

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号  
特表2025-510901  
(P2025-510901A)

(43)公表日 令和7年4月15日(2025.4.15)

|                   |                                                                                                                                                                  |         |       |             |                       |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------|-------------|-----------------------|
| (51)国際特許分類        |                                                                                                                                                                  | F I     |       | テーマコード (参考) |                       |
| C 1 2 N           | 15/11 (2006.01)                                                                                                                                                  | C 1 2 N | 15/11 | Z Z N A     | 4 B 0 6 4             |
| C 1 2 N           | 15/12 (2006.01)                                                                                                                                                  | C 1 2 N | 15/12 |             | 4 B 0 6 5             |
| C 1 2 N           | 15/52 (2006.01)                                                                                                                                                  | C 1 2 N | 15/52 | Z           |                       |
| C 1 2 N           | 1/21 (2006.01)                                                                                                                                                   | C 1 2 N | 1/21  |             |                       |
| C 1 2 P           | 21/02 (2006.01)                                                                                                                                                  | C 1 2 P | 21/02 | C           |                       |
|                   |                                                                                                                                                                  | 審査請求    | 未請求   | 予備審査請求      | 未請求 (全56頁) 最終頁に続く     |
| (21)出願番号          | 特願2024-557148(P2024-557148)                                                                                                                                      |         |       | (71)出願人     | 509240479             |
| (86)(22)出願日       | 令和5年3月30日(2023.3.30)                                                                                                                                             |         |       |             | ダニスコ・ユーエス・インク         |
| (85)翻訳文提出日        | 令和6年11月22日(2024.11.22)                                                                                                                                           |         |       |             | アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9    |
| (86)国際出願番号        | PCT/US2023/065162                                                                                                                                                |         |       |             | 4 3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル |
| (87)国際公開番号        | WO2023/192953                                                                                                                                                    |         |       |             | ・ロード 9 2 5            |
| (87)国際公開日         | 令和5年10月5日(2023.10.5)                                                                                                                                             |         |       | (74)代理人     | 110003579             |
| (31)優先権主張番号       | 63/326,615                                                                                                                                                       |         |       |             | 弁理士法人山崎国際特許事務所        |
| (32)優先日           | 令和4年4月1日(2022.4.1)                                                                                                                                               |         |       | (74)代理人     | 100118647             |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US)                                                                                                                                                           |         |       |             | 弁理士 赤松 利昭             |
| (81)指定国・地域        | AP(BW,CV,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 |         |       | (74)代理人     | 100123892             |
|                   | 最終頁に続く                                                                                                                                                           |         |       |             | 弁理士 内藤 忠雄             |
|                   |                                                                                                                                                                  |         |       | (74)代理人     | 100169993             |
|                   |                                                                                                                                                                  |         |       |             | 弁理士 今井 千裕             |
|                   |                                                                                                                                                                  |         |       | (74)代理人     | 100173978             |
|                   |                                                                                                                                                                  |         |       |             | 弁理士 朴 志恩              |
|                   |                                                                                                                                                                  |         |       |             | 最終頁に続く                |

(54)【発明の名称】 グラム陽性細菌細胞におけるタンパク質産生を強化するプロ領域突然変異

(57)【要約】

本開示は、概して、新規なプロ領域DNA配列を含む組み換えポリヌクレオチドに関する。本開示の特定の態様は、目的のタンパク質をコードするDNA配列に作動可能に連結された新規なプロ領域DNA配列を含む1つ以上の導入されたポリヌクレオチドを含む組み換えグラム陽性細菌株に関する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

30位並びに1、2、3、4、6、14、16、19、20、23、36、37、38、39、42、43、44、49、50、64、65、67、68、71、79、83及び84から選択される1つ以上の位置にアミノ酸置換を含むバリエーション領域配列であって、前記バリエーション領域の前記アミノ酸位置は、配列番号15に従って番号付けされている、バリエーション領域配列。

## 【請求項 2】

配列番号15と少なくとも約70%、約75%、約80%、約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドから誘導される、請求項1に記載のバリエーション領域。

10

## 【請求項 3】

2位にグリシン（G）及び3位にリシン（K）のアミノ酸挿入並びに1、32、38、46、66、67、70及び73から選択される1つ以上の位置にアミノ酸置換を含むバリエーション領域配列であって、前記バリエーション領域の前記アミノ酸位置は、配列番号14に従って番号付けされている、バリエーション領域配列。

## 【請求項 4】

配列番号14と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドから誘導される、請求項3に記載のバリエーション領域。

20

## 【請求項 5】

30位にグルタミン酸（E）からグリシン（G）への置換（E30G）、68位にロイシン（L）からリシン（K）への置換（L68K）及び73位にイソロイシン（I）からバリン（V）への置換（I72V）を含むバリエーション領域配列であって、前記バリエーション領域の前記アミノ酸位置は、配列番号15に従って番号付けされている、バリエーション領域配列又は30位にグルタミン酸（E）からグリシン（G）への置換（E30G）、68位にロイシン（L）からリシン（K）への置換（L68K）及び80位にグルタミン酸（E）からイソロイシン（I）への置換（E80I）を含むバリエーション領域配列であって、前記バリエーション領域の前記アミノ酸位置は、配列番号15に従って番号付けされている、バリエーション領域配列。

30

## 【請求項 6】

配列番号15と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドから誘導される、請求項5に記載のバリエーション領域。

## 【請求項 7】

請求項1～6のいずれか一項に記載のバリエーション領域核酸を含むポリヌクレオチド。

40

## 【請求項 8】

目的のタンパク質（POI）をコードする下流核酸配列に作動可能に連結されている、請求項1～6のいずれか一項に記載のバリエーション領域をコードする上流核酸を含むポリヌクレオチド。

## 【請求項 9】

目的のタンパク質（POI）をコードする下流核酸配列に作動可能に連結されている、請求項1～6のいずれか一項に記載のバリエーション領域をコードする下流核酸配列に作動可能に連結されている、シグナル配列をコードする上流核酸を含むポリヌクレオチド。

## 【請求項 10】

請求項7～9のいずれか一項に記載の下流ポリヌクレオチドに作動可能に連結された上

50

流プロモーターを含む発現カセット。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 に記載の導入されたカセットを含むグラム陽性宿主細胞。

【請求項 1 2】

グラム陽性細菌細胞中で目的のタンパク質（P O I）を産生する方法であって、

（a）グラム陽性細胞に、前記 P O I をコードする下流核酸に作動可能に連結されている、3 0 位並びに 1、2、3、4、6、1 4、1 6、1 9、2 0、2 3、3 6、3 7、3 8、3 9、4 2、4 3、4 4、4 9、5 0、6 4、6 5、6 7、6 8、7 1、7 9、8 3 及び 8 4 から選択される 1 つ以上の位置にアミノ酸置換を含むバリエーションプロ領域配列をコードする下流核酸に作動可能に連結された上流プロモーターを含む発現カセットを導入することであって、前記バリエーションプロ領域の前記アミノ酸位置は、配列番号 1 5 に従って番号付けされている、導入することと、

（b）前記 P O I の前記産生のための条件下において、前記改変された細胞を培養することと

を含む方法。

【請求項 1 3】

グラム陽性細菌細胞中で目的のタンパク質（P O I）を産生する方法であって、

（a）グラム陽性細胞に、前記 P O I をコードする下流核酸に作動可能に連結されている、2 位にグリシン（G）、3 位にリシン（K）のアミノ酸挿入並びに 1、3 2、3 8、4 6、6 6、6 7、7 0 及び 7 3 から選択される 1 つ以上の位置にアミノ酸置換を含むバリエーションプロ領域配列をコードする下流核酸に作動可能に連結された上流プロモーター配列を含む発現カセットを導入することであって、前記バリエーションプロ領域の前記アミノ酸位置は、配列番号 1 4 に従って番号付けされている、導入することと、

（b）前記 P O I の前記産生のための条件下において、前記改変された細胞を培養することと

を含む方法。

【請求項 1 4】

前記カセットは、前記上流プロモーターと前記下流バリエーションプロ領域との間に作動可能に連結及び配置されるシグナル配列をコードする核酸を更に含む、請求項 1 2 又は 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記改変された細胞は、前記同じ P O I をコードする下流核酸配列に作動可能に連結されている、配列番号 1 5 のプロ領域配列をコードする下流核酸に作動可能に連結された前記同じ上流プロモーター配列を含む導入された発現カセットを有する対照グラム陽性細胞と比較して増加した量の前記 P O I を産生する、請求項 1 2 又は 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

増加した量の前記 P O I は、対照細胞と比較して少なくとも約 0 . 1 % 増加する、請求項 1 2 又は 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 P O I は、アセチルエステラーゼ、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、アラビナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、カルボニックアンヒドラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、キモシン、クチナーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エピメラーゼ、エステラーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -グルカナーゼ、グルカンリザーゼ、エンド- $\beta$ -グルカナーゼ、グルコアミラーゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グリコシルヒドロラーゼ、ヘミセルラーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、ヒドロラーゼ、インベルターゼ、イソメラーゼ、ラッカーゼ、リガーゼ、リパーゼ、リアーゼ、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、オキシドレダクターゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチンデポリメラーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、ペクチン分解酵素、ペルヒドロラーゼ、ポリオールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダー

ゼ、フィターゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、リボヌクレアーゼ、トランスフェラーゼ、輸送タンパク質、トランスグルタミナーゼ、キシラナーゼ、ヘキソースオキシダーゼ及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 2 又は 1 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、概して、微生物宿主細胞、分子生物学、タンパク質工学、発酵、タンパク質産生などの分野に関する。本開示の特定の態様は、新規なプロ領域核酸（DNA）配列、新規なプロ領域 DNA 配列を含む組み換えポリヌクレオチド、目的のタンパク質をコードする核酸（DNA）配列に作動可能に連結された新規なプロ領域 DNA 配列を含む 1 つ以上の導入されたポリヌクレオチドを含む遺伝子改変（組み換え）グラム陽性細菌株などに関する。

10

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2022年4月1日出願の米国仮特許出願第 63 / 326, 615 号明細書の利益を主張する。

【0003】

配列表の参照

「NB41862WOPCT\_\_SequenceListing.xml」という名称の配列表のテキストファイルの電子的提出の内容は、2023年3月29日に作成され、サイズが 51 KB であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【背景技術】

【0004】

グラム陽性微生物は、その発酵生成物をその培養培地中に分泌する能力のため、大規模な工業用発酵に使用されることが多い。分泌タンパク質は、細胞膜及び細胞壁を越えて輸送され、その後、続いて外部培地中に放出される。例えば、異種ポリペプチドの大規模な工業的発酵及び分泌は、業界で広く使用されている技術であり、微生物細胞は、発現される異種ポリペプチドをコードする核酸で形質転換される。タンパク質産生方法における様々な進歩があるものの、当技術分野では、様々な産業での使用に用途を見出す、目的のタンパク質の産生を強化することを目的としたタンパク質発現のより効率的な方法を提供することが依然として必要とされている。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本明細書で概説されるとおり、本開示は、とりわけ、グラム陽性細菌（宿主）細胞中で目的のタンパク質を産生するための組成物及び方法を提供する。特定の実施形態は、新規なプロ領域核酸（DNA）配列、新規なプロ領域 DNA 配列を含む組み換えポリヌクレオチド（例えば、ベクター、プラスミド、発現カセットなど）、下流（3'）遺伝子コード配列に作動可能に連結された新規なプロ領域配列を含む組み換えポリヌクレオチド、プレタンパク質シグナル（分泌）配列をコードする上流（5'）DNA 配列に作動可能に連結された新規なプロ領域配列を含む組み換えポリヌクレオチドなどに関する。

40

【0006】

特定の態様では、本開示は、目的のタンパク質をコードする 1 つ以上の導入されたポリヌクレオチドを発現する組み換えグラム陽性細菌株を提供する。特定の実施形態では、1 つ以上の導入されたポリヌクレオチドは、目的のタンパク質をコードする DNA 配列に作動可能に連結された新規なプロ領域 DNA 配列を含む（この目的のタンパク質をコードする DNA 配列は、それに作動可能に連結された上流（5'）タンパク質シグナル配列を含み得る）。特定の他の態様では、本開示は、目的のタンパク質をコードする 1 つ以上の導入された新規なポリヌクレオチド構築物を発現する組み換えグラム陽性細菌株を設計／構

50

築するための組成物及び方法、目的のタンパク質を発現する組み換え株を培養するための組成物及び方法、目的のタンパク質の産生を強化するための組成物及び方法などを提供する。

【0007】

例えば、1つ以上の実施形態では、本開示は、配列番号9、配列番号11、配列番号14、配列番号29、配列番号30、配列番号32及び配列番号33並びに／又はこれらの組み合わせの1つ以上のアミノ酸配列に記載される新規なバリエーション領域配列を提供する。他の1つ以上の実施形態では、本開示は、図1、図2若しくは図3及び／又はこれらの組み合わせに記載される新規なバリエーション領域配列を提供する。更に他の1つ以上の実施形態では、本開示は、表1～5の1つ及び／又はこれらの組み合わせに記載又は説明される新規なバリエーション領域配列を提供する。

10

【0008】

したがって、特定の1つ以上の実施形態は、1つ以上のアミノ酸置換、1つ以上のアミノ酸挿入などを含むバリエーション（変異体）領域配列に関する。特定の実施形態では、バリエーション領域配列は、30位にアミノ酸置換を含み、バリエーション領域のアミノ酸位置は、配列番号15に従って番号付けされている。他の実施形態では、バリエーション領域配列は、30位並びに1、2、3、4、6、14、16、19、20、23、36、37、38、39、42、43、44、49、50、64、65、67、68、71、79、83及び84から選択される1つ以上の位置にアミノ酸置換を含み、バリエーション領域のアミノ酸位置は、配列番号15に従って番号付けされている。1つ以上の他の実施形態では、バリエーション領域配列は、配列番号15の1～84位と少なくとも約70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を含む親又は参照ポリペプチドから誘導される。特定の他の実施形態では、バリエーション領域配列は、少なくとも2位にグリシン（G）及び3位にリシン（K）のアミノ酸挿入を含み、バリエーション領域のアミノ酸位置は、配列番号14に従って番号付けされている。他の1つ以上の実施形態では、バリエーション領域配列は、少なくとも2位にグリシン（G）及び3位にリシン（K）のアミノ酸挿入並びに1、32、38、46、66、67、70及び73から選択される1つ以上の位置にアミノ酸置換を含み、バリエーション領域のアミノ酸位置は、配列番号14に従って番号付けされている。いくつかの他の実施形態では、バリエーション領域は、配列番号14の1～86位と少なくとも約70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を含む親又は参照ポリペプチドから誘導される。更に他の実施形態では、バリエーション領域配列は、少なくとも2位にグリシン（G）、3位にリシン（K）及び4位にアラニン（A）のアミノ酸挿入を含み、バリエーション領域のアミノ酸位置は、配列番号30に従って番号付けされている。特定の態様では、バリエーション領域は、配列番号30の1～87位と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドから誘導される。特定の他の1つ以上の実施形態では、バリエーション領域配列は、少なくとも2位にグリシン（G）、3位にリシン（K）及び4位にセリン（S）のアミノ酸挿入を含み、バリエーション領域のアミノ酸位置は、配列番号29に従って番号付けされている。いくつかの他の実施形態では、バリエーション領域は、配列番号29の1～87位と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドから誘導される。他の1つ以上の実施形態では、バリエーション領域配列は、少なくとも2位にグリシン（G）、3位にリシン（K）、4位にアラニン（A）及び5位にアラニン（A）のアミノ酸挿入を含み、バリエーション領域のアミノ酸位置は、配列番号31に従って番号付けされている。特定の1つ以

20

30

40

50

上の実施形態又は態様では、バリエーションプロ領域は、配列番号 31 の 1 ~ 88 位と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドから誘導される。他の実施形態では、バリエーションプロ領域配列は、30 位にグルタミン酸 (E) からグリシン (G) への置換 (E30G)、68 位にロイシン (L) からリシン (K) への置換 (L68K) 及び 73 位にイソロイシン (I) からバリン (V) への置換 (I72V) を含み、バリエーションプロ領域のアミノ酸位置は、配列番号 32 に従って番号付けされている。他の 1 つ以上の態様又は実施形態では、バリエーションプロ領域配列は、30 位にグルタミン酸 (E) からグリシン (G) への置換 (E30G)、68 位にロイシン (L) からリシン (K) への置換 (L68K) 及び 80 位にグルタミン酸 (E) からイソロイシン (I) への置換 (E80I) を含み、バリエーションプロ領域のアミノ酸位置は、配列番号 33 に従って番号付けされている。特定の実施形態では、バリエーションプロ領域は、配列番号 15、配列番号 32 及び／又は配列番号 33 の 1 ~ 84 位と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドから誘導される。他の態様では、本開示のバリエーションプロ領域は、表 1 ~ 5、図 1、図 2、図 3、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 14、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 33 及びこれらの組み合わせのいずれか 1 つに記載されたアミノ酸改変を含む。1 つ以上の実施形態では、表 1 ~ 5、図 1、図 2、図 3、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 14、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 33 及びこれらの組み合わせのいずれか 1 つに記載されたアミノ酸改変を含むバリエーションプロ領域は、配列番号 15 と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドから誘導される。

10

20

#### 【0009】

したがって、特定の他の 1 つ以上の実施形態は、本開示の新規なバリエーションプロ領域配列をコードする組み換え核酸を提供する。したがって、特定の実施形態は、バリエーションプロ領域核酸を含むポリヌクレオチドなどに関する。1 つ以上の実施形態では、本開示は、目的の異種タンパク質 (POI) をコードする下流 (3') 核酸配列に作動可能に連結されている、本開示のバリエーションプロ領域をコードする上流 (5') 核酸 (配列) を含むポリヌクレオチドを提供する。特定の他の態様では、本開示は、目的のタンパク質 (POI) をコードする下流核酸配列に作動可能に連結されている、本開示のバリエーションプロ領域をコードする下流 (3') 核酸配列に作動可能に連結されている、プレタンパク質シグナル (分泌) 配列をコードする上流 (5') 核酸を含むポリヌクレオチドを提供する。特定の他の実施形態は、本開示の下流 (3') ポリヌクレオチドに作動可能に連結された上流 (5') プロモーター領域配列を含む発現カセットに関する。

30

#### 【0010】

特定の他の 1 つ以上の実施形態では、本開示は、本開示の 1 つ以上の導入されたポリヌクレオチド又は発現カセットを含む組み換え (改変) グラム陽性細菌細胞／株に関する。したがって、本開示の他の実施形態は、本明細書に記載及び説明される組み換えグラム陽性細胞中で目的の異種タンパク質を産生する方法／プロセスに関する。

40

#### 【0011】

いくつかの 1 つ以上の実施形態では、本開示は、グラム陽性細菌細胞中で異種 POI を産生する方法を提供し、方法は、グラム陽性細胞中に、30 位並びに 1、2、3、4、6、14、16、19、20、23、36、37、38、39、42、43、44、49、50、64、65、67、68、71、79、83 及び 84 から選択される 1 つ以上の位置にアミノ酸置換を含むバリエーションプロ領域をコードする下流核酸配列に作動可能に連結された上流プロモーター領域を含む発現カセットを導入することであって、バリエーション

50

ロ領域核酸（配列）は、P O Iをコードする下流核酸配列に作動可能に連結され、バリエーションプロ領域のアミノ酸位置は、配列番号15に従って番号付けされている、導入することと、P O Iの産生のための条件下において、改変された細胞を増殖させる／培養する／発酵させることとを含む。特定の他の実施形態では、本開示は、グラム陽性細菌細胞中で異種P O Iを産生する方法を提供し、方法は、グラム陽性細胞中に、2位にグリシン（G）及び3位にリシン（K）のアミノ酸挿入並びに1、32、38、46、66、67、70及び73から選択される1つ以上の位置にアミノ酸置換を含むバリエーションプロ領域をコードする下流核酸（配列）に作動可能に連結された上流プロモーター領域配列を含む発現カセットを導入することと、バリエーションプロ領域核酸（配列）は、P O Iをコードする下流核酸配列に作動可能に連結され、バリエーションプロ領域のアミノ酸位置は、配列番号14に従って番号付けされている、導入することと、P O Iの産生のための条件下において、改変された細胞を増殖させる／培養する／発酵させることとを含む。更に他の実施形態では、本開示は、グラム陽性細菌細胞中で異種P O Iを産生する方法に関し、方法は、グラム陽性細胞中に本開示の発現カセットを導入することと、P O Iの産生のための条件下において、改変された細胞を増殖させる／培養する／発酵させることとを含む。本方法の特定の1つ以上の実施形態では、カセットは、プロモーターとバリエーションプロ領域配列との間に作動可能に連結及び配置されるプレタンパク質シグナル（分泌）配列をコードする核酸（配列）を含む。本方法のいくつかの他の実施形態では、改変された細胞は、対照グラム陽性細胞と比較して増加した量のP O Iを産生する。例えば、対照グラム陽性細胞は、同じP O I（すなわち改変された細胞と同じP O I）をコードする下流核酸配列に作動可能に連結されている、配列番号15を含むプロ領域配列をコードする下流核酸に作動可能に連結された同じ上流プロモーター配列（すなわち改変された細胞と同じ）を含む導入発現カセットを含む。本方法の特定の他の実施形態では、導入されたカセットは、細胞のゲノムに組み込まれる。本方法の特定の他の実施形態では、少なくとも2つのカセットが細胞に導入される。本開示の特定の他の1つ以上の実施形態を本明細書で説明し、以下に記載する。

10

20

40

50

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0012】

【図1】野生型（参照）B. レンツス（B. l e n t u s）プロ領域のアミノ酸配列及び本開示の特定のS E Lバリエーションプロ領域配列を示す。図1に示すように、参照のB. レンツス（B. l e n t u s）プロ領域配列は、配列番号15に記載される84個のアミノ酸（残基）位置を含み（30位のグルタミン酸（E）残基に下線が引かれている）、バリエーションプロ領域配列Aは、配列番号9に記載される84個のアミノ酸（残基）位置を含み（30位のヒスチジン（H）残基が太字になっている）、バリエーションプロ領域配列Bは、配列番号11に記載される84個のアミノ酸（残基）位置を含み（30位のグリシン（G）残基が太字になっている）、バリエーションプロ領域配列Cは、配列番号14に記載される86個のアミノ酸（残基）位置を含み（それぞれ2位及び3位に挿入されたグリシン（G）及びリシン（K）残基が太字で示され（G K）、32位のE残基に下線が引かれている）、バリエーションプロ領域配列Dは、配列番号29に記載される87個のアミノ酸（残基）位置を含み（それぞれ2～4位に挿入されたグリシン（G）、リシン（K）及びセリン（S）残基が太字で示される（G K S））、バリエーションプロ領域配列Eは、配列番号30に記載される87個のアミノ酸（残基）位置を含み（それぞれ2～4位に挿入されたグリシン（G）、リシン（K）及びアラニン（A）残基が太字で示される（G K A））、バリエーションプロ領域配列Fは、配列番号31に記載される88個のアミノ酸（残基）位置を含み（それぞれ2～5位に挿入されたグリシン（G）、リシン（K）、アラニン（A）及びアラニン（A）残基が太字で示される（G K A A））、バリエーションプロ領域配列Gは、配列番号32に記載される84個のアミノ酸（残基）位置を含み（30位のグリシン（G）残基が太字になっており、L 6 8 K及びI 7 2 V置換に下線が引かれている）バリエーションプロ領域配列Hは、配列番号33に記載される84個のアミノ酸（残基）位置を含む（30位のグリシン（G）残基が太字になっており、L 6 8 K及びE 8 0 I置換に下線が引かれ

ている)。

【0013】

【図2】野生型(WT)プロ領域配列(配列15)とアラインされたバリエーションプロ領域配列A(配列09)、バリエーションプロ領域配列B(配列11)、バリエーションプロ領域配列C(配列14)、バリエーションプロ領域配列D(配列29)、バリエーションプロ領域配列E(配列30)、バリエーションプロ領域配列F(配列31)、バリエーションプロ領域配列G(配列32)及びバリエーションプロ領域配列H(配列33)のアミノ酸配列を示す。図2に示すように、WTプロ領域は、30位にグルタミン酸(E)残基を含み(E、配列15)、バリエーションプロ領域配列Aは、30位にヒスチジン(H)残基を含み(H、配列09)、バリエーションプロ領域配列Bは、30位にグリシン(G)残基を含み(G、配列11)、バリエーションプロ領域配列Cは、グリシン(G)及びリシン(K)の2つのアミノ酸挿入を含み(GK挿入、配列14)、バリエーションプロ領域配列Dは、グリシン(G)、リシン(K)及びセリン(S)の3つのアミノ酸挿入を含み(GKS挿入、配列29)、バリエーションプロ領域配列Eは、グリシン(G)、リシン(K)及びアラニン(A)の3つのアミノ酸挿入を含み(GKA挿入、配列30)、バリエーションプロ領域配列Fは、グリシン(G)、リシン(K)、アラニン(A)、アラニン(A)の4つのアミノ酸挿入を含み(GKAA挿入、配列31)、バリエーションプロ領域配列Gは、30位にグリシン(G)残基、68位にリシン(K)残基及び72位にバリン(V)残基を含み、バリエーションプロ領域配列Hは、30位にグリシン(G)残基、68位にリシン(K)残基及び80位にイソロイシン(I)残基を含む。例えば、WTプロ領域配列(配列15)とバリエーションプロ領域配列C(配列14)とのアライメントで示されるように、2つのアミノ酸残基GKがWTプロ領域(配列番号15)の1位のアラニン(A)と2位のグルタミン酸(E)との間に挿入され、その結果、配列番号14の86個のアミノ酸バリエーションプロ領域配列Cがもたらされる。図2に示すように、配列15、配列09、配列11、配列32及び配列33で示された2つのハイフン(ー)は、配列14で示されたバリエーションプロ領域配列Cに対する2つのアミノ酸位置のギャップを示す。

10

20

【0014】

【図3】参照(野生型)B. レンツス(B. lentus)プロ領域アミノ酸配列(E<sub>30</sub>、配列番号15)、バリエーションプロ領域配列A(H<sub>30</sub>、配列番号09)、バリエーションプロ領域配列B(G<sub>30</sub>、配列番号11)、バリエーションプロ領域配列C(G<sub>2</sub>K<sub>3</sub>挿入、配列番号14)、バリエーションプロ領域配列D(G<sub>2</sub>K<sub>3</sub>S<sub>4</sub>挿入、配列番号29)、バリエーションプロ領域配列E(G<sub>2</sub>K<sub>3</sub>A<sub>4</sub>挿入、配列番号30)、バリエーションプロ領域配列F(G<sub>2</sub>K<sub>3</sub>A<sub>4</sub>A<sub>5</sub>挿入、配列番号31)、バリエーションプロ領域配列G(E<sub>30</sub>G、L<sub>68</sub>K及びI<sub>72</sub>Vの置換を伴う、配列番号32)及びバリエーションプロ領域配列H(E<sub>30</sub>G、L<sub>68</sub>K及びE<sub>80</sub>Iの置換を伴う、配列番号33)のアミノ酸(残基)位置の番号付けを示し、アミノ酸位置は、下付き数字で5' (N末端)から3' (C末端)の方向に示される(例えば、配列番号15の1位におけるアラニン(A<sub>1</sub>)、配列番号15の2位におけるグルタミン酸(E<sub>2</sub>)など)。例えば、本開示の変異体プロ領域配列は、図3に記載するように、野生型(参照)プロ領域配列の番号付け(配列番号15、E<sub>30</sub>)、バリエーション(参照)プロ領域配列Aの番号付け(配列番号9、H<sub>30</sub>)、バリエーション(参照)プロ領域配列Bの番号付け(配列番号11、G<sub>30</sub>)、バリエーション(参照)プロ領域配列Cの番号付け(配列番号14、GK挿入)、バリエーション(参照)プロ領域配列Dの番号付け(配列番号29、GKS挿入)、バリエーション(参照)プロ領域配列Eの番号付け(配列番号20、GKA挿入)、バリエーション(参照)プロ領域配列Fの番号付け(配列番号31、GKAA挿入)、バリエーション(参照)プロ領域配列Gの番号付け(配列番号32、L<sub>68</sub>K/I<sub>72</sub>V置換)、バリエーション(参照)プロ領域配列Hの番号付け(配列番号33、L<sub>68</sub>K/E<sub>80</sub>I置換)又はこれらの組み合わせを指し得る。

30

40

【発明を実施するための形態】

【0015】

生物学的配列の簡単な説明

50

配列番号 1 は、上流 (5') aprE 遺伝子フランキング領域、B. サブチリス (B. subtilis) のバリエント rrnI-P2 プロモーター及び 5'-aprE UTR 領域を含む核酸 (DNA) 配列である。

【0016】

配列番号 2 は、「BG46」という名称の野生型バチルスギブソニイ (Bacillus gibsonii) サブチリシンのアミノ酸配列である。

【0017】

配列番号 3 は、「BG46\_\_variant 1」という名称のバリエントである B. ギブソニイ (B. gibsonii) BG46 サブチリシンのアミノ酸配列である。

【0018】

配列番号 4 は、野生型 B. サブチリス (B. subtilis) の AprE タンパク質シグナル配列をコードする DNA 配列である。

【0019】

配列番号 5 は、バリエントプロ領域配列 A (30H、配列番号 9) をコードする DNA 配列である。

【0020】

配列番号 6 は、野生型 B. アミロリケファシエンス (B. amyloliquefaciens) BPN' ターミネーターの DNA 配列である。

【0021】

配列番号 7 は、カナマイシン (kan) 遺伝子発現カセットの DNA 配列である。

【0022】

配列番号 8 は、「BG46\_\_variant 2」という名称のバリエントである B. ギブソニイ (B. gibsonii) BG46 サブチリシンのアミノ酸配列である。

【0023】

配列番号 9 は、バリエントプロ領域 A の DNA 配列 (配列番号 5) によってコードされたアミノ酸配列である。

【0024】

配列番号 10 は、バリエントプロ領域配列 B (30G、配列番号 11) をコードする DNA 配列である。

【0025】

配列番号 11 は、バリエントプロ領域 B の DNA 配列 (配列番号 10) によってコードされたアミノ酸配列である。

【0026】

配列番号 12 は、B. アミロリケファシエンス (B. amyloliquefaciens) BPN' プロ領域配列のアミノ酸配列である。

【0027】

配列番号 13 は、バリエントプロ領域配列 C (GK 挿入、配列番号 14) をコードする DNA 配列である。

【0028】

配列番号 14 は、バリエントプロ領域 C の DNA 配列 (配列番号 13) によってコードされたアミノ酸配列である。

【0029】

配列番号 15 は、野生型 (WT) B. レンツス (B. lentus) プロ領域配列のアミノ酸配列である。

【0030】

配列番号 16 は、B. リケニフォルミス (B. licheniformis) serA 遺伝子 5' FR の DNA 配列である。

【0031】

配列番号 17 は、rrnI-p3 プロモーター領域を含む DNA 配列である。

【0032】

10

20

30

40

50

配列番号 18 は、B. サブチリス (B. subtilis) aprE 5' - UTR の DNA 配列である。

【0033】

配列番号 19 は、B. リケニフォルミス (B. licheniformis) amyL ターミネーターの DNA 配列である。

【0034】

配列番号 20 は、B. リケニフォルミス (B. licheniformis) serA 遺伝子 3' FR の DNA 配列である。

【0035】

配列番号 21 は、B. リケニフォルミス (B. licheniformis) lysA 遺伝子 5' FR の DNA 配列である。

10

【0036】

配列番号 22 は、B. リケニフォルミス (B. licheniformis) lysA 遺伝子 3' FR の DNA 配列である。

【0037】

配列番号 23 は、バリエントプロ領域配列 C (GKA 挿入、配列番号 14) をコードする DNA 配列である。

【0038】

配列番号 24 は、バリエントプロ領域 C の DNA 配列 (配列番号 23) によってコードされたアミノ酸配列である。

20

【0039】

配列番号 25 は、バリエントプロ領域配列 C (GKAA 挿入、配列番号 14) をコードする DNA 配列である。

【0040】

配列番号 26 は、バリエントプロ領域 C の DNA 配列 (配列番号 25) によってコードされたアミノ酸配列である。

【0041】

配列番号 27 は、バリエントプロ領域配列 C (GKAS 挿入、配列番号 14) をコードする DNA 配列である。

【0042】

配列番号 28 は、バリエントプロ領域 C の DNA 配列 (配列番号 27) によってコードされたアミノ酸配列である。

30

【0043】

配列番号 29 は、バリエントプロ領域配列 D のアミノ酸配列である。

【0044】

配列番号 30 は、バリエントプロ領域配列 E のアミノ酸配列である。

【0045】

配列番号 31 は、バリエントプロ領域配列 F のアミノ酸配列である。

【0046】

配列番号 32 は、バリエントプロ領域配列 G のアミノ酸配列である。

40

【0047】

配列番号 33 は、バリエントプロ領域配列 H のアミノ酸配列である。

【0048】

上記で簡潔に記載され、本明細書の以下で詳細に説明されたとおり、本開示は、とりわけ、新規なプロ領域核酸 (DNA) 配列、新規なプロ領域 DNA 配列を含む組み換えポリヌクレオチド (例えば、ベクター、プラスミド、発現カセットなど)、下流 (3') 遺伝子コード配列に作動可能に連結された新規なプロ領域配列を含む組み換えポリヌクレオチド、タンパク質シグナル (分泌) 配列をコードする上流 (5') DNA 配列に作動可能に連結された新規なプロ領域配列を含む組み換えポリヌクレオチドなどを提供する。特定の態様では、本開示は、目的のタンパク質をコードする 1 つ以上の導入されたポリヌクレオ

50

チドを発現する組み換えグラム陽性細菌株を提供する。特定の実施形態では、1つ以上の導入されたポリヌクレオチドは、目的のタンパク質をコードするDNA配列に作動可能に連結された新規なプロ領域DNA配列を含む（この目的のタンパク質をコードするDNA配列は、それに作動可能に連結された上流（5'）タンパク質シグナル配列を含み得る）。したがって、本開示の特定の他の態様は、とりわけ、目的のタンパク質をコードする1つ以上の導入された新規なポリヌクレオチド構築物を発現する組み換えグラム陽性細菌株を設計／構築するための組成物及び方法、目的のタンパク質を発現する組み換え株を培養するための組成物及び方法、目的のタンパク質の産生を強化するための組成物及び方法などを提供する。

【0049】

10

#### I. 定義

本開示の組み換え（改変）株及び本明細書に記載されるこれらの方法を考慮して、以下の用語及び語句を定義する。本明細書で定義されない用語には、当技術分野で通常使用される意味が与えられるべきである。

【0050】

他に定義されない限り、本明細書で使用する技術用語及び科学用語の全ては、本発明の組成物及び方法が属する技術分野の当業者が一般に理解する意味と同じ意味を有する。本明細書に記載のものに類似の又は均等な任意の方法及び材料も本発明の組成物及び方法を実施又は試験するために使用され得るが、以下では例示的な方法及び材料について記載する。本明細書で引用する刊行物及び特許の全ては、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0051】

特許請求の範囲が任意選択的な要素を排除するように記載され得ることに更に留意されたい。したがって、この記述は、特許請求項の構成要素の列挙に関連して「唯一」、「のみ」、「除いて」、「含まない」などの排他的な用語の使用又はその「否定的な」限定若しくは条件の使用のための先行文として機能することを意図する。

【0052】

本開示を読むことで当業者に明らかなように、本明細書に記載及び例示する個々の実施形態のそれぞれは、本明細書に記載する本組成物及び方法の範囲又は趣旨から逸脱することなく、他の一部の実施形態のいずれかの特徴から容易に分離又は組み合わせることができる別個の構成要素及び特徴を有する。記載した方法のいずれも、記載した事象の順序又は論理的に可能な他の任意の順序で実施され得る。

30

【0053】

本明細書で使用する時、語句「グラム陽性細菌」、「グラム陽性細胞」、「グラム陽性細菌株」及び／又は「グラム陽性細菌細胞」は、当技術分野で用いられるのと同じ意味を有する。例えば、グラム陽性細菌細胞は、アクチノバクテリア (*Actinobacteria*) 及びファーミキューテス (*Firmicutes*) の全ての株を含む。特定の実施形態では、こうしたグラム陽性細菌は、バチルス (*Bacilli*)、クロストリジウム (*Clostridia*) 及びモリクト (*Mollicutes*) 綱のものである。

【0054】

40

本明細書で使用する時、「バチルス (*Bacillus*) 属」としては、当業者に公知である「バチルス (*Bacillus*)」属内の全ての種が含まれ、例えば *B. subtilis*、*B. licheniformis*、*B. lentus*、*B. brevis*、*B. stearothermophilus*、*B. alkalophilus*、*B. amyloliquefaciens*、*B. clausii*、*B. halodurans*、*B. megaterium*、*B. coagulans*、*B. circulans*、*B. lautus* 及び *B. thur*

50

*ringiensis*) が挙げられるが、これらに限定されない。バチルス (*Bacillus*) 属が分類学的再編成を受け続けていることは、認識されている。したがって、この属は、再分類された種、例えば、限定しないが、現在、「ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス (*Geobacillus stearothermophilus*)」と称されている「*B. ステアロサーモフィルス (B. stearothermophilus)*」などの生物を含むものとする。

【0055】

本明細書で使用する時、用語「組み換え」又は「非天然」は、少なくとも1つの操作された遺伝子変化を有するか若しくは異種核酸分子の導入によって改変されている生物、微生物、細胞、核酸分子若しくはベクターを指すか、又は異種若しくは内因性核酸分子若しくは遺伝子の発現が制御され得るように変更されている細胞（例えば、微生物細胞）を指す。組み換えは、1つ以上のそのような改変を有する非天然細胞に由来するか、又は非天然細胞の子孫である細胞も指す。遺伝子変化としては、例えば、タンパク質をコードする発現可能な核酸分子を導入する改変、核酸分子の付加、欠失、置換又は細胞の遺伝物質の他の機能的変化が挙げられる。例えば、組み換え細胞は、天然の（野生型）細胞内で同一若しくは相同の形態で見出されない遺伝子又は他の核酸分子を発現し得るか（例えば、融合又はキメラタンパク質）、或いは過剰発現されるか、過小発現されるか、最小限で発現されるか又は全く発現されないなどの内因性遺伝子の変更された発現パターンを提供し得る。「組み換え」、「組み換える」又は「組み換え」核酸を生成することは、一般に、2つ以上の核酸断片の集合体であり、この集合体は、キメラ遺伝子を発生させる。

【0056】

用語「由来する」には、用語「～から生じた」、「～から得られた」、「～から入手可能な」及び「～から作成された」が含まれ、一般的に、1つの特定の材料若しくは組成物が、別の特定の材料若しくは組成物にその起源を見出されるか、又は別の特定の材料若しくは組成物を参照して説明可能な特徴を有することを示す。例えば、本開示の組み換えグラム陽性細菌細胞は、任意の既知のグラム陽性細菌株に由来する／任意の既知のグラム陽性細菌株から得られることができる。

【0057】

本明細書で使用する時、「核酸」は、ヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列及びそれらの断片又は部分並びにセンス鎖又はアンチセンス鎖のいずれを表しているかに関わらず、二本鎖又は一本鎖であり得る、ゲノム又は合成起源のDNA、cDNA及びRNAを指す。遺伝子コードの縮重の結果として、多数のヌクレオチド配列が所与のタンパク質をコードし得ることが理解されるであろう。

【0058】

本明細書に記載したポリヌクレオチド（若しくは核酸分子）には、「遺伝子」、「ベクター」及び「プラスミド」が含まれることは理解されている。

【0059】

したがって、用語「遺伝子」は、タンパク質のコード配列の全部又は一部を含む、アミノ酸の特定配列をコードするポリヌクレオチドを指し、例えば、遺伝子が発現する条件を決定する、プロモーター配列などの調節（非転写）DNA配列を含み得る。遺伝子の転写領域は、5' - 非翻訳領域（UTR）及び3' - UTRを含む非翻訳領域（UTR）並びにコード配列を含み得る。

【0060】

本明細書で使用する時、「内因性遺伝子」は、生物のゲノム中の天然の位置に存在する遺伝子を指す。

【0061】

本明細書で使用する時、「異種」遺伝子、「非内因性」遺伝子又は「外来」遺伝子は、通常、宿主生物中に見出されないが、遺伝子導入によって宿主生物に導入された遺伝子を指す。用語「外来」遺伝子は、非天然生物中に挿入された天然遺伝子及び／又は天然若しくは非天然生物中に挿入されたキメラ遺伝子を含む。

## 【0062】

本明細書で使用する時、「異種制御配列」は、天然では目的の遺伝子の発現を調節（制御）するように機能しない遺伝子発現制御配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーターなど）を指す。一般に、異種核酸は、その中にそれらが存在する細胞又はゲノムの一部に対して内因性（天然）ではなく、感染、トランスフェクション、形質転換、形質導入、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどによって細胞に加えられている。「異種」核酸構築物は、天然宿主細胞内で見出される制御配列／DNAコード配列の組み合わせと同一又は異なる制御配列／DNAコード（ORF）配列の組み合わせを含有し得る。

## 【0063】

本明細書で使用する時、用語「発現」は、本開示の核酸分子に由来するセンス（mRNA）若しくはアンチセンスRNAの転写及び安定した蓄積を指す。発現は、mRNAのポリペプチドへの翻訳も指し得る。したがって、用語「発現」には、以下に限定されないが、転写、転写後改変、翻訳、翻訳後改変、分泌などのポリペプチドの産生に關与する任意の工程が含まれる。

## 【0064】

本明細書で使用する時、用語「コード配列」は、その（コードされた）タンパク質産物のアミノ酸配列を直接的に指定するヌクレオチド配列を指す。コード配列の境界は、一般にオープンリーディングフレーム（以下「ORF」）によって決定され、それは、通常、ATG開始コドンで開始する。コード配列には、通常、DNA、cDNA及び組み換えヌクレオチド配列が含まれる。

## 【0065】

本明細書で使用する時、用語「プロモーター」、「プロモーター要素」、「プロモーター配列」などは、プロモーター領域配列が上流（5'）に配置され、下流（3'）の遺伝子CDSに作動可能に連結されているときにメッセンジャーRNA（mRNA）内への遺伝子コード配列（CDS）の転写を制御することが可能な核酸（DNA）配列を指す。当業者に概ね理解されるように、プロモーターは、一般的に、RNAポリメラーゼによる特異的結合及び転写開始のための部位を提供する。特定の態様では、用語「プロモーター」は、転写開始に必要なプロモーター核酸配列の最小部分を指す（すなわちRNAポリメラーゼ結合部位を含む）。例えば、プロモーターは、一般に、翻訳対象の遺伝子CDSの上流（5'）で+1転写開始部位（TSS）に相対的である「-10」（コンセンサス配列）要素及び「-35」（コンセンサス配列）要素を含む。コアプロモーターである-10要素及び-35要素は、当技術分野では一般に、それぞれ「TATAAT」（プリブノウボックス）コンセンサス領域及び「TTGACA」コンセンサス領域と呼ばれる。コアプロモーター（-10及び-35）領域の間隔は、一般に、約15～20介在塩基対（ヌクレオチド）離れている（すなわち空いている）。

## 【0066】

プロモーターは、それらの全体が天然遺伝子に由来し得るか、又は天然に存在する種々のプロモーターに由来する種々のエレメントから構成され得るか、又は更に合成核酸セグメントを含み得る。種々のプロモーターが、種々の細胞型において、又は種々の生育段階において、又は種々の環境若しくは生理的条件に応答して遺伝子の発現を指示し得ることが当業者に理解される。プロモーターは、構成的プロモーター、誘導プロモーター、可変プロモーター、ハイブリッドプロモーター、合成プロモーター、タンデムプロモーターなどであり得る。大半の細胞型で遺伝子の発現を最も多く引き起こすプロモーターは、一般に、「構成的プロモーター」と呼ばれる。更に、ほとんどの場合に調節配列の正確な境界は完全には明らかになっていないため、種々の長さのDNA断片が同じプロモーター活性を有し得ることが確認されている。特定の態様では、成熟した目的のタンパク質をコードする下流（3'）DNA配列（ORF）に作動可能に連結されたプロ領域配列（PRO）をコードする下流DNA配列に作動可能に連結されたタンパク質のシグナル配列（SS）をコードする下流DNA配列に作動可能に連結された上流（5'）プロモーター配列（p

10

20

30

40

50

r o) は、概略的に 5' - [p r o] - [S S] - [P R O] - [O R F] - 3' として示され得る。

#### 【0067】

本明細書で使用する時、目的の遺伝子のタンパク質コード配列に連結された目的の遺伝子の発現を制御する「機能的プロモーター配列」は、所望のグラム陽性宿主細胞におけるコード配列の転写及び翻訳を制御するプロモーター配列を指す。例えば、特定の実施形態では、本開示は、グラム陽性細胞中で機能する上流 (5') プロモーター (又は 5' プロモーター領域若しくはタンデム 5' プロモーターなど) を含むポリヌクレオチドを提供し、機能的プロモーター領域は、目的のタンパク質をコードする核酸配列に作動可能に連結している。

10

#### 【0068】

本明細書で使用する時、用語「前駆体タンパク質」は、不活性型のタンパク質を指す。特定の態様では、完全長タンパク質は、プロ配列の成熟したタンパク質形態の前駆体 (略称「プレタンパク質」) として合成される。他の態様では、完全長タンパク質は、シグナルペプチド配列、プロ配列及び成熟したタンパク質形態の前駆体 (略称「プレプロタンパク質」) として合成される。例えば、プレ配列は、通常、輸送のためのシグナルペプチドとして作用し、プロ配列は、一般に、関連する (成熟) タンパク質の正確なフォールディングのために不可欠である。

#### 【0069】

本明細書で使用する時、用語「成熟タンパク質」は、不活性型の前駆体 (完全長) タンパク質とは対照的な、活性型のタンパク質を指す。

20

#### 【0070】

本明細書で使用する時、用語「シグナル配列」、「分泌シグナル」及び「シグナルペプチド」は、互換的に使用され得、前駆体タンパク質の分泌又は直接輸送に関与し得るアミノ酸残基の配列を指す。シグナル (プレ) 配列は、一般的に、転座中にシグナルペプチダーゼによって前駆体タンパク質から切断される。シグナル (プレ) 配列は、一般的に、シグナル (プレ) 配列とプロ領域 (プロ) 配列とが作動可能な組み合わせで成熟 P O I 配列の上流 (5') で用いられる場合、成熟タンパク質配列の N 末端に位置するか又はプロ領域 (プロ) 配列の N 末端に位置する。

#### 【0071】

本明細書で使用する時、用語「プロ配列」、「プロー配列」及び「プロ領域配列」は、互換的に使用され得、「P R O」配列、「P r o」配列、「プロ」配列などと略され得る。本明細書で使用する時、プロ配列という用語は、当技術分野で理解されるものと同じ意味を有する。例えば、B. サブチリス (B. s u b t i l i s) アルカリセリンプロテアーゼである「サブチリシン」は、最初にプレプロサブチリシンとして産生され、これは、タンパク質分泌のためのシグナル (プレ) 配列、続く 77 個のアミノ酸プロ領域 (プロ) 配列、続く成熟サブチリシンをコードするアミノ酸配列からなる (例えば、プレプロサブチリシン)。プロ配列は、分子内シャペロン (例えば、タンパク質フォールディング反応を直接触媒する) として作用して、関連する (成熟) タンパク質の正確なフォールディングのために必須であることが多い。同様に、プロ配列は、成熟した目的のタンパク質のフォールディング及び細胞内輸送 (又は分泌) の両方に必要であり得、これは、これら 2 つの機能が密接に関連し合っていることを示唆する。特定の態様では、本開示のプロ領域配列は、配列番号 15 の野生型 (W T、参照) B. レンツス (B. l e n t u s) プロ領域配列由来のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、プロ領域配列は、配列番号 15、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 14、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32 及び / 又は配列番号 33 に対する相同性を含むアミノ酸配列に由来する。このため、特定の態様では、本明細書で説明される 1 つ以上のプロ領域バリエーションのアミノ酸改変は、配列番号 15、配列番号 9、配列番号 11 又は配列番号 14 のプロ領域アミノ酸配列を参照することによって番号付けされる。

30

40

#### 【0072】

50

例えば、本明細書に記載の1つ以上のプロ領域バリエーションのアミノ酸配列は、アライメントアルゴリズムを使用して配列番号15のアミノ酸配列とアラインすることができ、配列番号15のアミノ酸残基とアラインする（好ましくは、最適にアラインする）所与のアミノ酸配列中の各アミノ酸残基は、対応するアミノ酸残基の位置番号を参照することによって都合よく番号付けされる。配列アライメントアルゴリズムは、クエリー配列（ときに「参照配列」とも称される）と比較して、対象配列中で挿入又は欠失が発生する位置を特定する。他のプロ領域アミノ酸配列との配列アライメントは、アミノ酸アライメントアルゴリズムを使用して決定することができる。

#### 【0073】

特定の態様では、プロ領域アミノ酸配列の「位置」に対する参照は、1文字のアミノ酸（残基）、続いて位置番号として示すことができる（例えば、配列番号15、1位のアラニンは「A1」と示され、2位のグルタミン酸は「E2」と示されるなど）。関連する実施形態では、バリエーション（変異体）プロ領域アミノ酸配列に対する参照は、1文字のアミノ酸（残基）として示すことができ、親（参照）配列のアミノ酸位置が番号付けされ、その後と同じ位置の変異アミノ酸（残基）が続く（例えば、配列番号15、グリシン（G）で置換された1位のアラニン（A）は「A1G」と示され、ヒスチジン（H）で置換された30位のグルタミン酸（E）は「E30H」として示されるなど）。複数のアミノ酸残基もプロ領域アミノ酸配列の同じ位置で置換され得、親（参照）配列のアミノ酸位置が番号付けされ、その後にはスラッシュで区切られた同じ位置の変異アミノ酸残基が続く（例えば、配列番号15、グリシン（G）、グルタミン酸（E）又はリシン（K）で置換された1位のアラニン（A）が、「A1G/E/K」と示され得るなど）。

#### 【0074】

本明細書では、いくつかの範囲は、「約」という用語が先行する数値で示される。本明細書では、「約」という用語は、これが先行する正確な数及びこの用語が先行する数に近い数又は近似する数に対するリテラルサポートを提供するために使用される。ある数が、具体的に列挙された数に近い数又は近似的な数であるかの決定では、列挙されていない近い数又は近似的な数は、これが示されている文脈において、具体的に列挙される数の実質的均等物を提供する数であり得る。例えば、ある数値に関する「約」という用語は、この用語が文脈において別途明確に定義されない限り、この数値の-10%~+10%の範囲を指す。

#### 【0075】

本明細書で使用する時、「プロ」配列をコードするポリヌクレオチド、「プロ領域」配列をコードするポリヌクレオチド及び「プロ配列」をコードするポリヌクレオチドは、互換的に使用され得、すぐ上流（5'）に位置し、これらは、成熟した目的のタンパク質（POI）をコードする下流（3'）の遺伝子コード配列（CDS）に作動可能に連結されたDNA配列を指す。特定の態様では、プロ領域配列をコードするポリヌクレオチドは、上流（5'）タンパク質シグナル配列（SS）と成熟POIをコードする下流（3'）遺伝子CDSとの間に位置して、これらの間を連結するDNA配列を指す。例えば、プロ領域DNA配列（PRO）は、タンパク質シグナル配列をコードする上流（5'）DNA配列（SS）に作動可能に連結され、且つ成熟POIをコードする下流（3'）DNA遺伝子CDSに作動可能に連結される（例えば、5'-[SS]-[PRO]-[ORF]-3'; N-[pre]-[pro]-[タンパク質]-C）。

#### 【0076】

本明細書で使用する時、「野生型（WT）B. レンツス（B. lentus）プロ領域」配列は、配列番号15に記載されるアミノ酸配列を含む。特定の態様では、WT（参照）プロ領域配列（配列番号15）は、「E30プロ配列」又は「E30プロ配列」と称され得る。

#### 【0077】

本明細書で使用する時、「バリエーションプロ領域A」と称される変異体プロ領域配列は、配列番号9に記載されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、バリエーションプロ領域

域 A 配列（配列番号 9）は、「H 3 0 プロ配列」又は「H<sub>3</sub> 0 プロ配列」と称され得る。

【0078】

本明細書で使用する時、「バリエントプロ領域 B」と称される変異体プロ領域配列は、配列番号 11 に記載されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、バリエントプロ領域 B 配列（配列番号 11）は、「G 3 0 プロ配列」又は「G<sub>3</sub> 0 プロ配列」と称され得る。

【0079】

本明細書で使用する時、「バリエントプロ領域 C」と称される変異体プロ領域配列は、配列番号 14 に記載されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、バリエントプロ領域 C 配列（配列番号 14）は、「G K 挿入プロ配列」又は「G<sub>2</sub> K<sub>3</sub> 挿入プロ配列」と称され得る。

【0080】

本明細書で使用する時、「バリエントプロ領域 D」と称される変異体プロ領域配列は、配列番号 29 に記載されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、バリエントプロ領域 D 配列（配列番号 29）は、「G K S 挿入プロ配列」又は「G<sub>2</sub> K<sub>3</sub> S<sub>4</sub> 挿入プロ配列」と称され得る。

【0081】

本明細書で使用する時、「バリエントプロ領域 E」と称される変異体プロ領域配列は、配列番号 30 に記載されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、バリエントプロ領域 E 配列（配列番号 30）は、「G K A 挿入プロ配列」又は「G<sub>2</sub> K<sub>3</sub> A<sub>4</sub> 挿入プロ配列」と称され得る。

【0082】

本明細書で使用する時、「バリエントプロ領域 F」と称される変異体プロ領域配列は、配列番号 31 に記載されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、バリエントプロ領域 F 配列（配列番号 31）は、「G K A A 挿入プロ配列」又は「G<sub>2</sub> K<sub>3</sub> A<sub>4</sub> A<sub>5</sub> 挿入プロ配列」と称され得る。

【0083】

本明細書で使用する時、「バリエントプロ領域 G」と称される変異体プロ領域配列は、配列番号 32 に記載されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、バリエントプロ領域 G 配列（配列番号 32）は、L 6 8 K / I 7 2 V プロ配列と称され得る。

【0084】

本明細書で使用する時、「バリエントプロ領域 H」と称される変異体プロ領域配列は、配列番号 33 に記載されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、バリエントプロ領域 H 配列（配列番号 33）は、L 6 8 K / E 8 0 I プロ配列と称され得る。

【0085】

図 3 で大まかに示すように、アミノ酸（残基）位置の番号付けは、W T プロ領域アミノ酸配列（E<sub>3</sub> 0、配列番号 15）、バリエントプロ領域配列 A（H<sub>3</sub> 0、配列番号 09）、バリエントプロ領域配列 B（G<sub>3</sub> 0、配列番号 11）、バリエントプロ領域配列 C（G K 挿入、配列番号 14）、バリエントプロ領域配列 D（G K S 挿入、配列番号 29）、バリエントプロ領域配列 E（G K A 挿入、配列番号 30）、バリエントプロ領域配列 F（G K A A 挿入、配列番号 31）、バリエントプロ領域配列 G（L 6 8 K / I 7 2 V、配列番号 32）及び／又はバリエントプロ領域配列 H（L 6 8 K / E 8 0 I、配列番号 33）に対して参照され得る。

【0086】

本明細書で使用する時、本明細書で定義されるように、「完全長タンパク質をコードするポリヌクレオチド」という語句は「前駆体」タンパク質をコードする DNA 配列を指し、「成熟タンパク質をコードするポリヌクレオチド」という語句は「成熟」タンパク質をコードする DNA 配列を指す。特定の態様では、前駆体タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、少なくとも、成熟した目的のタンパク質（POI）のアミノ酸配列をコードする下流（3'）DNA 配列（例えばオープンリーディングフレーム、ORF）に作動

10

20

30

40

50

可能に連結されたプロ領域アミノ酸配列をコードする上流（５’）DNA配列を含む。他の態様では、前駆体タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、少なくとも、成熟POIのアミノ酸配列をコードする下流（３’）ORFに作動可能に連結されたプロ領域アミノ酸配列をコードする下流（３’）DNA配列に作動可能に連結されたタンパク質シグナル配列をコードする上流（５’）DNA配列を含む。

【0087】

本明細書で使用するとき、「非翻訳領域」という用語は、「UTR」と略記され得る。

【0088】

本明細書で使用するとき、「５’末端（５’）非翻訳領域」、「５’非翻訳領域」及び／又は「５’転写物リーダー」という語句は、互換的に使用され得、「５’-UTR」と略され得る。当技術分野で概ね理解されているとおり、５’-UTRは、開始コドンのすぐ上流（５’）にあるメッセンジャーRNA（mRNA）の領域として知られている。

【0089】

核酸は、それが別の核酸配列と機能的関係に置かれている場合、「作動可能に連結」している。例えば、分泌リーダー（すなわちシグナル配列）をコードするDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現する場合、ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結されるか、プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を与える場合、コード配列（CDS、ORF）に作動可能に連結されるか、又はリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように配置されている場合、コード配列に作動可能に連結される。一般に、「作動可能に連結された」は、連結されるDNA配列が隣接しており、且つ分泌リーダーの場合には隣接してリーディング期にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは、隣接している必要はない。連結は、便宜的な制限部位でのライゲーションによって行われる。そのような部位が存在しない場合、従来の手法に従って合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーが使用される。このため、作動可能に連結されたという用語は、一般に、一方の機能が他方の機能によって影響を受けるような単一核酸断片上での核酸配列の会合（並置）を指す。例えば、プロモーター（pro）は、遺伝子CDSの転写を制御する場合、遺伝子コード配列（遺伝子CDS）に作動可能に連結される（例えば、５’-[pro]-[遺伝子CDS] 3’）。

【0090】

本明細書で使用するとき、「バリエントrrnI-P2プロモーター及び５’-UTR領域」（略称「P2プロモーター／５’-UTR領域」）という語句は、配列番号1に記載されるバリエントB.サブチリス（B. subtilis）rrnI-P2プロモーター／５’-apre UTR領域のDNA配列を指す。

【0091】

本明細書で使用するとき、「野生型B.サブチリス（B. subtilis）apreシグナルペプチド配列」をコードするDNAは、「apre SS」と略され得、これは、配列番号4のヌクレオチド配列を含む。

【0092】

本明細書で使用するとき、「野生型B.アミロリケファシエンス（B. amyloliquefaciens）BPN’ターミネーター（BPN’term）」は、「term」と略され得、これは、配列番号6のヌクレオチド配列を含む。

【0093】

本明細書で使用するとき、配列番号3のアミノ酸配列を含むバリエントバチルスギブソニイ（Bacillus gibsonii）（BG46）サブチリシンは、「BG46\_\_variant 1」と略される。

【0094】

本明細書で使用するとき、配列番号8のアミノ酸配列を含むバリエントバチルスギブソニイ（Bacillus gibsonii）（BG46）サブチリシンは、「BG46\_\_variant 2」と略され、このBG46\_\_variant 2は、野生型B.ギブソニイ（B. gibsonii）（BG46）サブチリシンレポータータンパク質（配

列番号 2) に由来している。

【0095】

本明細書で使用する時、「好適な調節配列」は、コード配列の上流（5' 非コード配列）、配列内又はその下流（3' 非コード配列）に位置し、関連コード配列の転写、RNA プロセッシング若しくは安定性又は翻訳に影響を及ぼすヌクレオチド配列を指す。調節配列には、プロモーター、転写リーダー配列、RNA プロセッシング部位、エフェクター結合部位及びステムループ構造が含まれ得る。

【0096】

本明細書で使用する時、「宿主細胞」は、新たに導入される DNA 配列のための宿主又は発現ビヒクルとして作用する能力を有する細胞を指す。したがって、本開示の特定の  
10 実施形態では、宿主細胞は、グラム陽性細胞（例えば、バチルス属 (*Bacillus* sp.)）及び／又はグラム陰性細胞（例えば大腸菌 (*E. coli*)) である。

【0097】

本明細書で使用する時、「改変細胞」は、改変細胞が由来する親、参照又は対照細胞中に存在しない少なくとも 1 つの遺伝子改変を含む組み換え細胞を指す。

【0098】

本明細書で使用する時、組み換え（改変）細胞における目的のタンパク質（POI）の発現及び／又は産生を非改変（対照）細胞における同じ POI の発現及び／又は産生と比較する場合、改変細胞及び未改変細胞は、同一条件（例えば、培地、温度、pH などの同一条件）下で増殖／培養／発酵されることが理解されるであろう。  
20

【0099】

本明細書で使用する時、「増加した量」は、「組み換え細胞が未改変（対照）細胞と比較して増加した量の目的のタンパク質を「発現／産生する」などの語句で使用される場合、具体的には組み換え細胞によって発現／産生された目的のタンパク質（POI）の「増加した量」を指すが、この「増加した量」は常に、同じ POI を発現／産生する未改変（対照）細胞と比較したものであり、改変及び未改変細胞は、同じ条件下で増殖／培養／発酵される。

【0100】

本明細書で使用する時、タンパク質産生を「増加させる」又は「増加した」タンパク質産生とは、増加した量のタンパク質（例えば、目的のタンパク質）が産生されたことを意味する。タンパク質は、宿主細胞の内部で産生されるか又は培養培地中に分泌（又は輸送）され得る。特定の実施形態では、目的のタンパク質は、培養培地中に産生（分泌）される。タンパク質産生の増加は、例えば、親宿主細胞と比較してより高い最大レベルの、タンパク質若しくは酵素活性（例えば、アミラーゼ活性など）又は産生される全細胞外タンパク質として検出することができる。  
30

【0101】

本明細書で使用する時、用語「改変」及び「遺伝子改変」は、互換的に使用され、以下を含む：（a）遺伝子（若しくはその ORF）における 1 つ以上のヌクレオチドの導入、置換若しくは除去又は遺伝子若しくはその ORF の転写若しくは翻訳に必要な調節エレメントにおける 1 つ以上のヌクレオチドの導入、置換又は除去、（b）遺伝子破壊、（c）  
40 遺伝子変換、（d）遺伝子欠失、（e）遺伝子のダウンレギュレーション、（f）特異的変異誘発、及び／或いは（g）本明細書に開示される任意の 1 つ以上の遺伝子のランダム変異誘発。

【0102】

特定の態様では、遺伝子改変とは、具体的には、本開示のプロ領域（アミノ酸）配列をコードする核酸（DNA）配列における 1 つ以上のヌクレオチドの導入、置換又は除去を指す。例えば、特定の実施形態では、配列番号 15 に記載される天然のプロ領域アミノ酸配列をコードする DNA 配列は、本明細書で説明されるとおりに遺伝子改変される。

【0103】

本明細書で使用する時、用語「導入すること」には、「グラム陽性細菌細胞に「遺伝  
50

子」、「ポリヌクレオチド」、「オープンリーディングフレーム」(ORF)、「遺伝子コード配列」、「ベクター」、「発現カセット」などを導入すること」といった語句で用いられる場合、ポリヌクレオチド(DNA)を細胞に導入するための当技術分野で既知の方法が含まれ、限定しないが、プロトプラスト融合、天然又は人工形質転換(例えば、塩化カルシウム、エレクトロポレーション)、形質導入、トランスフェクション、接合などが挙げられる。

#### 【0104】

本明細書で使用する時、「形質転換された」又は「形質転換」は、細胞が組み換えDNA技術の使用によって形質転換されていることを指す。形質転換は、一般的に、1つ以上のヌクレオチド配列(例えば、ポリヌクレオチド、ORF又は遺伝子)を細胞に挿入することによって発生する。挿入されたヌクレオチド配列は、異種ヌクレオチド配列(すなわち形質転換対象の細胞に天然に存在しない配列)であり得る。したがって、形質転換は、一般的に、DNAが、染色体組み込み体又は自己複製染色体外ベクターとして維持されるように、外来性DNAを宿主細胞に導入することを指す。

10

#### 【0105】

本明細書で使用する時、「形質転換DNA」、「形質転換配列」及び「DNA構築物」は、配列を宿主細胞又は生物に導入するために使用されるDNAを指す。形質転換DNAは、配列を宿主細胞又は生物に導入するために使用されるDNAである。このDNAは、インビトロでPCR又は任意の他の好適な技術によって生成され得る。いくつかの実施形態では、形質転換DNAは、入来配列を含むが、他の実施形態では、形質転換DNAは、ホモロジーボックスにフランキンクされた入来配列を更に含む。更に別の実施形態では、形質転換DNAは、末端に付加された、他の非相同配列(すなわちスタッファ配列又はフランク)を含む。末端は、例えば、ベクターへの挿入などのように、形質転換DNAが閉環を形成するように閉じることができる。

20

#### 【0106】

本明細書で使用する時、「遺伝子の破壊」又は「遺伝子破壊」は、互換的に使用され、宿主細胞が機能的遺伝子産物(例えば、タンパク質)を産生することを実質的に妨げる任意の遺伝子改変を広く指す。したがって、本明細書で使用する時、遺伝子破壊としては、フレームシフト突然変異、未成熟終止コドン(すなわち機能的タンパク質が作製されないように)、タンパク質内部欠失の活性を排除又は低減させる置換(機能的タンパク質が作製されないように)、コード配列を破壊する挿入、転写に必要な天然プロモーターとオープンリーディングフレームとの間の作動可能な連結を除去する突然変異などが挙げられるが、これらに限定されない。

30

#### 【0107】

本明細書で使用する「入来配列」は、細菌細胞染色体内に導入されるDNA配列を指す。いくつかの実施形態では、入来配列は、DNA構築物の一部である。他の実施形態では、入来配列は、1つ以上の目的のタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、入来配列は、形質転換対象の細胞のゲノム内に既に存在しても又はしなくてもよい(すなわち相同配列又は異種配列であり得る)配列を含む。いくつかの実施形態では、入来配列は、1つ以上の目的のタンパク質、遺伝子及び／又は突然変異若しくは改変遺伝子をコードする。代替の実施形態では、入来配列は、機能的な野生型遺伝子若しくはオペロン、機能的な変異遺伝子若しくはオペロン又は非機能的な遺伝子若しくはオペロンをコードする。いくつかの実施形態では、非機能的配列は、遺伝子の機能を崩壊させるために遺伝子に挿入され得る。別の実施形態では、入来配列は、選択マーカを含む。更に別の実施形態では、入来配列は、2つのホモロジーボックスを含む。

40

#### 【0108】

本明細書で使用する時、「ホモロジーボックス」は、細菌細胞染色体内の配列と相同である核酸配列を指す。より詳細には、ホモロジーボックスは、本発明に従い、欠失、破壊、不活化、ダウンレギュレートされる等の遺伝子又は遺伝子の一部の直接フランキンクするコード領域と約80～100%の配列同一性、約90～100%の配列同一性又は約

50

95～100%の配列同一性を有する上流又は下流領域である。これらの配列は、細菌細胞染色体内にDNA構築物が組み込まれる場所を指示し、染色体のどの部分を入来配列で置換するかを指示する。本開示を限定することを意図しないが、ホモロジーボックスは、約1塩基対(bp)～200キロ塩基(kb)を含み得る。好ましくは、ホモロジーボックスは、約1bp～10.0kb；1bp～5.0kb；1bp～2.5kb；1bp～1.0kb及び0.25kb～2.5kbを含む。ホモロジーボックスは、約10.0kb、5.0kb、2.5kb、2.0kb、1.5kb、1.0kb、0.5kb、0.25kb及び0.1kbも含み得る。一部の実施形態では、選択マーカーの5'及び3'末端は、ホモロジーボックスによってフランキングされ、ホモロジーボックスは、遺伝子のコード領域に直接フランキングする核酸配列を含む。

10

#### 【0109】

本明細書で使用する時、宿主細胞「ゲノム」、細菌(宿主)細胞「ゲノム」又はバチルス属(*Bacillus* sp.) (宿主)細胞「ゲノム」は、染色体遺伝子及び染色体外遺伝子を含む。

#### 【0110】

本明細書で使用する時、用語「プラスミド」、「ベクター」及び「カセット」は、多くの場合で細胞の中央代謝の一部ではない遺伝子を運び、且つ通常、環状の二本鎖DNA分子の形態の染色体外エレメントを指す。そのような要素は、多数のヌクレオチド配列が、選択された遺伝子産物のためのプロモーター断片及びDNA配列を適切な3'未翻訳配列と共に細胞内に導入できる固有の構造に接合又は再結合されている任意の起源に由来する、線状若しくは環状の、一本鎖若しくは二本鎖のDNA若しくはRNAの自己複製配列、ゲノム組み込み配列、ファージ又はヌクレオチド配列であり得る。

20

#### 【0111】

本明細書で使用する時、用語「プラスミド」は、クローニングベクターとして使用され、且つ多くの細菌及び一部の真核生物で染色体外の自己複製遺伝要素を形成する環状の二本鎖(ds)DNA構築物を指す。いくつかの実施形態では、プラスミドは宿主細胞のゲノム中に組み込まれるようになり、いくつかの実施形態では、プラスミドは親細胞中に存在し、娘細胞内で失われる。

#### 【0112】

本明細書で使用する時、「形質転換カセット」は、遺伝子(又はそのORF)を含み、外来遺伝子に加えて、特定の宿主細胞の形質転換を促進する要素を有する特異的ベクターを指す。

30

#### 【0113】

本明細書で使用する時、用語「ベクター」は、細胞内で複製(増殖)することができ、新たな遺伝子又はDNAセグメントを細胞中に運ぶことができる任意の核酸を指す。したがって、この用語は、様々な宿主細胞間を輸送するために設計された核酸構築物を指す。ベクターとしては、「エピソーム」(すなわち自律的に複製するか又は宿主生物の染色体に組み込むことができる)である、ウイルス、バクテリオファージ、プロウイルス、プラスミド、ファージミド、トランスポゾン並びにYAC(酵母人工染色体)、BAC(細菌人工染色体)、PLAC(植物人工染色体)などの人工染色体が挙げられる。

40

#### 【0114】

「発現ベクター」は、細胞内に異種DNAを組み込んで発現させる能力を有するベクターを指す。多数の原核生物及び真核生物の発現ベクターが市販されており、当業者に知られている。適切な発現ベクターの選択は、当業者の知識の範囲内である。

#### 【0115】

本明細書で使用する時、用語「発現カセット」及び「発現ベクター」は、標的細胞中の特定の核酸の転写を許容する一連の特定の核酸要素を用いて、組み換え又は合成的に生成される核酸構築物(すなわち、これらは、上述したベクター又はベクターエレメントである)を指す。組み換え発現カセットは、プラスミド、染色体、ミトコンドリアDNA、プラスチドDNA、ウイルス又は核酸断片内に組み込むことができる。通常、発現ベクタ

50

一の組み換え発現カセット部分には、配列の中でも、転写対象の核酸配列及びプロモーターが含まれる。いくつかの実施形態では、DNA構築物には、標的細胞内の特定の核酸の転写を許容する一連の特定の核酸要素も含まれる。ある特定の実施形態では、本開示のDNA構築物は、本明細書で定義する選択マーカー及び不活化染色体セグメント又は遺伝子セグメント又はDNAセグメントを含む。

#### 【0116】

本明細書で使用する時、「ターゲティングベクター」は、その中にターゲティングベクターが形質転換される宿主細胞の染色体内の領域に相同なポリヌクレオチド配列を含み、その領域で相同組み換えを駆動できるベクターである。例えば、ターゲティングベクターは、相同組み換えによって宿主細胞の染色体に突然変異を導入する際に使用される。いくつかの実施形態では、ターゲティングベクターは、他の非相同的配列を含み、これは、例えば末端に付加される（すなわちスタッファー配列又はフランキング配列）。末端は、例えば、ベクターへの挿入など、ターゲティングベクターが閉環するように閉じることができる。例えば、ある特定の実施形態では、親B．リケニフォルミス（*B．licheniformis*）（宿主）細胞は、それらの中に1つ以上の「ターゲティングベクター」を導入することによって改変される（例えば、形質転換される）。

#### 【0117】

本明細書で使用する時、「目的のタンパク質」又は「POI」という用語は、改変（組み換え）グラム陽性宿主細胞中で発現することが望まれる目的のポリペプチドを指し、POIは、増加したレベル（すなわち「未改変」（親又は対照）細胞と比較して）で発現することが好ましい。したがって、本明細書で使用する時、POIは、酵素、基質結合タンパク質、界面活性タンパク質、構造タンパク質、受容体タンパク質などであり得る。特定の実施形態では、本開示の改変細胞は、対照細胞と比較して増加した量の異種の目的のタンパク質を産生する。特定の実施形態では、本開示の改変細胞によって産生された目的のタンパク質の増加した量は、対照細胞と比較して、少なくとも0.5%の増加、少なくとも1.0%の増加、少なくとも5.0%の増加又は5.0%超の増加である。

#### 【0118】

同様に、本明細書で定義する場合、「目的の遺伝子」又は「GOI」は、POIをコードする核酸配列（例えば、ポリヌクレオチド、遺伝子又はORF）を指す。「目的のタンパク質」をコードする「目的の遺伝子」は、天然型遺伝子、変異遺伝子又は合成遺伝子であり得る。

#### 【0119】

本明細書で使用する時、用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、互換的に使用され、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸残基を含む任意の長さのポリマーを指す。本明細書では、アミノ酸残基に対し、従来の1文字コード又は3文字コードを使用する。ポリペプチドは、直鎖状又は分岐鎖状であり得、改変アミノ酸を含み得、且つ非アミノ酸によって分断され得る。ポリペプチドという用語は、自然に或いは介入、例えばジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化又は標識化成分との結合などの任意の他の操作若しくは改変によって改変されているアミノ酸ポリマーも包含する。この定義の範囲には、例えば、アミノ酸の1つ以上のアナログ（例えば、非天然アミノ酸などを含む）を含有するポリペプチド及び当技術分野で知られる他の改変も含まれる。

#### 【0120】

特定の実施形態では、本開示の遺伝子は、酵素（例えば、アセチルエステラーゼ、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、アラビナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、炭酸脱水酵素、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、キモシン、クチナーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エピメラーゼ、エステラーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -グルカナーゼ、グルカンリサラーゼ、エンド- $\beta$ -グルカナーゼ、グルコアミラーゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グリコシルヒドロラーゼ、ヘミセルラーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、ヒドロラーゼ、インペルターゼ、イソメラーゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、リアーゼ

、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、オキシドレダクターゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチンデポリメラーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、ペクチン分解酵素、ペルヒドロラーゼ、ポリオールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、フィターゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、ラムノーガラクトツロナーゼ、リボヌクレアーゼ、トランスフェラーゼ、輸送タンパク質、トランスグルタミナーゼ、キシラナーゼ、ヘキソースオキシダーゼ及びこれらの組み合わせ)などの商業的に関連する工業用の目的のタンパク質をコードする。

【0121】

本明細書で使用する時、「バリエーション」ポリペプチドは、一般的に、組み換えDNA技術による、1個以上のアミノ酸の置換、付加又は欠失による親(又は参照)ポリペプチドに由来するポリペプチドを指す。バリエーションポリペプチドは、少数のアミノ酸残基によって親ポリペプチドと異なり得、親(参照)ポリペプチドとの一次アミノ酸配列の相同性/同一性のレベルによって定義され得る。

10

【0122】

特定の1つ以上の実施形態では、バリエーションポリペプチドは、親(参照)ポリペプチド配列と、少なくとも約40%~約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91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0123】

本明細書で使用する時、「バリエーション」ポリヌクレオチドは、親(若しくは参照)ポリヌクレオチドと特定の程度の配列相同性/同一性を有するか、又はストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で親ポリヌクレオチド(又はその相補体)とハイブリダイズするポリヌクレオチドを指す。特定の1つ以上の実施形態では、本開示のバリエーションポリヌクレオチドは、少なくとも約40%~少なくとも約100%の親(参照)ポリヌクレオチド配列とのヌクレオチド配列同一性を含む。特定の他の実施形態では、バリエーションポリヌクレオチドは、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の親(参照)ポリヌクレオチド配列とのヌクレオチド配列同一性を含む。

20

30

【0124】

本明細書で使用する時、用語「突然変異」は、核酸配列内の任意の変化又は変更を指す。点突然変異、欠失突然変異、サイレント突然変異、フレームシフト突然変異、スプライシング突然変異などを含む数種のタイプの突然変異が存在する。突然変異は、特異的に(例えば、部位特異的変異誘発によって)又はランダムに(例えば、化学薬品、修復マイナス細菌株を通しての継代によって)行われ得る。

【0125】

本明細書で使用する時、ポリペプチド若しくはその配列に関連して、用語「置換」は、1つのアミノ酸と別のアミノ酸との取り換え(すなわち置換)を意味する。

40

【0126】

本明細書で使用する時、用語「相同性」は、相同ポリヌクレオチド又は相同ポリペプチドに関する。2つ以上のポリヌクレオチド又は2つ以上のポリペプチドが相同である場合、これは、それらの相同ポリヌクレオチド又は相同ポリペプチドが、少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より一層好ましくは少なくとも85%、更により好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%及び最も好ましくは少なくとも98%の「同一性度」を有することを意味する。2つのポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列が、本明細書で定義するように相同であるほどの十分に高い同一性度を有するか否かは、当技術分野で知られるコンピュータープログラム、例えば、GCGプログ

50

ラムパッケージで提供される「GAP」(Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711)を使用して2つの配列をアラインさせることにより好適に調べることができる(Needleman and Wunsch, (1970)。DNA配列比較のために以下の設定でGAPを使用: GAP作成ペナルティ5.0及びGAP伸長ペナルティ0.3。

#### 【0127】

本明細書で使用する時、用語「同一性パーセント(%)」は、配列アライメントプログラムを使用してアラインさせたときの、ポリペプチドをコードする核酸配列間又はポリペプチドのアミノ酸配列間の核酸又はアミノ酸配列の同一性のレベルを指す。

10

#### 【0128】

本明細書で使用する時、用語「比生産性」は、所定の期間にわたって、細胞1個当たり、単位時間当たりに産生するタンパク質の総量を指す。

#### 【0129】

本明細書で使用する時、用語「精製された」、「単離された」又は「濃縮された」は、生体分子(例えば、ポリペプチド又はポリヌクレオチド)が、それが天然に会合する天然型の構成要素の一部又は全部から分離することにより、その天然状態から変更されることを意味する。そのような単離又は精製は、最終組成物中の望ましくない全細胞、細胞残屑、不純物、外来タンパク質又は酵素を除去するための、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、疎水性分離、透析、プロテアーゼ処理、硫酸アンモニウム沈澱若しくは他のタンパク質塩析、遠心分離、サイズ排除クロマトグラフィー、濾過、精密濾過、ゲル電気泳動又は勾配による分離などの当技術分野で知られる分離技術によって実施され得る。精製又は単離した生体分子組成物には、その後更に、追加の便益を付与する構成要素、例えば、活性化剤、抗阻害剤、望ましいイオン、pH調節化合物又は他の酵素若しくは化学物質を添加することができる。

20

#### 【0130】

II. タンパク質の産生を強化するための変異体プロ配列

本明細書で概説され、且つ下記の実施例で記載されるとおり、本出願人は、組み換えタンパク質の生産性を強化するための特定の遺伝子改変(変異)をテスト/スクリーニングするために、部位評価ライブラリー(SEL)を設計及び構築した。具体的には、実施例で記載されるように、本開示の組み換えバチルス(Bacillus)株におけるタンパク質発現をモニターするために、組み換えタンパク質(酵素)をレポーターとして用いた。異種(組み換え)成熟タンパク質の発現/産生に使用するのに好適な特定のプロ領域配列が説明されてきている。例えば、国際公開第2008/112258号パンフレット及び同第2010/123754号パンフレットは、B. クラウシイ(B. clausii)アルカリ前駆体プロテアーゼ及びB. レンツス(B. lentus)サブチリシン前駆体プロテアーゼのプロ配列を説明しており、特定の变異体プロ配列が成熟プロテアーゼの生産性の強化をもたらした。国際公開第1993/20214号パンフレットは、B. サブチリス(B. subtilis)におけるグラム陰性リパーゼ発現のための特定のAp

30

40

#### 【0131】

より具体的には、以下の実施例で説明するとおり、例示的な(サブチリシン)レポータータンパク質をコードする発現構築物のプロ領域に対して遺伝子改変(SEL)を実施した。具体的には、実施例で大まかに記載されるとおり(図1~図3を参照されたい)、野生型(参照)プロ配列(配列番号15)に由来するプロ領域配列に対してSELを実施して、成熟サブチリシンレポータータンパク質の生産性を強化するための変異をスクリーニングした。

#### 【0132】

実施例1で説明されるとおり、バリエーションプロ領域配列A(30H、配列番号9、図1

50

）をコードするアミノ酸配列を鋳型として用いて部位評価ライブラリー（S E L）を作成して4.4 kbの断片として生成し、発現カセットの直鎖DNAを用いてコンピテントなバチルス（B a c i l l u s）細胞を形質転換した。実施例1で説明されたとおり、配列解析を実施して、S E Lから固有のプロ領域配列Aバリエーション及び／又はプロ領域配列Bバリエーションを決定し、バリエーションプロ領域配列A（配列番号9）の84個のアミノ酸位置のそれぞれを全て他の19個の天然アミノ酸残基に変更（置換）した。具体的には、表1（実施例1）は、レポータータンパク質をWTプロ配列（配列番号15）で発現させた参照構築物と比較した、72時間後のレポータータンパク質の生産性（性能指数（P I）値）の結果を示す。例えば、表1で示すように、プロ領域配列A（E 3 0 H、配列番号9）のP Iは、WTプロ配列（3 0 E；配列番号15）のP Iと比較して約50%増加した。同様に、表1で示すとおり、アミノ酸30位と組み合わせた1、2、3、4、6、14、19、20、23、36、37、38、39、42、43、44、49、50、64、65、67、68、71、83又は84位のいずれか1つにおける変異は、参照プロ領域配列（配列番号15）と比較して72時間におけるレポータータンパク質の生産性の強化を実証した。加えて、選択された変異体の組み合わせの約80%は、余分の正電荷を有していた（表1、Δ電荷を参照されたい）。

10

#### 【0133】

実施例3でより詳細に説明されるように、例示的な（サブチリシン）レポータータンパク質（B G 4 6 \_ \_ v a r i a n t 2）をコードする発現構築物のプロ領域に対して遺伝子改変（S E L）を実施した。より具体的には、バリエーションプロ領域配列B（3 0 G、配列番号11、図1）をコードするアミノ酸配列を鋳型として用いて、本開示の1つ以上のプロ領域を含む直鎖DNA発現カセットを生成した。具体的には、78個のアミノ酸の野生型A p r Eプロペプチド配列（配列番号12）の5'配列を用いて、最初の3個のアミノ酸残基（1～3位、「A G K」、配列番号12）を、アラニン（A）である最初のアミノ酸残基と交換して、バリエーションプロ領域配列C（配列番号14、G K挿入、図2）を得た。例えば、表1（実施例1）で示すように、プロ領域バリエーションA配列の変異体（配列番号9、表1、変異体「E 3 0 G」）は、72時間の増殖後、野生型のプロ領域（表1、P I 1.0）及びプロ領域バリエーションA配列（配列番号11、表1、変異体「E 3 0 H」、P I 1.5）と比較して、レポータータンパク質の高い発現（P I 2.3）を示した。

20

30

#### 【0134】

本開示の実施例4は、アミノ酸グリシン（G）及びリシン（K）が挿入された（「G K」）、参照プロ領域配列（配列番号15）に基づくコンビナトリアルライブラリーの調製を更に説明する。より具体的には、実施例3で説明されるように、アミノ酸残基G Kを野生型プロ領域配列（配列番号15）のN末端に挿入して、図2のアライメントに示される86個のアミノ酸位置を含む、配列番号14に記載されるプロ領域バリエーションCのアミノ酸配列を得た。例えば、表2（実施例4）は、B G 4 6 \_ \_ v a r i a n t 2レポータータンパク質の生産性（P I）の増加を示したプロ領域変異体の組み合わせを示し、電荷（Δ電荷）の変化は、概ね+1～+4であった（表2）。特定の態様では、本出願人は、こうした正電荷が、プロ領域配列のループ領域（例えば、参照配列番号15の残基位置66～73など）における組み合わせとして好適であることに気づいた。

40

#### 【0135】

表2に示すように、S E Lプロ領域バリエーションC配列（配列番号14に由来）のP I値は、野生型（WT）プロ領域配列（配列番号15）のP I値と比較され、アミノ酸位置の番号付け（表2、1列目）は、WTプロ領域配列（すなわち「A G K」挿入がない）との比較である。したがって、実施例4で説明されたとおり、表2に記載されるプロ領域バリエーションC配列は、72時間の増殖後、野生型のプロ領域（表2、P I 1.0）及びプロ領域バリエーションB配列（変異体、「E 3 0 G」、P I 1.7）と比較してレポータータンパク質の高い発現を示した（約1.9～2.3のP I値）。

#### 【0136】

50

実施例 5 で概ね説明されるように、B. リケニフォルミス (B. licheniformis) 株の場合と同様に、発現をモニターするために BG46\_\_variant 2 サブチリシンをレポータータンパク質として用いた。より具体的には、本開示のバリエーションプロ領域配列をコードする DNA を、成熟した BG46\_\_variant 2 タンパク質をコードする DNA 配列に作動可能に連結させ、菌株は、実施例 5 で概ね説明されるとおりに構築した。例えば、E30G 変異 (配列番号 11) を含む対照プロ領域配列 B と比較した、バリエーションプロ領域配列を含む B. リケニフォルミス (B. licheniformis) 株の PI 値を表 3 に示し、バリエーションプロ領域配列は、72 時間の増殖後、対照プロ領域配列 (E30G) と比較してレポータータンパク質の高い発現を示した。

【0137】

実施例 6 でより詳細に説明されるように、バリエーションプロ領域配列 C (配列番号 14) の追加の N 末端の改変を実施した。例えば、バリエーションプロ領域配列 C (86 個のアミノ酸位置を有する) を更に改変して、3 位でリシン (K) の後にアラニン (A) 又はセリン (S) などの追加のアミノ酸を導入 (挿入) した。具体的には、実施例 6 で説明される (且つ図 1 ~ 図 3 に示される) ように、バリエーションプロ領域配列 D (配列番号 29、GKS 挿入)、E (配列番号 30、GKA 挿入) 及び F (GKAA 挿入; 配列番号 31) が構築され、プロ領域バリエーション配列 D、E 及び F の性能指数 (PI) 値 (表 4) がバリエーションプロ領域配列 C (配列番号 14、「GK」挿入) と比較される。表 4 に示すとおり、3 つの N 末端プロ領域変異体 (GKA、GKS、GKAA) の PI 指数は、72 時間の増殖後、プロ領域配列 C (GK、配列番号 14) と比較してレポータータンパク質 BG46\_\_variant 2 サブチリシン (配列番号 8) の高い発現を示した。

【0138】

同様に、プロ領域配列の特定の C 末端改変を、実施例 7 で説明するとおりに実施した。具体的には、図 1 ~ 3 で示すように、バリエーションプロ領域配列 B (配列番号 11) を更に操作して 68 位のロイシン (L) 残基をリシン (K) で置換し、72 位のイソロイシン (I) をバリン (V) で置換して、バリエーションプロ領域配列 G (配列番号 32) を生成したか、又は操作して 68 位のロイシン (L) 残基をリシン (K) で置換し、72 位 (80) のグルタミン酸 (E) をイソロイシン (I) で置換して、バリエーションプロ領域配列 F (配列番号 33) を生成した。表 5 に示すように、バリエーションプロ領域配列 G (配列番号 32) 及び H (配列番号 33) の PI 値は、参照 (対照) バリエーションプロ領域 B 配列 (配列番号 11) と比較して増加した。

【0139】

したがって、本開示の特定の実施形態は、とりわけ、新規なプロ領域配列をコードする組み換えポリヌクレオチド、成熟した目的のタンパク質をコードする DNA 配列に作動可能に連結された新規なプロ領域配列をコードする DNA 配列を含む発現カセット、新規なプロ領域配列を含む前駆体タンパク質をコードするポリヌクレオチドを発現する改変グラム陽性細菌細胞 / 株などを提供する。特定の態様では、本開示の新規なバリエーション (変異体) プロ領域配列は、配列番号 15 の野生型 B. レンツス (B. lentus) プロ配列由来のアミノ酸配列を含む。

【0140】

本明細書で使用する時、「バリエーションプロ領域」という語句は、1 つ以上のアミノ酸の置換、付加又は欠失により、典型的には組み換え DNA 技術によって参照プロ領域配列から誘導されるポリペプチド配列を指す。バリエーションプロ領域 (アミノ酸) 配列は、参照 (親) プロ領域配列と少数のアミノ酸残基だけ異なり得、参照 (親) プロ領域配列との一次アミノ酸配列の相同性 / 同一性のレベルによって定義され得る。

【0141】

上記のように、2 つのポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列に関連する「同一の」という用語は、下記で説明され、且つ当技術分野で既知である配列比較アルゴリズム又は配列解析アルゴリズムを用いて測定して、対応が最大になるようにアラインさせたときに同じとなる 2 つの配列中のヌクレオチド又はアミノ酸を指す。「パーセント (%) 同一

10

20

30

40

50

性」(略称「PID」)という語句は、ポリヌクレオチド(核酸)又はポリペプチド(アミノ酸)の配列同一性を指す。パーセント同一性は、当技術分野で既知の標準的手法を使用して決定され得る。特定の態様では、目的の配列によって共有されるアミノ酸同一性のパーセントは、配列をアラインし、例えばBLAST、MUSCLE又はCLUSTALなどのアライメントプログラム／アルゴリズムを使用して、配列情報を直接比較することによって決定され得る。例えば、BLASTアルゴリズムは、Altschul et al. (1990)及びKarlin et al. (1993)で説明されている。具体的には、アミノ酸配列同一性値のパーセント(%)は、一致する同一残基の数を、最適／最大アライメントのためにプログラムにより作られたあらゆるギャップを含む「参照」配列の総残基数で除算することにより決定される。BLASTアルゴリズムは、「参照」配列を「クエリー」配列と呼ぶ。

10

#### 【0142】

本明細書で使用する時、「相同プロ領域」は、一次、二次及び／又は三次構造で明確な類似性を有するプロ領域を指す。タンパク質相同性は、タンパク質がアラインされた場合の直鎖アミノ酸配列における類似性を指し得る。相同性は、アミノ酸配列アライメントにより、例えばBLAST、MUSCLE又はCLUSTALなどのプログラムを使用して決定され得る。タンパク質配列の相同性検索は、NCBI BLASTのBLASTP及びPSI-BLASTを使用して、0.001の閾値(E値カットオフ)で実施することができる(例えば、Altschul et al., 1997を参照されたい)。

#### 【0143】

BLASTプログラムは、数種の検索パラメーターを使用するが、そのほとんどは、デフォルト値に設定される。NCBI BLASTアルゴリズムは、生物学的類似性に関して最も関連する配列を見出すが、20個未満の残基のクエリー配列には推奨されていない(Altschul et al., 1997及びSchaffer et al., 2001)。核酸配列検索のための典型的なデフォルトBLASTパラメーターとしては、隣接ワード閾値=11; E値カットオフ=10; スコアリングマトリックス=NUC. 3.1(マッチ=1、ミスマッチ=-3); ギャップオープニング=5; 及びギャップエクステンション=2が挙げられる。アミノ酸配列検索のための典型的なデフォルトBLASTパラメーターとしては、ワードサイズ=3; E値カットオフ=10; スコアリングマトリックス=BLOSUM62; ギャップオープニング=11; 及びギャップエクステンション=1が挙げられる。この情報を使用して、タンパク質配列をグループ分けすることができ、且つ／又はそれから系統樹を生成することができる。アミノ酸配列は、Vector NTI Advance suiteなどのプログラムに入力することができ、ガイドツリーは、Neighbor Joining(NJ)法(Saitou and Nei, 1987)を使用して作成することができる。系統樹の構築は、木村の配列距離補正を使用し、ギャップを含む位置を無視して計算することができる。AlignXなどのプログラムは、系統樹上に示された分子名に続く括弧内に計算距離値を提示することができる。

20

30

#### 【0144】

分子間の相同性についての理解は、分子の進化史並びに分子の機能に関する情報を明らかにすることができ、新規に配列決定したタンパク質が、既に特性解析されたタンパク質と相同であれば、新規なタンパク質の生化学的機能を強く示すものとなる。2つの分子は、共通の祖先から誘導された場合に相同であるとされる。相同分子若しくはホモログは、パラログとオルトログとの2つのクラスに分類することができる。パラログは、1つの種内に存在するホモログである。パラログは、多くの場合、それらの詳細な生化学的機能が相違する。オルトログは、異なる種に存在するホモログであり、極めて類似した又は同一の機能を有する。タンパク質スーパーファミリーは、共通の祖先を推察することができる、タンパク質の最大のグループ(系統群)である。通常、この共通の祖先は、配列アライメントと機構類似性に基づいている。

40

#### 【0145】

50

CLUSTAL Wアルゴリズムは、配列アライメントアルゴリズムの別の例である (Thompson et al., 1994)。CLUSTAL Wアルゴリズムのデフォルトパラメーターとしては、ギャップオープニングペナルティ (= 10.0 ; ギャップエクステンションペナルティ = 0.05 ; タンパク質重量マトリックス = BLOSUMシリーズ ; DNA重量マトリックス = IUB ; ディレイ発散数列 (%) = 40 ; ギャップ分離距離 = 8 ; DNAトランジション重量 = 0.50 ; 親水性残基のリスト = GPSENDQEK R ; 負のマトリックスの使用 = OFF ; トグル残基特異的ペナルティ = ON ; トグル親水性ペナルティ = ON ; 及びトグルエンドギャップ分離ペナルティ = OFF が挙げられる。CLUSTAL Wアルゴリズムでは、いずれか一方の末端で発生する欠失が含まれる。例えば、500個のアミノ酸からなるポリペプチドの一方の末端 (又はポリペプチド内) で5個のアミノ酸が欠失したバリエーションは、「参照」ポリペプチドに対して、99% (495個 / 500個の同一残基 × 100) の配列同一性を有する。そのようなバリエーションは、ポリペプチドに対して「少なくとも99%の配列同一性」を有するバリエーションに含まれるであろう。

10

20

30

40

50

#### 【0146】

特定の実施形態では、バリエーションプロ領域配列は、本開示の参照 (親) プロ領域配列と、少なくとも約40% ~ 約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91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する。特定の実施形態では、プロ領域配列は、配列番号15、配列番号9、配列番号11、配列番号14、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32及び/又は配列番号33に対する相同性を含むアミノ酸配列に由来する。このため、特定の態様では、本明細書で説明される1つ以上のプロ領域バリエーションのアミノ酸改変は、配列番号15、配列番号9、配列番号11、配列番号14、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32及び/又は配列番号33のプロ領域アミノ酸配列を参照することによって番号付けされる。

#### 【0147】

特定の態様では、新規な (バリエーション) プロ領域配列は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有する親 (参照) プロ領域配列から誘導される。特定の実施形態では、バリエーションプロ領域配列は、配列番号15のアミノ酸 (位置) 番号付けに従い、アミノ酸 (残基) 30位並びに1、2、3、4、6、14、16、19、20、23、36、37、38、39、42、43、44、49、50、64、65、67、68、71、79、83及び84位からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸残基位置に変異を含む。

#### 【0148】

他の実施形態では、本開示のバリエーションプロ領域配列は、2位にグリシン (G) 及び3位にリシン (K) のアミノ酸挿入と、1、32、38、46、66、67、70及び73位から選択される1つ以上の位置にアミノ酸置換とを含み、アミノ酸位置は、配列番号14に従って番号付けされている。特定の実施形態では、新規な (バリエーション) プロ領域配列は、配列番号14のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を含む参照プロ領域配列から誘導される。

#### 【0149】

他の実施形態では、本開示のバリエーションプロ領域配列は、2位にグリシン (G)、3位にリシン (K) 及び4位にセリン (S) のアミノ酸挿入を含み、アミノ酸位置は、配列番号29に従って番号付けされている。特定の実施形態では、新規な (バリエーション) プロ領域配列は、配列番号29のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を含む参照プロ領域配列から誘導され

る。

【0150】

他の実施形態では、本開示のバリエーションプロ領域配列は、2位にグリシン（G）、3位にリシン（K）及び4位にアラニン（A）のアミノ酸挿入を含み、アミノ酸位置は、配列番号30に従って番号付けされている。特定の実施形態では、バリエーションプロ領域配列は、配列番号30のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を含む参照プロ領域配列から誘導される。

【0151】

他の実施形態では、本開示のバリエーションプロ領域配列は、2位にグリシン（G）、3位にリシン（K）、4位にアラニン（A）及び5位にアラニン（A）のアミノ酸挿入を含み、アミノ酸位置は、配列番号31に従って番号付けされている。特定の実施形態では、バリエーションプロ領域配列は、配列番号31のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を含む参照プロ領域配列から誘導される。

10

【0152】

特定の他の実施形態では、バリエーションプロ領域配列は、配列番号11のアミノ酸配列（G30；プロ領域B配列）と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有する親（参照）プロ領域配列から誘導される。

20

【0153】

特定の実施形態では、バリエーションプロ領域配列は、68位、72位及び80位から選択される位置に少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、アミノ酸位置は、配列番号9、配列番号11、配列番号15、配列番号32又は配列番号33に従って番号付けされている。

【0154】

特定の他の実施形態では、バリエーションプロ領域配列は、配列番号9、配列番号11、配列番号15、配列番号32又は配列番号33のアミノ酸（位置）番号付けに従い、アミノ酸（残基）30位並びに1、2、3、4、6、14、16、19、20、23、36、37、38、39、42、43、44、49、50、64、65、67、68、71、79、83及び84位からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸残基位置に変異を含む。

30

【0155】

特定の実施形態では、バリエーションプロ領域配列は、配列番号9、配列番号11、配列番号14、配列番号15、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32及び配列番号33の参照（親）配列などのプロ領域配列の正味電荷が参照（親）プロ領域配列に対して正電荷（例えば+1の正味電荷）であるように設計、操作、構築されるなどする。特定の実施形態では、本開示のバリエーションプロ領域配列は、プロ領域配列の正味電荷が少なくとも正1（+1）～約正4（+4）であるように設計、操作、構築されるなどする。他の1つ以上の実施形態では、本開示のバリエーションプロ領域配列は、表1、表2、表3、表4及び／又は表5に記載される1つ以上のアミノ酸改変を含む。

40

【0156】

III. 組み換えポリヌクレオチド及び分子生物学

上記で大まかに記載したとおり、本開示の特定の実施形態は、新規な変異体プロ領域配列に関する。関連する態様では、本開示は、1つ以上の変異体プロ領域核酸（DNA）配列を含む組み換えポリヌクレオチドを提供する。したがって、特定の実施形態は、組み換えポリヌクレオチド（例えば、ベクター、プラスミド、発現カセットなど）、目的のタンパク質を発現する組み換えグラム陽性細菌細胞／株などに関する。特定の態様では、本開示は、目的のタンパク質の産生を強化するために組み換えグラム陽性細菌細胞（株）に導入するのに適したポリヌクレオチド構築物を提供する。特定の態様では、本開示のポリヌクレオチド構築物は発現カセットと称され、カセットは、5'から3'の方向に、且つ作動

50

可能な組み合わせで、少なくとも、成熟した目的のタンパク質（POI）をコードする下流（3'）遺伝子CDSに連結された上流（5'）プロ領域DNA配列を含む。

【0157】

例えば、本明細書に記載の1つ以上の核酸配列は、任意の好適な合成、操作及び／若しくは単離技術又はそれらの組み合わせを使用することによって生成され得る。例えば、本明細書で説明される1つ以上のポリヌクレオチドは、標準的な核酸合成技術、例えば、当業者に周知の固相合成技術を用いて産生することができる。こうした技術では、通常で最大50個以上のヌクレオチド塩基からなる断片が合成され、続いて連結されて（例えば酵素的又は化学的ライゲーション法によって）、実質的に任意の所望される連続核酸配列を形成する。本明細書で説明される1つ以上のポリヌクレオチドの合成は、自動合成法で一般的に実践されているように、古典的ホスホラミダイト法（例えば、Beaucage and Caruthers, 1981）又はMatthes et al. (1984) によって説明される方法を用いた化学合成が挙げられるが、これらに限定されない、当技術分野で既知の任意の適切な方法によっても促進され得る。本明細書で説明される1つ以上のポリヌクレオチドは、自動DNA合成装置を使用することによっても産生することができる。カスタマイズされた核酸は、様々な商業的供給源から注文可能である（例えば、ATUM (DNA 2.0), Newark, CA, USA; Life Tech (GeneArt), Carlsbad, CA, USA; GenScript, Ontario, Canada; Base Clear B.V., Leiden, Netherlands; Integrated DNA Technologies, Skokie, IL, USA; Ginkgo Bioworks (Gen9), Boston, MA, USA; 及びTwist Bioscience, San Francisco, CA, USA)。核酸を合成するための他の技術及び関連する原理は、当技術分野で説明されており、且つ既知である。

10

20

【0158】

例えば、制限エンドヌクレアーゼ消化、ライゲーション、逆転写及びcDNA産生並びにポリメラーゼ連鎖反応（例えば、PCR）など、核酸の改変に有用な組み換えDNA技術が当技術分野で周知である。本明細書に記載の1つ以上のポリヌクレオチドは、本明細書で説明される1つ以上のバリエーションをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするか又はこのポリヌクレオチドをPCR増幅する1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを用いてcDNAライブラリーをスクリーニングすることによっても得ることができる。cDNAクローンをスクリーニングして単離する方法及びPCR増幅法は、当業者に周知であり、当業者に公知の標準的な参考文献に記載されている。本明細書で説明される1つ以上のポリヌクレオチドは、天然の（例えば、本明細書で説明される1つ以上のバリエーションプロ領域配列をコードする）ポリヌクレオチド骨格を、例えば既知の変異誘発手順（例えば、部位特異的変異誘発、部位飽和変異誘発及びインビトロ組み換え）によって変更することによって得ることができる。本明細書で説明される1つ以上のバリエーションをコードする本明細書で説明される改変ポリヌクレオチドを生成するのに好適な様々な方法が当技術分野で既知であり、例えば部位飽和変異誘発、系統変異誘発、挿入的変異誘発、欠失変異誘発、ランダム変異誘発、部位特異的変異誘発及び定向進化並びに様々な他の組み換え方法が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0159】

上記で大まかに記載され、下記の実施例でより詳細に説明されるとおり、本開示の特定の実施形態は、より多くの量の異種の目的のタンパク質を産生することが可能な、組み換え（改変）グラム陽性細胞に関する。したがって、特定の実施形態は、タンパク質産生能力が増加した、かかる組み換えグラム陽性細胞を構築する方法に関する。特定の実施形態では、目的のタンパク質をコードする1つ以上の発現カセットが、本開示のグラム陽性細胞に導入される。例示的な実施形態では、カセットは細胞のゲノムに組み込まれる。したがって、特定の実施形態は、組み換え（改変）グラム陽性宿主細胞の構築に使用するのに好適な、核酸分子、ポリヌクレオチド（例えば、ベクター、プラスミド、発現カセット）

50

、調節エレメントなどに関する。

【0160】

したがって、実施例で提示され、本明細書で大まかに説明されるとおり、本開示の組み換え細胞は、当業者により、当技術分野で周知の標準的且つ慣例的な組み換えDNA及び分子クローニング技法を用いて構築され得る。遺伝子改変の方法としては、(a) 遺伝子における1つ以上のヌクレオチドの導入、置換若しくは除去又は遺伝子の転写若しくは翻訳に必要な調節エレメントにおける1つ以上のヌクレオチドの導入、置換又は除去、(b) 遺伝子破壊、(c) 遺伝子変換、(d) 遺伝子欠失、(e) 遺伝子の下方制御、(f) 部位特異的変異誘発、及び／或いは(g) ランダム変異誘発が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0161】

特定の実施形態では、本開示の改変細胞は、当技術分野で周知の方法、例えば挿入、破壊、置換又は欠失を使用して、遺伝子の発現を減少又は消失させることによって構築され得る。改変又は不活化対象の遺伝子部分は、例えば、コード領域又はコード領域を発現させるために必要とされる調節エレメントであり得る。

【0162】

このような調節又は制御配列の例は、プロモーター配列又はその機能的部分（すなわち核酸配列の発現に十分に影響を及ぼし得る部分）であり得る。改変のための他の制御配列としては、リーダー配列、プロペプチド配列、シグナル配列、転写ターミネーター、転写活性化因子などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0163】

特定の他の実施形態では、改変細胞は、遺伝子の発現を消失又は減少させる遺伝子欠失によって構築される。遺伝子欠失技術は、遺伝子の部分的又は完全な除去を可能にし、それによりそれらの発現を排除するか又は非機能的（若しくは活性が減少した）タンパク質産物を発現させる。そのような方法では、遺伝子の欠失は、遺伝子にフランキングする5'及び3'領域を隣接して含有するように構築されているプラスミドを用い、相同組み換えによって遂行され得る。隣接する5'及び3'領域は、例えば、プラスミドが細胞内に定着するのを可能にする許容温度で第2の選択可能マーカーと会合している感温性プラスミド上で細胞内に導入され得る。続いて、細胞を非許容温度にシフトさせて、相同フランキング領域の1つで染色体に組み込まれたプラスミドを有する細胞を選択する。プラスミド組み込みの選択は、第2の選択可能マーカーの選択の影響を受ける。組み込み後、第2の相同フランキング領域での組み換え事象を、細胞を選択せずに数世代にわたって許容温度にシフトさせることによって刺激する。細胞をプレーティングして単一コロニーを得て、このコロニーを両方の選択可能マーカーの消失について試験する。したがって、当業者は、完全又は部分的欠失に好適な遺伝子のコード配列及び／又は遺伝子の非コード配列中のヌクレオチド領域を容易に同定し得る。

30

【0164】

他の実施形態では、改変細胞は、その転写又は翻訳に必要な遺伝子又は調節エレメント内の1つ以上のヌクレオチドを導入、置換又は除去することによって構築される。例えば、停止コドンの導入、開始コドンの除去又はオープンリーディングフレームのフレームシフトを生じさせるように、ヌクレオチドを挿入又は除去し得る。このような改変は、当技術分野で知られた方法に従い、部位特異的変異誘発又はPCR生成変異誘発によって達成され得る。したがって、特定の実施形態では、本開示の遺伝子は、完全又は部分的欠失によって不活化される。

40

【0165】

別の実施形態では、改変細胞は、遺伝子変換プロセスによって構築される。例えば、遺伝子変換法では、遺伝子に対応する核酸配列をインビトロで変異させて欠陥のある核酸配列を生成し、次にこの核酸配列を親細胞に形質転換して欠陥のある遺伝子を生成する。相同組み換えにより、欠陥のある核酸配列が内因性遺伝子に取って代わる。欠陥のある遺伝子又は遺伝子断片が、欠陥のある遺伝子を含有する形質転換体の選択に使用され得るマ

50

カーもコードすることが望ましい場合がある。例えば、欠陥のある遺伝子は、選択可能マーカールと会合している非複製プラスミド又は感温性プラスミド上に導入され得る。プラスミド組み込みの選択は、プラスミドの複製を許容しない条件下でそのマーカールを選択することの影響を受ける。遺伝子置換をもたらす第2の組み換え事象の選択は、選択可能マーカールの消失及び変異遺伝子の獲得に関してコロニーを調査することの影響を受ける。代わりに、欠陥のある核酸配列は、以下に記載するように、遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの挿入、置換又は欠失を含有し得る。

#### 【0166】

他の実施形態では、改変細胞は、遺伝子の核酸配列と相補的であるヌクレオチド配列を使用する確立されたアンチセンス技術によって構築される。より具体的には、グラム陽性細胞による遺伝子の発現は、この遺伝子の核酸配列に相補的なヌクレオチド配列を導入することにより減少（下方制御）又は消失させることができ、これは細胞内で転写され得、細胞内で産生されたmRNAにハイブリダイズすることができる。したがって、相補的アンチセンスヌクレオチド配列がmRNAにハイブリダイズできる条件下では、翻訳されるタンパク質量は減少又は消失される。こうしたアンチセンス法としては、限定されないが、RNA干渉（RNAi）、低分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA（miRNA）、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどが挙げられ、これらの全てが当業者に周知である。

#### 【0167】

他の実施形態では、改変細胞は、CRISPR-Cas9編集によって産生／構築される。例えば、目的のタンパク質をコードする遺伝子を、DNAの標的配列にエンドヌクレアーゼを動員するガイドRNA（例えば、Cas9）及びCpf1又はガイドDNA（例えば、NgAgo）のいずれかに結合することにより、それらの標的DNAを見出す核酸誘導型エンドヌクレアーゼによって編集又は破壊（又は欠失若しくは下方制御）し得、エンドヌクレアーゼは、DNA中で一本鎖又は二本鎖切断を生成することができる。この標的化DNA切断は、DNA修復のための基質となり、遺伝子を破壊又は欠失させるために提供された編集鋳型と再結合し得る。例えば、核酸誘導型エンドヌクレアーゼ（この目的ではS.ピオゲネス（S. pyogenes）由来Cas9）をコードする遺伝子又はCas9ヌクレアーゼをコードするコドン最適化遺伝子が、グラム陽性細胞中で活性なプロモーター及びグラム陽性細胞中で活性なターミネーターに作動可能に連結され、それによりグラム陽性細胞Cas9発現カセットを生成する。同様に、目的の遺伝子に固有の1つ以上の標的部位は、当業者により容易に同定される。例えば、目的遺伝子内の標的部位に向けられたgRNAをコードするDNA構築物を構築するためには、可変ターゲティングドメイン（VT）は、そのヌクレオチドが、S.ピオゲネス（S. pyogenes）Cas9に対するCas9エンドヌクレアーゼ認識ドメイン（CER）をコードするDNAに融合している、（PAM）プロトスペーサー隣接モチーフ（TGG）の5'側である標的部位のヌクレオチドを含むであろう。VTドメインをコードするDNAとCERドメインをコードするDNAとの組み合わせは、それによりgRNAをコードするDNAを生成する。したがって、gRNAのためのグラム陽性発現カセットは、gRNAをコードするDNAを、グラム陽性細胞中で活性なプロモーター及びグラム陽性細胞中で活性なターミネーターに作動可能に連結することによって生成される。

#### 【0168】

特定の実施形態では、エンドヌクレアーゼによって誘導されたDNA切断は、入来配列を用いて修復／置換される。例えば、上述したCas9発現カセット及びgRNA発現カセットによって生成されたDNA切断を精密に修復するためには、細胞のDNA修復機構が編集鋳型を利用できるように、ヌクレオチド編集鋳型が提供される。例えば、標的化遺伝子の約500bpの5'側は、編集鋳型を生成するために標的化遺伝子の約500bpの3'側に融合させることができ、この鋳型は、RGENによって生成されたDNA切断を修復するためにグラム陽性宿主の機構によって使用される。

#### 【0169】

C a s 9 発現カセット、g R N A 発現カセット及び編集鋳型は、多数の様々な方法（例えば、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、天然コンピテンス又は誘導コンピテンス）を使用して糸状菌細胞に共送達され得る。形質転換細胞は、遺伝子座をフォワードプライマー及びリバースプライマーを用いて増幅させることにより、標的遺伝子座をP C R 増幅させることによってスクリーニングされる。これらのプライマーは、野生型遺伝子座又はR G E N によって編集されている改変遺伝子座を増幅させることができる。次いで、これらの断片は、編集されたコロニーを同定するために、シーケンシングプライマーを使用して配列決定される。

#### 【0170】

更に他の実施形態では、改変細胞は、化学的変異誘発及び転位を含むが、それらに限定されない、当技術分野で周知の方法を使用したランダム変異誘発又は特異的変異誘発によって構築される。遺伝子の改変は、親細胞に突然変異誘発を受けさせ、且つその中で遺伝子の発現が低減又は排除されている変異細胞についてスクリーニングすることによって実施され得る。変異誘発は、特異的又はランダムであり得、例えば好適な物理的若しくは化学的変異誘発剤の使用、好適なオリゴヌクレオチドの使用又はD N A 配列をP C R 生成変異誘発に供することによって実施され得る。更に、変異誘発は、これらの変異誘発法の任意の組み合わせを使用することにより実施され得る。

#### 【0171】

本発明の目的に好適な物理的又は化学的な変異誘発剤の例としては、紫外線（U V ）照射、ヒドロキシルアミン、N -メチル-N' -ニトロ-N -ニトロソグアニジン（M N N G ）、N -メチル-N' -ニトロソグアニジン（N T G ）、O -メチルヒドロキシルアミン、亜硝酸、エチルメタンスルホネート（E M S ）、亜硫酸水素ナトリウム、蟻酸及びヌクレオチドアナログが挙げられる。このような薬剤を使用する場合、変異誘発は、一般的に、好適な条件下で最適な変異誘発剤の存在下で変異誘発対象の親細胞をインキュベートし、且つ遺伝子の減少した発現を示すか又は発現を示さない変異細胞を選択することによって実施される。

#### 【0172】

国際公開第2003/083125号パンフレットは、グラム陽性（バチルス（B a c i l l u s ））細胞を改変する方法、例えば大腸菌（E . c o l i ）をバイパスするためにP C R 融合を使用するバチルス（B a c i l l u s ）欠失株及びD N A 構築物の作製を開示する。国際公開第2002/14490号パンフレットは、（1）統合的プラスミド（p C o m K ）の構築及び形質転換、（2）コード配列、シグナル配列及びプロペプチド配列のランダム突然変異誘発、（3）相同組み換え、（4）形質転換D N A に非相同フラunkを付加することにより形質転換効率を増加させること、（5）二重交差組み込みを最適化すること、（6）部位特異的突然変異誘発、及び（7）マーカーレス欠失を含むバチルス属（B a c i l l u s ）細胞を改変する方法を開示している。

#### 【0173】

当業者は、ポリヌクレオチド配列を細菌細胞（例えば、グラム陰性細胞、グラム陽性細胞）に導入するのに好適な方法を十分に認識している。実際、プロトプラストの形質転換及び集合、形質導入並びにプロトプラストの融合を含む形質転換等の方法が知られており、本開示における使用に適している。形質転換法は、本開示のD N A 構築物を宿主細胞に導入するのに特に好ましい。

#### 【0174】

一般に使用される方法に加えて、いくつかの実施形態では、宿主細胞を直接、形質転換する（すなわち宿主細胞内に導入する前にD N A 構築物を増幅させるか又は他にプロセッシングするために中間細胞を使用しない）。D N A 構築物の宿主細胞内への導入には、D N A を、プラスミド又はベクター内に挿入することなく宿主細胞内に導入するための当技術分野で知られている物理的及び化学的方法も含まれる。このような方法としては、以下に限定されないが、塩化カルシウム沈降法、エレクトロポレーション法、裸のD N A 法、リポソーム法などが挙げられる。更なる実施形態では、D N A 構築物は、プラスミドに挿入

することなく、プラスミドと共に同時形質転換される。更なる実施形態では、選択マーカーは、当技術分野で既知の方法により、改変バチルス属 (*Bacillus*) 菌株から欠失又は実質的に切除される。幾つかの実施形態では、宿主染色体からのベクターの分割では、染色体内のフランキング領域を残し、一方、固有の染色体領域を除去する。

#### 【0175】

グラム陽性細胞中で遺伝子の発現に使用するためのプロモーター及びプロモーター配列領域、そのコード配列 (CDS)、オープンリーディングフレーム (ORF) 及び／又はバリエーション配列は、一般的に当業者に既知である。本開示のプロモーター配列は、一般的に、それらがグラム陽性細胞中で機能するように選択される。例えば、バチルス (*Bacillus*) 細胞中で遺伝子発現を駆動するのに有用なプロモーターとしては、B. サブチリス (*B. subtilis*) アルカリプロテアーゼ (*aprE*) プロモーター、B. サブチリス (*B. subtilis*) の  $\alpha$ -アミラーゼプロモーター (*amyE*)、B. リケニフォルミス (*B. licheniformis*) の  $\alpha$ -アミラーゼプロモーター (*amyL*)、B. アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*) の  $\alpha$ -アミラーゼプロモーター、B. サブチリス (*B. subtilis*) 由来の天然プロテアーゼ (*nprE*) プロモーター、変異体 *aprE* プロモーター又は B. リケニフォルミス (*B. licheniformis*) 若しくは他の関連するバチルス属 (*Bacilli*) 由来の任意の他のプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。バチルス属 (*Bacillus*) 細胞で様々な活性 (プロモーター強度) を有するプロモーターライブラリーをスクリーニング及び生成する方法は、国際公開第 2002/14490 号パンフレットで説明されている。

10

20

#### 【0176】

#### IV. タンパク質を産生するためのグラム陽性細胞の発酵

上記で大まかに説明したとおり、特定の実施形態は、タンパク質産生の表現型が増加したグラム陽性細胞を構築して得るための組成物及び方法に関する。したがって、特定の実施形態は、細胞を適切な培地中で発酵させることによりグラム陽性細胞中で目的のタンパク質を産生する方法に関する。本開示のグラム陽性細胞を発酵させるために、当技術分野で周知の発酵方法を適用し得る。

#### 【0177】

いくつかの実施形態では、細胞は、バッチ又は連続発酵条件下で培養される。古典的なバッチ発酵は、クローズドシステムであり、培地の組成は発酵の開始時に設定され、発酵中に変更されない。発酵の開始時、培地に所望の生物を接種する。この方法では、系にいくつもの成分も添加することなく発酵を行うことができる。一般に、バッチ発酵は、炭素源の添加に関して「バッチ」であると思われ、pH 及び酸素濃度などの因子を制御することが頻繁に行われる。バッチ系の代謝物及びバイオマス組成物は、発酵が停止される時点まで絶えず変化する。一般的なバッチ培養では、細胞は静的誘導期を経由して高増殖対数期へ進行し、最終的に増殖率が減少又は停止する静止期に進み得る。処理しない場合、静止期にある細胞は、最終的に死滅する。一般に、対数期の細胞は、生成物の大部分の産生を担っている。

30

#### 【0178】

標準バッチ系に対する好適な変形形態は、「フェドバッチ発酵」系である。一般的なバッチ系のこの変形形態では、発酵の進行に伴い基質が徐々に加えられる。フェドバッチ系は、カタボライト抑制が細胞の代謝を阻害する可能性が高い場合及び培地中の基質量が限られた量であることが望ましい場合に有用である。フェドバッチ系では、実際の基質濃度の測定は、困難であり、したがって pH、溶存酸素及び CO<sub>2</sub> などの廃ガスの分圧などの測定可能な因子の変化に基づいて推定される。バッチ及びフェドバッチ発酵は、当技術分野で一般的であり、知られている。

40

#### 【0179】

連続発酵は規定の発酵培地をバイオリアクターに連続的に添加し、処理のために等量の馴化培地を同時に除去するオープンシステムである。連続発酵は、一般に、培養物を一定

50

の高密度に維持し、細胞は主として対数増殖期にある。連続発酵は、細胞の増殖及び／又は産生物の濃度に影響する1つ以上の因子の調節を可能にする。例えば、一実施形態では、炭素源又は窒素源などの制限栄養素は、一定の比率で維持され、他の全てのパラメータは調節することができる。他の系では、培地の濁度によって測定される細胞濃度を一定に保ちながら、増殖に影響を及ぼす多数の因子は連続的に変化させることができる。連続系は、定常状態の増殖条件を維持しようとする。したがって、培地を取り出すことによる細胞損失は、発酵中の細胞増殖速度に対して平衡が保たなければならない。連続発酵プロセスで栄養素及び増殖因子を調節する方法並びに産生物形成速度を最大化するための手法は、工業微生物学の技術分野で周知である。

#### 【0180】

特定の実施形態では、本開示のグラム陽性細胞によって発現／產生された目的のタンパク質は、従来の手順、例えば宿主細胞を培地から遠心分離若しくは濾過によって分離するか、又は必要に応じて細胞を破壊し、上清を細胞破砕物及び細胞片から取り除くことによって培養培地から回収され得る。一般的に、清浄化後、上清又は濾液のタンパク質成分を塩、例えば硫酸アンモニウムによって沈澱させる。次いで、沈澱したタンパク質を可溶化させ、例えばイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過などの様々なクロマトグラフィー法によって精製し得る。

#### 【0181】

いくつかの実施形態では、細胞は、バッチ又は連続発酵条件下で培養される。古典的なバッチ発酵は、クローズドシステムであり、培地の組成は発酵の開始時に設定され、発酵中に変更されない。発酵の開始時、培地に所望の生物を接種する。この方法では、系にいかなる成分も添加することなく発酵を行うことができる。一般に、バッチ発酵は、炭素源の添加に関して「バッチ」であると見なされ、pH及び酸素濃度などの因子を制御することが頻繁に行われる。バッチ系の代謝物及びバイオマス組成物は、発酵が停止される時点まで絶えず変化する。一般的なバッチ培養では、細胞は静的誘導期を経由して高増殖対数期へ進行し、最終的に増殖率が減少又は停止する静止期に進み得る。処理しない場合、静止期にある細胞は、最終的に死滅する。一般に、対数期の細胞は、生成物の大部分の産生を担っている。

#### 【0182】

標準バッチ系に対する好適な変形形態は、「フェドバッチ発酵」系である。一般的なバッチ系のこの変形形態では、発酵の進行に伴い基質が徐々に加えられる。フェドバッチ系は、カタボライト抑制が細胞の代謝を阻害する可能性が高い場合及び培地中の基質量が限られた量であることが望ましい場合に有用である。フェドバッチ系では、実際の基質濃度の測定は、困難であり、したがってpH、溶存酸素及びCO<sub>2</sub>などの廃ガスの分圧などの測定可能な因子の変化に基づいて推定される。バッチ及びフェドバッチ発酵は、当技術分野で一般的であり、知られている。

#### 【0183】

連続発酵は、規定の発酵培地をバイオリアクターに連続的に添加し、処理のために等量の馴化培地を同時に除去するオープンシステムである。連続発酵は、一般に、培養物を一定の高密度に維持し、細胞は主として対数増殖期にある。連続発酵は、細胞の増殖及び／又は産生物の濃度に影響する1つ以上の因子の調節を可能にする。例えば、一実施形態では、炭素源又は窒素源などの制限栄養素は、一定の比率で維持され、他の全てのパラメータは調節することができる。他の系では、培地の濁度によって測定される細胞濃度を一定に保ちながら、増殖に影響を及ぼす多数の因子は連続的に変化させることができる。連続系は、定常状態の増殖条件を維持しようとする。したがって、培地を取り出すことによる細胞損失は、発酵中の細胞増殖速度に対して平衡が保たなければならない。連続発酵プロセスで栄養素及び増殖因子を調節する方法並びに産生物形成速度を最大化するための手法は、工業微生物学の技術分野で周知である。

#### 【0184】

特定の実施形態では、本開示のグラム陽性細胞によって発現／產生された目的のタンパ

10

20

30

40

50

ク質は、従来の手順、例えば宿主細胞を培地から遠心分離若しくは濾過によって分離するか、又は必要に応じて細胞を破壊し、上清を細胞破砕物及び細胞片から取り除くことによって培養培地から回収され得る。一般的に、清浄化後、上清又は濾液のタンパク質成分を塩、例えば硫酸アンモニウムによって沈澱させる。次いで、沈澱したタンパク質を可溶化させ、例えばイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過などの様々なクロマトグラフィー法によって精製し得る。

【0185】

#### V. 目的のタンパク質

本開示の目的のタンパク質（POI）は、任意の内因性又は異種タンパク質であり得、そのようなPOIのバリエーションであり得る。タンパク質は、1つ以上のジスルフィド架橋を含有し得るか、又はその機能的形態が単量体若しくは多量体であるタンパク質である。すなわち、このタンパク質は四次構造を有し、複数の同一（相同）若しくは非同一（異種）サブユニットから構成され、POI又はそのバリエーションPOIは、好ましくは、目的の特性を備えるタンパク質である。

10

【0186】

例えば、特定の実施形態では、本開示の改変グラム陽性細胞は、その未改変（参照又は対照）細胞と比較して、少なくとも約0.1%以上、少なくとも約0.5%以上、少なくとも約1%以上、少なくとも約5%以上、少なくとも約6%以上、少なくとも約7%以上、少なくとも約8%以上、少なくとも約9%以上又は少なくとも約10%以上のPOIを産生する。

20

【0187】

特定の実施形態では、本開示の改変グラム陽性細胞は、対照細胞と比較して、POIの増加した比生産性（Qp）を示す。例えば、比生産性（Qp）の検出は、タンパク質の産生を評価するために好適な方法である。比生産性（Qp）は、下記の式：

$$Qp = gP / gDCW \cdot hr$$

を使用して決定することができ、式中、「gP」は、タンク中に産生されるタンパク質のグラムであり、「gDCW」は、タンク中の乾燥細胞重量（DCW）のグラムであり、「hr」は、接種時点からの発酵時間（時間）であり、これは、産生時間及び増殖時間を含む。

【0188】

したがって、特定の他の実施形態では、本開示の改変グラム陽性細胞は、未改変（親）細胞と比較して、少なくとも約0.1%、少なくとも約1%、少なくとも約5%、少なくとも約6%、少なくとも約7%、少なくとも約8%、少なくとも約9%又は少なくとも約10%以上の比生産性（Qp）の増加を含む。

30

【0189】

特定の実施形態では、POI又はそのバリエーションPOIは、アセチルエステラーゼ、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、アラビナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、炭酸脱水酵素、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、キモシン、クチナーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エピメラーゼ、エステラーゼ、α-ガラクトシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、α-グルカナーゼ、グルカンリアーゼ、エンド-β-グルカナーゼ、グルコアミラーゼ、グルコースオキシダーゼ、α-グルコシダーゼ、β-グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グリコシルヒドロラーゼ、ヘミセルラーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、ヒドロラーゼ、インペルターゼ、イソメラーゼ、ラッカーゼ、リガーゼ、リパーゼ、リアーゼ、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、酸化還元酵素、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチンデポリメラーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、ペクチン分解酵素、ペルヒドロラーゼ、ポリオールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、フィターゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、ラムノーガラクトツロナーゼ、リボヌクレアーゼ、トランスフェラーゼ、輸送タンパク質、トランスグルタミナーゼ、キシラナーゼ、ヘキソースオキシダーゼ及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

40

50

## 【0190】

したがって、特定の実施形態では、P O I又はそのバリエーションP O Iは、酵素番号（E C）のE C 1、E C 2、E C 3、E C 4、E C 5又はE C 6から選択される酵素である。

## 【0191】

細胞内及び細胞外で発現したタンパク質の活性を検出及び測定するための、当業者に公知の様々なアッセイが存在する。

## 【0192】

## V I．例示的な実施形態

本明細書に開示する組成物及び方法の非限定的な実施形態は、以下のとおりである。

## 【0193】

1．30位並びに1、2、3、4、6、14、16、19、20、23、36、37、38、39、42、43、44、49、50、64、65、67、68、71、79、83及び84から選択される1つ以上の位置にアミノ酸置換を含むバリエーションプロ領域配列であって、バリエーションプロ領域のアミノ酸位置は、配列番号15に従って番号付けされている、バリエーションプロ領域配列。

## 【0194】

2．配列番号15の1～84位と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドに由来する、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

## 【0195】

3．2位にグリシン（G）及び3位にリシン（K）のアミノ酸挿入並びに1、32、38、46、66、67、70及び73から選択される1つ以上の位置にアミノ酸置換を含むバリエーションプロ領域配列であって、バリエーションプロ領域のアミノ酸位置は、配列番号14に従って番号付けされている、バリエーションプロ領域配列。

## 【0196】

4．配列番号14の1～86位と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドに由来する、実施形態3に記載のバリエーションプロ領域。

## 【0197】

5．2位にグリシン（G）、3位にリシン（K）及び4位にアラニン（A）のアミノ酸挿入を含み、バリエーションプロ領域のアミノ酸位置は、配列番号30に従って番号付けされている、バリエーションプロ領域配列。

## 【0198】

6．配列番号30の1～87位と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドに由来する、実施形態5に記載のバリエーションプロ領域。

## 【0199】

7．2位にグリシン（G）、3位にリシン（K）及び4位にセリン（S）のアミノ酸挿入を含み、バリエーションプロ領域のアミノ酸位置は、配列番号29に従って番号付けされている、バリエーションプロ領域配列。

## 【0200】

8．配列番号29の1～87位と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドに由来する、実施形態7に記載のバリエーションプロ領域。

## 【0201】

9．2位にグリシン（G）、3位にリシン（K）、4位にアラニン（A）及び5位にア

10

20

30

40

50

ラニン（A）のアミノ酸挿入を含み、バリエーションプロ領域のアミノ酸位置は、配列番号 31 に従って番号付けされている、バリエーションプロ領域配列。

【0202】

10. 配列番号 31 の 1～88 位と少なくとも 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドに由来する、実施形態 9 に記載のバリエーションプロ領域。

【0203】

11. 30 位にグルタミン酸（E）からグリシン（G）への置換（E30G）、68 位にロイシン（L）からリシン（K）への置換（L68K）及び 73 位にイソロイシン（I）からバリン（V）への置換（I72V）を含むバリエーションプロ領域配列であって、バリエーションプロ領域のアミノ酸位置は、配列番号 32 に従って番号付けされている、バリエーションプロ領域配列。

10

【0204】

12. 配列番号 15 又は配列番号 32 の 1～84 位と少なくとも 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドに由来する、実施形態 11 に記載のバリエーションプロ領域。

【0205】

13. 30 位にグルタミン酸（E）からグリシン（G）への置換（E30G）、68 位にロイシン（L）からリシン（K）への置換（L68K）及び 80 位にグルタミン酸（E）からイソロイシン（I）への置換（E80I）を含むバリエーションプロ領域配列であって、バリエーションプロ領域のアミノ酸位置は、配列番号 33 に従って番号付けされている、バリエーションプロ領域配列。

20

【0206】

14. 配列番号 15 又は配列番号 33 の 1～84 位と少なくとも 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドに由来する、実施形態 13 に記載のバリエーションプロ領域。

【0207】

15. 実施形態 1～14 のいずれか 1 つに記載のバリエーションプロ領域をコードする核酸。

30

【0208】

16. 実施形態 15 に記載のバリエーションプロ領域核酸を含むポリヌクレオチド。

【0209】

17. 目的のタンパク質（POI）をコードする下流（3'）核酸配列に作動可能に連結されている、実施形態 1～14 のいずれか 1 つに記載のバリエーションプロ領域をコードする上流（5'）核酸を含むポリヌクレオチド。

【0210】

18. 目的のタンパク質（POI）をコードする下流核酸配列に作動可能に連結されている、実施形態 1～14 のいずれか 1 つに記載のバリエーションプロ領域をコードする下流（3'）核酸配列に作動可能に連結されている、タンパク質シグナル（分泌）配列をコードする上流（5'）核酸を含むポリヌクレオチド。

40

【0211】

19. 実施形態 16～18 のいずれか 1 つに記載の下流（3'）ポリヌクレオチドに作動可能に連結された上流（5'）プロモーター領域配列を含む発現カセット。

【0212】

20. 実施形態 16～18 のいずれか 1 つに記載の導入されたポリヌクレオチド又は実施形態 19 に記載の導入されたカセットを含むグラム陽性宿主細胞。

【0213】

50

21. 1つ以上のアミノ酸置換は、バリエーションプロ領域配列の正味電荷を配列番号15の参照プロ領域と比較して増加させる、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

【0214】

22. 1つ以上のアミノ酸置換は、バリエーションプロ領域配列の正味電荷を配列番号14の参照プロ領域と比較して増加させる、実施形態3に記載のバリエーションプロ領域。

【0215】

23. 正味電荷の増加は、少なくとも1(+1)~4(+4)である、実施形態21又は22に記載のバリエーションプロ領域。

【0216】

24. 表1に記載のアミノ酸改変を含む、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

【0217】

25. 30位におけるアミノ酸置換は、グリシン(G)、ヒスチジン(H)又はアスパラギン(N)である、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

【0218】

26. 1位におけるアミノ酸置換は、スレオニン(T)である、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

【0219】

27. 2位におけるアミノ酸置換は、アラニン(A)又はプロリン(P)である、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

【0220】

28. 3位におけるアミノ酸置換は、アラニン(A)、シスチン(C)、グリシン(G)、アルギニン(R)、セリン(S)又はバリン(V)である、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

【0221】

29. 4位におけるアミノ酸置換は、グルタミン(Q)である、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

【0222】

30. 6位におけるアミノ酸置換は、アルギニン(R)である、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

【0223】

31. 14位におけるアミノ酸置換は、スレオニン(T)である、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

【0224】

32. 19位におけるアミノ酸置換は、アルギニン(R)である、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

【0225】

33. 20位におけるアミノ酸置換は、リシン(K)である、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

【0226】

34. 23位におけるアミノ酸置換は、リシン(K)、アスパラギン(N)又はグルタミン(Q)である、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

【0227】

35. 36位におけるアミノ酸置換は、グリシン(G)である、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

【0228】

36. 37位におけるアミノ酸置換は、スレオニン(T)である、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

【0229】

37. 38位におけるアミノ酸置換は、ヒスチジン(H)である、実施形態1に記載のバリエーションプロ領域。

10

20

30

40

50

【0230】

38．39位におけるアミノ酸置換は、リシン（K）又はグルタミン（Q）である、実施形態1に記載のバリエーション領域。

【0231】

39．44位におけるアミノ酸置換は、イソロイシン（I）である、実施形態1に記載のバリエーション領域。

【0232】

40．49位におけるアミノ酸置換は、スレオニン（T）又はグルタミン（Q）である、実施形態1に記載のバリエーション領域。

【0233】

41．50位におけるアミノ酸置換は、アルギニン（R）である、実施形態1に記載のバリエーション領域。

【0234】

42．64位におけるアミノ酸置換は、リシン（K）である、実施形態1に記載のバリエーション領域。

【0235】

43．65位におけるアミノ酸置換は、リシン（K）である、実施形態1に記載のバリエーション領域。

【0236】

44．67位におけるアミノ酸置換は、セリン（S）である、実施形態1に記載のバリエーション領域。

【0237】

45．68位におけるアミノ酸置換は、リシン（K）又はメチオニン（M）である、実施形態1に記載のバリエーション領域。

【0238】

46．79位におけるアミノ酸置換は、グルタミン（Q）である、実施形態1に記載のバリエーション領域。

【0239】

47．83位におけるアミノ酸置換は、イソロイシン（I）である、実施形態1に記載のバリエーション領域。

【0240】

48．84位におけるアミノ酸置換は、ロイシン（L）である、実施形態1に記載のバリエーション領域。

【0241】

49．表2、表3、表4、配列番号14、配列番号29、配列番号30、配列番号31及びこれらの組み合わせに記載のアミノ酸改変を含む、実施形態3に記載のバリエーション領域。

【0242】

50．1位におけるアミノ酸置換は、スレオニン（T）である、実施形態3に記載のバリエーション領域。

【0243】

51．32位におけるアミノ酸置換は、グリシン（G）である、実施形態3に記載のバリエーション領域。

【0244】

52．38位におけるアミノ酸置換は、グリシン（G）である、実施形態3に記載のバリエーション領域。

【0245】

53．46位におけるアミノ酸置換は、イソロイシン（I）である、実施形態3に記載のバリエーション領域。

【0246】

10

20

30

40

50

54. 66位におけるアミノ酸置換は、リシン（K）である、実施形態3に記載のバリエーション領域。

【0247】

55. 67位におけるアミノ酸置換は、リシン（K）である、実施形態3に記載のバリエーション領域。

【0248】

56. 70位におけるアミノ酸置換は、リシン（K）である、実施形態3に記載のバリエーション領域。

【0249】

57. 73位におけるアミノ酸置換は、アルギニン（R）である、実施形態3に記載のバリエーション領域。

10

【0250】

58. 表1～5、図1、図2、図3、配列番号9、配列番号11、配列番号14、配列番号29、配列番号30、配列番号32、配列番号33及びこれらの組み合わせのいずれか1つに記載されたアミノ酸改変を含むバリエーション領域。

【0251】

59. 配列番号15の1～84位と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有する親又は参照ポリペプチドに由来する、実施形態58に記載のバリエーション領域。

20

【0252】

60. グラム陽性細菌細胞中で異種の目的のタンパク質（POI）を産生する方法であって、（a）グラム陽性細胞中に、POIをコードする下流（3'）核酸配列に作動可能に連結されている、30位並びに1、2、3、4、6、14、16、19、20、23、36、37、38、39、42、43、44、49、50、64、65、67、68、71、79、83及び84から選択される1つ以上の位置にアミノ酸置換を含むバリエーション領域配列をコードする下流（3'）核酸に作動可能に連結された上流（5'）プロモーターを含む発現カセットを導入することであって、バリエーション領域のアミノ酸位置は、配列番号15に従って番号付けされている、導入することと、（b）POIの産生に好適な条件下において、改変された細胞を増殖させる／培養する／発酵させることを含む方法。

30

【0253】

61. グラム陽性細菌細胞中で異種の目的のタンパク質（POI）を産生する方法であって、（a）グラム陽性細胞に、POIをコードする下流（3'）核酸配列に作動可能に連結されている、2位にグリシン（G）、3位にリシン（K）のアミノ酸挿入並びに1、32、38、46、66、67、70及び73から選択される1つ以上の位置にアミノ酸置換を含むバリエーション領域配列をコードする下流（3'）核酸に作動可能に連結された上流（5'）プロモーター配列を含む発現カセットを導入することであって、バリエーション領域のアミノ酸位置は、配列番号14に従って番号付けされている、導入することと、（b）POIの産生に好適な条件下において、改変された細胞を増殖させる／培養する／発酵させることを含む方法。

40

【0254】

62. グラム陽性細菌細胞中で異種の目的のタンパク質（POI）を産生する方法であって、（a）グラム陽性細胞中に、実施形態19に記載の発現カセットを導入することと、（b）POIの産生に好適な条件下において、改変された細胞を増殖させる／培養する／発酵させることを含む方法。

【0255】

63. カセットは、プロモーターとバリエーション領域配列との間に作動可能に連結及び配置されるプレタンパク質シグナル（分泌）配列をコードする核酸を更に含む、実施形態60～62のいずれか1つに記載の方法。

50

## 【0256】

64. 改変された細胞は、同じPOIをコードする下流核酸配列に作動可能に連結されている、配列番号15のプロ領域配列をコードする下流(3')核酸に作動可能に連結された同じ上流(5')プロモーター配列を含む導入された発現カセットを有する対照グラム陽性細胞と比較して増加した量のPOIを産生する、実施形態60～62のいずれか1つに記載の方法。

## 【0257】

65. 増加した量のPOIは、対照細胞と比較して少なくとも約0.1%以上、少なくとも約0.5%以上、少なくとも約1%以上、少なくとも約5%以上、少なくとも約6%以上、少なくとも約7%以上、少なくとも約8%以上、少なくとも約9%以上又は少なくとも約10%以上のPOIである、実施形態64に記載の方法。

10

## 【0258】

66. 改変細胞の性能指数(PI)値は、改変された細胞と同じPOIをコードする下流核酸配列に作動可能に連結されている、配列番号15のプロ領域配列をコードする下流核酸に作動可能に連結された同じ上流プロモーター配列を含む導入された発現カセットを有する対照グラム陽性細胞と比較して少なくとも約1.1であり、改変細胞及び対照細胞は、同じ条件下で培養される、実施形態60～63のいずれか1つに記載の方法。

## 【0259】

67. 導入されたカセットは、細胞のゲノムに組み込まれる、実施形態60～63のいずれか1つに記載の方法。

20

## 【0260】

68. 少なくとも2つの導入されたカセットを含む、実施形態60～63のいずれか1つに記載の方法。

## 【0261】

69. POIは、酵素、抗体、受容体及び調節タンパク質からなる群から選択される、実施形態60～63のいずれか1つに記載の方法。

## 【0262】

70. POIは、アセチルエステラーゼ、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、アラビナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、カルボニックアンヒドラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、キモシン、クチナーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エピメラーゼ、エステラーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -グルカナーゼ、グルカンリザーゼ、エンド- $\beta$ -グルカナーゼ、グルコアミラーゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グリコシルヒドロラーゼ、ヘミセルラーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、ヒドロラーゼ、インベルターゼ、イソメラーゼ、ラッカーゼ、リガーゼ、リパーゼ、リアーゼ、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、オキシドレダクターゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチンデポリメラーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、ペクチン分解酵素、ペルヒドロラーゼ、ポリオールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、フィターゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、ラムノガラクトツロナーゼ、リボヌクレアーゼ、トランスフェラーゼ、輸送タンパク質、トランスグルタミナーゼ、キシラナーゼ、ヘキソースオキシダーゼ及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態60～63のいずれか1つに記載の方法。

30

40

## 【0263】

71. プロテアーゼは、天然又はバリエーションサブチリシンである、実施形態70に記載の方法。

## 【0264】

72. グラム陽性細菌細胞は、バチルス属(*Bacillus* sp.)細胞であり、任意選択的にバチルス属(*Bacillus* sp.)細胞は、*B. サブチリス*(*B. subtilis*)、*B. リケニフォルミス*(*B. licheniformis*)、*B. レンツス*(*B. lentus*)、*B. ブレビス*(*B. brevis*)、*B. ステアロサーモ*

50

フィルス (*B. stearothermophilus*)、*B.* アルカロフィルス (*B. alkalophilus*)、*B.* アミロリケファシエンス (*B. amyrolliquefaciens*)、*B.* クラウシイ (*B. clausii*)、*B.* ハロデュランス (*B. halodurans*)、*B.* メガテリウム (*B. megaterium*)、*B.* コアグラランス (*B. coagulans*)、*B.* サーキュランス (*B. circulans*)、*B.* ラウタス (*B. lautus*)、*B.* チューリングエンシス (*B. thuringiensis*) 及びゲオバチルス・ステアロサーモフィルス (*Geobacillus stearothermophilus*) からなる群から選択される、実施形態 60～71 のいずれか一項に記載の方法。

【実施例】

【0265】

本開示の所定の態様は、限定するものと解釈すべきでない以下の実施例に照らして更に理解され得る。材料及び方法の変更形態は、当業者に明白であろう。本明細書で使用される、標準の組み換え DNA 及び分子クローニング技術は、当技術分野で周知である (*Ausubel et al.*, 1987; *Sambrook et al.*, 1989)。

【0266】

実施例 1

部位評価ライブラリーによる GG36 プロ配列の改変

本実施例では、バリエーションサブチリシンタンパク質 (*BG46\_\_variant 1*、配列番号 2) を、本明細書に記載のタンパク質発現をモニターするためのレポーターとして使用した。より具体的には、上流 (5') の *aprE* 遺伝子フランキング領域を含む DNA 断片を、*B.* サブチリス (*B. subtilis*) *rrnI*-P2 プロモーター/5'-*aprE* UTR 領域の DNA 配列のバリエーションを含むポリヌクレオチド構築物 (例えば、発現カセット) に作動可能に連結させ、*B.* アミロリケファシエンス (*B. amyrolliquefaciens*) BPN' ターミネーター DNA 配列 (配列番号 6) に作動可能に連結された成熟した *BG46\_\_variant 1* (配列番号 2) をコードする DNA 配列に作動可能に連結されたバリエーションプロ領域配列 A (配列番号 9) をコードする DNA 配列 (配列番号 5) に作動可能に連結された *AprE* シグナル配列をコードする DNA 配列 (配列番号 4) に作動可能に連結された配列番号 1 を得、このポリヌクレオチド構築物は、カナマイシン (*kan*) 遺伝子発現カセット (配列番号 7) を含む下流 (3') の *aprE* 遺伝子フランキング領域配列に作動可能に連結された。より具体的には、この DNA 断片は、標準的な分子生物学的技法を用いて組み立てられてから鑄型として用いられて、本明細書に記載の 1 つ以上のプロ領域改変 (変異) を含む直鎖 DNA 発現カセットを生成した。

【0267】

プロ領域配列 A の部位評価ライブラリー (SEL)

【0268】

部位評価ライブラリー (SEL) を作成するためにバリエーションプロ領域配列 A (30H、配列番号 9) をコードするアミノ酸配列が鑄型として用いられ、これは、*Twist Bioscience HQ* (South San Francisco) によって 4.4 kb 断片として生成された。発現カセットの直鎖 DNA を用いてコンピテントな *B.* サブチリス (*B. subtilis*) 細胞を形質転換し、1.8 ppm のカナマイシンを含む LA プレートに形質転換混合物をプレーティングし、37℃で一晩インキュベートした。単一のコロニーを選別し、抗生物質選択下、37℃の *Luria* ブロス中で増殖させた。

【0269】

96 ウェルのマイクロタイタープレート (MTP) 中にチェリーピックされたユニークなプロ領域配列 A バリエーションを決定するために、配列解析を実施した。例えば、バリエーションプロ領域配列 A (配列番号 9) の第 1 のアミノ酸位置はアラニン (「A1a」又は「A」) であり、これは、全て他の 19 個の天然アミノ酸残基に変更 (置換) することができ、バリエーションプロ領域配列 A (配列番号 9) の第 2 のアミノ酸位置はグルタミン酸 (「G

10

20

30

40

50

「L」又は「E」)であり、これは、全て他の19個の天然アミノ酸残基に変更(置換)することができ、プロ領域配列A(配列番号9)の全ての84個の位置が評価されるまで以下同様に続けた(例えば、図1を参照されたい)。

【0270】

レポータータンパク質発現実験のために、形質転換細胞を振盪培養器内の96ウェルMTPの培養培地(MOP緩衝液ベースの強化半規定培地)中において32℃で3日間、300rpm、湿度80%で増殖させ、これを遠心分離及び濾過した。清澄化した培養上清を用いて、レポータープロテアーゼ活性を測定(アッセイ)して、生産性のレベルを決定し、試料は、72時間後に採取された。レポータープロテアーゼ活性アッセイについては、下記の実施例2でより詳細に説明する。

10

【0271】

生産性に影響を及ぼす位置

【0272】

以下に記載するとおり、表1は、参照構築物と比較した相対的なレポーターの生産性の結果を示し、レポーター遺伝子は、天然のGG36プロ領域配列(配列番号15)で発現され、発現は、下記の実施例2で説明される活性アッセイによって測定された。例えば、表1で示すとおり、性能指数(PI)値は、72時間後に採取した試料に対して付与され(PIは、実施例2で説明されるとおりに計算した)、30位との組み合わせで生産性に影響を与えたアミノ酸(残基)位置は、1、2、3、4、6、14、19、20、23、36、37、38、39、42、43、44、49、50、64、65、67、68、71、83、84である。5'アミノ酸の変化及び3'アミノ酸の改変は、生産性に影響を与え、更に選択された組み合わせの80%が余分の正電荷を有していた。

20

30

40

50

## 【表 1】

表 1  
性能指数 WT プロと比較したプロ領域バリエーション A 配列

| バリエーション対<br>WT | PI  | Δ電荷 |
|----------------|-----|-----|
| なし             | 1.0 | 0   |
| E30H           | 1.5 | 1   |
| E30G           | 2.3 | 1   |
| E6R-E30H       | 2.5 | 3   |
| S19R-E30H      | 2.3 | 2   |
| E30H-E39Q      | 2.4 | 2   |
| E23Q-E30H      | 2.3 | 2   |
| E3G-E30H       | 2.7 | 2   |
| E30H-L44I      | 2.2 | 1   |
| E30H-T83I      | 2.0 | 1   |
| E30H-E38H      | 2.5 | 2   |
| E23N-E30H      | 2.1 | 2   |
| E3A-E30N       | 2.5 | 2   |
| E30H-E67S      | 2.1 | 2   |
| E30H-E39K      | 2.7 | 3   |
| E30H-A79Q      | 2.2 | 1   |
| E3V-E30H       | 2.5 | 2   |
| E3C-E30H       | 2.4 | 2   |
| A1T-E30H       | 2.5 | 1   |
| A4Q-E30H       | 2.6 | 1   |
| E30H-T50R      | 2.3 | 2   |
| E30H-L68K      | 1.5 | 2   |
| E30H-E37T      | 2.4 | 2   |
| E30H-E36G      | 2.1 | 2   |
| E23K-E30H      | 2.2 | 3   |
| E14T-E30H      | 2.1 | 2   |
| E2P-E30H       | 2.4 | 2   |
| E2A-E30H       | 2.1 | 2   |
| E3R-E30H       | 2.7 | 3   |
| E30H-E49T      | 2.3 | 2   |
| E3S-E30H       | 2.2 | 2   |
| E30H-E49Q      | 2.3 | 2   |
| E30H-M84L      | 2.2 | 2   |
| E30H-A65K      | 2.3 | 2   |
| E20K-E30H      | 2.2 | 3   |
| E30H-D64K      | 2.3 | 3   |
| E30H-L68M      | 1.5 | 1   |
| E30H-E43D      | 2.2 | 1   |
| E16S-E30H      | 2.4 | 2   |
| E30H-I42V      | 2.4 | 1   |
| E30H-A71R      | 2.5 | 2   |
| A4N-E30H       | 2.2 | 1   |
| E30H-D64A      | 2.0 | 2   |
| E3P-E30H       | 2.4 | 2   |
| E6Q-E30H       | 2.4 | 2   |

10

20

30

40

## 【0273】

## 実施例 2

## プロテアーゼ活性アッセイ

BG46\_\_variant 1 サブチリシンのプロテアーゼ活性は、合成 suc-AAPF-pNA ペプチド基質の加水分解を測定することによって決定した。AAPF アッセイでは、使用する試薬溶液は、pH 8.6 の 100mM のトリス、10mM の CaCl<sub>2</sub>、0.005% の Tween（登録商標）-80（トリス/Ca 緩衝液）及び DMSO（suc-AAPF-pNA ストック溶液）（Sigma: S-7388）中 160mM の suc-AAPF-pNA とした。希釈標準溶液を調製するために、1mL の suc-

50

AAPF-pNAストック溶液を100mLのトリス/Ca緩衝液に添加して混合した。1mg/mLのsuc-AAPF-pNA希釈標準溶液を含有するマイクロタイタープレート(MTP)に酵素試料を加え、SpectraMaxプレートリーダーをキネティックモードで使用し、405nmで3~5分間、室温で活性をアッセイした。プロテアーゼ活性はmOD/分で表した。構築された各バリエーションの活性を測定し、同じプレートで増殖させた参照構築物と比較した。参照試料の値をバリエーション試料の値で割ることにより、性能指数(PI)である。

【0274】

#### 実施例3

##### 5'GG36プロ配列の改変

本実施例では、BG46\_\_variant 2サブチリシン(配列番号8)を、本明細書に記載の発現をモニターするためのレポータータンパク質として使用した。より具体的には、上流(5')のaprE遺伝子フランキング領域を含むDNA断片を、(5')B.サブチリス(B. subtilis)rrnI-P2プロモーター/5'-UTR aprE領域のDNA配列のバリエーションを含むポリヌクレオチド構築物に作動可能に連結させ、B.アミロリケファシエンス(B. amyloliquefaciens)BPN'ターミネーターDNA配列(配列番号6)に作動可能に連結された成熟したBG46\_\_variant 2サブチリシン(配列番号8)をコードするDNA配列に作動可能に連結されたバリエーションプロ領域配列B(配列番号9、30H)をコードするDNA配列(配列番号10)に作動可能に連結されたAprEシグナルペプチド配列をコードするDNA配列(配列番号4)に作動可能に連結された配列番号1を得、このポリヌクレオチド構築物は、カナマイシン(kan)遺伝子発現カセット(配列番号7)を含む下流(3')のaprE遺伝子フランキング領域配列に作動可能に連結された。より具体的には、このDNA断片は、標準的な分子生物学的技法を用いて組み立てられてから鑄型として用いられて、本明細書に記載の1つ以上のプロモーター領域改変を含む直鎖DNA発現カセットを生成した。

【0275】

##### 5'プロ領域改変の導入

【0276】

78個のアミノ酸のAprEプロ領域配列(配列番号12)の5'(N末端)配列を使用して、最初の3個のアミノ酸残基をバリエーションプロ領域配列C(配列番号14)の最初のアミノ酸残基(A)と交換して、配列番号13を得た。上記の表1に示すように、プロ領域バリエーションA配列の変異体(すなわち表1、「E030G」;配列番号11)は、レポーターの高い発現を示した。標準的な分子生物学的技法を用いて発現構築物を調製し、参照プロ領域と比較した。バリエーション(変異体)を4.4kbの直鎖DNA断片として生成し、これをコンピテントなB.サブチリス(B. subtilis)細胞を形質転換するために使用し、形質転換混合物を、1.8ppmのカナマイシンを含むLAプレート上にプレーティングし、37℃で一晩インキュベートした。単一のコロニーを選別し、抗生物質選択下、37℃のLuriaブロス中で増殖させた。

【0277】

レポータータンパク質発現実験のために、形質転換細胞を振盪培養器内の96ウェルMTPの培養培地(MOP緩衝液ベースの強化半規定培地)中において32℃で3日間、300rpm、湿度80%で増殖させ、これを遠心分離及び濾過した。清澄化した培養上清を用いて、レポータープロテアーゼ活性を測定(アッセイ)して、生産性のレベルを決定し、試料は、72時間後に採取された。レポータープロテアーゼ活性アッセイを、上記の実施例2で説明したとおりに実施し、バリエーションプロ領域Cのタンパク質生産性は、E030G-GG36プロ(配列番号11)よりも約1.1倍高かった。

【0278】

#### 実施例4

##### GG36プロ配列の更なる改変

本実施例では、BG46\_\_variant 2サブチリシン（配列番号8）を、本明細書に記載の発現をモニターするためのレポータータンパク質として使用した。構築は、上記の実施例3の説明に従って行った。より具体的には、コンビナトリアルライブラリーを参照プロ領域配列（配列番号15）上で調製し、5'（N末端）配列にアミノ酸グリシン（G）及びリシン（K）が挿入された（「GK」）（例えば、図2、配列番号14を参照されたい）。

【0279】

バリエーションプロ領域Cにおけるコンビナトリアルライブラリー

【0280】

プロ領域の変異を組み合わせるために表1のデータから選択を行い、標準的な分子生物学的技法を用いて発現構築物を調製し、これを参照プロ領域と比較した。直鎖DNA発現カセットを用いてコンピテントなB.サブチリス（B. subtilis）細胞を形質転換し、1.8 ppmのカナマイシンを含むLAプレートに形質転換混合物をプレーティングし、37℃で一晩インキュベートした。単一のコロニーを選別し、抗生物質選択下、37℃のLuriaブロス中で増殖させた。レポータータンパク質発現実験のために、形質転換細胞を振盪培養器内の96ウェルMTPの培養培地（MOP緩衝液ベースの強化半規定培地）中において32℃で3日間、300 rpm、湿度80%で増殖させ、これを遠心分離及び濾過した。清澄化した培養上清を用いて、レポータープロテアーゼ活性を測定（アッセイ）して、生産性のレベルを決定し、試料は、72時間後に採取された。レポータープロテアーゼ活性アッセイを、上記の実施例2で説明したとおりに実施した。

【0281】

生産性を改善するプロ領域における組み合わせ

【0282】

下記で示すとおり、表2は、発現レポーター（配列番号8）の生産性の増加を示したプロ領域変異の組み合わせの配列結果を明らかにし、デルタ（D）電荷は、+1～+4で変化する。より具体的には、ループ領域における組み合わせとしての正電荷（すなわち残基位置66～73）である。性能指数（PI）値は、72時間後に採取した試料に対して付与され、上記の実施例2で説明されるとおりに計算された。例えば、プロ領域バリエーションのPI値がWTプロ領域配列（表2、配列番号15）と比較され、アミノ酸位置の番号付け（表2、第1列）は、「GK」挿入なしの配列番号14との比較である。図3に示すように、バリエーションプロ領域配列は、参照バリエーションプロ領域配列C（配列番号14；86個のアミノ酸位置を含む）又は野生型（参照）プロ領域配列（配列番号15；84個のアミノ酸位置を含む）の位置番号付けに従って番号付けされ得る。

10

20

30

40

50

【表 2】

表2  
性能指数 GK 挿入なし WT プロ(配列番号 15)と比較した  
プロ領域バリエーション C(配列番号 14)配列

| バリエーション対 WT         | PI  | Δ電荷 |
|---------------------|-----|-----|
| なし                  | 1.0 | 0   |
| E32G                | 1.7 | 1   |
| L46I-D66K-A73R      | 1.9 | 3   |
| A67K-L70K-A73R      | 1.9 | 3   |
| L70K-A73R           | 2.0 | 2   |
| E38G-A67K-L70K      | 2.0 | 3   |
| D66K-A67K-L70K      | 2.0 | 4   |
| E32G-L70K           | 2.0 | 2   |
| A1T-L46I-A73R       | 2.0 | 1   |
| L70K-A73R           | 2.0 | 2   |
| E38G-L46I-D66K-A67K | 2.0 | 4   |
| E38G-D66K-A67K      | 2.0 | 4   |
| L46I-D66K-A67K-L70K | 2.0 | 4   |
| E38G-L46I-A67K      | 2.0 | 2   |
| L46I-L70K           | 2.1 | 1   |
| L46I-L70K-A73R      | 2.1 | 2   |
| E38G-L46I-A67K      | 2.1 | 2   |
| L46I-D66K-A67K-L70K | 2.2 | 4   |
| L46I-A67K-L70K      | 2.3 | 2   |

【0283】

実施例 5

バチルス・リケニフォルミス (BACILLUS LICHENIFORMIS) における 5' GG36 プロ配列の改変

本実施例では、BG46\_\_variant 2 サブチリシン (配列番号 8) を、本明細書に記載の発現をモニターするためのレポータータンパク質として使用した。構築は、概ね以下のとおりに実施した。バチルス・リケニフォルミス (Bacillus licheniformis) serA 選択可能マーカー発現カセット (配列番号 16) を含む (5') serA 遺伝子フランキング領域 (5' serA 遺伝子 FR) を含む第 1 の DNA 断片を、(3') serA 遺伝子フランキング領域 (3' serA 遺伝子 FR) (配列番号 20) に作動可能に連結された B. リケニフォルミス (B. licheniformis) amyL ターミネーター (配列番号 19) に作動可能に連結された成熟した BG46\_\_variant 2 サブチリシン (配列番号 8) をコードする DNA 配列に作動可能に連結されたバリエーションプロ領域 C 配列 (配列番号 14) をコードする DNA に作動可能に連結された B. サブチリス (B. subtilis) AprE シグナル配列 (配列番号 4) をコードする DNA に作動可能に連結された B. サブチリス (B. subtilis) aprE 5' 非翻訳領域 (5' -UTR; 配列番号 18) の DNA 配列に作動可能に連結された上流 (5') B. サブチリス (B. subtilis) rrnI-p3 プロモーター領域 DNA 配列 (配列番号 17) を含むポリヌクレオチド構築物に作動可能に連結させた。

【0284】

B. リケニフォルミス (B. licheniformis) lysA 選択可能マーカー発現カセット (配列番号 21) を含む (5') lysA 遺伝子フランキング領域 (5' ly 50

s A 遺伝子 FR) を含む第 2 の DNA 断片を、(3') lys A 遺伝子フランキング領域 (3' lys A 遺伝子 FR; 配列番号 22) に作動可能に連結された B. リケニフォルミス (B. licheniformis) amyL ターミネーター (配列番号 10) に作動可能に連結された成熟した BG46\_\_variant 2 サブチリシン (配列番号 8) をコードする DNA 配列に作動可能に連結されたバリエーションプロ領域 C 配列 (配列番号 14) をコードする DNA に作動可能に連結された B. サブチリス (B. subtilis) AprE シグナル配列 (配列番号 4) をコードする DNA に作動可能に連結された B. サブチリス (B. subtilis) aprE 5'-UTR (配列番号 18) の DNA 配列に作動可能に連結された上流 (5') B. サブチリス (B. subtilis) rrnI-p3 プロモーター領域 DNA 配列 (配列番号 17) を含むポリヌクレオチド構築物に作動可能に連結させた。

10

【0285】

より具体的には、これらの DNA 断片は、標準的な分子生物学的技法を用いて組み立てられてから鋳型として用いられて、本明細書に記載の 1 つ以上のプロ領域配列改変を含む直鎖 DNA 発現カセットを生成した。例えば、第 1 及び第 2 の DNA 断片 (上述) をゲノムに組み込むことによってバリエーションプロ領域配列を含む B. リケニフォルミス (B. licheniformis) 株を構築し、第 1 及び第 2 の断片は、以下の表 3 に記載されるプロ領域配列バリエーションを含む。表 3 に示すように、レポータータンパク質の産生は、標準的方法 (例えば、国際公開第 2019/055261 号パンフレットを参照されたい) を用いて過去に説明されたとおりに決定し、E30G バリエーションを含む対照プロ領域配列に対して正規化した。

20

【表 3】

表 3

性能指数 対照プロ領域配列 B(E32G; 配列番号 11) と比較した

B. リケニフォルミス (B. LICHENIFORMIS) における

プロ領域バリエーション C (GK, 配列番号 14) 配列

| バリエーション対 WT    | PI  | Δ電荷 |
|----------------|-----|-----|
| E32G           | 1.0 | 1   |
| E32G-L70K      | 1.1 | 2   |
| E32G-A73R      | 1.3 | 2   |
| E32G-L70K-A73R | 1.2 | 3   |

30

【0286】

実施例 6

5' GG36 プロ配列の追加的改変

本実施例では、BG46\_\_variant 2 サブチリシン (配列番号 8) を、本明細書に記載の発現をモニターするためのレポータータンパク質として使用した。具体的には、86 個のアミノ酸からなる変異 GG36 プロ配列 (配列番号 14; バリエーションプロ領域配列 C) の 5' (N 末端) 配列を、3 位でリシンの後にアラニン (A) 又はセリン (S) などの追加のアミノ酸を導入するように更に改変した (例えば、成熟プロテアーゼを培地中に放出するのを潜在的に促進するため)。例えば、これらの N 末端改変により、図 1 ~ 3 に示されるように、3 つのバリエーションプロ領域配列 D ~ F (配列番号 29 ~ 31) が得られた。

40

【0287】

これらの N 末端改変 GG36 プロ配列 (配列番号 29、配列番号 30 及び配列番号 31) を、(5') B. サブチリス (B. subtilis) rrnI-p2 プロモーター／

50

5'-UTR aprE領域DNA配列のバリエーションを含むポリヌクレオチド構築物に作動可能に連結された上流(5')のaprE遺伝子フランキング領域を含む発現カセット中で組み立てて、B. アミロリケファシエンス(B. amylo liquefaciens) BPN'ターミネーターDNA配列(配列番号6)に作動可能に連結された成熟したBG46\_\_variant 2サブチリシン(配列番号8)をコードするDNA配列に作動可能に連結されたバリエーションプロ領域配列をコードするDNA配列に作動可能に連結されたAprEシグナルペプチド配列をコードするDNA配列(配列番号4)に作動可能に連結された配列番号1を得、このポリヌクレオチド構築物は、下流のカナマイシン(kan)遺伝子発現カセット(配列番号7)を含む下流(3')のaprE遺伝子フランキング領域(3' aprE遺伝子FR)配列に作動可能に連結させた。変異／バリエーションプロ配列を含むカセットを、標準的な分子生物学的技法を用いてバチルス・サブチリス(Bacillus subtilis)細胞に形質転換した。

10

【0288】

形質転換細胞を振盪培養器内の96ウェルMTPの培養培地(MOP緩衝液ベースの強化半規定培地)中において32℃で3日間、300rpm、湿度80%で増殖させ、これを遠心分離及び濾過した。清澄化した培養上清を用いて、レポータープロテアーゼ活性を測定(アッセイ)して、生産性のレベルを決定し、試料は、72時間後に採取された。具体的には、表4は、レポータータンパク質をWTプロ配列(配列番号14)で発現させた参照構築物と比較した、72時間後のレポータータンパク質の生産性(性能指数(PI値))の結果を示す。

20

【表4】

表4

性能指数 バリエーションCプロ領域配列(配列番号14)と比較したプロ領域  
バリエーションD-F(配列番号29-31)

| 名称       | バリエーション | PI   | 配列番号 |
|----------|---------|------|------|
| バリエーションC | GK      | 1.00 | 14   |
| バリエーションE | GKA     | 1.3  | 30   |
| バリエーションD | GKS     | 1.2  | 29   |
| バリエーションF | GKAA    | 1.4  | 31   |

30

【0289】

上記の表4に示すように、プロ領域バリエーションのPI値をプロ領域配列バリエーションプロ領域配列Cと比較し(配列番号14、「G<sub>2</sub>K<sub>3</sub>」)、アミノ酸位置の番号付けは、配列番号14との比較である(すなわち「GK」挿入を伴う)。3つのN末端プロ領域変異体(AGKA、AGKS、AGKAA)のPI指数は、72時間の増殖後、バリエーションC(AGK、配列番号14)と比較してレポータータンパク質BG46\_\_variant 2サブチリシン(配列番号8)の高い発現を示した。

40

【0290】

実施例7

GG36プロ配列のC末端改変

本実施例では、GG36バリエーションプロ領域配列B(配列番号11)を更に操作して、68位のロイシン(L)をリシン(K)で置換し、72位のイソロイシン(I)をバリン(V)で置換するか、又は80位のグルタメート(E)をイソロイシン(I)と置換して、2つの操作されたプロ領域配列バリエーション配列G(配列番号32)及びH(配列番号33)を得た(例えば、図1～図3を参照されたい)。具体的には、形質転換細胞を上記のとおり増殖させ、清澄化した培養上清を用いて、レポータープロテアーゼ活性を測定(ア

50

ッセイ)して、生産性のレベルを決定し、試料は、72時間後に採取された。

【0291】

例えば、以下の表5は、レポータータンパク質をバリエーションBプロ領域配列(配列番号11)で発現させた参照構築物と比較した、72時間後のレポータータンパク質の生産性(PI値)の結果を示す。より具体的には、表5に示されるように、バリエーションプロ領域配列G及びHのPI値は、参照/対照バリエーションBプロ領域配列と比較して増加し、バリエーションプロ領域配列G(L68K及びI72V変異を含む)は、プロ領域配列B(E30G)に対して1.08のPIをもたらし、バリエーションプロ領域配列H(L68K及びE80I変異を含む)は、プロ領域配列B(E30G)に対して1.18のPIをもたらした。

10

【表5】

表5

性能指数 プロ領域バリエーションCと比較したプロ領域バリエーションG及びH

| 名称       | バリエーション           | PI  | Δ電荷対 WT |
|----------|-------------------|-----|---------|
| バリエーションB | E30G              | 1.0 | 1       |
| バリエーションG | E30G L68K<br>I72V | 1.4 | 2       |
| バリエーションF | E30G L68K<br>E80I | 1.5 | 3       |

20

【0292】

参考文献

国際公開第1993/20214号パンフレット

国際公開第2002/14490号パンフレット

国際公開第2003/083125号パンフレット

国際公開第2008/112258号パンフレット

国際公開第2010/123754号パンフレット

30

国際公開第2016/205710号パンフレット

Altschul et al., "Basic local alignment search tool", J. Mol. Biol., 215 (13): 403-410, 1990.

Altschul et al., "Gapped BLAST and PSI BLAST a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res, Set 1; 25 (17): 3389-402, 1997.

Karlin et al., "Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences", PNAS USA, 90 (12): 5873-5877, 1993.

40

Saitou and Nei, "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees", Mol. Biol. Evol., Vol. 4, issue 4, pages 406-425, 1987.

Schaffer et al., "Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements", Nucleic Acids Res, 29 (14):

50

2994-3005, 2001.

Thompson et al., "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weightin  
g, position-specific gap penalties and we  
ight matrix choice", Nucleic Acids Res, 22 (22): 4673-4680, 1994.

Beaucage and Caruthers, "Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis", Tetrahedron Lett., 22, 1859-1862, 1981.

Matthes et al., "Simultaneous rapid chemical synthesis of over one hundred oligonucleotides on a microscale", EMBO J., 3: 801-805, 1984.

【図面】

【図 1】

野生型及びバリアントプロ領域配列

野生型B lensusプロ領域配列(配列番号15)  
AEEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM  
バリアントプロ領域配列(配列番号9)  
AEEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM  
バリアントプロ領域配列(配列番号11)  
AEEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDGVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM  
バリアントプロ領域配列(配列番号14)  
AGGEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVE<sup>1</sup>SPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM  
バリアントプロ領域配列(配列番号29)  
AGKSEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM  
バリアントプロ領域配列(配列番号30)  
AGKA<sup>1</sup>SEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM  
バリアントプロ領域配列(配列番号31)  
AGKA<sup>1</sup>SEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM  
バリアントプロ領域配列(配列番号32)  
AEEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDGVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM  
バリアントプロ領域配列(配列番号33)  
AEEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDGVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM

図 1

【図 2】

アラインさせたプロ領域配列

A--BEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM (配列番号15)  
A--BEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM (配列番号9)  
A--BEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDGVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM (配列番号11)  
AGKSEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM (配列番号14)  
AGKSEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM (配列番号29)  
AGKA<sup>1</sup>SEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM (配列番号30)  
AGKA<sup>1</sup>SEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDGVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM (配列番号31)  
A--BEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDGVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM (配列番号32)  
A--BEAKKYLLIGNEQAVSEFVQVEANDGVAILSEEEVEI<sup>1</sup>ELLHFEETIPVLSVELSPEDVDALDPAISYIEEDA<sup>1</sup>VTM (配列番号33)

図 2

10

20

30

40

50

【図 3】

プロ領域アミノ酸位置の番号付け

野生型(参照) レンツス(0 items)プロ領域配列(配列番号15 E90)

A<sub>1</sub>E<sub>2</sub>E<sub>3</sub>A<sub>4</sub>K<sub>5</sub>K<sub>6</sub>X<sub>7</sub>L<sub>8</sub>I<sub>9</sub>G<sub>10</sub>F<sub>11</sub>N<sub>12</sub>I<sub>13</sub>E<sub>14</sub>Q<sub>15</sub>E<sub>16</sub>A<sub>17</sub>V<sub>18</sub>S<sub>19</sub>E<sub>20</sub>F<sub>21</sub>V<sub>22</sub>E<sub>23</sub>Q<sub>24</sub>V<sub>25</sub>E<sub>26</sub>A<sub>27</sub>N<sub>28</sub>D<sub>29</sub>**E**<sub>30</sub>V<sub>31</sub>A<sub>32</sub>I<sub>33</sub>L<sub>34</sub>S<sub>35</sub>E<sub>36</sub>E<sub>37</sub>E<sub>38</sub>V<sub>39</sub>V<sub>40</sub>  
E<sub>41</sub>I<sub>42</sub>E<sub>43</sub>L<sub>44</sub>L<sub>45</sub>H<sub>46</sub>E<sub>47</sub>F<sub>48</sub>F<sub>49</sub>T<sub>50</sub>I<sub>51</sub>P<sub>52</sub>V<sub>53</sub>S<sub>54</sub>V<sub>55</sub>V<sub>56</sub>S<sub>57</sub>L<sub>58</sub>S<sub>59</sub>P<sub>60</sub>E<sub>61</sub>D<sub>62</sub>V<sub>63</sub>D<sub>64</sub>A<sub>65</sub>L<sub>66</sub>E<sub>67</sub>L<sub>68</sub>D<sub>69</sub>F<sub>70</sub>A<sub>71</sub>I<sub>72</sub>S<sub>73</sub>Y<sub>74</sub>I<sub>75</sub>E<sub>76</sub>E<sub>77</sub>D<sub>78</sub>  
A<sub>79</sub>E<sub>80</sub>V<sub>81</sub>T<sub>82</sub>T<sub>83</sub>M<sub>84</sub>

バリエント(参照)プロ領域A配列(配列番号9 H00)

A<sub>1</sub>E<sub>2</sub>E<sub>3</sub>A<sub>4</sub>K<sub>5</sub>K<sub>6</sub>X<sub>7</sub>L<sub>8</sub>I<sub>9</sub>G<sub>10</sub>F<sub>11</sub>N<sub>12</sub>I<sub>13</sub>E<sub>14</sub>Q<sub>15</sub>E<sub>16</sub>A<sub>17</sub>V<sub>18</sub>S<sub>19</sub>E<sub>20</sub>F<sub>21</sub>V<sub>22</sub>E<sub>23</sub>Q<sub>24</sub>V<sub>25</sub>E<sub>26</sub>A<sub>27</sub>N<sub>28</sub>D<sub>29</sub>**H**<sub>30</sub>V<sub>31</sub>A<sub>32</sub>I<sub>33</sub>L<sub>34</sub>S<sub>35</sub>E<sub>36</sub>E<sub>37</sub>E<sub>38</sub>V<sub>39</sub>V<sub>40</sub>  
E<sub>41</sub>I<sub>42</sub>E<sub>43</sub>L<sub>44</sub>L<sub>45</sub>H<sub>46</sub>E<sub>47</sub>F<sub>48</sub>F<sub>49</sub>T<sub>50</sub>I<sub>51</sub>P<sub>52</sub>V<sub>53</sub>S<sub>54</sub>V<sub>55</sub>V<sub>56</sub>S<sub>57</sub>L<sub>58</sub>S<sub>59</sub>P<sub>60</sub>E<sub>61</sub>D<sub>62</sub>V<sub>63</sub>D<sub>64</sub>A<sub>65</sub>L<sub>66</sub>E<sub>67</sub>L<sub>68</sub>D<sub>69</sub>F<sub>70</sub>A<sub>71</sub>I<sub>72</sub>S<sub>73</sub>Y<sub>74</sub>I<sub>75</sub>E<sub>76</sub>E<sub>77</sub>D<sub>78</sub>  
A<sub>79</sub>E<sub>80</sub>V<sub>81</sub>T<sub>82</sub>T<sub>83</sub>M<sub>84</sub>

バリエント(参照)プロ領域B配列(配列番号11 G30)

A<sub>1</sub>E<sub>2</sub>E<sub>3</sub>A<sub>4</sub>K<sub>5</sub>K<sub>6</sub>X<sub>7</sub>L<sub>8</sub>I<sub>9</sub>G<sub>10</sub>F<sub>11</sub>N<sub>12</sub>I<sub>13</sub>E<sub>14</sub>Q<sub>15</sub>E<sub>16</sub>A<sub>17</sub>V<sub>18</sub>S<sub>19</sub>E<sub>20</sub>F<sub>21</sub>V<sub>22</sub>E<sub>23</sub>Q<sub>24</sub>V<sub>25</sub>E<sub>26</sub>A<sub>27</sub>N<sub>28</sub>D<sub>29</sub>**G**<sub>30</sub>V<sub>31</sub>A<sub>32</sub>I<sub>33</sub>L<sub>34</sub>S<sub>35</sub>E<sub>36</sub>E<sub>37</sub>E<sub>38</sub>V<sub>39</sub>V<sub>40</sub>  
E<sub>41</sub>I<sub>42</sub>E<sub>43</sub>L<sub>44</sub>L<sub>45</sub>H<sub>46</sub>E<sub>47</sub>F<sub>48</sub>F<sub>49</sub>T<sub>50</sub>I<sub>51</sub>P<sub>52</sub>V<sub>53</sub>S<sub>54</sub>V<sub>55</sub>V<sub>56</sub>S<sub>57</sub>L<sub>58</sub>S<sub>59</sub>P<sub>60</sub>E<sub>61</sub>D<sub>62</sub>V<sub>63</sub>D<sub>64</sub>A<sub>65</sub>L<sub>66</sub>E<sub>67</sub>L<sub>68</sub>D<sub>69</sub>F<sub>70</sub>A<sub>71</sub>I<sub>72</sub>S<sub>73</sub>Y<sub>74</sub>I<sub>75</sub>E<sub>76</sub>E<sub>77</sub>D<sub>78</sub>  
A<sub>79</sub>E<sub>80</sub>V<sub>81</sub>T<sub>82</sub>T<sub>83</sub>M<sub>84</sub>

バリエント(参照)プロ領域C配列(配列番号14 GK挿入)

A<sub>1</sub>**G**<sub>2</sub>K<sub>3</sub>E<sub>4</sub>E<sub>5</sub>A<sub>6</sub>K<sub>7</sub>K<sub>8</sub>X<sub>9</sub>L<sub>10</sub>I<sub>11</sub>G<sub>12</sub>F<sub>13</sub>N<sub>14</sub>I<sub>15</sub>E<sub>16</sub>A<sub>17</sub>V<sub>18</sub>S<sub>19</sub>E<sub>20</sub>F<sub>21</sub>V<sub>22</sub>E<sub>23</sub>Q<sub>24</sub>V<sub>25</sub>E<sub>26</sub>A<sub>27</sub>N<sub>28</sub>D<sub>29</sub>**E**<sub>30</sub>V<sub>31</sub>A<sub>32</sub>I<sub>33</sub>L<sub>34</sub>S<sub>35</sub>E<sub>36</sub>E<sub>37</sub>E<sub>38</sub>V<sub>39</sub>V<sub>40</sub>  
E<sub>41</sub>I<sub>42</sub>E<sub>43</sub>L<sub>44</sub>L<sub>45</sub>H<sub>46</sub>E<sub>47</sub>F<sub>48</sub>F<sub>49</sub>T<sub>50</sub>I<sub>51</sub>P<sub>52</sub>V<sub>53</sub>S<sub>54</sub>V<sub>55</sub>V<sub>56</sub>S<sub>57</sub>L<sub>58</sub>S<sub>59</sub>P<sub>60</sub>E<sub>61</sub>D<sub>62</sub>V<sub>63</sub>D<sub>64</sub>A<sub>65</sub>L<sub>66</sub>E<sub>67</sub>L<sub>68</sub>D<sub>69</sub>F<sub>70</sub>A<sub>71</sub>I<sub>72</sub>S<sub>73</sub>Y<sub>74</sub>I<sub>75</sub>E<sub>76</sub>E<sub>77</sub>D<sub>78</sub>  
E<sub>79</sub>D<sub>80</sub>A<sub>81</sub>E<sub>82</sub>V<sub>83</sub>T<sub>84</sub>T<sub>85</sub>M<sub>86</sub>

バリエント(参照)プロ領域D配列(配列番号29 GKS挿入)

A<sub>1</sub>**G**<sub>2</sub>K<sub>3</sub>**S**<sub>4</sub>E<sub>5</sub>E<sub>6</sub>A<sub>7</sub>K<sub>8</sub>K<sub>9</sub>X<sub>10</sub>L<sub>11</sub>I<sub>12</sub>G<sub>13</sub>F<sub>14</sub>N<sub>15</sub>I<sub>16</sub>E<sub>17</sub>Q<sub>18</sub>E<sub>19</sub>A<sub>20</sub>V<sub>21</sub>S<sub>22</sub>E<sub>23</sub>Q<sub>24</sub>V<sub>25</sub>E<sub>26</sub>A<sub>27</sub>N<sub>28</sub>D<sub>29</sub>**E**<sub>30</sub>V<sub>31</sub>A<sub>32</sub>I<sub>33</sub>L<sub>34</sub>S<sub>35</sub>E<sub>36</sub>E<sub>37</sub>E<sub>38</sub>V<sub>39</sub>V<sub>40</sub>  
E<sub>41</sub>I<sub>42</sub>E<sub>43</sub>L<sub>44</sub>L<sub>45</sub>H<sub>46</sub>E<sub>47</sub>F<sub>48</sub>F<sub>49</sub>T<sub>50</sub>I<sub>51</sub>P<sub>52</sub>V<sub>53</sub>S<sub>54</sub>V<sub>55</sub>V<sub>56</sub>S<sub>57</sub>L<sub>58</sub>S<sub>59</sub>P<sub>60</sub>E<sub>61</sub>D<sub>62</sub>V<sub>63</sub>D<sub>64</sub>A<sub>65</sub>L<sub>66</sub>E<sub>67</sub>L<sub>68</sub>D<sub>69</sub>F<sub>70</sub>A<sub>71</sub>I<sub>72</sub>S<sub>73</sub>Y<sub>74</sub>I<sub>75</sub>E<sub>76</sub>E<sub>77</sub>D<sub>78</sub>  
E<sub>80</sub>D<sub>81</sub>A<sub>82</sub>E<sub>83</sub>V<sub>84</sub>T<sub>85</sub>T<sub>86</sub>M<sub>87</sub>

バリエント(参照)プロ領域E配列(配列番号30 GK挿入)

A<sub>1</sub>**G**<sub>2</sub>K<sub>3</sub>**A**<sub>4</sub>E<sub>5</sub>E<sub>6</sub>A<sub>7</sub>K<sub>8</sub>K<sub>9</sub>X<sub>10</sub>L<sub>11</sub>I<sub>12</sub>G<sub>13</sub>F<sub>14</sub>N<sub>15</sub>I<sub>16</sub>E<sub>17</sub>Q<sub>18</sub>E<sub>19</sub>A<sub>20</sub>V<sub>21</sub>S<sub>22</sub>E<sub>23</sub>Q<sub>24</sub>V<sub>25</sub>E<sub>26</sub>A<sub>27</sub>N<sub>28</sub>D<sub>29</sub>**E**<sub>30</sub>V<sub>31</sub>A<sub>32</sub>I<sub>33</sub>L<sub>34</sub>S<sub>35</sub>E<sub>36</sub>E<sub>37</sub>E<sub>38</sub>V<sub>39</sub>V<sub>40</sub>  
E<sub>41</sub>I<sub>42</sub>E<sub>43</sub>L<sub>44</sub>L<sub>45</sub>H<sub>46</sub>E<sub>47</sub>F<sub>48</sub>F<sub>49</sub>T<sub>50</sub>I<sub>51</sub>P<sub>52</sub>V<sub>53</sub>S<sub>54</sub>V<sub>55</sub>V<sub>56</sub>S<sub>57</sub>L<sub>58</sub>S<sub>59</sub>P<sub>60</sub>E<sub>61</sub>D<sub>62</sub>V<sub>63</sub>D<sub>64</sub>A<sub>65</sub>L<sub>66</sub>E<sub>67</sub>L<sub>68</sub>D<sub>69</sub>F<sub>70</sub>A<sub>71</sub>I<sub>72</sub>S<sub>73</sub>Y<sub>74</sub>I<sub>75</sub>E<sub>76</sub>E<sub>77</sub>D<sub>78</sub>  
E<sub>80</sub>D<sub>81</sub>A<sub>82</sub>E<sub>83</sub>V<sub>84</sub>T<sub>85</sub>T<sub>86</sub>M<sub>87</sub>

バリエント(参照)プロ領域F配列(配列番号31 GKAA挿入)

A<sub>1</sub>**G**<sub>2</sub>K<sub>3</sub>**A**<sub>4</sub>E<sub>5</sub>E<sub>6</sub>A<sub>7</sub>K<sub>8</sub>K<sub>9</sub>X<sub>10</sub>L<sub>11</sub>I<sub>12</sub>G<sub>13</sub>F<sub>14</sub>N<sub>15</sub>I<sub>16</sub>E<sub>17</sub>Q<sub>18</sub>E<sub>19</sub>A<sub>20</sub>V<sub>21</sub>S<sub>22</sub>E<sub>23</sub>Q<sub>24</sub>V<sub>25</sub>E<sub>26</sub>A<sub>27</sub>N<sub>28</sub>D<sub>29</sub>**E**<sub>30</sub>V<sub>31</sub>A<sub>32</sub>I<sub>33</sub>L<sub>34</sub>S<sub>35</sub>E<sub>36</sub>E<sub>37</sub>E<sub>38</sub>V<sub>39</sub>V<sub>40</sub>  
E<sub>41</sub>I<sub>42</sub>E<sub>43</sub>L<sub>44</sub>L<sub>45</sub>H<sub>46</sub>E<sub>47</sub>F<sub>48</sub>F<sub>49</sub>T<sub>50</sub>I<sub>51</sub>P<sub>52</sub>V<sub>53</sub>S<sub>54</sub>V<sub>55</sub>V<sub>56</sub>S<sub>57</sub>L<sub>58</sub>S<sub>59</sub>P<sub>60</sub>E<sub>61</sub>D<sub>62</sub>V<sub>63</sub>D<sub>64</sub>A<sub>65</sub>L<sub>66</sub>E<sub>67</sub>L<sub>68</sub>D<sub>69</sub>F<sub>70</sub>A<sub>71</sub>I<sub>72</sub>S<sub>73</sub>Y<sub>74</sub>I<sub>75</sub>E<sub>76</sub>E<sub>77</sub>D<sub>78</sub>  
E<sub>80</sub>D<sub>81</sub>D<sub>82</sub>A<sub>83</sub>E<sub>84</sub>V<sub>85</sub>T<sub>86</sub>T<sub>87</sub>M<sub>88</sub>

バリエント(参照)プロ領域G配列(配列番号32 L68K+I72V置換)

A<sub>1</sub>E<sub>2</sub>E<sub>3</sub>A<sub>4</sub>K<sub>5</sub>K<sub>6</sub>X<sub>7</sub>L<sub>8</sub>I<sub>9</sub>G<sub>10</sub>F<sub>11</sub>N<sub>12</sub>I<sub>13</sub>E<sub>14</sub>Q<sub>15</sub>E<sub>16</sub>A<sub>17</sub>V<sub>18</sub>S<sub>19</sub>E<sub>20</sub>F<sub>21</sub>V<sub>22</sub>E<sub>23</sub>Q<sub>24</sub>V<sub>25</sub>E<sub>26</sub>A<sub>27</sub>N<sub>28</sub>D<sub>29</sub>**G**<sub>30</sub>V<sub>31</sub>A<sub>32</sub>I<sub>33</sub>L<sub>34</sub>S<sub>35</sub>E<sub>36</sub>E<sub>37</sub>E<sub>38</sub>V<sub>39</sub>V<sub>40</sub>  
E<sub>41</sub>I<sub>42</sub>E<sub>43</sub>L<sub>44</sub>L<sub>45</sub>H<sub>46</sub>E<sub>47</sub>F<sub>48</sub>F<sub>49</sub>T<sub>50</sub>I<sub>51</sub>P<sub>52</sub>V<sub>53</sub>S<sub>54</sub>V<sub>55</sub>V<sub>56</sub>S<sub>57</sub>L<sub>58</sub>S<sub>59</sub>P<sub>60</sub>E<sub>61</sub>D<sub>62</sub>V<sub>63</sub>D<sub>64</sub>A<sub>65</sub>L<sub>66</sub>E<sub>67</sub>L<sub>68</sub>D<sub>69</sub>F<sub>70</sub>A<sub>71</sub>I<sub>72</sub>S<sub>73</sub>Y<sub>74</sub>I<sub>75</sub>E<sub>76</sub>E<sub>77</sub>D<sub>78</sub>  
A<sub>79</sub>E<sub>80</sub>V<sub>81</sub>T<sub>82</sub>T<sub>83</sub>M<sub>84</sub>

バリエント(参照)プロ領域H配列(配列番号33 L68K+E80置換)

A<sub>1</sub>E<sub>2</sub>E<sub>3</sub>A<sub>4</sub>K<sub>5</sub>K<sub>6</sub>X<sub>7</sub>L<sub>8</sub>I<sub>9</sub>G<sub>10</sub>F<sub>11</sub>N<sub>12</sub>I<sub>13</sub>E<sub>14</sub>Q<sub>15</sub>E<sub>16</sub>A<sub>17</sub>V<sub>18</sub>S<sub>19</sub>E<sub>20</sub>F<sub>21</sub>V<sub>22</sub>E<sub>23</sub>Q<sub>24</sub>V<sub>25</sub>E<sub>26</sub>A<sub>27</sub>N<sub>28</sub>D<sub>29</sub>**G**<sub>30</sub>V<sub>31</sub>A<sub>32</sub>I<sub>33</sub>L<sub>34</sub>S<sub>35</sub>E<sub>36</sub>E<sub>37</sub>E<sub>38</sub>V<sub>39</sub>V<sub>40</sub>  
E<sub>41</sub>I<sub>42</sub>E<sub>43</sub>L<sub>44</sub>L<sub>45</sub>H<sub>46</sub>E<sub>47</sub>F<sub>48</sub>F<sub>49</sub>T<sub>50</sub>I<sub>51</sub>P<sub>52</sub>V<sub>53</sub>S<sub>54</sub>V<sub>55</sub>V<sub>56</sub>S<sub>57</sub>L<sub>58</sub>S<sub>59</sub>P<sub>60</sub>E<sub>61</sub>D<sub>62</sub>V<sub>63</sub>D<sub>64</sub>A<sub>65</sub>L<sub>66</sub>E<sub>67</sub>L<sub>68</sub>D<sub>69</sub>F<sub>70</sub>A<sub>71</sub>I<sub>72</sub>S<sub>73</sub>Y<sub>74</sub>I<sub>75</sub>E<sub>76</sub>E<sub>77</sub>D<sub>78</sub>  
A<sub>79</sub>**I**<sub>80</sub>V<sub>81</sub>T<sub>82</sub>T<sub>83</sub>M<sub>84</sub>

【配列表】

2025510901000001.xml

【図 3 - 2】

プロ領域アミノ酸位置の番号付け(続き)

バリエント(参照)プロ領域E配列(配列番号30 GK挿入)

A<sub>1</sub>**G**<sub>2</sub>K<sub>3</sub>**A**<sub>4</sub>E<sub>5</sub>E<sub>6</sub>A<sub>7</sub>K<sub>8</sub>K<sub>9</sub>X<sub>10</sub>L<sub>11</sub>I<sub>12</sub>G<sub>13</sub>F<sub>14</sub>N<sub>15</sub>I<sub>16</sub>E<sub>17</sub>Q<sub>18</sub>E<sub>19</sub>A<sub>20</sub>V<sub>21</sub>S<sub>22</sub>E<sub>23</sub>Q<sub>24</sub>V<sub>25</sub>E<sub>26</sub>A<sub>27</sub>N<sub>28</sub>D<sub>29</sub>**E**<sub>30</sub>V<sub>31</sub>A<sub>32</sub>I<sub>33</sub>L<sub>34</sub>S<sub>35</sub>E<sub>36</sub>E<sub>37</sub>E<sub>38</sub>V<sub>39</sub>V<sub>40</sub>  
E<sub>41</sub>I<sub>42</sub>E<sub>43</sub>L<sub>44</sub>L<sub>45</sub>H<sub>46</sub>E<sub>47</sub>F<sub>48</sub>F<sub>49</sub>T<sub>50</sub>I<sub>51</sub>P<sub>52</sub>V<sub>53</sub>S<sub>54</sub>V<sub>55</sub>V<sub>56</sub>S<sub>57</sub>L<sub>58</sub>S<sub>59</sub>P<sub>60</sub>E<sub>61</sub>D<sub>62</sub>V<sub>63</sub>D<sub>64</sub>A<sub>65</sub>L<sub>66</sub>E<sub>67</sub>L<sub>68</sub>D<sub>69</sub>F<sub>70</sub>A<sub>71</sub>I<sub>72</sub>S<sub>73</sub>Y<sub>74</sub>I<sub>75</sub>E<sub>76</sub>E<sub>77</sub>D<sub>78</sub>  
E<sub>80</sub>D<sub>81</sub>A<sub>82</sub>E<sub>83</sub>V<sub>84</sub>T<sub>85</sub>T<sub>86</sub>M<sub>87</sub>

バリエント(参照)プロ領域F配列(配列番号31 GKAA挿入)

A<sub>1</sub>**G**<sub>2</sub>K<sub>3</sub>**A**<sub>4</sub>E<sub>5</sub>E<sub>6</sub>A<sub>7</sub>K<sub>8</sub>K<sub>9</sub>X<sub>10</sub>L<sub>11</sub>I<sub>12</sub>G<sub>13</sub>F<sub>14</sub>N<sub>15</sub>I<sub>16</sub>E<sub>17</sub>Q<sub>18</sub>E<sub>19</sub>A<sub>20</sub>V<sub>21</sub>S<sub>22</sub>E<sub>23</sub>Q<sub>24</sub>V<sub>25</sub>E<sub>26</sub>A<sub>27</sub>N<sub>28</sub>D<sub>29</sub>**E**<sub>30</sub>V<sub>31</sub>A<sub>32</sub>I<sub>33</sub>L<sub>34</sub>S<sub>35</sub>E<sub>36</sub>E<sub>37</sub>E<sub>38</sub>V<sub>39</sub>V<sub>40</sub>  
E<sub>41</sub>I<sub>42</sub>E<sub>43</sub>L<sub>44</sub>L<sub>45</sub>H<sub>46</sub>E<sub>47</sub>F<sub>48</sub>F<sub>49</sub>T<sub>50</sub>I<sub>51</sub>P<sub>52</sub>V<sub>53</sub>S<sub>54</sub>V<sub>55</sub>V<sub>56</sub>S<sub>57</sub>L<sub>58</sub>S<sub>59</sub>P<sub>60</sub>E<sub>61</sub>D<sub>62</sub>V<sub>63</sub>D<sub>64</sub>A<sub>65</sub>L<sub>66</sub>E<sub>67</sub>L<sub>68</sub>D<sub>69</sub>F<sub>70</sub>A<sub>71</sub>I<sub>72</sub>S<sub>73</sub>Y<sub>74</sub>I<sub>75</sub>E<sub>76</sub>E<sub>77</sub>D<sub>78</sub>  
E<sub>80</sub>D<sub>81</sub>D<sub>82</sub>A<sub>83</sub>E<sub>84</sub>V<sub>85</sub>T<sub>86</sub>T<sub>87</sub>M<sub>88</sub>

バリエント(参照)プロ領域G配列(配列番号32 L68K+I72V置換)

A<sub>1</sub>E<sub>2</sub>E<sub>3</sub>A<sub>4</sub>K<sub>5</sub>K<sub>6</sub>X<sub>7</sub>L<sub>8</sub>I<sub>9</sub>G<sub>10</sub>F<sub>11</sub>N<sub>12</sub>I<sub>13</sub>E<sub>14</sub>Q<sub>15</sub>E<sub>16</sub>A<sub>17</sub>V<sub>18</sub>S<sub>19</sub>E<sub>20</sub>F<sub>21</sub>V<sub>22</sub>E<sub>23</sub>Q<sub>24</sub>V<sub>25</sub>E<sub>26</sub>A<sub>27</sub>N<sub>28</sub>D<sub>29</sub>**G**<sub>30</sub>V<sub>31</sub>A<sub>32</sub>I<sub>33</sub>L<sub>34</sub>S<sub>35</sub>E<sub>36</sub>E<sub>37</sub>E<sub>38</sub>V<sub>39</sub>V<sub>40</sub>  
E<sub>41</sub>I<sub>42</sub>E<sub>43</sub>L<sub>44</sub>L<sub>45</sub>H<sub>46</sub>E<sub>47</sub>F<sub>48</sub>F<sub>49</sub>T<sub>50</sub>I<sub>51</sub>P<sub>52</sub>V<sub>53</sub>S<sub>54</sub>V<sub>55</sub>V<sub>56</sub>S<sub>57</sub>L<sub>58</sub>S<sub>59</sub>P<sub>60</sub>E<sub>61</sub>D<sub>62</sub>V<sub>63</sub>D<sub>64</sub>A<sub>65</sub>L<sub>66</sub>E<sub>67</sub>L<sub>68</sub>D<sub>69</sub>F<sub>70</sub>A<sub>71</sub>I<sub>72</sub>S<sub>73</sub>Y<sub>74</sub>I<sub>75</sub>E<sub>76</sub>E<sub>77</sub>D<sub>78</sub>  
A<sub>79</sub>E<sub>80</sub>V<sub>81</sub>T<sub>82</sub>T<sub>83</sub>M<sub>84</sub>

バリエント(参照)プロ領域H配列(配列番号33 L68K+E80置換)

A<sub>1</sub>E<sub>2</sub>E<sub>3</sub>A<sub>4</sub>K<sub>5</sub>K<sub>6</sub>X<sub>7</sub>L<sub>8</sub>I<sub>9</sub>G<sub>10</sub>F<sub>11</sub>N<sub>12</sub>I<sub>13</sub>E<sub>14</sub>Q<sub>15</sub>E<sub>16</sub>A<sub>17</sub>V<sub>18</sub>S<sub>19</sub>E<sub>20</sub>F<sub>21</sub>V<sub>22</sub>E<sub>23</sub>Q<sub>24</sub>V<sub>25</sub>E<sub>26</sub>A<sub>27</sub>N<sub>28</sub>D<sub>29</sub>**G**<sub>30</sub>V<sub>31</sub>A<sub>32</sub>I<sub>33</sub>L<sub>34</sub>S<sub>35</sub>E<sub>36</sub>E<sub>37</sub>E<sub>38</sub>V<sub>39</sub>V<sub>40</sub>  
E<sub>41</sub>I<sub>42</sub>E<sub>43</sub>L<sub>44</sub>L<sub>45</sub>H<sub>46</sub>E<sub>47</sub>F<sub>48</sub>F<sub>49</sub>T<sub>50</sub>I<sub>51</sub>P<sub>52</sub>V<sub>53</sub>S<sub>54</sub>V<sub>55</sub>V<sub>56</sub>S<sub>57</sub>L<sub>58</sub>S<sub>59</sub>P<sub>60</sub>E<sub>61</sub>D<sub>62</sub>V<sub>63</sub>D<sub>64</sub>A<sub>65</sub>L<sub>66</sub>E<sub>67</sub>L<sub>68</sub>D<sub>69</sub>F<sub>70</sub>A<sub>71</sub>I<sub>72</sub>S<sub>73</sub>Y<sub>74</sub>I<sub>75</sub>E<sub>76</sub>E<sub>77</sub>D<sub>78</sub>  
A<sub>79</sub>**I**<sub>80</sub>V<sub>81</sub>T<sub>82</sub>T<sub>83</sub>M<sub>84</sub>

図3

図3(続き)

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
**PCT/US2023/065162**

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
**INV. C07K14/32 C12P21/02**  
**ADD. C07K14/195 C12N1/00**

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 C12R C12P 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. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>X</b>  | <b>WO 2010/123754 A1 (DANISCO US INC [US];<br/>FERRARI EUGENIO [US] ET AL.)<br/>28 October 2010 (2010-10-28)<br/>cited in the application<br/>claims 1-25; sequences 21, 22, 24, 27, 56,<br/>153, 111, 113, 158</b><br>----- | <b>1-17</b>           |
| <b>X</b>  | <b>US 2018/155701 A1 (BABE LILIA MARIA [US]<br/>ET AL) 7 June 2018 (2018-06-07)<br/>claims 1-22</b><br>-----                                                                                                                 | <b>1-17</b>           |
| <b>X</b>  | <b>EP 2 129 779 B1 (DANISCO US INC [US])<br/>9 March 2016 (2016-03-09)<br/>0005;<br/>claims 1-11</b><br>-----                                                                                                                | <b>1-17</b>           |
| <b>X</b>  | <b>US 2011/045571 A1 (FERRARI EUGENIO [US] ET<br/>AL) 24 February 2011 (2011-02-24)<br/>claims 1-25</b><br>-----                                                                                                             | <b>1-17</b>           |

☐ 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**24 August 2023**

Date of mailing of the international search report

**04/09/2023**

Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

**Merk1, Philipp**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/065162

**Box No. I    Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/065162

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2010123754 A1                          | 28-10-2010          | AR 076312 A1               | 01-06-2011          |
|                                           |                     | CA 2759695 A1              | 28-10-2010          |
|                                           |                     | CN 102414321 A             | 11-04-2012          |
|                                           |                     | CN 105238801 A             | 13-01-2016          |
|                                           |                     | DK 2421973 T3              | 30-07-2018          |
|                                           |                     | EP 2421973 A1              | 29-02-2012          |
|                                           |                     | JP 2012524542 A            | 18-10-2012          |
|                                           |                     | US 2011045571 A1           | 24-02-2011          |
|                                           |                     | US 2014045268 A1           | 13-02-2014          |
|                                           |                     | US 2016040147 A1           | 11-02-2016          |
|                                           |                     | WO 2010123754 A1           | 28-10-2010          |
| US 2018155701 A1                          | 07-06-2018          | CA 2989667 A1              | 22-12-2016          |
|                                           |                     | CN 107922934 A             | 17-04-2018          |
|                                           |                     | EP 3310913 A1              | 25-04-2018          |
|                                           |                     | JP 7134629 B2              | 12-09-2022          |
|                                           |                     | JP 2018518185 A            | 12-07-2018          |
|                                           |                     | US 2018155701 A1           | 07-06-2018          |
|                                           |                     | WO 2016205710 A1           | 22-12-2016          |
| EP 2129779 B1                             | 09-03-2016          | AU 2008226792 A1           | 18-09-2008          |
|                                           |                     | CA 2680563 A1              | 18-09-2008          |
|                                           |                     | CN 101641438 A             | 03-02-2010          |
|                                           |                     | CN 103667323 A             | 26-03-2014          |
|                                           |                     | EP 2129779 A2              | 09-12-2009          |
|                                           |                     | HK 1139982 A1              | 30-09-2010          |
|                                           |                     | JP 5867984 B2              | 24-02-2016          |
|                                           |                     | JP 2010521152 A            | 24-06-2010          |
|                                           |                     | KR 20090129425 A           | 16-12-2009          |
|                                           |                     | RU 2009137600 A            | 20-04-2011          |
|                                           |                     | US 2009075332 A1           | 19-03-2009          |
|                                           |                     | US 2014295526 A1           | 02-10-2014          |
|                                           |                     | WO 2008112258 A2           | 18-09-2008          |
| US 2011045571 A1                          | 24-02-2011          | AR 076312 A1               | 01-06-2011          |
|                                           |                     | CA 2759695 A1              | 28-10-2010          |
|                                           |                     | CN 102414321 A             | 11-04-2012          |
|                                           |                     | CN 105238801 A             | 13-01-2016          |
|                                           |                     | DK 2421973 T3              | 30-07-2018          |
|                                           |                     | EP 2421973 A1              | 29-02-2012          |
|                                           |                     | JP 2012524542 A            | 18-10-2012          |
|                                           |                     | US 2011045571 A1           | 24-02-2011          |
|                                           |                     | US 2014045268 A1           | 13-02-2014          |
|                                           |                     | US 2016040147 A1           | 11-02-2016          |
|                                           |                     | WO 2010123754 A1           | 28-10-2010          |

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 |                 | F I     | テーマコード (参考) |   |
|------------|-----------------|---------|-------------|---|
| C 1 2 N    | 9/00 (2006.01)  | C 1 2 N | 9/00        |   |
| C 1 2 N    | 15/63 (2006.01) | C 1 2 N | 15/63       | Z |

,MC,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者   ボンジョルニ、クリスティーナ  
              アメリカ合衆国、9 4 3 0 4   カリフォルニア州、パロ アルト、ページ ミル ロード 9 2 5
- (72)発明者   フーデヘブル、フリッツ  
              オランダ、2 3 4 2   ビーエイチ ウフストヘースト、ウィレム アイントホーフェンストラート 4
- (72)発明者   フリッシュ、ライアン エル  
              アメリカ合衆国、1 9 8 0 5   デラウェア州、ウィルミントン、センター ロード 9 7 4
- (72)発明者   マルダー、ハルム  
              オランダ、2 3 4 2   ビーエイチ ウフストヘースト、ウィレム アイントホーフェンストラート 4

F ターム (参考)   4B064   AG01 CA02 CA19 CC24 CE07 CE10 CE14 DA20  
                  4B065   AA15X AA26X AB01 AC14 BA02 BA03 BA04 CA24 CA27 CA28  
                  CA29 CA31 CA32 CA33 CA60