

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5647009号
(P5647009)

(45) 発行日 平成26年12月24日(2014.12.24)

(24) 登録日 平成26年11月14日(2014.11.14)

(51) Int.Cl.

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

F 1

C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 13 (全 33 頁)

(21) 出願番号	特願2010-549653 (P2010-549653)	(73) 特許権者	512212195
(86) (22) 出願日	平成21年3月3日(2009.3.3)		アッヴィ・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2011-512841 (P2011-512841A)		アメリカ合衆国、イリノイ・60064、
(43) 公表日	平成23年4月28日(2011.4.28)		ノース・シカゴ、ノース・ワウキガン・ロ
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/001351		ード・1
(87) 国際公開番号	W02009/114093	(74) 代理人	110001173
(87) 国際公開日	平成21年9月17日(2009.9.17)		特許業務法人川口国際特許事務所
審査請求日	平成24年3月1日(2012.3.1)	(72) 発明者	シエ, チヨンミン
(31) 優先権主張番号	61/067, 910		アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02
(32) 優先日	平成20年3月3日(2008.3.3)		459、ニュートン、オールド・フォート
(33) 優先権主張国	米国 (US)		・ロード・22
		(72) 発明者	ベルク, ジョナサン・ピー
			アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01
			564、スターリング、ビーマン・ロード
			・89

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵母を形質転換するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

0.01 から 1.0 M の酢酸リチウム (LiAc) 及び 1 から 100 mM のジチオスレイトール (DTT) を含む溶液中で、酵母細胞を温置する段階、

ベクター DNA、挿入 DNA、酵母細胞、0.1 から 10 M のソルビトール及び 0.1 から 10 mM の CaCl_2 又は MgCl_2 を含む懸濁液を提供する段階、および

10 から 50 μF の静電容量で、0.5 kV/cm から 12.5 kV/cm にて懸濁液をエレクトロポレーション処理し、それにより少なくとも 1×10^9 のライブラリサイズを得る段階、

を含む、酵母細胞のエレクトロポレーションにより酵母ライブラリを調製する方法。

10

【請求項 2】

懸濁液が 1 M ソルビトール及び 1 mM CaCl_2 を含む、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

懸濁液が、1 M ソルビトール及び 1 mM MgCl_2 を含む、請求項 1 の方法。

【請求項 4】

酵母細胞が、冷 0.1 M LiAc 及び 10 mM DTT 中で温置される、請求項 1 の方法。

【請求項 5】

懸濁液が、25 μF の静電容量で、2.5 kV/cm でエレクトロポレーション処理される、請求項 1 の方法。

20

【請求項 6】

エレクトロポレーション段階が 0.2 cm ギャップキュベット中で行われる、請求項 1 の方法。

【請求項 7】

ベクター DNA 1 μg から 8 μg が使用される、請求項 1 の方法。

【請求項 8】

ベクター DNA 4 μg が使用される、請求項 1 の方法。

【請求項 9】

ベクターが線状である、請求項 1 の方法。

【請求項 10】

懸濁液が 1.6×10^9 個の酵母細胞/mL の 400 μL を含む、請求項 1 の方法。

【請求項 11】

ベクター DNA：挿入 DNA の比が 1：0.5 から 1：10 の範囲である、請求項 1 の方法。

【請求項 12】

ベクター DNA：挿入 DNA の比が 1：3 である、請求項 1 の方法。

【請求項 13】

1.0 から 2 の OD₆₀₀ になるまで酵母細胞を培養する段階；

水中で酵母細胞を洗浄する段階；

ソルビトール及び CaCl₂ を含む溶液中で酵母細胞を洗浄する段階；

0.01 から 1.0 M の酢酸リチウム (LiAc) 及び 1 から 100 mM のジチオスレイトール (DTT) を含む溶液中で酵母細胞を温置する段階；

ソルビトール及び CaCl₂ を含む溶液中で酵母細胞を洗浄する段階；

酵母細胞エレクトロポレーション懸濁液を形成させるために、0.1 から 10 M のソルビトール及び 0.1 から 10 mM の CaCl₂ 又は MgCl₂ を含む溶液中で酵母細胞を再懸濁する段階；

酵母細胞-DNA エレクトロポレーション懸濁液を形成させるために、酵母細胞エレクトロポレーション懸濁液の体積をベクター DNA 及び挿入 DNA に添加する段階；および

0.2 cm ギャップキュベット中で 2.5 kV/cm から 12.5 kV/cm の間の電圧で酵母細胞-DNA エレクトロポレーション懸濁液をエレクトロポレーション処理する段階、

を含む、酵母ライブラリを調製するために DNA で酵母を形質転換するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願に対する相互参照)

本願は、2008 年 3 月 3 日提出の米国特許仮出願第 61/067、910 号に対する優先権及びその利益を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、酵母形質転換及びそれにより形質転換された酵母細胞及び酵母細胞ライブラリ及びそれ由来の組み換え産物の産生の分野に関する。とりわけ、本発明は、エレクトロポレーションによる酵母の形質転換に関する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

インビボでの動物免疫付与を用いるか又はインビトロでの組み換え抗体ディスプレイ技術により作製される治療用抗体は、臨床で成果を収めており、それ自体、有効な薬物探索技術としてこれらの技術を実証してきた。一般に動物免疫付与由来のモノクローナル抗体は、治療効果を達成するために十分に高い親和性を有することが予想される一方で、動物

10

20

30

40

50

免疫付与からの治療用抗体の開発には、非ヒト抗体のヒト化又はヒト抗体を発現するトランスジェニック動物の入手の何れかが必要である。インビトロディスプレイ技術により予め確立された抗体ライブラリからの完全ヒト抗体の直接選択（ファージ、細菌、酵母、哺乳動物細胞及びリポソーム性ディスプレイ）（Chao、G. ら（2006）*Nat. Protoc.* 1: 755-68; Gai、S. A. 及びWitttrup、K. D. （2007）*Curr. Opin. Struct. Biol.* 17: 467-73; Griffiths、A. D. ら（1994）*EMBO J.* 13: 3245-60; He、M. 及びKhan、F. （2005）*Expert Rev. Proteomics* 2: 421-30; Hoogenboom、H. R. （2002）*Methods Mol. Biol.* 178: 1-37; Hoogenboom、H. R. （2005）*Nat. Biotechnol.* 23: 1105-16）によって、有益な同様のアプローチがもたらされており、これは、標的抗原がインビボで生産性の高い免疫反応を誘発できない場合、最良の代替法となり得る。

10

【0004】

ヒト抗体ライブラリは、全長抗体又はFab、scFv及びdAbなどの様々な抗体断片をディスプレイするために改変されてきた。ライブラリは、一般に、合成的多様性をさらに導入するか又は導入せずに、B細胞レパートリーからの抗体多様性を捕捉し、ライブラリに移すことによるか（Hoet、R. M. ら（2005）*Nat. Biotechnol.* 23: 344-8）又は限定されたヒト抗体フレームワークにおいてCDR残基を合成により無作為化することによるか（Rothe、C. ら（2008）*J. Mol. Biol.* 376: 1182-200）の何れかで、構築される。抗体重及び軽鎖は個別に増幅され、ライブラリディスプレイ形式に再設定されるので、VHとVLとの間の新しい対形成がこのプロセス中に形成される。このVH-VLシャッフリングにより、新規の抗原結合部位が生成されるようになる一方で、これによってまた、理論的ライブラリ多様性も非常に顕著に向上する。ライブラリを有効にサンプリングするために必要とされる理論的なライブラリ多様性及び実際のライブラリのサイズを低下させることにより、より良好でより生産性の高い抗体ライブラリを操作するためにいくつかのストラテジーが開発されてきた。これらのストラテジーには、知的設計合成又は半合成ライブラリ（Rothe、C. ら（2008）*J. Mol. Biol.* 376: 1182-200）及び、多様性がより低いがより反応性が高い可能性があるB細胞レパートリーから作製された、免疫（Hoet、R. M. ら（2005）*Nat. Biotechnol.* 23: 344-8）又は偽免疫（pseudoimmune）（Lee、H. W. ら（2006）*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346: 896-903）ライブラリが含まれる。これらのアプローチは、いくつか又は実に多くのログにより理論的ライブラリ多様性を顕著に低下させることにおいて有効であり得るが、それらの稀少性に関係なく、抗体ヒットを同定する機会を増加させるための大きなライブラリサイズ及びそれらを作製するための方法に対する必要性によって、必ず、ライブラリ設計は完全なものになるであろう。

20

30

【0005】

酵母などの真核系における、核酸ライブラリ及びそれにより産生される組み換え産物（医薬用タンパク質など）の作製のための手段が利用可能であれば、E. コリなどの原核系の使用と比較して、顕著な長所がもたらされる。酵母は、一般に、細菌よりも高い細胞密度で増殖させることができ、連続発酵処理に容易に適応する。しかし、組み換え産物及びライブラリの生成のための宿主／ベクター系としての酵母種の開発において、形質転換条件及び外来核酸を酵母宿主細胞に安定して導入するための適切な手段に関する知識の欠如が大きな障害となっている。

40

【0006】

細胞の電氣的形質転換を促進する様々な電氣的及び生物学的パラメータの中でも特に挙げられるのは、細胞表面に対するDNAの吸着である。低強度の交流電場もまた、おそらく、DNA透過酵素の電氣的刺激によって、E. コリ細菌へのDNA転移を促進する。高

50

分子電解質DNAの電気穿孔性遺伝子移動における主要な電気拡散的又は電気泳動的効果に対する証拠が蓄積されてきた。エレクトロポレーションにより促進される電気浸透効果及び膜陥入もまた報告された。

【0007】

酵母細胞膜を横切る電場の適用の結果、エレクトロポレーションプロセスに対して非常に重要である一時的な孔が生じる。エレクトロポレーターシグナル生成装置は、電極間のギャップ (cm) を横切って動く電圧 (kV) を与える。この電位差は、 $E = kV/cm$ である電場強度と呼ばれるものと定義される。各細胞は、最適のエレクトロポレーションに対するそれ自身の臨界電場強度を有する。これは、細胞の大きさ、膜の構造及び細胞壁それ自身の個々の特徴による。例えば、哺乳動物細胞は、通常、細胞死及び／又はエレクトロポレーションが起こる前、0.5から5.0 kV/cmの間である必要がある。一般に、必要とされる電場強度は、細胞の大きさとは逆に変化する。

10

【0008】

形質転換の方法

1. エレクトロポレーションによる形質転換

Beckerら (Methods in Enzymology 194:182-187 (1991)) は、酵母サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) (*S. セレビシエ*) の形質転換の方法を開示する。Beckerはまた、スフェロプラスト形質転換も開示する。

20

【0009】

Faberら (Curr. Genet. 25:305-310 (1994)) は、メチロトロフ酵母、ハンセヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) の形質転換のための方法を開示する。Faberはまた、この方法をピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*) にも適用した。

【0010】

Helmutら (Analytical Biochem. 293:149-152 (2001)) は、LiAc及びDTT前処理の両方を組み合わせることによる、酵母形質転換効率の向上を開示する。

【0011】

Kasutskieら (Yeast 8:691-697 (1992)) は、様々な相同ベクタープラスミドによる無傷のカンジダ・マルトーサ (*Candida maltosa*) 細胞のエレクトロパルス形質転換を開示する。

30

【0012】

Meilhocら (Bio/Technology 8:223-227 (1990)) は、無傷の *S. セレビシエ* 酵母細胞及び電場パルスを用いた形質転換系を開示する。

【0013】

Neumannら (1996) Biophys. J. (1996) 71:868-877 は、エレクトロポレーション及びカルシウム介在DNA吸着による、酵母細胞形質転換の動力学を開示する。

【0014】

40

Pireddaら (Yeast 10:1601-1612 (1994)) は、酵母、ヤマダザイマ (ピキア) オーメリ (*Yamadazyma (Pichia) ohmeri*) に対する形質転換系を開示する。

【0015】

Scorerら (Bio/Technology 12:181-184 (1994)) は、エレクトロポレーション及びスフェロプラスト形質転換系の両方を用いた、ピキア・パストリスでの発現のための稀少な高コピー数形質転換体の迅速なG418選択を可能にするP. パストリスベクターを開示する。

