

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第5839411号
(P5839411)

(45) 発行日 平成28年1月6日 (2016.1.6)

(24) 登録日 平成27年11月20日 (2015.11.20)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 R 1/39 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 R 1:39

請求項の数 27 (全 84 頁)

(21) 出願番号	特願2013-502705 (P2013-502705)	(73) 特許権者	512229012
(86) (22) 出願日	平成23年3月28日 (2011.3.28)		フェニックス インク.
(65) 公表番号	特表2013-529064 (P2013-529064A)		アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォル
(43) 公表日	平成25年7月18日 (2013.7.18)		ニア州 サンディエゴ ローゼル・ストリ
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/030227		ート 1 0 7 9 0
(87) 国際公開番号	W02011/126811	(74) 代理人	100082072
(87) 国際公開日	平成23年10月13日 (2011.10.13)		弁理士 清原 義博
審査請求日	平成26年3月5日 (2014.3.5)	(72) 発明者	レタラック, ダイアン, エム.
(31) 優先権主張番号	PCT/US2010/030573		アメリカ合衆国 9 2 0 6 4 カリフォル
(32) 優先日	平成22年4月9日 (2010.4.9)		ニア州 ポウエイ キャリエッジ・ロード
(33) 優先権主張国	米国 (US)		1 3 4 2 0
(31) 優先権主張番号	61/325, 235	(72) 発明者	チュー, ローレンス
(32) 優先日	平成22年4月16日 (2010.4.16)		アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォル
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ニア州 サンディエゴ ウィローウィア・
			レーン 5 5 9 0
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組み換え型毒素タンパク質の高レベルの発現

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

シュードモナス菌宿主細胞における組み換え型毒素タンパク質を生成する方法であって、前記方法は：

毒素タンパク質をコード化するヌクレオチド配列を含む発現ベクターによりシュードモナス菌宿主細胞を形質転換する工程；及び

組み換え型毒素タンパク質の発現に適している培地において、形質転換されたシュードモナス菌宿主細胞を培養する工程を含み；

前記組み換え型毒素タンパク質は、

- a. クロストリジウムディフィシレ毒素 B、
- b. CRM 1 9 7、ここでこの組み換え型毒素タンパク質をコード化するヌクレオチド配列は、A z u、I b p S 3 1 A又はC u p A 2である、発現される時にこの組み換え型毒素タンパク質のペリプラズムへの輸送を誘導する分泌シグナルコード配列に融合され、
- c. ジフテリア毒素、ここでこの組み換え型毒素タンパク質をコード化するヌクレオチド配列は、A z u、I b p S 3 1 A又はC u p A 2である、発現される時にこの組み換え型毒素タンパク質のペリプラズムへの輸送を誘導する分泌シグナルコード配列に融合され、
- d. 破傷風毒素フラグメント C、
- e. 緑膿菌外毒素 A、
- f. コレラ毒素 B、
- g. コレラホロトキシン、および、

h. 百日咳毒素、から選択され、

前記組換え型毒素タンパク質は、1リットル当たり0.2グラム乃至1リットル当たり12グラムの可溶性の及び／又は活性な毒素タンパク質の収量で生成されることを特徴とする方法。

【請求項2】

前記毒素タンパク質をコード化する前記ヌクレオチド配列が、発現される時に毒素タンパク質のペリプラズムへの輸送を誘導する分泌シグナルコード配列に融合されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記宿主細胞は、少なくとも1つのプロテアーゼの発現を欠き、又は前記宿主細胞は、少なくとも1つのフォールディングモジュレータ、又はその組み合わせを過剰発現させることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

10

【請求項4】

前記組み換え型毒素タンパク質はCRM197であり、前記宿主細胞は、Hs1U、Hs1V、Prcl、DegP1、DegP2、及びAprAの発現を欠くことを特徴とする、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記組み換え型毒素タンパク質がCRM197であり、宿主細胞が、セラリシン、Hs1U、Hs1V、Prcl、DegP1、DegP2、AprA、又はそれらの任意の組み合わせの発現を欠くことを特徴とする、請求項3に記載の方法。

20

【請求項6】

前記宿主細胞がDsbA、DsbB、DsbC、及びDsbDを過剰発現し、前記組み換え型毒素タンパク質は分泌リーダーAzuに融合されることを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記宿主細胞がセラリシン又はHs1U及びHs1Vの発現を欠き、前記組み換え型毒素タンパク質が分泌リーダーAzuに融合されることを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項8】

前記組み換え型毒素タンパク質がCRM197であり、前記宿主細胞が野生型であり、前記組み換え型毒素タンパク質が分泌リーダーAzuに融合されることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

30

【請求項9】

前記組み換え型毒素タンパク質が、クロストリジウムディフィシレ毒素B、破傷風毒素フラグメントC、緑膿菌外毒素A、コレラ毒素B、コレラホロトキシン又は百日咳毒素であり、

前記組み換え型毒素タンパク質をコード化するヌクレオチド配列がその自然の分泌シグナルをコード化する配列に融合されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

活性アッセイにおける前記組み換え型毒素タンパク質の活性を測定する工程をさらに含み、生成された可溶性毒素タンパク質の40%乃至100%が活性であると決定されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

40

【請求項11】

前記活性アッセイが、免疫学アッセイ、受容体結合アッセイ、又は酵素アッセイであることを特徴とする、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記発現ベクターが、タンパク質コード配列に操作可能に連結されたlac誘導体プロモータを含み、前記培養する工程が、0.02乃至1.0mMの濃度でIPTGを使用するプロモータの誘発を含み、誘発時の細胞密度が、40乃至200の吸光度単位(AU)の光電密度であり、培養のpHが6乃至7.5であり、成長温度が20乃至35℃である

50

ことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記宿主細胞が、シュードモナス菌細胞であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記宿主細胞が緑膿菌であることを特徴とする、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記ヌクレオチド配列がシュードモナス菌宿主細胞における発現のために最適化されたことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記発現ベクターが分泌シグナルのためのコード配列に隣接しているタグ配列をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記発現ベクターが、毒素タンパク質のためのコード配列に隣接しているタグ配列をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記組み換え型毒素タンパク質がクロストリジウムディフィシレ毒素 B であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記宿主細胞が H t p X の発現を欠き、D e g P 1 の発現を欠き、H s l U、H s l V、P r c 1 及び P r c 2 の発現を欠き、L o n、l a、及び D e g P 2 の発現を欠き、又は；前記宿主細胞が、L o n、P r c 1、D e g P 2、A p r A の発現を欠き、D e g P 2 S 2 1 9 A を過剰発現することを特徴とする、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記組み換え型毒素タンパク質が破傷風毒素フラグメント C であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記宿主細胞が、L o n、l a 及び A p r A の発現を欠き、又は前記宿主細胞が、H s l U、H s l V、P r c 1、D e g P 1、D e g P 2、及び A p r A の発現を欠き、又は前記宿主細胞が d s b A B C D を過剰発現し、又は前記宿主細胞が G r p E、D n a K、及び D n a J を過剰発現することを特徴とする、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記組み換え型毒素タンパク質がコレラ毒素 B であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記宿主細胞が L o n、l a、及び A p r A の発現を欠き、又は H s l U、H s l V、P r c 1、D e g P 1、D e g P 2、及び A p r A の発現を欠き、D e g P 2 S 2 1 9 A を過剰発現することを特徴とする、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記組み換え型毒素タンパク質が野生型の百日咳毒素又は百日咳毒素 S 1 E 1 2 9 A R 9 K であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記組み換え型毒素タンパク質が、百日咳毒素 S 1 E 1 2 9 A R 9 K であり、宿主細胞が L o n、l a、及び A p r A の発現を欠くことを特徴とする、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記緑膿菌外毒素 A が野生型、CRM 6 6 又は r E P A であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記宿主細胞が、L o n、l a 及び A p r A の発現を欠き、又は前記宿主細胞が d s b

10

20

30

40

50

A B C Dを過剰発現することを特徴とする、請求項 2 6 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

〈優先権の主張〉

【0002】

この出願は、2010年4月16日出願の米国仮特許出願第61/325, 235号、2010年4月9日出願のPCT/US10/30573、及び2010年3月30日出願の米国仮特許出願第61/319, 152号に対する、アメリカ合衆国法典第35巻の第119条(e)に基づく優先権を請求する。これら出願の内容は、その全体における引用によって本明細書に組み込まれる。

10

【0003】

〈配列表〉

本出願は、E F S - W e bによってA S C I Iフォーマットで提出され、その全体における引用によって本明細書に組み込まれる配列表を含む。前記A S C I Iのコピーが、2011年3月16日に作られ、38194201. t x tと命名され、大きさは156, 975バイトである。

【背景技術】

【0004】

微生物の毒素タンパク質は、医学において、毒素を生産する微生物に対するワクチン接種用免疫原として、及び他のワクチン用の担体タンパク質及びアジュバントとして、及び科学的調査において分子の経路を研究するためのツールとして、使用される。

20

【0005】

ジフテリア毒素(DT)は、ジフテリア菌の毒素産生菌によって合成され分泌されるタンパク質毒素である。毒素産生菌は、毒素遺伝子を運搬するバクテリオファージ溶原菌を含む。DTは、成熟した毒素を形成するためにタンパク質分解を受ける、535-アミノ酸ポリペプチドとして合成される。成熟した毒素は、ジスルフィド架橋によって結合された、2つのサブユニット、A及びBを含む。無傷のDTのC末端部分から形成されたBサブユニットは、結合、及びDTの細胞膜を通る細胞質への侵入を可能にする。細胞の侵入に際して、無傷のDTのN末端部分から形成された酵素のAサブユニットは、伸長因子2(EF-2)のADPリボシル化を触媒する。その結果、EF-2は不活性化され、タンパク質合成が止まり、細胞が死ぬ。ジフテリア毒素は非常に細胞毒性である；単一の分子は、細胞に致死的であり得、10ng/kgの投与量は、動物とヒトを死滅させ得る。

30

【0006】

CRM197タンパク質は、DTの、無毒な免疫学的に交差反応性の形態である。それは、DT追加免疫又はワクチン抗原としてのその潜在的な使用のために研究されてきた。CRM197は、毒素産生性のコリネファージ(corynephage)βのニトロソグアニジン変異誘発によって作られた無毒のファージβ197^{tox-}によって感染した、ジフテリア菌によって生成される。CRM197タンパク質は、DTと同じ分子量を有するが、Aサブユニットの単独ベース変化(アデニンに対するグアニン)によって異なる。この単独ベース変化は、アミノ酸置換(グリシンの代わりにグルタミン酸)をもたらす、DTの毒性の特性を除去する。

40

【0007】

担体タンパク質としてCRM197を使用する複合糖質ワクチンは、ヒト使用のために承認された。ワクチンは：Menveo(登録商標)(Novartis Vaccines and Diagnostics)、髄膜炎菌サブグループA、C、Y及びW-135によって引き起こされる侵襲性の髄膜炎菌の疾患の予防のために示されたワクチン；Menjugate(Novartis Vaccines)、髄膜炎菌のグループC結合ワクチン；及びPrevnar(登録商標)(Wyeth Pharmaceuticals, Inc.)、肺炎連鎖球菌の7つの血清型を標的とする小児期肺炎ワクチン、

50

及びH i b T I T E R（登録商標）（W y e t h）、インフルエンザ菌b型ワクチンを含む。加えて、CRM197は、ジフテリア菌ワクチン接種用の追加免疫抗原（b o o s t i n g a n t i g e n）としての潜在的な使用を有し、他のワクチンで使用される担体タンパク質として調べられている。

【0008】

承認された治療上及び研究の使用に関する、CRM197の高レベルの発現のための方法は、報告されていない。CRM197は、何十ものmg/Lに及ぶレベルで、例えば、ジフテリア菌、枯草菌、大腸菌において発現される。P r e v n a r結合ワクチンの1回量は、約20μgのCRM197を含む。それ故、約1g/L又はそれ以上のレベルで経済的にCRM197を生成する方法は、ワクチン研究及び製造を大いに促進するであろう。

10

【0009】

コレラ菌、下痢及び嘔吐によって特徴付けられた感染を引き起こす病原菌によって産出されたコレラ毒素（C T X）はまた、ADPリボシル化毒素である。C T Xは、6つのタンパク質サブユニットから構成されたオリゴマーの複合体である：コレラ毒素Aサブユニット（C T A）の単一のコピー及びコレラ毒素Bサブユニット（C T B）の5つのコピー。各々12kDaの重量を有する5つのBサブユニットは五員環を形成する。Aサブユニットは、A1部分、C T A1、Gタンパク質をADPリボシル化する球状の酵素、及びA2鎖、C T A2を有し、それは、Bサブユニット環の中央のポアにきっちり位置する拡張したα螺旋体を形成する。この環は、宿主細胞表面上のGM1ガングリオシド受容体に結合し、全複合体の内部移行をもたらす。一旦内部移行されると、C T A1鎖はジスルフィド架橋の減少によって放出される。その後、C T A1は活性化され、アデニル酸シクラーゼのADPリボシル化を触媒する。アデニル酸シクラーゼ活性において結果として生じる増加は、環状AMP合成を増加させ、それは大量の液体及び電解質流出を引き起こし、下痢をもたらす。

20

【0010】

C T XのBサブユニットは、比較的無害であるが、GM1ガングリオシド受容体に結合するその能力を保持する。それ故、C T Bは、化学的に又は遺伝学的に結合した異種抗原の粘膜の取り込みの促進における使用を見出す。粘膜及び全身性の免疫を誘発することが実証されており、食用のワクチン生成で使用される候補である。その結合優先（b i n d i n g p r e f e r e n c e）のため、C T Bはまた、神経細胞のトレーサーとしての使用を見出す。

30

【0011】

百日咳毒素（P T X）は、百日咳菌、疾患百日咳を引き起こすヒトの呼吸器系の病原菌によって生成された外毒素及び病原性の因子である。百日咳ホロトキシンは、AB5構造を有するマルチサブユニットの複合体である。酵素学的に活性なAサブユニット（S1）は、哺乳動物細胞における幾つかのヘテロ三量体のGタンパク質のアルファサブユニットを修正する、ADPリボース転移酵素であり、Bオリゴマー（S2、S3、S4の2つのコピー、及びS5）は、細胞上の複合糖質受容体を結合する。毒素の5つのサブユニットは、百日咳トキシノイドオペロンから発現される。

40

【0012】

百日咳毒素の無毒な変異体は、保護ワクチンにおける使用、及びワクチンアジュバントとしての使用のために調査された。また、研究において、例えばGタンパク質シグナル経路の研究のために、百日咳毒素タンパク質を使用する必要がある。

【0013】

破傷風菌によって産出された破傷風毒素は、150kDaの分子量を有する神経毒素である。それは、2つの部分から構成される：100kDaの重鎖又はB鎖及び50kDaの軽鎖又はA鎖。鎖は、ジスルフィド結合によって連結される。B鎖は、神経細胞の細胞膜上のジシアログングリオシド（GD2及びGD1b）に結合する。A鎖、亜鉛エンドペプチダーゼは、小胞に関連する膜タンパク質（VAMP）を攻撃する。

50

【0014】

A鎖の作用は、影響を受けた神経細胞が、タンパク質シナプトブレビンの分解により抑制性神経伝達物質GABA（γ-アミノ酪酸）及びグリシンを放出するのを止める。この結果は、最も小さな刺激からの筋肉における危険な活動過剰、即ち、感覚の刺激による運動反射の障害ができないことである。これは、テタニー性攣縮と称される、アゴニスト及びアンタゴニスト筋肉組織の一般化された収縮を引き起こす。

【0015】

破傷風毒素のフラグメントC（Tet C又はTTC）は、破傷風毒素のプロテアーゼ開裂（例えば、パパインによる）によって、又はフラグメントの組み換え型発現を通じて生成された、50kDのポリペプチドである。それは、C末端での451のアミノ酸に相当する（アミノ酸位置865-1315）。 10

【0016】

フラグメントCは、無毒であることが示された。それが高い特異性と親和性により神経細胞に結合するため、TTCは、神経細胞の薬物送達、又は研究目的のために標的とする分子としての使用を見出す。また、TTCタンパク質は、ワクチン担体タンパク質として、及びクロストリジウムテタニ感染から保護するためのワクチンにおいて使用するのに、潜在的に有用である。

【0017】

クロストリジウムディフィシレ毒素B（TcdB）は、クロストリジウムディフィシレによって生成された毒性因子であり、それは、院内での（hospital acquired）下痢及び偽膜性大腸炎を引き起こす。TcdB、及び第2の大きなクロストリジウム毒素、TcdAは、偽膜性大腸炎の進行に関係する。 20

【0018】

TcdBは、約270kDのグルコシル化毒素であり、酵素、転位及び受容体結合のドメインに分けることができる。TcdBの第1の546アミノ酸は、酵素の領域を含み、それは、推定上の転位及び受容体結合ドメインに続く。TcdBは、診断テスト及びそれらの進行と同様に、クロストリジウムディフィシレ感染のための保護ワクチンとしての潜在的な使用を有する。

【0019】

緑膿菌の外毒素A（ETA又はPE）は、II型のADPRTである。そのファミリーメンバージフテリア毒素及びコレラ毒素のように、それは、細胞の伸長因子2のADPリボシル化によってタンパク質合成を阻害する。緑膿菌外毒素Aは、モノマーとして存在し、613のアミノ酸（66Kd）の単一のポリペプチド鎖から成る。 30

【0020】

ETAは、ワクチン共役として潜在的に有用である。ETAの無毒な突然変異体は、黄色ブドウ球菌、マラリア、及びチフス菌から保護するワクチン接種のためのワクチン共役として研究された。

【0021】

拡大する必要性を満たすのに十分な量におけるこれら毒素の産出は、著しい挑戦（challenges）を提示した。従来のタンパク質過剰発現系において作られた時、毒素タンパク質は、毒素の特異的な特性、例えば大きさ及び二次構造に依存する、分解、不適当な折り重ね（folding）又はその両方により、非常に低い濃度にてのみ、活性型において回復する。それ故、可溶性及び／又は活性型において、及び低コストで大量のこれら毒素を産出する方法が必要とされる。 40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0022】

本発明は、シュードモナス菌宿主細胞における組み換え型毒素タンパク質を生成する方法に関し、該方法は：発現ベクターへ、毒素タンパク質をコードするヌクレオチド配列を連結する工程；発現ベクターによりシュードモナス菌宿主細胞を形質転換する工程；及 50

び組み換え型毒素タンパク質の発現に適している培地において、形質転換されたシュードモナス菌宿主細胞を培養する工程を含み；ここで、組み換え型毒素タンパク質は、CRM197、ジフテリア毒素、コレラホロトキシン、コレラ毒素B、百日咳毒素、破傷風毒素フラグメントC、クロストリジウムディフィシレ毒素B、又は緑膿菌外毒素Aである。

【0023】

実施形態において、組み換え型毒素タンパク質は、コレラ毒素B、コレラホロトキシン、百日咳毒素、破傷風毒素フラグメントC、クロストリジウムディフィシレ毒素B、又は緑膿菌外毒素Aである。

【0024】

他の実施形態において、組み換え型毒素タンパク質は、コレラ毒素B、コレラホロトキシン、百日咳毒素、破傷風毒素フラグメントC、又はクロストリジウムディフィシレ毒素Bである。

【0025】

他の実施形態において、組み換え型毒素タンパク質は、CRM197、ジフテリア毒素、コレラホロトキシン、コレラ毒素B、百日咳毒素、破傷風毒素フラグメントC、又はクロストリジウムディフィシレ毒素Bである。

【0026】

特定の実施形態において、組換え型タンパク質は、1リットル当たり約0.2グラム乃至1リットル当たり約12グラムの可溶性の及び／又は活性な毒素タンパク質の収量にて生成される。特異的な実施形態において、可溶性の及び／又は活性な毒素タンパク質の収量は、約0.2g/L、約0.3g/L、約0.4g/L、約0.5g/L、約0.6g/L、約0.7g/L、約0.8g/L、約0.9g/L、約1g/L、約1.5g/L、約2g/L、約2.5g/L、約3g/L、約3.5g/L、約4g/L、約4.5g/L、約5g/L、約5.5g/L、約6g/L、約6.5g/L、約7g/L、約7.5g/L、約8g/L、約8.5g/L、約9g/L、約9.5g/L、約10g/L、約10.5g/L、約11g/L、約12g/L、約0.2g/L乃至約0.5g/L、約0.2g/L乃至約1g/L、約0.2g/L乃至約2g/L、約0.3g/L乃至約0.6g/L、約0.3g/L乃至約1g/L、約0.3乃至約2g/L、約0.4乃至約0.7g/L、約0.4乃至約1g/L、約0.4乃至約2g/L、約0.4乃至約3g/L、約0.5g/L乃至約1g/L、約0.5g/L乃至約2g/L、約0.5g/L乃至約3g/L、約0.5g/L乃至約4g/L、約0.5g/L乃至約5g/L、約0.5g/L乃至約6g/L、約0.5g/L乃至約7g/L、約0.5g/L乃至約8g/L、約0.5g/L乃至約9g/L、約0.5g/L乃至約10g/L、約0.5g/L乃至約11g/L、約0.5g/L乃至約12g/L、約1g/L乃至約2g/L、約1g/L乃至約3g/L、約1g/L乃至約4g/L、約1g/L乃至約5g/L、約1g/L乃至約6g/L、約1g/L乃至約7g/L、約1g/L乃至約8g/L、約1g/L乃至約9g/L、約1g/L乃至約10g/L、約1g/L乃至約11g/L、約1g/L乃至約12g/L、約2g/L乃至約3g/L、約2g/L乃至約4g/L、約2g/L乃至約5g/L、約2g/L乃至約6g/L、約2g/L乃至約7g/L、約2g/L乃至約8g/L、約2g/L乃至約9g/L、約2g/L乃至約10g/L、約2g/L乃至約11g/L、約2g/L乃至約12g/L、約3g/L乃至約4g/L、約3g/L乃至約5g/L、約3g/L乃至約6g/L、約3g/L乃至約7g/L、約3g/L乃至約8g/L、約3g/L乃至約9g/L、約3g/L乃至約10g/L、約3g/L乃至約11g/L、約3g/L乃至約12g/L、約4g/L乃至約5g/L、約4g/L乃至約6g/L、約4g/L乃至約7g/L、約4g/L乃至約8g/L、約4g/L乃至約9g/L、約4g/L乃至約10g/L、約4g/L乃至約11g/L、約4g/L乃至約12g/L、約5g/L乃至約6g/L、約5g/L乃至約7g/L、約5g/L乃至約8g/L、約5g/L乃至約9g/L、約5g/L乃至約10g/L、約5g/L乃至約11g/L、約5g/L乃至約12g/L、約6g/L乃至約7g/L、約6g/L乃至約8g/L、約6g/L乃至約9g/L、約6g/L乃至約10g/L

10

20

30

40

50

、約6 g/L乃至約11 g/L、約6 g/L乃至約12 g/L、約7 g/L乃至約8 g/L、約7 g/L乃至約9 g/L、約7 g/L乃至約10 g/L、約7 g/L乃至約11 g/L、約7 g/L乃至約12 g/L、約8 g/L乃至約9 g/L、約8 g/L乃至約10 g/L、約8 g/L乃至約11 g/L、約8 g/L乃至約12 g/L、約9 g/L乃至約10 g/L、約9 g/L乃至約11 g/L、約9 g/L乃至約12 g/L、約10 g/L乃至約11 g/L、約10 g/L乃至約12 g/L、又は約11 g/L乃至約12 g/Lである。

【0027】

実施形態において、毒素タンパク質をコード化するヌクレオチド配列は、発現される時に毒素タンパク質のペリプラズムへの輸送を誘導する分泌シグナルコード配列に融合される。実施形態において、宿主細胞は、少なくとも1つのプロテアーゼの発現を欠き、又は宿主細胞は、少なくとも1つのフォールディングモジュレータ (folding modulator)、又はその組み合わせを過剰発現させる。

10

【0028】

実施形態において、組み換え型毒素タンパク質はCRM197であり、宿主細胞は、HslU、HslV、Prc1、DegP1、DegP2、及びAprAの発現を欠く。関連する実施形態において、組み換え型毒素タンパク質は、Azu、IbpS31A、CupA2、PbpA20V、又はPbpである分泌リーダーに融合される。実施形態において、組み換え型毒素タンパク質はCRM197であり、宿主細胞は、HslU及びHslV、又はPrc1、又はDegP1、又はDegP2、又はAprAの発現を欠く。特異的な実施形態において、組み換え型毒素タンパク質はCRM197であり、宿主細胞は、セラリシン (Serralyisin)、HslU、HslV、Prc1、DegP1、DegP2、又はAprAの発現を欠き、又は宿主細胞は、DsbA、DsbB、DsbC、及びDsbDを過剰発現させる。実施形態において、宿主細胞は、DsbA、DsbB、DsbC、及びDsbDを過剰発現させ、組み換え型毒素タンパク質は分泌リーダーAzuに融合される。実施形態において、宿主細胞はセラリシンの発現を欠き、組み換え型毒素タンパク質は分泌リーダーPbp又はAzuに融合される。実施形態において、宿主細胞はHslUとHslVの発現を欠き、組み換え型毒素タンパク質は分泌リーダーPbp又はAzuに融合される。実施形態において、組み換え型毒素タンパク質はCRM197であり、宿主細胞は野生型であり、ここで、組み換え型毒素タンパク質は分泌リーダーPbp又はAzuに融合される。実施形態において、組み換え型毒素タンパク質はCRM197であり、組み換え型毒素タンパク質は、分泌リーダーAzu、Pbp、IbpS31A、CupA2、又はPbpA20Vに融合される。

20

30

【0029】

他の実施形態において、組み換え型毒素タンパク質はコレラ毒素Bであり、宿主細胞は、Lon、La、及びAprAの発現を欠き、又は宿主細胞は、HslU、HslV、Prc1、DegP1、DegP2、及びAprAの発現を欠く。関連する実施形態において、宿主細胞は、Lon、La、及びAprAの発現を欠き、ここで、組み換え型毒素タンパク質は、分泌リーダーPbp A20Vに融合される。

【0030】

他の実施形態において、組み換え型毒素タンパク質は、百日咳毒素S1 E129A R9Kであり、宿主細胞は、Lon、La、及びAprA；GrpE、DnaK、及びDnaJ；HtpX；RXF01590；又はppiB (RXF05345) の発現を欠いている。関連する実施形態において、組み換え型毒素タンパク質は、その自然の分泌リーダーに融合される。

40

【0031】

他の実施形態において、組み換え型毒素タンパク質は破傷風毒素Cであり、宿主細胞は、HslU、HslV、Prc1、DegP1、DegP2、及びAprAの発現を欠く。関連する実施形態において、組み換え型毒素タンパク質は、分泌リーダーDsbC、Pbp A20V、又はCupA2に融合される。

50

【0032】

他の実施形態において、組み換え型毒素タンパク質は破傷風毒素Cであり、宿主細胞は、Lon、La、及びAprAの発現を欠く。関連する実施形態において、組み換え型毒素タンパク質は分泌リーダーDsbAに融合される。

【0033】

他の実施形態において、組み換え型毒素タンパク質は破傷風毒素Cであり、宿主細胞は、GrpE、DnaK、及びDnaJの発現を欠く。関連する実施形態において、組み換え型毒素タンパク質は分泌リーダーNikAに融合される。

【0034】

他の実施形態において、組み換え型毒素タンパク質はクロストリジウムディフィシレ毒素Bであり、宿主細胞は、HtpX；DegP1；HslU、HslV、Prcl、及びPrcl2；又はLon及びDegP2の発現を欠き、又は宿主細胞は、Lon、Prcl、DegP2、AprAの発現を欠き、DegP2 S219Aを過剰発現する。

10

【0035】

実施形態において、組み換え型毒素タンパク質の活性は、活性アッセイにおいて測定され、ここで、生成された水溶性毒素タンパク質の約40%乃至約100%は、活性であると決定される。関連する実施形態において、活性アッセイは、免疫学アッセイ、受容体結合アッセイ、又は酵素アッセイである。

【0036】

本発明の実施形態において、発現ベクターは、タンパク質コード配列に効果的に連結されたlac誘導体プロモータを含み、ここで、培養は、約0.02乃至約1.0mMの濃度でIPTGを使用するプロモータの誘発を含み、誘発時の細胞密度は、約40乃至約200の吸光度単位(AU)の光学密度であり、培養のpHは、約6乃至約7.5であり、及び成長温度は約20乃至約35℃である。

20

【0037】

実施形態において、宿主細胞は緑膿菌細胞である。関連する実施形態において、宿主細胞はシュードモナスフルオレッセンスである。

【0038】

本発明の実施形態において、ヌクレオチド配列はシュードモナス菌宿主細胞における発現のために最適化された。関連する実施形態において、ヌクレオチド配列はシュードモナス宿主細胞における発現のために最適化された。他の関連する実施形態において、ヌクレオチド配列はシュードモナスフルオレッセンス宿主細胞における発現のために最適化された。

30

【0039】

実施形態において、百日咳毒素は野生型又はS1 E129A R9Kである。実施形態において、緑膿菌外毒素Aは野生型、CRM66、又はrEPAである。

【0040】

本発明の実施形態において、発現ベクターは、分泌シグナルのためのコード配列に隣接しているタグ配列を更に含む。実施形態において、発現ベクターは、毒素タンパク質のためのコード配列に隣接しているタグ配列を更に含む。

40

【0041】

本発明はまた、本明細書に記載の方法に従って生成された組み換え型毒素タンパク質を提供する。実施形態において、組み換え型毒素タンパク質は、CRM197、ジフテリア毒素、コレラホロトキシン、コレラ毒素B、百日咳毒素、破傷風毒素のフラグメントC、クロストリジウムディフィシレ毒素B、又は緑膿菌外毒素Aである。実施形態において、外毒素Aは野生型、CRM66、又はrEPAである。特定の実施形態において、組み換え型毒素タンパク質は、毒素の高収率を生成する又は高品質の毒素を生成するものとして本明細書で確認された、シュードモナスフルオレッセンスの菌株で生成される。特定の実施形態において、組み換え型の毒素タンパク質は、毒素タンパク質の最も高い収量をもたらすものとして、本明細書に記載のシュードモナスフルオレッセンスの菌株において生成

50

される。他の実施形態において、組み換え型毒素タンパク質は、毒素の発酵生成に使用されたものとして、本明細書に記載の菌株において生成される。

【0042】

〈引用による組み込み〉

この明細書で言及されるすべての公報、特許、及び特許出願は、個々の公報、特許、又は特許出願が、それぞれ、明確且つ個々に引用によって組み込まれると示されるように、同じ程度まで、引用によって本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0043】

本発明の新しい特徴は、特に、添付の特許請求の範囲内に明記される。本発明の特徴及び利点のより良い理解は、本発明の原理が利用される、具体例を明記する後述する詳細な説明を引用することによって、及び以下の添付図面によって得られるであろう。

【図1】CRM197の高スループット発現分析。図1Bで示されるDNA配列を使用して発現されるCRM197タンパク質は、毛細管のゲル電気泳動法（SDS-CGE）を使用して分析された。試験された40 CRM197-発現菌株の可溶性画分は、SDS-CGEデータから発生したゲル様の画像で示される。表10に記載されるような菌株名は、各々のレーン上に記録される。シュードモナスフルオレッセンスにより発現されたCRM197は、SDS-CGE（左の矢印）の上の～58 kDaにて、単一の結合として遊走した。第1のレーン及び最後のレーンにおける分子量マーカーは、16、20、29、48、69及び119 kDaである。

【図2】コレラ毒素Bの高スループット発現分析。配列番号：23で示されるDNA配列を使用して発現されたコレラ毒素Bは、毛細管のゲル電気泳動法（SDS-CGE）を使用して分析された。試験された40のコレラ毒素発現菌株からの可溶性画分は、SDS-CGEデータから発生したゲル様の画像で示される。表11に記載されるような菌株名は、各々のレーン上に記録される。誘発されたCTBは、SDS-CGE（左の矢印）の上の～11.5 kDaにて単一の結合として遊走した。第1のレーン及び最後のレーンにおける分子量マーカーは、16、20、29、48、69及び119 kDaである。

【図3】百日咳トキソイドオペロン。4210の塩基対を有するBPETOX_S1-R9K & E129Aが示される。

【図4A】百日咳トキソイドのDNA配列。翻訳を有する百日咳毒素S1 R9K E129A DNA配列が示される（配列番号：24）。配列は遺伝子バンクエントリーM13223に由来する。サブユニットS1-S5及びシグナル配列は配列上に示される。S1におけるR9K及びE129Aの変異が強調される。コード化されたタンパク質は、出現順で、配列番号25、26、28、29、及び27としてそれぞれ開示される。

【図4B】百日咳トキソイドのDNA配列。翻訳を有する百日咳毒素S1 R9K E129A DNA配列が示される（配列番号：24）。配列は遺伝子バンクエントリーM13223に由来する。サブユニットS1-S5及びシグナル配列は配列上に示される。S1におけるR9K及びE129Aの変異が強調される。コード化されたタンパク質は、出現順で、配列番号25、26、28、29、及び27としてそれぞれ開示される。

【図4C】百日咳トキソイドのDNA配列。翻訳を有する百日咳毒素S1 R9K E129A DNA配列が示される（配列番号：24）。配列は遺伝子バンクエントリーM13223に由来する。サブユニットS1-S5及びシグナル配列は配列上に示される。S1におけるR9K及びE129Aの変異が強調される。コード化されたタンパク質は、出現順で、配列番号25、26、28、29、及び27としてそれぞれ開示される。

【図4D】百日咳トキソイドのDNA配列。翻訳を有する百日咳毒素S1 R9K E129A DNA配列が示される（配列番号：24）。配列は遺伝子バンクエントリーM13223に由来する。サブユニットS1-S5及びシグナル配列は配列上に示される。S1におけるR9K及びE129Aの変異が強調される。コード化されたタンパク質は、出現順で、配列番号25、26、28、29、及び27としてそれぞれ開示される。

【図4E】百日咳トキソイドのDNA配列。翻訳を有する百日咳毒素S1 R9K E1

10

20

30

40

50

29A DNA配列が示される（配列番号：24）。配列は遺伝子バンクエントリーM13223に由来する。サブユニットS1-S5及びシグナル配列は配列上に示される。S1におけるR9K及びE129Aの変異が強調される。コード化されたタンパク質は、出現順で、配列番号25、26、28、29、及び27としてそれぞれ開示される。

【図5A】百日咳トキソイドサブユニットのアミノ酸配列。分泌シグナルが強調される。A. S1サブユニット（R9K E129A）（配列番号：25）。B. S2サブユニット（配列番号：26）。C. S3サブユニット（配列番号：27）。D. S4サブユニット（配列番号：28）。E. S5サブユニット（配列番号：29）。

【図5B】百日咳トキソイドサブユニットのアミノ酸配列。分泌シグナルが強調される。A. S1サブユニット（R9K E129A）（配列番号：25）。B. S2サブユニット（配列番号：26）。C. S3サブユニット（配列番号：27）。D. S4サブユニット（配列番号：28）。E. S5サブユニット（配列番号：29）。

10

【図5C】百日咳トキソイドサブユニットのアミノ酸配列。分泌シグナルが強調される。A. S1サブユニット（R9K E129A）（配列番号：25）。B. S2サブユニット（配列番号：26）。C. S3サブユニット（配列番号：27）。D. S4サブユニット（配列番号：28）。E. S5サブユニット（配列番号：29）。

【図5D】百日咳トキソイドサブユニットのアミノ酸配列。分泌シグナルが強調される。A. S1サブユニット（R9K E129A）（配列番号：25）。B. S2サブユニット（配列番号：26）。C. S3サブユニット（配列番号：27）。D. S4サブユニット（配列番号：28）。E. S5サブユニット（配列番号：29）。

20

【図5E】百日咳トキソイドサブユニットのアミノ酸配列。分泌シグナルが強調される。A. S1サブユニット（R9K E129A）（配列番号：25）。B. S2サブユニット（配列番号：26）。C. S3サブユニット（配列番号：27）。D. S4サブユニット（配列番号：28）。E. S5サブユニット（配列番号：29）。

【図6】百日咳トキソイド発現サンプルのウェスタンブロット解析。菌株名は各々のレーン上に記録される。誘発されたPtxは、11乃至26kDa（S1：26.1kDa、S2：20.9kDa、S3：21.8kDa、S4（2x）：12kDa、S5：11kDa）に及ぶ複数の結合として遊走した。A. 減少したサンプル。B. 減少していないサンプル。両方のパネル：レーン1-分子量マーカー（10、15、20、25、37、50、75、100、150、250kDa）；レーン2-ヌル；レーン3-菌株321；レーン4-菌株322；レーン5-菌株323；レーン6-菌株324；レーン7-菌株325；レーン8-菌株326；レーン9-菌株327；レーン10-菌株328。

30

【図7】破傷風毒素Cのフラグメントの発現。シュードモナスフルオレッセンスにおいて発現された破傷風毒素Cのフラグメントは、毛細管のゲル電気泳動法（SDS-CGE）を使用して分析された。試験された40の破傷風毒素発現菌株からの可溶性画分は、SDS-CGEデータから発生したゲル様の画像で示される。表15に記載されるような菌株名は、各々のレーン上に記録される。誘発された破傷風毒素Cのフラグメントは、SDS-CGE（左の矢印）の上の～51.6kDaにて単一の結合として遊走した。第1のレーン及び最後のレーンにおける分子量マーカーは、16、20、29、48、69及び119kDaである。

40

【図8】TcdB発現。シュードモナスフルオレッセンスにおいて発現されたTcdBは、毛細管のゲル電気泳動法（SDS-CGE）を使用して分析された。試験された24のTcdB発現菌株からの可溶性画分は、SDS-CGEデータから発生したゲル様の画像で示される。ヌルの抽出物及び標準試料（List Biologicals）と同様に表18に記載されるような菌株名は、各々のレーン上に記録される。誘発されたTcdBは、SDS-CGE（左の矢印）の上の～300kDaにて単一の結合として遊走した。第1のレーン及び最後のレーンにおける分子量マーカーは、16、20、29、48、69及び119kDaである。

【図9A】外毒素Aアミノ酸配列。緑膿菌外毒素Aのアミノ酸配列が示される（配列番号：34）。3つの外毒素Aタンパク質が図面によって示される：野生型、CRM66、及

50

び r E P A。異なる C R M 6 6 において、H i s 4 2 6（きわだって強調されたテキスト）は、配列上に示されるような T y r と交替する。r E P A において、配列上に示されるように、G l u 5 5 3（きわだって強調されたテキスト）は消される。

【図 9 B】外毒素 A アミノ酸配列。緑膿菌外毒素 A のアミノ酸配列が示される（配列番号：34）。3つの外毒素 A タンパク質が図面によって示される：野生型、C R M 6 6、及び r E P A。異なる C R M 6 6 において、H i s 4 2 6（きわだって強調されたテキスト）は、配列上に示されるような T y r と交替する。r E P A において、配列上に示されるように、G l u 5 5 3（きわだって強調されたテキスト）は消される。

【図 10】シュードモナスフルオレッセンス発酵培養における可溶性のコレラ毒素 B の生成。S D S - C G E 分析。レーン 1 - 1 6、2 0、2 9、4 8、6 9 及び 1 1 9 k D a の分子量マーカー。それぞれ、P S 5 3 8 - 0 8 8 U 5 発酵のレーン 2 誘発前サンプル及びレーン 3 誘発後サンプル、及び P S 5 3 8 - 0 8 8 U 6 発酵のレーン 4 誘発前サンプル及びレーン 5 誘発後サンプルであり、それらによるコレラ毒素 B の発現は、右の矢印で示される。

10

【図 11】シュードモナスフルオレッセンス発酵培養における可溶性の破傷風毒素のフラグメント C の生成。A. S D S - C G E 分析。レーン 1 - 1 6、2 0、2 9、4 8、6 9 及び 1 1 9 k D a の分子マーカー。レーン 2、3 及び 4 は、右側で矢印によって示された、破傷風毒素のフラグメント C を発現する、それぞれ P S 5 3 8 - 5 2 9 U 1、P S 5 3 8 - 5 4 6 U 5 及び P S 5 3 8 - 5 4 7 U 7 発酵の誘発後のサンプルである。B. ウェスタンブロット分析。菌株 P S 5 3 8 - 5 3 8（U 1 と U 2）、P S 5 3 8 - 5 4 8（U 3 と U 4）、P S 5 3 8 - 5 5 8（U 5 と U 6）及び P S 5 3 8 - 5 6 8（U 7 と U 8）からの発酵サンプルは、ウェスタンブロットによって評価された。発酵単位及び誘発後の時間（I 0、I 8、I 2 4）は各々のレーン上に示される。分子量（MW）基準はブロットの左側に示され、破傷風毒素 C の標準試料（S t d； L i s t B i o l o g i c a l, C a t # 1 9 3）は右側に示される。ブロットは、抗ラビット I g G ペルオキシダーゼが後続するラビット（A b c a m, C a t #： a b 3 4 8 9 0）で得られ、ヤギ（P i e r c e, C a t #： 3 1 4 6 0）で得られた、多クローンの抗破傷風毒素 C のフラグメントにより調べられた。I m m u n o p u r e M e t a l E n h a n c e d D A B（P i e r c e 3 4 0 6 5）は、検出に使用された。

20

【図 12】シュードモナスフルオレッセンス発酵培養における可溶性のクロストリジウムディフィシレ B 毒素タンパク質産生。レーン 1 - 1 6、2 0、2 9、4 8、6 9 及び 1 1 9 k D a の分子量マーカー。マーカーの大きさも、レーン 1 における遊走に基づき、右側にそれぞれの位置で示される。レーン 2、3 及び 4 は、右側にて矢印によって示された、クロストリジウムディフィシレ B 毒素タンパク質を発現する、それぞれ P S 5 3 8 - 6 7 1 U 5 及び U 6、及び P S 5 3 8 - 6 7 4 U 7 発酵の誘発後のサンプルである。

30

【図 13 A】野生型の百日咳トキソイドの D N A 配列。翻訳を有する野生型の百日咳毒素の D N A 配列が示される（配列番号：35）。配列は遺伝子バンクエントリー M 1 3 2 2 3 からである。サブユニット S 1 - S 5 及びシグナル配列は配列上に示される。コード化されたタンパク質は、出現順で、配列番号 4 1 - 4 5 としてそれぞれ開示される。

【図 13 B】野生型の百日咳トキソイドの D N A 配列。翻訳を有する野生型の百日咳毒素の D N A 配列が示される（配列番号：35）。配列は遺伝子バンクエントリー M 1 3 2 2 3 からである。サブユニット S 1 - S 5 及びシグナル配列は配列上に示される。コード化されたタンパク質は、出現順で、配列番号 4 1 - 4 5 としてそれぞれ開示される。

40

【図 13 C】野生型の百日咳トキソイドの D N A 配列。翻訳を有する野生型の百日咳毒素の D N A 配列が示される（配列番号：35）。配列は遺伝子バンクエントリー M 1 3 2 2 3 からである。サブユニット S 1 - S 5 及びシグナル配列は配列上に示される。コード化されたタンパク質は、出現順で、配列番号 4 1 - 4 5 としてそれぞれ開示される。

【図 13 D】野生型の百日咳トキソイドの D N A 配列。翻訳を有する野生型の百日咳毒素の D N A 配列が示される（配列番号：35）。配列は遺伝子バンクエントリー M 1 3 2 2 3 からである。サブユニット S 1 - S 5 及びシグナル配列は配列上に示される。コード化

50

されたタンパク質は、出現順で、配列番号41-45としてそれぞれ開示される。

【図13E】野生型の百日咳トキソイドのDNA配列。翻訳を有する野生型の百日咳毒素のDNA配列が示される（配列番号：35）。配列は遺伝子バンクエントリーM13223からである。サブユニットS1-S5及びシグナル配列は配列上に示される。コード化されたタンパク質は、出現順で、配列番号41-45としてそれぞれ開示される。

【図14A】コレラホロトキシンのアミノ酸及びDNA配列。A. 分泌リーダー（強調された）とのCTAアミノ酸配列（配列番号：38）（AE003852；タンパク質ID AAF94614.1）。B. 分泌リーダー（強調された）とのCTBアミノ酸配列（配列番号：39）（GenBank AE003852；タンパク質ID AAF94613.1）。C. 示された翻訳を有する、AとBのサブユニットを示すCTX DNA配列（配列番号：40）（Genbank AE003852）。コード化されたタンパク質は、出現順で、配列番号38及び39としてそれぞれ開示される。

10

【図14B】コレラホロトキシンのアミノ酸及びDNA配列。A. 分泌リーダー（強調された）とのCTAアミノ酸配列（配列番号：38）（AE003852；タンパク質ID AAF94614.1）。B. 分泌リーダー（強調された）とのCTBアミノ酸配列（配列番号：39）（GenBank AE003852；タンパク質ID AAF94613.1）。C. 示された翻訳を有する、AとBのサブユニットを示すCTX DNA配列（配列番号：40）（Genbank AE003852）。コード化されたタンパク質は、出現順で、配列番号38及び39としてそれぞれ開示される。

【図14C】コレラホロトキシンのアミノ酸及びDNA配列。A. 分泌リーダー（強調された）とのCTAアミノ酸配列（配列番号：38）（AE003852；タンパク質ID AAF94614.1）。B. 分泌リーダー（強調された）とのCTBアミノ酸配列（配列番号：39）（GenBank AE003852；タンパク質ID AAF94613.1）。C. 示された翻訳を有する、AとBのサブユニットを示すCTX DNA配列（配列番号：40）（Genbank AE003852）。コード化されたタンパク質は、出現順で、配列番号38及び39としてそれぞれ開示される。

20

【図14D】コレラホロトキシンのアミノ酸及びDNA配列。A. 分泌リーダー（強調された）とのCTAアミノ酸配列（配列番号：38）（AE003852；タンパク質ID AAF94614.1）。B. 分泌リーダー（強調された）とのCTBアミノ酸配列（配列番号：39）（GenBank AE003852；タンパク質ID AAF94613.1）。C. 示された翻訳を有する、AとBのサブユニットを示すCTX DNA配列（配列番号：40）（Genbank AE003852）。コード化されたタンパク質は、出現順で、配列番号38及び39としてそれぞれ開示される。

30

【図15】シュードモナスフルオレッセンス発酵培養における可溶性のrEPA生成のSDS-CGEのゲル様の画像。シュードモナスフルオレッセンスの発酵培養において発現された可溶性のrEPAは、毛細管のゲル電気泳動法（SDS-CGE）を使用して分析された。試験される、試験された誘発後0及び24時間での、発現菌株PS538-1633（u1とu2）、PS538-1640（u3とu5）及びPS538-1670（u6、u7及びu8）の発酵からの可溶性画分は、SDS-CGEデータから発生したゲル様の画像で示される。Mv = 分子量基準（16、20の、29、48及び69キロダルトン）。

40

【図16】シュードモナスフルオレッセンスの発酵培養における可溶性のrEPA生成トレンド。可溶性のrEPA発現レベルは、それぞれの発酵（u1、u2、u3、u6、u7及びu8）における菌株（PS538-1633、PS538-1640及びPS538-1670）のSDS-CGE分析によって測定されるように、誘発後の時間に対して図示される。

【図17】シュードモナスフルオレッセンスの発酵培養における可溶性のrEPA生成のウェスタンブロット。シュードモナスフルオレッセンスの発酵培養において発現された可溶性のrEPAは、ウェスタンブロット解析を使用して分析された。誘発後の0及び24時間での発現菌株PS538-1633（u1）、PS538-1640（u3とu5）

50

及びPS538-1670 (u6とu8)の発酵からの可溶性画分は、緑膿菌外毒素Aに特異的な抗体を使用するウェスタンブロット解析において示される。Mw＝分子量基準。std＝rEPA標準。

【図18】シュードモナスフルオレッセンス発酵培養における可溶性のCRM197生成のSDS-CGEのゲル様の画像。シュードモナスフルオレッセンスの発酵培養において発現されたCRM197は、毛細管のゲル電気泳動法(SDS-CGE)を使用して分析された。試験された誘発後の様々な時間(0、16、21及び23時間)での、発現菌株PS538-772 (u1とu2)、PS538-776 (u3とu5)及びPS538-782 (u6とu7)の様々な発酵からの可溶性画分は、SDS-CGEデータから発生したゲル様の画像において示される。Mw＝分子量基準(16、20の、29、48、68及び119キロダルトン)。

10

【図19】シュードモナスフルオレッセンスの発酵培養における可溶性のCRM197生成トレンド。それぞれの発酵(u1、u2、u3、u6及びu7)において異なる菌株(PS538-772、PS538-776及びPS538-782)からのSDS-CGEによって測定されるような可溶性のCRM197発現レベルは、誘発後の時間に対抗して図示される。

【図20】シュードモナスフルオレッセンス発酵培養における可溶性のCRM197生成のウェスタンブロット。シュードモナスフルオレッセンスの発酵培養において発現されたCRM197は、ウェスタンブロット解析を使用して分析された。試験される誘発後の様々な時間(0、16、21及び23時間)にて、発現菌株PS538-772 (u1とu2)、PS538-776 (u3とu5)及びPS538-782 (u6とu7)の様々な発酵からの可溶性画分は、ジフテリア毒素特異抗体を使用するウェスタンブロット解析において示される。Mw＝分子量基準(37、50の、75、100、150及び250キロダルトン)。STD＝CRM197基準。

20

【発明を実施するための形態】

【0044】

〈毒素〉

〈ADPリボシル化毒素〉

ADPリボシル化毒素(ADPRT)は、ニコチンアミドとNADのN-リボースの間のN-グリコシル結合の切断を促進し、標的タンパク質にADPリボース部分を移動する。ADPRTはそれぞれの標的に基づいて4つのファミリーに分類される。I型ADPRTはヘテロマーのGTP結合タンパク質を標的とする。それらは、コレラ毒素(CTX)、百日咳毒素(PTX)及び大腸菌易熱性毒素(LT)を含む。II型ADPRT(ジフテリア毒素及びシュードモナス菌外毒素Aは伸長因子2(EF2)を修正する。III型ADPRT(ボツリヌス菌C3細胞外酵素)は、小さなGTP結合タンパク質をADPリボシル化する。IV型ADPRT ADP-リボシル化アクチン。これらのアクチンに特異的なADPRTは、クロストリジウムボツリヌス菌C2毒素、ウェルシュ菌 ϵ -毒素、クロストリジウムディフィシレ毒素(引用により本明細書に組み込まれた、「Popoff, et al., 1988, "Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a Clostridium difficile strain," Infection and Immunity 56(9):2299-2306」に記載される、TcdAとTcdBとは異なる毒素)、C. spiroforme毒素、及びセレウス菌の成長力のある殺虫のタンパク質(VIP)を含む、二成分の毒素のファミリーを含む。

30

40

【0045】

各々の型のADPRTからの様々な酵素の成分の構造は、NADによって又はNAD無しで決定され、例えば、引用により本明細書に組み込まれた、「Tsuge, et al., 2008, "Structural basis of actin recognition and arginine ADP-ribosylation by Clostridium perfringens toxin," PNAS

50

105 (21): 7399-7404」により考察される。典型的なアクチン特異的ADPRTは2つの類似したドメインを所有する：触媒能力に不可欠であるCドメイン；及び結合及び転位サブユニットとの相互作用に重要であるNドメイン。対照的に、サルモネラ菌及びIII型ADPRT C3からのSpvBは、ADPリボース転移酵素ドメインを1つだけ有し、N末端アダプタードメインを欠く。すべてのIV型ADPRTにおいて、2つの重要なグルタミン酸残留物を含むEXEモチーフは、触媒中心に存在する。EXEモチーフの前のグルタメートは、ADPリボース転移酵素に重要な残留物であると思われる、それはアクチン中のArg-177から脱プロトン化させられる。後のグルタミン酸は、N-リボース上でO'2を有する水素結合を形成し、オキソカルベニウム陽イオンを安定させると思われる。

10

【0046】

ADPRTは、全てが引用によって本明細書に組み込まれる、「Barth, et al., 2004, "Binary Bacterial Toxins: Biochemistry, Biology, and Application of Common Clostridium and Bacillus Proteins," Microbiology and Molecular Biology Reviews 68 (3): 373-402」；「Mueller-Dieckmann, et al., "Structure of mouse ADP-ribosylhydrolase 3 (mARH3)," Acta Cryst F64: 156-162」；「Kulich, et al., 1995, "Expression of Recombinant Exoenzyme S of Pseudomonas aeruginosa," Infection and Immunity 63 (1): 1-8」；「Sakurai, et al., 2009, "Clostridium perfringens Iota-Toxin: Structure and Function," Toxins 1: 208-228」；及び「Schirmer, et al., 2002, "The ADP-ribosylating Mosquitocidal Toxin from Bacillus sphaericus," The Journal of Biological Chemistry 277 (14): 11941-11948」によって更に記載される。

20

【0047】

本発明の実施形態において、ADPRTを含むグループから選択された組み換え型毒素タンパク質が生成される。実施形態において、ADPRTのグループは、CTX (CTA及び／又はCTB)、PTX、DT (CRM197及び／又はWT)、及びシュードモナス菌外毒素Aから成る。実施形態において、ADPRTのグループは、CTX (CTA及び／又はCTB)、PTX、及びシュードモナス菌外毒素Aから成る。他の実施形態において、I型ADPRTを含むグループから選択された組み換え型毒素タンパク質が生成される。実施形態において、I型ADPRTのグループはCTX (CTA及び／又はCTB)、及びPTXから成る。他の実施形態において、III型ADPRTを含むグループから選択された組み換え型毒素タンパク質が生成される。実施形態において、III型ADPRTのグループは、DT (CRM197及び／又はWT)、及びシュードモナス菌外毒素Aから成る。

30

40

他の実施形態において、IV型ADPRTを含むグループから選択された組み換え型毒素タンパク質が生成される。実施形態において、IV型ADPRTはTcdBである。

【0048】

<CRM197及びDT>

交差反応性物質197 (CRM197) は、ミスセンス突然変異を有するDT遺伝子から生成されたジフテリア毒素 (DT) 変異体である。DTはADPリボシル化毒素である；CRM197は、DTのADPリボース転移酵素 (ADPRT) 活性を欠き、したがって無毒である。CRM197のための遺伝子は、単独ベース置換を有し、残留物52にてグリシンの代わりにグルタミン酸の取り込みをもたらす。(例えば、全てが引用によって

50

本明細書に組み込まれる、「Bishai, et al., 1987, "High-Level Expression of a Proteolytically Sensitive Diphtheria toxin Fragment in Escherichia coli," J. Bact. 169(11):5140-51」、「Giannini, et al., 1984, "The Amino-Acid Sequence of Two Non-Toxic Mutants of Diphtheria toxin: CRM45 and CRM197," Nucleic Acids Research 12(10): 4063-9」、及び「GenBank Acc. No. 1007216A」を参照。）

【0049】

10

CRM197タンパク質は、当該技術分野において既知の方法によって、又はジフテリア菌又は他の微生物における発現によって低レベルで調製され得る。自然発生の、又は野生型の、ジフテリア毒素は、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関を含む様々な公共のソースから利用可能な毒素産生菌から得られ得る。ジフテリア菌においてCRM197タンパク質を生成するためのプラスミドシステムは、例えば、その全体において引用によって本明細書に組み込まれる、米国特許第5,614,382号、「Plasmid for Production of CRM Protein and Diphtheria toxin」に記載される。

【0050】

ヌクレオチド配列は、コリネバクテリオファージ β によって運ばれたジフテリア毒素のための野生型構造遺伝子の既知のDTヌクレオチド配列に基づき、組換えDNA技術（例えば、「Sambrook et al, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989」に記載）の技術を使用して、及び部位特異的変異誘発によっても調製され得る。（例えば、引用によって本明細書に組み込まれる、「Greenfield, et al., 1993, "Nucleotide Sequence of the Structural Gene for Diphtheria toxin Carried by Corynebacteriophage 18," Proc Nat Acad Sci 80:6953-7」を参照。）本明細書の他の部分に記載されるように、ヌクレオチド配列は最適化され得る。

20

30

【0051】

本発明の実施形態において、CRM197又はDTは、実施例1における本明細書に記載の宿主菌株の何れかを使用して、実施例1に記載の発現ベクター（プラスミド）の何れかと組み合わせて生成される。実施形態において、核酸配列はシュドモナス菌宿主細胞における発現のために最適化される。実施形態において、使用される発現ベクターは、組み換え型のCRM197又はDTタンパク質に融合される、表8及び表3に記載の分泌物リーダーの何れかを発現する構築物を含む。実施形態において、自然の分泌リーダーが使用される。特定の実施形態において、CRM197又はDTタンパク質は、タグ、例えば精製タグにより発現される。実施形態において、本発明の方法は、約0.5 g/L乃至少なくとも約12 g/Lの収量で、CRM197又はDTを生成するために使用される。

40

【0052】

〈コレラ毒素〉

コレラ菌によって産出されたコレラ毒素（CTX）はまた、ADPリボシル化毒素である。コレラ毒素（CTX）は、6つのサブユニットタンパク質から構成されたオリゴマーの複合体である：コレラ毒素Aサブユニット（CTA）の単一のコピー、及びコレラ毒素Bサブユニット（CTB）の5つのコピー。各々12 kDaの重量を有する5つのBサブユニットは五員環を形成する。Aサブユニットは、A1部分、CTA1、Gタンパク質をADP-リボシル化する球状の酵素、及びA2鎖、CTA2を有し、それは、Bサブユニット環の中央のポアにきっちり位置する拡張した α 螺旋体を形成する。この環は、宿主細胞表面上のGM1ガングリオシド受容体に結合し、全複合体の内部移行をもたらす。一旦

50

内部移行されると、CTA1鎖はジスルフィド架橋の減少によって放出される。その後、CTA1は活性化され、アデニル酸シクラーゼのADPリボシル化を触媒する。アデニル酸シクラーゼ活性において結果として生じる増加は、環状AMP合成を増加させ、それは大量の液体及び電解質流出を引き起こし、下痢をもたらす。

【0053】

CTXのBサブユニットは、比較的無害であるが、GM1ガングリオシド受容体に結合するその能力を保持する。それ故、CTBは、化学的に又は遺伝学的に結合した異種抗原の粘膜の取り込みの促進における使用を見出す。粘膜及び全身性の免疫を誘発することが実証されており、食用のワクチン生成で使用される候補である。その結合優先 (binding preference) のため、CTBはまた、神経細胞のトレーサーとしての使用を見出す。

10

【0054】

その構造の特徴と同様にCTBの使用も、例えば、その全てが引用により本明細書に組み込まれる、「Nozoye, et al., 2009, “Production of *Ascaris suum* As14 Protein and Its Fusion Protein with Cholera Toxin B Subunit in Rice Seeds,” *Parasitology* 995-1000」; 「Harakuni, et al., 2005, “Heteropentameric Cholera Toxin B Subunit Chimeric Molecules Genetically Fused to a Vaccine Antigen Induce Systemic and Mucosal Immune Responses: a Potential New Strategy to Target Recombinant Vaccine Antigens to Mucosal Immune Systems,” *Infection and Immunity* 73 (9): 5654-5665」; 「Price, et al., 2005, “Intranasal Administration of Recombinant *Neisseria gonorrhoeae* Transferrin Binding Proteins A and B Conjugated to the Cholera Toxin B Subunit Induces Systemic and Vaginal Antibodies in Mice,” *Infection and Immunity* 73 (7): 3945-3953」; 及び「Sun, et al., 1999, “Intranasal Administration of a *Schistosoma mansoni* Glutathione S-Transferase-Cholera Toxoid Conjugate Vaccine Evokes Antiparasitic and Antipathological Immunity in Mice,” *J. Immunol.* 163: 1045-1052」に記載される。

20

30

【0055】

本発明の実施形態において、CTB又はCTXは、例1において本明細書に記載の宿主菌株の何れかを使用して、例3に記載の発現ベクターの何れかと組み合わせて生成される。実施形態では、核酸配列はシュードモナス菌宿主細胞における発現のために最適化される。実施形態において、使用される発現ベクターは、組み換え型CTB又はCTXタンパク質に融合される表8及び表3に記載の分泌リーダーの何れかを発現する構築物を含む。実施形態において、自然の分泌リーダーが使用される。特定の実施形態において、CTB又はCTXタンパク質は、タグ、例えば精製タグにより発現される。実施形態において、本発明の方法は、約0.2 g/L乃至少なくとも約5 g/Lの収量でCTB又はCTXを生成するために使用される。

40

【0056】

〈百日咳毒素〉

百日咳毒素は、百日咳菌によって生成された菌体外毒素と病原性の因子、疾患百日咳を

50

引き起こすヒト気道の病原菌である。百日咳ホロトキシンは、AB5構造とのマルチサブユニットの複合体である。酵素学的に活性なAサブユニット（S1）は、哺乳動物細胞において幾つかのヘテロ三量体のGタンパク質（主としてGiタンパク質）のアルファサブユニットを修正するADPリボース転移酵素であり、Bオリゴマー（S2、S3、S4の2つのコピー、及びS5）は、細胞上の複合糖質受容体を結合する。S1は、細胞エントリーの後にタンパク分解性に処理される。引用により本明細書に組み込まれる、「Carbonetti, et al., 2005, "Proteolytic Cleavage of Pertussis Toxin S1 Subunit is Not Essential for Its Activity in Mammalian Cells," BMC Microbiology 5:7」は、S1の処理が哺乳動物細胞におけるその細胞毒性活性に不可欠ではないと報告した。

10

【0057】

百日咳毒素の無毒な変異体はワクチンにおいて使用するために調査された。本発明の方法を使用して生成された百日咳毒素タンパク質は、百日咳から保護するためのワクチンにおける使用のために熟考される。百日咳毒素はまた、例えば、引用によって本明細書に組み込まれる、「Roberts, et al., 1995, "A Mutant Pertussis Toxin Molecule That Lacks ADP-Ribosyltransferase Activity, PT-9K/129G, Is an Effective Mucosal Adjuvant for Intranasally Delivered Proteins," Infection and Immunity 63(6):2100-2108」に記載されるように、ワクチンアジュバントとして試験された。更に、百日咳毒素はまた、研究目的、例えば、Gタンパク質シグナル経路（例えば、引用により本明細書に組み込まれる「McCoy, et al., 2010, "PAR1 and PAR2 couple to overlapping and distinct sets of G proteins and linked signaling pathways to differentially regulate cell physiology," Molecular Pharmacology Fast Forward MOL 62018」）に関する研究のために、及び自己免疫性疾患、例えば、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）、実験的自己免疫性精巣炎、実験的自己免疫性のブドウ膜炎などの誘発を高めるアジュバントとして役立つ（引用により本明細書に組み込まれる「Su, et al., 2001, "Pertussis Toxin Inhibits Induction of Tissue-Specific Autoimmune Disease by Disrupting G Protein-Coupled Signals," J Immunol 167:250-256.」）。

20

30

【0058】

毒素の5つのサブユニットは、図3に示される、百日咳トキシノイドオペロンから発現される。特定の変異体を含む百日咳毒素タンパク質の発現及び構造は、全てその全体において引用により組み込まれる、「Burnette, et al., 1992, "Properties of Pertussis Toxin B Oligomer Assembled In Vitro from Recombinant Polypeptides Produced by Escherichia coli," Infection and Immunity 60(6):2252-2256」；米国特許第5,085,862号「Genetic detoxification of pertussis toxin」；及び「Kaslow, et al., 1987, "Structure-Activity Analysis of the Activation of Pertussis Toxin," Biochemistry 26(1):123-7」によるものと同様、上記で引用された報告に記載される。

40

【0059】

50

本明細書で使用されるような百日咳毒素又はPTXは、百日咳毒素突然変異体S1 R9K E129A又は野生型のタンパク質を指す。野生型の百日咳毒素及び百日咳毒素突然変異体S1 R9K E129Aは、例えば、全てその全体において引用により組み込まれる、「Roberts, et al., 1995」(上記で引用)；米国特許第7, 427, 404号及び米国特許第7, 666, 436号、両方の表題「Pertussis Toxin Mutants, Bordetella Strains Capable of Producing Such Mutants and Their Use in the Development of Antipertussis Vaccines」；米国特許第5, 935, 580号、「Recombinant Mutants for Inducing Specific Immune Responses」；米国特許第7, 169, 399号、「Non-Toxic Double Mutant Forms of Pertussis Toxin as Adjuvants」；米国特許第5, 785, 971号及び米国特許第5, 427, 788号、両方の表題「Pertussis Toxin and Use in Vaccines」；及び米国特許第5, 773, 600号、「DNA Encoding Pertussis Toxin Muteins」に記載される。

【0060】

本発明の実施形態において、百日咳毒素突然変異体S1 E129A又は野生型の百日咳毒素は、実施例1、5及び7において本明細書に記載の宿主菌株の何れかを使用して生成される。実施形態において、使用される発現ベクターは、組み換え型PTXタンパク質に融合される表8及び表3に記載される分泌リーダーの何れかを発現する構築物を含む。実施形態において、自然の分泌リーダーが使用される。実施形態において、配列をコード化するサブユニットの何れか又は全ては、本明細書に別記されるように、選択されるシュードモナス菌宿主における発現のために最適化される。特定の実施形態において、サブユニットは、例えば、当該技術分野において周知の方法に従って個々の配列をサブクローン化することにより、2以上の構築物から発現される。特定の実施形態において、PTXタンパク質は、タグ、例えば精製タグにより発現される。実施形態において、本発明の方法は、約0.2 g/L乃至少なくとも約5 g/Lの収量でPTX又はPTXの個々のサブユニットを生成するために使用される。

【0061】

〈破傷風毒素のフラグメントC〉

破傷風菌によって産出された破傷風毒素は、150 kDaの分子量を有する神経毒である。それは2つの部分から構成される：100 kDaの重鎖又はB鎖及び50 kDaの軽鎖又はA鎖。鎖は、ジスルフィド結合によって連結される。B鎖は、神経細胞の細胞膜上のジシアロガングリオシド(GD2及びGD1b)に結合する。A鎖、亜鉛エンドペプチダーゼは、小胞に関連する膜タンパク質(VAMP)を攻撃する。

【0062】

A鎖の作用は、影響を受けた神経細胞が、タンパク質シナプトブレビンの分解により抑制性神経伝達物質GABA(γ-アミノ酪酸)及びグリシンを放出するのを止める。この結果は、最も小さな刺激からの筋肉における危険な活動過剰、即ち、感覚の刺激による運動反射の阻害ができないことである。これは、テタニー性攣縮と称される、アゴニスト及びアンタゴニスト筋肉組織の一般化された収縮を引き起こす。

【0063】

破傷風毒素のフラグメントC(TetC又はTTC)は、破傷風毒素のプロテアーゼ開裂(例えばパパインによる)によって、又はフラグメントの組み換え型の発現を通じて発生した50 kDのポリペプチドである。それは、C末端での451のアミノ酸に相当する(アミノ酸位置865-1315)。フラグメントCの組み換え型の発現は、例えば、その全体において全て引用により本明細書に組み込まれる、米国特許第5, 443, 966号、「Expression of Tetanus Toxin Fragment C」、WO/2005/000346、「Carrier Proteins for

Vaccines」、第6,010,871号、「Modification of Peptide and Protein」に開示される。

【0064】

フラグメントCは、無毒であり、マウスとモルモットにおける防御免疫応答を刺激できることが示された。米国特許第5,443,966号は、破傷風毒素の配列及び大腸菌におけるフラグメントCの生成を記載する。酵母における組み換え型のTTCの発現は、例えば、その全体において引用により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,571,694号、「Expression of Tetanus Toxin Fragment C in Yeast」に記載された。

【0065】

それが高い特異性と親和性により神経細胞に結合するため、TTCは、神経細胞の薬物送達、又は研究目的のために標的とする分子としての使用を見出す。そのような使用は、例えば、引用により本明細書に組み込まれる、「Tetanus toxin C fragment conjugated nanoparticles for targeted drug delivery to neurons, ” Biomaterials 28 (34) : 5176-5184」に記載される。

【0066】

TTCタンパク質はまた、例えばWO/2005/000346に記載されるように、ワクチン担体タンパク質として潜在的に有用であり、クロストリジウムテタニ感染から保護するためのワクチンにおいて使用するために調査された。

【0067】

本発明の実施形態において、TTCは、実施例1における本明細書に記載の宿主菌株の何れかを使用して、実施例8に記載の発現ベクターの何れかと組み合わせて生成される。実施形態では、核酸配列はシュドモナス菌宿主細胞における発現のために最適化される。実施形態において、使用される発現ベクターは、組み換え型TTCのタンパク質に融合する表8及び表3に記載の分泌リーダーの何れかを発現する構築物を有する。特定の実施形態において、TTCのタンパク質は、タグ、例えば精製タグにより発現される。実施形態において、自然の分泌リーダーが使用される。実施形態において、本発明の方法は、約0.5 g/L乃至少なくとも約12 g/Lの収量でTTCを生成するために使用される。

【0068】

〈クロストリジウムディフィシル毒素B〉

クロストリジウムディフィシル毒素B (TcdB) は、クロストリジウムディフィシルによって生成された病原性因子であり、それは院内での下痢及び偽膜性大腸炎を引き起こす。TcdB、及び第2の大きなクロストリジウム毒素、TcdAは、偽膜性大腸炎の進行に関係する。

【0069】

TcdB (約270 kDのグルコシル化毒素) は、酵素、転位及び受容体結合のドメインに分けることができる。TcdBの第1の546アミノ酸は、酵素の領域を含み、それは、推定上の転位及び受容体結合ドメインに続く。酵素活性は、このフラグメントのアミノ又はカルボキシ末端欠失が活性を減少するように、アミノ末端546の残留物を必要とすると報告された。酵素領域内で、トリプトファン102は、UDP-グルコース結合に不可欠であると示された。LC T内で保存されたDXDモチーフは、LC Tグルコシルトランスフェラーゼ活性に不可欠である。TcdB及びTcsL酵素ドメインのキメラの分析に関係する研究は、残留物364乃至516が基質特異性を付与することを示唆する。

【0070】

TcdBの構造及びその発現並びにクロストリジウムディフィシル感染のための保護ワクチンとしての潜在的な使用は、例えば、その全体において全て引用により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,226,597号、「Mutants of Clostridium Difficile Toxin B and Methods of Use」; 「Jank, et al., 2008, “Structure and

10

20

30

40

50

mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model, " Trends in Microbiology 16 (5) : 222-229」; 「Sullivan, et al., 1982, " Purification and Characterization of Toxins A and B of Clostridium difficile, " Infection and Immunity 35 (3) : 1032-1040」; 及び「Yang, et al., 2008, " Expression of recombinant Clostridium difficile toxin A and B in Bacillus megaterium, " BMC Microbiology 8 : 192」にて考察される。

10

【0071】

本発明の実施形態において、TcdBは、実施例1、5及び7における本明細書に記載の宿主菌株の何れかを使用して生成される。実施形態では、核酸配列はシュドモナス宿主細胞における発現のために最適化される。実施形態において、使用される発現ベクターは、組み換え型TcdBタンパク質に結合される表8及び表3に記載の分泌リーダーの何れかを発現する構築物を含む。実施形態において、自然の分泌リーダーが使用される。特定の実施形態において、TcdBタンパク質は、タグ、例えば精製タグにより発現される。実施形態において、本発明の方法は、約0.5g/L乃至少なくとも約10g/Lの収量でTcdBを生成するために使用される。

【0072】

20

〈緑膿菌外毒素A〉

緑膿菌外毒素A (ETA又はPE) は、II型ADPRTである。それは、触媒ドメインを哺乳動物細胞へと移動させることができ、細胞の伸長因子2のADPリボシル化によってタンパク質合成を阻害することができる、分泌された細菌毒素のファミリーの1つのメンバーである。タンパク質はモノマーとして存在し、613のアミノ酸(66Kd)の単一のポリペプチド鎖から成る。3.0-A分割(resolution)に決定される、外毒素AのX線結晶構造は、主として逆平行ベータ構造からなり、分子のおよそ半分; α -ヘリックスからなる中間のドメイン; 及び分子のおよそ3分の1を含むカルボキシル末端ドメインを含む、アミノ末端ドメインを示す。カルボキシル末端ドメインは、毒素のADPリボース転移酵素である。他の2つのドメインは、細胞受容体結合及び膜転位に恐らく関係する。

30

【0073】

毒素は細胞表面上の特異的な受容体を介して細胞に結合し、その後、毒素受容体複合体は細胞へ内部移行される。最終的に、ETAは、それが酵素学的にタンパク質合成を阻害するサイトゾルに伝送される。細胞の中毒が、酸性の小胞におけるpHを上げる、 NH_4^+ などの弱塩基によって予防されるため、伝送プロセスは、酸性の区画から生じると考えられる。酸性の状態への暴露に際して、PEの疎水性のドメインは細胞膜へ入り、酵素のドメインが拡張した形態でサイトゾルを通過するチャネルの形成をもたらす。毒性を減少させたPEと突然変異体の活性は、例えば、その全体において両方が引用により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,892,827号、「Recombinant Pseudomonas Exotoxins: Construction of an Active Immunotoxin with Low Side Effects」、及び「Lukac, et al., 1988, " Toxoid of Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A Generated by Deletion of an Active-Site Residue, " Infection and Immunity 56 (12) : 3095-3098」に記載される。

40

【0074】

ワクチン共役としての外毒素A突然変異体rEPAの使用は、例えば、引用により本明細書に組み込まれる、「Fattom, et al., 1993, " Labora

50

tory and Clinical Evaluation of Conjugate Vaccines Composed of Staphylococcus aureus Type 5 and Type 8 Capsular Polysaccharides Bound to Pseudomonas aeruginosa Recombinant Exoprotein A,” Infection and Immunity 61 (3):1023-1032」;「Qian, et al., 2007, “Conjugating recombinant proteins to Pseudomonas aeruginosa ExoProtein A: a strategy for enhancing immunogenicity of malaria vaccine candidates,” Vaccine 25 (20):3923-3933」;及び「in, et al., 2001. “The Efficacy of a Salmonella Typhi Vi Conjugate Vaccine in Two-To-Five-Year-Old Children,” N Engl J Med 344 (17): 1263-1269」に記載される。

10

【0075】

本明細書で使用されるような緑膿菌外毒素Aは、緑膿菌外毒素A突然変異体CRM66、欠失rEPA (deletion rEPA)、又は野生型のタンパク質を指す。本発明の実施形態において、外毒素Aは、実施例1、5及び7における本明細書に記載の宿主菌株の何れかを使用して、及び組み換え型外毒素Aタンパク質に融合される表8及び表3に記載の分泌リーダーの何れかを発現する構築物を有する発現ベクターを使用して生成される。実施形態では、核酸配列はシュードモナス菌宿主細胞における発現のために最適化される。実施形態において、自然の分泌リーダーが使用される。特定の実施形態において、ETAタンパク質は、タグ、例えば精製タグにより発現される。実施形態において、本発明の方法は、約0.5 g/L乃至少なくとも約12 g/Lの収量で外毒素Aを生成するために使用される。

20

【0076】

本発明の方法を使用して生成された典型的な毒素タンパク質は、表1に記録される。この表は限定していないことが理解される。本発明の実施形態において、本発明の方法を使用する生成のための、本明細書に記載の毒素の核酸配列の何れかは、選択されたシュードモナス菌宿主細胞における発現のために最適化することができる。本明細書に別記されるように、所定の配列の最適化に対する複数の選択肢がある。記載されるような選択肢の何れかは、本発明の方法を使用して生成された毒素の配列の最適化における使用のために熟慮される。本明細書で提供される最適化された配列は、本発明の方法に役立つ最適化された配列の限定しない例である。

30

【0077】

【表 1】

表 1. 典型的な毒素タンパク質

標的	典型的な配列原／参照	起源
CRM197	GenBank Acc. No. 1007216A	コリネバクテリウムジフテリア NCTC 13129
ジフテリア毒素 (WT)	GenBank NC_002935.2 GenBank CAA00374.1	コリネバクテリウムジフテリア
コレラホロトキシン	GenBank NC_002505.1; NP231099.1およびNP23110.1	コレラ菌
コレラ毒素B	GenBank ACH70471 (エルツール菌株)	コレラ菌 OI biovar El tor
百日咳毒素	SIにおける突然変異を伴う GenBank M13223.1	百日咳菌
破傷風毒素Cフラグメント	GenBank 1A8D_A	クロストリジウムテタニ
クロストリジウムディフィシレ Tox B VPI (TcdB)	GenBank CAA63562	クロストリジウムディフィシレ
緑膿菌外毒素A	GenBank NP_249839	緑膿菌 PAO1

10

【0078】

〈コドンの最適化〉

異種の発現系において、最適化工程は、宿主が外来タンパク質を生成する能力を改善し得る。タンパク質発現は、転写、mRNAの処理、及び翻訳の安定性及びその開始に影響を与えるものを含む、多数の因子によって管理される。ポリヌクレオチド最適化工程は、研究者が発現構築物を効率的に設計するのを援助するための工程と同様、宿主が外来タンパク質を生成する能力を改善するための工程を含み得る。最適化の戦略は、例えば、翻訳開始領域の修正、mRNAの構造要素の変化、及び異なるコドンバイアスの使用を含み得る。細菌の宿主における異種のタンパク質の発現を改善するための、核酸配列を最適化する方法は、当該技術分野において既知であり、文献に記載されている。例えば、シュドモナス宿主菌株における発現に関するコドンの最適化は、例えば、その全体において引用によって本明細書に組み込まれる、米国特許出願公報第2007/0292918号「Codon Optimization Method」に記載される。

20

【0079】

最適化は、このように異種遺伝子の多くの配列特徴の何れかに対処できる。特異的な例として、レアコドンに誘発された翻訳の停止は、減少された異種のタンパク質発現をもたらすことができる。レアコドンに誘発された翻訳の停止は、宿主生物においてめったに使用されない対象のポリヌクレオチドにおけるコドンの存在を含み、このことは、利用可能なtRNAプールにおけるそれらの欠乏により、タンパク質翻訳に負の影響を及ぼし得る。宿主生物における最適な翻訳を改善する1つの方法は、合成のポリヌクレオチド配列から取り除かれているレア宿主コドンをもたらすコドン最適化を行なう工程を含む。

30

【0080】

代替の翻訳の開始はまた、減少された異種のタンパク質発現をもたらすことができる。代替の翻訳の開始は、リボソーム結合部位(RBS)として機能することができるモチーフを不注意に含む、合成のポリヌクレオチド配列を含み得る。これらの部位は、遺伝子内部の部位から切り詰められたタンパク質の翻訳の開始をもたらす得る。精製中に取り除くのが難しくなり得る、切り詰められたタンパク質を生成する可能性を減少させる1つの方法は、最適化されたポリヌクレオチド配列から推定上の内部のRBS配列を除去する工程を含む。

40

【0081】

繰り返して誘発されたポリメラーゼスリップ(slippage)は、減少された異種のタンパク質発現をもたらす得る。繰り返して誘発されたポリメラーゼの滑り(slippage)は、フレームシフト突然変異をもたらす得るDNAポリメラーゼのスリップ又はスタッタリング(stuttering)を引き起こすと示された、ヌクレオチド配列

50

の繰り返しに関係する。そのような繰り返しはまた、RNAポリメラーゼのスリッページを引き起こし得る。高いG+C含量バイアスを有する生物体において、G又はCヌクレオチドの繰り返しからなる、より高い程度の繰り返しがあり得る。それ故、RNAポリメラーゼスリッページを誘発する可能性を減少させる1つの方法は、G又はCのヌクレオチドの拡張した繰り返しを変える工程を含む。

【0082】

干渉する二次構造はまた、減少された異種のタンパク質発現をもたらし得る。二次構造は、RBS配列又は開始コドンと隔離することができ、タンパク質発現の縮小に関連づけられた。ステムループ構造はまた、転写の停止及び減弱に関係し得る。最適化されたポリヌクレオチド配列は、改善された転写及び翻訳を許容するため、ヌクレオチド配列のRBS及び遺伝子のコード領域に最小の二次構造を含み得る。

10

【0083】

異種のタンパク質発現に影響を与え得る別の特徴は、制限部位の存在である。宿主発現ベクターへの転写単位とその後のサブクロニングにより妨害することができる制限部位を取り除くことによって、ポリヌクレオチド配列は最適化され得る。

【0084】

例えば、最適化プロセスは、宿主によって異種性に発現される所望のアミノ酸配列を同定することにより始まり得る。アミノ酸配列から、候補のポリヌクレオチド又はDNA配列が設計され得る。合成DNA配列の設計中に、コドン利用の頻度は、宿主発現生物体のコドン利用と比較することができ、レア宿主コドンは合成の配列から取り除かれ得る。更に、合成の候補DNA配列は、望ましくない酵素制限部位を取り除き、かつ任意の所望シグナル配列、リンカー、又は翻訳されていない領域を加える、又はそれらを取り除くために修正され得る。合成DNA配列は、G/Cの繰り返し及びステムループ構造などの翻訳プロセスにより妨害し得る、二次構造の存在に関して分析され得る。候補DNA配列が合成される前に、最適化された配列設計は、配列が所望のアミノ酸配列を正確にコード化することを確認するために調べられ得る。最終的に、候補DNA配列は、当該技術分野で既知のものなどの、DNA合成技術を使用して合成され得る。

20

【0085】

本発明の別の実施形態において、シュードモナスフルオレッセンスなどの宿主生物体における一般的なコドン利用は、異種のポリヌクレオチド配列の発現を最適化するために利用され得る。宿主発現系における特定のアミノ酸に好ましいように、めったに考慮されないコドンの割合及び分布が評価され得る。5%及び10%の使用の値は、カットオフ値として、レアコドンの測定に使用され得る。例えば、表2に記録されたコドンは、シュードモナスフルオレッセンスMB214ゲノムにおいて5%未満の計算された発生を有し、シュードモナスフルオレッセンス宿主において発現した、最適化された遺伝子において一般に回避されるであろう。

30

【0086】

【表2】

表2. シュードモナスフルオレッセンスMB214において5%未満で発生するコドン

アミノ酸	使用するコドン	%発生率
G Gly	GGA	3.26
I Ile	ATA	3.05
L Leu	CTA	1.78
	CTT	4.57
	TTA	1.89
R Arg	AGA	1.39
	AGG	2.72
	CGA	4.99
S Ser	TCT	4.28

40

【0087】

本発明は、使用されているシュードモナス菌宿主細胞における発現のために最適化された任意の配列を含む、生成された毒素のための任意のコード配列の使用を熟考する。使用

50

のために熟考された配列は、限定されないが、以下のものを除去するための最適化を含み、所望されるように任意の程度に最適化され得る：シュードモナス菌宿主細胞において5%未満で生じるコドン、シュードモナス菌宿主細胞において10%未満で生じるコドン、レアコドンに誘発された翻訳の停止、推定上の内部RBS配列、G又はCヌクレオチドの拡張した繰り返し、干渉する二次構造、制限部位、又はそれらの組み合わせ。

【0088】

更に、本発明の方法を実行するのに役立つ任意の分泌リーダーのアミノ酸配列は、任意の適切な核酸配列によってコード化され得る。

【0089】

〈発現系〉

本発明の方法に役立つ宿主細胞と同様に、シュードモナス菌宿主細胞において、有用な調節配列（例えば、プロモータ、分泌リーダー、及びリボソーム結合部位）を含む異種のタンパク質を発現する方法は、例えば、その全体において引用により全てが本明細書に組み込まれる、米国特許公報第2008/0269070号及び米国特許出願番号第12/610,207号、両方の表題「Method for Rapidly Screening Microbial Hosts to Identify Certain Strains with Improved Yield and/or Quality in the Expression of Heterologous Proteins」、米国特許公報第2006/0040352号、「Expression of Mammalian Proteins in Pseudomonas Fluorescens」、及び米国特許公報第2006/0110747号、「Process for Improved Protein Expression by Strain Engineering」に記載される。これら公報はまた、フォールディングモジュレータを過剰発現するために設計され、又は異種のタンパク質発現を増加させるために、欠失を含むプロテアーゼ変異が導入された、本発明の方法を実行するのに役立つ細菌の宿主菌株を記載する。

【0090】

〈リーダー〉

配列リーダーは、その全体において全てが引用により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公報第2008/0193974号及び第2010/0048864号、両方の表題「Bacterial Leader Sequences for Increased Expression」、及び米国特許出願公報第2006/0008877号、「Expression systems with Sec-secretion」、同様に米国特許出願公報第2008/0269070号及び米国特許出願第12/610,207号に詳しく記載される。

【0091】

実施形態において、分泌リーダーをコード化する配列は、毒素タンパク質をコード化する配列に融合される。実施形態において、分泌リーダーはペリプラズムの分泌リーダーである。実施形態において、分泌リーダーは自然の分泌リーダーである。

【0092】

【表 3】

表3.典型的な分泌リーダー配列

分泌リーダー	アミノ酸配列	配列番号
DsbA	MRNLILSAALVTASLFGMTAQA	3
Azu	MFAKLVAVSLTLASGQLLA	4
Ibp-S31A	MIRDNRLKTSLLRGLTLTLLSLTLLSPAHA	5
Tpr	MNRSSALLLAFVFLSGCQAMA	6
CupB2	MLFRTLLASLTFAVIAGLPSTAHA	7
CupA2	MSCTRAFKPLLLIGLATLMCSHAFA	8
NikA	MRLAALPLLAPLFIAPMAVA	9
Pbp A20V	MKLKRLMAAMTFVAAGVATVNAVA	10
DsbC	MRLTQHAAAAIALVSTFALA	11
TolB	MRNLLRGMLVVICCMAGIAAA	12
Pbp	MKLKRLMAAMTFVAAGVATANAVA	13
Lao	MQNYKKFLLAAVSMFAFSATAMA	14
CupC2	MPPRSIAACLGLLGLMATQAAA	15
PorE	MKKSTLAVAVTLGAIAQQAGA	16
Pbp	MKLKRLMAAMTFVAAGVATANAVA	17
FlgI	MKFKQLMAMALLLALSAVAQA	18
ttg2C	MQNRTVEIGVGLFLLAGILALLLALRVSGLSA	19
CRM197の 自然のリーダー	MSRKLFASXLIGALLGIGAPPSAHA	20

【0093】

本発明の方法に役立つ分泌リーダーは、表3に開示されたものに限定されないことが理解される。

【0094】

実施形態において、分泌リーダーは、Azu、IbpS31A、CupA2、又はPbpA20Vである。他の実施形態において、分泌リーダーは、Azu、IbpS31A、CupA2、PbpA20V、又はPbpである。

【0095】

自然のCRM197は、開裂される分泌リーダーを介してジフテリア菌から細胞外空間へ輸送され、GADDのアミノ末端配列（配列番号：21）を残す。CRM197の自然のアミノ末端、その後シュードモナスフルオレッセンスにおける発現を保存し、及びジスルフィド結合形成を確実にするために、タンパク質は細胞周辺腔に標的とされる。

【0096】

〈プロモータ〉

本発明に従って使用されるプロモータは、構成的なプロモータ又は調節されたプロモータであり得る。有用な調節されたプロモータの一般の例は、lacプロモータ（すなわち、lacZプロモータ）、特にDeBoerによる米国特許第4,551,433号に記載のtac及びtrcプロモータ、更にPtac16、Ptac17、PtacII、PlacUV5、及びT7lacプロモータ由来のファミリーのものを含む。1つの実施形態において、プロモータは宿主細胞生物体に由来しない。特定の実施形態において、プロモータは大腸菌生物体に由来する。

【0097】

誘導可能なプロモータ配列は、本発明の方法に従って毒素の発現を調節するために使用され得る。実施形態において、本発明の方法に役立つ誘導可能なプロモータは、lacプロモータ（すなわち、lacZプロモータ）、特にDeBoerによる米国特許第4,551,433号に記載のtac及びtrcプロモータ、更にPtac16、Ptac17、PtacII、PlacUV5、及びT7lacプロモータ由来のファミリーのものを含む。1つの実施形態において、プロモータは宿主細胞生物体に由来しない。特定の実施形態において、プロモータは大腸菌生物体に由来する。

【0098】

本発明に従った発現系に役立つ非lac型プロモータの一般の例は、例えば表4に記録されたものを含む。

【0099】

【表4】

表4. 非lacプロモータの例

プロモータ	誘導因子
P _R	高温
P _L	高温
P _m	アルキル-もしくはハロ-ベンゾアート
P _u	アルキル-もしくはハロ-トルエン
P _{sal}	サリチル酸

10

【0100】

例えば、「J. Sanchez-Romero & V. De Lorenzo (1999) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology (A. Demain & J. Davies, eds.) pp. 460-74 (ASM Press, Washington, D.C.)」; 「H. Schweizer (2001) Current Opinion in Biotechnology, 12:439-445」; 及び「R. Slater & R. Williams (2000 Molecular Biology and Biotechnology (J. Walker & R. Rapley, eds.) pp. 125-54 (The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK))」を参照。選択された細菌の宿主細胞に固有のプロモータのヌクレオチド配列を有するプロモータも、標的ポリペプチド、例えば、シュドモナスアントラニラート又はベンゾアートオペロンのプロモーター (Pant, Pben) をコード化する、トランスジーンの発現を制御するために使用され得る。1以上のプロモータが別のものに共有結合的に付着される、直列型のプロモータはまた、それが同じ又は異なる配列、例えば、Pant-Pbenの直列型プロモータ (プロモータ間混合 (interpromoter hybrid))、プラーク-プラークの直列型プロモータであっても、又はそれが同じ或いは異なる生物体由来としても、使用され得る。

20

30

【0101】

調節されたプロモータは、プロモータがその一部分である遺伝子の転写を制御するために、プロモータ調節タンパク質を利用する。調節されたプロモータが本明細書に使用される場合、相当するプロモータ調節タンパク質はまた、本発明に従った発現系の一部であろう。プロモータ調節タンパク質の例は次のものを含む: 活性化タンパク質、例えば、大腸菌カタボライト活性化タンパク質、MalTタンパク質; AraCファミリー転写活性化因子; リプレッサータンパク質、例えば、大腸菌LacIタンパク質; 及び二元機能調節タンパク質 (dual-function regulatory protein)、例えば、大腸菌NagCタンパク質。多くの調節されたプロモータ/プロモータ調節タンパク質の対は、当該技術分野では既知である。1つの実施形態において、標的タンパク質のための発現構築物及び対象の異種のタンパク質は、同じ調節要素に制御される。

40

【0102】

プロモータ調節タンパク質は、エフェクター化合物、すなわち、プロモータに制御される遺伝子の少なくとも1つのDNA転写制御領域に、タンパク質が放出又は結合することを可能にするように、調節タンパク質と可逆的に又は不可逆的に付随する化合物と相互に作用し、それにより遺伝子の転写を開始する際にトランスクリプターゼ酵素の作用を許容又は遮断する。エフェクター化合物は、誘発因子又はコリプレッサーとして分類され、これら化合物は、自然のエフェクター化合物及び無償性誘導物質化合物を含む。多くの規制されたプロモータ/プロモータ調節タンパク質/エフェクター化合物の三つ組は、当該技術分野では既知である。エフェクター化合物は細胞培養又は発酵の全体にわたって使用さ

50

れ得るが、調整されたプロモータが使用される好ましい実施形態において、宿主細胞バイオマスの所望の量又は密度の増加の後、適切なエフェクター化合物は、対象のタンパク質又はポリペプチドをコード化する所望の遺伝子の発現を直接又は間接的にもたらず培養に加えられる。

【0103】

lacファミリープロモータが利用される実施形態において、lacI遺伝子はまたシステムの中に存在し得る。通常構成的に発現した遺伝子であるlacI遺伝子は、lacファミリープロモータのlacオペレーターに結合する、Lacレプレッサータンパク質LacIタンパク質(Lac repressor protein LacI protein)をコード化する。したがって、lacファミリープロモータが利用される場合、lacI遺伝子も含まれ、発現系において発現され得る。

10

【0104】

シュドモナスに役立つプロモータシステムは、文献、例えば、米国特許出願公報第2008/0269070号に記載され、また上記で引用される。

【0105】

〈他の調節要素〉

実施形態において、可溶性タンパク質は、生成中に、細胞の細胞質又はペリプラズムのいずれかに存在する。タンパク質を標的とするのに役立つ分泌リーダーは、本明細書に別記され、及び米国特許出願公報第2008/0193974号、米国特許出願公報第2006/0008877号、及び米国特許出願第12/610,207号に記載される。

20

【0106】

他の要素は、限定されないが、転写エンハンサー配列、翻訳のエンハンサー配列、他のプロモータ、活性化因子、翻訳の開始及び停止の信号、転写ターミネーター、シストロンの調節剤(cistronic regulators)、多シストロン性の調節剤(polycistronic regulators)、発現されたポリペプチドの識別、分離、精製、及び／又は隔離を促進する、ヌクレオチド配列「タグ」及び「タグ」ポリペプチドコード配列などのタグ配列を含む。

【0107】

実施形態において、発現ベクターは、分泌シグナルのためのコード配列、又は対象のタンパク質又はポリペプチドのためのコード配列に隣接しているタグ配列を更に含む。1つの実施形態において、このタグ配列は、タンパク質の精製を許容する。タグ配列は、ヘキサヒスチジンアフィニティータグなどの、アフィニティータグであり得る(配列番号:46)。別の実施形態において、アフィニティータグはグルタチオンS-転移酵素分子であり得る。タグはまた、YFP又はGFPなど蛍光の分子、又はそのような蛍光タンパク質のアナログであり得る。タグはまた、抗体分子の一部、又は精製に役立つ既知の結合パートナーのための既知の抗原又はリガンドであり得る。

30

【0108】

本発明の方法を実行するのに役立つ発現構築物は、タンパク質コード配列に加えて、操作しやすくそれに結合した以下の調節要素を含み得る:プロモータ、リボソーム結合部位(RBS)、転写ターミネーター、及び翻訳の開始及び停止の信号。有用なRBSは、例えば、米国特許出願公報第2008/0269070号及び米国特許出願第12/610,207号に従って、発現系における宿主細胞として有用な種の何れかから得られ得る。多くの特異的な及び様々なコンセンサスRBSは既知であり、例えば、それらは、「D.

40

Frishman et al., Gene 234(2):257-65 (8 Jul. 1999)»;及び「B. E. Suzek et al., Bioinformatics 17(12):1123-30 (December 2001)»に記載され、引用される。加えて、自然又は合成のRBSが使用され得、例えば、それらは、「EP 0207459 (synthetic RBSs)»;「O. Ikehata et al., Eur. J. Biochem. 181(3):563-70 (1989) (native RBS sequence of AAGGA

50

AG)」に記載される。方法、ベクター、及び翻訳並びに転写の要素の更なる例、及び本発明に役立つ他の要素は、当該技術分野において衆知であり、例えば、引用により本明細書に組み込まれる多くの他の公報と同様に、引用により全てが本明細書に組み込まれる、Gilroyによる米国特許第5,055,294号及びGilroy et al.による米国特許第5,128,130号；Rammiller et al.による米国特許第5,252,479号；Barnes et al.による米国特許第4,695,455号及び第4,861,595号；Gray et al.による米国特許第5,252,479号；及びWilcoxによる米国特許第5,169,760号に記載される。

【0109】

〈宿主菌株〉

シュードモナスを含む細菌の宿主、及び密接に関連した細菌の生物体は、本発明の方法の実行における使用のために熟慮される。特定の実施形態において、シュードモナス菌宿主細胞はシュードモナスフルオレッセンスである。宿主細胞はまた、大腸菌細胞であり得る。

【0110】

本発明の方法を実行するのに役立つ宿主細胞及び構築物は、当該技術分野では既知であり、文献、例えば、その全体において引用により全てが本明細書に組み込まれる、米国特許出願公報第2009/0325230号、「Protein Expression Systems」に記載されていた試薬と方法を使用して同定され得る又は作られ得る。この公報は、ヌクレイン酸構築物を、染色体のlacI遺伝子挿入を含む栄養要求性のシュードモナスフルオレッセンス宿主細胞に導入することによる、組み換え型ポリペプチドの生成を記載する。ヌクレイン酸構築物は、宿主細胞におけるヌクレイン酸の発現を方向付けることができるプロモータに操作しやすく結合された、組み換え型ポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列を含み、また、栄養要求性の選択マーカーをコード化するヌクレオチド配列を含む。栄養要求性の選択マーカーは、原栄養性を栄養要求性の宿主細胞に回復させるポリペプチドである。実施形態において、細胞は、プロリン、ウラシル又はそれらの組み合わせのために栄養要求性である。実施形態において、宿主細胞はMB101 (ATCCデポジットPTA-7841)に由来する。その全体において両方とも引用により本明細書に組み込まれる、米国特許出願第2009/0325230号、「Protein Expression Systems」、及び「Schneider, et al., 2005, “Auxotrophic markers pyrF and proC can replace antibiotic markers on protein production plasmids in high-cell-density Pseudomonas fluorescens fermentation,” Biotechnol. Progress 21(2): 343-8」は、菌株MB101におけるpyrF遺伝子を消すことにより構築されたウラシルのための、生成宿主菌株の栄養要求性を記載する。原栄養性(proto-trophy)を回復するためにpyrF欠失を補足することができるプラスミドを発生させるため、pyrF遺伝子は、菌株MB214 (ATCCデポジットPTA-7840)からクローン化された。特定の実施形態において、シュードモナスフルオレッセンス宿主細胞における二重pyrF-proC二重栄養要求性(dual pyrF-proC dual auxotrophic)の選択マーカーシステムが使用される。記載されるようなPyrF生成宿主菌株(production host strain)は、本発明の方法を実行するのに役立つものとして本明細書に記載のものを含む、他の所望のゲノムの変化を導入するためのバックグラウンドとして使用され得る。

【0111】

実施形態において、宿主細胞はプセウドモナス目である。宿主細胞がプセウドモナス目である場合、それは、シュードモナス属を含むシュードモナス科のメンバーであり得る。γプロテオバクテリアの宿主は、大腸菌種のメンバー及びシュードモナスフルオレッセンス種のメンバーを含む。

10

20

30

40

50

【0112】

他のシュードモナス生物体も役立ち得る。シュードモナス及び密接に関連した種は、「Gram-Negative Aerobic Rods and Cocci」 by R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, pp. 217-289 (8th ed., 1974) (The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md., USA) (hereinafter "Bergey (1974)")」に記載の科及び／又は属に属するプロテオバクテリアのグループを含む、グラム陰性のプロテオバクテリアサブグループ1を含む。表5は、生物体のこれらの科及び属を提示する。

10

【0113】

【表5】

表5. Bergey(1974)「グラム陰性好気性の桿菌および球菌」に記載の科および属

ファミリーⅠシュードモナス科	グルコノバクター シュードモナス ザントモナス ズーグレア
ファミリーⅡアゾトバクター科	アゾモナス アゾトバクター ベイエリンキア デルキシア
ファミリーⅢリゾビウム科	アグロバクテリウム リゾビウム
ファミリーⅣメチロモナス科	メチロコッカス メチロモナス
ファミリーⅤハロバクテリウム科	ハロバクテリウム ハロコッカス
その他の属	アセトバクター アルカリゲネス ボルデテラ ブルセラ フランシセラ サーマス

20

30

【0114】

シュードモナス菌及び密接に関連する細菌は一般に、「グラム(−)プロテオバクテリアサブグループ1 (Gram(−) Proteobacteria Subgroup 1)」又は「グラム陰性好気性の桿菌及び球菌 (Gram-Negative Aerobic Rods and Cocci)」に定義されるグループの一部である (Buchanan and Gibbons (eds.) (1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, pp. 217-289)。シュードモナス宿主菌株は、例えば、上記で引用される文献、米国特許出願公報第2006/0040352号に記載される。

40

【0115】

「グラム陰性のプロテオバクテリアサブグループ1」はまた、分類において使用される基準に従ったこの見出し (heading) において分類されるプロテオバクテリアを含む。見出しはまた、アシドボラクス (Acidovorax) 属、ブレバンディモナス (Brevundimonas)、パークホルデルリア、ヒドロゲノファガ (Hydrogenophaga)、オセアニモナス (Oceanimonas)、ラルストニア、及びステノトロホモナス、ザントモナス属 (以前にザントモナス種と呼ばれていた) に属する生物体を再編成することにより作られたスフィンゴモナス属 (及びそれに由来するブラスト

50

モナス (*Blastomonas*) 属)、*Bergey* (1974) に定義されるような酢酸菌属に属する生物体を再編成することにより作られたアシドモナス (*Acidomonas*) 属などの、このセクションにおいて以前に分類されたが、もはやそうではないグループを含む。加えて、宿主は、シュードモナス属からの細胞、すなわちそれぞれアルテロモナスハロプランクティス (*Alteromonas haloplanktis*)、アルテロモナスニグリファシエンシス (*Alteromonas nigri faciens*) 及びアルテロモナスプトレファシエンシス (*Alteromonas putrefaciens*) として再分類された、シュードモナスエナリア (*enalia*) (ATCC 14393)、シュードモナスニグリファシエンシス (*nigri faciens*) (ATCC 19375) 及びシュードモナスプトレファシエンシス (ATCC 8071) を含み得る。同様に、例えば、シュードモナスアシドボランシス (ATCC 15668) 及びシュードモナステストステロニ (ATCC 11996) は、その後コマモナスアシドボランシス及びコマモナステストステロニとしてそれぞれ再分類され；また、シュードモナスニグリファシエンシス (*Pseudomonas nigri faciens*) (ATCC 19375) 及びシュードモナスピスキダ (*Pseudomonas piscicida*) (ATCC 15057) は、それぞれシュードアルテロモナスニグリファシエンシス (*Pseudoalteromonas nigri faciens*) 及びシュードアルテロモナスピスキダ (*Pseudoalteromonas piscicida*) として再分類された。「グラム陰性プロテオバクテリアのサブグループ1」はまた、以下の科のいずれかに属すると分類されるプロテオバクテリアを含む：シュードモナス科、アゾトバクター科（現在はしばしば、シュードモナス科の「アゾトバクター群」という同義語で呼ばれる）、リゾビウム科及びメチロモナス科（現在はしばしば「メチロコッカス」という同義語で呼ばれる）。従って、本明細書に記載のそれらの属に加えて、「グラム陰性プロテオバクテリアサブグループ1」内の他の場合には本明細書に記載されている、更なるプロテオバクテリア属は、以下のものを含む：1) アゾリゾフィルス (*Azorhizophilus*) 属のアゾトバクター群細菌；2) セルビブリオ、オリゲラ (*Oligella*) 及びテレディニバクター (*Teredinibacter*) 属のシュードモナス科細菌；3) ケラトバクター (*Chelatobacter*)、エンシファー (*Ensifer*)、リベリバクター (*Liberibacter*) (「カンジダリベリバクター (*Candidatus Liberibacter*)」とも呼ばれる)、及びシノリゾビウム (*Sinorhizobium*) 属のリゾビウム科細菌；及び4) メチロバクター (*Methylobacter*)、メチロカルダム (*Methylocaldum*)、メチロミクロビウム (*Methylobacterium*)、メチロサルシナ (*Methylosarcina*) 及びメチロスフェラ (*Methylosphaera*) 属のメチロコッカス科細菌。

【0116】

宿主細胞は「グラム陰性プロテオバクテリアサブグループ16」から選択され得る。「グラム陰性プロテオバクテリアサブグループ16」は、以下のシュードモナス種 (ATCC又は典型的な株の他の寄託番号を括弧内に示す) のプロテオバクテリアのグループとして定義される：シュードモナスアビエタニフィラ (*abietaniphila*) (ATCC 700689)；シュードモナスエルジノーサ (*aeruginosa*) (ATCC 10145)；シュードモナスアルカリゲネシス (*alcaligenes*) (ATCC 14909)；シュードモナスアンギリセプチカ (*anguilliseptica*) (ATCC 33660)；シュードモナスシトロネロリス (*citronellolis*) (ATCC 13674)；シュードモナスフラベセンシス (*flavescens*) (ATCC 51555)；シュードモナスメンドシナ (*mendocina*) (ATCC 25411)；シュードモナスニトロレデュセンシス (*nitroreducens*) (ATCC 33634)；シュードモナスオレオボランシス (ATCC 8062)；シュードモナスシュードアルカリゲネシス (*pseudoalcaligenes*) (ATCC 17440)；シュードモナスレジノボランシス (*resinovorans*)

(ATCC 14235) ; シュードモナスストラミネア (*straminea*) (ATCC 33636) ; シュードモナスアガリシ (*agarici*) (ATCC 25941) ; シュードモナスアルカリフィラ (*alcaliphila*) ; シュードモナスアルギノボラ (*alginovora*) ; シュードモナスアンデルソニー (*andersonii*) ; シュードモナスアスプレニイ (*asplenii*) (ATCC 23835) ; シュードモナスアゼライカ (*azelaica*) (ATCC 27162) ; シュードモナスベイジェリンキイ (*beyerinckii*) (ATCC 19372) ; シュードモナスボレアリス (*borealis*) ; シュードモナスボレオポリス (*boreopolis*) (ATCC 33662) ; シュードモナスブラシカセラム (*brassicacearum*) ; シュードモナスブタノボラ (*butanovora*) (ATCC 43655) ; シュードモナスセルロサ (*cellulosa*) (ATCC 55703) ; シュードモナスアウランチアカ (*aurantiaca*) (ATCC 33663) ; シュードモナスクロロラフィス (*chlororaphis*) (ATCC 9446、ATCC 13985、ATCC 17418、ATCC 17461) ; シュードモナスフラジ (*fragi*) (ATCC 4973) ; シュードモナスルンデンシス (*lundensis*) (ATCC 49968) ; シュードモナスタエトロレンス (*taetrolens*) (ATCC 4683) ; シュードモナスシシコーラ (*cissicola*) (ATCC 33616) ; シュードモナスコロナファシエンシス (*coronafaciens*) ; シュードモナスジテルペニフィラ (*diterpeniphila*) ; シュードモナスエロンガータ (*elongata*) (ATCC 10144) ; シュードモナスフレクテンス (*flectens*) (ATCC 12775) ; シュードモナスアゾトフォルマンシス (*azotiformans*) ; シュードモナスブレンネリ (*brenneri*) ; シュードモナスセドレラ (*cedrella*) ; シュードモナスコルガータ (*corrugata*) (ATCC 29736) ; シュードモナスエクストレモリエンタリス (*extremorientalis*) ; シュードモナスフルオレッセンシス (ATCC 35858) ; シュードモナスゲサルディイ (*gessardii*) ; シュードモナスリバネンシス (*libanensis*) ; シュードモナスマンデリイ (*mandelii*) (ATCC 700871) ; シュードモナスマーヅナリス (*marginalis*) (ATCC 10844) ; シュードモナスミグラエ (*migulae*) ; シュードモナスムシドレンシス (*mucidolens*) (ATCC 4685) ; シュードモナスオリエンタリス (*orientalis*) ; シュードモナスローデシアエ (*rhodesiae*) ; シュードモナスシンクサンタ (*synxantha*) (ATCC 9890) ; シュードモナストラアシイ (*tolaasii*) (ATCC 33618) ; シュードモナスベロニー (*veronii*) (ATCC 700474) ; シュードモナスフレデリクスベルゲンシス (*frederiksbergensis*) ; シュードモナスゲニクラタ (*geniculata*) (ATCC 19374) ; シュードモナスGINGERI (*gingeri*) ; シュードモナスシュードモナスグラミニス (*graminis*) ; シュードモナスグリモンティ (*grimontii*) ; シュードモナスハロデニトリフィカンシス (*halodenitrificans*) ; シュードモナス・ハロフィラ (*halophila*) ; シュードモナスヒビシコーラ (*hibiscicola*) (ATCC 19867) ; シュードモナスヒュッチエンシス (*huttiensis*) (ATCC 14670) ; シュードモナスヒドロゲノボラ (*hydrogenovora*) ; シュードモナスジェッセニー (*jessenii*) (ATCC 700870) ; シュードモナスキロネンシス (*kilonensis*) ; シュードモナスランセオラタ (*lanceolata*) (ATCC 14669) ; シュードモナスリニ (*lini*) ; シュードモナスマルギナタ (*marginata*) (ATCC 25417) ; シュードモナスメフィチカ (*mephitica*) (ATCC 33665) ; シュードモナスデニトリフィカンシス (*denitrificans*) (ATCC 19244) ; シュードモナスペルツシノゲナ (*peritucinogena*) (ATCC 190) ; シュードモナスピクトラム (*pictorum*) (ATCC 23328) ; シュードモナスサイクロフィラ (*psychro*

phila) ; シュードモナスフィルバ (filva) (ATCC 31418) ; シュードモナスモンテイリイ (monteilii) (ATCC 700476) ; シュードモナスモッセリイ (mosselii) ; シュードモナスオリジハビタンス (oryzihabitans) (ATCC 43272) ; シュードモナスプレコグロシシダ (plecoglossicida) (ATCC 700383) ; シュードモナスプチダ (putida) (ATCC 12633) ; シュードモナスレアクタンス (reactans) ; シュードモナススピノサ (spinosa) (ATCC 14606) ; シュードモナスバレアリカ (balearica) ; シュードモナスルテオラ (luteola) (ATCC 43273) ; シュードモナススタツツェリ (stutzeri) (ATCC 17588) ; シュードモナスアミグダリ (amygdali) (ATCC 33614) ; シュードモナスアベラナエ (avellanae) (ATCC 700331) ; シュードモナスカリカパPAYAE (caricapapayae) (ATCC 33615) ; シュードモナスシコリー (cichorii) (ATCC 10857) ; シュードモナスフィクセレクトアエ (ficuserectae) (ATCC 35104) ; シュードモナスフソコバギナエ (fuscovaginae) ; シュードモナスメリアエ (meliae) (ATCC 33050) ; シュードモナスシリング (syringae) (ATCC 19310) ; シュードモナスビリジフラバ (viridiflava) (ATCC 13223) ; シュードモナスサーモカルボキシドボランス (thermocarboxydovorans) (ATCC 35961) ; シュードモナスサーモトレランス (thermotolerans) ; シュードモナスチベルバレンシス (thiervervalensis) ; シュードモナスバンコウベレンシス (vancouverensis) (ATCC 700688) ; シュードモナスウィスコンシネンシス (wisconsinensis) ; 及びシュードモナスキアメンシス (xiamenensis) 。 1つの実施形態において、宿主細胞はシュードモナスフルオレッセンスである。

【0117】

宿主細胞はまた、「グラム陰性プロテオバクテリアサブグループ17」から選択され得る。「グラム陰性プロテオバクテリアサブグループ17」は、例えば、以下のシュードモナス種に属するものを含む「蛍光性シュードモナス菌」として当該技術分野で既知のプロテオバクテリアのグループとして定義される：シュードモナスアゾトフォルマンス (azotoformans) ; シュードモナスブレンネリ (brenneri) ; シュードモナスセドレラ (cedrella) ; シュードモナスコルガータ (corrugata) ; シュードモナスエクストレモリエンタリス (extremorientalis) ; シュードモナスフルオレッセンス (fluorescens) ; シュードモナスゲサルディイ (gessardi) ; シュードモナスリバネンシス (libanensis) ; シュードモナスマンデリイ (mandelii) ; シュードモナスマージナリス (marginalis) ; シュードモナスミグラエ (migulae) ; シュードモナスムシドレンス (mucidolens) ; シュードモナスオリエンタリス (orientalis) ; シュードモナスローデシアエ (rhodesiae) ; シュードモナスシンクサンタ (synxantha) ; シュードモナストラアシイ (tolaasii) ; 及びシュードモナスベロニイ (veronii) 。

【0118】

実施形態において、シュードモナス菌宿主細胞は、HslU、HslV、Prc1、DegP1、DegP2、AprA、又はそれらの組み合わせの発現を欠く。実施形態において、宿主細胞は、プロテアーゼHslU、HslV、Prc1、DegP1、DegP2及びAprAを欠き、DegP2 S219Aを過剰発現する。そのような菌株の一例は、宿主菌株2のように本明細書に開示される。これらプロテアーゼは、当該技術分野で既知であり、例えば米国特許出願公報第2006/0110747号に記載される。AprA、細胞外のセラリシン (serralysin) 型メタロプロテアーゼメタロプロテイナーゼは、例えば、引用により本明細書に組み込まれる、「Maunsell, et al., 2006, “Complex regulation of AprA

10

20

30

40

50

metalloprotease in *Pseudomonas fluorescens* M114: evidence for the involvement of iron, the ECF sigma factor, PbrA and pseudobactin M114 siderophore, *Microbiology* 152 (Pt 1): 29-42」に、及び米国特許出願公報第2008/0193974号及び第2010/0048864号に記載される。

【0119】

他の実施形態において、シュードモナス菌宿主細胞は、DsbA、DsbB、DsbC、及びDsbDを過剰発現する。DsbA、B、C及びDは、ジスルフィド結合イソメラーゼであり、例えば、米国特許出願公報第2008/0269070号及び米国特許出願第12/610, 207号に記載される。

10

【0120】

他の実施形態において、シュードモナス菌宿主細胞は野生型であり、すなわち、プロテアーゼ発現の不足が全く無く、任意のフォールディングモジュレータを過剰発現しない。

【0121】

プロテアーゼの発現を欠く宿主細胞は、野生型の宿主に関するそのプロテアーゼの正常な活性又は発現レベルの減少をもたらす、任意の修正を有し得る。例えば、ミスセンス変異又はナンセンス変異は、活性ではないタンパク質の発現に通じ得、遺伝子欠失はタンパク質発現を全くもたらしすることができない。遺伝子のアップストリームの制御領域の変化は、タンパク質発現の減少をもたらす、又は全くタンパク質発現をもたらすことができない。他の遺伝子欠乏は、タンパク質の翻訳に影響を与え得る。プロテアーゼの処理に必要とされるタンパク質の活性が不完全な場合、プロテアーゼの発現はまた、不完全となり得る。

20

【0122】

本発明の方法に役立つ、プロテアーゼ及びフォールディングモジュレータの例は、表6及び7にそれぞれ示される。RXF番号は読取枠を指す。（例えば、米国特許出願公報第2008/0269070号及び米国特許出願第12/610, 207号を参照。）

【0123】

【表 6 - 1】

表6. シュードモナスフルオレッセンス菌株MB214プロテアーゼ

分類	科	RXF	遺伝子	精選された機能	位置
アスパラギン酸ペプチダーゼ					
	A8 (シグナルペプチダーゼⅡファミリー)	RXF05383.2		リボタンパク質シグナルペプチダーゼ (ec 3.4.23.36)	細胞膜
	A24 (Ⅳ型ブレピリンペプチダーゼファミリー)	RXF05379.1		4型ブレピリンペプチダーゼ	細胞膜
システイン ペプチダーゼ					
	C15 (ピログルタミナルペプチダーゼⅠファミリー)	RXF02161.1		ピロリドンカルボン酸ペプチダーゼ (ec 3.4.19.3)	細胞質
	C40	RXF01968.1		侵入関連タンパク質、P60	シグナルペプチド
		RXF04920.1		侵入関連タンパク質、P60	細胞質
		RXF04923.1		ホスファターゼ関連タンパク質 papq	シグナルペプチド
	C56 (PfpⅠエンドペプチダーゼファミリー)	RXF01816.1		プロテアーゼⅠ (ec 3.4.-.-)	非分泌性
メタロペプチダーゼ					
	M1	RXF08773.1		膜アラニンアミノペプチダーゼ	非分泌性
	M3	RXF00561.2	prlC	オリゴペプチダーゼA (ec 3.4.11.2)	細胞質
		RXF04631.2		Zn依存性オリゴペプチダーゼ	細胞質
	M4 (サーモリシンファミリー)	RXF05113.2		細胞外メタロプロテアーゼ前駆体 (ec 3.4.24.-)	細胞外
	M41 (FtsHエンドペプチダーゼファミリー)	RXF05400.2		細胞分裂タンパク質ftsH (ec 3.4.24.-)	細胞膜
	M10	RXF04304.1		セラリシン (ec 3.4.24.40)	細胞外
		RXF04500.1		セラリシン (ec 3.4.24.40)	細胞外
		RXF01590.2		セラリシン (ec 3.4.24.40)	細胞外
		RXF04497.2		セラリシン (ec 3.4.24.40)	細胞外
		RXF04495.2		セラリシン (ec 3.4.24.40)	細胞外
		RXF02796.1		セラリシン (ec 3.4.24.40)	細胞外
	M14 (カルボキシペプチダーゼAファミリー)	RXF09091.1		亜鉛カルボキシペプチダーゼ前駆体 (ec 3.4.17.-)	細胞質
	M16 (ビトリリシンファミリー)	RXF03441.1		コエンザイムppq合成タンパク質F (ec 3.4.99.-)	非分泌性

【 0 1 2 4 】

【表 6 - 2】

	RXF01918.1		亜鉛プロテアーゼ (ec 3. 4. 99. -)	シグナルペプチド
	RXF01919.1		亜鉛プロテアーゼ (ec 3. 4. 99. -)	ペリプラズム
	RXF03699.2		プロセシングペプチダーゼ	シグナルペプチド
M17	(ロイシルアミノペプチダーゼファミリー)			
	RXF00285.2		サイトソルアミノペプチダーゼ (ec 3. 4. 11. 1)	非分泌性
M18				
	RXF07879.1		アスパルチルアミノペプチダーゼ (ec 3. 4. 11. 21)	細胞質
M20				
	RXF00811.1	dapE	サクシニル-L-アミノピメリン酸 デサクシニラーゼ (ec 3. 5. 1. 18)	細胞質
	RXF04052.2		Xaa-Hisジペプチターゼ (ec 3. 4. 13. 3)	シグナルペプチド
	RXF01822.2		カルボキシペプチダーゼ G2前駆体 (ec 3. 4. 17. 11)	シグナルペプチド
	RXF09831.2:: RXF04892.1		N-アシル-L-アミノ酸アミドヒドロラーゼ (ec 3. 5. 1. 14)	シグナルペプチド
M28	(アミノペプチダーゼYファミリー)			
	RXF03488.2		アルカリ性ホスファターゼ・アイソザイム 変換タンパク質前駆体 (ec 3. 4. 11. -)	外膜
M42	(グルタミルアミノペプチダーゼファミリー)			
	RXF05615.1		分解アミノペプチダーゼ (ec 3. 4. 11. -)	非分泌性
M22				
	RXF05817.1		O-シアロ糖タンパク質エンドペプチダーゼ (ec 3. 4. 24. 57)	細胞外
	RXF03065.2		糖プロテアーゼタンパク質ファミリー	非分泌性
M23				
	RXF01291.2		細胞壁エンドペプチダーゼ、ファミリー M23/M37	シグナルペプチド
	RXF03916.1		メタロエンドペプチダーゼに関する 膜タンパク質	シグナルペプチド
	RXF09147.2		細胞壁エンドペプチダーゼ、ファミリー M23/M37	シグナルペプチド
M24				
	RXF04693.1		メチオニンアミノペプチダーゼ (ec 3. 4. 11. 18)	細胞質
	RXF03364.1		メチオニンアミノペプチダーゼ (ec 3. 4. 11. 18)	非分泌性
	RXF02980.1		Xaa-プロアミノペプチダーゼ (ec 3. 4. 11. 9)	細胞質
	RXF06564.1		Xaa-プロアミノペプチダーゼ (ec 3. 4. 11. 9)	細胞質
M48	(Ste24エンドペプチダーゼファミリー)			
	RXF05137.1		熱ショックタンパク質HtpX	細胞膜
	RXF05081.1		亜鉛メタロプロテアーゼ (ec 3. 4. 24. -)	シグナルペプチド

【表 6 - 3】

M50 (S2Pプロテアーゼファミリー)			
	RXF04692.1	膜メタロプロテアーゼ	細胞膜
セリンペプチダーゼ			
S1 (キモトリプシン ファミリー)			
	RXF01250.2	プロテアーゼ do(ec 3.4.21.-)	ペリプラズム
	RXF07210.1	プロテアーゼ do(ec 3.4.21.-)	ペリプラズム
S8 (サブチリシン ファミリー)			
	RXF06755.2	セリンプロテアーゼ(ec 3.4.21.-)	非分泌性
	RXF08517.1	セリンプロテアーゼ(ec 3.4.21.-)	細胞外
	RXF08627.2	細胞外セリンプロテアーゼ前駆体 (ec 3.4.21.-)	シグナルペプチド
	RXF06281.1	細胞外セリンプロテアーゼ前駆体 (ec 3.4.21.-)	非分泌性
	RXF08978.1	細胞外セリンプロテアーゼ前駆体 (ec 3.4.21.-)	外膜
	RXF06451.1	セリンプロテアーゼ(ec 3.4.21.-)	シグナルペプチド
S9 (プロリルオリゴペプチダーゼ ファミリー)			
	RXF02003.2	プロテアーゼ ii (ec 3.4.21.83)	ペリプラズム
	RXF00458.2	加水分解酵素	非分泌性
S11 (D-Ala-D-Alaカルボキシペプチダーゼ Aファミリー)			
	RXF04657.2	D-アラニル-D-アラニン-エンド ペプチダーゼ(ec 3.4.99.-)	ペリプラズム
	RXF00670.1	D-アラニル-D-アラニンカルボキシ ペプチダーゼ(ec 3.4.16.4)	細胞膜
S13 (D-Ala-D-AlaペプチダーゼC ファミリー)			
	RXF00133.1	D-アラニル-メソ-ジアミノピメリン酸 エンドペプチダーゼ(ec 3.4.-.-)	外膜
	RXF04960.2	D-アラニル-メソ-ジアミノピメリン酸 エンドペプチダーゼ(ec 3.4.-.-)	シグナルペプチド
S14 (ClpPエンドペプチダーゼ ファミリー)			
	RXF04567.1	clpP atp依存性Clpプロテアーゼタンパク質 分解性サブユニット(ec 3.4.21.92)	非分泌性
	RXF04663.1	clpP atp依存性Clpプロテアーゼタンパク質 分解性サブユニット(ec 3.4.21.92)	細胞質
S16 (イオンプロテアーゼ ファミリー)			
	RXF04653.2	atp依存性プロテアーゼLa (ec 3.4.21.53)	細胞質
	RXF08653.1	atp依存性プロテアーゼLa (ec 3.4.21.53)	細胞質
	RXF05943.1	atp依存性プロテアーゼLa (ec 3.4.21.53)	細胞質
S24 (LexA ファミリー)			
	RXF00449.1	LexAリプレッサー(ec 3.4.21.88)	非分泌性
	RXF03397.1	LexAリプレッサー(ec 3.4.21.88)	細胞質

【表 6 - 4】

S26 (シグナルペプチダーゼ Iファミリー)				
	RXF01181.1		シグナルペプチダーゼ I (ec 3. 4. 21. 89)	細胞膜
S33				
	RXF05236.1	pip3	ブロリンイミノペプチダーゼ (ec 3. 4. 11. 5)	非分泌性
	RXF04802.1	pip1	ブロリンイミノペプチダーゼ (ec 3. 4. 11. 5)	非分泌性
	RXF04808.2	pip2	ブロリンイミノペプチダーゼ (ec 3. 4. 11. 5)	細胞質
S41 (C-末端処理ペプチダーゼ ファミリー)				
	RXF06586.1		Tail特異性プロテアーゼ (ec 3. 4. 21. -)	シグナルペプチド
	RXF01037.1		Tail特異性プロテアーゼ (ec 3. 4. 21. -)	シグナルペプチド
S45				
	RXF07170.1	pacB 2	ペニシリンアシラーゼ (ec 3. 5. 1. 11)	シグナルペプチド
	RXF06399.2	pacB 1	ペニシリンアシラーゼ ii (ec 3. 5. 1. 11)	シグナルペプチド
S49 (プロテアーゼ IV ファミリー)				
	RXF06993.2		可能なプロテアーゼ sohb (ec 3. 4. -. -)	非分泌性
	RXF01418.1		プロテアーゼ iv (ec 3. 4. -. -)	非分泌性
S58 (DmpA アミノペプチダーゼ ファミリー)				
	RXF06308.2		Dアミノペプチダーゼ (ec 3. 4. 11. 19)	細胞膜
トレオニンペプチダーゼ				
T1 (プロテアソーム ファミリー)				
	RXF01961.2	hslV	atp依存性プロテアーゼ hslV (ec 3. 4. 25. -)	細胞質
T3 (ガンマーグルタミルトランスフェラーゼ ファミリー)				
	RXF02342.1	ggt1	ガンマーグルタミルトランスペプチダーゼ (ec 2. 3. 2. 2)	ペリプラズム
	RXF04424.2	ggt2	ガンマーグルタミルトランスペプチダーゼ (ec 2. 3. 2. 2)	ペリプラズム
未分類のペプチダーゼ				
U32				
	RXF00428.1		プロテアーゼ (ec 3. 4. -. -)	細胞質
	RXF02151.2		プロテアーゼ (ec 3. 4. -. -)	細胞質
U61				
	RXF04715.1		ムラモイルテトラペプチドカルボキシペプチダーゼ (ec 3. 4. 17. 13)	非分泌性
U62				
	RXF04971.2	pmbA	PmbAタンパク質	細胞質
	RXF04968.2		TldDタンパク質	細胞質
Non MEROPS プロテアーゼ				
	RXF00325.1		リプレッサータンパク質 C2	非分泌性
	RXF02689.2		ミクロソームジペプチダーゼ (ec 3. 4. 13. 19)	細胞質
	RXF02739.1		膜ジペプチダーゼ (3. 4. 13. 19)	シグナルペプチド
	RXF03329.2		仮説のサイトソルのタンパク質	細胞質
	RXF02492.1		Xaa-プロジペプチダーゼ (ec 3. 4. 13. 9)	細胞質
	RXF04047.2		caaxアミノ末端プロテアーゼ ファミリー	細胞膜
	RXF08136.2		プロテアーゼ (トランスグルタミナーゼ様タンパク質)	細胞質
	RXF09487.1		亜鉛メタロプロテアーゼ (ec 3. 4. 24. -)	非分泌性

【0127】

特定のプロテアーゼは、プロテアーゼ及びシャペロン様の活性の両方を有し得る。これらプロテアーゼが、タンパク質収量及び／又は品質に対し負に影響を及ぼすとき、プロテアーゼを欠失させるのに役立ち、プロテアーゼのシャペロン活性がタンパク質収量及び／又は品質に対し陽性に影響を及ぼし得るとき、それらが過剰発現され得る。これらプロテアーゼは、以下のものを含むが、これらに限定されない：Hsp100 (Clp/Hsl) ファミリーメンバー R X F 0 4 5 8 7 . 1 (c l p A)、R X F 0 8 3 4 7 . 1、R X

10

20

30

40

50

F04654.2 (clpX)、RXF04663.1、RXF01957.2 (hslU)、RXF01961.2 (hslV)；ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼファミリーメンバーRXF05345.2 (ppiB)；メタロペプチダーゼM20ファミリーメンバーRXF04892.1 (アミヒドロラーゼ)；メタロペプチダーゼM24ファミリーメンバー (RXF04693.1 (メチオニンアミノペプチダーゼ) 及びRXF03364.1 (メチオニンアミノペプチダーゼ))；及びセリンペプチダーゼS26シグナルペプチダーゼIファミリーメンバーRXF01181.1 (シグナルペプチダーゼ)。

【0128】

【表7-1】

10

表7. シュードモナスフルオレッセンス菌株MB214タンパク質 フォールディングモジュレータ

ORF ID	遺伝子	機能	科	位置
GroES/EL				
RXF02095.1	groES	シャペロン	Hsp10	細胞質
RXF06767.1:: Rxf02090	groEL	シャペロン	Hsp60	細胞質
RXF01748.1	ibpA	小熱ショックタンパク質 (sHSP) IbpA PA3126; GroESLフォールディングに対するホルダとして働く	Hsp20	細胞質
RXF03385.1	hscB	シャペロンタンパク質 hscB	Hsp20	細胞質
Hsp70 (DnaK/J)				
RXF05399.1	dnaK	シャペロン	Hsp70	ペリプラズム
RXF06954.1	dnaK	シャペロン	Hsp70	細胞質
RXF03376.1	hscA	シャペロン	Hsp70	細胞質
RXF03987.2	cbpA	曲線状DNA結合タンパク質、dnaJ様活性	Hsp40	細胞質
RXF05406.2	dnaJ	シャペロンタンパク質 dnaJ	Hsp40	細胞質
RXF03346.2	dnaJ	分子シャペロン (DnaJファミリー)	Hsp40	非分泌性
RXF05413.1	grpE	熱ショックタンパク質 GrpE PA4762	GrpE	細胞質
Hsp100 (Clp/Hsl)				
RXF04587.1	clpA	atp依存性clpプロテアーゼatp結合サブユニット clpA	Hsp100	細胞質
RXF08347.1	clpB	ClpBタンパク質	Hsp100	細胞質

20

30

【0129】

【表 7 - 2】

RXF04654.2	clpX	atp依存性clpプロテアーゼatp結合サブユニット clpX	Hsp100	細胞質
RXF04663.1	clpP	atp依存性Clpプロテアーゼタンパク質分解サブユニット (ec 3.4.21.92)	MEROPS ペプチダーゼファミ リーS14	細胞質
RXF01957.2	hslU	atp依存性hslプロテアーゼatp結合サブユニットhslU	Hsp100	細胞質
RXF01961.2	hslV	atp依存性hslプロテアーゼatpタンパク質分解サブユニット	MEROPS ペプチダーゼファミ リーT1B	細胞質
Hsp33				
RXF04254.2	yrjI	33 kDaシャペロン(熱ショックタンパク質33相同体) (HSP33)	Hsp33	細胞質
Hsp90				
RXF05455.2	hspG	シャペロンタンパク質 hspG	Hsp90	細胞質
SecB				
RXF02231.1	secB	分泌特異性シャペロン SecB	SecB	非分泌性
ジスルフィド結合イソメラーゼ				
RXF07017.2	dsbA	ジスルフィドイソメラーゼ	DSBAオキシド- レダクターゼ	細胞質
RXF08657.2	dsbA/ dsbC/ dsbG/ fernA	ジスルフィドイソメラーゼ	DSBAオキシド- レダクターゼ	細胞質
RXF01002.1	dsbA/ dsbC	ジスルフィドイソメラーゼ	DSBAオキシド- レダクターゼ/ チオレドキシン	ペリプラズム
RXF03307.1	dsbC	ジスルフィドイソメラーゼ	グルタレドキシン/ チオレドキシン	ペリプラズム
RXF04890.2	dsbG	ジスルフィドイソメラーゼ	グルタレドキシン/ チオレドキシン	ペリプラズム
RXF03204.1	dsbB	ジスルフィド結合形成タンパク質B (ジスルフィドオキシドレダクターゼ)	DSBAオキシド- レダクターゼ	ペリプラズム
RXF04886.2	dsbD	チオール:ジスルフィド交換タンパク質dsbD	DSBAオキシド- レダクターゼ	ペリプラズム
ペプチジル-プロリル シストラン ス イソメラーゼ				
RXF03768.1	ppiA	ペプチジル- プロリル シストラン ス イソメラーゼ A (ec 5.2.1.8)	PPIase: シクロフィリン型	ペリプラズム
RXF05345.2	ppiB	ペプチジル- プロリル シストラン ス イソメラーゼ B	PPIase: シクロフィリン型	細胞質
RXF06034.2	fklB	ペプチジル- プロリル シストラン スイソメラーゼ FklB	PPIase: FKBP型	外膜
RXF06591.1	fklB/ fkbP	FK506結合タンパク質 ペプチジル- プロリル シストラン ス イソメラーゼ(EC 5.2.1.8)	PPIase: FKBP型	ペリプラズム
RXF05753.2	fklB; fkbP	ペプチジル-プロリル シストラン ス イソメラーゼ (EC 5.2.1.8)	PPIase: FKBP型	外膜
RXF01833.2	slyD	ペプチジル-プロリル シストラン ス イソメラーゼSlyD	PPIase: FKBP型	非分泌性

【表 7 - 3】

RXF04655.2	tig	トリガーファクター、ppiase (ec 5.2.1.8)	PPIase: FKBP 型	細胞質
RXF05385.1	yaad	推定されるFKBPタイプ16kDaペプチジル-プロリル シストランス イソメラーゼ(EC 5.2.1.8) (PPIase) (ロタマーゼ)	PPIase: FKBP 型	非分泌性
RXF00271.1		ペプチジル-プロリル シストランス イソメラーゼ (EC 5.2.1.8)	PPIase: FKBP 型	非分泌性
線毛集合シャペロン(papD様)				
RXF06068.1	cup	シャペロンタンパク質cup	線毛集合papD	ペリプラズム
RXF05719.1	ecpD	シャペロンタンパク質ecpD	線毛集合papD	シグナルペプチド
RXF05319.1	ecpD	Hnrタンパク質	線毛集合 シャペロン	ペリプラズム
RXF03406.2	ecpD; csuC	シャペロンタンパク質ecpD	線毛集合papD	シグナルペプチド
RXF04296.1	ecpD; cup	シャペロンタンパク質ecpD	線毛集合papD	ペリプラズム
RXF04553.1	ecpD; cup	シャペロンタンパク質ecpD	線毛集合papD	ペリプラズム
RXF04554.2	ecpD; cup	シャペロンタンパク質ecpD	線毛集合papD	ペリプラズム
RXF05310.2	ecpD; cup	シャペロンタンパク質ecpD	線毛集合papD	ペリプラズム
RXF05304.1	ecpD; cup	シャペロンタンパク質ecpD	線毛集合papD	ペリプラズム
RXF05073.1	gliF	グラム陰性線毛集合シャペロン周辺質機能	線毛集合papD	シグナルペプチド
Ⅱ型分泌複合体				
RXF05445.1	YacJ	ヒスチジノール-リン酸アミノトランスフェラーゼ (ec 2.6.1.9)	分類Ⅱピリドキ サル- リン酸依存性アミ ノトランスフェラー ゼファミリー。 ヒスチジノール-リ ン酸アミノトラン スフェラーゼサブ ファミリー	膜
RXF05426.1	SecD	タンパク質トランスロカーゼサブユニットsecD	Ⅱ型分泌複合体	膜
RXF05432.1	SecF	タンパク質トランスロカーゼサブユニットsecF	Ⅱ型分泌複合体	膜
ジスルフィド結合レダクターゼ				
RXF08122.2	trxC	チオレドキシン2	ジスルフィド結合 レダクターゼ	細胞質
RXF06751.1	Gor	グルタチオンレダクターゼ(EC 1.8.1.7) (GR) (GRase) PA2025	ジスルフィド結合 レダクターゼ	細胞質
RXF00922.1	gshA	グルタマート--システインリガーゼ (ec 6.3.2.2)	ジスルフィド結合 レダクターゼ	細胞質

【0131】

〈高スループットスクリーン〉

幾つかの実施形態において、高スループットスクリーンは、可溶性の組み換え型毒素タンパク質を発現するための最適条件を決定するために行われ得る。スクリーンにおいて変えられる条件は、例えば、宿主細胞、宿主細胞の遺伝的背景（例えば、異なるプロテアーゼの欠失）、発現構築物におけるプロモータのタイプ、組換え型タンパク質をコード化する配列に融合される分泌リーダー、成長温度、誘導可能なプロモータが使用される際の誘

10

20

30

40

50

発時のOD、lacZプロモータが使用される時の誘発に使用されたIPTGの濃度、タンパク質誘発の持続時間、培養への誘発剤の追加後の成長温度、培養の攪拌の割合、プラスミド維持のための選択法、血管における培養の量、及び細胞を溶解する方法を含む。

【0132】

幾つかの実施形態において、宿主菌株のライブラリ（あるいは「アレイ」）が提供され、ここで、ライブラリにおける各菌株（又は「宿主細胞の個体群」）は、宿主細胞における1つ以上の標的遺伝子の発現を調節するために遺伝子組み換えが行われた。「最適な宿主菌株」又は「最適な発現系」は、アレイにおける表現型で異なる宿主細胞の他の個体群と比較される、対象の発現されたタンパク質の量、品質、及び／又は位置に基づいて、同定され得る又は選択され得る。したがって、最適な宿主菌株は、所望の明細書に従って対象のポリペプチドを生成する菌株である。所望の明細書が生成されているポリペプチドに依存して変わる一方で、明細書は、タンパク質の品質及び／又は量、例えば、タンパク質が隔離される又は分泌されるかどうか、及びどれくらいの量で、タンパク質が適切に又は望ましいように修飾される（processed）及び／又は折り畳まれるかどうかを含む。実施形態において、改善された又は望ましい品質は、分泌リーダーの高忠実度開裂及び低レベルの分解での毒素タンパク質の生成であり得る。実施形態において、最適な宿主菌株又は最適な発現系は、可溶性の異種のタンパク質の量又は含量（amount or quantity）、還元可能な異種のタンパク質の量又は含量、適切に処理された異種のタンパク質の量又は含量、適切に折り重ねられた異種のタンパク質の量又は含量、活性の異種のタンパク質の量又は含量、及び／又は特定の絶対レベル又は一定の指示菌株、すなわち、比較に使用された菌株によって生成されたものに関連する特定のレベルの異種のタンパク質の量又は含量によって特徴づけられる、収量を生成する。

【0133】

異種のタンパク質の発現における改善された収量及び／又は品質により菌株を同定するために微生物の宿主をスクリーンする方法は、例えば、米国特許出願公報第20080269070号に記載される。

【0134】

〈発酵様式〉

本発明による発現系は、任意の発酵様式（fermentation format）において培養され得る。例えば、バッチ、フェドバッチ、半連続式、又は連続式の発酵モードが本明細書において利用され得る。

【0135】

実施形態において、発酵培地は、富栄養培地、最少培地及び無機塩培地の中から選択され得る。他の実施形態において、最少培地又は無機塩培地のいずれかが選択される。特定の実施形態において、無機塩培地が選択される。

【0136】

無機塩培地は、無機塩と、例えば、グルコース、スクロース、又はグリセロールなどの炭素源からなる。無機塩培地の例は、例えば、M9培地、シュードモナス培地（ATCC 179）、及びDavis-Mingoli培地（B D Davis & E S Mingoli（1950）J. Bact. 60:17-28を参照）を含む。無機塩培地を作るために使用される無機塩は、例えば、リン酸カリウム、硫酸アンモニウム又は塩化アンモニウム、硫酸マグネシウム又は塩化マグネシウム、及び鉄、銅、マンガン及び亜鉛の塩化カルシウム、ホウ酸塩及び硫酸塩などの微量元素の中から選択されるものを含む。典型的には、ペプトン、トリプトン、アミノ酸又は酵母抽出物など有機窒素源は、無機塩培地に含まれていない。代わりに、無機窒素源が使用され、これは、例えばアンモニウム塩、アンモニア水、気体のアンモニアの中から選択され得る。無機塩培地は、典型的には炭素源としてグルコース又はグリセロールを含むであろう。無機塩培地と比較して、最少培地も無機塩と炭素源を含み得るが、例えば、低レベルのアミノ酸、ビタミン、ペプトン又は他の成分で補われ得、もっとも、これらは、ごく最低限のレベルで加えられる。培地は、当該技術分野において、例えば、米国特許出願公開第2006/00

40352号に記載され、それは、上に引用され、引用により組み込まれる。本発明の方法において有用な培養手順及び無機塩培地の詳細は、「Riesenber g, D e t a l., 1991, “High cell density cultivation of Escherichia coli at controlled specific growth rate,” J. Biotechnol. 20 (1): 17-27」によって記載される。

【0137】

実施形態において、生成はバイオリアクター培養において達成され得る。培養は、例えば無機塩培地を含む2リットルまでのバイオリアクターにおいて成長し、アンモニアの追加により32℃及びpH6.5に維持され得る。溶解された酸素は、発酵槽へ散布された空気及び酸素の攪拌及び流量の増加によって過剰に維持され得る。過剰なレベルを維持するため、グリセロールは発光の間中培養に送達され得る。実施形態において、これら条件は、標的培養細胞濁度(density)、例えば、575nm(A₅₇₅)での光学濁度が達するまで、すなわち標的タンパク質生成を開始するためにIPTGが加えられる時点で、維持される。誘発時の細胞密度、IPTGの濃度、pH及び温度は、発現のための最適条件を決定するために各々変えられ得ることが理解される。実施形態において、誘発時の細胞密度は、A₅₇₅の40から200までの吸光度単位(AU)で変えられ得る。IPTG濃度は、0.02から1.0mMまでの範囲、6から7.5までのpH、及び20から35℃までの温度において変えられ得る。16-24時間後、各々のバイオリアクターからの培養は、遠心分離、及び80℃で冷凍された細胞ペレットによって採取され得る。その後、サンプルは、例えば、生成物形成のためのSDS-CGEによって分析され得る。

【0138】

発酵は任意の規模で行なわれ得る。本発明による発現系は、任意の規模での組換え型タンパク質発現に役立つ。したがって、例えば、マイクロリットル規模、ミリリットル規模、センチリットル規模、及びデシリットル規模の発酵容量が使用され得、1リットルの規模及びそれより大きな発酵容量が使用され得る。

【0139】

実施形態において、発酵容量は約1リットル、又はそれ以上である。実施形態において、発酵容量は、約1リットル乃至約100リットルである。実施形態において、発酵容量は、約1リットル、約2リットル、約3リットル、約4リットル、約5リットル、約6リットル、約7リットル、約8リットル、約9リットル、又は約10リットルである。実施形態において、発酵容量は、約1リットル乃至約5リットル、約1リットル乃至約10リットル、約1リットル乃至約25リットル、約1リットル乃至約50リットル、約1リットル乃至約75リットル、約10リットル乃至約25リットル、約25リットル乃至約50リットル、又は約50リットル乃至約100リットルである。他の実施形態において、発酵容量は、5リットル又はそれ以上、10リットル又はそれ以上、15リットル又はそれ以上、20リットル又はそれ以上、25リットル又はそれ以上、50リットル又はそれ以上、75リットル又はそれ以上、100リットル又はそれ以上、200リットル又はそれ以上、500リットル又はそれ以上、1,000リットル又はそれ以上、2,000リットル又はそれ以上、5,000リットル又はそれ以上、10,000リットル又はそれ以上、又は50,000リットル又はそれ以上である。

【0140】

〈細菌増殖条件〉

提供される本発明の方法に役立つ増殖条件は、約4℃乃至約42℃の温度、及び約5.7乃至約8.8のpHを含み得る。lacZプロモータを有する発現構築物が使用されるとき、発現は、約0.01mM乃至約1.0mMの終末濃度で培養にIPTGを加えることにより誘発され得る。

【0141】

培養のpHは、当業者には既知のpHバッファ及び方法を使用して維持され得る。培養

中のpHの制御はまた、アンモニア水を使用して達成され得る。実施形態において、培養のpHは、約5.7乃至約8.8である。特定の実施形態において、pHは、約5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、又は8.8である。他の実施形態において、pHは、約5.7乃至5.9、5.8乃至6.0、5.9乃至6.1、6.0乃至6.2、6.1乃至6.3、6.2乃至6.5、6.4乃至6.7、6.5乃至6.8、6.6乃至6.9、6.7乃至7.0、6.8乃至7.1、6.9乃至7.2、7.0乃至7.3、7.1乃至7.4、7.2乃至7.5、7.3乃至7.6、7.4乃至7.7、7.5乃至7.8、7.6乃至7.9、7.7乃至8.0、7.8乃至8.1、7.9乃至8.2、8.0乃至8.3、8.1乃至8.4、8.2乃至8.5、8.3乃至8.6、8.4乃至8.7、又は8.5乃至8.8である。また他の実施形態において、pHは、約5.7乃至6.0、5.8乃至6.1、5.9乃至6.2、6.0乃至6.3、6.1乃至6.4、又は6.2乃至6.5である。特定の実施形態において、pHは、約5.7乃至約6.25である。

【0142】

実施形態において、成長温度は約4℃乃至約42℃に維持される。特定の実施形態において、成長温度は、約4℃、約5℃、約6℃、約7℃、約8℃、約9℃、約10℃、約11℃、約12℃、約13℃、約14℃、約15℃、約16℃、約17℃、約18℃、約19℃、約20℃、約21℃、約22℃、約23℃、約24℃、約25℃、約26℃、約27℃、約28℃、約29℃、約30℃、約31℃、約32℃、約33℃、約34℃、約35℃、約36℃、約37℃、約38℃、約39℃、約40℃、約41℃、又は約42℃である。他の実施形態において、成長温度は、約25℃乃至約27℃、約25℃乃至約28℃、約25℃乃至約29℃、約25℃乃至約30℃、約25℃乃至約31℃、約25℃乃至約32℃、約25℃乃至約33℃、約26℃乃至約28℃、約26℃乃至約29℃、約26℃乃至約30℃、約26℃乃至約31℃、約26℃乃至約32℃、約27℃乃至約29℃、約27℃乃至約30℃、約27℃乃至約31℃、約27℃乃至約32℃、約26℃乃至約33℃、約28℃乃至約30℃、約28℃乃至約31℃、約28℃乃至約32℃、約29℃乃至約31℃、約29℃乃至約32℃、約29℃乃至約33℃、約30℃乃至約32℃、約30℃乃至約33℃、約31℃乃至約33℃、約31℃乃至約32℃、約30℃乃至約33℃、又は約32℃乃至約33℃に維持される。他の実施形態において、温度は培養中に変化する。1つの実施形態において、構築物、例えばIPTGから発現を誘発する薬剤が培養に加えられる前に、温度は約30℃に維持される。誘発薬剤を加えた後に、温度は約25℃に下げられる。

【0143】

〈誘発〉

本明細書に別記されるように、誘導可能なプロモータは、組み換え型毒素タンパク質、例えばlacプロモータの発現を制御するため発現構築物において使用され得る。lacプロモータ誘導体又はファミリーメンバー、例えばtacプロモータの場合、エフェクター化合物は、IPTGのような無償性誘導物質（「イソプロピルチオガラクトシド」とも呼ばれる、イソプロピル-β-D-1-チオガラクトピラノシド）などの、誘発因子である。実施形態において、lacプロモータ誘導体を使用され、細胞密度が約80乃至約160のOD₅₇₅によって同定されたレベルに達したとき、組換え型タンパク質発現は、約0.01mM乃至約1.0mMの終末濃度にIPTGを加えることによって誘発される。実施形態において、組換え型タンパク質のための培養誘発の時間でのOD₅₇₅は、約80、約90、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180であり得る。他の実施形態において、OD₅₇₅は、約80乃至約100、約100乃至約120、約120乃至約140、約140乃至約160である。他の実施形態において、OD₅₇₅は、約80乃至約120、約100乃至約140、又は約120乃至約160である。他の実施形態において、OD₅₇₅は、約80乃至約

140、又は約100乃至160である。細胞密度は、他の方法によって測定され得、他の単位、例えば1つの単位体積当たりの細胞において発現され得る。例えば、シュードモナスフルオレッセンス培養の約80乃至約160のOD575は、mL当たりおよそ 8×10^{10} 乃至約 1.6×10^{11} のコロニー形成単位又は35乃至70 g/Lの乾燥菌体重量に等しい。実施形態において、培養誘発の時間での細胞密度は、細胞密度又は測定の単位を決定するために使用される方法にかかわらず、OD575での吸光度によって本明細書に特定されるような細胞密度に等しい。当業者の1人は、任意の細胞培養のために適切な転換を行う方法を知っているだろう。

【0144】

実施形態において、培養の最終のIPTG濃度は、約0.01mM、約0.02mM、約0.03mM、約0.04mM、約0.05mM、約0.06mM、約0.07mM、約0.08mM、約0.09mM、約0.1mM、約0.2mM、約0.3mM、約0.4mM、約0.5mM、約0.6mM、約0.7mM、約0.8mM、約0.9mM、又は約1mMである。他の実施形態において、培養の最終のIPTG濃度は、約0.08mM乃至約0.1mM、約0.1mM乃至約0.2mM、約0.2mM乃至約0.3mM、約0.3mM乃至約0.4mM、に対する約0.2mM乃至約0.4mM、約0.08乃至約0.2mM、又は約0.1乃至1mMである。

【0145】

非lacプロモータが使用される実施形態において、本明細書及び文献に記載されるように、他の誘発因子又はエフェクターが使用され得る。1つの実施形態において、プロモータは、構成的なプロモータである。

【0146】

薬剤を加えて誘発した後、培養は、期間、例えば約24時間、組換え型タンパク質が発現される時間の間、成長し得る。誘発剤を加えた後、培養は、約1時間、約2時間、約3時間、約4時、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間、約36時間、又は約48時間成長し得る。誘発剤が培養に加えられた後、培養は、約1乃至48時間、約1乃至24時間、約10乃至24時間、約15乃至24時間、又は約20乃至24時間成長し得る。細胞培養は、遠心分離、及び後の溶解手順のため適切なバッファ又は溶液において再懸濁される培養ペレットによって濃縮され得る。

【0147】

実施形態において、細胞は、高圧機械細胞分裂のための装置（市販で利用可能であり、例えば、Microfluidics Microfluidizer、Constant Cell Disruptor、Niro-Soavi homogenizer、APV-Gaulin homogenizer）を使用して分裂される。組換え型タンパク質を発現する細胞は、例えば音波処理を使用して、分裂され得る。細胞を溶解するための当該技術分野で既知の任意の適切な方法は、可溶性画分を放出するために使用され得る。例えば、実施形態において、細胞膜溶解酵素及びEDTAなどの、化学物質及び/又は酵素の溶解試薬が使用され得る。凍結された培養又は以前に保管された培養の使用はまた、本発明の方法において熟慮される。培養は溶解前にOD標準化することができる。例えば、細胞は、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、又は約20のOD600に標準化され得る。

【0148】

遠心分離は、任意の適切な技術及び方法を使用して実行され得る。不溶性画分から可溶性画分を分離する目的のための細胞培養又は溶解産物の遠心分離は、当該技術分野において周知である。例えば、溶解された細胞は、20分間の20,800×gで（4℃で）遠心分離され、及び上清は、手動又は自動化液体処理を使用して除去される。ペレット（不溶性）画分は、緩衝液、例えば、リン酸緩衝食塩水（PBS）、pH7.4において再懸濁される。再懸濁は、例えば、オーバーヘッドミキサー、磁気攪拌棒、ロッキングシェー

カーに接続された羽根車などの装置を使用して実行され得る。

【0149】

「可溶性画分」、すなわち、溶解産物の遠心分離後に得られた可溶性の上清、及び「不溶性画分」、すなわち、溶解産物の遠心分離後に得られたペレットは、培養を溶解し、遠心分離することにより結果として生じる。これらの2つの画分はまた、それぞれ、「第1の可溶性画分」及び「第1の不溶性画分」と称され得る。

【0150】

〈生成物の評価〉

多数のアッセイ方法は、タンパク質を特徴づけるための当該技術分野において既知である。組み換え型毒素タンパク質の収量又は品質を特徴づけるための任意の適切な方法の使用は、本明細書で熟慮される。

10

【0151】

〈タンパク質の収量〉

本明細書に記載のような任意の精製画分におけるタンパク質の収量は、当業者に既知の方法、例えば、毛細管のゲル電気泳動法（C G E）及びウェスタンブロット解析によって決定され得る。本明細書に記載され、当該技術分野で既知の活性アッセイはまた、タンパク質の収量に関する情報を提供し得る。実施形態において、これらの方法又は当該技術分野で既知の他の方法は、タンパク質の適切な処理、例えば、適切な分泌リーダー開裂を評価するために使用される。

20

【0152】

タンパク質の収量の有用な測定は、例えば、培養量あたりの組換え型タンパク質の量（例えば、タンパク質のグラム又はミリグラム／培養のリットル）、細胞溶解後に得られる不溶性のペレットにおいて測定された組換え型タンパク質のパーセント又は画分（例えば、抽出上清における組み換え型のタンパク質の量／不溶性の画分におけるタンパク質）、活性タンパク質のパーセント又は画分（例えば、活性タンパク質の量／アッセイに使用されるタンパク質の量）、合計の細胞タンパク質（t c p）のパーセント又は画分、タンパク質／細胞の量、及び乾燥したバイオマスのパーセント又は比率を含む。実施形態において、本明細書に記載のようなタンパク質の収量の測定は、得られる可溶性のタンパク質の量又は活性タンパク質の量、又はその両方に基づく。

30

【0153】

収量が培養量に関して発現される実施形態において、培養細胞密度は、特に異なる培養間の収量が比較されているとき、考慮され得る。

【0154】

実施形態において、本発明の方法は、1リットル当たり約0.2グラムから1リットル当たり約12グラムまでの、可溶性の及び／又は活性な及び／又は適切に処理された（例えば、適切に分泌リーダーを開裂した）組み換え型毒素タンパク質又はサブユニットタンパク質の収量を得るために使用され得る。実施形態において、収量は、1リットル当たり約0.5グラムから1リットル当たり約12グラムまでである。特定の実施形態において、組換え型タンパク質又はサブユニットタンパク質の収量は、約0.2 g/L、約0.3 g/L、約0.4 g/L、約0.5 g/L、約0.6 g/L、約0.7 g/L、約0.8 g/L、約0.9 g/L、約1 g/L、約1.5 g/L、約2 g/L、約2.5 g/L、約3 g/L、約3.5 g/L、約4 g/L、約4.5 g/L、約5 g/L、約5.5 g/L、約6 g/L、約6.5 g/L、約7 g/L、約7.5 g/L、約8 g/L、約8.5 g/L、約9 g/L、約9.5 g/L、約10 g/L、約10.5 g/L、約11 g/L、約12 g/L、約0.2 g/L乃至約0.5 g/L、約0.2乃至約1 g/L、約0.2 g/L乃至約2 g/L、約0.3 g/L乃至約0.6 g/L、約0.3 g/L乃至約1 g/L、約0.3乃至約2 g/L、約0.4乃至約0.7 g/L、約0.4乃至約1 g/L、約0.4乃至約2 g/L、約0.4乃至約3 g/L、約0.5 g/L乃至約1 g/L、約0.5 g/L乃至約2 g/L、約0.5 g/L乃至約3 g/L、約0.5 g/L乃至約4 g/L、約0.5 g/L乃至約5 g/L、約0.5

40

50

g/L乃至約6 g/L、約0.5 g/L乃至約7 g/L、約0.5 g/L乃至約8 g/L、約0.5 g/L乃至約9 g/L、約0.5 g/L乃至約10 g/L、約0.5 g/L乃至約11 g/L、約0.5 g/L乃至約12 g/L、約1 g/L乃至約2 g/L、約1 g/L乃至約3 g/L、約1 g/L乃至約4 g/L、約1 g/L乃至約5 g/L、約1 g/L乃至約6 g/L、約1 g/L乃至約7 g/L、約1 g/L乃至約8 g/L、約1 g/L乃至約9 g/L、約1 g/L乃至約10 g/L、約1 g/L乃至約11 g/L、約1 g/L乃至約12 g/L、約2 g/L乃至約3 g/L、約2 g/L乃至約4 g/L、約2 g/L乃至約5 g/L、約2 g/L乃至約6 g/L、約2 g/L乃至約7 g/L、約2 g/L乃至約8 g/L、約2 g/L乃至約9 g/L、約2 g/L乃至約10 g/L、約2 g/L乃至約11 g/L、約2 g/L乃至約12 g/L、約3 g/L乃至約4 g/L、約3 g/L乃至約5 g/L、約3 g/L乃至約6 g/L、約3 g/L乃至約7 g/L、約3 g/L乃至約8 g/L、約3 g/L乃至約9 g/L、約3 g/L乃至約10 g/L、約3 g/L乃至約11 g/L、約3 g/L乃至約12 g/L、約4 g/L乃至約5 g/L、約4 g/L乃至約6 g/L、約4 g/L乃至約7 g/L、約4 g/L乃至約8 g/L、約4 g/L乃至約9 g/L、約4 g/L乃至約10 g/L、約4 g/L乃至約11 g/L、約4 g/L乃至約12 g/L、約5 g/L乃至約6 g/L、約5 g/L乃至約7 g/L、約5 g/L乃至約8 g/L、約5 g/L乃至約9 g/L、約5 g/L乃至約10 g/L、約5 g/L乃至約11 g/L、約5 g/L乃至約12 g/L、約6 g/L乃至約7 g/L、約6 g/L乃至約8 g/L、約6 g/L乃至約9 g/L、約6 g/L乃至約10 g/L、約6 g/L乃至約11 g/L、約6 g/L乃至約12 g/L、約7 g/L乃至約8 g/L、約7 g/L乃至約9 g/L、約7 g/L乃至約10 g/L、約7 g/L乃至約11 g/L、約7 g/L乃至約12 g/L、約8 g/L乃至約9 g/L、約8 g/L乃至約10 g/L、約8 g/L乃至約11 g/L、約8 g/L乃至約12 g/L、約9 g/L乃至約10 g/L、約9 g/L乃至約11 g/L、約9 g/L乃至約12 g/L、約10 g/L乃至約11 g/L、約10 g/L乃至約12 g/L、又は約11 g/L乃至約12 g/Lである。

【0155】

実施形態において、生成された組み換え型毒素タンパク質又はサブユニットタンパク質の量は、合計の細胞タンパク質の約1%乃至75%である。特定の実施形態において、生成された毒素タンパク質又はサブユニットタンパク質の量は、合計の細胞タンパク質の約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約1%乃至約5%、約1%乃至約10%、約1%乃至約20%、約1%乃至約30%、約1%乃至約40%、約1%乃至約50%、約1%乃至約60%、約1%乃至約75%、約2%乃至約5%、約2%乃至約10%、約2%乃至約20%、約2%乃至約30%、約2%乃至約40%、約2%乃至約50%、約2%乃至約60%、約2%乃至約75%、約3%乃至約5%、約3%乃至約10%、約3%乃至約20%、約3%乃至約30%、約3%乃至約40%、約3%乃至約50%、約3%乃至約60%、約3%乃至約75%、約4%乃至約10%、約4%乃至約20%、約4%乃至約30%、約4%乃至約40%、約4%乃至約50%、約4%乃至約60%、約4%乃至約75%、約5%乃至約10%、約5%乃至約20%、約5%乃至約30%、乃至約5%～約40%、乃至約5%乃至約50%、約5%乃至約60%、約5%乃至約75%、約10%乃至約20%、約10%乃至約30%、約10%乃至約40%、約10%乃至約50%、約10%乃至約60%、約10%乃至約75%、約20%乃至約30%、約20%乃至約40%、約20%乃至約50%、約20%乃至約60%、約20%乃至約75%、約30%乃至約40%、約30%乃至約50%、約30%乃至約60%、約30%乃至約75%、約40%乃至約50%、約40%乃至約60%、約40%乃至約75%、約50%乃至約60%、約50%乃至約75%、約60%乃至約75%、又は約70%乃至約75%である。

【0156】

特定の実施形態において、複数のタンパク質は同じ宿主細胞から生成される。例えば、実施形態において、百日咳毒素の全部で5つのサブユニットは、単一の培養で成長した同

10

20

30

40

50

じ宿主細胞から作られる。そのような実施形態において、観察された濃度、%の合計の細胞タンパク質又は活性は、個々の毒素サブユニットに関する、又は共に得られたすべてのサブユニットに関するものである。すなわち、実施形態において、本発明の方法は、1リットル当たり約1グラムから1リットル当たり約12グラムの、百日咳毒素タンパク質のS1、S2、S3、S4、又はS5サブユニットの収量を得るために使用される。実施形態において、生成されたS1、S2、S3、S4、又はS5サブユニットタンパク質の量は、合計の細胞タンパク質の1%乃至75%である。あるいは、本発明の方法は、1リットル当たり約1グラムから1リットル当たり約12グラムの、S1、S2、S3、S4、及びS5サブユニットタンパク質の収量を得るために使用される。実施形態において、生成されたS1、S2、S3、S4、及びS5サブユニットタンパク質の量は、合計の細胞タンパク質の1%乃至75%である。特定の実施形態において、得られた各サブユニットの量は、1リットル当たりのグラム又は%の合計の細胞タンパク質において、ほぼ同じである。

10

【0157】

タンパク質の「溶解度」及び「活性」は、品質に関連するが、異なる手段によって一般に決定される。タンパク質の溶解度、特に疎水性タンパク質は、典型的にはタンパク質の折り畳み構造に関係がある；不溶性は、疎水性アミノ酸残留物が折り重ねられたタンパク質の外側に不適当に位置付けられることを示す。方法、例えば下記のものを使用して評価されたタンパク質活性は、適切なタンパク質立体配座の別の指標である。本明細書に使用されるように、「可溶性の、活性な、又はその両方」又は「可溶性の及び／又は活性な」は、当業者に既知の及び本明細書に記載の方法により、可溶性、活性、又は可溶性及び活性の両方であると決定されるタンパク質を指す。与えられたタンパク質の「活性」は、結合活性、例えば、受容体、特異抗体、又は別の既知の基質に結合することにより、又は関連する場合の酵素活性によって表わされるものを含む。活性レベルは、例えば、標準又は対照サンプルの、又は引用として使用される任意のサンプルの活性と比較されるときのように、絶対項又は相対語において記載され得る。

20

【0158】

毒素を評価するための活性アッセイは、当該技術分野で既知であり、文献に記載される。活性アッセイは、免疫学又は抗体結合アッセイ、例えば、ウェスタンブロット解析及びELISA、同様に受容体結合アッセイを含み、例えば、CRM197はジフテリア毒素受容体（proHB-EGF）結合アッセイによって評価され得る。これらのアッセイに役立つ抗体は、市販で入手可能である。活性アッセイはまた酵素活性アッセイを含む。野生型のDTは、当該技術分野で既知の、緑膿菌外毒素Aに関して本明細書に別記された方法を使用して、免疫学的に、及びADPリボシル化活性によってアッセイされ得る。

30

【0159】

例えば、CTBのウェスタンブロット解析は、例えば、引用により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,140,082号、「Expression of Gene Products from Genetically Manipulated Strains of Bordetella」に記載されるように実行され得る。この特許は、ボルデテラにおけるCTBの発現を記載する。培養上清からのタンパク質は、SDS-PAGEによって分解され、又はCTB五量体をモノマーの形態に変換するために分解される前に沸騰された。タンパク質は、ナイロン細胞膜上に伝送され、ヤギ抗コレラゲノイドIgG抗体（抗CTB、List Biologicals #GAC-01C）により調べた。検出は、発掘作業化学発光（dig chemiluminescence）（Boehringer Mannheim）を使用して、アルカリフォスファターゼにより結合されたロバ抗ヤギIgGにより行なわれた。CTAとCTBの両方を含むコレラ毒素標準（Sigma）は、比較に使用された。

40

【0160】

PTXのウェスタンブロット解析は、例えば、実施例において本明細書に記載されるように、市販の抗体を使用して実行され得る。モノクローナル抗体は、例えば、Abcam

50

, Cambridge, MAから利用可能である。

【0161】

破傷風毒素Cフラグメントは、ウェスタンブロット解析、又は引用により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,443,966号、「Expression of tetanus toxin fragment C」に記載されるようなELISAによって評価され得る。抗体は、複数の商業的供給源、例えば、Abcam, Cambridge, MAから利用可能である。

【0162】

TcdB活性は、当該技術分野に記載されているような、ウェスタンブロット又は他の検出分析によって評価され得る。酵素活性は、例えば、当該技術分野、例えば、その全体において引用により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,226,597号に記載のグリコシドラーゼ/グリコシル化アッセイ方法を使用して、分析され得る。具体的には、グリコシル化反応は、50mMのn-2ヒドロキシエチルピペラジン-n'-2-エタンスルホン酸、100mMのKCl、1mMのMnCl₂、1mMのMgCl₂、100μg/mlのBSA、0.2mMのGDP、40μMの[¹⁴C]UDP-グルコース(303Ci/mol; ICN Pharmaceuticals)、100μMのUDP-グルコース及び3pmolのTcdB又は10pmolの各々の融合タンパク質を含む反応混合において実行され得る。アッセイは、37℃で一晩インキュベートすることを許容され、切断されたグルコースは、AG1-X2陰イオン交換レジンを使用して分離し、液体シンチレーション計数器で数えられる。

【0163】

緑膿菌外毒素Aの活性は、免疫学の方法、例えばウェスタンブロット解析を使用して評価され得る。ETAがADPリボシル化毒素であるため、それは、例えば、引用により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,892,827号に記載されるような、ADPリボシル化活性のためにアッセイされ得る。具体的には、ラビット網状赤血球調製又は伸長因子2(EF-2)により濃縮されたコムギ麦芽抽出物は、EF-2の源として使用される。アッセイ(500μlの全容積)は、約10pmoleのEF-2、37pmoleの¹⁴C-NAD(0.06μCi)、0.25乃至1.25μgのETA及びバッファ(40mMのDTT、1mMのEDTA、及び50mMのトリス、pH8.1)を含む。活性は、30分でEF-2に伝送されたNADのpmolesとして測定される。PEの既知の濃度の標準曲線は確立され、大腸菌からの抽出液におけるPEの活性を測定するために使用される。37℃で30分のインキュベーション後、0.5mlの12%のTCAは、各々のアッセイ混合物に加えられる。その後、アッセイ混合物は15分間氷浴に配置され、その後、10分間、3,000xg、4℃で遠心分離を行った。ペレットは、1mlの6%のTCAで洗浄され、上述のように遠心分離される。その後、ペレットはADPリボシル化活性の指数として、液体シンチレーション計数器において¹⁴C放射活性のために測定される。

【0164】

それ故、活性の測定は、例えば、抗体又は受容体の結合能力、基質の結合能力(カラム材料に関する)、又は酵素活性を表し得る。

【0165】

実施形態において、活性は、アッセイされる総量と比較して、抽出した上清における%活性組み換え型毒素タンパク質によって表わされる。これは、アッセイにおいて使用される組み換え型毒素タンパク質の総量に関連するアッセイによって活性であると決定された、組み換え型毒素タンパク質の量に基づく。他の実施形態において、活性は、標準の、例えば自然のタンパク質と比較して、タンパク質の%活性レベルによって表わされる。これは、標準サンプルにおける活性タンパク質の量に関連する、上清抽出液サンプルにおける、活性組み換え型毒素タンパク質の量に基づく(ここで、各々のサンプルから同じ量のタンパク質がアッセイにおいて使用される)。

【0166】

実施形態において、毒素タンパク質又はサブユニットの約40%乃至約100%は、活性であると決定される。実施形態において、組み換え型毒素タンパク質又はタンパク質サブユニットの約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、又は約100%は、活性であると測定される。実施形態において、組み換え型毒素タンパク質又はサブユニットの約40%乃至約50%、約50%乃至約60%、約60%乃至約70%、約70%乃至約80%、約80%乃至約90%、約90%乃至約100%、約50%乃至約100%、約60%乃至約100%、約70%乃至約100%、約80%乃至約100%、約40%乃至約90%、約40%乃至約95%、約50%乃至約90%、約50%乃至約95%、約50%乃至約100%、約60%乃至約90%、約60%乃至約95%、約60%乃至約100%、約70%乃至約90%、約70%乃至約95%、約70%乃至約100%、又は約70%乃至約100%は、活性であると決定される。

10

【0167】

他の実施形態において、組み換え型毒素タンパク質又はタンパク質サブユニットの約75%乃至約100%は、活性であると決定される。実施形態において、組み換え型の毒素タンパク質又はサブユニットの約75%乃至約80%、約75%乃至約85%、約75%乃至約90%、約75%乃至約95%、約80%乃至約85%、約80%乃至約90%、約80%乃至約95%、約80%乃至約100%、約85%乃至約90%、約85%乃至約95%、約85%乃至約100%、約90%乃至約95%、約90%乃至約100%、又は約95%乃至約100%は、活性であると決定される。

20

【0168】

誘発されたタンパク質の同一性を確認する手段も、当該技術分野で既知である。例えば、タンパク質は、MALDI-TOF質量分光法、N-末端配列分析、又はペプチドマッピングを使用する、ペプチド質量フィンガープリントによって分析され得る。

【0169】

本発明の好ましい実施形態が、本明細書に示され及び記載されてきた一方で、このような実施形態が、ほんの一例として提供されることは当業者に明白となるであろう。本発明から逸脱することなく、多数の変更、変化、及び置換が現在、当業者に生じるであろう。本明細書に記載の本発明の実施形態の様々な代替案が、本発明を実行する際に利用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲及びそれらの同等物の範囲内の方法及び構造が、それによって包含されることが

30

【実施例】**【0170】**

〈実施例1：組み換え型CRM197タンパク質の高スループット発現〉

CRM197発現菌株を構築し、菌株において生成された可溶性のCRM197タンパク質の量を毛細管のゲル電気泳動法(SDS-PAGE)を使用して分析した。結果として生じるデータに基づき、菌株を大規模な発現に使用するために選択した。

【0171】

〈CRM197発現菌株の構築及び成長〉

CRM197コード配列を、CRM197アミノ酸配列をコード化するためシュードモナスフルオレッセンスに好ましいコドンを使用して構築した。配列番号：1は、発現された合成の最適化されたCRM197遺伝子によってコード化されたアミノ酸配列を示し、配列番号：2は、発現された合成の最適化されたCRM197遺伝子のDNA配列を示す。

40

【0172】

表8に示されるような、10のシュードモナスフルオレッセンス分泌リーダーに融合される、最適化されたCRM197配列を運ぶプラスミドを構築した。CRM197コード配列を、ペリプラズムに対するタンパク質を適切に折り重ねられた及び活性型の回収率に向けるために融合した。

【0173】

50

【表 8】

表8. CRM197発現スクリーンに使用される分泌リーダー

	分泌リーダー
1	DsbA
2	Azu
3	Ibp-S31A
4	Tpr
5	CupB2
6	CupA2
7	NikA
8	Pbp A20V
9	DsbC
10	TolB

10

【0174】

組み換え型CRM197コード配列に融合された10の分泌リーダー融合を含む構築物を、シュードモナスフルオレッセンス宿主において試験した。表9に記録された4つの宿主を、各々の発現プラスミドにより試験した。宿主細胞を、示されたプラスミドにより電気穿孔し、微量金属及び5%のグリセロールを有するHTP増殖培地で再懸濁し、その後、400 μ lのM9塩、1%のグルコース培地、及び微量元素を有する96穴ディーププレート（96-well deep well plate）に伝送した。96ウェルプレートを、48時間振ることにより、30℃でインキュベートした。10 μ lの各々の40の種培養を、各々のウェルが微量元素及び5%のグリセロールにより補足された500 μ lのHTP培地を含む三重の96穴ディーププレートに伝送し、24時間、以前のようにインキュベートした。

20

【0175】

【表 9】

表9. CRM197発現スクリーンに使用される宿主菌株

宿主菌株	遺伝子型	型
1	lon、laa、aprA	PD
2	hslUV prc1 degP1 degP2 aprA欠損; DegP2 S219APD+FMOを過剰発現する	PD+FMO
3	dsbABCD	FMO
4	4grpE、dnaKJ	FMO

PD=プロテアーゼ欠損(Protease Deletion)(記載されたプロテアーゼは欠損する); FMO=フォールディングモジュレーター過剰発現(Folding Modulator Overexpressor)(記録されたフォールディングモジュレーターは過剰発現される。)

30

【0176】

イソプロピルー β -D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を、0.3mMの終末濃度で各々のウェルに加え、標的タンパク質の発現を誘発した。マンニトール(Sigma, M1902)を、1%の終末濃度で各々のウェルに加え、フォールディングモジュレーター過剰発現菌株におけるフォールディングモジュレーターの発現を誘発し、温度を25℃に下げた。誘発の24時間後に、400 μ lの量のPBSを使用して、細胞をOD600=15にまで標準化した。サンプルを、可溶性及び不溶性の画分を生成する音波処理及び遠心分離によって後で処理するために冷凍した。

40

【0177】

〈サンプル調製及びSDS-CGE分析〉

可溶性及び不溶性の細胞の画分を、標準化された培養の音波処理によって、その後遠心分離によって調製した。冷凍されて標準化された培養液(400 μ L)を溶かし、3.5分間超音波で処理した。溶解産物を、20分間20,800 $\times$ g(4℃)で遠心分離し、上清を、手動又は自動化液体処理を使用して取り除いた(可溶性画分)。ペレット(不溶性の画分)を冷凍し、その後、4℃で20分間20,080 $\times$ gで再び遠心分離して、残りの上清を取り除いた。その後、ペレットを、400 μ Lの1Xリン酸緩衝食塩水(PBS)、pH7.4において再懸濁した。SDS-CGE分析のための可溶性及び不溶性のサンプルの更なる希釈を、1Xリン酸緩衝食塩水(PBS)、pH7.4において行なっ

50

た。可溶性及び不溶性のサンプルを、ジチオトレイトール (DTT) の存在下で、SDS 毛細管ゲル電気泳動法 (CGE) (Caliper Life Sciences, Protein Express LabChip Kit, Part 760301) のために調製した。

【0178】

各々の菌株からの可溶性画分の減少する SDS-CGE 分析の結果を示す、代表的なゲル様の画像を図 1 に示す。表 10 は、構築された CRM197 発現菌株の各々に関して、3 つの複製の平均の可溶性 CRM197 の収量及び標準偏差を示す。各々の菌株のためスクリーンされた宿主菌株及び分泌リーダーも示す。

【0179】

10

分泌リーダー及び宿主菌株の両方は、CRM197 発現への著しい影響を示した。発現は、0.5 mL の規模で、検知可能でない収量から 1.2 g/L 以上までの範囲に及び、最も高い発現レベルは、宿主菌株 2 バックグラウンドにおいて観察された。PS538-776 において観察された収量は 1263 mg/L であり、PS538-772 におけるものは 1241 mg/L であり、両方とも 340 mg/L の平均収量を大幅に上回った。高い収量及び低い収量を、使用されるリーダーに依存する同じ宿主において観察し、及び高い収量及び低い収量を、異なる宿主菌株において同じリーダーを使用して観察した。PS538-772、PS538-773、PS538-776、PS538-778、PS538-782 を、大規模な発酵における評価のため選択した。

【0180】

20

【表 10】

表10: CRM197-発現菌株に関する平均CRM197収量

菌株番号	米国特許出願 第61/325,235号に おいて対応する 宿主菌種番号	宿主菌株	リーダー	平均収量(mg/L)	Std Dev(3つの複製)
PS538-761	PS538-731	1	DsbA	205	162
PS538-762	PS538-732	1	Azu	427	186
PS538-763	PS538-733	1	Ibp-S31A	361	183
PS538-764	PS538-734	1	Tpr	298	106
PS538-765	PS538-735	1	CupB2	105	109
PS538-766	PS538-736	1	CupA2	175	99
PS538-767	PS538-737	1	NikA	314	85
PS538-768	PS538-738	1	Pbp A20V	291	204
PS538-769	PS538-739	1	DsbC	148	91
PS538-770	PS538-740	1	TolB	213	36
PS538-771	PS538-741	2	DsbA	407	218
PS538-772	PS538-742	2	Azu	1241	372
PS538-773	PS538-743	2	Ibp-S31A	1107	219
PS538-774	PS538-744	2	Tpr	280	285
PS538-775	PS538-745	2	CupB2	192	219
PS538-776	PS538-746	2	CupA2	1263	474
PS538-777	PS538-747	2	NikA	699	259
PS538-778	PS538-748	2	Pbp A20V	914	416
PS538-779	PS538-749	2	DsbC	567	141
PS538-780	PS538-750	2	TolB	382	217
PS538-781	PS538-751	3	DsbA	591	230
PS538-782	PS538-752	3	Azu	1094	543
PS538-783	PS538-753	3	Ibp-S31A	323	143
PS538-784	PS538-754	3	Tpr	419	70
PS538-785	PS538-755	3	CupB2	75	74
PS538-786	PS538-756	3	CupA2	309	214
PS538-787	PS538-757	3	NikA	52	73
PS538-788	PS538-758	3	Pbp A20V	356	295
PS538-789	PS538-759	3	DsbC	319	117
PS538-790	PS538-760	3	TolB	69	88
PS538-791	PS538-761	4	DsbA	270	106
PS538-792	PS538-762	4	Azu	0	14
PS538-793	PS538-763	4	Ibp-S31A	0	6
PS538-794	PS538-764	4	Tpr	0	0
PS538-795	PS538-765	4	CupB2	18	39
PS538-796	PS538-766	4	CupA2	118	134
PS538-797	PS538-767	4	NikA	0	9
PS538-798	PS538-768	4	Pbp A20V	0	0
PS538-799	PS538-769	4	DsbC	0	0
PS538-800	PS538-770	4	TolB	0	0

【0181】

＜実施例2：組み換え型CRM197タンパク質の大規模発現＞

組み換え型CRM197タンパク質を、2リットルの発酵槽におけるシュードモナスフルオレッセンス菌株PS538-772、PS538-776、及びPS538-782において生成した。培養は、本明細書に、及び例えばRiesenberg, D., et al., 1991によっても記載されるような無機塩培地を含む、2リットルの発酵槽において成長し、アンモニアの追加により32℃及びpH6.5に維持された。溶解された酸素を、発酵槽に散布された空気及び酸素の攪拌及び流量の増加によって過剰に維持した。過剰レベルに維持するため、グリセロールを発酵の全体にわたって培養に送達した。これらの状態を、誘発のための標的培養細胞濁度(575nm(A₅₇₅))での光学濁度)が達するまで、すなわちCRM197生成を開始するためにIPTGが加えられ

る時点で、維持する。誘発の細胞密度を、 A_{575} の40から200までの吸光度単位（AU）で変えることができる。IPTG濃度を0.02から0.4mMまでの範囲で変えることができる。pH6から7.5、温度20乃至35℃。16－24時間後、各々のバイオリアクターからの培養を遠心分離によって採取し、及び細胞ペレットを80℃で冷凍した。サンプルを、生成物形成用のSDS－CGEによって分析した。

【0182】

複数の発酵条件を、1乃至2g/LのSDS－CGEによって決定されるようなトップCRM197発現をもたらすと評価した（図18及び19を参照）。誘発されたタンパク質の同一性を、ジフテリア毒素特異抗体を使用するウェスタンブロット解析によって確認した（図20）。

10

【0183】

〈実施例3：組み換え型のコレラ毒素Bタンパク質の高スループット発現〉

〈コレラ毒素B発現菌株の構築及び成長〉

コレラ毒素Bコード配列を、コレラ毒素Bアミノ酸配列をコード化するため、シュードモナスフルオレッセンスに好ましいコドンを使用して構築した。配列番号：22は、発現された合成のコレラ毒素B遺伝子によってコード化されたアミノ酸配列を示し、配列番号：23は、発現された合成の最適化されたコレラ毒素B遺伝子のDNA配列を示す。

【0184】

CRM197と共に使用される、同じ10のシュードモナスフルオレッセンス分泌リーダーコード配列に融合された、最適化されたコレラ毒素B配列を運ぶプラスミド（表8に示される）を構築した。分泌リーダーを、ペリプラズムに対するタンパク質を適切に折り重ねられた及び活性型の回収率に向けるために含む。

20

【0185】

組み換え型コレラ毒素Bタンパク質に融合される10の分泌リーダーを発現する構築物を、シュードモナスフルオレッセンス宿主において試験した。表9に記録された4つの宿主を、各々の発現プラスミドにより試験した。宿主細胞を、示されたプラスミドにより電気穿孔し、CRM197高スループット発現のために上述されるような、96－ウェルフォーマットにおいて成長させ、誘発した。サンプルを、CRM197高スループット発現サンプルのために上述されるようなSDS－CGEによって調製し、分析した。

【0186】

各々の菌株からの可溶性画分の減少するSDS－CGE分析の結果を示す代表的なゲル様の画像を、図2に示す。表11は、構築されたコレラ毒素B発現菌株の各々に関する3つの複製の平均の可溶性コレラ毒素Bの収量及び標準偏差を示す。

30

【0187】

分泌リーダー及び宿主菌株の両方は、コレラ毒素B発現への著しい影響を示した。発現は、0.5mLの規模で、検知可能でない収量から0.2g/L以上までの範囲に及び、最も高い発現レベルは、hs1UV prc1 degP1 degP2 aprA欠失／DegP2 S219A過剰発現宿主バックグラウンドにおいて観察された。リーダー6（CupA2）及び8（PbpA20V）に融合されるコレラ毒素Bの発現は、全て4つの菌株において一貫して高いように思われる。

40

【0188】

【表 1 1 - 1】

表 11. コレラ毒素B発現要約

菌株番号	宿主菌株	プラスミド	リーダー	平均収量 (mg/L)	Std Dev(3つの複製)
PS538-081	1	p538-021	DsbA	25	8
PS538-082	1	p538-022	Azu	1	8
PS538-083	1	p538-023	Ibp-S31A	0	5
PS538-084	1	p538-024	Tpr	35	14
PS538-085	1	p538-025	CupB2	10	9
PS538-086	1	p538-026	CupA2	138	18
PS538-087	1	p538-027	NikA	0	5
PS538-088	1	p538-028	Pbp A20V	213	23
PS538-089	1	p538-029	DsbC	0	6
PS538-090	1	p538-030	TolB	0	4
PS538-091	2	p538-021	DsbA	133	62
PS538-092	2	p538-022	Azu	83	56
PS538-093	2	p538-023	Ibp-S31A	50	44
PS538-094	2	p538-024	Tpr	61	55
PS538-095	2	p538-025	CupB2	62	19
PS538-096	2	p538-026	CupA2	147	57
PS538-097	2	p538-027	NikA	31	28
PS538-098	2	p538-028	Pbp A20V	223	78
PS538-099	2	p538-029	DsbC	41	24
PS538-100	2	p538-030	TolB	6	5
PS538-101	3	p538-021	DsbA	1	7
PS538-102	3	p538-022	Azu	1	2
PS538-103	3	p538-023	Ibp-S31A	19	17
PS538-104	3	p538-024	Tpr	28	36
PS538-105	3	p538-025	CupB2	5	9
PS538-106	3	p538-026	CupA2	40	12
PS538-107	3	p538-027	NikA	5	10
PS538-108	3	p538-028	Pbp A20V	45	19
PS538-109	3	p538-029	DsbC	0	6
PS538-110	3	p538-030	TolB	0	3

【 0 1 8 9】

【表 1 1 - 2】

PS538-111	4	p538-021	DsbA	0	5
PS538-112	4	p538-022	Azu	0	3
PS538-113	4	p538-023	Ibp-S31A	0	2
PS538-114	4	p538-024	Tpr	13	3
PS538-115	4	p538-025	CupB2	2	4
PS538-116	4	p538-026	CupA2	15	16
PS538-117	4	p538-027	NikA	0	2
PS538-118	4	p538-028	Pbp A20V	35	15
PS538-119	4	p538-029	DsbC	0	2
PS538-120	4	p538-030	TolB	0	2

【 0 1 9 0】

〈実施例 4：組み換え型コレラ毒素 B タンパク質の大規模発現〉

組み換え型コレラ毒素 B タンパク質を、シュードモナスフルオレッセンス P f e n e x 発現技術 (P f e n e x E x p r e s s i o n T e c h n o l o g y) (商 標) 菌株 P S 5 3 8 - 0 8 8 及び P S 5 3 8 - 0 9 1 において生成した。選択された菌株を、本明細書に、及び例えば R i e s e n b e r g , D . , e t a l . , 1 9 9 1 にも記載されるような無機塩培地を含む 2 リットルの発酵槽で成長させ、アンモニアを付けることにより、32℃及び pH 6.5 に維持した。溶解された酸素を、発酵槽に散布された空気及び酸素の攪拌及び流量の増加によって過剰に維持した。グリセロールを、過剰レベルを維持するために発酵の全体にわたって培養に送達した。これらの条件を、誘発用の標的培養細胞濁度 (5 7 5 n m (A ₅₇₅)) の光学濁度) が達するまで、すなわち標的タンパク質生成を開始するために IPTG が加えられた時点で、維持した。CTB 生成を開始するために IPTG を加えた。16-24 時間後、各々のバイオリアクターからの培養を遠心分離によって採取し、細胞ペレットを -80℃ で冷凍した。

10

【0191】

複数の発酵条件を、0.6 乃至 1.0 g/L の SDS-CGE によって決定されるような、トップ CTB 発現をもたらすと評価した。最上級の (t o p p e r f o r m i n g) 発酵培養を、pH 6.5 乃至 7.2 及び 32℃で、0.2 mM の IPTG を有するおよそ 80 乃至 160 の OD にて誘発した。可溶性の CTB 濃度を、SDS-CGE によって測定した (図 14 及び表 12 を参照) 。誘発されたタンパク質の同一性を、MALDI-TOF 質量分光法を使用するペプチド質量フィンガープリントによって確認した。

20

【0192】

【表 12】

表 12. 可溶性コレラ毒素 B 測定濃度

菌株	発酵	産生物	産出濃度(g/l)
PS538-088	U5	CTB	0.94 ± 0.03
PS538-088	U6	CTB	0.59 ± 0.01
PS538-091	U3	CTB	0.81 ± 0.09

【0193】

〈実施例 5：組み換え型百日咳毒素タンパク質の高スループット発現〉

30

〈百日咳トキソイド S1 E129A R9K 発現菌株の構築及び成長〉

S1 変異 E129A 及び R9K により、サブユニット S1、S2、S3、S4、及び S5 をコード化する百日咳トキソイドオペロンの配列を、組み換え型百日咳毒素の発現に使用した。図 3 は、オペロンのマップを示す。図 4 は、翻訳を伴う、オペロンの DNA 配列を示す (配列番号：24) 。図 5 は、S1、S2、S3、S4、及び S5 の個々のアミノ酸配列を示す。

【0194】

構築物を、表 13 に示される、8 つのシュードモナスフルオレッセンス宿主において発現した。宿主細胞を p538-081 により電気穿孔し、CRM197 高スループット発現のために上述されるような 96-ウェルフォーマットにおいて成長させ、誘発した。サンプルを、CRM197 高スループット発現サンプルのために上述されるような SDS-CGE によって調製し、分析した。

40

【0195】

【表 1 3】

表13. 百日咳毒素S1 E129A R9K発現菌株

菌株番号	宿主	遺伝子型	プラスミド	型
PS538-321	1	lon, la, aprA	p538-081	PD
PS538-322	2	hslUV, prc1, degP1, degP2 and aprA	p538-081	PD
PS538-323	3	dsbABCD	p538-081	FMO
PS538-324	4	grpE, dnaKJ	p538-081	FMO
PS538-325	5	htpX	p538-081	PD
PS538-326	6	RXF01590	p538-081	PD
PS538-327	7	lon, la, aprA 欠損; grpEおよびdnaKJを過剰発現する	p538-081	PD +FMO
PS538-328	8	ppiB (RXF05345)	p538-081	FMO

PD=プロテアーゼ欠損(Protease Deletion)(記録されたプロテアーゼは欠損する); FMO=フォールディングモジュレーター過剰発現(Folding Modulator Overexpressor)(記録されたフォールディングモジュレーターは過剰発現される。)

【0196】

〈発現された百日咳毒素のウェスタンブロット解析〉

上述された8つの培養からの可溶性画分を、百日咳トキソイド発現を評価するためにウェスタンブロットによって分析した。20マイクロリットルの可溶性画分(2倍希釈され、減少され、及び減少されなかった)を、1X Bio_Rad MESランニングバッファー中のBio_Rad 12% Bis-Tris Gel上で実行した。減少されたウェスタン分析のため、1XのXT還元剤を加えた。タンパク質を、20%のメタノールを有する1X NuPAGE転移バッファ(NuPAGE Transfer Buffer)(Invitrogen, NP0006-1)を使用して、60分間100Vで、SDS-PAGEから0.2μmのニトロセルロース膜(Biorad, 1620232)上に伝送した。細胞膜を、PBS(Pierce, 37528)におけるBlocker(商標)の1%のカゼインにおいて、室温で1時間遮断した。検出のため、希釈剤を捨て、百日咳菌毒素S4及びS1に対する各々のモノクローナル抗体の1:1000希釈の組み合わせを含んで、多くの物を加えた(Abcam, cat# ab37686 and #37547)。ブロットを4℃で一晩振ることによりインキュベートした。ブロットを、5分間各々PBS-Tweenにより3回洗浄し、その後、1時間室温で、ヤギ由来の抗マウスIgGペルオキシダーゼの1:5,000の希釈(Sigma, Cat# A4416)を含む、より多くの希釈剤においてインキュベートした。Immunopure Metal Enhanced DAB substrate(Pierce, 34065)を使用する発色現象の前に、ブロットを、5分間各々PBS-Tween(Sigma, P3563)により3回洗浄した。複数のサブユニットを、減少する及び減少しない条件下で、抗S1及び抗S4抗体によって検出した(図6)。観察された、発現されたトキソイドの減少した及び減少しないサンプルの横縞模様は、Sekura, et al. (J. Biological Chemistry 258: 14647, 1983)によって報告されるような、菌株165から精製された百日咳毒素に関して観察されたものと一致した。

【0197】

〈実施例6: 組み換え型百日咳毒素タンパク質の大規模発現〉

組み換え型百日咳毒素タンパク質を、シュードモナスフルオレッセンスPfeneX発現技術(PfeneX Expression Technology)(商標)菌株PS538-321、PS538-324、PS538-325、PS538-326、及びPS538-328において生成する。CTB大規模発現について上述されるように、選択された菌株を2リットルの発酵槽で成長させ、IPTGにより誘発し、サンプルを分析のために調製した。サンプルを、生成物形成のため、SDS-CGEによって分析し、それらの活性をウェスタンブロットによって分析した。

【0198】

〈実施例7: 組み換え型野生型百日咳トキソイドの高スループット発現〉

〈百日咳トキソイド発現菌株の構築及び成長〉

S 1を有する、サブユニットS 1、S 2、S 3、S 4、及びS 5をコード化する野生型の百日咳毒素オペロンの配列を、組み換え型百日咳トキソイドの発現に使用する。図13は、翻訳を伴う、野生型のオペロンのDNA配列を示す（配列番号：35）。

【0199】

構築物を、表14に示されるシュードモナスフルオレッセンス宿主において発現する。過剰発現プラスミドを有していない、記録される各菌株を、a)記載通りに（過剰発現プラスミドを有さない）；b) GrpE DnaKJ過剰発現プラスミドを含んで、及びc) DsbABCD過剰発現プラスミドを含んで試験する。宿主細胞をPTX WT発現プラスミドにより電気穿孔し、PTX S1 R9K E129A高スループット発現につ

10

【0200】

【表14-1】

表14. 百日咳毒素の野生型発現菌株

宿主	遺伝子型	型
9	hslUV prc2	PD
10	hslUV degP1	PD
11	la	PD
12	hslUV prc1 prc2	PD
13	lon la prc1 prc2	PD
14	RXF01590	PD
1	lon la aprA	PD
7	lon la prc1 degP2 aprA; GrpE DnaKJを過剰発現する	PD + FMO
15	RXF02151 RXF00428	PD

20

【0201】

【表 1 4 - 2】

16	lon la degP2	PD	
17	DsbABを過剰発現する	FMO	
18	DsbCDを過剰発現する	FMO	
19	prc1 degP2; degP2 S219Aを過剰発現する	PD + FMO	
20	prc1 degP2 clp1 aprA; degP2 S219Aを過剰発現する	PD + FMO	
21	prc1 degP2 lon aprA; degP2 S219Aを過剰発現する	PD + FMO	
22	prc1 degP2 degP1 aprA; degP2 S219Aを過剰発現する	PD + FMO	
23	lon prc1 degP2 degP1 aprA; degP2 S219Aを過剰発現する	PD + FMO	10
2	hslUV prc1 degP2 degP1 aprA; degP2 S219Aを過剰発現する	PD + FMO	
25	lon la degP2 prc1 aprA; degP2 S219Aを過剰発現する	PD + FMO	
26	degP2; SecBを過剰発現する	PD + FMO	
27	degP2; FkbPを過剰発現する	PD + FMO	
28	degP2; GroELESを過剰発現する	PD + FMO	
29	lon la aprA; SecBを過剰発現する	PD + FMO	
30	lon la aprA; FkbPを過剰発現する	PD + FMO	
31	lon la aprA; GroELESを過剰発現する	PD + FMO	
32	dsbC	PD	20
33	dsbC; DsbABを過剰発現する	PD + FMO	
3	DsbABCDを過剰発現する	FMO	
35	lexA aprA	PD	
36	SlyDを過剰発現する	FMO	
37	lon hslUV	PD	
38	Wt	---	
39	aprA	PD	
4	GrpE DnaKJを過剰発現する	FMO	
5	htpX	PD	
40	lon	PD	30
41	prc1	PD	
42	hslUV	PD	
43	degP2	PD	
44	degP1	PD	
45	prc2	PD	
46	RXF6451	PD	
6	RXF1590	PD	
48	RXF4692	PD	
49	hslUV mic	PD	
50	RXF2161	PD	40
51	RXF00133	PD	
52	RXF2796	PD	
53	RXF4968	PD	
54	DsbCを過剰発現する	FMO	

【表 1 4 - 3】

55	DsbACを過剰発現する	FMO
56	LepBを過剰発現する	FMO
57	SecBを過剰発現する	FMO
58	ClpAを過剰発現する	FMO
59	FklB2を過剰発現する	FMO
60	DnaK様を過剰発現する	FMO
61	FkbPを過剰発現する	FMO
62	PpiAを過剰発現する	FMO
8	PpiBを過剰発現する	FMO
63	HscAを過剰発現する	FMO
64	GshAを過剰発現する	FMO
65	Gorを過剰発現する	FMO
66	TrxCを過剰発現する	FMO
67	DsbGを過剰発現する	FMO
68	Ppiを過剰発現する	FMO
69	GroELESを過剰発現する	FMO
70	prc 1 aprA; GrpE DnaKJを過剰発現する	PD + FMO
71	過分泌	
72	DsbDを過剰発現する	FMO
73	過分泌	
74	過分泌	
75	prc1 prc2	PD
76	hslUV clpA	PD

*過剰発現プラスミドを有していないと記載された各菌株はそれぞれ試験される。a)記載通り(過剰発現プラスミドを有さない)、
b)GrpE DnaKJ過剰発現プラスミドを含む、c)DsbABCD過剰発現プラスミドを含む。PD=プロテアーゼ欠損(Protease Deletion)
(記録されたプロテアーゼが欠損する); FMO=フォールディングモジュレーター過剰発現(Folding Modulator Overexpressor)
(記録されたフォールディングモジュレーターが過剰発現される。)

【0203】

高小胞化菌株 (hyper-vesiculating strain) としても知られる、過分泌の菌株は、例えば、その全体において引用により本明細書に組み込まれる、WO2010/008764、「Pseudomonas Fluorescens Strains for Production of Extracellular Recombinant Protein」に記載される。

【0204】

〈実施例 8：組み換え型破傷風毒素フラグメント C タンパク質の高スループット発現〉
〈破傷風毒素 C 発現菌株の構築及び成長〉

破傷風毒素 C コード配列を、破傷風毒素 C アミノ酸配列順序をコード化するためにシュードモナスフルオレッセンスに好ましいコドンを使用して構築した。配列番号：30は、発現された合成の破傷風毒素 C 遺伝子によってコード化されたアミノ酸配列を示し、及び配列番号：31は、発現された合成の最適化された破傷風毒素 C 遺伝子の DNA 配列を示す。

【0205】

CRM197 (表 8 に示される) と共に使用される、同じ 10 のシュードモナスフルオレッセンス分泌リーダーコード配列に融合された、最適化された破傷風毒素 C 配列を運ぶプラスミドを構築した。分泌リーダーを、ペリプラズムに対するタンパク質を適切に折り重ねられた及び活性型の回収率に向けるために含む。

【0206】

組み換え型破傷風毒素 C タンパク質に融合する 10 の分泌リーダーを発現する構築物を

、シュードモナスフルオレッセンス宿主において試験した。表9に記録された4つの宿主を、各々のリーダーにより試験した。宿主細胞を、示されたプラスミドにより電気穿孔し、CRM197高スループット発現について上述されるような96-ウェルフォーマットにおいて成長させ、誘発した。サンプルを、CRM197高スループット発現サンプルについて上述されるようなSDS-CGEによって調製し、分析した。

【0207】

各々の菌株からの可溶性画分の減少するSDS-CGE分析の結果を示す代表的なゲル様の画像を、図7に示す。表15は、構築された破傷風毒素C-発現菌株の各々に関する3つの複製の平均の可溶性破傷風毒素Cの収量及び標準偏差を示す。破傷風毒素Cフラグメントは、試験されたほとんどの菌株において十分に発現されるように思われ、最も高い収量は、hslUV prc1 degP1 degP2 aprA欠失/DegP2 S219A過剰発現発現宿主(overexpression expression host)において600mg/Lにまで及ぶ。菌株PS538-529、PS538-538、PS538-544、PS538-546、PS538-547、PS538-548、PS538-558、PS538-565及びPS538-568を、更なる評価のため選択した。

【0208】

【表15-1】

表15. 破傷風毒素C発現の要約

菌株番号	宿主	プラスミド	リーダー	平均収量 (mg/L)	Std Dev(3つの複製)
PS538-529	1	p538-132	DsbA	261	75
PS538-530	1	p538-133	Azu	200	82
PS538-531	1	p538-134	Ibp-S31A	165	64
PS538-532	1	p538-135	Tpr	207	107
PS538-533	1	p538-136	CupB2	205	128
PS538-534	1	p538-137	CupA2	200	117
PS538-535	1	p538-138	NikA	174	96
PS538-536	1	p538-139	Pbp A20V	311	156
PS538-537	1	p538-140	DsbC	188	97
PS538-538	1	p538-141	TolB	129	63
PS538-539	2	p538-132	DsbA	486	89
PS538-540	2	p538-133	Azu	495	93
PS538-541	2	p538-134	Ibp-S31A	568	68
PS538-542	2	p538-135	Tpr	589	364
PS538-543	2	p538-136	CupB2	534	318
PS538-544	2	p538-137	CupA2	504	134
PS538-545	2	p538-138	NikA	444	145

【0209】

【表 1 5 - 2】

PS538-546	2	p538-139	Pbp A20V	637	280
PS538-547	2	p538-140	DsbC	574	68
PS538-548	2	p538-141	TolB	438	61
PS538-549	3	p538-132	DsbA	174	37
PS538-550	3	p538-133	Azu	180	58
PS538-551	3	p538-134	Ibp-S31A	88	58
PS538-552	3	p538-135	Tpr	247	134
PS538-553	3	p538-136	CupB2	199	39
PS538-554	3	p538-137	CupA2	165	69
PS538-555	3	p538-138	NikA	97	90
PS538-556	3	p538-139	Pbp A20V	297	112
PS538-557	3	p538-140	DsbC	151	52
PS538-558	3	p538-141	TolB	35	13
PS538-559	4	p538-132	DsbA	39	39
PS538-560	4	p538-133	Azu	40	43
PS538-561	4	p538-134	Ibp-S31A	36	40
PS538-562	4	p538-135	Tpr	35	39
PS538-563	4	p538-136	CupB2	54	26
PS538-564	4	p538-137	CupA2	42	36
PS538-565	4	p538-138	NikA	44	37
PS538-566	4	p538-139	Pbp A20V	37	40
PS538-567	4	p538-140	DsbC	39	43
PS538-568	4	p538-141	TolB	45	38

【0 2 1 0】

＜実施例 9：組み換え型破傷風毒素フラグメント C タンパク質の大規模発現＞

組み換え型破傷風毒素 C タンパク質を、シュードモナスフルオレッセンス *P f e n e x* 発現技術 (*P f e n e x* *E x p r e s s i o n* *T e c h n o l o g y*) (商標) 菌株 *P S 5 3 8 - 5 2 9*、*P S 5 3 8 - 5 3 8*、*P S 5 3 8 - 5 4 4*、*P S 5 3 8 - 5 4 6*、*P S 5 3 8 - 5 4 7*、*P S 5 3 8 - 5 4 8*、*P S 5 3 8 - 5 5 8*、*P S 5 3 8 - 5 6 5* 及び *P S 5 3 8 - 5 6 8* において生成した。選択された菌株を、*C R M 1 9 7* について上述されるような無機塩培地を含む 2 リットルの発酵槽において成長させた。

【0 2 1 1】

複数の発酵条件を、*S D S - C G E* によって決定されるような 6 乃至 10 g/L の菌株 *P S 5 3 8 - 5 2 9*、*P S 5 3 8 - 5 4 6*、及び *P S 5 3 8 - 5 4 7* からのトップ可溶性 *T T C* の発現をもたらすと評価した (図 1 1 A 及び表 1 6 を参照)。最上級の発酵培養を、*p H 7. 2* 及び *3 2 °C* で、0. 2 mM の *I P T G* を有するおよそ 1 6 0 の *O D* にて誘発した。誘発されたタンパク質の同一性を、*M A L D I - T O F* 質量分光法及びウェスタンブロットを使用する、ペプチド質量フィンガープリントによって確認した。質量分光法とウェスタンブロット解析は、*P S 5 3 8 - 5 2 9*、*P S 5 3 8 - 5 4 6* 及び *P S 5 3 8 - 5 4 7* (それぞれ *D s b A*、*P b p A 2 0 V* 及び *D s b C*) の分泌リーダーが、これらの発現条件下で 1 0 0 % の発現されたタンパク質から処理されないことを示した。しかしながら、*T o l B* リーダーを、分泌されたタンパク質から正確に開裂されるものと同定した (示されないデータ)。分泌リーダーの高忠実度開裂及び低レベルの分解により *T T C* の生成を可能にした菌株を同定するため、上記で概説された条件を使用して、*T o l B - T T C* 発現菌株 *P S 5 3 8 - 5 3 8*、*P S 5 3 8 - 5 4 8*、*P S 5 3 8 - 5 5 8* 及び *P S 5 3 8 - 5 6 8* を、2 L の発酵規模でスクリーンした。菌株 *P S 5 3 8 - 5 3 8*、*P S 5 3 8 - 5 4 8* 及び *P S 5 3 8 - 5 5 8* を、ウェスタンブロット解析によって材料の類似の

品質及び収量を生成するために観察した（図 1 1 B）。

【 0 2 1 2 】

【表 1 6】

表16. 可溶性破傷風毒素C(TTC)滴定濃度

菌株	発酵	産生物	産生濃度(g/L)
PS538-529	U1 - 図11A	TTC	5.7 ± 1.3
PS538-546	U7 - 図11A	TTC	9.5 ± 1.1
PS538-547	U5 - 図11A	TTC	6.2 ± 1.9
PS538-538	U1 - 図11B	TTC	2.5 ± 0.09
PS538-538	U2 - 図11B	TTC	1.8 ± 0.2
PS538-548	U3 - 図11B	TTC	5.3 ± 0.6
PS538-548	U4 - 図11B	TTC	4.5 ± 0.2
PS538-558	U5 - 図11B	TTC	1.1 ± 0.8
PS538-558	U6 - 図11B	TTC	1.9 ± 0.1
PS538-568	U7 - 図11B	TTC	0.2 ± 0.01
PS538-568	U8 - 図11B	TTC	0.2 ± 0.01

10

【 0 2 1 3 】

〈実施例 1 0：組み換え型クロストリジウムディフィシレ B タンパク質の高スループット発現〉

〈T c d B 発現菌株の構築及び成長〉

20

T c d B コード配列を、T c d B アミノ酸配列をコード化するためシュードモナスフルオレッセンスに好ましいコドンを使用して構築した。配列番号：3 2 は、発現された合成の T c d B 遺伝子によってコード化されたアミノ酸配列を示し、配列番号：3 3 は、発現された合成の最適化された T c d B 遺伝子の DNA 配列を示す。

【 0 2 1 4 】

最適化された T c d B 配列を運ぶプラスミドを、表 1 7 に記録された遺伝子型を有する、シュードモナスフルオレッセンス宿主において試験した。宿主細胞を、細胞質の発現プラスミド p 5 3 8 - 2 1 1 により電気穿孔し、CRM 1 9 7 高スループット発現について上述されるような 9 6 - ウェルフォーマットにおいて成長させ、誘発した。サンプルを、CRM 1 9 7 高スループット発現サンプルについて上述されるような SDS - C G E によって調製し、分析した。

30

【 0 2 1 5 】

【表 1 7 - 1】

表17. TcdB宿主菌株

宿主菌株	遺伝子型	型
37	hslUV lon	PD
38		WT
4	dnaKJ grpE	FMO
5	htpX	PD
40	lon	PD
41	prc1	PD
42	hslUV	PD
43	degP2	PD

40

【 0 2 1 6 】

【表 17-2】

44	degP1	PD
45	prc2	PD
47	RXF01590	PD
49	hslUV mic	PD
53	RXF04968	PD
55	dsbAC	FMO
61	fkbp	FMO
66	trxC	FMO
72	dsbD	FMO
76	hslUV clpA	PD
12	hslUV prc1 prc2	PD
1	lon la aprA	PD
16	lon la degP2	PD
2	hslUV prc1 degP1 degP2 aprA 欠損; degP2 S219Aを過剰発現する	PD + FMO
3	dsbABCD	FMO
21	degP2 S219Aの過剰発現を伴う lon prc1 degP2 aprA欠損	PD + FMO

10

【0217】

20

試験された24の菌株の各々からの可溶性画分の減少するSDS-CGE分析の結果を示す代表的なゲル様の画像を、図8に示す。表18は、構築されたTcdB発現菌株の各々に関する3つの複製の平均の可溶性TcdBの収量及び標準偏差を示す。菌株PS538-654、PS538-659、PS538-669、PS538-671、及びPS538-674を、更なる評価のため選択した。

【0218】

【表 18】

表18. TcdB発現要約

菌株番号	宿主菌株	プラスミド	平均収量 (mg/L)	Std Dev(3つの複製)
PS538-651	37	p538-211	103	7
PS538-652	38	p538-211	55	4
PS538-653	4	p538-211	57	1
PS538-654	5	p538-211	166	13
PS538-655	40	p538-211	88	3
PS538-656	41	p538-211	68	5
PS538-657	42	p538-211	90	14
PS538-658	43	p538-211	68	2
PS538-659	44	p538-211	109	8
PS538-660	45	p538-211	78	4
PS538-661	6	p538-211	98	15
PS538-662	49	p538-211	106	10
PS538-663	53	p538-211	91	6
PS538-664	55	p538-211	45	4
PS538-665	61	p538-211	63	6
PS538-666	66	p538-211	56	8
PS538-667	72	p538-211	70	8
PS538-668	76	p538-211	80	6
PS538-669	12	p538-211	117	39
PS538-670	1	p538-211	108	18
PS538-671	16	p538-211	247	65
PS538-672	2	p538-211	32	6
PS538-673	3	p538-211	52	2
PS538-674	21	p538-211	145	12

【0219】

〈実施例 11：組み換え型クロストリジウムディフィシレ毒素 B タンパク質の大規模発現〉

組み換え型クロストリジウムディフィシレ毒素 B タンパク質を、シュードモナスフルオレッセンス P f e n e x 発現技術 (P f e n e x E x p r e s s i o n T e c h n o l o g y) (商 標) 菌株 P S 5 3 8 - 6 5 4、P S 5 3 8 - 6 5 9、P S 5 3 8 - 6 6 9、P S 5 3 8 - 6 7 1、及び P S 5 3 8 - 6 7 4 において生成した。選択された菌株を 2 リットルの発酵槽で成長させ、IPTG により誘発し、CTB 大規模発現について上述されるように、サンプルを分析して調製した。

【0220】

複数の発酵条件を、およそ 2 g / l の S D S - C G E によって決定されるようなトップクロストリジウムディフィシレ B 毒素発現をもたらすと評価した。最上級の発酵培養を、pH 6.5 及び 32℃で、0.08 mM の IPTG を有するおよそ 160 の OD にて誘発した。可溶性のクロストリジウムディフィシレ B 毒素濃度を S D S - C G E によって決定した (図 12 及び表 19 を参照)。誘発されたタンパク質の同一性をウェスタンブロットによって確認した。

【0221】

【表 19】

表19. 可溶性クロストリジウムディフィシルB毒素(TcdB)滴定

菌株	発酵	産出物	産出濃度(g/L)
PS538-671	U5	TcdB	1.6 ± 0.4
PS538-671	U6	TcdB	2.1 ± 0.2
PS538-674	U7	TcdB	1.8 ± 0.2

【0222】

10

〈実施例12：組み換え型外毒素Aタンパク質の高スループット発現〉

〈緑膿菌外毒素A発現菌株の構築及び成長〉

緑膿菌外毒素A突然変異体 r E P A コード配列を、r E P A アミノ酸配列をコード化するためシュードモナスフルオレッセンスに好ましいコドンを使用して構築した。図13は、発現した合成の r E P A 遺伝子のアミノ酸及びDNA配列を示す。

【0223】

CRM197（表8に示される）と共に使用される同じ10のシュードモナスフルオレッセンス分泌リーダーコード配列に融合される、図13に示されるような、いずれかの欠失変異株 r E P A をコード化する最適化された配列を運ぶプラスミドを構築した。分泌リーダーコード配列を、ペリプラズムに対するタンパク質を適切に折り重ねられた及び活性型の回収率に向けるために含む。

20

【0224】

r E P A タンパク質に融合される10の分泌リーダーを発現する構築物を、表20に記録された、8つのシュードモナスフルオレッセンス宿主において試験した。宿主細胞を、示されたプラスミドにより電気穿孔し、CRM197高スループット発現について上述されるような96ウェルフォーマットにおいて成長させ、誘発した。サンプルを、CRM197高スループット発現サンプルについて上述されるようなSDS-CGEによって調製し、分析した。最も高い収量は、可溶性の r E P A の4.7乃至6.7 g/lの範囲に及ぶ。

【0225】

30

【表20】

表20. 外毒素A宿主株

宿主菌株	遺伝子型	型
5	htpX	PD
6	セラリシン	PD
7	Lon LaI aprA ; grpE dnaKLの過剰発現を伴う	PD/FMO
8	ppiB	PD
1	Lon-, La-, aprA-	PD
2	degP2 S219Aの過剰発現を伴うhslUV-, prc1-, degP1-, degP2-, aprA-	PD + FMO
3	dsbABCD 過剰発現	FMO
4	grpE, dnaKJ 過剰発現	FMO

40

【0226】

宿主細胞を、示されたプラスミドにより電気穿孔し、CRM197高スループット発現について上述されるような96ウェルフォーマットにおいて成長させ、誘発した。サンプルを、CRM197高スループット発現サンプルについて上述されるようなSDS-CGEによって調製し、分析した。最も高い収量は、可溶性の外毒素Aタンパク質の1.6乃至2.2 g/lの範囲に及んだ。表21は、更なる試験のため選択された発現菌株の各々に関する可溶性の r E P A の収量を示す。

【0227】

50

【表 2 1 - 1】

表21. rEPA HTP発現要約

株主菌株	宿主	プラスミド	分泌リーダー	容量収量 (g/L)
PS538-1670	3	p538-250	DsbC	6.7
PS538-1663	3	p538-243	Ibp-s31a	5.7
PS538-1633	1	p538-243	Ibp-s31a	5.7
PS538-1640	1	p538-249	Pbp-A20V	4.7
PS538-1662	3	p538-242	Azu	4.2
PS538-1632	1	p538-242	Azu	3.2
PS538-1671	4	p538-241	DsbA	2.9
PS538-1665	3	p538-245	Tpr	2.7
PS538-1667	3	p538-247	CupA2	2.6
PS538-1674	4	p538-244	TolB	2.3
PS538-1672	4	p538-242	Azu	2.2
PS538-1676	4	p538-246	CupB2	2.2
PS538-1677	4	p538-247	CupA2	2.1
PS538-1635	1	p538-245	Tpr	2.0
PS538-1675	4	p538-245	Tpr	2.0
PS538-1673	4	p538-243	Ibp-s31a	2.0
PS538-1680	4	p538-250	DsbC	1.9
PS538-1679	4	p538-249	Pbp-A20V	1.7
PS538-1669	3	p538-249	Pbp-A20V	1.6
PS538-1678	4	p538-248	NikA	1.5
PS538-1652	2	p538-242	Azu	1.5

10

20

【 0 2 2 8】

【表 2 1 - 2】

PS538-1653	2	p538-243	Ibp-s31a	1.4
PS538-1660	2	p538-250	DsbC	1.4
PS538-1637	1	p538-247	CupA2	1.3
PS538-1666	3	p538-246	CupB2	1.1
PS538-1636	1	p538-246	CupB2	1.0
PS538-1634	1	p538-244	TolB	1.0
PS538-1627	8	p538-247	CupA2	0.8
PS538-1631	1	p538-241	DsbA	0.8
PS538-1622	8	p538-242	Azu	0.8
PS538-1661	3	p538-241	DsbA	0.7
PS538-1603	5	p538-243	Ibp-s31a	0.6
PS538-1630	8	p538-250	DsbC	0.6
PS538-1602	5	p538-242	Azu	0.6
PS538-1605	5	p538-245	Tpr	0.6
PS538-1623	8	p538-243	Ibp-s31a	0.6
PS538-1664	3	p538-244	TolB	0.5
PS538-1668	3	p538-248	NikA	0.5
PS538-1610	5	p538-250	DsbC	0.5
PS538-1606	5	p538-246	CupB2	0.4
PS538-1659	2	p538-249	Pbp-A20V	0.4
PS538-1607	5	p538-247	CupA2	0.4
PS538-1626	8	p538-246	CupB2	0.4
PS538-1625	8	p538-245	Tpr	0.4
PS538-1638	1	p538-248	NikA	0.3
PS538-1609	5	p538-249	Pbp-A20V	0.3
PS538-1604	5	p538-244	TolB	0.3
PS538-1629	8	p538-249	Pbp-A20V	0.3
PS538-1657	2	p538-247	CupA2	0.2
PS538-1651	2	p538-241	DsbA	0.2
PS538-1601	5	p538-241	DsbA	0.2
PS538-1624	8	p538-244	TolB	0.2
PS538-1621	5	p538-241	DsbA	0.2
PS538-1608	5	p538-248	NikA	0.2
PS538-1654	2	p538-244	TolB	0.2
PS538-1628	8	p538-248	NikA	0.1
PS538-1658	2	p538-248	NikA	0.1
PS538-1655	2	p538-245	Tpr	0.1
PS538-1641	7	p538-241	DsbA	0.1
PS538-1611	6	p538-241	DsbA	NQ
PS538-1612	6	p538-242	Azu	NQ
PS538-1613	6	p538-243	Ibp-s31a	NQ
PS538-1614	6	p538-244	TolB	NQ
PS538-1615	6	p538-245	Tpr	NQ
PS538-1616	6	p538-246	CupB2	NQ
PS538-1617	6	p538-247	CupA2	NQ
PS538-1618	6	p538-248	NikA	NQ
PS538-1619	6	p538-249	Pbp-A20V	NQ
PS538-1620	6	p538-250	DsbC	NQ
PS538-1642	7	p538-242	Azu	NQ
PS538-1643	7	p538-243	Ibp-s31a	NQ

【 0 2 2 9】

【表 2 1 - 3】

PS538-1644	7	p538-244	TolB	NQ
PS538-1645	7	p538-245	Tpr	NQ
PS538-1646	7	p538-246	CupB2	NQ
PS538-1647	7	p538-247	CupA2	NQ
PS538-1648	7	p538-248	NikA	NQ
PS538-1649	7	p538-249	Pbp-A20V	NQ
PS538-1650	7	p538-250	DsbC	NQ
PS538-1656	2	p538-246	CupB2	NQ

NQ=定量化不可能 (Not Quantifiable)

【0 2 3 0】

〈実施例 1 3：組み換え型緑膿菌外毒素 A タンパク質の大規模発現〉

組み換え型緑膿菌外毒素 A タンパク質 (rEPA) を、2 リットルの発酵槽におけるシュードモナスフルオレッセンス菌株 PS538-1633、PS538-1640 及び PS538-1670 において生成した。培養を、本明細書に、また例えば Riesenb
erg, D., et al., 1991 に記載されるような無機塩培地を含む 2 リットルの発酵槽において成長させ、アンモニアを追加することにより 32℃ 及び pH 6.5 に維持した。溶解された酸素を、発酵槽に散布された空気及び酸素の攪拌及び流量の増加によって過剰に維持した。グリセロールを、過剰レベルを維持するために発酵の全体にわたって培養に送達する。これらの条件を、誘発用の標的培養細胞濁度 (575 nm (A575) での光学濁度) が達するまで、すなわち rEPA 生成を開始するために IPTG が加えられた時点で、維持した。誘発時の細胞密度は、A575 の 40 から 200 までの吸光度単位 (AU) で変えることができる。IPTG 濃度を、0.02 乃至 0.4 mM の範囲で変えることができる。pH 6 乃至 7.5 及び温度 20 乃至 35℃。16-24 時間後、各々のバイオリアクターからの培養を遠心分離によって採取し、細胞ペレットを -80℃ で冷凍した。サンプルを生成物形成用の SDS-CGE によって分析した。

【0 2 3 1】

複数の発酵条件を、32 g/L までの SDS-CGE によって決定されるようなトップ rEPA 発現をもたらすと評価した (図 15 及び 16)。誘発されたタンパク質の同一性を、緑膿菌外毒素 A に特異的な抗体を使用するウェスタンブロット解析によって確認した (図 17)。得た収量を表 22 に示す。

【0 2 3 2】

【表 2 2】

表 22. rEPA 発酵の分析

菌株番号	発酵	収量 (g/L)
PS538-1633	U1	15.5 +/- 0.7
PS538-1633	U2	11.1 +/- 0.6
PS538-1640	U3	20.1 +/- 1.7
PS538-1640	U5	31.9 +/- 1.6
PS538-1670	U6	20.0 +/- 0.7
PS538-1670	U7	14.6 +/- 1.1
PS538-1670	U8	31.0 +/- 1.7

【0 2 3 3】

〈実施例 1 4：組み換え型野生型ジフテリア毒素タンパク質の高スループット発現〉

〈野生型ジフテリア毒素発現菌株の構築及び成長〉

ジフテリア毒素コード配列を、野生型ジフテリア毒素アミノ酸配列をコード化するためシュードモナスフルオレッセンスに好ましいコドンを使用して構築する。配列番号：36 は、発現された合成のジフテリア毒素遺伝子のアミノ酸配列を示し、配列番号：37 は、発現された合成の最適化されたジフテリア毒素遺伝子の DNA 配列を示す。

【0 2 3 4】

CRM197 (表 8 に示される) と共に使用される 10 のシュードモナスフルオレッセ

ンス分泌リーダーコード配列に融合される、ジフテリア毒素をコード化する最適化された配列を運ぶプラスミドを構築する。分泌リーダーコード配列を、ペリプラズムに対するタンパク質を適切に折り重ねられた及び活性型の回収率に向けるために含む。

【0235】

組み換え型ジフテリア毒素タンパク質に融合する10の分泌リーダーを発現する構築物を、シュードモナスフルオレッセンス宿主において試験する。表9に記録された4つの宿主を、各々のリーダーにより試験する。宿主細胞を、示されたプラスミドにより電気穿孔し、CRM197高スループット発現について上述されるような96-ウェルフォーマットにおいて成長させ、誘発した。サンプルを、CRM197高スループット発現サンプルについて上述されるようなSDS-CGEによって調製し、分析する。

10

【0236】

〈実施例15：組み換え型野生型ジフテリア毒素タンパク質の大規模発現〉

組み換え型野生型ジフテリア毒素タンパク質を、選択されたシュードモナスフルオレッセンスPfensex発現技術(Pfensex Expression Technology) (商標) 菌株において生成する。選択された菌株を、2リットルの発酵槽において成長させ、IPTGにより誘発し、CRM197大規模発現について上述されるように、サンプルを分析のために調製した。サンプルをSDS-CGEによって分析する。

【0237】

〈実施例16：組み換え型コレラホロトキシタンパク質の高スループット発現〉

〈CTX発現菌株の構築及び成長〉

20

CTXコード配列を、CTXアミノ酸配列をコード化するためシュードモナスフルオレッセンスに好ましいコドンを使用して構築する。コード配列は、図14に示されるCTX遺伝子のアミノ酸及びDNA配列に基づく。

【0238】

CRM197 (表8に示される) と共に使用される10のシュードモナスフルオレッセンス分泌リーダーコード配列に融合された、最適化されたCTX配列を運ぶプラスミドを構築する。分泌リーダーを、ペリプラズムに対するタンパク質を適切に折り重ねられた及び活性型の回収率に向けるために含む。

【0239】

組み換え型CTXタンパク質に融合する10の分泌リーダーを発現する構築物を、シュードモナスフルオレッセンス宿主において試験する。表9に記録された4つの宿主を、各々の発現プラスミドにより試験する。宿主細胞を、示されたプラスミドにより電気穿孔し、CRM197高スループット発現について上述されるような96-ウェルフォーマットにおいて成長させ、誘発した。サンプルを、CRM197高スループット発現サンプルについて上述されるようなSDS-CGEによって調製し、分析する。

30

【0240】

〈実施例17：組み換え型コレラホロトキシタンパク質の大規模発現〉

組み換え型コレラホロトキシタンパク質を、選択されたシュードモナスフルオレッセンスPfensex発現技術(Pfensex Expression Technology) (商標) 菌株において生成する。選択された菌株を、2リットルの発酵槽において成長させ、IPTGにより誘発し、CRM197大規模発現について上述されるように、サンプルを分析のために調製した。サンプルをSDS-CGEによって分析する。

40

【0241】

【表 2 3 - 1】

表23. 配列一覧

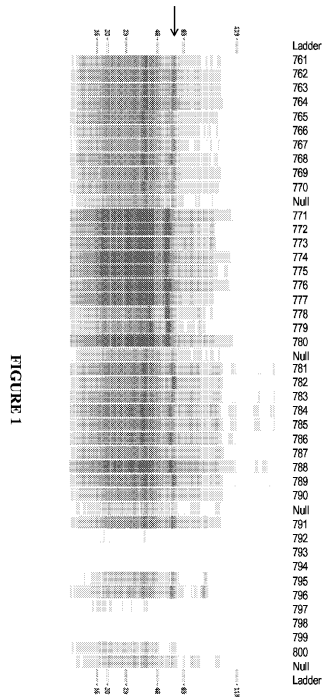
配列番号	記載
1	CRM197 アミノ酸配列
2	最適化されたCRM197 DNA配列
3	DsbA 分泌リーダー
4	Azu
5	Ibp-S31A
6	Tpr
7	CupB2
8	CupA2
9	NikA
10	Pbp A20V
11	DsbC
12	TolB
13	Pbp
14	Lao
15	CupC2
16	PorE
17	Pbp
18	FlgI
19	ttg2C
20	CRM197の自然のリーダー
21	分解産物GADD
22	コレラ毒素Bアミノ酸配列
23	最適化され翻訳されたコレラ毒素B DNA配列 配列番号22のアミノ酸配列をコード化する
24	百日咳毒素S1 R9K E129A DNA配列
25	百日咳毒素S1 R9K E129A アミノ酸配列
26	百日咳毒素S2 アミノ酸配列
27	百日咳毒素S3 アミノ酸配列
28	百日咳毒素S4 アミノ酸配列
29	百日咳毒素S5 アミノ酸配列
30	破傷風毒素Cアミノ酸配列

【 0 2 4 2 】

【表 2 3 - 2】

31	最適化された破傷風毒素C
32	TcdBアミノ酸配列
33	最適化されたTcdB DNA配列
34	外毒素Aアミノ酸配列
35	野生型百日咳トキソイドのDNA配列
36	野生型ジフテリア毒素アミノ酸配列
37	最適化された野生型ジフテリア毒素DNA配列
38	コレラ毒素Aアミノ酸配列
39	コレラ毒素Bアミノ酸配列
40	コレラホロトキシン(CTX)DNA配列
41	野生型百日咳毒素S1 アミノ酸配列
42	百日咳毒素S2 アミノ酸配列
43	百日咳毒素S3 アミノ酸配列
44	百日咳毒素S4 アミノ酸配列
45	百日咳毒素S5 アミノ酸配列
46	ヘキサヒスチジンアフィニティータグ

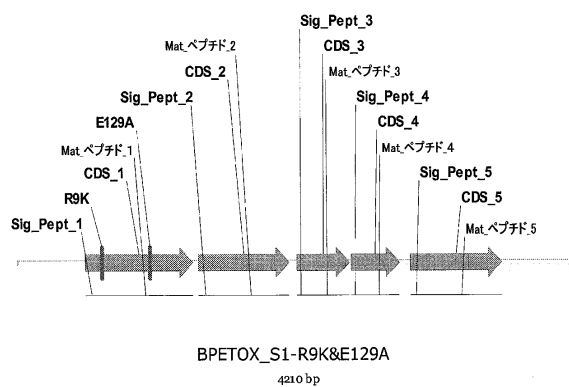
【図 1】



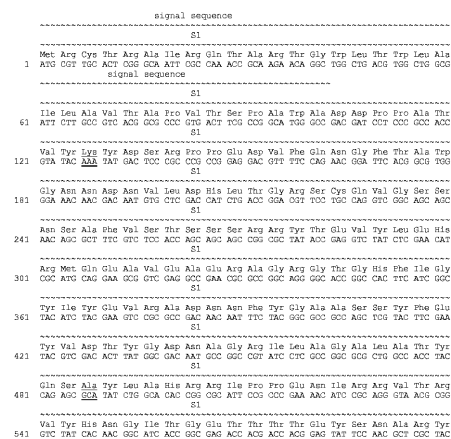
【図 2】



【図 3】



【図 4 - 1】



【図 4－2】

81

Val Ser Gln Gln Thr Arg Ala Asn Pro Asn Pro Tyr Thr Ser Arg Arg Ser Val Ala Ser
601 GTC AGC CAG CAG ACT CGC GGC AAT CCC AAC CCC TAC ACA TCG CGA AGG TCC GTA CGC TCG
81

Ile Val Gly Thr Leu Val Arg Met Ala Pro Val Ile Gly Ala Cys Met Ala Arg Gln Ala
601 ATC CTC GGC ACA TTG CTG CCG ATG GCG CGC GCG ATA GGC GGT TGG ATG GCG CGG CAG GCG
81

Glu Ser Ser Glu Ala Met Ala Ala Trp Ser Glu Arg Ala Gly Glu Ala Met Val Leu Val
721 GAA AUG TCC GAG GGC ATG GCA GCG TGG TCC GAA CGC GCG GCG GAG GCG ATG GTT CTC GTG
81

Tyr Tyr Glu Ser Ile Ala Tyr Ser Phe
781 TAC TAC GAA AGC ATC GCG TAT TCG TTC TAG AAC TGG CCG AGC CGC GAA CTC CGG TAA
signal sequence

82

Met Pro Ile Asp Arg Lys Thr Leu Cys His Leu Leu Ser Val Leu Pro Leu
841 TTG AAC AGC ATG CGC ATC GAC CGC AGC AGC CTC TCC CAT CTC CTG TCC GTT CTG CGC TTG
signal sequence

82

Ala Leu Leu Gly Ser His Val Ala Arg Ala Ser Thr Pro Gly Ile Val Ile Pro Pro Gln
901 GGC CTC CTC GGA TCT GAT CAG CTG GCG GCG GCG TCC AGC GCA GGC ATC GTC ATT CGC CGC CAG
82

Glu Gln Ile Thr Gln His Gly Ser Pro Tyr Gly Arg Cys Ala Asn Lys Thr Arg Ala Leu
961 GAA CAG ATT ACT CAG CAT GGC AGC CGC TAT GGA CGC TGC GCG AAC AGC ACT CGT GCG CTG
82

Thr Val Ala Glu Leu Arg Gly Ser Gly Asp Leu Gln Glu Tyr Leu Arg His Val Thr Arg
1021 ACC CTG GCG GAA TTG GCG GCG ACC GCG GAT CTC CAG GAG TAC CTC GGT CAT GTG AGC CGC
82

Gly Trp Ser Ile Phe Ala Leu Tyr Asp Gly Thr Tyr Leu Gly Gly Glu Tyr Gly Gly Val
1081 GGC TGG TCA ATA TTT GCG CTC TAT GGC ACC TAT CTC GCG GCG GAA TAT GCG GCG GTG
82

Ile Lys Asp Gly Thr Pro Gly Gly Ala Phe Asp Leu Lys Thr Thr Phe Cys Ile Met Thr
1141 ATC AGC GAC GGA ACA CGC GCG GCG GCA TTT GAC CTC AAA AGC AGC TTC TCG ATC ATG ACC
82

Thr Arg Asn Thr Gly Gln Pro Ala Thr Asp His Tyr Tyr Ser Asn Val Thr Ala Thr Arg
1201 ACG GCG AAT AGC GGT CAA CGC GGA AGG GAT CAC TAC TAC AGC AAC GTC ACC GCG ACT CGC

FIGURE 4-2

【図 4－3】

82

Leu Leu Ser Ser Thr Asn Ser Arg Leu Cys Ala Val Phe Val Arg Ser Gly Gln Pro Val
1261 CTG CTC TCC AGC ACC AAC AGC AGG CTA TGC CGC GTC TTC CTC AGA AGC GGG CAA CGC GTC
82

Ile Gly Ala Cys Thr Ser Pro Tyr Asp Gly Lys Tyr Trp Ser Met Tyr Ser Arg Leu Arg
1321 ATT GGC GCG TGC ACC AGC CGC TAT GAC GGC AAG TAC TGG AGC ATG TAC AGC CGC CTG CGC
82

Lys Met Leu Tyr Leu Ile Tyr Val Ala Gly Ile Ser Val Arg Val His Val Ser Lys Glu
1391 AAA ATG CTT TAC CTG ATC TAC CTG GCG GGC ATC TCC GTA GGC GTC CAT GTC AGC AAG GAA
82

Glu Gln Tyr Tyr Asp Tyr Glu Asp Ala Thr Phe Glu Thr Tyr Ala Leu Thr Gly Ile Ser
1441 GAA CAG TAT TAC GAC TAT GAG GAC GGA ACG TTC TCG AGT TAC GCG CTT AGC GGC ATC TCC
82

Ile Cys Asn Pro Gly Ser Ser Leu Cys
1501 ATC TGC AAT CCG GCA TCA TCC TTA TCC TGA GAC GCT TCC CCA CTC GAA CCA CGC CGC CGG
signal sequence

84

Val Arg Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ala Ser Gly
1561 GAC AGG GCG CGC CGC CGC GGT CGC GC CTG CGC GCG CTG GCG TGG TTG CTG GCA TCC GCG
signal sequence

84

Ala Met Thr His Leu Ser Pro Ala Leu Ala Asp Val Pro Tyr Val Leu Val Lys Thr Asn
1620 GCG ATG ACG CAT CTT TCC CGC GCG CTG GCG GAG GTT CCG TAT GTG CTG GAG ACG AAT
84

Met Val Val Thr Ser Val Ala Met Lys Pro Tyr Gln Val Thr Pro Thr Arg Met Leu Val
1680 ATG GTC GTC ACC AGC GTA GCG ATG AAC CGC TAT GAA GTC ACC CGC AGC GGC ATG CTG GTC
84

Cys Gly Ile Ala Ala Lys Leu Gly Ala Ala Ser Ser Pro Asp Ala His Val Pro Phe
1740 TGC GCG ATC GCG GCG AAA CTG GCG GCG GCG AGC AGC CGC GAG GCG CAC GTG CGC TTC
84

Cys Phe Gly Lys Asp Leu Val Ile Pro Pro Gly Ser Ser Pro Met Gln Val Met Leu Arg Ala
1800 TGC TTC GCG AAG GAT CTC AAG CGT CGC GCG AGC AGT CCG ARG GAA GTC ARG TTG CGC GCG
84

Val Phe Met Gln Gln Arg Pro Leu Arg Met Phe Leu Gly Pro Lys Gln Leu Thr Phe Glu
1860 GTC CTC ATG CAA CAA CGC CGC CTG CGC ATG TTT CTG GGT CCG AAG CAA CTC ACT TTC GAA

FIGURE 4-3

【図 4－4】

84

Gly Lys Pro Ala Leu Glu Leu Ile Arg Met Val Glu Cys Ser Gly Lys Gln Asp Cys Pro
1920 GGC AAG CGC GCG CTC GAA CTG ATC GCG ATG GTC GAA TCC AGC GCG AAG CAG GAT TCC CGC T
signal sequence

85

Met His Thr Ile Ala Ser Ile Leu Leu Ser Val Leu Gly Ile Tyr Ser
1961 GAA GCG GAA CGC C ATG CAT ACC ATC GCA TCC ATC TTG TCC GTG CTC GCG ATA TAC AG
signal sequence

85

Pro Ala Asp Val Ala Gly Leu Pro Thr His Leu Tyr Lys Asn Phe Thr Val Gln Glu Leu
2041 C CGC GGT GAC GTC GCG GCG TTG CCG ACC CAT CTC TAC AAG AAC TTC ACT GTC CAG GAG CT
85

Ala Leu Lys Leu Lys Gly Lys Asn Gln Glu Phe Cys Leu Thr Ala Phe Met Ser Gly Arg
2101 G GCG TTG AAA CTG AAG GCG AAG AAT CAG GAG TTC TGC CTG ACC GGC TAT ATG TCG GCG AG
85

Ser Leu Val Arg Ala Cys Leu Ser Asp Ala Gly His Glu His Asp Thr Phe Asp Thr
2161 A AGC CTG GTC CGC GCG TCC CTG TCC GAC GCG GGA CAC GAG CAC GAC ACG TGG TTC GAC AC
85

Met Leu Gly Phe Ala Ile Ser Ala Tyr Ala Leu Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Val Glu
2221 C ATG CTT GCG TTT GCG ATA TCG GCG TAT GAT CCG ATG AAG AGC GCG ATC GCG CTG ACG GTG GA
85

Asp Ser Pro Tyr Pro Gly Thr Pro Gly Asp Leu Leu Glu Leu Gln Ile Cys Pro Leu Asp
2281 A GAC TCG CGC TAT CGC GGC ACT CGC GGC GAT CTG CTC GAA CTG CAG ATC TCC CGC CTC AA
85

Gly Tyr Cys Glu
2341 C GGA TAT TGG GAA TCG AAG CCG TCC GGA GGT TTC GAC GTT TCC GCG GAA TCC GGT TGA GAC
signal sequence

83

Met Leu Ile Asn Asn Lys Lys Leu
2401 GAT CTT CGC CGC TGG TTC CAT TCC GCG AAC ACC GCA AC ATG CTC ATC AAC AAC AAC C
signal sequence

83

Leu His His Ile Leu Pro Ile Leu Val Leu Ala Leu Leu Gly Met Arg Thr Ala Gln Ala
2461 TG CTT CAT CAC ATT CTG CGC ATC CTG GTC CTC GCG CTG GCG ATG CGC ACG GCG CAG G

FIGURE 4-4

【図 4－5】

signal sequence

83

Val Ala Pro Gly Ile Val Ile Pro Pro Lys Ala Leu Phe Thr Gln Gln Gly Gly Ala Tyr
2521 CC GPT GCG CCA GGC ATC GTC ATC CGC CGC AAG GCA CTG TTC ACC CAA CAG GGC GGC GTC
83

Gly Arg Cys Pro Asn Gly Thr Arg Ala Leu Thr Val Ala Glu Leu Arg Gly Asn Ala Glu
2581 AT GGA GCG TCC CGC AAC GGA ACC CGC GCG TTG ACC GTC GAA CAA CTG CGC AAG GCG G
83

Leu Gln Thr Tyr Leu Arg Gln Ile Thr Pro Gly Trp Ser Ile Tyr Gly Leu Tyr Asp Gly
2641 AA TTG CAG ACG TAT TTG GCG CAG ATA ACG CGC GCG TGG TCC ATA TAC GGT CTC TAT GAC G
83

Thr Tyr Leu Gly Gln Ala Tyr Gly Gly Ile Ile Lys Asp Ala Pro Pro Gly Ala Gly Phe
2701 GT ACG TAC CTG GCG CAG GCG TAC GCG GGC ATC ATC AAG GAC GCG CGC CCA GCG GCG T
83

Ile Tyr Arg Glu Thr Phe Cys Ile Thr Thr Ile Tyr Lys Thr Gly Glu Pro Ala Ala Asp
2761 TC ATT TAT CGC GAA ACT TTC TGC ATC ACC ATC ATA TAC AAG ACC GGG CAA CGC GGT GCG G
83

His Tyr Tyr Ser Lys Val Thr Ala Thr Arg Leu Ala Ser Thr Asn Ser Arg Leu Cys
2821 AT CAC TAC TAC AGC AAG GTC ACG GCG ACT CGC CTG CTC GCG ACC AAC AGC AGC CTG T
83

Ala Val Phe Val Arg Asp Gly Gln Ser Val Ile Gly Ala Cys Ala Ser Pro Tyr Gln Gly
2881 CG GCG GTA TTC GTC AAG GAC GCG CAA TCG GTC ATC GGA GCG TCG GCG AGC CGC TAT GAA G
83

Arg Tyr Arg Asp Met Tyr Asp Ala Leu Arg Arg Leu Leu Tyr Met Ile Tyr Met Ser Gly
2941 CC AAG TAC ACA GAC ATG TAC GAC GCG CTG CGC GCG CTG CTC TAC ATG ATC TAT ATG TCC G
83

Leu Ala Val Arg Val His Val Ser Lys Glu Glu Gln Tyr Tyr Asp Tyr Glu Asp Ala Thr
3001 GC CTT GCG GTA GCG GTC CAC GTC AGC AAG GAG GAA CAG TAT TAC GAC TAC GAG GAC GCG A
83

Phe Gln Thr Tyr Ala Leu Thr Gly Ile Ser Leu Cys Asn Pro Ala Ala Ser Ile Cys
3061 CA TTC CAG ACC TAT GCG CTG AGC GCG ATT TCC CTC TCC AAC CGC GGA CGC TGG ATA TCC

FIGURE 4-5

【図 5 - 1】

1 Met Arg Cys Thr Arg Ala Ile Arg Gln Thr Ala Arg Thr Gly Trp
Leu Thr Trp Leu Ala

21 Ile Leu Ala Val Thr Ala Pro Val Thr Ser Pro Ala Trp Ala Asp
Asp Pro Pro Ala Thr

41 Val Tyr Lys Tyr Asp Ser Arg Pro Pro Glu Asp Val Phe Gln Asn
Gly Phe Thr Ala Trp

61 Gly Asn Asn Asp Asn Val Leu Asp His Leu Thr Gly Arg Ser Cys
Gln Val Gly Ser Ser

81 Asn Ser Ala Phe Val Ser Thr Ser Ser Ser Arg Arg Tyr Thr Glu
Val Tyr Leu Glu His

101 Arg Met Gln Glu Ala Val Glu Ala Glu Arg Ala Gly Arg Gly Thr
Gly His Phe Ile Gly

121 Tyr Ile Tyr Glu Val Arg Ala Asp Asn Asn Phe Tyr Gly Ala Ala
Ser Ser Tyr Phe Glu

141 Tyr Val Asp Thr Tyr Gly Asp Asn Ala Gly Arg Ile Leu Ala Gly
Ala Leu Ala Thr Tyr

161 Gln Ser Ala Tyr Leu Ala His Arg Arg Ile Pro Pro Glu Asn Ile
Arg Arg Val Thr Arg

181 Val Tyr His Asn Gly Ile Thr Gly Glu Thr Thr Thr Thr Glu Tyr
Ser Asn Ala Arg Tyr

201 Val Ser Gln Gln Thr Arg Ala Asn Pro Asn Pro Tyr Thr Ser Arg
Arg Ser Val Ala Ser

221 Ile Val Gly Thr Leu Val Arg Met Ala Pro Val Ile Gly Ala Cys
Met Ala Arg Gln Ala

241 Glu Ser Ser Glu Ala Met Ala Ala Trp Ser Glu Arg Ala Gly Glu
Ala Met Val Leu Val

261 Tyr Tyr Glu Ser Ile Ala Tyr Ser Phe

FIGURE 5-1

【図 5 - 2】

1 Met Pro Ile Asp Arg Lys Thr Leu Cys His Leu Leu Ser Val Leu
Pro Leu Ala Leu Leu

21 Gly Ser His Val Ala Arg Ala Ser Thr Pro Gly Ile Val Ile Pro
Pro Gln Glu Gln Ile

41 Thr Gln His Gly Ser Pro Tyr Gly Arg Cys Ala Asn Lys Thr Arg
Ala Leu Thr Val Ala

61 Glu Leu Arg Gly Ser Gly Asp Leu Gln Glu Tyr Leu Arg His Val
Thr Arg Gly Trp Ser

81 Ile Phe Ala Leu Tyr Asp Gly Thr Tyr Leu Gly Gly Glu Tyr Gly
Gly Val Ile Lys Asp

101 Gly Thr Pro Gly Gly Ala Phe Asp Leu Lys Thr Thr Phe Cys Ile
Met Thr Thr Arg Asn

121 Thr Gly Gln Pro Ala Thr Asp His Tyr Tyr Ser Asn Val Thr Ala
Thr Arg Leu Leu Ser

141 Ser Thr Asn Ser Arg Leu Cys Ala Val Phe Val Arg Ser Gly Gln
Pro Val Ile Gly Ala

161 Cys Thr Ser Pro Tyr Asp Gly Lys Tyr Trp Ser Met Tyr Ser Arg
Leu Arg Lys Met Leu

181 Tyr Leu Ile Tyr Val Ala Gly Ile Ser Val Arg Val His Val Ser
Lys Glu Glu Gln Tyr

201 Tyr Asp Tyr Glu Asp Ala Thr Phe Glu Thr Tyr Ala Leu Thr Gly
Ile Ser Ile Cys Asn

221 Pro Gly Ser Ser Leu Cys

FIGURE 5-2

【図 5 - 3】

1 Met Leu Ile Asn Asn Lys Lys Leu Leu His His Ile Leu Pro
Ile Leu Val Leu Ala Leu

21 Leu Gly Met Arg Thr Ala Gln Ala Val Ala Pro Gly Ile Val
Ile Pro Pro Lys Ala Leu

41 Phe Thr Gln Gln Gly Gly Ala Tyr Gly Arg Cys Pro Asn Gly
Thr Arg Ala Leu Thr Val

61 Ala Glu Leu Arg Gly Asn Ala Glu Leu Gln Thr Tyr Leu Arg
Gln Ile Thr Pro Gly Trp

81 Ser Ile Tyr Gly Leu Tyr Asp Gly Thr Tyr Leu Gly Gln Ala
Tyr Gly Gly Ile Ile Lys

101 Asp Ala Pro Pro Gly Ala Gly Phe Ile Tyr Arg Glu Thr Phe
Cys Ile Thr Thr Ile Tyr

121 Lys Thr Gly Gln Pro Ala Ala Asp His Tyr Tyr Ser Lys Val
Thr Ala Thr Arg Leu Leu

141 Ala Ser Thr Asn Ser Arg Leu Cys Ala Val Phe Val Arg Asp
Gly Gln Ser Val Ile Gly

161 Ala Cys Ala Ser Pro Tyr Glu Gly Arg Tyr Arg Asp Met Tyr
Asp Ala Leu Arg Arg Leu

181 Leu Tyr Met Ile Tyr Met Ser Gly Leu Ala Val Arg Val His
Val Ser Lys Glu Glu Gln

201 Tyr Tyr Asp Tyr Glu Asp Ala Thr Phe Gln Thr Tyr Ala Leu
Thr Gly Ile Ser Leu Cys

221 Asn Pro Ala Ala Ser Ile Cys

FIGURE 5-3

【図 5 - 4】

1 Val Arg Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ala Ser Gly Ala Met Thr
His Leu Ser Pro Ala Leu

21 Ala Asp Val Pro Tyr Val Leu Val Lys Thr Asn Met·Val Val
Thr Ser Val Ala Met Lys

41 Pro Tyr Glu Val Thr Pro Thr Arg Met Leu Val Cys Gly Ile
Ala Ala Lys Leu Gly Ala

61 Ala Ala Ser Ser Pro Asp Ala His Val Pro Phe Cys Phe Gly
Lys Asp Leu Lys Arg Pro

81 Gly Ser Ser Pro Met Glu Val Met Leu Arg Ala Val Phe Met
Gln Gln Arg Pro Leu Arg

101 Met Phe Leu Gly Pro Lys Gln Leu Thr Phe Glu Gly Lys Pro
Ala Leu Glu Leu Ile Arg

121 Met Val Glu Cys Ser Gly Lys Gln Asp Cys Pro

FIGURE 5-4

【図 5 - 5】

1 Met His Thr Ile Ala Ser Ile Leu Leu Ser Val Leu Gly Ile
Tyr Ser Pro Ala Asp Val

21 Ala Gly Leu Pro Thr His Leu Tyr Lys Asn Phe Thr Val Gln
Glu Leu Ala Leu Lys Leu

41 Lys Gly Lys Asn Gln Glu Phe Cys Leu Thr Ala Phe Met Ser
Gly Arg Ser Leu Val Arg

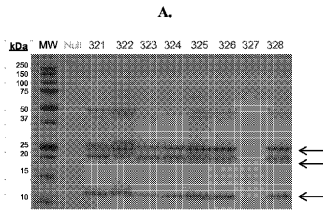
61 Ala Cys Leu Ser Asp Ala Gly His Glu His Asp Thr Trp Phe
Asp Thr Met Leu Gly Phe

81 Ala Ile Ser Ala Tyr Ala Leu Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr
Val Glu Asp Ser Pro Tyr

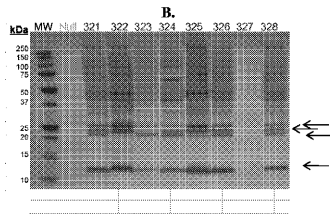
101 Pro Gly Thr Pro Gly Asp Leu Leu Glu Leu Gln Ile Cys Pro
Leu Asn Gly Tyr Cys Glu

FIGURE 5-5

【図 6 A】

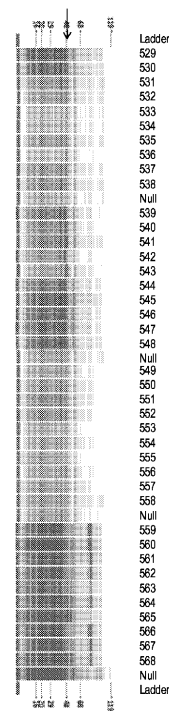


【図 6 B】



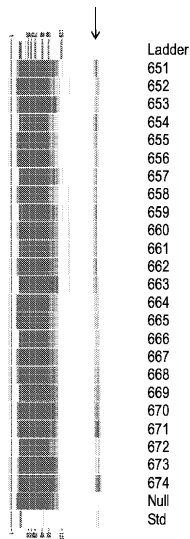
【図 7】

FIGURE 7



【図 8】

FIGURE 8



【図 9 A】

シュドモナス外毒素Aアミノ酸配列

1 Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val Leu
Asp Leu Lys

21 Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro Ala Ile Ala Asp Thr
Asn Gly Gln

41 Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys
Leu Ala Ile

61 Asp Asn Ala Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly
Gly Val Glu

81 Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser Trp
Ser Leu Asn

101 Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn Ile Lys Val Phe Ile
His Glu Leu

121 Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met
Gly Asp Glu

141 Leu Leu Ala Lys Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu
Ser Asn Glu

161 Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met Ala
Gln Ala Gln

181 Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser Gly Lys Val Leu Cys
Leu Leu Asp

201 Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp
Asp Thr Trp

221 Glu Gly Lys Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu
Asp Ile Lys

241 Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala
Ala Leu Thr

261 Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln
Pro Arg Gly

281 Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu
Tyr

301 Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala
Ser Pro Gly

321 Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg
Leu Ala Leu

341 Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn
Asp Glu Ala

361 Gly Ala Ala Ser Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly
Glu Cys Ala

【図 9 B】

シュードモナス外毒素Aアミノ酸配列

```

381  Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala
    Glu Phe
401  Leu Gly Asp Gly Gly Asp Ile Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr
    Val Glu
        Tyr - CRM66
421  Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly
    Tyr His
441  Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg
    Ser Gln
461  Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala
    Tyr Gly
481  Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu
    Leu Arg
501  Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Leu Thr Leu
    Ala Ala
521  Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg
    Leu Asp
        Δ - rEPA
541  Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp
    Pro Leu
561  Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val
    Gly Gly
581  Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro
    Asp Tyr
601  Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys

```

【図 10】

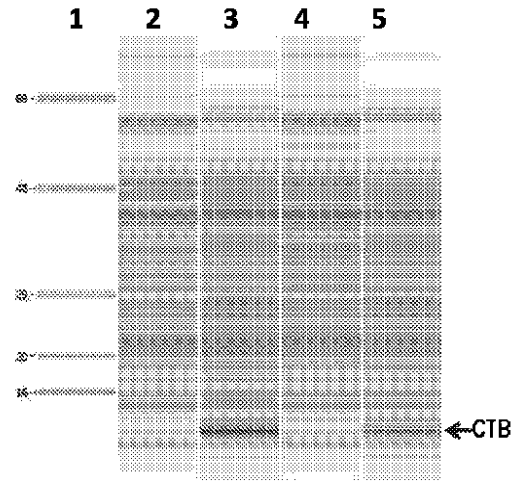


FIGURE 10

【図 11 A】

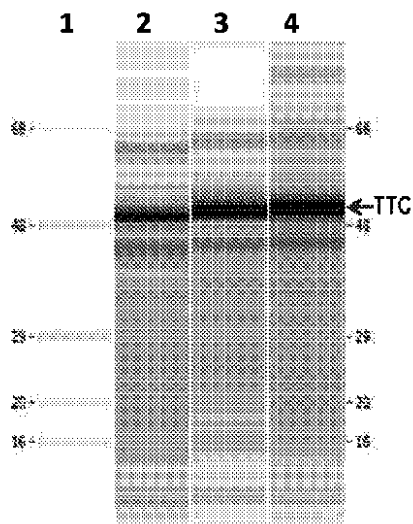


FIGURE 11A

【図 11 B】

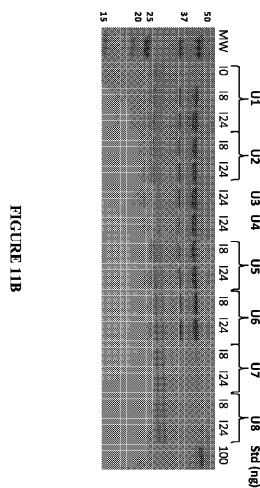


FIGURE 11B

【図 1 2】

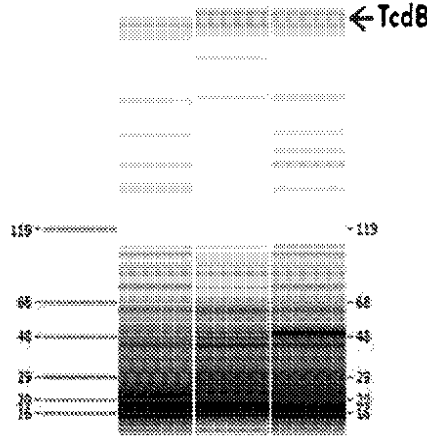


FIGURE 12

【図 1 3 - 1】

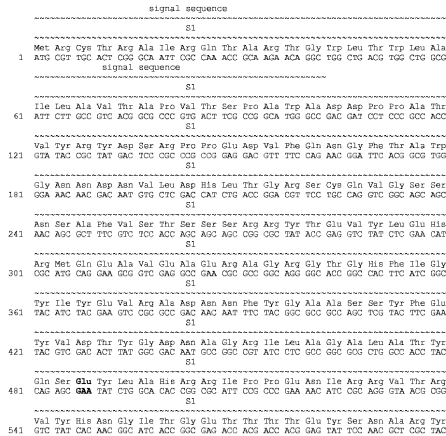


FIGURE 13-1

【図 1 3 - 2】

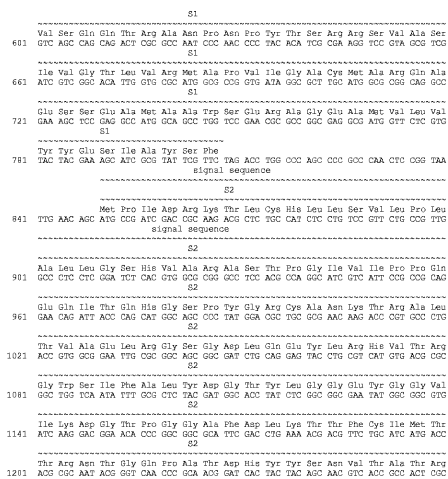


FIGURE 13-2

【図 1 3 - 3】

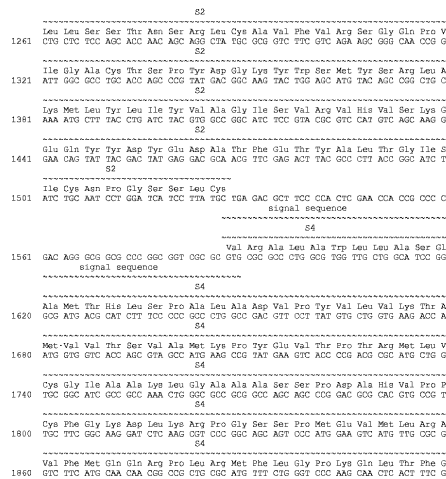


FIGURE 13-3

【図 13－4】

```
-----
84
-----
Gly Lys Pro Ala Leu Glu Leu Ile Arg Met Val Glu Cys Ser Gly Lys Gln Asp Cys Pro
1920 GGC AAG CCC GCG CTC GAA CTG ATC CGT ATG GTC GAA TGC AGC GGC AAG CAG CAT TCC CGC T
-----
signal sequence
-----
85
-----
Met His Thr Ile Ala Ser Ile Leu Leu Ser Val Leu Gly Ile Tyr Ser
1981 GAA GGC GAA CCC C AAG CAT AAG ATC GGA TGC ACC CTG TTT TCC GTG GGC ATA TAC AG
-----
signal sequence
-----
85
-----
Pro Ala Asp Val Ala Gly Leu Pro Thr His Leu Tyr Lys Asn Phe Thr Val Gln Glu Leu
2041 C CGC GCT GAC CTC GGC GGC TTG CGC ACC CAT CTG TAC AAG AAC TTC ACT GTC CAG GAG CT
-----
85
-----
Ala Leu Lys Leu Lys Gly Lys Asn Gln Glu Phe Cys Leu Thr Ala Phe Met Ser Gly Arg
2103 G GGC TTG AAA CTG AAG GGC AAG AAT CAG GAG TTC TGC CTG ACC GGC TTC ATG TGG GGC AG
-----
85
-----
Ser Leu Val Arg Ala Cys Leu Ser Ser Asp Ala Gly His Glu His Asp Thr Trp Phe Asp Thr
2163 A AAC CTG GTC CGG GCG TGC CTG TCC CAG GCG GGA CAG CAG CAC ACG TGG TTC GAC AC
-----
85
-----
Met Leu Gly Phe Ala Ile Ser Ala Tyr Ala Leu Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Val Glu
2223 C AAG CTT GGC TTT GGC ATA TGC GGC TAT GGC CTC AAG AGC CGC ATC GCG CTG AGC GTC GA
-----
85
-----
Asp Ser Pro Tyr Pro Gly Thr Pro Gly Asp Leu Leu Glu Leu Gln Ile Cys Pro Leu Asn
2283 A GAC TGC CGC TAT CGC GGC ACT CCC GGC GAT CTG CTC GAA CTG CAG ATC TCC CGC CTC AA
-----
85
-----
Gly Tyr Cys Glu
2343 C GGA TAT TGC GAA TG AAC CCT TCC GGA GGT TTC GAC GTT TCC GGC CAA TCC GGT TGA GAC
-----
signal sequence
-----
83
-----
Met Leu Ile Asn Asn Lys Lys Leu
2403 CAT CTT CGC CCC TGC TTT CAT TCC GGC AAC ACC GCA AC ATG CTG ATC AAC AAG AAG C
-----
signal sequence
-----
83
-----
Leu His His Ile Leu Pro Ile Leu Val Leu Ala Leu Leu Gly Met Arg Thr Ala Gln Ala
2463 TG CTT CTT CAC ATT CTG CGC ATC CTG CTC GGC CTG GGC ATG CGC AGC GGC CAG G
```

FIGURE 13-4

【図 14 A】

A. 下線部の分泌リーダーを伴うコレラ毒素Aサブユニット(AE003852; タンパク質ID AAF94614.1)

```
1 Met Val Lys Ile Ile Phe Val Phe Phe Ile Phe Leu Ser Ser
Phe Ser Tyr Ala Asn Asp

21 Asp Lys Leu Tyr Arg Ala Asp Ser Arg Pro Pro Asp Glu Ile
Lys Gln Ser Gly Gly Leu

41 Met Pro Arg Gly Gln Ser Glu Tyr Phe Asp Arg Gly Thr Gln
Met Asn Ile Asn Leu Tyr

61 Asp His Ala Arg Gly Thr Gln Thr Gly Phe Val Arg His Asp
Asp Gly Tyr Val Ser Thr

81 Ser Ile Ser Leu Arg Ser Ala His Leu Val Gly Gln Thr Ile
Leu Ser Gly His Ser Thr

101 Tyr Tyr Ile Tyr Val Ile Ala Thr Ala Pro Asn Met Phe Asn
Val Asn Asp Val Leu Gly

121 Ala Tyr Ser Pro His Pro Asp Glu Gln Glu Val Ser Ala Leu
Gly Gly Ile Pro Tyr Ser

141 Gln Ile Tyr Gly Trp Tyr Arg Val His Phe Gly Val Leu Asp
Glu Gln Leu His Arg Asn

161 Arg Gly Tyr Arg Asp Arg Tyr Tyr Ser Asn Leu Asp Ile Ala
Pro Ala Ala Asp Gly Tyr

181 Gly Leu Ala Gly Phe Pro Pro Glu His Arg Ala Trp Arg Glu
Glu Pro Trp Ile His His

201 Ala Pro Pro Gly Cys Gly Asn Ala Pro Arg Ser Ser Met Ser
Asn Thr Cys Asp Glu Lys

221 Thr Gln Ser Leu Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Tyr Gln Ser
Lys Val Lys Arg Gln Ile

241 Phe Ser Gly Tyr Gln Ser Asp Ile Asp Thr His Asn Arg Ile
Lys Asp Glu Leu
```

【図 13－5】

```
-----
signal sequence
-----
83
-----
Val Ala Pro Gly Ile Val Ile Pro Pro Lys Ala Leu Phe Thr Gln Gln Gly Gly Ala Tyr
2521 CC GGT GCG CCA GGC ATC GTC ATC CGC CCG AAG GCA CTG TTC ACC CAA CAG GGC GGC T
-----
83
-----
Gly Arg Cys Pro Asn Gly Thr Arg Ala Leu Thr Val Ala Glu Leu Arg Gly Asn Ala Glu
2581 AT GAA CGC TGC CGC AAC GAA ACC CGC GCG TTG ACC GTG GGC GAA CTG CGC GGC AAC GGC G
-----
83
-----
Leu Gln Thr Tyr Leu Arg Gln Ile Thr Pro Gly Trp Ser Ile Tyr Gly Leu Tyr Asp Gly
2641 AA TTG CAG ACG TAT TTG GCG CAG ATA ACG CGC GCG TGG TCC ATA TAC GGT CTC TAT GAC G
-----
83
-----
Thr Tyr Leu Gly Gln Ala Tyr Gly Gly Ile Ile Lys Asp Ala Pro Pro Gly Ala Gly Phe
2701 GT ACG TAC CTG GGC CAG GCG TAC GCG GCG ATC AAG GAC GCG CGC CCA GGC GCG GGC T
-----
83
-----
Ile Tyr Arg Glu Thr Phe Cys Ile Thr Thr Ile Tyr Lys Thr Gly Gln Pro Ala Ala Asp
2761 TC ATT TAT CGC GAA ACT TTC TGC ATC ACG ACC ATA TAC AAG ACC GGG CAA CGC GCT GGC G
-----
83
-----
His Tyr Tyr Ser Lys Val Thr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Ser Thr Asn Ser Arg Leu Cys
2821 AT CAC TAC TAC ACG AAG GTC ACG GCG ACC CGC CTG CTC GCG AGC ACC AAC ACG AGG CTG T
-----
83
-----
Ala Val Phe Val Arg Asp Gly Gln Ser Val Ile Gly Ala Cys Ala Ser Pro Tyr Glu Gly
2881 GC GGC GTA TTC GTC AGG GAC GCG GAA TCC GTC ATC GGA GCG TCC GCG AGC CGC TAT GAA G
-----
83
-----
Arg Tyr Arg Asp Met Tyr Asp Ala Leu Arg Arg Leu Leu Tyr Met Ile Tyr Met Ser Gly
2941 GC AGG TAC AGA GAC ATG TAC GAC GCG CTG CGC GCG CTG TAC ATG ATC TAT ATG TCC G
-----
83
-----
Leu Ala Val Arg Val His Val Ser Lys Glu Glu Gln Tyr Tyr Asp Tyr Glu Asp Ala Thr
3001 GC CTT CGC GTA CGC CTC CAC GTC AGC AAG GAC GAA CAG TAT TAC GAC TAC GAG GAG GTC A
-----
83
-----
Phe Gln Thr Tyr Ala Leu Thr Gly Ile Ser Leu Cys Asn Pro Ala Ala Ser Ile Cys
3061 CA TTC CAG ACC TAT GGC CTC ACG GGC ATT TCC CTC TGC AAC CCG GCA GCG TCG ATA TGC
```

FIGURE 13-5

【図 14 B】

B. 下線部の分泌リーダーを伴うコレラ毒素Bアミノ酸配列(AE003852; タンパク質ID AAF94613.1)

```
1 Met Ile Lys Leu Lys Phe Gly Val Phe Phe Thr Val Leu Leu Ser
Ser Ala Tyr Ala His

21 Gly Thr Pro Gln Asn Ile Thr Asp Leu Cys Ala Glu Tyr His Asn
Thr Gln Ile Tyr Thr

41 Leu Asn Asp Lys Ile Phe Ser Tyr Thr Glu Ser Leu Ala Gly Lys
Arg Glu Met Ala Ile

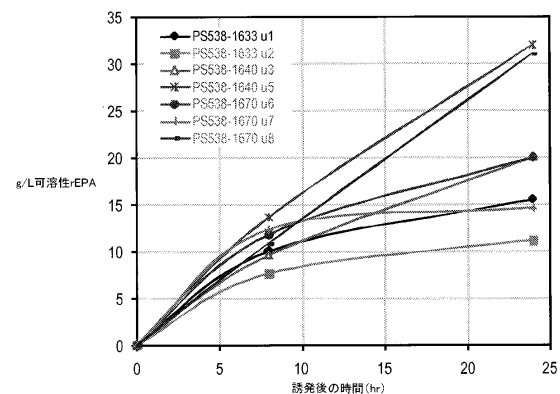
61 Ile Thr Phe Lys Asn Gly Ala Ile Phe Gln Val Glu Val Pro Gly
Ser Gln His Ile Asp

81 Ser Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile
Ala Tyr Leu Thr Glu

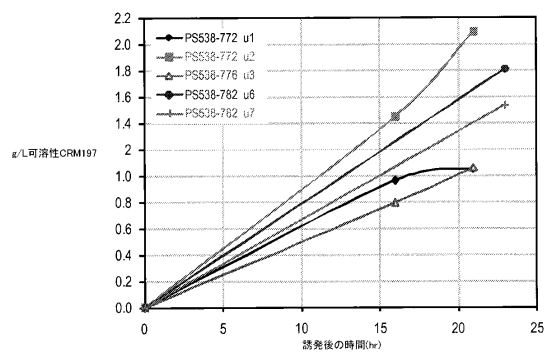
101 Ala Lys Val Glu Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro His
Ala Ile Ala Ala Ile

121 Ser Met Ala Asn
```

【図 16】



【図 19】



【図 1 4 C】

C. コレラ毒素DNA配列(AサブユニットおよびBサブユニット コード領域GenBank AE003852)

分泌リーダー

~~~~~

CTA

~~~~~

1 Met Val Lys Ile Ile Phe Val Phe Phe Ile Phe Leu Ser Ser Phe Ser Tyr Ala Asn Asp
 ATG GTA AAG ATA ATA TTT GTG TTT TTT ATT TTC TTA TCA TCA TTT TCA TAT GCA AAT GAT
 CTA

~~~~~

61 Asp Lys Leu Tyr Arg Ala Asp Ser Arg Pro Pro Asp Glu Ile Lys Gln Ser Gly Gly Leu  
 GAT AAG TTA TAT CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT GAT GAA ATA AAG CAG TCA GGT GGT CTT  
 CTA

~~~~~

121 Met Pro Arg Gly Gln Ser Glu Tyr Phe Asp Arg Gly Thr Gln Met Asn Ile Asn Leu Tyr
 ATG CCA AGA GGA CAG AGT GAG TAC TTT GAC CGA GGT ACT CAA ATG AAT ATC AAC CTT TAT
 CTA

~~~~~

181 Asp His Ala Arg Gly Thr Gln Thr Gly Phe Val Arg His Asp Asp Gly Tyr Val Ser Thr  
 GAT CAT GCA AGA GGA ACT CAG ACG GGA TTT GTT AGG CAC GAT GAT GGA TAT GTT TCC ACC  
 CTA

~~~~~

241 Ser Ile Ser Leu Arg Ser Ala His Leu Val Gly Gln Thr Ile Leu Ser Gly His Ser Thr
 TCA ATT AGT TTG AGA AGT GCC CAC TTA GTG GGT CAA ACT ATA TTG TCT GGT CAT TCT ACT
 CTA

~~~~~

301 Tyr Tyr Ile Tyr Val Ile Ala Thr Ala Pro Asn Met Phe Asn Val Asn Asp Val Leu Gly  
 TAT TAT ATA TAT GTT ATA GCC ACT GCA CCC AAC ATG TTT AAC GTT AAT GAT GTA TTA GGG  
 CTA

~~~~~

361 Ala Tyr Ser Pro His Pro Asp Glu Gln Glu Val Ser Ala Leu Gly Gly Ile Pro Tyr Ser
 GCA TAC AGT CCT CAT CCA GAT GAA CAA GAA GTT TCT GCT TTA GGT GGG ATT CCA TAC TCC
 CTA

~~~~~

421 Gln Ile Tyr Gly Trp Tyr Arg Val His Phe Gly Val Leu Asp Glu Gln Leu His Arg Asn  
 CAA ATA TAT GGA TGG TAT CGA GTT CAT TTT GGG GTG CTT GAT GAA CAA TTA CAT CGT AAT  
 CTA

~~~~~

481 Arg Gly Tyr Arg Asp Arg Tyr Tyr Ser Asn Leu Asp Ile Ala Pro Ala Ala Asp Gly Tyr
 AGG GGC TAC AGA GAT AGA TAT TAC AGT AAC TTA GAT ATT GCT CCA GCA GCA GAT GGT TAT
 CTA

~~~~~

541 Gly Leu Ala Gly Phe Pro Pro Glu His Arg Ala Trp Arg Glu Glu Pro Trp Ile His His  
 GGA TTG GCA GGT TTC CCT CCG GAG CAT AGA GCT TGG AGG GAA GAG CCG TGG ATT CAT CAT  
 CTA

~~~~~

601 Ala Pro Pro Gly Cys Gly Asn Ala Pro Arg Ser Ser Met Ser Asn Thr Cys Asp Glu Lys
 GCA CCG CCG GGT TGT GGG AAT GCT CCA AGA TCA TCG ATG AGT AAT ACT TGC GAT GAA AAA

【図 1 4 D】

C. コレラ毒素DNA配列(AサブユニットおよびBサブユニット コード領域GenBank AE003852)

分泌リーダー

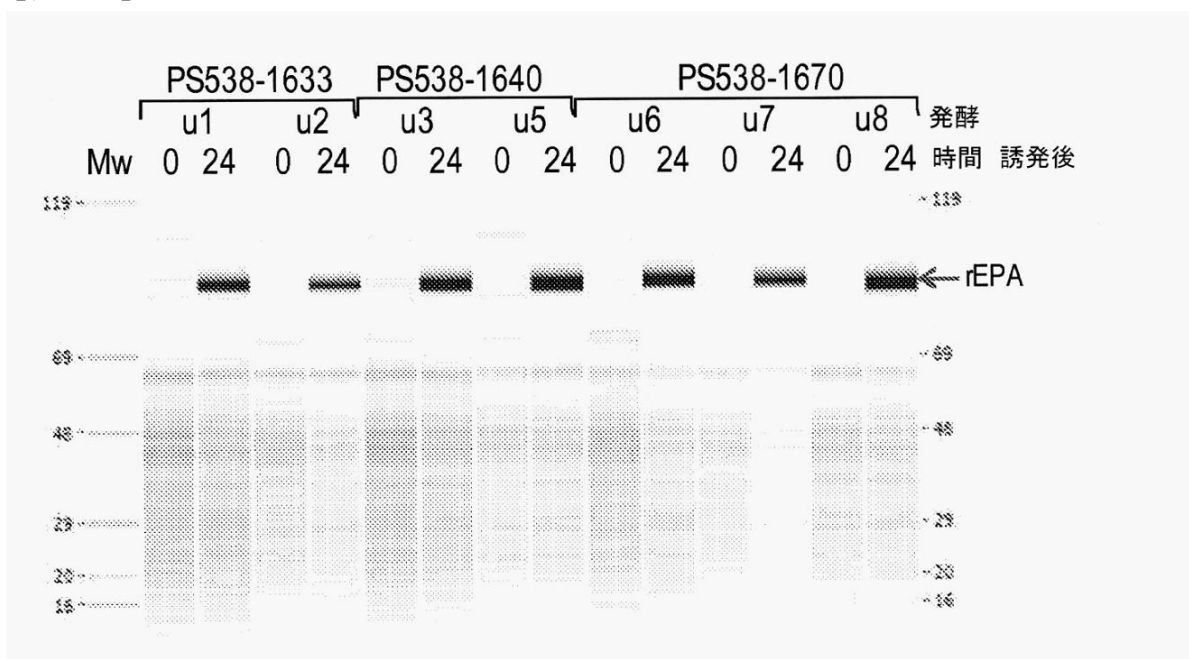
```

CTA
~~~~~
Thr Gln Ser Leu Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Tyr Gln Ser Lys Val Lys Arg Gln Ile
661 ACC CAA AGT CTA GGT GTA AAA TTC CTT GAC GAA TAC CAA TCT AAA GTT AAA AGA CAA ATA
CDS_1
~~~~~

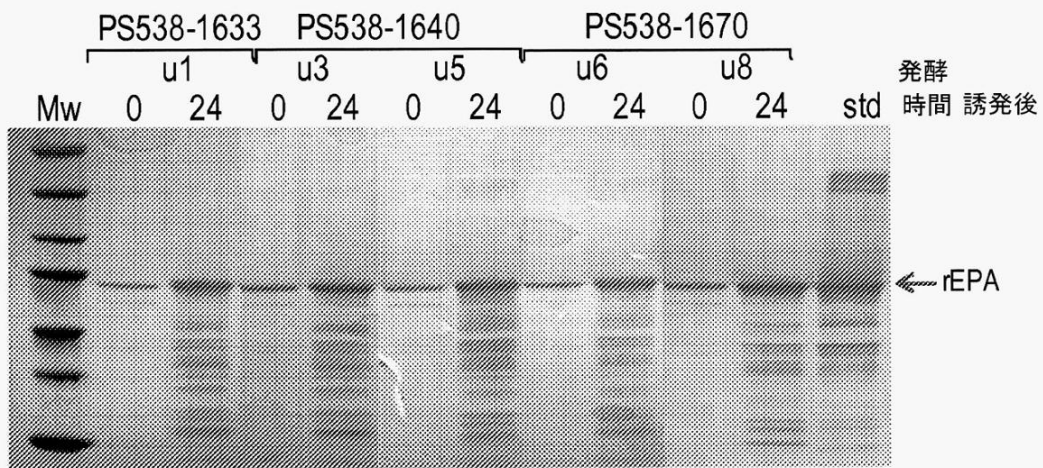
CTA
~~~~~
Secretion Leader
~~~~~
CTB
~~~~~
Met Ile Lys
Phe Ser Gly Tyr Gln Ser Asp Ile Asp Thr His Asn Arg Ile Lys Asp Glu Leu ***
721 TTT TCA GGC TAT CAA TCT GAT ATT GAT ACA CAT AAT AGA ATT AAG GAT GAA TTA TGA TTA
Secretion Leader
~~~~~
CTB
~~~~~
LLeu Lys Phe Gly Val Phe Phe Thr Val Leu Leu Ser Ser Ala Tyr Ala His Gly Thr Pro
781 AAT TAA AAT TTG GTG TTT TTT TTA CAG TTT TAC TAT CTT CAG CAT ATG CAC ATG GAA CAC
CTB
~~~~~
PGLn Asn Ile Thr Asp Leu Cys Ala Glu Tyr His Asn Thr Gln Ile Tyr Thr Leu Asn Asp
841 CTC AAA ATA TTA CTG ATT TGT GTG CAG AAT ACC ACA ACA CAC AAA TAT ATA CGC TAA ATG
CTB
~~~~~
ALys Ile Phe Ser Tyr Thr Glu Ser Leu Ala Gly Lys Arg Glu Met Ala Ile Ile Thr Phe
901 ATA AGA TAT TTT CGT ATA CAG AAT CTC TAG CTG GAA AAA GAG AGA TGG CTA TCA TTA CTT
CTB
~~~~~
PLys Asn Gly Ala Ile Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser Gln Lys
961 TTA AGA ATG GTG CAA TTT TTC AAG TAG AAG TAC CAG GTA GTC AAC ATA TAG ATT CAC AAA
CTB
~~~~~
LLys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Ala Tyr Leu Thr Glu Ala Lys Val
1021 AAA AAG CGA TTG AAA GGA TGA AGG ATA CCC TGA GGA TTG CAT ATC TTA CTG AAG CTA AAG
CTB
~~~~~
VGlu Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro His Ala Ile Ala Ala Ile Ser Met Ala
1081 TCG AAA AGT TAT GTG TAT GGA ATA ATA AAA CGC CTC ATG CGA TTG CCG CAA TTA GTA TGG
CTB
~~~~~
AAsn
1141 CAA ATT AA

```

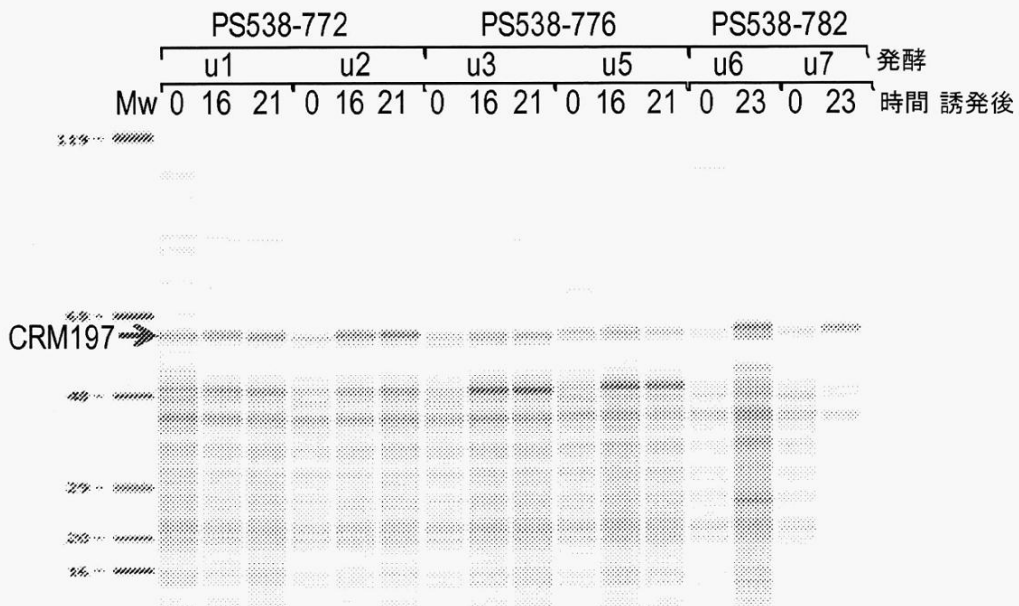
【図 1 5】



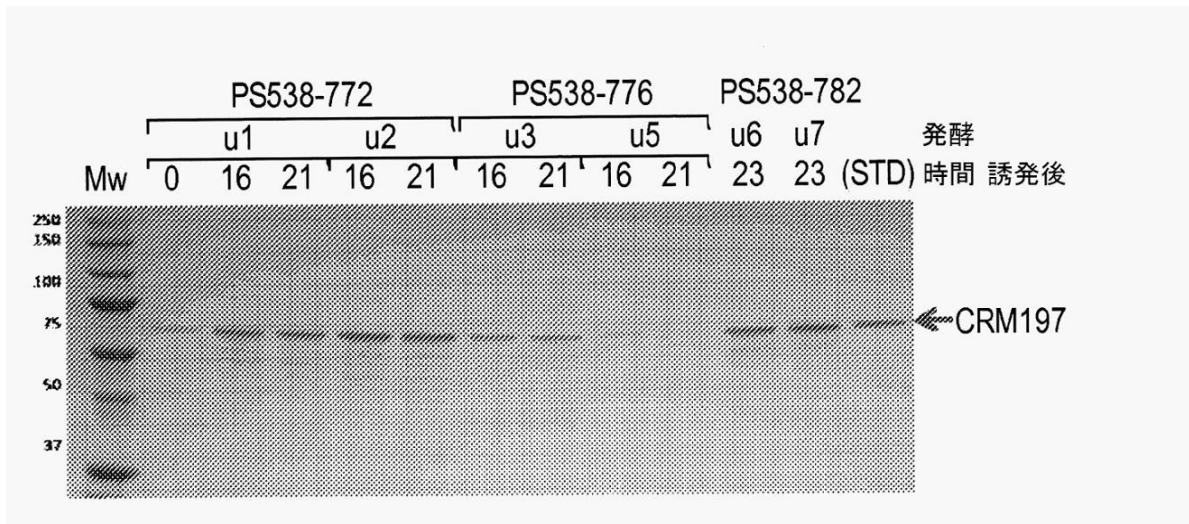
【図 17】



【図 18】



【図 20】



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/319,152

(32)優先日 平成22年3月30日(2010.3.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ジン, ホングファン

アメリカ合衆国 92128 カリフォルニア州 サンディエゴ カナリッジ・ロード 11978

(72)発明者 タルボット, ヘンリー, ダブリュー.

アメリカ合衆国 92130 カリフォルニア州 サンディエゴ スタージョン・コート 4111

審査官 福間 信子

(56)参考文献 米国特許第04830962 (US, A)

特表2007-519402 (JP, A)

国際公開第2008/134461 (WO, A1)

国際公開第2008/094986 (WO, A1)

特表2013-507113 (JP, A)

米国特許第05055294 (US, A)

国際公開第2006/014899 (WO, A1)

WOZNIAK D.J. et al., Applied and Environmental Microbiology, 1995年, Vol.61, No.5, pp.1739-1744

BISHAI W.R. et al., Journal of Bacteriology, 1987年, Vol.169, No.11, pp.5140-5151

ZHOU J. et al., Journal of Tongji Medical University, 1999年, Vol.19, No.4, pp.253-256

RETAILLACK D.M. et al., Biotechnol Lett, 2007年, Vol.29, pp.1483-1491

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90

C12P 21/02

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)