

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6909591号
(P6909591)

(45) 発行日 令和3年7月28日(2021.7.28)

(24) 登録日 令和3年7月7日(2021.7.7)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 P 21/02 (2006.01)

C 12 P 21/02

C 12 N 1/19 (2006.01)

C 12 N 1/19

C 12 N 1/16 (2006.01)

C 12 N 1/16

Z N A C

F

請求項の数 5 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2017-38078 (P2017-38078)
 (22) 出願日 平成29年3月1日 (2017.3.1)
 (65) 公開番号 特開2018-143100 (P2018-143100A)
 (43) 公開日 平成30年9月20日 (2018.9.20)
 審査請求日 令和1年12月12日 (2019.12.12)

(73) 特許権者 000002288
 三洋化成工業株式会社
 京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1
 (74) 代理人 110000914
 特許業務法人 安富国際特許事務所
 (72) 発明者 上田 真澄
 京都市東山区一橋野本町11番地の1 三
 洋化成工業株式会社内
 (72) 発明者 中西 睦
 京都市東山区一橋野本町11番地の1 三
 洋化成工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】有用物質の生産方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

培養液に含まれる酵母により有用物質を培養液中に分泌生産する有用物質の生産方法であつて、前記酵母が、*Saccharomyces* 株であり、前記培養液が、一般式(1)で表される化合物(A)を含有し、前記化合物(A)のHLB値が0.1~1.6であつて、かつ数平均分子量が9400~30000であり、前記化合物(A)の重量割合が、前記培養液の重量を基準として0.0001~1.0重量%である有用物質の生産方法。

$\text{HO} - (\text{A}^1 \text{O})^{m^1} - (\text{A}^2 \text{O})^{m^2} - (\text{A}^3 \text{O})^{m^3} - \text{H}$ (1)

[一般式(1)中、 $\text{A}^1 \text{O}$ 、 $\text{A}^2 \text{O}$ 及び $\text{A}^3 \text{O}$ はそれぞれ独立に炭素数2~4のオキシアルキレン基を表し、 $\text{A}^1 \text{O}$ と $\text{A}^2 \text{O}$ は構造式が異なっており、 $\text{A}^2 \text{O}$ と $\text{A}^3 \text{O}$ は構造式が異なっており、 m^1 、 m^2 及び m^3 は、 $\text{A}^1 \text{O}$ 、 $\text{A}^2 \text{O}$ 及び $\text{A}^3 \text{O}$ の平均付加モル数を表し、それぞれ独立に1~600の数である。]

10

【請求項 2】

前記有用物質が、タンパク質である請求項1に記載の有用物質の生産方法。

【請求項 3】

前記一般式(1)で表される化合物(A)における $\text{A}^1 \text{O}$ 、 $\text{A}^2 \text{O}$ 及び $\text{A}^3 \text{O}$ が、それぞれ独立にオキシエチレン基又は1,2-オキシプロピレン基である請求項1又は2に記載の有用物質の生産方法。

【請求項 4】

前記一般式(1)で表される化合物(A)における $\text{A}^1 \text{O}$ 及び $\text{A}^3 \text{O}$ が、オキシエチレン

20

基であって、 A^2O が、1, 2 - オキシプロピレン基である請求項1～3のいずれか1項に記載の有用物質の生産方法。

【請求項5】

前記一般式(1)で表される化合物(A)の数平均分子量が9400～20000であり、 A^2O が、1, 2 - オキシプロピレン基であり、 m^2 が10～70の数である請求項1～4のいずれか1項に記載の有用物質の生産方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、有用物質の生産方法に関する。

【背景技術】

【0002】

酵母は、アミノ酸やタンパク質等の有用物質を生産するために広く利用されている。特に近年は、医薬上・産業上有用なタンパク質の遺伝子を酵母に導入することで形質転換した酵母によってタンパク質を効率的に生産する技術が知られるようになっている。

【0003】

有用物質生産に用いる細菌として大腸菌を用いる場合は、大腸菌体内には糖鎖合成酵素が存在しないため、糖の付いていないタンパク質の生産に限定される。一方で、有用物質生産に酵母を用いると、酵母が発現するタンパク質は糖鎖合成酵素によって糖鎖付加などの翻訳後修飾を受けた後に菌体外へ分泌されるため、糖の付いたタンパク質生産が可能である(非特許文献1)。

20

【0004】

しかし、酵母によるタンパク質生産方法では、大腸菌と比較し、タンパク質生産量が低いという課題があった(非特許文献2)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】馬場 忠、「構造生物」Vol.5、No.1(1998)、p.35～39

30

【非特許文献2】江崎信芳等著、「生化学基礎の基礎」、化学同人、2002年3月、p.288～289

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

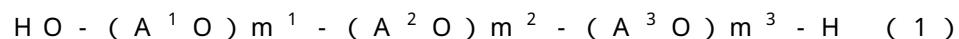
本発明の目的は、酵母を用いた有用物質の生産量に優れる生産方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

