

明 細 書

発明の名称： E n o 1 遺伝子のプロモーター

技術分野

[0001] 本発明は、E n o 1 遺伝子のプロモーターを有する外来遺伝子発現ベクターを用いることによって得られた、外来蛋白質の転写活性が増強された哺乳動物形質転換細胞、及びこれを用いた該外来蛋白質の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 遺伝子組換え技術の発展によって、治療用蛋白質や抗体医薬といった蛋白質性医薬品が急速にその市場を拡大している。中でも、抗体医薬は人体に投与しても有害な免疫反応を引き起こすリスクが低いとされ、その特異性の高さから開発が盛んに進められている。

[0003] 抗体医薬に代表される蛋白質性医薬を生産させる宿主としては、微生物や酵母、動植物細胞、昆虫、トランスジェニック動植物等を挙げることができる。蛋白質性医薬の生理活性や抗原性には、正しいフォールディングや糖鎖修飾などの翻訳後修飾が必須であることが多いため、糖鎖修飾を行うことができない微生物や糖鎖構造の大きく異なる植物は宿主として不適である。ヒトと類似した糖鎖構造を有し、翻訳後修飾が可能、さらには多くの使用実績から安全性の面で懸念がないCHO (Chinese Hamster Ovary: チャイニーズハムスターの卵巣) 細胞等の哺乳動物培養細胞が現在の主流となっている。

[0004] 哺乳動物培養細胞を宿主とする場合、微生物等と比較して、増殖速度の低さ、生産性の低さ、高価なコスト等の問題を抱えている（非特許文献1）。また、抗体医薬品を臨床で利用するためには大量の投与が必要となるため、世界的にもその生産能力の不足が問題となっている。哺乳類培養細胞発現系で蛋白質性医薬品を製造する場合、合成低分子医薬品に比べて製造コストが高いため、各製造工程の改良によって製造コストの低減が図られているが、哺乳類培養細胞発現系における生産量の向上も製造コスト低減の有力な方法

である（非特許文献2、3）。そこで、哺乳動物培養細胞における外来蛋白質の生産性を向上させるため、これまでに、プロモーターやエンハンサー、薬剤選択マーカー、遺伝子増幅、培養工学的手法等多くのアプローチが試行錯誤されてきている。

[0005] CHO細胞を宿主細胞として用いる場合、外来遺伝子の発現、すなわち蛋白質性医薬品の生産にはウイルス由来のHuman cytomegalovirus major immediate early promoter（以下CMVプロモーター）が一般的に用いられている（非特許文献4、5、6）。また、CHO細胞において、elongation factor-1 alphaであるEF1 α （特許文献1、非特許文献7）、ヒトリボソーム蛋白質遺伝子であるRPL32やRPS11の転写開始点の上流域のポリヌクレオチド（プロモーター領域）を単独または他の異種プロモーターと組み合わせて蛋白質発現に使用できることが知られている（非特許文献8、特許文献2、3）。哺乳動物細胞において、外来蛋白質の生産性を向上させたヒートショックプロテインA5（Hspa5／GRP78）遺伝子及びヒートショックプロテインA8（Hspa8）のプロモーターが知られている（特許文献4、5）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第3051411号

特許文献2：国際公報第2006／123097号

特許文献3：国際公報第2013／080934号

特許文献4：国際公報第2018／066492号

特許文献5：国際公報第2020／032153号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Florian M. Wurm., Nat. Biotechnol. 22 (11) : 1393-1398, 2004

非特許文献2：Farid SS., J Chromatogr B An

alyt Technol Biomed Life Sci. 848 (1) : 8-18, 2007

非特許文献3: Werner RG. Economic aspects of commercial manufacture of biopharmaceuticals. J Biotechnol. 113 (1-3) : 171-182, 2004

非特許文献4: Durocher Y et al., Curr Opin Biotechnol. 20 (6) : 700-707, 2009

非特許文献5: Boshart M et al., Cell. 41 (2) : 521-530, 1985

非特許文献6: Foecking MK et al., Gene. 45 (1) : 101-105, 1986

非特許文献7: Deer JR. and Allison DS., Biotechnol. Prog. 20: 880-889, 2004

非特許文献8: Hoeksema F. et al., Biotechnology Research International, Volume 2011, Article ID 492875, 11 pages

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の課題は、哺乳動物培養細胞等の宿主細胞において高い外来遺伝子発現亢進活性を有するプロモーターを提供すること、及び、当該プロモーターを用いて蛋白質性医薬品となる外来蛋白質の生産量を亢進させる手段を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 上記課題解決のため、本発明は以下の[1] - [34]を提供する。

[1] チャイニーズハムスター由来の遺伝子のプロモーターであって、

配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13及び配列番号14から選択されるか、又は、

それらの配列と少なくとも 85%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなる、ポリヌクレオチド。

[2] 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 10、配列番号 11、及び配列番号 12 から選択されるか、又は

それらの配列と少なくとも 85%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなる、

[1] のポリヌクレオチド。

[2a] 配列番号 18 のヌクレオチド配列、又は、該配列と少なくとも 85%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、[1] 又は [2] のポリヌクレオチド。

[3] 配列番号 1 のヌクレオチド配列と少なくとも 99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、[1] のポリヌクレオチド。

[4] 配列番号 3 のヌクレオチド配列と少なくとも 99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、[1] のポリヌクレオチド。

[5] 配列番号 4 のヌクレオチド配列と少なくとも 99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、[1] のポリヌクレオチド。

[6] 配列番号 10 のヌクレオチド配列と少なくとも 99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、[1] のポリヌクレオチド。

[7] 配列番号 11 のヌクレオチド配列と少なくとも 99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、[1] のポリヌクレオチド。

[8] 配列番号 12 のヌクレオチド配列と少なくとも 99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、[1] のポリヌクレオチド。

[9] 配列番号 13 のヌクレオチド配列と少なくとも 99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、[1] のポリヌクレオチド。

[10] 配列番号 14 のヌクレオチド配列と少なくとも 99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、[1] のポリヌクレオチド。

[10a] チャイニーズハムスター由来の遺伝子のプロモーターであって

、配列番号 18 のヌクレオチド配列、又は、該配列と少なくとも 85 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、ポリヌクレオチド。

[10b] 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択されるか、又は、

それらの配列と少なくとも 85 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなる、

[10a] のポリヌクレオチド。

[0010] [11] マウス由来の遺伝子のプロモーターであって、

配列番号 2、配列番号 17、及び配列番号 16 から選択されるか、又は、

それらの配列と少なくとも 85 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなる、

ポリヌクレオチド。

[11a] 配列番号 18 のヌクレオチド配列と少なくとも 85 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、[11] のポリヌクレオチド。

[12] 配列番号 2 のヌクレオチド配列と少なくとも 99 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、[11] のポリヌクレオチド。

[13] 配列番号 17 のヌクレオチド配列と少なくとも 99 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、[11] のポリヌクレオチド。

[14] 配列番号 16 のヌクレオチド配列と少なくとも 99 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、[11] のポリヌクレオチド。

[14a] マウス由来の遺伝子のプロモーターであって、配列番号 18 のヌクレオチド配列と少なくとも 85 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、ポリヌクレオチド。

[14b] 配列番号 2、配列番号 17、及び配列番号 16 から選択されるか、又は、

それらの配列と少なくとも 85 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなる、

[14a] のポリヌクレオチド。

[0011] [15] [1] 又は [11] の配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 2、配列番号 17、又は配列番号 16 のヌクレオチド配列に対して 90% 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなり、プロモーター活性を有する、ポリヌクレオチド。

[16] [1] 又は [11] に配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 2、配列番号 17、又は配列番号 16 のヌクレオチド配列に対して 95% 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなり、プロモーター活性を有する、ポリヌクレオチド。

[17] [1] 又は [11] の配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 2、配列番号 17、又は配列番号 16 のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、プロモーター活性を有する、ポリヌクレオチド。

[17a] 長さが、1 kbp 以上 10 kbp 以下、2 kbp 以上 6 kbp 以下、2.6 kbp 以上 5 kbp 以下、2.7 kbp 以上 4.5 kbp 以下、2.8 kbp 以上 4 kbp 以下である、[1] - [17] のいずれかのポリヌクレオチド。

[18] [1] - [17] 及び [17a] のいずれかのポリヌクレオチド及び外来遺伝子を含む、ポリヌクレオチド。

[0012] [19] [1] - [18] 及び [17a] のいずれかのポリヌクレオチド

及び外来遺伝子を含む、外来遺伝子発現ユニット。

〔19a〕 転写ターミネーター領域をさらに含む、〔19〕の外来遺伝子発現ユニット。

〔20〕 外来遺伝子が、蛋白質をコードする遺伝子である、〔19〕又は〔19a〕の外来遺伝子発現ユニット。

〔21〕 外来遺伝子がヘテロ多量体蛋白質をコードする遺伝子である、〔20〕の外来遺伝子発現ユニット。

〔22〕 外来遺伝子が抗体又はその抗原結合性断片をコードする遺伝子である、〔21〕の外来遺伝子発現ユニット。

〔23〕 〔19〕－〔22〕及び〔19a〕のいずれかの外来遺伝子発現ユニットを含む、外来遺伝子発現ベクター。

〔24〕 〔19〕－〔22〕及び〔19a〕のいずれかの外来遺伝子発現ユニットと、

下記（a）～（e）から選択されるいずれか一つ以上のポリヌクレオチドと、を含む外来遺伝子発現ベクター；

（a）配列番号5のヌクレオチド配列、又はその部分配列、

（b）配列番号6のヌクレオチド配列、又はその部分配列、

（c）配列番号7のヌクレオチド配列、又はその部分配列、

（d）配列番号5、配列番号6、又は配列番号7のヌクレオチド配列に対して80％以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなり、外来遺伝子発現亢進活性を有する、ポリヌクレオチド、

（e）配列番号5、配列番号6、又は配列番号7のヌクレオチド配列に対して85％以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなり、外来遺伝子発現亢進活性を有するポリヌクレオチド。

〔24a〕 〔19〕－〔22〕及び〔19a〕のいずれかの外来遺伝子発現ユニットと、下記（b）又は（d）のポリヌクレオチドと、を含む外来遺

伝子発現ベクター；

(b) 配列番号6のヌクレオチド配列、又はその部分配列、

(d) 配列番号6のヌクレオチド配列に対して80%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなり、外来遺伝子発現亢進活性を有する、ポリヌクレオチド。

[25] [23]、[24]又は[24a]に記載の外来遺伝子発現ベクターが導入された形質転換細胞。

[26] 哺乳動物由来の培養細胞である、[24]の形質転換細胞。

[27] COS-1細胞、293細胞、又はCHO細胞である、[25]の形質転換細胞。

[0013] [28] [25] - [27]のいずれかの形質転換細胞を培養し、培養物から外来遺伝子由来の蛋白質を取得することを特徴とする、該蛋白質の製造方法。

[29] 外来遺伝子由来の蛋白質が、単量体蛋白質又は多量体蛋白質である、[28]に記載の製造方法。

[30] 多量体蛋白質が、ヘテロ多量体蛋白質である、[29]に記載の製造方法。

[31] ヘテロ多量体蛋白質が、抗体蛋白質である、[30]に記載の製造方法。

[31a] 形質転換細胞の培養が流加培養である、[28] - [31]のいずれかの製造方法。

[31b] 形質転換細胞が6日以上培養される、[28] - [31]及び[31a]のいずれかの製造方法。

[0014] [32] 形質転換細胞において外来遺伝子を発現させるための、[1] - [18]のいずれかのポリヌクレオチドの使用。

[33] 形質転換細胞において外来遺伝子を発現させることを目的とする、[23]又は[24]の外来遺伝子発現ベクターの使用。

[0015] [34] [23]、[24]又は[24a]の外来遺伝子ベクターを遺伝子

導入することによって、外来遺伝子を発現する形質転換細胞を製造する方法。

発明の効果

[0016] 本発明により、哺乳動物培養細胞等の宿主細胞において高い外来遺伝子発現亢進活性を有するプロモーター、及び、当該プロモーターを用いて蛋白質性医薬品となる外来蛋白質の生産量を亢進させる手段が提供される。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]抗体H鎖（HC）およびL鎖（LC）遺伝子のプロモーターとしてEno1遺伝子、あるいは、ヒトEF1 α 遺伝子由来のプロモーターを用いた、ヒト化抗体遺伝子Y発現ベクターpDSLH3.1-Eno1-Y、および、pDSLH3.1-hEF1 α -Yの概略図。

[図2-A]ヒト化抗体Y発現ステーブルプールを用いた流加培養にて、チャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子プロモーターにより発現された抗体生産量を、ヒトEF1 α 遺伝子プロモーターと比較した図。図2-Aは、縦軸に各サンプリング日における生細胞数を示す。hEF1 α は、ヒトEF1 α 遺伝子プロモーターを示し、Eno1は、チャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子プロモーターを示す（図2-Bにおいても同様とする）。

[図2-B]ヒト化抗体Y発現ステーブルプールを用いた流加培養にて、チャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子プロモーターにより発現された抗体生産量を、ヒトEF1 α 遺伝子プロモーターと比較した図。図2-Bは、縦軸に各サンプリング日における生産量を示す。

[図3]チャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子の開始コドンから上流約5.0kbpから2.5kbpの領域をプロモーターとして使用して一過性発現させたホタルルシフェラーゼ発現量を各鎖長で比較した図。縦軸は、pGL4.10上のFirefly由来ルシフェラーゼの発光量をpGL4.74上のRenilla由来ルシフェラーゼの発光量で割った値を示す。図中、チャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子の開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドから上流約5.0kbpまで（配列番

号10)、同約4.5kbpまで(配列番号11)、同約4.0kbpまで(配列番号4)、同約3.5kbpまで(配列番号12)、同約3.0kbpまで(配列番号1)、同約2.8kbpまで(配列番号3)、同約2.7kbpまで(配列番号13)、同約2.6kbpまで(配列番号14)、同約2.5kbpまで(配列番号15)の各領域を、それぞれ、Eno1 5k、Eno1 4.5k、Eno1 4k、Eno1 3.5k、Eno1 3.0k、Eno1 2.8k、Eno1 2.7k、Eno1 2.6k、Eno1 2.5kと表記した。

[図4-A]各生物種由来Eno1遺伝子プロモーターを使用して作製したヒト化抗体Y発現ステーブルプールの流加培養にて、抗体生産量を比較した図。Eno1、mEno1は、それぞれチャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子プロモーター、マウス由来Eno1遺伝子プロモーターの結果を示す。図4-Aは、縦軸に各サンプリング日における生細胞数を示す。図中、チャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子の開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドから上流約4.0kbpまで(配列番号4)、同約3.5kbpまで(配列番号12)、同約3.0kbpまで(配列番号1)、同約2.8kbpまで(配列番号3)の各領域を、それぞれ、Eno1 4k、Eno1 3.5k、Eno1 3k、Eno1 2.8kと表記した。マウス由来Eno1遺伝子の開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドから上流約4.0kbpまで(配列番号16)、同約3.5kbpまで(配列番号17)、同約3.0kbpまで(配列番号2)の各領域を、それぞれ、mEno1 4k、mEno1 3.5k、mEno1 3kと表記した(図4-Bにおいても同様とする)。

[図4-B]各生物種由来Eno1遺伝子プロモーターを使用して作製したヒト化抗体Y発現ステーブルプールの流加培養にて、抗体生産量を比較した図。Eno1、mEno1は、それぞれチャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子プロモーター、マウス由来Eno1遺伝子プロモーターの結果を示す。図4-Bは、縦軸に各サンプリング日における生産量を示す。

[図5-A]各生物種由来E n o 1 遺伝子プロモーターとDNAエレメントA 7を組み合わせ使用して作製したヒト化抗体Y発現ステーブルプールの流加培養にて、抗体生産量を比較した図。E n o 1、mE n o 1は、それぞれチャイニーズハムスター由来E n o 1 遺伝子プロモーター、マウス由来E n o 1 遺伝子プロモーターの結果を示す。図5-Aは、縦軸に各サンプリング日における生細胞数を示す。図中、各E n o 1 遺伝子プロモーターは図4-Aと同様に表記し、DNAエレメントA 7と組み合わせした場合A 7 (+)、A 7が無い場合A 7 (-)と表記した(図5-Bも同様とする)。

[図5-B]各生物種由来E n o 1 遺伝子プロモーターとDNAエレメントA 7を組み合わせ使用して作製したヒト化抗体Y発現ステーブルプールの流加培養にて、抗体生産量を比較した図。図5-Bは、縦軸に各サンプリング日における生産量を示す。

[図6]配列表

発明を実施するための形態

[0018] 以下、本発明を実施するための好適な形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

[0019] 本明細書において、「遺伝子」とは、mRNAに転写され、蛋白質に翻訳される部分を意味し、DNAのみならずそのmRNA、cDNA及びそのRNAも含まれるものとする。

本明細書において、「ポリヌクレオチド」とは核酸と同じ意味で用いており、DNA、RNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれている。

本明細書において、「ポリペプチド」と「蛋白質」は区別せずに用いている。

本明細書において、「遺伝子発現」とは、ある遺伝子がmRNAに転写される現象、及び／又は該mRNAから蛋白質が翻訳される現象を意味している。

本明細書において、「外来遺伝子」とは、人工的に宿主細胞に導入される遺伝子を意味している。

本明細書において、「外来蛋白質」とは、外来遺伝子にコードされる蛋白質を意味している。

本明細書において、「遺伝子発現ユニット」とは、転写の読み枠の方向に、少なくともプロモーター領域、外来遺伝子、転写ターミネーター領域（ポリA付加シグナル）を有するポリヌクレオチドを意味している。

本明細書において、「プロモーター」とは、DNAからRNAへの転写の開始に関与する転写因子が結合する領域を意味する。本明細書においては、「プロモーター領域」ということもある。プロモーターとして、例えば、開始コドンの上流約3 kbpのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列直前のヌクレオチドまでのポリヌクレオチドを例示でき、5' UTR、及びイントロンを含んでもよい。

本明細書において、「プロモーター活性」とは、転写因子がプロモーターに結合し、転写を開始し、遺伝子にコードされる蛋白質の生産を行う活性をいい、ホタルルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子にコードされる蛋白質の活性を指標として検定することが可能である。

本明細書において、「プロモーター活性を有する」とは、後記（実施例2）に記載の流加培養での抗体発現量を指標としたプロモーター活性の評価と同様の条件で、抗体発現を認める、又は、後記（実施例3）に記載の方法と同様の条件で、ホタルルシフェラーゼが活性を示すことをいう。

本明細書中において、「DNAエレメント」とは、遺伝子発現ユニットの近傍に配置された場合、又は、遺伝子発現ユニットが含まれる外来遺伝子発現ベクター上に配置された場合に、外来遺伝子発現亢進活性を有するポリヌクレオチドを意味する。

本明細書中において、「抗体の抗原結合性断片」とは、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味しており、Fab、F(ab')₂等を含むが、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。

本明細書中において、「配列同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定される、2つ以上のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の、配列間の関係をいう。当該分野において、「配列同一性」は、場合に依りて、一列の2つ以上のヌクレオチド配列間または2つ以上のアミノ酸配列間の一致によって決定したときの、核酸分子間またはポリペプチド間の配列関連性の程度を意味する。「配列同一性」は、2つ以上の配列のうち小さなものと、特定の数理的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によってアドレス指定されるギャップアラインメント（存在する場合）との間の同一一致のパーセントを算出することにより評価することができる。具体的には、European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) が提供する ClustalW2 等のソフトを使用することにより評価することができるが、当業者において使用されるものであればこれに限定されない。

本明細書中において、「ストリンジントな条件でハイブリダイズする」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、ある核酸に対する配列同一性が80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、最も好ましくは99%以上のヌクレオチド配列からなる核酸の相補鎖がハイブリダイズし、それより配列同一性が低いヌクレオチド配列からなる核酸の相補鎖がハイブリダイズしない条件を挙げることができる。より具体的には、市販のハイブリダイゼーション溶液 ExpressHyb Hybridization Solution（クロンテック社製）中、68℃でハイブリダイズすること、又は、DNAを固定したフィルターを用いて0.7乃至1.0MのNaCl存在下68℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1乃至2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度SSCとは150 mM NaCl、15 mM クエン酸ナトリウムからなる）を用い、68℃で洗浄する条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることを意味する。

[0020] 本明細書において、「約」とは、基準値に対してプラス又はマイナスそれぞれ10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%又は1%まで変動する値を示す。好ましくは、「約」という用語は、基準値に対してプラス又はマイナスそれぞれ10%、5%、又は1%の範囲を示す。

[0021] 1. 外来遺伝子の発現亢進に使用されるプロモーター

本発明の外来遺伝子の発現亢進に使用されるプロモーター（以下、「本発明のプロモーター」ということもある）は、 α -エノラーゼ（ α -e n o l a s e）（以下、「E n o 1」という）遺伝子のプロモーターである。

[0022] E n o 1 遺伝子のプロモーターの由来は、特に限定されないが、哺乳類由来であってもよく、例えばチャイニーズハムスター、ヒト、マウス等由来のE n o 1 遺伝子のプロモーターを挙げることができる。本発明のプロモーターは、好適にはげっ歯類由来のE n o 1 遺伝子のプロモーターであり、さらに好適にはチャイニーズハムスターあるいはマウス由来のE n o 1 遺伝子のプロモーターである。さらにより好適にはチャイニーズハムスター由来のE n o 1 遺伝子のプロモーターである。

[0023] チャイニーズハムスター由来E n o 1 遺伝子のプロモーターとしては、E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流例えば2.0 k b p、2.5 k b p、2.6 k b p、2.7 k b p、2.8 k b p、3.0 k b p、3.5 k b p、4.0 k b p、4.5 k b p、5.0 k b p、5.5 k b p、6.0 k b pのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドを含んでなる配列が例示される。

チャイニーズハムスター由来E n o 1 遺伝子のプロモーターとして、より具体的には、配列番号1, 3, 4, 10, 11, 12, 13, 14のポリヌクレオチドが例示される。

配列番号1のヌクレオチド配列は、チャイニーズハムスター由来E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流約3.0 k b pのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドからなる配列である。

配列番号 3 のヌクレオチド配列は、チャイニーズハムスター由来 E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流約 2. 8 k b p のヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドからなる配列である。

配列番号 4 のヌクレオチド配列は、チャイニーズハムスター由来 E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流約 4. 0 k b p のヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドからなる配列である。

配列番号 10 のヌクレオチド配列は、チャイニーズハムスター由来 E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流約 5. 0 k b p のヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドからなる配列である。

配列番号 11 のヌクレオチド配列は、チャイニーズハムスター由来 E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流約 4. 5 k b p のヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドからなる配列である。

配列番号 12 のヌクレオチド配列は、チャイニーズハムスター由来 E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流約 3. 5 k b p のヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドからなる配列である。

配列番号 13 のヌクレオチド配列は、チャイニーズハムスター由来 E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流約 2. 7 k b p のヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドからなる配列である。

配列番号 14 のヌクレオチド配列は、チャイニーズハムスター由来 E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流約 2. 6 k b p のヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドからなる配列である。

[0024] E n o 1 遺伝子のプロモーターは、その優位な転写活性のために、開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドから開始コドン配列の上流約 2. 8 k b p の長さあるいはそれよりも長い領域とされ得る。したがって、優位なプロモーター活性の観点から、チャイニーズハムスター由来 E n o 1 遺伝子プロモーターは、配列番号 1, 3, 4, 10, 11, 12 のポリヌクレオチドとされることが好ましい。チャイニーズハムスター由来 E n o 1 遺伝子プロモーターは、より好ましくは、配列番号 1, 3, 4,

12のポリヌクレオチドが選択され、さらにより好ましくは、配列番号1, 3のポリヌクレオチドが選択され得る。

[0025] マウス由来Eno1遺伝子プロモーターとして、Eno1遺伝子の開始コドンの上流例えば2.0 kbp、2.5 kbp、3.0 kbp、3.5 kbp、4.0 kbp、4.5 kbp、5.0 kbp、5.5 kbp、6.0 kbpのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドを含んでなる配列が例示される。

マウス由来Eno1遺伝子プロモーターとして、より具体的には、配列番号2, 17, 16のポリヌクレオチドが例示される。

配列番号2のヌクレオチド配列は、マウス由来Eno1遺伝子の開始コドンの上流約3.0 kbpのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドからなる配列である。

配列番号17のヌクレオチド配列は、マウス由来Eno1遺伝子の開始コドンの上流約3.5 kbpのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドからなる配列である。

配列番号16のヌクレオチド配列は、マウス由来Eno1遺伝子の開始コドンの上流約4.0 kbpのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドからなる配列である。

[0026] また、本発明のプロモーターは、配列番号1, 2, 17, 3, 4, 10, 11, 12, 13, 14, 16のいずれか一つのヌクレオチド配列に対して80%以上、好ましくは85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上であってもよく、より好ましくは90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上であってもよく、さらに好ましくは95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、最も好ましくは99%以上、100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなり、かつ、プロモーター活性を有するポリヌクレオチドであっても良い。

[0027] 部分配列は、配列番号1, 2, 17, 3, 4, 10, 11, 12, 13,

14, 16のいずれか一つのヌクレオチド配列の全長のうち80%以上、好ましくは85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上であつてもよく、より好ましくは90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上であつてもよく、さらに好ましくは95%以上、96%以上、97%以上、98%以上であつてもよく、最も好ましくは99%以上、100%の長さを有する断片であつてよい。部分配列は、全長の5'側（上流）あるいは3'側（下流）の断片であつてよく、全長のうち複数の領域をつなぎ合わせた断片であつてもよい。

[0028] 本発明のプロモーターは、配列番号1, 2, 17, 3, 4, 10, 11, 12, 13, 14, 16のいずれか一つのヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロモーター活性を有するポリヌクレオチドであつてもよい。

[0029] 本発明のプロモーターは、配列番号18のヌクレオチド配列、又は、該配列と少なくとも85%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでいることが好ましく、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上の同一性を有する配列を含んでいることがより好ましく、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上の同一性を有する配列を含んでいることが更に好ましく、99%以上の同一性を有する配列を含んでいることが特に好ましく、100%の同一性を有する配列を含んでいることが最も好ましい。

特にチャイニーズハムスター由来のEno1プロモーターは、配列番号18のヌクレオチド配列、又は、該配列と少なくとも85%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでいることが好ましく、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上の同一性を有する配列を含んでいることがより好ましく、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上の同一性を有する配列を含んでいることが更に好ましく、99%以上の同一性を有する配列を含んでいることが特に好ましく、100%の同一性を

有する配列を含んでいることが最も好ましい。

[0030] 本発明のプロモーターの長さは、1 k b p 以上 1 0 k b p 以下であれば特に限定されるものではなく、2 k b p 以上 6 k b p 以下であることが好ましく、2. 6 k b p 以上 5 k b p 以下であることがより好ましく、2. 7 k b p 以上 4. 5 k b p 以下であることがさらに好ましく、2. 8 k b p 以上 4 k b p 以下であることが特に好ましく、典型的には約 3 k b p とできる。プロモーターの性能を十分有するプロモーター長においては、短い方が遺伝子導入効率の点において効果を発揮しやすい。

[0031] 本発明のプロモーターは、配列番号 1, 2, 1 7, 3, 4, 1 0, 1 1, 1 2, 1 3, 1 4, 1 6 のいずれか一つのヌクレオチド配列において、1 又は複数、好ましくは 1 乃至 3 0 0 個、より好ましくは 1 乃至 2 0 0 個、さらに好ましくは 1 乃至 1 0 0 個、特に好ましくは 1 乃至 3 0 個のヌクレオチドが欠失、置換、及び／又は付加されたヌクレオチド配列からなる改変ポリヌクレオチドであって、かつプロモーター活性を有するポリヌクレオチドであってもよい。

[0032] 前記ヌクレオチド配列の改変（欠失、置換、及び／又は付加）の導入は、K u n k e l 法若しくは G a p p e d d u p l e x 法等の当該技術分野で公知の手法、又はこれに準ずる方法により行うことができ、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えば M u t a n t - K （タカラバイオ社製）若しくは M u t a n t - G （タカラバイオ社製）、タカラバイオ社の L A P C R i n v i t r o M u t a g e n e s i s シリーズキット等）が利用できる。このような改変ポリヌクレオチドも本発明のプロモーターとして使用することができる。

[0033] 本発明のプロモーターの有する外来遺伝子発現亢進活性は、ホタルルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子にコードされる蛋白質の活性、あるいは、流加培養での抗体生産量を指標として検定することが可能である。

本発明のプロモーターを含むベクターのレポーター遺伝子にコードされる蛋白質の活性（例えばホタルルシフェラーゼ発光量）がコントロールベクタ

一のレポーター遺伝子にコードされる蛋白質の活性（例えばウミシイタケルシフェラーゼ発光量）と比較して１倍以上、好ましくは２０倍以上、より好ましくは３０倍以上、さらに好ましくは４０倍以上、さらにより好ましくは４５倍以上、特に好ましくは５０倍以上の活性を示す場合、該プロモーターが外来遺伝子発現亢進活性を有すると判断することができる。

ヒトEF1 α プロモーターを使用した場合と本発明のプロモーターを使用した場合を比較して、流加培養での抗体生産量が同等以上、好ましくは１．２倍以上、より好ましくは１．３倍以上、さらに好ましくは１．５倍以上、特に好ましくは１．８倍、１．９倍あるいは２．０倍以上に上昇した場合、該プロモーターが外来遺伝子発現亢進活性を有すると判断することができる。１．２倍程度以上の亢進によっても、細胞の培養スケールの低減、培養時間、及び精製工程の短縮が期待され、結果として収量の向上と培養コストの低減が可能となる。収量が向上すれば、医薬としての外来蛋白質を安定して供給することが可能となる。また、培養コストが低減されれば、医薬としての外来蛋白質の原価が低減される。

[0034] ２． 外来遺伝子発現ユニット

本発明の外来遺伝子発現ユニット（以下、「本発明の遺伝子発現ユニット」ということもある）は、転写の読み枠の方向に、少なくとも前記１．に記載の本発明のプロモーター、外来遺伝子、及び転写ターミネーター領域（ポリA付加シグナル）を有するものである。

また、ポリA付加配列は、プロモーターからの転写に対して転写終結を起こす活性を有する配列であればよく、プロモーターの遺伝子と同じ又は異なる遺伝子のものであってもよい。

[0035] ３． 外来遺伝子の発現亢進に使用されるDNAエレメント

前記２．に記載の本発明の遺伝子発現ユニットにDNAエレメントを組み合わせて使用することにより、外来遺伝子の発現をさらに亢進することができる。組み合わせて使用するDNAエレメントは、アセチル化ヒストンH3との相互作用を指標として取得することが可能である。一般にヒストン（H

3、H4)のアセチル化は転写の活性化に関与しているといわれており、主に2つの説が考えられている。ヒストンテールがアセチル化することで電荷的に中和され、DNAとヒストンとの結合が緩くなるというヌクレオソームの立体構造変化が関係している説(Mellor J. (2006) Dynamic nucleosomes and gene transcription. Trends Genet. 22(6):320-329)と、様々な転写因子のリクルートに関与するという説(Nakatani Y. (2001) Histone acetylases—versatile players. Genes Cells. 6(2):79-86)である。いずれの説においても、ヒストンのアセチル化が転写活性化に関与している可能性は高く、抗アセチル化ヒストンH3抗体を用いたクロマチン免疫沈降(Chromatin Immunoprecipitation; ChIP)によって、アセチル化ヒストンH3と相互作用するDNAエレメントを濃縮することが可能である。

[0036] 本発明のプロモーターと組み合わせて使用する、外来遺伝子の発現亢進に使用されるDNAエレメントとして、A2、A7、及びA18を挙げることができる。DNAエレメントは、A7が好ましい。

A2はヒト15番染色体80966429～80974878に位置しており、AT含量62.2%、8450bpのポリヌクレオチドである。A2のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号5に記載されている。

A7はヒト11番染色体88992123～89000542に位置しており、AT含量64.52%、8420bpのポリヌクレオチドである。A7のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号6に記載されている。

A18は、ヒト4番染色体111275976～111284450に位置しており、AT含量62.54%、8475bpのポリヌクレオチドである。A18のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号7に記載されている。

[0037] 本発明のプロモーターと組み合わせて使用する、DNAエレメントの有する外来遺伝子発現亢進活性は、分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP

）等のレポーター遺伝子にコードされる蛋白質の活性を指標として検定することが可能である。

[0038] 本発明のプロモーターと組み合わせて使用する場合、前記DNAエレメントのいずれか1種を単独で使用しても良く、DNAエレメントの1種を2コピー以上使用しても良い。あるいは2種以上DNAエレメントを組み合わせて使用しても良い。

[0039] 本発明において使用されるDNAエレメントは、配列番号5乃至7のいずれか一つのヌクレオチド配列に対して80%以上、好ましくは85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、さらに好ましくは90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、より好ましくは95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、最も好ましくは99%以上、100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつ外来遺伝子発現亢進活性を有するヌクレオチド配列であっても良い。

[0040] 本発明において使用されるDNAエレメントは、配列番号5乃至7のいずれか一つのヌクレオチド配列において、1個又は複数、好ましくは1乃至1000個あるいは1乃至500個、より好ましくは1乃至100個あるいは1乃至50個、さらに好ましくは1乃至10個あるいは1乃至5個、特に好ましくは4個、3個、2個あるいは1個のヌクレオチドが欠失、置換、及び／又は付加されたヌクレオチド配列からなる改変ポリヌクレオチドであって、かつ外来遺伝子発現亢進活性を有するポリヌクレオチドであってもよい。

[0041] 前記ポリヌクレオチドの改変（欠失、置換、及び／又は付加）の導入は、Kunkel法若しくはGapped duplex法等の当該技術分野で公知の手法、又はこれに準ずる方法により行うことができ、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutant-K（タカラバイオ社製）若しくはMutant-G（タカラバイオ社製）、タカラバイオ社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキット等）が利用できる。このような変異ポリヌクレオチドも本発明のDNAエレメントとして使用することができる。

[0042] 本発明において使用されるDNAエレメントは、配列番号5乃至7のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド配列のうち、少なくとも3000、あるいは、少なくとも2000の連続するヌクレオチドからなる部分配列を使用することができる。このような部分配列としては、例えば、国際公報第2012/005378号に記載されたものであってもよく、A2の部分配列としては、例えば、A2-1乃至A2-17を挙げることができ、A7の部分配列としては、例えば、A7-1乃至A7-18を挙げることができ、A18の部分配列としては、例えば、A18-1乃至A18-4を挙げることができる。

[0043] 本発明においては、前記DNAエレメントの部分配列のいずれか1種を単独で使用しても良く、部分断片の1種を2コピー以上使用しても良い。あるいは2種以上部分断片を組み合わせ使用しても良い。また、各DNAエレメントの全長配列と部分配列を組み合わせ使用しても良い。該組み合わせにおいて、部分配列は、組み合わせを構成する全長配列のDNAエレメント由来であっても、異なる全長配列のDNAエレメント由来であっても良い。

[0044] 4. ポリヌクレオチドの取得

本発明において、後記の産生亢進の対象となる外来蛋白質をコードする外来遺伝子を含むポリヌクレオチドは、以下に示す一般的な方法により取得することができる。例えば、外来遺伝子が発現している細胞や組織に由来するcDNAライブラリーを、当該遺伝子断片をもとにして合成したDNAプローブを用いてスクリーニングすることにより単離することができる。mRNAの調製は、当該技術分野において通常用いられる手法により行うことができる。例えば、前記細胞又は組織を、グアニジニン試薬、フェノール試薬等で処理して全RNAを得、その後、オリゴ(dT)セルロースカラムやセファロース2Bを担体とするポリウーセファロース等を用いたアフィニティークラム法により、あるいはバッチ法によりポリ(A)+RNA(mRNA)を得る。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりポリ(A)+RNAをさらに分画してもよい。次いで、得られたmRNAを鋳型として、オリゴdTプ

ライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖cDNAを合成し、該一本鎖cDNAからDNA合成酵素I、DNAリガーゼ及びRNaseH等を用いて二本鎖cDNAを合成する。合成した二本鎖cDNAをT4DNA合成酵素によって平滑化後、アダプター（例えば、EcoRIアダプター）の連結、リン酸化等を経て、λgt11等のλファージに組み込んでin vivoパッケージングすることによってcDNAライブラリーを作製する。また、λファージ以外にもプラスミドベクターを用いてcDNAライブラリーを作製することもできる。その後、cDNAライブラリーから目的のDNAを有する株（ポジティブクローン）を選択すればよい。

- [0045] また、蛋白質の産生に用いる前記プロモーター、ターミネーター領域を含むポリヌクレオチド、前記DNAエレメント又は外来遺伝子を含むポリヌクレオチドをゲノムDNAから単離する場合は、一般的手法（Molecular Cloning（1989）、Methods in Enzymology 194（1991））に従い、採取源となる生物の細胞株よりゲノムDNAを抽出し、ポリヌクレオチドを選別することにより行う。ゲノムDNAの抽出は、例えば、Cryer らの方法（Methods in Cell Biology, 12, 39-44（1975））及びP. Philippsenらの方法（Methods Enzymol., 194, 169-182（1991））に従って行うことができる。
- [0046] 目的とするプロモーター、DNAエレメント、又は外来遺伝子を含むポリヌクレオチドの取得は、例えばPCR法（PCR Technology. Henry A. Erlich, Atackton press（1989））によって行うこともできる。PCR法を用いたポリヌクレオチドの増幅には、プライマーとして20～30merの合成一本鎖DNAを、鋳型としてゲノムDNAを用いる。増幅された遺伝子はポリヌクレオチド配列を確認した後、用いる。PCRの鋳型としては、バクテリア人工染色体（BAC）等のゲノムDNAライブラリーを使用することが可能である。
- [0047] 一方、配列未知の外来遺伝子を含むポリヌクレオチドの取得は、（a）常

法により遺伝子ライブラリーを作製し、(b) 作製された遺伝子ライブラリーから所望のポリヌクレオチドを選択し、当該ポリヌクレオチドを増幅する、ことによって行うことができる。遺伝子ライブラリーは、採取源となる生物の細胞株から常法により得た染色体DNAを適当な制限酵素によって部分消化して断片化し、得られた断片を適当なベクターに連結し、該ベクターを適当な宿主に導入することによって調製することができる。また、細胞よりmRNAを抽出し、ここからcDNAを合成後、適当なベクターに連結し、該ベクターを適当な宿主に導入することによっても調製することができる。この際用いられるベクターとしては、通常公知の遺伝子ライブラリー調製用ベクターとして知られるプラスミドを用いることができ、ファージベクター又はコスミド等も広く用いることができる。形質転換又は形質導入を行う宿主は、前記ベクターの種類に応じたものを用いればよい。外来遺伝子を含むポリヌクレオチドの選択は、前記遺伝子ライブラリーから、外来遺伝子に特有の配列を含む標識プローブを用いるコロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法等によって行う。

[0048] また外来遺伝子を含むポリヌクレオチドを化学的に全合成することもできる。例えば相補的な2対のオリゴヌクレオチドを作製しこれらをアニールさせる方法や、数本のアニールされたDNAをDNAリガーゼにより連結する方法、又は一部相補的な数本のオリゴヌクレオチドを作製しPCRによりギャップを埋める方法等により、遺伝子を合成することができる。

[0049] ポリヌクレオチド配列の決定は、通常の方法、例えばジデオキシ法 (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463-5467 (1977)) 等により行うことができる。更に前記ポリヌクレオチド配列の決定は、市販のシークエンスキット等を用いることによっても容易に行い得る。

[0050] 5. 外来遺伝子発現ベクター

本発明の外来遺伝子発現ベクターとしては、前記1. に記載のプロモーターを含む前記2. に記載の外来遺伝子発現ユニットを含むベクターが提供さ

れる。本発明の外来遺伝子発現ベクターは、前記3.に記載のDNAエレメントの1種、DNAエレメントの1種を2個以上のコピー数、DNAエレメントの2種以上の組み合わせを含んでもよい。前記の外来遺伝子発現ベクターによって外来遺伝子を宿主細胞内で発現させる際には、DNAエレメントを遺伝子発現ユニットの直前又は直後に配置してもよく、又は遺伝子発現ユニットから離れた位置に配置しても良い。また、複数のDNAエレメントを含む1つの外来遺伝子発現ベクターを用いてもよい。なお、DNAエレメントの向きは、遺伝子発現ユニットに対して順方向又は逆方向のいずれであっても良い。

[0051] 外来遺伝子としては、特に限定はされないが、分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP)、緑色蛍光蛋白質 (GFP)、ルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子、 α -アミラーゼ遺伝子、 α -ガラクトシダーゼ遺伝子等の各種酵素遺伝子、医薬上有用な生理活性蛋白質であるインターフェロン α 、インターフェロン γ 等の各種インターフェロン遺伝子、IL1、IL2等の各種インターロイキン遺伝子、エリスロポエチン (EPO) 遺伝子、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 遺伝子等の各種サイトカイン遺伝子、成長因子遺伝子、又は多量体蛋白質をコードする遺伝子、例えば抗体又はその抗原結合性断片であるヘテロ多量体をコードする遺伝子等を挙げることができる。これらの遺伝子はいかなる手法によって得られるものでもよい。

[0052] 「抗体の抗原結合性断片」とは、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味しており、Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、diabody、線状抗体、及び抗体断片より形成された多特異性抗体等を含む。また、F(ab')₂を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるFab'も抗体の抗原結合性断片に含まれる。但し、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。また、これらの抗原結合性断片には、抗体蛋白質の全長分子を適当な酵素で処理したもののみならず、遺伝子工学的に改変された抗体遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された蛋白質も含まれる。

[0053] また、本発明の外来遺伝子発現ベクターには、形質転換体を選抜するための選択マーカーを含めることができる。例えば、セルレニン、オーレオバシジン、ゼオシン、カナバニン、シクロヘキシミド、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ブラストシジン、テトラサイクリン、カナマイシン、アンピシリン、ネオマイシン等の薬剤に対して耐性を付与する薬剤耐性マーカー等を使用することで、形質転換体の選抜を行うことが可能である。また、エタノール等に対する溶剤耐性や、グリセロールや塩等に対する浸透圧耐性、銅等の金属イオン耐性等を付与する遺伝子をマーカーにすることで、形質転換体の選抜を行うことも可能である。

[0054] 本発明の外来遺伝子発現ベクターは、染色体DNAに組込まれないベクターであってもよい。一般的に、外来遺伝子発現ベクターは宿主細胞に遺伝子導入された後、ランダムに染色体に組込まれるが、simian virus 40 (SV40) やpapillomavirus (BPV、HPV)、EBV等の哺乳動物ウイルス由来の構成成分を用いることにより、導入された宿主細胞中で自己複製が可能なepisomal vectorとして使用することができる。例えば、SV40由来の複製起点及びtrans-acting factorであるSV40 large T抗原をコードした配列を有するベクターやEBV由来のoriP及びEBNA-1をコードした配列を有するベクター等が広く用いられている。DNAエレメントの効果はベクターの種類、あるいは染色体への組込み有無を問わず、外来遺伝子発現亢進活性を示すことが可能である。

[0055] 6. 形質転換細胞

本発明の形質転換細胞は、前記5. の外来遺伝子発現ベクターを用いて導入した形質転換細胞である。

形質転換させる宿主細胞としては、真核細胞、好ましくは哺乳動物細胞、さらに好ましくはヒト、マウス、ラット、ハムスター、サル、又はウシ由来の細胞である。哺乳動物細胞としては、COS-1細胞、293細胞、CHO細胞（例えば、CHO-K1、CHO-O1、CHO DG44、CHO

d h f r-、C H O-S等)等を挙げることができるが、これらに限定されない。

本発明において、宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、導入遺伝子が宿主内にて安定に存在し、かつ適宜発現させることができる方法であればいかなる方法でもよく、一般的に用いられている方法、例えば、リン酸カルシウム法 (I t o e t a l. , (1984) A g r i c. B i o l. C h e m. , 48, 341)、エレクトロポレーション法 (B e c k e r, D. M. e t a l. (1990) M e t h o d s. E n z y m o l. , 194, 182-187)、スフェロプラスト法 (C r e g g h e t a l. , M o l. C e l l. B i o l. , 5, 3376 (1985))、酢酸リチウム法 (I t o h, H. (1983) J. B a c t e r i o l. 153, 163-168)、リポフェクション法等を挙げることができる。

本発明の形質転換細胞において、外来遺伝子は一過性に発現されてもよいし、安定(ステーブル)に発現されてもよいが、安定発現系で発現されているものが好ましい。

安定発現系とは、発現ベクターをリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法などにより染色体に取り込ませ発現させる方法である。導入遺伝子が染色体上に維持され、導入遺伝子の発現を数週間以上もの長期間維持することが可能である。またプラスミドへの選択マーカーの導入を行えば薬剤選抜が可能となり、導入遺伝子が染色体上に維持された細胞を効率的に選択することが出来るようになる。

[0056] 7. 外来蛋白質の製造方法

本発明の外来蛋白質の製造は、前記6.の項目に記載の形質転換細胞を公知の方法により培養し、その培養物から採取し、精製することにより行うことができる。「培養物」とは、培養上清のほか、培養細胞、又は細胞の破砕物のいずれをも意味するものである。なお、6.の項目に記載の形質転換細胞を用いて産生することのできる外来蛋白質としては、単量体蛋白質のみな

らず多量体蛋白質を選択することも可能である。異なる複数のサブユニットから構成されるヘテロ多量体蛋白質の生産を行う場合、これらのサブユニットをコードしている複数の遺伝子を、それぞれ6. の項目に記載の宿主細胞に導入する必要がある。

形質転換細胞の培養は、その宿主細胞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。

形質転換細胞が哺乳動物細胞の場合は、例えば37℃、5%又は8%CO₂条件下で培養し、培養時間は24～1000時間程度であり、培養は静置、振とう、攪拌、通気下の回分培養、流加培養、灌流培養又は連続培養等により実施することができる。培養は、好ましくは流加培養である。形質転換細胞を流加培養する期間としては、3日以上20日以下であればよく、5日以上18日以下であることがより好ましく、6日以上15日以下であることが特に好ましい。

前記の培養物（培養液）から外来蛋白質遺伝子の発現産物の確認は、SDS-PAGE、ウエスタン解析、ELISA等により行うことができる。

[0057] 8. 抗体蛋白質の製造方法

前記7. の項目に記載の製造方法を用いて製造されるヘテロ多量体蛋白質としては抗体蛋白質を挙げることができる。抗体蛋白質は、2分子の重鎖ポリペプチド及び2分子の軽鎖ポリペプチドからなる4量体蛋白質である。従って、抗原結合能を維持した形態で抗体蛋白質を取得するためには、前記6. の項目に記載の形質転換細胞において、重鎖及び軽鎖の遺伝子の双方が導入されている必要がある。この場合に、重鎖及び軽鎖の遺伝子発現ユニットは、同じ発現ベクター上に存在しても良く、あるいは異なる発現ベクター上に存在していても良い。同じ発現ベクター上に存在する場合、遺伝子の読み取り方向から、軽鎖の遺伝子発現ユニット、重鎖の遺伝子発現ユニットの順で存在していてもよく、DNAエレメント、軽鎖の遺伝子発現ユニット、重鎖の遺伝子発現ユニットの順で存在することが好ましい。さらに、DNAエレメント、軽鎖の遺伝子発現ユニット、重鎖の遺伝子発現ユニットの後に、

選択マーカールを含んでいることがより好ましい。

本発明において製造される抗体としては、ウサギ、マウス、ラット等実験動物を所望の抗原で免疫して作製された抗体を挙げることができる。また、前記の抗体を原料とするキメラ抗体、及びヒト化抗体も本発明において製造される抗体として挙げることができる。さらに、遺伝子改変動物又はファージディスプレイ法によって取得されるヒト抗体についても、本発明において製造される抗体である。

抗体製造に用いる抗体遺伝子としては、該抗体遺伝子より転写・翻訳される重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの組合せが、任意の抗原蛋白質と結合する活性を保持している限り、特定のポリヌクレオチド配列を持つ抗体遺伝子に限定されない。

また、抗体遺伝子としては、必ずしも抗体の全長分子をコードしている必要はなく、抗体の抗原結合性断片をコードしている遺伝子を用いることができる。これらの抗原結合性断片をコードする遺伝子は、抗体蛋白質の全長分子をコードする遺伝子を遺伝子工学的に改変することによって取得することができる。

[0058] 9. その他の外来蛋白質の製造方法

本発明の製造方法の対象となる外来蛋白質としては、前述の抗体に加え、ヒト又は非ヒト動物由来の各種蛋白質、その抗原結合性断片、その改変体等を挙げることができる。そのような蛋白質等としては、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）、脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）、C型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）、バソプレッシン、ソマトスタチン、成長ホルモン（GH）、インスリン、オキシトシン、グレリン、レプチン、アディポネクチン、レニン、カルシトニン、オステオプロテジェリン、インスリン様成長因子（IGF）等のペプチドホルモン、インターロイキン、ケモカイン、インターフェロン、腫瘍壊死因子（TNF α / β ほかTNFスーパーファミリー等）、神経成長因子（NGF）、細胞増殖因子（EGF、FGF、PDGF、HGF、TGF等）、造血因子（CSF、G-CSF、エリスロ

ポエチン等)、アディポカイン等のサイトカイン、TNF受容体等の受容体、リゾチーム、プロテアーゼ、プロテイナーゼ、ペプチダーゼ等の酵素、その機能性断片(元の蛋白質の生物活性を一部又は全部保持している断片)、それらの蛋白質を含むことからなる融合蛋白質等を挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

実施例

[0059] 以下、実施例により本発明を具体的に説明する。ただし、これらの実施例は本発明の技術的範囲をなんら限定するものではない。本発明の実施例で用いるプラスミド、制限酵素、DNA修飾酵素等は市販のものであり、常法に従って使用することができる。また、DNAのクローニング、ポリヌクレオチド配列の決定、宿主細胞の形質転換、形質転換細胞の培養、得られる培養物からの蛋白質の採取、精製等に用いた操作についても当業者によく知られているものであるか、文献により知ることのできるものである。

[0060] (実施例1) Eno1遺伝子のプロモーター領域のクローニング

Eno1のプロモーター領域としては、GenBankにXM_027398299.1で登録されているmRNAの配列およびNC_048595.1で登録されているチャイニーズハムスターゲノムのスキファールド配列を参考にして、Eno1遺伝子の開始コドン配列の上流約3.0kbpのヌクレオチドから開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでの配列を用いた。

[0061] Eno1遺伝子のプロモーター領域は、CHO細胞のゲノムDNAをテンプレートとして、以下に示すプライマーセットとPrimeSTAR Max DNA Polymerase(タカラバイオ)を用いたPCRで増幅し、QIAquick PCR Purification kit(QIAGEN)で精製した。クローニングしたチャイニーズハムスターEno1遺伝子のプロモーター領域のヌクレオチド配列を配列表の配列番号1に示す。

[0062] Eno1遺伝子プロモーターのプライマーセット

K24(Fw): TTCGCGGCCGCGGCACGCAGCGCGCA

GG (配列番号8)

K25 (Rev) : TTCACTAGTTGTCTGTAGGGGAAAA
AAAAAAAAAC (配列番号9)

[0063] (実施例2) 抗体発現量を指標としたチャイニーズハムスター由来Eno1
遺伝子プロモーターの流加培養による評価

(2-1) 抗体発現ベクターの構築

抗体発現ベクターは、特許文献4に記載のヒト化抗体遺伝子Y発現ベクターpDSLH3.1-Hspa5-YのHspa5遺伝子プロモーターに該当するヌクレオチド配列を、実施例1で増幅、精製したDNA断片を用いてチャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子プロモーターのヌクレオチド配列と置換することでpDSLH3.1-Eno1-Yを構築した。ベクターの概略図を図1に示す。比較対象としたpDSLH3.1-hEF1 α -Yは特許文献4に記載されているものを使用した。

[0064] (2-2) ヒト化抗体Y発現ステーブルプールの作製

CHO-K1細胞(ATCC)を無血清培地での浮遊培養が可能となるように馴化し、宿主細胞CHO-O1細胞を得た。CHO-O1細胞に、(2-1)で構築した抗体発現ベクターpDSLH3.1-Eno1-Y、又は特許文献4に記載のpDSLH3.1-hEF1 α -Yを、遺伝子導入装置Neon Transfection System (Invitrogen)を用いて遺伝子導入し、T-25フラスコにて5%CO₂、37℃で培養した。遺伝子導入の1日後にGeneticin (Life Technologies Corporation)を終濃度800 μ g/mLで添加し、1週間薬剤選択培養を行った。その後、125mL容三角フラスコにて5%CO₂、37℃で培養し、ヒト化抗体Y発現ステーブルプール(各ベクターについて2つのプール)を作製した。

[0065] (2-3) ヒト化抗体Y発現ステーブルプールの流加培養による抗体生産量
評価

(2-2)で作製したヒト化抗体Y発現ステーブルプールを用いて、12

5 mL 容三角フラスコにて14日間の流加培養を行った。培養条件は、初期播種密度 $0.3 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 、培養液量30 mLとし、基礎培地にG13（富士フィルム和光純薬社製カスタム培地）、フィード培地にF13（富士フィルム和光純薬社製カスタム培地）を用いた。フィード培地は培養3日目から、初期培養液量の3%（v/v）を13日目まで毎日添加した。7日目、10日目、14日目にサンプリングを行い、生細胞密度、抗体生産量等を測定した。

[0066] 生細胞数、抗体生産量の推移を、それぞれ図2-A、図2-Bに示す。各ベクターについて作製した2つのプールの抗体生産量の平均値を算出し、抗体生産性を比較した結果、培養14日目のEno1プロモーターでの抗体生産量は、ヒトEF1 α プロモーターの2.0倍の値に達し、現在頻繁に使用されているプロモーターでの抗体生産量を大きく上回った。

[0067] （実施例3）一過性発現でのルシフェラーゼ発光量を指標としたチャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子プロモーター長の検討

（3-1）ルシフェラーゼ発現ベクターの構築

pGL4.10（プロメガ社製）に各鎖長のEno1プロモーターを挿入してホタル（Firefly）由来ルシフェラーゼ発現ベクターを構築した。検討した鎖長は、Eno1遺伝子の開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドから上流約5.0 kbpまで（配列番号10）、同約4.5 kbpまで（配列番号11）、同約4.0 kbpまで（配列番号4）、同約3.5 kbpまで（配列番号12）、同約3.0 kbpまで（配列番号1）、同約2.8 kbpまで（配列番号3）、同約2.7 kbpまで（配列番号13）、同約2.6 kbpまで（配列番号14）、同約2.5 kbpまで（配列番号15）とした。

[0068] （3-2）一過性発現でのルシフェラーゼ発光量評価

CHO-O1細胞に、Lipofectamin2000 CD（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いて、（3-1）で構築したホタル（Firefly）由来ルシフェラーゼ発現ベクターを、ウミシイタケ

(Renilla) 由来ルシフェラーゼを発現するコントロールベクター pGL4.74 と同時に遺伝子導入した。遺伝子導入後、24 時間後に細胞を遠心分離 (1000 rpm、3 min) して 1.5 mL チューブに回収し、PBS バッファーで洗浄した。その後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (プロメガ社製) を用いてルシフェラーゼ発光量を測定した。尚、各プロモーター長に対して N = 2 で遺伝子導入を実施した。

[0069] pGL4.10 上の Firefly 由来ルシフェラーゼの発光量を pGL4.74 上の Renilla 由来ルシフェラーゼの発光量で割った値をプロモーター活性とした (図 3)。また、N = 2 で得られたプロモーター活性から算出した平均値を表 1 に示した。結果、チャイニーズハムスター由来 Eno1 遺伝子の開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドから開始コドン配列の上流約 5.0 kbp まで (配列番号 10)、同約 4.5 kbp まで (配列番号 11)、同約 4.0 kbp まで (配列番号 4)、同約 3.5 kbp まで (配列番号 12) の領域を用いた場合には、同約 3.0 kbp まで (配列番号 1) の領域を用いた場合の 80% 以上のプロモーター活性が得られた。また、開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドから開始コドン配列の上流 2.8 kbp (配列番号 3) を用いた場合では、同約 3.0 kbp まで (配列番号 1) の領域を用いた場合とほぼ同等のプロモーター活性が得られた。開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドから開始コドン配列の上流約 2.7 kbp まで (配列番号 13) 及び同約 2.6 kbp まで (配列番号 14) の領域を用いた場合には、同約 3.0 kbp まで (配列番号 1) の領域を用いた場合と比較して約 50% のプロモーター活性が得られた。また、開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドから開始コドン配列の上流約 2.5 kbp まで (配列番号 15) の領域を用いた場合には、同約 3.0 kbp まで (配列番号 1) の領域を用いた場合と比較して、約 15% のプロモーター活性が得られた。以上より、チャイニーズハムスター由来 En

○ 1 遺伝子のプロモーターの転写活性は、開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドから開始コドン配列の上流約 2.8 kbp 以上の長さの領域において顕著に高いことが認められた。

また、プロモーターの転写活性は、配列番号 3 (Eno1 2.8 k) と配列番号 13 (Eno1 2.7 k) との間で、配列番号 3 (Eno1 2.8 k) の方が顕著に優れていた。このことから、プロモーターが、配列番号 18 (配列番号 3 (Eno1 2.8 k) と配列番号 13 (Eno1 2.7 k) の差分配列 (100 bp)) を有する場合、転写活性が特に向上すると考えられた。

[0070] [表1]

プロモーター	Promoter Activity (Firefly Luc/Renilla Luc)
Eno1 5k	1.1×10^2
Eno1 4.5k	1.0×10^2
Eno1 4k	93
Eno1 3.5k	88
Eno1 3.0k	1.1×10^2
Eno1 2.8k	1.0×10^2
Eno1 2.7k	56
Eno1 2.6k	48
Eno1 2.5k	16

[0071] (実施例 4) 抗体発現量を指標とした、マウス由来 Eno1 遺伝子プロモーターの流加培養による評価

(4-1) 抗体発現ベクターの構築

ヒト化抗体遺伝子 Y 発現ベクター pDSLH3.1-hEF1 α -Y の、抗体 H 鎖および L 鎖遺伝子のプロモーターをマウス Eno1 プロモーターに置換した、pDSLH3.1-mEno1-Y、pDSLH3.1-mEn

o 1-3, 5-Y 及び pDSLH3, 1-mEno1-4, 0-Y を構築した。マウス由来 Eno1 遺伝子プロモーターには、Eno1 の開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドから開始コドン配列の上流約 3.0 kbp までの領域（配列番号 2）、同約 3.5 kbp までの領域（配列番号 17）、又は同約 4.0 kbp までの領域（配列番号 16）を用いた。

[0072] 同様に、チャイニーズハムスター由来 Eno1 遺伝子プロモーターの Eno1 の開始コドン配列に対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドから開始コドン配列の上流約 4.0 kbp までの領域（配列番号 4）、同約 3.5 kbp までの領域（配列番号 12）及び同約 2.8 kbp までの領域（配列番号 3）を Eno1 遺伝子プロモーターとして用いて pDSLH3, 1-Eno1-4, 0-Y、pDSLH3, 1-Eno1-3, 5-Y、pDSLH3, 1-Eno1-2, 8-Y を構築した。

[0073] （4-2）ヒト化抗体 Y 発現ステーブルプールの作製

pDSLH3, 1-hEF1 α -Y（特許文献 4）、（2-1）で構築した DSLH3, 1-Eno1-Y、（4-1）で構築した pDSLH3, 1-mEno1-Y、pDSLH3, 1-mEno1-3, 5-Y、pDSLH3, 1-mEno1-4, 0-Y、pDSLH3, 1-Eno1-2, 8-Y、pDSLH3, 1-Eno1-3, 5-Y 及び pDSLH3, 1-Eno1-4, 0-Y を、（2-2）に記載の方法で CHO-O1 細胞にトランスフェクション、薬剤選択培養を行い、ヒト化抗体 Y 発現ステーブルプール（各ベクターについて 2 つのプール）を作製した。

[0074] （4-3）ヒト化抗体 Y 発現ステーブルプールの流加培養による抗体生産量評価

（4-2）で作製したヒト化抗体 Y 発現ステーブルプールを用いて、125 mL 容三角フラスコにて流加培養を行った。基礎培地に G13、フィード培地に F13 を用いた。

[0075] 生細胞数、抗体生産量の推移を、それぞれ図 4-A、図 4-B に示す。各

ベクターについて作製した2つのプールの抗体生産量の平均値を算出し、抗体生産性を比較した結果、培養14日目時点における抗体生産量は、マウス由来Eno1遺伝子プロモーター3.0 kbp (mEno1 3k)、3.5 kbp (mEno1 3.5k) 及び4.0 kbp (mEno1 4k) で、ヒトEF1 α プロモーター (hEF1 α) のそれぞれ1.3倍、1.8倍、1.9倍の値に達し、現在広く使用されているプロモーターでの抗体生産量を大きく上回った。マウス由来Eno1遺伝子プロモーターもチャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子プロモーターと同等のプロモーター能を有することがわかった。

チャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子プロモーター2.8 kbp (Eno1 2.8 k)、3.0 kbp (Eno1 3k)、3.5 kbp (Eno1 3.5k) 及び4.0 kbp (Eno1 4k) では、ヒトEF1 α プロモーターのそれぞれ2.7倍、2.0倍、2.8倍、3.1倍の値 (培養14日目時点) に達し、現在広く使用されているプロモーターでの抗体生産量を大きく上回った。

マウス由来Eno1遺伝子プロモーターとチャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子プロモーターの抗体産生性を比較した場合、チャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子プロモーターの方が優れていることがわかった。

[0076] さらに、細胞1個、1日あたりの抗体産生量 (Qp) を以下の式により算出した。

$$Qp = [10日目の抗体生産量] \div [10日目の積算生細胞密度]$$

(0、7、10日目の生細胞密度を用いて算出した生細胞密度の経時変化の積分値を、「10日目の積算生細胞密度」とした)

[0077] チャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子プロモーター2.8 kbp (Eno1 2.8 k)、3.0 kbp (Eno1 3k)、3.5 kbp (Eno1 3.5k) 及び4.0 kbp (Eno1 4k) では、ヒトEF1 α プロモーターのそれぞれ2.7倍、2.3倍、3.0倍、3.1倍にも達した。

マウス由来E n o 1 遺伝子プロモーター3 k b p (m E n o 1 3 k)、3. 5 k b p (m E n o 1 3. 5 k)、4 k (m E n o 1 4 k) では、ヒトE F 1 α プロモーターのそれぞれ1. 9倍、2. 2倍、2. 4倍にも達した。

細胞1個あたりの抗体産生量(Q p)を比較した場合においても、マウス由来E n o 1 遺伝子プロモーターよりもチャイニーズハムスター由来E n o 1 遺伝子プロモーターの方が優れることがわかった。

[0078] (実施例5) 流加培養での抗体発現量を指標とした各生物種由来E n o 1 遺伝子プロモーターとA 7の組み合わせ効果の検討

(5-1) 抗体発現ベクターの構築

(2-1)で構築したp D S L H 3. 1-E n o 1-Y、(4-1)で構築したp D S L H 3. 1-E n o 1-3. 5-Y、p D S L H 3. 1-E n o 1-2. 8-Y、p D S L H 3. 1-m E n o 1-Y、p D S L H 3. 1-m E n o 1-3. 5-Y、p D S L H 3. 1-m E n o 1-4. 0-Y、及びp D S L H 3. 1-E n o 1-4. 0-Yを親ベクターとして、それらの発現カセットの上流にDNAエレメントA 7(配列番号6)を、特許文献5と同様の方法で挿入した抗体発現ベクターを構築した。

[0079] (5-2) ヒト化抗体Y発現ステーブルプールの作製

親ベクター及び抗体発現ベクターA 7を、(2-2)に記載の方法でC H O-O 1細胞にトランスフェクション、薬剤選択培養を行い、ヒト化抗体Y発現ステーブルプール(各ベクターについて2つのプール)を作製した。

[0080] 5-3) ヒト化抗体Y発現ステーブルプールの流加培養による抗体生産量評価

(5-2)で作製したヒト化抗体Y発現ステーブルプールを用いて、125 mL容三角フラスコにて流加培養を行った。基礎培地にG 1 3、フィード培地にF 1 3を用いた。生細胞数、抗体生産量の推移をそれぞれ図5 A、図5 Bに示す。各ベクターについて作製した2つのプールの抗体生産量の平均値を算出し、抗体生産性を比較した。培養14日目時点におけるA 7を含む

抗体発現ベクターでの抗体生産量は、A7を含まない抗体発現ベクターの1.7～5.4倍の値を示した。よって、DNAエレメントA7と、チャイニーズハムスター由来又はマウス由来のいずれのEno1遺伝子プロモーターを組み合わせ使用した場合においても、抗体生産性が大幅に向上することが分かった。

配列表フリーテキスト

[0081] 配列番号1：チャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子のプロモーター
Eno1遺伝子の開始コドンの上流約3.0kbpのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでからなるヌクレオチド配列

配列番号2：マウス由来Eno1遺伝子のプロモーター Eno1遺伝子の開始コドンの上流約3.0kbpのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでからなるヌクレオチド配列

配列番号3：チャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子のプロモーター
Eno1遺伝子の開始コドンの上流約2.8kbpのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでからなるヌクレオチド配列

配列番号4：チャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子のプロモーター
Eno1遺伝子の開始コドンの上流約4.0kbpのヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでからなるヌクレオチド配列

配列番号5：DNAエレメントA2のヌクレオチド配列

配列番号6：DNAエレメントA7のヌクレオチド配列

配列番号7：DNAエレメントA18のヌクレオチド配列

配列番号8：Eno1遺伝子プロモーターのプライマー K24

配列番号9：Eno1遺伝子プロモーターのプライマー K25

配列番号10：チャイニーズハムスター由来Eno1遺伝子のプロモーター
Eno1遺伝子の開始コドンの上流約5.0kbpのヌクレオチドから開

始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでからなるヌクレオチド配列

配列番号 1 1 : チャイニーズハムスター由来 E n o 1 遺伝子のプロモーター
E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流約 4 . 5 k b p のヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでからなるヌクレオチド配列

配列番号 1 2 : チャイニーズハムスター由来 E n o 1 遺伝子のプロモーター
E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流約 3 . 5 k b p のヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでからなるヌクレオチド配列

配列番号 1 3 : チャイニーズハムスター由来 E n o 1 遺伝子のプロモーター
E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流約 2 . 7 k b p のヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでからなるヌクレオチド配列

配列番号 1 4 : チャイニーズハムスター由来 E n o 1 遺伝子のプロモーター
E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流約 2 . 6 k b p のヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでからなるヌクレオチド配列

配列番号 1 5 : チャイニーズハムスター由来 E n o 1 遺伝子のプロモーター
E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流約 2 . 5 k b p のヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでからなるヌクレオチド配列

配列番号 1 6 : マウス由来 E n o 1 遺伝子のプロモーター E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流約 4 . 0 k b p のヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでからなるヌクレオチド配列

配列番号 1 7 : マウス由来 E n o 1 遺伝子のプロモーター E n o 1 遺伝子の開始コドンの上流約 3 . 5 k b p のヌクレオチドから開始コドンに対応するヌクレオチド配列の直前のヌクレオチドまでからなるヌクレオチド配列

配列番号 18 : 配列番号 3 (Eno 1 2. 8 k) と配列番号 13 (Eno 1 2. 7 k) の差分配列

請求の範囲

- [請求項1] チャイニーズハムスター由来の遺伝子のプロモーターであって、
配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13及び配列番号14から選択されるか、又は、
それらの配列と少なくとも85%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなる、ポリヌクレオチド。
- [請求項2] 配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号10、配列番号11及び配列番号12から選択されるか、又は
それらの配列と少なくとも85%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなる、請求項1に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項3] 配列番号1のヌクレオチド配列と少なくとも99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、請求項1に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項4] 配列番号3のヌクレオチド配列と少なくとも99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、請求項1に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項5] 配列番号4のヌクレオチド配列と少なくとも99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、請求項1に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項6] 配列番号10のヌクレオチド配列と少なくとも99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、請求項1に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項7] 配列番号11のヌクレオチド配列と少なくとも99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

- [請求項8] 配列番号 1 2 のヌクレオチド配列と少なくとも 99 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項9] 配列番号 1 3 のヌクレオチド配列と少なくとも 99 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項10] 配列番号 1 4 のヌクレオチド配列と少なくとも 99 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項11] マウス由来の遺伝子のプロモーターであって、
配列番号 2、配列番号 1 7 及び配列番号 1 6 から選択されるか、又は、
それらの配列と少なくとも 85 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなる、ポリヌクレオチド。
- [請求項12] 配列番号 2 のヌクレオチド配列と少なくとも 99 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項13] 配列番号 1 7 のヌクレオチド配列と少なくとも 99 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項14] 配列番号 1 6 のヌクレオチド配列と少なくとも 99 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる、請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項15] 請求項 1 又は 1 1 に記載の配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 2、配列番号 1 7、又は配列番号 1 6 のヌクレオチド配列に対して 90 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、

又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなり、
プロモーター活性を有する、
ポリヌクレオチド。

[請求項16] 請求項1又は11に記載の配列番号1、配列番号3、配列番号4、
配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、
配列番号2、配列番号17、又は配列番号16のヌクレオチド配列に対して95%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、
又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなり、
プロモーター活性を有する、
ポリヌクレオチド。

[請求項17] 請求項1又は11に記載の配列番号1、配列番号3、配列番号4、
配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、
配列番号2、配列番号17、又は配列番号16のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、
プロモーター活性を有する、ポリヌクレオチド。

[請求項18] チャイニーズハムスター由来の遺伝子のプロモーターであって、配列番号18のヌクレオチド配列、又は、該配列と少なくとも85%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、請求項17に記載のポリヌクレオチド。

[請求項19] 請求項1～18のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド及び外来遺伝子を含む、外来遺伝子発現ユニット。

[請求項20] 外来遺伝子が、蛋白質をコードする遺伝子である、請求項19に記載の外来遺伝子発現ユニット。

[請求項21] 外来遺伝子がヘテロ多量体蛋白質をコードする遺伝子である、請求項20に記載の外来遺伝子発現ユニット。

[請求項22] 外来遺伝子が抗体又はその抗原結合性断片をコードする遺伝子である、請求項21に記載の外来遺伝子発現ユニット。

- [請求項23] 請求項19～22のいずれか一項に記載の外来遺伝子発現ユニットを含む、外来遺伝子発現ベクター。
- [請求項24] 請求項19～22のいずれか一項に記載の外来遺伝子発現ユニットと、
下記(a)～(e)から選択されるいずれか一つ以上のポリヌクレオチドと、を含む外来遺伝子発現ベクター；
(a) 配列番号5のヌクレオチド配列、又はその部分配列、
(b) 配列番号6のヌクレオチド配列、又はその部分配列、
(c) 配列番号7のヌクレオチド配列、又はその部分配列、
(d) 配列番号5、配列番号6、又は配列番号7のヌクレオチド配列に対して80%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなり、外来遺伝子発現亢進活性を有する、ポリヌクレオチド、
(e) 配列番号5、配列番号6、又は配列番号7のヌクレオチド配列に対して85%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の部分配列を含んでなり、外来遺伝子発現亢進活性を有するポリヌクレオチド。
- [請求項25] 請求項23又は24に記載の外来遺伝子発現ベクターが導入された形質転換細胞。
- [請求項26] 哺乳動物由来の培養細胞である、請求項25に記載の形質転換細胞。
- [請求項27] COS-1細胞、293細胞、又はCHO細胞である、請求項26に記載の形質転換細胞。
- [請求項28] 請求項25～27のいずれか一項に記載の形質転換細胞を培養し、培養物から外来遺伝子由来の蛋白質を取得することを特徴とする、該蛋白質の製造方法。
- [請求項29] 外来遺伝子由来の蛋白質が、単量体蛋白質又は多量体蛋白質である、請求項28に記載の製造方法。

- [請求項30] 多量体蛋白質が、ヘテロ多量体蛋白質である、請求項29に記載の製造方法。
- [請求項31] ヘテロ多量体蛋白質が、抗体蛋白質である、請求項30に記載の製造方法。
- [請求項32] 形質転換細胞において外来遺伝子を発現させるための、請求項1～18のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドの使用。
- [請求項33] 形質転換細胞において外来遺伝子を発現させるための、請求項23又は24に記載の外来遺伝子発現ベクターの使用。