(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年5月22日(22.05.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/100910 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 21/02 (2006.01) *C12N 15/57* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12N 9/16* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2019/044380

(22) 国際出願日： 2019年11月12日(12.11.2019)

(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 2018-212755 2018年11月13日(13.11.2018) JP

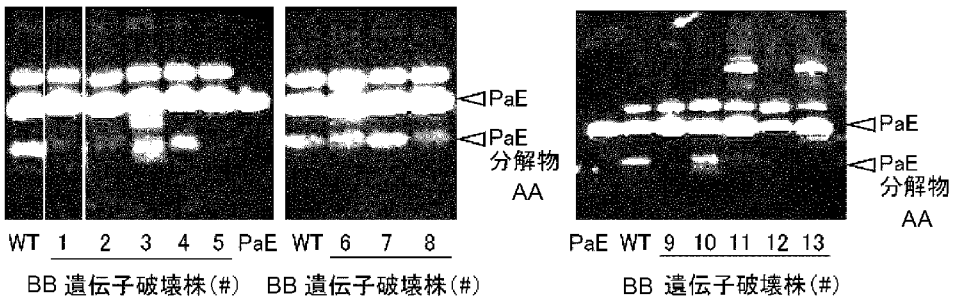
(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(**NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY**) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目３番１号 Tokyo (JP). 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (**NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH ORGANIZATION**) [JP/JP]; 〒3058517 茨城県つくば市観音台３－１－１ Ibaraki (JP).

(72) 発明者: 森田 友岳 (**MORITA Tomotake**); 〒3058560 茨城県つくば市梅園１－１－１ 中央第１ 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 小池 英明(**KOIKE Hideaki**); 〒3058560 茨城県つくば市梅園１－１－１ 中央第１ 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 大前 奈月(**OMAE Natsuki**); 〒3058560 茨城県つくば市梅園１－１－１ 中央第１ 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 北本 宏子(**KITAMOTO Hiroko**); 〒3058604 茨城県つくば市観音台三丁目１番地３ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 農業環境変動研究センター内 Ibaraki (JP). 山下 結香(**YAMASHITA Yuka**); 〒3058604 茨城県つくば市観音台三丁目１番地

(54) **Title:** MUTANT YEAST AND METHOD FOR PRODUCING PROTEIN USING SAME

(54) 発明の名称： 変異酵母及びそれを使用したタンパク質の製造方法

FIG.2



AA Decomposition product
BB Gene-disrupted strain

(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to efficiently produce a cutinase-like enzyme by finding a peptidase or a protease that is involved in the decomposition of the cutinase-like enzyme and inhibiting the activity of the peptidase or the peptidase. By introducing a mutation to the gene of at least one type of peptidase or protease that is involved in the decomposition of PaE, a yeast is provided in which the activity of the peptidase or protease is inhibited.

(57) 要約：本発明は、クチナーゼ様酵素の分解に関与するペプチダーゼ又はプロテアーゼを探し出し、当該ペプチダーゼ又はプロテアーゼの活性を抑制することによって、クチナーゼ様酵素を効率的に製造することを目的としている。ＰａＥの分解に関与する少なくとも１種のペプチダーゼ又はプロテアーゼの遺伝子に変異が導入されることにより、そのペプチダーゼ又はプロテアーゼの活性が抑制されている酵母が提供される。

WO 2020/100910 A1

［続葉有］

３ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 農業環境変動研究センター内 Ibaraki (JP). 鎗水 透 (YARIMIZU Tohru); 〒3058604 茨城県つくば市観音台三丁目１番地３ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 農業環境変動研究センター内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 田中 伸一郎, 外 (TANAKA Shinichiro et al.); 〒1008355 東京都千代田区丸の内３丁目３番１号 新東京ビル 中村合同特許法律事務所 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ： 変異酵母及びそれを使用したタンパク質の製造方法

技術分野

[0001]　本発明は、変異酵母及びそれを使用したタンパク質の製造方法に関する。

背景技術

[0002]　シュードザイマ・アンタクティカ（Ｐｓｅｕｄｏｚｙｍａ　ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）が産生するエステラーゼ（ＰａＥ）など、生分解性プラスチックを速やかに分解するクチナーゼ様酵素が、植物常在性の酵母や糸状菌から単離同定されている。そのような酵素を生成する菌の培養条件の最適化、高生産株の選定、及び高発現遺伝子カセットの導入などにより、クチナーゼ様酵素の生産量を向上させることが研究されてきた（非特許文献１）。

[0003]　一方、菌によって生産された酵素が、当該菌に由来するプロテアーゼによって分解される現象が一般的に知られている（特許文献１）。しかしながら、クチナーゼ様酵素を分解するプロテアーゼについては知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第02/101038号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Watanabe et al., Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 100, No. 7, pp. 3207-3217, 2016.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006]　ＰａＥを産生して分泌する酵母の培養液中には、当該ＰａＥの分解物が培養経過に伴って蓄積される。ＰａＥを産業利用するためには、このような分解を抑制することが必要である。本発明は、ＰａＥの分解に関与するペプチダーゼ又はプロテアーゼを探し出し、当該ペプチダーゼ又はプロテアーゼの活性を抑制することによって、ＰａＥを効率的に製造することを目的として

いる。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、ＰａＥの分解に関与するプロテアーゼを見出した。そして、それらの活性を抑制すると、意外なことに、ＰａＥの分解はもちろん、他のタンパク質の分解も抑制されることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、以下に示す変異酵母及びそれを使用してタンパク質を製造する方法、並びに、酵母を使用してタンパク質を製造する方法を提供するものである。

〔１〕シュードザイマ・アンタクティカ（Ｐｓｅｕｄｏｚｙｍａ ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）が産生するエステラーゼ（ＰａＥ）の分解に関与する少なくとも１種のペプチダーゼ又はプロテアーゼの遺伝子に変異が導入されることにより、そのペプチダーゼ又はプロテアーゼの活性が抑制されている、酵母。

〔２〕前記遺伝子の少なくとも１つの塩基が欠失している若しくは他の塩基で置換されているか、又は、前記遺伝子に少なくとも１つの塩基が挿入されている、前記〔１〕に記載の酵母。

〔３〕前記遺伝子全体が欠失している、前記〔１〕又は〔２〕に記載の酵母。

〔４〕前記ペプチダーゼ又はプロテアーゼが、ＰＡＮ１＿０１６ｆ０５３３０（配列番号１）、ＰＡＮ１＿００４ｒ０２２６６（配列番号２）、ＰＡＮ１＿００３ｒ０１８５６（配列番号３）、ＰＡＮ１＿００３ｒ０１６６８（配列番号４）、ＰＡＮ１＿００１ｆ００８４６（配列番号５）、ＰＡＮ１＿０１９ｆ０５８４５（配列番号６）、ＰＡＮ１＿０２４ｆ０６６８５（配列番号７）、ＰＡＮ１＿０１２ｒ０４５６４（配列番号８）、ＰＡＮ１＿０１０ｒ０４２２７（配列番号９）、ＰＡＮ１＿０１３ｒ０４７７９（配列番号１０）、及び、ＰＡＮ１＿０２３ｒ０６５６３（配列番号１１）からなる群から選択されるシュードザイマ・アンタクティカの遺伝子又はそのホモログ若しくはオルソログにコードされている酵素を１種以上含む、前記〔１〕～〔３〕のいずれか一項に記載の酵母。

〔５〕シュードザイマ属の酵母である、前記〔１〕～〔４〕のいずれか一項に記載の酵母。

〔６〕前記ＰａＥを産生する、前記〔１〕～〔５〕のいずれか一項に記載の酵母。

〔７〕組換えタンパク質を産生する、前記〔１〕～〔６〕のいずれか一項に記載の酵母。

〔８〕前記〔１〕～〔７〕のいずれか一項に記載の酵母を使用して、タンパク質を製造する方法。

〔９〕前記タンパク質がＰａＥである、前記〔８〕に記載の方法。

〔１０〕酵母を使用してタンパク質を製造する方法であって、

前記酵母において、ＰａＥの分解に関与する少なくとも１種のペプチダーゼ又はプロテアーゼの活性を抑制する工程を含むことを特徴とする、方法。

発明の効果

[0008] 本発明に従えば、ＰａＥの分解に関与する少なくとも１種のペプチダーゼ又はプロテアーゼの遺伝子に変異が導入されることにより、そのペプチダーゼ又はプロテアーゼの活性が抑制されている酵母が提供される。このような変異酵母を使用することにより、培養液中におけるＰａＥの分解を抑制することができるだけなく、意外なことに、他のタンパク質の分解も抑制することができる。また、酵母を使用してタンパク質を製造する際に、ＰａＥの分解に関与する少なくとも１種のペプチダーゼ又はプロテアーゼの遺伝子の活性を抑制すれば、培養液中におけるＰａＥの分解だけでなく他のタンパク質の分解も抑制することができる。したがって、効率的なタンパク質の生産が可能となる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]培養上清中のＰａＥ及びその分解物の電気泳動写真を示す。

[図2]各遺伝子破壊株の培養上清中のＰａＥ及びその分解物をウェスタンブロット法により解析したメンブレンの写真を示す。

[図3]ＰｒｏＡ遺伝子の相補実験の結果を示す。

[図4]異なる方法で培養した場合のＰａＥ及びその分解物のウェスタンブロット解析結果を示す。

[図5]各遺伝子破壊株の培養上清のリパーゼ活性のグラフを示す。

[図6]各遺伝子破壊株の培養上清のゼラチン分解活性を表すゲルの写真を示す。

[図7]培養時間に応じた培養液のＰａＥ活性及び乾燥菌体重量の変化のグラフを示す。

[図8]培養液中のＰａＥ及びその分解物の電気泳動写真を示す。

[図9]静置時間に応じた培養液のＰａＥの残存活性及び乾燥菌体重量の変化のグラフを示す。

[図10]静置後の培養液中のＰａＥ及びその分解物の電気泳動写真を示す。

[図11]静置時間に応じた培養上清のＰａＥの残存活性及び乾燥菌体重量の変化のグラフを示す。

[図12]静置後の培養上清中のＰａＥ及びその分解物の電気泳動写真を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明をさらに詳細に説明する。

本発明の酵母は、ＰａＥの分解に関与する少なくとも１種のペプチダーゼ又はプロテアーゼの遺伝子に変異が導入されることにより、そのペプチダーゼ又はプロテアーゼの活性が抑制されていることを特徴としている。本明細書に記載の「酵母」とは、単細胞性を示す真菌類のことをいい、担子菌酵母であってもいいし、子嚢菌酵母であってもよい。ある態様では、前記酵母は、シュードザイマ属、ロドトルーラ属、クリプトコッカス属、モエスジオマイセス属、ピキア属、サッカロマイセス属、又は、シゾザッカロマイセス属の酵母であってもよい。また、前記酵母は、ＰａＥ及び／又は他の組換えタンパク質を産生してもよい。前記ＰａＥを産生する酵母は、もともとＰａＥを発現するものであってもいいし、ＰａＥを発現するように形質転換されたものであってもよい。

[0011] 前記ＰａＥは、植物常在性の担子菌酵母であるシュードザイマ・アンタク

ティカ（最近分類が変更され、モエスジオマイセス・アンタクティクス（Ｍｏｅｓｚｉｏｍｙｃｅｓ　ａｎｔａｒｃｔｉｃｕｓ）と呼ばれることもある。）から、生分解性プラスチックを分解する酵素として単離同定されたクチナーゼ様酵素である。具体的には、前記ＰａＥは、Ｐ．アンタクティカのＧＢ－４（０）株（独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託された酵母；受託番号ＮＩＴＥ　Ｐ－０２３９２）、ＧＢ－４（１）Ｗ株、ＧＢ－４（０）－ＨＰＭ７株（独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託された酵母；受託番号ＮＩＴＥ　Ｐ－０２２３８）及びＯＭＭ６２－２株（独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託された酵母；受託番号ＮＩＴＥ　Ｐ－０２２３９）などにより産生され得る。なお、クチナーゼ様酵素は、そのアミノ酸配列中にクチナーゼと共通するリパーゼボックスを有しているものの、必ずしもクチナーゼのようなクチン分解活性を有しているわけではないし、タンパク質全体のアミノ酸配列に関してクチナーゼとの相同性が高いわけでもない。基質特異性に関しても、クチナーゼでは、短鎖脂肪酸エステルの分解活性が高く、長鎖脂肪酸エステルの分解活性は低いのに対して、クチナーゼ様酵素は、短鎖脂肪酸エステル及び長鎖脂肪酸エステルのどちらもよく分解する。このように、クチナーゼとクチナーゼ様酵素とは、それぞれ特性が異なる別種の酵素であると認識されている。

[0012] 前記ＰａＥの分解に関与する少なくとも１種のペプチダーゼ又はプロテアーゼは、前記ＰａＥの産生条件下で産生され得るものであるので、例えば、前記変異を導入する対象遺伝子の候補は、前記ＰａＥの産生量が高まる条件下で発現されるｍＲＮＡ又はタンパク質と、そうでない条件下で発現されるｍＲＮＡ又はタンパク質とをそれぞれ比較するトランスクリプトーム解析及びプロテオーム解析によって選出してもよい。あるいは、ゲノム解析が進んでいる子嚢菌酵母のペプチダーゼ又はプロテアーゼのオルソログを、ＰａＥをもともと発現するＰ．アンタクティカのゲノムから、前記変異を導入する対象遺伝子の候補として選出してもよい。そして、各候補遺伝子を常法によ

って欠失させた変異体を作製し、当該変異体が産生するＰａＥ及びその分解物をウェスタンブロット法などによって確認することによって、前記ＰａＥの分解に関与する少なくとも１種のペプチダーゼ又はプロテアーゼを同定してもよい。また、このようにして同定されたペプチダーゼ又はプロテアーゼは、前記ＰａＥを直接分解するものであってもいいし、前記ＰａＥを直接分解するペプチダーゼ又はプロテアーゼの前駆体を切断して活性化させるペプチダーゼ又はプロテアーゼであってもよい。

[0013] ある態様では、ＰａＥの分解に関与する少なくとも１種のペプチダーゼ又はプロテアーゼは、以下の群から選択されるシュードザイマ・アンタクティカの遺伝子又はそのホモログ若しくはオルソログにコードされている酵素を１種以上含んでもよい。

ＰＡＮ１＿０１６ｆ０５３３０（配列番号１）

ＰＡＮ１＿００４ｒ０２２６６（配列番号２）

ＰＡＮ１＿００３ｒ０１８５６（配列番号３）

ＰＡＮ１＿００３ｒ０１６６８（配列番号４）

ＰＡＮ１＿００１ｆ００８４６（配列番号５）

ＰＡＮ１＿０１９ｆ０５８４５（配列番号６）

ＰＡＮ１＿０２４ｆ０６６８５（配列番号７）

ＰＡＮ１＿０１２ｒ０４５６４（配列番号８）

ＰＡＮ１＿０１０ｒ０４２２７（配列番号９）

ＰＡＮ１＿０１３ｒ０４７７９（配列番号１０）

ＰＡＮ１＿０２３ｒ０６５６３（配列番号１１）

各遺伝子の具体的な塩基配列は、以下のとおりである。

[0014] ＜ＰＡＮ１＿０１６ｆ０５３３０＞

5’-ATGGCGTTGGGGAAAGGACCCCTTTTTGGCTCTCTGGCTCAGCTGACCGTGGCAGGGATGGGATCG
TCGCCGGCTGCCCTCCACCCTTTTCTCGAGGCGAGGCGCAGCGGCGCAGCGTACGCGGCCAGTTGGAGA
GGACTGCATGCAGCCGCTCACTTACACCGCCCAGCTGCCGCTCGCTCGCCAAGCCGAGAGAGAGAGAGA
ACCCTGCCGCATCGAATCAGCCCAACGGCTGCTCCACACCCCGGCCGCAACTCAGCACAGCTCAGCGCT

ATCTCTCTCGCGGTCCATCCGCACTGGCCCGCTGCTCATCCTCTGTGGCTGGCTGCGTATAATCGGCTG
AGCGCCGCTTCCCCCTCTCCTCCCTCCTCCACCATCCTCCTCAACGTCCACTCATCTCTCCCCTCTCTC
CAATTTAGGAGTGGCACAATGAAGCTCAATCTCTCGCTCACGTTTGTCGCCGCACTCGCCACCGCCTTT
GCCGGCGTCGAGGCGGGCGTGCACAAGGCCAAGCTGCAGAAGGTGACGCCCTCGCGCGAGCTCACCCTC
GAGGGCCTCGCCGCCCAGGCCGAGGTGCTCCAGCTCAAGTACGGCGGCGGTGCCTCCAAGAAGCAGGCG
CCCTTCGCCGCCAACCCGGAGCACGACTTTAGCATCCAGCCCATCGCGCCCAAGGACTCGGCCTCGGCG
TGGTATGCCGAAGCCAAGAAGGGCCACGGCGTGCCCCTCACCGACTTCCTCAACGCCCAGTACTTTTGC
GACATCTCGCTCGGCACCCCCGCCCAGGAGTTCAAGGTGATCCTCGACACCGGCTCCTCCAACCTCTGG
GTGCCCTCCACCAAGTGCTCCTCCATCGCCTGCTTCCTCCACAAGAAGTACGACAGCTCCGCCTCGTCC
AGCTACAAGAAGAACGGCACCGAGTTCAAGATCCAGTACGGCTCCGGTTCCATGGAGGGCATCGTCTCG
AACGACGTGCTCAAGATCGGCGACCTCACCATCAAGGGTCAGGACTTCGCCGAGGCCACCAGCGAGCCT
GGCCTGGCGTTCGCCTTTGGCAAGTTTGACGGCATCCTGGGCCTGGCGTACGACACGATCTCGGTCAAC
GGCATCGTGCCGCCCATGTACCAGATGATCGACCAGGGCCTGCTTGATGCGCCCCAGGTGTCGTTCTAC
CTCGGCTCCTCGGAGGCCGACGGCGGCGAGGCGGTGTTTGGCGGCATCGACGACTCGCACTACACGGGC
AAGATCCACTGGGCGCCCGTCAAGCGCAAGGGCTACTGGGAGGTGGCGCTGGACAAGCTCGCGCTCGGA
GATGAGGAGCTCGAGCTCGACAACGGCTCGGCCGCCATCGACACGGGCACCTCGCTCATCGCCATGGCC
ACCGACACCGCCGAGATCCTCAACGCCGAGATCGGCGCCACCAAGTCGTGGAACGGCCAGTACTCGGTG
GACTGCGAAAAGGTCAAGGACCTGCCGCCGCTCACGTTCTACATTGACGGCAAGCCGTTCAAGCTCGAG
GGCAAGGACTATGTGCTCGAGGTGCAGGGCTCGTGCATCTCGAGCTTCTCGGGCATCAACTTGCCCGGC
CCGCTCGCCGATATGCTGATTGTCGGCGACGTCTTCCTCAGGAAGTACTACTCGGTGTATGATCTCGGC
AGGAACGCTGTTGGTCTCGCCGAGGCCAAGTGA-3’（配列番号１）