40

本発明者らは、これらの問題点を解決すべく鋭意検討した結果、本発明に到達した。即ち、本発明は、培養液に含まれる酵母により有用物質を培養液中に分泌生産する有用物質の生産方法であって、前記酵母が、Saccharomyces株であり、前記培養液が、一般式(1)で表される化合物(A)を含有し、前記化合物(A)のHLB値が0.1～1.6であって、かつ数平均分子量が200～30000であり、前記化合物(A)の重量割合が、前記培養液の重量を基準として0.0001～10重量%である有用物質の生産方法である。



[一般式(1)中、 A^1O 、 A^2O 及び A^3O はそれぞれ独立に炭素数2～4のオキシアルキレン基を表し、 A^1O と A^2O は構造式が異なっており、 A^2O と A^3O は構造式が

50

異なっており、 m^1 、 m^2 及び m^3 は、 A^1O 、 A^2O 及び A^3O の平均付加モル数を表し、それぞれ独立に 1 ~ 600 の数である。】

【発明の効果】

【0008】

本発明の有用物質の生産方法を用いることで、酵母を用いて有用物質を多量に生産させることができる。

【図面の簡単な説明】

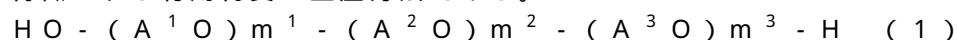
【0009】

【図1】製造例12で用いるベクターを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明の有用物質の生産方法は、培養液に含まれる酵母により有用物質を培養液中に分泌生産する有用物質の生産方法であって、培養液が、下記一般式(1)で表される化合物(A)を含有し、下記一般式(1)で表される化合物(A)のHLB値が0.1~16であって、かつ数平均分子量が200~30000であり、培養液中に下記一般式(1)で表される化合物(A)が、培養液の重量を基準として0.0001~10重量%含むことを特徴とする有用物質の生産方法である。



[一般式(1)中、 A^1O 、 A^2O 及び A^3O はそれぞれ独立に炭素数2~4のオキシアカルキレン基を表し、 A^1O と A^2O は構造式が異なっており、 A^2O と A^3O は構造式が異なっており、 m^1 、 m^2 及び m^3 は、 A^1O 、 A^2O 及び A^3O の平均付加モル数を表し、それぞれ独立に 1 ~ 600 の数である。]

【0011】

本発明の生産方法に用いる培養する培地としては、当技術分野で通常用いられる細胞培養用培地であれば特に制限なく用いることができ、炭素源、窒素源その他の必須栄養素を含む天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0012】

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール及びプロパノール等のアルコール類が挙げられる。

【0013】

窒素源としては、無機酸又は有機酸のアンモニウム塩(塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等)、アンモニア、ペプトン、肉エキス及びコーンスチーブリカー等が挙げられる。

【0014】

その他の必須栄養素としては、無機塩類が挙げられ、無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅及び炭酸カルシウム等が用いられる。

【0015】

遺伝子操作が可能であり、産業利用のしやすさの観点から、Saccharomyces 株を用いる。

Saccharomyces 株としては、Saccharomyces cerevisiae、Saccharomyces bayanus、Saccharomyces kudriavzevii、Saccharomyces mikatae、Saccharomyces paradoxus 及びSaccharomyces pastorianus 等を用いることが好ましい。

【0016】

本発明の生産方法に用いる酵母としては、目的とする有用物質の種類に応じて遺伝子組み換えを行った酵母を用いてもよい。

遺伝子組み換えをする方法としては、例えば以下のように、細菌(大腸菌及び酵母等)を

10

20

30

40

50

用いて酵母に組み込むためのプラスミドを作製し、作製したプラスミドを酵母に組み込んで形質転換する方法が挙げられる。

【0017】

1) 酵母に組み込むためのプラスミドの作製

酵母に組み込むためのプラスミドの作製は、以下の方法等を用いることができる。

目的タンパク質を発現している細胞（動物細胞及び植物細胞等）からメッセンジャーRNA（mRNA）を分離し、該mRNAから単鎖のcDNAを作製し、次に二本鎖DNAを合成する。その後、合成した二本鎖DNAを、細菌に組み込むためのファージDNA又はプラスミドに組み込み、得られた組み換えファージ又はプラスミドを宿主となる細菌に形質転換しcDNAライブラリーを作製する。

10

次に、形質転換した細菌から得たcDNAライブラリーの中から、目的とするDNAを含有するプラスミドをスクリーニングする。スクリーニングの方法としては、プラスミドと、目的タンパク質遺伝子又は相補配列の一部をコードするDNAプローブとのハイブリダイゼーション法が挙げられる。

スクリーニング後、細菌中の目的とするクローン化DNAを有するプラスミドから、該クローン化DNA又はその一部を切りだし、該クローン化DNA又はその一部をプロモーターの下流に連結することによって、目的遺伝子を有する酵母に組み込むためのプラスミドを作製することができる。

また、該クローン化DNA又はその一部を酵母に組み込むためのプラスミドに導入する際に、内膜を移行させるシグナル配列（ペリプラズムに目的物質を発現させるシグナル配列）をコードするDNAを連結することもできる。

20

このような酵母に組み込むためのプラスミドの作製方法としては、例えばバイオ実験イラストレイティッド7（水野貴之著、2003年10月30日発行）の47～69項に記載の方法を用いることができる。