【0016】

Shermanら (Laboratory Course Manual for M

50

ethods in Yeast Genetics、p. 91 102、Cold Spring Harbor Laboratory (1986)) は、酵母突然変異体 L E U 2 及び H I S 3 の形質転換を開示する。

【0017】

Suga 及び Hatakeyama (Curr. Genet. 43:206-211 (2003)) は、カルシウムの添加によるエレクトロポレーション前にコンピテント細胞を作製するための凍結法を開示する。

【0018】

Thompson ら (Yeast 14:565-571 (1998)) は、エレクトロポレーションによる形質転換のための、S. セレビシエ及びカンジダ・アルビカンズ (Candida albicans) などの酵母細胞の調製を開示する。

10

【0019】

Yang ら (Applied and Environmental Microbiology 60 (12):4245-4254 (1994)) は、その URA3 遺伝子及び相同自己複製配列 ARS2 に基づく、ピキア・スチピチス (Pichia stipitis) のエレクトロポレーションを開示する。

【0020】

Raymond に対する米国特許第 5, 716, 808 号は、エレクトロポレーションを用いた外来 DNA コンストラクトを含有するピキア・メタノリカ (Pichia methanolic) 細胞を調製するための方法及びピキア・メタノリカ細胞において外来ペプチドを産生させるための方法を開示する。

20

【0021】

Abbas に対する米国特許第 7, 009, 045 号は、エレクトロポレーションによる及びスフェロプラスト形質転換による、フラビン生成酵母、ピキア・ギリエルモンディ (Pichia guilliermondii) 及びカンジダ・ファマータ (Candida famata) の形質転換を開示する。

【0022】

2. スフェロプラスト形成による形質転換

Becker ら (Methods in Enzymology 194:182-187 (1991)) は、酵母 S. セレビシエならびにスフェロプラスト形質転換の形質転換の方法を開示する。

30

【0023】

Scorer ら (Bio/Technology 12:181-184 (1994)) は、エレクトロポレーション及びスフェロプラスト形質転換系の両方を用いた、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) での発現のための稀少な高コピー数形質転換体の G418 選択を可能にする P. パストリスベクターを開示する。

【0024】

Stroman らに対する米国特許第 4, 808, 537 号は、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) からのメタノール誘導性遺伝子及び、スフェロプラスト形質転換を用いた異種遺伝子のメタノール制御発現に有用な制御領域を、単離しクローニングするための方法を開示する。

40

【0025】

Cregg に対する米国特許第 4, 837, 148 号は、ピキアの宿主株において染色体外エレメントとしてプラスミドを維持することが可能な自己複製配列を開示する。この特許は、DNA 配列を含むコンストラクトならびにスフェロプラスト形成により生成される形質転換生物をさらに開示し、本発明の DNA 配列及びコンストラクトを作製するためのプロセスならびに何らかの源から配列を単離するための方法を提供する。

【0026】

Stroman らに対する米国特許第 4, 855, 231 号は、メタノールの存在、異化代謝産物非抑制性炭素源及び炭素源欠乏に反応性がある DNA 配列を開示する。' 2 3

50

1 特許は、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) のスフェロプラスト形質転換を明らかにする。

【0027】

Stromanらに対する米国特許第4, 879, 231号は、ピキア・パストリスなどの酵母に対するスフェロプラスト形質転換法を開示する。

【0028】

Creggらに対する米国特許第4, 882, 279号は、ピキア属の酵母、例えばピキア・パストリスに対するスフェロプラスト形質転換技術を開示する。

【0029】

Creggに対する米国特許第5, 135, 868号は、ピキア属の酵母の部位特異的ゲノム修飾のための方法に関する。'868特許は、スフェロプラスト形質転換法を使用する。

10

【0030】

Buckholzに対する米国特許第5, 268, 273号は、ピキア・パストリスのスフェロプラスト形質転換の方法に関する。

【0031】

Raymondに対する米国特許第5, 736, 383号は、ピキア属の酵母株、特にピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*) の形質転換の方法に関する。'383特許は、ピキア属の酵母のスフェロプラスト形質転換の方法ならびにエレクトロポレーションによる形質転換の方法にさらに関する。

20

【0032】

3. その他の形質転換系

Kunzeら (*Current Genetics* 9 (3): 205-209 (1985)) は、プラスミド pYe (ARG4) 411を用いた、*S. セレビシエ*、カンジダ・マルトーサ (*Candida maltosa*) 及びピキア・ギリエルモンディ (*Pichia guilliermondii*) G266の形質転換の方法を開示し、これは、pBR322に挿入された*S. セレビシエ* ARG4遺伝子を含む。Kunzeは、形質転換の方法においてCaCl₂を使用した。

【0033】

Kunzeら (*J. Basic Microbiol.* 25 (2): 141-144 (1985)) は、CaCl₂を用いた、産業的に重要な酵母カンジダ・マルトーサ (*Candida maltosa*) 及びピキア・ギリエルモンディ (*Pichia guilliermondii*) G266の形質転換の方法を開示する。

30

【0034】

Kunzeら (*Acta Biotechnol.* 6 (1): 28 (1986)) は、産業的に重要な酵母カンジダ・マルトーサ (*Candida maltosa*) 及びピキア・ギリエルモンディ (*Pichia guilliermondii*) の形質転換を開示する。

【0035】

Neistatら (*Mol. Ge. Mikrobiol. Virusol.* 12: 19-23 (1986)) (要約のみ) は、*S. セレビシエ* のADE2遺伝子を担うプラスミドによる、ハンセンラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、ピキア・ギリエルモンディ (*Pichia guilliermondii*)、ウィリオプシス・サツルヌス (*Williopsis saturnus*) 酵母の形質転換を開示する。形質転換の方法は開示されていない。

40

【0036】

Creggらに対する米国特許第4, 929, 555号は、DNAによる形質転換に対して妥当であるピキア属のメチロトロフィー種の全細胞を作製するための方法及びこのような種、特にピキア・パストリスの全細胞をDNAで形質転換するための方法を開示する。

50

【0037】

Heefnerらに対する米国特許第5, 231, 007号は、6日間に対して1Lあたり約7.0から7.5gのリボフラビン量を産生するカンジダ・ファーマータ (*Candida famata*) の高フラビン生成株の作製及び単離の方法を開示する。この方法は、親株及びスクリーニングプロトコルに従い各段階後に選択される子孫株において行われる反復突然変異誘発段階及びプロトプラスト融合段階の組み合わせを含む。

【0038】

4. ベクター、ARSエレメント及び遺伝子ライブラリ

Clyne, R. K. ら (EMBO J. 14 (24) : 6348-6357 (1995)) は、ARS1、分裂酵母、シズサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) のARSエレメントの微小構造分析に関する。一連のネスト化欠失突然変異の特徴から、重要なARS活性を保持した650bp以下の断片はなかったので、ARS1を包含するDNAの最小断片が大きいことが示される。

10

【0039】

Liauta-Teglivets, O. ら (Yeast 11 (10) : 945-952 (1995)) は、ピキア・ギリエルモンディ (*Pichia guilliermondii*) ゲノムライブラリからのリボフラビン生合成に含まれるGTP-シクロヒドローラーゼの構造遺伝子のクローニングを開示する。

【0040】

Cannon, R. D. ら (Mol. Gen. Genet. 221 (2) : 210-218 (1990)) は、カンジダ・アルビカンズ (*Candida albicans*) 及び *S. セレビシエ* で機能的である自己複製配列 (ARS) エレメントの単離及びヌクレオチド配列を開示する。

20

【0041】

Takagi, M. ら (J. Bacteriol. 167 (2) : 551-555 (1986)) は、そのゲノムから単離されたARS部位を使用することによる、カンジダ・マルトーサ (*Candida maltosa*) における宿主-ベクター系の構築を開示する。

【0042】

Pla, J. ら (Gene 165 (1) : 115-120 (1995)) は、カンジダ・アルビカンズ (*Candida albicans*) 及び *S. セレビシエ* の両方の非組み込み型 (non integrative) 遺伝子形質転換を促進することが示されている、自己複製活性のあるARS2及びARS3カンジダ・アルビカンズ (*Candida albicans*) DNA断片に関する。

30

【0043】

Fournierらに対する米国特許第5, 212, 087号は、ヤロウィア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*) において有効であるARS配列ならびにこれらの配列を担うプラスミドを開示する。

【0044】

Hagensonらに対する米国特許第5, 665, 600号は、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 線状プラスミド及びARS配列を含有するそのDNA断片を開示する。'600特許は、米国特許第4, 929, 555号のCreggらに記載のようなスフェロプラスト形質転換系を使用した。

40

【0045】

Creggらに対する米国特許第4, 837, 148号は、ピキアの宿主株において染色体外エレメントとしてプラスミドを維持することが可能な自己複製配列を開示する。'148特許は、このDNA配列を含むコンストラクトならびにそれにより形質転換された生物にさらに関する。この特許は、本発明のDNA配列及びコンストラクトを作製するためのプロセスならびに何らかの源からその配列を単離するための方法をさらに提供する。

【0046】

50

Chaoら(Nature Protocols、1(2):755-768(2006))は、エレクトロポレーションにより酵母細胞を形質転換し、5 μ g 挿入物及び1 μ g ベクターDNAにより最大 5×10^7 ライブラリサイズを達成するためのプロトコルを開示する。

【0047】

上記方法及び開示は、次第により高い形質転換効率を達成してはいるが、以前として困難であり、 10^6 から 10^7 サイズ範囲の複数の小さなライブラリから 10^8 から 10^9 サイズ範囲のより大きな複合したライブラリサイズを蓄積するために、長い時間を要し、繰り返し実行することが必要である。

【0048】

酵母ライブラリは、ファージライブラリにより達成されているサイズ又は効率を達成していない。2005年にHoogenboom(Nature Biotech.、23(9):1105-1116)により概説されているように、典型的な最大ファージライブラリのサイズは 10^{10} から 10^{11} であり、一方、典型的な酵母ライブラリは 10^7 のサイズであるが(その他のディスプレイ技術(Hoogenboom、H. R. (2002) Methods Mol. Biol. 178:1-37; Hoogenboom、H. R. (2005) Nat. Biotechnol. 23:1105-16により達成されるものよりも顕著に小さい。)、 10^9 の範囲のライブラリサイズが既に報告されている(Hoet、R. M. ら(2005) Nat. Biotechnol. 23:344-8; Lipovsek、D. ら(2007) J Mol Biol. 368:1024-41; Segal、L. ら(2007) Bioinformatics 23:1440-9)。Feldhausら(Nature Biotech.、21:163-170(2003))は、努力を要して形質転換を繰り返し、次いで形質転換されたライブラリを組み合わせることによって、 1.5×10^9 ライブラリを構築できることを示した。エレクトロポレーションプロトコルにおける最近の進展(Chao、Nature Protocols 1(2):755-768(2006)参照)により、1回の形質転換で最大 5×10^7 酵母ライブラリサイズを達成可能になったが、発明者らは、Chaoのプロトコルが酵母を形質転換する形質転換効率が、一般に、顕著により低いことを見出した。今まで達成された酵母ライブラリサイズが、依然として、 10^{10} から 10^{11} サイズのファージディスプレイライブラリにより日常的に達成可能であるものよりも顕著に低いことは今なお相違ない。

【0049】

磁性ビーズ及び蛍光標示式細胞分類の両方を用いた酵母ディスプレイライブラリ選択により、特に蛍光活性化細胞分類(FACS)とのその適合性によって、標的抗原に対する特異的結合物を濃縮するための有効で感度の高い方法が得られる。しかし、酵母細胞の形質転換効率が低いために、典型的な酵母ディスプレイライブラリのサイズに限界があることによって、この選択能力の長所が損なわれる。酵母ディスプレイ選択技術が、ファージディスプレイ(約 10^{10} の大きさ)に対して作製されるものと同様の大きな抗体ライブラリと組み合わせられ得る場合、酵母ディスプレイ技術により、非常に有効な抗体探索ツールがもたらされる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0050】

