

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2006年10月12日 (12.10.2006)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2006/107084 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 1/19 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
C12N 9/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/307262
- (22) 国際出願日: 2006年3月30日 (30.03.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2005-103275 2005年3月31日 (31.03.2005) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人山口大学 (YAMAGUCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田1677-1 Yamaguchi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてののみ): 赤田 倫治 (AKADA, Rinji) [JP/JP]; 〒7558611 山口県宇部市常盤台2-16-1 国立大学法人山口大学内 Yamaguchi (JP). 星田 尚司 (HOSHIDA, Hisashi) [JP/JP]; 〒7558611 山口県宇部市常盤台2-16-1 国立大学法人山口大学内 Yamaguchi (JP). 藤田 恒康 (FUJITA, Tsuneyasu) [JP/JP]; 〒7558611 山口県宇部市常盤台2-16-1 国立大学法人山口大学内 Yamaguchi (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: YEAST MUTANT STRAIN CAPABLE OF PRODUCING SECRETED THERMOSTABLE ENZYME IN HIGH SECRETION LEVEL

(54) 発明の名称: 分泌型耐熱性酵素を高分泌生産できる酵母変異株

(57) Abstract: An yeast mutant strain into which DNA encoding a secreted thermostable enzyme is transformed and in which at least one gene selected from the group consisting of ADE6, ALG3, ALG5, ALG6, ALG8, ALG9, ALG10, ALG12, ASE1, BOP1, CAP1, CLB4, CSN9, CWH41, FLO1, GDS1, GPA2, HAP2, HFM1, HUB1, IVY1, IXR1, KEX1, MET12, OST5, PMP3, RMD6, RVS167, SET7, SNT309, SRF6, SYC1, TOS1, TRM1, UBR2, VIK1, VTS1, YBL081W, YGL242C, YGR042W, YGR054W, YGR071C, YIL039W, YJL007C, YLR232W and YLR407W or a gene homologous to the gene is disrupted or inhibited on its expression.

(57) 要約: 本発明は、分泌型耐熱性酵素をコードするDNAを形質転換し、且つ以下の遺伝子: ADE6、ALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10、ALG12、ASE1、BOP1、CAP1、CLB4、CSN9、CWH41、FLO1、GDS1、GPA2、HAP2、HFM1、HUB1、IVY1、IXR1、KEX1、MET12、OST5、PMP3、RMD6、RVS167、SET7、SNT309、SRF6、SYC1、TOS1、TRM1、UBR2、VIK1、VTS1、YBL081W、YGL242C、YGR042W、YGR054W、YGR071C、YIL039W、YJL007C、YLR232W及びYLR407Wから成る群より選択される遺伝子又はその相同遺伝子の1以上が破壊又は発現抑制された酵母変異株に関する。

WO 2006/107084 A1

## 明 細 書

## 分泌型耐熱性酵素を高分泌生産できる酵母変異株

## 技術分野

本発明は、分泌型耐熱性酵素を高分泌生産できる、分泌型耐熱性酵素をコードする DNA を形質転換し、且つ特定の遺伝子が破壊又は発現抑制された酵母変異株に関する。

## 背景技術

耐熱性酵素とは、タンパク質の 3 次構造（立体構造）が高温でも壊れにくく、酵素活性を保持している酵素をいう。工業的に使用される酵素は、物理的に、化学的に、高い安定性が要求され、特に耐熱性酵素が好んで使用される。これは、酵素の関わる多くの反応が、高温で行えるほうが好ましいからである。つまり、55℃～95℃の如き高温下での処理が可能になり、基質の溶解度が増加し、溶媒粘度が減少し、触媒作用が加速され、さらに食品や医薬品の製造過程においては細菌混入のリスクが低下するからである。高温でのこれらのメリットを生かすため、種々の耐熱性酵素が求められている。

好熱菌の生体成分である酵素、核酸、膜、リボソームなどは熱安定性である。これらの菌から得られる耐熱性酵素は、医学・工学など広い分野で利用されている。例えば、遺伝子 DNA を試験管内で大量に増やす方法として近年、開発された PCR 法（Polymerase chain reaction）では、使用する酵素を大腸菌の DNA ポリメラーゼからサーマス菌（*Thermus*）の DNA ポリメラーゼ（Taq 酵素）に切り替えたことにより、加熱を繰り返すたびに新たに酵素を加える必要がなくなり、自動化が可能になって、非常に広範な分野で用いられるようになった。

好熱性細菌（*thermophilic bacteria*, *thermophile*, *Caldoactive bacteria*）とは、通常 55℃以上で生育できる細菌の総称で、温泉や火山、あるいは海底の熱水の噴出口付近などから採取される。代表的なものにバチルス（*Bacillus*）属、サーマス（*Thermus*）属がある。バチルス（*Bacillus*）属由来の酵素は高い耐熱性

を示すことから、現在産業的に使用される酵素の主流を占めている。

その一つ、バチルス・リチェニホルミス (*Bacillus licheniformis*) 由来の $\alpha$ -アミラーゼは、バイオテクノロジーの反応で使用される天然の酵素の中で最も熱安定性が高いものの一つであり、90°C以上の温度で工業的にデンプン加水分解を行うことも可能とされている (非特許文献1)。

これらの耐熱性酵素を産業上利用するためには多量に生産する手段が必要であり、好熱性菌を培養することが考えられる。しかしながら、これらの好熱細菌からの耐熱性酵素の取得には高温での微生物培養操作を要するため、さらには一般に好熱性菌の酵素生産速度が大きくないことなどから、工業的な酵素製造方法としては問題を有している。そこで常温程度の温度で生育でき、しかも高い酵素生産速度を示す宿主を用いた組換え体での生産が望まれる。

組換え DNA 技術による酵素生産の宿主としては、一般に酵母菌サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) が広く用いられており、1978年以来これに内在するプラスミドや DNA 複製開始点 (ars) や、誘導的あるいは恒常的高発現プロモーターなどを用いたベクターが開発されている。これにより酵母菌は、宿主にとって本質的に異種のタンパク質を遺伝子操作により、細胞培養培地中に分離する有用なタンパク質生産物として得ることができる (特許文献1)。

酵母の宿主-ベクター系は、酵母が真核生物であることにより、動物や植物の遺伝子の発現が大腸菌や枯草菌のような原核生物よりも効率がよい可能性がある。また、原核生物のように発熱性の毒素を持たないという利点もある。そして、古くから発酵工業に使われており、安全性の高いことが認められている。これまでにインターフェロン ( $\alpha$ 及び $\gamma$ )、B型肝炎ワクチン、キモシンなどのタンパク質の生産にも用いられている。また、遺伝子産物の生産量を上げるために、生産されたタンパク質を細胞外に分泌する分泌ベクターも開発され、ヒト・インスリン、上皮成長因子 (EGF)、インスリン様成長因子やインターロイキン2などが分泌生産されるようになった。

しかしながら、酵母に限らず、組換え体による異種タンパク質生産では必ずしも異種タンパク質の高生産が実現されているわけではない。例えば、同種の宿主-ベクター系を用いても、生産されるタンパク質量は大きく異なり (非特許文献2)、

組換えタンパク質は宿主内で発現抑制を受けていると考えられる。

バチルス・リチェニホルミス由来耐熱性アミラーゼと麹菌由来 $\alpha$ -アミラーゼはそれらの cDNA が共にクローニングされている。これらをそれぞれ同じベクターに導入し、サッカロミセス・セレビスエで発現させてアミラーゼ生産量を比較すると、酵母での耐熱性アミラーゼの生産量が非常に小さい（図 1、TAA：麹菌由来 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、AmyL H133I-A209V：バチルス・リチェニホルミス由来耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子）。