【0018】

2) 酵母の形質転換

上記1)で作製した酵母に組み込むためのプラスミドを用いて酵母を形質転換する方法としては、リチウム塩で処理して自然にDNAを取り込みやすい状態にしてプラスミドを取り込ませる方法や、あるいは電気的にDNAを細胞内に導入する方法を採用できる（Bækker and Guarante, Methods Enzymol., 194, 182-187 (1991)）。

30

【0019】

本発明の生産方法で用いる培養液は、一般式(1)で表される化合物(A)を含有する。化合物(A)は、1種を単独で用いても、2種以上を併用して用いても良い。

一般式(1)中、A¹O、A²O及びA³Oはそれぞれ独立に炭素数2～4のオキシアルキレン基を表す。

また、A¹OとA²Oは構造式が異なっており、A²OとA³Oは構造式が異なっている。

炭素数2～4のオキシアルキレン基としては、オキシエチレン基（以下EOと略記）、1,2-又は1,3-オキシプロピレン基（以下POと略記）及び1,2-、1,3-、1,4-又は2,3-オキシブチレン基（以下BOと略記）が挙げられる。

40

このうち、A¹O、A²O及びA³Oは、有用物質の生産量の観点から、それぞれ独立にEO又はPOであることが好ましく、更に好ましい組み合わせは、A¹O及びA³Oが、EOであって、A²Oが、POである組み合わせである。

また、上記の組み合わせにおけるPOは、有用物質の生産量の観点から、1,2-オキシプロピレン基であることが好ましい。

【0020】

一般式(1)中、m¹、m²及びm³は、それぞれ独立にA¹O、A²OとA³Oの平均付加モル数を表し、1～600の数である。

このうち、m¹、m²及びm³は、有用物質の生産量の観点から、m¹及びm³が1～2

50

00の数であり、かつ、 m^2 が10～70の数であることが好ましい。

【0021】

本発明の方法で用いる一般式(1)で表される化合物(A)のHLB値は、0.1～16であり、好ましくは9～16である。HLB値が0.1～16の範囲外の場合、有用物質の生産量が悪化する。

一般式(1)で表される化合物(A)のHLB値は親水系と親油性のバランスを示す指標であって、例えば「界面活性剤入門」〔2007年三洋化成工業株式会社発行、藤本武彦著〕142頁に記載されているグリフィン法によって、一般式(1)で表される化合物(A)の分子量の値と一般式(1)で表される化合物の親水基部分の分子量の値との比率から以下の式で計算することができる。

$$\text{HLB 値} = 20 \times \frac{\text{化合物(A)の親水基部分の分子量}}{\text{化合物(A)の分子量}}$$

【0022】

本発明の方法において、一般式(1)で表される化合物(A)の数平均分子量は、200～30000であり、有用物質の生産量の観点から、好ましくは1000～20000である。

本発明の方法において、一般式(1)で表される化合物(A)の数平均分子量は下記の方法により算出することができる。

数平均分子量は、テトラヒドロフラン(以下、THFと略記)への可溶分に対し、GPC(Gel Permeation Chromatography)を用いて以下の条件で測定することができる。

測定装置：東ソー株式会社製の「HLC-8120」

カラム：東ソー株式会社製の「TSKgel GMHXL」(2本)と東ソー(株)製の「TSKgel Multipore HXL-M」(1本)

試料溶液：0.25質量%のTHF溶液

カラムへの試料溶液の注入量：100μl

流速：1ml/分

測定温度：40

検出装置：屈折率検出器

基準物質：東ソー株式会社製の標準ポリスチレン(TSK standard POLYSTYRENE)12点(数平均分子量：500、1050、2800、5970、9100、18100、37900、96400、190000、355000、1090000、2890000)。

【0023】

本発明の生産方法では、一般式(1)で表される化合物(A)が、酵母の培養のいずれかの時期に、培養液に含まれていれば良い。

例えば、培養開始時点において、あらかじめ培養液に一般式(1)で表される化合物(A)が加えられていてもよく、培養途中で培養液に一般式(1)で表される化合物(A)を加えてもよい。

有用物質の生産効率等の観点から、培養開始時点の培養液は一般式(1)で表される化合物(A)を含んでいないことが好ましい。この場合、一般式(1)で表される化合物(A)を酵母の対数増殖期に加えることが好ましい。

また、溶解性の観点から、一般式(1)で表される化合物(A)は、水溶液の状態で培養液に加えることが好ましい。

【0024】

本発明の方法において、使用される一般式(1)で表される化合物(A)の合計使用量(重量%)は、対象となる微生物、生産される有用物質の種類及び抽出方法の種類によって適宜選択されるが、培養液の重量に基づいて、0.0001～10重量%であり、生産したタンパク質の変性を抑制する観点から、好ましくは0.005～10重量%である。

