

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02016/021149**

発行日 平成29年5月18日 (2017.5.18)

(43) 国際公開日 **平成28年2月11日 (2016.2.11)**

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>		C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>		C 1 2 N 1/19		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

出願番号	特願2016-539830 (P2016-539830)	(71) 出願人	304020177 国立大学法人山口大学 山口県山口市吉田 1 6 7 7 - 1
(21) 国際出願番号	PCT/JP2015/003793	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(22) 国際出願日	平成27年7月29日 (2015.7.29)	(74) 代理人	100102255 弁理士 小澤 誠次
(31) 優先権主張番号	特願2014-158646 (P2014-158646)	(74) 代理人	100096482 弁理士 東海 裕作
(32) 優先日	平成26年8月4日 (2014.8.4)	(74) 代理人	100188352 弁理士 松田 一弘
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100131093 弁理士 堀内 真
		(74) 代理人	100150902 弁理士 山内 正子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高発現プロモーター

## (57) 【要約】

T D H 3 プロモーターや G A L 1 0 プロモーターよりも高発現のプロモーターを提供することを課題とする。

酵母において目的遺伝子を高発現させるためのプロモーターであって、酵母の T D H 3 又は G A L 1 0 プロモーター配列と、酵母のリボソームタンパク質遺伝子のイントロン配列とを順次備えており、前記酵母のリボソームタンパク質遺伝子のイントロン配列が、( a ) 配列番号 1 ~ 4 に示す塩基配列；( b ) 配列番号 1 ~ 4 に示す塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された配列；( c ) 配列番号 1 ~ 4 に示す塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する配列；の ( a ) ~ ( c ) のいずれかの配列であるプロモーターを作製する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

酵母において目的遺伝子を高発現させるためのプロモーターであって、酵母の T D H 3 又は G A L 1 0 遺伝子のプロモーター配列と、酵母のリボソーマルタンパク質遺伝子のイントロン配列とを順次備えており、前記酵母のリボソーマルタンパク質遺伝子のイントロン配列が、以下に示す ( a ) ~ ( c ) のいずれかの配列であることを特徴とするプロモーター。

( a ) 配列番号 1 ~ 4 に示す塩基配列；

( b ) 配列番号 1 ~ 4 に示す塩基配列において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、付加、若しくは挿入された配列；

( c ) 配列番号 1 ~ 4 に示す塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する配列；

## 【請求項 2】

酵母が、サッカロマイセス・セレビスエであることを特徴とする請求項 1 記載のプロモーター。

## 【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載のプロモーターを含む組換えベクター。

## 【請求項 4】

請求項 3 記載の組換えベクターが導入された酵母の形質転換体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、酵母において目的遺伝子を高発現させるためのプロモーターに関し、より詳しくは、酵母において目的遺伝子を高発現させるためのプロモーターであって、酵母の T D H 3 又は G A L 1 0 遺伝子のプロモーター配列と、酵母のリボソーマルタンパク質遺伝子のイントロン配列とを順次備えたプロモーターに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

酵母は酵素や医薬品用タンパク質の生産宿主として利用されており、これらタンパク質の生産性を高めるには高発現プロモーターの利用は不可欠である。これまでに酵母においてタンパク質を高発現させるために、様々な高発現プロモーターが利用されている。かかるプロモーターとしては、恒常的高発現の T D H 3 遺伝子のプロモーター（以下、「T D H 3 プロモーター」ともいう）、P G K 1 遺伝子のプロモーター、A D H 1 遺伝子のプロモーター、誘導的高発現の G A L 1 遺伝子のプロモーター、G A L 1 0 遺伝子のプロモーター（以下、「G A L 1 0 プロモーター」ともいう）、C U P 1 遺伝子のプロモーター、P H O 5 遺伝子のプロモーターなどがあり、中でも恒常的に発現量の強さが期待できるものとして、T D H 3 遺伝子のプロモーターや P G K 遺伝子のプロモーターなど、解糖系遺伝子のプロモーターが好んで利用されている。

## 【0003】

また、さらなるタンパク質の生産性向上を求めて、例えば、クレイベロマイセス・マルキシヤヌス (*Kluyveromyces marxianus*) の染色体における P I R 1 遺伝子の上流に位置し、当該 P I R 1 遺伝子の発現を制御している領域からなるプロモーターを利用する方法（特許文献 1 参照）や、T D H 3 遺伝子の開始コドンの 5' 側上流 1 5 0 塩基対よりさらに 5' 側上流の非翻訳領域と外来の異種遺伝子とから成る D N A 断片を利用する方法（特許文献 2 参照）や、酵母のピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 ( P D C ) のプロモーターの制御下に目的遺伝子をゲノムに導入することを特徴とする遺伝子発現方法（特許文献 3 参照）や、人工的なイントロン様配列によって高発現させる方法（非特許文献 1 参照）が提案されている。

## 【0004】

しかしながら、上記プロモーターを用いても、絶対的な発現量は古くから用いられている T D H 3 プロモーターや G A L 1 0 プロモーターなどからほとんど改善されていないの

10

20

30

40

50

が現状であり、より高い発現能力を有するプロモーターの開発が求められていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2013-179899号公報

【特許文献2】特開平08-168380号公報

【特許文献3】特開2003-164295号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】L. Li et al., Letters in Applied Microbiology 40:347-352 (2005)

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、TDH3プロモーターやGAL10プロモーターよりも高発現のプロモーターを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、酵母遺伝子破壊株を用いたゲノムワイド解析から、イントロンに発現能力を高める作用があることに着目するに至った。また、開始コドン上流にイントロンがあれば、構造遺伝子を操作することなく過剰発現可能であると考えた。そこで、開始コドンより上流、又は開始コドン領域近くにイントロンを含むプロモーター配列をゲノム上から探した。その結果、いくつかのリボソーマルタンパク質（以下、「RPS」ともいう）をコードする遺伝子であるリボソーマルタンパク質遺伝子のプロモーター配列が高い活性を持つことを明らかにした。

20

【0009】

さらに、これらのプロモーター配列のエンハンサー領域を、一般的高発現プロモーターであるTDH3プロモーター及び誘導型高発現プロモーターであるGAL10プロモーターのエンハンサー領域に置換することでより発現能力が高まると考えた。そこで、分泌性ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として、リボソーマルタンパク質遺伝子のプロモーターのイントロン配列の上流の様々な位置にTDH3プロモーター配列を配置して発現を調べたところ、イントロン配列のすぐ上流にTDH3プロモーター配列を配置した時に最もルシフェラーゼ活性が高いことが明らかとなった。さらにガラクトース誘導性の高発現プロモーターであるGAL10プロモーター配列をリボソーマルタンパク質遺伝子プロモーターのイントロン配列の上流に配置したプロモーターではガラクトース誘導的にルシフェラーゼ活性が高いことを見だし、本発明を完成した。

30

【0010】

すなわち、本発明は以下に開示されるとおりのものである。

(1) 酵母において目的遺伝子を高発現させるためのプロモーターであって、酵母のTDH3又はGAL10プロモーター配列と、酵母のリボソーマルタンパク質遺伝子のイントロン配列とを順次備えており、前記酵母のリボソーマルタンパク質遺伝子のイントロン配列が、以下に示す(a)~(c)のいずれかの配列であることを特徴とするプロモーター

40

(a) 配列番号1~4に示す塩基配列；

(b) 配列番号1~4に示す塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、付加、若しくは挿入された配列；

(c) 配列番号1~4に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する配列；

(2) 酵母が、サッカロマイセス・セレビシエであることを特徴とする上記(1)記載のプロモーター。

(3) 上記(1)又は(2)記載のプロモーターを含む組換えベクター。

(4) 上記(3)記載の組換えベクターが導入された酵母の形質転換体。

50

## 【発明の効果】

## 【0011】

本発明のプロモーターは、TDH3プロモーターの15倍以上、GAL10プロモーターの10倍以上もの高発現能力を有する。かかるプロモーターを用いることで、酵母における酵素や医薬品用タンパク質などの有用物質を効率よく生産することが可能となる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0012】

【図1】TDH3プロモーター配列 - RPSイントロン配列 - yCLuc株を培養し、培養液中のルシフェラーゼの相対発現量 ( $RLU / (\mu l \cdot OD)$ ) を調べた結果を示す図である。

【図2】GAL10プロモーター配列 - RPS25Aのイントロン配列 - yCLuc株、及びTDH3プロモーター配列 - RPS25Aのイントロン配列 - yCLuc株を培養し、培養液中のルシフェラーゼの相対発現量 ( $RLU / (\mu l \cdot OD)$ ) を調べた結果を示す図である。

【図3】TDH3プロモーター配列 - 長さの異なるRPS25Aプロモーター配列 - yCLuc株を培養し、培養液中のルシフェラーゼの相対発現量 ( $RLU / (\mu l \cdot OD)$ ) を調べた結果を示す図である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0013】

本発明のプロモーターとしては、酵母において目的遺伝子を高発現させるためのプロモーターであって、酵母のTDH3又はGAL10遺伝子のプロモーター配列と、酵母のリボソーマルタンパク質遺伝子のイントロン配列とを順次備えており、前記酵母のリボソーマルタンパク質遺伝子のイントロン配列が以下に示す(a)~(c)のいずれかの配列であることを特徴とするプロモーターであれば特に制限されず、プロモーターとは、目的遺伝子配列の上流に配置され、RNAポリメラーゼが結合することにより、下流に配置された遺伝子の発現を制御することができる領域の塩基配列を意味し、エンハンサー領域も含まれる。なお、本発明のプロモーターが備える配列は、上述のように酵母のTDH3又はGAL10遺伝子のプロモーター配列と、酵母のリボソーマルタンパク質遺伝子のイントロン配列とを組み合わせた配列であることから、自然産物ではない。

(a) 配列番号1~4に示す塩基配列；

(b) 配列番号1~4に示す塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された配列；

(c) 配列番号1~4に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する配列；

## 【0014】

なお、配列番号1に示す塩基配列は、リボソーマルタンパク質遺伝子24A (RPS24A) のイントロン配列、配列番号2に示す塩基配列は、リボソーマルタンパク質遺伝子25A (RPS25A) のイントロン配列、配列番号3に示す塩基配列は、リボソーマルタンパク質遺伝子26A (RPS26A) のイントロン配列、配列番号4に示す塩基配列は、リボソーマルタンパク質遺伝子26B (RPS26B) のイントロン配列である。

## 【0015】

上記(b)における1又は数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された配列としては、1~10個、好ましくは1~5個、より好ましくは1~3個、さらに好ましくは1~2個、最も好ましくは1個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された配列を挙げることができる。

## 【0016】

上記(c)における配列番号1~4に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する配列としては、好ましくは93%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の同一性を有する配列を挙げることができる。

## 【0017】

酵母としては特に制限されず、サッカロマイセス属 (Saccharomyces)、キャンディダ

10

20

30

40

50

属 (Candida)、クルイベロマイセス属 (Kluyveromyces) ピキア属 (Pichia)、及びシゾサッカロマイセス属 (Schizosaccharomyces) に属する酵母を挙げることができ、サッカロマイセス属に属する酵母を好適に挙げることができ、サッカロマイセス・セレビスエをより好適に挙げることができる。

【0018】

上記目的遺伝子としては、用途に合わせて全長の遺伝子でも、その一部でもよい。また、その由来はいかなる生物から単離された遺伝子でも、遺伝子工学的に作製された人工的な遺伝子でもよい。

【0019】

本発明において、目的遺伝子を高発現させるとは、例えば、TDH3プロモーター配列を用いた場合と比較して、プロモーター配列の下流に配置した目的遺伝子を15倍以上、好ましくは35倍以上、より好ましくは40倍以上発現させることや、GAL10プロモーター配列を用いた場合と比較して、プロモーター配列の下流に配置した目的遺伝子を8倍以上、好ましくは10倍以上発現させることを挙げることができる。

10

【0020】

目的遺伝子の発現は、たとえば、プロモーター配列の下流に、分泌型のルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を作動可能に連結した組換えポリヌクレオチドをサッカロマイセス・セレビスエに導入して得られた形質転換体を、YPD液体培地 (1%酵母エキス、2%ペプトン、2%グルコース) にて28、150rpmで24時間培養したときの培養液中のルシフェラーゼの相対発現量 (RLU / (μl · OD)) を測定することによって求めることができる。

20

【0021】

本発明における酵母のTDH3又はGAL10プロモーター配列としては、その全長の配列だけでなく、全長の配列に対して1~10個、より好ましくは1~5個、さらに好ましくは1~3個、最も好ましくは1~2個、中でも1個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された配列や、全長の配列と90%以上、好ましくは93%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の同一性を有する配列も含まれる。なお、酵母のTDH3プロモーター配列又はGAL10プロモーター配列は、酵母の染色体や、酵母のTDH3プロモーター配列又はGAL10配列を含有する市販のベクターをテンプレートとしてPCRにより増幅することや、これらの染色体やベクターを制限酵素処理することによって得ることができる。

30

【0022】

酵母のTDH3又はGAL10遺伝子のプロモーター配列と、酵母のリボソーマルタンパク質遺伝子のイントロン配列とを順次備えているとは、酵母のTDH3又はGAL10プロモーター配列の下流に、酵母のリボソーマルタンパク質遺伝子のイントロン配列 (以下、単に「RPSイントロン配列」ともいう) が作動可能に組み込んでいけば特に制限されず、酵母のTDH3又はGAL10プロモーター配列と、酵母のRPSイントロン配列との間には任意の塩基配列を含んでいてもよいが、かかる任意の塩基配列の長さとしては、200塩基対以下、好ましくは100塩基対以下、より好ましくは50塩基対以下を挙げることができ、0塩基対、即ち、任意の塩基配列を含まず、酵母のTDH3又はGAL10プロモーター配列と、酵母のRPSイントロン配列とが直接つながっていることが最も好ましい。

40

【0023】

本発明の組換えベクターに用いるベクターとしては、本発明のプロモーターを含み、該プロモーターの下流に作動可能に組み込んだ目的遺伝子を発現できるものであれば特に制限されず、直鎖状でも環状でもよく、自立複製可能であるものや、あるいは染色体中へ組み込み可能であるものが好ましく、また、ターミネーターなどの制御配列や選択マーカーを含有しているものを用いてもよい。

【0024】

本発明の組換えベクターが導入された酵母の形質転換体としては、本発明の組換えベク

50

ターが導入された酵母の形質転換体であって、酵母としては、サッカロマイセス属の酵母が好ましく、サッカロマイセス・セレビスエがより好ましい。

【 0 0 2 5 】

本発明の組換えベクターの酵母への導入方法としては、特に制限されず、酢酸リチウム法、リポフェクション法、リン酸カルシウム共沈殿法、リポソーム法、D E A E デキストラン法などの化学的方法；ウイルスベクターを利用する方法、特異的受容体を利用する方法、細胞融合法などの生物学的的方法；エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法、超音波遺伝子導入法などの物理的方法；などの公知の方法を例示することができる。

【 0 0 2 6 】

本発明の組換えベクターを含む酵母の形質転換体を培養することで、目的遺伝子産物を効率よく生産することができる。培養方法としては酵母の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。例えば、本発明の組換えベクターが導入された酵母がサッカロマイセス・セレビスエの場合は、30 前後、pH 6 前後、及び、振とう培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下で培養することができる。目的遺伝子産物は培養液又は破碎した酵母から回収することができ、かかる回収する方法としては、公知のタンパク質の回収方法、例えば、遠心分離、次いで、ゲルろ過、イオン交換、アフィニティなどのクロマトグラフィーにより回収する方法を挙げることができる。

【 実施例 1 】

【 0 0 2 7 】

サッカロマイセス・セレビスエのゲノム配列から、コーディング配列上流、あるいは開始コドン A T G 直後に配置されたイントロン配列を探索したところ、R P S 2 4 A、R P S 2 5 A、R P S 2 6 A、R P S 2 6 B のイントロン配列が見つかった。そこで、T D H 3 プロモーター配列の下流に R P S 2 4 A、R P S 2 5 A、R P S 2 6 A、R P S 2 6 B のイントロン配列を配置した人工プロモーターを構築し、T D H 3 プロモーター配列の発現能力と比較した。

【 0 0 2 8 】

[ R P S イントロン配列 - y C L u c 株の構築 ]

( R P S 2 4 A p (-730 ~ +469) -yCLuc株の構築 )

RAK4333株 ( Fukunaga T et al. Yeast 30: 243-253 (2013) ) の染色体 D N A から U R A 3 - 2 9 0 ( 配列番号 5 ) と U R A - 2 9 0 c ( 配列番号 6 ) をプライマーに用いて P C R により U R A 3 - 5 ' - T D H 3 p - y C L u c - U R A 3 を増幅し、snt309株 ( Giaever G et al., Nature 418: 387-391 (2002) ) に導入し R A K 6 1 6 4 株を得た。

【 0 0 2 9 】

作製した R A K 6 1 6 4 の染色体 D N A をテンプレートに、プライマーに Sc U R A 3 - 5 ' 4 0 - S c R P S 2 4 A - 7 3 0 ( 配列番号 7 ) と y C L u c + 3 0 c N o A T G - S c R P S 2 4 A + 4 6 9 c ( 配列番号 8 ) を用いて、P C R により R P S 2 4 A の - 7 3 0 から + 4 6 9 まで ( 開始コドン A T G の A の位置を + 1 とする ) の D N A 断片 ( S c U R A 3 - 5 ' 4 0 - R P S 2 4 A p - y C L u c + 3 0 ) を増幅した。同じく R A K 6 1 6 4 の染色体 D N A をテンプレートに、y C L u c + 1 ( 配列番号 9 ) と U R A 3 - 3 1 0 c ( 配列番号 1 0 ) をプライマーとして y C L u c - U R A 3 を増幅した。S c U R A 3 - 5 ' 4 0 - R P S 2 4 A p - y C L u c + 3 0 と y C L u c - U R A 3 の 2 種の D N A 断片を融合させるために、これらの D N A 断片をテンプレートとし、S c U R A 3 - 5 ' 4 0 - S c R P S 2 4 A - 7 3 0 ( 配列番号 7 ) と U R A 3 - 3 1 0 c ( 配列番号 1 0 ) をプライマーに用いて P C R を行い、S c U R A 3 - 5 ' 4 0 - R P S 2 4 A p - y C L u c - U R A 3 を増幅した。これを S. cerevisiae B Y 4 7 4 3 株 ( Brachmann C B et al., Yeast 14:115-132 (1998) ) の ura3 0 の位置に次の方法で導入した。

【 0 0 3 0 】

試験管に Y P D 液体培地 ( 1 % 酵母エキス、2 % ペプトン、2 % グルコース ) を 2 m l 入れ、酵母を植菌し、28 で一晩振とう培養した。15 m l チューブに 9 m l の Y P D 液体培地を入れ、そこに 1 晩培養した培養液 1 m l を加え、28 で 5 時間静置培養した。次に 8、0 0 0 r p m、室温で 1 分間遠心し、上澄みを捨て、5 m l の滅菌水を加えて

10

20

30

40

50

、再び同じ条件で遠心し上澄みを捨て、残った液で細胞を懸濁した。形質転換液（5.4% ポリエチレングリコール 3350、120 mM 酢酸リチウム、750 µg/ml サケ精巢 DNA）135 µl に、細胞懸濁液 61 µl、PCR で増幅した DNA 溶液 4 µl を加え十分混合した。これを 42 °C の温浴中に 40 分間置いた後、100 µl の滅菌水を加え SD - Ura 寒天培地（0.17% Yeast Nitrogen Base、0.5% 硫酸アンモニウム、2% グルコース、0.0024% adenine sulfate、0.01% L-Histidine HCl、0.02% L-Leucine、0.01% L-Lysine HCl、0.01% L-Methionene、0.01% L-Tryptophan、2% 寒天末）に広げ、28 °C で 3 日間静置培養し、形質転換体のコロニーを得た。

【0031】

ScURA3-5' 40-RPS24Ap-yCLuc-URA3 を *S. cerevisiae* BY4743 株に導入した上記形質転換体（RAK8422）は *ura3*<sup>0</sup>::RPS24Ap-yCLuc-URA3 の遺伝子型を持つ。

10

【0032】

（RPS25Ap(-1598~-1)-yCLuc 株の構築）

RAK6164 の染色体 DNA をテンプレートに、プライマーに ScURA3-5' 40-ScRPS25A-1598（配列番号 11）と yCLuc+30c-ScRPS25A-1c（配列番号 12）を用いて、PCR により RPS25A の -1598 から -1 までの DNA 断片（ScURA3-5' 40-RPS25Ap-yCLuc+30）を増幅した。同じく RAK6164 の染色体 DNA をテンプレートに、yCLuc+1（配列番号 9）と URA3-310c（配列番号 10）をプライマーとして yCLuc-URA3 を増幅した。ScURA3-5' 40-RPS25Ap-yCLuc+30 と yCLuc-URA3 の 2 種の DNA 断片を融合させるために、これらの DNA 断片をテンプレートとし、ScURA3-5' 40-ScRPS25A-1598（配列番号 11）と URA3-310c（配列番号 10）をプライマーに用いて PCR を行い、ScURA3-5' 40-RPS25Ap-yCLuc-URA3 を増幅した。この DNA 断片を *S. cerevisiae* BY4743 株に上記の方法で導入した。

20

【0033】

ScURA3-5' 40-RPS25Ap-yCLuc-URA3 を *S. cerevisiae* BY4743 株に導入した形質転換体（RAK8424）は *ura3*<sup>0</sup>::RPS25Ap-yCLuc-URA3 の遺伝子型を持つ。

【0034】

（RPS26Ap(-1115~-1)-yCLuc 株の構築）

RAK6164 の染色体 DNA をテンプレートに、プライマーに ScURA3-5' 40-ScRPS26A-1115（配列番号 13）と yCLuc+30c-ScRPS26A-1c（配列番号 14）を用いて、PCR により RPS26A の -1115 から -1 までの DNA 断片（ScURA3-5' 40-RPS26Ap-yCLuc+30）を増幅した。同じく RAK6164 の染色体 DNA をテンプレートに、yCLuc+1（配列番号 9）と URA3-310c（配列番号 10）をプライマーとして yCLuc-URA3 を増幅した。ScURA3-5' 40-RPS26Ap-yCLuc+30 と yCLuc-URA3 の 2 種の DNA 断片を融合させるために、これらの DNA 断片をテンプレートとし、ScURA3-5' 40-ScRPS26A-1115（配列番号 13）と URA3-310c（配列番号 10）をプライマーに用いて PCR を行い、ScURA3-5' 40-RPS26Ap-yCLuc-URA3 を増幅した。これを *S. cerevisiae* BY4743 株に上記の方法で導入した。

30

【0035】

ScURA3-5' 40-RPS26Ap-yCLuc-URA3 を *S. cerevisiae* BY4743 株に導入した形質転換体（RAK8426）は *ura3*<sup>0</sup>::RPS26Ap-yCLuc-URA3 の遺伝子型を持つ。

【0036】

（RPS26Bp(-1505~-1)-yCLuc 株の構築）

RAK6164 の染色体 DNA をテンプレートに、プライマーに ScURA3-5' 40-ScRPS26B-1505（配列番号 15）と yCLuc+30c-ScRPS26B-1c（配列番号 16）を用いて、PCR により RPS26B の -1505 から -1 までの DNA 断片（ScURA3-5' 40-RPS26Bp-yCLuc+30）を増幅した。同じく RAK6164 の染色体 DNA をテンプレートに、yCLuc+1（配列番号 9）と URA3-310c（配列番号 10）をプライマーとして yCLuc-URA3 を増幅した。ScURA3-5' 40-RPS26Bp-yCLuc+30 と yCLuc-URA3 の 2 種の DNA 断片を融合させるために、これらの DNA 断片をテンプレートとし、ScURA3-5' 40-ScRPS26B-1505（配列番号 15）と URA3-310c（配列番号 10）をプライマーに用いて PCR を行い、ScURA3-5' 40-RPS26Bp-yCLuc-URA3 を増幅した。これを *S. cerevisiae* BY4743 株に上記の方法で導入した。

50

## 【 0 0 3 7 】

ScURA3-5'40-RPS26Bp-yCLuc-URA3を*S. cerevisiae* BY4743株に導入した形質転換体(RAK8428)はura3 0::RPS26Bp-yCLuc-URA3の遺伝子型を持つ。

## 【 0 0 3 8 】

[ TDH3プロモーター配列 - RPSイントロン配列 - yCLuc株の構築 ]

上記のとおり構築したura3 0::RPS24Ap-yCLuc-URA3、ura3 0::RPS25Ap-yCLuc-URA3、ura3 0::RPS26Ap-yCLuc-URA3、ura3 0::RPS26Bp-yCLuc-URA3のそれぞれの遺伝子型を持つ酵母株から染色体を調製した。これらの染色体をテンプレートとし、下記の表1に示すプライマーの組合せでPCRを行い、高発現プロモーターとして知られているTDH3コーディング配列上流配列40塩基(TDH3プロモーター配列の一部)と、RPSイントロン配列とを順次上流に持つyCLuc-URA3のDNA断片を増幅した。

10

## 【 0 0 3 9 】

## 【表1】

テンプレート	プライマー
ura3 Δ0::RPS24Ap-yCLuc-URA3	ScTDH3-40(40)-RPS24A+1 (配列番号17)、 URA3-280c (配列番号21)
ura3 Δ0::RPS25Ap-yCLuc-URA3	ScTDH3-40(40)-RPS25A-327 (配列番号18)、 URA3-280c (配列番号21)
ura3 Δ0::RPS26Ap-yCLuc-URA3	ScTDH3-40(40)-RPS26A-378 (配列番号19)、 URA3-280c (配列番号21)
ura3 Δ0::RPS26Bp-yCLuc-URA3	ScTDH3-40(40)-RPS26B-361 (配列番号20)、 URA3-280c (配列番号21)

20

## 【 0 0 4 0 】

増幅したDNA断片をそれぞれ、RAK5125株(MATa ade2 0A his3 1 leu2 0 met15 0 ura3 0::ScTDH3p-yGLuc-LEU2)に上記の方法で導入して形質転換体を得た。得られた形質転換体はそれぞれ下記の遺伝子型を持つ。

30

ura3 0::TDH3p-RPS24A(+1\_+469)-yCLuc-URA3

ura3 0::TDH3p-RPS25A(-327\_-1)-yCLuc-URA3

ura3 0::TDH3p-RPS26A(-378\_-1)-yCLuc-URA3

ura3 0::TDH3p-RPS26B(-361\_-1)-yCLuc-URA3

## 【 0 0 4 1 】

これらの遺伝子型におけるTDH3pはTDH3コーディング配列上流698塩基の配列である。また、RPS24A(+1\_+469)、RPS25A(-327\_-1)、RPS26A(-378\_-1)及びRPS26B(-361\_-1)は、それぞれのPRS遺伝子のイントロン配列である。

## 【 0 0 4 2 】

また、コントロールとして、TDH3p-yCLuc-URA3遺伝子をRAK5125株に導入した形質転換体も作製した。かかる形質転換体はura3 0::TDH3p-yCLuc-URA3の遺伝子型を持つ。

40

## 【 0 0 4 3 】

[ ルシフェラーゼ活性の測定 ]

24-wellマルチウェルプレートの各ウェルにYPD液体培地を1ml入れ、上記で作製した形質転換体を植菌し、28℃、150rpmで24時間培養した。得られた培養液10μlを、YPD液体培地1mlを入れた24-wellマルチウェルプレートの各ウェルに植菌した。これを28℃、150rpmで24時間培養した。培養液の600nmの濁度(OD<sub>600</sub>)を分光光度計で測定した。ルシフェラーゼ測定キット(アトー社製)とルミノメータ(Glo Max20/20n Luminometer: Promega社製)を用いて培養液中のル

50

シフェラーゼの相対発現量 ( R L U / ( μ l · O D ) ) をルシフェラーゼ活性として算出することでプロモーターの発現能力を評価した。

【 0 0 4 4 】

結果を図 1 に示す。図 1 に示すように、 T D H 3 プロモーター配列のみを用いた場合と比較して、 T D H 3 プロモーター配列と P R S 2 4 A のイントロン配列を用いた場合には 4 0 倍、 T D H 3 プロモーター配列と P R S 2 5 A のイントロン配列を用いた場合には 4 9 倍、 T D H 3 プロモーター配列と P R S 2 6 A のイントロン配列を用いた場合には 3 9 倍、 T D H 3 プロモーター配列と P R S 2 6 B のイントロン配列を用いた場合には 1 7 倍も高い発現能力を有することが明らかとなった。

【 実施例 2 】

【 0 0 4 5 】

[ G A L 1 0 プロモーター配列 - R P S イントロン配列 - y C L u c 株の構築 ]  
( G A L 1 0 プロモーター配列 - R P S 2 5 A のイントロン配列 - y C L u c 株の構築 )  
細胞に悪影響を与えるタンパク質の生産では誘導型発現の仕組みは欠かせない。現在、最も発現能力の高い誘導型プロモーターは G A L 1 0 プロモーターである。そこで、 G A L 1 0 プロモーター配列の下流に P R S のイントロン配列をつなげることで、 G A L 1 0 プロモーターよりも発現能力の高い誘導型プロモーターの作製を試みた。具体的には、 G A L 1 0 コーディング配列上流 5 1 1 b p をガラクトースプロモーターとして用い、その下流に R P S 2 5 A のイントロン配列 ( - 3 2 7 ~ - 1 ) をつなげたプロモーターをサッカロマイセス・セレピシエ染色体上に構築した。以下にその構築方法を示す。

【 0 0 4 6 】

ura3 0::RPS25Ap-yCLuc-URA3 を持つ酵母株 ( RAK8424 ) の染色体をテンプレートに、 ScURA3-5'40-ScRPS25A-600 ( 配列番号 2 2 ) と URA3-280c ( 配列番号 2 1 ) をプライマーに用いて P C R を行い、 ScURA3-5'40-ScRPS25A-600-yCLuc-URA3 を増幅した。この D N A 断片を RAK3600 ( Fukunaga T et al. Yeast 30: 243-253 (2013) ) へ上記の方法で導入し、形質転換体 ( RAK10635 ) を得た。

【 0 0 4 7 】

RAK4296 ( Fukunaga T et al. Yeast 30: 243-253 (2013) ) の染色体 D N A をテンプレートに TDH3p40yCLuc+1 ( 配列番号 2 3 ) と 15G-yCLuc+1662c ( 配列番号 2 4 ) をプライマーに用いて、 P C R により TDH3p40-yCLuc-15C を増幅した。また、 RAK3625 の染色体 DNA をテンプレートに 15C-LEU2-1 ( 配列番号 2 5 ) と URA3-300c ( 配列番号 2 6 ) をプライマーに用いて、 P C R により 15G-LEU2-URA3-3' を増幅した。これら 2 つの D N A 断片を 1 5 C ( 連続するシトシン 1 5 塩基 ) 配列を介して P C R で融合させた。得られた融合 D N A 断片 TDH3p40-yCLuc-LEU2-URA3-3' を RAK4314 株に導入し S D - L e u 寒天培地で選択し、形質転換体を得た。この形質転換体 ( RAK4920 ) は ura3 0::TDH3p-yCLuc-LEU2 の遺伝子型を持つ。

【 0 0 4 8 】

ura3 0::TDH3p-yCLuc-LEU2 の遺伝子型を持つ酵母 RAK4920 の染色体をテンプレートに、 yCLuc+21 ( 配列番号 2 7 ) と URA3-280c ( 配列番号 2 1 ) をプライマーとして P C R し、 yCLuc の大部分を上流に持つ L E U 2 マーカーを増幅した。 RAK10635 の U R A 3 マーカーをこの L E U 2 マーカーを用いて置換し、 ura3 0:: ScRPS25A-600-yCLuc-LEU2 を構築した ( RAK12003 ) 。この酵母株から染色体を調製し、これをテンプレートとして、 ScGAL10p-40(40)-RPS25A-327 ( 配列番号 2 8 ) と URA3-280c ( 配列番号 2 1 ) をプライマーに用いて P C R を行い、 GAL10p-40(40)-RPS25A(-327\_-1)-yCLuc-LEU2-URA3-3' を増幅した。この D N A 断片を RAK4315 株 ( ura3 0::GAL10p-URA3 ) に上記の方法で導入し S D - L e u 寒天培地 ( 0 . 1 7 % Yeast Nitrogen Base、 0 . 5 % 硫酸アンモニウム、 2 % グルコース、 0 . 0 0 3 % adenine sulfate、 0 . 0 1 % Uracil、 0 . 0 1 % L-Histidine HCl、 0 . 0 1 % L-Lysine HCl、 0 . 0 1 % L-Methionene、 0 . 0 1 % L-Tryptphan、 2 % 寒天末 ) で増殖した株を選択して形質転換体を得た。得られた形質転換体は ura3 0::GAL10p-RPS25A(-327\_-1)-yCLuc-LEU2 の遺伝子型を持つ。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 9 】

( G A L 1 0 プロモーター配列 - y C L u c 株の構築 )

コントロールとして、GAL10p-yCLuc-LEU2をURA3 0に挿入した株を次のように構築した。RAK12003株の染色体をテンプレートにGAL10p40-yCLuc+1 ( 配列番号 2 9 ) とURA3-280c ( 配列番号 2 1 ) をプライマーに用いてP C R し、ScGAL10-40(40)-yCLuc -LEU2-URA3-3 ' を増幅した。これをRAK4315 ( ura3 0::GAL10p-URA3 ) に導入してSD-Leu寒天培地を用いて形質転換体を得た。得られた形質転換体はura3 0::GAL10p-yCLuc-LEU2の遺伝子型を持つ。

## 【 0 0 5 0 】

( ルシフェラーゼ活性の測定方法 )

2 4 - w e l l マルチウェルプレートの各ウェルにY P D 液体培地を1 m l 入れ、上記で作製したura3 0::GAL10p-RPS25A(-327\_-1)-yCLuc-LEU2、ura3 0::GAL10p-yCLuc-LEU2の遺伝子型を持つ形質転換体、及び実施例1で作製したura3 0::TDH3p-RPS25A(-327\_-1)-yCLuc-URA3、ura3 0::TDH3p-yCLuc-URA3の遺伝子型を持つ形質転換体を植菌し、2 8、1 5 0 r p m で2 4 時間培養した。得られた培養液1 0 μ l を、非誘導条件のY P D 培地又は誘導条件(ガラクトース条件)のY P G a l 液体培地(1%酵母エキス、2%ペプトン、2%ガラクトース)1 m l を入れた2 4 - w e l l マルチウェルプレートの各ウェルに植菌した。これを2 8、1 5 0 r p m で2 4 時間培養した。培養液の6 0 0 n m の濁度( O D<sub>600</sub> ) を分光光度計で測定し、上記と同様の方法でプロモーターの発現能力を評価した。

## 【 0 0 5 1 】

結果を図2に示す。図2に示すように、ガラクトース条件において、G A L 1 0 プロモーター配列のみを用いた場合と比較して、G A L 1 0 プロモーター配列とP R S 2 5 A のイントロン配列を用いた場合には1 1 倍も高い発現能力を有することが明らかとなった。さらに、G A L 1 0 プロモーターとP R S 2 5 A のイントロン配列を用いた場合でも、グルコース培地では発現が抑制され、ガラクトース培地で発現が1 2 5 5 倍向上していた。G A L 1 0 プロモーター配列のみを用いた場合の誘導倍率が1 5 0 倍程度であることを考えると、G A L 1 0 プロモーター配列とP R S 2 5 A のイントロン配列を用いた場合には非常にガラクトース誘導性が高いことが明らかとなった。

## 【 0 0 5 2 】

さらに、極めて高い発現能力を有するT D H 3 プロモーター配列とP R S 2 5 A のイントロン配列を用いた場合と比較しても7 0 % 近くもの発現能力を有しており、G A L 1 0 プロモーター配列とP R S 2 5 A のイントロン配列を用いると、誘導性及び発現能力が高いプロモーターとなることが明らかとなった。

## 【 実施例 3 】

## 【 0 0 5 3 】

[ T D H 3 プロモーター配列 - 長さの異なる R P S 2 5 A プロモーター - y C L u c 株の構築 ]

RAK10635の染色体D N A をテンプレートとし、ScTDH3(-40~-1)-RPS25Ap-500 ( 配列番号 3 0 ) とURA3-280c ( 配列番号 2 1 )、ScTDH3p-40(40)-RPS25Ap-450 ( 配列番号 3 1 ) とURA3-280c ( 配列番号 2 1 )、又は、ScTDH3p-40(40)-RPS25Ap-400 ( 配列番号 3 2 ) とURA3-280c ( 配列番号 2 1 ) の組合せでP C R を行い、それぞれ、ScTDH3p(40)-ScRPS25A(-500~-1)-yCLuc-URA3、ScTDH3p(40)-ScRPS25A(-450~-1)-yCLuc-URA3、ScTDH3p(40)-ScRPS25A(-400~-1)-yCLuc-URA3のD N A 断片を増幅した。それぞれのD N A 断片をRAK5125に上記記載の方法で導入し、それぞれ、ura3 0::ScTDH3p-ScRPS25A(-500~-1)-yCLuc-URA3、ura3 0::ScTDH3p-ScRPS25A(-450~-1)-yCLuc-URA3、ura3 0::ScTDH3p-ScRPS25A(-400~-1)-yCLuc-URA3の遺伝子型を持つ形質転換体を得た。

## 【 0 0 5 4 】

得られた形質転換体は、T D H 3 プロモーター下流に、イントロンを含み長さの異なるR P S 2 5 A プロモーター配列( R P S 2 5 A の - 5 0 0 から - 3 2 8 ( 配列番号 3 3 )

10

20

30

40

50

とRPS25Aのイントロン配列である-327から-1(配列番号2)、RPS25Aの-450から-328(配列番号34)とRPS25Aの-327から-1(配列番号2)、又は、RPS25Aの-400から-328(配列番号35)とRPS25Aの-327から-1(配列番号2)を持つ。これらの形質転換体、及び実施例1で作製したura3 0::TDH3p-yCLuc-URA3の遺伝子型を持つ形質転換体を上記と同様の方法で培養し、ルシフェラーゼ活性測定、及び培養液の濁度測定を行い、発現能力を評価した。

【0055】

結果を図3に示す。図3に示すように、TDH3プロモーター配列と、RPS25Aイントロン配列の間にRPS25Aイントロン配列の上流の配列を173塩基対、123塩基対、73塩基対含む場合においても、TDH3プロモーター配列のみを用いた場合と比較して、37倍、24倍、27倍高い発現能力を示すことが明らかとなった。また、TDH3プロモーター配列と、RPS25Aイントロン配列とが直接つながっていれば、TDH3プロモーター配列のみを用いた場合と比較して、103倍も高い発現能力を示すことが明らかとなった。すなわち、TDH3プロモーターとRPS25Aイントロン配列の間にRPS25Aイントロン配列の上流の配列の一部を含んでいても高い発現能力を示すが、TDH3プロモーター配列と、RPS25Aイントロン配列とが直接つながっているほうが、より高い発現能力を有することが明らかとなった。

10

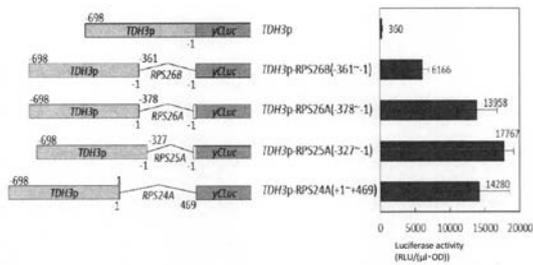
【産業上の利用可能性】

【0056】

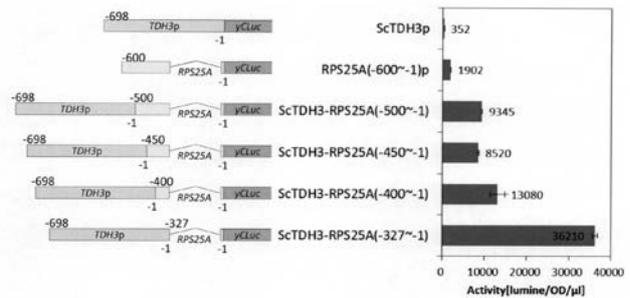
本発明のプロモーターは高発現能力を有することから、酵素や、ワクチン、抗体などのタンパク質生産分野において利用可能である。また、キシロースやセルロースからのエタノール生産の分野にも応用することが可能である。さらに、酵母自身の配列を使用しており、セルフクロニングであることから、安全性が高く、食品分野でも利用可能である。

20

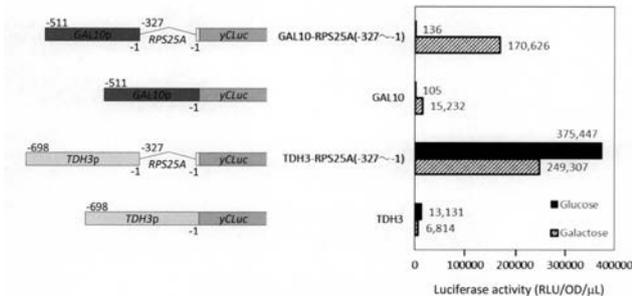
【図1】



【図3】



【図2】



【配列表】

2016021149000001.app

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/JP2015/003793
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N15/09(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)n  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, C12N1/19, C12P21/02  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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Masaki KONDO et al., "Enhanced protein production by using intron sequences in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", Abstracts of the 66th Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan [online], 05 August 2014 (05.08.2014), [retrieved on 25 September 2015 (25.09.2015)], Retrieved from the Internet: <URL:http://ci.nii.ac.jp/naid/110009906091>, page 19, 1P-010	1-4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 28 September 2015 (28.09.15)		Date of mailing of the international search report 06 October 2015 (06.10.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/003793

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Masaki KONDO et al., "Saccharomyces cerevisiae ni Okeru Intron Hairetsu o Riyo shita Tanpakushitsu no Kohatsugen", 2014 Nendo Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry Taikai Koen Yoshishu [online], 05 March 2014 (05.03.2014), [retrieved on 25 September 2015 (25.09.2015)], Retrieved from the Internet:<URL:http://www.jsbba.or.jp/MeetingofJSBBA/2014/MeetingofJSBBA2014.pdf>, 3A13p05	1-4
A	GOFFEAU A et al., Definition: TPA_inf: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome V, complete sequence, Database GenBank [online], Accession No.BK006939, 2014.07.29, [retrieved on 2015.09.28], Retrieved from the Internet: <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/329138879?sat=18&satkey=15166794>	1-4
A	JUNEAU K et al., High-density yeast-tiling array reveals previously undiscovered introns and extensive regulation of meiotic splicing, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [online], 2007.01.23, [retrieved on 2015.09.28], Retrieved from the Internet:<URL:http://www.pnas.org/content/104/5/1522.long>, <doi:10.1073/pnas.0610354104>, Vol.104, p.1522-1527 & Supporting Information	1-4
A	NIEUWINT RTM et al., The gene for yeast ribosomal protein S31 contains an intron in the leader sequence, Current Genetics, 1985, Vol.10, p.1-5	1-4
A	JUNEAU K et al., Introns regulate RNA and protein abundance in yeast, Genetics [online], 2006.07.02, [retrieved on 2015.09.28], Retrieved from the Internet:<URL:http://www.genetics.org/content/174/1/511.long>, <doi:10.1534/genetics.106.058560>, Vol.174, p.511-518	1-4

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 0 3 7 9 3									
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, C12P21/02(2006.01)n											
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, C12P21/02											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq											
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									
PX	近藤真樹 ほか, 酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> におけるイントロン配列を利用したタンパク質の高発現, 第66回日本生物工学会大会講演要旨集 [online], 2014.08.05, [retrieved on 2015.09.25], Retrieved from the Internet:<URL: <a href="http://ci.nii.ac.jp/naid/110009906091">http://ci.nii.ac.jp/naid/110009906091</a> >, p. 19, 1P-010	1-4									
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 28.09.2015		国際調査報告の発送日 06.10.2015									
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) 北田 祐介	4 N 4 8 6 8								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3488								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 0 3 7 9 3
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
A	近藤真樹 ほか, Saccharomyces cerevisiae におけるイントロン配列を利用したタンパク質の高発現, 2014 年度日本農芸化学会大会講演要旨集 [online], 2014.03.05, [retrieved on 2015.09.25], Retrieved from the Internet:<URL: <a href="http://www.jsbba.or.jp/MeetingofJSBBA/2014/MeetingofJSBBA2014.pdf">http://www.jsbba.or.jp/MeetingofJSBBA/2014/MeetingofJSBBA2014.pdf</a> >, 3A13p05	1-4
A	GOFFEAU A et al., Definition: TPA_inf: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome V, complete sequence, Database GenBank [online], Accession No. BK006939, 2014.07.29, [retrieved on 2015.09.28], Retrieved from the Internet:<URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/329138879?sat=18&amp;satkey=15166794">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/329138879?sat=18&amp;satkey=15166794</a> >	1-4
A	JUNEAU K et al., High-density yeast-tiling array reveals previously undiscovered introns and extensive regulation of meiotic splicing, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [online], 2007.01.23, [retrieved on 2015.09.28], Retrieved from the Internet:<URL: <a href="http://www.pnas.org/content/104/5/1522.long">http://www.pnas.org/content/104/5/1522.long</a> >, <doi:10.1073/pnas.0610354104>, Vol.104, p.1522-1527 & Supporting Information	1-4
A	NIEUWINT RTM et al., The gene for yeast ribosomal protein S31 contains an intron in the leader sequence, Current Genetics, 1985, Vol.10, p.1-5	1-4
A	JUNEAU K et al., Introns regulate RNA and protein abundance in yeast, Genetics [online], 2006.07.02, [retrieved on 2015.09.28], Retrieved from the Internet:<URL: <a href="http://www.genetics.org/content/174/1/511.long">http://www.genetics.org/content/174/1/511.long</a> >, <doi:10.1534/genetics.106.058560>, Vol.174, p.511-518	1-4

## フロントページの続き

(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

(出願人による申告) 平成23年度、独立行政法人科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業 先端的低炭素化技術開発(A L C A) 「低炭素化に資する発酵微生物のゲノム育種およびゲノム工学的「耐熱化」」受託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(74) 代理人 100141391  
弁理士 園元 修一

(74) 代理人 100198074  
弁理士 山村 昭裕

(72) 発明者 星田 尚司  
山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内

(72) 発明者 赤田 倫治  
山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内

Fターム(参考) 4B065 AA80X AA80Y

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。