その原因は異種タンパク質の発現においては、異種細胞中での構造形成が困難な場合が多く、構造形成が不完全なこれらのタンパク質は宿主内で分解されることが知られており（非特許文献 3）、高生産の妨げとなっていると考えられる。また、タンパク質の構造異常を管理している品質管理機構の働きにより、異種タンパク質の生産が抑制されている可能性があるが、この機構の詳細はほとんどわかっていない。従って、常温で効率よく耐熱性タンパク質を生産する技術が課題となっている。

特許文献 1 特開平 6-181779 号公報

非特許文献 1 Philippe Joyet, et al., "Hyperthermostable Variant of a Highly Thermostable Alpha-Amylase" BIO/TECHNOLOGY VOL10 DECEMBER 1992

非特許文献 2 Cereghino, J.L. and Cregg, J.M., "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*", FEMS Microbiol. Rev. 24, 45-66 (2000)

非特許文献 3 Hammnd, C. and Helenius, A., "Quality control in the secretory pathway" Curr. Opin. Cell Biol., 7, 523-529 (1995)

#### 発明の開示

本発明は、分泌型耐熱性酵素を高分泌生産できる、分泌型耐熱性酵素をコードする DNA を形質転換し、且つ特定の遺伝子が破壊又は発現抑制された酵母変異株を提供することを目的とする。

本発明者らは、酵母における分泌型耐熱性酵素（バチルス・リチェニホルミス由来の $\alpha$ -アミラーゼ変異体 H133I-A209V）の分泌について、分泌生産を抑制する機

構を調査するために、4792株の遺伝子破壊株に分泌型耐熱性酵素の遺伝子を形質転換し、分泌活性を測定したところ、意外なことに、ある特定の遺伝子破壊株が、天然の酵母に比較して分泌活性が高いことを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

本発明は、以下を包含する。

(1) 分泌型耐熱性酵素をコードするDNAを形質転換し、且つ下記の遺伝子又はその相同遺伝子の1以上が破壊又は発現抑制された酵母変異株。

遺伝子：ADE6、ALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10、ALG12、ASE1、BOP1、CAP1、CLB4、CSN9、CWH41、FL01、GDS1、GPA2、HAP2、HFM1、HUB1、IVY1、IXR1、KEX1、MET12、OST5、PMP3、RMD6、RVS167、SET7、SNT309、SRF6、SYC1、TOS1、TRM1、UBR2、VIK1、VTS1、YBL081W、YGL242C、YGR042W、YGR054W、YGR071C、YIL039W、YJL007C、YLR232W、YLR407W

(2) 上記酵母がサッカロミセス・セレビシエであることを特徴とする、(1)記載の酵母変異株。

(3) 上記破壊又は発現抑制された遺伝子又はその相同遺伝子が、ALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10、ALG12、HFM1、RMD6、TOS1、VTS1及びYIL039Wから成る群より選択される1以上の遺伝子又はその相同遺伝子であることを特徴とする、(1)記載の酵母変異株。

(4) 上記分泌型耐熱性酵素がバチルス・リチェニホルミス由来のアミラーゼであることを特徴とする、(1)記載の酵母変異株。

(5) 分泌型耐熱性酵素をコードするDNAを形質転換し、且つ小胞体におけるタンパク質N結合型糖鎖付加に関わる遺伝子が破壊又は発現抑制された酵母変異株。

(6) 上記酵母がサッカロミセス・セレビシエであることを特徴とする、(5)記載の酵母変異株。

(7) 上記小胞体におけるタンパク質N結合型糖鎖付加に関わる遺伝子がALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10、ALG12、CWH41及びOST5から成る群より選択される1以上の遺伝子又はその相同遺伝子であることを特徴とする、(5)記載の酵母変異株。

(8) 上記小胞体におけるタンパク質N結合型糖鎖付加に関わる遺伝子が ALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10 及び ALG12 から成る群より選択される 1 以上の遺伝子又はその相同遺伝子であることを特徴とする、(7) 記載の酵母変異株。

(9) 上記分泌型耐熱性酵素がバチルス・リチェニホルミス由来のアミラーゼであることを特徴とする、(5) 記載の酵母変異株。

(10) (1) ~ (9) のいずれか 1 記載の酵母変異株を培養する工程と、前記酵母変異株の培養物又は培養上清から上記分泌型耐熱性酵素を単離する工程と、を含む、分泌型耐熱性酵素の生産方法。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2005-103275 号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、TDH3 プロモーター下流にそれぞれ挿入した麹菌由来  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 TAA とバチルス・リチェニホルミス由来耐熱性  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 AmyL-H133I-A209V を持つ発現ベクターをサッカロミセス・セレビシエに形質転換した組換え酵母のアミラーゼ発現を示している。ヨウ素デンプン反応を起こしていない白い部分 (ハロ) がアミラーゼ活性の大きさを示している。

図 2 A は、バチルス・リチェニホルミス由来の  $\alpha$ -アミラーゼ変異体 H133I-A209V の遺伝子 AmyL-H133I-A209V をベクター p316TDH3pAN に組換えた組換え体 p316TDHAmyL-H133I-A209V を図示している。

図 2 B は、p316TDHAmyL-H133I-A209V によって形質転換された、サッカロミセス・セレビシエ BY4743 株における、 $\alpha$ -アミラーゼ変異体 H133I-A209V の発現を示している。

図 3 A は、サッカロミセス・セレビシエの 4792 種類の遺伝子破壊株に組換え体 p316TDHAmyL-H133I-A209V を形質転換することを図示している。

図 3 B は、アミラーゼ活性検出試験を図示している。

図 4 は、4792 種類のサッカロミセス・セレビシエ遺伝子破壊株におけるバチルス・リチェニホルミス由来  $\alpha$ -アミラーゼ変異体 H133I-A209V の活性試験の測定結

果である。

図 5 は、各遺伝子破壊株における  $\alpha$ -アミラーゼ変異体 H133I-A209V の分泌量を、親株の分泌量を + とした場合の相対的な分泌量(++, +++) で示す。

図 6 は、小胞体 (ER) での N 結合型糖鎖付加タンパク質のグリコシル化プロセスにおけるオリゴ糖の伸長・転移並びにサッカロミセス・セレビスエにおけるこれらの反応に関わる酵素をコードしている遺伝子を示している。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明によれば、酵母のある特定の遺伝子を破壊した株を作製し、この株に分泌型耐熱性酵素をコードする DNA を形質転換し、当該分泌型耐熱性酵素の細胞外への分泌量を測定することによって、分泌型耐熱性酵素を高分泌生産する株を選択し、これによって本発明に係る酵母変異株を得ることができ、並びに、そのような株を得るために破壊又は発現抑制すべき遺伝子を同定できる。

サッカロミセス・セレビスエには、約 6000 個の遺伝子がある。そのうち生存にとって必須な遺伝子約 1200 個を除いた 4792 個の遺伝子をそれぞれ破壊したサッカロミセス・セレビスエの 4792 種類の遺伝子破壊株 (4792 yeast deletion strains collection) が EUROSCARF、Invitrogen 及び Open Biosystems から販売されている。

一方、バチルス・リチェニホルミス由来の  $\alpha$ -アミラーゼ変異体 H133I-A209V は、熱安定性の高い分泌型耐熱性酵素として知られている (非特許文献 1)。この  $\alpha$ -アミラーゼの遺伝子 AmyL-H133I-A209V をベクター p316TDHpAN に組換えた組換え体 p316TDHAmyL-H133I-A209V (酵素遺伝子発現ベクター) を図 2 A に示す。なお、この組換え体を使用して形質転換した、サッカロミセス・セレビスエ BY4743 株を培養し、アミラーゼ活性を検出することにより、 $\alpha$ -アミラーゼ変異体 H133I-A209V の発現が確認された (図 2 B)。