なお、培養液の重量は、培養開始時点の培養液の重量を基準とする。

【0025】

10

20

30

40

50

本発明の有用物質の製造方法で製造される有用物質としては、タンパク質（酵素、ホルモンタンパク質、抗体及びペプチド等）、多糖、オリゴ糖及び核酸等が挙げられる。

【0026】

タンパク質としては、酵素 { 酸化還元酵素（コレステロールオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ及びペルオキシダーゼ等）、加水分解酵素（リゾーム、プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、アミラーゼ、リバーゼ、セルラーゼ及びグルコアミラーゼ等）、異性化酵素（グルコースイソメラーゼ等）、転移酵素（アシリトランスフェラーゼ及びスルホトランスフェラーゼ等）、合成酵素（脂肪酸シンターゼ、リン酸シンターゼ及びクエン酸シンターゼ等）及び脱離酵素（ペクチンリアーゼ等）等 }、ホルモンタンパク質 { 骨形成因子（BMP）、インターフェロン、インターフェロン 10 、インターロイキン1～12、成長ホルモン、エリスロポエチン、インスリン、顆粒状コロニー刺激因子（G-CSF）、組織プラスミノーゲン活性化因子（TPA）、ナトリウム利尿ペプチド、血液凝固第VII因子、ソマトメジン、グルカゴン、成長ホルモン放出因子、血清アルブミン及びカルシトニン等 }、抗体、抗原タンパク質（B型肝炎表面抗原等）、機能性タンパク質 { プロネクチン（登録商標）、不凍ペプチド、抗菌ペプチド等 }、蛍光タンパク質（GFP等）、発光タンパク質（ルシエラーゼ等）及びペプチド（特にアミノ酸組成を限定するものではなく、オリゴペプチド、ジペプチド及びトリペプチド等）等が挙げられる。

【0027】

多糖としては、ヒアルロン酸、コンドロイチン、キサンタン及びセルロース等が挙げられる。 20

【0028】

オリゴ糖としては、スクロース、ラクトース、トレハロース、マルトース、ラフィノース、パノース、シクロデキストリン、ガラクトオリゴ糖及びフラクトオリゴ糖等が挙げられる。

【0029】

核酸としては、イノシンーリン酸、アデノシンーリン酸及びグアノシンーリン酸等が挙げられる。

【0030】

これらのうち、有用物質の生産効率等の観点からタンパク質が好ましい。 30

【0031】

本発明の有用物質の生産方法は、培養工程及び精製工程を有することが好ましい。

【0032】

培養工程では、以下の有用物質の生産に用いる培養液のオートクレーブ滅菌（好ましくは120、20分間）を行い、ここに前培養した酵母を本培養することが好ましい。

酵母の培養の温度は、好ましくは15～32であり、更に好ましくは25～30である。

培地のpHは、4～7であることが好ましい。

本培養開始から6～800時間後に培養温度を維持したまま一般式（1）で表される化合物（A）の水溶液を添加し、本培養開始から20～1000時間培養を継続する等で培養工程を実施することが好ましい。 40

培養中の培養液は公知の攪拌装置（攪拌羽根及びマグネットスター等）を用いて攪拌することが好ましい。培養工程に用いる装置としては、公知の培養装置を用いることができるが、試験管、ディープウェルプレート（ビーエム機器株式会社製品等）及び微生物培養装置（エイブル社製等）等が挙げられる。

【0033】

なお、培養工程で用いる前培養した酵母として組み替え酵母を用いる場合、前培養は酵母を発現ベクターで形質転換して組み換え酵母を作製し、組み換え酵母を前培養する。前培養は寒天培地上で好ましくは15～32で3～72時間行うことで行うことができる。

【0034】

10

20

30

40

50

精製工程は、培養液中に分泌された有用物質（タンパク質等）を分離する工程であり、遠心分離、中空糸分離、ろ過、溶剤による沈殿処理及びカラム処理（イオン交換カラム、ゲルろ過カラム、疎水カラム、アフィニティカラム及び限外カラム等）等の公知の分離方法で微生物及び微生物残さと分離することで行うことができる。

溶剤による沈殿処理としては、エタノール沈殿、硫酸アンモニウム沈殿及びポリエチレングリコール沈殿等の沈殿処理が挙げられる。

【0035】

精製工程においてカラム処理をおこなう場合、カラムクロマトグラフィーに使用される充填剤としては、シリカ、デキストラン、アガロース、セルロース、アクリルアミド及びビニルポリマー等が挙げられ、市販品では Sephadex シリーズ、Sephacryl シリーズ、Sephadose シリーズ（以上、Pharmacia 社）、Bio-Gel シリーズ（Bio-Rad 社）等が挙げられる。10

【0036】

精製工程で分離された酵母は、その後、新たに培養液を供給することにより、更に培養することができる。その培養液等を更に精製工程に供して精製、培養を繰り返すことにより、有用物質の連続生産を行うことができる。

【実施例】

【0037】

以下の実施例及び比較例により本発明をさらに説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。以下、特に定めない限り部は重量部を示す。20

【0038】

なお、実施例及び比較例で用いる一般式（1）で表される化合物（A）として、化合物（A-1）～（A-11）を以下の製造方法に従って製造した。

また、製造した化合物（A-1）～（A-11）の数平均分子量及びHLB値を表1に示す。

【0039】

< 製造例1 >

ステンレス製加圧反応装置に1,2-プロパンジオール19部と水酸化ナトリウム0.05部を仕込み、窒素置換後に110～130で1,2-プロピレンオキサイド420部を4時間かけてオートクレーブ内圧が0.3MPa以上にならないようにして、徐々に滴下した。同温度でさらに10時間反応させた。30

