

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成30年1月11日 (2018.1.11)

【公表番号】特表2017-508454(P2017-508454A)

【公表日】平成29年3月30日 (2017.3.30)

【年通号数】公開・登録公報2017-013

【出願番号】特願2016-552921(P2016-552921)

【国際特許分類】

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P 39/02 (2006.01)

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 P 21/02 Z N A C

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 15/00 A

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 39/02

A 6 1 P 37/04

A 6 1 K 37/02

【手続補正書】

【提出日】平成29年11月22日 (2017.11.22)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

減少ゲノム大腸菌宿主において組換え C R M 1 9 7 を産生するための方法であって、前記組換え C R M 1 9 7 タンパク質の発現に好適な条件下で、周辺質への C R M 1 9 7 タンパク質の移送を指向する o m p A、o m p F または y t f Q シグナル配列に融合された、前記 C R M 1 9 7 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む減少ゲノム大腸菌をインキュベートし、それにより、1 リットル当たり少なくとも 1 グラムの可溶性 C R M 1 9 7 の収量を得ることを含み、前記ヌクレオチド配列は、発現制御配列に動作可能に連結されており、天然の親大腸菌株が、天然 - 2 フレームシフト突然変異を含む K - 1 2 株であり、ここで、前記減少ゲノム大腸菌宿主は、次の修飾：(i) 大腸菌 K - 1 2 M G 1 6 5 5 株の少なくとも次の D N A セグメント：b 0 2 4 5 - b 0 3 0 1、b 0 3 0 3 - b 0 3 1 0、b 1 3 3 6 - b 1 4 1 1、b 4 4 2 6 - b 4 4 2 7、b 2 4 4 1 - b 2 4 5 0、b 2 6 2 2 - b 2 6 5 4、b 2 6 5 7 - b 2 6 6 0、b 4 4 6 2、b 1 9 9 4 - b 2 0 0 8、b 4 4 3 5、b 3 3 2 2 - b 3 3 3 8、b 2 3 4 9 - b 2 3 6 3、b 1 5 3 9 - b 1 5 7 9、b 4 2 6 9 - b 4 3 2 0、b 2 9 6 8 - b 2 9 7 2、b 2 9 7 5 - b 2 9 7 7、b 2 9 7 9 - b 2 9 8 7、b 4 4 6 6 - 4 4 6 8、b 1 1 3 7 - b 1

1 7 2、b 0 5 3 7 - b 0 5 6 5、b 0 0 1 6 - b 0 0 2 2、b 4 4 1 2 - b 4 4 1 3、
b 0 5 7 7 - b 0 5 8 2、b 4 4 1 5、b 2 3 8 9 - b 2 3 9 0、b 2 3 9 2 - b 2 3 9
5、b 0 3 5 8 - b 0 3 6 8、b 0 3 7 0 - b 0 3 8 0、b 2 8 5 6 - b 2 8 6 3、b 3
0 4 2 - b 3 0 4 8、b 0 6 5 6、b 1 3 2 5 - b 1 3 3 3、b 2 0 3 0 - b 2 0 6 2、
b 2 1 9 0 - b 2 1 9 2、b 3 2 1 5 - b 3 2 1 9、b 3 5 0 4 - b 3 5 0 5、b 1 0 7
0 - b 1 0 8 3、b 1 8 7 8 - b 1 8 9 4、b 1 9 1 7 - b 1 9 5 0、b 4 3 2 4 - b 4
3 4 2、b 4 3 4 5 - b 4 3 5 8、b 4 4 8 6、b 0 4 9 7 - b 0 5 0 2、b 0 7 0 0 -
b 0 7 0 6、b 1 4 5 6 - b 1 4 6 2、b 3 4 8 1 - b 3 4 8 4、b 3 5 9 2 - b 3 5 9
6、b 0 9 8 1 - b 0 9 8 8、b 1 0 2 1 - b 1 0 2 9、b 2 0 8 0 - b 2 0 9 6、b 4
4 3 8、b 3 4 4 0 - b 3 4 4 5、b 4 4 5 1、b 3 5 5 6 - b 3 5 5 8、b 4 4 5 5、
b 1 7 8 6、b 0 1 5 0 - b 0 1 5 3、及び b 2 9 4 5 の欠失、(i i) オロト酸ホスホ
リボシルトランスフェラーゼ活性を強化するための r p h 遺伝子の欠失、(i i i) 活性
アセトヒドロキシ酸シンターゼ I I 産生の回復のための、i l v G 遺伝子における天然 -
2 フレームシフト突然変異の補正、ならびに (i v) i c l R 及び a r p A 遺伝子の全て
または一部の欠失を含む、方法。

