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド６１：GGACCTCCTGGCCCACC（配列番号６１）

(b)オリゴヌクレオチド６９：TGCGGGTCCTTGGAATC（配列番号６９）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)cDNA溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ

(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ

(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６８℃にて６分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて６分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約５．４ｋｂのＤＮＡをMinElute PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて精製した。得られたDNAはアルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸した後、アガロースゲル電気泳動により約５．４ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約１．６ｋｂのＤＮＡ及び前記約５．４ｋｂのDNAをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からヒトコラーゲンTypeIα2ヘリックス領域の中央５２２残基をコードするDNAが挿入されたプラスミド（以下、pAT018と記すこともある。）を精製することにより、pAT018を得た。

【０１１５】

（２－５－５）　pAT018-Eco52Iの構築

pAT018（実施例（２－５－４）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素AccIII及びPmeＩにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約２．６ｋｂのAOX1プロモーターの3'側領域、ヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域及びＮ末端側ヘリックス領域２７残基をコードするＤＮＡ、並びに、ヒトコラーゲンTypeIα2ヘリックス領域の中央５２２残基をコードするＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pYHsCOL1A2 Exp unit-Eco52I（実施例（２－３－８）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素AccIII及びPmeＩにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約４．９kbのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約２．６ｋｂのＤＮＡ及び前記約４．９ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からAOX1プロモーターの３'側領域、ヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域及びＮ末端側ヘリックス領域２７残基をコードするDNA、並びに、ヒトコラーゲンTypeIα2ヘリックス領域の中央５２２残基をコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pAT018-Eco52Iと記すこともある。）を精製することにより、pAT018-Eco52Iを得た。

【０１１６】

（２－５－６）　pAT028-Eco52Iの構築

下記オリゴヌクレオチド７０及び７１を合成した。下記オリゴヌクレオチド７０及び７１をプライマーとし、pUC18－HsCOL1A２（実施例（１－１１）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、ヒトコラーゲンTypeIα2ヘリックス領域の中央５２２残基をコードするDNAを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド７０：GGCCCTGTTGGTGCTGC（配列番号７０）

(b)オリゴヌクレオチド７１：AGCCTCTCCAGAGGGACCCTT（配列番号７１）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)cDNA溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)ＭｇＳＯ$_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ
(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ
(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６８℃にて１分４０秒間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて１分４０秒間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約１．６ｋｂのＤＮＡをMinElute PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて精製した。得られたDNAの５’末端にＴ４ポリヌクレオチドキナーゼ（タカラバイオ）を用いてリン酸基を付加した後、アガロースゲル電気泳動により約１．６ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

下記オリゴヌクレオチド６８及び６１を合成した。下記オリゴヌクレオチド６８及び６１をプライマーとし、pAT018-Eco52I（実施例（２－５－５）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、AOX1プロモーター、ヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域及びＮ末端側ヘリックス領域２７残基をコードするＤＮＡ、ヒトコラーゲンTypeIα2のヘリックス領域の中央５２２残基をコードするＤＮＡ、ヒトコラーゲンTypeIα2のＣ末端ノンヘリックス領域及びＣ末端側ヘリックス領域１５残基をコードするＤＮＡ、ＡＯＸ１ターミネーター、並びに、ベクタープラスミドからなるＤＮＡを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド６８：TGCTTCTCCAGATGGTCCTTTCTC（配列番号６８）
(b)オリゴヌクレオチド６１：GGACCTCCTGGCCCACC（配列番号６１）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)cDNA溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ
(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ
(c)ＭｇＳＯ$_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ
(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ
(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ
(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ
(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６８℃にて７分４０秒間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２５回、その後、更に反応溶液を６８℃にて７分４０秒間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約７．６ｋｂのＤＮＡをMinElute PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて精製した。得られたDNAはアルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸した後、アガロースゲル電気泳動により約７．３ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約１．６ｋｂのＤＮＡ及び前記約７．６ｋｂのDNAをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からヒトコラーゲンTypeIα2ヘリックス領域の中央５２２残基をコードするDNAが挿入されたプラスミド（以下、pAT028-Eco52Iと記すこともある。）を精製することにより、pAT028-Eco52Iを得た。

【０１１７】

（２－５－７）　pEXP-HA-HsCOL1A2-1A1 M500X2の構築

pAT028-Eco52I（実施例（２－５－６）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52

Iにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約５．６ｋｂのヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域の中央５２２残基の２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドの発現カセットを有するDNAを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pEXP-HA-HsCOL1A1 M500X2（実施例（２－５－３）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52Iにて切断し、アルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸化した後、MinElute Reaction Cleanup Kit（QIAGEN）を用いて精製した。

前記約５．６ｋｂのＤＮＡ及び前記プラスミドをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域の中央５２２残基の２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドの発現カセットを有するＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-HA-HsCOL1A2-1A1 M500X2と記すこともある。）を精製することにより、pEXP-HA-HsCOL1A2-1A1 M500X2を得た。

【０１１８】

（２－６）　ヒトコラーゲンTypeIIIα1発現カセット導入プラスミド（pEXP-HA-HsCOL3A1）の作製

【０１１９】

（２－６－１）　pSN026の構築

下記オリゴヌクレオチド７２及び７３を合成した。下記オリゴヌクレオチド７２及び７３をプライマーとし、pUC19-HsCOL3A1（実施例（１－１２）参照）と命名されたプラスミドを鋳型としてＰＣＲを行うことにより、ヒトTypeIIIα1をコードするＤＮＡの両端に制限酵素認識配列が付加されたＤＮＡを増幅した。

(a)オリゴヌクレオチド７２：TATTCGAAACGATGATGAGCTTTGTGCAAAAGGGG（配列番号７２）

(b)オリゴヌクレオチド７３：TTACTAGTTTATAAAAAGCAAACAGGGCCAACGT（配列番号７３）

反応溶液の組成を以下に示す。

(a)cDNA溶液（１０ｎｇ／μｌ）　・・・１μｌ

(b)ｄＮＴＰ（各２ｍＭ－ｍｉｘ）　・・・５μｌ

(c)$MgSO_4$（２５ｍＭ）　・・・２μｌ

(d)プライマー（１０ｐｍｏｌ／μｌ）　・・・各１．５μｌ

(e)10×PCR buffer for KOD-plus-（東洋紡）　・・・５μｌ

(f)KOD-plus- DNA polymerase（１Ｕ／μｌ、東洋紡）　・・・１μｌ

(g)滅菌蒸留水　・・・３３μｌ

ＰＣＲは反応溶液を９４℃にて２分間加熱した後、９４℃にて１５秒間の変性反応、６０℃にて３０秒間のアニーリング反応、及び、６８℃にて５分間の伸長反応からなるサイクルを５回、９４℃にて１５秒間の変性反応、並びに、６８℃にて５分間のアニーリング及び伸長反応からなるサイクルを２３回、その後、更に反応溶液を６８℃にて５分間保持する条件で行った。

前記ＰＣＲの結果得られた約４．４ｋｂのＤＮＡを制限酵素 BspT104I及びSpeIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により約４．４ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pSN006（実施例（２－３－３）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断した後、アガロースゲル電気泳動により約４．２ｋｂのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約４．４ｋｂのＤＮＡ及び前記約４．２ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、ヒトTypeIIIα1をコードするＤＮＡの両端に制限酵素認識配列が付加されたＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pSN026と記すこともある。）を精製することにより、pSN026を得た。

【０１２０】

（２－６－２）　pEXP-HA-HsCOL3A1の構築

pSN026（実施例（２－６－１）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約５．３ｋｂのAOX1プロモーター、及び、ヒトコラーゲンTypeIIIα1をコードするＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

pEXH002（実施例（２－３－４）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約６．６kbのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製した。

前記約５．３ｋｂのＤＮＡ及び前記約６．６ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換した。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いた。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養した。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養した（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からAOX1プロモーター、及び、ヒトコラーゲンTypeIIIα1をコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-HA-HsCOL3A1と記すこともある。）を精製することにより、pEXP-HA-HsCOL3A1を得た。

【０１２１】

（２－７）　ヒトコラーゲンTypeIIα1発現カセット導入プラスミド（pEXP-HA-YHsCOL2A１）の作製

【０１２２】

（２－７－１）　pIM200の構築

pUC57-YHsCOL2A1（実施例（１－２１）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約４．４ｋｂのヒトコラーゲンTypeIIα1をコードするＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製する。

pSN006（実施例（２－３－３）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素BspT104I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約４．２kbのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製する。

前記約４．４ｋｂのＤＮＡ及び前記約４．２ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換する。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いる。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養する。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養する（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からヒトコラーゲンTypeIIα1をコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pIM200と記すこともある。）を精製することにより、pIM200を得る。

【０１２３】

（２－７－２）　pEXP-HA-YHsCOL2A1の構築

pIM200（実施例（２－７－１）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約５．３ｋｂのAOX1プロモーター、及び、ヒトコラーゲンTypeIIα1をコードするＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製する。

pEXH002（実施例（２－３－４）参照）と命名されたプラスミドを制限酵素Eco52I及びSpeIにて切断し、アガロースゲル電気泳動にて、約６．６kbのＤＮＡを分離し、MinElute Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いてゲルから抽出・精製する。

前記約５．３ｋｂのＤＮＡ及び前記約６．６ｋｂのＤＮＡをライゲーションし、得られたライゲーション液を用いて大腸菌（Competent high DH5α、東洋紡）を形質転換する。尚、前記ライゲーション反応にはLigation Kit ver2.1（タカラバイオ）を用いる。

５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ寒天培地上に、前記形質転換した大腸菌を接種して培養する。寒天培地上に形成されたコロニーを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、振盪培養する（３７℃、１７時間）。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）を用いて、培養菌体からAOX1プロモーター、及び、ヒトコラーゲンTypeIIα1をコードするＤＮＡが挿入されたプラスミド（以下、pEXP-HA-YHsCOL2A1と記すこともある。）を精製することにより、pEXP-HA-YHsCOL2A1を得る。

【０１２４】

実施例３　（発現カセット導入酵母の作製）

（３－１）　プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、及び、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット導入酵母の作製

【０１２５】

（３－１－１）　酵母の形質転換

アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）より市販のコマガタエラ　パストリス（Komagataella pastoris）　PPY12株（ATCC204163）を購入した。

エレクトロポレーション法により、PPY12株を実施例２－１で得られたpEXP-A-P4Hbsig(-)A1revで形質転換した。

１００ｍｌのＹＰＤ液体培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、及び、２％グルコース）にPPY12株を接種し、３０℃にて菌濁度（OD_{660}）＝約１０となるまで培養した。培養液から菌体を回収し上清を取り除いた後、１ＭソルビトールにOD_{660}＝約１５０の濁度で懸濁し、菌体懸濁液を調製した。

１０μｇのpEXP-A-P4Hbsig(-)A1rev（実施例（２－１－１２）参照）を制限酵素AatIIで切断した。エタノール沈殿でＤＮＡを回収し５μｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌに溶解してＤＮＡ溶液を調製した。

前記菌体懸濁液１００μｌと、前記ＤＮＡ溶液５μｌとを混ぜ、混合液を調製した。当該混合液に遺伝子導入装置（ＥＣＭ６３０、ＢＴＸ）を用いてパルスを加えた後、ＭＤ寒天培地（１．３４％イーストナイトロジェンベース、４×１０$^{-5}$％ビオチン、２％グルコース、０．００５％ヒスチジン、２％寒天）上に広げ、３０℃にて４８時間培養した。ＭＤ寒天培地上に形成したコロニーを形質転換体として単離した。形質転換体として０５０５２５－５－３株を得た。

【０１２６】

（３－１－２）　プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット、及び、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニットの発現検討

０５０５２５－５－３株を、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した１００ｍｌのＢＭＧＹ培地[１％酵母エキス、２％ペプトン、１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、１％グリセロール、０．００５％ヒスチジン]に植菌して、３０℃にて２４時間振とう培養した。得られた培養液から菌体を調製し、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した５０ｍｌのBMM培地［１００mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％ イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、０．５％メタノール、０．００５％ヒスチジン］にOD_{660}＝約１０の終濃度で植菌し、３０℃

にて７２時間振とう培養した。この間、約１２時間おきに５０％メタノールを０．５ｍｌ添加した。

前記培養液から菌体を回収して上清を取り除いた後、マルチビーズショッカー（安井器械）を用い、酵母破砕条件（ガラスビーズ直径０．５ｍｍ、２５００ｒｐｍ、４０分）にて菌体を破砕した。得られた破砕液を遠心分離して菌体破砕液の上清を回収し、可溶性画分を調製した。

前記可溶性画分をサンプルバッファー（ナカライテスク）と混合し、１００℃で５分間保温した後、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。電気泳動装置はERICA-MP（DRC）、電気泳動ゲルは５～１５％グラジェントゲル（XV PANTERA MPゲル、DRC）を用い、２００Vで２０分間電気泳動した。電気泳動終了後、得られたアクリルアミドゲルを、ＰＶＤＦメンブレン（イモビロン－Ｐ、ミリポア）にエレクトロブロッティングした。ブロッティング装置はMINICA-MP（DRC）を用い、４０Vで３０分間行った。