その後、同温度でエチレンオキサイド66部を4時間かけてオートクレーブ内圧が0.3MPa以上にならないようにして、徐々に滴下した後、同温度でさらに10時間反応させ、化合物（A-1）を得た。

【0040】

< 製造例2 >

製造例1において、1,2-プロパンジオールの仕込み量を19部から15.8部に変更し、1,2-プロピレンオキサイドの滴下量を420部から350部に変更し、エチレンオキサイドの滴下量を66部から138部に変更した以外は同様の操作を行い、化合物（A-2）を得た。40

【0041】

< 製造例3 >

製造例1において、1,2-プロパンジオールの仕込み量を19部から12.2部に変更し、1,2-プロピレンオキサイドの滴下量を420部から270部に変更し、エチレンオキサイドの滴下量を66部から220部に変更した以外は同様の操作を行い、化合物（A-3）を得た。

【0042】

< 製造例4 >

製造例1において、1,2-プロパンジオールの仕込み量を19部から4.8部に変更し、1,2-プロピレンオキサイドの滴下量を420部から106部に変更し、エチレンオ50

キサイドの滴下量を 66 部から 394 部に変更した以外は同様の操作を行い、化合物 (A - 4) を得た。

【0043】

< 製造例 5 >

ステンレス製加圧反応装置にサンニックス PP - 2000 [三洋化成工業(株)製; 1, 2 - オキシプロピレン基を構成単位とするポリオキシプロピレングリコール(数平均分子量: 2000)] 450 部と水酸化ナトリウム 0.05 部を仕込み、窒素置換後に 110 ~ 130 でエチレンオキサイド 50 部を 4 時間かけてオートクレーブ内圧が 0.3 MPa 以上にならないようにして、徐々に滴下した後、同温度でさらに 10 時間反応させ、化合物 (A - 5) を得た。 10

【0044】

< 製造例 6 >

製造例 5において、サンニックス PP - 2000 の仕込み量を 450 部から 323 部に変更し、エチレンオキサイドの滴下量を 50 部から 178 部に変更した以外は同様の操作を行い、化合物 (A - 6) を得た。

【0045】

< 製造例 7 >

製造例 5において、サンニックス PP - 2000 の仕込み量を 450 部から 106 部に変更し、エチレンオキサイドの滴下量を 50 部から 392 部に変更した以外が同様の操作を行い、化合物 (A - 7) を得た。 20

【0046】

< 製造例 8 >

製造例 5において、サンニックス PP - 2000 450 部に代えてサンニックス PP - 3000 [三洋化成工業(株)製; 1, 2 - オキシプロピレン基を構成単位とするポリオキシプロピレングリコール(数平均分子量: 3200)] を 101 部使用し、エチレンオキサイドの滴下量を 50 部から 402 部に変更した以外は同様の操作を行い、化合物 (A - 8) を得た。

【0047】

< 製造例 9 >

製造例 1において、1, 2 - プロピレンオキサイドの滴下量を 420 部から 290 部に変更し、エチレンオキサイドの滴下量を 66 部から 250 部に変更した以外は同様の操作を行い、化合物 (A - 9) を得た。 30

【0048】

< 製造例 10 >

ステンレス製加圧反応装置にエチレングリコール 10 部と水酸化ナトリウム 0.05 部を仕込み、窒素置換後に 110 ~ 130 でエチレンオキサイド 35 部を 4 時間かけてオートクレーブ内圧が 0.3 MPa 以上にならないようにして、徐々に滴下した。同温度でさらに 10 時間反応させた。

その後、同温度で 1, 2 - プロピレンオキサイド 402 部を 4 時間かけてオートクレーブ内圧が 0.3 MPa 以上にならないようにして、徐々に滴下した。同温度でさらに 10 時間反応させて、化合物 (A - 10) を得た。 40

【0049】

< 製造例 11 >

製造例 10において、エチレンオキサイドの滴下量を 35 部から 92 部に変更した以外は同様の操作を行い、化合物 (A - 11) を得た。

【0050】

【表1】

	一般式(1)で表される 化合物(A)	数平均 分子量	HLB	A ¹ O	A ² O	A ³ O	m ¹	m ²	m ³
				EO又はPO	EO	EO	3.0	30	3.0
製造例1	A-1	2000	2.5	EO	PO	EO	3.0	30	3.0
製造例2	A-2	2400	5.5	EO	PO	EO	7.5	30	7.5
製造例3	A-3	3100	8.7	EO	PO	EO	16	30	16
製造例4	A-4	8000	15.6	EO	PO	EO	71	30	71
製造例5	A-5	2200	1.8	EO	PO	EO	2.5	34	2.5
製造例6	A-6	3100	7.2	EO	PO	EO	13	34	13
製造例7	A-7	9400	15.8	EO	PO	EO	84	34	84
製造例8	A-8	16000	15.9	EO	PO	EO	145	55	145
製造例9	A-9	2200	8.9	EO	PO	EO	11	21	11
製造例10	A-10	2800	2.0	PO	EO	PO	22	6.0	22
製造例11	A-11	3100	4.0	PO	EO	PO	22	14	22

【0051】

実施例及び比較例で使用した一般式(1)で表される化合物(A)の数平均分子量は下記 50

の方法により測定した。

数平均分子量は、テトラヒドロフラン（以下、THFと略記）への可溶分に対し、GPC（Gel Permeation Chromatography）を用いて以下の条件で測定した。

