

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2009年9月24日(24.09.2009)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2009/116286 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/09 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/001214
- (22) 国際出願日: 2009年3月18日(18.03.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2008-069329 2008年3月18日(18.03.2008) JP  
特願 2008-187206 2008年7月18日(18.07.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人山口大学(YAMAGUCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田 1 6 7 7-1 Yamaguchi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 赤田倫治(AKADA, Rinji) [JP/JP]; 〒7558611 山口県宇部市常盤台 2 丁目 1 6 - 1 国立大学法人山口大学内 Yamaguchi (JP). サノムノンクラ(SANOM, Nonklang) [TH/JP]; 〒7558611 山口県宇部市常盤台 2 丁目 1 6 - 1 国立大学法人山口大学内 Yamaguchi (JP). 星田尚司(HOSHIDA, Hisashi) [JP/JP]; 〒7558611 山口県宇部市常盤台 2 丁目 1 6 - 1 国立大学法人山口大学内 Yamaguchi (JP). アブデルバナットバビカ モハメド(ARMED ABDEL-BANAT, Babiker Mohamed) [SD/JP]; 〒7558611 山口県宇部市常盤台 2 丁目 1 6 - 1 国立大学法人山口大学内 Yamaguchi (JP).
- (74) 代理人: 廣田雅紀(HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号若林ビル 3 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))  
— 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i)及び 48.2(a)(viii))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: FLOCCULENT YEAST AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称: 凝集性酵母、及びその作製法

(57) Abstract: Disclosed is a novel transformant of *Kluyveromyces marxianus*, which is produced by introducing a foreign flocculation gene into a bacterium *Kluyveromyces marxianus*, and has suitable levels of heat resistance and flocculating properties for the industrial production of bioethanol. Also disclosed is a method for producing the transformant with efficiency. Attention has focused on a *Saccharomyces cerevisiae* flocculation gene FLO as a foreign gene for imparting flocculating properties to a bacterium *Kluyveromyces marxianus*, and a linear DNA fragment containing a known expression promoter sequence and a FLO gene sequence originated from *Saccharomyces cerevisiae* is produced. The linear DNA fragment is introduced into a bacterium *Kluyveromyces marxianus*, and it is confirmed that a transformant of *Kluyveromyces marxianus* can be produced efficiently and that the flocculating properties of the transformant is significantly improved unexpectedly.

(57) 要約: 【課題】 外来の凝集性遺伝子をクルイペロマイセス・マルシアヌス菌に導入することにより、バイオエタノールの工業生産に適した、耐熱性及び凝集性を有する新規のクルイペロマイセス・マルシアヌス形質転換体、ならびに、該形質転換体の効率的な作製法を提供すること。【解決手段】 本発明者らは、クルイペロマイセス・マルシアヌスに凝集性を付与するための外来遺伝子として、サッカロマイセス・セレビスエ由来の FLO 遺伝子配列とを含む線状 DNA 断片を作製した。この線状 DNA 断片をクルイペロマイセス・マルシアヌス菌に導入した結果、クルイペロマイセス・マルシアヌス形質転換体が効率よく得られることを確認するとともに、予想外にも、上記形質転換体の凝集性が顕著に高まることを確認し、本発明を完成するに至った。



WO 2009/116286 A1

## 明 細 書

### 凝集性酵母、及びその作製法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、バイオエタノール生産のための凝集性を高めたクルイベロマイセス・マルシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*) に属する凝集性酵母、及びその作製法等に関する。

#### 背景技術

[0002] 微生物は、工業製品を生産するために重要な位置を占めている。その中で、より効率よく安価に生産を行うことが課題とされてきた。その解決方法は、より高い生産性を示す菌株を選択すること、微生物培養のための培地組成や培養温度等の培養条件の検討等であった。近年の分子遺伝学の発達のもとでは、菌株の選択肢のひとつとして、従来菌株から優秀な遺伝子を特定して利用し、菌株を形質転換する手法があげられる。従来、有用な食品類を生産してきた酵母においても、より有効な生産のために形質転換が多く行われている。

[0003] 有効な生産のための形質転換のひとつとして、菌体の凝集性を高める形質転換があげられる。発酵法によるアルコール生産は、発酵酵母であるサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の中で特にアルコール生産性の高い株を用いて、回分発酵法あるいは、連続発酵法という手法で実施されている。従来、回分発酵法は、アルコール発酵酵母に糖蜜等を原料として加え、一定の条件下で培養することによりアルコールを生成させる。生成されたアルコールは、培養液を加熱して蒸留回収するが、培養液中に残った酵母は、加熱により死滅する。従って、アルコール生産を続ける際には、酵母液を補充しなければならない。このような工程は、効率が悪く、さらにコスト高になる。凝集性酵母を使用した場合は、静置して上清のアルコールを回収し、沈殿している凝集性酵母に新たな発酵液を加えて、再度アルコール生産を行うことができるため、回分発酵法によるアルコール生産におい

ては、凝集性の酵母が望まれていた。

[0004] 凝集性を付与する形質転換の手法として、アルコール発酵酵母の染色体上の任意のマーカー遺伝子領域に、外来DNAである凝集性遺伝子発現カセットを導入して作製した、実用的な凝集性アルコール発酵酵母とその育種方法（特許文献1）、酵母の凝集性遺伝子の凝集性に関与する蛋白領域をコードするDNAを取得し、該DNAをビール酵母に導入して凝集性が強化された酵母を製造する方法（特許文献2）、燃料用エタノール生産のために凝集性酵母の構築（非特許文献1）等がある。これらの既に報告されている形質転換酵母は、サッカロマイセス・セレビシエ由来の凝集性遺伝子を、サッカロマイセス・セレビシエに属する酒類製造用酵母に導入して作製されたものである。一方、サッカロマイセス・セレビシエと異なる属に属する酵母に、サッカロマイセス・セレビシエ由来の凝集性遺伝子を導入した形質転換酵母については未だ報告されておらず、サッカロマイセス・セレビシエ由来の凝集性遺伝子が、サッカロマイセス・セレビシエ以外の酵母においても凝集性の調節に関与するかどうかについては全く知られていなかった。

[0005] サッカロマイセス・セレビシエでは、全ゲノムの解析がおわり、凝集性遺伝子が特定されている。凝集性に関与するFLO遺伝子群には、第1番染色体上に存在するFLO1遺伝子（非特許文献2）、第8番染色体上に存在するFLO5遺伝子（非特許文献3）、第5番染色体上に存在するFLO8遺伝子（非特許文献4）、第1番染色体上に存在するFLO9遺伝子（非特許文献5）、第11番染色体上に存在するFLO10遺伝子（非特許文献6）等がある。これらの遺伝子は、FLO1と類似の塩基配列を有するレクチン様タンパク質であるとされている。

[0006] 現在、石油供給の問題点から、世界レベルで石油に代わって、生物由来資源（バイオマス）によるエネルギー源の探索が試みられている。バイオマスによる新エネルギーのひとつに、バイオマス燃料であるバイオエタノールがある。バイオエタノールは、糖質あるいはデンプン質を多く含む植物資源が利用されている。バイオマスを原料とした微生物によるアルコール生産の方

法としては、サゴヤシ原木の粉碎物を糖化し、サッカロマイセス・セレビスエによるエタノールの発酵生産法（特許文献3）、サッカロマイセス・セレビスエに属する酵母を用いた生ごみなどの廃棄物からの燃料用アルコールの生産法（特許文献4）が開示されている。バイオエタノールの生産に使う酵母は、バイオマスの処理に対応できる耐熱性を有し、アルコール生産酵母と同様に高い凝集性を有する酵母が望まれている。

[0007] 酵母クルイベロマイセス・マルシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*) は耐熱性を有する酵母であり、Lertwattanasakul や山田らによって糖からエタノールへの変換に関与する酵素アルコールデヒドロゲナーゼ (alcohol dehydrogenase; Adh) の発現が確認されている（非特許文献7）。クルイベロマイセス・マルシアヌスはエタノールを産生することができるだけでなく、タンパク質生産性が高いことから、工業的な生産において非常に有用であると考えられるが、クルイベロマイセス・マルシアヌスの形質転換方法が一般的に確立されていない等、研究が進んでいないのが現状である。このため、バイオエタノールの工業生産に適したクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換株については、これまで全く報告されていない。

[0008] 特許文献1：特許第3040959号公報

特許文献2：特許第3643404号公報

特許文献3：特開2007-195406号公報

特許文献4：特開2006-325577号公報

非特許文献1：Biotechnol Lett, 30: 97-102, 2008

非特許文献2：Yeast, 9: 423-427, 1993

非特許文献3：Science, 265: 2077-2082, 1994

非特許文献4：Nature 387: 78-81, 1997

非特許文献5：Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92: 3809-3813, 1995

非特許文献6：Nature 369: 371-378, 1994

非特許文献7：Biosci. Biotechnol. Biochem. 71: 1170-82, 2007

## 発明の開示

## 発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明の課題は、外来の凝集性遺伝子をクワイベロマイセス・マルシアヌス菌に導入することにより、バイオエタノールの工業生産に適した、耐熱性及び凝集性を有する新規のクワイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体を提供すること、ならびに、上記形質転換体の効率的な作製法を提供することにある。

## 課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、クワイベロマイセス・マルシアヌスに凝集性を付与するための外来遺伝子として、サッカロマイセス・セレビシエの凝集性遺伝子 F L O に着目し、F L O 遺伝子発現を誘導するための F L O 遺伝子発現カセットとして、既知の発現プロモーター配列とサッカロマイセス・セレビシエ由来の F L O 遺伝子配列とを含む直鎖状（線状）DNA断片を作製した。この線状 DNA断片をクワイベロマイセス・マルシアヌス菌に導入した結果、クワイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体が効率よく得られることを確認するとともに、予想外にも、上記形質転換体の凝集性が顕著に高まることを確認し、本発明を完成するに至った。

[0011] すなわち本発明は、[1] (A) サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の内在性 F L O 遺伝子上流にマーカー遺伝子配列及び発現プロモーター配列を導入してサッカロマイセス・セレビシエ形質転換体を作製する工程；(B) 工程 (A) で作製されたサッカロマイセス・セレビシエ形質転換体由来の染色体 DNA から、マーカー遺伝子配列、発現プロモーター配列、及び、F L O 遺伝子配列を含む DNA断片を得る工程；(C) 工程 (B) で得られた DNA断片を、F L O 遺伝子発現カセットとしてクワイベロマイセス・マルシアヌスに導入し、クワイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体を作製する工程；の工程 (A) ~ (C) を順次含むことを特徴とする凝集性及び耐熱性を有するクワイベロマイセス・マルシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*) 形質転換体の作製方法や、[2] サッカロマイセス・セレビシエの内在性 F L O 遺伝子が、F L O 1 遺伝子、F L O 5 遺伝子、F L O