得られたメンブランを用いてウェスタンブロッティングを行い、プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニットを検出した。メンブランのブロッキングにはBlocking one（ナカライテスク）、抗体反応にはCan Get Signal（東洋紡）を用い、１次抗体は抗ラットプロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニットマウス抗体（６３１６７、ＭＰ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ）を２０００倍希釈に、２次抗体は坑マウス IgG-HRP Linked ヒツジ抗体（NA-931、GEヘルスケアバイオサイエンス）を２００００倍希釈に調製して用いた。２次抗体の検出はECL Western Blotting Detection System（GEヘルスケアバイオサイエンス）を用いて化学発光で行った。化学発光はイメージアナライザー（LAS-3000UVmini、富士フィルム）で検出・定量した。ウェスタンブロティングを行った結果、０５０５２５－５－３株ではプロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニットに相当する分子量の位置にシグナルが検出されたことから、プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニットを生産することが示された。

前記得られたメンブランを用いてウェスタンブロッティングを行い、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニットを検出した。メンブランのブロッキングにはBlocking one（ナカライテスク）、抗体反応にはCan Get Signal（東洋紡）を用い、１次抗体は抗ヒトプロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニットウサギ抗体（ＳＰＡ－８９０、Ｓｔｒｅｓｓｇｅｎ）を５０００倍希釈に、２次抗体は坑ウサギ IgG-HRP Linked ロバ抗体（NA-934、GEヘルスケアバイオサイエンス）を２００００倍希釈に調製して用いた。２次抗体の検出はECL Western Blotting Detection System（GEヘルスケアバイオサイエンス）を用いて化学発光で行った。化学発光はイメージアナライザー（LAS-3000UVmini、富士フィルム）で検出・定量した。ウェスタンブロティングを行った結果、０５０５２５－５－３株ではプロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニットに相当する分子量の位置にシグナルが検出されたことから、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニットを生産することが示された。

【０１２７】

（３－２） プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα１発現カセット、及び、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα２発現カセット導入酵母の作製

【０１２８】

（３－２－１） 酵母の形質転換

エレクトロポレーション法により、０５０５２５－５－３株（実施例（３－１－１）参照）を実施例２－３－９で得られたpEXP-HA-YHsCOL1A2-1A1で形質転換した。

１００ｍｌのＹＰＤ液体培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、及び、２％グルコース）に０５０５２５－５－３株を接種し、３０℃にて菌濁度（OD_{660}）＝約１０となるまで培養した。培養液から菌体を回収し上清を取り除いた後、１ＭソルビトールにOD_{660}＝約１５０の濁度で懸濁し、菌体懸濁液を調製した。

１０μｇのpEXP-HA-YHsCOL1A2-1A1（実施例（２－３－９）参照）を制限酵素XbaIで切断した。エタノール沈殿でＤＮＡを回収し５μｌの１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌに溶解し

てＤＮＡ溶液を調製した。
前記菌体懸濁液１００μｌと、前記ＤＮＡ溶液５μｌとを混ぜ混合液を調製した。当該混合液にエレクトロポレーション装置（ＥＣＭ６３０、ＢＴＸ）を用いてパルスを加えた後、ＭＤ寒天培地（１．３４％イーストナイトロジェンベース、４×１０$^{-5}$％ビオチン、２％グルコース、２％寒天）上に広げ、３０℃にて４８時間培養した。ＭＤ寒天培地上に形成したコロニーを形質転換体として単離した。形質転換体として０７０３２７－１－１１株を得た。

【０１２９】

（３－２－２）　ヒトコラーゲンTypeIα1、及び、ヒトコラーゲンTypeIα2の発現検討

０７０３２７－１－１１株（実施例（３－２－１）参照）を、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した１００ｍｌのＢＭＧＹ培地[１％酵母エキス、２％ペプトン、１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、１％グリセロール]に植菌して、３０℃にて２４時間振とう培養した。得られた培養液から菌体を調製し、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した５０ｍｌのBMM培地［１００mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％ イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、０．５％メタノール］にＯＤ$_{660}$＝約１０の終濃度で植菌し、３０℃にて７２時間振とう培養した。この間、約１２時間おきに５０％メタノールを０．５ｍｌ添加した。

前記培養液から菌体を回収して上清を取り除いた後、マルチビーズショッカー（安井器械）を用い、酵母破砕条件（ガラスビーズ直径０．５ｍｍ、２５００ｒｐｍ、４０分）にて菌体を破砕した。得られた破砕液を遠心分離して菌体破砕液の上清を回収し、可溶性画分を調製した。

前記可溶性画分をサンプルバッファー（ナカライテスク）と混合し、１００℃で５分間保温した後、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。電気泳動装置はERICA-MP（DRC）、電子泳動ゲルは５～１５％グラジェントゲル（XV　PANTERA　MPゲル、DRC）を用い、２００Vで２０分間電気泳動した。電気泳動終了後、得られたアクリルアミドゲルはCBB染色液を用いて染色し、タンパク質のバンドを検出した。その結果、０７０３２７－１－１株ではコラーゲンTypeIα1のプロコラーゲンに相当する分子量のバンド、及び、コラーゲンTypeIα2のプロコラーゲンに相当する分子量のバンドが検出されたことから、ヒトコラーゲンTypeIα1、及び、ヒトコラーゲンTypeIα2を産生することが示された。

【０１３０】

（３－３）　プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット、ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット、並びに、ヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット導入酵母の作製

【０１３１】

（３－３－１）　酵母の形質転換

エレクトロポレーション法により、０５０５２５－５－３株（実施例（３－１－１）参照）を実施例２－４－４で得られたpEXP-HA-YHsCOL1A2-1A1 N60C15で形質転換した。

１００ｍｌのＹＰＤ液体培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、及び、２％グルコース）に０５０５２５－５－３株（実施例（３－１－１）参照）を接種し、３０℃にて菌濁度（ＯＤ$_{660}$）＝約１０となるまで培養した。培養液から菌体を回収し上清を取り除いた後、１ＭソルビトールにOD_{660}＝約１５０の濁度で懸濁し、菌体懸濁液を調製した。

１０μｇのpEXP-HA-YHsCOL1A2-1A1 N60C15（実施例（２－４－４）参照）を制限酵素XbaIで切断した。エタノール沈殿でＤＮＡを回収し５μｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌに溶解してＤＮＡ溶液を調製した。

前記菌体懸濁液１００μｌと、前記ＤＮＡ溶液５μｌとを混ぜ混合液を調製した。当該

混合液にエレクトロポレーション装置（ＥＣＭ６３０、ＢＴＸ）を用いてパルスを加えた後、ＭＤ寒天培地（１．３４％イーストナイトロジェンベース、４×１０$^{-5}$％ビオチン、２％グルコース、２％寒天）上に広げ、３０℃にて４８時間培養した。ＭＤ寒天培地上に形成したコロニーを形質転換体として単離した。形質転換体として０８０１１８－３－３株を得た。

【０１３２】

（３－３－２）　ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド、並びに、ヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドの発現検討

０８０１１８－３－３株（実施例（３－３－１）参照）を、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した１００ｍｌのＢＭＧＹ培地[１％酵母エキス、２％ペプトン、１００mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、１％グリセロール]に植菌して、３０℃にて２４時間振とう培養した。得られた培養液から菌体を調製し、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した５０ｍｌのBMM培地［１００mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％ イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、０．５％メタノール］にＯＤ$_{660}$＝約１０の終濃度で植菌し、３０℃にて７２時間振とう培養した。この間、約１２時間おきに５０％メタノールを０．５ｍｌ添加した。

前記培養液から菌体を回収して上清を取り除いた後、マルチビーズショッカー（安井器械）を用い、酵母破砕条件（ガラスビーズ直径０．５mm、２５００ｒｐｍ、４０分）にて菌体を破砕した。得られた破砕液を遠心分離して菌体破砕液の上清を回収し、可溶性画分を調製した。

前記可溶性画分をサンプルバッファー（ナカライテスク）と混合し、１００℃で５分間保温した後、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。電気泳動装置はERICA-MP（DRC）、電子泳動ゲルは５～１５％グラジェントゲル（XV　PANTERA　MPゲル、DRC）を用い、２００Vで２０分間電気泳動した。電気泳動終了後、得られたアクリルアミドゲルを、ＰＶＤＦメンブレン（イモビロン－Ｐ、ミリポア）にエレクトロブロッティングした。ブロッティング装置はMINICA-MP（DRC）を用い、４０Vで３０分間行った。

得られたメンブランを用いてウェスタンブロッティングを行い、ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドのプロコラーゲンを検出した。メンブランのブロッキングにはBlocking one（ナカライテスク）、抗体反応にはCan Get Signal（東洋紡）を用い、１次抗体は抗ヒトプロコラーゲンTypeIα1ヤギ抗体（SC-8782、Santa Cruz）を２０００倍希釈に、二次抗体は坑ヤギ IgG-HRP Linked ロバジ抗体（SC-2033、Santa Cruz）を２０００倍希釈に調製して用いた。二次抗体の検出はECL Western Blotting Detection System（GEヘルスケアバイオサイエンス）を用いて化学発光で行った。化学発光はイメージアナライザー（LAS-3000UVmini、富士フィルム）で検出・定量した。ウェスタンブロティングを行った結果、０８０１１８－３－３株ではヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドのプロコラーゲンに相当する分子量の位置にシグナルが検出されたことから、ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドを産生することが示された。

前記得られたメンブランを用いてウェスタンブロッティングを行い、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα２のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドのプロコラーゲンを検出した。メンブランのブロッキングにはBlocking one（ナカライテス

ク）、抗体反応にはCan Get Signal（東洋紡）を用い、１次抗体は抗ヒトコラーゲンTypeIウサギ抗体（ab292、abcam）を５０００倍希釈に、二次抗体は坑ウサギ IgG-HRP Linked ロバ抗体（NA-934、GEヘルスケアバイオサイエンス）を１００００倍希釈に調製して用いた。二次抗体の検出はECL Western Blotting Detection System（GEヘルスケアバイオサイエンス）を用いて化学発光で行った。化学発光はイメージアナライザー（LAS-3000UV mini、富士フィルム）で検出・定量した。ウェスタンブロティングを行った結果、０８０１１８－３－３株（実施例（３－７－１）参照）ではヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドのプロコラーゲンに相当する分子量の位置にシグナルが検出されたことから、ヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域６０残基、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドを産生することが示された。

【０１３３】

（３－４） プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット、ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット、並びに、ヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット導入酵母の作製

【０１３４】

（３－４－１） 酵母の形質転換

エレクトロポレーション法により、０５０５２５－５－３株（実施例（３－１－１）参照）を実施例２－５－７で得られたpEXP-HA-HsCOL1A2-1A1 M500X2で形質転換した。

１００ｍｌのＹＰＤ液体培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、及び、２％グルコース）に０５０５２５－５－３株（実施例（３－１－１）参照）を接種し、３０℃にて菌濁度（OD_{660}）＝約１０となるまで培養した。培養液から菌体を回収し上清を取り除いた後、１ＭソルビトールにOD$_{660}$＝約１５０の濁度で懸濁し、菌体懸濁液を調製した。

１０μｇのpEXP-HA-HsCOL1A2-1A1 M500X2（実施例（２－５－７）参照）を制限酵素ＸｂａＩで切断した。エタノール沈殿でＤＮＡを回収し５μｌの１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌに溶解してＤＮＡ溶液を調製した。

前記菌体懸濁液１００μｌと、前記ＤＮＡ溶液５μｌとを混ぜ混合液を調製した。当該混合液にエレクトロポレーション装置（ＥＣＭ６３０、ＢＴＸ）を用いてパルスを加えた後、ＭＤ寒天培地（１．３４％イーストナイトロジェンベース、４×１０$^{-5}$％ビオチン、２％グルコース、２％寒天）上に広げ、３０℃にて４８時間培養した。ＭＤ寒天培地上に形成したコロニーを形質転換体として単離した。形質転換体として０８０８０１－２－４株を得た。

【０１３５】

（３－４－２） ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド、並びに、ヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドの発現検討

０８０８０１－２－４株（実施例（３－４－１）参照）を、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した１００ｍｌのＢＭＧＹ培地[１％酵母エキス、２％ペプトン、１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、１％グリセロール]に植菌して、３０℃にて２４時間振とう培養した。得られた培養液から菌体を調製し、５００ｍｌのバッフル付き三角

フラスコに調製した５０ｍｌのBMM培地［１００mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％ イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、０．５％メタノール］にＯＤ$_{660}$＝約１０の終濃度で植菌し、３０℃にて７２時間振とう培養した。この間、約１２時間おきに５０％メタノールを０．５ｍｌ添加した。

前記培養液から菌体を回収して上清を取り除いた後、マルチビーズショッカー（安井器械）を用い、酵母破砕条件（ガラスビーズ直径０．５mm、２５００ｒｐｍ、４０分）にて菌体を破砕した。得られた破砕液を遠心分離して菌体破砕液の上清を回収し、可溶性画分を調製した。

前記可溶性画分をサンプルバッファー（ナカライテスク）と混合し、１００℃で５分間保温した後、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。電気泳動装置はERICA-MP（DRC）、電子泳動ゲルは５～１５％グラジェントゲル（XV PANTERA MPゲル、DRC）を用い、２００Vで２０分間電気泳動した。電気泳動終了後、得られたアクリルアミドゲルを、ＰＶＤＦメンブレン（イモビロン－Ｐ、ミリポア）にエレクトロブロッティングした。ブロッティング装置はMINICA-MP（DRC）を用い、４０Vで３０分間行った。