【特許文献1】米国特許第5,716,808号明細書

【特許文献2】米国特許第7,009,045号明細書

【特許文献3】米国特許第4,808,537号明細書

【特許文献4】米国特許第4,837,148号明細書

【特許文献5】米国特許第4,855,231号明細書

【特許文献6】米国特許第4,879,231号明細書

【特許文献7】米国特許第4,882,279号明細書

- 【特許文献8】米国特許第5, 135, 868号明細書
- 【特許文献9】米国特許第5, 268, 273号明細書
- 【特許文献10】米国特許第5, 736, 383号明細書
- 【特許文献11】米国特許第4, 929, 555号明細書
- 【特許文献12】米国特許第5, 231, 007号明細書
- 【特許文献13】米国特許第5, 212, 087号明細書
- 【特許文献14】米国特許第5, 665, 600号明細書
- 【非特許文献】
- 【0051】
- 【非特許文献1】Chao、G. 他、Nat. Protoc. 1、2006年、p. 75 10
5-768
- 【非特許文献2】Gai、S. A. 及びWitttrup、K. D.、Curr. Opin. Struct. Biol. 17、2007年、p. 467-73
- 【非特許文献3】Griffiths、A. D. 他、EMBO J. 13、1994年、p. 3245-3260
- 【非特許文献4】He、M. 及びKhan、F.、Expert Rev. Proteomics 2、2005年、p. 421-430
- 【非特許文献5】Hoogenboom、H. R.、Methods Mol. Biol. 178、2002年、p. 1-37
- 【非特許文献6】Hoogenboom、H. R.、Nat. Biotechnol. 2 20
3、2005年、p. 1105-1116
- 【非特許文献7】Hoet、R. M. 他、Nat. Biotechnol. 23、2005年、p. 344-348
- 【非特許文献8】Rothe、C. 他、J Mol Biol. 376、2008年、p. 1182-1200
- 【非特許文献9】Lee、H. W. 他、Biochem. Biophys. Res. Commun. 346、2006年、p. 896-903
- 【非特許文献10】Becker他、Methods in Enzymology 194、1991年、p. 182-187
- 【非特許文献11】Faber他、Curr. Genet. 25、1994年、p. 30 30
5-310
- 【非特許文献12】Helmuthe、Analytical Biochem. 293、2001年、p. 149-152
- 【非特許文献13】Kasutskie他、Yeast 8、1992年、p. 691-697
- 【非特許文献14】Meilhoc他、Bio/Technology 8、1990年、p. 223-227
- 【非特許文献15】Neumann他、Biophys. J. 71、1996年、p. 868-877
- 【非特許文献16】Piredda他、Yeast 10、1994年、p. 1601- 40
1612
- 【非特許文献17】Scorer他、Bio/Technology 12、1994年、p. 181-184
- 【非特許文献18】Sherman他、Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics、1986年、p. 91-102、Cold Spring Harbor Laboratory
- 【非特許文献19】Suga及びHatakeyama、Curr. Genet. 43、2003年、p. 206-211
- 【非特許文献20】Thompson他、Yeast 14、1998年、p. 565-571 50

- 【非特許文献21】Yang 他、Applied and Environmental Microbiology 60 (12)、1994年、p. 4245-4254
- 【非特許文献22】Becker 他、Methods in Enzymology 194、1991年、p. 182-187
- 【非特許文献23】Kunze 他、Current Genetics 9 (3)、1985年、p. 205-209
- 【非特許文献24】Kunze 他、J. Basic Microbiol. 25 (2)、1985年、p. 141-144
- 【非特許文献25】Kunze 他、Acta Biotechnol. 6 (1)、1986年、p. 28
- 【非特許文献26】Neistat 他、Mol. Ge. Mikrobiol. Virusol. 12、1986年、p. 19-23
- 【非特許文献27】Clyne、R. K. 他、EMBO J. 14 (24)、1995年、p. 6348-6357
- 【非特許文献28】Liuta-Teglivets、O. 他、Yeast 11 (10)、1995年、p. 945-952
- 【非特許文献29】Cannon、R. D. 他、Mol. Gen. Genet. 221 (2)、1990年、p. 210-218
- 【非特許文献30】Takagi、M. 他、J. Bacteriol. 167 (2)、1986年、p. 551-555
- 【非特許文献31】Pla、J. 他、Gene 165 (1)、1995年、p. 115-120
- 【非特許文献32】Lipovsek、D. 他、J Mol Biol. 368、2007年、p. 1024-1041
- 【非特許文献33】Segal、L. 他、Bioinformatics 23、2007年、p. 1440-1449
- 【非特許文献34】Feldhaus 他、Nature Biotech.、21、2003年、p. 163-170

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0052】

従って、酵母を用いた、例えば抗体ライブラリなどのタンパク質ライブラリを作製するための有効な方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0053】

(発明の要旨)

本発明は、例えば最大 2×10^{10} のサイズの酵母細胞ライブラリの作製のための、酵母細胞を形質転換する高効率で迅速な方法を提供する。本発明の方法により、ファージライブラリの規模の収率を達成することが可能になる。本発明の方法は、以前に未探索のより大きい抗体多様性スペースに到達するための実際的なツールとして、酵母ディスプレイ技術を適用する際の重大な問題を排除し、このライブラリサイズは、現在、実験室で増殖させ得る酵母培養物のサイズによってのみ制限される。

【0054】

最良の組み合わせを明らかにするために、 CaCl_2 、 MgCl_2 、スクロース、ソルビトール、酢酸リチウム、ジチオスレイトール、エレクトロポレーション電圧、DNA投入量及び細胞体積の使用を含む複数の成分及び条件を試験するか又は滴定した。この新しく開発されたプロトコルを適用することによって、 $1-1.5 \times 10^8$ 個の形質転換体/mg ベクターDNAの典型的な形質転換効率で、基本的に1日でヒト脾臓RNAから、 2×10^{10} 抗体ライブラリを構築した。配列分析により、この非免疫ヒト脾臓抗体ライブラリ内の抗体生殖細胞系列配列の多様な表示が確認された。試験的なライブラリ選択を

行うことによって、発明者らは、低ナノモル親和性のTNF- α 及びIL-18に対するヒト抗体を同定し、このことから、このライブラリの生産性が明らかになった。

【0055】

ある態様において、本発明は、(a)核酸ベクター、酵母細胞、ソルビトール及びCaCl₂を含む懸濁液を提供し、(b)約10から約50 μ Fの静電容量で、0.5kV/cmから12.5kV/cm超で懸濁液をエレクトロポレーション処理する段階を含む、酵母細胞のエレクトロポレーションにより酵母ライブラリを調製する方法を提供する。ある実施形態において、本発明は、(a)約1.0から約2のOD₆₀₀になるまで酵母細胞を培養し；(b)冷水の体積中で酵母細胞を洗浄し；(c)冷1Mソルビトール/1mM CaCl₂の体積中で酵母細胞を洗浄し；(d)30℃の0.1M LiAc/10mM DTTの体積中で酵母細胞を温置し；(e)第二の多量の冷1Mソルビトール/1mM CaCl₂の体積中で酵母細胞を洗浄し；(f)酵母細胞エレクトロポレーション懸濁液を形成させるために、第三の冷1Mソルビトール/1mM CaCl₂の体積中で酵母細胞を再懸濁し；(g)酵母細胞-DNAエレクトロポレーション懸濁液を形成させるために、エレクトロポレーション細胞懸濁液の体積をベクターDNA及び挿入DNAに添加し；(h)0.2cmギャップキュベット中で約2.5kV/cmから約12.5kV/cmの間の電圧で酵母細胞-DNAエレクトロポレーション懸濁液をエレクトロポレーション処理する段階を含む、ライブラリを調製するためにDNAで酵母を形質転換するための方法を提供する。

10

【0056】

ベクターDNA：挿入DNAの比は、約1：0.5から約1：10、例えば、1：0.5、1：1；1：2、1：3、1：4、1：5、1：6、1：7、1：8、1：9又は1：10の範囲である。ある実施形態において、ベクターDNA約1 μ g及び挿入DNA約1 μ gを反応に使用する。別の実施形態において、ベクターDNA約1 μ g及び挿入DNA約2 μ gを沈殿させる。別の実施形態において、ベクターDNA約1 μ g及び挿入DNA約3 μ gを沈殿させる。さらに別の実施形態において、ベクターDNA約1 μ g及び挿入DNA約4 μ gを沈殿させる。さらに別の実施形態において、ベクターDNA約1 μ g及び挿入DNA約5 μ gを沈殿させる。

20

【0057】

ある実施形態において、細胞懸濁液は、酵母細胞約50から約400 μ L、例えば、酵母細胞約50、100、150、200、250、300、350、400 μ Lを含む。

30

【0058】

ある実施形態において、酵母細胞懸濁液は、約1から約10 $\times$ 10⁹個の酵母細胞/mL、例えば、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9又は約10 $\times$ 10⁹個の酵母細胞/mLである。

【0059】

ある実施形態において、酵母細胞をエレクトロポレーション処理するために使用される電場強度は、約0.5kV/cmから約12.5kV/cm、例えば、約0.5、約1.0、約2.0、約2.5、約3.0、約3.5、約4.0、約4.5、約5.0、約5.5、約6.0、約6.5、約7.0、約7.5、約8.0、約8.5、約9.0、約9.5、約10.0、約10.5、約11.0、約11.5、約12.0、約12.5、約13.0、約13.5、約14.0、約14.5、又は約15.0kV/cmであった。

40

【0060】

ある実施形態において、酵母細胞は、約10から約50 μ F、例えば、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45又は約50の静電容量でエレクトロポレーション処理される。

【0061】

ある実施形態において、酵母細胞は、約0.1から約10Mソルビトール及び約0.1から約10mM CaCl₂もしくはMgCl₂、例えば、約0.1、約0.25、約0.5、約0.75、約1.0、約2.0、約3.0、約4.0、約5.0、約6.0、約

50

7. 0、約8. 0、約9. 0もしくは約10. 0Mソルビトール又は例えば、約0. 1、約0. 25、約0. 5、約0. 75、約1. 0、約2. 0、約3. 0、約4. 0、約5. 0、約6. 0、約7. 0、約8. 0、約9. 0もしくは約10. 0mM CaCl_2 又は MgCl_2 中で懸濁している。

【0062】

ある実施形態において、酵母細胞は、約0. 01から約1. 0M LiAc 、例えば、約0. 01、約0. 02、約0. 03、約0. 04、約0. 05、約0. 06、約0. 07、約0. 08、約0. 09、約0. 1、約0. 2、約0. 3、約0. 4、約0. 5、約0. 6、約0. 7、約0. 8、約0. 9又は約1. 0M LiAc 及び／又は約1から約100mM DTT 、例えば、約1、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90又は約100mM DTT 中で温置する。

10

【0063】

特定の実施形態において、本発明は、(a) 約1. 0から約2の OD_{600} になるまで酵母細胞を一晩培養し；(b) 水中で酵母細胞を洗浄し；(c) ソルビトール及び CaCl_2 を含む溶液中で酵母細胞を洗浄し；(d) LiAc 及び DTT を含む溶液中で酵母細胞を温置し；(e) ソルビトール及び CaCl_2 を含む溶液中で酵母細胞を洗浄し；(f) 酵母細胞エレクトロポレーション懸濁液を形成させるために、ソルビトール及び CaCl_2 を含む溶液の体積中で酵母細胞を再懸濁し；(g) 酵母細胞-DNAエレクトロポレーション懸濁液を形成させるために、エレクトロポレーション細胞懸濁液の体積をベクターDNA及び挿入DNAに添加し；(h) 0. 2cmギャップキュベット中で約2. 5kV/cmから約12. 5kV/cmの間の電圧で酵母細胞-DNAエレクトロポレーション懸濁液をエレクトロポレーション処理する段階の2以上を含む、ライブラリを作製するためにDNAで酵母を形質転換するための方法を提供する。

20

【0064】

別の特定の実施形態において、本発明は、(a) DNAをペレットになるように沈殿させ、続いて最小体積中で再懸濁することにより、約1:0. 5から約1:10の比のベクター及び挿入DNAの体積を最小化し；(b) (i) 培養プレートからの酵母コロニー入りの培地の第一の体積又は増殖中の酵母培養物の一部を接種し；(ii) 30℃で一晩酵母細胞を増殖させ；(iii) 段階(ii)からの細胞入りの培地の第二の体積を接種し、約1. 3から約1. 6の OD_{600} に到達するまで細胞を30℃で増殖させることによって、適切な増殖状態になるまでコロニーからの酵母細胞を培養し；(c) 遠心によって酵母細胞をペレット化し；(d) 冷水で酵母細胞を洗浄し；(e) 冷1Mソルビトール/1mM CaCl_2 で酵母細胞を洗浄し；(f) 0. 1M LiAc /10mM DTT 中で酵母細胞を再懸濁し；(g) 30℃にて250rpmで30分間、酵母細胞を温置し；(h) 1Mソルビトール/1mM CaCl_2 で酵母細胞を洗浄し；(i) 酵母細胞エレクトロポレーション懸濁液を形成させるために、1Mソルビトール/1mM CaCl_2 中で酵母細胞を再懸濁し；(j) 酵母細胞-DNAエレクトロポレーション懸濁液を形成させるために、酵母細胞エレクトロポレーション細胞懸濁液の一部をDNAペレットに添加し；(k) 約0. 5kVから約2. 5kVの範囲及び25 μF の静電容量で、酵母細胞-DNAエレクトロポレーション懸濁液をエレクトロポレーション処理し、(l) エレクトロポレーション処理される酵母細胞-DNAエレクトロポレーション懸濁液に1Mソルビトール/YPD（最終濃度：0. 5Mソルビトール、0. 5xYPD）の1:1混合物を添加し、30℃で1時間温置し；(m) 酵母細胞をペレット化し、10mL 1Mソルビトール中で再懸濁する段階の2以上を含む、DNAで酵母を形質転換するための方法を提供する。

30

40

【0065】

添付の図面とともに読む場合、好ましい実施形態の次の記述から、本発明の前述及びその他の目的、特性及び長所ならびに本発明そのものがより詳細に理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【0066】

50

【図1】図1は、ベクター：挿入物及び電圧2.5 kV/cmから12.5 kV/cmの関数としてのコロニー数を示す、表1のデータのグラフ表示を示す。

【図2】図2は、ベクター：挿入物及び電圧2.5 kV/cmから12.5 kV/cmの関数としてのコロニー数を示す、表3のデータのグラフ表示を示す。

【図3】図3は、キュベットあたりの体積を増加させることによって、エレクトロポレーション効率が顕著に向上することを示す。

【図4】図4は、（ベクター：挿入物比ではなく）DNA投入量増加及び高電圧が最大形質転換効率に重要であることを示す。

【発明を実施するための形態】

【0067】

10

（発明の詳細な記述）

いくつかの既に明らかにされた条件を試験し、組み合わせることによって、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) に対する高効率エレクトロポレーションプロトコルが確立された (Chao, G. ら (2006) *Nat. Protoc.* 1:755-68; Becker, D. M. 及びGuarente, L. (1991) *Methods Enzymol.* 194:182-7; Helmut, M. ら (2001) *Anal. Biochem.* 293:149-52; Neumann, E. ら (1996) *Biophys. J.* 71:868-77; Simon, J. R. (1993) *Methods Enzymol.* 217:478-83; Suga, M. 及びHatakeyama, T. (2003) *Curr. Genet.* 43:206-11; Thompson, J. R. ら (1998) *Yeast* 14:565-71)。これらには、エレクトロポレーション緩衝液中での、細胞調節剤としての酢酸リチウム (LiAc) 及びジチオスレイトール (DTT) の組み合わせ（これらの両者とも酵母形質転換の頻度を促進するために使用されてきた。） (Helmut, M. ら (2001) *Anal. Biochem.* 293:149-52; Thompson, J. R. ら (1998) *Yeast* 14:565-71; Gietz, R. D. ら (1995) *Yeast* 11:355-60) 及びソルビトール及び塩化カルシウムの包含 (Becker, D. M. 及びGuarente, L. (1991) *Methods Enzymol.* 194:182-7; Helmut, M. ら (2001) *Anal. Biochem.* 293:149-52; Neumann, E. ら (1996) *Biophys. J.* 71:868-77) が含まれる。

20

30

【0068】

定義：

「発現ベクター」という用語は、自己増殖部位 (ARS)、転写開始部位及び、宿主生物中で発現させようとするタンパク質をコードする少なくとも1つの構造遺伝子を含むDNAコンストラクトを意味する。複製部位 (site of replication) 又は複製起点は、クローニング及び発現ベクターの複製を調節する何らかのDNA配列である。発現ベクターはまた、通常、宿主酵母におけるタンパク質の発現を調節する、1以上のエンハンサー及び／又はプロモーター、サプレッサー及び／又はサイレンサー及び終結因子などの適切な調節領域も含有する。本発明による発現ベクターはまた、本明細書中に記載のような必須遺伝子を含む選択マーカーも含有し得る。本発現ベクターはまた、場合によっては、広く利用可能であり、当業者にとって周知であるその他の選択可能マーカーも含有する。発現ベクターは、ベクターの一種である。ベクターは、場合によっては、1以上の酵母株由来の1以上のARS配列 (エレメント) を含み得る。

40

【0069】

「操作可能に連結される」という用語は、DNAセグメントがその意図する目的に呼応して機能するように、DNAセグメントが配置されることを意味する（例えば、転写がプロモーターで開始し、コードセグメントを通じて転写終結因子まで進行する。）。

【0070】

「形質転換」という用語は、遺伝子型を変化させるレシピエント酵母宿主細胞へのDN

50

A又はその他の核酸の導入を意味する。

【0071】

「形質転換体」又は「形質転換（された）細胞」という用語は、形質転換を受けた、レシピエント酵母宿主細胞及びその子孫を意味する。

【0072】

本発明のエレクトロポレーション法に有用なベクターには、pYDベクター、酵母細胞により増殖させられ得る、何らかのその他のベクター及びそれらの派生コンストラクト又は一般に核酸が含まれる。本発明の発現ベクターは、そのベクターが宿主酵母細胞を形質転換するか、それに遺伝子移入するか又は形質導入し得る限り、ベクターのあらゆる型に基づき得る。好ましい実施形態において、本発現ベクターは、酵母プラスミド、特にS. セレビシエ由来のものに基づく。酵母細胞の形質転換後、ライブラリ配列をコードする外来性DNAがその細胞により取り込まれ、次に形質転換された細胞により発現される。

10

【0073】

より好ましくは、本発現ベクターは、E. コリ又は酵母の何れかにおいて増殖させられ得る酵母-細菌シャトルベクターであり得る（Struhler（1979）Proc. Natl. Acad. Sci. 76:1035-1039）。pBR322などのE. コリプラスミドDNA配列の包含により、E. コリでのベクターDNAの定量的調製が容易になり、従って酵母の効率的な形質転換が容易になる。

【0074】

シャトルとして作用し得る酵母プラスミドベクターの型は、複製ベクター又は統合ベクターであり得る。複製ベクターは、機能的なDNA複製起点の存在に基づいて、酵母の染色体DNAとは独立して、それ自身の維持を媒介可能な酵母ベクターである。統合ベクターは、複製及び従って宿主細胞での組み換えDNAの継続的な維持を容易にするための、染色体DNAでの組み換えに依存する。複製ベクターは、DNA複製起点が内在性の2ミクロンプラスミド酵母由来である、2ミクロンベースのプラスミドベクターであり得る。あるいは、この複製ベクターは、自己複製（ARS）ベクターであり得、この場合、「見かけの」複製起点は、酵母の染色体DNA由来である。場合によっては、複製ベクターは、上記のDNA複製起点の1つに加えて、セントロメアを有することが知られている酵母染色体DNAの配列を有する、セントロメア（CEN）プラスミドであり得る。

20

【0075】

本ベクターは、閉環型又は線状形態で酵母細胞に形質転換され得る。ベクターを組み込むことによる酵母の形質転換は、遺伝性の安定性があるにもかかわらず、ベクターが閉環形態である場合、効率的でない可能性がある（例えば、収率が僅か約1-10個の形質転換体/μg DNA）。酵母染色体DNAと相同であるDNA配列に自由端がある線状化ベクターは、高効率で酵母を形質転換し（100-1000倍）、この形質転換DNAは、一般に切断部位と相同な配列に組み込まれることが分かっている。従って、適切な制限エンドヌクレアーゼでベクターDNAを切断することによって、形質転換効率を上昇させ、染色体組み込みの部位を標的化することが可能である。統合的な形質転換は、形質転換の効率が十分に高く、組み込みに対する標的DNA配列が、宿主細胞の代謝に必須の遺伝子を破壊しない領域内であるならば、醸造酵母の遺伝子組み換えに適用可能であり得る。

30

40

【0076】

高コピー数（およそ20-50コピー/細胞）を有するARSプラスミドは、最も不安定である傾向があり、世代あたり10%を超える頻度で失われる。しかし、ARSプラスミドの安定性は、セントロメアの接着により向上させることができ；セントロメアプラスミドは、細胞1個あたり1又は2コピー存在し、1世代あたりの喪失は僅かおよそ1%である。関心のある何らかの遺伝子を含む本発明のエレクトロポレーション法を用いた酵母宿主細胞による発現のためのタンパク質の非限定例には、抗体及び抗体断片、ホルモン、サイトカイン及びリンホカイン、受容体、接着分子及び酵素が含まれる。

【0077】

本発明のエレクトロポレーション法により形質転換され得る酵母株には、サッカロミセ

50

ス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などのサッカロミセス属及びシゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces Pombe*) などのシゾサッカロミセス属の酵母種が含まれる。ある実施形態において、本酵母細胞は 2 倍体酵母細胞である。あるいは、本酵母細胞は、酵母半数体細胞の「a」及び「α」株などの半数体細胞である。

【0078】

本発明は、1 以上の核酸コンストラクトとともに酵母を含有する細胞懸濁液をエレクトロポレーション処理することを含む、酵母細胞の形質転換のための方法を提供する。酵母細胞の形質転換の結果、単クローンから、(a) 酵母表面タンパク質に連結されるか又は、酵母細胞表面タンパク質もしくはその他の成分との特異的な共有結合もしくは非共有結合の相互作用を介した会合により酵母細胞の表面で提示される、ペプチド又はタンパク質；(b) 細胞内で発現されるペプチド又はタンパク質；又は(c) 培地などの細胞外空間に分泌されるか又は固体表面に沈積するペプチド又はタンパク質に対してスクリーニングを行うために使用することができる酵母細胞集団（即ち、酵母ライブラリ又はライブラリ）まで、得ることができる。このような酵母ライブラリは、都合よく、複数回の適用、酵母細胞中に導入され得るかもしくは外来性に添加され得る、別のタンパク質、ペプチド、DNA、RNA 又はその他の化学物質に対する、ペプチドもしくはタンパク質間の相互作用について、スクリーニング又は特性分析を行いやすい可能性がある。具体例は、酵母ディスプレイ、酵母 2 ハイブリッド、酵母 3 ハイブリッドなどで見られるものである。

【0079】

本発明は、酵母細胞を形質転換することに十分である、抵抗、電場強度及びパルス持続時間の 1 以上を用いて、1 以上の制御配列及び 1 以上の遺伝子又は遺伝子セグメントを含む 1 以上の核酸コンストラクトとともに酵母を含有する細胞懸濁液をエレクトロポレーション処理することを含む、酵母細胞の形質転換に対する方法を提供する。

【0080】

ある実施形態において、電場強度は、約 2.5 kV/cm から約 12.5 kV/cm である。ある種の実施形態において、電場強度は、約 0.5 kV/cm、約 1.0 kV/cm、約 1.5 kV/cm、約 2.0 kV/cm 又は約 2.5 kV/cm である。これらの値は、エレクトロポレーションキュベットが 0.2 cm のギャップを有することを考慮している。より高い電場強度が可能であるが、しかしそれらの実用性は、より強いパルスを送ることができる装置の開発に大きく依存する。

【0081】

ある実施形態において、パルス持続時間は、約 3 ミリ秒から約 10 ミリ秒である。特定の実施形態において、パルス持続時間は約 4.8 ミリ秒である。

【0082】

本発明のエレクトロポレーション法による細胞の処理は、電極対の間で酵母細胞懸濁液に電場をかけることにより行われる。この電場強度は、細胞のエレクトロポレーションが、細胞に対して損傷なく又は最小限の損傷で行われるように、合理的に、的確に調整しなければならない。電極間の距離を測定することができ、式 $E = V/d$ に従う適切な電圧を電極にかけることができる (E = 電場強度 (V/cm); V = 電圧 (ボルト) 及び d = 距離 (cm))。

【0083】

本明細書中に記載の手順を行うためのパルス発生装置は、長年にわたり市販されてきた。ある適切なシグナル発生装置は、Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) である。典型的な設定は、静電容量エクスペンダープラス (expenders plus) 及びパルスコントローラプラスモジュール (pulse controller plus module) に連結される Gene Pulser II からなる。

【0084】

市販されているさらなるエレクトロポレーションモデルには、Gene Pulser

10

20

30

40

50

MXcellシステム又はGene Pulser X cell eukaryotic system (Bio-Rad)、Cellject Pro Electroporator (Thermo Scientific)、Multiporator Electroporation System及びその他のEppendorf^(R)エレクトロポレーションシステム (Eppendorf、North America)、ECMエレクトロポレーションジェネレーター及びBTX^(R) HT96 ウェルエレクトロポレーションシステム (BTX、Harvard apparatus) が含まれ、これらは全て、本明細書中で開示される条件を用いて酵母細胞をエレクトロポレーション処理するのに適切な装置である。

【0085】

10

酵母細胞へのDNAの導入を促進するために、本発明内でエレクトロポレーションを使用する。エレクトロポレーションは、細胞膜を一過性に透過性にして、細胞内にDNAなどの巨大分子を通すことができるようにするための、パルス状電場を使用するプロセスである。しかし、DNAが細胞に移される実際の機構はよく理解されていない。カンジダ・ファーマータ (Candida famata) の形質転換に対して、例えば、約10から約13 kV/cmの電場強度及び約R5 (129 オーム) の抵抗値及び約45 msの時定数を有する実験的減衰パルス状電場に細胞が曝露される場合、驚くべきことにエレクトロポレーションが有効である。通常、抵抗及び静電容量は、選択されたエレクトロポレーション装置に依存して、既存であるか又は使用者により選択され得るかの何れかである。何れにしても、この装置は、必要に応じて電場強度及び減衰パラメータを与えるために、製造者の説明書に従い、設定される。

20

【0086】

本発明は、何らかの1以上の所望の内在性 (即ちその酵母細胞内に天然に存在する) 又は異種遺伝子の高レベル発現を可能にする、酵母の形質転換の高効率法にさらに関する。本発明の方法は、例えば抗体又はキメラ又はその断片を発現するライブラリを調製するための方法にさらに関する。

【0087】

ある場合において、関心のある遺伝子を担う発現ベクターは、単一クローン又は、細胞内タンパク質 (例えば、核又は細胞質タンパク質)、膜タンパク質 (例えば、膜貫通タンパク質又は膜結合タンパク質) 又は分泌タンパク質を発現する多くの形質転換細胞からなるライブラリを作製するために、エレクトロポレーションにより酵母宿主細胞に形質転換され得る。タンパク質を精製し、タンパク質機能を調べ、タンパク質-タンパク質相互作用を同定するために又は新規タンパク質結合物もしくは相互作用パートナーを同定するために、形質転換細胞又はライブラリを使用することができる。抗体及び抗体断片を提示するか又は発現する非常に大きな酵母ライブラリを作製する能力は重要な点である。選択抗原に結合する抗体を同定するために、このライブラリを標的抗原による選択に供することができる。

30

【0088】

形質転換酵母は、人工的に構築されたプラスミドを喪失する傾向があるので、それらにおいて正の選択圧を与えるように培地を使用することは有利である。その株が主要代謝産物に対して栄養要求性変異株である場合及び使用されるベクタープラスミドが株原栄養性を回復することができるマーカー遺伝子を含む場合 (例えば上述のLEU2 遺伝子)、培地からの代謝産物を除外することによってこの選択圧が働き得る。同じ結果を得るためにその他の手段が存在し、本発明を実施するためにも使用され得る。

40

【0089】

関心のある構造遺伝子の性質に依存して、産物又は発現産物は、酵母宿主細胞の細胞質に留まり得るか又は分泌され得る。細胞中に留まるタンパク質だけでなく、分泌されるタンパク質も可溶性であることが分かっている。産物又は発現産物が酵母宿主細胞中に留まるべきものである場合、これは、形質転換体が高密度に到達するまで、所望産物の発現又は産生が殆ど又は全くないように、誘導性転写開始領域を有することが一般には望ましい

50

ものであり得る。産物又は発現産物が発現されるのに十分な時間後、従来の手段、例えば遠心、溶解及び関心のある産物の単離によって、その細胞を単離し得る。産物の性質及び使用に依存して、溶解物を、クロマトグラフィー、電気泳動、溶媒抽出、結晶化、透析、限外ろ過などの様々な精製法に供し得る。クロマトグラフィーの方法には、以下に限定されないが、ガスクロマトグラフィー、HPLC、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー及び当業者にとって公知のクロマトグラフィーのその他の方法が含まれる。精製度は、約50%から90%以上、好ましくは約100%まで、変動し得る。

【0090】

あるいは、関心のある発現産物又は産物は、培地中に分泌され得、継続的に産生され、培地を一部採取した場合、所望の産物を例えばカラム又はアフィニティークロマトグラフィー、限外ろ過、沈殿などにより抽出し、使用した培地を廃棄するか又は必須成分を戻すことにより再循環させる。限外ろ過からの産物を含有する透過液は、さらなる蒸発により、さらに濃縮に供され、続いて結晶化又はアルコール及び／又はpH調整を用いた沈殿に供され得る。当業者は、多くのプロセスの選択肢を知っている。産物が分泌されるべきものである場合、非構成領域が使用され得るが、通常、構成的転写開始領域が使用される。

【0091】

別段の断りがない限り、本明細書中で新しく記載される全てのヌクレオチド配列は、自動DNA配列決定装置（例えば、PE Applied Biosystems、Inc.からのモデル377など）を用いて決定した。従って、当技術分野で公知のように、この自動化法により決定された何らかのDNA配列に対して、本明細書中で決定された何れのヌクレオチド配列もある程度のエラーを含有し得る。自動化法により決定されたヌクレオチド配列は、配列決定されたDNA分子の実際のヌクレオチド配列と、通常、少なくとも約90%同一、より一般的には少なくとも約95%から少なくとも約99.9%同一である。実際の配列は、当技術分野で周知の手動式DNA配列決定法を含むその他の方法によって、より正確に決定され得る。

【0092】

例示

【実施例1】

【0093】

ベクターDNAの調製

scFv+300bp DNA断片での組み換えでの使用に対して、制限酵素SfiI及びNotIによりpYDStevベクターを消化した。効率を向上させ、非切断ベクターが形質転換されないようにするために、SfiI/NotI消化ベクターをBgIII及びHpaI（両者ともスタッファー内で切断）でさらに消化した。

【0094】

Bioline（Randolph、MA）からのSurecleanを用いて、消化DNAを精製した。簡潔に述べると、Surecleanの等体積と制限消化物を混合した。試料を室温で10分間、温置した。次に、13.2krpmで15分間、試料を遠心した。上清を廃棄し、70%エタノール2.5x試料体積でペレットを洗浄した。次に、13.2krpmで15分間、試料を遠心した。上清を除去し、ペレットを風乾した。5-10µL TE pH8中でペレットを再懸濁した。

【実施例2】

【0095】

挿入DNAの調製

相同組み換えを効率的に行うために、挿入物に十分なベクター配列5'及び3'（例えば約300塩基対）を付加して関心のある挿入物を増幅するためにPCRを用いて、挿入DNAを調製する。

【0096】

ファーストストランド（1st Strand）cDNA合成のために免疫グロブリンのIgM及びIgG（IgM/G cDNAに対して）又はIgK（IgK cDNA）

とハイブリッド形成する免疫グロブリン定常領域プライマーを消化した（表2）。具体的には、IgM/G cDNAに対して、プライマーFc gRev 1、2及び3及びFc mRev 1、2及び3を使用した。IgKファーストストランド（1st Strand）cDNA合成に対して、CkRev 1、2及び3を使用した。

【0097】

上記のプライマーを使用し、Invitrogen 1st Strand Synthesisキットを用いて、cDNA合成反応を行った。

【0098】

【表1】

表1：代表的なPCR反応（段階1）

IgM/G cDNA				IgK cDNA			
50 ng/μL	Clone	Tech	ボ	50 ng/μL	Clone	Tech	ボ
300 ng/μL	Fc gRev 1	3 μL		300 ng/μL	CkRev 1	1.5 μL	
300 ng/μL	Fc gRev 2	3 μL		300 ng/μL	CkRev 2	1.5 μL	
300 ng/μL	Fc gRev 3	3 μL		300 ng/μL	CkRev 3	1.5 μL	
300 ng/μL	Fc mRev 1	3 μL		10 μL	dNTPs (10mM)		
300 ng/μL	Fc mRev 2	3 μL		75.5 μL	dd水		
300 ng/μL	Fc mRev 3	3 μL		100 μL	総体積		
dNTPs (10mM)	20 μL						
142 μL	dd水						
200 μL	総体積						

50 μL/rxn、65℃で5分間、次いで4℃で1分間反応。

【0099】

10

20

30

【表 2】

表 2：本実験で使用したオリゴヌクレオチド

オリゴ名	配列	説明	配列番号
Ckrev1	TCCACCTTC CACTG	Ckリバープライ マー1	配列番号1
Ckrev2	CAGGCACAC AACAG	Ckリバープライ マー2	配列番号2
Ckrev3	GAGTGTCAC AGAGC	Ckリバープライ マー3	配列番号3
FcGrev1	AGTTCCACG ACACC	IgGリバープライ マー	配列番号4
FcGrev2	GAAGGTGTG CACG	IgGリバープライ マー	配列番号5
FcGrev	CCACGCTGC TGAG	IgGリバープライ マー	配列番号6
FcMrev1	ACTTTGCAC ACCAC	IgMリバープライ マー	配列番号7
FcMrev2	TTTGTTGCC GTTGG	IgMリバープライ マー	配列番号8
FcMrev3	GGGAATTCT CACAGG	IgMリバープライ マー	配列番号9
PYD5prev	GCGCCCTGA AAATACAGG TTTTC	pYDベクターのS fiI部位のすぐ上 流でハイブリッド形 成。相同組み換え効 率を向上させるため にscFvに付加す る約300bpの伸 長部を作製するた めに5107プライマ ーと組み合わせて使 用。	配列番号10

【0100】

合成の段階 2：

マスターミックス 45 μ L (80 μ L RT緩衝液 (10x)、160 μ L MgCl₂、80 μ L 0.1M DTT、40 μ L RNase Outを含む調製済み保存液) を各冷 50 μ L 反応液に添加し、試験管を 42℃で 2 分間置いた。Superscript II リバーストランスクリプターゼ 5 μ L を各反応試験管に添加し、42℃で 50 分間温置し、70℃に 15 分間移し、次いで 4℃に移した。RNase H 5 μ L を各反応に添加し、次いで 37℃で 20 分間温置した。4 回の IgG/M 反応を貯え、2 回の IgK 反応物を貯えた。

【実施例 3】

【0101】

ヒト脾臓 IgG/M VH 及び IgK VL DNA の作製

Sblattero 及び Bradbury (1998) Immunotechnology 3: 271-278 により定められたオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ヒト VH 及び VK 免疫グロブリンの様々な種類を増幅した。

【0102】

8 x 100 μ L 試料VH反応液

80 μ L 10 x PCR反応緩衝液
 8 μ L dNTPs (10 mM)
 32 μ L MgSO₄ (50 mM)
 8 μ L VHバックプライマー (20 μ M)
 8 μ L (各5 μ M / 20 μ M 3' プライマートータル) に対する、VH1 / 2、VH4 / 5、VH3 及び VH6 の当モル混合液
 16 μ L IgM / G cDNA
 8 μ L Platinum Taq HiFi
640 μ L dd水
 100 μ L / rxn

10

8 x 100 μ L 試料VK反応液

80 μ L 10 x PCR反応緩衝液
 8 μ L dNTPs (10 mM)
 32 μ L MgSO₄ (50 mM)
 8 μ L VKバックプライマー (20 μ M)
 8 μ L VK1、VK2 / 4、VK3 及び VK5 の当モル混合液 (各5 μ M / 20 μ M 3' プライマートータル)
 16 μ L IgK cDNA
 8 μ L Platinum Taq HiFi
640 μ L dd水
 100 μ L / rxn

20

PCRプログラム

1. 94 °Cで2分間
2. 94 °Cで30秒間
3. 55 °Cで30秒間
4. 68 °Cで30秒間
5. 段階2に戻って39回繰り返し
6. 68 °C5分間
7. 4 °Cで維持。

30

【0103】

1% GTGアガロースゲル上で反応物を精製した。Qiaquick Gel Extractionキットを用いて、適切なサイズ、約400 bpのバンドを精製した。スピんカラム1本あたりアガロースを含有するDNA 0.4 mgを使用した。55 °Cに予め温めたEB50 μ Lで試料を溶出した。類似試料を貯え、Nanodrop分光光度計 (Nanodrop Technologies、Wilmington、Delaware) を用いてA₂₆₀ / A₂₈₀を測定した。

40

【実施例4】

【0104】

VH / VK scFvの作製

重複伸長 (SOE) PCRにより重ね継ぐことによって、VH / VK scFvを作製した。VH For 及び VK Back プライマーは、scFv分子を作製するためにVH 及び VL 領域を連結する (Gly₄ Ser)₃ リンカーを生成させる相同性を有している。反応を次のように設定した。

50

【0105】

100 μ L / rxn (例としてVH10 / VKアセンブリ) で24 rxn

240 μ L 10xPlat Taq HiFi 緩衝液

24 μ L dNTPs (10mM)

96 μ L MgSO₄ (50mM)

24 μ L scFv Rev (20 μ M)

24 μ L scFv For (20 μ M)

141 μ L VH10バック (VH 24 pmol / 100 μ L rxnあたり1 pmol)

72 μ L 当モル混合液VK1、2、9及び12 DNA (24 pmol トータル / 100 μ L rxnあたり、各0.25 pmol VK)

24 μ L Platinum Taq HiFi

1755 μ L dd水

100 μ L / rxn

10

PCRプログラム

1. 94 $^{\circ}$ Cで2分間

2. 94 $^{\circ}$ Cで30秒間

3. 55 $^{\circ}$ Cで30秒間

4. 68 $^{\circ}$ Cで1分間

5. 段階2に戻り39x

6. 68 $^{\circ}$ Cで5分間

7. 4 $^{\circ}$ Cで維持。

20

【0106】

VH又はVKゲル断片に対して、上述したように、scFvバンド (約800 bp) をゲル精製した。

【0107】

pYD5' 300 bp断片とのSOE PCRでの使用のために、同様の試料を溜めた。

30

【0108】

形質転換効率を確実に向上させるために、発明者らは、pYDベクターにおけるscFv挿入部位 (SfiI) の相同5'の約300 bpを有する挿入DNA断片を操作した。ヒト脾臓scFvにこのホモロジーを付加するために、pYD1sTev SfiI部位のすぐ上流の領域に相補的であるプライマーを設計した (pYD5prev)。SOE PCRにより既存の脾臓scFvへ添加しようとする約300 bp断片を作製するために、pYD1 5'プライマー (5107) と組み合わせてこのプライマーを使用した。

【0109】

5107 / pYD5prev PCR

40

1 μ L pYDsTev (10 ng / μ L)

10 μ L 10xPlat Taq HiFi 緩衝液

4 μ L MgSO₄ (50mM)

1 μ L dNTPs (10mM)

1 μ L 5107 (20 μ M)

1 μ L pYD5prev (20 μ M)

1 μ L Platinum Taq HiFi

80 μ L dd水

100 μ L / rxn

50

PCRプログラム

1. 94℃で2分間
2. 94℃で30秒間
3. 55℃で30秒間
4. 68℃で30秒間
5. 段階2に戻り39x
6. 68℃で5分間
7. 4℃で維持。

10

【0110】

VH又はVKゲル断片に対して、上述したように、5107/pYD5prevバンド（約300bp）をゲル精製した。脾臓scFvとのSOE PCRでの使用のために、同様の試料を貯えた。

【0111】

scFv + 300 PCR (16x100μL rxn 混合液)

162μL 10xPlat Taq HiFi 緩衝液
 16.2μL dNTPs (10mM)
 64.8μL MgSO4 (50mM)
 16.2μL 5107 (20μM)
 16.2μL scFv For (20μM)
 32.4μL VH/VK scFv DNA
 16.2μL 5107/pYDprev5 DNA
 16.2μL Platinum Taq HiFi
1279.8μL dd水
 100μL / rxn

20

【0112】

上記のscFv反応に対するものと同様にPCR反応を行った。VH又はVKゲル断片に対して上記で述べたように、ScFv + 300bp（約1100bp）をゲル精製した。エレクトロポレーション反応での使用のために、同様の試料を貯えた。

30

【実施例5】**【0113】**

先行技術の酵母ライブラリ形質転換プロトコール

次のものは、先行技術の酵母形質転換プロトコールである。5mL YPD培地にEBY100コロニーを接種し（YPDプレート上に新たに画線接種）、30℃で一晩増殖させる。一晩培養物を用いて、600nmで0.1の吸収まで50mL培養物をYPD培地中に接種し、30℃で、600nmで約1.3から1.5の吸収になるまで約6時間、増殖させた。細胞は対数増殖期の初期から中期でなければならない。後期の対数又は静止期の細胞を用いると、形質転換効率が実質的に低下する。細胞が増殖している間、製造者のプロトコールに従い、Pellet Paintを用いて形質転換のためのDNAを沈殿させる。通常、約 5×10^7 個のライブラリを作製するために、挿入物5mg及びカットベクター1mgをそれぞれ含む、4個のエレクトロポレーションキュベットに入れるべきDNAを使用する。骨格のみの対照もまた調製する。DNAはペレット形態のままにしておく。挿入物：骨格比は、キュベット1個あたり少なくとも1mgを用いて、5：1から1：1で変動し得る。

40

【0114】

600nmで約1.3-1.5の吸収に細胞が到達したら、500μL Tris-DTT緩衝液を培養物に添加し、30℃で15分間振盪器で温置する。形質転換効率は、10-20分のDTT温置時間に対して比較的一定であるが、20分を超える温置の場合は

50

かなり低下する。4℃にて2500gで3分間、細胞をペレット化し、25mL氷冷E緩衝液（10mM Tris pH7.5、270mMスクロース、1mM MgCl₂）で洗浄する（例えば、すすぎ、再びペレット化し、上清を吸引）。1mL氷冷E緩衝液で細胞を再び洗浄し、300μLの総体積になるようにしてE緩衝液中で再懸濁する。細胞懸濁液（キュベット1個あたり50μL）の適切な体積中でDNA対照ペレットを再懸濁する。細胞を氷上で維持する。再懸濁細胞-DNA混合物50μLを予め冷却したエレクトロポレーションキュベットに対して等分し、パルスをかけるまで、エレクトロポレーションキュベットを氷上に置いておく。

【0115】

キュベットをジーンパルサーに搭載し、パルスコントローラーなしで0.54kV及び25μFでエレクトロポレーション処理する。温（30℃）YPD培地1mLをすぐにキュベットに添加する。エレクトロポレーションに対する典型的な時定数は、形質転換効率に大きな影響を与えず、約15msから40msの範囲である。

【0116】

パルスを受けたキュベットから15mL Falconチューブに細胞を移す。キュベットから残存細胞を回収するために、各キュベットをさらなるYPD培地1mLで洗浄する。30℃で1時間細胞を振盪する。2500gで5分間、細胞をペレット化し、上清を除去し、10mL SDCAA培地で再懸濁する。形質転換効率を調べるために、連続希釈液をSDCAAプレート上にプレーティングする。骨格のみの対照は、骨格+挿入物形質転換の1%未満の効率であるはずである。細胞懸濁液を100-1000mL SDCAA培地+pen-strep（1:100希釈）入りのフラスコに移し、30℃で24から48時間、温置する。8x10⁷ライブラリを作製するためにこの方法を使用し、この方法は、表3に記載の処理7に相当し、本発明の最適化プロトコール（実施例6参照）と比較して、0.4%の効率である。

【実施例6】

【0117】

本発明の方法2の酵母ライブラリ形質転換プロトコール

本発明は、例えば最大で2x10¹⁰のサイズの酵母細胞ライブラリ作製のための、酵母細胞を形質転換する、高効率で及び迅速な方法を提供する。最適な条件を同定するために、CaCl₂、MgCl₂、スクロース、ソルビトール、酢酸リチウム、ジチオスレイトール（DTT）の使用、エレクトロポレーション電圧、DNA投入量及び細胞体積を含む複数成分及び条件を試験し、滴定した。

【0118】

本発明のエレクトロポレーションプロトコールは、Suga及びHatakeyama（2003）Curr. Genet. 43:206-211; Neumannら（1996）Biophys. J.（1996）71:868-877; Thompsonら（1998）Yeast 14:565-571; Becker及びGuarente（1991）Methods Enzymol. 194, 182-187; Melihonら（1990）Biotechnology 8:223-227; Helmutら（2001）Analytical Biochem. 293:149-152のプロトコール；及び実施例5で提供されるプロトコールにおける改法である。

【0119】

酵母細胞の調製：静止期までS. セレビシエを一晩増殖させた。約0.3のOD₆₀₀に到達するまで、培養物のアリコートYPD培地100mLに接種した。遠心により回収する前に、OD₆₀₀が約1.6に到達するまで細胞を増殖させた。細胞をペレット化し、冷水で2回、50mLエレクトロポレーション緩衝液（1Mソルビトール/1mM CaCl₂）で1回洗浄し、30℃にて30分間、0.1M LiAc/10mM DTT 20mL中で温置した。50mLエレクトロポレーション緩衝液で再び細胞を洗浄し、次いで1mL体積に到達するまでエレクトロポレーション緩衝液100-200μL中で懸濁した。これは、およそ1から10x10⁹個の細胞/mLに相当する。

【0120】

エレクトロポレーション：細胞懸濁液100、200、300又は400 μL を1個のキューベットあたりのエレクトロポレーション処理に対して使用し、対応する3、6、9又は12 μg DNA挿入物とともに1、2、3又は4 μg の線状化ベクター（ベクター：挿入物比＝1：3）を使用した。BioRad Gene Pulserキューベット（0.2 cm電極ギャップ）中、2.5 kV及び25 μF で細胞をエレクトロポレーション処理した。典型的なエレクトロポレーション時定数は、3.0から4.5ミリ秒の範囲であった。エレクトロポレーション後、1 Mソルビトール：YPD培地の1：1混合液10 mL中で細胞を懸濁し、30 $^{\circ}\text{C}$ で1時間温置した。次に、細胞を回収し、20 g/Lグルコース、6.7 g/L酵母窒素塩基（アミノ酸なし）、5.4 g/L Na_2HPO_4 、8.6 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 及び5 g/Lカザミノ酸を含有したSD-UT培地（-ura、-trp）中で培養した。選択SD-UTプレート上に形質転換細胞の10倍連続希釈物をプレーティングすることによって形質転換体の数を調べた。図3を参照して、72時間後、コロニーを計数し、形質転換効率（A）を形質転換体の数/ μg ベクターDNAの平均±標準偏差として表し；収率（B）は、キューベット1個あたりの形質転換体の総数の平均±標準偏差として表した。

