(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3667339号
(P3667339)
(45)発行日　平成17年7月6日(2005.7.6)　(24)登録日　平成17年4月15日(2005.4.15)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C12P 21/02	C12P	21/02	C
C12N 1/19	C12N	1/19	
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA
//(C12N 1/19	C12N	1/19	
C12R 1:865)	C12R	1:865	

請求項の数 17　(全 23 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平8-500567
(86)(22)出願日　平成7年6月7日(1995.6.7)
(65)公表番号　特表平10-501123
(43)公表日　平成10年2月3日(1998.2.3)
(86)国際出願番号　PCT/GB1995/001317
(87)国際公開番号　WO1995/033833
(87)国際公開日　平成7年12月14日(1995.12.14)
審査請求日　平成14年6月3日(2002.6.3)
(31)優先権主張番号　9411356.0
(32)優先日　平成6年6月7日(1994.6.7)
(33)優先権主張国　英国(GB)

(73)特許権者
デルタ、バイオテクノロジー、リミテッド
イギリス国ノッティンガム、キャッスル、ブールバード、キャッスル、コート　(番地なし)
(74)代理人
弁理士　佐藤　一雄
(74)代理人
弁理士　小野寺　捷洋
(74)代理人
弁理士　中村　行孝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】酵母菌株

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
酵母を培養して、Ｈｓｐ１５０タンパク質と共精製される所望なタンパク質を得ることを含む酵母からの所望なタンパク質の製造法であって、酵母が熱ショックタンパク質１５０（Ｈｓｐ１５０）を欠いており、所望なタンパク質がＨｓｐ１５０またはＨｓｐ１５０融合タンパク質ではないことを特徴とする方法。
【請求項２】
酵母がそのゲノムに欠陥があり、Ｈｓｐ１５０タンパク質の生成量が減少する、請求の範囲第１項に記載の方法。
【請求項３】
酵母を培養し、Ｈｓｐ１５０タンパク質と共精製される所望なタンパク質を得ることを含む酵母からの所望なタンパク質の製造法であって、Ｈｓｐ１５０タンパク質がこの酵母によって産生されず、所望なタンパク質がＨｓｐ１５０融合タンパク質ではないことを特徴とする、方法。
【請求項４】
所望なタンパク質がアルブミンである、請求の範囲第１～３項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
所望なタンパク質がヒトアルブミンである、請求の範囲第４項に記載の方法。
【請求項６】

酵母がTorulaspora、Kluyveromyces、Schizosaccharomyces、PichiaまたはSaccharomyces種である、請求の範囲第１～５項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
酵母がS.cerevisiaeである、請求の範囲第６項に記載の方法。
【請求項８】
所望なタンパク質が酵母から周囲の培地に分泌され、そこから精製される、請求の範囲第１～７項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
形質転換されてクロマトグラフィ法でＨｓｐ１５０と共精製される所望なタンパク質を発現する酵母であって、Ｈｓｐ１５０を欠いており、所望なタンパク質がＨｓｐ１５０融合タンパク質ではないことを特徴とする酵母。
【請求項１０】
酵母がそのゲノムに欠陥があり、Ｈｓｐ１５０タンパク質の生成量が減少する、請求の範囲第９項に記載の酵母。
【請求項１１】
実質的にＨｓｐ１５０タンパク質が酵母によって産生されない、請求の範囲第９項に記載の酵母。
【請求項１２】
所望なタンパク質がアルブミンである、請求の範囲第９～１１項のいずれか１項に記載の酵母。
【請求項１３】
所望なタンパク質がヒトアルブミンである、請求の範囲第１２項に記載の酵母。
【請求項１４】
酵母がTorulaspora、Kluyveromyces、SchizosaccharomycesまたはSaccharomyces種である、請求の範囲第９～１３項のいずれか１項に記載の酵母。
【請求項１５】
酵母がS.cerevisiaeである、請求の範囲第１４項に記載の酵母。
【請求項１６】
酵母をＤＮＡ構築物で形質転換して、所望なタンパク質を酵母の培養中に酵母から分泌させる、請求の範囲第９～１５項のいずれか１項に記載の酵母。
【請求項１７】
(i)　酵母を所望なタンパク質の発現のためのコード配列で形質転換し、
(ii)　酵母のゲノムを分断して、酵母のＨｓｐ１５０の量が異常に低くなるようにする、段階を含んでなり、
段階(i)および(ii)は、いずれの順序で行ってもまたは同時に行ってもよい、請求の範囲第９～１６項のいずれか１項に記載の、酵母の製造法。
【発明の詳細な説明】
技術分野
本発明は、酵母種による異種タンパク質の産生に関し、更に詳細にはこのタンパク質を産生する酵母の適用に関する。
背景および従来技術
近年、酵母は、組換えヒトアルブミン（ｒＨＡ）（Sleepら、1990, 1991;Fleerら、1991）などの異種タンパク質(Romanosらによる総説、1992）の産生用の宿主生物として広く用いられている。酵母は、遺伝子操作を容易に行うことができ、単純な培地上で成育して高細胞密度とすることができ、真核細胞として分泌並びに細胞質ゾルタンパク質の産生に好適である。
酵母を成育培地への分泌による所望な異種タンパク質を産生する目的で用いるときには、宿主によって分泌された他のタンパク質だけでなく、細胞からの漏出または細胞溶解の結果として上清に含まれる細胞内タンパク質など多数の宿主由来のタンパク質も含まれることがある。タンパク質が分泌されない工程では、当然のことであるが高濃度の細胞内酵母

タンパク質による汚染がある。所望なタンパク質を精製し、これらの汚染タンパク質を調製物から除去する必要があり、このような方法はＷＯ９２／０４３６７号明細書およびＥＰ５２４６８１号明細書に開示されている。汚染タンパク質の多くは、所望のタンパク質とは十分に異なる物理化学的特性を有し、イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィのような標準的技法によって効率的に分離することができる。従来技術では、これらのタンパク質は上記のような技法によって十分に除去することができるという印象がある。例えば、ＥＰ５２４　６８１号明細書(Gist-brocades)、ＥＰ５７０　９１６号明細書(Green Cross)、およびＥＰ４６４　５９０号明細書(Green Cross)を参照されたい。実際に、本発明者らは、所望なタンパク質から汚染タンパク質を除去する目的で、精巧なクロマトグラフィ技法（未発表）を開発した。

発明の要約

本発明者らは、別の方法も採用し、タンパク質に関与する遺伝子、すなわちＨＳＰ１５０遺伝子であって組換えヒトアルブミン（ｒＨＡ）とおよび原則として他の所望なタンパク質と共に共精製される（co-purifies）遺伝子を同定した。本発明によれば、精製中に極めて精巧で複雑な除去手段を開発するのではなく初期の発酵から汚染タンパク質を除去するのである。このタンパク質は、以前は共精製汚染物（co-purifying contaminant)であることは知られていなかった。

本発明の一つの態様では、ＨＳＰ１５０遺伝子は宿主のゲノムから機能的に欠失されている。これは所望なタンパク質の産生に悪影響を全く引き起こさず、標準的な精製技術によって除去することが困難であることが明らかになっている潜在的汚染物を除去する。このような修飾酵母において、Ｈｓｐ１５０に極めて類似したタンパク質をコードする少なくとも２個の密接に関連した遺伝子ＰＩＲ１およびＰＩＲ３が含まれているにも拘らず、これらの生物から精製されたｒＨＡはこの科からの如何なるタンパク質も検出可能な濃度(level)で含んでいない。