そこで、具体的に、上述の 4792 種類の遺伝子破壊株に酵素遺伝子発現ベクター p316TDHAmyL-H133I-A209V を、図 3 A に示す方法で形質転換する。次いで、図 3 B に示すデンプン培地とヨウ素デンプン反応を用いた方法で、アミラーゼ活性を測定することにより、アミラーゼ分泌量を測定する。そして、このうち、アミラ

一ゼ分泌量が親株よりも高いものを同定し、当該遺伝子破壊株で破壊されている遺伝子を、本発明に係る酵母変異株を得るために破壊又は発現抑制すべき対象遺伝子として同定できる。

このようにして破壊又は発現抑制の対象遺伝子として同定された遺伝子を下記の表 1 に示す。

本発明は、分泌型耐熱性酵素をコードする DNA を形質転換し、且つ表 1 に示す遺伝子又はその相同遺伝子の 1 以上が破壊又は発現抑制された酵母変異株に関する。本発明に係る酵母変異株では、形質転換された DNA からコードされる分泌型耐熱性酵素の細胞外への分泌量が、陰性対照(分泌型耐熱性酵素をコードする DNA が形質転換されているが、表 1 に示す遺伝子又はその相同遺伝子が破壊又は発現抑制されていない酵母)と比べて高い。

破壊又は発現抑制の対象となる遺伝子としては、サッカロミセス・セレビシエの遺伝子名称(一般名/系統的名称、ただし一般名がないものについては、系統的名称のみ示す)に従えば、表 1 に示す ADE6/YGR061C、ALG3/YBL082C、ALG5/YPL227C、ALG6/YOR002W、ALG8/YOR067C、ALG9/YNL219C、ALG10/YGR227W、ALG12/YNR030W、ASE1/YOR058C、BOP1/YPL221W、CAP1/YKL007W、CLB4/YLR210W、CSN9/YDR179C、CWH41/YGL027C、FLO1/YAR050W、GDS1/YOR355W、GPA2/YER020W、HAP2/YGL237C、HFM1/YGL251C、HUB1/YNR032C-A、IVY1/YDR229W、IXR1/YKL032C、KEX1/YGL203C、MET12/YPL023C、OST5/YGL226C-A、PMP3/YDR276C、RMD6/YEL072W、RVS167/YDR388W、SET7/YDR257C、SNT309/YPR101W、SRF6/YNL179C、SYC1/YOR179C、TOS1/YBR162C、TRM1/YDR120C、UBR2/YLR024C、VIK1/YPL253C、VTS1/YOR359W、YBL081W、YGL242C、YGR042W、YGR054W、YGR071C、YIL039W、YJL007C、YLR232W 及び YLR407W から成る群より選択される 1 以上の遺伝子が挙げられる。また、これら遺伝子の分子機能、生物学的作用及び局在を表 1 に示す。なお、これら遺伝子の遺伝子配列、アミノ酸配列及びその他の情報については、例えば、Saccharomyces Genome Database(<http://www.yeastgenome.org/>)から得ることができる。

特に、ALG3(RHK1)、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10(DIE2)、ALG12(ECM39)、HFM1、RMD6、TOS1、VTS1 及び YIL039W から成る群より選択される 1 以上の遺伝子又はその相同遺伝子が破壊又は発現抑制された酵母は、形質転換された DNA からコード

される分泌型耐熱性酵素の細胞外への分泌量が、陰性対照と比べて非常に高い。

さらに、破壊又は発現抑制の対象となる遺伝子としては、小胞体におけるタンパク質 N 結合型糖鎖付加に関わる遺伝子が挙げられる。ここで、小胞体におけるタンパク質 N 結合型糖鎖付加に関わる遺伝子とは、小胞体での N 結合型糖鎖付加タンパク質のグリコシル化プロセスにおけるオリゴ糖の伸長及び転移に参与する酵素やタンパク質をコードする遺伝子を意味する。

このような小胞体におけるタンパク質 N 結合型糖鎖付加に関わる遺伝子としては、例えば、上述のサッカロミセス・セレビスエの遺伝子のうちの ALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10、ALG12、CWH41 及び OST5 から成る群より選択される 1 以上の遺伝子又はその相同遺伝子が挙げられる。特に、ALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10 及び ALG12 から成る群より選択される 1 以上の遺伝子又はその相同遺伝子を破壊又は発現抑制した酵母変異株では、形質転換された DNA からコードされる分泌型耐熱性酵素の細胞外への分泌量が陰性対照と比べて非常に高い。

ここで、相同遺伝子とは、形質転換すべき酵母がサッカロミセス・セレビスエ以外の酵母である場合に、当該酵母における上述したサッカロミセス・セレビスエの遺伝子からコードされるタンパク質と同様の活性又は機能を有するタンパク質をコードする遺伝子を意味する。

一方、分泌型耐熱性酵素とは、細胞外へ分泌され、且つ高温(例えば、55°C~95°C)下でもタンパク質の 3 次構造が壊れにくく、酵素活性を保持する酵素を意味する。本発明において、形質転換の対象となる分泌型耐熱性酵素をコードする DNA としては、いずれの分泌型耐熱性酵素をコードする DNA であってもよく、形質転換すべき酵母に対して同種、異種のいずれであってもよい。また、当該 DNA からコードされる分泌型耐熱性酵素は、非分泌型耐熱性酵素に既知の分泌シグナルペプチドを機能的に連結した融合タンパク質であってもよい。形質転換の対象となる分泌型耐熱性酵素をコードする DNA としては、例えば、バチルス・リチェニホルミス由来のアミラーゼ(例えば、上述の  $\alpha$ -アミラーゼ変異体 H133I-A209V 等)、バチルス・ステアロサーモフィラス(*Bacillus stearothermophilus*)由来のアラニンデヒドロゲナーゼ、サーモコッカス・コダカラエンシス(*Thermococcus kodakaraensis*)由来の DNA ポリメラーゼ及びパイロコッカス・ホリコシ

(*Pyrococcus horikoshii*)由来のセルラーゼをコードする DNA が挙げられる。

本発明において、宿主となる酵母は、いずれの種類のもであってもよいが、例えば、サッカロミセス・セレビシエ、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 及びクレイベロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) が挙げられる。

以下に、本発明に係る酵母変異株の作製方法を説明する。

#### (1) 分泌型耐熱性酵素をコードする DNA の形質転換

本発明に係る酵母変異株の作製では、分泌型耐熱性酵素をコードする DNA を宿主酵母に形質転換する。分泌型耐熱性酵素をコードする DNA は、分泌型耐熱性酵素をコードする遺伝子を含む DNA 断片や適当なベクターに分泌型耐熱性酵素をコードする遺伝子が挿入された発現ベクターであってよい。分泌型耐熱性酵素をコードする遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主酵母中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えばプラスミド、シャトルベクター、ヘルパープラスミドなどが挙げられる。また該ベクター自体に複製能がない場合には、宿主酵母の染色体に挿入することなどによって複製可能となる DNA 断片であってもよい。

ベクターに分泌型耐熱性酵素をコードする遺伝子を挿入するには、先ず、精製された分泌型耐熱性酵素をコードする遺伝子を含む DNA 断片を適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNA の制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。またベクターと分泌型耐熱性酵素をコードする遺伝子を含む DNA 断片とのそれぞれ一部に相同な領域を持たせることにより、PCR などを用いた *in vitro* 法又は *in vivo* 法によって両者を連結する方法であってもよい。