10

【0121】

LiAc、DTT、 CaCl_2 及びソルビトールの組み合わせの結果、常に、形質転換効率は、 1.6×10^6 個の細胞/mLの密度で、1 μg ベクターDNA及び100 μL 酵母細胞から、 $3 \pm 1 \times 10^7$ 個の形質転換体/ μg （ベクターDNA）（600 nmの光学密度により決定される場合、 $\text{OD} = 10^7$ 個の細胞と仮定）となった（図3）。このことから、酵母細胞のおおよそ2%が首尾よく形質転換され、1個のエレクトロポレーションキューベットから $3 \pm 1 \times 10^7$ 個のライブラリサイズが予想され得ることが示唆された。さらにより大きいライブラリを作製するために、個々のキューベットあたりの最適細胞体積を評価した。驚くべきことに、キューベット1個あたり100 μL から200 μL に細胞体積を増加させた場合、形質転換効率が、 1×10^8 個の形質転換体/ μg ベクターDNAへと顕著に向上した。0.2 cmギャップキューベット中の最大400 μL 細胞体積で、同じ密度及び細胞対DNA比を用いて、1個のキューベットから、 5×10^8 という規模のライブラリサイズを容易に作製することができた（図3）。

20

【0122】

このエレクトロポレーション法は、様々な操作者によって及び2種類の異なるエレクトロポレーター（BioRad Gene PulserTMモデル#1652076及びGene Pulser^(R) IIモデル#1652108）において、同様の形質転換効率が得られたので、再現性が高い。

30

【実施例7】

【0123】

LiAc、DTT、ソルビトール及び CaCl_2 の使用を比較することによる、S. セレビシエのエレクトロポレーション効率の上昇

表3は、実施例7の方法ならびにその方法における改法に対する、エレクトロポレーション効率、キューベット1個あたりの収率、%効率及び最大ライブラリサイズを示す。

40

【0124】

【表 3】

表 3

処理	エレクトロポレーション効率 ^a $\times 10^7$	キュベット1個あたりの収率 ^b $\times 10^7$	効率% ^c	最大ライブラリサイズ ^d
1. 組み合わせプロトコール	18.3 $\pm$ 2.5	73.2 $\pm$ 9.7	100	2 $\times 10^{10}$
2. LiAcなし	1.7 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.4	9	1.4 $\times 10^9$
3. DTTなし	0.81 $\pm$ 0.017	3.3 $\pm$ 0.07	4	8 $\times 10^8$
4. ソルビトール/MgCl ₂	11.4 $\pm$ 0.9	45.5 $\pm$ 3.5	62	9 $\times 10^9$
5. ソルビトールのみ	9 $\pm$ 1.8	36 $\pm$ 7.1	49	8 $\times 10^9$
6. スクロース/CaCl ₂	0.4 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 1.5	2	3.8 $\times 10^8$
7. スクロース/MgCl ₂	0.09 $\pm$ 0.01	0.4 $\pm$ 0.07	0.4	8 $\times 10^7$

^cベクターDNA 1 μ gあたりの形質転換体数

^d1キュベットエレクトロポレーション反応あたりの形質転換体の総数

^e本プロトコールを用いて得られた形質転換効率を100%と仮定

^f25のキュベットエレクトロポレーション反応が1日に行われると仮定

【0125】

組み合わせプロトコールは、ベクター4 μ g及びDNA挿入物12 μ gとの酵母懸濁液(1.6 $\times 10^9$ /mL)400 μ Lのエレクトロポレーションの、実施例7に記載のものである。その他の処理に対して、組み合わせプロトコールは、次の変更点を除き、実施例7に従った：(2) DTTのみで細胞を前処理し、(3) LiAcのみで細胞を前処理し、(4) CaCl₂の代わりにMgCl₂を使用した。(5) エレクトロポレーション緩衝液からCaCl₂を除き、(6) 1Mソルビトールの代わりに270mMスクロースを使用し、(7) エレクトロポレーション緩衝液として270mMスクロース/1mM MgCl₂を使用した。

【0126】

表2で示されるように、DTT又はLiAc前処理を除外した結果、それぞれ93.3%及び85.7%、効率が低下した。同様に、ソルビトールを除外するか又はこれをスクロースで置き換えることにより、96%を超える効率低下が起こった(表2及びデータを示さず。)。これは、浸透圧を安定させ、エレクトロポレーション後の酵母膜の完全性を支えるソルビトールの能力が、少なくとも部分的に、高形質転換効率を達成することに関与するという以前の知見と矛盾しない(Becker, D. M. 及びGuarente, L. (1991) Methods Enzymol. 194:182-7; Weaver, J. C. ら(1988) FEBS Lett. 229:30-4)。おそらく細胞膜へのDNAの結合を促進するために、エレクトロポレーション中にCaCl₂が存在すること(Neumann, E. ら(1996) Biophys. J. 71:868-77)は、それを除外した場合に形質転換効率が30%とあまり低下せず、MgCl₂でそれを置き換えても11%しか低下しなかったので、あまり重要なパラメーターではないと思われる。

【実施例8】

【0127】

エレクトロポレーション効率における電圧の影響

エレクトロポレーション効率における電圧の影響を調べるために及び最良のベクター：挿入物比を決定するために、実験を行った。実験を2回行った。0.2 cmギャップキュベット中で、0.5～2.5 kVの範囲のいくつかの電圧を使用し、1：1から1：10（w/w）の範囲のいくつかのベクター：挿入物比（ベクターDNA量は1 μgに一定に維持した。）で、実施例2のプロトコルを行った。上述のように、全ての反応物を濃縮し、SureCleanを用いて沈殿させ、dd水中でDNAペレットを再懸濁し、その後、細胞懸濁液を添加した。

【0128】

10

各実験において、上述のように酵母細胞を調製した。5回の反応に対して、ベクター／挿入物の体積を11.6 μLに固定した。

【0129】

実験#1

【0130】

【表4】

表4：ベクター：挿入物及び電場強度¹の関数としてのコロニー数を示すグラフ

	2.5 kV/cm	5 kV/cm	7.5 kV/cm	10 kV/cm	12.5 kV/cm
1：1	0	0	2	83	21
1：2	0	2	26	170	160
1：3	0	1	84	212	104
1：4	6	1	104	362	139
1：5	0	1	61	179	68
1：10	0	3	52	182	126

20

¹0.5から2.5 kVの範囲の電圧で0.2 cmギャップキュベット中でエレクトロポレーションを行った。

30

【0131】

【表5】

表5：ベクター：挿入物及び電場強度¹の関数としての遺伝子移入効率

移入効率	7.5 kV/cm	10 kV/cm	12.5 kV/cm
1：1	2.00E+06	8.30E+07	2.10E+07
1：2	2.60E+07	1.70E+08	1.60E+08
1：3	8.40E+07	2.12E+08	1.04E+08
1：4	1.04E+08	3.62E+08	1.39E+08
1：5	6.10E+07	1.79E+08	6.80E+07
1：10	5.20E+07	1.82E+08	1.26E+08

40

¹0.5から2.5 kVの範囲の電圧で0.2 cmギャップキュベット中でエレクトロポレーションを行った。

【0132】

結果：1.5から2.5の電圧範囲で1：1のベクター：挿入物比；1.0から2.5の電圧範囲で1：2のベクター：挿入物比；1.0から2.5の電圧範囲で1：3のベクター：挿入物比；0.5から2.5の電圧範囲で1：4のベクター：挿入物比；1.0か

50

ら 2.5 の電圧範囲で 1 : 5 のベクター：挿入物比；及び 1.0 から 2.5 の電圧範囲で 1 : 10 のベクター：挿入物比で、形質転換を検出した。全てのベクター：挿入物比に対して、2.0 kV の電圧を用いて、ピークコロニー数が達成された。最適条件は、1 : 4 のベクター：挿入物比及び 2.0 kV の電圧であると考えられる (3.62×10^8 の遺伝子移入効率が達成された。)。

【0133】

実験 # 2

【0134】

【表 6】

表 6：ベクター：挿入物及び電場強度¹の関数としてのコロニー数を示すグラフ

データセット 2	2.5 kV/cm	5 kV/cm	7.5 kV/cm	10 kV/cm	12.5 kV/cm
1 : 1	0	1	19	65	44
1 : 2	0	0	45	110	154
1 : 3	0	1	37	92	152
1 : 4	0	1	50	136	160
1 : 5	0	1	51	116	163
1 : 10	0	1	0	123	167

¹ 0.5 から 2.5 kV の範囲の電圧で 0.2 cm ギャップキュベット中でエレクトロポレーションを行った。

【0135】

【表 7】

表 7：ベクター：挿入物及び電場強度¹の関数としての遺伝子移入効率

移入効率	7.5 kV/cm	10 kV/cm	12.5 kV/cm
1 : 1	1.90E+07	6.50E+07	4.40E+07
1 : 2	4.50E+07	1.10E+08	1.54E+08
1 : 3	3.70E+07	9.20E+07	1.52E+08
1 : 4	5.00E+07	1.36E+08	1.60E+08
1 : 5	5.10E+07	1.16E+08	1.63E+08
1 : 10	0.00E+00	1.23E+08	1.67E+08

¹ 0.5 から 2.5 kV の範囲の電圧で 0.2 cm ギャップキュベット中でエレクトロポレーションを行った。

【0136】

結果：1.0 から 2.5 の電圧範囲で 1 : 1 のベクター：挿入物比；1.5 から 2.5 の電圧範囲で 1 : 2 のベクター：挿入物比；1.0 から 2.5 の電圧範囲で 1 : 3 のベクター：挿入物比；0.5 から 2.5 の電圧範囲で 1 : 4 のベクター：挿入物比；1.0 から 2.5 の電圧範囲で 1 : 5 のベクター：挿入物比；及び 1.0 から 2.5 の電圧範囲で 1 : 10 挿入物比で、形質転換を検出した (1.5 kV ではコロニーなし)。ベクター：挿入物比 1 : 1 に対して、2.0 kV の電圧を用いてピークコロニー数が達成された。全てのその他のベクター：挿入物比に対して、2.5 kV 電圧が最適であった。最適条件は、1 : 10 のベクター：挿入物比及び 2.5 kV の電圧であると考えられる。この実験の結果から、最適電圧は 2 - 2.5 kV であり、ベクターに対する挿入物の量を増加させても、1 : 2 の比を凌ぐ顕著な利点は得られないことが示される。

【0137】

実験#3：DNA投入量増加及び高電圧は最大形質転換効率に重要である（しかし、ベクター：挿入物比は重要ではない。）。

【0138】

同じ1：3のベクター：挿入物比に維持しながら、ベクターDNA 1、2、3、4又は8 μg とともに400 μL 酵母懸濁液をエレクトロポレーション処理することによって、形質転換効率におけるDNA量の影響を調べた。実施例7に記載のようにS. セレビシエを処理した。1キュベットあたり1、2、3又は4 μg ベクターを用いて、400 μL 酵母細胞懸濁液（ 1.6×10^9 個の細胞/mL）をエレクトロポレーション処理した（ベクター：挿入物比=1：3に維持）。図4を参照して、72時間後、コロニー数を調べ、（A）形質転換効率（ベクターDNA 1 μg あたりの平均形質転換体±標準偏差）及び（B）形質転換収率（1個のキュベットあたりの形質転換体の総数±標準偏差）として表した。さらに、（C）2又は2.5 kV及び様々なベクター：挿入DNA比で400 μL 酵母懸濁液をエレクトロポレーション処理した。ベクターDNA 1 μg あたりの平均形質転換体として形質転換効率を表す。

【0139】

興味深いことに、各形質転換に対して4 μg ベクターDNA以下を使用した場合、形質転換効率は顕著に変化せず、8 μg ベクターDNA投入量では僅かに低下した（図4A）。予想されるように、形質転換ライブラリサイズの収率は、DNA投入量の増加に対応して向上した（図4B）。全体として、4 μg 線状化ベクターの使用は、最も都合よく効率的な条件であることが分かった。（1：3のベクター：挿入物比を達成するための）12 μg DNA挿入物を減少させることができるか否かを調べるために、様々なベクター：挿入物比を試験した。結果から、形質転換効率に悪影響を与えることなく、この比を1：1.5という低い値にすることができると示される（図4C）。しかし、ベクター：挿入物比が1：1より小さいか又は1：5より大きい場合、形質転換効率の低下が観察された（データ示さず。）。さらに、エレクトロポレーション電圧設定は、2.5 kVから2 kV以下にエレクトロポレーション電圧を低下させると形質転換効率が顕著に低下するので、重要であることが分かった（図4C及びデータ示さず。）。