S. cerevisiae Ｈｓｐ１５０タンパク質は最初はRussoら（１９９２年）によって記載され、本質的に産生され、広汎にＯ－グリコシル化され、成育培地に効率的に分泌されることが示された。２８℃で成育した細胞を３７℃に移したところ、Ｈｓｐ１５０タンパク質の濃度が７倍に増加することが見られた。Makarowは、Ｈｓｐ１５０（またはそのフラグメント）と所望なタンパク質との融合体を調製して、分泌を高め調節可能とすることを提案した（ＷＯ９３／１８１６７号明細書）。ＨＳＰ１５０遺伝子は、成熟タンパク質には含まれない１８個のアミノ酸のＮ－末端分泌シグナル配列を含む４１３個のアミノ酸の一次翻訳生成物をコードする。更に、翻訳後プロセシング現象が一組の塩基性残基に対するＣ－末端に起こり、会合したままの５４および３４１個のアミノ酸の２個のサブユニットを生成する。３４１個のアミノ酸サブユニットは１９個のアミノ酸配列の１１個のタンデム反復を含むが、その機能は知られていない。ＨＳＰ１５０遺伝子の同族体（homologues）は、Torulaspora delbrueckii、Kluyveromyces marxianusおよびSchizosaccharomyces pombeに見いだされた（Russoら、１９９２年）。

同じタンパク質は、Toh-eら（１９９３年）によってＰＩＲ２タンパク質と命名されている。ＨＳＰ１５０／ＰＩＲ２遺伝子は、少なくとも３種類の遺伝子（ＰＩＲ１、ＰＩＲ２、およびＰＩＲ３）の科の一員であってその総てが約１９個のアミノ酸の類似の内部タンデム反復を含むものであることが示された。ＰＩＲ遺伝子の同族体は、Kluyveromyces lactisおよびZygosaccharomyces rouxii（Tho-eら、１９９３年）にも含まれることが示された。ＨＳＰ１５０／ＰＩＲ２遺伝子の分断（disruption）により、これは必須の遺伝子ではないことが示された（Russoら、１９９２年；Toh-eら、１９９３年）。

本明細書では、所望なタンパク質としてｒＨＡについて説明する。しかしながら、本発明によって提起された問題は、原則としてｒＨＡと類似の特性を有していて従って同じ方法で精製される他の如何なるタンパク質でも見られることを理解すべきである。従って、本発明によって提供される解決策、すなわちＨｓｐ１５０の除去は、これら他のタンパク質の製造にも適用することができる。

本発明者らの研究により、Ｈｓｐ１５０タンパク質は、イオン交換クロマトグラフィによ

ってはｒＨＡから非効率的に分離されることが明らかになった。しかしながら、意外なことには、ｒＨＡが含まれないときには、Ｈｓｐ１５０はｒＨＡ画分と同等な画分には現れない。例えば、ｒＨＡ含有培養物の上清を、ｒＨＡがカラムに確実に結合する条件下でカチオン交換カラムを通過させるときには（例えば、ｐＨ４．５、伝導率＜７ｍＳ）、Ｈｓｐ１５０もカラムに結合し、ｒＨＡと同じ条件下で溶出するので、ｒＨＡ調製物を汚染する。しかしながら、ｒＨＡを分泌しない酵母からの培養物上清を同じ条件下でこのカラムを通過させると、Ｈｓｐ１５０タンパク質はマトリックスに結合せず、カラムを直接通過してしまう。溶出液画分は、ｒＨＡが含まれない場合にはＨｓｐ１５０を含まない。同様に、Ｈｓｐ１５０タンパク質は、ｒＨＡの非存在下でアルブミンの結合を生じる条件下（例えば、ｐＨ５．５、１．５ｍＳ）でのアニオン交換カラム工程には結合しないが、ｒＨＡが含まれるときにはｒＨＡ溶出液画分に存在する。意外なことには、本発明者らは、培養物上清にｒＨＡが含まれていると、ｒＨＡのクロマトグラフィ精製の際の幾つかの酵母タンパク質の挙動が有意に変化し、例えばイオン交換クロマトグラフィによってアルブミンから分離されることを示す物理化学的性質を有するタンパク質は、実際にｒＨＡ調製物を汚染し、除去が困難となることを見いだした。

本発明の一態様は、酵母を培養し、タンパク質を得ることを含んでなる、酵母から所望なタンパク質を製造する方法であって、酵母が熱ショックタンパク質１５０（Ｈｓｐ１５０）を欠くことを特徴とする方法を提供する。

これを達成する最も好都合な方法は、ゲノムに欠陥を有し、Ｈｓｐ１５０の産生量が減少するようになる酵母を作成することである。例えば、コード配列または調節領域（またはＨｓｐ１５０遺伝子の発現を調節するもう一つの遺伝子）に欠失、挿入または転位があり、Ｈｓｐ１５０タンパク質はほとんどまたは全く産生されないことがある。或いは、酵母を形質転換して、抗－Ｈｓｐ１５０抗体のような抗－Ｈｓｐ１５０剤を産生することができる。

ＨＳＰ１５０遺伝子を修飾して、供精製タンパク質の産生量(level)が減少するようにするため、部位特異的突然変異誘発または他の既知の技法を用いて、BoststeinおよびShortle、「イン・ビトロ突然変異誘発の方法および応用(Strategies and Applications of In Vitro Mutagenesis)」, Science,229:193-210(1985)に記載されているように置換、挿入、欠失および転位などの単一または多重突然変異ををを起こすことができ、上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される。好適な突然変異としては、終止(termination)突然変異（明らかに、３′末端付近に導入された終止コドンは遺伝子生成物を有益とするのに不十分な効果しか持たないことがあり、当業者であれば、例えばコード配列の５′の４分の３に突然変異を容易に起こすことができるであろう）、コード配列の大きな欠失に対して小さな読み取り枠を変更する点突然変異、ｍＲＮＡを不安定にする遺伝子発現および突然変異に影響するプロモーターまたはターミネーターの突然変異が挙げられる。幾つかの所望な点突然変異または特異的アミノ酸置換は、荷電分布を変化させることによってクロマトグラフィ挙動に影響を与えることがある。従って、産生したタンパク質は本来のＨｓｐ１５０のものと同様な一次アミノ酸配列を有するが、機能的には異なっており、所望なタンパク質と共に共精製されない。このような修飾タンパク質は、Ｈｓｐ１５０であるとは考えられない。特異的突然変異は、遺伝子トランスプレースメント（gene transplacement）として知られている遺伝子分断法（gene disruption technique)の拡張によって導入することができる(Winston,F.ら、(1983)Methods Enzymol.,101, 211-228）。

Ｈｓｐ１５０タンパク質に挿入される如何なるポリペプチドも、所望なタンパク質のリガンドとはならず、また生じるものであってはならない。当業者であれば、単純な結合分析法によってリガンドが用いられたかまたは創製されたかを容易に測定することができる。一般的には、遺伝子配列の分断には選択可能マーカーが用いられるが、特に分断現象を表現型によって検出することができる場合には、これはそうである必要はない。多くの場合に、介在配列の挿入は、停止コドンがＨｓｐ１５０配列と共にフレームに含まれており、挿入されたコード配列は翻訳されないようになる。或いは、挿入配列が、Ｈｓｐ１５０に