得られたメンブランを用いてウェスタンブロッティングを行い、ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドのプロコラーゲンを検出した。メンブランのブロッキングにはBlocking one（ナカライテスク）、抗体反応にはCan Get Signal（東洋紡）を用い、１次抗体は抗ヒトプロコラーゲンTypeIα1ヤギ抗体（SC-8782、Santa Cruz）を２０００倍希釈に、二次抗体は坑ヤギ IgG-HRP Linked ロバジ抗体（SC-2033、Santa Cruz）を２０００倍希釈に調製して用いた。二次抗体の検出はECL Western Blotting Detection System（GEヘルスケアバイオサイエンス）を用いて化学発光で行った。化学発光はイメージアナライザー（LAS-3000UVmini、富士フィルム）で検出・定量した。ウェスタンブロティングを行った結果、０８０８０１－２－４株ではヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドのプロコラーゲンに相当する分子量の位置にシグナルが検出されたことから、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα１のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドを産生することが示された。

前記得られたメンブランを用いてウェスタンブロッティングを行い、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα２のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドのプロコラーゲンを検出した。メンブランのブロッキングにはBlocking one（ナカライテスク）、抗体反応にはCan Get Signal（東洋紡）を用い、１次抗体は抗ヒトコラーゲンTypeIウサギ抗体（ab292、abcam）を５０００倍希釈に、二次抗体は坑ウサギ IgG-HRP Linked ロバ抗体（NA-934、GEヘルスケアバイオサイエンス）を１００００倍希釈に調製して用いた。二次抗体の検出はECL Western Blotting Detection System（GEヘルスケアバイオサイエンス）を用いて化学発光で行った。化学発光はイメージアナライザー（LAS-3000UVmini、富士フィルム）で検出・定量した。ウェスタンブロティングを行った結果、０８０８０１－２－４株ではヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα２のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドのプロコラーゲンに相当する分子量の位置にシグナルが検出されたことから、ヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域、Ｎ末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、Ｃ末端側ヘリックス領域１５残基、及び、Ｃ末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチドを産生することが示された。

【０１３６】

（３－５）　プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット、及び、ヒトコラーゲンTypeIIIα1発現カセット導入酵母の作製

【０１３７】

（３－５－１）　酵母の形質転換

エレクトロポレーション法により、０５０５２５－５－３株（実施例（３－１－１）参照）を実施例２－６－２で得られたpEXP-HA-HsCOL3A1で形質転換した。

１００ｍｌのＹＰＤ液体培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、及び、２％グルコース）に０５０５２５－５－３株（実施例（３－１－１）参照）を接種し、３０℃にて菌濁度（OD_{660}）＝約１０となるまで培養した。培養液から菌体を回収し上清を取り除いた後、１ＭソルビトールにOD_{660}＝約１５０の濁度で懸濁し、菌体懸濁液を調製した。

１０μｇのpEXP-HA-HsCOL3A1（実施例（２－６－２）参照）を制限酵素XbaIで切断した。エタノール沈殿でＤＮＡを回収し５μｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌに溶解してＤＮＡ溶液を調製した。

前記菌体懸濁液１００μｌと、前記ＤＮＡ溶液５μｌとを混ぜ混合液を調製した。当該混合液にエレクトロポレーション装置（ＥＣＭ６３０、ＢＴＸ）を用いてパルスを加えた後、ＭＤ寒天培地（１．３４％イーストナイトロジェンベース、４×１０$^{-5}$％ビオチン、２％グルコース、２％寒天）上に広げ、３０℃にて４８時間培養した。ＭＤ寒天培地上に形成したコロニーを形質転換体として単離した。形質転換体として０８０９１７－１－２株を得た。

【０１３８】

（３－５－２）　ヒトコラーゲンTypeIIIα1の発現検討

０８０９１７－１－２株（実施例（３－５－１）参照）を、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した１００ｍｌのＢＭＧＹ培地[１％酵母エキス、２％ペプトン、１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、１％グリセロール]に植菌して、３０℃にて２４時間振とう培養した。得られた培養液から菌体を調製し、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した５０ｍｌのBMM培地［１００mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％ イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、０．５％メタノール］にOD_{660}＝約１０の終濃度で植菌し、３０℃にて７２時間振とう培養した。この間、約１２時間おきに５０％メタノールを０．５ｍｌ添加した。

前記培養液から菌体を回収して上清を取り除いた後、マルチビーズショッカー（安井器械）を用い、酵母破砕条件（ガラスビーズ直径０．５ｍｍ、２５００ｒｐｍ、４０分）にて菌体を破砕した。得られた破砕液を遠心分離して菌体破砕液の上清を回収し、可溶性画分を調製した。

前記可溶性画分をサンプルバッファー（ナカライテスク）と混合し、１００℃で５分間保温した後、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。泳動装置はERICA-MP（DRC）、電気泳動ゲルは５～１５％グラジェントゲル（XV　PANTERA　MPゲル、DRC）を用い、２００Vで２０分間電気泳動した。電気泳動終了後、得られたアクリルアミドゲルはCBB染色液を用いて染色し、タンパク質のバンドを検出した。その結果、０８０９１７－１－２株ではコラーゲンTypeIIIα1のプロコラーゲンに相当する分子量のバンドが検出されたことから、ヒトコラーゲンTypeIIIα1を生産することが示された。

【０１３９】

（３－６）　プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット、及び、ヒトコラーゲンTypeIIα1発現カセット導入酵母の作製

【０１４０】

（３－６－１）　酵母の形質転換

エレクトロポレーション法により、０５０５２５－５－３株（実施例（３－１－１）参照）を実施例２－７－２で得られるpEXP-HA-YHsCOL2A1で形質転換する。

１００ｍｌのＹＰＤ液体培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、及び、２％グルコース）に０５０５２５－５－３株（実施例（３－１－１）参照）を接種し、３０℃にて菌濁度（OD_{660}）＝約１０となるまで培養する。培養液から菌体を回収し上清を取り除いた後、１ＭソルビトールにOD_{660}＝約１５０の濁度で懸濁し、菌体懸濁液を調製する。

１０μｇのpEXP-HA-YHsCOL2A1（実施例（２－７－２）参照）を制限酵素XbaIで切断する。エタノール沈殿でＤＮＡを回収し５μｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌに溶解してＤＮＡ溶液を調製する。

前記菌体懸濁液１００μｌと、前記ＤＮＡ溶液５μｌとを混ぜ混合液を調製する。当該混合液にエレクトロポレーション装置（ＥＣＭ６３０、ＢＴＸ）を用いてパルスを加えた後、ＭＤ寒天培地（１．３４％イーストナイトロジェンベース、4×10^{-5}％ビオチン、２％グルコース、２％寒天）上に広げ、３０℃にて４８時間培養する。ＭＤ寒天培地上に形成したコロニーを形質転換体として単離する。

【０１４１】

（３－６－２）　ヒトコラーゲンTypeIIα1の発現検討

形質転換体（実施例（３－６－１）参照）を、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した１００ｍｌのＢＭＧＹ培地[１％酵母エキス、２％ペプトン、１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％イーストナイトロジェンベース（Difco）、4×10^{-5}％ビオチン、１％グリセロール]に植菌して、３０℃にて２４時間振とう培養する。得られた培養液から菌体を調製し、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した５０ｍｌのBMM培地［１００mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％ イーストナイトロジェンベース（Difco）、4×10^{-5}％ビオチン、０．５％メタノール］にOD_{660}＝約１０の終濃度で植菌し、３０℃にて７２時間振とう培養する。この間、約１２時間おきに５０％メタノールを０．５ｍｌ添加する。

前記培養液から菌体を回収して上清を取り除いた後、マルチビーズショッカー（安井器械）を用い、酵母破砕条件（ガラスビーズ直径０．５ｍｍ、２５００ｒｐｍ、４０分）にて菌体を破砕する。得られた破砕液を遠心分離して菌体破砕液の上清を回収し、可溶性画分を調製する。

前記可溶性画分をサンプルバッファー（ナカライテスク）と混合し、１００℃で５分間保温した後、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動する。電気泳動装置はERICA-MP（DRC）、電気泳動ゲルは５～１５％グラジェントゲル（XV　PANTERA　MPゲル、DRC）を用い、２００Vで２０分間電気泳動する。電気泳動終了後、得られたアクリルアミドゲルはCBB染色液を用いて染色し、タンパク質のバンドを検出する。コラーゲンTypeIIα1のプロコラーゲンに相当する分子量のバンドが検出されることにより、ヒトコラーゲンTypeIIα1を生産することが示される。

【０１４２】

（３－７）　プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット、ヒトコラーゲンTypeIα1発現カセット、ヒトコラーゲンTypeIα2発現カセット、及び、シクロフィリンＢ発現カセット導入酵母の作製

【０１４３】

（３－７－１）　酵母の形質転換

エレクトロポレーション法により、０７０３２７－１－１１株（実施例（３－２－１）参照）を実施例２－２－４で得られたpEXP-A-CyPB ZeoRで形質転換した。

１００ｍｌのＹＰＤ液体培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、及び、２％グルコース）に０７０３２７－１－１１株（実施例（３－２－１）参照）を接種し、３０℃にて菌濁度（OD_{660}）＝約１０となるまで培養した。培養液から菌体を回収し上清を取り除いた後、１ＭソルビトールにOD_{660}＝約１５０の濁度で懸濁し、菌体懸濁液を調製した。

１０μｇのpEXP-A-CyPB ZeoR（実施例（２－２－４）参照）を制限酵素BglIIで切断した。エタノール沈殿でＤＮＡを回収し５μｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌに溶解してＤＮＡ溶液を調製した。

前記菌体懸濁液１００μｌと、前記ＤＮＡ溶液５μｌとを混ぜ、混合液を調製した。当該混合液にエレクトロポレーション装置（ＥＣＭ６３０、ＢＴＸ）を用いてパルスを加えた後、ＭＤ寒天培地（１．３４％イーストナイトロジェンベース、４×１０$^{-5}$％ビオチン、２％グルコース、３００μｇ／ｍｌゼオシン、２％寒天）上に広げ、３０℃にて４８時間培養する。ＭＤ寒天培地上に形成したコロニーを形質転換体として単離した。pEXP-A-CyPB ZeoRの形質転換体として０８１０２４－５－１株を得た。

【０１４４】

（３－７－２）　シクロフィリンＢの発現検討

０８１０２４－５－１株（実施例（３－７－１）参照）を、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した１００ｍｌのＢＭＧＹ培地[１％酵母エキス、２％ペプトン、１００mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、１％グリセロール]に植菌して、３０℃にて２４時間振とう培養した。得られた培養液から菌体を調製し、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した５０ｍｌのBMM培地［１００mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％ イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、０．５％メタノール］にＯＤ$_{660}$＝約１０の終濃度で植菌し、３０℃にて７２時間振とう培養した。この間、約１２時間おきに５０％メタノールを０．５ｍｌ添加した。

前記培養液から菌体を回収して上清を取り除いた後、マルチビーズショッカー（安井器械）を用い、酵母破砕条件（ガラスビーズ直径０．５mm、２５００ｒｐｍ、４０分）にて菌体を破砕した。得られた破砕液を遠心分離して菌体破砕液の上清を回収し、可溶性画分を調製した。

前記可溶性画分をサンプルバッファー（ナカライテスク）と混合し、１００℃で５分間保温した後、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。電気泳動装置はERICA-MP（DRC）、電気泳動ゲルは５～１５％グラジェントゲル（XV　PANTERA　MPゲル、DRC）を用い、２００Vで２０分間電気泳動した。電気泳動終了後、得られたアクリルアミドゲルはCBB染色液を用いて染色し、タンパク質のバンドを検出した。その結果、０８１０２４－５－１株ではシクロフィリンＢに相当する分子量のバンドが検出されたことから、シクロフィリンを生産することが示された。

【０１４５】

（３－８）　プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα１発現カセット、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα２発現カセット、及び、シクロフィリンＣ発現カセット導入酵母の作製

【０１４６】

（３－８－１）　酵母の形質転換

エレクトロポレーション法により、０７０３２７－１－１１株（実施例（３－２－１）参照）を実施例２－２－５で得られたpEXP-A-CyPC ZeoRで形質転換した。

１００ｍｌのＹＰＤ液体培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、及び、２％グルコース）に０７０３２７－１－１１（実施例（３－２－１）参照）株を接種し、３０℃にて菌濁度（ＯＤ$_{660}$）＝約１０となるまで培養した。培養液から菌体を回収し上清を取り除いた後、１ＭソルビトールにOD_{660}＝約１５０の濁度で懸濁し、菌体懸濁液を調製した。

１０μｇのpEXP-A-CyPC ZeoR（実施例（２－２－５）参照）を制限酵素BglIIで切断した。エタノール沈殿でＤＮＡを回収し５μｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌに溶解してＤＮＡ溶液を調製した。

前記菌体懸濁液１００μｌと、前記ＤＮＡ溶液５μｌとを混ぜ、混合液を調製した。当該混合液にエレクトロポレーション装置（ＥＣＭ６３０、ＢＴＸ）を用いてパルスを加えた後、ＭＤ寒天培地（１．３４％イーストナイトロジェンベース、４×１０$^{-5}$％ビオチン、２％グルコース、３００μｇ／ｍｌゼオシン、２％寒天）上に広げ、３０℃にて４８時間培養する。ＭＤ寒天培地上に形成したコロニーを形質転換体として単離した。pEXP-A-CyPC ZeoRの形質転換体として０８１０２４－６－１株を得た。

