【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】令和7年3月31日(2025.3.31)

【公開番号】特開2025-3991(P2025-3991A)
【公開日】令和7年1月14日(2025.1.14)
【年通号数】公開公報(特許)2025-006
【出願番号】特願2024-158832(P2024-158832)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　1/19(2006.01)
Ｃ１２Ｐ 21/02(2006.01)
Ｃ１２Ｎ 15/81(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　1/19　　ＺＮＡ
Ｃ１２Ｐ 21/02　　Ｃ
Ｃ１２Ｎ 15/81　１００Ｚ
Ｃ１２Ｎ　1/19

【手続補正書】
【提出日】令和7年3月21日(2025.3.21)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヘム含有タンパク質を産生する方法であって、前記方法は、
抗生物質耐性遺伝子をコードする組換え核酸を欠く組換えピキア・パストリス（Pichia pastoris）細胞を発酵ブロスにおいて発酵させる工程を含み、
ここで、前記組換えピキア・パストリス（Pichia pastoris）細胞は、
１つ以上の安定に組み込まれた組換え核酸であって、前記１つ以上の安定に組み込まれた組換え核酸は、ＡＬＡシンターゼ、ＡＬＡデヒドラターゼ、ポルフォビリノーゲンデアミナーゼ、ウロポルフィリノーゲンＩＩＩシンターゼ、ウロポルフィリノーゲンＩＩＩデカルボキシラーゼ、コプロポルフィリノーゲンＩＩＩオキシダーゼ、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、およびフェロキラターゼから選択される１つ以上のヘム生合成に関与するポリペプチドをコードする、核酸；
第１のメタノール誘導性プロモーターと作動的に連結しているヘム含有タンパク質をコードする安定に組み込まれた組換え核酸；および
転写活性化因子をコードする組換え核酸
を含む、方法。
【請求項２】
前記１つ以上のヘム生合成に関与するポリペプチドをコードする前記１つ以上の安定に組み込まれた組換え核酸のうちの少なくとも１つは、第２のメタノール誘導性プロモーターと作動的に連結している、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記転写活性化因子をコードする前記組換え核酸は、前記第１のメタノール誘導性プロモーターと作動的に連結している、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記ヘム含有タンパク質がレグヘモグロビンである、請求項１に記載の方法。

【請求項５】
前記ヘム含有タンパク質を精製する工程をさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記転写活性化因子をコードする前記組換え核酸は、構成的プロモーターと作動的に連結している、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記転写活性化因子をコードする前記組換え核酸は、第３のメタノール誘導性プロモーターと作動的に連結している、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記転写活性化因子をコードする前記組換え核酸は、第３のメタノール誘導性プロモーターと作動的に連結している、請求項２に記載の方法。
【請求項９】
前記１つ以上のヘム生合成に関与するポリペプチドをコードする１つ以上の安定に組み込まれた組換え核酸、前記ヘム含有タンパク質をコードする前記安定に組み込まれた組換え核酸、および前記転写活性化因子をコードする前記組換え核酸の各々は、ピキア・パストリス（Pichia pastoris）のプロモーターと、独立して作動的に連結している、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記１つ以上のヘム生合成に関与するポリペプチドをコードする１つ以上の安定に組み込まれた組換え核酸、前記ヘム含有タンパク質をコードする前記安定に組み込まれた組換え核酸、および前記転写活性化因子をコードする前記組換え核酸は、ピキア・パストリス（Pichia pastoris）のプロモーターと作動的に連結している、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
前記１つ以上のヘム生合成に関与するポリペプチドは、ピキア・パストリス（Pichia pastoris）のヘム生合成ポリペプチドである、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記組換えピキア・パストリス（Pichia pastoris）細胞は、ＡＬＡシンターゼ、ＡＬＡデヒドラターゼ、ポルフォビリノーゲンデアミナーゼ、ウロポルフィリノーゲンＩＩＩシンターゼ、ウロポルフィリノーゲンＩＩＩデカルボキシラーゼ、コプロポルフィリノーゲンＩＩＩオキシダーゼ、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、およびフェロキラターゼをコードする１つ以上の安定に組み込まれた組換え核酸を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
前記転写活性化因子は、ピキア・パストリス（Pichia pastoris）の転写活性化因子である、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
前記転写活性化因子は、ピキア・パストリス（Pichia pastoris）からのメタノール発現レギュレーター１（Ｍｘｒ１）、ハンセヌラ・ポリモルファ（Hansenula polymorpha）からのアルコールデヒドロゲナーゼレギュレーター１（Ａｄｒ１）、カンジダ・ボイジニイ（Candida boidinii）からのメタノール誘導の転写レギュレーション１（Ｔｒｍ１）、およびカンジダ・ボイジニイ（Candida boidinii）からのメタノール誘導の転写レギュレーション２（Ｔｒｍ２）から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
前記転写活性化因子をコードする前記組換え核酸は、安定に組み込まれている、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
前記発酵ブロスを、鉄または薬学的にもしくは代謝的に許容されるそれらの塩で補完する工程をさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
前記組換えピキア・パストリス（Pichia pastoris）細胞を溶解し、前記溶解された

組換えピキア・パストリス（Pichia pastoris）細胞から前記ヘム含有タンパク質を精製する工程をさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
前記ヘム含有タンパク質がグロビンである、請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
前記ヘム含有タンパク質が、プロテアーゼ、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、オキシドレダクターゼおよび植物ヘモグロビンから選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項２０】
前記第１のメタノール誘導性プロモーターが、アルコールオキシダーゼ１（ＡＯＸ１）、メタノールオキシダーゼ（ＭＯＸ）、アルコールオキシダーゼ（ＡＯＤ１）、メタノリカアルコールオキシダーゼ１（ＭＯＤ１）、メタノリカアルコールオキシダーゼ２（ＭＯＤ２）、ジヒドロキシアセトンシンターゼ（ＤＨＡＳ）およびペロキシン８（ＰＥＸ８）から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項２１】
前記第１のメタノール誘導性プロモーターが、アルコールオキシダーゼ１（ＡＯＸ１）、メタノールオキシダーゼ（ＭＯＸ）、アルコールオキシダーゼ（ＡＯＤ１）、メタノリカアルコールオキシダーゼ１（ＭＯＤ１）、メタノリカアルコールオキシダーゼ２（ＭＯＤ２）、ジヒドロキシアセトンシンターゼ（ＤＨＡＳ）およびペロキシン８（ＰＥＸ８）から選択される、請求項１４に記載の方法。
【請求項２２】
前記組換えピキア・パストリス（Pichia pastoris）細胞を溶解し、前記溶解された組換えピキア・パストリス（Pichia pastoris）細胞から前記ヘム含有タンパク質を精製する工程をさらに含む、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記第１のメタノール誘導性プロモーターが、アルコールオキシダーゼ１（ＡＯＸ１）であり、前記転写活性化因子が、メタノール発現レギュレーター１（Ｍｘｒ１）である、請求項１に記載の方法。
【請求項２４】
前記組換えピキア・パストリス（Pichia pastoris）細胞を溶解し、前記溶解された組換えピキア・パストリス（Pichia pastoris）細胞から前記ヘム含有タンパク質を精製する工程をさらに含む、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
ヘム含有タンパク質を産生する方法であって、前記方法は、
抗生物質耐性遺伝子をコードする組換え核酸を欠く組換えピキア・パストリス（Pichia pastoris）細胞を発酵ブロスにおいて発酵させる工程を含み、
ここで、前記組換えピキア・パストリス（Pichia pastoris）細胞は、
ｉ）第１のメタノール誘導性プロモーターと作動的に連結している、ＡＬＡシンターゼをコードする安定に組み込まれた組換え核酸；
ｉｉ）第２のメタノール誘導性プロモーターと作動的に連結している、ＡＬＡデヒドラターゼをコードする安定に組み込まれた組換え核酸；
ｉｉｉ）第３のメタノール誘導性プロモーターと作動的に連結している、ポルフォビリノーゲンデアミナーゼをコードする安定に組み込まれた組換え核酸；
ｉｖ）第４のメタノール誘導性プロモーターと作動的に連結している、ウロポルフィリノーゲンＩＩＩシンターゼをコードする安定に組み込まれた組換え核酸；
ｖ）第５のメタノール誘導性プロモーターと作動的に連結している、ウロポルフィリノーゲンＩＩＩデカルボキシラーゼをコードする安定に組み込まれた組換え核酸；
ｖｉ）第６のメタノール誘導性プロモーターと作動的に連結している、コプロポルフィリノーゲンＩＩＩオキシダーゼをコードする安定に組み込まれた組換え核酸；
ｖｉｉ）第７のメタノール誘導性プロモーターと作動的に連結している、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする安定に組み込まれた組換え核酸；

ｖｉｉｉ）第８のメタノール誘導性プロモーターと作動的に連結している、フェロキラターゼをコードする安定に組み込まれた組換え核酸；
ｉｘ）第９のメタノール誘導性プロモーターと作動的に連結している、ヘム含有タンパク質をコードする安定に組み込まれた組換え核酸の２つ以上のコピー；および
ｘ）構成的プロモーターまたは第１０のメタノール誘導性プロモーターと作動的に連結している、転写活性化因子をコードする組換え核酸
を含み、
ここで、前記第１から第９のメタノール誘導性プロモーターの各々は、前記転写活性化因子が結合する配列を含む、方法。