対する異なる読取り枠にあることがある。
遺伝子は、１以上の部分（場合によっては、調節領域、遺伝子全体までを含む）が切除または反転していることがあり、または挿入部分を有し、ＨＳＰ１５０座(locus)からタンパク質を産生しないかまたは所望なタンパク質と共精製されないＨＳＰ１５０座からタンパク質を産生することがある。
好ましくは、酵母は所望なタンパク質を分泌し、次にこれは発酵培地から精製される。精製は他のところで行うことができるので、Ｈｓｐ１５０タンパク質の濃度が低いかまたはゼロである所望なタンパク質を含む培地の生産は、それ自体が目的である。
２種類の異なるクロマトグラフィ分離法（その一方は所望のタンパク質のためのアフィニティクロマトグラフィである）の後にもタンパク質とＨｓｐ１５０とが会合しているとき、またはアフィニティクロマトグラフィを用いないとき、タンパク質が３種類の異なる段階（例えば、アニオン交換、カチオン交換およびゲル浸透段階）の後にも会合してるならば、タンパク質は、一般的にはＨｓｐ１５０と共精製されるとは考えられる。本質的には、所望なタンパク質の同一性は、自己定義されるものであり、所望なタンパク質が別の適当な精製工程の後に酵母タンパク質で汚染されることを当業者が分かるときには、この酵母タンパク質がＨｓｐ１５０であるかどうかを（以下に更に詳細に説明する既知の方法を用いて）決定することができ、若しそうであれば、本発明の酵母および方法を用いることができ、所望なタンパク質がＨｓｐ１５０で汚染されていなければ、本発明の必要はない。本発明者らは、本発明の方法が特にアルブミンおよびアルブミンと類似の物理化学的特性を有する他のタンパク質に適用可能であり、これらを同様のクロマトグラフィ法によって精製されることを見いだした。所望のタンパク質はヒトアルブミンであるのが好ましい。
ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）は、ヒト血清中に３５～４５ｇＬ$^{-1}$の濃度で含まれる５８５個のアミノ酸のタンパク質であり、総血清タンパク質の約６０％を表す。ＨＳＡは血清の浸透圧のかなりの部分に関与しており、内因性および外因性リガンドのキャリヤーとしても機能する。これは、臨床的には重傷の火傷、ショックまたは失血の患者の治療に用いられ、現在ではヒト血液から抽出によって商業生産されている。微生物での組換えヒトアルブミン（ｒＨＡ）の産生は、ＥＰ３３０　４５１号明細書およびＥＰ３６１　９９１号明細書に開示されている。
アルブミンは、正常なＨＳＡ／ｒＨＡの変異体であってもよい。「変異体」とは、保存性または非保存性の挿入、欠失および置換であって、これらの変化がアルブミンの腫脹性の(oncotic)有用なリガンド結合または非免疫原性特性を実質的に変化させないものを包含する。特に、ヒトアルブミンの天然に存在する多型変異体、ヒトアルブミンのフラグメント、例えばＥＰ３２２　０９４号明細書（すなわち、ＨＳＡ（１－ｎ）であり、ｎは３６９～４１９である）に開示されているもの、およびアルブミンと他のタンパク質との融合体、例えばＷＯ９０／１３６５３号明細書に開示されているものが挙げられる。
「保存性置換」とは、Ｇｌｙ、Ａｌａ；Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ；Ａｓｐ、Ｇｌｕ；Ａｓｎ、Ｇｌｎ；Ｓｅｒ、Ｔｈｒ；Ｌｙｓ、Ａｒｇ；およびＰｈｅ、Ｔｙｒのような基内での交換を意味する。
本発明の第二の主要な態様では、形質転換によりクロマトグラフィ法でＨｓｐ１５０と共精製される所望なタンパク質を発現する酵母であって、酵母がこのようなＨｓｐ１５０を欠いていることを特徴とする酵母が提供される。
形質転換した宿主細胞自身の他に、本発明は、栄養培地中でのこれらの細胞の培養物、好ましくはモノクローン性（クローン的に均質な）培養物、またはモノクローン性培養物から誘導される培養物をも意図する。
所望なタンパク質は、従来の方法で、例えば酵母染色体中または遊離プラスミド上に挿入されたコード配列から産生される。
酵母は、通常の方法のいずれか、例えばエレクトロポレーションで、所望なタンパク質のコード配列で形質転換される。酵母のエレクトロポレーションによる形質転換法は、Becker & Guarente, (1990), Methods Enzymol., 194, 182に開示されている。

目的通りに形質転換した細胞、すなわち本発明のＤＮＡ構築物を含む細胞は、周知の手法によって同定することができる。例えば、発現構築物の導入によって生じる細胞を成育して、所望のポリペプチドを生成させることができる。細胞を収穫して溶解し、そのＤＮＡ内容物を、Southern(1975), J. Mol. Biol., 98, 503またはBerentら、(1985), Biotech., 3, 208に記載されているような方法を用いてＤＮＡの存在について調べることができる。また、上清中のタンパク質の存在についても、抗体を用いて検出することができる。

有用な酵母プラスミドベクターとしては、ｐＲＳ４０３－４０６およびｐＲＳ４１３－４１６等が挙げられ、一般的にStratagene Cloning Systems、ラ・ヨラ、ＣＡ９２０８７、米国から発売されている。プラスミドｐＲＳ４０３、ｐＲＳ４０４、ｐＲＳ４０５およびｐＲＳ４０６は、酵母組み込み(Yeast Integrating)プラスミド（ＹＩｐｓ）であり、酵母に選択可能なマーカーＨＩＳ３、ＴＲＰ１、ＬＥＵ２およびＵＲＡ３を組み込む。プラスミドｐＲＳ４１３－４１６は、酵母動原体(Yeast Centromere)プラスミド（ＹＣｐｓ）である。

様々な方法が開発されて、ＤＮＡが相補性粘着末端を介してベクターに操作可能に結合されている。例えば、相補的ホモポリマー路(tracts)を、ベクターＤＮＡに挿入されるＤＮＡセグメントに加えることができる。このベクターとＤＮＡセグメントとを、次に相補的ホモポリマー尾部の間で水素結合によって結合して組換えＤＮＡ分子を形成する。

１以上の制限部位を有する合成リンカーにより、ＤＮＡセグメントをベクターに結合させるもう一つの方法が提供される。前に記載された方法によるエンドヌクレアーゼの制限消化によって生じたＤＮＡセグメントを、バクテリオファージＴ４　ＤＮＡポリメラーゼまたはE. coli ＤＮＡポリメラーゼＩであって、それらの３′－５′－エキソヌクレオチド分解活性で突出(protruding)３′-一本鎖末端を除去し、窪んだ(recessed)３′－末端に重合活性で満たす酵素で処理する。

従って、これらの活性を組合せることによって、平滑末端を有するＤＮＡセグメントが生成する。次に、平滑末端セグメントを、バクテリオファージＴ４　ＤＮＡリガーゼのような平滑末端を有するＤＮＡ分子の連結を触媒することができる酵素の存在下で大モル過剰量のリンカー分子と共にインキュベーションする。従って、反応の生成物は、その両末端にポリマーリンカー配列を有するＤＮＡセグメントである。次に、これらのＤＮＡセグメントを適当な制限酵素で開裂し、ＤＮＡセグメントの末端と適合する末端を生成する酵素で開裂した発現ベクターに連結する。

様々な制限エンドヌクレアーゼ部位を有する合成リンカーは、International Biotechnologies Inc., ニュー・ヘブン(New Haven)、ＣＮ、米国などの多くの供給元から市販されている。

本発明によりＤＮＡを修飾する所望な方法は、Saikiら(1988), Science, 239, 487-491によって開示されたポリメラーゼ連鎖反応を用いることである。この方法では、酵素的に増幅されるＤＮＡは、２種類の特異的オリゴヌクレオチドプライマーであってそれ自身増幅したＤＮＡに組み込まれるプライマーが隣接(flanked)する。この特異的プライマーは、制限エンドヌクレアーゼ認識部位であって当該技術分野で知られている方法を用いて発現ベクターにクローニングするのに用いることができる部位を含んでいてもよい。

Ｈｓｐ１５０タンパク質を産生する任意の酵母を、本発明に従って改質することができる。本発明の実施に有用であると思われる酵母の代表的属はPicha（Hansenula）、Saccharomyces、Kluyveromyces、Candida、Torulopsis、Torulaspora、Schizosaccharomyces、Citeromyces、Pachysolen、Debaromyces、Metschunikowia、Rhodosporidium、Leucosporidium、Botryoascus、Sporidiobolus、Endomycopsisなどである。好ましい属は、Saccharomyces、Schizosaccharomyces、Kluyveromyces、およびTorulasporaからなる群から選択されるものである。Saccharomyces spp.の例はS. cerevisiae、S. italicusおよびS. rouxiiである。Kluyveromyces spp.の例は、K. fragilis、K. lactisおよびK. marxianusである。好適なTorulaspora種は、T. delbrueckiiである。Pichia (Hansenula)spp.の例は、P. angusta（以前は、H. polymorpha)、P. anomala（以前は、H. anomala）、およびP. pastorisである。