【実施例9】

【0140】

ナイーブヒト脾臓抗体ライブラリの多様性及び生産性

大きなヒト抗体ライブラリを作製するために、本発明のエレクトロポレーションプロトコルを使用した。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）及び既に報告されているプライマー（Sblattero, D. 及びBradbury, A. (1998) Immunotechnology 3: 271-8）を使用して、市販の脾臓ポリARNAからヒトVH及びVk cDNA断片を個別に増幅した。各生殖細胞系列ファミリーがライブラリにおいて等しく示されるように、Vk断片を均等に一緒に貯えた。重複PCRにより、VH及び貯えたVk断片からScFv断片を個別に調製した。線状ベクターDNAと混合されたこれらのScFv断片から、エレクトロポレーションにより複数の酵母ライブラリを作製し、全てのVH生殖細胞系列配列の均等な表示を維持するために、均等に一緒に貯えた。ScFv生殖細胞系列組成物を分析するために、多数の酵母コロニーの配列決定を行い、その結果から多様性が高いことが確認された。稀少なVH7生殖細胞系列遺伝子を除き、全てのその他の生殖細胞系列遺伝子ファミリーが同定され、それらの表示は、発明者らのライブラリでのそれらの生殖細胞系列遺伝子数とおおよそ比例していた（表8参照）。同一のVH配列は同定されなかったもので、ライブラリ多様性は、Vkに対しては 10^4 の最大理論的多様性及びVHに対しては 10^8 の最大理論的多様性（約 10^8 個のドナーB細胞）と仮定すれば、 10^{12} の規模である可能性は95%であると推定される（これはライブラリサイズによってのみ制限される。）。この高効率酵母エレクトロポレーションプロトコルを用いることにより、典型的なファージライブラリのサイズに匹敵するサイズの酵母ライブラリを構築することが現在可能である（Hoogenboom, H. R. (

2002) Methods Mol. Biol. 178:1-37; Sblattero、D. 及びBradbury、A. (2000) Nat. Biotechnol. 18:75-80)。実際に、単純に20個のキュベットにエレクトロポレーションの規模を大きくすることにより、 2×10^{10} 酵母ライブラリを作製ために要する時間は僅か1日となり、 10^9 酵母ライブラリは現在、親和性成熟又はその他の最適化目的のために日常的に作製されている。

【0141】

【表8】

表8：ナイーブヒト脾臓抗体ライブラリの多様性

VH生殖細胞系列ファミリー	理論的分布 (%)	ナイーブヒト脾臓ライブラリの実際の分布 (%) (n=347)
VH1	21	15
VH2	7	5
VH3	50	62
VH4	16	16
VH4 (DP63)	2.5	3.2
VH5	0.5	0.3
VH6	2.5	1.5
VH7	0.5	0

【0142】

構築されたライブラリが適度に優れた親和性を有する抗体を産生することを明らかにするために、最初にライブラリサイズを約 10^7 個細胞に縮小するために磁気活性化細胞ソーティングを行い、次いで基本的に既に記載のようにFACSを複数回行うことにより、ヒト腫瘍壊死因子 α (TNF α) に対してヒト脾臓抗体ライブラリを選択した (Chao、G. ら (2006) Nat. Protoc. 1:755-68; Feldhaus、M. J. ら (2003) Nat. Biotechnol. 21:163-70)。TNF α に対する複数の結合物が同定され、それらのVHは、VH1、VH3及びVH4由来であり、V κ はV κ 1及びV κ 2ヒト生殖細胞系列配列由来であり、このことから、このライブラリは、実際に、多様な抗体プールから抗原結合物を生み出したことが示される。scFvのうち1つは、TNF α に対して、4 nMの親和性を示し、別のものは40 nMの親和性を示した。IgG転換時に、4 nM結合物は同様の結合親和性を維持し (ELISAにより1.5 nM)、一方、40 nM結合物は親和性の顕著な向上を示した (ELISAにより0.3 nM)。この見かけの親和性の上昇は、同じホモ三量体TNF α タンパク質で2つのTNF α と相互作用する変換IgGの親和力によるものであり得る。さらなるライブラリ選択により、このライブラリからヒトIL-18に対する低ナノモル親和性抗体も同定された (データは示さず。)。

【0143】

最適のエレクトロポレーション条件を使用することによって、日常的に 1×10^8 酵母形質転換体/ μ gベクターDNAの酵母形質転換効率を達成することができる。この形質転換効率は最小の細胞体積 (100 μ L) で達成されるので、自動及びマルチウェルエレクトロポレーション装置に非常に受け入れられ易い。例えば、96-ウェルエレクトロポレーションプレートにおいてエレクトロポレーションを設定することによって、 9.6×10^9 のライブラリサイズを達成することができることを構想し得る。このマルチウェルエレクトロポレーションが手動又は自動操作により10から11回繰り返される場合、1日で 10^{11} 個の形質転換体より大きい酵母ライブラリを容易に構築することができる。構築されたライブラリのこの効率及び可能なサイズは、典型的なファージライブラリにほ

ば等しく、酵母抗体ディスプレイ及び酵母ツーハイブリッド相互作用スクリーニングなど、本ライブラリに適用し得る様々な適用に対して、構築された酵母ライブラリの使用の成功率を最大化することにおいて非常に望ましい。

【0144】

【表9】

参考文献

1. Chao, G. et al. (2006) *Nat. Protoc.* 1:755-68.
2. Gai, S. A. and Wittrup, K. D. (2007) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17:467-73. 10
3. Griffiths, A. D. et al. (1994) *EMBO J.* 13:3245-60.
4. He, M. and Khan, F. (2005) *Expert Rev. Proteomics* 2:421-30.
5. Hoogenboom, H. R. (2002) *Methods Mol. Biol.* 178:1-37.
6. Hoogenboom, H. R. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1105-16.
7. Hoet, R. M. et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:344-8.
8. Rothe, C. et al. (2008) *J. Mol. Biol.* 376:1182-200.
9. Lee, H. W. et al. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346:896-903.
10. Lipovsek, D. et al. (2007) *J. Mol. Biol.* 368:1024-41.
11. Segal, L. et al. (2007) *Bioinformatics* 23:i440-9.
12. Becker, D. M. and Guarente, L. (1991) *Methods Enzymol.* 194:182-7.
13. Helmuth, M. et al. (2001) *Anal. Biochem.* 293:149-52. 20
14. Neumann, E. et al. (1996) *Biophys. J.* 71:868-77.
15. Simon, J. R. (1993) *Methods Enzymol.* 217:478-83.
16. Suga, M. and Hatakeyama, T. (2003) *Curr. Genet.* 43:206-11.
17. Thompson, J. R. et al. (1998) *Yeast* 14:565-71.
18. Gietz, R. D. et al. (1995) *Yeast* 11:355-60.
19. Brzobohaty, B. and Kovac, L. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132:3089-93.
20. Weaver, J. C. et al. (1988) *FEBS Lett.* 229:30-4.
21. Sblattero, D. and Bradbury, A. (1998) *Immunotechnology* 3:271-8.
22. Sblattero, D. and Bradbury, A. (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:75-80.
23. Feldhaus, M. J. et al. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:163-70. 30

【0145】

参照による組み込み

本願を通して引用され得る、全ての引用参照物（参考文献、特許、特許出願及びウェブサイトを含む。）の内容は、本明細書により、参照により明確に組み込まれる。本発明の実施は、別段の断りがない限り、当技術分野で周知である、細胞エレクトロポレーション及び酵母細胞生物学の従来技術を使用する。

【0146】

同等性

本発明は、本発明の精神又は不可欠な特徴から逸脱することなく、その他の具体的な形態で実施され得る。従って、先行する実施形態は、全ての点で、本明細書中に記載される本発明の制限ではなく、例示的なものであるとみなされるものである。このように、本発明の範囲は、先行する記述ではなく添付の特許請求の範囲により示され、従って、本特許請求の範囲の同等性の意義及び範囲内で行われる変更は全て、本発明に包含されるものとする。 40

【図 1】

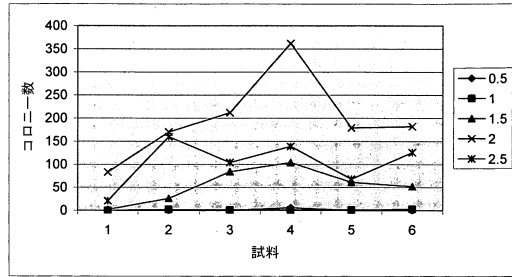


Figure 1

【図 2】

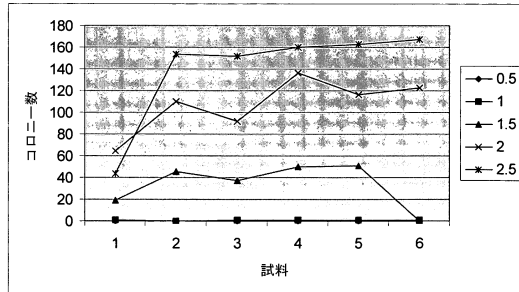


Figure 2

【図 4】

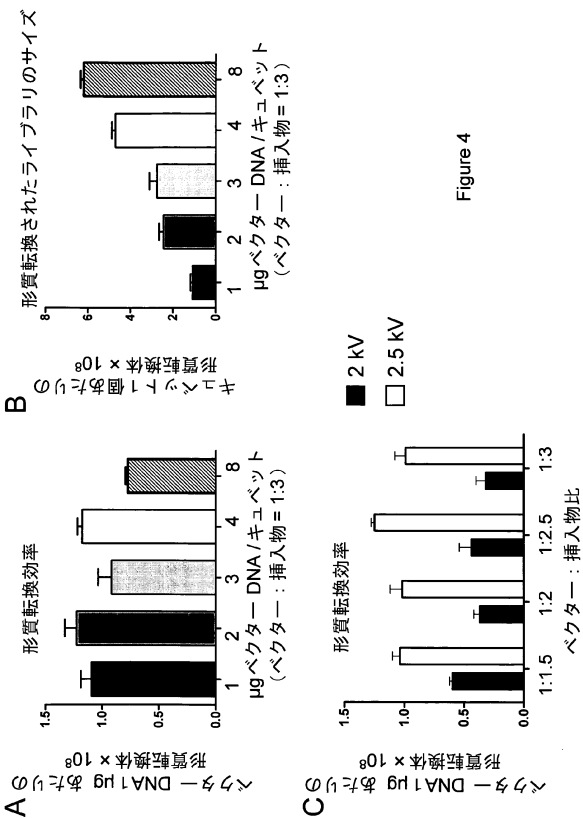


Figure 4

【図 3】

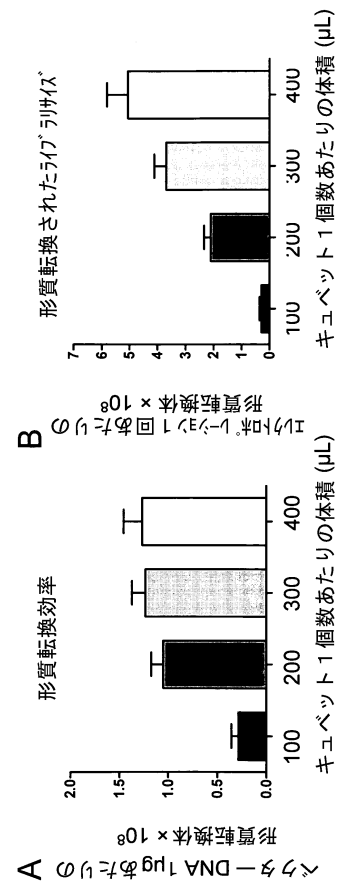


Figure 3

【配列表】

0005647009000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ペレス, ジェニファー・エム
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01605、ウースター、ロングメドウ・アベニュー・135
- (72)発明者 ベナトウィル, ロレンゾ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02155、メッドフォード、ジェローム・ストリート・17、アパートメント・2

審査官 櫛引 明佳

- (56)参考文献 Suga and Hatakeyama, Curr Genet, Vol.43, p.206-211,2003
David et al, Methods in Enzymology, Vol.388, p.348-358,2004
Takahashi and Ide, Analytical Biochemistry, Vol.293, p.152-155,2001
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
Caplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
PubMed