【請求項 2】

前記天然の親大腸菌株が、K - 1 2 株 M G 1 6 5 5 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

1 リットル当たり少なくとも 2 グラムの可溶性 C R M 1 9 7 の収量が得られる、請求項
1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記シグナル配列が、O m p F または Y t f Q である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記シグナル配列が、Y t f Q である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記減少ゲノム大腸菌が、そこから、前記大腸菌 K - 1 2 M G 1 6 5 5 株の少なくと
も次の DNA セグメント：b 0 3 1 5 - b 0 3 3 1、b 0 3 3 3 - b 0 3 4 1、b 0 3 4
6 - b 0 3 5 4、b 2 4 8 1 - b 2 4 9 2、b 2 2 1 9 - b 2 2 3 0、b 4 5 0 0、b 3
7 0 7 - b 3 7 2 3、b 0 6 4 4 - b 0 6 5 0、b 4 0 7 9 - 4 0 9 0、b 4 4 8 7、b
4 0 9 2 - b 4 1 0 6、b 0 7 3 0 - b 0 7 3 2、b 3 5 7 2 - b 3 5 8 7、b 1 6 5 3
、b 2 7 3 5 - b 2 7 4 0、b 2 4 0 5 - b 2 4 0 7、b 3 8 9 6 - b 3 9 0 0、b 1 2
0 2、b 4 2 6 3 - b 4 2 6 8、b 0 6 1 1、b 2 3 6 4 - b 2 3 6 6、b 0 8 3 9、b
0 4 8 8 - b 0 5 0 0、及び b 0 5 0 2 をさらに欠失している、請求項 1 ~ 5 のいずれか
一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記減少ゲノム大腸菌が、M D S 4 2 株である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の
方法。

【請求項 8】

前記減少ゲノム大腸菌が、M D S 6 9 株である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記減少ゲノム大腸菌が、機能 r e c A (b 2 6 9 9) 遺伝子を含む、請求項 1 ~ 8 の
いずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記減少ゲノム大腸菌が、r e l A 遺伝子であって、前記 r e l A 遺伝子のコード配列
の 5 4 7 または 5 4 8 位に少なくとも 1 つの点突然変異を有する r e l A 遺伝子を含み、
前記突然変異が、5 4 7 位での G A 突然変異、5 4 7 位での G T 突然変異、5 4 8 位
での C G 突然変異、または 5 4 8 位での C T 突然変異のうちの 1 つ以上から選択され
る、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記減少ゲノム大腸菌が、機能 p o l B (b 0 0 6 0)、機能 d i n B (b 0 2 3 1)

、及び機能 u m u D C (b 1 1 8 3 - b 1 1 8 4) 遺伝子の 1 つ以上 を欠く、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記減少ゲノム大腸菌が、挿入配列を含まない、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記 C R M 1 9 7 ヌクレオチド配列が、前記大腸菌宿主細胞における発現のために最適化される、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

(a) 前記減少ゲノム大腸菌を成長させることと、

(b) C R M 1 9 7 の発現を誘導することと、を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記方法が、発酵装置内で実行される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

以下のうちの 1 つ以上：(1) 工程 (a) が、前記減少ゲノム大腸菌を 3 7 で最大 1 9 時間成長させ、続いて工程 (b) の前及び後で、約 2 0 ~ 3 0 で成長させることを含む、(2) 工程 (a) 及び (b) が、血清、酵母抽出物、または他の動物由来の副産物を含まない成長培地中で行われる、(3) 工程 (a) において、p H が、6 . 5 ~ 7 . 5 の範囲である、ならびに / あるいは (4) p H が、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、またはヒスチジン緩衝液を用いて維持される、を含む、請求項 1 4 または 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記緩衝液が、リン酸緩衝液である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

発現が、工程 (b) において、好適な量の I P T G を添加することによって誘導される、請求項 1 4 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

発現が、2 0 0 ~ 2 7 5 の O D₆₀₀ で誘導される、請求項 1 4 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記発酵装置が、0 . 5 ~ 5 0 , 0 0 0 リットルの培養物を含む、請求項 1 5 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