9 遺伝子、及び、F L O 1 0 遺伝子から選択される 1 以上の F L O 遺伝子であることを特徴とする上記[1]記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の作製方法や、[3]マーカー遺伝子が、栄養要求性マーカー遺伝子であることを特徴とする上記[1]又は[2]記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の作製方法や、[4]栄養要求性マーカー遺伝子がヒスチジン、ロイシン、ウラシル、メチオニン、リシン、アデニン、トリプトファン、アルギニンの少なくとも 1 つの栄養要求性遺伝子であることを特徴とする上記[1]～[3]のいずれかに記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の作製方法や、[5]栄養要求性マーカー遺伝子が U R A 3 遺伝子であることを特徴とする上記[4]記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の作製方法や、[6]クルイベロマイセス・マルシアヌスが、ヒスチジン、ロイシン、ウラシル、メチオニン、リシン、アデニン、トリプトファン、アルギニンの少なくとも 1 つの栄養要求性遺伝子に変異を有するクルイベロマイセス・マルシアヌス変異体であることを特徴とする上記[1]～[5]のいずれかに記載の作製方法や、[7]発現プロモーターがグリセルアルデヒド-3-リン酸 デヒドロゲナーゼ 3 ( T D H 3 ) プロモーターであることを特徴とする上記[1]～[6]のいずれかに記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の作製方法や、[8]線状の D N A 断片を、F L O 遺伝子発現カセットとしてクルイベロマイセス・マルシアヌスに導入することを特徴とする上記 [ 1 ] ～ [ 7 ] のいずれかに記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の作製方法や、[9]クルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体形質転換体が、R A K 4 2 9 9 株 ( N I T E B P - 5 1 4 ) 、 R A K 4 3 0 0 株 ( N I T E B P - 5 1 5 ) 、 R A K 4 3 0 1 株 ( N I T E B P - 5 1 6 ) 、 又は、R A K 4 3 0 2 株 ( N I T E B P - 5 1 7 ) であることを特徴とする上記[1]～[8]のいずれか記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の作製方法に関する。

[0012] また本発明は、[10]上記[1]～[8]のいずれかに記載の作製方法により作製された凝集性及び耐熱性を有するクルイベロマイセス・マルシアヌス形

質転換体や、[11]RAK4299株(NITE BP-514)、RAK4300株(NITE BP-515)、RAK4301株(NITE BP-516)、又は、RAK4302株(NITE BP-517)であることを特徴とする上記[10]記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体に関する。

### 発明の効果

[0013] 本発明により、クルイベロマイセス・マルシアヌスを形質転換して凝集性及び耐熱性に優れた酵母を作製することが可能であり、バイオエタノールの工業生産のために有効な酵母を提供することができる。

### 図面の簡単な説明

[0014] [図1] pST106プラスミド由来のTDH3プロモーターとURA3DNA断片をFLO遺伝子上流に挿入する模式図を示す。

[図2]形質転換用DNA断片の電気泳動結果を示す図である。(Lane 1, 6: DNA ladder、lane 2: FLO3由来、lane 3: FLO5由来、lane 4: FLO9由来、lane 5: FLO10由来)

[図3]形質転換用DNA断片を導入したサッカロマイセス・セレビシエBY4700の染色体DNA(TF)と、導入していない染色体DNA(WT)の電気泳動結果を示す図である。

[図4]形質転換用DNA断片を導入して得られた4タイプのサッカロマイセス・セレビシエの染色体DNAにおける組換えFLO遺伝子の電気泳動結果を示す図である。(Lane 1, 6: DNA ladder、lane 2: URA3-TDH3p-FLO1、lane 3: URA3-TDH3p-FLO5、lane 4: URA3-TDH3p-FLO9、lane 5: URA3-TDH3p-FLO10)

[図5]クルイベロマイセス・マルシアヌス DMKU3-1042と、サッカロマイセス・セレビシエ BY4700に対する各形質転換体の凝集性を示す図である。

[図6] クルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の28℃と40℃での凝集性を示す図である。

[図7] 温度40～50℃におけるヒートショックの時間について、温度に対する反応時間の上限と下限を示した図である。

[図8] クルイベロマイセス・マルシアヌス DMKU3-1042の形質転換についての結果の写真を示す図である。直鎖DNAのURA3断片を25 ng使用してプレート一面の形質転換体数を得ることができる。

[図9] クルイベロマイセス・マルシアヌス DMKU3-1042の形質転換効果における酵母細胞の濃度の影響を示す図である。

[図10] クルイベロマイセス・マルシアヌス DMKU3-1042の形質転換効果におけるポリエチレングリコール(PEG)の分子量とヒートショック後の希釈液の影響を示す図である。

[図11] クルイベロマイセス・マルシアヌス DMKU3-1042の形質転換効果におけるDTTの影響を示す図である。

[図12] クルイベロマイセス・マルシアヌス DMKU3-1042の形質転換効果におけるDNA断片の大きさの影響を示す図である。

[図13] クルイベロマイセス・マルシアヌス DMKU3-1042の形質転換効果におけるヒートショック温度と時間の影響を示す図である。

[図14] クルイベロマイセス・マルシアヌス DMKU3-1042が、DNA断片を用いた形質転換に最も有効な菌株であることを示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

- [0015] 本発明の凝集性及び耐熱性を有する酵母の作製方法としては、耐熱性酵母クルイベロマイセス・マルシアヌス(*Kluyveromyces marxianus*)にFLO遺伝子発現カセットを導入する方法を含むものであれば特に制限されるものではなく、上記FLO遺伝子としては、クルイベロマイセス・マルシアヌスに凝集性を付与することができるFLO遺伝子であればどのようなものでもよいが、例えば、全ゲノム配列が解析されているサッカロマイセス・セレビスエのFLO遺伝子を好適に挙げることができ、より具体的には、サッカロマ



イセス・セレビスエの F L O 1 遺伝子、F L O 5 遺伝子、F L O 9 遺伝子、F L O 1 0 遺伝子等を好適に例示することができる。サッカロマイセス・セレビスエの F L O 遺伝子の情報は、D D B J (DNA Data Bank of Japan)、E M B L - E B I (European Molecular Biology Laboratory)、G e n B a n k - N C B I (National Center for Biotechnology Information)、S G D (Saccharomyces Genome Database) 等のゲノムデータベースから、その塩基配列情報を知ることができる。

[0016] 上記 F L O 遺伝子発現カセットとしては、クルイベロマイセス・マルシアヌスに F L O 遺伝子の発現を誘導できるものであれば特に制限されるものではないが、形質転換体を効率的に選択するためのマーカー遺伝子配列含み、さらに、F L O 遺伝子の発現が発現プロモーターにより制御されるよう設計された F L O 遺伝子発現カセットであることが好ましい。上記選択マーカー遺伝子としては、抗生物質等の薬剤耐性遺伝子や、栄養要求性マーカー遺伝子等のレシピエント(宿主)細胞における欠失産物をコードする遺伝子等を挙げることができ、上記薬剤耐性遺伝子としては、アンピシリン、ブレオマイシン、カナマイシン、オリゴマイシン等の薬剤に対する耐性遺伝子等を、上記栄養要求性マーカー遺伝子としては、H I S 3、U R A 3、L E U 2 等を例示することができ、特に栄養要求性マーカー遺伝子を用いることが好ましい。栄養要求性マーカー遺伝子と選択培地を組み合わせることによって、マーカー遺伝子を発現する細胞を選択することができ、例えば、U R A 3 の栄養要求性遺伝子を細胞に導入した場合、形質転換した宿主細胞は、ウラシルを含まない培地で成育することができ、凝集性を付与された菌株の選択が可能になる。また、上記発現プロモーターとしては、特に制限されるものではないが、例えば、グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ 3 (T D H 3、G A P) プロモーター、T D H 1 プロモーター、T D H 2 プロモーター、P H O 5 プロモーター、P G K プロモーター、A D H プロモーター、G A L 1 プロモーター、G A L 1 0 プロモーター、ヒートショックタンパク質

プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、CUP1プロモーター等を具体的に挙げることができ、これらのプロモーター配列は、生体由来のゲノムDNA配列であっても、化学的な手法等により人工的に得られたDNA配列であってもよい。

[0017] FLO遺伝子発現カセットを導入して形質転換を行うためのクルイベロマイセス・マルシアヌ菌体は、マーカーとなる遺伝子に変異された変異体を用いることが望ましい。変異遺伝子を取得する方法は、特に限定されるものではなく、従来公知の方法を用いて行うことができる。UV照射による方法として、例えば、Hashimotoらの方法 (Applied and Environmental Microbiology, 71(1):312-319, 2005)、がある。この方法では、生育させたプレート上の酵母株に35cmの距離からUVを20秒照射して、0.05~0.2%の変異体を得られている。この方法に準じて、ヒスチジン (His)、ロイシン (Leu)、アルギニン (Arg)、ウラシル (Ura)、メチオニン (Met)、トリプトファン (Tri)の栄養要求性変異株を得ることができる。あるいは、遺伝子破壊カセットベクター等、標的とする遺伝子と相同的な塩基配列を持ち、遺伝子として働き得ないDNAを細胞中に導入して相同的組換えを起こさせ、不活化させる方法もある (特開2001-46053号公報)。発現を目視できない遺伝子の変異を行う場合は、細胞の薬剤 (抗生物質等) 感受性試験、細胞の生育速度、酵素活性試験、光学的方法又は栄養要求性試験により観察できるようなマーカー遺伝子を導入する必要がある。

[0018] 上述のような、栄養要求性マーカー遺伝子配列と、サッカロマイセス・セレビシエ由来のFLO遺伝子配列とを含み、前記FLO遺伝子の発現が前記発現プロモーターにより制御されるよう設計されたFLO遺伝子発現カセットを用いた本発明の酵母の作製方法としては、(A) サッカロマイセス・セレビシエの内在性FLO遺伝子の上流に栄養要求性マーカー遺伝子配列及び発現プロモーター配列を導入してサッカロマイセス・セレビシエ形質転換体を作製する工程；(B) 工程(A)で作製されたサッカロマイセス・セレビ

シエ形質転換体由来の染色体DNAから、栄養要求性マーカー遺伝子配列、発現プロモーター配列、及び、FLO遺伝子配列を含むDNA断片を得る工程；（C）工程（B）で得られたDNA断片に含まれる栄養要求性マーカー遺伝子に対応する栄養要求性遺伝子に変異を有するクルイベロマイセス・マルシアヌス変異体に、前記DNA断片をFLO遺伝子発現カセットととして導入し、クルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体を作製する工程；の工程（A）～（C）を順次含む作製方法を挙げることができる。

[0019] 上記工程（A）において、サッカロマイセス・セレビシエ形質転換体は、栄養要求性遺伝子に変異したサッカロマイセス・セレビシエ菌株に、栄養要求性マーカー遺伝子配列と、サッカロマイセス・セレビシエ由来のFLO遺伝子配列とを含む形質転換用DNA断片を導入することにより作製することができる。上記栄養要求性遺伝子に変異したサッカロマイセス・セレビシエ菌株としては、市販のウラシル要求性遺伝子に変異したサッカロマイセス・セレビシエ BY4700株や、ウラシル、ロイシン、リシンの要求性遺伝子に変異したサッカロマイセス・セレビシエ BY4740株や、ヒスチジン、ロイシン、ウラシルの要求性遺伝子に変異したサッカロマイセス・セレビシエ BY4743株や、Hashimotoらの方法（Applied and Environmental Microbiology, 71(1):312-319, 2005）に準じて作製したウラシル要求性遺伝子変異のクルイベロマイセス・マルシアヌス RAK3605等を用いることができる。また、上記形質転換用DNA断片の作製には、サッカロマイセス・セレビシエFLO遺伝子の配列情報に基づき、開始コドンATGからATGを含んで40番目の塩基までの配列からなるDNA断片を用いることができ、例えば、40塩基からなるDNA断片の塩基配列としては、FLO1遺伝子由来の場合は、atgacaatgcctcatcgctatatgtttttggcagtccttta（配列番号1）であり、FLO5遺伝子由来の場合は、atgacaattgcacaccactgcatatTTTTGGTAACTCTGG（配列番号2）であり、FLO9遺伝子由来の場合は、atgtctctggcacattattgtttactactag

c c a t c g t c a (配列番号3)であり、FLO10遺伝子由来の場合は、a t g c c t g t g g c t g c t c g a t a t a t a t t t t t g a c c g g c c t a t (配列番号4)等を挙げることができる。これらのFLO遺伝子の塩基配列情報を基に作製したDNA断片をアニールして、発現プロモーター配列と栄養要求性マーカー遺伝子配列を有するプラスミドに挿入し、PCRによって所望の領域を増幅することでFLO遺伝子発現カセット用のDNA配列を得ることができる。上記発現プロモーター配列と栄養要求性マーカー遺伝子配列を有するプラスミドとしては、特に制限されるものではないが、例えば、Turgeonらの方法(Plasmid 51:24-36, 2004)にしたがって作製された、発現プロモーターとしてTDH3pを、栄養要求性遺伝子としてウラシル要求性遺伝子を有するプラスミドURA3-TDH3p(「pST106」という)を好適に挙げることができる。

[0020] 遺伝子変異株に、形質転換用DNA断片を導入する方法は、DNA断片を導入する一般的な形質転換の手法を用いることができる。例えば、接合法、エレクトロポレーション法、コンピテントセル法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等の何れの方法も用いることができる。また、赤田らの方法(特開2005-269920号公報)により、アルカリ金属イオンとポリエチレングリコールを含有する培地でヒートショックを行ない、形質転換用DNA断片を導入することもできる。

[0021] 上記工程(A)において、ウラシル要求性遺伝子の変異したサッカロマイセス・セレビシエ BY4700株を用いたサッカロマイセス・セレビシエ形質転換体の例として、URA3-TDH3p-FLO401を導入したサッカロマイセス・セレビシエ RAK3977株や、URA3-TDH3p-FLO405を導入したサッカロマイセス・セレビシエ RAK3979株や、URA3-TDH3p-FLO409を導入したサッカロマイセス・セレビシエ RAK3981株や、URA3-TDH3p-FLO4010を導入したサッカロマイセス・セレビシエ RAK3983株等の以下の実施例にて作製された形質転換体を挙げることができる。

[0022] 上記工程（B）において、工程（A）で作製されたサッカロマイセス・セレビシエ形質転換体由来の染色体DNAから、FLO遺伝子発現カセットをコードするDNA断片を得る方法としては、上記サッカロマイセス・セレビシエ形質転換体の染色体DNAを、SDS（ラウリル硫酸ナトリウム）溶液等を用いた通常の方法で、溶解・攪拌・抽出・遠心分離の操作を行うことにより精製し、精製された染色体DNAを鋳型としてPCR反応を行う方法を挙げることができ、上記PCR反応の際に、栄養要求性マーカー遺伝子配列、発現プロモーター配列、及び、FLO遺伝子配列を含むFLO遺伝子発現カセット配列を含むDNA配列を増幅するよう設計したプライマーを用いることにより、FLO遺伝子発現カセットをコードするDNA断片を得ることができる。

[0023] 上記（C）においては、上記FLO遺伝子発現カセットに含まれる栄養要求性マーカー遺伝子に対応する染色体遺伝子に変異を有するクルイベロマイセス・マルシアヌス栄養要求性変異体であれば、どのような栄養要求性遺伝子に変異したクルイベロマイセス・マルシアヌス変異体であっても使用することができ、ヒスチジン、ロイシン、ウラシル、メチオニン、リシン、アデニン、トリプトファン、アルギニン等の栄養要求性遺伝子に変異したクルイベロマイセス・マルシアヌス変異体を選択することができる。例えば、以下の実施例に示すように、FLO遺伝子発現カセットとして、URA3-TDH3p-FLO遺伝子断片を用いる場合には、ウラシル要求性遺伝子に変異したクルイベロマイセス・マルシアヌス菌株のクルイベロマイセス・マルシアヌス RAK3605株を用いて作製することができる。

[0024] 本発明の作製方法を用いて作製される凝集性及び耐熱性を有する酵母としては、特に制限されるものではないが、例えば、ウラシル要求性遺伝子に変異したクルイベロマイセス・マルシアヌス RAK3605株に、サッカロマイセス・セレビシエ RAK3977株由来のFLO遺伝子発現カセット（URA3-TDH3p-FLO1）を導入した、クルイベロマイセス・マルシアヌス RAK4299株（受託番号：NITE BP-514）や、

サッカロマイセス・セレビスエ RAK3979株由来のFLO遺伝子発現カセット(URA3-TDH3p-FLO5)を導入した、クルイベロマイセス・マルシアヌス RAK4300株(受託番号:NITE BP-515)や、サッカロマイセス・セレビスエ RAK3981株由来のFLO遺伝子発現カセット(URA3-TDH3p-FLO9)を導入した、クルイベロマイセス・マルシアヌス RAK4301株(受託番号:NITE BP-516)や、サッカロマイセス・セレビスエ RAK3983株由来のFLO遺伝子発現カセット(URA3-TDH3p-FLO10)を導入した、クルイベロマイセス・マルシアヌス RAK4302株(受託番号:NITE BP-517)等を具体的に挙げることができる。なお、上記の4種のクルイベロマイセス・マルシアヌス変異株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(住所:千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に寄託されている。

[0025] 本発明において、形質転換した菌株を選択するための培地としては、通常使用されている酵母培養用の培地でも良く、例えば、実施例にあげたYPD培地(1%酵母エキス、2%ペプトン、2%グルコース)や、YM培地(0.3%酵母エキス、0.3%麦芽エキス、0.5%ペプトン、1%グルコース)を用いることができる。培地の炭素源、窒素源の種類や、アルカリ金属イオン等の培地への添加物については、形質転換体の選択が有効に行えるものであれば何れの培地でも良い。培養は、25~33℃、好ましくは28~30℃で、1~5日、好ましくは2~3日行う。

[0026] 以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げるが本発明はこれに限定されない。

### 実施例 1

[0027] <サッカロマイセス・セレビスエのFLO遺伝子上流への過剰発現プロモーターTDH3pの挿入>

#### A. URA3-TDH3p断片の増幅

マーカー遺伝子であるURA3遺伝子配列と、発現プロモーター配列であ

るTDH3とを有するpST106プラスミドをテンプレートに、表1に示すプライマーを用いてPCR反応を行い、サッカロマイセス・セレビシエ形質転換用のDNA断片を作製した。上記プライマーはpST106プラスミドのURA3-TDH3 p配列をはさむように設計されており、さらに、サッカロマイセス・セレビシエのFLO1、FLO5、FLO9又はFLO10遺伝子上流配列をそれぞれ40塩基含むよう設計されている。PCR反応液は、1対の0.2 μMのプライマーを各々0.2 μl、KOD plusバッファー1.0 μl (TOYOBO社製)、0.2 mM dNTPs 1.0 μl (TOYOBO社製)、0.2 mM MgSO<sub>4</sub> 0.8 μl (TOYOBO社製)、0.4 ng/μl pST106プラスミド0.4 μl、KOD Plus DNA polymerase 0.2 μl (TOYOBO社製)、滅菌水6.2 μlで、トータル10 μlの液とした。反応は、まず94°Cで1分間加熱し、その後、94°Cで20秒間の熱変性、55°Cで30秒間のアニーリング、68°Cで3分間の伸長反応を30サイクル行った。その結果、FLO1、FLO5、FLO9又はFLO10遺伝子上流の相同配列をそれぞれ持つDNA断片URA3-TDH3 p-FLO401、URA3-TDH3 p-FLO405、URA3-TDH3 p-FLO409、URA3-TDH3 p-FLO4010 (以下、これらのDNA断片を総称してURA3-TDH3 p-FLO40sということがある)を得た(図1、2)。

[0028]

[表1]

作製する形質転換用DNA断片 (URA3-TDH3p-FL040s)	プライマー I	プライマー II
URA3-TDH3p-FL0401	FL01-401 (配列番号 5) tatlttttaattciltgicaccagtaa acagaacalccaaaaggcgcgcccg	FL01-402 (配列番号 6) taaagactgccaaaaacatatagcg atgaggcaatgtcatittatgtgat
URA3-TDH3p-FL0405	FL05-401 (配列番号 7) caaatgatitcittaaatlgatta gcaccactaaaaaaggcgcgcccg	FL05-402 (配列番号 8) ccaagattacaaaaaatatgcagtg gigtgcaalgtcatittatgtgat
URA3-TDH3p-FL0409	FL09-401 (配列番号 9) gcaatttaaaaagaacaatgtaca ataaaaagcccaaaaaggcgcgcccg	FL09-402 (配列番号 10) tgacgatggctagtagtaacaata atgtgccagagacatittatgtgat
URA3-TDH3p-FL04010	FL010-401 (配列番号 11) tttgttttaggggtcittaatcaaag aacaacaataaaaaaggcgcgcccg	FL010-402 (配列番号 12) atagcccggtcaaaaatatataicg agcagccacaggcatittatgtgat

## [0029] B. サッカロマイセス・セレビスエへのURA3-TDH3p配列の導入

サッカロマイセス・セレビスエ BY4700株を、2mlのYPD培地（1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%グルコース）の入ったテストチューブに接種し、28℃、150rpmで一夜培養した。培養液1mlを、YPD培地9mlの入ったペトリ皿へ移し、28℃、150rpmで5時間培養した。培養液は、8500rpmで3分間の遠心分離を行い、細胞を集め、滅菌蒸留水で一度洗った。残渣は、滅菌蒸留水100μlで溶解した。形質転換用の溶液は、60%のPEG3350を115μl、4Mのリチウムアセテート5μl、蒸留水15μlを混合して調製した。細胞溶解液50μlは、形質転換用バッファー135μlの入ったマイクロ遠心分離用のチューブへ移し、サーモンDNA10μlと上記Aで作製した4種類のDNA断片（URA3-TDH3p-FL040s）をそれぞれ5μlを加え、攪拌機を使って30秒間よく攪拌した。チューブを42℃で40分間熱処理をした。形質転換された細胞溶液200μlは、選択培地へ広げ、28℃で2-3日培養した。ウラシル欠損培地で生育した細胞のコロニーをランダムに採取して形質転換細胞を分離した。形質転換細胞は、YPD培地に生育させ、4℃で保存した。

## [0030] C. PCRによるサッカロマイセス・セレビスエ形質転換体の確認



### 1. PCR用DNAの調製

上記Bで作製した形質転換細胞を、1 mlのYPD培地の入った12穴プレートに接種し、28°Cで20時間培養した。培養後、YPD培地1 mlを添加し、さらに28°Cで4時間培養した。培養液1.5 mlを採取して、マイクロ遠心分離用のチューブへ移し、12000 rpmで3分間の遠心分離を行った後、上清を除き、残渣を滅菌蒸留水で一度洗った。蒸留水を除き、7.5 μlの細胞を2.5 μlの1% SDSを含むマイクロ遠心分離用のチューブへ移し、攪拌機を使って30秒間よく攪拌した。12000 rpmで3分間遠心分離を行い、上清を取った。上清は、コロニーPCRに使用した。

### [0031] 2. コロニーPCR

コロニーPCRは表2に示すプライマーを用いて行った。PCR反応液は、0.4 μMの1対のプライマーを各々0.4 μl、KOD Dashバッファー1.0 μl (TOYOBO社製)、0.2 mM dNTPs 1.0 μl (TOYOBO社製)、KOD Dash DNA polymerase 0.2 μl (TOYOBO社製)、滅菌水4.0 μlで、上記で作製した形質転換細胞の染色体DNA 5.0 μlをテンプレートとして、トータル10 μlの液でPCRを行った。反応は、まず94°Cで1分間加熱し、その後、94°Cで20秒間の熱変性、60°Cで2秒間のアニーリング、74°Cで4分間の伸長反応を30サイクル行った。その結果、図3で示すとおりサッカロマイセス・セレビシエ BY4700株にURA3-TDH3p-FLO4Osが導入された形質転換体が作製されたことを確認した。ここで作製された4種類のサッカロマイセス・セレビシエの形質転換体は、内在性のFLO1、FLO5、FLO9又はFLO10遺伝子上流に、選択マーカであるURA3遺伝子配列と、TDH3プロモーター配列とを含むものである。

### [0032]

[表2]

Template	プライマー I	プライマー II
FL01 TF	FL01-517 (配列番号1 3) : gaattcagccctccctcgcgc	FL01/5-415c (配列番号1 4) : ctagggttacgtttgttgggt
FL05 TF	FL05-413 (配列番号1 5) : ggcaccctcgagaattacactt	FL01/5-415c (配列番号1 4) : ctagggttacgtttgttgggt
FL09 TF	FL09-362 (配列番号1 6) : gtacatcacacagaccacaga	FL09-455c (配列番号1 7) : taagaaccctcctgiggigga
FL010 TF	FL010-311 (配列番号1 8) : gttgttgggatgtatccgccg	FL010-284c (配列番号1 9) : gcacaagtaatcgtatgcgcat

## 実施例 2

[0033] <サッカロマイセス・セレビシエ由来URA3-TDH3p-FLOsのクルイベロマイセス・マルシアヌスへの導入>

### A. URA3-TDH3p-FLOsの増幅

実施例1で作製したサッカロマイセス・セレビシエの形質転換体由来の染色体DNAをテンプレートとして用いてクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換用のDNA断片 (URA3-TDH3p-FLOs ; FLO遺伝子発現カセット) を作製した。表3に示すように、各サッカロマイセス・セレビシエの形質転換体のURA3配列、TDH3p配列及び完全長FLO遺伝子を増幅するためのプライマーを設計し、DNA断片URA3-TDH3p-FLOsを増幅した。PCR反応は、実施例1Aと同様に行った。反応は、まず94℃で1分間加熱し、その後、94℃で20秒間の熱変性、55℃で30秒間のアニーリング、68℃で5分間の伸長反応を30サイクル行った。その結果、増幅したPCR産物をアガロース電気泳動やUV照射の写真で分析した(図4)。

[0034]

[表3]

Template 組換え FLO 遺伝子	Template 由来菌株	プライマー 1	プライマー 1 1
URA3-IDH3p-FL01	RAK3977	FL01-517 (配列番号 1 3) : gaattctagccttccctctgctc	FL01-5037c (配列番号 2 0) : aagttggcgaiggttcaatlaattgc
URA3-IDH3p-FL05	RAK3979	FL05-413 (配列番号 1 5) : ggcaccctcgagaattacactt	FL05-3759c (配列番号 2 1) : gtactgcgtgiggcaigtlaagcagc
URA3-IDH3p-FL09	RAK3981	FL09-362 (配列番号 1 6) : gtacatcacacacgaccacaga	FL09-4454c (配列番号 2 2) : actagalccttacgttagtactgctg
URA3-IDH3p-FL010	RAK3983	FL010-311 (配列番号 1 8) : gttggllggtaigtatccgccg	FL010-3980c (配列番号 2 3) : cgccgggcagtagtaactatgttta

## [0035] B. クレイベロマイセス・マルシアヌスの URA 3 欠損株の作製

クレイベロマイセス・マルシアヌスの URA 3 欠損株は、Hashimotoらの方法 (Appl Microbiol. Biotechnol., 69: 689-696, 2006) で取得した。すなわち、酵母株を YPD プレートにスプレッドし、UV を 60 秒照射後、28°C で一晩培養し、そのプレートを、Akadaらの方法 (Yeast 23, 399-405, 2006) で調製した 5-FOA 培地にレプリカし、さらに 3 日間培養した。生育したコロニーを単離し、ウラシル要求性を確認後、形質転換が成功した株を RAK3605 株とした。

## [0036] C. URA 3-IDH 3p-FL05 のクレイベロマイセス・マルシアヌス 染色体への導入

クレイベロマイセス・マルシアヌス RAK3605 を、25 ml の YPD 培地の入った 250 ml の三角フラスコに接種し、28°C で 18 時間培養した。培養液 25 ml を、50 ml の遠心管に移し、8500 rpm 5 分間の遠心分離を行い、細胞を集め、上清を除去した。形質転換用の溶液は、60% の PEG 3350 を 400  $\mu$ l、1M の DTT 60  $\mu$ l、4M のリチウムアセテート 30  $\mu$ l、蒸留水 110  $\mu$ l を含む 600  $\mu$ l とした。細胞を 500  $\mu$ l の形質転換用溶液で溶解した。細胞溶解液 100  $\mu$ l をマイクロ遠心分離用のチューブへ移し、上記作製の DNA 断片 5  $\mu$ l を FLO 遺伝子発現カセットとして加え、攪拌機を使って 30 秒間よく攪拌した。チューブを 47°C で 15 分間熱処理をした。形質転換された細胞溶液に 100 ml の

YPD培地を加え、200  $\mu$  lをウラシル欠損培地へ広げ、28°Cで2-3日培養した。ウラシル欠損培地で生育した細胞のコロニーを採取して形質転換細胞を分離した。形質転換細胞は、YPD培地に1-2日間生育させ、4°Cで保存した。

### 実施例 3

[0037] < F L O 遺伝子を発現するクルイベロマイセス・マルシアヌスとサッカロマイセス・セレビシエの凝集性 >

F L O 遺伝子を発現するクルイベロマイセス・マルシアヌスと、サッカロマイセス・セレビシエを、それぞれ5 mlのYPD培地の入ったテストチューブに接種し、28°C、150 rpmで24時間培養した。培養後、テストチューブを、攪拌機を使って15秒間よく攪拌し、テストチューブはラックに1時間立てておき、経時的に凝集速度を観察した。図5に示すように、F L O 遺伝子過剰発現株では、野生株 (WT : クルイベロマイセス・マルシアヌス DMKU3-1042、WT : サッカロマイセス・セレビシエ BY4700) に比較し、高い凝集性を示した。

### 実施例 4

[0038] < クルイベロマイセス・マルシアヌスの F L O 遺伝子過剰発現株の高温での凝集性 >

F L O 遺伝子を発現するクルイベロマイセス・マルシアヌスを、24穴板の各ウエルに5 mlのYPD培地が入っているウエルに接種し、28°C又は40°C、150 rpmで24時間振とう培養した。図6に示すように、クルイベロマイセス・マルシアヌスの F L O 遺伝子過剰発現株では、高温での凝集性が維持されていた。

#### [参考例]

以下に参考例として、直鎖状DNAを用いた効率的なクルイベロマイセス・マルシアヌスの形質転換方法の条件検討を行った結果を示す。

[0039] < 材料 >

1. 培地

YPD培地は、蒸留水中、1%酵母エキス、2%ペプトン、2%グルコースを溶解し、121°Cで20分間オートクレーブを掛けた。ウラシル欠損培地（以下「-U培地」とする）は、0.17%酵母由来の窒素源（アミノ酸と硫酸アンモニウムを除く）、0.5%硫酸アンモニウム、2%グルコース、さらに0.06%のアミノ酸混合物（4%アデノシンサルフェイト、16%L-トリプトファン、16%L-塩酸ヒスチジン、16%L-メチオニン、32%L-ロイシンと16%L-塩酸リシン）とした。これらの成分は蒸留水に溶解し、121°Cで20分間オートクレーブに掛ける前に、1N水酸化ナトリウムでpH6.0に調製した。固体培地にする場合は、2%寒天を加えた。

[0040] 2. 酵母菌株

サッカロマイセス・セレビシエBY4704（ATCC200868）より、形質転換のためのURA3遺伝子断片を得た。宿主としては、クルイベロマイセス・マルシアヌスのURA3欠損株であるDMKU3-1042、NCYC587（National Collection of Yeast Cultures, Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich, United Kingdom, NR47UA. より入手）、IFO0273とIFO0277（前記2種は、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部・生物遺伝資源部門（NBRCより入手）を使用した。すべての酵母は、形質転換に使用する前に、新鮮なYPD培地のプレート上で、28°C、1~2日間培養した。

[0041] 3. DNA断片

サッカロマイセス・セレビシエBY4704由来のURA3遺伝子断片は、KOD-Plus DNAポリメラーゼ（TOYOBO社製）を用いてPCRを行い増幅した。プライマーセットは、URA3-40（5'-atcaagaaggttaatgtggctgtgg-3'：配列番号24）とURA3-40c（5'-ttcgtcattatagaaatcattacgac-3'：配列番号25）、URA3-300（5'-gaa

g a g t a t t g a g a a g g g c a a c - 3' : 配列番号 26) と URA 3-300c (5' - t g t t g t g a a g t c a t t g a c a c a g - 3' : 配列番号 27)、または URA 3-1000 (5' - t a c t a g g a a a t g a g a a t t t t t g g a a - 3' : 配列番号 28) と URA 3-1000c (5' - t g c g a t t g g c a g t g g a a c a g t g g t a - 3' : 配列番号 29) を適宜用いた。PCRは、まず 94°Cで1分間加熱し、その後、94°Cで20秒間の熱変性、55°Cで30秒間のアニーリング、68°Cで3分間の伸長反応を30サイクル行った。

[0042] <形質転換方法>

URA 3 遺伝子欠損株である、クルイベロマイセス・マルシアヌス DM KU 3-1042 菌株細胞を、YPD 培地 (1%酵母エキス、2%ペプトン、2%グルコース、2%寒天) の入ったシャーレ上で 28°C、一夜培養し、そこから試験用の細胞を採取した。細胞は、YPD 液体培地 (1%酵母エキス、2%ペプトン、2%グルコース) 25ml の入った三角フラスコへ接種し、28°Cで17時間、通気下 150 rpm で振とう培養した。培養液 50 ml を取り、遠心分離管に移して、8000 rpm で2分間遠心分離を行った。上清を除き、残渣に形質転換用バッファー (60%PEG 3350 2ml、4Mリチウムアセテート 150 $\mu$ l、1M DTT 300 $\mu$ l、滅菌蒸留水 550 $\mu$ l) を 1.4ml 加え、15秒間攪拌混合し、混合溶液をマイクロ遠心分離管に移した。12000 rpm で15秒間超遠心分離を行い、上清を除いた。残渣に、前記形質転換用バッファー 500 $\mu$ l を加え、良く攪拌した。混合液 100 $\mu$ l をマイクロ遠心分離管に移し、試験用には、DNA断片 (URA 3) 25 ng (0.5 $\mu$ l) を添加し、対照には添加しなかった。ミクサーでよく混合し、47°Cで15分間ヒートショックを行って培養した。次いで、反応液に滅菌水及び-U培地 150 $\mu$ l を加えて懸濁し、混合液をスプリーダーで-U固体培地のプレートに伸ばし、28°Cで2~3日培養した。

[0043] URA 3-40 (配列番号 24) と URA 3-40c (配列番号 25) で

増幅したDNA断片を用いて行った結果を図14に示した。対照のURA3遺伝子欠損株では、菌体の生育は見られず、試験用では、多くのコロニーが見られ、細胞にURA3遺伝子のDNAが取り込まれたことが証明された。

[0044] <酵母細胞濃度の影響>

YPD液体培地中で生育させた酵母細胞の濃度は、600nm (OD600)の吸光度で測定した。42°Cで2時間のヒートショック処理を行うことを除いては、実施例1と同じ条件下で形質転換を行った。その結果、図9に示すように、酵母細胞の濃度は濃い程反応性が高いことが明らかになった。

[0045] <形質転換用反応液組成の影響>

1. ポリエチレングリコール (PEG) の分子量と希釈溶媒

実施例1と同じ条件下で、形質転換用バッファー中のポリエチレングリコール (PEG) の分子量を変えて形質転換を行った。PEGは、PEG3350 (平均分子量3350) とPEG600 (平均分子量600) を用い、形質転換用バッファー中、最終濃度40%となるようにした。また、対照としてPEGを加えない場合も同様に行った。図10に示すように、PEG3350を添加する方が効果的な結果であった。

[0046] 2. DTT

上述の条件と同じ条件下で、形質転換用バッファー中のDTTの最終濃度を0から100mMまで変えて形質転換を行った。その結果、図11に示すように濃度依存的に、DTTの効果が明らかになった。

[0047] <サッカロマイセス セレビシエ染色体由来のDNA断片の大きさの影響>

上述の条件と同じ条件下で、サッカロマイセス セレビシエの染色体URA3 DNA断片を、増幅プライマーのみを変えて形質転換を行った。用いたプライマーは、DNAサイズが1.702kbとなるURA3-300 (配列番号26) とURA3-300c (配列番号27) のセット、またはサイズが2.804kbとなるURA3-1000 (配列番号28) とURA3-1000c (配列番号29) のセットを用いPCRで増幅した。その結果

、図12に示すようにPCRでは、いずれの場合にも高い形質転換効率を示した。なお、反応液の懸濁は-U培地を用いる方が高い形質転換効率を示した。

[0048] <ヒートショックの時間と温度の影響>

上述の条件と同じ条件下で、DNA断片を加えた後の反応液のヒートショックについて、温度と時間のみを変えて形質転換を行った。ヒートショックは、42℃、47℃または49℃の温度で、1分間、5分間、15分間または45分間行った。その結果、図13に示すように、温度により効果的な時間が異なることが明らかになった。

[0049] <宿主クルイベロマイセス マルシアヌスの菌株の選択>

上述の条件と同じ条件下で、クルイベロマイセス マルシアヌス DMKU3-1042と同じURA3遺伝子欠損株である、NCYC587、IFO00273およびIFO0277を用いて形質転換を行った。その結果、図14に示すように、宿主としては、クルイベロマイセス マルシアヌス DMKU3-1042を用いることが最も効果的であることが分かった。なお、反応液の懸濁は-U培地を用いる方が高い形質転換効率を示した。

[0050] 本発明の酵母の形質転換方法は、従来の人為的形質転換法と比べて、操作が簡便であり、形質転換に要する時間が短く、且つ1μgのDNAあたり10の6乗個以上という高い形質転換率を有し、さらに形質転換細胞の保存が良好で、継代が充分に行える利点がある。

### 産業上の利用可能性

[0051] 本発明により、バイオエタノールの工業生産に有利な、凝集性と耐熱性に優れたエタノール産生酵母を提供することができる。



0-1	様式 PCT/RO/134 (SAFE) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	PCT-SAFE Version 3.51.028.203 MT/FOP 20080401/0.20.5.12
0-1-1		
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	FH19-041
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	段落番号	0011, 0012, 0024
1-3	寄託の表示	NPMD (独)製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター (NPMD) 日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 2008年 02月 29日 (29.02.2008) NPMD BP-514
1-3-1	寄託機関の名称	
1-3-2	寄託機関のあて名	
1-3-3	寄託の日付	
1-3-4	受託番号	
1-4	追加の表示	なし
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
1-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし
2	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
2-1	段落番号	0011, 0012, 0024
2-3	寄託の表示	NPMD (独)製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター (NPMD) 日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 2008年 02月 29日 (29.02.2008) NPMD BP-515
2-3-1	寄託機関の名称	
2-3-2	寄託機関のあて名	
2-3-3	寄託の日付	
2-3-4	受託番号	
2-4	追加の表示	なし
2-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
2-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし

3	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
3-1	段落番号	0011, 0012, 0024
3-3	寄託の表示	
3-3-1	寄託機関の名称	NPMD (独)製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター (NPMD)
3-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8
3-3-3	寄託の日付	2008年 02月 29日 (29.02.2008)
3-3-4	受託番号	NPMD BP-516
3-4	追加の表示	なし
3-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
3-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし
4	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
4-1	段落番号	0011, 0012, 0024
4-3	寄託の表示	
4-3-1	寄託機関の名称	NPMD (独)製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター (NPMD)
4-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8
4-3-3	寄託の日付	2008年 02月 29日 (29.02.2008)
4-3-4	受託番号	NPMD BP-517
4-4	追加の表示	なし
4-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
4-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし

## 受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	
0-4-1	権限のある職員	

## 国際事務局記入欄

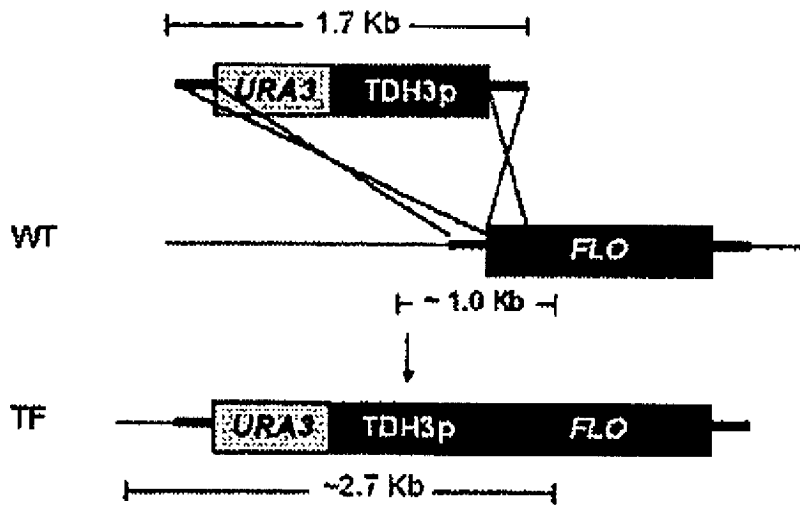
0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

## 請求の範囲

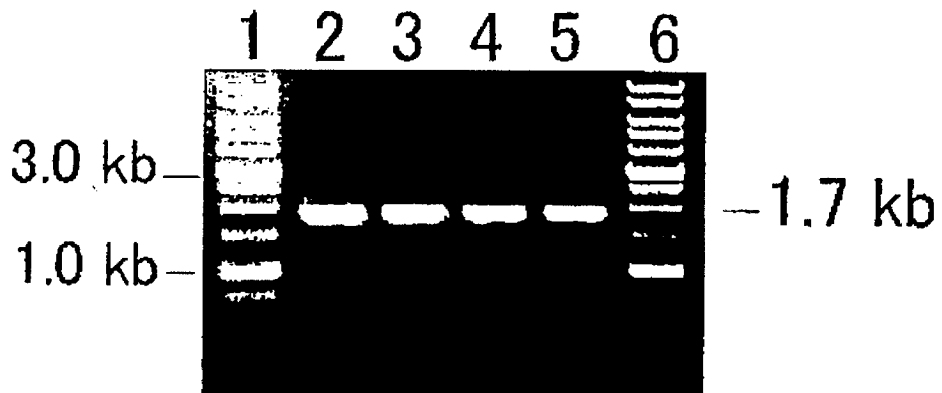
- [1] 以下の工程（A）～（C）を順次含むことを特徴とする凝集性及び耐熱性を有するクルイベロマイセス・マルシアヌス（*Kluyveromyces marxianus*）形質転換体の作製方法。
- （A）サッカロマイセス・セレビスエ（*Saccharomyces cerevisiae*）の内在性 F L O 遺伝子の上流にマーカー遺伝子配列及び発現プロモーター配列を導入してサッカロマイセス・セレビスエ形質転換体を作製する工程；
- （B）工程（A）で作製されたサッカロマイセス・セレビスエ形質転換体由来の染色体 DNA から、マーカー遺伝子配列、発現プロモーター配列、及び、F L O 遺伝子配列を含む DNA 断片を得る工程；
- （C）工程（B）で得られた DNA 断片を、F L O 遺伝子発現カセットとしてクルイベロマイセス・マルシアヌスに導入し、クルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体を作製する工程；
- [2] サッカロマイセス・セレビスエの内在性 F L O 遺伝子が、F L O 1 遺伝子、F L O 5 遺伝子、F L O 9 遺伝子、及び、F L O 1 0 遺伝子から選択される 1 以上の F L O 遺伝子であることを特徴とする請求項 1 記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の作製方法。
- [3] マーカー遺伝子が、栄養要求性マーカー遺伝子であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の作製方法。
- [4] 栄養要求性マーカー遺伝子がヒスチジン、ロイシン、ウラシル、メチオニン、リシン、アデニン、トリプトファン、アルギニンの少なくとも 1 つの栄養要求性遺伝子であることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の作製方法。
- [5] 栄養要求性マーカー遺伝子が U R A 3 遺伝子であることを特徴とする請求項 4 記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の作製方法。
- [6] クルイベロマイセス・マルシアヌスが、ヒスチジン、ロイシン、ウラシル、メチオニン、リシン、アデニン、トリプトファン、アルギニンの少なくとも

- 1つの栄養要求性遺伝子に変異を有するクルイベロマイセス・マルシアヌス変異体であることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の作製方法。
- [7] 発現プロモーターがグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ3 (TDH3) プロモーターであることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の作製方法。
- [8] 線状のDNA断片を、FLO遺伝子発現カセットとしてクルイベロマイセス・マルシアヌスに導入することを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の作製方法。
- [9] クルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体が、RAK4299株 (NITE BP-514)、RAK4300株 (NITE BP-515)、RAK4301株 (NITE BP-516)、又は、RAK4302株 (NITE BP-517)であることを特徴とする請求項1～8のいずれかに記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体の作製方法。
- [10] 請求項1～8のいずれかに記載の作製方法により作製された凝集性及び耐熱性を有するクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体。
- [11] RAK4299株 (NITE BP-514)、RAK4300株 (NITE BP-515)、RAK4301株 (NITE BP-516)、又は、RAK4302株 (NITE BP-517)であることを特徴とする請求項10記載のクルイベロマイセス・マルシアヌス形質転換体。

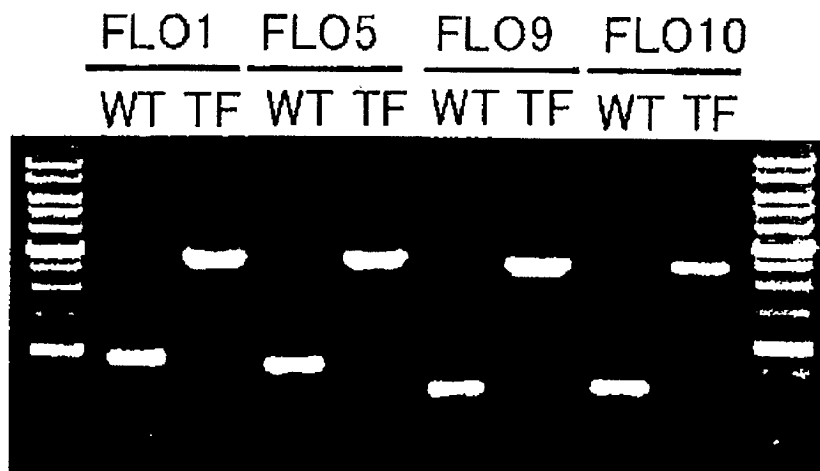
[圖1]



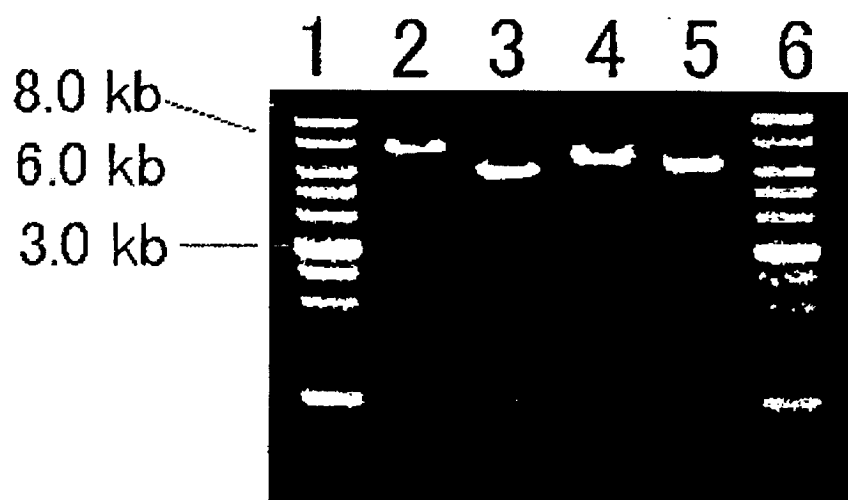
[圖2]



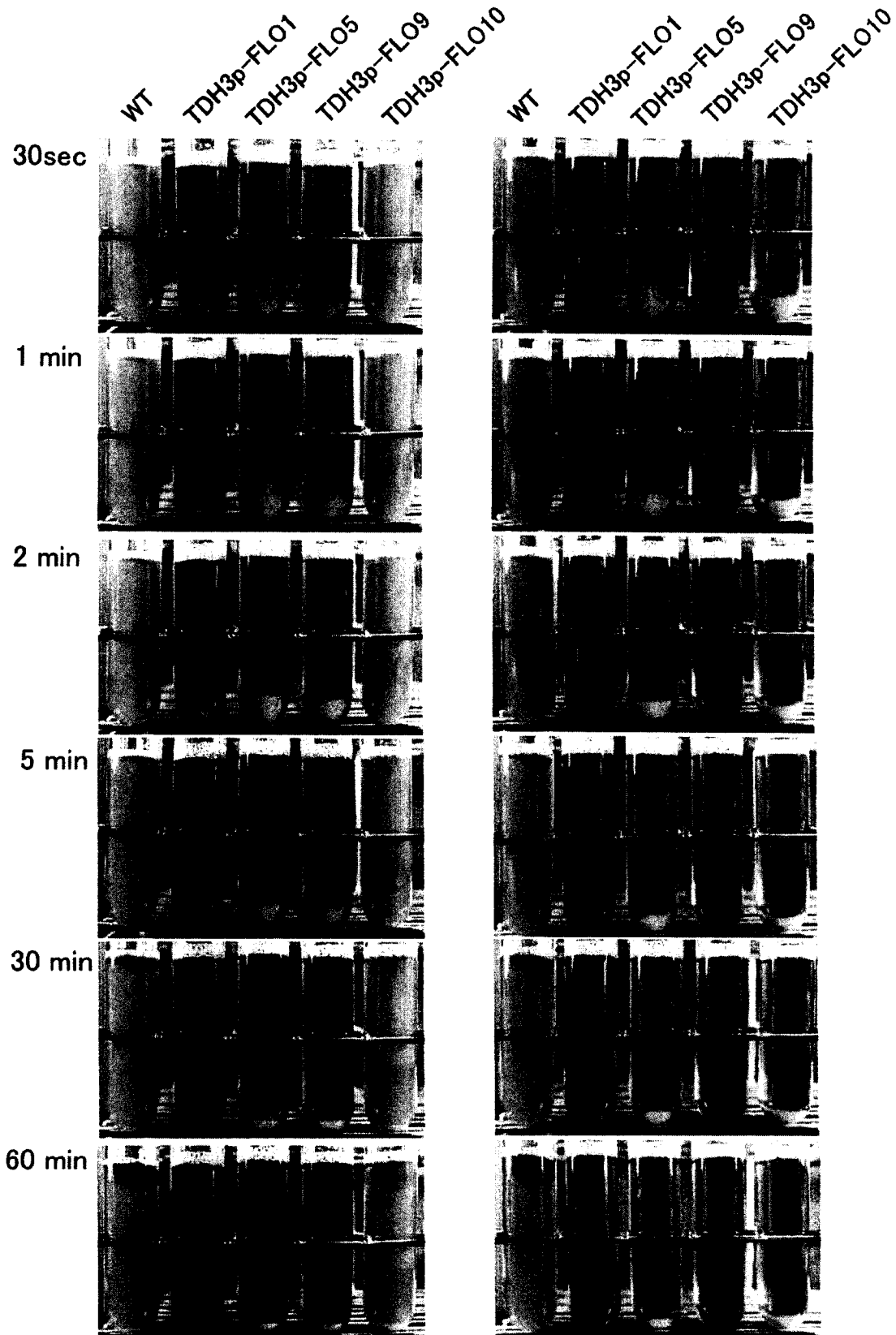
[圖3]



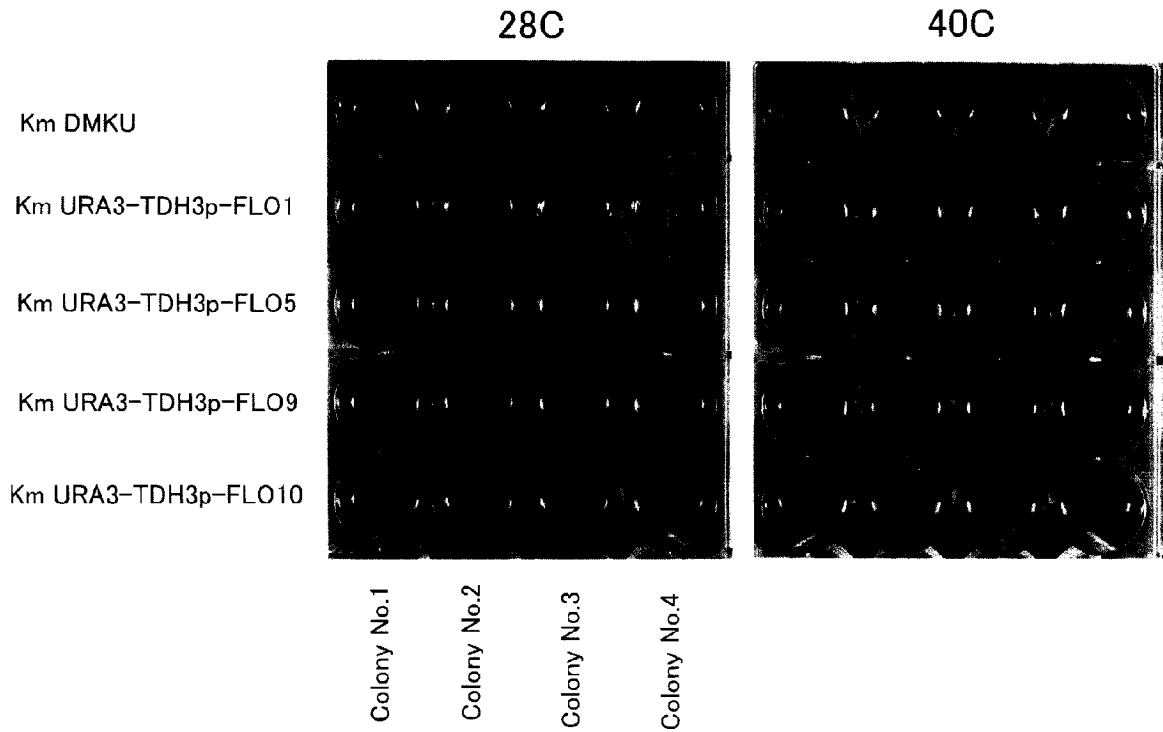
[図4]



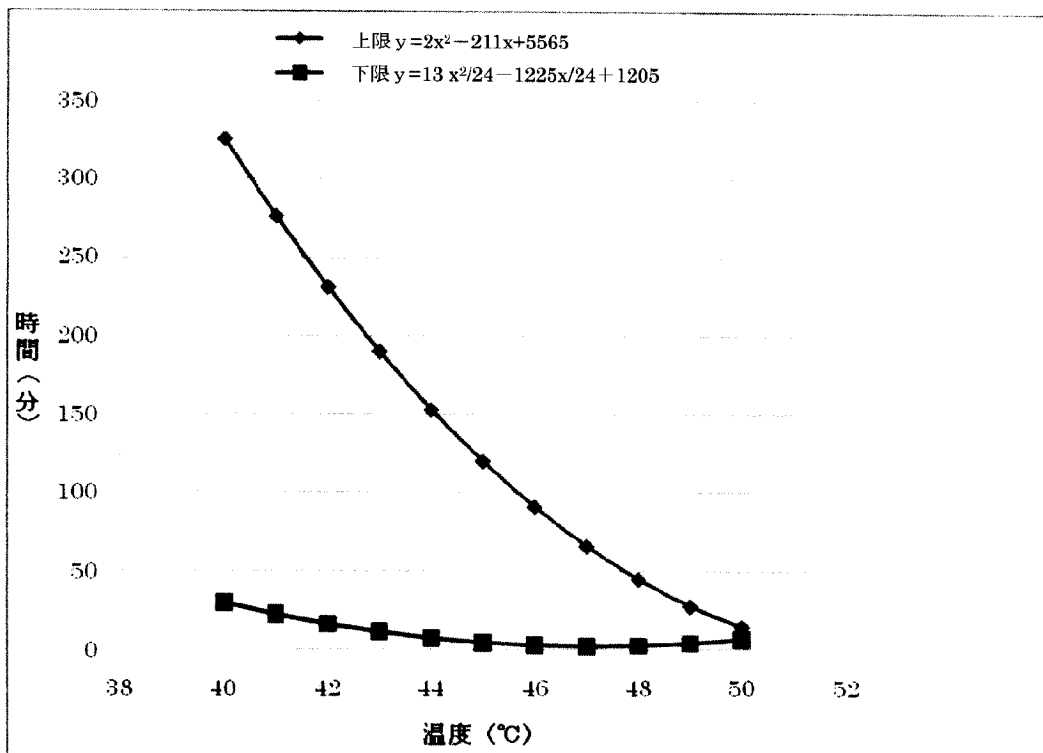
[5]

*K. marxianus**S. cerevisiae* BY4700

[図6]

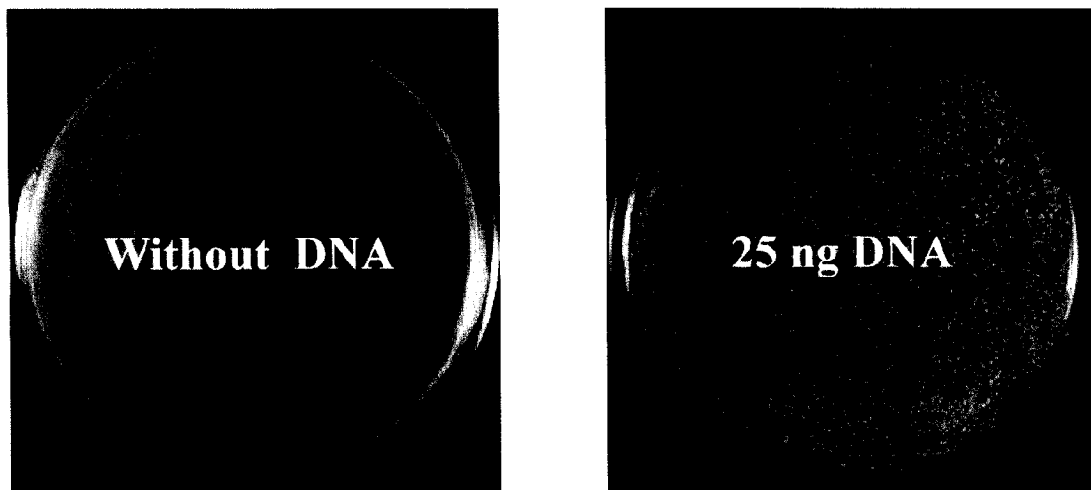


[図7]

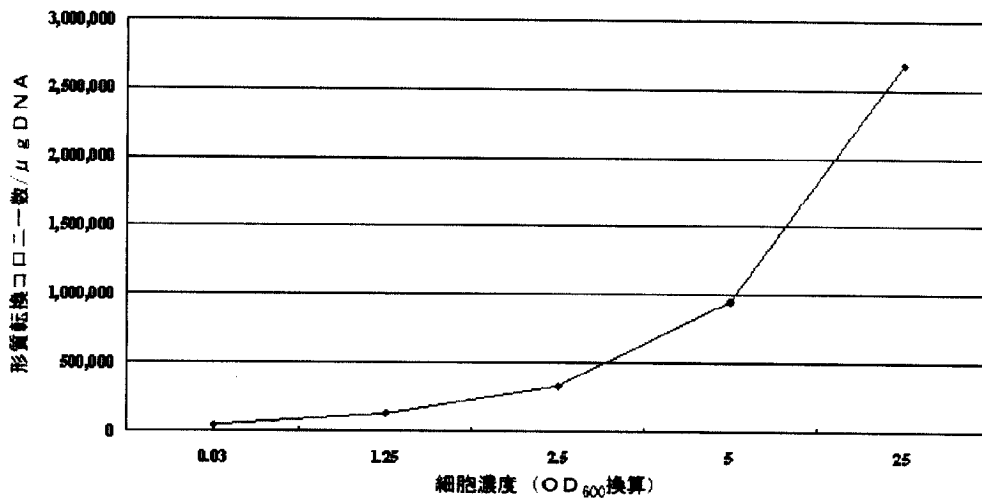




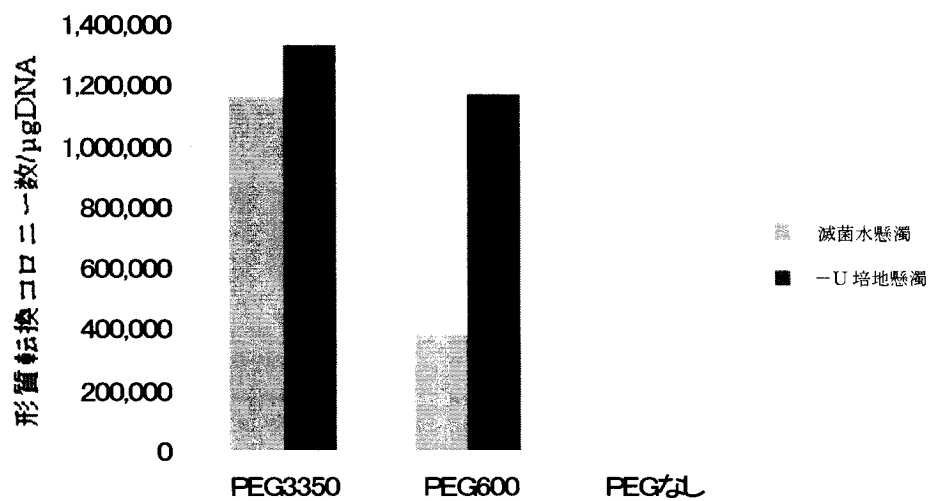
[図8]



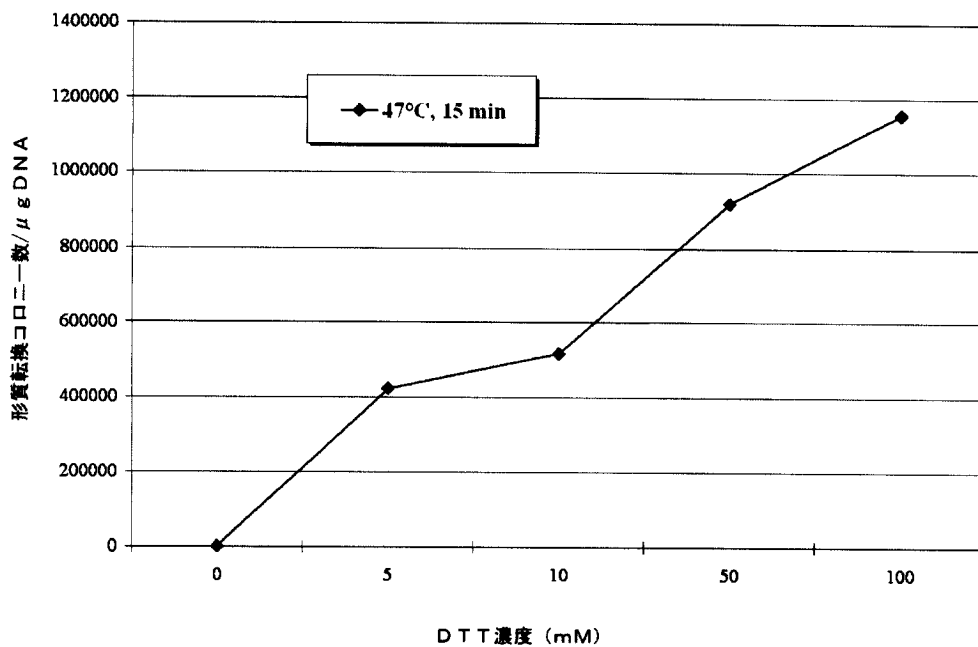
[図9]



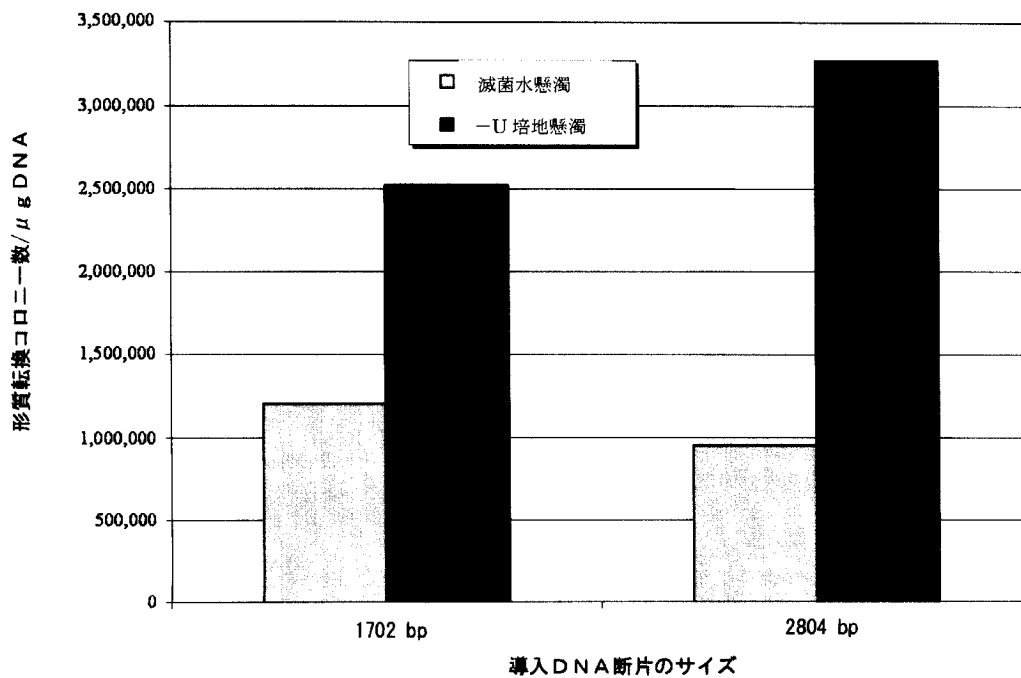
[図10]



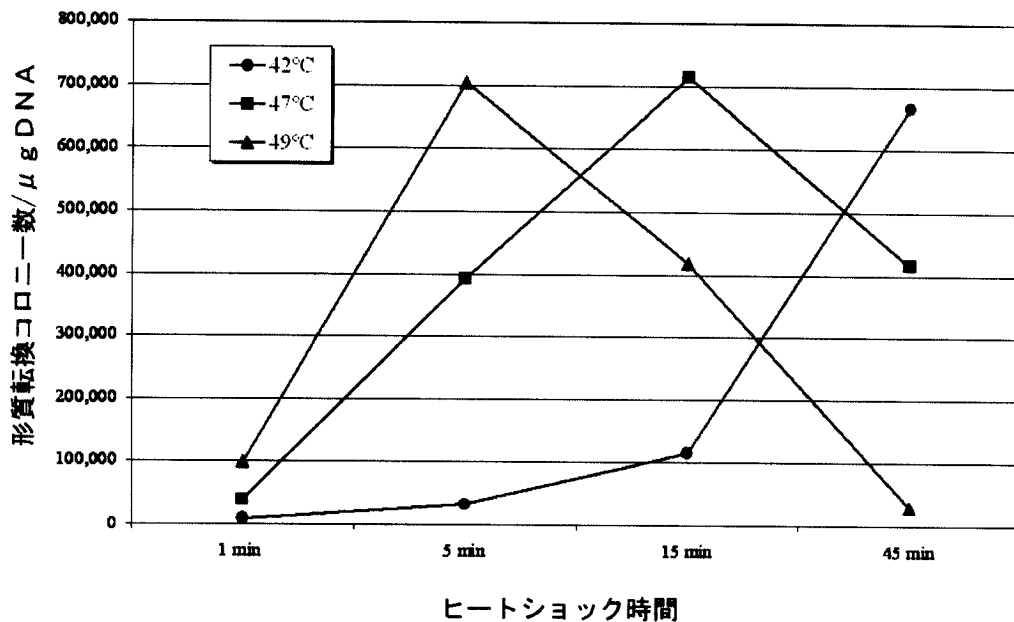
[図11]



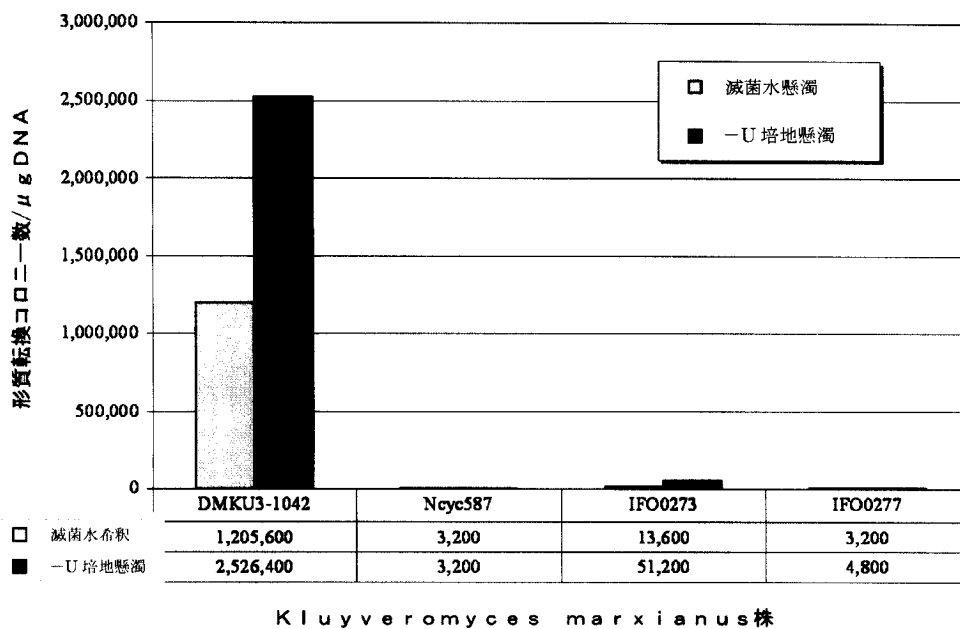
[図12]



[図13]



[図14]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2009/001214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
C12N15/09(2006.01) i, C12N1/19(2006.01) i

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)  
C12N15/09, C12N1/19

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ALMEIDA, C. et al., "Acquisition of flocculation phenotype by Kluyveromyces marxianus when overexpression GAP1 gene encoding an isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase", J. Microbiol. Methods, (2003), Vol.55, pp.433-440, full text (particularly, page 434, 2.2. Plasmids, Table 1, page 435, 2.5. Yeast transformation, page 439, right row, lines 1 to 8)	1-11
Y	JP 2005-532055 A (Salinbar S.A.), 27 October, 2005 (27.10.05), Full text; (particularly, Claims 4, 6, 7; Par. No. [0002]) & WO 2004/005491 A1 & EP 1551951 A	1-11

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	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 21 April, 2009 (21.04.09)	Date of mailing of the international search report 12 May, 2009 (12.05.09)
----------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/001214

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LUNDBLAD, V. et al., "Manipulation of cloned yeast DNA", Current Protocols in Mol. Biol., (1997), Unit 13.10.1-13.10.14, full text (particularly, 13.10.9-10 BASIC PROTOCOL 5)	1-11
Y	KURODA, S. et al., "Fermentable and nonfermentable carbon sources sustain constitutive levels of expression of yeast triosephosphate dehydrogenase 3 gene from distinct promoter elements", J. Biol. Chem., (1994), Vol.269, No.8, pp.6153-6162, full text (page 6153, left row, lines 3 to 8)	7-11
A	SUZUKI, O. et al., "Utilization of thermotolerant and flocculent yeast for wastewater treatment", Hakko Kogaku Kaishi, (1991), Vol.69, No.2, pp.83-87, abstract	1-11
A	JP 7-509372 A (Sapporo Breweries Ltd.), 19 October, 1995 (19.10.95), Full text & WO 1994/019475 A2 & EP 640140 A & US 5585271 A1	1-11
A	CUNHA, A. F. et al., "Control by sugar of Saccharomyces cerevisiae flocculation for industrial ethanol production", FEMS Yeast Res., (2006), Vol.6, pp.280-287, full text	1-11
A	JP 2006-174767 A (Kobe University), 06 July, 2006 (06.07.06), Full text; (particularly, Claim 10; examples 1, 2) (Family: none)	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, C12N1/19

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)  
MEDLINE/CAP1us/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	ALMEIDA, C. et al., "Acquisition of flocculation phenotype by Kluyveromyces marxianus when overexpression GAP1 gene encoding an isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase", J. Microbiol. Methods, (2003), Vol.55, pp.433-440, 全文(特に第 434 頁 2.2.Plasmids 欄, Table 1, 第 435 頁 2.5.Yeast transformation 欄, 第 439 頁右列 1~8 行参照)	1-11

C 欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.04.2009

国際調査報告の発送日

12.05.2009

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐藤 巖

4B

3334

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2005-532055 A (サリンバル エス. アー. ) 2005.10.27, 全文(特に請求項 4,6,7, 段落【0002】参照) & WO 2004/005491 A1 & EP 1551951 A	1-11
Y	LUNDBLAD, V. et al., "Manipulation of cloned yeast DNA", Current Protocols in Mol. Biol., (1997), Unit 13.10.1-13.10.14, 全文(特に 13.10.9-10 BASIC PROTOCOL 5 参照)	1-11
Y	KURODA, S. et al., "Fermentable and nonfermentable carbon sources sustain constitutive levels of expression of yeast triosephosphate dehydrogenase 3 gene from distinct promoter elements", J. Biol. Chem., (1994), Vol.269, No.8, pp.6153-6162, 全文(第 6153 頁左列 3-8 行参照)	7-11
A	SUZUKI, O. et al., "Utilization of thermotolerant and flocculent yeast for wastewater treatment", 醗酵工学会誌, (1991), Vol.69, No.2, pp.83-87, 要約	1-11
A	JP 7-509372 A (サッポロビール株式会社) 1995.10.19, 全文 & WO 1994/019475 A2 & EP 640140 A & US 5585271 A1	1-11
A	CUNHA, A. F. et al., "Control by sugar of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> flocculation for industrial ethanol production", FEMS Yeast Res., (2006), Vol.6, pp.280-287, 全文	1-11
A	JP 2006-174767 A (国立大学法人神戸大学) 2006.07.06, 全文(特に請求項 10, 実施例 1,2 参照) (ファミリーなし)	1-11