【０１４７】
（３－８－２）　シクロフィリンＣの発現検討
０８１０２４－６－１株（実施例（３－８－１）参照）を、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した１００ｍｌのＢＭＧＹ培地[１％酵母エキス、２％ペプトン、１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、１％グリセロール]に植菌して、３０℃にて２４時間振とう培養した。得られた培養液から菌体を調製し、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した５０ｍｌのBMM培地［１００mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％ イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、０．５％メタノール］にＯＤ$_{660}$＝約１０の終濃度で植菌し、３０℃にて７２時間振とう培養した。この間、約１２時間おきに５０％メタノールを０．５ｍｌ添加した。
前記培養液から菌体を回収して上清を取り除いた後、マルチビーズショッカー（安井器械）を用い、酵母破砕条件（ガラスビーズ直径０．５ｍｍ、２５００ｒｐｍ、４０分）にて菌体を破砕した。得られた破砕液を遠心分離して菌体破砕液の上清を回収し、可溶性画分を調製した。
前記可溶性画分をサンプルバッファー（ナカライテスク）と混合し、１００℃で５分間保温した後、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。電気泳動装置はERICA-MP（DRC）、電気泳動ゲルは５～１５％グラジェントゲル（XV　PANTERA　MPゲル、DRC）を用い、２００Vで２０分間電気泳動した。電気泳動終了後、得られたアクリルアミドゲルはCBB染色液を用いて染色し、タンパク質のバンドを検出した。その結果、０８１０２４－６－１株ではシクロフィリンＣに相当する分子量のバンドが検出されたことから、シクロフィリンを生産することが示された。
【０１４８】
（３－９）　プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα１発現カセット、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα２発現カセット、及び、シクロフィリンＢ発現カセット導入酵母の作製（その２）
【０１４９】
（３－９－１）　酵母の形質転換
エレクトロポレーション法により、０７０３２７－１－１１株（実施例（３－２－１）参照）をpEXP-A-PER3 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－６）参照）、pEXP-A-AOX2 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－７）参照）、或は、pEXP-A-FLD1 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－８）参照）で形質転換する。
１００ｍｌのＹＰＤ液体培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、及び、２％グルコース）に０５０８１８－３－１株を接種し、３０℃にて菌濁度（ＯＤ$_{660}$）＝約１０となるまで培養する。培養液から菌体を回収し上清を取り除いた後、１ＭソルビトールにOD_{660}＝約１５０の濁度で懸濁し、菌体懸濁液を調製する。
１０μｇのpEXP-A-PER3 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－６）参照）、pEXP-A-AOX2 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－７）参照）、或は、pEXP-A-FLD1 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－８）参照）を制限酵素BglIIで切断する。エタノール沈殿でＤＮＡを回収し５μｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌに溶解してＤＮＡ溶液を調製する。
前記菌体懸濁液１００μｌと、前記ＤＮＡ溶液５μｌとを混ぜ、混合液を調製する。当該混合液にエレクトロポレーション装置（ＥＣＭ６３０、ＢＴＸ）を用いてパルスを加えた後、ＭＤ寒天培地（１．３４％イーストナイトロジェンベース、４×１０$^{-5}$％ビオチン、２％グルコース、３００μｇ／ｍｌゼオシン、２％寒天）上に広げ、３０℃にて４８時間培養する。ＭＤ寒天培地上に形成したコロニーを形質転換体として単離する。
【０１５０】
（３－９－２）　シクロフィリンＢの発現検討
形質転換体（実施例（３－９－１）参照）を、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した１００ｍｌのＢＭＧＹ培地[１％酵母エキス、２％ペプトン、１００ｍＭリン

酸カリウム緩衝液（ｐＨ）６．０）、１．３４％イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、１％グリセロール]に植菌して、３０℃にて２４時間振とう培養する。得られた培養液から菌体を調製し、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した５０ｍｌのBMM培地［１００mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％ イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、０．５％メタノール］にＯＤ$_{660}$＝約１０の終濃度で植菌し、３０℃にて７２時間振とう培養する。この間、約１２時間おきに５０％メタノールを０．５ｍｌ添加する。

前記培養液から菌体を回収して上清を取り除いた後、マルチビーズショッカー（安井器械）を用い、酵母破砕条件（ガラスビーズ直径０．５mm、２５００ｒｐｍ、４０分）にて菌体を破砕する。得られた破砕液を遠心分離して菌体破砕液の上清を回収し、可溶性画分を調製する。

前記可溶性画分をサンプルバッファー（ナカライテスク）と混合し、１００℃で５分間保温した後、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動する。電気泳動装置はERICA-MP（DRC）、電気泳動ゲルは５～１５％グラジェントゲル（XV PANTERA MPゲル、DRC）を用い、２００Vで２０分間電気泳動する。電気泳動終了後、得られたアクリルアミドゲルを、ＰＶＤＦメンブレン（イモビロン－Ｐ、ミリポア）にエレクトロブロッティングする。ブロッティング装置はMINICA-MP（DRC）を用い、４０Vで３０分間行なう。

得られたメンブランを用いてウェスタンブロッティングを行い、FK506結合タンパク質を検出する。メンブランのブロッキングにはBlocking one（ナカライテスク）、抗体反応にはCan Get Signal（東洋紡）を用い、１次抗体としては抗シクロフィリンＢウサギ抗体（11607-1-AP、ProteinTech Group）を２０００倍希釈に、２次抗体は坑ウサギ IgG-HRP Linked ロバ抗体（NA-934、GEヘルスケアバイオサイエンス）を１００００倍希釈に調製して用いる。２次抗体の検出はECL Western Blotting Detection System（GEヘルスケアバイオサイエンス）を用い化学発光で行う。化学発光はイメージアナライザー（LAS-3000 UVmini、富士フィルム）で検出・定量する。シクロフィリンＢに相当する分子量の位置にシグナルが検出されることにより、シクロフィリンＢを生産することが示される。

【０１５１】

（３－１０） プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα１のＮ末端ノンヘリックス領域、N末端側ヘリックス領域６０残基、C末端側ヘリックス領域１５残基、及び、C末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット、ヒトコラーゲンＴｙｐｅＩα２のＮ末端ノンヘリックス領域、N末端側ヘリックス領域６０残基、C末端側ヘリックス領域１５残基、及び、C末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット、並びに、シクロフィリンＢ発現カセット導入酵母の作製

【０１５２】

（３－１０－１） 酵母の形質転換

エレクトロポレーション法により、０８０１１８－３－３株（実施例（３－３－１）参照）をpEXP-A-PER3 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－６）参照）、pEXP-A-AOX2 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－７）参照）、或は、pEXP-A-FLD1 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－８）参照）で形質転換する。

１００ｍｌのＹＰＤ液体培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、及び、２％グルコース）に０８０１１８－３－３株（実施例（３－３－１）参照）を接種し、３０℃にて菌濁度（ＯＤ$_{660}$）＝約１０となるまで培養する。培養液から菌体を回収し上清を取り除いた後、１MソルビトールにOD$_{660}$＝約１５０の濁度で懸濁し、菌体懸濁液を調製する。

１０μｇのpEXP-A-PER3 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－６）参照）、pEXP-A-AOX2 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－７）参照）、或は、pEXP-A-FLD1 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－８）参照）を制限酵素BglIIで切断する。エタノール沈殿でＤＮＡを回収し５μｌの１０mM Ｔｒｉｓ－ＨＣｌに溶解してＤＮＡ溶液を調製する。

前記菌体懸濁液１００μｌと、前記ＤＮＡ溶液５μｌとを混ぜ混合液を調製する。当該混合液にエレクトロポレーション装置（ＥＣＭ６３０、ＢＴＸ）を用いてパルスを加えた

後、ＭＤ寒天培地（１．３４％イーストナイトロジェンベース、４×１０$^{-5}$％ビオチン、２％グルコース、３００μｇ／ｍｌゼオシン、２％寒天、）上に広げ、３０℃にて４８時間培養する。ＭＤ寒天培地上に形成したコロニーを形質転換体として単離する。

【０１５３】

（３－１０－２）　シクロフィリンＢの発現検討

形質転換体（実施例（３－１０－１）参照）を、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した１００ｍｌのＢＭＧＹ培地[１％酵母エキス、２％ペプトン、１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、１％グリセロール]に植菌して、３０℃にて２４時間振とう培養する。得られた培養液から菌体を調製し、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した５０ｍｌのBMM培地［１００mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％ イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、０．５％メタノール］にＯＤ$_{660}$＝約１０の終濃度で植菌し、３０℃にて７２時間振とう培養する。この間、約１２時間おきに５０％メタノールを０．５ｍｌ添加する。

前記培養液から菌体を回収して上清を取り除いた後、マルチビーズショッカー（安井器械）を用い、酵母破砕条件（ガラスビーズ直径０．５ｍｍ、２５００ｒｐｍ、４０分）にて菌体を破砕する。得られた破砕液を遠心分離して菌体破砕液の上清を回収し、可溶性画分を調製する。

前記可溶性画分をサンプルバッファー（ナカライテスク）と混合し、１００℃で５分間保温した後、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動する。電気泳動装置はERICA-MP（DRC）、電気泳動ゲルは５～１５％グラジェントゲル（XV　PANTERA　MPゲル、DRC）を用い、２００Vで２０分間電気泳動する。電気泳動終了後、得られたアクリルアミドゲルを、ＰＶＤＦメンブレン（イモビロン－Ｐ、ミリポア）にエレクトロブロッティングする。ブロッティング装置はMINICA-MP（DRC）を用い、４０Vで３０分間行う。

得られたメンブランを用いてウェスタンブロッティングを行い、シクロフィリンＢを検出する。メンブランのブロッキングにはBlocking one（ナカライテスク）、抗体反応にはCan Get Signal（東洋紡）を用い、１次抗体としては抗シクロフィリンBウサギ抗体（11607-1-AP、ProteinTech　Group）を２０００倍希釈に、２次抗体は坑ウサギ IgG-HRP Linked ロバ抗体（NA-934、GEヘルスケアバイオサイエンス）を１００００倍希釈に調製して用いる。２次抗体の検出はECL Western Blotting Detection System（GEヘルスケアバイオサイエンス）を用い化学発光で行う。化学発光はイメージアナライザー（LAS-3000UVmini、富士フィルム）で検出・定量する。シクロフィリンＢに相当する分子量の位置にシグナルが検出されることにより、シクロフィリンＢを生産することが示される。

【０１５４】

（３－１１）　プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット、ヒトコラーゲンTypeIα1のＮ末端ノンヘリックス領域、N末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、C末端側ヘリックス領域１５残基、及び、C末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット、ヒトコラーゲンTypeIα2のＮ末端ノンヘリックス領域、N末端側ヘリックス領域２７残基、ヘリックス領域中央５２２残基２量体、C末端側ヘリックス領域１５残基、及び、C末端ノンヘリックス領域からなる融合ポリペプチド発現カセット、並びに、シクロフィリンＢ発現カセット導入酵母の作製

【０１５５】

（３－１１－１）　酵母の形質転換

エレクトロポレーション法により、０８０８０１－２－４株（実施例（３－４－１）参照）をpEXP-A-PER3 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－６）参照）、pEXP-A-AOX2 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－７）参照）、或は、pEXP-A-FLD1 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－８）参照）で形質転換する。

１００ｍｌのＹＰＤ液体培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、及び、２％グルコース）に０８０８０１－２－４株（実施例（３－４－１）を接種し、３０℃にて菌濁度（ＯＤ

$_{660}$）＝約１０となるまで培養する。培養液から菌体を回収し上清を取り除いた後、１ＭソルビトールにOD$_{660}$＝約１５０の濁度で懸濁し、菌体懸濁液を調製する。

１０μｇのpEXP-A-PER3 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－６）参照）、pEXP-A-AOX2 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－７）参照）、或は、pEXP-A-FLD1 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－８）参照）を制限酵素BglIIで切断する。エタノール沈殿でＤＮＡを回収し５μｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌに溶解してＤＮＡ溶液を調製する。

前記菌体懸濁液１００μｌと、前記ＤＮＡ溶液５μｌとを混ぜ混合液を調製する。当該混合液にエレクトロポレーション装置（ＥＣＭ６３０、ＢＴＸ）を用いてパルスを加えた後、ＭＤ寒天培地（１．３４％イーストナイトロジェンベース、４×１０$^{-5}$％ビオチン、２％グルコース、３００μｇ／ｍｌゼオシン、２％寒天、）上に広げ、３０℃にて４８時間培養する。ＭＤ寒天培地上に形成したコロニーを形質転換体として単離する。

【０１５６】

（３－１１－２）　シクロフィリンＢの発現検討

形質転換体（実施例（３－１１－１）参照）を、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した１００ｍｌのＢＭＧＹ培地[１％酵母エキス、２％ペプトン、１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、１％グリセロール]に植菌して、３０℃にて２４時間振とう培養する。得られた培養液から菌体を調製し、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した５０ｍｌのBMM培地［１００mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％ イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、０．５％メタノール］にＯＤ$_{660}$＝約１０の終濃度で植菌し、３０℃にて７２時間振とう培養する。この間、約１２時間おきに５０％メタノールを０．５ｍｌ添加する。

前記培養液から菌体を回収して上清を取り除いた後、マルチビーズショッカー（安井器械）を用い、酵母破砕条件（ガラスビーズ直径０．５ｍｍ、２５００ｒｐｍ、４０分）にて菌体を破砕する。得られた破砕液を遠心分離して菌体破砕液の上清を回収し、可溶性画分を調製する。