測定装置：東ソー株式会社製の「HLC-8120」

カラム：東ソー株式会社製の「TSKgel GMHXL」（2本）と東ソー（株）製の「TSKgel MulticoreHXL-M」（1本）

試料溶液：0.25質量%のTHF溶液

カラムへの試料溶液の注入量：100μl

流速：1ml/分

10

測定温度：40

検出装置：屈折率検出器

基準物質：東ソー株式会社製の標準ポリスチレン（TSK standard POLYSTYRENE）12点（数平均分子量：500、1050、2800、5970、9100、18100、37900、96400、190000、355000、1090000、2890000）。

【0052】

<製造例12：酵母の作製>

Gaussia princeps由来のルシフェラーゼ（GLuc）のアミノ酸配列については、UniprotにおけるAAG54095で開示されている。

20

このアミノ酸配列を基に、出芽酵母のコドン使用に合わせた遺伝子配列を設計し、Gaussia princeps由来のルシフェラーゼタンパク質をコードする遺伝子（下記配列番号1）の合成を行なった。

得られた合成遺伝子は市販のEcoRIとSalIで切断、YEp352GAPIIベクターは市販のEcoRIとSalIで切断後、それぞれアガロースゲル電気泳動を行い、それぞれの断片に相当するバンドをゲルから切り出した。切り出したゲルからプロメガ社のWizard SV DNA and PCR Clean-Up Systemを用いてDNA断片を抽出、精製した。NanoDrop Lite（Thermo Fisher Scientific社）でDNA濃度を測定後、それぞれの断片50ngずつを混合しH₂Oで7.5μLとし、3.75μLのLigation High Ver. 2（TOYOBO社）を加え、16、30分間反応した。うち2μLを用いて、大腸菌ECOSTM Competent E. coli. DH5（ニッポンジーン社）を形質転換した。50μg/mLのアンピシリンを含むLB寒天培地で37、16時間培養し、形質転換体を得た。

30

得られたコロニーを、50ug/mLのアンピシリンを含むLB液体培地で37、16時間培養を行った。菌体よりプロメガ社のWizard Plus SV Miniprep DNA Purification Systemを用いてYEp352GAPII-GLucベクターを精製した。シークエンス解析を行い、塩基配列に間違いがないことを確認し、YEp352GAPII-GLucベクターとした。

得られたYEp352GAPII-GLucベクターからBamHIを用いてGAPDHプロモーターとターミネーターを含む領域を上記と同様に回収し、酵母インテグレーション型プラスミドpRS305のBamHI部位に同様に挿入し、形質転換を行なった。得られたコロニーを培養後、プラスミドを回収することで図1に示すベクター（pRS305-GLuc）を作製した。このベクター（pRS305-GLuc）をEcoRVで切断して線状化した後、常法に従い出芽酵母（Saccharomyces cerevisiae）W303-1B株の形質転換を行なった。

40

形質転換後の菌液をSD-Leu寒天培地（2.67% Minimal SD Base Medium、0.069% DO Supplement-Leu（Takara Bio社）、2% Agar）に塗布し、30で2日間培養することで形質転換体のコロニーを得た。コロニーをプレートから搔きとり、PCR反応液に懸濁する簡易P

50

C R 法にて染色体上への組み込みを確認し、この *Saccharomyces* 株である酵母を G L u c 発現出芽酵母とした。

【 0 0 5 3 】

< 実施例 1 ~ 1 0 >

製造例 1 2 で製造した G L u c 発現出芽酵母をカザミノ酸培地 5 m l [0 . 5 重量 % カザミノ酸 [Casamino Acid, technical DifcoTM、Becton, Dickinson and Company 社 (以下 BD 社) 製]、0 . 6 7 重量 % イーストナイトロジエンベース (Yeast Extract DifcoTM、BD 社製)、2 重量 % グルコース [D (+) - Glucose、和光純薬工業社製]] に白金耳を用いて植菌して 3 0 で 6 時間、2 0 0 r p m で振とう培養して作製した培養液 1 5 μ l を、2 m l Y P A D 培地 [2 重量 % ペプトン (Bacto Peptone DifcoTM、BD 社製)、1 重量 % 酵母エキス (Yeast Extract DifcoTM、BD 社製)、2 重量 % グルコース [D (+) - Glucose、和光純薬工業社製] 、アデニン (Adenine Sulfate、和光純薬工業社製) (4 0 m g / l)] に再懸濁した。

再懸濁して得られた培養液を 3 0 で 2 時間、1 1 0 0 r p m で振とう培養を続けた後に、表 2 に記載する化合物 (A) を、培養液の重量を基準として 0 . 3 重量 % になるように添加した。

その後、更に、3 0 で 2 4 時間、1 1 0 0 r p m で振とう培養を続けた。

その後、培養液のサンプリングを行い、遠心分離機によって、酵母を含む培養液から菌体と培養上清を分離した後、培養上清を回収した。

【 0 0 5 4 】

< 比較例 1 >

化合物 (A) を添加しなかったこと以外は実施例 1 と同様にして、実施し、培養上清を得た。

【 0 0 5 5 】

< 実施例 1 1 ~ 1 4 >

実施例 8 において、添加する化合物 (A - 8) の添加量を、培養液の重量を基準として、表 3 に記載の重量 % になるように加えたこと以外は実施例 8 と同様にして、培養上清を得た。

【 0 0 5 6 】

< 培養液の濁度の評価 >

各培養上清を、1 m l (光路長 : 1 0 m m) の石英セルに加え、濁度計 [U V - 1 7 0 0 、(株)島津製作所製] を用いて、濁度の測定を行った。

なお、培養上清は、適切な吸光度になるように生理食塩水で希釈して測定を行った。

また、実施例 1 ~ 1 4 で得た培養上清に対しては、Y P A D 培地 2 m l をブランクとして用いた。培養液の濁度は下記数式 (1) によって算出した。

培養液の濁度 = [(希釈した培養液の濁度の測定値) - (ブランクの濁度の測定値)] \times 培養液の希釈倍率 [数式 (1)]

実施例 1 ~ 1 4 及び比較例 1 の場合、実施例 1 ~ 1 4 及び比較例 1 每の「培養液の濁度」を、比較例 1 の培養液の濁度で除し、この値を実施例 1 ~ 1 4 及び比較例 1 每の培養液の濁度比とした。評価結果を表 2 及び表 3 に示す。

培養液の濁度比が高いほど、酵母濃度が高いことを意味している。

また、酵母濃度あたりのタンパク質の活性値が高いほど活性を維持したタンパク質を効率的に生産できていることを意味する。

【 0 0 5 7 】

< ルシフェラーゼ活性の評価 >

ルシフェラーゼ活性評価は、ルシフェラーゼ発現酵母の培養上清 2 0 μ l に、ルシフェリン溶液 6 0 μ l 添加した混合液に対し、ルミノメーターを用いて以下の条件で測定することができる。

10

20

30

40

50

ルミノメーター：アト－株式会社製の「アト－（株）製 AB - 2350 PHELIOS」

ルシフェリン溶液：ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社製品またはアト－株式会社製品

試料溶液：製造例に記載の通り、ルシフェラーゼ発現酵母を所定時間培養した培養上清
測定温度：25

検出装置：発光検出器

検出波長：460 nm

実施例1～14及び比較例1の場合、実施例1～14及び比較例1毎の測定した発光強度を、比較例1の発光強度で除し、この値を実施例1～14及び比較例1毎のルシフェラーゼ活性値比とした。評価結果を表2及び表3に示す。
10

ルシフェラーゼ活性値比が高いほど、培養液上清の単位体積あたりのタンパク質の活性値が高いことを意味している。

また、各実施例又は各比較例のルシフェラーゼ活性比を、各実施例及び各比較例の培養液の濁度比で除することで、酵母濃度あたりのルシフェラーゼ活性値比を求めることができる。
。

この酵母濃度あたりのルシフェラーゼ活性値比が高いほど、ルシフェラーゼ活性を維持したタンパク質を効率的に生産できていることを意味する。

【0058】

<ルシフェラーゼの発現量の評価>

20

ルシフェラーゼ発現量の評価は、以下に詳述するウェスタンプロッティング（電気泳動、転写及び発色を含む）により評価した。

（1）電気泳動

電気泳動は、組み換え酵母の培養上清10 μlに、サンプルバッファー溶液10 μl添加した混合液を用いて以下の条件で実施した。

試料溶液：各実施例又は各比較例で得た培養上清

ポリアクリルアミドゲル：E-R15L e・パジェル [アト－（株）製]

電気泳動槽：WSE-1100P パジェラン-R [アト－（株）製]

電気泳動時間：90分

サンプルバッファー溶液：4X Laemmli サンプルバッファー [バイオ・ラッド（株）製品] 900 μlと2-メルカプトエタノール100 μlの混合液
30

（2）転写

転写は、上記条件で電気泳動後、転写メンブレンを用いて以下の条件で実施することができる。

転写メンブレン：Amersham Hybond P0.45 PVDF [GEヘルスケア（株）製]

転写液：AE-1465 Ez Fast Blot [アト－（株）製] を蒸留水で10倍に希釈した液

電圧／電流：12V / 400mA

転写時間：30分
40

（3）発色

上記条件で転写後、その転写メンブレンをブロッキング、次いで一次抗体及び二次抗体で抗原抗体反応を行った。本試験においては、一次抗体としてAnti-Gluc Antibody (BioLabs社製)を使用し、二次抗体としてhorse radish peroxidase HRP標識二次抗体を用い、ImageQuant LAS 4000を用いて以下の条件で発色させた。

検出器：ImageQuant LAS 4000（富士フィルム株式会社製品）

ブロッキング時間：45分

一次抗体反応時間：120分

二次抗体反応時間：60分
50

(4) 発現量の解析方法

(1)～(3)の操作の後、転写メンブレンにルシフェラーゼのバンドが検出された後、そのバンドの濃さをイメージJ (National Institutes of Health, USA)によって、定量した。

実施例1～14及び比較例1の場合、実施例1～14及び比較例1毎の定量したバンドの濃さを、比較例1のバンドの濃さで除し、この値を実施例1～14及び比較例1毎のルシフェラーゼの発現量比とした。評価結果を表2及び表3に示す。

ルシフェラーゼ発現量比が高いほど、培養液上清の単位体積あたりのルシフェラーゼの発現量が高いことを意味している。

また、各実施例又は各比較例のルシフェラーゼの発現量比を、各実施例及び各比較例の培養液の濁度比で除することで、酵母濃度あたりのルシフェラーゼの発現量比を求めることができる。10

この酵母濃度あたりのルシフェラーゼの発現量比が高いほど、ルシフェラーゼ活性を維持したタンパク質を効率的に生産できていることを意味する。

【0059】

【表2】

		実施例										比較例 1	
		化合物(A)											
化合物(A)の 添加量 (重量%)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	0	A-1	0.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
0	0	A-2	—	0.3	—	—	—	—	—	—	—	—	
6	0	A-3	—	—	0.3	—	—	—	—	—	—	—	
0	0	A-4	—	—	—	0.3	—	—	—	—	—	—	
0	0	A-5	—	—	—	—	0.3	—	—	—	—	—	
6	0	A-6	—	—	—	—	—	0.3	—	—	—	—	
0	0	A-7	—	—	—	—	—	—	0.3	—	—	—	
0	0	A-8	—	—	—	—	—	—	—	0.3	—	—	
0	0	A-10	—	—	—	—	—	—	—	—	0.3	—	
0	0	A-11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.3	
ルシフェラーゼ発現量比		1.6	1.5	1.1	1.4	1.3	1.3	1.6	1.6	1.3	1.4	1.0	
ルシフェラーゼ活性値 ($\times 10^6$ RLU)		6.1	5.5	5.3	4.7	5.2	5.1	5.7	8.1	4.4	5.7	4.0	
ルシフェラーゼ活性値比		1.5	1.4	1.3	1.2	1.3	1.3	1.4	2.0	1.1	1.4	1.0	
評価結果	培養液の濁度 (Absorbance)		0.84	0.81	0.77	0.71	0.79	0.76	0.68	0.68	0.77	0.75	0.79
	培養液の濁度比		1.06	1.02	0.98	0.90	1.01	0.97	0.86	0.86	0.98	0.95	1.00
	酵母濃度あたりのルシフェラーゼ発現量 (発現量比/濁度比)		1.5	1.5	1.1	1.5	1.3	1.3	1.8	1.8	1.3	1.5	1.0
	酵母濃度あたりのルシフェラーゼ活性値 (活性値比/濁度比)		1.4	1.3	1.4	1.3	1.3	1.3	1.7	2.4	1.1	1.5	1.0

【表2】

【表3】

	化合物(A)の 添加量 (重量%)	化合物(A)の 化合物(A-8)(重量%)	実施例				比較例 1
			11	12	13	14	
評価結果	ルシフェラーゼ発現量比	0.1	0.2	0.3	0.45	-	
	ルシフェラーゼ活性値 ($\times 10^6$ RLU)	1.2	1.2	1.6	1.3	1.0	
	ルシフェラーゼ活性値比	8.4	8.4	8.1	11.3	4.0	
	培養液の濁度 (Absorbance)	2.1	2.1	2.0	2.8	1.0	
	培養液の濁度比	0.77	0.81	0.68	0.82	0.79	
	酵母濃度あたりのルシフェラーゼ発現量 (発現量比/濁度比)	0.98	1.02	0.86	1.04	1.00	
【0061】	酵母濃度あたりのルシフェラーゼ活性値 (活性値比/濁度比)	1.2	1.2	1.8	1.3	1.0	
		2.1	2.1	2.4	2.7	1.0	

【0061】

一般式(1)で表される化合物(A)を含有する実施例1～14は、化合物(A)を含有しない比較例1と比較して、有用物質であるタンパク質としての酵素(ルシフェラーゼ)の生産量に優れることが分かる。

【産業上の利用可能性】

【0062】

本発明の有用物質の生産方法は、効率的にバイオ医薬品製造に用いる上で有用である。

【符号の説明】

【0063】

Amp^r : アンピシリン耐性遺伝子

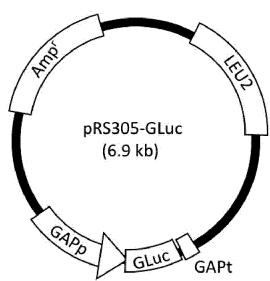
LEU2 : ロイシン合成酵素

GAPp : GAP プロモーター

GAPT : GAP ターミネーター

GLuc : *Gaussia princeps* 由来のルシフェラーゼ

【図1】



【配列表】

0006909591000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 千葉 靖典

茨城県つくば市東1-1-1 国立研究開発法人産業技術総合研究所つくばセンター内

(72)発明者 横尾 岳彦

茨城県つくば市東1-1-1 国立研究開発法人産業技術総合研究所つくばセンター内

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 特開昭60-196185 (JP, A)

特開2002-291494 (JP, A)

特公昭45-030189 (JP, B1)

国際公開第98/044146 (WO, A1)

特開昭50-121482 (JP, A)

斎藤好廣, プルロニック系界面活性剤, 日本油化学会誌, 2000年, Vol.49, No.10, pp.1071-1080

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 21/02

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/BIOSIS/WPI/DS(STN)