ＨＳＰ１５０の同族体(homologues)は、広汎な種類の酵母属、例えばTorulaspora sp.、Kluyveromyces sp.、Schizosaccharomyces sp.およびZygosaccharomyces sp.に存在することが既に示されている(Russoら、１９９２年；Toh-eら、１９９３年）。また、本発明者らの研究により、Pichia sp.がＨＳＰ１５０の同族体を有することもサザンブロッティングによって示されている。

S. cerevisiaeの形質転換法は、総対的にはＥＰ２５１　７４４号明細書ＥＰ２５８　０６７号明細書およびＷＯ９０／０１０６３号明細書に教示されており、上記特許明細書の内容は、引用によって本明細書に含まれる。

S. cerevisiaeの好適なプロモーターとしては、ＰＧＫ１遺伝子、ＧＡＬ１またはＧＡＬ１０遺伝子、ＣＹＣ１、ＰＨＯ５、ＴＲＰ１、ＡＤＨ１、ＡＤＨ２、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、グルコキナーゼ、α－交配因子(mating factor）フェロモン、ａ－交配因子フェロモン用の遺伝子と結合したプロモーター、ＰＲＢ１プロモーター、ＧＵＴ２プロモーター、ＧＰＤ１プロモーター、および５′調節領域の部分と他のプロモーター５′調節領域の部分または上流活性化部位（例えば、ＥＰ－Ａ－２５８　０６７号明細書のプロモーター）とのハイブリッドを伴うハイブリッドプロモーターが挙げられる。

Schizosaccharomyces pombeで用いられる好都合な調節可能なプロモーターはMaundrell（1990）J. Biol. Chem. 265, 10857-10864によって記載されたｎｍｔ遺伝子からのチアミン－抑制性プロモーター、およびHoffmanおよびWinston（1990）Genetics 124, 807-816によって記載されたグルコース抑制性ｆｂｐ１遺伝子プロモーターである。

外来遺伝子の発現のためのPichiaの形質転換の方法は、例えばCreggら（１９９３年）および各種のPhilipsの特許公報（例えば、米国特許第４，８５７，４６７号明細書であり、この特許明細書の内容は、引用によって本明細書に含まれる）に教示されており、Pichiaの発現キットはInvitrogen BV、レーク(Leek)、オランダ、およびInvitrogen Corp.、サンジエゴ、カリフォルニアから発売されている。好適なプロモーターとしては、ＡＯＸ１およびＡＯＸ２が挙げられる。

上記のGellissenら（１９９２年）の文献およびGleesonら、（1986）J. Gen. Microbiol. 132, 3459-3465には、Hansenulaベクターおよび形質転換に関する情報および好適なプロモーターはＭＯＸ１およびＦＭＤ１であることが記載されており、Fleerら（１９９１年）のＥＰ３６１　９９１号明細書およびRhone-Poulenc Rorerからの他の公表物には、Kluyveromyces spp.での外来タンパク質の発現法と好適なプロモーターがＰＧＫ１であることが教示されている。

転写終止シグナルは、好ましくは転写終止およびポリアデニル化に適正なシグナルを含む真核性遺伝子の３′フランキング配列である。好適な３′フランキング配列は、例えば用いられる発現制御配列に自然に結合した遺伝子の配列であることができ、すなわちプロモーターに相当することができる。また、これらは異なっていてもよく、その場合にはS.cerevisiaeＡＤＨ１遺伝子の終止シグナルが好ましい。

所望のタンパク質は、最初に分泌リーダー配列で発現されてもよく、これは選択された酵母で有効な任意のリーダーであってもよい。S. cerevisiaeで有用なリーダーとしては、ＥＰ－Ａ－３８７　３１９号明細書の交配因子αポリペプチド（ＭＦα－１）およびハイブリッドリーダーからのものが挙げられる。このようなリーダー（またはシグナル）は酵母によって折断された後、成熟アルブミンが周囲の培地に放出される。更に、このようなリーダーとしては、ＪＰ６２－０９６０８６号明細書（９１／０３６５１６号として許可）に開示されたS. cerevisiaeインベルターゼ（ＳＵＣ２）、酸ホスファターゼ（ＰＨＯ５）、ＭＦα－１の前配列(presequence）、β－グルカナーゼ（ＢＧＬ２）およびキラー毒素；S. diastaticusグルコアミラーゼII;S. carlsbergensisα－ガラクトシダーゼ（ＭＥＬ１）；K. lactisキラー毒素；およびCandidaグルコアミラーゼのものが挙げられる。

発明の詳細な説明

本発明の好ましい態様を、添付図面に関連して更に詳細に説明する。

第１図は、酵母菌株（ＤＢＵ３）を形質転換し、ＨＳＰ１５０遺伝子を分断するのに用いられるＥｃｏＲＩ　ＨＳＰ１５０－ＵＲＡ３－ＨＳＰ１５０フラグメントの調製を示す工程図である（実施例１）。
第２図は、ＨＳＰ１５０コード配列全体を除去するのに用いられる更なるＥｃｏＲＩフラグメントの調製を示す工程図である（実施例２）。
総ての標準的組換えＤＮＡ順は、特に断らない限りSambrookら（１９８９年）に記載されている通りである。ｒＨＡをコードするＤＮＡ配列は、ＥＰ２０１　２３９号明細書に開示されているｃＤＮＡから誘導される。

実施例１

ＨＳＰ１５０遺伝子を、遺伝子分断(gene disruption)の方法（Rothstein、１９８３年）によって突然変異を行い、ＨＳＰ１５０コード配列の一部を効果的に欠失させることにより、Ｈｓｐ１５０の産生を防止した。
ＨＳＰ１５０遺伝子（Russoら、１９９２年）の５′および３′末端のＰＣＲ増幅に適する４種類のオリゴヌクレオチドを、Applied Biosystems 380B Oligonucleotide Synthesizerを用いて合成した。

5′ 末端

LRE45: 5′-CTATTTCCTATTTCGGGAATTCTTAAAGACAAAAAAGCTC-3′

LRE46: 5′-GGCTGTGGTGCTGCAGATGATGCGCTGG-3′

3′ 末端

LRE47: 5′-GCTACTTCCGCTTCTGCAGCCGCTACCTCC-3′

LRE48: 5′-GCCGTGTAGCGAGGGAATTCTGTGGTCACGATCACTCG-3′

ＬＲＥ４５およびＬＲＥ４８にはＨＳＰ１５０遺伝子配列の変化が含まれており、ＨＳＰ１５０遺伝子ＰＣＲ生成物の５′または３′末端にＥｃｏＲＩ部位を導入するようになっていることに留意されたい。ＬＲＥ４６およびＬＲＥ４７は、いずれもＨＳＰ１５０遺伝子配列（ＳＥＱ１）に天然に含まれているＰｓｔＩ部位を含んでいる。
ＰＣＲを行い、S. cerevisiaeゲノムＤＮＡ由来のＤＮＡ（Clontech Labotatories,Inc.）から、それぞれＬＲＥ４５およびＬＲＥ４６またはＬＲＥ４７およびＬＲＥ４８を用いてＨＳＰ１５０遺伝子の５′および３′末端を個々に増幅した。
条件は、下記の通りであった。１μｇ／ｍｌゲノムＤＮＡ、各プライマー約１．２×10^{-10}モル、９４℃で６１秒間変性、３７℃で１２１秒間アニーリング、７２℃で１８１秒間３０サイクルでＤＮＡ合成、各サイクルの後ＤＮＡ合成段階まで１０秒間延長、次いで４℃で含浸。ＰＣＲは、Perkin - ELmer - Cetus Thermalサイクラー(cycler)を用いて行い、Perkin-Elemer-Cetus PCRキットを製造業者の推薦に従って用いた。ＰＣＲ生成物はゲル電気泳動によって分析し、予想した大きさのものであることを見いだした。それぞれのＰＣＲ生成物をＥｃｏＲＩおよびＰｓｔＩで消化し、ＥｃｏＲＩ／ＰｓｔＩで消化したｐＵＣ１９（Yanisch-Perronら、１９８５年）にクローニングして、ｐＡＹＥ５０３（ＨＳＰ１５０遺伝子の５′末端を含む）およびｐＡＹＥ５０４（ＨＳＰ１５０遺伝子の３′末端を含む）を形成した（第１図を参照されたい）。
プラスミドＤＮＡの配列決定をｐＡＹＥ５０３およびｐＡＹＥ５０４について行い、インサートが所望の配列であることを確認した。ｐＡＹＥ５０３およびｐＡＹＥ５０４をＥｃｏＲＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化し、ＨＳＰ１５０遺伝子フラグメントを単離して、一緒にｐＵＣ１９ＸＨ（ポリリンカー中にＨｉｎｄＩＩＩ部位を欠くｐＵＣ１９の誘導体）にクローニングしてｐＡＹＥ５０５を形成した。ＵＲＡ３遺伝子をＹＥｐ２４（Botsteinら、１９７９年）からＨｉｎｄＩＩＩフラグメントとして単離し、ｐＡＹＥ５０５のＨｉｎｄＩＩＩ部位にクローニングしてｐＡＹＥ５０６を形成した（第１図）。ｐＡＹＥ５０６は、ＨＳＰ１５０遺伝子の５′および３′領域が隣接した(flanked)選択可能なマーカ