前記可溶性画分をサンプルバッファー（ナカライテスク）と混合し、１００℃で５分間保温した後、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動する。電気泳動装置はERICA-MP（DRC）、電気泳動ゲルは５～１５％グラジェントゲル（XV　PANTERA　MPゲル、DRC）を用い、２００Vで２０分間電気泳動する。電気泳動終了後、得られたアクリルアミドゲルを、ＰＶＤＦメンブレン（イモビロン－Ｐ、ミリポア）にエレクトロブロッティングする。ブロッティング装置はMINICA-MP（DRC）を用い、４０Vで３０分間行う。

得られたメンブランを用いてウェスタンブロッティングを行い、シクロフィリンＢを検出する。メンブランのブロッキングにはBlocking one（ナカライテスク）、抗体反応にはCan Get Signal（東洋紡）を用い、１次抗体としては抗シクロフィリンＢウサギ抗体（11607-1-AP、ProteinTech　Group）を２０００倍希釈に、２次抗体は坑ウサギ IgG-HRP Linked ロバ抗体（NA-934、GEヘルスケアバイオサイエンス）を１００００倍希釈に調製して用いる。２次抗体の検出はECL Western Blotting Detection System（GEヘルスケアバイオサイエンス）を用い化学発光で行う。化学発光はイメージアナライザー（LAS-3000UVmini、富士フィルム）で検出・定量する。シクロフィリンＢに相当する分子量の位置にシグナルが検出されることにより、シクロフィリンＢを生産することが示される。

【０１５７】

（３－１２）　プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット、ヒトコラーゲンTypeIIIα1発現カセット、及び、シクロフィリンＢ発現カセット導入酵母の作製

【０１５８】

（３－１２－１）　酵母の形質転換

エレクトロポレーション法により、０８０９１７－１－２株（実施例（３－５－１）参照）をpEXP-A-PER3 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－６）参照）、pEXP-A-AOX2 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－７）参照）、或は、pEXP-A-FLD1 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２

－２－８）参照）で形質転換する。
１００ｍｌのＹＰＤ液体培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、及び、２％グルコース）に０８０９１７－１－２株（実施例（３－５－１）参照）を接種し、３０℃にて菌濁度（OD_{660}）＝約１０となるまで培養する。培養液から菌体を回収し上清を取り除いた後、１ＭソルビトールにOD_{660}＝約１５０の濁度で懸濁し、菌体懸濁液を調製する。
１０μｇのpEXP-A-PER3 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－６）参照）、pEXP-A-AOX2 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－７）参照）、或は、pEXP-A-FLD1 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－８）参照）を制限酵素BglIIで切断する。エタノール沈殿でＤＮＡを回収し５μｌの１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌに溶解してＤＮＡ溶液を調製する。
前記菌体懸濁液１００μｌと、前記ＤＮＡ溶液５μｌとを混ぜ混合液を調製する。当該混合液にエレクトロポレーション装置（ＥＣＭ６３０、ＢＴＸ）を用いてパルスを加えた後、ＭＤ寒天培地（１．３４％イーストナイトロジェンベース、４×１０$^{-5}$％ビオチン、２％グルコース、３００μｇ／ｍｌゼオシン、２％寒天、）上に広げ、３０℃にて４８時間培養する。ＭＤ寒天培地上に形成したコロニーを形質転換体として単離する。
【０１５９】
（３－１２－２） シクロフィリンＢの発現検討
形質転換体（実施例（３－１２－１）参照）を、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した１００ｍｌのＢＭＧＹ培地[１％酵母エキス、２％ペプトン、１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、１％グリセロール]に植菌して、３０℃にて２４時間振とう培養する。得られた培養液から菌体を調製し、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した５０ｍｌのBMM培地［１００mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％ イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、０．５％メタノール］にOD_{660}＝約１０の終濃度で植菌し、３０℃にて７２時間振とう培養する。この間、約１２時間おきに５０％メタノールを０．５ｍｌ添加する。
前記培養液から菌体を回収して上清を取り除いた後、マルチビーズショッカー（安井器械）を用い、酵母破砕条件（ガラスビーズ直径０．５ｍｍ、２５００ｒｐｍ、４０分）にて菌体を破砕する。得られた破砕液を遠心分離して菌体破砕液の上清を回収し、可溶性画分を調製する。
前記可溶性画分をサンプルバッファー（ナカライテスク）と混合し、１００℃で５分間保温した後、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動する。電気泳動装置はERICA-MP（DRC）、電気泳動ゲルは５～１５％グラジェントゲル（XV PANTERA MPゲル、DRC）を用い、２００Vで２０分間電気泳動する。電気泳動終了後、得られたアクリルアミドゲルを、ＰＶＤＦメンブレン（イモビロン－Ｐ、ミリポア）にエレクトロブロッティングする。ブロッティング装置はMINICA-MP（DRC）を用い、４０Vで３０分間行う。
得られたメンブランを用いてウェスタンブロッティングを行い、シクロフィリンＢを検出する。メンブランのブロッキングにはBlocking one（ナカライテスク）、抗体反応にはCan Get Signal（東洋紡）を用い、１次抗体としては抗シクロフィリンＢウサギ抗体（11607-1-AP、ProteinTech Group）を２０００倍希釈に、２次抗体は坑ウサギ IgG-HRP Linked ロバ抗体（NA-934、GEヘルスケアバイオサイエンス）を１００００倍希釈に調製して用いる。２次抗体の検出はECL Western Blotting Detection System（GEヘルスケアバイオサイエンス）を用い化学発光で行う。化学発光はイメージアナライザー（LAS-3000UVmini、富士フィルム）で検出・定量する。シクロフィリンＢに相当する分子量の位置にシグナルが検出されることにより、シクロフィリンＢを生産することが示される。
【０１６０】
（３－１３） プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット、ヒトコラーゲンTypeIIα1発現カセット、及び、シクロフィリンＢ発現カセット導入酵母の作製
【０１６１】
（３－１３－１） 酵母の形質転換

エレクトロポレーション法により、プロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット、及び、ヒトコラーゲンTypeIIα1発現カセット導入酵母（実施例（３－６－１）参照）をpEXP-A-PER3 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－６）参照）、pEXP-A-AOX2 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－７）参照）、或は、pEXP-A-FLD1 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－８）参照）で形質転換する。

１００ｍｌのＹＰＤ液体培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、及び、２％グルコース）にプロリル－４－ヒドロキシラーゼα１サブユニット発現カセット、プロリル－４－ヒドロキシラーゼβサブユニット発現カセット、及び、ヒトコラーゲンTypeIIα1発現カセット導入酵母（実施例（３－６－１）参照）を接種し、３０℃にて菌濁度（OD_{660}）＝約１０となるまで培養する。培養液から菌体を回収し上清を取り除いた後、１ＭソルビトールにOD_{660}＝約１５０の濁度で懸濁し、菌体懸濁液を調製する。

１０μｇのpEXP-A-PER3 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－６）参照）、pEXP-A-AOX2 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－７）参照）、或は、pEXP-A-FLD1 Pro-CyPB ZeoR（実施例（２－２－８）参照）を制限酵素BglIIで切断する。エタノール沈殿でＤＮＡを回収し５μｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌに溶解してＤＮＡ溶液を調製する。

前記菌体懸濁液１００μｌと、前記ＤＮＡ溶液５μｌとを混ぜ混合液を調製する。当該混合液にエレクトロポレーション装置（ＥＣＭ６３０、ＢＴＸ）を用いてパルスを加えた後、ＭＤ寒天培地（１．３４％イーストナイトロジェンベース、４×１０$^{-5}$％ビオチン、２％グルコース、３００μｇ／ｍｌゼオシン、２％寒天、）上に広げ、３０℃にて４８時間培養する。ＭＤ寒天培地上に形成したコロニーを形質転換体として単離する。

【０１６２】

（３－１３－２）　シクロフィリンＢの発現検討

形質転換体（実施例（３－１６－１）参照）を、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した１００ｍｌのＢＭＧＹ培地[１％酵母エキス、２％ペプトン、１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、１％グリセロール]に植菌して、３０℃にて２４時間振とう培養する。得られた培養液から菌体を調製し、５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した５０ｍｌのBMM培地［１００mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％ イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、０．５％メタノール］にOD_{660}＝約１０の終濃度で植菌し、３０℃にて７２時間振とう培養する。この間、約１２時間おきに５０％メタノールを０．５ｍｌ添加する。

前記培養液から菌体を回収して上清を取り除いた後、マルチビーズショッカー（安井器械）を用い、酵母破砕条件（ガラスビーズ直径０．５ｍｍ、２５００ｒｐｍ、４０分）にて菌体を破砕する。得られた破砕液を遠心分離して菌体破砕液の上清を回収し、可溶性画分を調製する。

前記可溶性画分をサンプルバッファー（ナカライテスク）と混合し、１００℃で５分間保温した後、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動する。電気泳動装置はERICA-MP（DRC）、電気泳動ゲルは５～１５％グラジェントゲル（XV　PANTERA　MPゲル、DRC）を用い、２００Vで２０分間電気泳動する。電気泳動終了後、得られたアクリルアミドゲルを、ＰＶＤＦメンブレン（イモビロン－Ｐ、ミリポア）にエレクトロブロッティングする。ブロッティング装置はMINICA-MP（DRC）を用い、４０Vで３０分間行う。

得られたメンブランを用いてウェスタンブロッティングを行い、シクロフィリンＢを検出する。メンブランのブロッキングにはBlocking one（ナカライテスク）、抗体反応にはCan Get Signal（東洋紡）を用い、１次抗体としては抗シクロフィリンＢウサギ抗体（11607-1-AP、ProteinTech　Group）を２０００倍希釈に、２次抗体は坑ウサギ IgG-HRP Linked ロバ抗体（NA-934、GEヘルスケアバイオサイエンス）を１００００倍希釈に調製して用いる。２次抗体の検出はECL Western Blotting Detection System（GEヘルスケアバイオサイエンス）を用い化学発光で行う。化学発光はイメージアナライザー（LAS-3000UVmini、富士フィルム）で検出・定量する。シクロフィリンＢに相当する分子量の位置にシグ

ナルが検出されることにより、シクロフィリンＢを生産することが示される。

【０１６３】

実施例４　（コラーゲンの調製）（その１）

【０１６４】

（４－１）　酵母の培養及び菌体の調製（その１）

０７０３２７－１－１１株（実施例（３－２－１）参照）、０８１０２４－５－１株（実施例（３－７－１）参照）、０８１０２４－６－１株（実施例（３－８－１）参照）を５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した１００ｍｌのＢＭＧＹ培地[１％酵母エキス、２％ペプトン、１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％イーストナイトロジェンベース（Difco）、４×１０$^{-5}$％ビオチン、１％グリセロール]に植菌し、３０℃にて振とう培養し、２４時間前培養を行った。

３Ｌ容量のファーメンター（型式：BMS-03P1、エイブル）に０．８ＬのＢａｓａｌ　ｓａｌｔ培地を調製した。前培養液を終濃度OD_{660}＝約１．２５となる様に植菌し、通気攪拌して本培養を開始した。

本培養は、培養温度３０℃、最大通気量を０．８ｖｖｍ（０．８Ｌ）、攪拌速度８００pmに設定して開始した。培地中のグリセロールがすべて消費され、酸素消費量が低下した時点より、約１５g/hの速度でグリセロール流加培地（５０％グリセロール、１．２％PMT１溶液）の流加を開始した。グリセロール流加は培養液のOD_{660}＝約４００となった時点で停止した。その後、メタノール流加培地［９８．６％（Ｗ／Ｖ）メタノール、１．２％ＰＭＴ１溶液］の添加を開始しメタノール流加培養を行った。メタノール流加開始後、培養温度を３２℃に変更し、溶存酸素量を約８ｐｐｍとなるよう制御した。また、培養期間を通じて培養液のｐＨは２８％アンモニア水、及び、４Ｍリン酸を用いてｐＨ＝約５．０に定値制御した。約１３６時間の培養により０７０３２７－１－１１株の培養液が１６９６ｇ、０８１０２４－５－１株の培養液が１５６８ｇ、及び、０８１０２４－６－１株の培養液が１５８９ｇ得られた。以下に用いた培地の組成を示す。

（Ｂａｓａｌ　ｓａｌｔ培地の組成）

（ａ）８５％H_3PO_4　・・・２６．７ｍＬ／Ｌ

（ｂ）$CaSO_4 \cdot 2H_2O$　・・・０．９３ｇ／Ｌ

（ｃ）K_2SO_4　・・・１８．２ｇ／Ｌ

（ｄ）$MgSO_4 \cdot 7H_2O$　・・・１４．９ｇ／Ｌ

（ｅ）ＫＯＨ　・・・４．１３ｇ／Ｌ

（ｆ）グリセロール　・・・４０ｇ／Ｌ

前記成分を混合後、オートクレーブ滅菌した。２８％アンモニア水でｐＨを５．０に調製した後、ＰＭＴ１溶液を培地１L当り２ｍｌ、消泡剤メタノール溶液（１２．５％アデカノールＬＧ２９５Ｓ）を培地１L当り１ｍ添加した。

（ＰＭＴ１溶液の組成）

（ａ）$CuSO_4 \cdot 5H_2O$　・・・６．０ｇ／Ｌ

（ｂ）ＫＩ　・・・０．８ｇ／Ｌ

（ｃ）$MnSO_4 \cdot H_2O$　・・・３．０ｇ／Ｌ

（ｄ）$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$　・・・０．２ｇ／Ｌ

（ｅ）H_3BO_3　・・・０．２ｇ

（ｆ）$CaSO_4 \cdot 2H_2O$　・・・０．５ｇ／Ｌ

（ｇ）$ZnCl_2$　・・・２０ｇ／Ｌ

（ｈ）$FeSO_4 \cdot 7H_2O$　・・・６５ｇ／Ｌ

（ｉ）ビオチン　・・・０．２ｇ／Ｌ

（ｊ）濃硫酸　・・・５mL／Ｌ

前記培養液を５０００ｒｐｍ、４℃で１０分間遠心分離して菌体を回収した。培地成分を取り除くため前記菌体をリン酸カリウム緩衝液（５０ｍＭ、ｐＨ６．０）に懸濁した後、懸濁液を遠心分離して菌体を回収した。この作業を合計２回繰り返し、菌体を調製した。０７０３２７－１－１１株の菌体が６３２．６ｇ、０８１０２４－５－１株の菌体が５