宿主酵母への分泌型耐熱性酵素をコードする DNA の導入方法は、酵母に DNA を導入する方法であれば特に限定されず、例えば電気穿孔法 (エレクトロポレーション法)、スフェロプラスチ法、酢酸リチウム法等が挙げられる。

#### (2) 宿主酵母の遺伝子の破壊又は発現抑制

本発明に係る酵母変異株の作製では、宿主酵母において、上述した破壊又は発現抑制の対象遺伝子を破壊又は発現抑制する。ここで、遺伝子破壊とは、宿主酵母に内在する遺伝子に変異を導入し、当該遺伝子を破壊又は欠損させることで、

当該遺伝子からコードされるタンパク質が生産されないか又は生産されたタンパク質が機能を持たないことを意味する。このような遺伝子破壊がなされた既存の酵母の遺伝子破壊株又は遺伝子欠損株をそのまま宿主として使用することができ、例えば、上述したサッカロミセス・セレビシエの遺伝子破壊株 (EUROSCARF、Invitrogen 及び Open Biosystems 製) が挙げられる。また、遺伝子破壊方法としては、例えば、UV や EMS 等の変異処理法、相同組換えによる遺伝子置換法、トランスポゾンを利用した遺伝子破壊等が挙げられる。

一方、発現抑制とは、宿主酵母に内在する遺伝子の転写又は翻訳レベルでの抑制、あるいは当該遺伝子から発現されたタンパク質の活性又は機能の抑制を意味する。このような発現抑制により、宿主酵母において、対象遺伝子からコードされるタンパク質の活性又は機能を抑制することができる。

遺伝子の転写レベルでの抑制方法としては、例えば、対象遺伝子を制御するプロモーターの置換や変異、RNA の不安定化、コピー数の減少 (二倍体における、対象遺伝子の一方の対立遺伝子の破壊) 等が挙げられる。

遺伝子の翻訳レベルでの抑制方法としては、例えば、アンチセンス RNA を用いる方法が挙げられる。対象遺伝子の mRNA に対するアンチセンス RNA を転写する遺伝子を、宿主酵母ゲノムに組み込み、当該アンチセンス RNA を過剰発現させることで、対象遺伝子の mRNA の翻訳が抑制される。

また、対象遺伝子からコードされるタンパク質の活性又は機能の抑制方法としては、例えば、これらタンパク質に対する抗体を用いた方法が挙げられる。酵母宿主を、このような抗体存在下で培養することで、対象遺伝子からコードされるタンパク質に抗体が結合することで、当該タンパク質の活性又は機能を抑制できる。

このように、分泌型耐熱性酵素をコードする DNA の形質転換と宿主酵母の遺伝子の破壊又は発現抑制とを行うことで、本発明に係る酵母変異株を得ることができる。

本発明に係る酵母変異株では、形質転換した DNA からコードされる分泌型耐熱性酵素が高分泌生産される。

そこで、本発明に係る酵母変異株を培養し、培養後、酵母変異株の培養物又は

培養上清から分泌型耐熱性酵素を単離することで、分泌型耐熱性酵素を高収率で得ることができる。

酵母変異株を培養する培地や培養条件は、特に限定されず、使用した宿主酵母の種類に応じて適宜選択すればよい。

培養後、酵母変異株の培養物をそのまま使用するか又は遠心分離等により酵母変異株を除去し、培養上清とする。その後、有機溶媒による抽出等により培養物又は培養上清から分泌型耐熱性酵素を採取し、必要に応じてさらに各種クロマトグラフィー等を用いて単離精製することができる。

あるいは、培養後、酵母変異株の培養物又は培養上清をそのまま使用してもよい。

このように、本発明に係る酵母変異株を用いれば、常温程度の温度下で分泌型耐熱性酵素を高収率で分泌生産することができる。

#### 実施例

##### (1) 組換え体 p316TDHAmyL-H133I-A209V の構築

図 2 A に示すように、サッカロミセス・セレビシエにおいて、バチルス・リチエニホルミス由来  $\alpha$ -アミラーゼ (AmyL) 変異体 H133I-A209V を発現させるための、組換え体 p316TDHAmyL-H133I-A209V (発現ベクター) を構築した。

AmyL-H133I-A209V cDNA 断片を、両端にそれぞれ AscI サイトと NotI サイトを有するように、PCR によって製造した。

次いで、AmyL-H133I-A209V cDNA 断片を、AscI 及び NotI によって消化し、同様に消化されたベクター p316TDH3pAN にクローン化した。

##### (2) $\alpha$ -アミラーゼ変異体 H133I-A209V の発現

上記 (1) の組換え体 p316TDHAmyL-H133I-A209V を使用して、サッカロミセス・セレビシエ BY4743 株を形質転換した後、培養した。次いで、培養後、図 3 B に示すデンプン培地とヨウ素デンプン反応を用いた方法により、アミラーゼ活性を検出することにより、 $\alpha$ -アミラーゼ変異体 H133I-A209V の発現 (培養上清への分泌) を確認した (図 2 B 参照)。

##### (3) 組換え体 p316TDHAmyL-H133I-A209V の遺伝子破壊株への形質転換

サッカロミセス・セレビシエには、約 6000 個の遺伝子がある。そのうち生存に

とって必須な遺伝子約 1200 個を除いた 4792 個の各遺伝子をそれぞれ破壊した、4792 株の遺伝子破壊株 (4792 yeast deletion strains collection) が EUROSCARF、Invitrogen 及び Open Biosystems から販売されている。

図 3 A に示すように、上記 (1) で作製したバチルス・リチェニホルミス由来  $\alpha$ -アミラーゼ変異体 H133I-A209V 発現ベクター p316TDHAmyL-H133I-A209V を、上記 4792 種類の遺伝子破壊株に形質転換した。

具体的には、各遺伝子破壊株を、25  $\mu$ L の培地を分注した 96 穴マイクロタイターウェルで 28°C、24 時間静置培養した。静置培養後、培養液を、発現ベクターを含む 25  $\mu$ L の遺伝子導入液と混合し、42°C で 2 時間処理した。次いで、この混合液を選択培地にまき、28°C で 48 から 72 時間培養することで、形質転換体を得た。

#### (4) アミラーゼ活性試験

図 3 B は、アミラーゼ活性試験を図示している。

上記 (3) で得られた形質転換体を、28°C、pH6.0 で、ウラシルを含まない合成培地で培養し、得られた培養液を 1% デンプンを含む選択培地 (pH6.0) に植菌し、28°C、24 時間静置培養後、ヨウ素デンプン反応により生じたハロによりアミラーゼ活性を検出した。

#### (5) アミラーゼ活性試験結果

図 4 は、上記 (4) の 4792 株のサッカロミセス・セレビスエ遺伝子破壊株におけるバチルス・リチェニホルミス由来  $\alpha$ -アミラーゼ変異体 H133I-A209V の活性試験の測定結果を示している。図 4 には、96 穴マイクロタイターウェルが 54 枚示されている。各 1 穴がサッカロミセス・セレビスエ遺伝子破壊株 1 株毎のアミラーゼ活性試験結果に対応している。

#### (6) 高分泌生産株

上記 (5) のアミラーゼ活性試験の結果、バチルス・リチェニホルミス由来  $\alpha$ -アミラーゼ変異体 H133I-A209V を高分泌生産する、46 種類の形質転換体である遺伝子破壊株を得た。それぞれの遺伝子破壊株 (破壊遺伝子名で表記) と親株のアミラーゼ活性試験の結果を図 5 に示す。図 5 では、各遺伝子破壊株における  $\alpha$ -アミラーゼ変異体 H133I-A209V の分泌量を、親株の分泌量を + とした場合の相対的な分泌量 (++, +++) で示す。また、下記の表 1 には、図 5 に示す遺伝子破壊株の