(c) 洗剤の不在下で、前記培養した減少ゲノム大腸菌細胞を機械的に破碎し、前記得られた細胞溶解物を遠心分離して、可溶性画分を得る、さらなる工程を含む、請求項 1 4 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

C R M 1 9 7 が、1 つ以上の精製工程により、前記可溶性画分から精製される、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記 1 つ以上の精製工程が、疎水性相互作用クロマトグラフィー及び / または陰イオン交換クロマトグラフィーを含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記精製工程が、疎水性相互作用クロマトグラフィー、続いて陰イオン交換クロマトグラフィーを含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記減少ゲノム大腸菌が、機能 r e c A (b 2 6 9 9) 遺伝子を欠く、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

周辺質への C R M 1 9 7 タンパク質の移送を指向する o m p A、o m p F または y t f

Qシグナル配列に融合された、前記CRM197タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む減少ゲノム大腸菌宿主であって、前記ヌクレオチド配列は、発現制御配列に動作可能に連結されており、天然の親大腸菌株が、天然-2フレームシフト突然変異を含むK-12株であり、ここで、前記減少ゲノム大腸菌宿主は、次の修飾：
 (i) 大腸菌K-12 MG1655株の少なくとも次のDNAセグメント：b0245-b0301、b0303-b0310、b1336-b1411、b4426-b4427、b2441-b2450、b2622-b2654、b2657-b2660、b4462、b1994-b2008、b4435、b3322-b3338、b2349-b2363、b1539-b1579、b4269-b4320、b2968-b2972、b2975-b2977、b2979-b2987、b4466-b4468、b1137-b1172、b0537-b0565、b0016-b0022、b4412-b4413、b0577-b0582、b4415、b2389-b2390、b2392-b2395、b0358-b0368、b0370-b0380、b2856-b2863、b3042-b3048、b0656、b1325-b1333、b2030-b2062、b2190-b2192、b3215-b3219、b3504-b3505、b1070-b1083、b1878-b1894、b1917-b1950、b4324-b4342、b4345-b4358、b4486、b0497-b0502、b0700-b0706、b1456-b1462、b3481-b3484、b3592-b3596、b0981-b0988、b1021-b1029、b2080-b2096、b4438、b3440-b3445、b4451、b3556-b3558、b4455、b1786、b0150-b0153、及びb2945の欠失、(ii) オロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ活性を強化するためのrph遺伝子の欠失、(iii) 活性アセトヒドロキシ酸シンターゼII産生の回復のためのilvG遺伝子における天然-2フレームシフト突然変異の補正、ならびに(iv) iclR及びarpA遺伝子の全てまたは一部の欠失を含む、減少ゲノム大腸菌宿主。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

本発明のこれら及び他の実施形態は、本明細書において以下により詳細に記載される。

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

(項目1)

減少ゲノム大腸菌宿主において組換えCRM197を産生するための方法であって、前記組換えCRM197タンパク質の発現に好適な条件下で、発現制御配列に動作可能に連結された周辺質へのCRM197タンパク質の移送を指向するシグナル配列に融合された、前記CRM197タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む減少ゲノム大腸菌をインキュベートし、それにより、1リットル当たり少なくとも1グラムの可溶性CRM197の収量を得ることを含み、前記天然の親大腸菌株が、K12株、好ましくはK12 MG1655である、前記方法。

(項目2)

1リットル当たり少なくとも2グラム、1リットル当たり少なくとも3グラム、1リットル当たり少なくとも4グラム、または1リットル当たり少なくとも5グラムの可溶性CRM197の収量が得られる、項目1に記載の前記方法。

(項目3)

前記シグナル配列が、OmpA、OmpF、MglB、MalE、OppA、RbsB、Agp、FkpA、YtfQ、HdeA、HdeB、OmpC、及びGlnHシグナル配列からなる群から選択される、項目2に記載の前記方法。

(項目 4)

前記シグナル配列が、O m p FまたはY t f Qである、項目 3 に記載の前記方法。

(項目 5)

前記シグナル配列が、Y t f Qである、項目 4 に記載の前記方法。

(項目 6)

前記減少ゲノム大腸菌が、大腸菌株 M G 1 6 5 5 より約 2 % ~ 約 4 0 % 小さい、好ましくは約 5 % ~ 約 3 0 % 小さいように遺伝子操作されるゲノムを有する、項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目 7)