[0015] ＜ＰＡＮ１＿００４ｒ０２２６６＞

5’-ATGAAGTTCCTTTCGCTCGCTGCGGCGGCCGCCAGTGCCGGTCTGCTGCTTCTCAGCGGCGTCGAG
GCCGCCAACAACCCGGCTGTCGTCGCCGGTCCCAAGCCCATCGCCGGTCCTGCTACCGCTCCCAACGCT
CCTGCCACGCTCAGGAACAGCAGGGGCAAGGTCGCCCAGCTCGAGAAGGCAAACTACGTGCCGCGCGGC
TACATCGTCGAGCTCGAGTCGTCGTCGTCCAAGGGCGGCAAGCGCGACAACCCGCATGCCGAGGTGCAC
GACCACCTCGCCAAGCGCGGCAAGTCGTACAAGACGCGCTTCGAGTACAACGACCCCGCCACCTTTGTC
GGCATGTCGGTCATCCTCGACAGCGACGACGACTACCAGTCGCTCGCATCCGCCCCGGGTGTCAAGAAG

GTCTACCGCACCACGCTCTACTCGATCCCCGCTTACGAGCCTACCACTGTCTCGGACGAGTTCGTCAAG

GCTGCCACCGGCAAGGATGGCGCTGCCGCCGCTGGCCCCGCTAGCCGCAAGAAGCGCCGCGACGAGCCC

AAGAACGCCGAGCAGGGCTACACCGACACCTTCTCCCCCCACGTCATGACTGGTGTCGACAAGGTCCAT

GCCAAGGGCTTCCTGGGCAAGGGCCAGACCGTCGGTATTATTGACACTGGTATCGACTACACCCACCCT

GGTCTCGGCGGCAAGCCGGGCAACAAGCCCTGCTTCGGCGCTGGCTGCCTCGTCATTGGCGGATACGCC

TTCGTCGACGATGCCTTCAACGGTACCAACACTCCCGTCGCTAGCGCCGACCCCTTCGACTGCAACGGT

CACGGCACCCACGTCGCCGGTACCGTCGCTGCCAACGACACCACCCTCGGCTTCACTGGTGTTGCTCCC

CATGCCAAGATCCGTGCCTACCGTGTCTTTGGCTGCCAGGGCAGCACTCCGGACGACATCATCATCGCC

GCGCTGCAGCGTGCCTACTTTGACGGAAACGACGTGCTCAGTCTCTCGCTCGGTGGCCCCGGTGGCTGG

AGCGAGGCTCCCTCGTCGGCCGTCGCCTCGCGTATCGCCAGTCTCGGAACTCCTCTCGCTATTGCTCAG

TCCAACTCGGGTGCCTACGGTATGGCTTACGCTTCGTCGCCTGCCAGCGGTGATCTCGTCATGAGCGTC

GGCTCGGTCCAGAACACCGACCTCACCGGTATCTCGGCCGCCATTGTCCCCAACACTCTCGACCGCAAG

ACCGTCACCGTGCTCAAGGGATCGCCCTTCACCTTTGCCGATGGCCAGTCCAAGACGCTCGAGGTGTAC

CCGACTTCGTCCAGCCTCACTGTTACCGACGACGTCTGCTCTCCCCTTCCGGACTCGACACCCGATCTG

TCGAACAAGGTCGTCCTGGTCGGACGTGGCACTTGTCTCTTTGCCACAAAGTTCCAAAACATCGCAGCA

AAGGGCGGCAAGTACGTGCTTGTGTACAACTCGGCGGCTTCCATCACCTACGTCGAGACCGACGTTGCC

GGTCAGCAGGCTGCCTCGCTCACCCGCGACGACGGCCTCTACCTCAAGCAGCAGATCAACAACGGCGTC

AAGGTCTCGCTCGACTTTAGCAACTCGCAGATCGCCACCATCAAGGACACTGCCACCGGTGGCCTCATG

AGCTCCTTCTCGACCTACGGCCCCACCTACGAGAACCGTCTCGACTCGCCCACCACCTCGGCTCCCGGC

GGCAACATCCTCTCGACCTACCCGATCAAGAAGGGTGCGTACGCTATCCTCTCCGGTACCTCGATGGCC

ACGCCGTTCATGTCGGGCTCCATCGCCGTCTTCCAGGCCGCGCGTGGAAAGTTCTCGCCCGATGCGCTC

AACAGCATCTTCTCCAACACTGCCGCCCCACTCATGAACGACACAACGAGCAACCTGTACGAGACCGTC

GCCAAGCAGGGTACTGGTCTGGTGGACGTCAACAAGGCGCTGTACCAGCAGATCACGCTCAGCCCCTCG

GTGATCGAGCTCAACGACACGGTGCACTTCAACGGCTCGCAGACCATCACGGTCAAGAACCTGGGCAGC

AAGCCGCTGGCGTATAAGCTCTCGCACCTCCCCGTCGGCACCGCCCAGTCGCAGGAGGACGACTCGATC

TTCTTCAACCTCGCCCCCGTGCCGCTGAGCACCAACTACGCCAGCGTCAAGTTCAGCAAGACCAACCTC

GTCGTGCCGCCCAAGGGCACTGCCAAGTTCACGGCGACCTTCACGCCGCCTGAGGGTGTGCGCACGGAC

AAGCTGCCCTTCTACTCGGGCTTCATCCACCTCGAGCCCCAGTCCAAGGACTACAGCGCTGCCAACATC

GCCTACGGTGGCTACAAAGCCGACACGTCCAAGACGCAGATCCTTGACAACACCTCGGAACTGTTCGGC
GTGGGACTGCCCGTTCTCGCCTCGGCTGATGGCAACACGTTTATCGAGTCGGATAACACCAGCTACAGC
CTGAGTAACGTTGCCAACTGGCCGCAGTTTGTGTACCGCCTCAACTACGGTACGCCTTACCTGCAGATC
GACCTTGTCAACGCCACCACCGACTTCAAGCCCACGTACAACGTCGACGGCTCGGCCGCCCAGAGTGCA
GCTGCCAACCACAGGAGGTTCATCCACCGTCGTCAGCTCAACGGTCAGAAGACGCCTCAGCCCATGCCT
GTGCCTGGTGGTCCCAAGCCTCCCGCGCCCAAGCCCGGCAACGGCCCCAAGCCCAAGCCTGGTCCCAAG
CCCGGTCATGGCGGTGAGCCTGCTCCGGCTCCCAAGCCCGTCGCGGGTGCTGGCTTTGCCGACGTCAAG
ACGGTGGGCATGCTCGCCAACGGCTACTACAGCGGCAGGAACAGTGCGACCGGTCAGCTGGCTGACTAC
TCGTACAACGTTCAGCTCATCACCCCGCAGCTCCAGCTGCCCCAGAACGGAAGCACCACCCTCACTCCG
GGTACTTACAAGGTGCTTCTCCGCGCCCAGCGCGTGCTCACCGAGGGCAAGCTCGAGAGCGACTACGAG
TCGTACCTCTCGCACGCCTTCACCATCACCGCTTAA-3’（配列番号２）

[0016] ＜ＰＡＮ１＿００３ｒ０１８５６＞

5’-ATGATCGCTGGATCGTTCACAGCTTCCAGACTCTCTAGGGGGAGCCTTTCGGGCATCGGCCGCCTG
GCGCTGCGTGTGCCCGCAGCAGCACGTTGCTACACCGCCGGCAGCCTCAAGATCAATGCGGACCGAATG
ATGAAGACGCTGCACGAGACGTGCGAATGGGGCGCAGCGCACCGATACGGCGACGGACCATTCGAGACG
GGTATGGCGCGTCTGACGCTTGACAAGGACGACGCGACTGCTCGACGCTGGCTGTGGAAGGAGGCGGAG
AAGCTAGGCTGTTCGGTGGACGTCGACGAGATGGGCAACATGTTTATGATCCGCAAAGGCAAGAAGAAC
GGCAGACCCACCGCGATGGGCAGCCATCTGGACACACAGCCGACGGGTGGAAGGTACGACGGCATCCTG
GGCGTGATGGCCGGACTGGAAGCGCTGCGCACGATGAACGACCACGATCTAGAGACCGAGTATCCCGTG
GCGCTGGTCAACTGGACCAACGAGGAGGGCGCACGCTTCCCACAGTCGATCGTCGGCTCGGGTGTGTGG
TGCCACGACGTGCCGCTGGAGAAGGCATGGAATCTGCAGGACGTGAAGGATGCGTCGCTCACGATGAAG
TCGGAGCTCGCCAAGATCGGCTTCCTCGGATCGACGCGGTGCAGCCACGAAGCCACGCCACTGGCGGCA
CACTTTGAGCTTCATATCGAGCAGGGTCCGATCCTGGAAGCGACGGGCAAGAAGGTCGGCATCGTTCAG
GGTGGACAGGCGTACAAGTGGTTTGACATCAATGTGCGCGGTCGTGAATGCCACACGGGATCCACACCG
TTCGACACCCGCTCCGACGCCATGCTGTGCGCATCGCGCATCATTGTCGAGAGCAATCGCATCGCCAAG
CAGCACAAAGGCCTTGCAAGCACGGTAAGTCTCGACTGTACAGACGCAGGTCTTGAAGAATCTCAGCTG
ACGCCTTGGCTGTGCTCCGCGTTTCGGCGGAATTGCAGGGCATCTTGCGCCTCTCGCCTGGAAGCGTCA
ACACATGCCCTGGCCATGTCTTTTTCACACTGGACGTTCGGCATCCTTCGACGGACAAGCTCGCGGCGC

TGTGCGGTGAGATCGAAGCGGCGGCGCAGCGAATCGCGGCCGAGGAGAGCGGAAAGGGGTGCAGCCTCG
AGTGGGTCGAGACGTTCGACAGCCCAGCGATCACGTTCCACCACGACTGCATCGACAGCGTGCGCAAGG
CAGTCGAGGCCAACTACGGCAGCGATGCAGGCGTTGACATCTACAGCGGCGCAGGCCACGATACATGCT
CGACCAGCAAGGTGTGCCCATCCTCGATGGTCTTCATCACGAGCAAGGAGGGCATCTCGCACAATCCGC
GGGAGTATTCGTCGCCGCAAGACTGGTGGGTACAGCTGCGCCGTGATCTGCGTGAGAACCGGGTGGGCG
TGAAAGCTGAAACTGACTTCATTTAACCTTGTGTGGCTGCGCAGTGCGACCGGTGCGCAGGTCCTCATG
GATGCAGCACTGCTGTACGATTCGCAGCGCCAGCAATGAAGTGCGCGGGAAAGAAAAAGCCCCGCTCAT
CAGCCACAGATCGCCGACACAATGGTACCAACAGATATGAACACCGGTGATGCTGATTGTGACAGGCAG
TCACGGCAACGTCCGAGGCAATGGTGGGAAGTCGCGGCAAGGCGGCTCCAAGGACTGCTGCTGCTGCTA
CCCTGGGTTGGTCGCGCGGGGTAAGTTGAAGTGACTTGGCGGCTGAATCCCGCTCGGCTGCAGCTGTGC
ATGTCTCAGCGTGGATTGGGCTAGGTGGAATTGGGACGCCACGAGAGCAGAGCTTAAATTTGCCGTGGG
CGCGTGCAATTCGGCAGCTTTTGGCGCGCGTTGGAAGCGCAAGGAGGCCCGTGCTAGGTTAAACTCTCT
CTGGCGCTGCAGATGCCTCTCTGCCTTCGGATGAGCTTGTGGATGGCGCATGCGGATCGTCTCGGACAC
CAATGAGGCGTAGAAGAGCAGAAGAGCAAGGTGGCTTGAACGGCGCTCGATTGGATGCGCATCCGAGCG
TCGGCCGGCGGGCGCTAACGCAAGCCGATGCTGTGTGAACACGGCAAGGAGGTGGGAGAAGCTTGCGCA
GCGCACAAAGCCTCGCTTTGCTGCAGGGAGCGACAGGGAGCGACAGGGAGCCCAAGGTGCGGATGTGCC
TCGGGTTTGCGCTCGAAGCACCTCGACGCTCGGCCCTGAGCTACCCGTGGGCTGCTCGACAACCGATTG
CCGAAGCTGTCGGTGCGCCCATGCATGCCTTGGTGTTGCGCAGCGCAAGAATATTGACTCGCCGCCACT
CGCTGTTGAGCGCCCGCAGCTACGGCATTCCGCTAGCTCAAGCTCCGCCGCAGCCTCCAGTCCGCCAAG
CTGTCCCGCACCCTATCCCCCCCACCACCCTCGCGTATAAAGCACACCCGCGCTCGTCGCCTGCGCCAT
CTTTGCCCGTCTTCCCAAACCCCACCCTGCTTAAGCCACTCGATTCCCCATCCATCATGGCAGCTCCCT
ATACCGACACGGGCGTCAAGCCCGACGACTTCACCGAGTTCGACTATGTCGTCGTTGGCGGCGGCACGG
CGGGTCTGGCGGTGGCTGCGCGTCTGTCTGAAGACGCCTCCGTGTCGGTCGGTGTGATCGAAGCGGGGC
TGTGGCGTCCCGAGTGCCCCAAGATCAACTACCCGGCGTTCATCGGTCAGACGCCCATGAATCCGGACT
ACGACTGGTGCTACGAGACCGAGCCGCAGCAGCACTCGAACGGACGCAAGTACCCGTGGCCGCGCGGCA
AGGTGCTCGGCGGCAGCAGTGCGCTCAACTTTCTCGTGTGGCAGCGCGGCTACAAGGGCGAGTACGACG
ACATTGGCAAGCTCGGCAACTCGGGCTGGTCGTGGGACGACTTTGCCAACTTTGCGCGCAAGAGCGCCA
CGCTCGAAAAGCCGGCCGAGCAACTGCAAGAGGCACACCTCGCCACGTACGACGAAGAGGTTCACGGCT

CCGACGGTCCGGTTCAGACCTCGTACAGCAAGTGGTACACCGAGGCGCAGCGTCCGTGGTTCGAGGCGC
TCAAGAGTCTCGGCCTCGCCAATGTTAGGGACGGTCTGGCCGGCAGCAACGCCGGCTTCTGGGTCTCAC
CTGGTACGCTGTGCCCCAAGAACGGCGTGCGCTCGTACTCGGCCAGCGCCTACTATGCTCCCAACGCCA
AGCGCTCCAACCTCAAGGTCATCACGGGCGCCCTTGCCTCCAAGATCCTCTTTGGCGAGGCCAAGAACG
CTGCAGGCGAGCTCGTCGCCTCGGGTGTCGAGTATTCGGTCGACGGCGCTAGCTACACCGTCAAGGCGC
GCAGGGAGGTGGTGGTGAGCGGCGGCACGATCAACAGCCCGCACCTGCTCGAGCTCTCGGGCATCGGCA
AGGCGGACGTGCTCAAGGCAGCAGGCATCGAGCAGCGCATCGAGCTCGACGTGGGCGAAAACGTCCAGG
ACCATCTCTACACCACCACCACCTTCAAGCTCAAGCCGGGCCACACCACCTGGGACAAGATGCGCCAGG
ACGACTTTGCCAAGGCGGCCATGGAGCAGTACGCGGCCGGCGGCGACGATCGCGGCATCGTTGCATCGA
TCATCTCGGGCTTCGCCTACGTCCCGCTGAAGCAGTACCTCTCTGCGGACGAGATTGCCAAGATCAAGG
ACGAGGTGGCCAAGATCGACTGGAGCCAGTACTCGAACGGCGTGCGCGAGACGGTTCAGCTGCAGCTTG
CGCGTCTGGACGACGAGCAGTGTCCCTTCACCGAGTTCATCTTTACACCGGGCTACTTTGCAACCTTCT
CTGCGCCAGAGGAGGGTCAGGAGTACTACAGCATCCTGGCGTGTCTGCAGCAGCCCTTTTCGCGCGGCT
CCATCCATGCTGCCTCGTCCGACCCCGCGCAACCGCCCAAGATCAACGCCAACTACTTTAGCGTCGACG
CGGATCTCGAGATCCTCTCCAAGGCGGTCAAGTACTGCGACACCATCACCACCACTTCTCCACTCAAGG
ACATTACCGTGGCAAGGCAGGATCCCGATCCGGAGAAGTGCACCACGGACGACGACTTCCGCGAGTTTA
CAAAGGACGTCACCAGCACCGAGTACCATCCGATCGGAAGCTGCTCCATGATGCCGCGCGACAAGGGCG
GCGTGGTGGATGCAAGGCTCAAGGTGTACGGTACCGCCAACGTGCGTGTGGCCGATGCCTCCATCATCC
CCATCCACGTCTCGTCGCACATCCAGTCCGCCGTTTACGCCGTCGGCGAAAAGGCAGCCCACATGATCC
GCGAGGATGCCAAAAAGGCCCACTAG-3’（配列番号３）