ー（ＵＲＡ３）を含む。
ＨＳＰ１５０を産生する能力を欠いている菌株を構築するため、ＤＢ１　ｃｉｒ°　ｐＡＹＥ３１６(Sleepら、１９９１年）のｕｒａ３誘導体をランダム化学的突然変異誘発および５－フルオロ－オロチン酸に対する耐性の選択によって得た（Boekeら、１９８７年）。プラスミドｐＡＹＥ３１６は２μｍのプラスミドを基にしており、酵母ＰＲＢ１プロモーターの制御下でヒトアルブミンのコード配列をＡＤＨ１ターミネーターおよびＬＥＵ２選択可能マーカーと共に含む。
この菌株を１００ｍｌの緩衝した最小培地（Yeast Nitrogen Base［アミノ酸なし、硫酸アンモニウムなし、Difco］、（NH_4）$_2$ SO_4 ５ｇ／リットル、クエン酸一水和物６．０９ｇ／リットル、$NaHPO_4$ ２０．１６ｇ／リットル、スクロース２０ｇ／リットル、ｐＨ６．５）で一晩成育させ、細胞を遠心分離によって集めた後、滅菌水で１回洗浄した。次いで、細胞を１０ｍｌの滅菌水に再懸濁させ、２ｍｌのアリクウォットを別の１５ｍｌFalcon試験管に入れた。次に、Ｎ－メチル－Ｎ′－ニトロ－Ｎ－ニトロソグアニジン（ＮＴＧ）の５ｍｇ／ｍｌ溶液をこの試験管に下記のように加えた。０μｌ、２０μｌ、４０μｌ、８０μｌまたは１６０μｌ。次に、細胞を３０℃で２０分間インキュベーションした後、遠心分離し、滅菌水で３回洗浄した。最後に、細胞をＹＥＰ（１％（ｗ／ｖ）酵母抽出物、２％（ｗ／ｖ）Bactoペプトン）１ｍｌに再懸濁して、４℃で保存した。
突然変異誘発処理の後に生き残った細胞の割合を、試料の希釈物を２％（ｗ／ｖ）スクロースを含むＹＥＰプレートに広げて３０℃で３日間インキュベーションすることによって測定した。約５０％の生存率となった処理からの細胞を２％（ｗ／ｖ）スクロースを含むＹＥＰプレート上で成育した後、２％（ｗ／ｖ）スクロースを含み、５－フルオロ－オロチン酸（１ｍｇ／ｍｌ）およびウラシル（５０μｇ／ｍｌ）を補足したＹＮＢ最小培地上にレプリカ平板法を行った。この培地で成育することができるコロニーを精製し、これらがウラシル補足の非存在下で成育できないこと、およびこの欠点は形質転換によってＵＲＡ３遺伝子を導入することによって補正することができることを試験によって明らかにした。
ｕｒａ３株であるＤＢＵ３　ｃｉｒ°（ｐＡＹＥ３１６）をＥｃｏＲＩで消化したｐＡＹＥ５０６で形質転換して、Ura^+ 形質転換体を選択した。これらの形質転換体でのＨＳＰ１５０遺伝子の分断は、ＨＳＰ１５０遺伝子の５′および３′末端を含んでなるフラグメント（ｐＡＹＥ５０５からのＥｃｏＲＩフラグメント）をプローブとして用いるサザンブロット分析によって確かめた。
次に、酵母を、発酵槽で最小培地中のフェッドバッチ培養によって高細胞密度まで成育した（Collins、１９９０年）。簡単に説明すれば、１０リットルの作業容積を有する発酵槽に、濃縮塩混合物（第１表）５０ｍｌ／リットル、微量元素溶液（第２表）１０ｍｌ／リットル、ビタミン混合物（第３表）５０ｍｌ／リットル、およびスクロース２０ｇ／リットルを含む初期バッチ培地を５リットルまで満たした。その塩混合物１００ｍｌ／リットル、微量元素混合物２０ｍｌ／リットル、ビタミン溶液１００ｍｌ／リットル、およびスクロース５００ｇ／リットルを含む供給培地の等容を計量ポンプによって発酵槽に接続された別の溜め(reservoir)で保持した。水酸化アンモニウムまたは硫酸を自動添加することによって、ｐＨを５．７±０．２に保持し、温度を３０℃に保持した。攪拌速度を調節して、溶存酸素圧力(tension)を１ｖ／ｖ／分の空気流速で＞２０％空気飽和度とした。

第１表　塩混合物

化合物	濃度（ｇ／リットル）
KH_2PO_4	１１４．０
$MgSO_4$	１２．０
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	３．０
Na_2EDTA	２．０

第２表　微量元素溶液

化合物	濃度（ｇ／リットル）
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	３．０
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	１０．０
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	３．２
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	０．０７９
H_3BO_3	１．５
KI	０．２
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	０．５
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	０．５６
H_3PO_4	７５ｍｌ／リットル

第３表　ビタミン溶液

化合物	濃度（ｇ／リットル）
パントテン酸Ｃａ	１．６
ニコチン酸	１．２
ｍ－イノシトール	１２．８
チアミンＨＣｌ	０．３２
ピリドキシンＨＣｌ	０．８
ビオチン	０．００８

発酵槽に、緩衝した最小培地(Yeast Nitrogen Base［アミノ酸なし、硫酸アンモニウムなし、Difco］１．７ｇ／リットル、$(NH_4)_2SO_4$ ５ｇ／リットル、クエン酸一水和物６．０９ｇ／リットル、Na_2HPO_4 ２０．１６ｇ／リットル、スクロース２０ｇ／リットル、ｐＨ６．５）中で成育したS.cerevisiaeの一晩培養したもの１００ｍｌを接種した。初期バッチ発酵は炭素源が消費されてしまうまで進行し、この時点で計量ポンプのスイッチを入れ、原料(feed)の添加をWangら（１９７９年）によって開発されたものに基

づいたアルゴリズムを用いてコンピューター制御した（マイクロMFCSシステム、B. Braun、メルズンゲン(Melsungen)、ドイツ国）。マススペクトロメーターをコンピューター制御系と共に用いて、発酵による排出ガスを監視し、原料の添加を制御して設定した成育速度（例えば、０．１時$^{-1}$）を保持した。炭素基質のバイオマスへの最大転化は、呼吸係数を１．２未満に保持することによって達成され（Collins、１９９０年）、この手段により約１００ｇ／リットル細胞乾燥重量の細胞密度を達成することができる。