破壊遺伝子(又はそれにコードされるタンパク質)の一般名及び系統的名称、並びにその遺伝子からコードされるタンパク質の分子機能、生物学的作用及びその細胞内の局在を示す。

図5に示されたように、分泌型耐熱性酵素をコードするDNAを形質転換し、且つ以下の遺伝子：ADE6、ALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10、ALG12、ASE1、BOP1、CAP1、CLB4、CSN9、CWH41、FLO1、GDS1、GPA2、HAP2、HFM1、HUB1、IVY1、IXR1、KEX1、MET12、OST5、PMP3、RMD6、RVS167、SET7、SNT309、SRF6、SYC1、TOS1、TRM1、UBR2、VIK1、VTS1、YBL081W、YGL242C、YGR042W、YGR054W、YGR071C、YIL039W、YJL007C、YLR232W及びYLR407Wのうち1つを破壊したサッカロミセス・セレビスエは、親株と比べて、分泌型耐熱性酵素を特に強力に高分泌生産した。特に、分泌型耐熱性酵素をコードするDNAを形質転換し、且つALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10、ALG12、RMD6、TOS1、VTS1及びYIL039Wから成る群の遺伝子が破壊された遺伝子破壊株は、親株と比べて著しく高い活性(+++)、すなわち著しく高い分泌量を有することが理解される。

一方、図6は、小胞体でのN結合型糖鎖付加タンパク質のグリコシル化プロセスにおけるオリゴ糖の伸長・転移並びにサッカロミセス・セレビスエにおけるこれらの反応に関わる酵素をコードしている遺伝子を示している。図6において、白抜きで示した遺伝子は、 $\alpha$ -アミラーゼ変異体H133I-A209Vを高分泌生産した上記遺伝子破壊株の破壊遺伝子に対応する。また、必須遺伝子には下線を付した。

図5に示す遺伝子破壊株の破壊遺伝子のうち、ALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10、ALG12、CWH41及びOST5の9個の遺伝子は、小胞体におけるタンパク質N結合型糖鎖付加に関わる遺伝子であった(表1及び図6)。この9個のうち7個のALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10及びALG12を破壊した遺伝子破壊株は、形質転換されたDNAからコードされる分泌型耐熱性酵素を著しく高分泌生産(+++)した。このような結果から、サッカロミセス・セレビスエを含めた酵母では、小胞体におけるタンパク質N結合型糖鎖付加に関わる遺伝子を破壊した酵母変異株は、形質転換されるDNAからコードされる分泌型耐熱性酵素を高分泌生産することが期待できる。

表 1

一般名	系統的名称	分子機能	生物学的作用	局在
<i>ADE6</i>	YGR061C	ホスホリボシルフォルミルグリシンアミジン合成活性	プリン生合成	細胞質
<i>ALG3</i>	YBL082C	$\alpha$ -1,3-マンノシルトランスフェラーゼ活性	ドリコール結合糖鎖合成、タンパク質糖鎖修飾	小胞体
<i>ALG5</i>	YPL227C	ドリコールリン酸-糖転移活性	N-結合型糖鎖	小胞体膜
<i>ALG6</i>	YOR002W	ヘキソシル基転移酵素活性	ドリコール結合多糖生合成、タンパク質糖鎖修飾	小胞体
<i>ALG8</i>	YOR067C	多糖転移活性	ドリコール結合多糖生合成、多糖-脂質中間体形成	小胞体膜
<i>ALG9</i>	YNL219C	マンノシルトランスフェラーゼ活性	ドリコール結合糖鎖合成、タンパク質糖鎖修飾	小胞体
<i>ALG10</i>	YGR227W	ドリコールリン酸グルコース-糖脂質糖転移活性	N結合型糖鎖合成	小胞体膜
<i>ALG12</i>	YNR030W	$\alpha$ -1,6-マンノシルトランスフェラーゼ活性	ドリコール結合糖鎖合成、タンパク質糖鎖修飾	小胞体
<i>ASE1</i>	YOR058C	微小管結合	紡錘糸形成	核微小管、紡錘体微小管
<i>BOP1</i>	YPL221W	不明	不明	芽のくびれ、液胞
<i>CAP1</i>	YKL007W	タンパク質結合	アクチンフィラメント制御	F-アクチンキャッピングタンパク質複合体
<i>CLB4</i>	YLR210W	サイクリン依存型タンパク質リン酸化酵素調整因子	細胞周期 G2/M 遷移、細胞周期 S 期	核
<i>CSN9</i>	YDR179C	不明	フェロモン応答	シグナロソーム複合体
<i>CWH41</i>	YGL027C	マンノシル多糖グルコシダーゼ活性	細胞壁合成・制御	小胞体膜
<i>FLO1</i>	YAR050W	マンノース結合	凝集	細胞壁
<i>GDS1</i>	YOR355W	不明	好気呼吸	細胞質、ミトコンドリア、核
<i>GPA2</i>	YER020W	GTPase 活性	細胞の成長・維持、擬菌糸、シグナル伝達、胞子形成	ミトコンドリア
<i>HAP2</i>	YGL237C	転写活性化活性	炭水素代謝制御	CCAAT 結合因子複合体

<i>HFM1</i>	YGL251C	DNA ヘリカーゼ活性	DNA 巻き戻し	核
<i>HUB1</i>	YNR032C-A	タンパク質結合	接合時の形態形成	シュムー先端
<i>IVY1</i>	YDR229W	リン脂質結合	分泌経路	液胞膜
<i>IXR1</i>	YKL032C	DNA 結合	DNA 修復	核染色体
<i>KEX1</i>	YGL203C	カルボキシペプチダーゼ D 活性	タンパク質プロセッシング	ゴルジ体トランス面
<i>MET12</i>	YPL023C	メチレンテトラヒドロフォレ イト還元活性	メチオニン代謝	細胞
<i>OST5</i>	YGL226C-A	ドリコールリン酸多糖-タ ンパク質 糖転移活性	N 結合型糖鎖	多糖転移酵素複合 体
<i>PMP3</i>	YDR276C	不明	陽イオン輸送	細胞膜
<i>RMD6</i>	YEL072W	不明	不明	不明
<i>RVS167</i>	YDR388W	細胞骨格タンパク質結合	エンドサイトーシス、出 芽、浸透圧応答	アクチンパッチ
<i>SET7</i>	YDR257C	不明	不明	核
<i>SNT309</i>	YPR101W	不明	mRNA スプライシング	スプライオソーム複 合体
<i>SRF6</i>	YNL179C	不明	不明	不明
<i>SYC1</i>	YOR179C	不明	転写終結	mRNA 切断・ポリ A 付加複合体
<i>TOS1</i>	YBR162C	不明	不明	細胞壁、液胞
<i>TRM1</i>	YDR120C	tRNA (グアニン-N2-)-メ チル転移酵素	tRNA メチル化	ミトコンドリア、核外 膜
<i>UBR2</i>	YLR024C	ユビキチン-タンパク質 リガーゼ活性	タンパク質ユビキチン化	細胞質
<i>VIK1</i>	YPL253C	微小管モーター活性	微小管関連機能	キネシン複合体、中 心体
<i>VTS1</i>	YOR359W	RNA 結合性細胞内輸送 活性	タンパク質の液胞への輸 送	細胞質
	YBL081W	不明	不明	不明
	YGL242C	不明	不明	不明
	YGR042W	不明	不明	細胞質、核
	YGR054W	翻訳開始因子活性	翻訳開始	細胞質リボソーム
	YGR071C	不明	不明	核
	YIL039W	不明	不明	小胞体
	YJL007C	不明	不明	不明
	YLR232W	不明	不明	不明
	YLR407W	不明	不明	不明

## 産業上の利用可能性

本発明によれば、分泌型耐熱性酵素をコードする DNA を形質転換し、且つ以下の遺伝子：ADE6、ALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10、ALG12、ASE1、BOP1、CAP1、CLB4、CSN9、CWH41、FLO1、GDS1、GPA2、HAP2、HFM1、HUB1、IVY1、IXR1、KEX1、MET12、OST5、PMP3、RMD6、RVS167、SET7、SNT309、SRF6、SYC1、TOS1、TRM1、UBR2、VIK1、VTS1、YBL081W、YGL242C、YGR042W、YGR054W、YGR071C、YIL039W、YJL007C、YLR232W 及び YLR407W から成る群より選択される遺伝子又はその相同遺伝子の 1 以上が破壊又は発現抑制された酵母変異株が提供される。本発明に係る酵母変異株を用いれば、形質転換された DNA よりコードされる分泌型耐熱性酵素を高分泌生産することができる。

また、同様に、小胞体におけるタンパク質 N 結合型糖鎖付加に関わる遺伝子が破壊又は発現抑制された本発明に係る酵母変異株を用いることで、形質転換された DNA からコードされる分泌型耐熱性酵素を高分泌生産することができる。

本発明に係る酵母変異株は、種々の分泌型耐熱性酵素を生産することが可能であるが、とりわけ、分泌型耐熱性アミラーゼを効率よく分泌生産し得るものである。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

## 請求の範囲

1. 分泌型耐熱性酵素をコードする DNA を形質転換し、且つ下記の遺伝子又はその相同遺伝子の 1 以上が破壊又は発現抑制された酵母変異株。

遺伝子：ADE6、ALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10、ALG12、ASE1、BOP1、CAP1、CLB4、CSN9、CWH41、FLO1、GDS1、GPA2、HAP2、HFM1、HUB1、IVY1、IXR1、KEX1、MET12、OST5、PMP3、RMD6、RVS167、SET7、SNT309、SRF6、SYC1、TOS1、TRM1、UBR2、VIK1、VTS1、YBL081W、YGL242C、YGR042W、YGR054W、YGR071C、YIL039W、YJL007C、YLR232W、YLR407W

2. 上記酵母がサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) であることを特徴とする、請求項 1 記載の酵母変異株。

3. 上記破壊又は発現抑制された遺伝子又はその相同遺伝子が、ALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10、ALG12、HFM1、RMD6、TOS1、VTS1 及び YIL039W から成る群より選択される 1 以上の遺伝子又はその相同遺伝子であることを特徴とする、請求項 1 記載の酵母変異株。

4. 上記分泌型耐熱性酵素がバチルス・リチェニホルミス (*Bacillus licheniformis*) 由来のアミラーゼであることを特徴とする、請求項 1 記載の酵母変異株。

5. 分泌型耐熱性酵素をコードする DNA を形質転換し、且つ小胞体におけるタンパク質 N 結合型糖鎖付加に関わる遺伝子が破壊又は発現抑制された酵母変異株。

6. 上記酵母がサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) であることを特徴とする、請求項 5 記載の酵母変異株。

7. 上記小胞体におけるタンパク質 N 結合型糖鎖付加に関わる遺伝子が ALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10、ALG12、CWH41 及び OST5 から成る群より選択される 1 以上の遺伝子又はその相同遺伝子であることを特徴とする、請求項 5 記載の酵母変異株。

8. 上記小胞体におけるタンパク質 N 結合型糖鎖付加に関わる遺伝子が ALG3、ALG5、ALG6、ALG8、ALG9、ALG10 及び ALG12 から成る群より選択される 1 以上の

遺伝子又はその相同遺伝子であることを特徴とする、請求項7記載の酵母変異株。

9. 上記分泌型耐熱性酵素がバチルス・リチェニホルミス (*Bacillus licheniformis*)由来のアミラーゼであることを特徴とする、請求項5記載の酵母変異株。

10. 請求項1～9のいずれか1項記載の酵母変異株を培養する工程と、前記酵母変異株の培養物又は培養上清から上記分泌型耐熱性酵素を単離する工程と、を含む、分泌型耐熱性酵素の生産方法。

図 1

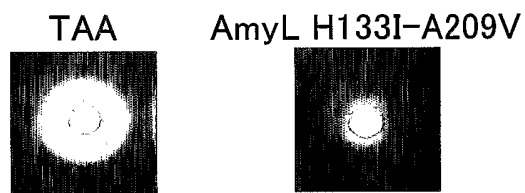


図 2 A

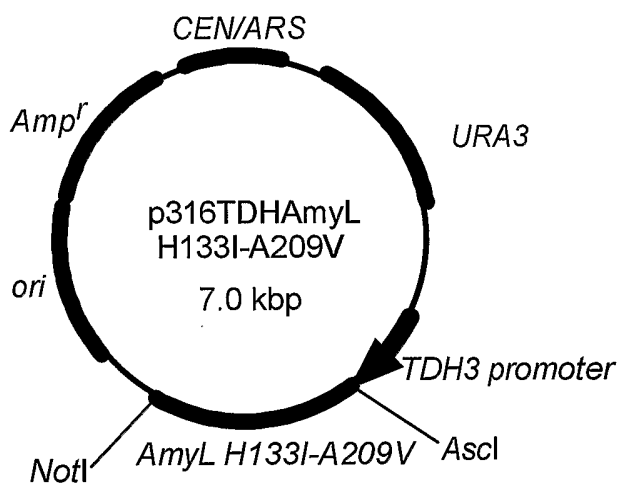
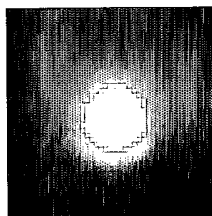


図 2 B



p316TDHAmyL  
H1331-A209V

図 3 A

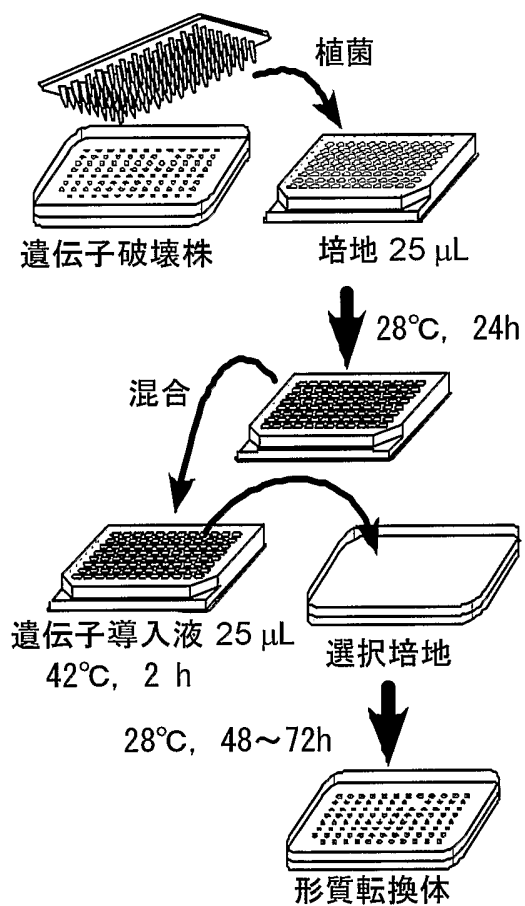


図 3 B

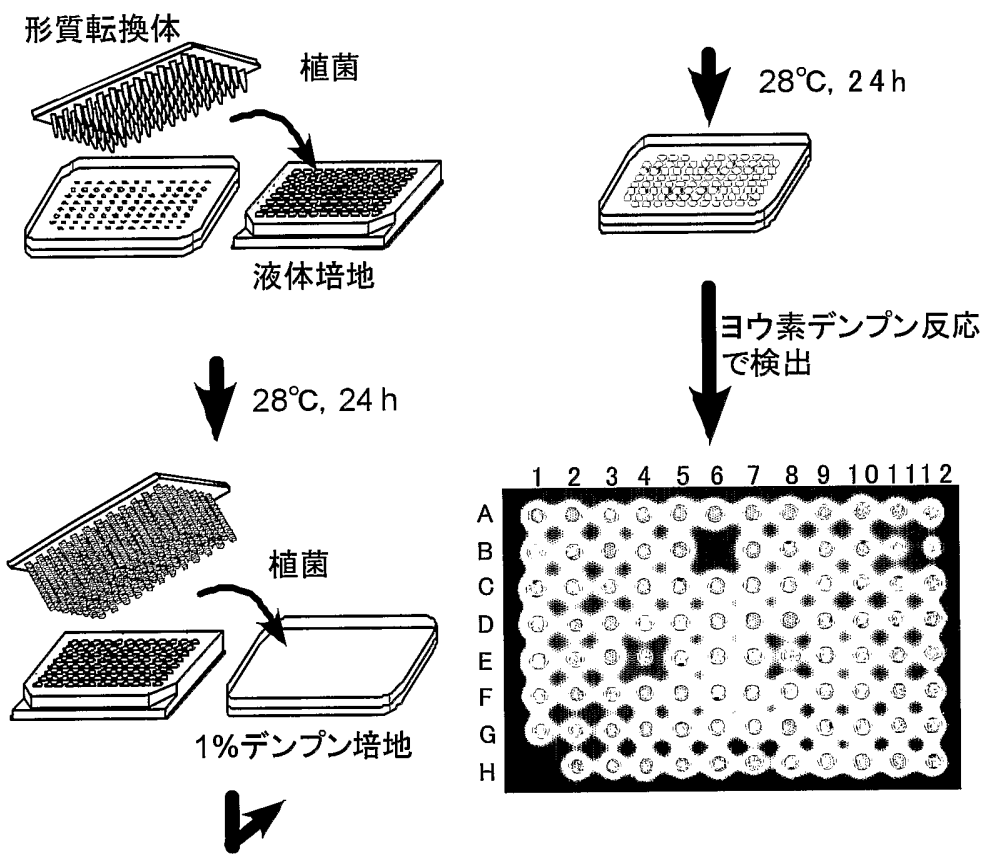


図 4

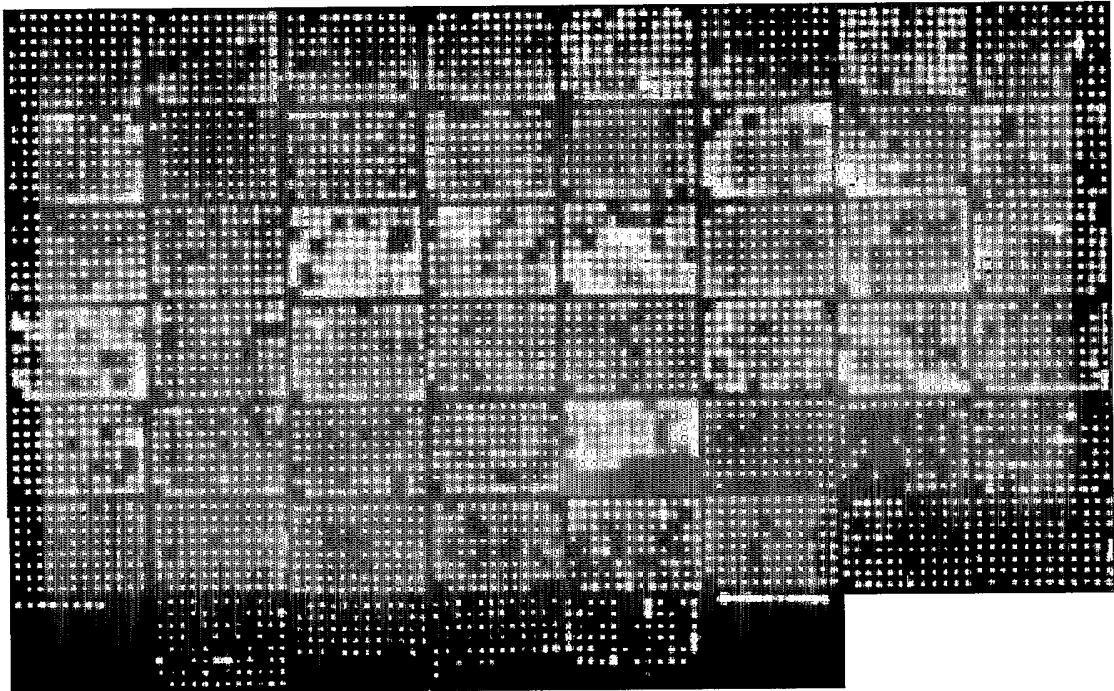


図 5

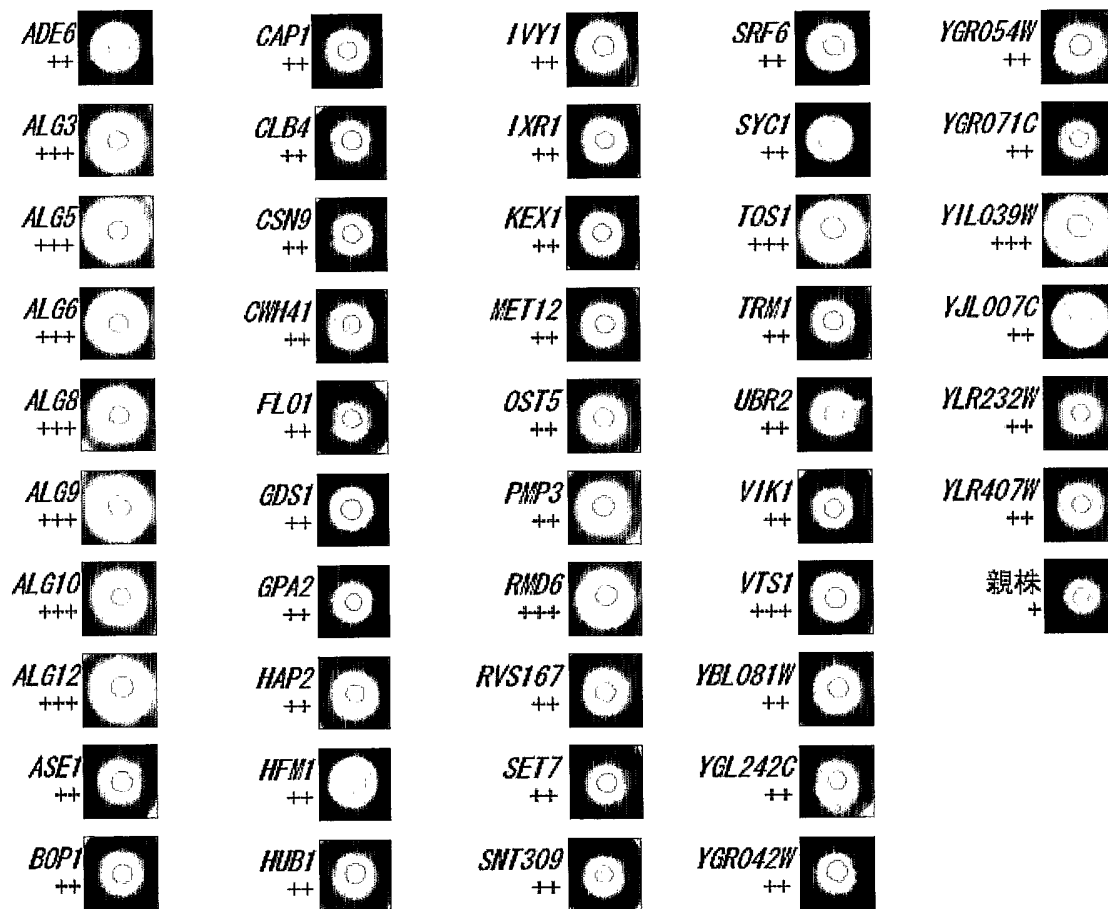
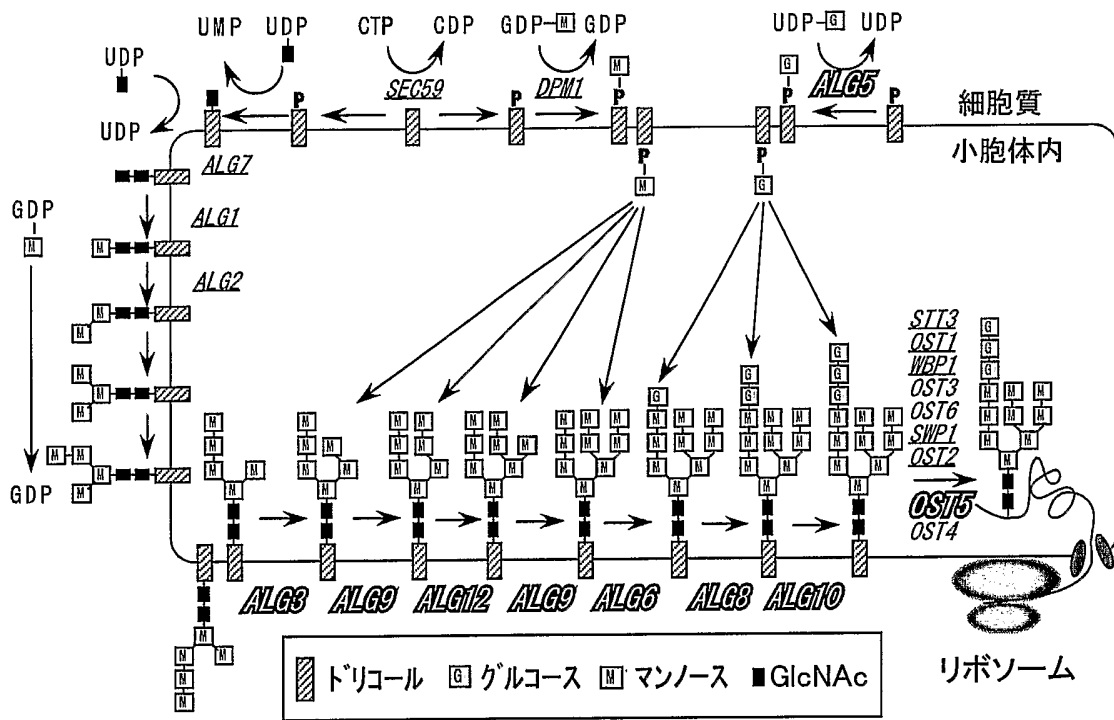


図 6



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/307262

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <b>C12N1/19</b> (2006.01), <b>C12N9/00</b> (2006.01), <b>C12N15/09</b> (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>C12N1/19</b> (2006.01), <b>C12N9/00</b> (2006.01), <b>C12N15/09</b> (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus (JDream2), BIOSIS/WPI (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-58143 A (Yugen Kaisha Yamaguchi TLO), 10 March, 2005 (10.03.05), (Family: none)	1-10
Y	Sho MINEMATSU, "Saccharomyces cerevisiae Idenshi Hakai Kabu-set eno High Throughput Keishitsu Tenkanho ni yoru Gairai Amylase no Bunpi Seisan Kiko Kaiseki", Nippon Nogei Kagakukai Taikai Koen Yoshishu, Vol.2004, page 140 (05 March, 2004 (05.03.04)), 3A02p07	1-10
Y	Donald, K.A.G. et al., Production of bacterial thermophilic xylanase in Saccharomyces cerevisiae, Appl.Microbiol.Biotechnol., Vol.42, pages 309 to 312, (1994)	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
		"&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 28 April, 2006 (28.04.06)	Date of mailing of the international search report 23 May, 2006 (23.05.06)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/307262

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Alessandra, M. et al., Industrial-scale production and rapid purification of an archeal beta-glycosidase expressed in Saccharomyces cerevisiae, Biotechnology and Applied Biochemistry, Vol.22, No.3, pages 261 to 268, (1995)	1-10
A	Honda, H. et al., Cloning and expression in Saccharomyces cerevisiae of an endo- $\beta$ -glucanase gene from a thermophilic cellulolytic anaerobe, Appl.Microbiol.Biotechnol., Vol.28, pages 57 to 58, (1988)	1-10
A	Saito, T. et al., Expression of a Thermostable Cellulase Gene from a Thermophilic Anaerobe in Saccharomyces cerevisiae, Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol.69, No.5, pages 282 to 286, (1990)	1-10
A	Moracci, M. et al., Expression of the Thermostable $\beta$ -Galactosidase Gene from the Archaeobacterium Sulfolobus solfataricus in Saccharomyces cerevisiae and Characterization of a New Inducible Promoter for Heterologous Expression, Journal of Bacteriology, Vol.174, No.3, pages 873 to 882, (1992)	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. <b>C12N1/19</b> (2006.01), <b>C12N9/00</b> (2006.01), <b>C12N15/09</b> (2006.01)		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. <b>C12N1/19</b> (2006.01), <b>C12N9/00</b> (2006.01), <b>C12N15/09</b> (2006.01)		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus (JDream2), BIOSIS/WPI (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2005-58143 A (有限会社山口ティール・エル・オー) 2005.03.10 (ファミリーなし)	1-10
Y	峯松章、Saccharomyces cerevisiae 遺伝子破壊株セットへのハイスループット形質転換法による外来アミラーゼの分泌生産機構解析、 日本農芸化学会大会講演要旨集 Vol.2004, pp.140 (2004.03.05) 3A02p07	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 28.04.2006	国際調査報告の発送日 23.05.2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 明照 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 8412

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Donald, K.A.G. et al., Production of bacterial thermophilic xylanase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , Vol.42, pp.309-312 (1994)	1 - 1 0
A	Alessandra, M. et al., Industrial-scale production and rapid purification of an archeal beta-glycosidase expressed in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Biotechnology and Applied Biochemistry</i> , Vol.22, No.3, pp.261-268 (1995)	1 - 1 0
A	Honda, H. et al., Cloning and expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> of an endo- $\beta$ -glucanase gene from a thermophilic cellulolytic anaerobe, <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , Vol.28, pp.57-58 (1988)	1 - 1 0
A	Saito, T. et al., Expression of a Thermostable Cellulase Gene from a Thermophilic Anaerobe in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Journal of Fermentation and Bioengineering</i> , Vol.69, No.5, pp.282-286 (1990)	1 - 1 0
A	Moracci, M. et al., Expression of the Thermostable $\beta$ -Galactosidase Gene from the Archaeobacterium <i>Sulfolobus solfataricus</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and Characterization of a New Inducible Promoter for Heterologous Expression, <i>Journal of Bacteriology</i> , Vol.174, No.3, pp.873-882 (1992)	1 - 1 0