[0017] ＜ＰＡＮ１＿００３ｒ０１６６８＞

5’-ATGCGATCCTCCTGGCTCTCCACCGCCTCGGCCGTGCTCGTGTGCGCTGCTGCGCTCGCCAACTCG
GCCAAGCTCCCCGCCCCCGTCGAGCAGATCCACTACGACCAGTCGGGCAACCTCGTCTGGAACGGAGAT
GCCGACGCGAGTCCCGCCGTCCCTTCGCTCGGCCGTCCCGACTTTTCCGGCCTCAGCCTCAGCGACATC
GCTGCTGCCGCTGCTCCCGCCAAGCAGGCCGCCCAGGACGTCTACGCCGACTCGATGAAGTACGCCGAC
GACGTTCTCTCCTGGGCTGAGCACGAGATCGAGCGCATCGAGGACAAGGTCCAGGAAGTCGTCGCCGGC
ACTCACAAGGAGATCAAGGACTGGATCCACACCGGCAAGGTCCTCGTCGATGGCCTCGAGTTCGAGCGC
CTCACCCACCCCGCCTTCCCCGAGTACTCGCTCCGCCTCAACGCCAAGTCCGAGTCCTTCTGCGACCAG

GACGTCGTCCAGCACAGCGGCTACCTCGACATCTCGGACTCCAAGCATCTCTGGTTCATCTTCTTCGAG
TCGCGCAGCAAGCCCAAGTCCGACCCCGTCGTCCTCTGGCTCAACGGCGGTCCCGGCTGCTCCTCCTCC
ACCGGTCTTCTCTTCGAGCTCGGCCCCTGCCGCGTCACCGACGAGGGCCGCGCCGTCAAGAACAACCCG
CACTCGTGGAACAACAACGCAAACCTCCTCTTCCTCGACCAGCCCGTCGACGTCGGTTACTCCTACTCG
GACAACGACTCGGTCAACAACTCACCCGCCGCTGCCGAGGACGTCTACGCCTTCCTCCAGCTCTTCTTC
ACCAAGTTCCCCGAGTACTCCAAGCTCCCCTTCACCGCCTCGGGCGAGTCGTACGCAGGCACCTACCTG
CCCAACATCGCCTCCACCATCTACAAGAAGAACAACAACCTCGCTCTCTCCCGCTACGCCAACCCCGAG
CTCGCTCCCAAGCACATCAACCTCGACACCGTCATGATCGGCAACGGTCTCAGCTCGCCCCAGTACCAG
TTCCCCTCCGTCCCCACCTACGCCTGCGGCGCCGAGAACAAGTATGCGCTCTTTGACCCTTCCAGCTCC
ACCTGCGCCACGCTCGAGCAGCAGGCCACCACATGCAAGTCGCTCATCGAGTCGTGCCAGAAGTACAAC
TCGCGCCTCACCTGCACGCCCGCCGCGCTCTACTGCTGGAGCCGCCTCTACGGCCCCGCACAGGAGACC
GGCAGGAACCTGTACGATGTGCGCAAGAAGTGCGACCGCGAGAAGGACGGCCCGCTCTGCTACAAGGAC
ATGGAGTACATCGAGACGCTCCTCAACACGCCCAGCATCAAGAAGAACCTCGGCGTGCCCGAGTCGGTG
AACTTCCAGTCGTGCAACATGAACATTAACCAGGCCTTCCTCCTCCAGGGCGACTCGATGCACGACTCG
GCCGCCCTCCTGCCCGAGCTCATCGAGGACGGCATCCGCGTCCTCATCTACGCCGGCGAGGCCGACTTC
ATGTGCAACTACATGGGCAACCTCGAGTGGATGCAGAACCTCCAGACCAGCTACCTCGACGACTTTAAC
AACGGCACTGCCCAGGACTGGATCGTCAACGGCAAGAAGGCCGGCTCCGTACGCAAGGGCGGCAAGGGC
GCCGGTTCCGTCGCCTTTGTCAGGGTCGCAGAGGCCGGTCACATGGTCCCCTACGACCAGCCCGAGAAC
GCGTTGGACATGATCAACAAGTGGCTCGCCAACAAGCCTCTTGCTTGA-3’（配列番号４）

[0018] ＜ＰＡＮ１＿００１ｆ００８４６＞

5’-ATGGAAGCAGGCAGGAGAGGCTCGGATGAGAGGCTGCCGGATGTTGCATACGGCATGGGGGGAGGG
ACCGGCGAGGTGTTGATGGACTGGGATTGGATCGGGCGAGGTTGAGCCGAAACGCGGCAGTCGGCGCCG
CTACCGGCCACACTATGCGGCGCTTATTTGGACTTCGCTCCGATGAGCTCCCAGGCCCCAATCTCGCGC
CTTGCTCGGTCAATCGCAACGGACGCTTTGTGCAAGATACCTAGCCTGGTCTTCAGAGCCGTGCCGCTC
GTCTGACCAGATTCCAAAGACGAAGAAGAGAGCACTTTCGGACGTCACGGACTGTGTTTAGCGCACGGT
GCACCTTGCGAAAAAAAAAGGGTCAAAAAGTCGAAGGAGACCAACACAGCTCGCCATGTCGCGTGCCGG
CAGCAGAGAGAGAAAAAAAAGGGGGAGAGAGAGAGGAGAGCGGGTGCAGCTCAGCCGAGCGTCGACG
GTGAGCTCTCTGCCTGCCCTCTTCGGACTCCTCCCGTCCGCTGCAGCCGCCTCCTCGTCGGAAGCACAC

CGCACTCGATGGAATGCCTGCGCTGAGCCTTCTTTAGAGCTTTGGGCGACTGGCGAAGCGTCTTCAGCG

TCGCCATCAAAGTCAAGCGCTTGCTCTGCTACCACCATCACCACCATCGTCTCTCTCTCTCCCCGTCTC

GATCCGTGTCTCGAGTTTTTCTCTTTGCGCGTGGCTTTCCTACTCCACTCCACCCAGCAAGGCCCGCAT

TGCGCATTTCAGAGGCCATCTCGCGTCGGTTGCAAAAGAAAAATCGCGTTCGTGCGTAAGTGCTTTTTG

GGCTTCCCGGGCTCCGTTGGCACCGGCCGGCCACCCTTCGTCAGCCGCCGCTGTCGTCGTCCGTCGCTC

GCTCGGGCCAGCCAGCGATCTGTGCGAGAGCCTGTGCATTTGGCTAACTGAGCTTTTTTCCGTTGCCTT

CCCTCCCCTCTCTCGCCACCAATCCACTTTCTCTTCGCGTGCAGATGAAAGTGAACTCGCTCCTTGCCT

CCTGCATTCGAGCCCAATCAGCTCCACGTTCAATCCTTCGTCCCCACACTCTCGGCGCCAACCCCACCG

TCGCAAGCCTCGCTCGTGCTCACACGCCGATTCGCCCTCGTCTTCTGCAAAACCATCTTGCAAAGGTAC

GCTTTCTCTTCCTCTTCCCCCAGCGGTGATTTCCCAAACTTCTTCTCGCCCTCGCAGCTTCAACTCTTC

TGCACACGCAGCGGCTACATGTCGCCATCTGATCCGCGCCGAGCCAGAAACACTTACATCGCATTTGCG

CTCTCCATCTGTGCTGCTCTGGCTGCCGTCCTCGTCGCTCCATCCTTTGGCGATTCGATCTGGCAGTCG

CTCCGCTCCTCGGTCGGCTCTACCTTCCACCGCACCCACGCAACTTGTGCCCTCGCAGACCCAGCCTTC

GCGCCCGTCTCTTCCACCATGACCGACGCCACCGACGCCTCCAAGTGGTTCCGCTTGCCCCGCAATGTC

GTGCCCACCCACTACGACATTACGCTCAAGTCCGACCTCGAGGCGCTCCAGTTCTCCGGAACCGCCACC

ATCGACCTCGACGTGCTCGAGGACACTGACTCGATCGTCTTCAACGCCGCCGAGAAGCTCGCCCTCTCC

AAGTCCCTCGTCCTCAGCCAGGCGCTCAAGACCGACAACAAGAGCTTCGTCACCCTCGACATCGACGCA

AAGCATGAGCGCGCAACCGCAAAGCTCCCCAACACCCTCCCCAAGGGCTCCAAGGCGCAGCTCGTCGTC

GCCTTCGCCAGCGACATCGACAAGAGCATGATGGGCTTCTATCGCTCCACCTGGGAGCACGAGGGCAAG

AAGGGCTACTACGCACTTACCCAGTTCGAGCCCACCGCCGCCCGCCGCGCCATCCCCACCTGGGACGAG

CCCAACCTCAAGGCCACCTACACCTTCCGCATGATCCACCGCAAGGACACCACCGCCCTCGCCAACATG

AACGTCGTCAGCTCCCACGACATCTCCCAGTCCGAGCAGGACAAGCTGCTCCGCGCCGCCGAGCTCGGC

CTCGACGACATCCTTGCCACCACCAGCAAGACCGAGGGCAAGACCGAAGGCAAGACCGAGGGCAAGACC

GAGCTCGCCTCCACCGCCTCCAACGACTGGACCGTCACCGAGTTCGCCACCACGCCCAAGGTGTCCACC

TACCTCGTCGCCTGGGCCAACGGCCCCTTTGTCAGCATCGAGAGCAGCTACACCAGCCCGCTCACCGGC

AACGTCATCCCCATGAAGGTCTACACCACCCCAGAGTACATCCACCAGGCCCAGTACGCGCTCGACGTC

AAGGTCAAGGTGCTCCCCGAGTACGAGCGCGTCTTTGACGTCGCCTACCCGCTCCCCAAGCTCGACACG

CTCGTCGCCTCCGACTTTGACGCAGGCGCCATGGAGAACTGGGGCCTCATCACCGGCCGCACCTCGGTC

TACCTCTACGACCCCGAGAAGTCGGGCCTGCAGTCGCAGAAGCGCACCGCAGGCGTCCAGTCGCACGAG
GTCGCGCACCAGTGGTTCGGCAACATCGCCACGCTCGACTGGTGGGACAACCTCTGGCTCAACGAGGCC
TTCGCCACGCTCATGGGCGAGGTCGTCATCCTCGACCGATGCTTCCCCGAGTGGGAGTCCGCCTCCGAG
TTCATCAACGTCCACCTCGACCGCGCGCTCGACCTCGACGGCAAGCGCTCCAGCCACCCCATCGAGGTG
CCGCTCCAGGGCGAGAACGTCGAGGACGCCATCAACCAGGTCTTTGACGCCATCTCCTACTCCAAGGGC
GCCAGTGTGCTCCGCATGCTCTCCAACATGATTGGCGAGGACGTCTTCCTCAAGGGCGTCTCGATCTAC
CTCAAGAAGCACCTCTACTCCAACGCCGTCACCAAGGACCTCTGGAACGGCATCAGCGAGTCGTCCGGC
CGCGACATTGCCTCGATCATGGCCAACTGGGTGCTCAAGCAGGGCTTCCCCGTGCTCACCGTCACCGAG
GATGCCGATGGCCTCACCGTCAAGCAGAACCGCTTCCTCTCCACCGGCGACCCCACCGCCGAGGAGGAC
AAGACGCTGTGGTACGTGCCGCTCATGCTCAAGACCGTCGGCGCCGACGGCAAGGTCGCCGTCGACCGC
GACGCCTTCCTCAACAGCGAGCGCGAGGTCAAGATCCCGCTTGCCAACGCCAAGGACGCCACCTACAAG
CTCAACGCCGAGACCATCGGCGTCTACCGCGTCGCTTACTCGCCCGAGCGCCTCGCCAAGCTCGGTGAG
GAGGCTGCCAAGAAGGATTCGGCCTTCTCGCTCGAGGACCGCCTGGGTCTGGTCTCGGACGCCTTTACG
CTCGCCTCGGCCGGCTACGGCAAGACGTCCGGTGGTCTGTCGCTTGCCAAGGCGCTGCGCAACGACCCC
ACGTACCTGGTCAACTCGGCGTCGTCGCTCAACCTCGGCACGCTCGCCAGCGCGTGGTGGGAGCAGGAT
GCGCAGGTGACGGGCGCGATCAAGAAGCTGCGCGCCGACATCTTTGGCCCTACGGCCAAGAAGCTCGGC
TTCGAGTTTGGCGCCGACGACTCGCCCGATCTCAAGCAGCTGCGTGCGGTCGCCATCGCGGCTGCGTCT
GCGGGCGAGGATGCGTGGACGCTGGGCGAGATCAAGAGGCGCTTTGACCACCTTGCCACCACGGGCGAC
GACAGCCAGATCCACCCGGATCTGTTGCGCACCACCATGGCGCGTGCGGTCGAGCACGGTGGCGAGAAG
GAGTACGAGGCAGTGCTTGCCATTTACCGCAAGCCTTCGACGCCTACGCACAAGATTGCGGCCATGCTG
GCGCTGGGTGCGTCCAAGGACGTTGCGCTGCTGGAGCGCACCGTGGACTTCCTGTTCGGTGACGAGGTC
AAGGAGCAGGACTTTATGTTCTTCTTTGCGGCGCTGTCGGGCAACCCTGCTGGGCGACGTCTGATTTGG
GATGCGACCAAGAGCCGCTGGGAGGCGCTGTCCAAGCGGTTCGCGGGCAACTTTTCGCTCTCGCGCATC
ATCGAGTACTCGTTCAGCGCCTTTTCGTCCGAGCAGGATGCGCAGGATGTGGAGCAGTTCTTCAAGGAC
AAGGACACCGCCAAGTTCTCCATGGGTCTCAGCCAGGGTCTCGATGCTGTGCGCGCCCGCGCTAGGTGG
GTCGAGCGCGATGCCGAGGATGTCAAGCAGTGGCTCCAGGCCAACGGCTACCTTGCCTGA-3’（配列番号５）

[0019] ＜ＰＡＮ１＿０１９ｆ０５８４５＞

5’-ATGCAGTTCAAGAGCCTCGCCGTTATCCTTGGCGCCGCCCTCATGGTGGCGTCGCCCGTCTTTGCC
GCCCCCGCCACGCGCACCTGTGGTAACACCGAGGTTGCCCCCGCTGATGTGGAGCAGGCTCTCTCTGCC
CGCGTCGCTGCCGCCCGCTCGGCCCGCACCTCCGGGAGTACTAGCGACCTCGCCTTCACTTCCGCCAGC
ATCCCCGTCTACTACCACGTGATCACCGACGGCACCAACGGCCGCCTCACCTCGAGCCAGATCAACTCT
CAGATCTCGGTTCTCAACCAGGGCTACTCGGGCACTGGTGTGTCGTTCTACCTCGCCGGTACCGAGACC
ACCGTCAACTCGAACTGGTTCAACAACGTTAACCAGGGCACCTCTGCCGAGGCTGCCATGAAGAACACC
CTCCGCAAGGGCGGTGCCAACGCGCTCAACGTCTACACCGTCAACTTCACCGGCGGTCTTCTCGGTTAC
GCCACTTTCCCCTGGAGCTACGCTTCGGCTCCCAAGAACGACGGTATCGTTCTCCAGTGGACTTCCTAC
CCCGGAGGTCCGATCTCAAACTACAACCAGGGCAAGACTCTCGTCCATGGTAAGCTTTTTTTCCATCAA
ACATTGTGGATTCGTTTGACCATATACTGACAATCGAACTTGATACTTTTTGATGCCAATAGAGGTCGG
ACACTGGGTTGGTCTTTACCACACCTTCCAGGGCGGTTGCTCCAGCCCCGGTGACTACGTCGACGACAC
CCCCGCTCAGGGCCAGCCCACCCAGGGCTGCCCTACTACTGCCCCCGACACATGCTCGGGCGGCGGTGC
TGACGACATCAAGAACTACATGAACTACAGCTACGACGTCTGCCTCACCCGCTTCACCGCCGGTCAGGT
CTCGCGCCTCCAGGCTGCCCTTGATGCCTACCGTTAAAGCAACGGGATCGACCCCAAAAGAACTCGTTC
CGCAGGTCTCGTCGTCGGGCTTGCATGTCACCTTTCGCCTTCGCACCGCATCTTTTCTAGCCGCACTTT
TGGAATCAACAGCTTTTACATTTGAGCGTTTCGACTGCCAGCCTGTACGGGCTTCTCGTCTTCTCAGCA
ACCCACAACTTTTGCAGCCTCAGTGTTTGAAGTGATCAACGACTTTGCTTCAGGATGCGAGCCGCTCGT
ACGAGCTCCTCCTCCGGTCTGTGGAATCGACGCGCCACCGGGGTCTGCAGCTGCAGCGCTGTCGATTTC
CGCCGCGCCAAAATTCCAAATCCCGCACACTGACGTCCTGCCTGCCCGGGCAAACGCCGCGGAATTGCC
CGACGCCACTTCCCGCACTTTCCGCACTTTCGGCACACCGCAGCTCCTCACGCGCGGAAGCTCGCAATC
AGCTCCAACACCCCGCGAGCACATGCGGTCCGCTCCTCCGCAGCAAGACTCTCCGCGTTGA-3’（配
列番号６）

[0020] ＜ＰＡＮ１＿０２４ｆ０６６８５＞

5’-ATGCTCAAGTTCAGCCTGCTCCAGCTCACCACGCTCGCACTCGTGCTGCTTGGCAGCCAAGAAGCA
CTCGCCGCACCAGGCAAGAAGCGCCCTGTCGAAGCCGTGAGTTTCCTTTAGCAGGCCGTCGCGATGTTG
AATCGCTCGCTCACCACCGTCCTCCTTTTGCAACAACAGAAACGCCTCCGCAACGATGTCAAGCGCAAG
GATCTTCTCGACGGCGCCAAGAGGCTGCAGGAGATCGCCTACGCCACCACGGAGCGCAACCGCGTGTTT
GGCTCGCCCGGCCACAAGGCGACGGTGGAGTACATCCAGAGCGAGCTGCGCAAGGCGGGCGACTACTAC

GACGTGTACCTGCAGCCCTTCACCGCGACGTATGCCGAGCACTCGGCCGAGGTGGCGATCGACAACAAG
GCGGTCGAGTCCAACACGTTCACCTACTCGCCCAATGGCGAGTTCAACGATCTCGAACTCGTACCCGTC
AACAACCTCGGTTGCGACCAGGCCGACTTCCCCGCAGGCGTCGAGGGCAAGATCGCACTGATCAAGCGA
GGCACTTGCGCGTTCGGCATCAAGGTCGCTCGTGCGGGCACGGCCAAGGCGGCTGCTGTGCTCATCTAC
AACAATGCACCGGGCGATGTGTCGGGCACGCTCGGCAGTGCAGGACCTACGCCCGAGGGCCCCTTTGTG
CCCGTCGCCGGCGTCGACCAGGAGACCGGTGACGCTCTTGCGGCTCGTCTGGCTGCGGGCGAAAAGGTG
ACGGCCGACATGAAGCTCGAGGGCGTCATCGAGGACCGCACCACGCACAACGTCATCGCCGAATCGCGC
GGCGGCTCCAAGGATCAGGTTCTCATGCTGGGTGCGCACTCGGACAGCGTCACCGCCGGTCCCGGCATC
AACGACAACGGATCCGGTTCGGTTGCGCTGCTCACCGTCGCCAAGAACCTGGCCAAGTACAGCGTGAAC
AACGCGGTCCGCTTTGCCTGGTGGTCGGCCGAGGAGTACGGCCTGCTGGGTGCCGAGCACTACGTCGGC
GAGCTCTCGCAGCAGCAGAAGGACCAGATCCGCATCTACCTCAACTTTGACATGATCGCCTCGCCCAAC
TATGTGCTGAGCGTGCACGACGGCGATGGCAGCACCTTCAACACCACCGGCCCCGCCGGATCGGCGCAG
GCCGAGGCGATGTTCTTTGACTACTTTAAGAACGTCGCCAAGAAGCCGCTGATCGAGGGACCCTTCGAT
GGCCGTAGCGACTACGGGCCGTTCCTGGACGCCGGGATTGCTGCTGGCGGTCTCGACACTGGTGCCGAG
GGTCTCAAGACCGAGGAGGAGGCCAAGCTGTTTGGCGGCGAGGCGGGCATCGCGTACGACCCCAACTAC
CACGCGGCTGGCGACACCATCGACAACCTCGCCATGGAGGCGTTTGAGGTCAACACCAAGGCCATCTCG
CACGCCGTCGCGCTCTACTCGACGTCGTTCGACAGCCTCGGCCCCCGCGCCAAGGTGGCAGCCAACCGC
AGGGACGTCGCCAAGAAGGTCGACCACAGCAACCACCGATGCGGCGGCGACCTTGCGCTTCTGTGA-3’

（配列番号７）

[0021] ＜ＰＡＮ１＿０１２ｒ０４５６４＞

5’-ATGTACACGAAGCGATACCTCGGCCTCCTGGCCCTCGCTCTGAGCCTCCCGCTCGCCGCGCTCGCC
GCTCCCGCTCACCAGCCCTTCGTGCCCGGTTCGAGCGCCAACGCATACTCCCCCTCGACTCAGTTTGCG
CCCCTCACCGCAAACCCTGACCTCGAGACCATCCCGGGCGCCTACATGGTCGTCCTCAAGGATGGCGTC
AGCTCCGCAGACTTCTTTGCCCACCAGGGCCTCATCTCGTCCGCTCAGCTCTCGGCAAACGGCTTCCAC
GGCGAGGATGCGGAAGGCATCCGCCACGTCTACGACCTCGAGGGCCACCTCCAGGGCTACGCCGGCAAG
TTCACCGATGACGTCCTCGACTACATTCGCGCACAGCCCGAGGTCGAGTACGTCGAGATGGACTCGCGC
GTCTCGATCGAGGTCATGCCTCAGGCCGAGGACAAGACCTGGGACGTTCAGTACGACGCCGACCTCGGC
CAGGCCGCCCTCTCGGTCATGAACACGGACAAGGTCGGCGCCTATGACATTGAGAAGGGCGCCCCCTGG

GGTCTCGCCCGCATCTCGCACCGCAAGCGCCTCGGCCTCAGCACCTTCAACAAGTACGTCTACCAGGGC
GACGGCGGTGAGGGCGTCACCGCCTACATCATCGACACCGGCATCAACATCAACCACGTCGAGTTCGAG
GGTCGCGCTCGCTGGGGCAAGACCATGCCCCAGAACGACGTCGACGAGGACGGCAACGGTCACGGCACC
CACTGCGCCGGTACCATCGGCTCGCGCAAGTACGGCGTAGCAAAGAAGGCCGACCTCGTCGCCGTCAAG
GTGCTCGGCTCCGGCGGCTCCGGCTCCATGTCGGACGTCACCGGCGGCGTCCTCTGGGCCGTCGACGAC
GCCAAGAAGCTCACCGCACAGTTCCGCGCCAACCCGCGCTCGGCGGCGGCCAAGAAGCACAAGGGCTTC
GTCGCCAACATGTCGCTCGGCGGCGGCAAGTCGATCACGCTCGACAAGGCCGTCAACGGCGCCGTCACC
GCAGGCATGCACTTTGGCGTCGCCGCAGGCAACGAGAACCAGGACGCCTGCAACGTCTCGCCCGCCGGC
GCATCCAACCCCGTCACCGTCGGCGCCTCCACCGTCCAGGACGAGCGCGCCTACTTCTCCAACAAGGGC
AAGTGCGTCGACATCTTTGCGCCCGGCCTCAACATCCTCTCCACCTGGAACACGGGCAACACCTCGGTC
AACACCATCTCGGGCACCTCGATGGCCAGCCCGCACATTGTCGGCCTGCTCGCCTATCTGCTCTCGATC
TACGGCACCGCCGACTTCAAGCTGCTCGCTGGCGGCCAGGCGGACCACCTCTCGATCGCCGCCGTCGAG
GACTCGCTCGCCTCGAAGCTCTCGAGCGTGCTTCCCATCCCCGCCATGGCGCTCGACCTGGTGAGCAGC
GTCGCCGGCTACTTTGCCGGTGCCGATGCCGCCAAGCCCGACATTGACGGCGTGCTGTCGCCCACCGAG
CTCAAGAAGGCGCTCATCAAGCTCGCCTCGCCTGGCGTCCTCACGGGCCTCGACGCGGACACGGTCAAC
AAGCTCGCCTTCAACAACGCCACCTCGTCGGCCTGA-3’（配列番号８）

[0022] ＜ＰＡＮ１＿０１０ｒ０４２２７＞

5’-ATGAAGTCCAACACGGCCTGGGCTGGCCTCGCCGCCACCGCCACCCTCACCGCGCTCGTCTCGGCA
AAGCACGAGCTCGACGTCTCGCACGAGCCCATCACCTCGCTCTTCAAGGCCGACGGCACCCCTTCCCAC
CCGCACTTCCTCCAGTCGCGATGGGTCACCTCCGAGCTGCCCCTCGACTACCGCAAACGCGACCTCTCC
GGCACCGGTTCCAAGCGCAGCTCAAAGACCTGCCGCGCCGACAAGTCCAAGCCACGCACCGACGACCGC
AAGCACCACGGCCGCCACAGCGTCCTCCACACGCTCGACCACCTCGGCCACCAGGTCGCCAGCTGGATC
GAGGGCGGCAAGTACCACGACCACTCGCTCGGCATCGTCATCAACAAGGCCACCGACAACTCGGCAGAC
AACGAGTGGCTCGTCAACGTCGGCTTTGGCTCGCCCGCCCAGACGCTCAAGATGGTCTTTGACTCGGGC
AGCTCCGACACCTGGGTCTACTCGCCCCAGTGCTGCTACGCCAACAACCACACCTTCTTCGACCCCAAC
CAGTCCGACACCTTCCACAACCGCACCGTCGTCAACAACGTCGCCGTCCCCGCTCCCGACGGCACCCCG
GGCCAGGCTTGGTCCTCCACCTACGGCTCCGGCTCCAGCGTCTCGGGCTACGTCGGCATCGACGACTTC
ACCTTTGGCCAGCAGAGGCTCACCGTCGACCAGCTGCCCCTCGCCCTCGTCACCTCCATCAAGGGCTCG

CGCGCGGGCCGTGGCATGGAGGGCCTCGTCGGCCTTTCCGCAGGCTCCGGCTCCGAAACCCCGGGCGAG
TGGACCACGCCCTTTGAGGCCATGTCGTCGCGCGGCCAGATCGACCAGACCTACCTCACTGCCACGCTG
CGCAAGGCCAACCGCAACACGGGCAAGGGCGGCGGAGGCCGCTACACCTTTGGCGAGATCGACGACCGC
CTGCTCGACGGCAACATCACCTGGACGCGCGCCCTCTCCCCCTACCTCTGGGCAGGTTACTTTGACCAG
ATGACCTTTGGCGACTCGCTCCTCGCCGCCGCACCGGGCACCCAGGAACGCCCGATCCGCTTCATGATC
GACACCGGCTCCGCCGTCTTCTATCTGCCCCCACCCATCGTCAAGCAGATCAACAGCCAGATCGCCGGC
TCGCTCGTCGCCAACTCGTCGAGCGGCCTCGCCTTCCCTTACCTCGTCCCCTGCGACACCGGCCTCAAG
AGGCACGAGAGGACCGCCAACAACCCCAGCTTCAACCTCCAGATCGGCGGCACCAACTTCACCATCCCC
AAGGAGGACTACGTCTTCTACGCCAACCAGCCCGTGCCCGCGGCGGCGGCGGGCGGCAAGACCGACATG
TGCTACTCGGCCTTCCAGACCGGTCCCGCGCAGATCTCGATCATCGGCCTCAGCTTCATCAAGAACCAC
GTCGTCGTGCTCGACCAGGGCGGACGCAACCTCACCGTCTCCGCCAGGCGCATCGGTCTGGGCCAGCGC
AAGGACGTGCGCTACGACTGA-3’（配列番号９）

[0023] ＜ＰＡＮ１＿０１３ｒ０４７７９＞

5’-ATGCGTTCCAATTCCAGCTTCGACAACACCGCATCCCACCAGCCAGCACCCGATTCCACCACGCAA
ATCACCCCACCCATCGACGCAGACCCTTCATCATCACAACACTCTAGCTCCTCCTCGGCGCGCCGTCCA
CCACCCTCGCCGCACGCCAGCCCAGAGCACAAACCTAGCCCGCGTTTCCCCACAGCCCTCTCAGCCACG
GATCACCGCAGGTCGAGCGCATACAAGCGAGCGCGCACCGCCAGCCCCATCATCGACGACAACAGCAGC
GACGTCGAGAACGACAACAGGTCCGCTTACTCCCGTTCCGCTAGCGACTTGGGCGATCTCGACCTCACC
GAACACGCGTCGTCCGTGCAACCTACACCGCTCCGCCAGAGCGTCTCGTCAGCCGAACTGCTCCATTCA
GCACGCCCTTTCGGAAGCGGCATCGTCATGGCATCACTCGACCCCAACGTTGAGGGTCTCATGACCGAG
CAGTCCCTCAGTCTCGACGACGGCGCTGTCGCCGCACCCGCCTCGGTCGCCGCCATGTCCGCCGATCTC
AGCCACGACGAAGAGCCGCCCTCGTACCAGGAGGCTGTGCCTCTGCCTCCCTCGTCCTTGGCGCCTAGC
AACGAGCCAAGACCCACAGGCCAACAGCAGCTCAGCATCGTTTCACCCATGAGGAACCTCCCCTTGCAC
GCCGGCGACACCTGGTATATCGTCAGCCGAGCGTGGTACCGTCGCTGGGATGCCGCTTGTTCGGAGCAT
CGCGACGCGGATCCATCAGAGAAGGCAGATCCTCCCGTCGGCCCCATCGACAACGCCGACCTCTTGGAC
TCCGAGGCGCCAACCGGATTCGCACAGCTGCGACAGCACATCAACGAACACATCGACTACGAGATGCTT
CCCGAGCAAGGTTGGAAGCTCCTCGTCGCTTGGTACGGCTGCACTGGTCCCGTCTTTGCCAGAAACGCC
ATCGAAGGTCTCAGTCCCGGCCAGGAGAGTGTCGAGTTCTACCCGCCCATCATCCGACTGCTCCGCGTG

GTCCAGGACGACACCAAAGACGACGTCACCCGCGCGCCCTTGTTCAGCTTGTCCGTCAGCACCGAGCTG

TCCGAGCTCAAGGCCAAGGCCAAGACCACCTTCGACCTCGGCGACGTTGCCGATGTCGATCTGCGCTTC

TACCACTTCCCCGAGCCCGAAGACAGCGAGCTGCAATCGGGTCGGGTGACCATCGCTCGGGTCGAGCTC

GACGGCGTCGACCTCATCGATGCCAACGAAGACAAGCCCGACACCTACCGCTCCGACGTCACGCTCAAG

TCGATCGGCATCGACGAGATCGAGGTCAACTTGGTCGTCGAGACGCGCAAGTCCGGAAGATGGCAATCA

GAAGGACCCGCCGAGGAAGCGCCCTCGGTCAAAGGCATCTTTGCACAGCAGAGCGGCGACTTTTTCAGC

AACCTGCAACAGCCCAGCGCGAGCACCACCAGCATCACCGCTGCTGGCTCCGCGGGCGATGCTCTTGGC

AGAGTCACGCGTTCGCAAACAGCGACCGACCGCACCATGGGTAGGTCGCGCGGATTGCGCGGCCTCAAC

AACCTCGGCAACACGTGTTTCATGAACAGTGCGCTGCAGTGCCTGAGCAACACGTACGAGCTGCAGCAG

TACTTTGTCTCGGGCGCGTATCGCGACGAGCTCAACACCGACAACCCGCTCGGCATGGGCGGCGCCATC

GCAGAAGCCTTCGGAAACCTCATCTCCAACATCTGGAACGGCCAGGGCGGCTCGTTCTGGCCGCGCGAG

TTCAAGTTCGCCCTCTCGCGATTCGCTCCCCAGTTCAGCGGCTACGCACAGCACGATAGCCAGGAGCTG

CTTGCCTTCTTGCTCGACGGCCTCCACGAGGATCTCAACCGCATTCTCAAGAAGCCCTACATCGAGGCG

CCCGACTGGGACGGCGGCGACGAAAAGGCGCTCGTCGCCTTTGCAAAGCGTCAGTGGGACATCTACAAG

GCACGCAACGACTCGGTCATCGTCGATCTCTTCCAGGGCCAGTACCGCAGCACACTCGTGTGTCCCGAG

TGCAGCAAGATCTCGATCAAGTTTGATCCATTCATGTACCTCACGCTGCCCATCCCCAACAAGAAGGTC

TGGCGCGCACAGGTCTACTTTGTGCCGCTCGAGCCCACCAAGCCCTTGCAAAAGTTTCACGTCCAGCTT

CCAGCCGGCAGCACCGTCAGCAAGCTTCGCCAGAAGGTGGCCGCGCAGTTTGGCGTCGAGACGCGCCAG

CTGATCTGTGGCGAGGTCTGGCACCACCGCATCTACAAGTGGATCGACGATTACGAGCCGCTCGTCGAC

ATCAAGGACGGCGACTTTGTCTACTTCTGGGAGGTGCCTGCCGCGCCGCGCTTGTCCAAGCAGCGCCAC

TACCGCTACCATCGCTCCGTGGAGGACGCCGAGGAGGCGCTCGACATTCCCGAGGCAGACCATGCCATC

GTGCCCGTCTTTGCCAACTATGCCCAAAAGATTGCCTCCGCCTCGTCGAGCCAGGCCTTTGTCAGCCGC

CGCACTCGTGGCGAGCCGGTAGGCATCCCCTTCTTCATCGCTGTGCCAAAGCAGGACATCAACGATCTC

AACGCCGTGCGCAAGCTCGTCACCGACGGCTTCTCTCGCTTCGCGCGCGATCAGGACGCGTATCGGAAT

GTGGTTGAAGAGCAAACCGAAGATGTCGCACGCCTTGCGACAGCCGAGACATCCKCTCAGGCCCAAATC

TCGGACTGGGAAATGGTCGACGACGATGCCGCAAACGAGGCCAACGTCGAGGTCGTACCACCGAGCCAA

CCGGTCGGCCCAGATGCGGTCACCGAGATTCACGAAGATGGGAATGCTGTTGTGGTGTCCGACGCCAGT

GCATCAAGCACCGACGTTTCGCTGGCCGCCAGCAAAGCTCTCGTGCAGTCCGAGCCGTCGCTTCGCATC

CGTTTCAGCGTCGCCGAAGCCGGTCAAGGTCTTCCCAAGGGCAGCGAAAGCGGCGCAGATCACCTCTCG
GAGGAGATCACGGAACGACAGGCGCGCCTCGCCAAGCGTGCTCTCGCAACACCAATCGACGCGGACGAG
GAGGACATGGACGAGGGCGATGACGAGTCTCAGGCCGCACCCAAAGCGTCCAAGGCGATTCCGCTGGTC
TACACTGGCGGCGCGATCGTGTGCACATGGTCGTCCGCCTTCTGCGAACGCGACCTGCTGGTCGAATCC
GATTCCGGCCAGCTGTGGGGAGACTACGAGCAAGTGGTCGACGAGGCCATCCGCGAGCGCGACGCGGCT
GGCCCCTCGCGCCCCAAGTCGCTGTCGATCGAGGACTGCATGGACGAATTCACCAGGGAGGAGCAGCTC
GGAGAGGACGATCCGTGGTACTGCCCATCGTGCAAGGAGTTCCGACAGGCGACCAAGAAGTTTGACCTT
TGGAAAGCACCGGACATCCTGGTGGTGCATCTGAAGCGCTTCAGCGCGGGGCGCCACTCGCGCGACAAG
CTCAACATGCTCGTCGACTTCCCGCTCGAGGGACTGGATCTGACGGATCGGGTCGAGGGCACGCAGGCG
CTGCGGCGCGTGCAGGAGGAGGCCAAGCAGAGCGGCGAGGAGCTTTCGGAGAGCATGCTGGGCTCGGGC
ATCCTGCGTCCGCTCGAAGACAACGACGATGCGGTGGCGGTGGACAAGCCGATCTACGACCTGTACGCG
GTGGACAACCACTTTGGCGGGCTTGGCGGCGGGCACTACACGGCGTTCGCAAAGAGCCCGGCAGATGGC
AAGTGGTACGAATTCGACGACTCGAGCGTACGGCCGGTGGCGAACCCCGAGAGTGTTAAGAGCGCTTCG
GCGTATCTGCTCTTCTATCGCCGGCGGACGACGAGGCCGATCGGTGGCAAGTCGAGGCAAAAATTCCAG
GAGGCCGCCAAGTCCAAGGCGTCGAGTGCATCGCAGAGCGCCGAGGCTAGCACGTCGGGGCTGCAGAAC
CAGCTCACTCCGGCCGACGATGACGACTCGAGCGACTCGTCGAGTGACGAAGCACCTGAATGGTCGCTG
AACCTGCGAAGCGGCGCGGGTGTTGATGCGGTAGAGCCTGCGTCTGGCTGGTCGAGCACCGGCAACTCG
CCCCCATCCTCCAGTCGCGCTTCTAGTCCCGATAGCGACCGCGATCTGGACTCTCCGTGA-3’（配列番号１０）

[0024] ＜ＰＡＮ１＿０２３ｒ０６５６３＞

5’-ATGTGCTCGCCCAACGTCCACTTTGAGCACCTTATCGGCTCGTCCAATCCATCGCCTGCATCGCCT
GCATCGCCATCACAACCGTTCCGCAGCCTCTCGCACGCACGCATCGCCGGCGCATCATCCTGGCGCTCG
AATAGCGACCAATCCGCATCGACAGCAGCGCCACTGAGCCACACCATCAACCACCACTCGTCCGTGCTC
TCGCTCGCGGTCGATGAGCGTCGCAACCTGCTCTACTCGGGCTCCCAGGAGGGCTGCATCCACGTTTGG
GACCTCGAGACATTCCAGCCAGCTGCGCGGCTACAAGGCCACACAGGGAGCGTGCTTGCGCTCGAGCTC
GCTCCGGAGAAGCGCTGGCTCTTTAGCTCGTCCGGGGACAACACGATCCGCGTATGGAACACCGACACG
AATTCGCCGCTCTTTGTGGTACATCCTGCCGAAGAGAACGTCGGCGACATCTTTGCACTCAAGTGGTGC
GCCAGGCTCCAGACGCTGTACCTGGGATGCCAGTCCACCTCGATCCAGTGGATCTGCCTGGCGGGATTC

GACAAGCAGCCCGGCCCGTCGAAGCGGCTCGACGCCAACGAGTTGCTCGCGCCGCATGCTGACGTGGGC

ACAGCACCAGTCGGCTTCAACCAGGCAGGCGCGGACAGTCCCATCATCTCGACGCCGGACATCGTCGCA

CGGCCGCACAGGTTCTTCGACTCGGTCCCCGTTGCGCTCAGCAGGTCCGGCCTCGGCAGCGCCGGAAGC

TCGACTCCAGCACGTGTCCGACCACCGTCCTCGGCCCCTCTGAAATTCTCCAAGGCAACCGCTTCGACT

GACGGACCGCTATCCACCGAGCTAGATTCGCATCTGAGCGACAAGGGGCCGCTGTCGACCACCCGCGCC

ACCGAAAAGGTTCTGCACGCCGCATCGCAACGCCTGGATAGCACGGCCGTGCGCGACGAGATGGCACGC

GACGACTCGGGCGGATCGGTGCGCACGCTGCTCGTGCCGCCGAGCTCTGCAGTGCCCTCGGCGCACTTT

GGCTACGTCTACTGCCTGGCGCTGCTGACGCTCGAGGGCGATGCGCAGCACCCGACCGTGCTCGCCTCG

GGCTCGGGCGACGAGACCATCAAGCTGTGGCACGCCACGCGCGCCGGCCTCTCGCTGCTCGCCACGCTT

GAAAGCCCAAATGCGGACGGCAACGCTGTGCTCGCGCTTGCCTCGTGGAAGACGACGCTCTTCGCCGGT

CTGCAGGGCGGAGAGGTCGAGGTGTGGGATCTCGAGACGTGTACGCTCGTGCGCACCATCCGCGCGCAC

TCGGACGATGTCATCTGTCTAGAGACGTGTGCCGAGTCCGGCCTGCTGTTCACCGCGGGCGCGGATGGG

AATGTGCACACGTGGGACCGGTCCTTTAGACGCATCAACAGGGTGCAGGCGCACAAAGGCATCGTGTTG

TCCATGACCAAGGTGCGCACGCCTGCTAAAAGCGGCGAGGCAGCGAGGGTGGCACAGCTAGTCACGGGG

TCCAGCGACAACTTTATCCGCATCTGGGACACGACCGCCTCGCCCGCACTGCCGTCATCGTCGCGCGAA

CCTGTAGCCGAACTGCGCCGCCGCGAGCTGGAGCATCTGTCGCTCGAAGAGCCCGCTATGCCCTCGCTC

TCCTCGACGCCGATTGCCACGTCGTCTGCCGTCGTGACGCGCGCGCAGGGTGCCGAGCAGGCCGAGACG

CCCGAGGCAGTGTCGGCGCAGTGGCCGCTGCTGCGTTCGCTGCTGCGCAGGTTCATCGCGATTCCCAGC

ATCAGTTCGAGCGAAGAGCACCGCGAAGACTGCCGGCAGGCGGCGCACTTTCTCAAGACGTGCTTCCAA

GAGCTCGGCGCCGAGGCGCGCATCCTACCCAATCCGGTGGGCACCAATCCGCTCGTGCTCGCCACGTTC

AAGGCCAACGCCTACCGCTCGCGGCGGCGCAGGACGGCGGCGAGTGGCGCGAACGAACGCTCGCGCAGT

GCATCCACCTCGGCGTCGGCATCGACCGCGTCGACGAGCTCGTCCGAATCGCACACCGTGGACAACGAC

GACGACGACGACGAGGACGCGCAGGGCCTGAGCGGGTCCATCATGTTTGACCACCTGGACGGGCGGGAT

GCTGCAGCGGATGCGGACGAGGCGAGGACACCGCGCGCACGACCGCAGAAGCGGTGTCTGTTCTACGGC

CACTACGACTGCATCGCCGCCGAGGGCTCGTGGGCGTCGGAGCCGTTTACGCTCGACGGGCGCGACGGC

TTCCTGTACGGCCGCGGTGTGTCGGACAACAAGGGCCCCATCCTGGCGGCGGCGTGTGCGGTGCATCGG

CTGCTCTCGACGCGCCGGCTGCACTCGGACGTGGTGTTCCTGATCGAGGGCGAGGAGGAGAATGGCTCG

GTGGGCTTCGTAGAGGCGGTGCGCAGGTTCAAGAGCGAGATCGGACCGATCGATGTGGTGCTGCTCTCC

AACTCGTACTGGTTGGACGACGAGACGCCGTGCATCACGGTCGGGCTGCGCGGGGTTGTGCGCGCCACG
GTGAGTGTGGGCAGTGGCGAACGCGATGTGCACTCGGGCGTCGAGGGCGGTGCGATCCGCGAACCGATG
GTCGACATGGTCAAGCTGCTTGCTGCGCTCACTGCCGAAGGTGAGCGTGTCGCGCTGCCCGGATTCTAC
GATGCGGTGAGGCAGACGACCGAGGACGAGGTGCAGGCGTACCGCGATATCGTGCACATCAAACAGCAC
GCCGGTGCGCATGCGGATACCGTGGAATCGCTCATGGCCAAGTGGAGATACCCGTCGCTATCGGTGCAC
AACCTGCGCGTGTCGGGCCCGGGCAACTCGACGGTGATTCCGTCGAGCGTCGAGGCGCAAGTGTCGCTG
CGCATCGTTCCGGACCAACAGCTGGCGCAGATCGAGGCGTCGCTGCGCGCCCACGTCGCATCGACGTTC
GACGCGCTGTATGCAACGCCTGCATCGGCGGCGGGCCGCGTGGTGCGCAACAAGGTGTGCGTCACCGTA
GACCACCGTGCCGACTGGTGGCTCGGCTCGGATGCGAGCGTGTACTTTGCGCTTCTGCGCGATGCGGTG
CGCCACGAGTGGAAGGCGGAGCCCATCTCGATCCGCGAGGGCGGCAGTATCCCTGCGATTGCGATTCTG
GAAAAGGAGCTCGGCGCGGCGGCAGTGCACTTGCCCATGGGCCAGAGCAGCGACAGCGCACACCTGCCC
AACGAACGCCTCCGCCAGTCCAACCTGGTCAAGGGCCACAACGTCGTCATGCGCTTCATCGCCGGGCTC
GCTCATGTGTAG-3’（配列番号１１）

[0025] 前記ＰａＥの分解に関与する少なくとも１種のペプチダーゼ又はプロテアーゼの遺伝子に導入される変異は、そのペプチダーゼ又はプロテアーゼの活性が抑制される限り特に制限されないが、例えば、前記遺伝子の少なくとも１つの塩基の欠失、前記遺伝子の少なくとも１つの塩基の置換、又は、前記遺伝子への少なくとも１つの塩基の挿入などであってもよい。ある態様では、本発明の酵母においては、前記遺伝子全体が欠失している。

[0026] 別の態様では、本発明は、前記酵母を使用して、タンパク質を製造する方法にも関している。前記タンパク質としては、種々のタンパク質が採用され得るが、好ましくはＰａＥである。前記ＰａＥ以外のタンパク質を製造する場合には、製造するタンパク質の安定性向上に最適な変異対象遺伝子を選択してもよい。例えば、前記タンパク質がリパーゼＡである場合には、前記変異対象遺伝子は、ＰＡＮ１＿００１ｆ００８４６（配列番号５）及び／又はＰＡＮ１＿０１０ｒ０４２２７（配列番号９）又はそのホモログ若しくはオルソログを含んでもよい。また、ＰＡＮ１＿００４ｒ０２２６６（配列番号２）又はそのホモログ若しくはオルソログがコードするペプチダーゼ又はプ

ロテアーゼの活性が抑制されると、タンパク質の分解が広く抑制されることから、様々なタンパク質の安定性を向上することができると期待される。

[0027] また別の態様では、本発明は、酵母を使用してタンパク質を製造する方法にも関しており、当該方法は、

前記酵母において、ＰａＥの分解に関与する少なくとも１種のペプチダーゼ若しくはプロテアーゼ又はその遺伝子のホモログ若しくはオルソログがコードするペプチダーゼ若しくはプロテアーゼの活性を抑制する工程を含むことを特徴としている。このような抑制手段としては、当技術分野で通用使用される手段を特に制限されることなく採用することができるが、例えば、前記ペプチダーゼ若しくはプロテアーゼの遺伝子又はそのホモログ若しくはオルソログに変異を導入して活性を抑制してもいいし、前記ペプチダーゼ若しくはプロテアーゼ又はその遺伝子のホモログ若しくはオルソログがコードするペプチダーゼ若しくはプロテアーゼに対する抗体や阻害剤を使用して活性を抑制してもよい。また、ｐＨなどの培養、分離・精製、及び保管条件を制御することで活性を抑制してもよい。

[0028] 以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例

[0029] 〔実施例１〕酵母の培養中に生じるＰａＥ分解物及び酵素活性の低下の確認

Ｐ．アンタクティカのＰａＥ高生産変異株であるＧＢ－４（０）－Ｘ１４株（要すれば非特許文献１を参照）を、キシロース存在下で常法により培養した。遠心分離によって組換え型ＰａＥを含む培養上清を回収し、室温で静置した。培養直後の培養上清及び冷蔵保存後の培養上清をＳＤＳポリアクリルアミドゲルにより電気泳動し、当該ゲルをクマシーブリリアントブルー（ＣＢＢ）により染色した。また、培養直後の培養上清及び冷蔵保存後の培養上清のＰａＥ活性を測定した。

[0030] その結果、ＰａＥに由来するバンドの下に、ＰａＥ分解物に由来するバンドが確認され、培養後の日数が経過するにしたがって、ＰａＥ分解物のバン

ドが太くなった（図１）。また、以下の表１に示すように、培養後の日数が経過するにしたがって、培養上清のＰａＥ活性が低下することが確認された。なお、ＰａＥ活性の測定は、従来の方法に従って行った。すなわち２０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌバッファー（ｐＨ６．８）に、吸光度（ＯＤ６６０）が約０．６５となるようにポリブチレンサクシネート－コ－アジペート（ＰＢＳＡ）のエマルジョンを懸濁した。その水懸濁液１．９ｍＬを口径１３ｍｍの試験管に入れ、上記培養上清を適宜希釈して１００μＬ加え、３０℃、１８０ｒｐｍで１５分間振とうし、水懸濁液の吸光度を測定した。酵素活性の単位として、１分間当たりに吸光度を１．０減少させる酵素量を１Ｕと定義した。

[表1]

表１：培養上清のＰａＥ活性

	培養後の日数（日）			
	0（培養直後）	1	2	3
PaE活性（U/mL）	149.58	145.59	136.9	129.56
残存率（%）	100	97.33	91.52	86.62

[0031] 〔実施例２〕ＰａＥの分解に関与するペプチダーゼ又はプロテアーゼの候補遺伝子の探索

Ｐ．アンタクティカＧＢ－４（０）株をキシロース存在下又はグルコース存在下で培養し、Ｐ．アンタクティカのトランスクリプトームを、Ｐ．アンタクティカのゲノム情報に基づいて作製したＤＮＡアレイで経時的に解析した。キシロース存在下で培養すると、培養初期にＰａＥ遺伝子が強く発現する。これに対して、グルコース存在下での培養時と比較してキシロース存在下での培養時に特徴的に発現する遺伝子であって、かつ培養後期に向けて発現量が増加する遺伝子を、ＰａＥの分解に関与する遺伝子の候補として選定した。

また、サッカロマイセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のゲノム情報から予測されるＰ．アンタクティカのゲノム中の推定プロテアーゼ遺伝子も、ＰａＥの分解に関与する遺伝子の候補と

して選定した。

そして、培養上清のプロテオーム解析を行い、グルコース存在下での培養時と比較してキシロース存在下での培養時に特徴的に産生されるタンパク質であって、かつ培養後期に向けて産生量が増加するタンパク質をコードする遺伝子を、ＰａＥの分解に関与する遺伝子の候補として選定した。

[0032] 以下の表２に、トランスクリプトーム解析、推定プロテアーゼ遺伝子探索、及びプロテオーム解析によって選定されたＰａＥの分解に関与するペプチダーゼ又はプロテアーゼの候補遺伝子を示す。

[表2]

表２：ＰａＥの分解に関与するペプチダーゼ又はプロテアーゼの候補遺伝子

候補番号	遺伝子番号 (配列番号)	選定手段
1	PAN1_016f05330 (配列番号1)	トランスクリプトーム解析 推定プロテアーゼ遺伝子探索
2	PAN1_004r02266 (配列番号2)	トランスクリプトーム解析 プロテオーム解析
3	PAN1_008r03624	トランスクリプトーム解析
4	PAN1_003r01856 (配列番号3)	トランスクリプトーム解析
5	PAN1_003r01668 (配列番号4)	トランスクリプトーム解析 推定プロテアーゼ遺伝子探索
6	PAN1_001f00846 (配列番号5)	トランスクリプトーム解析
7	PAN1_019f05845 (配列番号6)	トランスクリプトーム解析
8	PAN1_024f06685 (配列番号7)	トランスクリプトーム解析
9	PAN1_012r04564 (配列番号8)	推定プロテアーゼ遺伝子探索
10	PAN1_004r02266	プロテオーム解析
11	PAN1_010r04227 (配列番号9)	プロテオーム解析
12	PAN1_013r04779 (配列番号10)	プロテオーム解析
13	PAN1_023r06563 (配列番号11)	プロテオーム解析

[0033] 〔実施例３〕ＰａＥ分解物に対する候補遺伝子破壊の影響

Ｐ．アンタクティカＧＢ－４（０）株において、表２に記載の遺伝子のいずれかを常法により破壊した。簡単に説明すると、ｎｏｕｒｓｅｏｔｈｒｉ

ｃｉｎ耐性遺伝子を薬剤耐性マーカーとして、これを標的遺伝子の間に挿入した遺伝子破壊断片を作製し、当該遺伝子破壊断片を相同組換えによって細胞に導入することで遺伝子破壊株を作製した。遺伝子が破壊できたかどうかはコロニーＰＣＲで確認した。

[0034] 作製した各遺伝子破壊株を、キシロース含有培地を含む３００ｍＬ三角フラスコ中で５日間培養（３０℃、２００ｒｐｍ）した。各培養液から遠心分離（５０００ｒｐｍ、５分間）により菌体を除去して培養上清を取得し、これを２５℃で８日間静置した。各培養上清中のＰａＥ及びその分解物を、ウェスタンブロット法により解析した。ウェスタンブロット法では、抗ＰａＥポリクローナル抗体及びＨＲＰ－抗ウサギＩｇＧ抗体を使用し、ＥＣＬプライム（ＧＥヘルスケア社製）を用いた化学発光により、メンブレン上に転写したＰａＥ及びその分解物を検出した（露光時間６０分）。対照として、野生型のＰ．アンタクティカＧＢ－４（０）株の培養上清（ＷＴ）及び粗精製したＰａＥを使用した。

[0035] ２～４回行った実験の代表的な結果を図２に示し、ＰａＥ分解物に由来するシグナルの強さを以下の表３にまとめる。

[表3]

表３：ＰａＥ分解物に由来するシグナルの強さ

候補番号	シグナルの強さ
1	－
2	＋＋
3	＋＋＋＋
4	＋＋
5	＋
6	＋＋
7	＋＋
8	＋
9	－
10	＋＋＋
11	＋
12	＋
13	＋

＋＋＋＋：毎回の実験で野生型よりも強いシグナルを検出

＋＋＋：半数回以上の実験で野生型よりも強いシグナルを検出し、他の実

験では同程度あるいは弱いシグナルを検出

＋＋：半数回以上の実験で野生型と同程度のシグナルを検出したが他の実験では弱いシグナルを検出

＋：毎回の実験で弱いシグナルを検出

－：毎回の実験で検出されるシグナルなし

[0036] 各遺伝子破壊株はＰａＥを産生し、それを培養上清中に分泌した。候補遺伝子３又は１０の破壊株では、ＰａＥ分解物に由来するシグナルが、野生型と同等かそれ以上に強く観察された。一方、候補遺伝子１、２、４～９、又は１１～１３の破壊株では、ＰａＥ分解物に由来するシグナルが、野生型と比較して低下し、特に候補遺伝子１の破壊株及び候補遺伝子９の破壊株では、ＰａＥ分解物に由来するシグナルがほとんど確認されなかった。したがって、候補遺伝子１、２、４～９、又は１１～１３は、ＰａＥの分解に関与していることがわかったので、これらの遺伝子破壊株は、ＰａＥの生産に有用である。なお、遺伝子１２の破壊株については、今回の培養条件では増殖に異常が見られたが、培養条件の最適化は行わず、以降の実験では使用しなかった。

[0037] 〔実施例４〕ＰｒｏＡ遺伝子の相補実験

野生型のＰ．アンタクティカＧＢ－４（０）株又は候補遺伝子１（ＰｒｏＡ遺伝子）の破壊株（ΔＰｒｏＡ）に、ＰｒｏＡ遺伝子を含む相補用遺伝子断片（ｐＵＸＶ１－ｎｅｏ：：ＰｒｏＡ）又は対照遺伝子断片（ｐＵＸＶ１－ｎｅｏ）を導入して、形質転換体を作製した。これらの形質転換体を使用して実施例３に記載の方法で培養上清を調製した。各培養上清及び遠心分離前の菌体を含む培養液を２５℃で７日間静置した後、ウェスタンブロット法でＰａＥ分解物を検出した。その結果を図３に示す。

[0038] ＰｒｏＡ遺伝子破壊株（ΔＰｒｏＡ）に対照遺伝子断片を導入した形質転換体の培養上清では、ＰａＥ分解物に由来するシグナルがほとんど確認されなかったが、ＰｒｏＡ遺伝子を含む相補用遺伝子断片を導入した形質転換体の培養上清では、ＰａＥ分解物に由来するシグナルが増加した。また、野生

型の菌株にＰｒｏＡ遺伝子を含む相補用遺伝子断片を導入した形質転換体の培養上清でも、対照用遺伝子断片を導入した形質転換体の培養上清と比較して、ＰａＥ分解物に由来するシグナルが増加した。したがって、ＰｒｏＡ遺伝子の破壊によるＰａＥ分解物の減少は、ＰｒｏＡ遺伝子の導入により相補されることが確認された。

[0039]〔実施例５〕ジャー培養での遺伝子破壊の影響

培養条件が異なると発現する遺伝子のプロファイルも変化し得るので、ＰａＥ分解物に対する遺伝子破壊の影響を、実施例３のようなフラスコでの培養よりもスケールの大きいジャー培養においても確認した。具体的には、候補遺伝子１（ＰｒｏＡ遺伝子）又は候補遺伝子９（ＰｒｏＢ遺伝子）の破壊株を、キシロース含有培地を含む５Ｌ容ジャーファーメンターで３日間培養（２０℃、４２３ｒｐｍ）した。各培養上清中のＰａＥ及びその分解物を、ウェスタンブロット法により解析した。その結果を図４に示す。

[0040] ジャー培養によりＰａＥを生産した場合であっても、ＰａＥ分解物に由来するシグナルは、野生型の菌株の培養上清と比較して、ＰｒｏＡ遺伝子破壊株及びＰｒｏＢ遺伝子破壊株のいずれの培養上清においても減少していた。一方、ＰｒｏＡ遺伝子破壊株の培養上清とＰｒｏＢ遺伝子破壊株の培養上清とを比較すると、後者の培養上清の方が、前者の培養上清よりもＰａＥ分解物に由来するシグナルは少なく、全く検出されなかった。したがって、ＰａＥを大規模に製造する場合には、ＰｒｏＢ遺伝子破壊株が特に有用である可能性が示唆された。

[0041]〔実施例６〕各遺伝子破壊株のリパーゼ活性

Ｐ．アンタクティカの培養上清中には、リパーゼＡが含まれていることが知られている。ＰａＥの分解を指標にして選択した遺伝子の破壊株が、このリパーゼＡの活性に影響を及ぼすかどうか確認した。具体的には、実施例３の方法に従って作製した各遺伝子破壊株の培養上清を使い、リパーゼキットＳ（ＤＳファーマバイオメディカル株式会社製）で、リパーゼ活性を測定した。その結果を図５に示す。

[0042] 野生型の菌株の培養上清と比較して、候補遺伝子２～４、６、８～１１、又は１３の破壊株の培養上清では、リパーゼ活性が向上していた。候補遺伝子６又は１１の破壊株ではリパーゼ活性が特に高かった。したがって、これらの遺伝子破壊株では、リパーゼＡの分解が抑制されていることが示唆された。

[0043] 〔実施例７〕各遺伝子破壊株の培養上清のゼラチン分解活性

ゼラチン分解活性は、一般的なプロテアーゼ活性の指標として考えられているため、ゼラチン分解活性が低ければ、種々のタンパク質を安定して生産するために有利であると考えられる。ＰａＥの分解を指標にして選択した遺伝子の破壊株が、他のタンパク質の生産にも有用であるかどうか評価するために、代表例として、候補遺伝子１～７の破壊株の培養上清のゼラチン分解活性を確認した。具体的には、実施例３の方法に従って作製した各遺伝子破壊株の培養上清を、サンプルバッファー（６２．５ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ６．８）、２％ ＳＤＳ、１０％ グリセロール、０．００２％ ＢＰＢ）と混合し、０．１％ゼラチンを含むゲルに供し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを行った。そして、泳動後のゲルを２．５％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００で処理した後、０．１Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌに浸漬した。これを３７℃で１６時間インキュベートした後、ＣＢＢで染色した。その結果を図６に示す。

[0044] ゲル中のゼラチンが分解されると、その部分はＣＢＢで染色されないため、ゲルが白く抜けたように見えるが、候補遺伝子２の破壊株の培養上清では、ゼラチンが分解されずゲルが白くならなかった。すなわち、これらの遺伝子破壊の培養上清では、プロテアーゼの活性が一般的に抑制されていた。ゼラチンゲルのｐＨを５．２又は９．８に調整した場合でも、同様の結果が得られた。したがって、ＰａＥの分解を指標にして選択した遺伝子の破壊株が、他のタンパク質の生産にも有用であることが示唆された。

[0045] 以上より、ＰａＥの分解に関与する少なくとも１種のペプチダーゼ又はプロテアーゼの遺伝子に変異を導入することによりそのペプチダーゼ又はプロテアーゼの活性を抑制した変異酵母を使用すれば、培養液中におけるＰａＥ

の分解を抑制することができるだけなく、意外なことに、他のタンパク質の分解も抑制することができることがわかった。したがって、効率的なタンパク質の生産が可能となる。

[0046] 〔実施例８〕培養中のＰａＥの安定性

Ｐ．アンタクティカＧＢ４（０）株に由来するキシラナーゼプロモーター及びＰａＥ遺伝子並びにマーカーとしてのネオマイシン耐性遺伝子を含む発現用カセットを、野生型のＰ．アンタクティカＧＢ４（０）株に導入して作製したＰａＥ高生産変異株（ＸＧ８株）又はそのＰｒｏＢ遺伝子破壊株（Δｐｒｏ Ｂ株）を、キシロース存在下で常法により３Ｌ容ジャーファーメンターで培養した。培養開始２４時間後、４８時間後、及び７２時間後に各培養液を採取して、その乾燥菌体重量を測定した。また、以降のＰａＥ活性測定方法は次のように行った。すなわち２５ｍＭのＨＥＰＥＳバッファー（ｐＨ７．３ ± ０．１）に、吸光度（$ＯＤ_{660}$）が約０．５５となるようにＰＢＳＡのエマルジョンを懸濁した。その水懸濁液１．９９５ｍＬを口径１０ｍｍの試験管に入れ、上記培養上清を適宜希釈して５μＬ加え、３０℃、１５０ｒｐｍで１５分間振とうし、水懸濁液の吸光度を測定した。酵素活性の単位として、１分間当たりに吸光度を１．０減少させる酵素量を１Ｕと定義した。そして、各培養上清をＳＤＳポリアクリルアミドゲルにより電気泳動し、当該ゲルをＣＢＢにより染色した。

[0047] その結果、乾燥菌体重量に関しては、ＸＧ８株とΔｐｒｏＢ株との間に差はなかったが、ＰａＥ活性は、ΔｐｒｏＢ株の培養上清の方が大きかった（図７）。このことは、ＣＢＢ染色の結果と一致していた。すなわち、ＸＧ８株の培養上清では、ＰａＥに由来するバンドの下に、ＰａＥ分解物に由来するバンドが確認され、培養後の日数が経過するにつれて、ＰａＥ分解物のバンドが太くなっていたが、ΔｐｒｏＢ株の培養上清では、ＰａＥ分解物はほとんど確認されなかった（図８）。

[0048] 〔実施例９〕菌体懸濁液中でのＰａＥの安定性

酵素を工業的に大容量で（例えば３００Ｌタンクで）製造する場合には、

培養終了後、すべての培養液を遠心ろ過するまでに１日以上を要することがある。その間、培養液は２４時間以上菌体が入ったまま放置されることになるが、その際に溶菌が進み、培養上清中のＰａＥがプロテアーゼによって分解されてしまう危険がある。そこで、ＰｒｏＢ遺伝子の破壊が、培養終了後のＰａＥの維持に有効であるかどうか検討した。具体的には、ＸＧ８株又はΔｐｒｏＢ株を、実施例８と同様の方法で７２時間培養し、各培養液を低付着性マイクロチューブに１ｍＬずつ分注した。これらのチューブを、分注直後（０時間静置）又は２５℃で４、８、１２、２４、３６、又は４８時間静置後に、転倒混和して、１５，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離した。回収した培養上清はすぐに－３０℃で保管し、残った菌体は、１０５℃で６時間乾燥させた後に、その重量（乾燥菌体重量）を測定した。また、各培養上清のＰａＥ活性を、実施例８に記載の方法で測定し、分注直後の培養上清のＰａＥ活性を基準とした残存活性（％）を求めた。そして、各培養上清をＳＤＳポリアクリルアミドゲルにより電気泳動し、当該ゲルをＣＢＢにより染色した。

[0049] その結果、ＸＧ８株及びΔｐｒｏＢ株のどちらでも乾燥菌体重量が減少しており、静置中に溶菌が起こっていることが確認された。一方、ＸＧ８株の培養上清においては、静置時間が経過するにつれてＰａＥ活性が低下し、４８時間後には５５．１％にまで減少していたのに対して、ΔｐｒｏＢ株の培養上清においては、ＰａＥ活性の低下はほとんど起こっていなかった（図９）。このことは、ＣＢＢ染色の結果と一致していた。すなわち、ＸＧ８株の培養上清では、ＰａＥに由来するバンドの下に、ＰａＥ分解物に由来するバンドが確認され、静置時間が経過するにつれて、ＰａＥ分解物のバンドが太くなっていたが、ΔｐｒｏＢ株の培養上清では、ＰａＥ分解物はほとんど確認されなかった（図１０）。

[0050] 〔実施例１０〕培養ろ液中でのＰａＥの安定性

ＸＧ８株又はΔｐｒｏＢ株を、実施例８と同様の方法で７２時間培養し、培養直後の培養液７００ｍＬを、それぞれ８，０００ｒｐｍで１０分間遠心

分離した。また、各培養液７００ｍＬを、５００ｍＬ容三角フラスコ２本に移して２５℃で２４時間静置した後に、それぞれ８，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離した。回収した各培養上清を０．４５μｍ孔ステリカップでフィルターろ過し、それぞれ１８ｍＬずつを２０ｍＬ容のバイアル瓶３本に分注した。これらのバイアル瓶から、分注直後（０時間静置）又は２５℃で１、３、５、７、１１、又は１４日静置後に、１ｍＬずつサンプリングした。各培養上清のＰａＥ活性を、実施例８に記載の方法で測定し、分注直後の培養上清のＰａＥ活性を基準とした残存活性（％）を求めた。そして、各培養上清をＳＤＳポリアクリルアミドゲルにより電気泳動し、当該ゲルをＣＢＢにより染色した。

[0051] その結果、ＸＧ８株及びΔｐｒｏＢ株のどちらにおいても、培養直後に回収した培養上清のＰａＥ活性は、その後の静置期間中に少なくとも８０％は維持されていたが、培養２４時間後に回収したＸＧ８株の培養上清においては、静置時間が経過するにつれてＰａＥ活性が低下し、１４日後には約３０％程度にまで減少していた（図１１）。これは、培養が終了してから培養上清を回収するまでの間に溶菌した菌体からＰａＥを分解するペプチダーゼ又はプロテアーゼが放出され、培養上清中のＰａＥを分解したものと考えられる。一方、ΔｐｒｏＢ株の培養上清においては、ＰａＥ活性の低下がほとんど起こっていなかった（図１１）。これらのことは、ＣＢＢ染色の結果と一致していた。すなわち、ＸＧ８株の培養上清では、ＰａＥに由来するバンドの下に、ＰａＥ分解物に由来するバンドが確認され、静置時間が経過するにつれて、ＰａＥ分解物のバンドが太くなっていたが、ΔｐｒｏＢ株の培養上清では、ＰａＥ分解物はほとんど確認されなかった（図１２）。

[0052] 実施例８～１０の試験結果によれば、ＰｒｏＢ遺伝子の破壊は、培養中のＰａＥの分解の抑制だけでなく、培養後の溶菌に伴うＰａＥの分解の抑制にも有効であった。したがって、ＰａＥの分解に関与する少なくとも１種のペプチダーゼ又はプロテアーゼの遺伝子に変異を導入することによりそのペプチダーゼ又はプロテアーゼの活性を抑制した変異酵母を使用すれば、作業に

時間を要する大容量での工業的製造においても、効率的なタンパク質の生産が可能となる。

請求の範囲

[請求項1] シュードザイマ・アンタクティカ（Ｐｓｅｕｄｏｚｙｍａ ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）が産生するエステラーゼ（ＰａＥ）の分解に関与する少なくとも１種のペプチダーゼ又はプロテアーゼの遺伝子に変異が導入されることにより、そのペプチダーゼ又はプロテアーゼの活性が抑制されている、酵母。

[請求項2] 前記遺伝子の少なくとも１つの塩基が欠失している若しくは他の塩基で置換されているか、又は、前記遺伝子に少なくとも１つの塩基が挿入されている、請求項１に記載の酵母。

[請求項3] 前記遺伝子全体が欠失している、請求項１又は２に記載の酵母。

[請求項4] 前記ペプチダーゼ又はプロテアーゼが、ＰＡＮ１＿０１６ｆ０５３０（配列番号１）、ＰＡＮ１＿００４ｒ０２２６６（配列番号２）、ＰＡＮ１＿００３ｒ０１８５６（配列番号３）、ＰＡＮ１＿００３ｒ０１６６８（配列番号４）、ＰＡＮ１＿００１ｆ００８４６（配列番号５）、ＰＡＮ１＿０１９ｆ０５８４５（配列番号６）、ＰＡＮ１＿０２４ｆ０６６８５（配列番号７）、ＰＡＮ１＿０１２ｒ０４５６４（配列番号８）、ＰＡＮ１＿０１０ｒ０４２２７（配列番号９）、ＰＡＮ１＿０１３ｒ０４７７９（配列番号１０）、及び、ＰＡＮ１＿０２３ｒ０６５６３（配列番号１１）からなる群から選択されるシュードザイマ・アンタクティカの遺伝子又はそのホモログ若しくはオルソログにコードされている酵素を１種以上含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の酵母。

[請求項5] シュードザイマ属の酵母である、請求項１～４のいずれか一項に記載の酵母。

[請求項6] 前記ＰａＥを産生する、請求項１～５のいずれか一項に記載の酵母。

[請求項7] 組換えタンパク質を産生する、請求項１～６のいずれか一項に記載の酵母。

[請求項8] 請求項１～７のいずれか一項に記載の酵母を使用して、タンパク質を製造する方法。

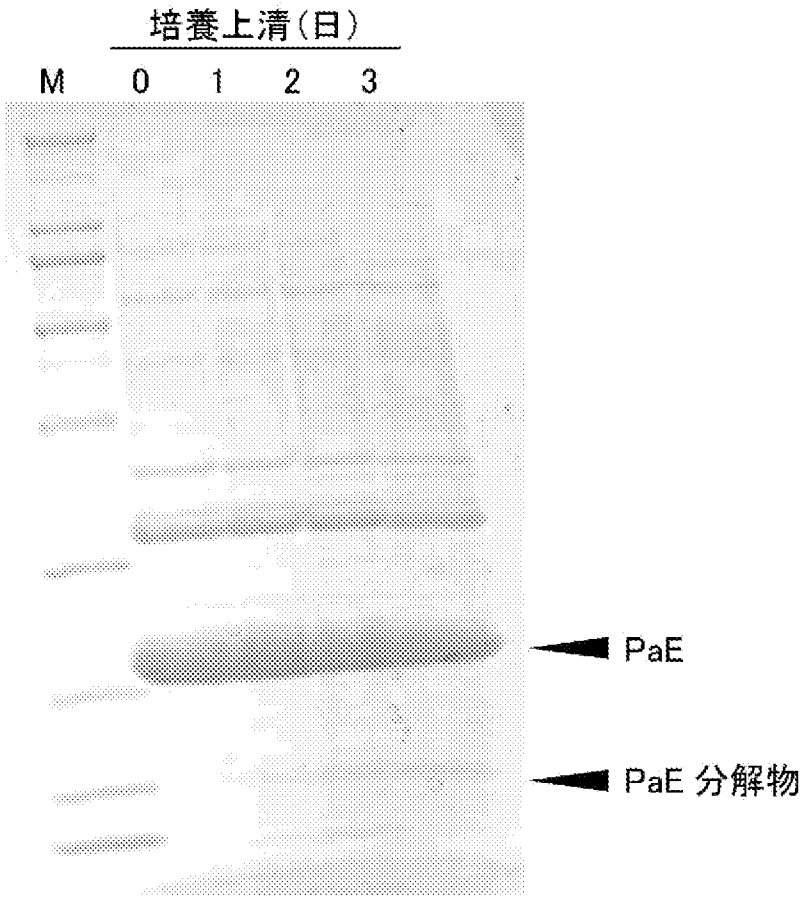
[請求項9] 前記タンパク質がＰａＥである、請求項８に記載の方法。

[請求項10] 酵母を使用してタンパク質を製造する方法であって、

前記酵母において、ＰａＥの分解に関与する少なくとも１種のペプチダーゼ又はプロテアーゼの活性を抑制する工程を含むことを特徴とする、方法。

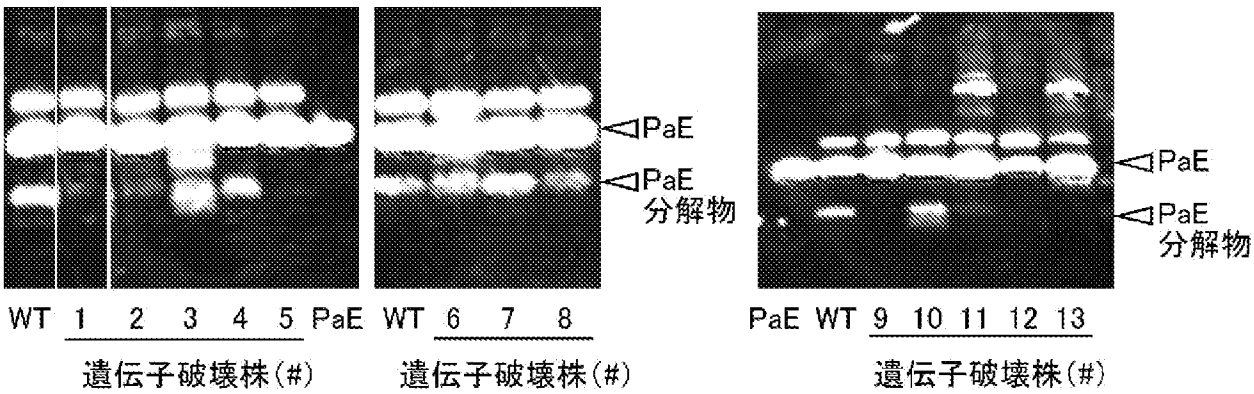
[図1]

FIG.1



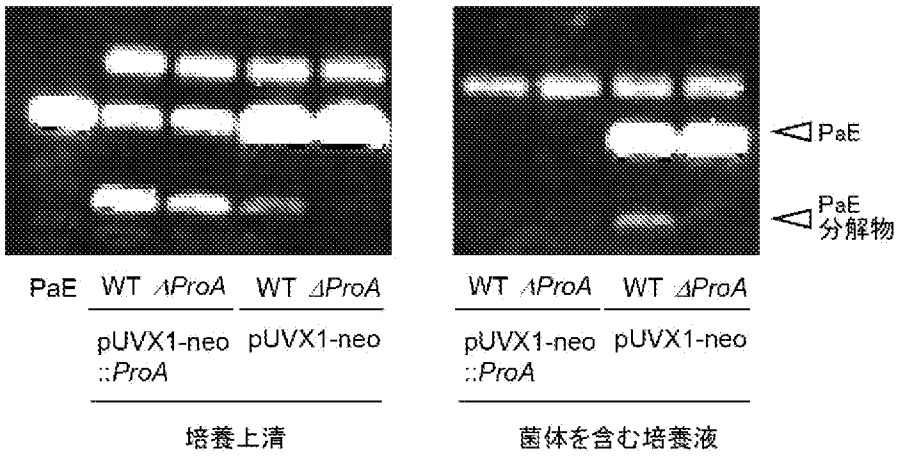
[図2]

FIG.2



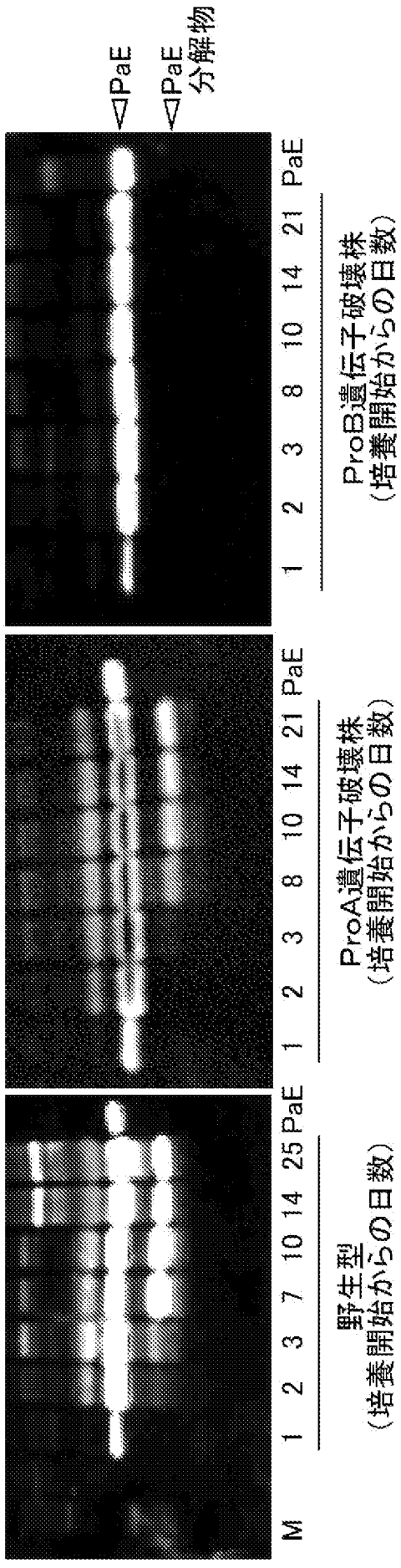
[図3]

FIG.3


PaE
PaE 分解物
PaE
WT ΔProA
WT ΔProA
pUVX1-neo ::ProA
pUVX1-neo
WT ΔProA
WT ΔProA
pUVX1-neo ::ProA
pUVX1-neo
培養上清
菌体を含む培養液

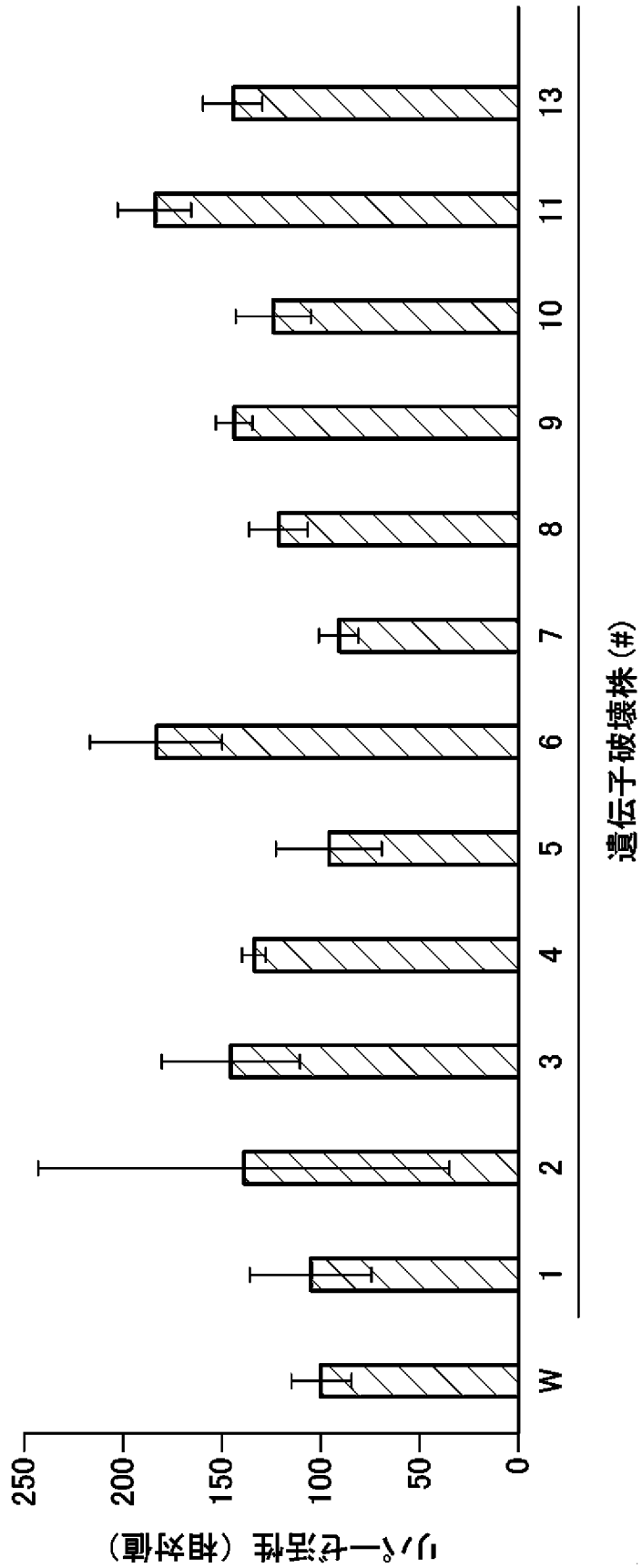
[図4]

FIG.4


◁PaE
◁PaE
分解物
M 1 2 3 7 10 14 25 PaE
野生型
（培養開始からの日数）
1 2 3 8 10 14 21 PaE
ProA遺伝子破壊株
（培養開始からの日数）
1 2 3 8 10 14 21 PaE
ProB遺伝子破壊株
（培養開始からの日数）

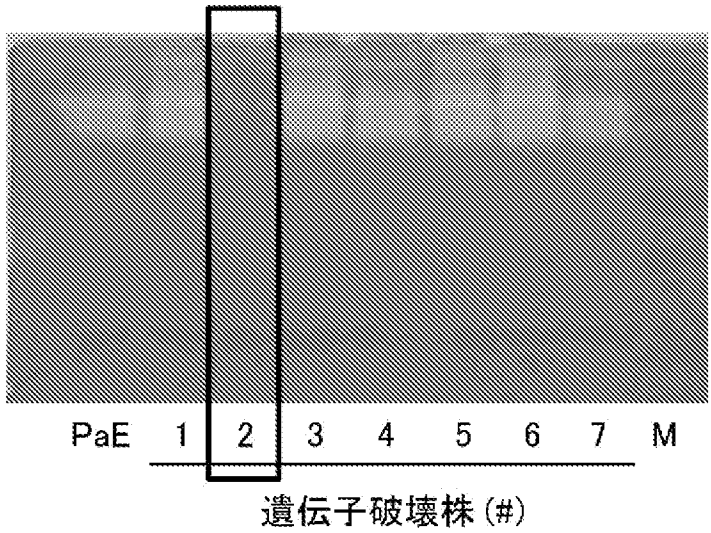
[図5]

FIG.5



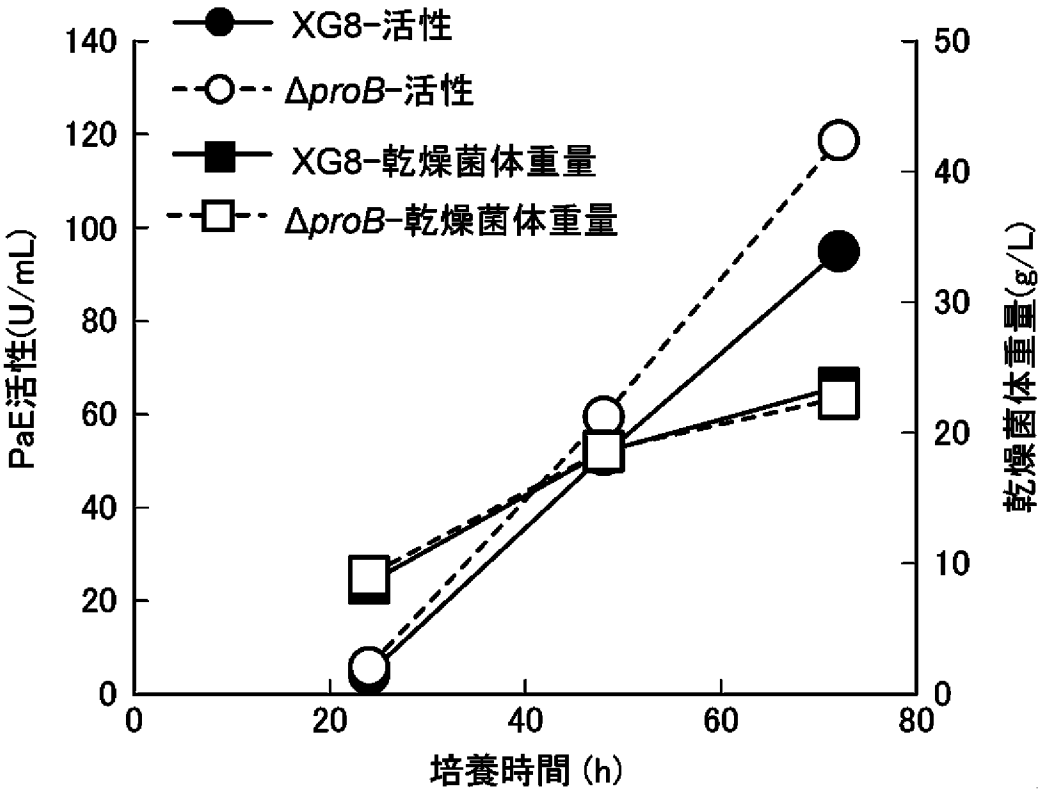
[図6]