発酵ブロスを遠心分離して細胞を除いた後、下記のようにしてアフィニティクロマトグラフィによる精製を行った。培養上清をCibacron Blue F3GA Sepharoseカラム(Pharmacia)を通過させ、次に、これを０．１Mリン酸グリシン緩衝液、ｐＨ８．０で洗浄した。次に、ｒＨＡを2Ｍ　ＮａＣｌ、０．１Ｍ　リン酸グリシン、ｐＨ８．０でカラムから溶出した。或いは、アルブミンは、血清または発酵培地、例えばＷＯ９２／０４３６７号明細書、Maurelら（１９８９年）、Curling（１９８０年）、およびＥＰ５２４　６８１号明細書に開示されているものからアルブミンを精製するための各種の既知の手法のいずれかによって、培地から精製することもできる。

Ｈｓｐ１５０から精製したｒＨＡの分析では、ＨＳＰ１５０タンパク質はこれらの試料に含まれることが明らかになった。ＨＳＰ１５０タンパク質は、ＥＬＩＳＡまたはウェスターンブロッティングのような従来技術を用いて測定した。

抗ＨＳＰ１５０抗体はRussoら(1992) Proc. Nat.Acad. Sci.(USA) 89, 3671-3675に開示されている。

実施例２

ＨＳＰ１５０タンパク質コード配列を、下記のようにしてクローニングしたＨＳＰ１５０配列の別のフラグメントを用いて欠失させた。

ＹＥｐ２４からのＵＲＡ３ＨｉｎｄＩＩＩフラグメント（実施例１を参照されたい）をＨｉｎｄＩＩＩでｐＩＣ１９Ｒ(Marsh J.L. ら、（1984）Gene 32,481-485)にクローニングしてｐＡＹＥ６０１を形成した後、ＳａｌＩ／ＣｌａＩフラグメントとして切り取り、ＸｈｏＩおよびＣｌａＩ部位でｐＡＹＥ５０５へ挿入してｐＡＹＥ６０２を形成した（第２図）。このプラスミドをＥｃｏＲＩで消化した後、これを用いてＵｒａ$^{+}$形質転換体に対して選択するＤＢＵ３　ｃｉｒ°（ｐＡＹＥ３１６）を形質転換した。これらの形質転換体でのＨＳＰ１５０遺伝子の分裂は、実施例１に記載されているサザンブロット分析によって確認した。

従って、この実施例では、ＨＳＰ１５０コード配列の全体が除去されるが、実施例１では、配列が分断されて非機能的タンパク質を生成する。

実施例３

サザンブロッティングにより、Hansenula polymorpha（現在はpichia angustaと呼ばれる）でのＨｓｐ１５０同族体を示した。P. angusta遺伝子は、実施例１および２と同様の方法によって機能的に欠失される。

文献

Boeke, J.D. ら(1987) Methods Enzymol. 154, 164-175.

Botstein, D.ら(1979) Gene 8, 17-24.

Collins, S.H.(1990)、バイオテクノロジーによるタンパク質の製造(Protein Production by Biotechnology) (Harris, T.J.R. 監修) 中、 pp 61-77, Elsevier,バーキング, エセックス。

Curling (1980)「イオン交換クロマトグラフィによるアルブミンの精製(Albumin Purification by Ion Exchange Chromatography)」、「血漿タンパク質の精製法(Methods of Plasma Protein Purification)」中、Curling, J.M. 監修、Academic Press, ロンドン。

Fleer, R. ら(1991) Bio/Technology 9, 968-975.

Maurelら(1989)「血漿タンパク質のバイオテクノロジー(Biotechnology of Plasma Proteins)」, Colloque INSERM 175, 19-24.

Romanos, M. ら(1992) Yeast 8, 423-488.

Rothstein, R.J. (1983) Methods Enzymol. 101, 202-211.

Russo, P. ら (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 3671-3675.

Sambrook, J.ら(1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual,第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press,コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク。

Sleep, D. ら (1991) Bio/Technology 9, 183-187.

Toh-e ら (1993) Yeast 9, 481-494.

Wang, H.Y.ら (1979) Biotechnology & Bioeng. 21, 975.

Yanisch-Perron, C.ら (1985) Gene 33, 103-119.

配列表

(1) 一般的情報

(i) 出願人

(A) 名称：Delta Biotechnology Limited

(B) 街名：Castle Court, Castle Boulevard

(C) 市名：ノッティンガム

(E) 国名：英国

(F) 郵便コード(ZIP):NG7 IFD

(ii) 発明の名称：酵母菌株
(iii) 配列の数：６
(iv) コンピューターにより読み込み可能な形態：
(A) 媒体の型：フロッピーディスク
(B) コンピューター：IBM PC compatible
(C) オペレーティングシステム：PC-DOS/MS-DOS
(D) ソフトウェア：PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)
(vi) 先行出願資料：
(A) 出願番号：GB 9411356.0
(B) 出願日：１９９４年６月７日
(2) 配列番号：１についての情報：
(i) 配列の特性：
(A) 長さ：４０塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：ｃＤＮＡ
(iii) ハイポセティカル配列：Ｎｏ
(ix) 配列の特徴：
(A) 特徴を表わす記号：misc feature
(B) 存在位置：1..40
(D) 他の情報：注＝「Ｈｓｐ１５０遺伝子の５′末端のＰＣＲ増幅のためのオリゴヌクレオチド」
(xi) 配列：配列番号：１：
CTATTTCCTA TTTCGGGAAT TCTTAAAGAC AAAAAAGCTC
40
(2) 配列番号：２についての情報：
(i) 配列の特性：
(A) 長さ：２８塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：ｃＤＮＡ
(iii) ハイポセティカル配列：Ｎｏ
(ix) 配列の特徴：
(A) 特徴を表わす記号：misc feature
(B) 存在位置：1..28
(D) 他の情報：注＝「Ｈｓｐ１５０遺伝子の５′末端のＰＣＲ増幅のためのオリゴヌクレオチド」
(xi) 配列：配列番号：２：
GGCTGTGGTG CTGCAGATGA TGCGCTGG
28
(2) 配列番号：３についての情報：
(i) 配列の特性：
(A) 長さ：３０塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：ｃＤＮＡ
(iii) ハイポセティカル配列：Ｎｏ

(ix) 配列の特徴：
(A) 特徴を表わす記号：misc feature
(B) 存在位置：1..30
(D) 他の情報：注＝「Ｈｓｐ１５０遺伝子の３′末端のＰＣＲ増幅のためのオリゴヌクレオチド」
(xi) 配列：配列番号：３：
GCTACTTCCG CTTCTGCAGC CGCTACCTCC
30
(2) 配列番号：４についての情報：
(i) 配列の特性：
(A) 長さ：３８塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：ｃＤＮＡ
(iii) ハイポセティカル配列：Ｎｏ
(ix) 配列の特徴：
(A) 特徴を表わす記号：misc feature
(B) 存在位置：1..38
(D) 他の情報：注＝「Ｈｓｐ１５０遺伝子の３′末端のＰＣＲ増幅のためのオリゴヌクレオチド」
(xi) 配列：配列番号：４：
GCCGTGTAGC GAGGGAATTC TGTGGTCACG ATCACTCG
38
(2) 配列番号：５についての情報：
(i) 配列の特性：
(A) 長さ：２０４８塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：ＤＮＡ(genomic)
(iii) ハイポセティカル配列：Ｎｏ
(vi) 起源：
(A) 生物名：Saccharomyces cerevisiae
(ix) 配列の特徴：
(A) 特徴を表わす／記号：CDS
(B) 存在位置：397..1638
(xi) 配列：配列番号：５：

AGTGATCTTA CTATTTCCTA TTTCGGAAAT TATTAAAGAC
AAAAAAGCTC ATTAATGGCT 60

TTCCGTCTGT AGTGATAAGT CGCCAACTCA GCCTAATTTT
TCATTTCTTT ACCAGATCAG 120

GAAAACTAAT AGTACAAATG AGTGTTTTCT CAAGCGGAAC
ACCACATTTT GAGCTAAATT 180

TAGATTTTGG TCAAAATAAG AAAGATCCTA AAAAAGGAAT
GGTTGGTGAA AAATTTATTA 240

GCTTGAATGG TAGGAATCCT CGAGATATAA AAGGAACACT
TGAAGTCTAA CGACAATCAA 300

TTTCGATTAT GTCCTTCCTT TTACCTCAAA GCTCAAAAAA
ATATCAATAA GAAACTCATA 360

TTCCTTTTCT AACCCTAGTA CAATAATAAT AATATA ATG CAA
TAC AAA AAG ACT 414
Met Gln Tyr Lys Lys Thr
1 5

TTG GTT GCC TCT GCT TTG GCC GCT ACT ACA TTG GCC GCC
TAT GCT CCA 462
Leu Val Ala Ser Ala Leu Ala Ala Thr Thr Leu Ala Ala Tyr Ala Pro
10 15 20

TCT GAG CCT TGG TCC ACT TTG ACT CCA ACA GCC ACT TAC
AGC GGT GGT 510

Ser Glu Pro Trp Ser Thr Leu Thr Pro Thr Ala Thr Tyr Ser Gly Gly
25 30 35

GTT ACC GAC TAC GCT TCC ACC TTC GGT ATT GCC GTT CAA
CCA ATC TCC 558
Val Thr Asp Tyr Ala Ser Thr Phe Gly Ile Ala Val Gln Pro Ile Ser
40 45 50

ACT ACA TCC AGC GCA TCA TCT GCA GCC ACC ACA GCC TCA
TCT AAG GCC 606
Thr Thr Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ala Thr Thr Ala Ser Ser Lys Ala
55 60 65 70

AAG AGA GCT GCT TCC CAA ATT GGT GAT GGT CAA GTC CAA
GCT GCT ACC 654
Lys Arg Ala Ala Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Val Gln Ala Ala Thr
75 80 85

ACT ACT GCT TCT GTC TCT ACC AAG AGT ACC GCT GCC GCC
GTT TCT CAG 702
Thr Thr Ala Ser Val Ser Thr Lys Ser Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln
90 95 100

ATC GGT GAT GGT CAA ATC CAA GCT ACT ACT AAG ACT ACC
GCT GCT GCT 750
Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Ala Ala Ala
105 110 115

GTC TCT CAA ATT GGT GAT GGT CAA ATT CAA GCT ACC ACC
AAG ACT ACC 798
Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr
120 125 130

TCT GCT AAG ACT ACC GCC GCT GCC GTT TCT CAA ATC AGT
GAT GGT CAA 846
Ser Ala Lys Thr Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Ser Asp Gly Gln
135 140 145 150

ATC CAA GCT ACC ACC ACT ACT TTA GCC CCA AAG AGC ACC
GCT GCT GCC 894
Ile Gln Ala Thr Thr Thr Thr Leu Aia Pro Lys Ser Thr Ala Ala Ala
155 160 165

GTT TCT CAA ATC GGT GAT GGT CAA GTT CAA GCT ACC ACC

ACT ACT TTA 942
Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Val Gln Ala Thr Thr Thr Thr Leu
170 175 180

GCC CCA AAG AGC ACC GCT GCT GCC GTT TCT CAA ATC GGT
GAT GGT CAA 990
Ala Pro Lys Ser Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln
185 190 195

GTT CAA GCT ACT ACT AAG ACT ACC GCT GCT GCT GTC TTT
CAA ATT GGT 1038
Val Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Ala Ala Ala Val Phe Gln Ile Gly
200 205 210

GAT GGT CAA GTT CTT GCT ACC ACC AAG ACT ACT CGT GCC
GCC GTT TCT 1086
Asp Gly Gln Val Leu Ala Thr Thr Lys Thr Thr Arg Ala Ala Val Ser
215 220 225 230

CAA ATC GGT GAT GGT CAA GTT CAA GCT ACT ACC AAG ACT
ACC GCT GCT 1134
Gln Ile Gly Asp Gly Gln Val Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Ala Ala
235 240 245

GCT GTC TCT CAA ATC GGT GAT GGT CAA GTT CAA GCA ACT
ACC AAA ACC 1182
Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Val Gln Ala Thr Thr Lys Thr
250 255 260

ACT GCC GCA GCT GTT TCC CAA ATT ACT GAC GGT CAA GTT
CAA GCC ACT 1230
Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Thr Asp Gly Gln Val Gln Ala Thr
265 270 275

ACA AAA ACC ACT CAA GCA GCC AGC CAA GTA AGC GAT GGC
CAA GTC CAA 1278
Thr Lys Thr Thr Gln Ala Ala Ser Gln Val Ser Asp Gly Gln Val Gln
280 285 290

GCT ACT ACT GCT ACT TCC GCT TCT GCA GCC GCT ACC TCC
ACT GAC CCA 1326
Ala Thr Thr Ala Thr Ser Ala Ser Ala Ala Ala Thr Ser Thr Asp Pro
295 300 305 310

GTC GAT GCT GTC TCC TGT AAG ACT TCT GGT ACC TTA GAA
ATG AAC TTA 1374
Val Asp Ala Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Thr Leu Glu Met Asn Leu
315 320 325

AAG GGC GGT ATC TTA ACT GAC GGT AAG GGT AGA ATT GGT
TCT ATT GTT 1422
Lys Gly Gly Ile Leu Thr Asp Gly Lys Gly Arg Ile Gly Ser Ile Val
330 335 340

GCT AAC AGA CAA TTC CAA TTT GAC GGT CCA CCA CCA CAA
GCT GGT GCC 1470
Ala Asn Arg Gln Phe Gln Phe Asp Gly Pro Pro Pro Gln Ala Gly Ala
345 350 355

ATC TAC GCT GCT GGT TGG TCT ATA ACT CCA GAC GGT AAC
TTG GCT ATT 1518
Ile Tyr Ala Ala Gly Trp Ser Ile Thr Pro Asp Gly Asn Leu Ala Ile
360 365 370

GGT GAC AAT GAT GTC TTC TAC CAA TGT TTG TCC GGT ACT
TTC TAC AAC 1566
Gly Asp Asn Asp Val Phe Tyr Gln Cys Leu Ser Gly Thr Phe Tyr Asn
375 380 385 390

TTG TAC GAC GAA CAC ATT GGT AGT CAA TGT ACT CCA GTC
CAC TTG GAA 1614
Leu Tyr Asp Glu His Ile Gly Ser Gln Cys Thr Pro Val His Leu Glu
395 400 405

GCT ATC GAT TTG ATA GAC TGT TAAGCAGAAA ACTATTAGTT
CTTTTATCCT 1665
Ala Ile Asp Leu Ile Asp Cys
410

GATGACTTTT TCTCATTTGC ATTGATTAGA AAGGAAAAAA
AGAAGTGTCC TTTTCTACTA 1725

CTACTCTAGT CGCATCCATT CCTTTGCATT TATCTTTTCT
GCGGTTGGCC AATCCATTCT 1785

TCCGAGAATT TGGCTAGCCA TACTTGATGT TTTCCCATTA
TTGGTTCGTT TGGCAATGCT 1845

AATTTTCTTA ATTGCCCCTT ATATACTCTT CCATAAAATG
TTTTTTTTAT AACTAATTTT 1905

CTGTATATCA TTATCTAATA ATCTTATAAA ATGTTAAAAA
GACTTGGAAA GCAACGAGTG 1965

ATCGTGACCA CATAATTGCC TCGCTACACG GCAAAAATAA
GCCAGTCCTA ATGTGTATAT 2025

TAAAGGCTGC ATGTGGCTAC GTC
2048

(2) 配列番号：６についての情報：
(i) 配列の特性：
(A) 長さ：４１３アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：６：

Met Gln Tyr Lys Lys Thr Leu Val Ala Ser Ala Leu Ala Ala Thr Thr
1 5 10 15

Leu Ala Ala Tyr Ala Pro Ser Glu Pro Trp Ser Thr Leu Thr Pro Thr
20 25 30

Ala Thr Tyr Ser Gly Gly Val Thr Asp Tyr Ala Ser Thr Phe Gly Ile
35 40 45

Ala Val Gln Pro Ile Ser Thr Thr Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ala Thr
50 55 60

Thr Ala Ser Ser Lys Ala Lys Arg Ala Ala Ser Gln Ile Gly Asp Gly
65 70 75 80

Gln Val Gln Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ser Val Ser Thr Lys Ser Thr
85 90 95

Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln Ala Thr Thr
100 105 110

Lys Thr Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln
115 120 125

Ala Thr Thr Lys Thr Thr Ser Ala Lys Thr Thr Ala Ala Ala Val Ser
130 135 140

Gln Ile Ser Asp Gly Gln Ile Gln Ala Thr Thr Thr Thr Leu Ala Pro
145 150 155 160

Lys Ser Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Val Gln
165 170 175

Ala Thr Thr Thr Thr Leu Ala Pro Lys Ser Thr Ala Ala Ala Val Ser
180 185 190

Gln Ile Gly Asp Gly Gln Val Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Ala Ala
195 200 205

Ala Val Phe Gln Ile Gly Asp Gly Gln Val Leu Ala Thr Thr Lys Thr
210 215 220

Thr Arg Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Val Gln Ala Thr
225 230 235 240

Thr Lys Thr Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Val
245 250 255

Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Thr Asp
260 265 270

Gly Gln Val Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Gln Ala Ala Ser Gln Val
275 280 285

Ser Asp Gly Gln Val Gln Ala Thr Thr Ala Thr Ser Ala Ser Ala Ala
290 295 300

Ala Thr Ser Thr Asp Pro Val Asp Ala Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly
305 310 315 320

Thr Leu Glu Met Asn Leu Lys Gly Gly Ile Leu Thr Asp Gly Lys Gly
325 330 335

Arg Ile Gly Ser Ile Val Ala Asn Arg Gln Phe Gln Phe Asp Gly Pro
340 345 350

Pro Pro Gln Ala Gly Ala Ile Tyr Ala Ala Gly Trp Ser Ile Thr Pro
355 360 365

Asp Gly Asn Leu Ala Ile Gly Asp Asn Asp Val Phe Tyr Gln Cys Leu
370 375 380

Ser Gly Thr Phe Tyr Asn Leu Tyr Asp Glu His Ile Gly Ser Gln Cys
385 390 395 400

Thr Pro Val His Leu Glu Ala Ile Asp Leu Ile Asp Cys
405 410

【図１】

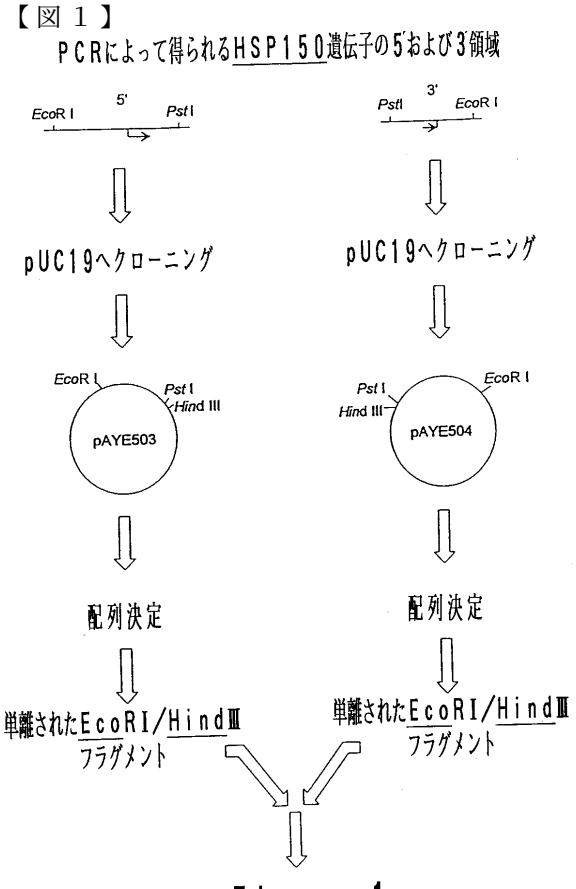
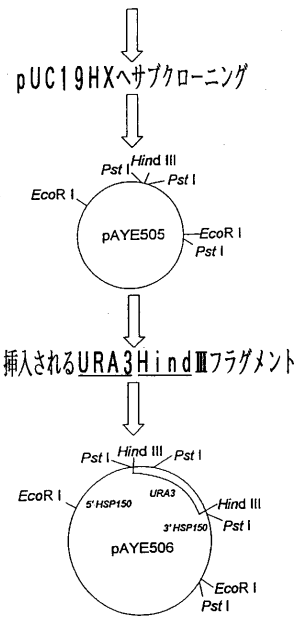
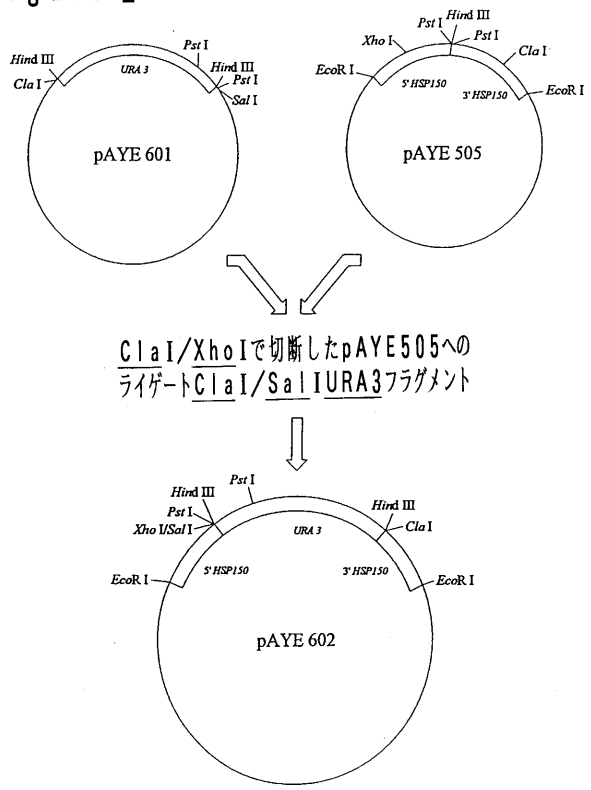


Figure 1

Figure 1 cont'd



【図２】
Figure 2


Hind III
Pst I
Cla I
URA 3
Hind III
Pst I
Sal I
pAYE 601
Pst I
Hind III
Xho I
Pst I
Cla I
EcoR I
5' HSP150
3' HSP150
EcoR I
pAYE 505
ClaI/XhoIで切断したpAYE505へのライゲートClaI/SalIURA3フラグメント
Pst I
Hind III
Pst I
Xho I/Sal I
URA 3
Hind III
Cla I
EcoR I
5' HSP150
3' HSP150
EcoR I
pAYE 602

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI
(C12P 21/02	C12P 21/02
C12R 1:865)	C12R 1:865

(72)発明者 ウッド, パトリシア キャロル
イギリス国ノッティンガム、キャッスル、ブールバード、キャッスル、コート （番地なし） デルタ、バイオテクノロジー、リミテッド内
(72)発明者 クワーク, アラン ビクター
イギリス国ノッティンガム、キャッスル、ブールバード、キャッスル、コート （番地なし） デルタ、バイオテクノロジー、リミテッド内

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第９３／０１８１６７（WO, A1）
Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,Vol.89,No.9(1992)p.3671-3675
Yeast,Vol.9,No.5(1993)p.481-494
Mol.Gen.Genet.,Vol.239,No.1-2(1993)p.273-280
Bio/Technology,Vol.8(1990)p.42-46

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq