

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-525359

(P2017-525359A)

(43) 公表日 平成29年9月7日 (2017. 9. 7)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 5 O
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-508541 (P2017-508541)
 (86) (22) 出願日 平成27年8月14日 (2015. 8. 14)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年4月7日 (2017. 4. 7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/045260
 (87) 国際公開番号 W02016/025825
 (87) 国際公開日 平成28年2月18日 (2016. 2. 18)
 (31) 優先権主張番号 62/038, 095
 (32) 優先日 平成26年8月15日 (2014. 8. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509240479
 ダニスコ・ユーエス・インク
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94
 304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロ
 ード 925
 (74) 代理人 100071010
 弁理士 山崎 行造
 (74) 代理人 100118647
 弁理士 赤松 利昭
 (74) 代理人 100123892
 弁理士 内藤 忠雄
 (74) 代理人 100169993
 弁理士 今井 千裕
 (74) 代理人 100185535
 弁理士 逢坂 敦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質の産生改善のための組成物及び方法

(57) 【要約】

本開示の態様は、例えば、膜結合型銅輸送 ATPアーゼ及び可溶性銅トランスポーターなど、宿主細胞での銅輸送に関与する1つ又は2つ以上のタンパク質の発現レベルを操作することによる、宿主細胞から分泌される銅酵素の発現の改良方法に関する。本開示は、そのような改良された宿主細胞と、目的とする1つ又は2つ以上の銅酵素を含む改良された宿主細胞由来の生成物とを含む組成物も提供する。

【選択図】 図 1 A

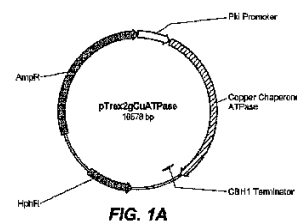


FIG. 1A

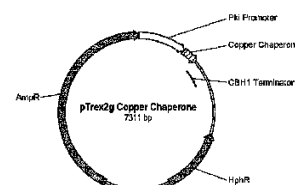


FIG. 1B

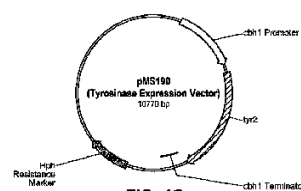


FIG. 1C

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

宿主細胞からの銅酵素の産生方法であって、
銅酵素を発現する宿主細胞で銅金属シャペロンを過剰発現させることと、
前記銅酵素を産生するのに十分な条件下で前記宿主細胞を培養することと、を含み、
前記宿主細胞が、実質的に同じ培養条件下で培養されたときに前記銅金属シャペロンを過剰発現しない対応する宿主細胞と比較して、増加した量の前記銅酵素を産生する、方法。

【請求項 2】

前記銅酵素が、前記宿主細胞から分泌される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記銅酵素が、溶解性多糖モノオキシゲナーゼ (L P M O)、ラッカーゼ、チロシナーゼ、アミノオキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、カテコールオキシダーゼ、ドーパミン - モノオキシゲナーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、L - アスコルビン酸オキシダーゼ、ペプチジルグリシンモノオキシゲナーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ケルセチン 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ、及びスーパーオキシドジスムターゼからなる群から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記銅酵素が、前記宿主細胞に内因性である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記銅酵素が、前記宿主細胞に異種性である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記銅酵素及び / 又は前記銅金属シャペロンの発現が、前記宿主細胞由来のプロモーターによって制御される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記宿主細胞が、トリコデルマ・リーゼイ (T . reesei) 細胞であり、前記プロモーターが、トリコデルマ・リーゼイ由来のビルビン酸キナーゼ (p k i) 又はセロビオヒドロラーゼ I (c b h 1) プロモーターである、請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記宿主細胞が、少なくとも 1 つの追加の銅酵素を発現し、前記少なくとも 1 つの追加の銅酵素の産生レベルが、実質的に同じ培養条件下で前記銅金属シャペロンを過剰発現しない対応する宿主細胞と比較して増加している、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記銅金属シャペロンが、膜結合型銅輸送 A T P アーゼである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記膜結合型銅輸送 A T P アーゼが、配列番号 6 と少なくとも 60 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記膜結合型銅輸送 A T P アーゼが、表 2 に列記されるものから選択される、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記銅金属シャペロンが、可溶性銅トランスポーターである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記可溶性銅トランスポーターが、配列番号 3 と少なくとも 60 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載の方法。

50

【請求項 14】

前記可溶性銅トランスポーターが、表 1 に列記されるものから選択される、請求項 12 又は 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記宿主細胞で第 2 の銅金属シャペロンを過剰発現させることを更に含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記第 1 の銅金属シャペロンが、配列番号 6 と少なくとも 60 % 同一であるアミノ酸配列を含む膜結合型銅輸送 ATP アーゼであり、前記第 2 の銅金属シャペロンが、配列番号 3 と少なくとも 60 % 同一であるアミノ酸配列を含む可溶性銅トランスポーターである、請求項 15 に記載の方法。

10

【請求項 17】

前記宿主細胞が、糸状菌宿主細胞である、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記糸状菌宿主が、アスペルギルス、アクレモニウム、アウレオバシジウム、ボーベリア、セファロスポリウム、セリポリオブシス、ケトミウム・ペシロマイセス、クリソスポリウム、クラビセプス、コキオボラス、クリプトコッカス、シアツス、エンドチア、エンドチア・ムコール、フザリウム、ギロクラディウム、フミコーラ、マグナボルテ、ミセリオフトラ、ミロテシウム、ムコール、ニューロスボラ、ファネロカエテ、ボドスポラ、ペシロマイセス、ペニシリウム、ピリキュラリア、リゾムコール、リゾプス、シゾフィラム、スタゴノスポラ、タラロマイセス、トリコデルマ、サーモマイセス、サーモアスカス、チセラピア、トリポクラジウム、トリコフィトン、トラメテス、及びプレウロタスからなる群から選択される、請求項 17 に記載の方法。

20

【請求項 19】

前記糸状菌宿主細胞が、トリコデルマ・リーゼイ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・オリザエ、又はタラロマイセス・エメルソニ宿主細胞である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

前記過剰発現させることが、前記宿主細胞での転写因子 Mac 1 の発現を増加させることを含む、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 21】

前記 Mac 1 の発現を増加させることが、Mac 1 発現ベクターを前記宿主細胞に導入することを含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

宿主細胞の銅毒性の低減方法であって、

宿主細胞で銅金属シャペロンを過剰発現させることを含み、前記宿主細胞が、前記銅金属シャペロンを過剰発現しない対応する宿主細胞と比較して低減された銅毒性を有する、方法。

40

【請求項 23】

前記宿主細胞が、銅酵素を過剰発現する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

細胞培養プロセス中の銅濃度の低減方法であって、

銅を含む細胞培養培地で銅金属シャペロンを過剰発現する宿主細胞を培養して、細胞培養プロセスを産生することを含み、結果として生じる細胞培養プロセス中の銅濃度が、実質的に同じ培養条件下で実質的に同じ細胞培養培地で培養されたときに前記銅金属シャペロンを過剰発現しない対応する宿主細胞から得られる細胞培養プロセスの銅濃度と比較して減少している、方法。

【請求項 25】

組換え宿主細胞であって、

50

銅酵素をコードする第 1 のポリヌクレオチドと、
銅金属シャペロンをコードする第 2 のポリヌクレオチドと、を含み、
前記銅酵素が、前記宿主細胞で発現し、前記銅金属シャペロンが、前記宿主細胞で過剰発現し、

前記銅酵素の発現レベルが、実質的に同じ培養条件下で前記銅金属シャペロンを過剰発現しない対応する宿主細胞と比較して、前記宿主細胞で増加している、組換え宿主細胞。

【請求項 26】

前記銅酵素が、前記宿主細胞から分泌される、請求項 25 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 27】

前記銅酵素が、溶解性多糖モノオキシゲナーゼ (L P M O)、ラッカーゼ、チロシナーゼ、アミノオキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、カテコールオキシダーゼ、ドーパミン - モノオキシゲナーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、L - アスコルビン酸オキシダーゼ、ペプチジルグリシンモノオキシゲナーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ケルセチン 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ、及びスーパーオキシドジスムターゼからなる群から選択される、請求項 25 又は 26 に記載の組換え宿主細胞。

10

【請求項 28】

前記銅酵素が、表 3 に列記されるものから選択される、請求項 27 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 29】

前記銅酵素が、前記宿主細胞に異種性である、請求項 25 ~ 28 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

20

【請求項 30】

前記銅酵素及び / 又は前記銅金属シャペロンの発現が、前記宿主細胞のプロモーターによって制御される、請求項 25 ~ 29 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 31】

宿主細胞が、トリコデルマ・リーゼイであり、前記プロモーターが、トリコデルマ・リーゼイ由来の p k i 又は c b h 1 プロモーターである、請求項 30 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 32】

前記第 2 のポリヌクレオチドが、配列番号 6 と少なくとも 60 % 同一であるアミノ酸配列を含む膜結合型銅輸送 A T P アーゼをコードする、請求項 25 ~ 31 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

30

【請求項 33】

前記第 2 のポリヌクレオチドが、配列番号 3 と少なくとも 60 % 同一であるアミノ酸配列を含む可溶性銅トランスポーターをコードする、請求項 25 ~ 32 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 34】

前記宿主細胞が、第 2 の銅金属シャペロンをコードする第 3 のポリヌクレオチドを更に含む、請求項 25 ~ 33 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 35】

前記第 1 の銅金属シャペロンが、配列番号 6 と少なくとも 60 % 同一であるアミノ酸配列を含む膜結合型銅輸送 A T P アーゼであり、前記第 2 の銅金属シャペロンが、配列番号 3 と少なくとも 60 % 同一であるアミノ酸配列を含む可溶性銅トランスポーターである、請求項 34 に記載の組換え宿主細胞。

40

【請求項 36】

前記組換え宿主細胞が、糸状菌宿主細胞である、請求項 25 ~ 35 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 37】

前記糸状菌宿主が、アスペルギルス、アクレモニウム、アウレオバシジウム、ボーベリア、セファロスポリウム、セリポリオブシス、ケトミウム・ベシロマイセス、クリソスポ

50

リウム、クラビセプス、コキオボラス、クリプトコッカス、シアツス、エンドチア、エンドチアムコール、フザリウム、ギロクラディウム、フミコーラ、マグナボルテ、ミセリオフトラ、ミロテシウム、ムコール、ニューロスボラ、ファネロカエテ、ボドスボラ、ペシロマイセス、ペニシリウム、ピリキュラリア、リゾムコール、リゾプス、シゾフィラム、スタゴノスボラ、タラロマイセス、トリコデルマ、サーモマイセス、サーモアスカス、チエラピア、トリポクラジウム、トリコフィトン、トラメテス、及びブレウロタスからなる群から選択される、請求項 36 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 38】

前記糸状菌宿主細胞が、トリコデルマ・リーゼイ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・オリザエ、又はタラロマイセス・エメルソニ宿主細胞である、請求項 36 に記載の組換え宿主細胞。

10

【請求項 39】

前記組換え宿主細胞が、Mac1 を過剰発現し、Mac1 の過剰発現が、前記宿主細胞での前記銅金属シャペロンの過剰発現をもたらす、請求項 25 ~ 38 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 40】

請求項 25 ~ 39 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞の培養物から得られる上清。

【請求項 41】

請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法を使用して得られる上清。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

（関連出願の相互参照）

本出願は、参照により全体が本明細書に援用される、2014年8月15日に出願された米国仮特許出願第62/038,095号の優先権を主張するものである。

【0002】

（配列表）

米国特許法施行規則第1.52条に従う、EFSにより提出された配列表が、参照により本明細書に援用される。EFSにより提出された配列表のテキストファイルは、2015年7月10日に作成されたファイル「40456WOPCT__ST25.txt」を含み、44キロバイトのサイズである。

30

【0003】

（発明の分野）

本開示の態様は、例えば、膜結合型銅輸送ATPアーゼ及び可溶性銅トランスポーターなど、1つ又は2つ以上の銅金属シャペロンの発現量を操作することにより、宿主細胞から分泌される銅酵素の発現の改良方法に関する。本開示は、そのような改良された宿主細胞と、目的とする1つ又は2つ以上の銅酵素を含有する改良された宿主細胞から作製された生成物とを含む組成物も提供する。

【背景技術】

【0004】

40

銅は、多くの酵素（ここでは銅酵素と称する）の重要なコファクターである、酸化還元活性を有する遷移金属である。しかしながら、細胞内の遊離銅の濃度は、その毒性のため、低濃度に保たなければならない。すなわち、全細胞中の銅の0.01%未満が細胞質内に遊離しており、大部分の銅は、その細胞毒性作用を防止するために、メタロチオネインにより結合、キレート化される。更に、細胞の区画の違いにより銅濃度が異なり、ミトコンドリアでは細胞質より銅濃度が高く、またゴルジ体よりも濃度が高い。

【0005】

このような酵素を過剰発現させるように設計された組換え宿主細胞において、1つ又は2つ以上の機能性銅酵素を産生するための工業的環境において、細胞内の遊離銅の利用可能性は限られている。上記のような細胞内の銅の偏りにより、この問題は、銅酵素を分泌

50

させる際に特に顕著となる。しかしながら、宿主細胞を培養しながら正しいバランスを維持できる量で追加の銅を供給すること、すなわち、宿主細胞に毒性を与えることなく、機能性の銅酵素の分泌生産を促進することは、技術的にかなり困難である。

【 0 0 0 6 】

宿主細胞からの銅酵素の生産に関連する問題に加えて、製造プラントからの廃液中の許容銅濃度も規制されている。すなわち、銅酵素の培養生産プロセスに添加できる銅の量にも限度が存在する。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

以上より、組み換え宿主細胞を開発し、当該宿主細胞を用いて培養プロセスにおいて銅酵素の生産を向上させる方法に対するニーズが存在する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

本発明の態様は、少なくとも部分的には、望ましい組み換え宿主細胞（例えば糸状菌宿主細胞）における1つ又は2つ以上の銅金属シャペロンの発現増加により、宿主細胞における銅酵素の分泌生産を向上させることができる、という発見に基づく。したがって、1つ又は2つ以上の銅金属シャペロンの発現が増加した組み換え宿主細胞が本明細書で提供され、当該細胞は、実質的に同じ培養条件下で1つ又は2つ以上の銅金属シャペロンの発現増加を示さない親である宿主細胞と比較し、銅酵素の産生/分泌能が向上している。銅酵素をこれらの宿主細胞から産生する方法、並びにそのような宿主細胞から産生される銅酵素を含有する組成物も提供される。

【 0 0 0 9 】

本発明の組成物及び方法において用いられる分泌される銅酵素の例としては、限定されないが、溶解性多糖モノオキシゲナーゼ（LPMO）、ラッカーゼ、チロシナーゼ、アミノオキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、カテコールオキシダーゼ、ドーパミンベータ-モノオキシゲナーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ヘキサースオキシダーゼ、L-アスコルビン酸オキシダーゼ、ペプチジルグリシンモノオキシゲナーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ケルセチン2,3-ジオキシゲナーゼ及びスーパーオキシドジスムターゼが挙げられる。

【 0 0 1 0 】

本発明の態様には、限定されないが、以下のものが含まれる。

1. 宿主細胞からの銅酵素の産生方法であって、銅酵素を発現する宿主細胞で銅金属シャペロンを過剰発現させることと、銅酵素を産生するのに十分な条件下で前記宿主細胞を培養することと、を含み、前記宿主細胞が、実質的に同じ培養条件下で培養されたときに前記銅金属シャペロンを過剰発現しない対応する宿主細胞と比較して、増加した量の前記銅酵素を産生する、方法。

2. 前記銅酵素が、前記宿主細胞から分泌される、態様1に記載の方法。

3. 前記銅酵素が、溶解性多糖モノオキシゲナーゼ（LPMO）、ラッカーゼ、チロシナーゼ、アミノオキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、カテコールオキシダーゼ、ドーパミン-モノオキシゲナーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ヘキサースオキシダーゼ、L-アスコルビン酸オキシダーゼ、ペプチジルグリシンモノオキシゲナーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ケルセチン2,3-ジオキシゲナーゼ、及びスーパーオキシドジスムターゼからなる群から選択される、態様1又は2に記載の方法。

4. 前記銅酵素が、前記宿主細胞に内因性である、態様1～3のいずれかに記載の方法。

5. 前記銅酵素が、前記宿主細胞に異種性である、態様1～4のいずれかに記載の方法。

6. 前記銅酵素及び/又は前記銅金属シャペロンの発現が、前記宿主細胞由来のプロモーターによって制御される、態様1～5のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

7. 前記宿主細胞が、トリコデルマ・リーゼイ (T. reesei) 細胞であり、前記プロモーターが、トリコデルマ・リーゼイ由来のピルビン酸キナーゼ (p k i) 又はセロピオヒドロラーゼ I (c b h 1) プロモーターである、態様 6 に記載の方法。

8. 前記宿主細胞が、少なくとも 1 つの追加の銅酵素を発現し、前記少なくとも 1 つの追加の銅酵素の産生レベルが、実質的に同じ培養条件下で前記銅金属シャペロンを過剰発現しない対応する宿主細胞と比較して増加している、態様 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

9. 前記銅金属シャペロンが、膜結合型銅輸送 A T P アーゼである、態様 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

10. 前記膜結合型銅輸送 A T P アーゼが、配列番号 6 と少なくとも 60 % 同一であるアミノ酸配列を含む、態様 9 に記載の方法。

11. 前記膜結合型銅輸送 A T P アーゼが、表 2 に列記されるものから選択される、態様 9 又は 10 に記載の方法。

12. 前記銅金属シャペロンが、可溶性銅トランスポーターである、態様 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

13. 前記可溶性銅トランスポーターが、配列番号 3 と少なくとも 60 % 同一であるアミノ酸配列を含む、態様 12 に記載の方法。

14. 前記可溶性銅トランスポーターが、表 1 に列記されるものから選択される、態様 12 又は 13 に記載の方法。

15. 前記宿主細胞で第 2 の銅金属シャペロンを過剰発現させることを更に含む、態様 1 ~ 14 のいずれかに記載の方法。

16. 前記第 1 の銅金属シャペロンが、配列番号 6 と少なくとも 60 % 同一であるアミノ酸配列を含む膜結合型銅輸送 A T P アーゼであり、前記第 2 の銅金属シャペロンが、配列番号 3 と少なくとも 60 % 同一であるアミノ酸配列を含む可溶性銅トランスポーターである、態様 15 に記載の方法。

17. 前記宿主細胞が、糸状菌宿主細胞である、態様 1 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

18. 前記糸状菌宿主が、アスペルギルス、アクレモニウム、アウレオバシジウム、ボレーリア、セファロスポリウム、セリポリオプシス、ケトミウム・ベシロマイセス、クリソスポリウム、クラビセプス、コキオボラス、クリプトコッカス、シアツス、エンドチア、エンドチア・ムコール、フザリウム、ギロクラディウム、フミコーラ、マグナボルテ、ミセリオフトラ、ミロテシウム、ムコール、ニューロスボラ、ファネロカエテ、ポドスポラ、ベシロマイセス、ペニシリウム、ピリキュラリア、リゾムコール、リゾプス、シゾフィラム、スタゴノスポラ、タラロマイセス、トリコデルマ、サーモマイセス、サーモアスカス、チエラピア、トリボクラジウム、トリコフィトン、トラメテス、及びブレウロタスからなる群から選択される、態様 17 に記載の方法。

19. 前記糸状菌宿主細胞が、トリコデルマ・リーゼイ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・オリザエ、又はタラロマイセス・エメルソニ宿主細胞である、態様 17 に記載の方法。

20. 前記過剰発現させることが、前記宿主細胞での転写因子 M a c 1 の発現を増加させることを含む、態様 1 ~ 19 のいずれかに記載の方法。

21. 前記 M a c 1 の発現を増加させることが、M a c 1 発現ベクターを宿主細胞に導入することを含む、態様 20 に記載の方法。

22. 宿主細胞の銅毒性の低減方法であって、宿主細胞で銅金属シャペロンを過剰発現させることを含み、前記宿主細胞が、前記銅金属シャペロンを過剰発現しない対応する宿主細胞と比較して低減された銅毒性を有する、方法。

23. 前記宿主細胞が、銅酵素を過剰発現する、態様 22 に記載の方法。

24. 細胞培養プロセス中の銅濃度の低減方法であって、銅を含む細胞培養培地で銅金属シャペロンを過剰発現する宿主細胞を培養して、細胞培養プロセスを生成することを含み、結果として生じる細胞培養プロセス中の銅濃度が、実質的に同じ培養条件下で実質的に同じ

10

20

30

40

50

細胞培養培地で培養されたときに前記銅金属シャペロンを過剰発現しない対応する宿主細胞から得られる細胞培養ブ罗斯の銅濃度と比較して減少している、前記方法。

25．組換え宿主細胞であって、銅酵素をコードする第1のポリヌクレオチドと、銅金属シャペロンをコードする第2のポリヌクレオチドと、を含み、前記銅酵素が、前記宿主細胞で発現し、前記銅金属シャペロンが、前記宿主細胞で過剰発現し、前記銅酵素の発現レベルが、実質的に同じ培養条件下で前記銅金属シャペロンを過剰発現しない対応する宿主細胞と比較して、前記宿主細胞で増加している、組換え宿主細胞。

26．前記銅酵素が、前記宿主細胞から分泌される、態様25に記載の組換え宿主細胞。

27．前記銅酵素が、溶解性多糖モノオキシゲナーゼ(LPMO)、ラッカーゼ、チロシナーゼ、アミノオキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、カテコールオキシダーゼ、ドーパミン - モノオキシゲナーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ヘキサースオキシダーゼ、L-アスコルビン酸オキシダーゼ、ペプチジルグリシンモノオキシゲナーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ケルセチン2,3-ジオキシゲナーゼ、及びスーパーオキシドジスムターゼからなる群から選択される、態様25に記載の組換え宿主細胞。

28．前記銅酵素が、表3に列記されるものから選択される、態様27に記載の組換え宿主細胞。

29．前記銅酵素が、前記宿主細胞に異種性である、態様25～28のいずれか1つに記載の組換え宿主細胞。

30．前記銅酵素及び/又は前記銅金属シャペロンの発現が、前記宿主細胞のプロモーターによって制御される、態様25～29のいずれか1つに記載の組換え宿主細胞。

31．宿主細胞が、トリコデルマ・リーゼイであり、前記プロモーターが、トリコデルマ・リーゼイ由来のpki又はcbh1プロモーターである、態様30に記載の組換え宿主細胞。

32．前記第2のポリヌクレオチドが、配列番号6と少なくとも60%同一であるアミノ酸配列を含む膜結合型銅輸送ATPアーゼをコードする、態様25～31のいずれか1つに記載の組換え宿主細胞。

33．前記第2のポリヌクレオチドが、配列番号3と少なくとも60%同一であるアミノ酸配列を含む可溶性銅トランスポーターをコードする、態様25～32のいずれか1つに記載の組換え宿主細胞。

34．前記宿主細胞が、第2の銅金属シャペロンをコードする第3のポリヌクレオチドを更に含む、態様25～33のいずれか1つに記載の組換え宿主細胞。

35．前記第1の銅金属シャペロンが、配列番号6と少なくとも60%同一であるアミノ酸配列を含む膜結合型銅輸送ATPアーゼであり、前記第2の銅金属シャペロンが、配列番号3と少なくとも60%同一であるアミノ酸配列を含む可溶性銅トランスポーターである、態様34に記載の組換え宿主細胞。

36．前記組換え宿主細胞が、糸状菌宿主細胞である、態様25～35のいずれか1つに記載の組換え宿主細胞。

37．前記糸状菌宿主が、アスペルギルス、アクレモニウム、アウレオバシジウム、ボーマベリア、セファロスポリウム、セリポリオブシス、ケトミウム・ペシロマイセス、クリソスポリウム、クラビセプス、コキオボラス、クリプトコッカス、シアツス、エンドチア、エンドチア・ムコール、フザリウム、ギロクラディウム、フミコーラ、マグナボルテ、ミセリオフトラ、ミロテシウム、ムコール、ニューロスボラ、ファネロカエテ、ボドスボラ、ペシロマイセス、ペニシリウム、ピリキュラリア、リゾムコール、リゾプス、シゾフィラム、スタゴノスポラ、タラロマイセス、トリコデルマ、サーモマイセス、サーモアスカス、チエラピア、トリポクラジウム、トリコフィトン、トラメテス、及びプレウロタスからなる群から選択される、態様36に記載の組換え宿主細胞。

38．前記糸状菌宿主細胞が、トリコデルマ・リーゼイ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・オリザエ、又はタラロマイセス・エメルソニ宿主細胞である、態様36に記載の組換え宿主細胞。

10

20

30

40

50

39. 前記組換え宿主細胞が、Mac 1を過剰発現し、Mac 1の過剰発現が、前記宿主細胞での前記銅金属シャペロンの過剰発現をもたらす、態様25～38のいずれかに記載の組換え宿主細胞。

40. 態様25～39の一つに記載の組換え宿主細胞の培養物から得られる上清。

41. 態様1～21のいずれか一つに記載の方法を使用して得られる上清。

【図面の簡単な説明】

【0011】

当業者であれば、以下に係る図面が説明のみを目的とするものであると理解するであろう。

【0012】

当該図面は、いかなる形であれ、本教示の範囲を限定することを目的とするものではない。

【図1A】トリコデルマ・リーゼイ由来の銅金属シャペロンの発現構築物の概略図を示す。膜結合型銅トランスポーターATPアーゼの発現構築物。

【図1B】トリコデルマ・リーゼイ由来の銅金属シャペロンの発現構築物の概略図を示す。細胞質の(可溶性)銅トランスポーターの発現構築物。これらの銅の金属シャペロン遺伝子を、構成的ピルビン酸キナーゼ(pki)プロモーターを用い、またCBH1遺伝子由来のターミネーターを含ませた形で発現させた。選択マーカー(hphR)であるハイグロマイシン耐性遺伝子を用いて、上記のプラスミドを有する形成転換体を選抜した。AmpRは、細菌細胞内でのプラスミドの伝播に用いられるアンピシリン耐性遺伝子である。

【図1C】トリコデルマ・リーゼイ由来の銅金属シャペロンの発現構築物の概略図を示す。トリコデルマ・リーゼイチロシナーゼ(アミノ酸配列:配列番号9)を過剰発現させるための発現ベクターを示す。cbh1プロモーター及びそれに続くcbh1転写ターミネーターにより、チロシナーゼを転写させた。

【図2】チロシナーゼ過剰産生株の14Lスケールの培養における、細胞外タンパク質発現のSDS-PAGEによる分析を示す。培養時間を時間単位で下部に示し、銅のフィードの開始を上部の矢印で示す。チロシナーゼ及びエンドグルカナーゼ6タンパク質のバンドを左側(各々Ty r及びEG6)で示す。銅含有チロシナーゼ酵素は、69時間以内に産生のピークを示し、残りの時間では蓄積量が減少した。対照的に、銅を含有しないエンドグルカナーゼ6(EG6)酵素は、全時間経過において蓄積を示した。

【図3】銅濃度の増加によるチロシナーゼ発現に対する効果を示す。銅の量の増加(各レーンの下部に示す)によるチロシナーゼ(Ty r)の発現を示すSDS-PAGEである。図示されるように、増殖培地中の硫酸銅の量の増加によりチロシナーゼ合成が減少した。

【図4】0～1000 μMの範囲の銅濃度で培養した2つの異なるチロシナーゼ過剰産生株(A及びC、各々上図及び下図の株に該当)の分析を示す。タンパク質産生への副作用のない銅の最高濃度は、約15 μMであった。15 μM以上の銅濃度によりチロシナーゼ産生レベルが減少した。基質としてチロシンを用い、生成物の形成を検出することにより、培養上清に存在するチロシナーゼ活性を測定した(286 nm(白色バー)及び470 nm(黒色バー))。

【図5】チロシナーゼ活性のスポットアッセイを用いて、高濃度の銅(6 mM)の存在下で培養したこれらの株で見られるチロシナーゼ活性を検出したが、チロシナーゼは検出できなかった。チロシナーゼ活性は株A(レーン8のウェル)及びC(レーン1のウェル)のコントロールウェル(点線で示す)では検出できなかった。株A及びCが、膜結合型銅輸送ATPアーゼの発現プラスミド(レーン2～7のウェル)又は細胞質(可溶性)銅トランスポーターの発現プラスミド(レーン9～12のウェル)で再度形質転換されたとき、これらの株のチロシナーゼ産生能が回復した。すなわち、これらのいずれの銅金属シャペロンの発現でも、銅毒性を低減でき、チロシナーゼ銅酵素の発現をもたらした。このアッセイにおいてチロシナーゼ活性は、10 μLの培養上清及び200 μLの10%スキム

10

20

30

40

50

ミルク(35 に予熱)をマイクロタイタープレートに添加し、35 で少なくとも10分間混合物をインキュベートすることにより検出した。チロシナーゼが存在し活性を示すとき、ミルクは白色から赤色に変化した。プラスの記号は、赤色が検出されたウェルを示す。

【図6】*Cerrena unicolor*由来の銅メタロプロテインラッカーゼDの発現ベクター構築物を示す。ラッカーゼD遺伝子が、*cbh1*プロモーターから転写され、CBH1シグナル配列を経て*cbh1*転写ターミネーターに至る。成熟型のラッカーゼDの配列を配列番号10に示す。

【図7A】銅金属シャペロンを過剰発現するか又はしないラッカーゼD過剰発現株(株32A)におけるラッカーゼD産生の解析を示す。株32A(最も左のバー、100%で設定)、並びに株32A由来であり、細胞質トランスポーター及び膜結合型銅輸送ATPアーゼを過剰発現する(図1A及び1Bに示される発現ベクターで形質転換された)株(#46、#47、及び#48)におけるラッカーゼDの相対的発現量を示す。

【図7B】銅金属シャペロンを過剰発現するか又はしないラッカーゼD過剰発現株(株32A)におけるラッカーゼD産生の解析を示す。株32A(最も左のバー、100%で設定)、並びに株32A由来であり、膜結合型銅輸送ATPアーゼを過剰発現する(図1Aに示される発現ベクターで形質転換された)株(#2、#16、#29、#30、及び#31)におけるラッカーゼDの相対的発現量を示す。

【図7C】銅金属シャペロンを過剰発現するか又はしないラッカーゼD過剰発現株(株32A)におけるラッカーゼD産生の解析を示す。株32A(最も左のバー、100%で設定)、並びに株32A由来であり、細胞質銅トランスポーターを過剰発現する(図1Bの発現ベクターで形質転換された)株(#5、#22、#27、及び#35)におけるラッカーゼDの相対的発現量を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

細胞質型(可溶性)及び膜結合型の銅金属シャペロンはいずれも、銅と結合して細胞内の所定の部位へ銅を輸送する機能を示し、当該部位において、銅メタロプロテイン(例えば銅酵素)として銅が取り込まれ得る(O'Halloranら、*Metallochaperones, an intracellular shuttle service, for metal ions*, 2000 JBC: 275(33): 25057~25060、及びRobinsonら、*Copper Metallochaperones* 2010 Annu. Rev. Biochem. 79: 537~62を参照)。分泌型の銅酵素の場合、細胞質型の銅トランスポーター(例えば酵母Atx1ポリペプチド及びその相同体)及びゴルジ膜結合型銅パーミアーゼ(例えば酵母Ccc2ポリペプチド及びその相同体)を含む多様な銅金属シャペロンが、ゴルジ複合体のルーメンへの銅の輸送を行う。ゴルジ体には、銅は発現/フォールディング/分泌プロセスの間に銅酵素に取り込まれ得る。(Huffmanら、*Energetics of Copper Trafficking between Atx1 metallochaperone & the intracellular Copper transporter, Ccc2*, 2000 JBC 275(25): 18611~18614を参照)。銅金属シャペロンは、分析されている全ての真核生物間で高度に保存されている。

【0014】

本教示は、宿主細胞における銅酵素の分泌が、1つ又は2つ以上の銅金属シャペロンの過剰発現によって改善できるという発見に基づく。したがって、本教示は、1つ又は2つ以上の銅金属シャペロン(例えば、可溶性銅トランスポーター、膜結合型銅トランスポーター、又はその両方)を過剰発現させることにより、宿主細胞(例えば糸状菌)におけるタンパク質分泌を増加させる方法を提供する。本教示は、分泌の増加を目的とする銅金属シャペロン及び銅酵素を含む発現用の宿主(例えば糸状菌)も提供する。

【0015】

本発明の組成物及び方法をより詳細に説明する前に、本発明の組成物及び方法は、記載

10

20

30

40

50

される特定の態様に限定されず、ゆえに、当然ながら適宜変形され得ることを理解すべきである。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を記載するという目的でのみ使用されるものであり、制限を意図するものではなく、したがって、本発明の組成物及び方法の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ制限されることもまた理解されるであろう。

【0016】

値の範囲が示される場合、間にある各値、文脈により別途明確に規定されない限り下限の単位の10分の1まで、その範囲の上限と下限との間及びその規定の範囲内の任意の別の規定の値又は間にある値が、本発明の組成物及び方法の範囲内に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限及び下限は、独立してそれらのより小さい範囲に 10
含まれてもよく、規定の範囲内の任意の明確に除外されている限界に従って、やはり本発明の組成物及び方法の範囲内に包含される。規定の範囲が上限若しくは下限のいずれか又は両方を含む場合、これらの含まれる上限若しくは下限のいずれか又は両方を除外する範囲もまた本発明の組成物及び方法に含まれる。

【0017】

本明細書において、ある特定の範囲は、用語「約」が前に来る数値で示される。用語「約」は、本明細書において、その後に続く正確な数、並びにその用語の後に続く数に近い又は近似の数を文字で支持するために使用される。ある数が具体的に列挙されている数に近い又は近似の数であるかどうかを決定するとき、その近い又は近似する列挙されていない数は、それが提示されている文脈において、具体的に列挙されている数の実質的な同値 20
を示す数であり得る。例えば、ある数値に関して、用語「約」は、その用語が文脈において別途明確に定義されていない限り、その数値の - 10 % ~ + 10 % の範囲を指す。別の例では、語句「約6のpH値」は、そのpH値が別途明確に定義されていない限り、5 . 4 ~ 6 . 6 のpH値を指す。

【0018】

本明細書において提供する項目は、明細書全体を参照することにより有することができる、本組成物及び方法の種々の態様又は実施形態を限定するものではない。したがって、すぐ下に定義される用語は、明細書全体を参照することにより、一層完全に定義される。

【0019】

本明細書は、説明の簡略化のため、幾つかセクションで構成されているが、読者であれば、1つのセクションでなされた説明が他のセクションでも適用され得ることを理解するであろう。この方法では、本開示の異なる節で使用される項目は、限定的なものとして解釈されるべきではない。 30

【0020】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術及び科学用語は、本組成物及び方法の属する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同様の意味を持つ。本組成物及び方法を実施又は試験する上で、本明細書に記載されるものと同様又は同等の任意の方法及び材料もまた使用することができるが、代表的な例示の方法及び材料を以下に記載する。 40

【0021】

本明細書において引用されている全ての出版物及び特許は、それぞれの個々の出版物又は特許が参照により援用されると具体的かつ個々に示された場合と同様に、本明細書に参照により援用され、関連の出版物が引用された方法及び/又は材料を開示及び記述するために、参照により本明細書に援用される。任意の出版物の引用は、出願日の前のその開示に関するものであり、本発明の組成物及び方法が先行発明のためにそのような出版物に先行する権利を有さないことを承認するものと解釈されるべきではない。更に、示されている出版日は、実際の出版日とは異なる場合があり、それぞれ別個に確認する必要があるであろう。 50

【0022】

この発明を実施するための形態に従い、以下の略記及び定義を適用する。なお、単数形

「a」、「an」、及び「the」には、内容によって明らかに指示がない限り、複数の指示対象が含まれることに留意されたい。よって、例えば、「酵素(an enzyme)」という場合には、複数のこうした酵素が含まれ、「投入量(the dosage)」という場合には、当業者には既知の1つ又は2つ以上の投入量及びその当量が含まれる。

【0023】

特許請求の範囲は、任意選択的な要素を除外するように作成され得ることに更に留意されたい。したがって、この記述は、請求項の構成要素の列挙、又は「消極的(negative)」限定の使用に関連して、「だけ(solely)」、「のみ(only)」などのような排他的な用語を使用するための先行する根拠として役立つことを意図する。

【0024】

本明細書で使用される用語「～から本質的になる(consisting essentially of)」は、その用語の後の成分が、前記成分の作用又は活性に寄与又は干渉しない、全組成物の30重量%未満の全量の他の既知の成分の存在下にある、組成物を指すことに更に留意されたい。

【0025】

本明細書で使用される用語「含む(comprising)」は、用語「含む」の後の成分を含むが、これらに限定されないことを意味することにもまた留意されたい。用語「含む」の後の成分は、必要又は必須であるが、その成分を含む組成物は、他の必須でない又は任意選択的な成分も更に含み得る。

【0026】

本明細書で使用される用語「～からなる(consisting of)」は、用語「～からなる」の後の成分を含み、これらに限定されることを意味することにもまた留意されたい。用語「～からなる」の後の成分はしたがって、必要又は必須であり、他の成分は組成物中に存在しない。

【0027】

本開示を読めば当業者には明らかとなるように、本明細書において記述及び例示されている個々の実施形態のそれぞれは、本明細書において記載されている本発明の組成物及び方法の範囲又は趣旨から逸脱することなく、他のいくつかの実施形態のいずれかの特徴と容易に分離し、又はそれと組み合わせることができる別個の成分及び特徴を有する。任意の列挙されている方法は、列挙されている事象の順序で又は論理的に可能な任意の他の順序で行うことができる。

【0028】

定義

「コード配列」という用語は、本発明では、プロモーターを含む適切な制御配列の制御下に置かれたとき、ポリペプチドに翻訳され得るメッセンジャーRNAに転写される核酸配列として定義する。コード配列は例えば、一つのオープンリーディングフレーム、又はイントロンによって分離された幾つかのオープンリーディングフレームを有してもよい。例えば、コード配列は、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、又は組換えDNAであってもよい。DNAコード配列は一般に、開始コドン(例えばATG)で始まり、停止コドン(例えばTAA、TAG、及びTGA)で終わる。

【0029】

本明細書で使用される「銅金属シャペロン」又は「銅シャペロン」は、細胞内において、銅を必須とする金属酵素(また銅酵素とも呼ばれる)への銅の輸送及び/又は取り込みを促進するタンパク質である。銅金属シャペロンには、細胞質性(又は可溶性)の銅トランスポーター(例えば配列番号3及び表1)、膜結合型銅トランスポーター(例えば配列番号12、13、14、及び15、それらの相同体、並びに、その銅輸送活性を保持する少なくとも60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する配列)、膜結合型輸送ATPアーゼ(例えば配列番号6及び表2)が含まれる。後者には、宿主細胞から分泌されるタンパク質に

10

20

30

40

50

銅を輸送する、ゴルジ膜に存在する銅金属シャペロンが含まれる（また、「銅パーミアーゼ」、「銅トランスポーター ATPアーゼ」などとも呼ばれる）。

【0030】

「銅酵素」は、1つ又は2つ以上の銅原子を含むあらゆる金属酵素を指す。その例としては、限定されないが、溶解性多糖モノオキシゲナーゼ（LPMO）、ラッカーゼ、チロシナーゼ、アミノオキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、カテコールオキシダーゼ、ドーパミン - モノオキシゲナーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ヘキサースオキシダーゼ、L - アスコルビン酸オキシダーゼ、ペプチジルグリシンモノオキシゲナーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ケルセチン 2, 3 - ジオキシゲナーゼ、及びスーパーオキシドジスムターゼが挙げられる。

10

【0031】

「由来の」の用語は、「～に起源を有する」、「～から得た」、「～から得られる」、「～から単離した」、及び「～から作製した」の用語を包含するものであり、一般に、1つの特定の材料が、その起源を別の特定の材料に有するか、又は別の特定の材料を参照して記載できる特徴を有することを指す。

【0032】

本明細書で使用される用語「DNA構築物」は、少なくとも2つの隣接するDNAポリヌクレオチド断片を含むポリヌクレオチドを意味する。

【0033】

ポリヌクレオチド又はポリペプチドに関する用語「内因性」は、宿主細胞中に天然に存在するポリヌクレオチド又はポリペプチドを指す。

20

【0034】

「発現」という用語は、核酸配列に基づいてポリペプチドが産生される過程を指す。このプロセスは、転写と翻訳の両方を含む。

【0035】

本明細書で使用される場合、「発現ベクター」は、1つ又は2つ以上の特定のポリペプチドをコードするDNA配列を含むDNA構築物を意味し、当該配列は、適切な宿主で当該1つ又は2つ以上のポリペプチドの発現に影響を及ぼし得る適切な制御配列と作動可能に連結される。このような調節配列として、転写に作用するプロモーター、転写を調節するための任意のオペレーター配列、mRNA上の適切なリボソーム結合部位をコードしている配列、並びに転写及び翻訳の終結を調節する配列を挙げることができる。異なる細胞タイプを、異なる発現ベクターとともに使用してもよい。枯草菌（*Bacillus subtilis*）で用いられるベクター用の典型的なプロモーターはA p r Eプロモーターであり、ストレプトマイセス・リビダンスで用いられる典型的なプロモーターはA 4プロモーター（アスペルギルス・ニガー由来）であり、大腸菌（*E. coli*）で用いられる典型的なプロモーターはL a cプロモーターであり、サッカロマイセス・セレビシエで用いられる典型的なプロモーターはP G K 1であり、アスペルギルス・ニガーで用いられる典型的なプロモーターはg l a Aであり、トリコデルマ・リーゼイ用の典型的なプロモーターはp k i 及びc b h I が挙げられる。ベクターは、プラスミド、ファージ粒子、又は単純に潜在的なゲノムインサートであってよい。ベクターは、好適な宿主に形質転換すると、宿主ゲノムとは独立して複製及び機能できるようになり、あるいは好適な条件下でゲノム自体に組み込まれ得る。本明細書において、プラスミド及びベクターは、互換的に使用されることがある。しかしながら、本発明の組成物及び方法は、同等の機能を果たし、当技術分野において公知である、又は公知となる他の形態の発現ベクターを含むことを意図する。よって、広範な種類の宿主/発現ベクターの組合せを、本明細書に記載のDNA配列を発現させるのに用いることができる。

30

40

【0036】

有用な発現ベクターは、例えば、染色体の、非染色体以外の、及び合成DNA配列のセグメントからなってもよく、例えば様々な公知のSV40誘導體及び公知の細菌プラスミド（例えばc o l E 1、p C R 1、p B R 3 2 2、p M b 9、p U C 1 9 及びそれらの

50

誘導体等の大腸菌由来プラスミド)、広宿主域プラスミド(例えばRP4)、バクテリオファージDNA(例えばNM989などの多くのバクテリオファージの誘導体)、及び他のDNAファージ(例えばM13)、及び一本鎖DNAファージ、酵母プラスミド(例えば2プラスミド又はその誘導体)、真核細胞用のベクター(例えば動物細胞用のベクター)、及びプラスミドとバクテリオファージDNAとの組合せ由来のベクター(例えばバクテリオファージDNA又は他の発現制御配列を用いるために改良されたプラスミド)が挙げられる。本発明の組成物及び方法に係る発現ベクターを用いた発現技術は当業者に公知であり、その概略は、例えばSambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, Second Edition, Cold Spring Harbor Press (1989)に記載されている。多くの場合、本明細書に記載のDNA配列を含むそのような発現ベクターが、取り込みイベントを通じて特定の種のゲノムへ直接挿入されることによって、単細胞宿主に形質転換する(例えば、Bennett & Lasure, 「More Gene Manipulations in Fungi」, Academic Press, San Diego, pp. 70~76 (1991)、及びその中で宿主菌への標的特異的なゲノム挿入に関して引用される記事を参照)。

10

20

30

40

50

【0037】

用語「糸状菌」は、エウミコチニア亜門に属する全ての糸状の形態の種を指す(Alexopoulos, C. J. (1962), INTRODUCTION TO MYCOLOGY, Wiley, New Yorkを参照)。これらの真菌類は、キチン質、グルカン及び他の複合多糖から構成される細胞壁を有する栄養菌系によって特徴づけられる。本教示の糸状菌は、形態学的に、生理学的に、及び遺伝学的に、酵母とは区別される。糸状菌の栄養生長は菌系の伸展によるものであり、炭素の異化は絶対好気性である。糸状菌には、エウミコチニア亜門に属する全ての糸状の形態の種(特にPezizomycotina種)が含まれる。糸状菌の親細胞は、限定されないが、トリコデルマ属(例えば、トリコデルマ・ロンギブラキアタム、トリコデルマ・ビリデ、トリコデルマ・コニング、トリコデルマ・ハルジアナム)、ペニシリウム属、フミコーラ属(フミコーラ・インソレンス及びフミコーラ・グリセア等)、クリソスポリウム属(クリソスポリウム・ルクノウェンス等)、ミセリオフトラ属、グリオクラジウム属、アスペルギルス属、フザリウム属、ニューロスボラ属、ヒポクレア属(例えば、ヒポクレアジェコリナ)及びエメリセラ属の種の細胞であってもよい。本明細書で使用される場合、用語「トリコデルマ」又は「トリコデルマ属」は、従来トリコデルマ属と分類されていたか、又はトリコデルマ属と現在分類されているあらゆる菌株のことを指す。具体的実施形態では、GH61酵素は糸状菌の細胞由来であり得る。GH61A酵素の例としては、ヒポクレア・ジェコリナ(トリコデルマ・リーゼイ)、ヒポクレア・ルーファ、ヒポクレア・オリエンタリス、ヒポクレア・アトロピリディス、ヒポクレア・ビレンス、エメリセラ・ニデュランス、アスペルギルス・テレウス、アスペルギルス・オリザエ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・カワチ、アスペルギルス・フラバス、アスペルギルス・クラバタス、ゲウマノミセス・グラミニス、トリコデルマ・サツリスボラム、ニューロスボラ・テトラスペルマ、ニューロスボラ・クラッサ、ニューロスボラ・フミゲート、ネオサルトリヤ・フミゲート、ネオサルトリヤ・フィシェリ、チエラピア・テレストリス、及びチエラピア・ヘテロタリカに存在する酵素が挙げられる。

【0038】

「異種」という用語は、通常は相互に関係していない要素のことを指す。たとえば、組み換え宿主細胞が異種タンパク質を産生する場合には、当該タンパク質は、同じ野生型の宿主細胞で産生されず、異種プロモーターは、野生型の宿主細胞に内因性の核酸には存在しないプロモーターであり、また異種のコード配列に作動可能に連結したプロモーターは、通常野生型の宿主細胞において作動可能に連結していないコード配列に作動可能に連結したプロモーターである。

【0039】

「異種」核酸構築物、又は配列は、それが発現される細胞に対して生来のものではない配列の一部を有する。制御配列に関して、異種は、今ではその発現を制御している同一の遺伝子を制御するように、天然では機能しない制御配列（すなわち、プロモーター又はエンハンサー）を指す。通常、異種核酸配列は、それらが存在する細胞又は遺伝子の一部にとって内因性ではなく、感染、トランスフェクション、形質転換、マイクロインジェクション、電気穿孔法又はこれらに類するものにより、細胞に添加されている。「異種」核酸構築物は、生来の細胞に見られる制御配列／DNAコード配列の組み合わせと同じ又は異なる制御配列／DNAコード配列を含有し得る。

【0040】

用語「相同体」又は「相同な」は、ある生体分子が、対象となるアミノ酸配列又は対象となるヌクレオチド配列に対して、一定の同一性を有することを意味する。相同配列は、従来公知の配列アラインメントツール（例えばClustal、BLASTなど）を使用して、対象となる配列と少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するアミノ酸又は核酸配列を含む配列として取得する。典型的には、対象となる酵素の相同体は、対象となる酵素と同じ／類似する活性部位残基を含み、及び／又は、特に明記しない限り類似する酵素活性を示す。

10

【0041】

配列アラインメントを実施し、配列同一性を決定する方法は、当業者には既知であり、過度の実験を行わずとも実施することができ、同一性の値の計算は明確に得ることができるであろう。例えば、Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 19 (1995) (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York)、及びALIGNプログラム (Dayhoff, Atlas of Protein Sequence and Structure 5: Suppl. 3 (1978) (National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.)) を参照。配列のアラインメント及び配列同一性の決定のために、幾つかのアルゴリズムが利用でき、かかるアルゴリズムとしては、例えば、Needlemanらの相同性アラインメントアルゴリズム (J. Mol. Biol. 48: 443 (1970))、Smithらの局所的相同性アルゴリズム Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)、Pearsonらの類似性検索方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 2444 (1988))、Smith-Watermanアルゴリズム (Meth. Mol. Biol. 70: 173~187 (1997))、並びにBLASTP、BLASTN及びBLASTXアルゴリズム (Altschulら、J. Mol. Biol. 215: 403~410 (1990)) が挙げられる。

20

30

【0042】

これらのアルゴリズムを用いたコンピュータ化されたプログラムも利用でき、かかるプログラムとしては、限定されないが、ALIGN若しくはMegalign (DNASTAR) ソフトウェア、又はWU-BLAST-2 (Altschulら、Meth. Enzym., 266: 460~480 (1996))、又はGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA及びTFASTA (Genetics Computing Group (GCG) のパッケージ、バージョン8、マディソン、ウィスコンシン、USAにて利用可能)、及びIntelligenetics社 (マウンテンビュー、カリフォルニア) のPC/GeneプログラムのCLUSTALが挙げられる。当業者は、比較されている配列の長さにあたる最大のアラインメントを得るために必要とされるアルゴリズムを含む、アラインメントを評価するための適切なパラメータを決定することができる。好ましくは、配列同一性は、プログラムにより決定されるデフォルトパラメータを使用して決定される。具体的には、配列同一性は、以下のデフォルトパラメータにより、Clustal W (Thompson J. D. ら、Nucleic Acids Res. 22

40

50

: 4 6 7 3 ~ 4 6 8 0 (1 9 9 4)) により決定できる :

【 0 0 4 3 】

【 表 1 】

ギャップ開始ペナルティ:	10.0	
ギャップ伸張ペナルティ:	0.05	
タンパク質重み行列:	BLOSUM行列	
DNA重み行列:	IUB	
相違配列遅延(Delay divergent sequences)%:	40	
ギャップ間距離:	8	
DNAトランジションの重み:	0.50	
親水性残基リスト:	GPSNDQEKR	10
負値行列の使用:	オフ	
残基特異的なペナルティの切り替え(Toggle Residue specific penalties):	オン	
親水性ペナルティの切り替え:	オン	
エンドギャップ分離ペナルティの切り替え:	オフ	

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される場合、用語「宿主細胞」又は「宿主株」は、特定の目的（例えば特定の遺伝子の発現、ベクターの伝播など）に適する細胞を意味する。具体的実施形態では、宿主細胞は、本発明の組成物及び方法に係る目的とする1つ又は2つ以上のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列（例えば、銅酵素及び/又は1つ又は2つ以上の銅金属シャペロンをコードするポリヌクレオチド配列）を含む発現ベクターを有する。宿主細胞には、原核及び真核生物が含まれ、目的のポリペプチド/酵素（又は複数のポリペプチド/酵素）の発現、及び/又はベクターの伝播にとり有用ないかなる形質転換可能な微生物も含まれる。宿主細胞の例としては、限定されないが、バチルス属、ストレプトマイセス属、エシェリチア属、トリコデルマ属、アスペルギルス属、サッカロミセス属等の細胞種が挙げられる。具体的態様では、宿主細胞は、組み換え宿主細胞（すなわち天然には存在しない細胞（下記の「組換え体」の定義を参照））である。

【 0 0 4 5 】

細胞へ核酸配列を挿入するという文脈における「導入された」という用語は、当技術分野において公知の「遺伝子導入」、「形質転換」、又は「形質導入」を意味する。

【 0 0 4 6 】

本明細書で使用される場合、アミノ酸又はヌクレオチド配列に関する「配列同一性パーセント(%)」は、目的とする配列（例えば金属シャペロンタンパク質の配列）中のアミノ酸残基又はヌクレオチドと同一な、候補配列中のアミノ酸残基又はヌクレオチドの占めるパーセンテージとして定義される。その際には、配列を並べ、必要に応じてギャップを挿入して最適なアラインメント（最大の配列同一性(%)）とし、また配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮しない。

【 0 0 4 7 】

「精製された」又は「単離された」又は「富化された(enriched)」は、生体分子（例えば、ポリペプチド又はポリヌクレオチド）が、それが自然界において関連している自然発生成分の一部又は全てから分離されることによって、その天然の状態から改変されたことを意味する。かかる単離又は精製は、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水性分離、透析、プロテアーゼ処理、硫酸沈殿又は他のタンパク質塩析、遠心分離、サイズ排除クロマトグラフィー、濾過、精密濾過、ゲル電気泳動又は勾配分離などの当技術分野において承認されている分離技術によって達成されて、最終組成物において望ましくない細胞全体、細胞残屑、不純物、外来タンパク質、又は酵素を除去する。更に、精製され若しくは単離された生体分子組成物（例えば精製されたポリペプチド）に、別の成分（例えば活性化剤、抗阻害剤、好適なイオン、pH調製化合物又は他の酵素又は化学物質）を添加して追加の有利な性質を付与することができる。

【 0 0 4 8 】

本明細書で使用される場合、「微生物」は、細菌、真菌、ウイルス、原虫、及び他の微生物又は微小な生物を指す。

【0049】

用語「核酸」及び「ポリヌクレオチド」は交換可能に用いられ、DNA、RNA、cDNA、それらの一本鎖体若しくは二本鎖体及び化学修飾体が含まれる。遺伝暗号は退縮を有するため、複数のコドンが特定のアミノ酸をコードする際に用いられることもあり、ゆえに本発明には、特定のアミノ酸配列をコードする全てのポリヌクレオチドが含まれる。

【0050】

「作動可能に連結している」の用語は、複数の要素の配置が、それらの機能的関連を可能にしていることを指す。例えば、配列の転写制御の場合は、プロモーターはコード配列に作動可能に連結し、またシグナル配列が宿主細胞の分泌システムを通じてタンパク質に指示する場合は、シグナル配列はタンパク質と作動可能に連結する。

10

【0051】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」及び「酵素」という用語は互換的に使用されて、ペプチド結合により連結されたアミノ酸残基を含む任意の長さのポリマーを指す。アミノ酸残基については従来の一文字又は三文字コードが本明細書でも使用される。ポリマーは直鎖又は分枝鎖であってよく、修飾されたアミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸によって中断されてもよい。当該用語はまた、天然に又は介入により修飾されたアミノ酸ポリマーが含まれ、例えば、ジスルフィド結合の形成、グリコシル化、リビド化、アセチル化、リン酸化又は他のあらゆる操作若しくは修飾（例えば標識物質とのコンジュゲート）が含まれる。例えば、アミノ酸の1つ又は2つ以上の類似体（例えば、非天然アミノ酸などを含む）を含有するポリペプチド、並びに当技術分野において公知の他の修飾物も定義に含まれる。

20

【0052】

用語「プロモーター」は、本発明では細胞内で下流のポリヌクレオチドの転写を指令する核酸として定義される。具体的な場合では、当該ポリヌクレオチドはコード配列を含んでもよく、プロモーターは翻訳可能なRNAへのコード配列の転写を誘導し得る。

【0053】

用語「組換え」は、生体成分又は組成物（例えば、細胞、核酸、ポリペプチド/酵素、ベクターなど）に関連して使用される場合、生体成分又は組成物が天然では見られない形態であることを示す。換言すれば、生体成分又は組成物は、人間の介入によって、天然の形態から変化させられている。例えば、組み換え細胞（又は宿主細胞）には、その天然の親細胞（すなわち非組み換え細胞）に存在しない1つ又は2つ以上の遺伝子を発現する細胞、1つ又は2つ以上の天然の遺伝子をその天然の親細胞とは異なる量で発現する細胞、及び/又はその天然の親細胞とは異なる条件下で1つ又は2つ以上の天然の遺伝子を発現する細胞が含まれる。組み換え核酸は、1つ又は2つ以上のヌクレオチドにより天然の配列と異なってもよく、異種配列（例えば異種プロモーター、非天然若しくは変異型シグナル配列をコードする配列など）と作動可能に連結してもよく、イントロン配列を欠いてもよく、及び/又は単離された形態であってよい。組換えポリペプチド/酵素は、天然の配列とは1つ又は2つ以上のアミノ酸が異なってもよく、異種配列と融合されていてもよく、短縮されている若しくはアミノ酸の内部欠失を有していてもよく、天然の細胞には見られない様式で（例えば、ポリペプチドをコードする発現ベクターが細胞中に存在することによりポリペプチドを過剰発現する組換え細胞から）発現してもよく、かつ/又は単離された形態であってよい。いくつかの実施形態では、組換えポリヌクレオチド又はポリペプチド/酵素は、対応する野生型と同一であるが、非天然形態（例えば、単離された又は富化された形態）である配列を有することが強調される。

30

40

【0054】

用語「シグナル配列」は、タンパク質のN末端部分に存在し、細胞外への成熟型タンパク質の分泌を促進する一連のアミノ酸のことを指す。細胞外タンパク質の成熟型は、分泌プロセスの際に切断されるシグナル配列は有していない。

【0055】

用語「ベクター」は本発明では、1つ又は2つ以上のタイプの細胞に導入される核酸配

50

列を輸送するよう設計されたポリヌクレオチドとして定義される。ベクターには、クローニングベクター、発現ベクター、シャトルベクター、プラスミド、バクテリオファージ又はウイルス粒子、DNA構築物、発現カセットなどが含まれる。発現ベクター及びカセットは、調節配列（例えばプロモーター、シグナル配列、コード配列及び転写ターミネーター）を有してもよい。

【0056】

「実質的に同じ培養条件」等の用語は、第1の宿主細胞が、第2の宿主細胞と同じ又はほとんど同じに培養されることにより、第1及び第2の宿主細胞の性能又は特徴において有意な比較が可能である条件を意味する。実質的に同じであり得るパラメータには、温度、pH、銅濃度、時間、攪拌、培地等が含まれる。比較用の宿主細胞の培養を「実質的に同じ培養条件」下で実施する際の設定は、当業者の技量の範囲内である。

10

【0057】

用語「形質転換された」、「安定に形質転換された」及び「トランスジェニック」は、ゲノム中に組み込まれたか、又は複数世代を通して維持されるエピソームとして保持される非天然の（例えば異種）核酸配列を有する細胞のことを指す。

【0058】

ラッカーゼ（IUBMB酵素番号：EC 1.10.3.2）は、多くの植物、菌類及び微生物に存在する銅含有オキシダーゼ酵素である。ラッカーゼは、フェノールに類似する分子に作用し、1電子酸化を触媒する。ラッカーゼは、モノリグノール（天然に生じるフェノールのファミリー）の酸化的カップリングを促進することによって、リグニン形成に役割を果たし得る。ラッカーゼは、ウリシオールオキシダーゼ、ウルシオールオキシダーゼ、及びp-ジフェノールオキシダーゼと称されることもある。

20

【0059】

チロシナーゼ（IUBMB酵素番号：EC 1.14.18.1）は、広範囲な種類のバクテリア、菌類、プラント、昆虫、甲殻類及び哺乳類に存在するタイプII銅タンパク質であり、幾つかの色素分子（例えばベタレイン及びメラニン）の合成に関与する。チロシナーゼは、モノフェノールモノオキシゲナーゼ、フェノラーゼ、モノフェノールオキシダーゼ、クレゾラーゼ、モノフェノラーゼ、チロシン-ドーパオキシダーゼ、モノフェノールモノオキシダーゼ、モノフェノールジヒドロキシフェニルアラニン、オキシゲンオキシドレダクターゼ、N-アセチル-6-ヒドロキシトリプトファンオキシダーゼ、モノフェノール-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニンオキシゲンオキシドレダクターゼ、o-ジフェノール、O₂オキシドレダクターゼ、及びフェノールオキシダーゼと称されることもある。

30

【0060】

「GH61」若しくは「GH61酵素」、又は「AA9」若しくは「AA9酵素」などは、AA9として最近分類が改訂されたグリコシドヒドロラーゼ61ファミリー（GH61）に属する酵素を意味する。AA9（従前はGH61）タンパク質は、銅依存性の溶解性多糖モノオキシゲナーゼ（LPMO）である。AA9ファミリーの説明及びAA9酵素のリストは、www.cazy.orgのCarbohydrate-Active Enzyme Database（CAZy）に存在する（またLombard V, Golconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B (2014) The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. Nucleic Acids Res 42: D490~D495. [PMID: 24270786]を参照）。具体的態様では、AA9酵素はトリコデルマ・リーゼイ由来であり、配列番号11で示されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列、そのアレル変異体、又はLPMO活性を保持するその断片である。異なる種由来のGH61/AA9ファミリーのメンバーのリスト受託番号（Genbank及びUni

40

50

prot)を表3に示す。

【0061】

組成物及び方法：

本教示は、宿主細胞における銅酵素の分泌が、1つ又は2つ以上の銅金属シャペロンの過剰発現によって改善できるという発見に基づく。したがって、本教示は、1つ又は2つ以上の銅金属シャペロン（例えば、可溶性銅トランスポーター、膜結合型銅トランスポーター、又はその両方）を過剰発現させることにより、宿主細胞（例えば糸状菌）におけるタンパク質分泌を増加させる方法を提供する。本教示は、分泌の増加を目的とする銅金属シャペロン及び銅酵素を含む発現用の宿主（例えば糸状菌）も提供する。

【0062】

本教示の一態様では、宿主細胞において目的とする銅酵素とともに銅金属シャペロンを過剰発現させることによって、宿主における目的の銅酵素の分泌／産生を増加させるための方法が提供される。本教示の銅金属シャペロンは、銅輸送に関与するいかなる適切なタンパク質であってもよい。幾つかの実施形態では、銅金属シャペロンは、銅輸送機能が全長の銅金属シャペロンに対して実質的に同じか又は強化された、銅金属シャペロンの断片であり得る。

【0063】

様々な実施形態では、本教示の態様において有用な銅金属シャペロンは、あらゆる細胞質内／可溶性、又は膜結合型銅トランスポーターも包含する。幾つかの実施形態では、銅金属シャペロンは、表1及び2に示される銅トランスポーター、並びにその誘導体若しくは相同体から、例えば当業者に周知の機能的若しくは構造的類似性の観点から選択される。例えば、本発明の具体的態様は、配列番号3のアミノ酸配列と同一であるか、又は実質的に同一（例えば、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の同一性（%）を有する）1つ又は2つ以上の可溶性銅トランスポーターの使用を含む。更に、本発明の特定の態様は、配列番号6、12、13、14、又は15のアミノ酸配列と同一であるか、又は実質的に同一の（例えば、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の同一性（%）を有する）、1つ又は2つ以上の膜結合型銅トランスポーターの使用を含む。本発明で詳述されるように、銅酵素分泌の向上を示す宿主細胞は、1つ又は2つ以上の膜結合型銅トランスポーター、1つ又は2つ以上の可溶性銅トランスポーター、又は膜結合型及び可溶性銅トランスポーターの組合せを発現することができる。

【0064】

一般に、1つ又は2つ以上の銅金属シャペロンは、宿主細胞で1つ又は2つ以上の望ましい銅酵素とともに宿主細胞で過剰発現し、その際、銅金属シャペロン及び銅酵素の発現は、それら自身に作動可能に連結しているプロモーターの制御下にある。幾つかの実施形態では、銅金属シャペロン及び／又は銅酵素は、目的の宿主細胞に本来存在するプロモーターの制御下で発現されるか、あるいは、当該銅金属シャペロン及び／又は銅酵素は、目的の宿主細胞にとり異種であるプロモーターの制御下で発現される。幾つかの実施形態では、銅の金属シャペロン及び／又は銅酵素は、構成的プロモーターの制御下で発現され、一方、他の実施形態では、銅の金属シャペロン及び／又は銅酵素は、誘導性プロモーターの制御下で発現される。宿主細胞において銅金属シャペロン（すなわち1つ又は2つ以上の銅金属シャペロン）及び銅酵素（すなわち1つ又は2つ以上の銅酵素）を発現するためにプロモーターのあらゆる組合せが使用され得る点に留意すべきである。例えば、1つ又は2つ以上の銅金属シャペロンが異種の構成的プロモーターの制御下で発現する一方で、1つ又は2つ以上の銅酵素が天然の誘導性プロモーターの制御下で発現される（又はその逆もあり得る）。幾つかの実施形態では、作動可能に連結しているプロモーターは、改良された天然のプロモーター（例えば、プロモーターの転写活性が強化された、変異を有する天然のプロモーター）であってもよい。

【0065】

具体的実施形態では、1つ又は2つ以上の銅金属シャペロンの過剰発現は、宿主細胞の1つ又は2つ以上の銅金属シャペロンの生来のプロモーターの転写リプレッサー又はインデューサーの発現を変化させることによって実現できる。例えば、銅金属シャペロンの転写リプレッサーの発現を宿主細胞において減少させることができ、逆に、銅金属シャペロンの転写インデューサー（又はアクチベーター）の発現を宿主細胞において増加させることができる。1つの例では、銅金属シャペロンの転写アクチベーターであるMac1（金属結合アクチベーター1：酵母の銅不足誘導性転写因子）の発現により、銅金属シャペロンの過剰発現、宿主細胞内での増加をもたらすことができる。転写活性剤（例えばMac1）の発現の増加は、宿主細胞に転写因子の発現カセット又は発現ベクターを導入することにより実現できる。

10

【0066】

本明細書で使用される場合、用語「プロモーター」は、作動可能に連結しているコード配列（例えば遺伝子、cDNA又は合成されたコード配列）の直接の転写を制御する核酸配列のことを指す。プロモーターは、転写開始部位の近傍の必要な核酸配列を含むことができ、例えばポリメラーゼII型プロモーターの場合、TATAエレメントである。プロモーターは、他の転写及び翻訳調節核酸配列と共に、全体として調節配列と称され、作動可能に連結されるコード配列の発現を制御する。一般には、調節配列は、限定されないが、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始部位及び終結配列、翻訳開始及び終結配列、並びにエンハンサー又はアクチベーター配列を有する。調節配列は通常、コード配列が発現される宿主細胞に適するものであり、それにより認識される。

20

【0067】

構成的プロモーターは、大部分の環境的及び増殖的条件下で活性を有するプロモーターである。誘導性若しくは抑制的プロモーターは、環境的若しくは増殖的制御下で活性を有するプロモーターである。プロモーターは、当業者に公知のように、限定されないが、例えば炭素、窒素又は他の栄養利用可能性、温度、pH、浸透圧、重金属の存在、阻害剤の濃度、ストレス、又はそれらの組合せなどの環境的要因の変化によって誘導若しくは抑制が可能である。プロモーターは、当業者に公知のように、例えば特定の炭素源のレベル、特定のエネルギー源のレベル、特定の代謝物質のレベル、又はそれらの組合せなどの代謝因子によって誘導若しくは抑制が可能である。

30

【0068】

適切なプロモーターの非限定的な例としては、*P. chrysogenum*のcbh1、cbh2、egl1、egl2、egl3、egl4、egl5、xyn1及びxyn2抑制性酸性ホスファターゼ遺伝子（phoA）プロモーター（Graessleら、Applied and Environmental Microbiology（1997），63（2），753～756を参照）、グルコース抑制性PCK1プロモーター（Leukerら、Gene（1997），192（2），235～240を参照）、マルトース誘導性、グルコース抑制性MRP1プロモーター（Munroら、Molecular Microbiology（2001），39（5），1414～1426を参照）、メチオニン抑制性MET3プロモーター（Liuら、Eukaryotic Cell（2006），5（4），638～649を参照）が挙げられる。

40

【0069】

本教示に有用な誘導性プロモーターの例は、トリコデルマ・リーゼイのcbh1プロモーターであり、そのヌクレオチド配列はGenBank受託番号D86235として寄託されている。他の典型的なプロモーターは、セルラーゼ酵素をコードする遺伝子の制御に関与するプロモーター（例えばcbh2、egl1、egl2、egl3、egl5、xyn1及びxyn2）である。

【0070】

本教示では、銅金属シャペロンを用いることにより、宿主において適切な銅酵素の分泌／産生を増加させることができる。分泌される銅酵素は通常、最初に宿主細胞で発現したとき、シグナル配列（例えば、タンパク質又はポリペプチドを細胞内の分泌経路へと導く

50

アミノ酸配列タグ)と作動可能に連結されている。シグナル配列は、銅酵素にとり固有のシグナル配列(すなわち野生型酵素に存在するシグナル配列)か、又は異種シグナル配列(すなわち組み換え法により目的とする成熟型銅酵素に作動可能に連結された、異なる分泌タンパク質由来のシグナル配列)であってもよい。いかなる公知の、又は後で発見された適切なシグナル配列も使用でき、例えば、アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ又はアスパラギン酸プロテアーゼ由来のシグナル配列、又はリゾムコール・ミエハイ又はトリコデルマ・リーゼイのアスパラギン酸プロテアーゼ又はセルラーゼ由来のシグナル配列、(例えば、トリコデルマ・リーゼイのセロビオヒドロラーゼⅠ、セロビオヒドロラーゼⅡ、エンドグルカナーゼⅠ、エンドグルカナーゼⅡ、又はエンドグルカナーゼⅢ)が例示される。

10

【0071】

本教示では、銅金属シャペロンをあらゆる宿主において用いることにより、宿主における目的の銅酵素の分泌を増加させることができる。幾つかの実施形態では、発現宿主は糸状菌である。一般に、「糸状菌」は、エウミコチニア亜門に属する糸状の形態の真核微生物である。これらの菌類は、キチン、 β -グルカン及び他の複合多糖から構成される細胞壁を有する栄養菌系によって特徴づけられる。様々な実施形態では、本教示の糸状菌は、酵母とは形態学的、生理学的及び遺伝学的に区別される。幾つかの実施形態では、本教示の糸状菌としては、限定されないが、アスペルギルス、アクレモニウム、アウレオバシジウム、ボーベリア、セファロスポリウム、セリポリオプシス、ケトミウム・ベシロマイセス、クリソスポリウム、クラビセプス、コキオボラス、クリプトコッカス、シアツス、エンドチア、エンドチア・ムコール、フザリウム、ギロクラディウム、フミコーラ、マグナボルテ、ミセリオフトラ、ミロテシウム、ムコール、ニューロスボラ、ファネロカエテ、ポドスポラ、ベシロマイセス、ペニシリウム、ピリキュラリア、リゾムコール、リゾプス、シゾフィラム、スタゴノスポラ、タロマイセス、トリコデルマ、サーモマイセス、サーモアスカス、チエラピア、トリボクラジウム、トリコフィトン、トラメテス、及びブレウロタス属が挙げられる。幾つかの実施形態では、本教示の糸状菌としては、限定されないが、アスペルギルス・ニードランス、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・オリザエ、ヒポクレア・ジェコリナ、ニューロスボラ・クラッサ、トリコデルマ・リーゼイ、及びトリコデルマ・ピリデが挙げられる。

20

【0072】

本教示の別の態様は、銅金属シャペロン及び目的とする銅酵素を発現する発現宿主を提供する。幾つかの実施形態では、本教示の発現宿主は、銅酵素をコードする第1ポリヌクレオチドと、銅金属シャペロンをコードする第2ポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、前記発現宿主は更に、例えば、第2ポリヌクレオチドによってコードされるものと異なる第2の銅金属シャペロンをコードする第3ポリヌクレオチドを含む。更に、前記宿主細胞は、例えば、第1ポリヌクレオチドによってコードされるものと異なる目的とする第2の銅酵素をコードする第4ポリヌクレオチドを更に含んでもよい。具体的実施形態では、1つ又は2つ以上の銅酵素及び1つ又は2つ以上の銅金属シャペロンをコードするポリヌクレオチドは、(例えば形質転換によって)宿主細胞に導入される組み換え発現カセットであり、この点については以下に詳細に説明する。

30

40

【0073】

幾つかの実施形態では、目的の銅酵素は、融合ポリペプチドとして産生されてもよい。幾つかの実施形態では、目的の銅酵素は、糸状菌から効率的に分泌されるポリペプチドと融合させることにより、分泌を促進し、以降の精製/同定を容易にし、安定性向上させることが可能となる。

【0074】

一般に、本教示の発現宿主中の、1つ又は2つ以上の銅金属シャペロン及び/又は1つ又は2つ以上の銅酵素をコードする1つ又は2つ以上のポリヌクレオチドは、発現宿主のゲノム構造内、例えば発現宿主の染色体に遺伝的に挿入若しくは導入され得るか、又は染色体外に存在して、例えば、ベクターが有する選抜マーカーの選抜条件下で、発現宿主細

50

胞内で複製可能ベクターとして存在することができる。

【 0 0 7 5 】

分泌性の銅酵素の産生 / 分泌は、例えば酵素活性又は存在する酵素の量を検出するアッセイによって、サンプル（例えば培地）から直接測定することができる。免疫学的方法（例えばウエスタンブロット又は E L I S A）を用いることにより、質的及び量的に、分泌性の銅酵素の発現を評価することができる。そのような方法の詳細は当業者に公知であり、そのような方法を行うため試薬が多数市販されている。

【 0 0 7 6 】

表 1 . トリコデルマ・リーゼイの可溶性（細胞質）銅トランスポーターと相同性を有するタンパク質のリスト（配列番号 3）。表 1 は、受託番号（UNIPROT）、生物、及び配列番号 3 との配列同一性を示す。タンパク質の配列データベース UNIPROT を、アミノ酸配列の基として用いた。配列同一性は、NCBI / BLAST のウェブサイトの Uniprot データベースに対する、標準的なタンパク質 - タンパク質 BLAST（blastp）を用いて決定した。

【表 2 - 1】

受託番号 (UNIPROT)	生物 / 株	トリコデルマ・リーゼイの 可溶性銅トランスポーターに 対する同一性 (%)
G0RSG6	ヒボクレア・ジェコリナ (株 QM6a) (トリコデルマ・リーゼイ)	100.00%
G9MGG2	ヒボクレア・ビレンス (株 Gv29-8 / FGSC 10586) (グリオクラジウム・ビレンス) (トリコデルマ・ビレンス)	88.00%
C7Z0W4	ネクトリア・ヘマトコッカ (株 77-13-4 / ATCC MYA-4622 / FGSC 9596 / MPV1) (フザリウム・ソラニ subsp. pisi)	88.00%
W9HYZ7	フザリウム・オキシスポラム FOSC 3-a	83.00%
N4UNQ9	フザリウム・オキシスポラム f. sp. キューベンセ (株 レース 1) (バナナ病菌)	83.00%
N1S578	フザリウム・オキシスポラム f. sp. キューベンセ (株 レース 4) (バナナ病菌)	83.00%
J9NC66	フザリウム・オキシスポラム f. sp. リコベルシシ (株 4287 / CBS 123668 / FGSC 9935 / NRRL 34936) (トマト萎凋病フザリウム)	83.00%
G3J9Z1	コルディセプス・ミリタリス (株 CM01) (冬虫夏草)	90.00%
E9ERN2	メタルヒジウム・アニソプリエ (株 ARSEF 23 / ATCC MYA-3075)	84.00%
S0EGT1	ギベレラ・フジクロイ (株 CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) (馬鹿苗病及び根腐れ病菌) (フザリウム・フジクロイ)	81.00%
F9G5W7	フザリウム・オキシスポラム (株 F05176) (萎凋病フザリウム)	81.00%
J4UKW3	ビューベリア・パシアナ (株 ARSEF 2860) (白きょう病菌) (トリチア・シオタエ (Tritirachium shioetae))	87.00%
G9NWT7	ヒボクレア・アトロビリディス (株 ATCC 20476 / IMI 206040) (トリコデルマ・アトロビリデ)	81.00%
F9XNY2	ミコスファエラ・グラミニコラ (株 CBS 115943 / IPO323) (コムギ葉枯病菌) (セプトリア・トリチシ)	83.00%
E9E111	メタルヒジウム・アクリダム (Metarhizium acridum) (株 CQMa 102)	84.00%
K3VY44	フザリウム・シュードグラミネアルム (株 CS3096) (コムギ及びオオムギ根頭腐敗病)	75.00%
I1S268	ギベレラ・ゼア (株 PH-1 / ATCC MYA-4620 / FGSC 9075 / NRRL 31084) (コムギ根枯病菌) (フザリウム・グラミネアルム)	74.00%
M1W946	クラビセプス・ブルブレア (株 20.1) (麦角菌) (スファセリア・セゲタム)	81.00%
T4ZYJ9	オフィオコルディセプス・シネンシス (株 Co18 / CGMCC 3.14243) (冬虫夏草菌 (Yarsagumba caterpillar fungus)) (ヒルステラ・シネンシス)	80.00%
T0KGZ7	コレトリチウム・グロエオスポリオイデス (Colletotrichum gloeosporioides) (株 Cg-14) (炭疽病菌) (グロメラ・シングラタ)	75.00%
L2G003	コレトリチウム・グロエオスポリオイデス (株 Nara_g05) (炭疽病菌) (グロメラ・シングラタ)	75.00%
E3QL83	コレトリチウム・グラミニコラ (株 M1.001 / M2 / FGSC 10212) (トウモロコシ炭疽病菌) (グロメラ・グラミニコラ)	74.00%
H1UVP4	コレトリチウム・ヒジニアナム (Colletotrichum higginsianum) (株 IMI 349063) (アブラナ科炭疽病菌)	73.00%
N4VDA2	コレトリチウム・オルビクラレ (Colletotrichum orbiculare) (株 104-T / ATCC 96160 / CBS 514.97 / LARS 414 / MAFF 240422) (キュウリ炭疽病菌) (コレトリチウム・ラゲナリウム)	72.00%
G2RH83	チエラピア・テレストリス (株 ATCC 38088 / NRRL 8126) (アクレモニウム・アラバメンセ)	70.00%
G2QPF6	チエラピア・ヘテロタリカ (株 ATCC 42464 / BCRC 31852 / DSM 1799) (ミセリオフトラ・サーモフィラ)	71.00%

【 0 0 7 7 】

(表 1 の続き)

【表 2 - 2】

受託番号 (UNIPROT)	生物/株	トリコデルマ・リーゼイの 可溶性銅トランスポーターに 対する同一性(%)
M3B392	ミコスファエラ・フィジエンシス(株CIRAD86)(黒葉枯病菌)(シュードセルコスボラ・フィジエンシス)	71.00%
J3PBB2	ガエウマンノマイセス・グラミニスvar. トリチシ(株R3-111a-1)(コムギ及びオオムギ立ち枯れ病菌)	67.00%
G2XBJ6	ベルチシリウム・ダヒリアエ(株VdLs. 17/ATCC MYA-4575/FGSC 10137)(バーティシリウム萎凋病)	68.00%
C9SLB0	ベルチシリウム・アルファルファエ(Verticillium alfalfae)(株VaMs. 102/ATCC MYA-4576/FGSC 10136)(アルファルファのバーティシリウム萎凋病)(ベルチシリウム・アルポーアトラム)	68.00%
L7JDG8	マグナポルテ・オリザエ(株P131)(イネいもち病菌)(ピリキュラリア・オリザエ)	67.00%
L7HXX7	マグナポルテ・オリザエ(株Y34)(イネいもち病菌)(ピリキュラリア・オリザエ)	67.00%
G4MRF2	マグナポルテ・オリザエ(株70-15/ATCC MYA-4617/FGSC 8958)(イネいもち病菌)(ピリキュラリア・オリザエ)	67.00%
FQX7H1	グロスミア・クラビゲラ(株kw1407/UAMH 11150)(青変菌)(グラフィオクラジエラ・クラビゲラ(Graptiocladiella clavigera))	70.00%
E5R4F7	レブスファエリア・マクスス(株JN3/単離23, 1.3/レースAv1-4-5-6-7-8)(黒脚病菌)(フォーマ・リンガム)	69.00%
M2NDS8	バウドニア・コンブニアセンシス(Baudoinia compniacensis)(株UAMH 10762)(エンジェルズシェア(Angels' share)病菌)	71.00%
R8BW20	トグニニア・ミニマ(Togninia minima)(株UCR-PA7)(エスカ病菌)(ファエオアクレモニウム・アレオフィラム)	66.00%
U7PM18	スポロトリクス・シェンキ(株ATCC 58251/de Perez 2211183)(スポロトリコーシス(Rose-picker's disease)菌)	69.00%
M3CXY4	スファエルリナ・ムシバ(Sphaerulina musiva)(株SO2202)(ボブラ茎潰瘍菌)(セプトリア・ムシバ(Septoria musiva))	64.00%
M4FJF4	マグナポルテ・ポアエ(Magnaporthe poae)(株ATCC 64411/73-15)(ケンタッキーブルーグラス病菌)	65.00%
Q2GVA6	カエトミウム・グロボサム(株ATCC 6205/CBS 148.51/DSM 1962/NBRC 6347/NRRL 1970)(土壌菌)	69.00%
W3WZP2	ペスタロチオプシス・フィシ(Pestalotiopsis fici)W106-1	62.00%
A7EZX1	スクレロチニア・スクレロチオラム(株ATCC 18683/1980/Ss-1)(白カビ)(ウェゼリニア・スクレロチオラム(Whetzelinia sclerotiorum))	69.00%
R0K8K2	セトスファエリア・ツルシカ(株28A)(トウモロコシ煤斑病菌)(エクセロヒルム・ツルシカム)	68.00%
S3C0P8	オフィオストマ・ピセアエ(株UAMH 11346)(青変病菌)	66.00%
G0RZ60	カエトミウム・サーモフィラム(株DSM 1495/CBS 144.50/IMI 039719)	72.00%
W9XAR0	カプロニア・エビマイセス(Capronia epimyces)CBS 606.96	66.00%
H6BU98	エクソフィアラ・デルマチチジス(株ATCC 34100/CBS 525.76/NIH/UT8656)(黒色真菌)(ワンギエラ・デルマチチジス)	68.00%
N1PEF2	マイコスファエラ・ピニ(Mycosphaerella pini)(株NZE10/CBS 128990)(赤斑葉枯病菌)(ドチストロマ・セプトスポラム(Dothistroma septosporum))	67.00%
W9XE16	クラドフィアラ・ロフォラ・プサムモフィラ(Cladophialophora psammophila)CBS 110553	68.00%

10

20

【0078】

30

表 2 : 膜結合型トリコデルマ・リーゼイ銅輸送 ATPアーゼ(又は銅パーミアーゼ)(配列番号 6)に対して相同な配列。表 2 は、受託番号(UNIPROT)、生物、及び配列番号 6 との配列同一性を示す。タンパク質の配列データベース UNIPROT を、アミノ酸配列の基として用いた。配列同一性は、NCBI/BLAST のウェブサイトの UniProt データベースに対する、標準的なタンパク質 - タンパク質 BLAST (blastp) を用いて決定した。

【表 3 - 1】

受託番号 (UNIPROT)	生物/株	トリコデルマ・リーゼイの 銅輸送ATPアーゼに 対する同一性(%)
G0RK31	ヒボクレア・ジェコリナ(株QM6a)(トリコデルマ・リーゼイ)	100.00%
G9N254	ヒボクレア・ビレンス(株Gv29-8/FGSC 10586)(グリオクラジウム・ビレンス)(トリコデルマ・ビレンス)	84.00%
G9PAF2	ヒボクレア・アトロビリディス(株ATCC 20476/IMI 206040)(トリコデルマ・アトロビリデ)	75.00%
E9ECM0	メタルヒジウム・アクリダム(Metarhizium acridum)(株CQMa 102)	74.00%
E9EKQ2	メタルヒジウム・アニソブリエ(株ARSEF 23/ATCC MYA-3075)	73.00%
G3JK92	コルディセプス・ミリタリス(株CM01)(冬虫夏草)	71.00%
J4WLH8	ビューベリア・バシアナ(株ARSEF 2860)(白きょう病菌)(トリチラシウム・シオタエ(Tritirachium shioetae))	71.00%
X0F5I6	フザリウム・オキシスポラムf. sp. ラディシス-リコベルシシ26381	71.00%
W9L8T5	フザリウム・オキシスポラムFo47	71.00%
X0IUR8	フザリウム・オキシスポラムf. sp. conglutinansレース2 54008	71.00%
F9F4A0	フザリウム・オキシスポラム(株Fo5176)(萎凋病フザリウム)	71.00%
S0D152	ギベレラ・フジクロイ(株CBS 195.34/IMI 58289/NRRL A-6831)(馬鹿苗病及び根腐れ病菌) (フザリウム・フジクロイ)	71.00%
X0ARP5	フザリウム・オキシスポラムf. sp. melonis 26406	71.00%
W9Q9P3	フザリウム・オキシスポラムf. sp. pisi HDV247	71.00%
N4UMC8	フザリウム・オキシスポラムf. sp. キューベンセ(株レース1)(バナナ病菌)	71.00%
X0CHX5	フザリウム・オキシスポラムf. sp. raphani 54005	71.00%
W9M4Y1	フザリウム・オキシスポラムf. sp. リコベルシシMN25	71.00%
W9HH20	フザリウム・オキシスポラムFOSC 3-a	71.00%
X0K9C1	フザリウム・オキシスポラムf. sp. キューベンセトロピカルレース4 54006	71.00%
J9N7Q4	フザリウム・オキシスポラムf. sp. リコベルシシ(株4287/CBS 123668/FGSC 9935/ NRRL 34936)(トマト萎凋病フザリウム)	71.00%
X0N9B8	フザリウム・オキシスポラムf. sp. バンシフェクタム25433	71.00%
N1RJG7	フザリウム・オキシスポラムf. sp. キューベンセ(株レース4)(バナナ病菌)	71.00%
W7MRF0	ギベレラ・モニリフォルミス(株M3125/FGSC 7600)(トウモロコシ穂及び茎腐れ病菌) (フザリウム・ベルチシリオイデス)	70.00%
C7YWD7	ネクトリア・ヘマトコッカ(株77-13-4/ATCC MYA-4622/FGSC 9596/MPV1) (フザリウム・ソラニsubsp. pisi)	71.00%

10

20

【0079】

(表2の続き)

【表 3 - 2】

受託番号 (UNIPROT)	生物／株	トリコデルマ・リーゼイの 銅輸送ATPアーゼに 対する同一性(%)
K3W0V9	フザリウム・シュードグラミネアルム(株CS3096)(コムギ及びオオムギ根腐敗病)	70.00%
M1WIK4	クラビセプス・ブルブレア(株20.1)(菱角菌)(スファセリア・セゲタム)	70.00%
T0KKX9	コレトリチウム・グロエオスポリオイデス(Colletotrichum gloeosporioides)(株Cg-14)(炭疽病菌) (グロメラ・シングラタ)	70.00%
Q0WV8	グロメラ・ラゲナリウム(炭疽病菌)(コレトリチウム・ラゲナリウム)	70.00%
N4UX28	コレトリチウム・オルビクラレ(Colletotrichum orbiculare)(株104-T/ATCC 96160/ CBS 514.97/LARS 414/MAFF 240422)(キュウリ炭疽病菌)(コレトリチウム・ラゲナリウム)	70.00%
G2WT58	ペルチシリウム・ダヒリアエ(株VdLs.17/ATCC MYA-4575/FGSC 10137)(パーティシリウム萎凋病)	69.00%
Q8J286	コレトリカム・リンデムチアナム(ダイズ炭疽病菌)(グロメラ・リンデムチアナ(Glomerella lindemuthiana))	69.00%
H1UZ58	コレトリチウム・ヒジンシアナム(Colletotrichum higginsianum)(株IMI 349063)(アブラナ科炭疽病菌)	70.00%
E3QAD8	コレトリチウム・グラミニコラ(株M1.001/M2/FGSC 10212)(トウモロコシ炭疽病菌) (グロメラ・グラミニコラ)	70.00%
X0G9A8	フザリウム・オキシスポラムf. sp. ラディシス-リコベルシシ26381	71.00%
W9L5N1	フザリウム・オキシスポラムFo47	71.00%
G4N6G7	マグナボルテ・オリザエ(株70-15/ATCC MYA-4617/FGSC 8958)(イネいもち病菌) (ピリキュラリア・オリザエ)	69.00%
X0IFU3	フザリウム・オキシスポラムf. sp. conglutinansレース2 54008	72.00%
X0ASZ2	フザリウム・オキシスポラムf. sp. melonis 26406	71.00%
W9QGK7	フザリウム・オキシスポラムf. sp. pisi HDV247	71.00%
X0DH57	フザリウム・オキシスポラムf. sp. raphani 54005	71.00%
W9MAB3	フザリウム・オキシスポラムf. sp. リコベルシシMN25	71.00%
W9HH28	フザリウム・オキシスポラムFOSC 3-a	71.00%
X0M7A2	フザリウム・オキシスポラムf. sp. バシンフェクタム25433	71.00%
L7JFD3	マグナボルテ・オリザエ(株P131)(イネいもち病菌)(ピリキュラリア・オリザエ)	69.00%
L7I603	マグナボルテ・オリザエ(株Y34)(イネいもち病菌)(ピリキュラリア・オリザエ)	69.00%
G2REL9	チエラピア・テレストリス(株ATCC 38088/NRRL 8126)(アクレモニウム・アラバメンセ)	69.00%
W3WMU8	ベスタロチオプシス・フィシ(Pestalotiopsis fici)W106-1	68.00%
B2AAH3	ボドスポラ・アンセリナ(株S/ATCC MYA-4624/DSM 980/FGSC 10383)(Pleurage anserina)	69.00%
G9SH44	ペルチシリウム・アルファルファエ(Verticillium alfalfae)(株VaMs.102/ATCC MYA-4576/ FGSC 10136)(アルファルファのパーティシリウム萎凋病)(ペルチシリウム・アルポーアトラム)	68.00%
M4G378	マグナボルテ・ボアエ(株ATCC 64411/73-15)(ケンタッキーブルーグラス病菌)	68.00%
R8BNC2	トグニニア・ミニマ(Togninia minima)(株UCR-PA7)(エスカ病菌)(ファエオアクレモニウム・アレオフィラム)	69.00%

10

20

【0080】

表3：銅酵素の例は、当初はグリコシドヒドロラーゼ61(GH61)ファミリーとして分類されていたが、現在はAA9(銅依存性溶解性多糖モノオキシゲナーゼ(LPMO))として分類されている。

30

【表 4 - 1】

生物	GenBank受託番号:	Uniprot番号:
アガリクス・ビスボラス	AAA53434. 1	Q00023
アスペルギルス・フミガタス	CAF31975. 1, AFJ54163. 1	Q6MYM8.
アスペルギルス・カワチ	BAB62318. 1	Q96WQ9
アスペルギルス・ニダランス	EAA65609. 1, EAA59072. 1, EAA66740. 1, CBF83171. 1, EAA59545. 1, EAA58450. 1, EAA63617. 1, EAA59125. 1, EAA64722. 1, ABF50850. 1, EAA64499. 1	C8VTW9, Q5BE19, Q5B7G9, C8V193, Q5AQA6, Q5AUY9, C8V0F9, Q5AZ52, C8VIS7, Q5B8T4, C8V6H2, Q5B6H0, Q5BCX8, C8VNP4, Q5BAP2
アスペルギルス・ニガー	CAK38942. 1, CAK45495. 1, CAK41095. 1, CAK97151. 1, CAK46515. 1, CAK97324. 1, CAK42466. 1	A2QJX0, A2QR94, A2QYU6, A2QZE1, A2R313, A2R5J9, A2R5N0
アスペルギルス・オリゼ	BAE55582. 1, BAE56764. 1, BAE58643. 1, BAE58735. 1, BAE59290. 1, BAE60320. 1, BAE64395. 1, BAE65561. 1	Q2US83, Q2UNY1, Q2UIH2, Q2UI80, Q2UGM5, Q2UDP5, Q2U220, Q2TYW2
ビボラリス・マイディス	AAM76663. 1	Q8J0H7
ボトリオティナ・フケリアナ	CCD34368. 1, CCD47228. 1, CCD48549. 1, CCD50139. 1, CCD50144. 1, CCD51504. 1, CCD49290. 1, CCD52645. 1, CCD50451. 2, CCD50451. 1	
ケトミウム・サーモフィラム	AGY80102. 1, AGY80103. 1, AGY80104. 1, AGY80105. 1, AGY80103. 1, AGY80104. 1, AGY80105. 1	
コレトリカム・グラミニコラ	CAQ16278. 1, CAQ16206. 1, CAQ16208. 1, CAQ16217. 1	B5WYD8, B5WY66, B5WY68, B5WY77
コプリノプシス・シネレア	CAG27578. 1	
クリプトコッカス・バシリスボラス	ADV19810. 1	
クリプトコッカス・ネオフォルマンズ	AFR92731. 1, AFR92731. 2, AAC39449. 1, AAW41121. 1	Q59899, F5HH24
フラムリナ・ヴェルティベス	ADX07320. 1	
フザリウム・フジクロイ	CCT72465. 1, CCT67119. 1, CCT69268. 1, CCT72729. 1, CCT72942. 1, CCT73805. 1, CCT74544. 1, CCT74587. 1, CCT67584. 1, CCT75380. 1, CCT67584. 1, CCT75380. 1, CCT64153. 1, CCT64954. 1, CCT63889. 1	
フザリウム・グラミネアラム	ABT35335. 1, XP__383871. 1	
グロエオフィラム・トラベウム	AEJ35168. 1	
ヘテロバシディオン・バルビボラム	AFO72234. 1, AFO72233. 1, AFO72232. 1, AFO72235. 1, AFO72236. 1, AFO72237. 1, AFO72238. 1, AFO72239. 1	
フミコーラ・インソレンス	CAG27577. 1	
ヒボクレア・オリエンタリス	AFD50197. 1	
ラシオディプロディア・テオプロマエ	CAJ81215. 1, CAJ81216. 1, CAJ81217. 1, CAJ81218. 1	
レプトスフェリア・マクランズ	CBX91313. 1, CBX93546. 1, CBX94224. 1, CBX94532. 1, CBX94572. 1, CBX95655. 1, CBX96476. 1, CBX96550. 1, CBX96949. 1, CBX97718. 1, CBX98126. 1, CBY01974. 1, CBY02242. 1, CBX91667. 1, CBX93965. 1, CBX98254. 1, CBY00196. 1, CBY01204. 1, CBY01256. 1, CBY01257. 1	E4ZJM8, E4ZQ11, E4ZS44, E4ZSU4, E4ZSY4, E4ZVM9, E4ZZ41, E4ZYM4, E5A089, E5A201, E5A3B3, E5AFI5, E5ACPO, E4ZK72, E4ZQA3, E5A3P1, E5A955, E5AC13, E5ADG7, E5ADG8

10

20

30

【 0 0 8 1 】

(表 3 の 続 き)

【表 4 - 2】

生物	GenBank受託番号:	Uniprot番号:
ロイコアガリクス・ゴンギロフォラス	CDJ79823. 1	
マグナボルテ・グリスア	EAA54572. 1, XP_359989. 1, EAA53409. 1, XP_367775. 1, EAA56945. 1, XP_367375. 1, EAA53298. 1, XP_367664. 1, EAA57051. 1, XP_362437. 1, EAA54517. 1, XP_365800. 1, EAA57285. 1, XP_362794. 1, EAA57097. 1, XP_362483. 1, EAA50788. 1, XP_362102. 1, EAA57439. 1, XP_362640. 1, EAA49718. 1, XP_364864. 1, EAA50298. 1, XP_361583. 1, EAA52941. 1, XP_369395. 1, EAA51422. 1, EAA56258. 1, XP_369714. 1, EAA53354. 1, XP_367720. 1, XP_370106. 1	G4N3E5, G4MUY8, G4MXC7, G4MXS5, G4MS66, G4MVX4, G4NAI5, G4N560, G4NHT8, G4N220,
マルブランケア・シナモニア	CCP37674. 1	
メラノカルパス・アルボミセス	CCP37668. 1	
ミセリオフトラ・フェルグシ	CCP37667. 1	
ミセリオフトラ・サーモフィラ	AEO61257. 1, AEO56016. 1, AEO54509. 1, AEO55082. 1, AEO55652. 1, AEO55776. 1, AEO56416. 1, AEO56542. 1, AEO56547. 1, AEO56642. 1, AEO56665. 1, AEO58412. 1, AEO58921. 1, AEO59482. 1, AEO59823. 1, AEO59836. 1, AEO59955. 1, AEO60271. 1, AEO61304. 1, AEO61305. 1, AEO56498. 1, AEO58169. 1	
ニューロスボラ・クラッサ	CAD21296. 1, XP_326543. 1, EAA32426. 1, CAD70347. 1, EAA26656. 1, XP_322586. 1, CAE81966. 1, EAA36262. 1, XP_329057. 1, CAF05857. 1, EAA30230. 1, XP_331120. 1, EAA33178. 1, XP_328604. 1, EAA29347. 1, XP_325824. 1, EAA36362. 1, XP_330104. 1, EAA29018. 1, XP_328466. 1, EAA29132. 1, XP_327806. 1, EAA30263. 1, XP_331016. 1, EAA34466. 1, XP_325016. 1, EAA26873. 1, XP_330877. 1, EAA33408. 1, XP_328680. 1, EAA36150. 1, CAB97283. 2, XP_330187. 1	Q1K8B6, Q8WZQ2, Q1K4Q1, Q873G1, Q7SHD9, Q7S411, Q7SA19, Q7S1V2, Q7SHI8, Q7S111, Q7S1A0, Q7S439, Q7SCJ5, Q7RWN7, Q7SAR4, Q7RV41, Q9P3R7
ベニシリウム・クリソゲナム	CAP80988. 1, CAP91809. 1, CAP92380. 1, CAP86439. 1	B6H016, B6H3U0, B6H3A3, B6HG02
ファネロカエテ・クリソボリウム	AAM22493. 1, BAL43430. 1	Q8NJ19
ビリフォルモスボラ・インディカ	CCA67659. 1, CCA68244. 1, CCA70035. 1, CCA70418. 1, CCA70703. 1, CCA72182. 1, CCA72183. 1, CCA72192. 1, CCA72220. 1, CCA73144. 1, CCA73151. 1, CCA74246. 1, CCA74814. 1, CCA75037. 1, CCA66803. 1, CCA67656. 1, CCA67657. 1, CCA67658. 1, CCA70417. 1, CCA71764. 1, CCA72221. 1, CCA74449. 1, CCA76320. 1, CCA76671. 1, CCA77877. 1	

10

20

【0082】

(表 3 の 続 き)

30

【表 4 - 3】

生物	GenBank受託番号:	Uniprot番号:
ボドスボラ・アンセリナ	CAP59702.1, CAP61395.1, CAP61476.1, CAP61650.1, CAP64619.1, CAP64732.1, CAP64865.1, CAP65111.1, CAP65855.1, CAP65866.1, CAP65971.1, CAP66744.1, CAP67176.1, CAP67190.1, CAP67201.1, CAP67466.1, CAP67481.1, CAP67493.1, CAP67740.1, CAP68173.1, CAP68309.1, CAP68352.1, CAP68375.1, CAP71532.1, CAP71839.1, CAP72740.1, CAP73072.1, CAP73254.1, CAP73311.1, CAP73320.1, CAP61048.1, CAP70156.1, CAP70248.1	B2A9F5, B2AD80, B2ADG1, B2ADY5, B2AKU6, B2AL94, B2ALM7, B2AM18, B2APD8, B2APE9, B2API9, B2ARG6, B2AS05, B2AS19, B2AS30, B2ASU3, B2ASV8, B2ASX0, B2ATL7, B2AUV0, B2AV86, B2AVC8, B2AVF1, B2B346, B2B403, B2B4L5, B2B5J7, B2B629, B2B686, B2B695, B2AC83, B2AZV6, B2AZD4
ブレノケタ・リコベルシシ	AEV53599.1	
ラサムソニア・ビスソクラミドイデス	CCP37669.1	
レメルソニア・サーモフィラ	CCP37675.1	
シタリジウム・インドネシアカム	CCP37676.1	
ソルダリア・マクロスボラk-hell	CAQ58424.1	C1KU36
サーモアスカス・アウランディアクス	ABW56451.1, ACS05720.1, CCP37673.1, AGO68294.1	
サーモマイセス・デュボンティ	CCP37672.1	
サーモマイセス・ラヌギノサス (Thermomyces lanuginosus)	CCP37678.1	
チエラビア・テレストリス (Thielavia terrestris)	CAG27576.1, AEO62422.1, AEO67662.1, AEO64605.1, AEO69044.1, AEO64177.1, AEO64593.1, AEO65532.1, AEO65580.1, AEO66274.1, AEO67396.1, AEO68023.1, AEO68157.1, AEO68577.1, AEO68763.1, AEO71031.1, AEO67395.1, AEO69043.1, ACE10231.1, ACE10232.1, ACE10232.1, ACE10233.1, ACE10233.1, AEO71030.1, ACE10234.1, ACE10235.1, ACE10235.1	
トリコデルマ・リーゼイ	AAP57753.1, ABH82048.1, ACK19226.1, ACR92640.1, CAA71999.1	Q7Z9M7, O14405
トリコデルマ・サツリスボラム	ADB89217.1	D3JTC4
トリコデルマ属	ACH92573.1	B5TYI4
トリコデルマ・ビリデ	ACD36971.1, ADJ57703.1, ACD36973.1	B4YEW1, B4YEW3, D9IXC6
未培養真核細胞	CCA94933.1, CCA94930.1, CCA94931.1, CCA94932.1, CCA94934.1	
ボルバリエラ・ボルバセア	AFP23133.1, AAT64005.1	Q6E5B4
ゼア・マイズ	ACF86151.1, ACF78974.1, ACR36748.1	B4FA31

10

20

【0083】

有用性

本発明で詳述される組成物及び方法は、銅酵素の生産に多くの利益をもたらす。例えば、本開示の態様は、銅酵素の産生向上を産業的に応用することを可能にし、例えば、商業的に有用な製品（例えばセルロース系エタノール）の製造において銅酵素をセルロース系バイオマス処理に用いることが挙げられる。他の銅酵素（例えばラッカーゼ及びチロシナーゼ）の産生量の向上も産業的価値（例えば洗剤、バイオ燃料及び食品用途への使用）を高めるものである。

30

【0084】

更に、本開示の組成物及び方法は、銅酵素の産生において使用される銅の量の低減を可能にし、それにより培養プロセスからの排水中の銅濃度を低減させ、ゆえに工場排水におけるこの金属の排出基準を満たすことの一助となる。

40

【0085】

本発明の組成物及び方法の他の態様及び実施形態は、上記の説明及び以下の実施例より明らかとなるであろう。

【実施例】

【0086】

本教示の態様を実施例を参照して更に説明するが、それはいかなる形であれ本教示を限定するものと解釈すべきでない。

【0087】

実施例1：チロシナーゼ発現細胞に対する銅の影響

トリコデルマ・リーゼイチロシナーゼ（配列番号9）の過剰発現用の発現ベクターを構築し（図1C）、トリコデルマ・リーゼイ宿主細胞を形質転換した。トリコデルマ・リー

50

ゼイチロシナーゼをコードするDNA配列の発現を誘導するプロモーターをc b h 1プロモーターとした。これらの形質転換された宿主細胞からの分泌タンパク質の発現量を、14 Lの培養において測定した。グルコースが枯渇するまで、細胞をフラスコ中、34 及びpH 3.5の条件で前培養した。グルコース/ソホロースのフィードを開始した後、温度が34 から28 へ推移し、pHが3.5から4へ推移した。(グルコース/ソホロースはc b h 1プロモーターの誘導物質である)。攪拌、圧力及びエアフローを調節して溶存酸素(%)を一定にした。(酵素産生の速度に応じて)培養を約200時間行った。図2中、上記のチロシナーゼ発現宿主細胞の14 Lスケール培養による細胞外タンパク質の発現をSDS-PAGEにより解析した。培養時間を時間単位で下に示し、培養中の銅フィードの開始を上向きの矢印で示す。分泌された酵素チロシナーゼ及びエンドグルカナーゼ6のゲル中のバンドを左側(各々Ty r及びEG6)で示す。銅含有チロシナーゼ酵素は、69時間以内にピーク産生を示し、その後、残りの時間において蓄積が減少した。対照的に、銅を含有しないエンドグルカナーゼ6(EG6)酵素は、全時間経過において蓄積を示した。これは、銅含有酵素の発現効率が、時間経過とともに、非銅含有酵素と比較し低下したことを示すものである。

10

20

30

40

50

【0088】

チロシナーゼの発現向上を試みるため、チロシナーゼ過剰発現宿主細胞を、様々な量の銅において培養した。図3は、銅の量(各レーンの下部に示す)を増加させた場合の、チロシナーゼ(Ty r)発現のSDS-PAGE解析を示す。この図に示されるように、増殖培地中に存在する硫酸銅の量の増加により、宿主細胞におけるチロシナーゼ産生は、増加ではなくむしろ減少した。このパターンは、チロシナーゼを過剰発現する2つの独立した宿主細胞株におけるチロシナーゼ活性のアッセイにおいても確認された(図4)。図4中、チロシナーゼ過剰発現株A及びC(各々上部及び下部のパネル)を、0~1000 µMの範囲の銅濃度で培養し、基質としてチロシンを用い、286 nm(白色バー)及び470 nm(黒色バー)における生成物の形成を検出することにより、培養上清のチロシナーゼ活性を測定した。タンパク質産生への副作用に至らなかった最大の銅濃度は約15 µMである。追加の銅が分泌経路に適切に導入されず、そのためチロシナーゼ分泌の低下及び/又は細胞毒性に至らなかったと予想される。

【0089】

実施例2：銅金属シャペロンの過剰発現による、チロシナーゼ発現の増加

トリコデルマ・リーゼイ由来の可溶性銅トランスポーター及び膜結合型銅輸送ATPアーゼの合成遺伝子を、公知の配列との相同性により同定し、更に合成した(GeneArt(登録商標)、Life Technologies)。これらの2つのトリコデルマ・リーゼイの銅金属シャペロンの発現ベクターを構築し、それらの過剰発現が実施例1の宿主細胞においてチロシナーゼ発現を向上させ得るか否かの決定に用いた。図1A~1Bは、細胞質(可溶性)銅トランスポーターの発現構築物(1A)、及び膜結合型銅輸送ATPアーゼの発現構築物(1B)の概略図を表す。これらの銅シャペロン遺伝子は、構成的ピルビン酸キナーゼ(pk i)プロモーターと、CBH1遺伝子由来のターミネーターを用いて発現させた。

【0090】

図5は、低い/検出不可能な程度のチロシナーゼ発現に至る銅濃度(6 mM)下で培養したチロシナーゼ過剰発現細胞由来のチロシナーゼ活性に関するスポットアッセイの結果を示す。このアッセイにおいてチロシナーゼ活性は、10 µLの培養上清及び200 µLの10%スキムミルク(35 まで予熱)をマイクロタイタープレートに添加し、35 で10分(又はそれ以上)の間、混合物をインキュベートすることにより検出した。チロシナーゼが存在し、活性を有するとき、ミルクは白色から赤色に変化した。プラスの記号は、顕著な赤色のウェルを示す。

【0091】

予想どおり、チロシナーゼ活性はコントロール株A(レーン8のウェル)及び株C(レーン1のウェル)で検出できなかった(点線で大枠を示す)。しかしながら、これらの株

が膜結合型銅輸送 ATPアーゼ（レーン 2～7 のウェル）又は細胞質（可溶性）銅トランスポーター（レーン 9～12 のウェル）のプラスミドで再形質転換されたとき、株 A 及び C のチロシナーゼ産生能は回復した。このように、これらのいずれの銅シャペロンの発現においても、チロシナーゼ銅酵素の発現が顕著に増加した。

【0092】

実施例 3：銅金属シャペロンの過剰発現による、ラッカーゼの発現の増加：

図 6 は、Cerrena unicolor 由来の銅金属タンパク質であるラッカーゼ D の発現ベクター構築物を示す（CBH1 シグナル配列及び cbh1 転写ターミネーターを有し、cbh1 プロモーターから転写される）。成熟型のラッカーゼ D の配列を配列番号 10 に示す。

10

【0093】

図 7 A～7 C は、上記の銅金属シャペロンの一方又は両方の過剰発現の有無における、ラッカーゼ D 過剰発現株（株 32 A）におけるラッカーゼ D 産生の分析結果を示す（図 1 で表されるベクターから発現される配列番号 3 及び 6）。図 7 A は、株 32 A（最も左のバー、100% で設定）、並びに株 32 A 由来であり、細胞質トランスポーター及び膜結合型銅輸送 ATPアーゼを過剰発現する（図 1 A 及び 1 B の発現ベクターで形質転換された）株（#46、#47、及び #48）におけるラッカーゼ D の相対的発現量を示す。図 7 B は、株 32 A（最も左のバー、100% で設定）、並びに株 32 A 由来であり、膜結合型銅輸送 ATPアーゼを過剰発現する（図 1 A の発現ベクターで形質転換された）株（#2、#16、#29、#30、及び #31）におけるラッカーゼ D の相対的発現量を示す。図 7 C は、株 32 A（最も左のバー、100% で設定）、並びに株 32 A 由来であり、細胞質銅トランスポーターを過剰発現する（図 1 B の発現ベクターで形質転換された）株（#5、#22、#27、及び #35）におけるラッカーゼ D の相対的発現量を示す。形成転換体を 5 日間マイクロタイタープレートで培養し、ラッカーゼ発現を ABTS アッセイ（ABTS = 2, 2'-アジノ-ビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸））を用いて測定した。ABTS アッセイにおいて、10 µL の 5 日間液体培地を新しいプレートに移し、150 µL の 100 mM NaOAc（pH 5）及び 20 µL の 4.5 mM ABTS を添加した。分光光度計を用い、20 秒の間隔で 5 分間にわたり、最大 OD₄₂₀ 値を測定した。このデータは、膜結合型銅輸送 ATPアーゼのみの発現、又は、細胞質（可溶性）銅トランスポーターとの組合せによる発現が、ラッカーゼ D の産生を大幅に向上させたことを示す。

20

30

【0094】

上記組成物及び方法は、一部の詳細において理解の明確化の目的のために例示及び実施例により説明したが、添付の特許請求の範囲の趣旨又は範囲から逸脱することなくこれに一定の変更及び修正を加えることができることは、本明細書の教示を考慮すれば当業者であれば容易に理解される。

【0095】

したがって、上記記載は単に本組成物及び方法の原理を述べたに過ぎない。当業者であれば、ここに明瞭に記載され又は示されていなくとも、本組成物及び方法の原理を含み、各請求項の趣旨及び範囲内で様々な態様を考案できることを理解されたい。更に、本明細書に記載される全ての例及び暫定的な言い回しは、本組成物及び方法の原理並びに当該技術分野の進歩に寄与する本発明者らの思想が読者によって理解されるのを助けるためのものであり、そのように具体的に記載した例及び条件に限定されるものではないと解釈されるべきである。また、本明細書において、本組成物及び方法の原理、態様、及び実施形態を記載するすべての表現、並びにその具体例は、その構成及び機能の両方の均等物を包含することを意図している。更に、そのような均等物が、現在知られている均等物と、将来創出される均等物、すなわち構成のいかにかわらず同じ機能をもたらすよう創出された任意の均等物の両方を包含することを意図している。本発明の組成物及び方法の範囲は、したがって、本明細書に示され、記載された例示の実施形態に限定することを意図するものではない。

40

50

【表 5 - 2】

配列番号	説明	配列
5	トリコデルマ・リーゼイ 膜結合型銅輸送 ATPアーゼのコード配列	<p>ATGGCCCCAACATACATCAAAGTCCCGGGCGGGACAATGATGAGCATGCGAGTGCGACCCCTTACGCCAAAGAGCGCGCA CATGGCCCAACCACTCTGCGCGTTGGTGGCATGACATGTGGTTCTGTCACAGCAGCCGCTCGAGGGCGGGCTTCAAGGGCG TCAAGGGCGTTGGTACCGTCTCCGTACGCTTGTATGGAGAGGGCTGTCGTAATGCACGACCCCGGATCATCAGCGCTG AACAGGTTTCGAGAGATTATCGAAGATTGTGGATTTCGACGCTGAGCTGCTGTGACGCGGACCTCTTGAGCCCACTCGTCCCTC GATTCTCGGATGCCAAGGGGGATGAGGACATCGATAGCGGCTCTTGACGACCAAGGATGCGCATCGAAGGCATGACGCTGT GGCGCTGTACATCTGCTGTGAGGGTGGATTCAAGGATATCCAGGTGTCAAGAGCTTCAGCATCTGCTTCTTTCTGAG CGAGCCGTATCGAACACGATCCAGAACTTTGCCACCGGACAAGATTACCGAAATCATCGAAGACCGGGGCTTGGTGC CGAAATCGTCGATTCCGTGAAGGCGCAACCTGGCAGCAGTACCGAGGCTGAGAACCCAGCAAGTCAATGTGCTGACTACGA CGGTAGCCATCGAAGGAATGACTTGCGGTGCCTGTACGCTGCTGTTGAGGGAGGCTTTTCAGGAGTTGACGGCATCCTGA AATTCACATCAGTCTTCTGCGCGAAAGGGCAGTCAATTAATCAGCATGTCAACCAAGATCTCCGCGCAACAGATTTCCGAAA TCGTTGAAGACCGGGGATTTGGTGTACGCTTGTCCACCGTCCCGAGGGCAACGATCTCAGCAGTACGACCTCGAGT TCAAAATCTATGCGAGCCCGGACGCGCCACTGCAAAAGGAGCTGGAGGAAAAGCTGCTGGCACTTGTGCTGTTAAATCT GCTTCCCTCAGCCTATCAACGAGCCGCTGTCCGTACGCAACGACCTGCCGTCAATGGGCTCCGAGGGATCGTCGAGGC GGTAGAGGCGCAAGGCTGAATGCTTTGGTGGCGGACAGGCTACGCAACCAAGCGCAACTCGAATCTTGGCGCAAGACTC GCGAGATCCAGGAATGGAGGACGGCGTGGCAAGACGTCGCGCTCGTTGCGCATTCGGGTATTCGTTCTTCCATGGTGTGAG CTATGATCTCAGACGCTCTGAACCTGAGTCTAATCCACCTTGGCCATGGTCTCTACCTCGGCGAGCTCGTCAACTTGGTACT CACAACACCTGTTCAAGTTTGGGTTGGAAGCGCTTTACGCTCTCGGCTTCAAGTCTGCTCAAGCAGCGTTCGCGGACTAT GGATGTGCTCGTATGCTCGGACCTCCTGCGCTTACTTCTTCAGCATCTTCTCCATGGTCATCTCTATCCTCTTCGAGCCT GATTCCCGCGGGGACGATCTTTGACACCGACGCTATCCTATCCTTGTGACCTTGGCGCTATCTTGAGAACAGC GCCAAGGGTACAGACATCAAAGGCTCTGTCCCGTCTCATGTCTCTAGCCCGCTCGATGGCCACCATCTACAGGATCCCAT GCCGCGGAGAAGGCGAGCAGAATCATGGGCCAAGTCAACCGATACCCGCGGATCGGAAGGCAACCGCTCTGGAGATTG CGAGCGGCTCGTCTGACGAGGAGAAGAGCATCCCTACTGAGCTGCTTCAGGTGGGAGATATCGTCTGCTATCCGACCCGGT GATAAGATTCCGGCGGACGCGCTGTTATGCGAGGAGAGACCTACGTCGACGAGAGCATGGTCACCGGAGAGGCAATGCC GGTGAGAGAGGATTGGCAGCAACGTTGATTGGAGGACCGCTCAACGGCAACGGCAGAGTGGACTTTCGCGTCAACCGAG CCGGCGGGATACCCAGCTCAGTCAGATTGTCAAGCTTGTTCAGGACGCGCAGACGACGAGGGCGCTATTCAAAGGGTG GCCGCGGATTTGGCTGGCTACTTTGTGCTACAATCTTGTGCTCGGCTCCTCACCTTCTTGGCTGGTTGATCCTGAGCC ACGCCCTGTGCGACCCCTATGATTTTCTTGAAGAACCAGTGGTGGCAAGGTCATGATTGCGTCAAGCTGTGCATCT CCGTCAATTGATTTGATGCTTGTGCTCTGGGCTTGGCCACGCGGACAGCTGTCTATGGTAGGCACGGGCTGGGCGCT GAGAATGGCATCCTCATCAAAGGGCGAGCTGCGCTGGAGCGCAACCAAGCTTACCAAAAGTCTGCTTGGCAAAAACCGG CACAATCACTCGTGGAAGAAATGGAGGTGCGCAAGAGCGGCTTGTGTTTCCCTGGAATGACAAAGTGTGCGCAGACCAAG TCTGTTGGGCGCTGTGCGTCTGCGGCAAAATGGGCAAGCAGCAGCCCTATCGGAAGGGCGATTCTGGCAGGCAAGGC AGAAGTCGGCATCCTTGAAGCCGAAGCGGCAATTCAGGAAGCGTCAATGATTTCAAGTTGACTGTTGGCAAGGGCATCGA TGCTATCGTTGAACCTGCATTATCCGGTGTGCGGACAGCTATAGGGTCTTGTGCTGGAATGTCACTTCTTGAAGAGAA CGCGCTCGAGGTCCCCAAGGATGCCGTGCGAGGCGAGCAGCAATCAACTCGTCCGTCAAAGAGCTCAGGAGCCAAAGCT GTGACTGCGGGCAGCAGCAACATCTTTGTGCGCATGATGGAAGTACAGCGGCCACCTTTGTCTCTCGACACCATCAAA GATGGGGCGGCGGGGTCAATTTCTGACTGCATGATGGCATCAAGACGGCATGGTGACGGGAGACCGGACCGCCAC CGCCCTGGCGTTGCGGCGCTCGTGGGCATCTCTCCGAGGACGTTGTTGCGGCGCTCAGCCCGACAGAAAGCAGGTGA TAGTACAGCAGTTCCAGAAACAGGAGAGGTGGTGGCATGGTGGGAGACGGCATCAACGACTCGCGGCGGCTCGCTACG GCCGACGTTGGTATCGCCATGTGCGAGCGGAACGACGCTGGCCATGGAGGGCCGAGATGTTGTGCTTATGCTCGCGCAGCA CCTGCTGAGCATCCCGTCCGCCATCCACCTCACTGGGACCATCTTCGCGCGCATCAAGCTGAACCTGGCGTGGGCATGCA TCTACAACATTGTGCGGCTGCCCATGCGATGGGTTTCTTCTGCGCTTGGCATCCACATGCACCCCATGTTGCGCGGGTT CGCCATGGCCTGCAAGTACATTAAGTGTAGTGGTTAGCAGCTGGCGCTCCGATGGTGGGCAACGACCGCAGTGGATGGACG AGGCGTCCGAACCGGCGGGTGGCCTGCGCTGGATGAGCGGCAACGGGATCGTTGGCTGGGCTAAGGAGACGTTTGGACG CGTCAGGAGAGGGAAGCGTGGAGGAGGTTACGTGGCTTGGAGAATTTAGAGGTTCTGA</p>
6	トリコデルマ・リーゼイ 膜結合型銅輸送ATP アーゼのアミノ酸配列	<p>MARTYIKVPRGRNDEHASATLTPKSAHMAATTLRVGGMTGSGCTAAVEGGFGKGVKGVGTVSVSLVMERAVVMHDPRIISAE QVREIIEGCGFDAELLSTDLLSPVPRFSDAKGDEIDISGLLTVAIEGMTGCACTSAVEGGFGKDIPGVKSFSISLLSERAVIE HDPPELLPTDKITEIIEDRGFGAEIVDSVKAQPGSSTEAENPASHVVTVAIEGMTGCACTSAVEGGFGQVDGILKFNISLLAE RAVITHDVKISAEQISEIVEDRGFGATVLSVPEANDLSSTTSQFKIYGPSDAATAKELEEKLLALAGVKSASLSLSDRLSV THQPAVIGLRGIVEAVEAAGLNLVADSHDNNAQLESIAKTRIEQEWRTACKTSASFAPVFLVSLMVLPMISDSLNLISLHLG HGLYLGDVVNLVLTTPVQFGVGKRFYVSFAKSLKHSPTMDVLVMLGTSCAYFFSIFSMVISILFEPHSPPGTIFDTSTMLITF VTLGRYLENSAKGQTSKALSRLMSLAPSMATYITDPIAAEKAESWAKSTDTPADAKGQPSGDASGSSYEESKIPTTELLQVG DIVVIRPGDKIPADGVVMRGETYVDESMTVGEAMPVQKRIGSNVIGTVNGNVRVDFRVTRAGRDQLSQIVKLVDQAQTTT APIQKVADTLAGYFVPTILLGLTFLWLILSHALSHPPMIFLKNSTSGGKVMICVKLCISIVIFACPCALGLATPTAVMVGTG GAENGLIKGGAALERTTQVTKVVLDKGTITRGKMEVAKSGLVFPWNVDVNSQTKVWVAAVGLAEMGEHPIGRAILAAKA EVGILEAEAAIPGSVNDFKLTVGKGIDAIVEPALSGDRTRYRVLAGNVTFLEENGVEVPKDAVEAAERINSSVKSSRAKAVTA GTTNIFVAIDGKYSGLCLSDTIKDGAAAGVISVLHSMGIKTAMVTGDRPTALAVAALVGSIPEDVFAGVSPDQKQVIVQGFQ NQGEVVMVGDGINDSPALATADVGIAMSSGTDVAMEAADVVLMPDDLLSIPSAHLRTTRIFRRIKLNLAWACIYNIVGLPIA MGFFLPFGIHMHPMFAGFAMACSSISVVVSSLALRWQRPQWMDASEPAGGLRWMSGTIGVWAKETFGRVRRGKREE GYVALENLEV</p>

10

20

30

【0098】

(表4の続き)

【 0 0 9 9 】
(表 4 の 続 き)

配列番号	説明	配列
7	トリコデルマ・リーゼイチロシナーゼの遺伝子配列	ATGCTGTTGTGACGCTCCCTCTCGGCGTTGGCCTTGGCCACAGTTTCACTCGCACAGGGGACGACACACATCCCCGTCAACC GGTGTTCCCGCTCTCTCGGTGCTGCGGTGCCGCTGAGACAGACATCAATGACCTGGCCAAAGTCGGGGCCGCAATTGGTG AGTGACGGCCCTCCTCCACCAACCTTTACCTCACTCAAGAGAACAGGGGAGACAAGTCAAGCGGATGAAAGAGAGGTG GACAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAGTGTGTGTGTATGTGTAGAGCGAGAGAGAGAGAGAGAGACAAAGAGCTATTGGATGG ACCAAGGAGCCAGCATGGAGAACAGGGGGAGAGCTTGAACGATTCGAGGAGAGGGGGGCTCAGATGTGCGGTGCCGAATAGGGA TCTCTACGTTGACGCCATGTACACATGTCCAGATGGACTCCCATGACCCGATACAGCTTCTTCCAGATTGCCGTTAAATAT ACATCTCGGCGCTCCTCGCGAGGCGAGCTGACTCTCGGAGGCTTTGGTGTAAACACCAAGCTAGGCATCGCGGCGACCGCTCAATT GAGTACAAACAAGGCGGAGCAAAGTACGCGGCGATGGCTGGCTGGGACTGCTGCCCTCAGCGGTTGATGTGTTTTGTGTCATCGA GGAGGGGCGCAAGAGTTTCATGGACTTGAACCTCTTCGCCCTTGTGTGAGCCGGAAATCATCGTCTCTGACAGTTTCATTAG GAGGACCTCTTCATCAAGCTGGTGACCGCCCTATGTCTCGCTCTTTGAGGATATGATTTGACCAAGCTCGGACTTTGACCTCATTA CAAAACATCAACTGACATGCTTGCAGCAAGCCCTTGGTCTCGCTGCCAAGGGCATCGCCAACTCGATTCGCCCTCTGTCCG CGCCAAGTACCAAGGCTGCGCGCCGCCAGCGCTGCGCGCCGCCCTACTGGGACTTGAGGCGCGCGACAGCTCCGTGCGCCGGCGT ACCGTCCCCCAGCGCTCAAGATCAACGTCGCCAGCGGCGAGCAGCAACAGACCGCTCGACTACCAACACCCGCTCAAGA CGTACTACTTCCGCGCATGTCTTGTACCGGCTCGTAGCGGCGAGTTCAACGGCGGAGGCAACGACCAACCGCTCGGCTGC GCGCCCTTCCAAAGCAGCATCTCCCGCCACCGGCCAACTCCAACCTGGCTGCCGCTCTTCAAGATCCTGGATCGTACGTAG TGCCCTTTCCCTTTTGGAAAGCTTCCCTTGAAGTAAAGCTGGCTACTGACACAGAGAGCGGCGCGACGATCGATGTCTGAC CAACTCTCAAAACTTTGCGGACTTTCGCTCCACCAGCGGCGCCGGGCTTCAACGTTGAGCAGATCCACAAGGCCATCGCACT GGGACGGTGCTTGGCGCTCCGACTTCTCTCGCCCGGACTACTCGGCTTCGACGCCCTGTTGTAGTCAATCGAGACGCT AAGAGCTCATTTGTACAACAACCGATGGCAACAGCATGTCTGACTGACGCTCGAAAATAGCTTCATGACCAACCGCCAGGTC GACCGCATGTGGGCGCTTCTGGGAGGCCATCATGCCCTCGTCCGCCCTCTTCAAGCGGCTGTACAAGGGCGAGTCCGCGCT CAACTCCAAGTCGGGACGACCATCACCCCGAAGTCCGCCCTGACGCCCTTCTAACAGGCGCAAGGCCGATTCACACAGT CCAACAGGTCAGAGGATCCAGGGCATGGGCTACTCGTACCAGGGCATCGAGTACTGGCAAAAGTCCCAGGCCAGATC AAGTCGAGCGTCACCAACCATCAACAGCATGTACGGGCGCAACTCGGGCGAAGGCGCAAGCGCCCGCGCGACTTCTT GAGCGACATTGTACCGGAGCTCGAGAACCCTCATCAAGACCCGTTACTTTGCCAAGTCTCGGTCAACGTGACCGAGGTGA CGGTCCGCGCCCGCGAGATCAACGCTTACGTGCGGCGCGCAAGGCGCGGAGCGGCTTGAATCGTCTGATCAAGCTCCCGCGGA GGGACAGGTCGAACGGCGGCTTCACTTGAACACCCCATCGCCGCTGACGCCCTTCTAACAGGCGCAAGGCCGATTCACAGG CCTTTACCGAGGACATTGAGGTTGAGATTCTCTGTGAAGTTTTCCGCCCTCTCTCCAGTCCCGAGCACTCACTGTCACTAT TTCGACTAGTCAACGCTCAAGATGTGATTTGTTGCTGACCCCGCAAGCGCGAGAAGGACGGCAAGGCATCCGCCCTCGAGAC GGTCCCCAGGCTGTGCATCGACCTCGAGGTGCGCAACGCTACCCCTGCCCTCGCGCTCGACCACTGCCCAAGTACGGCC AGCGCTCAAGGCAACCGCGCAAGGCGCGCCAGCGCGGACACCGGCTTTGCCGTTTCCCATATTCCTCTCTGTAA
8	トリコデルマ・リーゼイチロシナーゼのコード配列	ATGCTGTTGTGACGCTCCCTCTCGGCGTTGGCCTTGGCCACAGTTTCACTCGCACAGGGGACGACACACATCCCCGTCAACC GGTGTTCCCGCTCTCTCGGTGCTGCGGTGCCGCTGAGACAGAACATCAATGACCTGGCCAAAGTCGGGGCCGCAATTGGGA TCTCTACGTTTCAGGCCATGTACACATGTGCAAGATGGACTCCCATGACCCGATACAGCTTCTTCCAGATTGCCGCGATCCA CGGCGCACCGCTACATTTGAGTACAACAAGGCGGAGCAAAAGTCGGGCGATGGCTGGCTGCTGCCCTGACTGCCCTGAGTGA GACCTCTTCATCAGCTGGCACCGCCCTATGTCTGCTCTTTGAGCAAGCCTTGGTCTCCGTCGCCAAGGGCATTGCGCAAC TCGATCTCCCGGCTGTGCTCGGCGCAAGTACCAAGCTGCGCGCGGACGCTGCGCGCCCTACTGGGACTGGGCGCGCG ACAGTCTCCGTGCGCGCGCTCACCGTCCCCAGAGCTCGACGATCAAGCTCCCCAGCGGACGACCAAGAACCGTCA CTACCAACACCCGCTCAAGAGCTACTCTCCCGGCGATGTCTGATGACCGGCTCGTACGGCGAGTTCACCGCGGAGGCA CGACACACACCGTCCGCTGCGCGGCTCCAAAGCAGGATCTCCGCCACGCGCAAGCTTCAACCTGGCTGCCGCTCTTAC AAGTCTGGATCTACGATGTCTGACCAACTCTCAAAACTTTGCGGACTTTCGCTCCACCAGCGGCGCCGGCATCAACGTT GAGCAGATCCACAAGCGCATCCACTGGGACGGTGCTTGGCGCTCCGAGTCTCTCGCCCGCACTCTCGGCTTGCAGCC CCTGTTCTTCATCGACCAACGCGGCTGACCGCATGGGCGCTTGGGAGGCGCATCGCTCTGTCGCGCCCTTTCAC GGCCTCGTCAAGGGCGAGTCCGCGCTCAACTCCAAGTCGGGCGACCACTACCCCGCACTGCCCTGACAGCCCTTCT ACAGGCGCAACGGCAAGTTTCAACAGCTCAACACGGTCAAGGACGATCAAGGCGATGGGCTACTCGTACCAAGGACGAG TACTGGCAAAAGTCCCAGGCCAGATCAAGTCGAGCGTCAACCACTCATCAACCAGCTGTACGGGCCCACTCGGGCAA GAAGCGCAACGCGCGCGGACATCTTTGAGCGCATTTGTCAACGAGCTCGAGAAGCTCATCAAGAACCGTTACTTTGCCA AGATCTCGGTCAACGCTGACCGAGGTGACGGTCCGCCCGCGAGATCAACGCTTACGTGCGGCGGCAAGGGCGGCGAG CTTGATCGTCAAGAGCTCCCGCGCGAGGCGACGGTCAACGGCGGCTTCAACATTTGAACACCCCATGCAAAAGACATCTGC ACGGTGCTCTCGGCAACGCGCTTACCGGACCTTACCGGATGAGTTGATCTCTGAAGGACGCAAGCAATC COCCTCGAGACGGTCCCGACGCTGTCCATCGACCTCGAGGTCGCAACGCTCAAGCTGCCCTCGCGCTCGACCAAGTGC CAAGTACGGCCACGCTCCAGGCAACCGCGCAAGGCGCCAGCGCGGACACCGCTTTGCCGTTCCCATATTCCTCTCTCT TGTA

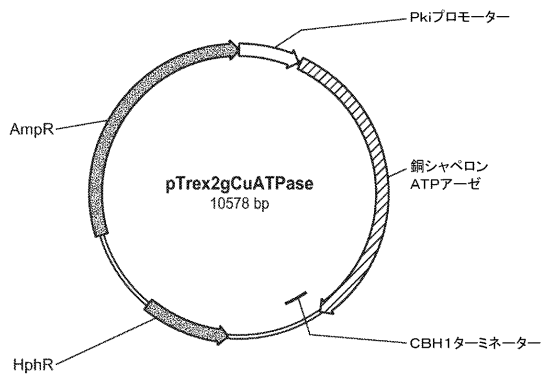
【表 5 - 4】

配列番号	説明	配列
9	トリコデルマ・リーゼイナロシナーゼのアミノ酸配列(下線部はシグナルペプチドを示し、成熟酵素はこの下線部の配列を含まない)	MLLSASLSALALATVSLAAGGTHIPVTGVPVSPGAAVPLRQINIDLAKSGPQWDLYVQAMYNMSKMDSHDPYSFFQIAGIHGAPYIEYNKAGAKSGDGWLGYPHGEDLFISWHRPYVLLFEQALVSVAKGANSYPPSVRAKYQAAAAASLRAPYWDWAADSSVPAVTPQTLKINVPSSGSSTKTVDYTNPLKTYFFPRMSLTGSYGFTGGGNDHTVRCASKQSPATANSNLAARPYKSWIYDVLNNSQNFADFASTSGPGINVEQIHNAIHWDGACGSGQFLAPDYSGFDPLFFMHHAQVDRMWAFAWEAMPPSSPLFTASYKGQSRFNSKSGSTITPDSPLQPFYQANGKFHTSNTVKSIQGMGYSYQGIEYWGKSSQAQIKSSVTIINGLYGPNSSGKKRNAPRDFLSDIVTDVENLIKTRYFAKISVNVTEVTVRPAEINVYVGGQKAGSLVMKLPAGETVNGGFTIDNPMQSSILHGGLRNAVGAFTEDIEVEILSKDGQAIPLETVPSLSIDLEVANVTLPALDQLPKYGGRRSRHRAKAAQRGHRFAVPHIPPL
10	Cerrana unicolor 由来のラッカーゼDの成熟アミノ酸配列(成熟型=シグナル配列なし)	AIGFVADLHIVNKDLAPDGVQRPTVLAGGTFFPGTLITGQKGDNFQLNVIDDLTDDRMLTPTSIHWHGFFQKGTAWADGPAFVTCPIADNSFLYDFDVPDQAGTFWYHSHLSTGYCDGLRGAFVVDNDPHKDLVDVDDGGTVITLADWYHVLQGTVVGAAATPDSTLNLGRSQGTGPADAELAVISVEHNKRYRFRLVVISCDPNFTFSVDGHNMVTIEVDGVNTRPLTVDSIQIFAGQRYSFVLNANQPEDNYWIRAMPNIGRNTTLDGKNAAILRYKNASVEEPKTVGGPAQSPLEADLRPLVPAPVPGNAVPGGADINHLNLTFNGLFSINNASFTNPSPVALLQILSGAQNAQDILLPTGSYIGLELGKVVVELVIPPLAVGGPHPFHLHGHNFWVRSAGSDEYNFDDAILRDVVSIGAGTDEVITRFVTDNPGPWFLHCHIDWHLEAGLAIVFAEINGTAAANPTQAWDELCPKYNGLSASQKVKPKKGTAI
11	トリコデルマ・リーゼイ由来のGH61Aの成熟アミノ酸配列(成熟型=シグナル配列なし)	HGHINDIVNGVWYQAYDPTTFFYESNPPIVVGWTAADLDNGFVSPDAYQNPDIICHKNATNAKGHASVKAGDTILFQWVVPWPVPHPGPIVDYLANCNGDCETV/DKTTLEFFKIDGVGLLSGGDPGTWASDVLISSNNNTWVVVKIPDNLAPGNYVLRHEIILHSAGQANGAQNYPCQFNIAVSGSGSLQPSGVLGTDLYHATDPGVUNINYTSPLNYIIPGPTVVSGLPTSVAGGSSAATATASATVPGGGSGPTSRITTTTARTTQASSRPSSTPPATTAPAGGPTQTLYGQCGSGSYSGPTRCAPATCSTLNPPYAQCLN
12	トリコデルマ・リーゼイの銅イオン膜貫通トランスポーター(ウェブサイト: genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html protein ID:52315)	MDMGDSSQSKISMLWNWYTDACFLSSSWRIRNRGMFAASCIGVLLVASVELMRRIGQEYDNSIVRQWHRQAAMASDRAGGRTQGSASYCERLLFRATPLQQLVRAIHAATFGAAIYVMLLAMYFNNGYIICIFIGAYIGSFVFWHEPLTAG
13	トリコデルマ・リーゼイの銅イオン膜貫通トランスポーター(ウェブサイト: genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html protein ID:62716)	MLWNWNVMTNCFISKHWQITSKGMFAGSCIGVILLVIALEFLRRLSKEYDRFLIKQHAAPRAVPAFRPSVLQQALRALLHVAQFSVAYIVMLLAMY
14	トリコデルマ・リーゼイの銅イオン膜貫通トランスポーター(ウェブサイト: genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html protein ID:71029)	MDHSHMHAMEGHEGHGGHGGMGDMCSMNMLFTWDTTNLCIVFRQWHYRSTASLIFSIAVVLGIGYEALRSVSRRYEASLATRLETVPQRNRETYSKRGHVIAKATLYAIQNFYAFMLMLVFMTYNGWVMVAVSLGAFVGYLLFGHSTSATKDNACH
15	トリコデルマ・リーゼイの銅イオン膜貫通トランスポーター(ウェブサイト: genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html protein ID:108749)	MTMLMAMVFQTDIRTPLYANSWTPHHAGAYAGTCIFLIALAVIARLLVAFRARGERIWADHDARRRYVVVNGKEPVAERLSRDSDAKSATMWISENGVEERVVVVEKKDGAATRPWRFSVDPVRAAMDTVIVGVGYLLMLAVMTMNVGYFMSVLGGTFLGSLLVGRYSEVYHH

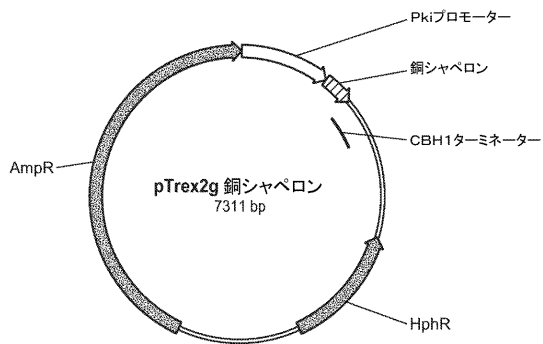
10

20

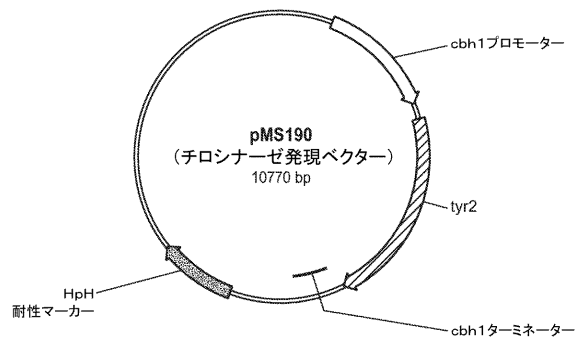
【図 1 A】



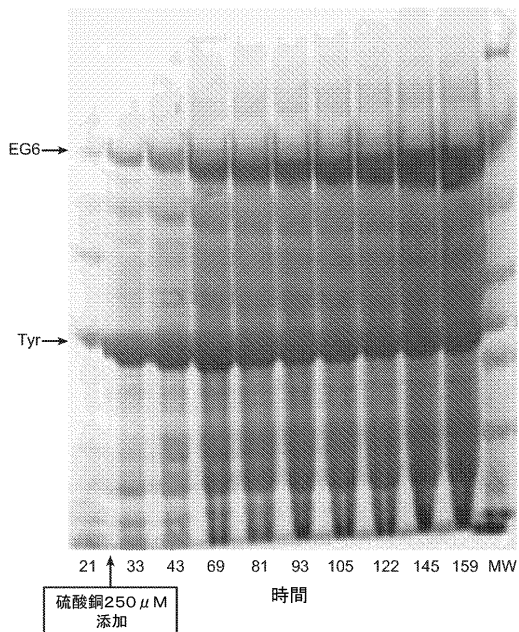
【図 1 B】



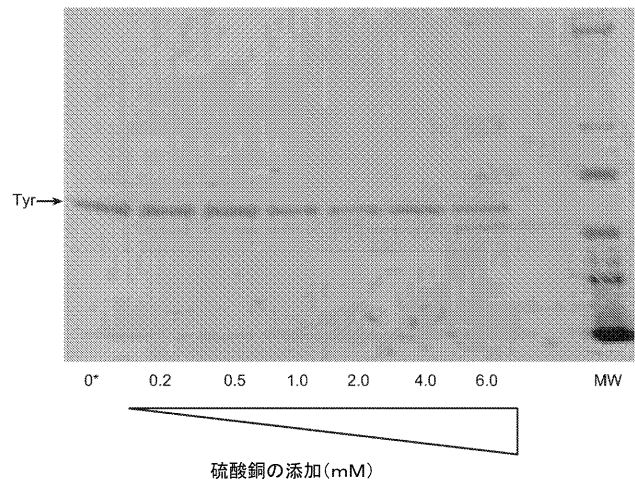
【図 1 C】



【図 2】

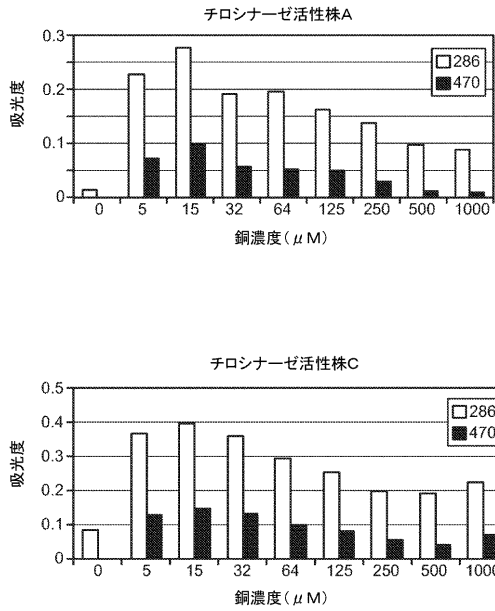


【図 3】

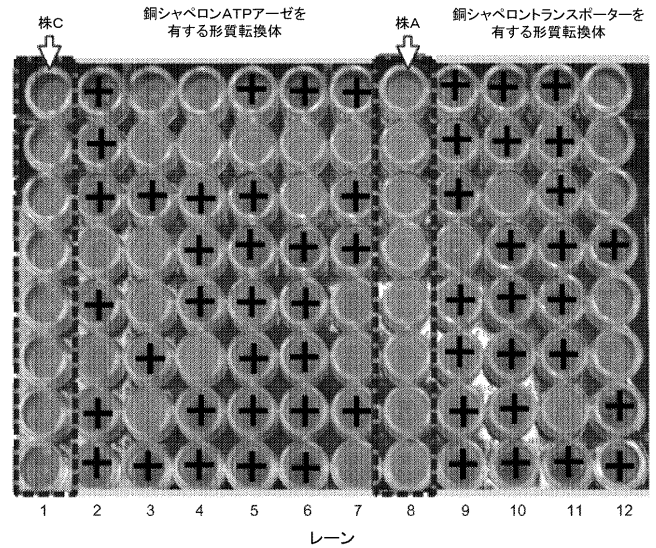


*0: 微量元素として32 μMの硫酸銅を含有

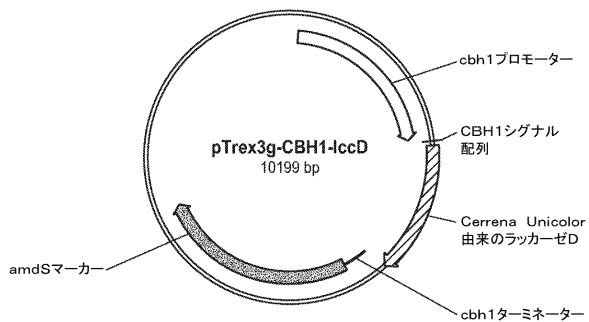
【図4】



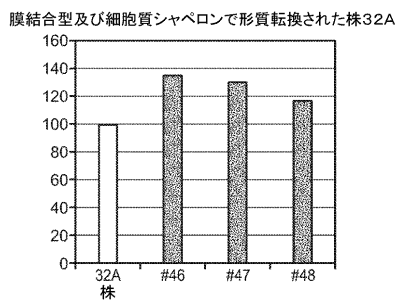
【図5】



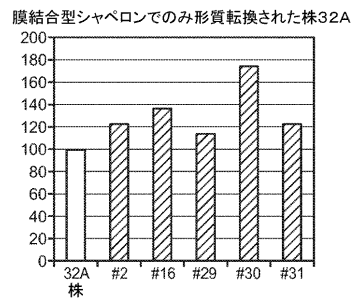
【図6】



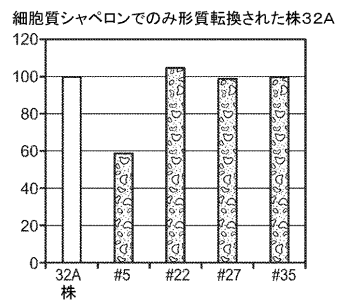
【図7A】



【図7B】



【図7C】



【配列表】

2017525359000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/045260

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/37 C12N9/02 C12N15/67 C12N15/80
 ADD. C12N9/30

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)

C12N C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	DE 100 46 932 A1 (CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND [DE]) 16 May 2002 (2002-05-16) paragraphs [0001], [0003], [0004] - [0005], [0010], [0011] paragraphs [0018] - [0022], [0031], [0042], [0045] - [0047] paragraphs [0050], [0060], [0073], [0076], [0079] - [0083] GSP:ABB77506; sequence 2 ----- -/--	1-19,41 20,21

☒ 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

16 October 2015

Date of mailing of the international search report

15/01/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bonello, Steve

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/045260

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KELLER GREG ET AL: "Independent metalloregulation of Ace1 and Mac1 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", EUKARYOTIC CELL, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 4, no. 11, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 1863-1871, XP002406474, ISSN: 1535-9778, DOI: 10.1128/EC.4.11.1863-1871.2005 page 1864, column 1, paragraph 3 -----	20,21
X	Andreas Uldschmid: "Isolierung und Charakterisierung von Kupferhomeostase-Faktoren aus <i>Trametes versicolor</i> und deren Einfluss auf die Laccase-Expression", , 2 August 2002 (2002-08-02), pages 1-169, XP055220950, München Retrieved from the Internet: URL:https://edoc.ub.uni-muenchen.de/641/1/Uldschmid_Andreas.pdf [retrieved on 2015-10-14] page 9, paragraph 2 - page 14 page 92 - page 95 page 113 - page 115 -----	1-6,8,9, 12,13, 15,17, 18,41
A	ALESSANDRA PISCITELLI ET AL: "Heterologous laccase production and its role in industrial applications", BIOENGINEERED BUGS, vol. 1, no. 4, 27 January 2007 (2007-01-27), pages 254-264, XP055221359, page 253, column 2 page 254, column 2, paragraph 5 - page 255, column 1, paragraph 3 -----	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/045260**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-21, 41

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2015/ 045260

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-21, 41

A method for producing a cuproenzyme and supernatant obtained by the method.

2. claims: 22, 23

A method for reducing copper toxicity of a host cell.

3. claim: 24

A method of reducing copper levels in a cell culture broth.

4. claims: 25-40

A recombinant host cell expressing a cuproenzyme and copper metallochaperone and supernatant obtained from it.

Information on patent family members

PCT/US2015/045260

DE 10046932	A1	16-05-2002	NONE
-------------	----	------------	------

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/04 (2006.01) C 1 2 N 9/04

(81) 指定国 AP (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP (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), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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

(72) 発明者 マドリッド、スーザン エム

アメリカ合衆国 9 4 3 0 4 カリフォルニア州、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5

F ターム (参考) 4B050 CC03 DD03 FF13E LL02 LL04

4B065 AA62X AA63X AA70X AA70Y AB01 BA01 CA28 CA41 CA54 CA57