８３．５ｇ、及び、０８１０２４－６－１株の菌体が５９９．１ｇ得られた。

【０１６５】

（４－２）　コラーゲンの抽出・精製）（その１）

０７０３２７－１－１１株（実施例（４－１）参照）の菌体６００ｇ、０８１０２４－５－１株（実施例（４－１）参照）の菌体５８３．５ｇ、及び、０８１０２４－６－１株（実施例（４－１）参照）の菌体５９９．１ｇを破砕してコラーゲンを抽出・精製した。菌体の破砕はダイノミル（DYNO-MILL TypeKDL-A、WILLY A.BACHOFEN AG製）を用いて行った。

前記菌体を４０％（W/W）の濃度でリン酸カリウム緩衝液（５０ｍＭ、ｐＨ６．０）に懸濁し、懸濁液を調製した。送液ポンプを用いて、酵母用の条件に設定したダイノミルに前記懸濁液を４０００g／時間の速度で送り込んで懸濁液を破砕した。

リン酸カリウム緩衝液（５０ｍＭ、ｐＨ６．０）を加えて菌体破砕液の濃度を１／２に希釈した。終濃度０．２Nで濃塩酸を用えてｐＨを強酸性（ｐＨ１．５以下）に調整した。終濃度５ｍｇ／ｍｌとなるようペプシン（Ｐ７０００、SIGMA）を添加した後、前記菌体破砕液を攪拌しながら４℃で保温した。約９６時間後、前記菌体破砕液を９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離し、不溶性の画分を除去して上清を調製した。前記上清に１０ＮのＮａＯＨを添加してｐＨを約１０に調整した後、攪拌しながら４℃で保温した。約１６時間後、前記上清を９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離し、不溶性の画分を除去して上清を調製した。

前記上清に終濃度０．５Ｍとなるように酢酸を添加し、濃塩酸を用いてｐＨを３．０に調整した後、攪拌しながら４℃で保温した。約１６時間後、前記上清を９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離し、不溶性の画分を除去して上清を調製した。前記上清に終濃度１ＭでＮａＣｌを溶解した後、攪拌しながら４℃に保温した。約１６時間後、前記上清を９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離し、不溶性の画分を回収した。前記不溶性の画分に０．１NのＨＣｌを添加した後、攪拌しながら４℃で保温して溶解液を調製した。約１６時間後、前記溶解液を９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離し、不溶性の画分を除去して上清を調製した。

前記上清に終濃度が０．０５Ｍとなるように１Ｍリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．４）を添加した後、１０ＮのＮａＯＨを用いてｐＨを約７．４に調整した。終濃度４ＭでＮａＣｌを溶解した後、攪拌しながら４℃で保温した。約１６時間後、９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離して不溶性の画分を回収した。前記不溶性の画分の重量の２．８倍の重量の０．１NHＣｌを添加した後、攪拌しながら４℃で保温した。約１６時間後、９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離して不溶性の画分を回収した。前記不溶性の画分に０．１NのＨＣｌを添加して攪拌しながら４℃で保温して溶解液を調製した。約１６時間後、前記溶解液を９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離し、不溶性の画分を除去して上清を調製した。

前記上清に終濃度が０．５Ｍとなるように酢酸を添加し、濃塩酸を用いてｐＨを約３．０に調整した。前記上清に終濃度２ＭでＮａＣｌを溶解した後、攪拌しながら４℃で保温した。約１６時間後、前記上清を９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離して、不溶性の画分を回収した。前記不溶性の画分に０．１ＮのＨＣｌを添加した後、攪拌しながら４℃で保温して溶解液を調製した。約１６時間後、前記溶解液を９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離し、不溶性の画分を除去して上清を調製した。

前記上清を透析チューブ（Spectra/Por　１３２６６５、SPECTUM　LABORATORIES）に入れ、１０倍容量の１ｍＭ　ＨＣｌ溶液に対する透析を３回行なった後、０．２２μｍのフィルター（Millex GP、ミリポア）を用いてろ過した。０７０３２７－１－１１株の菌体から６７．６ｇ、０８１０２４－５－１株の菌体から５７．０ｇ、及び、０８１０２４－６－１株の菌体から４６．８ｇの精製コラーゲン溶液が得られた。

【０１６６】

実施例５　（精製コラーゲン溶液の分析）（その１）

【０１６７】

（５－１）　精製コラーゲン溶液のコラーゲンTypeI濃度測定（その１）
ヒトコラーゲンTypeIをFibroGenより入手した。BCAプロテインアッセイキット（Thermo Fisher Scientific）を用い、ヒトコラーゲンTypeIを標品として精製コラーゲン溶液のヒトコラーゲンTypeI濃度を測定した。０７０３２７－１－１１株（実施例（４－１）参照）の菌体から得られた精製コラーゲン溶液のコラーゲンTypeI濃度は４．８９ｍｇ／ｍｌ、０８１０２４－５－１株（実施例（４－１）参照）の菌体から得られた精製コラーゲン溶液のコラーゲンTypeI濃度は４．９４ｍｇ／ｍｌ、及び、０８１０２４－６－１株（実施例（４－１）参照）の菌体から得られた精製コラーゲン溶液のコラーゲンTypeI濃度は６．１２ｍｇ／ｍｌであった。

【０１６８】

（５－２）　フェノール・硫酸法による中性糖数の定量（その１）
６．２５μｇ／ｍｌ、１２．５μｇ／ｍｌ、２５．０μｇ／ｍｌ、５０．０μｇ／ｍｌ、１００μｇ／ｍｌのマンノース水溶液を調製した。ガラス試験管に、０．２ｇの前記マンノース水溶液または精製コラーゲン溶液を分取した。０．２ｍｌの５％（Ｗ／Ｗ）のフェノール水溶液を加えて混合した後、1mlの濃硫酸を滴下した。室温に40分間静置して呈色させた後、吸光度（OD_{490}）を測定した。マンノース溶液の吸光度から検量線を作成し、検量線から精製コラーゲン溶液の中性糖濃度をマンノース換算の値として算出した。得られた値から、コラーゲンTypeI　１分子あたりの中性糖数を算出した。マンノースの分子量は１８０、コラーゲンTypeIの分子量は３１８８００として算出を行った。０７０３２７－１－１１株（実施例（４－１）参照）の菌体から得られた精製コラーゲン溶液では中性糖数は１５．４、０８１０２４－５－１株（実施例（４－１）参照）の菌体から得られた精製コラーゲン溶液では中性糖数は１０．７、及び、０８１０２４－６－１株（実施例（４－１）参照）の菌体から得られた精製コラーゲン溶液では中性糖数は１１．８であった。

【０１６９】

実施例６　（コラーゲンの調製）（その２）

【０１７０】

（６－１）　酵母の培養及び菌体の調製（その２）
形質転換体［実施例（３－９－１）、実施例（３－１０－１）、実施例（３－１１－１）、実施例（３－１２－１）、及び、実施例（３－１３－１）参照］を５００ｍｌのバッフル付き三角フラスコに調製した１００ｍｌのＢＭＧＹ培地[１％酵母エキス、２％ペプトン、１００ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、１．３４％イーストナイトロジェンベース（Difco）、4×10^{-5}％ビオチン、１％グリセロール]に植菌し、３０℃にて振とう培養し、２４時間前培養を行う。
３Ｌ容量のファーメンター（型式：BMS-03P1、エイブル）に０．８ＬのＢａｓａｌ　ｓａｌｔ培地を調製する。前培養液を終濃度OD_{660}＝約１．２５となる様に植菌し、通気攪拌して本培養を開始する。
本培養は、培養温度３０℃、最大通気量を０．８ｖｖｍ（０．８Ｌ）、攪拌速度８００pmに設定して開始する。培地中のグリセロールがすべて消費され、酸素消費量が低下した時点より、約１５g/hの速度でグリセロール流加培地（５０％グリセロール、１．２％PMT１溶液）の流加を開始する。グリセロール流加は培養液のOD_{660}＝約１３０となった時点で停止する。その後、メタノール流加培地［９８．６％（Ｗ／Ｖ）メタノール、１．２％ＰＭＴ１溶液］の添加を開始しメタノール流加培養を行う。メタノール流加開始後、培養温度を３２℃に変更し、溶存酸素量を約８ｐｐｍとなるよう制御する。また、培養期間を通じて培養液のｐＨは２８％アンモニア水、及び、４Ｍリン酸を用いてｐＨ＝約５．０に定値制御する。約１３６時間の培養により培養液を得る。以下に用いた培地の組成を示す。
（Ｂａｓａｌ　ｓａｌｔ培地の組成）
（ａ）８５％H_3PO_4　・・・２６．７ｍＬ／Ｌ
（ｂ）$CaSO_4\cdot2H_2O$　・・・０．９３ｇ／Ｌ

（ｃ）K_2SO_4　・・・１８．２ｇ／Ｌ
（ｄ）$MgSO_4 \cdot 7H_2O$　・・・１４．９ｇ／Ｌ
（ｅ）ＫＯＨ　・・・４．１３ｇ／Ｌ
（ｆ）グリセロール　・・・４０ｇ／Ｌ
前記成分を混合後、オートクレーブ滅菌する。２８％アンモニア水でｐＨを５．０に調製した後、ＰＭＴ１溶液を培地１Ｌ当り２ｍｌ、消泡剤メタノール溶液（１２．５％アデカノールＬＧ２９５Ｓ）を培地１Ｌ当り１ｍ添加する。
（ＰＭＴ１溶液の組成）
（ａ）$CuSO_4 \cdot 5H_2O$　・・・６．０ｇ／Ｌ
（ｂ）ＫＩ　・・・０．８ｇ／Ｌ
（ｃ）$MnSO_4 \cdot H_2O$　・・・３．０ｇ／Ｌ
（ｄ）$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$　・・・０．２ｇ／Ｌ
（ｅ）H_3BO_3　・・・０．２ｇ
（ｆ）$CaSO_4 \cdot 2H_2O$　・・・０．５ｇ／Ｌ
（ｇ）$ZnCl_2$　・・・２０ｇ／Ｌ
（ｈ）$FeSO_4 \cdot 7H_2O$　・・・６５ｇ／Ｌ
（ｉ）ビオチン　・・・０．２ｇ／Ｌ
（ｊ）濃硫酸　・・・５mL／Ｌ
前記培養液を５０００ｒｐｍ、４℃で１０分間遠心分離して菌体を回収する。培地成分を取り除くため前記菌体をリン酸カリウム緩衝液（５０ｍＭ、ｐＨ６．０）に懸濁した後、懸濁液を遠心分離して菌体を回収する。この作業を合計２回繰り返し、形質転換体［実施例（３－９－１）、実施例（３－１０－１）、実施例（３－１１－１）、実施例（３－１２－１）、及び、実施例（３－１３－１）参照］の菌体を調製する。
【０１７１】
（６－２）　コラーゲンの抽出・精製（その２）
形質転換体［実施例（３－９－１）、実施例（３－１０－１）、実施例（３－１１－１）、実施例（３－１２－１）、及び、実施例（３－１３－１）参照］の菌体を破砕してコラーゲンを抽出・精製する。菌体の破砕はダイノミル（DYNO-MILL TypeKDL-A、WILLY A.BACHOFEN AG製）を用いて行う。
前記菌体を２０％（W/W）の濃度でリン酸カリウム緩衝液（５０ｍＭ、ｐＨ６．０）に懸濁し、懸濁液を調製する。送液ポンプを用いて、酵母用の条件に設定したダイノミルに前記懸濁液を４０００g／時間の速度で送り込んで懸濁液を破砕する。
リン酸カリウム緩衝液（５０ｍＭ、ｐＨ６．０）を加えて菌体破砕液の濃度を１／２に希釈する。終濃度０．２Nで濃塩酸を用えてｐＨを強酸性（ｐＨ１．５以下）に調整する。終濃度５ｍｇ／ｍｌとなるようペプシン（Ｐ７０００、シグマ）を添加した後、前記菌体破砕液を攪拌しながら４℃で保温する。約９６時間後、前記菌体破砕液を９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離し、不溶性の画分を除去して上清を調製する。前記上清に１０ＮのＮａＯＨを添加してｐＨを約１０に調整した後、攪拌しながら４℃で保温する。約１６時間後、前記上清を９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離し、不溶性の画分を除去して上清を調製する。
前記上清に終濃度０．５Ｍとなるように酢酸を添加し、濃塩酸を用いてｐＨを３．０に調整した後、攪拌しながら４℃で保温する。約１６時間後、前記上清を９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離し、不溶性の画分を除去して上清を調製する。前記上清に終濃度１ＭでＮａＣｌを溶解した後、攪拌しながら４℃に保温する。約１６時間後、前記上清を９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離し、不溶性の画分を回収する。前記不溶性の画分に０．１NのＨＣｌを添加した後、攪拌しながら４℃で保温して溶解液を調製する。約１６時間後、前記溶解液を９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離し、不溶性の画分を除去して上清を調製する。
前記上清に終濃度が０．０５Ｍとなるように１Ｍリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．４）を添加した後、１０ＮのＮａＯＨを用いてｐＨを約７．４に調整する。終濃度４ＭでＮａ