FIG.6



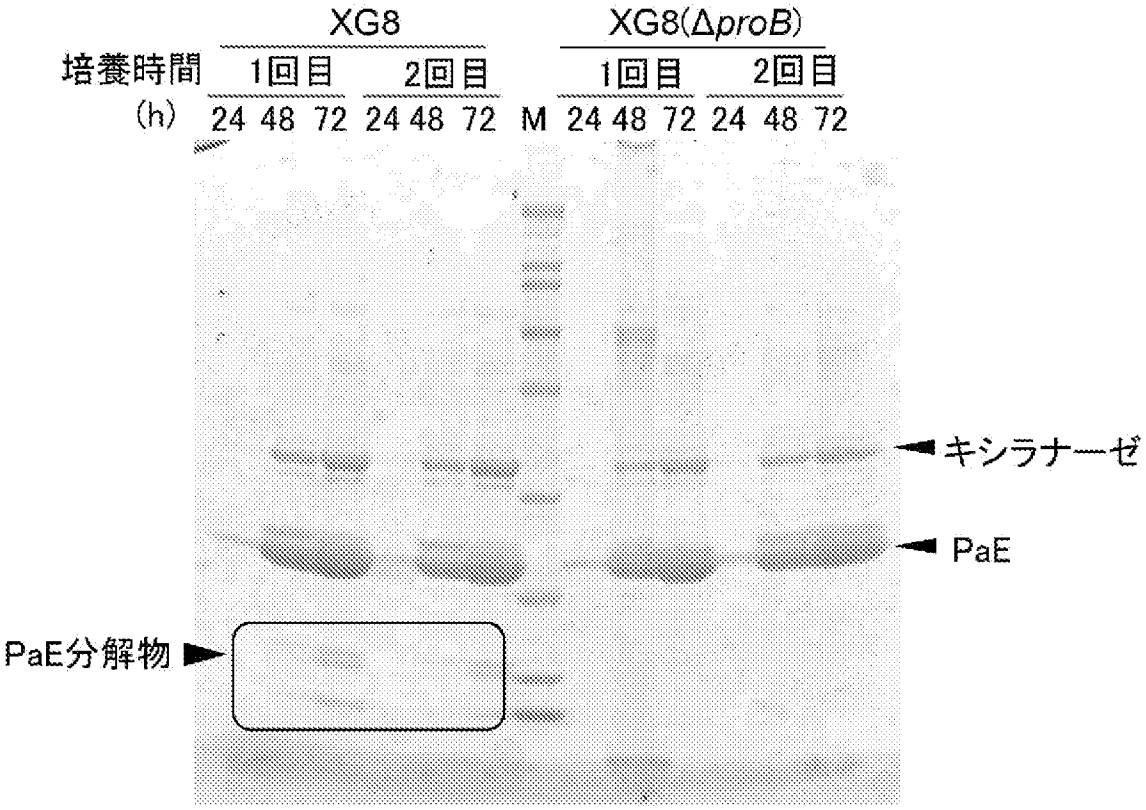
[図7]

FIG.7



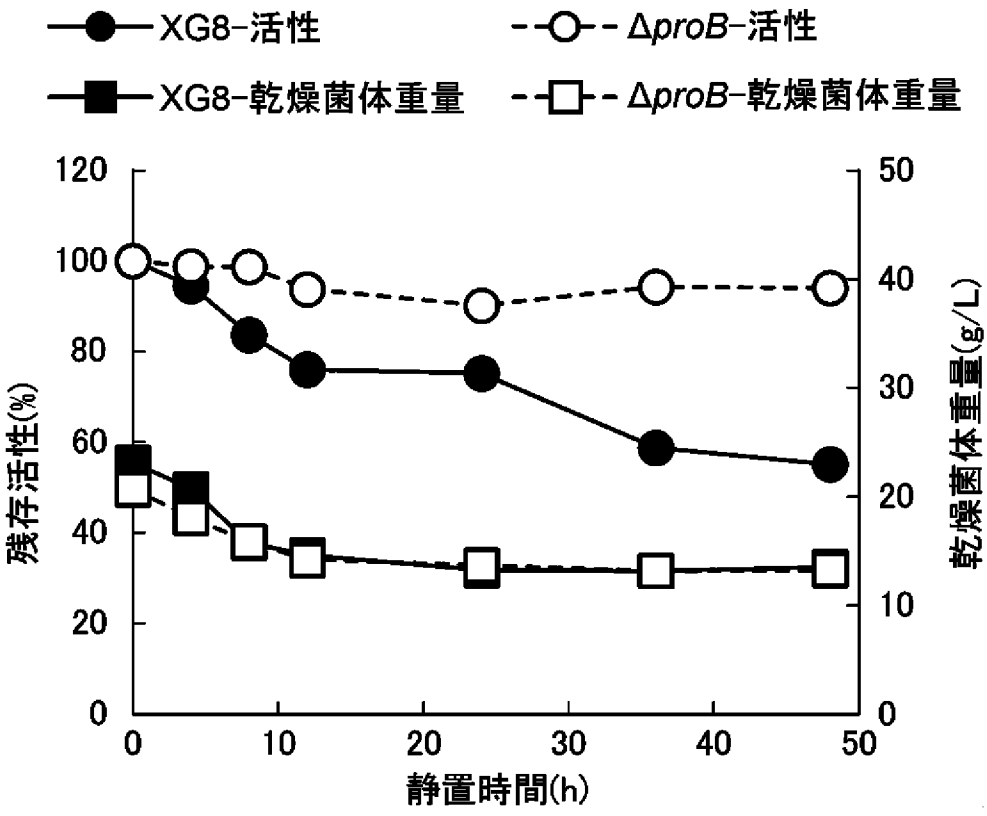
[図8]

FIG.8



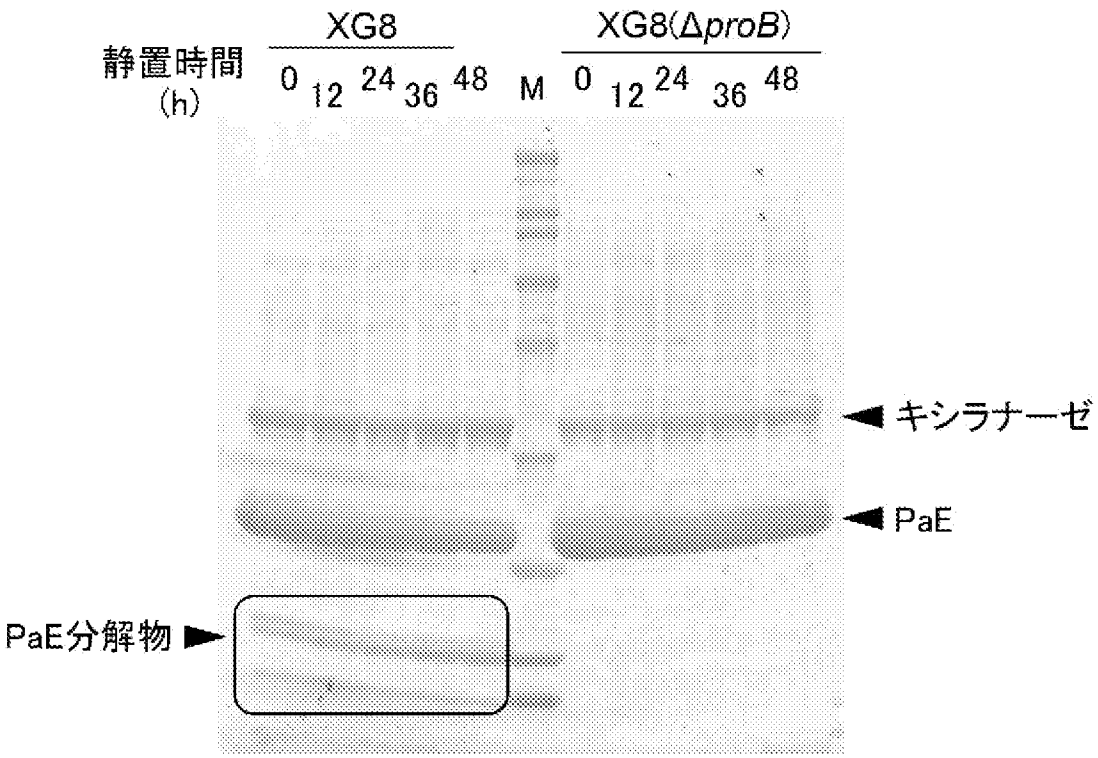
[図9]

FIG.9



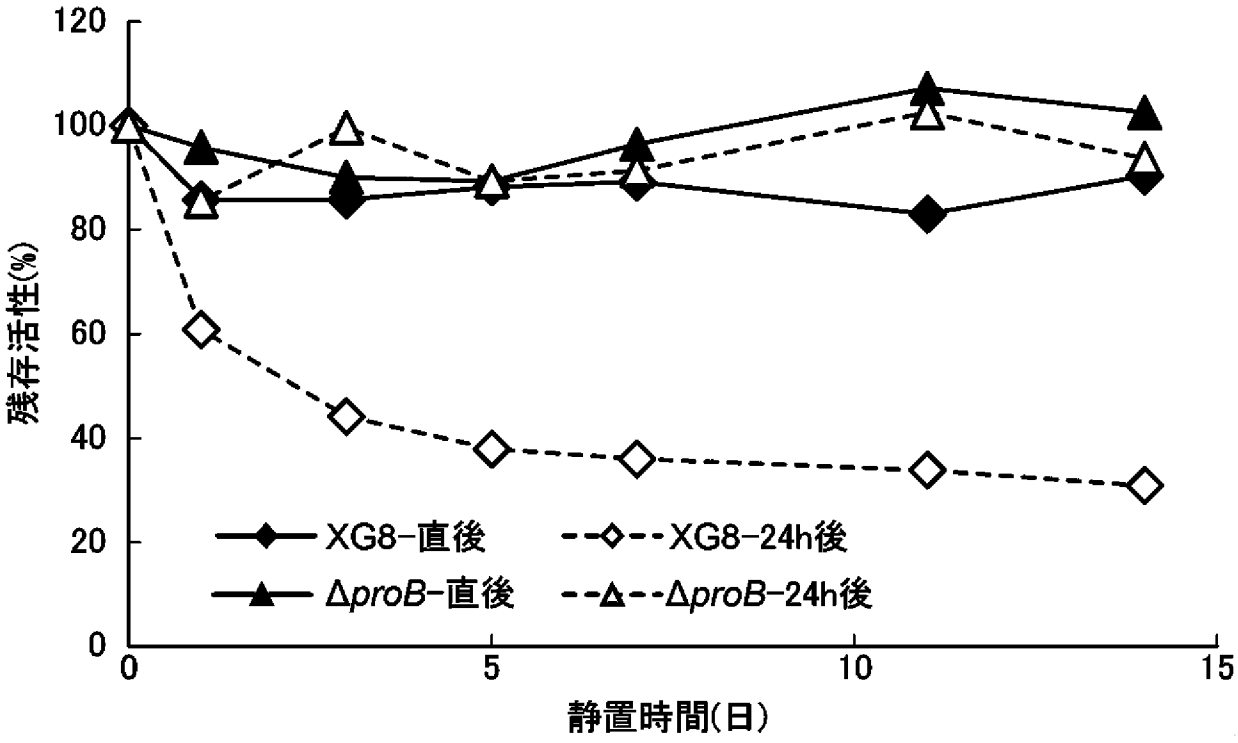
[図10]

FIG.10



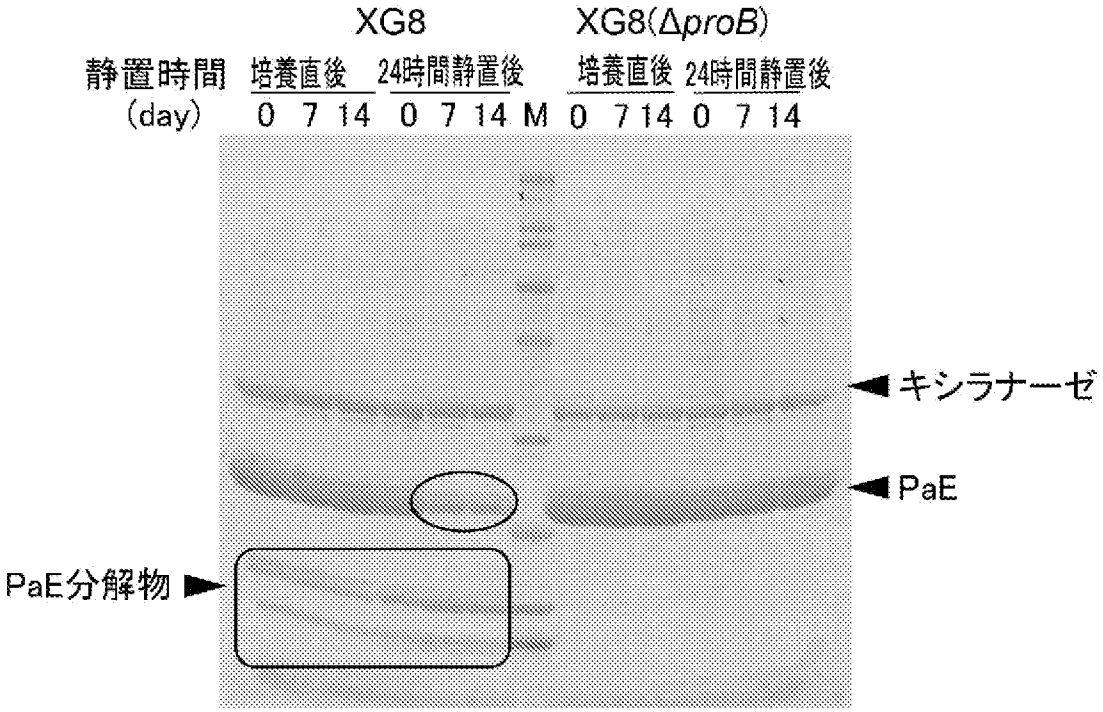
[図11]

FIG.11



[図12]

FIG.12


XG8
XG8(ΔproB)
静置時間
培養直後
24時間静置後
培養直後
24時間静置後
(day)
0 7 14 0 7 14 M 0 7 14 0 7 14
キシラナーゼ
PaE
PaE分解物

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/044380

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12P 21/02(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 15/57(2006.01)n; C12N 9/16(2006.01)n
FI: C12N1/19; C12P21/02 C; C12N15/57; C12N15/57 ZNA; C12N9/16
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)
C12P21/02; C12N1/19; C12N15/57; C12N9/16

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WATANABE, Takashi et al., "High-level recombinant protein production by the basidiomycetous yeast Pseudozyma antarctica under a xylose-inducible xylanase promoter", Appl. Microbiol. Biotechnol., 23 December 2015, vol. 100, pp. 3207-3217 in particular, summary, fig. 5	1-10
Y	GRAF, Alexandra et al., "Yeast systems biotechnology for the production of 1-10 heterologous proteins", FEMS Yeast Res., 01 April 2009, vol. 9, pp. 335-348 summary, p. 338	1-10
Y	ZHANG, Yewang, LIU, Ruijiang, WU, Xiaoyu, "The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast Pichia pastoris", Annals of Microbiology, 2007, vol. 57, no. 4, pp. 553-560 summary, "PROTEASES IN Pichia pastoris"	1-10

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 January 2020 (10.01.2020)	10 February 2020 (10.02.2020)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/044380

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WU, Min et al., "Disruption of YPS1 and PEP4 genes reduces proteolytic degradation of secreted HSA/PTH in Pichia pastoris GS115", J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 26 March 2013, vol. 40, pp. 589-599 summary, etc.	1-10
Y	YU, XiaoWei et al., "Identification of novel factors enhancing recombinant protein production in multi-copy Komagataella phaffii based on transcriptomic analysis of overexpression effects.", Scientific Reoorts. 24 November 2017, vol. 7, 16249 (pp. 1-12) summary, etc.	1-10
Y	MORITA, Tomotake et al., "Genome and Transcriptome Analysis of the Basidiomycetous Yeast Pseudozyma antarctica Producing Extracellular Glycolipids, Mannosylerythritol Lipids", PLOS ONE, 24 February 2014, vol. 9, issue 2, e86490 (pp. 1-12) summary, etc.	1-10
Y	YARIMIZU, Tohru et al., "Targeted gene replacement at the URA3 locus of the basidiomycetous yeast Pseudozyma antarctica and its transformation using lithium acetate treatment", Yeast, 21 September 2017, vol. 34, pp. 483-494 summary, etc.	1-10

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2019/044380

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12P 21/02(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 15/57(2006.01)n; C12N 9/16(2006.01)n
FI: C12N1/19; C12P21/02 C; C12N15/57; C12N15/57 ZNA; C12N9/16

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））

C12P21/02; C12N1/19; C12N15/57; C12N9/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

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	関連する請求項の番号
Y	WATANABE, Takashi et al. , High-level recombinant protein production by the basidiomycetous yeast Pseudozyma antarctica under a xylose-inducible xylanase promoter, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2015.12.23, Vol.100, p.3207-3217 特に要旨，図５	1-10
Y	GRAF, Alexandra et al., Yeast systems biotechnology for the production of heterologous proteins, FEMS Yeast Res., 2009.04.01, Vol.9, p.335-348 要旨，第338頁	1-10
Y	ZHANG, Yewang, LIU, Ruijiang, WU, Xiaoyu, The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast Pichia pastoris, Annals of Microbiology, 2007, Vol.57, No.4, p.553-560 要旨，「PROTEASES IN Pichia pastoris」	1-10
Y	WU, Min et al., Disruption of YPS1 and PEP4 genes reduces proteolytic degradation of secreted HSA/PTH in Pichia pastoris GS115, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2013.03.26, Vol.40, p.589-599 要旨等	1-10

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

＊ 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
10.01.2020	10.02.2020

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
田ノ上　拓自 4N 6115

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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	関連する請求項の番号
Y	YU, Xiao-Wei et al., Identification of novel factors enhancing recombinant protein production in multi-copy Komagataella phaffii based on transcriptomic analysis of overexpression effects, Scientific Reports, 2017.11.24, Vol.7, 16249 (p.1-12) 要旨等	1-10
Y	MORITA, Tomotake et al., Genome and Transcriptome Analysis of the Basidiomycetous Yeast Pseudozyma antarctica Producing Extracellular Glycolipids, Mannosylerythritol Lipids, PLOS ONE, 2014.02.24, Vol.9, Issue2, e86490 (p.1-12) 要旨等	1-10
Y	YARIMIZU, Tohru et al., Targeted gene replacement at the URA3 locus of the basidiomycetous yeast Pseudozyma antarctica and its transformation using lithium acetate treatment, Yeast, 2017.09.21, Vol.34, p.483-494 要旨等	1-10

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2019/044380

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見: