

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-506328

(P2021-506328A)

(43) 公表日 令和3年2月22日 (2021.2.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/63 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/63 1 0 0 Z	4 B 0 6 4
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21 Z N A	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	
<b>C 1 2 N 1/13 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/13	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-535048 (P2020-535048)	(71) 出願人	520216781
(86) (22) 出願日	平成30年12月19日 (2018.12.19)		シンギュロン・ソシエテ・アノニム
(85) 翻訳文提出日	令和2年8月5日 (2020.8.5)		ベルギー国、4 1 0 2・スラン、リュ・ド
(86) 国際出願番号	PCT/EP2018/085941		ゥ・ボワ・ド・サンージャン・1 5 / 1
(87) 国際公開番号	W02019/121983	(71) 出願人	514084347
(87) 国際公開日	令和1年6月27日 (2019.6.27)		ユニベルシテ リブレ デ ブリュッセル
(31) 優先権主張番号	17208600.1		ベルギー 1 0 5 0 ブリュッセル アベ
(32) 優先日	平成29年12月19日 (2017.12.19)		ニュー エフ. デー. ルーズベルト 5
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		0
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100119253
			弁理士 金山 賢教
		(74) 代理人	100124855
			弁理士 坪倉 道明
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発酵プロセス

## (57) 【要約】

いくつかの実施形態は、その遺伝的活性が宿主に利点を付与する第一の核酸配列を含む自己複製性染色体外核酸分子を用いた微生物宿主を使用して目的産物を生産するための方法であって、前記第一の核酸分子の遺伝的活性が制御されてもよい、前記方法に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

a) その遺伝的活性が宿主に利点を付与する第一の核酸配列を含む自己複製性染色体外核酸分子を含む微生物宿主を提供するステップであって、前記第一の核酸配列の遺伝的活性が制御される、前記ステップ；  
b) 前記自己複製性染色体外核酸分子は前記目的産物の生産に関与する第二の核酸配列を含んでいてもよく、ここで、前記第二の核酸配列の遺伝的活性は第一の配列のものから独立して制御される；  
c) 前記形質転換微生物宿主が自己複製性染色体外分子を維持するための所与のレベルまで第一の核酸配列を発現することを可能にする条件下で前記形質転換微生物宿主を培養することで増殖中の微生物集団とし、同時に前記目的産物をコードする第二の配列を遺伝的に制御するステップ  
を含む、微生物宿主を使用して目的産物を生産するための方法。

10

**【請求項 2】**

ステップ a) の前またはステップ a) 中に、ステップ b) の第二の核酸配列を含んでもよい前記自己複製性染色体外核酸分子で微生物宿主を形質転換すること、それによって自己複製性染色体外核酸分子を含む微生物宿主を提供することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

ステップ c) の少なくとも一部において、条件が、第一の核酸配列が前記遺伝的活性を呈さないようなものである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

**【請求項 4】**

目的産物が、培養ステップ c) の終了時に精製される、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5】**

目的産物が、微生物バイオマス、自己複製性染色体外核酸分子、前記第二の核酸配列の転写産物、前記第二の配列によりコードされるポリペプチド、または前記ポリペプチドにより直接的もしくは間接的に生産される代謝物である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

微生物宿主が、細菌、酵母、糸状真菌または藻類である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

**【請求項 7】**

第一の核酸配列が、誘導性プロモーターに作動可能に連結される、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 8】**

第一の核酸配列が、その発現がその宿主に培地中の特定のバクテリオシンの存在に対する抵抗性を付与する免疫遺伝子をコードする配列を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 9】**

第一の核酸配列によりコードされる配列が、その宿主に培地中の少なくとも 2 つの別個のバクテリオシンの存在に対する抵抗性を付与する、請求項 8 に記載の方法。

40

**【請求項 10】**

バクテリオシンが B 1 7、C 7 または C o l V であって、B 1 7 に対する抵抗性を付与する免疫性が M c b G であり、C 7 に対する抵抗性を付与する免疫性が M c c E または C 末端 M c c E のいずれかであり、および C o l V に対する抵抗性を付与する免疫性が C v i である、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 11】**

自己複製性染色体外核酸分子がプラスミドである、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 1 2】

その遺伝的活性が微生物宿主に利点を付与する第一の核酸配列を含み、ここで前記第一の核酸配列の遺伝的活性は制御され、および目的産物の生産に直接的または間接的に関与する第二の核酸配列を含んでもよい、自己複製性染色体外核酸分子。

## 【請求項 1 3】

第一の核酸配列が、誘導性プロモーターに作動可能に連結される、請求項 1 2 に記載の自己複製性染色体外核酸分子。

## 【請求項 1 4】

プラスミドである、請求項 1 2 または 1 3 に記載の自己複製性染色体外核酸分子。

## 【請求項 1 5】

第一の核酸配列が、その発現がその宿主に培地中の特定のバクテリオシンの存在に対する抵抗性を付与する免疫遺伝子をコードする配列を含む、請求項 1 2 から 1 4 のいずれか一項に記載の自己複製性染色体外核酸分子。

## 【請求項 1 6】

第一の核酸配列によりコードされる配列が、その宿主に培地中の少なくとも 2 つの別個のバクテリオシンの存在に対する抵抗性を付与する、請求項 1 5 のいずれか一項に記載の自己複製性染色体外核酸分子。

## 【請求項 1 7】

バクテリオシンが B 1 7、C 7 または C o l V であって、B 1 7 に対する抵抗性を付与する免疫調節因子が M c b G であり、C 7 に対する抵抗性を付与する免疫調節因子が M c c E または C 末端 M c c E のいずれかであり、および C o l V に対する抵抗性を付与する免疫調節因子が C v i である、請求項 1 6 に記載の自己複製性染色体外核酸分子。

## 【請求項 1 8】

微生物宿主が、細菌、酵母、糸状真菌または藻類であってもよい、請求項 1 1 から 1 6 のいずれか一項に記載の自己複製性染色体外核酸分子を含む微生物宿主。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本明細書中の実施形態は、その遺伝的活性が宿主に利点を付与する第一の核酸配列を含む自己複製性染色体外核酸分子を用いた微生物宿主を使用して目的産物を生産するための方法であって、前記第一の核酸分子の遺伝的活性が制御されてもよい、前記方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

抗生物質は、微生物細胞中での目的産物の生産のための選択剤として広く用いられている。しかしながら、抗生物質の使用に関連して、例えば環境中での抗生物質の大規模な拡散などのいくつかの欠点がある。加えて、DNA コンストラクト中の抗生物質抵抗性をコードする配列は、細胞にとってエネルギー的な負担となり、したがって産物の収量に悪影響を及ぼす。このエネルギー的な負担は、抵抗性付与遺伝子が大きい遺伝子である場合、高レベルで発現している場合および / または構成的に発現している場合にとりわけ関連がある。

## 【0 0 0 3】

したがって、既存の方法の全ての欠点を持たない、代替的でさらに改良された方法へのニーズが依然としてある。

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0 0 0 4】

第一の態様において、

a) 第一の核酸配列を含む自己複製性染色体外核酸分子を含む微生物宿主を提供するステップであって、前記第一の核酸配列の遺伝的活性が制御されてもよい、前記ステップ；

10

20

30

40

50

b) 前記自己複製性染色体外核酸分子が前記目的産物の生産に関与する第二の核酸配列を含んでもよいステップであって、前記第二の核酸配列の遺伝的活性が第一の配列から独立して制御される、前記ステップ；

c) 前記微生物宿主が自己複製性染色体外分子を維持するための所与のレベルまで第一の核酸配列を発現することを可能にする条件下で前記微生物宿主を培養することで増殖中の微生物集団とし、同時に前記目的産物をコードする第二の配列を遺伝的に制御するステップ

を含む、微生物宿主を使用して目的産物を生産するための方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0005】

10

【図1】図1はpSyn2-McbE/Fの構成を示す。

【図2】図2はpSyn2-McbGの構成を示す。

【図3】図3はpMcbG 1.1の構成を示す。

【図4】図4はpMcbG 1.0の構成を示す。

【図5】図5はpBACT5.0ベクターを示す。

【図6】図6はpBACT2.0ベクターを示す。

【図7】図7はpBACT5.0-mcherryベクターを示す。

【図8】図8はプロモーターの調整を示す。

【図9】図9はKanR(pKan-pLac)を有し、ミクロシンC7およびColV(pBACT6.0-pLac)に対する2つの免疫性を有するE.コリにおけるタンパク質Xの過剰発現の比較を示す。

20

【図10】図10はKanR(pKan-T7prom)を有し、ミクロシンC7およびColV(pBACT5.0-T7prom)に対する2つの免疫性を有するE.コリにおけるイオタ-カラギナーゼタンパク質の過剰発現の比較を示す。

【図11】図11はKanR(pKan-T7prom)を有し、ミクロシンC7およびColV(pBACT5.0-T7prom)に対する2つの免疫性を有するE.コリにおけるラムダ-カラギナーゼタンパク質の過剰発現の比較を示す。

【発明を実施するための形態】

【0006】

30

ステップa)

ステップa)は、その遺伝的活性が宿主に利点を付与する第一の核酸配列を含む自己複製性染色体外核酸分子を含む微生物宿主を提供することを含み、ここで前記第一の核酸配列の遺伝的活性が制御されてもよい。自己複製性染色体外核酸分子は、微生物宿主(例として、本明細書中に記載される微生物細胞)中に提供されることができる。例えば、宿主または宿主の前身は、予め自己複製性染色体外核酸分子で形質転換されたものであり得る。かくして、いくつかの実施形態において、ステップa)は、その遺伝的活性が宿主に利点を付与する第一の核酸配列を含む自己複製性染色体外核酸分子を含む微生物細胞宿主を提供することを含み、ここで前記第一の核酸配列の遺伝的活性が制御されてもよい。

【0007】

40

任意選択の形質転換ステップ

いくつかの実施形態において、微生物宿主は、前記自己複製性染色体外核酸分子を受け取った宿主のみが生存することを可能にする条件下で、自己複製性染色体外核酸分子で形質転換され、このようにして自己複製性染色体外核酸分子を含む微生物宿主が提供される。かくして、いくつかの実施形態において、この方法は、前記自己複製性染色体外核酸分子を受け取った宿主のみが生存することを可能にする条件下、ステップa)の前またはステップa)中に微生物宿主を前記自己複製性染色体外核酸分子で形質転換すること、このようにして自己複製性染色体外核酸分子を含む微生物宿主を提供することをさらに含む。

【0008】

微生物宿主中に形質転換される自己複製性染色体外核酸分子は、ステップb)の第二の核酸配列を含んでもよい。自己複製性染色体外核酸分子を含む微生物宿主は、続いてステ

50

ップc)に従って培養することができる。

【0009】

本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸の関連の中で、第一の核酸配列を含む自己複製性染色体外核酸分子が提供される。自己複製性染色体外核酸分子は、ゲノムを含まずに存在することができ、プラスミドまたはエピソード、ミニ染色体または同様のものに由来し得て、またはこれらを含み得て、これらから本質的になり得て、またはこれらからなり得る。この態様は、高コピー数（用いられるプラスミドに応じて1から数百コピーまたは10から50コピー）のかかる核酸分子を微生物細胞宿主中に導入して維持することができることから、魅力的である。加えて、任意の宿主を、本明細書中の実施形態の方法において用いることができる。いくつかの実施形態において、宿主のゲノムを改変する必要はない。本明細書中の実施形態の方法を実施するために必要な遺伝的エレメントは、自己複製性染色体外核酸分子中に存在する。かかる自己複製性染色体外核酸分子は、通常、複製起点、目的である第一の核酸配列および調節領域を含む。いくつかの実施形態において、理論により限定されるものではないが、免疫調節因子をコードする第一の核酸配列は、宿主細胞中で自己複製性染色体外核酸の存在および機能を維持するための選択可能マーカーとして働く。いくつかの実施形態において、免疫調節因子をコードする第一の核酸配列は、産物を生産することができるように自己複製性染色体外核酸の存在を維持する。産物は、例えば環境中で物質を発酵させて1または複数の新たな物質を生産することにより、宿主が存在する環境を変えることができる。いくつかの実施形態において、変異を獲得した自己複製性染色体外核酸に対する選択圧を与えることにより遺伝的浮動が最小化され、機能的な免疫調節因子を産生せず、機能が低減された免疫調節因子を生産し、および/または変異（複数可）を獲得していない自己複製性染色体外核酸よりも低レベルの免疫調節因子を生産した。

10

20

【0010】

本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸の関連の中で、第一の核酸配列により表される第一の核酸分子は、遺伝的活性を呈することが可能であり、前記遺伝的活性は、それが存在してこの遺伝的活性が発現した微生物宿主細胞に選択的な利点を付与する。この遺伝的活性は、第一の核酸分子によりコードされる産物により提供される。そのうえ、この遺伝的活性は、制御することができ、または低いレベルで構成的に発現し、または調整可能であり、または弱い構成的プロモーターの制御下にある。前記活性の制御は、宿主にとってのエネルギー的な負担を制限する利点を提供するものと考えられる。同様に、宿主のエネルギー的な負担を制限する利点は、遺伝的活性が低いレベルで構成的に発現し、または調整可能であり、または弱い構成的プロモーターの制御下にあるときに得られ得る。出願文の全体を通じて、「利点を付与すること」という概念は、「バクテリオシンに対する免疫性を付与すること」または「バクテリオシンに対する抵抗性を付与すること」により置き換えられ得る。いくつかの実施形態において、第一の核酸配列は、本明細書中に記載される免疫調節因子をコードし、それによって宿主に利点を付与する。

30

【0011】

第二の核酸配列は、直接的または間接的に目的産物をコードする。同じ記述が、本明細書中に記載される第二の核酸分子の遺伝的活性についても成立する。いくつかの実施形態において、目的産物は、工業プロセス、例えば発酵プロセスにおいて有用な酵素を含む。発酵プロセスは、培養培地中で少なくとも1つの化合物を発酵させることができる。いくつかの実施形態において、目的産物は、産業上有用な分子、例えば炭水化物、脂質、有機分子、栄養素、肥料、バイオ燃料、化粧品（またはその前駆体）、医薬もしくは生物製剤（またはその前駆体）、または列举された項目のいずれか2つ以上を含む。

40

【0012】

本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸の関連の中で、遺伝的活性は、微生物宿主中の第一の核酸分子の存在により引き起こされるまたはこれと連鎖する任意の活性を意味し得る。前記活性の利点は、所与の条件（pH、温度、所与の分子、例えば本明細書中に記載されるバクテリオシンまたは2つ以上のバクテリオシンの組み合わせ

50

せなどの存在．．．) 下で生存するまたは生存して増殖する能力であり得る。したがって、前記活性の利点は、自己複製性染色体外核酸分子を含む微生物細胞 / 宿主の数を決定することにより評価され得る。評価は、任意選択の形質転換ステップの終了時および / もしくはこのステップの間に (しかし培養ステップ c) の前、またはステップ a) および培養ステップ c) の前に)、ならびに / または培養ステップ c) の前に実施され得る。ある実施形態において、存在する自己複製性染色体外核酸分子を含む微生物宿主細胞の数は、前記自己複製性染色体外核酸分子を受け取った微生物宿主が生存することを可能にする条件下で培養されている場合、(例として、本明細書中に記載され、かつ所与の条件中に存在する 1 または複数のバクテリオシンに対する免疫性を保有することにより) 最初の微生物細胞 / 宿主の数と比較して減少しておらず、少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % またはそれより多く増加し得る。この評価ステップの持続時間は、少なくとも 6 時間、12 時間、24 時間、36 時間、48 時間、60 時間、72 時間、84 時間、96 時間、108 時間、120 時間またはそれより長いものであり得て、この持続時間には、列挙された値のいずれか 2 つの間の範囲が包含される。

10

#### 【0013】

本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸の関連の中で、遺伝的活性の制御は、核酸分子 (すなわち第一および / または第二の核酸分子) の活性の増加または減少のいずれかを意味し得る。したがって、遺伝的活性の制御は、制御することができ、または低いレベルで構成的に発現し、または調整可能であり、または弱い構成的プロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態において、遺伝的活性が調節 / 制御されるコーディング産物は、免疫調節因子を含む、これらから本質的になる、もしくはこれらからなるか、または目的産物の生産に関与する。いくつかの実施形態において、遺伝的活性は、遺伝子発現レベルで調節 / 制御される。いくつかの実施形態において、遺伝的活性は、転写レベルで、例えばプロモーターを活性化または抑制することにより調節される。いくつかの実施形態において、この関連でのプロモーターは、誘導性プロモーターである。いくつかの実施形態において、この関連でのプロモーターは、弱プロモーターである。理論により限定されるものではないが、いくつかの実施形態の弱プロモーターは、宿主に付与される利点 (例として免疫調節因子活性) がプロモーターの制御下にある遺伝子産物 (複数可) のレベルおよび / または活性の変化に感受性であるように、転写レベルをアップレギュレートまたはダウンレギュレートするよう修正可能であることができる。いくつかの実施形態において、プロモーターは、配列番号 707 により表される P24 プロモーターおよび / または配列番号 708 により表される ProC プロモーターおよび / または P24 LacO ハイブリッドプロモーターを含む、これらから本質的になる、またはこれらからなる。P24 LacO ハイブリッドプロモーターは、調整可能な / 制御されたプロモーターである。いくつかの実施形態において、遺伝子活性は、転写後レベルで、例えば RNA 安定性の調節を通じて調節 / 制御される。いくつかの実施形態において、遺伝的活性は、翻訳レベルで、例えば翻訳開始の調節を通じて調節 / 制御される。いくつかの実施形態において、遺伝的活性は、翻訳後レベルで、例えばポリペプチド安定性の調節、ポリペプチドの翻訳後修飾またはポリペプチドへの阻害剤の結合を通じて調節 / 制御される。

20

30

40

#### 【0014】

いくつかの実施形態において、遺伝的活性は増加する。いくつかの実施形態において、免疫調節因子および / または目的産物の生産に関与する第二の核酸分子のコーディング産物のうちの少なくとも 1 つの活性が増加する。概念的には、遺伝的活性は、遺伝的活性を直接的に活性化することにより、または遺伝子活性の阻害物質の活性を減少させることにより、増加させることができる。いくつかの実施形態において、遺伝的活性は、プロモーター活性を誘導すること、転写リプレッサーを阻害すること、RNA の安定性を増加させ

50

ること、転写後阻害物質を阻害すること（例えば、リボザイムまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドを阻害すること）、翻訳を誘導すること（例えば、調節可能なtRNAを介して）、所望の翻訳後修飾を生成させること、または翻訳後阻害物質を阻害すること（例えば遺伝子によりコードされるポリペプチドを対象とするプロテアーゼ）のうちの少なくとも1つにより活性化される。いくつかの実施形態において、所望の環境中に存在する化合物は、プロモーターを誘導する。例えば、培養培地中の鉄の存在は、本明細書中に記載される鉄感受性プロモーターによる転写を誘導することができる。いくつかの実施形態において、所望の培養培地中に存在する化合物は、転写リプレッサーを阻害する。例えば、環境中のテトラサイクリンの存在は、tetリプレッサーを阻害することができ、それゆえにtetプロモーターからの活性を可能にする。いくつかの実施形態において、所望の培養培地外でのみ見出される化合物は、転写を誘導する。

10

#### 【0015】

いくつかの実施形態において、遺伝的活性は減少する。概念的には、遺伝的活性は、遺伝的活性を直接的に阻害することにより、または遺伝的活性の活性化物質の活性を減少させることにより、減少させることができる。いくつかの実施形態において、遺伝的活性は低減されるが、いくらかのレベルの活性は残る。いくつかの実施形態において、遺伝的活性は完全に阻害される。いくつかの実施形態において、遺伝的活性は、プロモーター活性を阻害すること、転写リプレッサーを活性化すること、RNAの安定性を減少させること、転写後阻害物質を活性化すること（例えば、リボザイムまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現させること）、翻訳を阻害すること（例えば、調節可能なtRNAを介して）、必要とされる翻訳後修飾を生成させないこと、ポリペプチドを不活性化すること（例えば阻害物質と結合させることにより、またはポリペプチドに特異的なプロテアーゼを介して）、またはポリペプチドを適当に局在させないことのうちの少なくとも1つにより減少する。いくつかの実施形態において、遺伝的活性は、遺伝子を所望の位置から取り除くことによって、例えばFLP-FRTもしくはcre-loxカセット、相同組換えもしくはCRIPR-CAS9活性を用いて、またはプラスミドの欠損もしくは分解を通じて遺伝子を切除することによって減少する。いくつかの実施形態において、遺伝子産物（例としてポリペプチド）または遺伝子産物により生産される産物（例として酵素反応生成物）は、遺伝子活性をさらに阻害する（例としてネガティブフィードバックループ）。

20

#### 【0016】

いくつかの実施形態において、第一の核酸分子の遺伝的活性により微生物宿主に付与される利点は、バクテリオシン（またはバクテリオシンの混合物）を含む培地中で生存するまたは生存して増殖する能力である。本明細書中で用いられるとき、「バクテリオシン」は、かかるポリペプチドの細胞を含まないまたは化学合成のバージョンを包含する。「バクテリオシン」およびこの語根のバリエーションは、宿主細胞により分泌されたポリペプチドをも指し得る。したがって、バクテリオシンは、同類または近縁の細菌株（複数可）の増殖を阻害するために細菌により生産されるタンパク質性毒素を包含する。これらは酵母およびゾウリムシの殺傷因子と類似しており、構造的、機能的および生態学的に多様である。バクテリオシンはまた、宿主細胞により分泌されるバクテリオシンの合成バリエーションも包含する。バクテリオシンの合成バリエーションは、合成バリエーションが宿主細胞により分泌される対応するバクテリオシンの活性の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%をなお呈するかぎり、何らかの方法で宿主細胞により分泌されるバクテリオシンに由来し得る。

30

40

#### 【0017】

抗生物質の詳細な記述は、本明細書の最後にある一般的記述に特化した部分の中で提供される。

#### 【0018】

「バクテリオシン」は、ポリペプチドが生成された個々の宿主細胞以外の、宿主細胞とクローン的に関係している細胞および他の微生物細胞を包含する少なくとも1つの細胞を無力化することができる。

50

## 【0019】

特定の「免疫調節因子」（本明細書中でより詳細に論じられる）を発現する細胞は、特定のバクテリオシンまたはバクテリオシングループの無力化効果に対する免疫性がある。かくして、バクテリオシンは、バクテリオシンを産生する細胞および／または他の微生物細胞を、これらの細胞が適切な免疫調節因子を産生しないかぎり、無力化することができる。かくして、バクテリオシンは、複数の他の微生物（microbial organism）に対する細胞傷害効果または増殖阻害効果を発揮することができる。ある実施形態において、バクテリオシンは、微生物細胞の翻訳機構（例としてリボソームなど）により産生される。別の実施形態において、バクテリオシンは、化学合成される。いくつかのバクテリオシンは、ポリペプチド前駆体に由来することができる。ポリペプチド前駆体は、切断（例えばプロテアーゼによるプロセッシング）を受けることでバクテリオシンポリペプチド自体をもたらすことができる。かくして、いくつかの実施形態において、バクテリオシンは、前駆体ポリペプチドから生産される。いくつかの実施形態において、バクテリオシンは、翻訳後修飾、例えば切断を受けたまたは1つもしくは複数の官能基の付加を受けたポリペプチドを含む、これらから本質的になる、またはこれらからなる。

10

## 【0020】

バクテリオシンの無力化活性としては、微生物複製の停止または細胞傷害を挙げることができる。いくつかのバクテリオシンは、細胞傷害活性（例として「殺菌」効果）を持ち、それゆえに微生物（microbial organism）、例えば細菌、酵母、藻類、合成微生物（microorganism）などを殺傷することができる。いくつかのバクテリオシンは、例えば細胞周期を停止させることにより、微生物（microbial organism）、例えば細菌、酵母、藻類、合成微生物（microorganism）などの複製を阻害することができる（例として「静菌」効果）。

20

## 【0021】

いくつかのバクテリオシンが同定されて性質決定されている（表1.1および1.2を参照されたい）。何らかの特定の理論により限定されるものではないが、例示的なバクテリオシンは、典型的に翻訳後修飾を受ける「クラスI」バクテリオシン、および典型的に非修飾である「クラスII」バクテリオシンに分類することができる。加えて、各クラス中の例示的なバクテリオシンは、表1.1中にまとめられるように様々なサブグループにカテゴリー分けすることができ、この出典であるCotter, P. D. et al. "Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics" Nature Reviews Microbiology 11: 95 - 105は、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる。

30

## 【0022】

何らかの特定の理論により限定されるものではないが、バクテリオシンは、様々な方法で標的微生物細胞の無力化をもたらすことができる。例えば、バクテリオシンは細胞壁を透過することができ、それゆえに細胞壁を脱分極させて呼吸を妨げることができる。表1.1：例示的なバクテリオシンの分類。

## 【0023】

表1.1：例示的なバクテリオシンの分類

40



【表 1】

グループ	示差的特徴	例
クラスⅠ（典型的には修飾されている）		
MccC7-C51 型バクテリオシン	カルボキシ末端のアスパラギン酸に共有結合している	MccC7-C51
ラッソペプチド	投げ縄構造を持つ	MccJ25
直鎖アゾールまたはアゾリン含有ペプチド	複素環を有するが他の修飾はない	MccB17
ランチビオティクス	ランチオニン架橋を有する	ナイシン、プラノスポリシン、メルサシジン、アクタガルジン、ミュータシン 1140
リナリジン	直鎖構造を持ち、脱水アミノ酸を含有する	シペマイシン
プロテウシン (Proteusin)	複数のヒドロキシル化、エピマー化およびメチル化を含有する	ポリセオナミド A
サクチビオティクス (Sactibiotics)	硫黄- $\alpha$ -炭素結合を含有する	サブチロシン A、ツリシン CD
パテラミド様シアノバクチン	複素環を保有し、大環状化される	パテラミド A
アナシクラミド様シアノバクチン	プレニルが付着したタンパク構成アミノ酸からなる環状ペプチド	アナシクラミド A10
チオペプチド	中央のピリジン、ジヒドロピリジンまたはピペリジン環を、同様に複素環を含有する	チオストレプトン、ノカチアシン I、GE2270 A、フィリピマイシン
ボトロマイシン	大環状アミジン、脱カルボキシル化されたカルボキシ末端のチアゾールおよび炭素がメチル化されたアミノ酸を含有する	ボトロマイシン A2
グリコシン	S-結合型糖ペプチドを含有する	サブランシン 168
クラスⅡ（典型的には非修飾または環状）		

10

20

30

40

グループ	示差的特徴	例
IIa ペプチド (ペディオシン PA-1 様バクテリオシン)	保存された YGNGV モチーフを有する (ここで N は任意のアミノ酸を表す)	ペディオシン PA-1、エンテロシン CRL35、カルノバクテリオシン BM1
IIb ペプチド	2 つの非修飾ペプチドが活性に必要とされる	ABP118、ラクタシン F
IIc ペプチド	環状ペプチド	エンテロシン AS-48
IId ペプチド	非修飾、直鎖、非ペディオシン様の、単一ペプチドのバクテリオシン	MccV、MccS、エピデルミシン (epidermicin) NI01、ラクトコッシン A
IIe ペプチド	非リボソーム性のシデロフォア型修飾を有する、セリンに富んだカルボキシ末端領域を含有する	MccE492、MccM

10

20

## 【 0 0 2 4 】

いくつかのバクテリオシンが、本明細書中の実施形態に従って用いることができる。例示的なバクテリオシンは、表 1 . 2 中に示される。いくつかの実施形態において、表 1 . 2 のポリペプチド配列を含む、これらから本質的になる、またはこれらからなる、少なくとも 1 つのバクテリオシンが提供される。表 1 . 2 中に示されるように、いくつかのバクテリオシンは、分子対として機能する。かくして、特に明示的に述べられないかぎり、機能的な「バクテリオシン」または「バクテリオシンを提供すること」などが本明細書中で論じられる場合、個々で機能するバクテリオシンと一緒に機能的なバクテリオシン対が包含されることが理解される。表 1 . 2 に関して、括弧内に収載された「起源生物」は、指示されたバクテリオシンを産生することが知られている生物の別の名称および / または株の情報を指し示す。

30

## 【 0 0 2 5 】

本明細書中の実施形態はまた、表 1 . 2 中に記載されるバクテリオシンとの同一性を有するペプチドおよびタンパク質を包含する。用語「同一性」は、核酸またはタンパク質の配列相同性または 3 次元的相同性を包含するような意味を持つ。ポリペプチドに対する核酸またはタンパク質の配列相同性および / または 3 次元的相同性を決定するためのいくつかの技術が存在する。これらの方法は、1 つの配列、ドメインまたはモデルが持つ、標的の配列、ドメインまたはモデルとの同一性の程度を見出すためにルーチン的に使用される。非常に広い範囲の機能的バクテリオシンが本明細書中に開示されるバクテリオシンの特徴を取り込むことができ、それゆえに表 1 . 2 中のバクテリオシンとの非常に広い程度の同一性を提供することができる。いくつかの実施形態において、バクテリオシンは、表 1 . 2 のポリペプチドのいずれか 1 つと少なくとも 5 0 % の同一性を、例えば、少なくとも 5 0 %、5 1 %、5 2 %、5 3 %、5 4 %、5 5 %、5 6 %、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 %、8 8 %、8 9 %、

40

50

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を持つ。パーセント同一性は、BLASTソフトウェア (Altschul, S. F., et al. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215: 403-410、ワールドワイドウェブ上、blast.ncbi.nlm.nih.govにおいてアクセス可能) をデフォルトのパラメーターで用いることにより決定され得る。

#### 【0026】

表1.2中のバクテリオシンは天然起源のものであるが、当業者は、表1.2のバクテリオシンのバリエーション、表1.2のバクテリオシンもしくはそのバリエーション以外の天然起源のバクテリオシン、または合成のバクテリオシンを、本明細書中のいくつかの実施形態に従って用いることができることを理解する。いくつかの実施形態において、かかるバリエーションは、野生型タンパク質と比べて、同じまたは異なる微生物 (microorganism) または微生物 (microorganism) の種に対する細胞傷害性または増殖阻害活性のレベルが高められているか、または減少している。いくつかのモチーフは、バクテリオシンの特質として認識されている。例えば、モチーフYGXGV (配列番号2) (ここでXは任意のアミノ酸残基である) は、クラスIlaバクテリオシンのN末端コンセンサス配列の特質である。したがって、いくつかの実施形態において、合成のバクテリオシンは、配列番号2と少なくとも50%の同一性を有する、例えば配列番号2と少なくとも50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するN末端配列を含む。いくつかの実施形態において、合成のバクテリオシンは、配列番号2を含むN末端配列を含む。加えて、いくつかのクラスIibバクテリオシンは、GxxxGモチーフ (xは任意のアミノ酸を意味する) を含む。何らかの特定の理論により限定されるものではないが、GxxxGモチーフは、細胞膜の中でヘリックスタンパク質間の会合を媒介することで、例えば、細胞膜相互作用を通じたバクテリオシン媒介性の無力化を促すことができると考えられる。かくして、いくつかの実施形態において、バクテリオシンは、細胞膜との相互作用を促すモチーフを含む。いくつかの実施形態において、バクテリオシンは、GxxxGモチーフを含む。任意選択で、GxxxGモチーフを含むバクテリオシンは、ヘリックス構造を含むことができる。本明細書中に記載される構造に加えて、本明細書中で用いられる「バクテリオシン」は、微生物細胞に対して、本明細書中に明示的に提供されるバクテリオシンのうちのいずれかと実質的に同じ効果を持つ構造も包含する。

#### 【0027】

2つ以上のバクテリオシンまたはその部分を含む、これらから本質的になる、またはこれらからなる融合ポリペプチドは、いずれか個々のバクテリオシンよりも幅広い範囲の微生物 (microbial organism) に対する無力化活性を持つことができることが示されている。例えば、ハイブリッドバクテリオシンであるEnt35-MccV (GKYYGNGVSCNKKGCSDWGRAIGIIGNNSAANLATGGAAGWKSGGASGRDIAMAI GTLSGQFVAGGI GAAGGVAGGA IYDYASTHKPNPAMSPSGLGGTIKQKPEGIPSEAWNYAAGRLCNWSPNNLS DVC L、配列番号3) は、病原性のグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌に対して抗微生物活性を呈示することが示されている (Acuna et al. (2012), FEBS Open Bio, 2: 12-19)。なお、Ent35-MccV融合バクテリオシンは、N末端からC末端までに、N末端のグリシン、エンテロシンCRL35、3つのグリシンを含むリンカー、およびC末端のミクロシンVを含む。本明細書において、バクテリオシンは、バクテリオシン活性を持つ2つ以上のポリペプチドの融合体を含むことができると考えられる。いくつかの実施形態において、2

つ以上のバクテリオシンの融合ポリペプチドが提供される。いくつかの実施形態において、2つ以上のバクテリオシンは、表1、2からのポリペプチドまたはその改変体を含む、これらから本質的になる、またはこれらからなる。いくつかの実施形態において、2つ以上のバクテリオシンを含む融合ポリペプチドは、いずれか個々のバクテリオシンよりも幅広い活性スペクトルを、例えば、より多くの微生物 (microbial organism) に対する無力化活性、より幅広い範囲の環境条件下での無力化活性、および/またはより高効率の無力化活性を持つ。いくつかの実施形態において、2つ以上のバクテリオシン、例えば2、3、4、5、6、7、8、9または10個のバクテリオシンの融合体が提供される。いくつかの実施形態において、2つ以上のバクテリオシンポリペプチドは、共有結合、例えばペプチド結合を介して互いに融合される。いくつかの実施形態において、リンカーは、2つのバクテリオシンポリペプチドの間に位置する。いくつかの実施形態において、リンカーは、1または複数のグリシン、例えば約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のグリシンを含む、これらから本質的になる、またはこれらからなる。いくつかの実施形態において、リンカーは、細胞内で切断されて、融合タンパク質中に包含される個々のバクテリオシンを産生する。いくつかの実施形態において、本明細書中に提供されるバクテリオシンは、改変されていないバクテリオシンと比べて所望の活性スペクトルを提供するように改変される。例えば、改変バクテリオシンは、改変されていないバクテリオシンと同じ生物に対して、高められたまたは減少した活性を持ち得る。あるいは、改変バクテリオシンは、改変されていないバクテリオシンが弱い活性しか持たないまたは全く活性を持たない生物に対して、高められた活性を持ち得る。

10

20

【0028】

表1、2：例示的なバクテリオシン

【表 2】

ポリペ プチド 配列番 号	名 称	ク ラ ス	起 源 生 物	ポリヌク レオチド 配列番号
4	アシドシン 8912	未分類	ラクトバチルス・アシドフィル ス (Lactobacillus acidophilus)	5
6	アシドシン A	クラス IIA/YGNGV	ラクトバチルス・アシドフィル ス	7
8	アシドシン B (AcdB)	未分類	ラクトバチルス・アシドフィル ス	9
10	アシドシン LF221B (ガセ リシン K7 B)	未分類	ラクトバチルス・ガセリ (Lactobacillus gasseri)	11
12	アウレオシン A53	未分類	スタフィロкокカス・アウレウ ス (Staphylococcus aureus)	13
14	アビシン A	クラス IIA/YGNGV	エンテロкокカス・アビウム (Enterococcus avium) (ストレ プトкокカス・アビウム (Streptococcus avium) )	15
16	バクテリオシ ン 31	未分類	エンテロкокカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) (スト レプトкокカス・フェカリス (Streptococcus faecalis) )	17
18	バクテリオシ ン J46	未分類	ラクトкокカス・ラクティス (Lactococcus lactis)	19
20	バクテリオシ ン T8	クラス IIa	エンテロкокカス・フェシウム (Enterococcus faecium) (スト レプトкокカス・フェシウム (Streptococcus faecium) )	21
22	ボチシン (Boticin) B	未分類	クロストリジウム・ボツリナム (Clostridium botulinum)	23
24	ボビシン HJ50	ランチビオティッ ク	ストレプトкокカス・エクイナ ス (Streptococcus equinus) (ス トレプトкокカス・ボビス (Streptococcus bovis) )	25

10

20

30

40

26	ブロコシン-c	未分類	ブロコトリクス・カンペストリス ( <i>Brochothrix campestris</i> )	27
28	ブチリビブリオシン AR10	未分類	ブチリビブリオ・フィブリソルベンス ( <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> )	29
30	ブチリビブリオシン OR79	ランチビオティック	ブチリビブリオ・フィブリソルベンス	31
32	カルノバクテリオシン B2 (カルノシン CP52)	クラス IIA/YGNGV	カルノバクテリウム・マルタロマチカム ( <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> ) (カルノバクテリウム・ピシコラ ( <i>Carnobacterium piscicola</i> ))	33
34	カルノバクテリオシン BM1 (カルノバクテリオシン B1)	クラス IIA/YGNGV	カルノバクテリウム・マルタロマチカム (カルノバクテリウム・ピシコラ)	35
36	カルノバクテリオシン-A (ピシコリン-61)	クラス IIc、サブグループに分類されないバクテリオシン (疑わしい)	カルノバクテリウム・マルタロマチカム (カルノバクテリウム・ピシコラ)	37
38	カルノサイクリン-A	未分類	カルノバクテリウム・マルタロマチカム (カルノバクテリウム・ピシコラ)	39
40	カロシン D	未分類	ペクトバクテリウム・カロトボルム亜種カロトボルム ( <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ) (エルウィニア・カロトボラ亜種カロトボラ ( <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> ))	41
42	セレイン 7B	未分類	バチルス・セレウス ( <i>Bacillus cereus</i> )	43
44	シンナマイシン (ランチオペプチン)	ランチビオティック	ストレプトベルチシリウム・グリセオベルチシラタム	45

10

20

30

40

			(Streptovercillium griseovercillatum)	
46	サーキュラリン A	未分類	ゲオバチルス・カウストフィル ス (Geobacillus kaustophilus) (HTA426 株)	47
48	クロストシン 574	未分類	クロストリジウム・チロブチリ カム (Clostridium tyrobutyricum)	49
50	コアグリン A	未分類	バチルス・コアグランス (Bacillus coagulans)	51
52	コリシン-10	未分類	エシェリキア・コリ	53
54	コリシン-E1	未分類	エシェリキア・コリ	55
56	コリシン-Ia	未分類	エシェリキア・コリ	57
58	コリシン-Ib	未分類	エシェリキア・コリ	59
60	コリシン-M	未分類	エシェリキア・コリ	61
62	コリシン-N	未分類	エシェリキア・コリ	63
64	コリシン-V (ミクロシン-V)	未分類	エシェリキア・コリ	65
66	コロンビシン (Columbicin) A	ランチビオティッ ク	エンテロコッカス・コロンバエ (Enterococcus columbae)	69
68	カルバシン-A	クラス IIA/YGNGV	ラクトバチルス・カルバタス (Lactobacillus curvatus)	69
70	シペマイシン	未分類	ストレプトマイセス属種 (Streptomyces sp.)	71
72	サイトリシン	ランチビオティッ ク	バチルス・ハロデュランス (Bacillus halodurans) (ATCC BAA-125 / DSM 18197 / FERM 7344 / JCM 9153 / C-125 株)	73
74	ダイバーシン (Divercin) V41	クラス IIa/YGNGV	カルノバクテリウム・ダイバー ジェンス (Carnobacterium divergens) (ラクトバチルス・ ダイバージェンス (Lactobacillus divergens) )	75

10

20

30

40

76	ダイバージシ ン (Divergicin) 750	未分類	カルノバクテリウム・ダイバー ジェンス (ラクトバチルス・ダ イバージェンス)	77
78	ダイバージシ ン A	クラス IIc	カルノバクテリウム・ダイバー ジェンス (ラクトバチルス・ダ イバージェンス)	79
80	デュランシン Q	未分類	エンテロコッカス・デュランス (Enterococcus durans)	81
82	デュランシン TW-49M	未分類	エンテロコッカス・デュランス	83
84	ディスガラク ティシン (Dysgalacticin )	未分類	ストレプトコッカス・ディスガ ラクティエ亜種エクイシミリス (Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis) (ストレプト コッカス・エクイシミリス (Streptococcus equisimilis) )	85
86	エンテロシン 1071A	未分類	エンテロコッカス・フェカリス (ストレプトコッカス・フェカ リス)	87
88	エンテロシン 7A (エンテロ シン L50A)	配列リーダーのな いバクテリオシン	エンテロコッカス・フェカリス (ストレプトコッカス・フェカ リス)	89
90	エンテロシン 7B	未分類	エンテロコッカス・フェカリス (ストレプトコッカス・フェカ リス)	91
92	エンテロシン 96	クラス II	エンテロコッカス・フェカリス (ATCC 700802 / V583 株)	93
94	エンテロシン A	クラス IIa、IIc (疑 わしい)	エンテロコッカス・フェシウム (ストレプトコッカス・フェシ ウム)	95
96	エンテロシン AS-48 (バクテ リオシン AS- 48)	未分類	エンテロコッカス・フェカリス (ストレプトコッカス・フェカ リス)	97

10

20

30

40



98	エンテロシン B	クラス IIc、サブグループに分類されないバクテリオシン (疑わしい)	エンテロコッカス・フェシウム (ストレプトコッカス・フェシウム)	99
100	エンテロシン CRL35 (ムンジチシン KS)	クラス IIa	エンテロコッカス・ムンチイ ( <i>Enterococcus mundtii</i> )	101
102	エンテロシン EJ97	未分類	エンテロコッカス・フェカリス (ストレプトコッカス・フェカリス)	103
104	エンテロシン P	クラス IIa、IIb および IIc (疑わしい)	エンテロコッカス・フェシウム (ストレプトコッカス・フェシウム)	105
106	エンテロシン Q	クラス IIc	エンテロコッカス・フェシウム (ストレプトコッカス・フェシウム)	107
108	エンテロシン SE-K4	クラス IIa	エンテロコッカス・フェカリス (ストレプトコッカス・フェカリス)	109
110	エンテロシン W アルファ	クラス IIb	エンテロコッカス・フェカリス (ストレプトコッカス・フェカリス)	111
112	エンテロシン W ベータ	クラス IIb	エンテロコッカス・フェカリス (ストレプトコッカス・フェカリス)	113
114	エンテロシン X アルファ	クラス IIb	エンテロコッカス・フェシウム (ストレプトコッカス・フェシウム)	115
116	エンテロシン X ベータ	クラス IIb	エンテロコッカス・フェシウム (ストレプトコッカス・フェシウム)	117
118	エンテロリシン A	クラス III	エンテロコッカス・フェカリス (ストレプトコッカス・フェカリス)	119

10

20

30

40

120	エピシジン 280	ランチビオティッ ク	スタフィロコッカス・エピデル ミディス (Staphylococcus epidermidis)	121
122	エピデルミシ ン NI01	未分類	スタフィロコッカス・エピデル ミディス	123
124	エピデルミン	ランチビオティッ ク	スタフィロコッカス・エピデル ミディス	125
126	エピランシン K7	ランチビオティッ ク	スタフィロコッカス・エピデル ミディス	127
128	ガリデルミン	ランチビオティッ ク	スタフィロコッカス・ガリナラ ム (Staphylococcus gallinarum)	129
130	ガルビシン A	IId	ラクトコッカス・ガルビエ (Lactococcus garvieae)	131
132	ガルビシン ML	未分類	ラクトコッカス・ガルビエ	133
134	ガセリシン A	未分類	ラクトバチルス・ガセリ	135
136	ガセリシン T (ガセリシン K7 B)	未分類	ラクトバチルス・ガセリ	137
138	グリコシン F	未分類	ラクトバチルス・プランタラム (Lactobacillus plantarum)	139
140	ハロシン H4	未分類	ハロフェラックス・メディテラ ネイ (Haloferax mediterranei) (ATCC 33500 / DSM 1411 / JCM 8866 / NBRC 14739 / NCIMB 2177 / R-4 株) (ハロバクテリウ ム・メディテラネイ (Halobacterium mediterranei) )	141
142	ハロシン-S8	未分類	ハロアーケオン (Haloarchaeon) S8a	143
144	ヘルベティシ ン-J	未分類	ラクトバチルス・ヘルベティカ ス (Lactobacillus helveticus) (ラクトバチルス・サントリエ ウス (Lactobacillus suntoryeus) )	145

10

20

30

40

146	ヒラシン JM79	クラス II sec-依存性	エンテロコッカス・ヒラエ ( <i>Enterococcus hirae</i> )	147
148	ラクタシン-F (lafA)	クラス IIB	ラクトバチルス・ジョンソニー ( <i>Lactobacillus johnsonii</i> ) (CNCM I-12250 / La1 / NCC 533 株)	149
150	ラクタシン-F (lafX)	クラス IIB	ラクトバチルス・ジョンソニー (CNCM I-12250 / La1 / NCC 533 株)	151
152	ラクティシン 3147 A1	ランチビオティッ ク	ラクトコッカス・ラクティス亜 種ラクティス ( <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ) (ストレプトコッ カス・ラクティス ( <i>Streptococcus lactis</i> ))	153
154	ラクティシン 3147 A2	ランチビオティッ ク	ラクトコッカス・ラクティス亜 種ラクティス (ストレプトコッ カス・ラクティス)	155
156	ラクティシン 481 (ラクトコ ッシン DR)	ランチビオティッ ク	ラクトコッカス・ラクティス亜 種ラクティス (ストレプトコッ カス・ラクティス)	157
158	ラクティシン Q	未分類	ラクトコッカス・ラクティス	159
160	ラクティシン Z	未分類	ラクトコッカス・ラクティス	161
162	ラクトビン-A (アミロボリ ン-L471)	クラス IIB	ラクトバチルス・アミロボラス ( <i>Lactobacillus amylovorus</i> )	163
164	ラクトシン-S	ランチビオティッ ク	ラクトバチルス・サケイ ( <i>Lactobacillus sakei</i> ) L45	165
166	ラクトコッシ ン 972	未分類	ラクトコッカス・ラクティス亜 種ラクティス (ストレプトコッ カス・ラクティス)	167
168	ラクトコッシ ン-A	未分類	ラクトコッカス・ラクティス亜 種クレモリス ( <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> ) (ストレプトコ	169

10

20

30

40

			ッカス・クレモリス ( <i>Streptococcus cremoris</i> ) )	
170	ラクトコッシン-B	未分類	ラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (ストレプトコッカス・クレモリス)	171
172	ラクトサイクリシン Q	未分類	ラクトコッカス属種 ( <i>Lactococcus</i> sp.) QU 12	173
174	ラテロスポルリン ( <i>Laterosporulin</i> )	未分類	ブレビバチルス属種 ( <i>Brevibacillus</i> sp.) GI-9	175
176	ロイコシン N	クラス II d	ロイコノストック・シュードメセンテロイデス ( <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> )	177
178	ロイコシン Q	クラス II d	ロイコノストック・シュードメセンテロイデス	179
180	ロイコシン-A (ロイコシン A-UAL 187)	クラス IIA/YGNGV	ロイコノストック・ゲリダム ( <i>Leuconostoc gelidum</i> )	181
182	ロイコシン-B (ロイコシン B-Ta11a)	クラス IIA/YGNGV	ロイコノストック・カルノサム ( <i>Leuconostoc carnosum</i> )	183
184	ロイコサイクリシン Q	未分類	ロイコノストック・メセンテロイデス ( <i>Leuconostoc mesenteroides</i> )	185
186	リケニシジン A1	ランチビオティック (2つのペプチド)	バチルス・リケニホルミス ( <i>Bacillus licheniformis</i> ) (DSM 13 / ATCC 14580 株)	187
188	リノシン M18	未分類	ブレビバクテリウム・リネンス ( <i>Brevibacterium linens</i> )	189
190	リステリオシン 743A	クラス II a	リステリア・イノキュア ( <i>Listeria innocua</i> )	191
192	メルサシジン	ランチビオティック、タイプ B	バチルス属種 ( <i>Bacillus</i> sp.) (HIL-Y85/54728 株)	193
194	メセンテリシン Y105	クラス IIA/YGNGV	ロイコノストック・メセンテロイデス	195

10

20

30

40

196	ミシガニン-A	ランチビオティック	クラビバクター・ミシガネンシ ス亜種ミシガネンシス ( <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> )	197
198	ミクロシン B17 (MccB17)	未分類	エシェリキア・コリ	199
200	ミクロシン C7	未分類	エシェリキア・コリ	201
202	ミクロシン E492	未分類	クレブシエラ・ニューモニエ ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )	203
204	ミクロシン H47	未分類	エシェリキア・コリ	205
206	ミクロシン J25	未分類	エシェリキア・コリ	207
208	ミクロシン-24	未分類	エシェリキア・コリ	209
210	ムンジチシン KS	未分類	エンテロコッカス・ムンチイ	211
212	ムンジチシン L	クラス IIA/YGNGV	エンテロコッカス・ムンチイ	213
214	ミュータシン 1140 (ミュー タシン III)	ランチビオティック	ストレプトコッカス・ミュータ ンス ( <i>Streptococcus mutans</i> )	215
216	ミュータシン- 2	ランチビオティック	ストレプトコッカス・ミュータ ンス	217
218	ナイシン A	ランチビオティック	ラクトコッカス・ラクティス亜 種ラクティス (ストレプトコッ カス・ラクティス)	219
220	ナイシン F	ランチビオティック	ラクトコッカス・ラクティス	221
222	ナイシン Q	ランチビオティック	ラクトコッカス・ラクティス	223
224	ナイシン U	ランチビオティック	ストレプトコッカス・ウベリス ( <i>Streptococcus uberis</i> )	225
226	ナイシン Z	ランチビオティック	ラクトコッカス・ラクティス亜 種ラクティス (ストレプトコッ カス・ラクティス)	227

10

20

30

40

228	ヌカシン ISK-1	ランチビオティック	スタフィロкокカス・ワーネリ ( <i>Staphylococcus warneri</i> )	229
230	パエニシジン A	ランチビオティック	パエニバチルス・ポリミキサ ( <i>Paenibacillus polymyxa</i> ) (バ チルス・ポリミキサ ( <i>Bacillus</i> <i>polymyxa</i> ) )	231
232	ペディオシン PA-1 (ペディ オシン ACH)	クラス IIA/YGNGV	ペディオコッカス・アシディラ クティシ ( <i>Pediococcus</i> <i>acidilactici</i> )	233
234	ペノシン A	クラス IIA/YGNGV	ペディオコッカス・ペントサセ ウス ( <i>Pediococcus pentosaceus</i> ) (ATCC 25745 / 183-1w 株)	235
236	Pep5	ランチビオティック	スタフィロкокカス・エピデル ミディス	237
238	ピシコリン 126	クラス IIA/YGNGV	カルノバクテリウム・マルタロ マチカム (カルノバクテリウ ム・ピシコラ)	239
240	プラントリシ ン 1.25 $\beta$	未分類	ラクトバチルス・プラントラム	241
242	プラントリシ ン 423	クラス IIa	ラクトバチルス・プラントラム	243
244	プラントリシ ン ASM1	未分類	ラクトバチルス・プラントラム	245
246	プラントリシ ン E	未分類	ラクトバチルス・プラントラム	247
248	プラントリシ ン F	クラス IIb	ラクトバチルス・プラントラム	249
250	プラントリシ ン J	クラス IIb	ラクトバチルス・プラントラム	251
252	プラントリシ ン K	未分類	ラクトバチルス・プラントラム	253
254	プラントリシ ン NC8 $\alpha$	未分類	ラクトバチルス・プラントラム	255
256	プラントリシ ン NC8 $\beta$	未分類	ラクトバチルス・プラントラム	257

10

20

30

40

258	プランタリシン S $\alpha$	未分類	ラクトバチルス・プランタラム	259
260	プランタリシン S $\beta$	未分類	ラクトバチルス・プランタラム	261
262	プランタリシン W $\alpha$	ランチビオティック (2つのペプチド)	ラクトバチルス・プランタラム	263
264	プランタリシン W $\beta$	ランチビオティック (2つのペプチド)	ラクトバチルス・プランタラム	265
266	プランタリシン-A	未分類	ラクトバチルス・プランタラム (ATCC BAA-793 / NCIMB 8826 / WCFS1 株)	267
268	プロピオニン SM1	未分類	プロピオニバクテリウム・イエーンセニー (Propionibacterium jensenii)	269
270	プロピオニン T1	未分類	プロピオニバクテリウム・ソエニイ (Propionibacterium thoenii)	271
272	プロピオニン-F	未分類	プロピオバクテリウム・フロイデンライヒ亜種フロイデンライヒ (Propionibacterium freudenreichii subsp. freudenreichii)	273
274	ピオシン S1	未分類	シュードモナス・エルギノーサ (Pseudomonas aeruginosa)	275
276	ピオシン S2	コリシン/ピオシン (pyosin) ヌクレアーゼファミリー	シュードモナス・エルギノーサ (ATCC 15692 / PAO1 / 1C / PRS 101 / LMG 12228 株)	277
278	ルミノコッシン-A	ランチビオティック	ルミノコッカス・グナバス (Ruminococcus gnavus)	279
280	サカシン G	クラス IIa	ラクトバチルス・サケイ	281
282	サカシン-A	クラス IIA/YGNGV	ラクトバチルス・サケイ	283
284	サカシン-P (サカシン 674)	クラス IIA/YGNGV	ラクトバチルス・サケイ	285

10

20

30

40

286	サリバリシン 9	ランチビオティッ ク	ストレプトコッカス・サリバリ ウス (Streptococcus salivarius)	287
288	サリバリシン A	ランチビオティッ ク	ストレプトコッカス・ピオゲネ ス (Streptococcus pyogenes) 血 清型 M28 (MGAS6180 株)	289
290	サリバリシン A3	ランチビオティッ ク	ストレプトコッカス・サリバリ ウス	291
292	サリバリシン- A sa	ランチビオティッ ク	ストレプトコッカス・サリバリ ウス	293
294	スタフィロコ ッシン C55 ア ルファ	ランチビオティッ ク (2つのペプチ ド)	スタフィロコッカス・アウレウ ス	295
296	スタフィロコ ッシン C55 ベ ータ	ランチビオティッ ク (2つのペプチ ド)	スタフィロコッカス・アウレウ ス	297
298	ストレプトチン	ランチビオティッ ク	ストレプトコッカス・ピオゲネ ス	299
300	ストレプトコ ッシン A-FF22	ランチビオティッ ク	ストレプトコッカス・ピオゲネ ス	301
302	ストレプトコ ッシン A-M49	ランチビオティッ ク	ストレプトコッカス・ピオゲネ ス血清型 M49	303
304	サブランシン 168	ランチビオティッ ク	バチルス・サチリス (Bacillus subtilis) (168 株)	305
306	サブチリン	ランチビオティッ ク	バチルス・サチリス	307
308	サブチロシン	未分類	バチルス・サチリス (168 株)	309
310	サブチロシン- A	未分類	バチルス・サチリス (168 株)	311
312	サーモフィリ ン 1277	ランチビオティッ ク	ストレプトコッカス・サーモフ ィラス (Streptococcus thermophilus)	313
314	サーモフィリ ン 13	未分類	ストレプトコッカス・サーモフ ィラス	315
316	サーモフィリ ン A	未分類	ストレプトコッカス・サーモフ ィラス	317

10

20

30

40



318	チオシリン (マイクロコッ シン P1) (ミ クロコッシン P2) (チオシ リン I) (チオ シリン II) (チオシリン III) (チオシ リン IV) (抗 生物質 YM- 266183) (抗 生物質 YM- 266184)	未分類	バチルス・セレウス (ATCC 14579 / DSM 31 株)	319
320	ツリシン CD アルファ	2つのペプチドラ ンチビオティック	バチルス・セレウス 95/8201	321
322	ツリシン CD ベータ	2つのペプチドラ ンチビオティック	バチルス・セレウス 95/8201	323
324	ツリシン-17	クラス II d	バチルス・チューリンゲンシス ( <i>Bacillus thuringiensis</i> )	325
326	トリフォリト キシン	未分類	リゾビウム・レグミノサルム次 亜種トリフォリ ( <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> )	327
328	ウベリシン (Ubericin) A	クラス II a	ストレプトコッカス・ウベリス	329
330	ウベロリシン (Uberolysin)	未分類	ストレプトコッカス・ウベリス	331
332	UviB	未分類	クロストリジウム・パーフリン ジェンス ( <i>Clostridium perfringens</i> )	333
334	バリアシン	ランチビオティッ ク、タイプ A	マイクロコッカス・バリアンス ( <i>Micrococcus varians</i> )	335
336	ズーシン A	未分類	ストレプトコッカス・エクイ亜 種ズーエピデミクス ( <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> )	337

10

20

30

40

338	フルボシン (Fulvocin) -C	未分類	ミクソコッカス・フルバス (Myxococcus fulvus)	339
340	デュラマイシン-C	ランチビオティック	ストレプトマイセス・グリセオルテウス (Streptomyces griseoluteus)	341
342	デュラマイシン (デュラマイシン-B) (ロイコペプチン (Leucopeptin))	ランチビオティック B	ストレプトベルチシリウム・グリセオベルチシラタム	343
344	カルノシン UI49	ランチビオティック	カルノバクテリウム属種 (UI49 株)	345
346	ラクトコッシン-G $\alpha$	未分類	ラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス (ストレプトコッカス・ラクティス)	347
348	ラクトコッシン-G $\beta$	未分類	ラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス (ストレプトコッカス・ラクティス)	349
350	アンコベニン	ランチビオティック	ストレプトマイセス属種 (A647P-2 株)	351
352	アクタガルジン (ガルジマイシン)	ランチビオティック	アクチノプラネス・リグリアエ (Actinoplanes liguriae)	353
354	カルバチシン FS47	未分類	ラクトバチルス・カルバタス	355
356	ババリシン-MN	クラス IIA/YGNGV	ラクトバチルス・サケイ	357
358	ミュータシン B-Ny266	ランチビオティック	ストレプトコッカス・ミュータンス	359
360	ムンジチシン	クラス IIA/YGNGV	エンテロコッカス・ムンチイ	361
362	ババリシン-A	クラス IIA/YGNGV	ラクトバチルス・サケイ	363
364	ラクトシン-705	クラス IIb	ラクトバチルス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei)	365

10

20

30

40

366	ロイコシン-B	未分類	ロイコノストック・メセンテロ イデス	367
368	ロイコシン C	クラス IIA/YGNGV	ロイコノストック・メセンテロ イデス	369
370	LCI	未分類	バチルス・サチリス	371
372	リケニン	未分類	バチルス・リケニホルミス	373
374	ラクトコッシン MMFII	クラス IIA/YGNGV	ラクトコッカス・ラクティス亜 種ラクティス (ストレプトコッ カス・ラクティス)	375
376	セラシン (Serracin) -P	Phage-Tail-Like	セラチア・プリムシカ (Serratia plymuthica)	377
378	ハロシン-C8	未分類	ハロバクテリウム属種 (AS7092 株)	379
380	サブペプチン (Subpeptin) JM4-B	未分類	バチルス・サチリス	381
382	カルバリシン (Curvalicin) - 28a	未分類	ラクトバチルス・カルバタス	383
384	カルバリシン- 28b	未分類	ラクトバチルス・カルバタス	385
386	カルバリシン- 28c	未分類	ラクトバチルス・カルバタス	387
388	ツリシン-S	未分類	バチルス・チューリンゲンシス 亜種エントモシダス (Bacillus thuringiensis subsp. entomocidus)	389
390	カルバチシン L442	未分類	ラクトバチルス・カルバタス	391
392	ダイバージシ ン M35	クラス IIa/YGNGV	カルノバクテリウム・ダイバー ジェンス (ラクトバチルス・ダ イバージェンス)	393
394	エンテロシン E-760	クラス IIb	エンテロコッカス属種	395
396	バクテリオシ ン E50-52	未分類	エンテロコッカス・フェシウム (ストレプトコッカス・フェシ ウム)	397

10

20

30

40

398	パエニバシリ ン	未分類	パエニバチルス・ポリミキサ (バチルス・ポリミキサ)	399
400	エピランシン 15x	未分類	スタフィロコッカス・エピデル ミデイス	401
402	エンテロシン- HF	クラス IIa	エンテロコッカス・フェシウム (ストレプトコッカス・フェシ ウム)	403
404	バシロシン (Bacillocin) 602	クラス IIa	パエニバチルス・ポリミキサ (バチルス・ポリミキサ)	405
406	バシロシン 1580	クラス IIa	バチルス・サーキュランス ( <i>Bacillus circulans</i> )	407
408	バシロシン B37	未分類	パエニバチルス・ポリミキサ (バチルス・ポリミキサ)	409
410	ラムノシン A	未分類	ラクトバチルス・ラムノサス ( <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )	411
412	リケニシジン A2	ランチビオティッ ク (2つのペプチ ド)	バチルス・リケニホルミス (DSM 13 / ATCC 14580 株)	413
414	プランタリシ ン C19	クラス IIa	ラクトバチルス・プランタラム	415
416	アシドシン J1132 $\beta$	クラス IIb	ラクトバチルス・アシドフィル ス	417
418	抗カンジダ活 性を有する因 子	未分類	エンテロコッカス・フェカリス	419
420	Ava_1098 (推定ヘテロ シスト分化タ ンパク質)	未分類	アナベナ・バリアビリス ( <i>Anabaena variabilis</i> ) ATCC 29413	421
422	alr2818 (推定ヘテロ シスト分化タ ンパク質)	未分類	ノストック属種 ( <i>Nostoc</i> sp) 7120	423
424	Aazo_0724 (推 定ヘテロシス	未分類	ノストック・アゾラエ ( <i>Nostoc</i> <i>azollae</i> ) 0708	425

10

20

30

40

	ト分化タンパク質)			
426	AM1_4010 (推定ヘテロシスト分化タンパク質)	未分類	アカリオクロリス・マリナ ( <i>Acaryochloris marina</i> ) MBIC11017	427
428	PCC8801_3266 (推定ヘテロシスト分化タンパク質)	未分類	シアノセイス ( <i>Cyanothece</i> ) PCC 8801	429
430	Cyan8802_2855 (推定ヘテロシスト分化タンパク質)	未分類	シアノセイス PCC 8802	431
432	PCC7424_3517	未分類	シアノセイス PCC 7424	433
434	cce_2677 (推定 HetP タンパク質)	未分類	シアノセイス ATCC 51142	435
436	CY0110_11572 (推定ヘテロシスト分化タンパク質)	未分類	シアノセイス CCY0110	437
438	MC7420_4637	未分類	マイクロコレウス・クソノプラス テス ( <i>Microcoleus chthonoplastes</i> ) PCC 7420	439
440	asr1611 (推定 DUF37 ファミリータンパク質)	未分類	ノストック属種 7120	441
442	Ava_4222 (推定 DUF37 ファミリータンパク質)	未分類	アナベナ・バリアビリス ATCC 29413	443
444	N9414_07129 (推定 DUF37	未分類	ノデュラリア・スプミゲナ ( <i>Nodularia spumigena</i> ) CCY9414	445

10

20

30

40

	ファミリータ ンパク質)			
446	Aazo_0083 (推 定 DUF37 ファ ミリータンパ ク質)	未分類	ノストック・アゾラエ 0708	447
448	S7335_3409 (推定 DUF37 ファミリータ ンパク質)	未分類	シネココッカス ( <i>Synechococcus</i> ) PCC 7335	449
450	P9303_21151 (推定 DUF37 ファミリータ ンパク質)	未分類	プロクロロコッカス・マリナス ( <i>Prochlorococcus marinus</i> ) MIT 9303	451
720	カルバリシン- 28c	未分類	ラクトバチルス・カルバタス	721
722	ツルイシン (thruicin) -S	未分類	バチルス・チューリンゲンシス	723
724	カルバチシン L442	未分類	ラクトバチルス・カルバタス L442	725
726	バクテリオシ ンダイバージ シン M35	P84962	カルノバクテリウム・ダイバー ジェンス (ラクトバチルス・ダ イバージェンス)	727
728	ランチビオテ イック 107891	P85065	ミクロビスポラ属種 ( <i>Microbispora</i> sp.) (107891 株)	729
730	エンテロシン E-760 (バクテ リオシン E- 760)	P85147	エンテロコッカス属種	731
732	バクテリオシ ン E50-52	P85148	エンテロコッカス・フェシウム ( <i>Streptococcus</i> ・フェシ ウム)	733
734	ランチビオテ イック パエニ バシリン	P86013	パエニバチルス・ポリミキサ (バチルス・ポリミキサ)	735

10

20

30

40

736	ランチビオテ イック エピラ ンシン 15X	P86047	スタフィロコッカス・エピデル ミディス	737
738	エンテロシン- HF	P86183	エンテロコッカス・フェシウム (ストレプトコッカス・フェシ ウム)	739
740	バクテリオシ ン SRCAM 602	P86393	パエニバチルス・ポリミキサ (バチルス・ポリミキサ)	741
742	バクテリオシ ン SRCAM 1580	P86394	バチルス・サーキュランス	743
744	バクテリオシ ン SRCAM 37	P86395	パエニバチルス・ポリミキサ (バチルス・ポリミキサ)	745
746	バクテリオシ ンラムノシン A (断片)	P86526	ラクトバチルス・ラムノサス	747
748	ランチビオテ イック リケニ シジン A2 (LchA2) (BliA2)	P86720	バチルス・リケニホルミス (ATCC 14580 / DSM 13 / JCM 2505 / NBRC 12200 / NCIMB 9375 / NRRL NRS-1264 / Gibson 46 株)	749
750	ピオシン-S2 (EC 3.1.-.-) (Killer タンパ ク質)		シュードモナス・エルギノーサ (ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1 株)	751
752	プラントリシ ン C19 (断 片)		ラクトバチルス・プラントラム	753
754	LsbB		ラクトコッカス・ラクティス亜 種ラクティス (ストレプトコッ カス・ラクティス)	755
756	アシドシン J1132 ベータペ プチド (断 片)		ラクトバチルス・アシドフィル ス	757

10

20

30

40

758	性質不明タンパク質		ラクトバチルス・サリバリウス ( <i>Lactobacillus salivarius</i> ) cp400	759
-----	-----------	--	-------------------------------------------------------------	-----

## 【0029】

例えば、いくつかの実施形態において、抗真菌活性（例えば抗酵母活性など）が望まれる。抗真菌活性を有するいくつかのバクテリオシンが同定されている。例えば、バチルスからのバクテリオシンは、酵母株に対して無効化活性を持つことが示されており { Ade tunji and Olaoye (2013) Malaysian Journal of Microbiology 9:130-13 を参照されたい。この文献はその全体が参照により本明細書中に組み込まれる）、エンテロコッカス・フェカリスのペプチド (WLPPAGLLGRCGRWFRPWLLWLQ SGAQY KWLGNLFGLGPK、配列番号1) は、カンジダ属種 (*Candida species*) に対して無効化活性を持つことが示されており { Shekh and Roy (2012) BMC Microbiology 12:132 を参照されたい。この文献はその全体が参照により本明細書中に組み込まれる）、シュードモナスからのバクテリオシンは、真菌、例えばカーブラリア・ルナータ (*Curvularia lunata*)、フザリウム属種 (*Fusarium species*)、ヘルミントスポリウム属種 (*Helminthosporium species*) およびビオポラリス属種 (*Biopolaris species*) などに対して無効化活性を持つことが示されている (Shalani and Srivastava (2008) The Internet Journal of Microbiology, Volume 5 Number 2, DOI:10.5580/27dd - ワールドワイドウェブ上、アーカイブ [pub.com/journal/the-internet-journal-of-microbiology/volume-5-number-2/screening-for-antifungal-activity-of-pseudomonas-fluorescens-against-phytopathogenic-fungi.html#sthash.d0Ys03UO.1DKuTlUS.dpuf](http://pub.com/journal/the-internet-journal-of-microbiology/volume-5-number-2/screening-for-antifungal-activity-of-pseudomonas-fluorescens-against-phytopathogenic-fungi.html#sthash.d0Ys03UO.1DKuTlUS.dpuf) においてアクセス可能。この文献はその全体が参照により本明細書中に組み込まれる）。例として、5. サチリス (5. subtilis) からのボトリシジン (botrycidin) AJ1316 { Zuber, P et al. (1993) Peptide Antibiotics. In *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics* ed Sonenshein et al., pp. 897-916, American Society for Microbiology を参照されたい。この文献はその全体が参照により本明細書中に組み込まれる）およびアリリン B1 { Shenin et al. (1995) Antibiot Khimioter 50:3-7 を参照されたい。この文献はその全体が参照により本明細書中に組み込まれる）は、抗真菌活性を持つことが示されている。かくして、いくつかの実施形態において、例えば真菌微生物 (microbial organism) の無効化が望まれる実施形態において、バクテリオシンは、ボトリシジン AJ1316 またはアリリン B1 のうちの少なくとも1つを含む。

## 【0030】

例えば、いくつかの実施形態において、ラン藻の培養におけるバクテリオシンの活性が望ましい。いくつかの実施形態において、バクテリオシンは、ラン藻を無効化するために提供される。いくつかの実施形態において、バクテリオシンは、ラン藻の培養環境中に典型的に見出される侵入性の微生物 (microbial organism) を無効化するために提供される。保存されたバクテリオシンポリペプチドのクラスターが、多種多様なラン藻の種において同定されている。例えば、Wang et al. (2011),



Genome Mining Demonstrates the Widespread Occurrence of Gene Clusters Encoding Bacteriocins in Cyanobacteria. PLoS ONE 6 (7): e22384 (この文献はその全体が参照により本明細書中に組み込まれる)中に報告されるように、少なくとも145個の推定バクテリオシン遺伝子クラスターが、少なくとも43種のラン藻において同定されている。例示的なラン藻のバクテリオシンは、表1.2中に配列番号420、422、424、426、428、30、432、434、436、438、440、442、444、446、448および450として示される。

#### 【0031】

本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸の関連の中で、バクテリオシンが微生物細胞に対して本明細書中で説明されるものと異なるメカニズムを介して作用し得るとしても、微生物宿主がバクテリオシンを含む培地で培養されているとき、最初の微生物宿主数と比較して、微生物宿主の数が少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%またはそれより多く減少した場合、バクテリオシンは活性があると言われ得る。この培養ステップの持続時間は、存在する微生物宿主の数をカウントすることによりバクテリオシンの活性を評価する前の、少なくとも12時間、24時間、36時間、48時間、60時間、72時間またはそれより長いものであり得る。活性は、顕微鏡下で細胞をカウントすることにより、または任意の公知の微生物技術により評価され得る。いくつかの実施形態において、微生物宿主がバクテリオシンを含む培地で培養されているとき、最初の微生物宿主集団と比較して、少なくとも指定された数またはパーセンテージ (percentage) の微生物宿主において増殖が停止した場合、例えば少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%の微生物宿主が停止した場合、バクテリオシンは活性がある。

#### 【0032】

本明細書中のいくつかの実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸の関連の中で、バクテリオシンは、それぞれ配列番号198または200を含むまたはこれらからなるアミノ酸配列により表されるB17またはC7である。B17およびC7は、本明細書中のいくつかの実施形態に従って、簡単に生産でき、使い易く、培養培地中で安定な選択剤であることが実験的に確認されている(実施例1を参照されたい)。本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸のうちのいくつかはまた、配列番号198または200と少なくとも50%の同一性を持つ、例えば配列番号198または200と少なくとも50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を持つバクテリオシンの使用を包含する。B17またはC7のかかるバリエーションは、それらが少なくとも実質的なB17またはC7の活性を呈するかぎり、本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸において用いられ得る。この関連において、「実質的な」とは、例えば、配列番号198または200を持つB17またはC7の活性の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも100%またはそれより大きいこ

10

20

30

40

50

とを意味する。バクテリオシンの活性は、本明細書中で先に記載されている。

【0033】

本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸の関連の中で、ならびに標的の微生物宿主および用いられるバクテリオシンに応じて、当業者は、培地中または寒天ペトリプレート中で用いられることになるバクテリオシンの濃度がわかる。バクテリオシンB17またはC7を用いて、発明者らは、本明細書中の実施形態の方法および使用を実施することを可能にする、すなわち前記遺伝的活性の発現の利点を観察または可視化することを可能にする濃度で前記バクテリオシンを含む培養培地を調製することができた。前記活性の利点が自己複製性染色体外核酸分子を含む宿主の増殖を可能にすることであるならば、前記培地または寒天プレート中のバクテリオシンの量は、前記自己複製性染色体外核酸分子を受け取った微生物宿主が生存し増殖することを可能にする条件下で培養されている場合、最初の微生物細胞/宿主の数と比較して、前記自己複製性染色体外を含まない宿主の数が少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%またはそれより多く減少しているような量である。この評価ステップの持続時間は、少なくとも6時間、12時間、24時間、36時間、48時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間、120時間またはそれより長いものであり得る。前記培養培地は、実質的なバクテリオシン活性を失うことなく滅菌され得る。この関連において、「実質的な」とは、例えば、滅菌前の培養培地中に存在するバクテリオシン活性の50%超、60%超、70%超、80%超、90%超を意味する。

10

20

【0034】

本明細書中のいくつかの実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸に適した第一の核酸配列、およびバクテリオシンに免疫性を提供するその産物が表2中に示される。

【0035】

表2：バクテリオシンに対する免疫性を提供する例示的な核酸配列

【表 3】

ポリペプチド配列番号	名称	起源生物	ポリヌクレオチド配列番号
452	マイクロシン H47 免疫調節因子 MchI	エシェリキア・コリ	453
454	コリシン-E3 免疫調節因子 (コリシン-E3 B 鎖) (ImmE3) (マイクロシン-E3 免疫調節因子)	エシェリキア・コリ	455
456	コリシン-E1 免疫調節因子 (ImmE1) (マイクロシン-E1 免疫調節因子)	エシェリキア・コリ	457
458	クロアシン免疫調節因子	エシェリキア・コリ	459
460	コリシン-E2 免疫調節因子 (ImmE2) (マイクロシン-E2 免疫調節因子)	エシェリキア・コリ	461
462	コリシン-A 免疫調節因子 (マイクロシン-A 免疫調節因子)	シトロバクター・フロインデイ (Citrobacter freundii)	463
464	コリシン-Ia 免疫調節因子	エシェリキア・コリ	465
466	コリシン-Ib 免疫調節因子	エシェリキア・コリ	467
468	コリシン-N 免疫調節因子 (マイクロシン-N 免疫調節因子)	エシェリキア・コリ	469
470	コリシン-E8 免疫調節因子 (ImmE8) (マイクロシン-E8 免疫調節因子)	エシェリキア・コリ	471
472	ラクトコッシン-A 免疫調節因子	ラクトコッカス・ラクティス 亜種ラクティス (ストレプトコッカス・ラクティス)	473
474	ラクトコッシン-A 免疫調節因子	ラクトコッカス・ラクティス 亜種クレモリス (ストレプトコ	475

10

20

30

40

		ツカス・クレモリス)	
476	コリシン-D 免疫調節因子 (マイクロシン-D 免疫調節因子)	エシェリキア・コリ	477
478	コリシン-E5 免疫調節因子 (ImmE5) (マイクロシン-E5 免疫調節因子)	エシェリキア・コリ	479
480	コリシン-E6 免疫調節因子 (ImmE6) (マイクロシン-E6 免疫調節因子)	エシェリキア・コリ	481
482	ColE6 中のコリシン-E8 免疫調節因子 (E8Imm[E6])	エシェリキア・コリ	483
484	コリシン-E9 免疫調節因子 (ImmE9) (マイクロシン-E9 免疫調節因子)	エシェリキア・コリ	485
486	コリシン-M 免疫調節因子 (マイクロシン-M 免疫調節因子)	エシェリキア・コリ	487
488	コリシン-B 免疫調節因子 (マイクロシン-B 免疫調節因子)	エシェリキア・コリ	489
490	コリシン-V 免疫調節因子 (マイクロシン-V 免疫調節因子)	エシェリキア・コリ	491
492	コリシン-E1*免疫調節因子 (ImmE1) (マイクロシン-E1*免疫調節因子)	シグラ・ソンネイ (Shigella sonnei)	493
494	コリシン-E1 免疫調節因子 (ImmE1) (マイクロシン-E1 免疫調節因子)	エシェリキア・コリ	495
496	蓋然性のあるロイコシン-A 免疫調節因子	ロイコノストック・ゲリダム	497
498	ラクトコッシン-B 免疫調節因子	ラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (ストレプトコッカス・クレモリス)	499
500	ペディオシン PA-1 免疫調節因子 (ペディオシン ACH 免疫調節因子)	ペディオコッカス・アシディラクティシ	501
502	推定カルノバクテリオシン-BM1 免疫調節因子	カルノバクテリウム・マルタロ	503

10

20

30

40

		マチカム (カル ノバクテリウ ム・ピシコラ)	
504	推定カルノバクテリオシン-B2 免疫調節因子 (カルノシン-CP52 免疫調節因子)	カルノバクテリ ウム・マルタロ マチカム (カル ノバクテリウ ム・ピシコラ)	505
506	ナイシン免疫調節因子	ラクトコッカ ス・ラクティス 亜種ラクティス (ストレプトコ ッカス・ラクテ イス)	507
508	トリフォリトキシシン免疫調節因子	リゾビウム・レ グミノサルム次 亜種トリフォリ	509
510	抗リステリアバクテリオシンサブチロシン生合 成タンパク質 AlbD	バチルス・サチ リス (168 株)	511
512	推定 ABC トランスポーターATP 結合性タンパク 質 AlbC (抗リステリアバクテリオシンサブチロ シン生合成タンパク質 AlbC)	バチルス・サチ リス (168 株)	513
514	抗リステリアバクテリオシンサブチロシン生合 成タンパク質 AlbB	バチルス・サチ リス (168 株)	515
516	コリシン-E7 免疫調節因子 (ImmE7) (ミクロ シン-E7 免疫調節因子)	エシェリキア・ コリ	517
518	ピオシン-S1 免疫調節因子	シュードモナ ス・エルギノー サ	519
520	ピオシン-S2 免疫調節因子	シュードモナ ス・エルギノー サ (ATCC 15692 / PAO1 / 1C / PRS 101 / LMG 12228 株)	521

10

20

30

40

522	ヒラシン-JM79 免疫因子	エンテロコッカ ス・ヒラエ	523
524	蓋然性のあるメセンテリシン-Y105 免疫調節因子	ロイコノストッ ク・メセンテロ イデス	525
526	マイクロシン-24 免疫調節因子	エシェリキア・ コリ	527
528	コリシン-K 免疫調節因子	エシェリキア・ コリ	529
530	マイクロシン C7 自己免疫調節因子 MccF	エシェリキア・ コリ	531
532	サカシン-A 免疫因子	ラクトバチル ス・サケイ	533
534	ColE9 中のコリシン-E5 免疫調節因子 (E5Imm[E9])	エシェリキア・ コリ	535
536	抗リステリアバクテリオシンサブチロシン生合 成タンパク質 AlbD	バチルス・サチ リス	537
538	マイクロシン-J25 排出 ATP 結合性/パーミアーゼタ ンパク質 McjD (マイクロシン-J25 免疫調節因子) (マイクロシン-J25 分泌 ATP 結合性タンパク質 McjD)	エシェリキア・ コリ	539
540	マイクロシン E492 免疫調節因子	クレブシエラ・ ニューモニエ	541
	McbG	エシェリキア・ コリ	699
	MccE	エシェリキア・ コリ	700
706	MccE の C 末端部分	E.コリに由来 し、人工的なも のと考えられる	701
	Cvi	エシェリキア・ コリ	709
	McbG-MccE	E.コリに由来 し、人工的なも のと考えられる	715
	McbG-Cter 部分 MccE (Cter は C 末端により置き換えることができ る)	E.コリに由来 し、人工的なも のと考えられる	716

10

20

30

40

	Cvi-MccE	E.コリに由来し、人工的なものと考えられる	717
	Cvi-Cter 部分 MccE (Cter は C 末端により置き換えることができる)	E.コリに由来し、人工的なものと考えられる	718

## 【 0 0 3 6 】

表 2 のバクテリオシンに対する免疫性を提供する配列は天然起源であるが、当業者は、かかる分子のバリエーション、表 2 のもの以外の天然起源の分子、または合成のものを、本明細書中のいくつかの実施形態に従って用いることができることを理解する。いくつかの実施形態において、特定のバクテリオシン、バクテリオシンの特定のクラスもしくはカテゴリーまたはバクテリオシンの特定の組み合わせに対する免疫性を付与する特定の分子または免疫性を付与する分子の特定の組み合わせ。分子が免疫性を付与することができる例示的なバクテリオシンは、表 2 中に同定される。表 2 は免疫性を付与する分子についての「起源生物」を同定しているが、免疫性を付与するこれらの分子は、本明細書中のいくつかの実施形態に従って、所望のバクテリオシン免疫活性を提供するために、他の天然起源の、遺伝子改変の、または合成の微生物 (microorganism) 中で容易に発現させることができる。かくして、本明細書中で用いられるとき、「免疫調節因子」または「バクテリオシンに対する免疫性を付与または提供する分子」は、本明細書中に明確に提供される構造だけでなく、完全合成の免疫調節因子および本明細書中に開示されるバクテリオシンと機能的に等価であるバクテリオシンに対する免疫性を提供する免疫調節因子といった本明細書中に記載される「免疫調節因子」構造と実質的に同じ効果を持つ構造も包含する。

## 【 0 0 3 7 】

表 2 のポリペプチドをコードする例示的なポリヌクレオチド配列は、表 2 中に指し示される。当業者は、遺伝暗号は縮重され、そのうえ、コドン使用頻度は遺伝子産物が発現している特定の生物に基づいて変わり得て、かくして、特定のポリペプチドが 1 つ以上のポリヌクレオチドによりコードされることができることを容易に理解する。いくつかの実施形態において、バクテリオシン免疫調節因子をコードするポリヌクレオチドは、バクテリオシン免疫調節因子を発現する生物のコドン使用頻度に基づいて選択される。いくつかの実施形態において、バクテリオシン免疫調節因子をコードするポリヌクレオチドは、バクテリオシン免疫調節因子を発現する特定の生物に基づいてコドン最適化される。非常に広い範囲の機能的免疫調節因子が本明細書中に開示される免疫調節因子の特徴を取り込むことができ、それゆえに表 2 中の免疫調節因子との非常に広い程度の同一性を提供することができる。いくつかの実施形態において、免疫調節因子は、表 2 のポリペプチドのいずれか 1 つと少なくとも約 50 % の同一性を、例えば、少なくとも 50 %、51 %、52 %、53 %、54 %、55 %、56 %、57 %、58 %、59 %、60 %、61 %、62 %、63 %、64 %、65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の同一性を持つ。

## 【 0 0 3 8 】

本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸の関連の中で、バクテリオシンに対する抵抗性または免疫性は、細胞がバクテリオシンを含む培地で培養されているとき、バクテリオシンを使用した培養ステップ終了時の微生物細胞の数が最初の微生物細胞の数と比較して減少しておらず、いくつかの実施形態において少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少

なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%またはそれより多く増加したことを意味し得る。この培養ステップの持続時間は、存在する微生物細胞の数をカウントすることによりバクテリオシンの活性を評価する前の、少なくとも12時間、24時間、36時間、48時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間、120時間またはそれより長いものであり得る。

#### 【0039】

本明細書中のいくつかの実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸に適しており、そのコーディング産物が免疫性を付与する核酸分子は、McbG（バクテリオシンB17に対する免疫性）であり、これは配列番号699により表される。McbGは、本明細書中のいくつかの実施形態に従って、構成的または誘導的に選択可能マーカーとして有用であることが実験的に確認されている（実施例3を参照されたい）。別の好適な核酸は、配列番号700により表されるMccE（バクテリオシンC7に対する免疫性）、または配列番号701により表されるそのc末端部分である。MccEは、ミクロシン/バクテリオシンに対して感受性である株におけるベクター選択マーカーとして用いられている（実施例2を参照されたい）。いくつかの実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸はまた、そのコーディング産物がバクテリオシンB17および/またはC7に対する免疫性を付与し、かつ配列番号699、700または701と少なくとも50%の同一性を、例えば配列番号699、700または701と少なくとも50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を持つ核酸分子の使用を包含する。かかるMcbGおよび/またはMccEバリエーションは、それらが少なくとも実質的なMcbG（それぞれMccE）の活性を呈するかぎり、本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸において用いられ得る。この関連において、「実質的な」とは、例えば、配列番号699、700または701を持つMcbG（それぞれMccE）の活性の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも100%またはそれより大きいことを意味する。McbG（それぞれMccE）のコーディング産物により付与される免疫性は、本明細書中で先に記載されている。

#### 【0040】

驚くべきことに、配列番号701により表されるMccEのC末端部分は、バクテリオシンC7に対する抵抗性を付与するために十分であることが見出された。この関連において、部分は、例えば元の核酸分子の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%またはそれより大きいものであることを意味する。これは、かかる短い核酸分子がバクテリオシンに対する抵抗性を付与することができる点で相当に魅力的であり、驚くべきことである。かかる短い核酸分子を含む自己複製性染色体外核酸分子は、微生物細胞に何らの負担を生じさせないものと予想される。

#### 【0041】

本明細書中のいくつかの実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸にさらに適しており、その産物がバクテリオシンに対する免疫性を提供する核酸分子は、その単一の産物が少なくとも2つの別個のバクテリオシンに対して免疫性を提供する単一の核酸分子である。いくつかの実施形態において、かかる核酸分子のかかる産物は、B17およびC7に対する、またはCovおよびC7に対する、またはCovおよびB17に対する、またはB17、C7およびCovに対する免疫性を提供する。Covをコードする核酸は、配列番号65として同定され、対応するコーディングアミノ酸配列は、配列番号64として同定される。

#### 【0042】

10

20

30

40

50



いくつかの実施形態において、その産物が B 1 7 および C 7 に対する免疫性を提供する核酸分子は、配列番号 7 1 5 または 7 1 6 と少なくとも 5 0 % の同一性を持つ、例えば配列番号 7 1 5 または 7 1 6 と少なくとも 5 0 %、5 1 %、5 2 %、5 3 %、5 4 %、5 5 %、5 6 %、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 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の同一性を持つ配列により表される。配列番号 7 1 5 は、M c c E と融合した M c b G の核酸分子である。配列番号 7 1 6 は、本明細書中で先に記載される、M c c E の C 末端部分と融合した M c b G の核酸分子である。

10

#### 【 0 0 4 3 】

いくつかの実施形態において、その産物が C o l V および C 7 に対する免疫性を提供する核酸分子は、配列番号 7 1 7 または 7 1 8 と少なくとも 5 0 % の同一性を持つ、例えば配列番号 7 1 7 または 7 1 8 と少なくとも 5 0 %、5 1 %、5 2 %、5 3 %、5 4 %、5 5 %、5 6 %、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 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の同一性を持つ配列により表される。配列番号 7 1 7 は、M c c E と融合した C v i の核酸分子である。配列番号 7 1 8 は、本明細書中で先に記載される、M c c E の C 末端部分と融合した C v i の核酸分子である。

20

#### 【 0 0 4 4 】

コア配列のかかる同一性バリエーションは、本明細書中で先に記載される、それらが由来する分子の少なくとも実質的な活性を呈するかぎり、本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸において用いられ得る。

#### 【 0 0 4 5 】

本明細書中のいくつかの実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸において、本明細書中に記載される、その産物が単一の、または 1 つ以上の、または少なくとも 2 つのバクテリオシンに対して免疫性を付与するこれらの核酸分子の各々は、本明細書中に記載されるプロモーターに作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態において、プロモーターは、弱プロモーターである。いくつかの実施形態において、弱プロモーターは、配列番号 7 0 8 により表される p r o C プロモーター、または配列番号 7 0 7 により表される P 2 4 プロモーターであり、これは、実験的に確認されている（例として実施例 3 を参照されたい）。

30

#### 【 0 0 4 6 】

本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸において有用である好適なコンストラクトは、その産物がバクテリオシンに対する免疫性を付与する第一の核酸分子を含むことができ、これらのコンストラクトは、配列番号 7 0 2、7 0 3、7 1 0、7 1 1、7 0 4、7 0 5、7 1 2、7 1 3 または 7 1 4 を含み得る、これらから本質的になり得る、またはこれらからなり得る。これらのコンストラクトの各々は、本出願の実験部の中に広範に記載されており、この実験部は、本明細書中のいくつかの実施形態に従って、これらのコンストラクトの各々が実際に構築されて好適であることが確認されたことを記している（例として、実施例 1 および 2 および 3 を参照されたい）。

40

#### 【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態の方法において、培養培地に加えられるバクテリオシンは、本明細書中で同定される B 1 7 および / または C 7 および / または C o l V である。

#### 【 0 0 4 8 】

この方法は、任意の目的産物の生産を可能にし得る。いくつかの実施形態の方法におい

50

て、目的産物は、微生物バイオマス、自己複製性染色体外核酸分子、前記第二の核酸配列 (n u c l e i c   s e q u e n c e ) の転写産物、前記第二の配列によりコードされるポリペプチド、または前記ポリペプチドにより直接的もしくは間接的に生産される代謝物である。

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態の方法において、目的産物は、培養ステップ c ) の終了時に精製される。これは、当業者に公知の技術を用いて実施され得る。

【 0 0 5 0 】

自己複製性染色体外核酸分子の存在に関連したエネルギー的な負担が最小化されているため、目的産物の収量は最適になると予想される。

10

【 0 0 5 1 】

この方法は、任意の好適な微生物細胞を、例えば宿主として用い得る。好適な微生物細胞は、一般的記述というタイトルの明細書の部分の中に収載される。それ自体が適した、および本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物および宿主における使用に適した微生物細胞としては、限定されるものではないが、細菌（例えば、グラム陰性細菌、例えば E . コリ種）、酵母、糸状真菌または藻類が挙げられる。いくつかの実施形態において、微生物細胞は、合成の微生物細胞である。

【 0 0 5 2 】

ある方法において、自己複製性染色体外核酸分子上に存在する第一の核酸配列は、プロモーターに作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、弱プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、構成的プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、誘導性である。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、弱い構成的プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、弱い誘導性プロモーターである。前記プロモーターの誘導能は、第一の核酸配列の遺伝的活性の存在を制御する手段である。プロモーターは、当該技術分野で周知である。詳細な記述は、本明細書の一般的記述に特化した部分の中で提供される。プロモーターは、1または複数のコーディング配列の転写を駆動するために用いることができる。前記自己複製性染色体外核酸分子は、目的産物の生産に関与する第二の核酸配列を含んでもよく、ここで前記第二の核酸配列の遺伝的活性は、第一の配列のものから独立して制御される。

20

30

【 0 0 5 3 】

ある実施形態において、前記第二の核酸配列の遺伝的活性の制御は、第一の配列の遺伝的活性の制御から独立していない。

【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態において、第二のプロモーターは、本明細書中に記載される目的産物の生産に関与している前記第二の核酸配列の発現を駆動する。ある実施形態において、第一のプロモーターは、本明細書中に記載される免疫調節因子ポリヌクレオチドの発現を駆動する。

【 0 0 5 5 】

本明細書中で用いることができるプロモーターは、それが作動可能に連結される核酸分子にとってネイティブでないものであり得て、すなわち、それが作動可能に連結される核酸分子（コーディング配列）にとって異種であるプロモーターであり得る。いくつかの実施形態のプロモーターは、それが作動可能に連結されるコーディング配列にとって異種であるが、いくつかの実施形態において、プロモーターは、同種、例として、微生物細胞にとって内因性である。いくつかの実施形態において、（ヌクレオチド配列にとって）異種のプロモーターは、コーディング配列にとってネイティブであるプロモーターよりも、コーディング配列を含む転写産物を高い定常状態レベルで生産する能力がある（または単位時間あたりより多くの転写産物分子、すなわち m R N A 分子を生産する能力がある）。いくつかのプロモーターは、いつでも変わらず転写を駆動することができる（「構成的プロモーター」）。いくつかのプロモーターは、例えば環境条件、化合物、遺伝子産物、細胞

40

50

周期ステージなどの存在または不存在に応じて、選択環境下でのみ転写を駆動することができる（「コンディショナルプロモーター」または「誘導性プロモーター」）。

【0056】

当業者は、所望の発現活性に応じて、適切なプロモーターを選択し、発現させる配列とシスに置くことができる（すなわち、つまりこれと作動可能に連結される）ことを理解する。例示的な活性を有する例示的なプロモーターは、本明細書中の表3.1~3.11中に提供される。当業者は、いくつかのプロモーターには特定の転写機構（例としてRNAポリメラーゼ、基本転写因子など）との適合性があることを理解する。かくして、本明細書中に記載されるいくつかのプロモーターについて適合性のある「種」が同定されるが、本明細書中のいくつかの実施形態によると、これらのプロモーターは同定された種以外の微生物（microorganism）において、例えば適合性のある内因性の転写機構を有する種、適合性のある転写機構を含む遺伝子改変種、または適合性のある転写機構を含む完全合成の微生物（microbial organism）において容易に機能することができると考えられる。

10

【0057】

本明細書中の表3.1~3.11のプロモーターは、BioBricks財団から公的に入手可能である。なお、BioBricks財団は、これらのプロモーターをBioBrick（商標）Public Agreement（BPA）に従って使用することを奨励している。

20

【0058】

本明細書中に記載される「コーディング」ポリヌクレオチド（例えば第一の核酸配列および/または目的産物（product of interest）の生産に關与する第二の核酸配列）のいずれも、一般に、所望のプロモーターの制御下で発現させることを受け入れられることが理解されるものである。ある実施形態において、第一の核酸配列は、第一のプロモーターの制御下にある。ある実施形態において、目的産物の生産に關与する第二の核酸配列は、第二のプロモーターの制御下にある。

【0059】

一般に、特定の転写産物についての翻訳開始は、転写産物のコーディング配列の5'末端における特定の配列により調節される。例えば、コーディング配列は、イニシエーターtRNAと対になるように構成された開始コドンから始まることができる。天然起源の翻訳系は典型的にMet（AUG）を開始コドンとして用いるが、イニシエーターtRNAは任意の所望のトリプレット（複数可）に結合するように設計することができ、したがって、ある種の実施形態において、AUG以外のトリプレットも開始コドンとして機能することができる。加えて、開始コドン付近の配列、例えば典型的な真核生物の翻訳系におけるコザック配列（（gcc）gccNccAUGG、配列番号542、ここでNは「A」または「G」を表す）もしくは配列内リボソーム進入部位（Internal Ribosome Entry Site、IRES）、または典型的な原核生物の翻訳系におけるシャイン・ダルガーノ配列（GGAGGU、配列番号543）は、リボソームのアセンブリを促すことができる。かくして、いくつかの実施形態において、「コーディング」ポリヌクレオチド配列、例えば第一の核酸配列、または発酵産物の生産に關与する第二の核酸配列を含む転写産物は、適切な開始コドンおよび翻訳開始配列を含む。いくつかの実施形態において、例えば、2つ以上の「コーディング」ポリヌクレオチド配列が転写産物上でシスに置かれたら、各ポリヌクレオチド配列は、適切な開始コドンおよび翻訳開始配列（複数可）を含む。

30

40

【0060】

いくつかの実施形態において、例えば、2つ以上の「コーディング」ポリヌクレオチド配列が転写産物上でシスに置かれたら、この2つの配列は単一の翻訳開始配列の制御下にあり、シスにコードされるポリペプチドの両方を伴って機能することができる単一のポリペプチドを提供するか、またはシスにコードされる2つのポリペプチドを分離するための手段、例えば2A配列などを提供する。いくつかの実施形態において、免疫調節因子また

50

は産業上有用な分子の翻訳開始を調節するために、翻訳イニシエーター ( i n t i a t o r ) t R N A は調節可能である。

【 0 0 6 1 】

表 3 . 1 : 例示的な金属感受性プロモーター

【表 4】

配列番号	名称	記述
544	BBa_I721001	鉛プロモーター
545	BBa_I731004	FecA プロモーター
546	BBa_I760005	Cu 感受性プロモーター
547	BBa_I765000	Fe プロモーター
548	BBa_I765007	Fe および UV プロモーター ーs
549	BBa_J3902	PrFe (PI + PII rus オペロ ン)

10

【 0 0 6 2 】

表 3 . 2 : 例示的な細胞シグナル伝達応答性プロモーター

20

【表 5】

配列番号	名称	記述
550	BBa_I1051	Lux カセット右向きプロモーター (Lux cassette right promoter)
551	BBa_I14015	P (Las) TetO
552	BBa_I14016	P (Las) CIO
553	BBa_I14017	P (Rhl)
554	BBa_I739105	ダブルプロモーター (LuxR/HSL、ポジティブ/cI、ネガティブ)
555	BBa_I746104	S.アウレウスからの agr オペロン中の P2 プロモーター
556	BBa_I751501	plux-cI ハイブリッドプロモーター
557	BBa_I751502	plux-lac ハイブリッドプロモーター
558	BBa_I761011	CinR、CinL およびグルコース制御性プロモーター
559	BBa_J06403	CI により抑制可能な RhlR プロモーター
560	BBa_J102001	リバース Lux プロモーター
561	BBa_J64000	rhII プロモーター
562	BBa_J64010	lasI プロモーター
563	BBa_J64067	LuxR+3OC6HSL 独立性 R0065
564	BBa_J64712	LasR/LasI 誘導性 & RHLR/RHLI 抑制性プロモーター
565	BBa_K091107	pLux/cI ハイブリッドプロモーター
566	BBa_K091117	pLas プロモーター
567	BBa_K091143	pLas/cI ハイブリッドプロモーター
568	BBa_K091146	pLas/Lux ハイブリッドプロモーター
569	BBa_K091156	pLux
570	BBa_K091157	pLux/Las ハイブリッドプロモーター
571	BBa_K145150	ハイブリッドプロモーター: HSL-LuxR 活性化、P22 C2 抑制性
572	BBa_K266000	PAI+LasR -> LuxI (AI)
573	BBa_K266005	PAI+LasR -> LasI & AI+LuxR --  LasI
574	BBa_K266006	PAI+LasR -> LasI+GFP & AI+LuxR --  LasI+GFP
575	BBa_K266007	Complex QS -> LuxI & LasI サーキット
576	BBa_K658006	3 位変異プロモーターlux pR-3 (luxR & HSL 調節性)
577	BBa_K658007	5 位変異プロモーターlux pR-5 (luxR & HSL 調節性)
578	BBa_K658008	3&5 位変異プロモーターlux pR-3/5 (luxR & HSL 調節性)
579	BBa_R0061	プロモーター (HSL 媒介性 luxR リプレッサー)
580	BBa_R0062	プロモーター (luxR & HSL 調節性 -- lux pR)
581	BBa_R0063	プロモーター (luxR & HSL 調節性 -- lux pL)

10

20

30

40

582	BBa_R0071	プロモーター (RhIR & C4-HSL 調節性)
583	BBa_R0078	プロモーター (cinR および HSL 調節性)
584	BBa_R0079	プロモーター (LasR & PAI 調節性)
585	BBa_R1062	プロモーター、標準 (luxR および HSL 調節性 -- lux pR)

【 0 0 6 3 】

表 3 . 3 : 例示的な構成的 E . コリ <sup>7 0</sup> プロモーター

【表 6】

配列番号	名称	記述
586	BBa_I14018	P (Bla)
587	BBa_I14033	P (Cat)
588	BBa_I14034	P (Kat)
589	BBa_I732021	プライマーファミリーメンバーを構築するための鋳型
590	BBa_I742126	リバーズ ラムダ cI-調節性プロモーター
591	BBa_J01006	キープロモーター absorbs 3
592	BBa_J23100	構成的プロモーターファミリーメンバー
593	BBa_J23101	構成的プロモーターファミリーメンバー
594	BBa_J23102	構成的プロモーターファミリーメンバー
595	BBa_J23103	構成的プロモーターファミリーメンバー
596	BBa_J23104	構成的プロモーターファミリーメンバー
597	BBa_J23105	構成的プロモーターファミリーメンバー
598	BBa_J23106	構成的プロモーターファミリーメンバー
599	BBa_J23107	構成的プロモーターファミリーメンバー
600	BBa_J23108	構成的プロモーターファミリーメンバー
601	BBa_J23109	構成的プロモーターファミリーメンバー
602	BBa_J23110	構成的プロモーターファミリーメンバー
603	BBa_J23111	構成的プロモーターファミリーメンバー
604	BBa_J23112	構成的プロモーターファミリーメンバー
605	BBa_J23113	構成的プロモーターファミリーメンバー
606	BBa_J23114	構成的プロモーターファミリーメンバー
607	BBa_J23115	構成的プロモーターファミリーメンバー
608	BBa_J23116	構成的プロモーターファミリーメンバー
609	BBa_J23117	構成的プロモーターファミリーメンバー
610	BBa_J23118	構成的プロモーターファミリーメンバー
611	BBa_J23119	構成的プロモーターファミリーメンバー
612	BBa_J23150	J23107 からの 1bp 変異体
613	BBa_J23151	J23114 からの 1bp 変異体
614	BBa_J44002	pBAD リバーズ
615	BBa_J48104	NikR プロモーター、 <i>expre</i> を抑制する転写因子のリボン-ヘリックス-ヘリックスファミリータンパク質
616	BBa_J54200	<i>lacq</i> プロモーター
617	BBa_J56015	<i>lacIQ</i> -プロモーター配列

10

20

30

40

618	BBa_J64951	E.コリ CreABCD リン酸感知性オペロンプロモーター
619	BBa_K088007	GlnRS プロモーター
620	BBa_K119000	lacZ の構成的な弱プロモーター
621	BBa_K119001	変異 LacZ プロモーター
622	BBa_K137029	-10 から-35 エLEMENTの間の (TA) 10 を有する構成的プロモーター
623	BBa_K137030	-10 から-35 エLEMENTの間の (TA) 9 を有する構成的プロモーター
624	BBa_K137031	-10 から-35 エLEMENTの間の (C) 10 を有する構成的プロモーター
625	BBa_K137032	-10 から-35 エLEMENTの間の (C) 12 を有する構成的プロモーター
626	BBa_K137085	-10 から-35 エLEMENTの間の 13bp を有する最適化 (TA) リピート構成的プロモーター
627	BBa_K137086	-10 から-35 エLEMENTの間の 15bp を有する最適化 (TA) リピート構成的プロモーター
628	BBa_K137087	-10 から-35 エLEMENTの間の 17bp を有する最適化 (TA) リピート構成的プロモーター
629	BBa_K137088	-10 から-35 エLEMENTの間の 19bp を有する最適化 (TA) リピート構成的プロモーター
630	BBa_K137089	-10 から-35 エLEMENTの間の 21bp を有する最適化 (TA) リピート構成的プロモーター
631	BBa_K137090	-10 から-35 エLEMENTの間の 17bp を有する最適化 (A) リピート構成的プロモーター
632	BBa_K137091	-10 から-35 エLEMENTの間の 18bp を有する最適化 (A) リピート構成的プロモーター
633	BBa_K256002	J23101:GFP
634	BBa_K256018	J23119:IFP
635	BBa_K256020	J23119:HO1
636	BBa_K256033	赤外光シグナルレポーター (J23119:IFP:J23119:HO1)
637	BBa_K292000	ダブルターミネーター+構成的プロモーター
638	BBa_K292001	ダブルターミネーター+構成的プロモーター+強 RBS
639	BBa_K418000	IPTG 誘導性 Lac プロモーターカセット
640	BBa_K418002	IPTG 誘導性 Lac プロモーターカセット
641	BBa_K418003	IPTG 誘導性 Lac プロモーターカセット
642	BBa_M13101	M13K07 遺伝子 I プロモーター

10

20

30

40



643	BBa_M13102	M13K07 遺伝子 II プロモーター
644	BBa_M13103	M13K07 遺伝子 III プロモーター
645	BBa_M13104	M13K07 遺伝子 IV プロモーター
646	BBa_M13105	M13K07 遺伝子 V プロモーター
647	BBa_M13106	M13K07 遺伝子 VI プロモーター
648	BBa_M13108	M13K07 遺伝子 VIII プロモーター
649	BBa_M13110	M13110
650	BBa_M31519	g3 の改変プロモーター配列
651	BBa_R1074	構成的プロモーターI
652	BBa_R1075	構成的プロモーターII
653	BBa_S03331	—構成的プロモーター

10

【 0 0 6 4 】

表 3 . 4 : 例示的な構成的 E . コリ<sup>8</sup> プロモーター

【表 7】

配列番号	名称	記述
654	BBa_J45992	完全長の定常期 osmY プロモーター
655	BBa_J45993	最小の定常期 osmY プロモーター

20

【 0 0 6 5 】

表 3 . 5 : 例示的な構成的 E . コリ<sup>3 2</sup> プロモーター

【表 8】

配列番号	名称	記述
656	BBa_J45504	htpG ヒートショックプロモーター

30

【 0 0 6 6 】

表 3 . 6 : 例示的な構成的 B . サチリス<sup>A</sup> プロモーター

【表 9】

配列番号	名称	記述
657	BBa_K143012	プロモーターveg B.サチリスのための構成的プロモーター
658	BBa_K143013	プロモーター43 B.サチリスのための構成的プロモーター
659	BBa_K780003	バチルス・サチリスのための強い構成的プロモーター
660	BBa_K823000	PliaG
661	BBa_K823002	PlepA
662	BBa_K823003	Pveg

10

【0067】

表 3. 7 : 例示的な構成的 B. サチリス<sup>B</sup> プロモーター

【表 10】

配列番号	名称	記述
663	BBa_K143010	B.サチリスのためのプロモーターctc
664	BBa_K143011	B.サチリスのためのプロモーターgsiB
665	BBa_K143013	プロモーター43 B.サチリスのための構成的プロモーター

20

【0068】

表 3. 8 : 種々の原核生物からの例示的な構成的プロモーター

【表 11】

配列番号	名称	記述
666	a_K112706	サルモネラからの Pspv2
667	BBa_K112707	サルモネラからの Pspv

30

【0069】

表 3. 9 : バクテリオファージ T7 からの例示的な構成的プロモーター

【表 1 2】

配列番号	名称	記述
668	BBa_I712074	T7 プロモーター (T7 バクテリオファージからの強プロモーター)
669	BBa_I719005	T7 プロモーター
670	BBa_J34814	T7 プロモーター
671	BBa_J64997	T7 コンセンサス-10 および残部
672	BBa_K113010	オーバーラッピング T7 プロモーター
673	BBa_K113011	よりオーバーラッピングな T7 プロモーター
674	BBa_K113012	弱オーバーラッピングな T7 プロモーター (weaken overlapping T7 promoter)
675	BBa_R0085	T7 コンセンサスプロモーター配列
676	BBa_R0180	T7 RNAP プロモーター
677	BBa_R0181	T7 RNAP プロモーター
678	BBa_R0182	T7 RNAP プロモーター
679	BBa_R0183	T7 RNAP プロモーター
680	BBa_Z0251	T7 強プロモーター
681	BBa_Z0252	T7 弱結合性および進行性
682	BBa_Z0253	T7 弱結合性プロモーター

10

20

【 0 0 7 0 】

表 3 . 1 0 : 酵母からの例示的な構成的プロモーター

【表 1 3】

配列番号	名称	記述
683	BBa_I766555	pCyc (中程度) プロモーター
684	BBa_I766556	pAdh (強) プロモーター
685	BBa_I766557	pSte5 (弱) プロモーター
686	BBa_J63005	酵母 ADH1 プロモーター
687	BBa_K105027	cyc100 最小プロモーター
688	BBa_K105028	cyc70 最小プロモーター
689	BBa_K105029	cyc43 最小プロモーター
690	BBa_K105030	cyc28 最小プロモーター
691	BBa_K105031	cyc16 最小プロモーター
692	BBa_K122000	pPGK1
693	BBa_K124000	pCYC 酵母プロモーター
694	BBa_K124002	酵母 GPD (TDH3) プロモーター
695	BBa_K319005	酵母中程度長 ADH1 プロモーター
696	BBa_M31201	酵母 CLB1 プロモーター領域、G2/M 細胞周期特異的

10

20

## 【 0 0 7 1】

表 3 . 1 1 : 種々の真核生物からの例示的な構成的プロモーター

【表 1 4】

配列番号	名称	記述
697	BBa_I712004	CMV プロモーター
698	BBa_K076017	Ubc プロモーター

30

## 【 0 0 7 2】

上で参照されるプロモーターは、限定されない例としてのみ、提供される。プロモーターは、合成のプロモーターであり得る。本明細書中のいくつかの実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸に適したプロモーターは、本明細書中で先に記載されており、例として、本明細書中のいくつかの実施形態に従って実験的に確認されている配列番号 7 0 8 により表される p r o C (実施例 2 を参照されたい)、および本明細書中のいくつかの実施形態に従って実験的に確認されている配列番号 7 0 7 により表される P 2 4 (実施例 3 を参照されたい)である。いくつかの実施形態において、好適な誘導性プロモーターは、P 2 4 L a c O ハイブリッドプロモーターであり、これは、L a c I の存在下で抑制され、I P T G の存在下で活性がある。このプロモーターは、本明細書中のいくつかの実施形態に従って実験的に確認されている (実施例 3 を参照されたい)。

40

## 【 0 0 7 3】

当業者は、上で参照されるプロモーターの多くのバリエーションおよび多くの他のプロモーター (天然に存在する生物から単離されたプロモーター、そのバリエーション、および完全合成のまたは操作されたプロモーターを包含する) を、本明細書中のいくつかの実施形

50

態に従って容易に用いることができることを容易に認識する。バリエーション、完全合成または合成のプロモーター、またはエンジニアプロモーター (engineer promoter) は、転写産物をコードする核酸分子と作動可能に連結されている対照または参照プラスミド中で試験したとき、前記プラスミドが細胞中に存在すると検出可能な量の前記転写産物分子が存在する場合に活性があるまたは機能すると言われ、したがって、本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸において用いることができる。バリエーション、完全合成または合成のプロモーター、またはエンジニアプロモーターは、それが由来するプロモーターの活性の少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% または少なくとも 100% を持ち得る。

#### 【0074】

この方法は、前記自己複製性染色体外核酸分子を受け取った宿主が生存することを可能にする条件下で、前記微生物宿主を前記自己複製性染色体外核酸分子で形質転換することを含んでもよい。なお、いくつかの実施形態において、自己複製性染色体外核酸分子は微生物細胞中に提供され得て (例として、微生物細胞またはその前身が自己複製性染色体外核酸分子で形質転換された場合)、かくして、いくつかの実施形態において、形質転換ステップはこの方法において必要ではない。形質転換ステップは、ステップ c) の培養の前に実施することができる。いくつかの実施形態において、形質転換ステップは、自己複製性染色体外核酸分子を含む宿主細胞を提供するためにステップ a) の前に提供される。いくつかの実施形態において、形質転換ステップにおいて用いられる自己複製性染色体外核酸分子は、任意選択ステップ b) の第二の核酸をさらに含む。

#### 【0075】

微生物 (microbial organism) を遺伝子改変する技術は、当該技術分野で周知である (例えば M. R. Green および J. Sambrook による Molecular Cloning Fourth edition, 2012 Cold Spring Harbor Laboratory Press, A laboratory manual を参照されたい、この文献はその全体が参照により本明細書中に組み込まれる)。いくつかの実施形態において、微生物 (microorganism) は、前記第一の核酸配列を含む自己複製性染色体外核酸分子を、および任意選択で目的産物の生産に関与する分子を含むように遺伝子改変される。ポリヌクレオチドまたは核酸分子は、微生物 (microorganism) に送達され得る。

#### 【0076】

ある実施形態において、微生物細胞は、前記自己複製性染色体外核酸分子を受け取った細胞が生存することを可能にする少なくとも 1 つの所与の条件に対応する第一の核酸配列の遺伝的活性によりポジティブに選択され、前記条件は環境条件であることができる。環境条件は、培養培地であり得る。

#### 【0077】

微生物細胞を柔軟に遺伝子改変すること、例えば、遺伝的活性の所望のタイプおよび / またはスペクトルを持つように微生物細胞を設計または再設計することは、有用であり得る。いくつかの実施形態において、1 または複数の所望の別個の第一の核酸配列を挿入するためのカセットが提供される。例示的なカセットとしては、限定されるものではないが、Cre / lox カセットまたは FLP / FRT カセットが挙げられる。

#### 【0078】

ある実施形態において、微生物細胞は、本明細書中に記載される第一の核酸配列を含む異なる自己複製性染色体外核酸分子を 1 つより多く (2 つより多く、3 つより多く、...) 含み、このことは、前記細胞が 1 つより多く (2 つより多く、3 つより多く、...) の遺伝的活性を呈することができる、各遺伝的活性は細胞に利点を付与することを意味する。第一のプロモーターが各々の異なる自己複製性染色体外核酸分子の中に存在するならば、各々の前記第一のプロモーターは、異なるものであっても同一のものであってもよい。したがって、目的産物を生産するための方法であって、微生物宿主が 1 つ、2 つ、3 つ、4 つまたはそれより多くの別個の染色体外核酸分子を含み、各々が前記微生物宿主に対

して別個の遺伝的活性を付与する前記方法において、1つ、2つ、3つ、4つまたはそれより多くの別個のバクテリオシンを用いることは、本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸の範囲内である。あるいは、その産物が少なくとも別個のバクテリオシンに対する免疫性を提供する単一の核酸分子が用いられることは、本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸の範囲内である。かかる核酸分子は、本明細書中に記載されている。

#### 【0079】

いくつかの実施形態において、所望のプラスミドを「ドナー」微生物細胞からレシピエント微生物細胞に導入するため、プラスミド接合を用いることができる。Goni-Moreno, et al. (2013) Multicellular Computing Using Conjugation for Wiring. PLoS ONE 8(6): e65986、この文献はその全体が参照により本明細書中に組み込まれる。いくつかの実施形態において、プラスミド接合は、接合プラスミドをドナー微生物細胞からレシピエント微生物細胞に導入することにより、レシピエント微生物細胞を遺伝子改変することができる。何らかの特定の理論により限定されるものではないが、同じまたは機能的に同じ複製遺伝子セットを含む接合プラスミドは、典型的には、同じ微生物細胞の中で共存することができない。かくして、いくつかの実施形態において、プラスミド接合は、レシピエント細胞中に存在していた別の接合プラスミドにとって代えるために新たな接合プラスミドを導入することにより、レシピエント微生物細胞を「リプログラム」する。いくつかの実施形態において、プラスミド接合は、第一の核酸分子（いくつかの実施形態において免疫調節因子をコードすることができる）の特定の組み合わせを使用して微生物細胞を設計する（または再設計する）ために用いられる。いくつかの実施形態によると、第一の酸配列（acid sequence）（いくつかの実施形態において免疫調節因子をコードすることができる）の異なる組み合わせを含む様々な接合プラスミドが提供される。プラスミドは、本明細書中に記載される付加的な遺伝的エレメント、例えばプロモーター、翻訳開始部位などを含むことができる。いくつかの実施形態において、所望のプラスミドを含むドナー細胞をプラスミド接合のために選択することができるように、様々な接合プラスミドがドナー細胞のコレクション中に提供される。いくつかの実施形態において、免疫調節因子の特定の組み合わせが選択され、組み合わせを含む接合プラスミドをレシピエント細胞に導入するため、適切なドナー細胞が目的の微生物細胞と接合される。いくつかの実施形態において、レシピエント細胞は、例えば、培養の中に導入するための、または培養を始めるために導入するための、「新たに設計された」細胞である。

#### 【0080】

##### ステップb)

ステップa)に加えて、いくつかの実施形態において、この方法は、前記自己複製性染色体外核酸分子が前記目的産物の生産に関与する第二の核酸配列を含む任意選択のステップb)であって、前記第二の核酸配列の遺伝的活性が第一の配列のものから独立して制御される、前記ステップをさらに含む。

#### 【0081】

本明細書中の実施形態の方法、使用、組成物、宿主および核酸との関連で、表現「独立して制御される」は、本開示を考慮して当業者により理解されるような慣例的かつ普通の意味を持ち、第一および第二の核酸配列の遺伝的活性を制御するために別個の方法が用いられることを意味することを包含する。核酸配列の遺伝的活性を制御する方法は、既に本明細書中に詳細に記載されている。

#### 【0082】

##### ステップc)

いくつかの実施形態において、ステップa)（本明細書中に記載される形質転換を包含してもよい）および任意選択のステップb)の後にステップc)が続き、これは、前記形質転換微生物宿主が自己複製性染色体外分子を維持するための所与のレベルまで第一の核酸配列を発現することを可能にする条件下で前記形質転換微生物宿主を培養することで増

殖中の微生物集団とすることを含む。いくつかの実施形態において、任意選択で前記目的産物をコードする第二の配列を制御すること。

【0083】

いくつかの実施形態の方法において、ステップc)の少なくとも一部の条件は、第一の核酸配列が前記遺伝的活性を呈さないようなものである。「ステップc)の一部」は、例えば、ステップc)の持続時間のうちの少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%もしくは90%または100%までを意味する。方法のこの実施形態は、第一の核酸配列の遺伝的活性の存在なくしてステップc)の一部が実施されることから、相当に魅力的である。前記遺伝的活性の存在は、微生物宿主細胞にとってエネルギー的な負担となり、目的産物の好適な産生レベルを保つために必ずしも必要ではない。いくつかの実施形態において、第一の核酸配列の遺伝的活性を伴わないステップc)の部分があり、その後前記活性を伴う部分があることが想定される。これらの2つの部分は、ステップc)の間に1または複数回、繰り返され得る。

10

【0084】

微生物細胞は、任意の好適な微生物培養環境中で培養され得る。微生物培養環境は、多種多様な培養培地、例えば原料を含むことができる。具体的な培養培地の選択は、所望の用途に依存し得る。培養培地の条件としては、化学的組成だけでなく、温度、光量、pH、CO<sub>2</sub>レベルなども挙げられる。培養培地は、バクテリオシンを含むことができる。ある実施形態において、バクテリオシンの活性を誘導する化合物は、原料の中ではなく原料の外部に存在する。

20

【0085】

ある実施形態において、本明細書中に記載される遺伝子改変または形質転換微生物(microorganism)は、少なくとも1つの原料を含む培養培地に添加される。ある実施形態において、培養培地は、免疫調節因子の活性または発現を誘導する化合物を含む。

【0086】

用語「原料」は、本開示を考慮して当業者により理解されるような慣例的かつ普通の意味を持ち、例えば工業プロセスとの関連で、微生物(microbial organism)により消費され、発酵され、精製され、改変され、あるいは処理され得る材料を包含する。かくして、「原料」は食品または食品製品に限定されない。本明細書中で用いられるとき、「原料」は、培養培地のカテゴリーである。したがって、本明細書中で用いられるとき、「培養培地」は、限定されるものではないが原料を包含する。かくして、本明細書中で「培養培地」に言及されるとき、常に原料もまた明確に考えられる。

30

【0087】

形質転換微生物細胞を培養する前に、効果を決定すること、またはもしあるならば、前記自己複製性染色体外核酸分子を受け取った宿主が生存することおよび任意選択で増殖することを可能にする条件を最適化することが有用であり得る。

【0088】

いくつかの実施形態において、その遺伝的活性が微生物宿主に利点を付与する第一の核酸配列を含み、ここで前記第一の核酸配列の遺伝的活性は制御され、および目的産物の生産に直接的または間接的に関与する第二の核酸配列を含んでもよい、自己複製性染色体外核酸分子を含む微生物細胞または微生物宿主または微生物宿主細胞または合成の微生物宿主細胞が提供される。

40

【0089】

いくつかの実施形態において、その遺伝的活性が微生物宿主に利点を付与する第一の核酸配列を含み、ここで前記第一の核酸配列の遺伝的活性は制御され、および目的産物の生産に直接的または間接的に関与する第二の核酸配列を含んでもよい、自己複製性染色体外核酸分子が提供される。

【0090】

この微生物宿主およびこの自己複製性染色体外核酸分子の各特徴は、本明細書中に既に

50

記載されている。

【0091】

#### 一般的記述

本明細書中で用いられる用語は、本開示を考慮して読んだときに当業者により理解される慣例的かつ普通の意味を持ち、次の一般的記述を包含することができる。

【0092】

微生物 (microorganism)

本明細書中で用いられるとき、「微生物 (microbial organism)」、「微生物 (microorganism)」、「微生物細胞」または「微生物宿主」およびこれらの語根のバリエーション (例えば複数化など) は、本開示を考慮して当業者により理解されるような慣例的かつ普通の意味を持ち、任意の天然起源の種または合成もしくは完全合成の原核生物もしくは真核生物の単細胞生物、同様に古代種 (Archae species) を包含する。それゆえに、この表現は、細菌種、真菌種および藻類の細胞を指すことができる。本明細書中の実施形態に従って用いることができる例示的な微生物 (microorganism) としては、限定されるものではないが、細菌、酵母、糸状菌および藻類、例えば光合成性微細藻類が挙げられる。さらには、完全合成の微生物 (microorganism) ゲノムを合成して単一の微生物細胞内に移植することで、連続的な自己複製能力がある合成の微生物 (microorganism) を生産することができる (Gibson et al. (2010), "Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome," Science 329:52-56 を参照されたい、この文献はその全体が参照により本明細書中に組み込まれる)。かくして、いくつかの実施形態において、微生物 (microorganism) は完全合成である。遺伝子発現を調節するエレメントおよび遺伝子産物をコードするエレメント (例えば免疫調節因子、毒素、解毒物質および産業上有用な分子であり、目的産物とも呼ばれる) といった遺伝的エレメントの所望の組み合わせは、所望のシャシーに載せて、部分的または完全合成の微生物 (microorganism) 内にアセンブルすることができる。産業用途のための遺伝子改変された微生物 (microbial organism) の記述は、Wright, et al. (2013) "Building in biosafety for synthetic biology" Microbiology 159:1221-1235 中にも見出すことができる。遺伝的エレメントの好適な実施形態は、本明細書中で後に記載される。

【0093】

様々な細菌の種および株を本明細書中の実施形態に従って用いることができ、遺伝子改変バリエーションまたは公知の種の「シャシー」をベースとした合成細菌を提供することができる。本明細書中の実施形態に従って用いることができる、産業上利用可能な特質を有する例示的な細菌としては、限定されるものではないが、バチルス属種 (例えばバチルス・コアグランス、バチルス・サチリスおよびバチルス・リケニホルミス)、バエニバチルス属種、ストレプトマイセス属種、ミクロコッカス属種、コリネバクテリウム属種 (Corynebacterium species)、アセトバクター属種 (Acetobacter species)、ラン藻の種、サルモネラ属種、ロドコッカス属種 (Rhodococcus species)、シュードモナス属種、ラクトバチルス属種、エンテロコッカス属種、アルカリゲネス属種 (Alcaligenes species)、クレブシエラ属種、バエニバチルス属種、アルスロバクター属種 (Arthrobacter species)、コリネバクテリウム属種、ブレヴィバクテリウム属種、サーマス・アクアティカス (Thermus aquaticus)、シュードモナス・スタツェリ (Pseudomonas stutzeri)、クロストリジウム・サーモセルス (Clostridium thermocellus) およびエシェリキア・コリが挙げられる。

【0094】



様々な酵母の種および株を本明細書中の実施形態に従って用いることができ、遺伝子改変バリエーションまたは公知の種の「シャシー」をベースとした合成酵母を提供することができる。本明細書中の実施形態に従って用いることができる、産業上利用可能な特質を有する例示的な酵母としては、限定されるものではないが、サッカロマイセス属種 (*Saccharomyces species*) (例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロマイセス・バヤヌス (*Saccharomyces bayanus*)、サッカロマイセス・ブラウディ (*Saccharomyces boulardii*)、カンジダ属種 (*Candida species*) (例えば、カンジダ・ウティリス (*Candida utilis*)、カンジダ・クルセイ (*Candida krusei*)、シゾサッカロマイセス属種 (*Schizosaccharomyces species*) (例えばシゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、シゾサッカロマイセス・ジャポニカス (*Schizosaccharomyces japonicas*)、ピキア属種 (*Pichia species*) またはハンゼヌラ属種 (*Hansenula species*) (例えば、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) またはハンゼヌラ・ポリモルフ (*Hansenula polymorphd*)、およびブレタノマイセス属種 (*Brettanomyces species*) (例えば、ブレタノマイセス・クラウゼニ (*Brettanomyces claussonii*)) が挙げられる。

10

20

【0095】

様々な藻類の種および株を本明細書中の実施形態に従って用いることができ、遺伝子改変バリエーションまたは公知の種の「シャシー」をベースとした合成藻類を提供することができる。いくつかの実施形態において、藻類は、光合成微細藻類を含む、これらから本質的になる、またはこれらからなる。バイオ燃料のために有用であることができ、本明細書中の実施形態に従って用いることができる例示的な藻類としては、ボトリオコッカス・ブラウニー (*Botryococcus braunii*)、クロレラ属種 (*Chlorella species*)、ドナリエラ・テルチオレクタ (*Dunaliella tertiolecta*)、グラシラリア属種 (*Gracilaria species*)、プレウロクリシス・カルテラエ (*Pleurochrysis carterae*)、およびサルガッサム属種 (*Sargassum species*) が挙げられる。加えて、多くの藻類が、食品製品、肥料製品、廃棄物の中和、環境浄化、および炭水化物の製造 (例えば、バイオ燃料) のために有用であることができる。

30

40

50

【0096】

様々な糸状菌の種および株を本明細書中の実施形態に従って用いることができ、遺伝子改変バリエーションまたは公知の種の「シャシー」をベースとした合成糸状菌を提供することができる。本明細書中の実施形態に従って用いることができる、産業上利用可能な特質を有する例示的な糸状菌としては、限定されるものではないが、アクレモニウム (*Acremonium*)、アガリクス (*Agaricus*)、アルテルナリア (*Alternaria*)、アスペルギルス (*Aspergillus*)、アウレオバシジウム (*Aureobasidium*)、ボトリオスパエリア (*Botryosphaeria*)、セリポリオプシス (*Ceriporiopsis*)、ケトミジウム (*Chaetomidium*)、クリソスポリウム (*Chrysosporium*)、クラビセプス (*Claviceps*)、コクリオボルス (*Cochliobolus*)、コプリノプシス (*Coprinosporium*)、コプトテルメス (*Coptotermes*)、コリナスカス (*Corynascus*)、クリフォネクトリア (*Cryphonectria*)、クリプトコックス (*Cryptococcus*)、ジプロディア (*Diplodia*)、エクシジア (*Exidia*)、フィリバシジウム (*Filibasidium*)、フザリウム (*Fusarium*)、ジベレラ (*Gibberella*)、ホロマスチゴトイデス (*Holomastigotooides*)、フミコラ (*Humicola*)、イルペクス (*Irpex*)、レンチヌラ (*Lentinula*)、レプトスパエリア (*Leptosphaeria*)、マゲ

ナボルテ (*Magnaporthe*)、メラノカルプス (*Melanocarpus*)、メリピルス (メリピルス)、ムコール (*Mucor*)、ミセリオフトラ (*Myceliophthora*)、ネオカフィマスティクス (*Neocaffimastix*)、ニューロスポラ (*Neurospora*)、ペキロマイセス (*Paecilomyces*)、ペニシフィウム (*Penicillium*)、ファネロカエテ (*Phanerochaete*)、ピロミセス (*Piromyces*)、ポイトラシア (*Poitrasia*)、シュードプレクタニア (*Pseudoplectania*)、シュードトリコニンファ (*Pseudotrichonympha*)、リゾムコール (*Rhizomucor*)、シゾフィラム (*Schizophyllum*)、スキタリジウム (*Scytalidium*)、タラロマイセス (*Talaromyces*)、サーモアスカス (*Thermoascus*)、チエラビア (*Thielavia*)、トリボクラジウム (*Tolypocladium*)、トリコデルマ (*Trichoderma*)、トリコファエア (*Trichophaea*)、ベルチシリウム (*Verticillium*)、ボルバリエラ (*Volvariella*) またはキシラリア (*Xylaria*) が挙げられる。

【0097】

種としては、アクレモニウム・セルロリティカス (*Acremonium cellulyticus*)、アスペルギルス・アクレアタス (*Aspergillus aculeatus*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・フォエチダス (*Aspergillus foetidus*)、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・ジャポニカス (*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、クリソスポリウム・イノプス (*Chrysosporium inops*)、クリソスポリウム・ケラチノフィラム (*Chrysosporium keratinophilum*)、クリソスポリウム・ラクノウェンス (*Chrysosporium lucknowense*)、クリソスポリウム・メルダリウム (*Chrysosporium merdarium*)、クリソスポリウム・パニコラ (*Chrysosporium pannicola*)、クリソスポリウム・クイーンズランドイカム (*Chrysosporium queenslandicum*)、クリソスポリウム・トロピカム (*Chrysosporium tropicum*)、クリソスポリウム・ゾナ・ターン (*Chrysosporium zona turn*)、フザリウム・バクトリジオイデス (*Fusarium bactridioides*)、フザリウム・セラリス (*Fusarium cerealis*)、フザリウム・クルークウェレンス (*Fusarium crookwellense*)、フザリウム・クルモラム (*Fusarium culmorum*)、フザリウム・グラミネアルム (*Fusarium graminearum*)、フザリウム・グラミンム (*Fusarium graminum*)、フザリウム・ヘテロスポラム (*Fusarium heterosporum*)、フザリウム・ネグンジ (*Fusarium negundi*)、フザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、フザリウム・レチクラタム (*Fusarium reticulatum*)、フザリウム・ロセウム (*Fusarium roseum*)、フザリウム・サムブシナム (*Fusarium sambucinum*)、フザリウム・サルコクロウム (*Fusarium sarcocroum*)、フザリウム・スポロトリキオイデス (*Fusarium sporotrichioides*)、フザリウム・サルフレウム (*Fusarium sulphureum*)、フザリウム・トルロサム (*Fusarium torulosum*)、フザリウム・トリコテシオイデス (*Fusarium trichothecioides*)、フザリウム・ベネナトルン (*Fusarium venenaturn*)、フミコラ・グリセア (*Humicola grisea*)、フミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、フミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*)、イルベクス・ラク

10

20

30

40

50

テウス (*Irpex lacteus*)、ムコール・ミエヘイ (*Mucor miehei*)、ミセリオフトラ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*)、ニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*)、ペニシリウム・フニコロスム (*Penicillium funiculosum*)、ペニシリウム・プロプロゲナム (*Penicillium purpurogenum*)、ファネロカエテ・クリソスポリウム (*Phanerochaete chrysosporium*)、チエラビア・アクロマチカ (*Thielavia achromatica*)、チエラビア・アルボミセス (*Thielavia albomyces*)、チエラビア・アルボピロサ (*Thielavia albopilosa*)、チエラビア・オウストラレインシス (*Thielavia australeinsis*)、チエラビア・フィメチ (*Thielavia fimeti*)、チエラビア・ミクロスポラ (*Thielavia microspora*)、チエラビア・オビスボラ (*Thielavia ovispora*)、チエラビア・ペルビアナ (*Thielavia peruviana*)、チエラビア・セトサ (*Thielavia setosa*)、チエラビア・スペデドニウム (*Thielavia spededonium*)、チエラビア・サブサーモフィラ (*Thielavia subthermophila*)、チエラビア・テレストリス (*Thielavia terrestris*)、トリコデルマ・ハルジアヌム (*Trichoderma harzianum*)、トリコデルマ・コニング (*Trichoderma koningii*)、トリコデルマ・ロンギブラキアタム (*Trichoderma longibrachiatum*)、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) またはトリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) が挙げられる。

#### 【0098】

##### 抗生物質

「抗生物質」およびこの語根のバリエーションは、本開示を考慮して当業者により理解されるような慣例的かつ普通の意味を持ち、少なくとも1つの微生物細胞を殺傷するまたは増殖を停止させることができる代謝物または代謝経路の中間体を包含する。いくつかの抗生物質は、微生物細胞、例えば細菌に生産させることができる。いくつかの抗生物質は、化学的に合成することができる。少なくとも、バクテリオシンは遺伝子産物（いくつかの実施形態においては、付加的な翻訳後プロセッシングを受けたもの）またはその合成アナログを指し、抗生物質は代謝経路の中間体もしくは産物またはそれらの合成アナログを指す点で、バクテリオシンは抗生物質と別個のものと理解される。

#### 【0099】

##### 配列同一性および類似性

配列同一性は、本開示を考慮して当業者により理解されるような慣例的かつ普通の意味を持ち、配列を比較することにより決定される、2つ以上のアミノ酸（ポリペプチドまたはタンパク質）配列または2つ以上の核酸（ポリヌクレオチド）配列間の関係を包含する。通常、配列同一性または類似性は、比較される配列の全長にわたって比較される。当該技術分野において、「同一性」も、場合によってはかかる配列のストランド間のマッチにより決定される、アミノ酸または核酸配列間の配列の関連性の程度に言及することができる。2つのアミノ酸配列間の「類似性」は、1つのポリペプチドのアミノ酸配列およびその保存的アミノ酸置換を第二のポリペプチドの配列と比較することにより決定することができる。「同一性」および「類似性」は、当業者に公知の様々な方法により容易に計算することができる。いくつかの実施形態において、配列同一性は、本明細書中で同定される配列の全長を比較することにより決定される。

#### 【0100】

同一性を決定するためのいくつかの方法は、試験される配列間の最大マッチを与えるように設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公的に入手可能なコンピュータプログラム中に成文化される。2つの配列間の同一性および類似性を決定するためのコンピュータプログラム方法としては、例として、NCBIおよび他の供給源から

公的に入手可能な *BestFit*、*BLASTP*、*BLASTN* および *FASTA* (*Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990)) が挙げられる (*BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD* 20894)。用いられるアルゴリズムは、*EMBOSS* (ワールドワイドウェブ上、[www.ebi.ac.uk/emboss/align](http://www.ebi.ac.uk/emboss/align)においてアクセス可能) であることができる。*EMBOSS* を用いたアミノ酸配列比較のためのパラメーターとしては、ギャップ開始 10.0、ギャップ伸長 0.5、*Blosum 62* 行列を挙げることができる。*EMBOSS* を用いた核酸配列比較のためのパラメーターとしては、ギャップ開始 10.0、ギャップ伸長 0.5、DNA 完全行列 (DNA 同一性行列) を挙げることができる。

10

#### 【0101】

任意選択で、アミノ酸類似性の程度の決定において、当業者は、いわゆる「保存的」アミノ酸置換を考慮に入れることもあり得て、これは当業者に明らかである。保存的アミノ酸置換とは、類似の側鎖を持つ残基の交換可能性を指す。例えば、脂肪族側鎖を持つアミノ酸のグループはグリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンであり；脂肪族ヒドロキシル側鎖を持つアミノ酸のグループはセリンおよびスレオニンであり；アミド含有側鎖を持つアミノ酸のグループはアスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族側鎖を持つアミノ酸のグループはフェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンであり；塩基性側鎖を持つアミノ酸のグループはリジン、アルギニンおよびヒスチジンであり；硫黄含有側鎖を持つアミノ酸のグループはシステインおよびメチオニンである。好適な保存的アミノ酸置換グループとしては、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、およびアスパラギン - グルタミンが挙げられる。本明細書中に開示されるアミノ酸配列の置換的バリエーションは、開示される配列中の少なくとも1つの残基が取り除かれ、異なる残基がその場所に挿入されているものである。いくつかの実施形態において、アミノ酸の変化は保存的である。天然起源アミノ酸の各々に適した保存的置換としては、Ala から ser；Arg から lys；Asn から gln または his；Asp から glu；Cys から ser または ala；Gln から asn；Glu から asp；Gly から pro；His から asn または gln；Ile から leu または val；Leu から ile または val；Lys から arg；gln または glu；Met から leu または ile；Phe から met、leu または tyr；Ser から thr；Thr から ser；Trp から tyr；Tyr から trp または phe；および Val から ile または leu が挙げられる。

20

30

#### 【0102】

同種 (homologous) または相同 (homologous)

用語「同種 (homologous)」は、本開示を考慮して当業者により理解されるような慣例的かつ普通の意味を持ち、所与の (組換え) 核酸またはポリペプチド分子および所与の宿主生物または宿主細胞間の関係を指し示すために用いられる場合を包含して、天然において核酸またはポリペプチド分子が同じ種の、任意選択で同じ品種または株である宿主細胞または生物により産生されることを意味するものと理解することができる。宿主細胞と同種であるならば、ポリペプチドをコードする核酸配列は、典型的には、その天然の環境中よりも別のプロモーター配列に作動可能に連結される。2つの核酸配列の関連性を指し示すために用いられる場合、用語「相同 (homologous)」は、本開示を考慮して当業者により理解されるような慣例的かつ普通の意味を持ち、相補的な一本鎖核酸配列にハイブリダイズし得る1つの一本鎖核酸配列を指すことができる。ハイブリダイゼーションの程度は、先に提示したように、配列間の同一性の量ならびにハイブリダイゼーション条件、例えば温度および塩濃度などといったいくつかの要因に依存し得る。同一性の領域は約 5 bp より大きいものであることができ、同一性の領域は 10 bp より大きいものであることができる。いくつかの実施形態において、2つの核酸またはポリペプチド配列は、80% 超の同一性を持つ場合に相同であると言われる。

40

#### 【0103】

50

## 異種

用語「異種」は、本開示を考慮して当業者により理解されるような慣例的かつ普通の意味を持ち、核酸（DNAまたはRNA）またはタンパク質に関して用いられた場合を包含して、それが存在する生物、細胞、ゲノムもしくはDNAもしくはRNA配列の一部として天然にはない、または天然においてそれが見出されるものとは異なる細胞もしくはゲノムもしくはDNAもしくはRNA配列中の位置（複数可）において見出される核酸またはタンパク質（ポリペプチドまたは酵素とも称される）を指すことができる。異種の核酸またはタンパク質は、それが導入される細胞にとって内因性ではないが、別の細胞から得られており、または合成的もしくは組換え的に生産されている。一般に、必然的ではないが、かかる核酸は、DNAが転写または発現した細胞により普通は生産されないタンパク質をコードする。同様に、外因性RNAは、外因性RNAが存在する細胞において普通は発現しないタンパク質をコードする。異種の核酸およびタンパク質はまた、外来核酸またはタンパク質とも呼ばれ得る。それが発現する細胞にとって異種または外来であると当業者が認識する任意の核酸またはタンパク質は、異種の核酸またはタンパク質という用語により本明細書中に包含される。異種という用語はまた、核酸またはアミノ酸配列の非天然の組み合わせ、すなわち組み合わせ配列の少なくとも2つが互いにとって外来である組み合わせにも当てはまる。

10

### 【0104】

作動可能に連結される

本明細書中で用いられるとき、用語「作動可能に連結される」は、本開示を考慮して当業者により理解されるような慣例的かつ普通の意味を持ち、機能的関係にあるポリヌクレオチドエレメント（またはコーディング配列または核酸配列または核酸分子）の連結を指すことができる。核酸配列は、別の核酸配列と機能的関係になるように置かれたとき、「作動可能に連結される」。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、コーディング配列の転写に影響を与えるならば、コーディング配列に作動可能に連結される。作動可能に連結されるとは、連結される核酸配列が典型的には近接することを意味し、2つのタンパク質のコーディング領域をつなぐことが必要な場合は、近接してリーディングフレームに入ることを意味する。

20

### 【0105】

プロモーター

本明細書中で用いられるとき、用語「プロモーター」は、本開示を考慮して当業者により理解されるような慣例的かつ普通の意味を持ち、1または複数の核酸分子の転写を制御するように機能する、核酸分子の転写開始部位の転写方向に関して上流に位置する核酸断片を指すことができ、DNA依存的RNAポリメラーゼの結合部位、転写開始部位、ならびに限定されるものではないが転写因子結合部位、リプレッサーおよびアクティベータータンパク質結合部位といった任意の他のDNA配列、並びにプロモーターからの転写の量を調節/制御するように直接的または間接的に作用することが当業者に公知である任意の他のヌクレオチド配列の存在により構造的に同定される。「構成的」プロモーターは、大半の環境および発生条件下で活性があるプロモーターである。「誘導性」プロモーターは、環境および発生的な調節の下で活性があるプロモーターである。

30

40

### 【0106】

本書類およびその特許請求の範囲において、動詞「含むこと」およびその活用形は、限定されない意味で、その言葉に続く項目が包含されるが、具体的に言及されない項目が除外されないことを意味するように用いられる。加えて、動詞「なること」は、「から本質的になること」により置き換えられ得て、本明細書中で定義される自己複製性染色体核酸分子、微生物宿主（または方法）が具体的に同定されたものよりも付加的な構成成分（複数可）（または付加的なステップ）を含み得て、前記付加的な構成成分（複数可）（または付加的なステップ）は本発明の固有の性質を変えないことを意味する。加えて、不定冠詞「a」または「an」によるエレメントへの言及は、エレメントがただ1つであることを文脈が明確に必要としないかぎり、エレメントが1つより多く存在する可能性を除外

50

しない。それゆえに、不定冠詞「a」または「an」は、通常「少なくとも1つ」を意味する。

【0107】

本明細書中で引用される全ての特許および参考文献は、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる。次の例は、説明の目的のみのために提示され、本発明の範囲を限定することを全く意図しない。

【0108】

配列表（特に指示がない限りDNA）

配列番号1 エンテロコッカス・フェカリス ペプチド

配列番号2 バクテリオシンのモチーフ特質

配列番号3 ハイブリッドバクテリオシン、Ent35-MccV

配列番号4～698、720～759：表1～3中の配列（表中に指し示されるように、半分はDNA／半分はタンパク質）

配列番号699 McbG

配列番号700 MccE

配列番号701 MccEのC末端部分

配列番号702 pSyn2-McbG

配列番号703 pSyn2-McbE/F

配列番号704 pMcbG1.0

配列番号705 pMcbG.1.1.

配列番号706 MccEのC末端部分（アミノ酸）

配列番号707 P24プロモーター

配列番号708 proCプロモーター

配列番号709 Cvi

配列番号710 proC-McbG-CterMccE（proc）（CterはC末端により置き換えることができる）

配列番号711 proC-Cvi-Cter-MccE（proc）（CterはC末端により置き換えることができる）

配列番号712 pBACT5.0

配列番号713 pBACT2.0

配列番号714 pBACT5.0-mcherry

配列番号715 McbG-MccE

配列番号716 McbG-Cter部分MccE（CterはC末端により置き換えることができる）

配列番号717 Cvi-MccE

配列番号718 Cvi-Cter部分MccE（CterはC末端により置き換えることができる）

配列番号719：ベクターpUC-ColV

図の説明

図1：構成：pSyn2-McbE/F：Ptacの下に遺伝子McbEおよびFを含有する。

【0109】

図2：構成：pSyn2-McbG：Ptacの下に遺伝子McbGを含有する。

【0110】

図3：構成：pMcbG 1.1：P24の下に遺伝子McbGを含有する。

【0111】

図4：構成：pMcbG 1.0：P24 LacOの下に遺伝子McbGを含有する。

【0112】

図5：pBACT5.0ベクター

図6：pBACT2.0ベクター

10

20

30

40

50

図 7 : p B A C T 5 . 0 - m c h e r r y ベクター

図 8 : プロモーターの調整。インダクターの非存在下では ( 上部 ) 、リプレッサーはオペレーターと結合して選択遺伝子の発現を妨げることができる。インダクターの存在下では ( 下部 ) 、リプレッサーはオペレーターと結合することができず、選択遺伝子の発現が可能になる。

【 0 1 1 3 】

図 9 : K a n R ( p K a n - p L a c ) を有し、ミクロシン C 7 および C o l V ( p B A C T 6 . 0 - p L a c ) に対する 2 つの免疫性を有する E . コリにおけるタンパク質 X の過剰発現の比較。5 m g の総抽出物を S D S - P A G E 中で分析した。

【 0 1 1 4 】

図 10 : K a n R ( p K a n - T 7 p r o m ) を有し、ミクロシン C 7 および C o l V ( p B A C T 5 . 0 - T 7 p r o m ) に対する 2 つの免疫性を有する E . コリにおけるイオタ - カラギナーゼタンパク質の過剰発現の比較。5 m g の総抽出物を S D S - P A G E 中で分析した。

【 0 1 1 5 】

図 11 : K a n R ( p K a n - T 7 p r o m ) を有し、ミクロシン C 7 および C o l V ( p B A C T 5 . 0 - T 7 p r o m ) に対する 2 つの免疫性を有する E . コリにおけるラムダ - カラギナーゼタンパク質の過剰発現の比較。5 m g の総抽出物を S D S - P A G E 中で分析した。

【 実施例 】

【 0 1 1 6 】

実施例 1 : 選択剤としてのバクテリオシン B 1 7 および C 7 の使用剤

1 . バクテリオシン B 1 7 、C 7 および C o l V の生産

使用した株 : C 6 0 0 : F <sup>-</sup> t o n A 2 1 t h i - 1 t h r - 1 l e u B 6 l a c Y 1 g l n V 4 4 r f b C 1 f h u A 1  
Appleyard Genetics 39 ( 1954 ) , 440 - 452 中に記載されている。

【 0 1 1 7 】

M i c B 1 7 の生産のために使用したベクターは下の表中に記載される。

【 0 1 1 8 】

表 X : M i c B 1 7 の生産のために使用したベクター

使用したコンストラクト p C I D 9 0 9

m c c B 1 7 産生遺伝子 ( m c b A B C D E F G ) を含有する p A C Y C 1 8 4 、クロラムフェニコール抵抗性

これらのコンストラクトは、Rodriguez - Sainz , M . C . , C . e t a l . 1990 . Mol . Microbiol . 4 : 1921 - 1932 中に詳細に記載されたものである。

【 0 1 1 9 】

M i c C 7 を生産するために使用したベクターは、P p 7 0 である。このベクターは p B R 3 2 2 ベースであり、m c c 遺伝子クラスターを有する約 6 0 0 0 b p の DNA 断片を保有する ( Zukher I e t a l , N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h , 2014 , Vol . 42 , No . 19 11891 - 11902 中に記載される ) 。

【 0 1 2 0 】

C o l V を生産するために使用したベクターは、p U C - C o l V ( 配列番号 7 1 9 ) である。このベクターは p U C 5 7 ベースであり、C o l V 遺伝子クラスターを有する約 5 0 0 0 b p の DNA 断片を保有する。

【 0 1 2 1 】

これらの組換えベクターを宿した株を、L B 培地中、37 で増殖させた。一晚培養後、発酵培地を遠心分離し、上清を 0 . 2 ミクロンのフィルターでろ過した ( f l i t r

10

20

30

40

50

e d)。

#### 【0122】

上清中に存在するバクテリオシン活性を、感受性株を含有するプレート上の拡散阻害増殖 (diffusion inhibition growth) のサイズにより推定した。

#### 【0123】

### 2. 結果

本発明者らは、B17、C7またはColV活性を呈する上清を、培養培地中に加えられる古典的抗生物質、例えばAmp、KanまたはChlなどとして用いることができることを実証した。かかるバクテリオシン活性を提示する上清を数ヶ月間（少なくとも12ヶ月間） - 20 で保存したが、活性の著しい減少は認められなかった。かかるバクテリオシン活性を有する培地を含有するペトリプレートに+4 で数週間（少なくとも4週間）保存した。本発明者らは、活性の減少を認めなかった。したがって、本発明者らは、培養培地中に存在するかかるB17、C7またはColV活性は安定であることを実証した。

10

#### 【0124】

### 3. 結論

実験室中での発酵により産生されるバクテリオシンB17、C7およびColVは、簡単に生産でき、使い易く、培養培地中で安定な選択剤である。これらの性質は、古典的な選択剤として用いられる抗生物質のものと同様である。

20

#### 【0125】

実施例2：C7およびB17に対する抵抗性の付与に必要とされる最小の遺伝的エレメントの同定

#### 1. 必要なベクターの構築

文献は、B17バクテリオシン：B17のための配列番号699により表されるMcbGおよびポンプ（B17のためのMcbEおよびMcbF、配列番号703により表される）の場合にも、それ自身のバクテリオシンの生産に対する宿主の生産のために必要なエレメントを決定することを可能にした。これらの遺伝子は、必要である（またはより正確には、バクテリオシンB17の作用に対する保護に関与する）ことが知られている。B17遺伝子座についての文献は、それがどれであるか、または抵抗性を与えるために十分なエレメントはどれであるかを同定していない。

30

#### 【0126】

本発明者らは、B17免疫性構造から遺伝子を分離し、これらをベクター中で、誘導性プロモーター（Ptac）の後ろにそれらをクローニングした。

#### 【0127】

構築物：pSyn2 - McbG（図2、配列番号702）：Ptacの下に遺伝子McbGを含有する

構築物：pSyn2 - McbE / F（図1、配列番号703）：Ptacの下に遺伝子McbEおよびFを含有する

本発明者らは、B17免疫性構造から遺伝子を分離し、それらをベクター中で、誘導性プロモーター（Ptac）の後ろにクローニングした。

40

#### 【0128】

本発明者らは、McbGの低発現（Ptacは誘導されない）は株に対する抵抗性の表現型を与えるために十分であること、他方、McbE / Fの存在は毒性であり、B17の存在に関係して提供される保護についての応答を与えさせなかったことを示した。

#### 【0129】

### 2. 結果

驚くべきことに、配列番号701により表されるMcbEのC末端部分は、バクテリオシンC7に対する抵抗性を付与するために十分であることが見出された。

#### 【0130】

50



本発明者らは、それぞれ B 1 7 および C 7 に対する抵抗性を与えるためにベクター中にクローニングした場合に M c b G および M c c E 遺伝子（または配列番号 7 0 1 により表されるトランケートの M c c E）のプラスミドからの発現が可能であること、ならびに、これらのタンパク質をこれらのミクロシン / バクテリオシンに感受性である株においてベクター選択マーカーとして用いることができることを実証した。使用したベクターは、p B A C T 2 . 0（図 6、配列番号 7 1 3）である。

【 0 1 3 1 】

配列番号 7 1 0 は、コンストラクト p r o C - M c b G - C t e r M c c E を表す。

【 0 1 3 2 】

本発明者らは、それぞれ C o l V および C 7 に対する抵抗性を与えるためにベクター中にクローニングした場合に C v i および M c c E 遺伝子の C 末端部分のプラスミドからの発現が可能であること、ならびに、これらのタンパク質をこれらのミクロシン / バクテリオシンに感受性である株においてベクター選択マーカーとして用いることができることを実証した。使用したベクターは、p B A C T 5 . 0（図 5、配列番号 7 1 2）である。

【 0 1 3 3 】

配列番号 7 1 1 は、コンストラクト p r o C - C v i - C t e r M c c E を表す。

【 0 1 3 4 】

### 3 . 結論

したがって、配列番号 7 0 1 により表される小さいサイズの単一セグメントを C 7 に対する選択マーカーとして用いることが可能である。

【 0 1 3 5 】

実施例 3 : 細菌からのエネルギーをほとんどまたは全く用いない選択可能マーカーを M c b G から作成することができるか？

#### 1 . 構築したベクター

この疑問に答えるため、M c b G 遺伝子を弱プロモーター P 2 4（配列番号 7 0 7）の下にクローニングした。P 2 4 プロモーターは、B r a a t s c h S e t a l , B i o t e c h n i q u e s . 2 0 0 8 S e p ; 4 5 ( 3 ) : 3 3 5 - 7 中に記載されたものである。

【 0 1 3 6 】

本発明者らは、B 1 7 M c b G 免疫性構造遺伝子を挿入し、後者をベクター中で弱い構成的プロモーター（P 2 4）の後ろにクローニングした。L a c I の存在下で抑制され、I P T G の存在下で活性がある誘導性プロモーターである P 2 4 L a c O ハイブリッドプロモーターを使用して、第二のコンストラクトを作成した。

【 0 1 3 7 】

構築物：P 2 4 L a c O の下に遺伝子 M c b G を含有する p M c b G 1 . 0（図 4、配列番号 7 0 4）

構築物：P 2 4 の下に遺伝子 M c b G を含有する p M c b G 1 . 1（図 3、配列番号 7 0 5）

使用した株は以下のものである：

B L 2 1 ( D E 3 ) : f h u A 2 [ l o n ] o m p T g a l ( D E 3 ) [ d c m ] h s d S

D E 3 = s B a m H I o E c o R I - B i n t : : ( l a c I : : P l a c U V 5 : : T 7 遺伝子 1 ) i 2 1 n i n 5

B L 2 1 ( D E 3 ) 株をベクター p M c b G 1 . 0 または p M c b G 1 . 1（図 3 または 4 を参照されたい）で形質転換した。形質転換後、形質転換体を、B 1 7 を含有するプレート上で選択した。単離コロニーを再度増殖させ、それらが含有したプラスミドを、適切な制限酵素での処理の後にゲル電気泳動により分析した。

【 0 1 3 8 】

### 2 . 結果

本発明者らは、M c b G の弱い転写は B 1 7 に対する抵抗性を与えるために十分である

ことを示した。加えて、本発明者らは、この選択マーカーは P 2 4 L a c O プロモーターを介して誘導可能であること、およびこの遺伝子を含むベクターは I P T G の存在下でのみ抵抗性の表現型を与えることを示している。

【 0 1 3 9 】

### 3 . 結 論

M c b G 遺伝子は、構成的または誘導的に選択可能なマーカーとして用いることが可能である。それゆえに、プロセス中の必要に応じた低レベルでの構成的発現および誘導性発現は、産生細胞からプラスミドを喪失することなく、産生細胞にとってのエネルギー的な負担を低減することを可能にすることが示される。

【 0 1 4 0 】

10

#### 実施例 4 : m - c h e r r y タンパク質の生産

配列番号 7 1 4 は、m - c h e r r y タンパク質を生産するために用いられるコンストラクトを表す。このコンストラクトは図 7 中に表現される。

【 0 1 4 1 】

m - c h e r r y タンパク質は産生され、I P T G の存在下、ペトリ皿上で赤色になる細菌コロニーとして可視化された。

【 0 1 4 2 】

#### 実施例 5 : プロモーターの調整

本発明者らは、調整可能な免疫性選択を有するベクターを調製した ( 図 8 を参照されたい ) 。プロモーターの調整は、選択を「オン」または「オフ」に切り替えることを可能にする。これは、初めて、例えば宿主による組換えプラスミドの喪失に応じて、選択圧を発酵プロセス中の必要性に適応させることを可能にする。これは、宿主にとってのエネルギーの負担を制限することにより利点を提供する。それゆえに、かかるベクターは工業的結果物 ( 組換え産物 ) を改良する。そのうえ、これらはどのような株においても使い易く ( 宿主ゲノム中の特別な特徴は必要とされない ) 、抗生物質を必要としない。

20

【 0 1 4 3 】

#### 実施例 6 : 抗生物質 ( カナマイシン ) 選択と免疫性選択との比較

本発明者らは、異なる組換えタンパク質に対して免疫性選択を適用した。

【 0 1 4 4 】

図 9 は、K a n R ( p K a n - p L a c ) を有し、ミクロシン C 7 および C o l V ( p B A C T 6 . 0 - p L a c ) に対する 2 つの免疫性を有する E . コリにおけるタンパク質 X の過剰発現の比較を示す。5 m g の総抽出物を S D S - P A G E 中で分析した。

30

【 0 1 4 5 】

図 1 0 は、K a n R ( p K a n - T 7 p r o m ) を有し、ミクロシン C 7 および C o l V ( p B A C T 5 . 0 - T 7 p r o m ) に対する 2 つの免疫性を有する E . コリにおけるイオタ - カラギナーゼタンパク質の過剰発現の比較を示す。5 m g の総抽出物を S D S - P A G E 中で分析した。使用したベクターは、p B A C T 5 . 0 ベクター ( 配列番号 7 1 2 ) をベースとする。

【 0 1 4 6 】

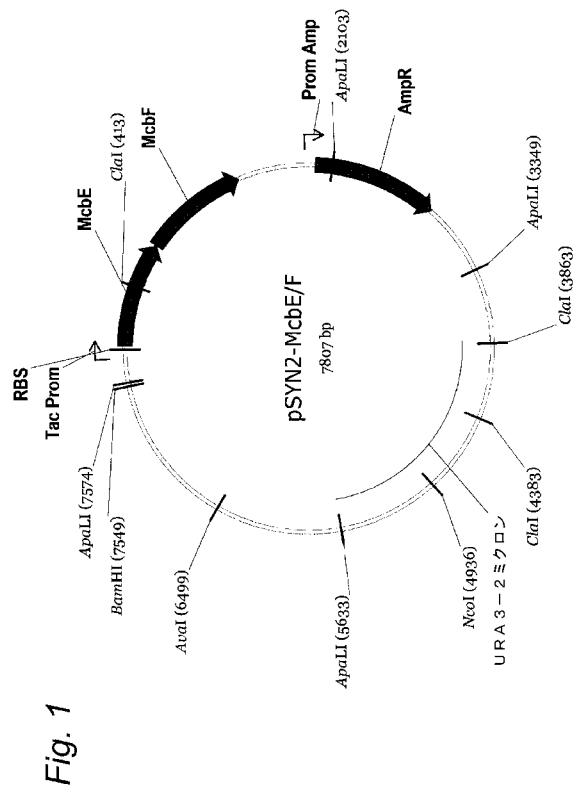
図 1 1 は、K a n R ( p K a n - T 7 p r o m ) を有し、ミクロシン C 7 および C o l V ( p B A C T 5 . 0 - T 7 p r o m ) に対する 2 つの免疫性を有する E . コリにおけるラムダ - カラギナーゼタンパク質の過剰発現の比較を示す。5 m g の総抽出物を S D S - P A G E 中で分析した。使用したベクターは、p B A C T 5 . 0 ベクター ( 配列番号 7 1 2 ) をベースとする。

40

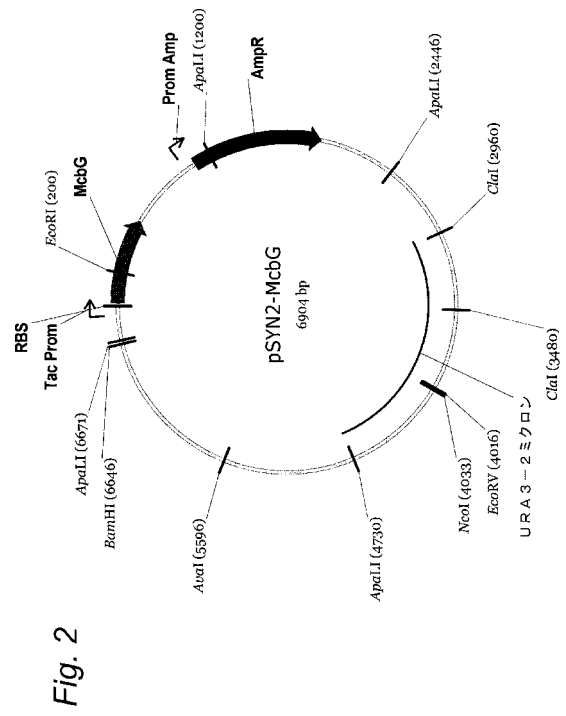
【 0 1 4 7 】

この例において用いられる弱い構成的 p r o C プロモーターは、宿主にとってのエネルギー的負担を低減することを可能にする。

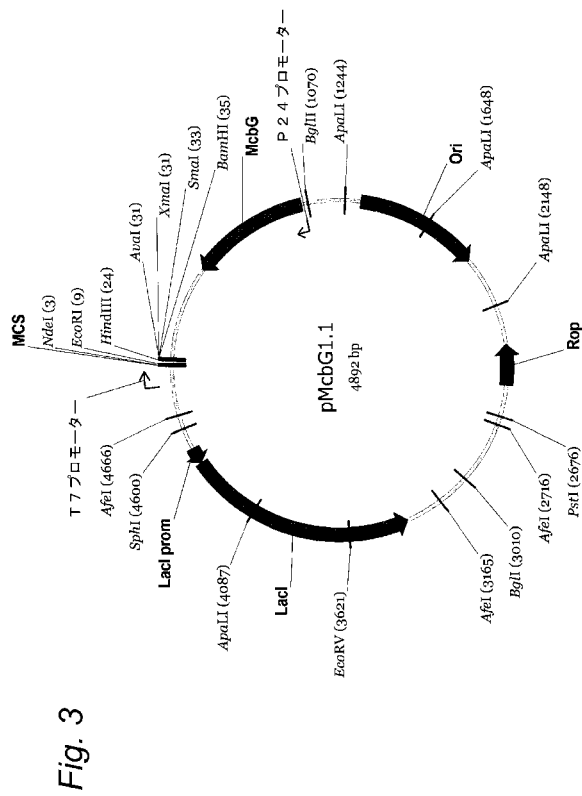
【 図 1 】



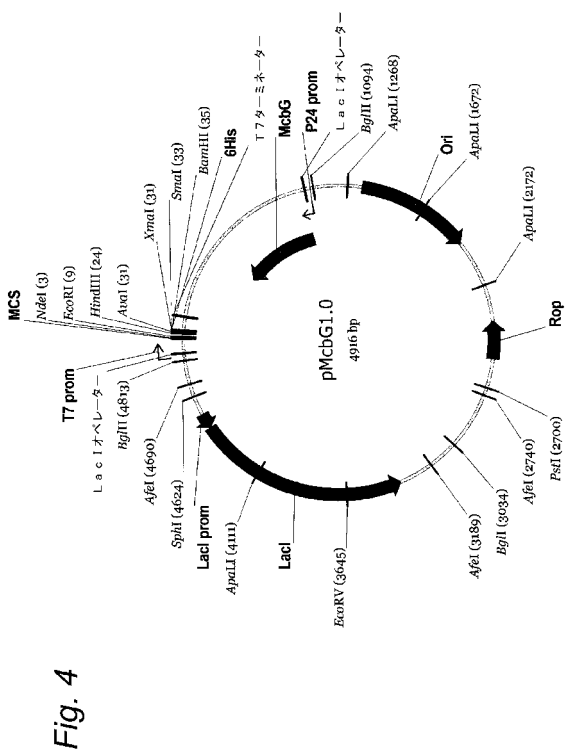
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】

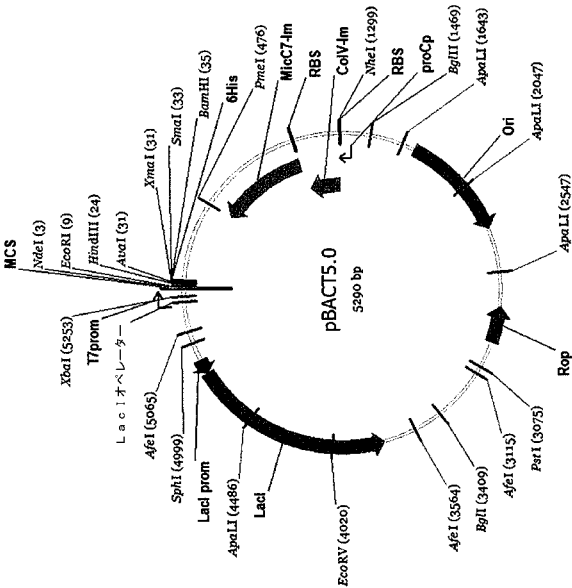


Fig. 5

【 図 6 】

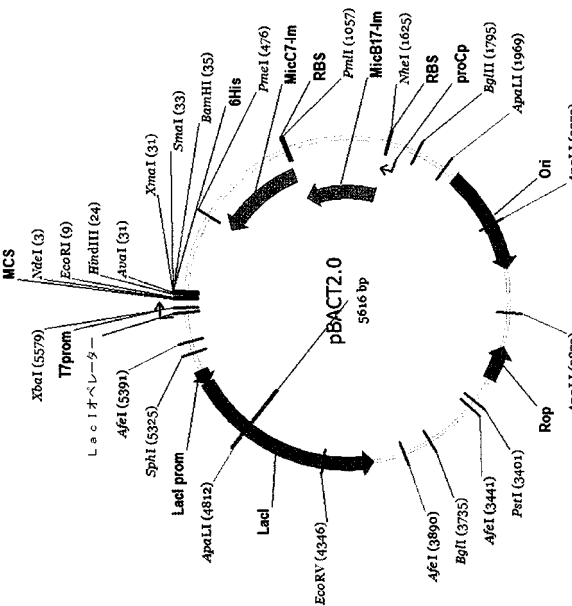


Fig. 6

【 図 7 】

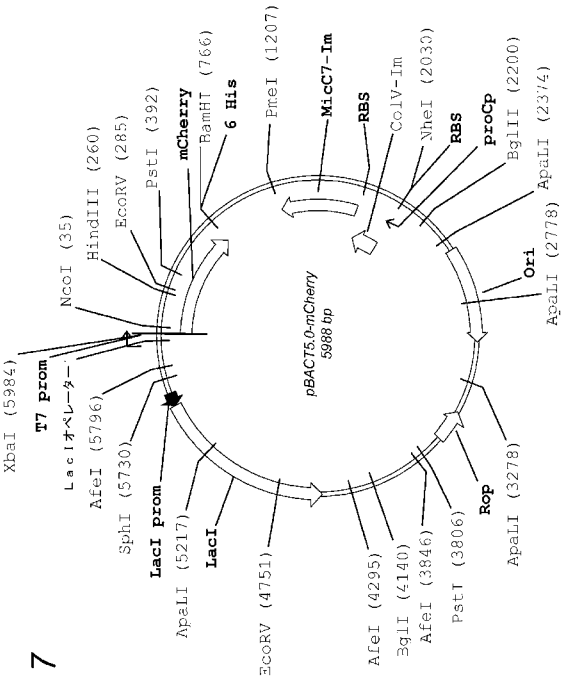


Fig. 7

【 図 8 】

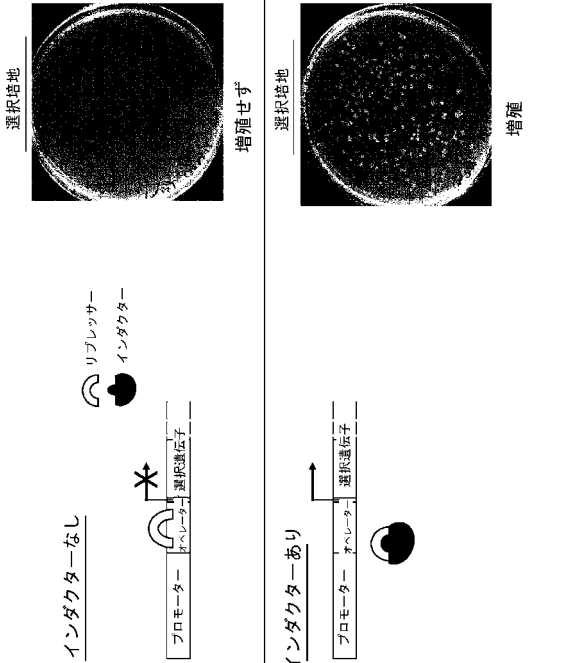


Fig. 8

【図 9】

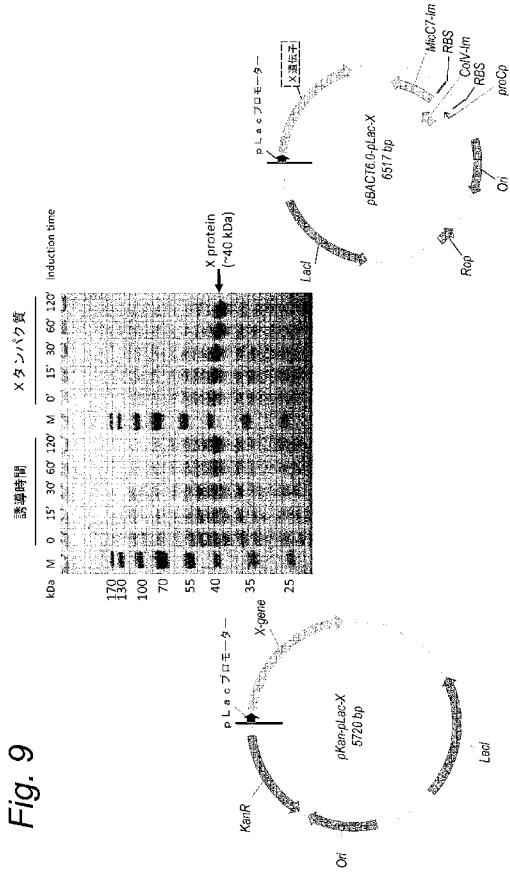


Fig. 9

【図 11】

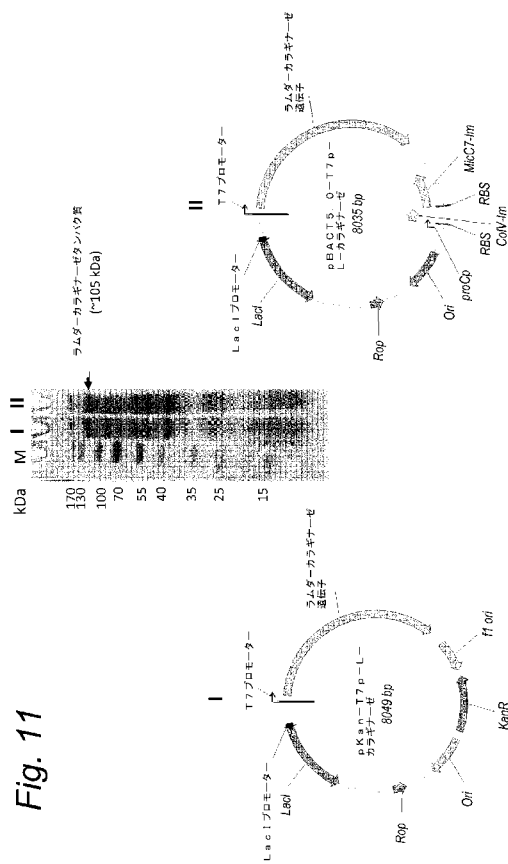


Fig. 11

【図 10】

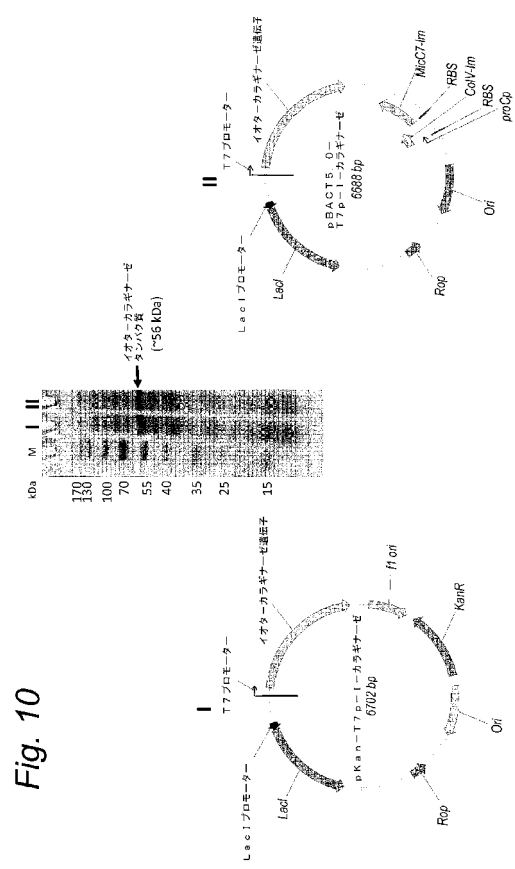


Fig. 10

【配列表】

2021506328000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2018/085941

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/245 C12N15/70  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K C12N

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

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

EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>G E Allison ET AL: "Functional analysis of the gene encoding immunity to lactacin F, lafI, and its use as a Lactobacillus-specific, food-grade genetic marker", Applied and Environmental Microbiology, 1 December 1996 (1996-12-01), pages 4450-4460, XP055467010, UNITED STATES Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://aem.asm.org/content/62/12/4450.full.pdf#page=1&amp;view=FiH">http://aem.asm.org/content/62/12/4450.full.pdf#page=1&amp;view=FiH</a> abstract page 4456, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 page 4459, left-hand column, paragraph 1 figure 3</p> <p>----- -/--</p>	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 March 2019

Date of mailing of the international search report

11/03/2019

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Sonnerat, Isabelle

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/085941

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	D. A. BREDE ET AL: "Identification of the Propionicin F Bacteriocin Immunity Gene (pcfI) and Development of a Food-Grade Cloning System for Propionibacterium freudenreichii", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 73, no. 23, 1 December 2007 (2007-12-01), pages 7542-7547, XP055467000, US ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.01023-07 abstract page 7544, left-hand column, paragraphs 3,4 page 7545, right-hand column page 7546, left-hand column, paragraph 2 -----	1-18
X	WO 2009/011940 A2 (UNIV MARYLAND [US]; GALEN JAMES E [US]; FANG CHEE-MUN [US]) 22 January 2009 (2009-01-22) abstract paragraphs [0080] - [0083] example 6 -----	1-18
X	C.-M. FANG ET AL: "Use of mchI Encoding Immunity to the Antimicrobial Peptide Microcin H47 as a Plasmid Selection Marker in Attenuated Bacterial Live Vectors", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 76, no. 10, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 4422-4430, XP055467029, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.00487-08 the whole document -----	1-18
X	TAKALA T. ET AL: "A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene nisI", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 59, no. 4-5, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 467-471, XP055018982, ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/s00253-002-1034-4 the whole document -----	1-18
A	SOPHIE DUQUESNE ET AL: "Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria", NATURAL PRODUCT REPORTS, vol. 24, no. 4, 1 January 2007 (2007-01-01), page 708, XP055467441, GB ISSN: 0265-0568, DOI: 10.1039/b516237h the whole document -----	1-18

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/085941

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009011940 A2	22-01-2009	US 2010112674 A1 WO 2009011940 A2	06-05-2010 22-01-2009
-----			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
**C 1 2 P 21/02 (2006.01)** C 1 2 P 21/02 C

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100129713  
 弁理士 重森 一輝  
 (74)代理人 100137213  
 弁理士 安藤 健司  
 (74)代理人 100143823  
 弁理士 市川 英彦  
 (74)代理人 100183519  
 弁理士 櫻田 芳恵  
 (74)代理人 100196483  
 弁理士 川崎 洋祐  
 (74)代理人 100203035  
 弁理士 五味渕 琢也  
 (74)代理人 100160749  
 弁理士 飯野 陽一  
 (74)代理人 100160255  
 弁理士 市川 祐輔  
 (74)代理人 100202267  
 弁理士 森山 正浩  
 (74)代理人 100182132  
 弁理士 河野 隆  
 (74)代理人 100146318  
 弁理士 岩瀬 吉和  
 (74)代理人 100127812  
 弁理士 城山 康文  
 (72)発明者 ガバン, フィリップ  
 ベルギー国、1 3 4 0・オティニー、アヴニユ・ドゥ・ボワ・クロード・1 3  
 (72)発明者 エル・バクリ, ムハンマド  
 ベルギー国、1 0 7 0・ブリュッセル、アヴニユ・ドクトゥール・ザメノフ・1 0 / 3 3  
 (72)発明者 ファン・メルデレン, ローレンス  
 ベルギー国、1 4 1 0・ワートルロー、リュ・ドゥ・ラ・スタシオン・2 4  
 Fターム(参考) 4B064 AG01 CA02 CA05 CA06 CA08 CA19 CC24  
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA83X AB01 BA02 CA24