Ｃｌを溶解した後、攪拌しながら４℃で保温する。約１６時間後、９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離して不溶性の画分を回収する。前記不溶性の画分に０．１ＮＨＣｌを添加した後、攪拌しながら４℃で保温して溶解液を調製する。約１６時間後、前記溶解液を９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離し、不溶性の画分を除去して上清を調製する。

前記上清に終濃度が０．５Ｍとなるように酢酸を添加し、濃塩酸を用いてｐＨを約３．０に調整する。前記上清に終濃度２ＭでＮａＣｌを溶解した後、攪拌しながら４℃で保温する。約１６時間後、前記上清を９０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心分離して、不溶性の画分を回収する。前記不溶性の画分に０．１Ｎの ＨＣｌを添加した後、攪拌しながら４℃で保温して溶解液を調製する。

前記溶解液を透析チューブ（Spectra/Por １３２６６５、SPECTUM LABORATORIE）に入れ、１０倍量の１ｍＭ ＨＣｌ溶液に対する透析を３回行った後、０．２２μｍのフィルター（Millex GP、ミリポア）を用いてろ過することにより精製コラーゲン溶液を得る。

【０１７２】

実施例７ （精製コラーゲン溶液の分析）（その２）

【０１７３】

（７－１） 精製コラーゲン溶液のコラーゲン濃度測定（その２）

ヒトコラーゲンTypeIをFibroGenより入手する。BCAプロテインアッセイキット（Thermo Fisher Scientific）を用い、ヒトコラーゲンTypeIを標品として精製コラーゲン溶液（実施例（６－２）参照）のコラーゲン濃度を測定する。

【０１７４】

（７－２） フェノール・硫酸法による中性糖数の定量（その２）

６．２５μｇ／ｍｌ、１２．５μｇ／ｍｌ、２５．０μｇ／ｍｌ、５０．０μｇ／ｍｌ、１００μｇ／ｍｌのマンノース水溶液を調製する。ガラス試験管に、０．２ｇの前記マンノース水溶液または精製コラーゲン溶液（実施例（６－２）参照）を分取する。０．２ｍｌの５％（Ｗ／Ｗ）のフェノール水溶液を加えて混合した後、1mlの濃硫酸を滴下する。室温に40分間静置して呈色させた後、吸光度（OD_{490}）を測定する。マンノース溶液の吸光度から検量線を作成し、検量線から精製コラーゲン溶液の中性糖濃度をマンノース換算の値として算出する。得られた値から、コラーゲン １分子あたりの中性糖数を算出する。

【産業上の利用可能性】

【０１７５】

本発明により、医薬品、工業製品、化粧品、食品等として商業的に一層価値がある高性能な多用途素材となるようなグリシン繰り返し配列タンパク質を、本来の物性が損なわれない状態で生産する形質転換体、及び、当該形質転換体を用いてグリシン繰り返し配列タンパク質を取得する方法等が提供可能となる。

【配列表フリーテキスト】

【０１７６】

配列番号：１に記載される塩基配列は、his4のクローニングのためのプライマー
配列番号：２に記載される塩基配列は、his4のクローニングのためのプライマー
配列番号：３に記載される塩基配列は、arg4のクローニングのためのプライマー
配列番号：４に記載される塩基配列は、arg4のクローニングのためのプライマー
配列番号：５に記載される塩基配列は、aox1プロモーターのクローニングのためのプライマー
配列番号：６に記載される塩基配列は、aox1プロモーターのクローニングのためのプライマー
配列番号：７に記載される塩基配列は、per3プロモーターのクローニングのためのプライマー
配列番号：８に記載される塩基配列は、per3プロモーターのクローニングのためのプライ

マー
配列番号：９に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたper3プロモーターのクローニングのためのプライマー
配列番号：１０に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたper3プロモーターのクローニングのためのプライマー
配列番号：１１に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたaox2プロモーターのクローニングのためのプライマー
配列番号：１２に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたaox2プロモーターのクローニングのためのプライマー
配列番号：１３に記載される塩基配列は、fld1プロモーターのクローニングのためのプライマー
配列番号：１４に記載される塩基配列は、fld1プロモーターのクローニングのためのプライマー
配列番号：１５に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたfld1プロモーターのクローニングのためのプライマー
配列番号：１６に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたfld1プロモーターのクローニングのためのプライマー
配列番号：１７に記載される塩基配列は、aox1ターミネーターのクローニングのためのプライマー
配列番号：１８に記載される塩基配列は、aox1ターミネーターのクローニングのためのプライマー
配列番号：１９に記載される塩基配列は、aox1 3'非コーディング領域のクローニングのためのプライマー
配列番号：２０に記載される塩基配列は、aox1 3'非コーディング領域のクローニングのためのプライマー
配列番号：２１に記載される塩基配列は、αファクターのクローニングのためのプライマー
配列番号：２２に記載される塩基配列は、αファクターのクローニングのためのプライマー
配列番号：２３に記載される塩基配列は、ヒトcol1a1のクローニングのためのプライマー
配列番号：２４に記載される塩基配列は、ヒトcol1a1のクローニングのためのプライマー
配列番号：２５に記載される塩基配列は、ヒトcol1a2のクローニングのためのプライマー
配列番号：２６に記載される塩基配列は、ヒトcol1a2のクローニングのためのプライマー
配列番号：２７に記載される塩基配列は、ヒトcol3a1のクローニングのためのプライマー
配列番号：２８に記載される塩基配列は、ヒトcol3a1のクローニングのためのプライマー
配列番号：２９に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたaox1ターミネーターのクローニングのためのプライマー
配列番号：３０に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたaox1ターミネーターのクローニングのためのプライマー
配列番号：３１に記載される塩基配列は、psn005構築のためのリンカー１
配列番号：３２に記載される塩基配列は、psn005構築のためのリンカー１
配列番号：３３に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたα遺伝子のシグナル配列及びプロ配列をコードするＤＮＡを含有する発現ベクター構築のためのプライマー
配列番号：３４に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたα遺伝子のシグナル配列及びプロ配列をコードするＤＮＡを含有する発現ベクター構築のためのプライマー
配列番号：３５に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたp4hbのクローニングのためのプライマー
配列番号：３６に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたp4hbのクローニングのためのプライマー
配列番号：３７に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加された発現ユニットのク

ローニングのためのプライマー
配列番号：３８に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加された発現ユニットのクローニングのためのプライマー
配列番号：３９に記載される塩基配列は、psn007構築のためのリンカー３
配列番号：４０に記載される塩基配列は、psn007構築のためのリンカー３
配列番号：４１に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたp4ha1のクローニングのためのプライマー
配列番号：４２に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたp4ha1のクローニングのためのプライマー
配列番号：４３に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加された発現ユニットのクローニングのためのプライマー
配列番号：４４に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたarg4のクローニングのためのプライマー
配列番号：４５に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたarg4のクローニングのためのプライマー
配列番号：４６に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたhsp47遺伝子のクローニングのためのプライマー
配列番号：４７に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたhsp47遺伝子のクローニングのためのプライマー
配列番号：４８に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたzeor遺伝子のクローニングのためのプライマー
配列番号：４９に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたzeor遺伝子のクローニングのためのプライマー
配列番号：５０に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたhis4のクローニングのためのプライマー
配列番号：５１に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたhis4のクローニングのためのプライマー
配列番号：５２に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたaox1 3'非コーディング領域のクローニングのためのプライマー
配列番号：５３に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたaox1 3'非コーディング領域のクローニングのためのプライマー
配列番号：５４に記載される塩基配列は、psn006構築のためのリンカー３
配列番号：５５に記載される塩基配列は、psn006構築のためのリンカー３
配列番号：５６に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加された発現ユニットのクローニングのためのプライマー
配列番号：５７に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加された発現ユニットのクローニングのためのプライマー
配列番号：５８に記載される塩基配列は、ヒトcol1a1のサブクローニングのためのプライマー
配列番号：５９に記載される塩基配列は、ヒトcol1a1のサブクローニングのためのプライマー
配列番号：６０に記載される塩基配列は、ヒトcol1a2のサブクローニングのためのプライマー
配列番号：６１に記載される塩基配列は、ヒトcol1a2のサブクローニングのためのプライマー
配列番号：６２に記載される塩基配列は、ヒトcol1a1のサブクローニングのためのプライマー
配列番号：６３に記載される塩基配列は、ヒトcol1a1のサブクローニングのためのプライマー
配列番号：６４に記載される塩基配列は、ヒトcol1a1のサブクローニングのためのプライ

マー
配列番号：６５に記載される塩基配列は、ヒトcol1a1のサブクローニングのためのプライマー
配列番号：６６に記載される塩基配列は、ヒトcol1a1のサブクローニングのためのプライマー
配列番号：６７に記載される塩基配列は、ヒトcol1a2のサブクローニングのためのプライマー
配列番号：６８に記載される塩基配列は、ヒトcol1a2のサブクローニングのためのプライマー
配列番号：６９に記載される塩基配列は、ヒトcol1a2のサブクローニングのためのプライマー
配列番号：７０に記載される塩基配列は、ヒトcol1a2のサブクローニングのためのプライマー
配列番号：７１に記載される塩基配列は、ヒトcol1a2のサブクローニングのためのプライマー
配列番号：７２に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたヒトcol3a1のサブクローニングのためのプライマー
配列番号：７３に記載される塩基配列は、制限酵素サイトが付加されたヒトcol3a1のサブクローニングのためのプライマー
配列番号：７６に記載される塩基配列は、酵母最適化コドンを有するヒトシクロフィリンＣにおけるＯＲＦの合成ＤＮＡ
配列番号：７８に記載される塩基配列は、酵母最適化コドンを有するヒトシクロフィリンＣにおけるＯＲＦの合成ＤＮＡ
配列番号：９８に記載される塩基配列は、酵母最適化コドンを有するヒトコラーゲンにおけるＯＲＦの合成ＤＮＡ
配列番号：１００に記載される塩基配列は、酵母最適化コドンを有するヒトコラーゲンType Ｉ α 2前駆体におけるＯＲＦの合成ＤＮＡ
配列番号：１０２に記載される塩基配列は、酵母最適化コドンを有するヒトコラーゲンType II α 1前駆体におけるＯＲＦの合成ＤＮＡ
配列番号：１０４に記載される塩基配列は、酵母最適化コドンを有するヒトコラーゲンType III α 1前駆体におけるＯＲＦの合成ＤＮＡ
配列番号：１１２に記載される塩基配列は、ゼオシン（TM）耐性カセットのための合成ＤＮＡ

【図１】

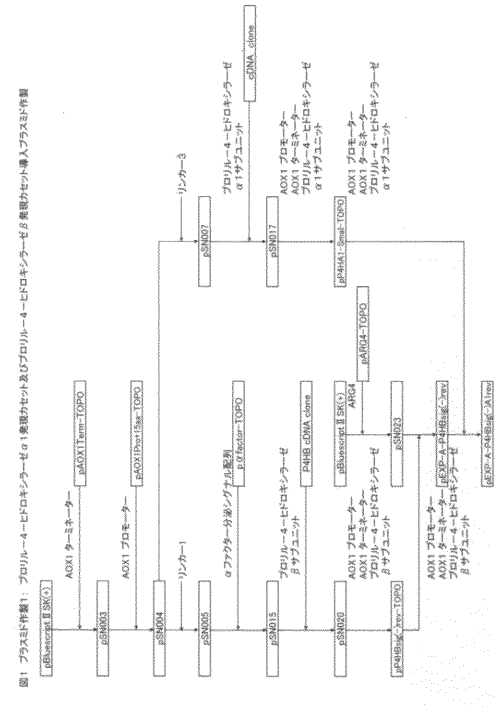


図1 プラスミド作製1： プロリル－4－ヒドロキシラーゼα1発現カセット及びプロリル－4－ヒドロキシラーゼβ発現カセット導入プラスミド作製

【図２】

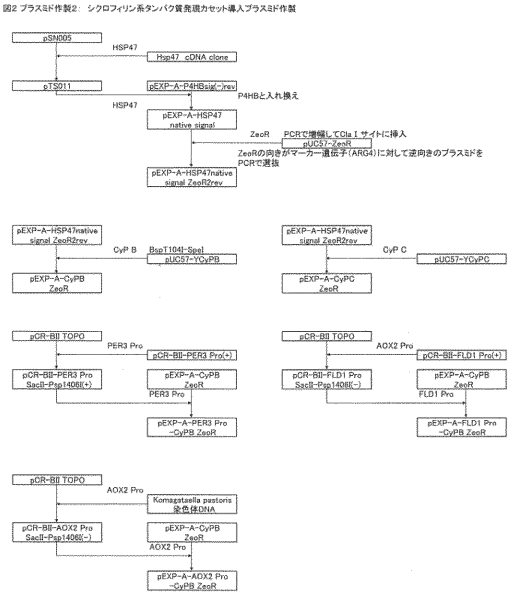


図2 プラスミド作製2： シクロフィリン系タンパク質発現カセット導入プラスミド作製

【図３】

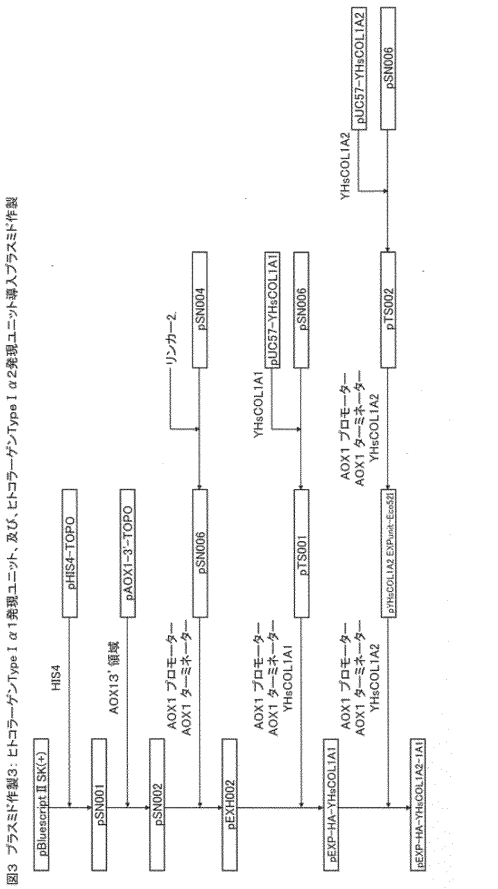


図3 プラスミド作製3：ヒトコラーゲンType Ⅰα1発現ユニット、及び、ヒトコラーゲンType Ⅰα2発現ユニット導入プラスミド作製

【図４】

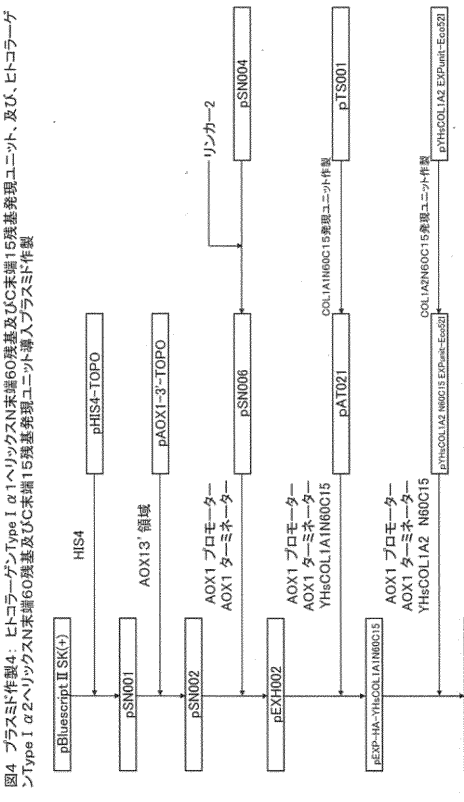


図4 プラスミド作製4：ヒトコラーゲンType Ⅰα1ヘリックスN末端60残基及びC末端15残基発現ユニット、及び、ヒトコラーゲンType Ⅰα2ヘリックスN末端60残基及びC末端15残基発現ユニット導入プラスミド作製

【図５】

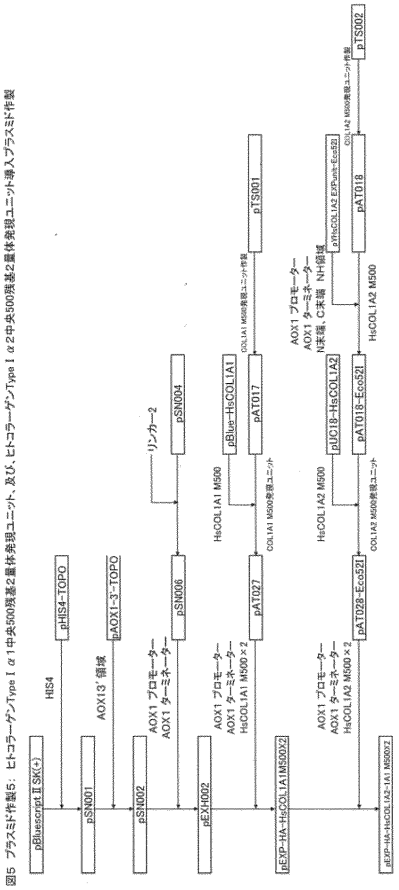


図5 プラスミド作製5：ヒトコラーゲンTypeⅠα1中央500残基2量体発現ユニット、及び、ヒトコラーゲンTypeⅠα2中央500残基2量体発現ユニット導入プラスミド作製

【図６】

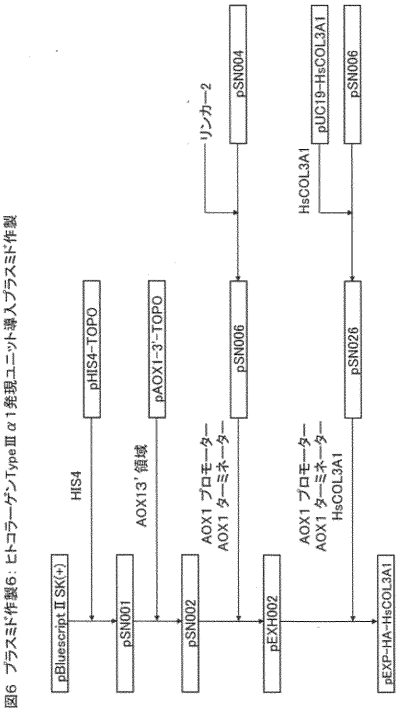


図6 プラスミド作製6：ヒトコラーゲンTypeⅢα1発現ユニット導入プラスミド作製

【図７】

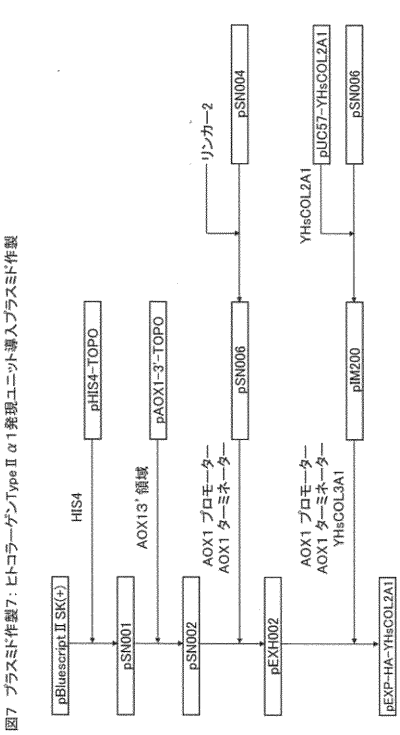
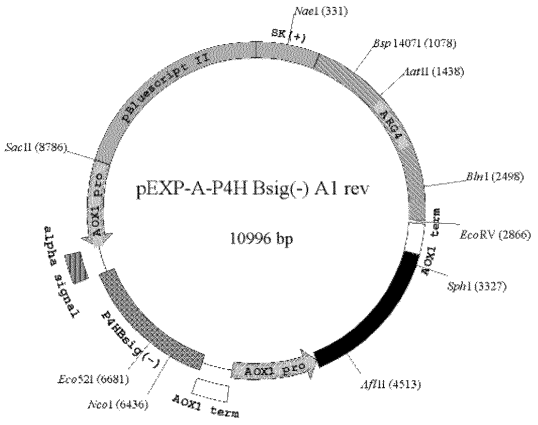
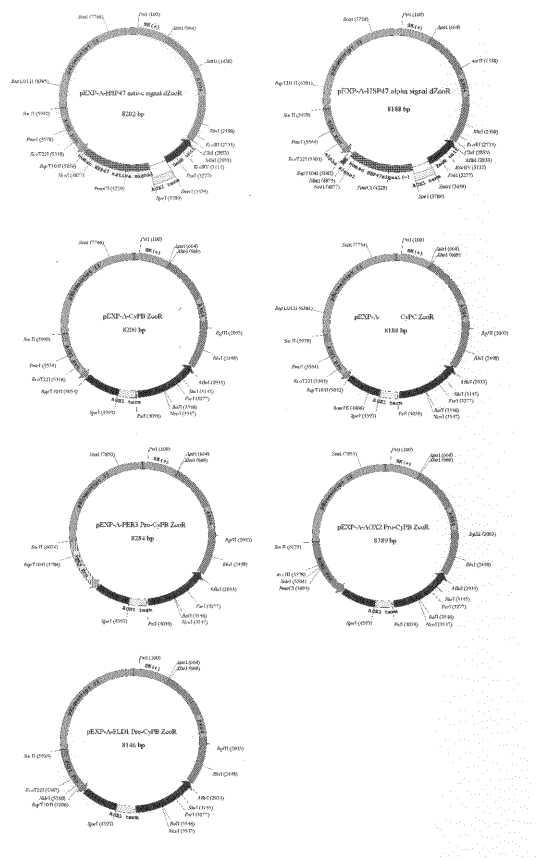


図7 プラスミド作製7：ヒトコラーゲンTypeⅡα1発現ユニット導入プラスミド作製

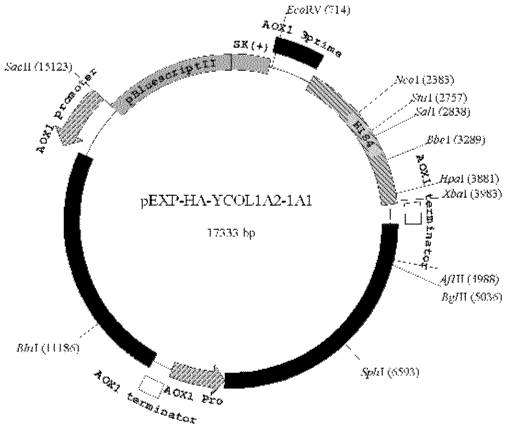
【図８】



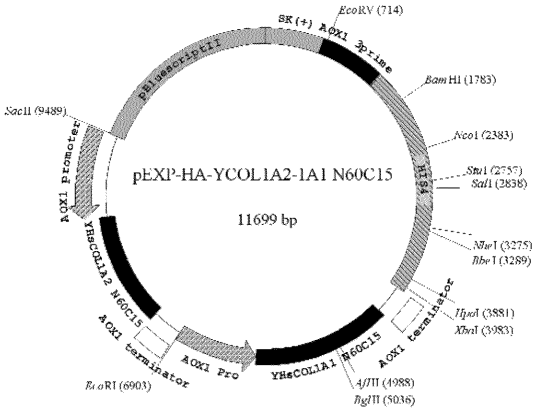
【図９】



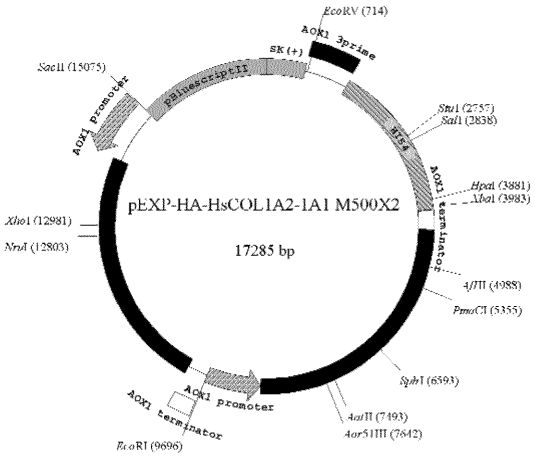
【図１０】



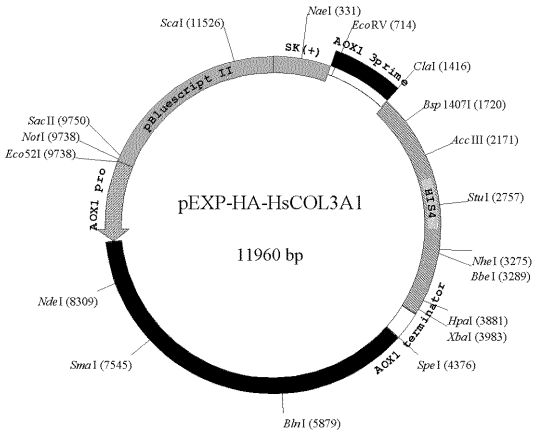
【図１１】



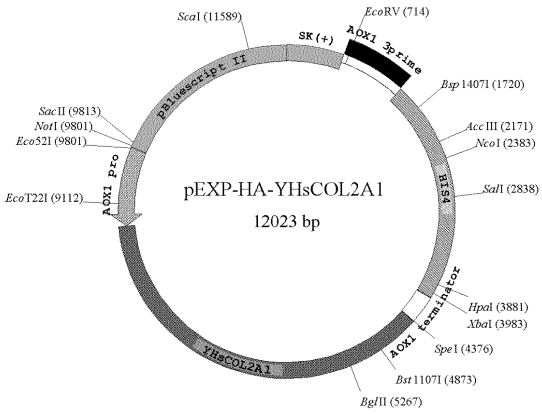
【図１２】



【図１３】



【図１４】



【配列表】
2011190210000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｐ 21/02 (2006.01)	Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ

(72)発明者 西尾 昌一
大阪市此花区春日出中三丁目１番９８号 住友化学株式会社内

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA03 AA05 AA20 BA08 BA80 CA04 CA05 CA06 CA09
CA10 DA06 DA12 EA04 FA02 FA07 FA10 GA11 GA19 HA03
HA08 HA14
4B050 CC03 DD11 LL01 LL02
4B064 AG01 CA06 CA19 CC24 DA01 DA10 DA20
4B065 AA72X AA72Y AA90Y AA93Y AB01 AC14 BA02 BA25 CA24 CA28
CA41 CA44 CA50
4H045 AA10 AA20 BA10 CA40 EA01 EA15 EA20 FA72 FA74