前記減少ゲノム大腸菌が、そこから、前記大腸菌 K - 1 2 株 M G 1 6 5 5 の少なくとも次の DNA セグメント：b 0 2 4 5 - b 0 3 0 1、b 0 3 0 3 - b 0 3 1 0、b 1 3 3 6 - b 1 4 1 1、b 4 4 2 6 - b 4 4 2 7、b 2 4 4 1 - b 2 4 5 0、b 2 6 2 2 - b 2 6 5 4、b 2 6 5 7 - b 2 6 6 0、b 4 4 6 2、b 1 9 9 4 - b 2 0 0 8、b 4 4 3 5、b 3 3 2 2 - b 3 3 3 8、b 2 3 4 9 - b 2 3 6 3、b 1 5 3 9 - b 1 5 7 9、b 4 2 6 9 - b 4 3 2 0、b 2 9 6 8 - b 2 9 7 2、b 2 9 7 5 - b 2 9 7 7、b 2 9 7 9 - b 2 9 8 7、b 4 4 6 6 - b 4 4 6 8、b 1 1 3 7 - b 1 1 7 2、b 0 5 3 7 - b 0 5 6 5、b 0 0 1 6 - b 0 0 2 2、b 4 4 1 2 - b 4 4 1 3、b 0 5 7 7 - b 0 5 8 2、b 4 4 1 5、b 2 3 8 9 - b 2 3 9 0、b 2 3 9 2 - b 2 3 9 5、b 0 3 5 8 - b 0 3 6 8、b 0 3 7 0 - b 0 3 8 0、b 2 8 5 6 - b 2 8 6 3、b 3 0 4 2 - b 3 0 4 8、b 0 6 5 6、b 1 3 2 5 - b 1 3 3 3、b 2 0 3 0 - b 2 0 6 2、b 2 1 9 0 - b 2 1 9 2、b 3 2 1 5 - b 3 2 1 9、b 3 5 0 4 - b 3 5 0 5、b 1 0 7 0 - b 1 0 8 3、b 1 8 7 8 - b 1 8 9 4、b 1 9 1 7 - b 1 9 5 0、b 4 3 2 4 - b 4 3 4 2、b 4 3 4 5 - b 4 3 5 8、b 4 4 8 6、b 0 4 9 7 - b 0 5 0 2、b 0 7 0 0 - b 0 7 0 6、b 1 4 5 6 - b 1 4 6 2、b 3 4 8 1 - b 3 4 8 4、b 3 5 9 2 - b 3 5 9 6、b 0 9 8 1 - b 0 9 8 8、b 1 0 2 1 - b 1 0 2 9、b 2 0 8 0 - b 2 0 9 6、b 4 4 3 8、b 3 4 4 0 - b 3 4 4 5、b 4 4 5 1、b 3 5 5 6 - b 3 5 5 8、b 4 4 5 5、b 1 7 8 6、b 0 1 5 0 - b 0 1 5 3、及び b 2 9 4 5 を欠失している、項目 6 に記載の前記方法。

(項目 8)

前記減少ゲノム大腸菌が、そこから、前記大腸菌 K - 1 2 M G 1 6 5 5 株の少なくとも次の DNA セグメント：b 0 3 1 5 - b 0 3 3 1、b 0 3 3 3 - b 0 3 4 1、b 0 3 4 6 - b 0 3 5 4、b 2 4 8 1 - b 2 4 9 2、b 2 2 1 9 - b 2 2 3 0、b 4 5 0 0、b 3 7 0 7 - b 3 7 2 3、b 0 6 4 4 - b 0 6 5 0、b 4 0 7 9 - b 4 0 9 0、b 4 4 8 7、b 4 0 9 2 - b 4 1 0 6、b 0 7 3 0 - b 0 7 3 2、b 3 5 7 2 - b 3 5 8 7、b 1 6 5 3、b 2 7 3 5 - b 2 7 4 0、b 2 4 0 5 - b 2 4 0 7、b 3 8 9 6 - b 3 9 0 0、b 1 2 0 2、b 4 2 6 3 - b 4 2 6 8、b 0 6 1 1、b 2 3 6 4 - b 2 3 6 6、b 0 8 3 9、b 0 4 8 8 - b 0 5 0 0、及び b 0 5 0 2 をさらに欠失している、項目 7 に記載の前記方法。

。

(項目 9)

前記減少ゲノム大腸菌が、M D S 4 2 株である、項目 7 に記載の前記方法。

(項目 1 0)

前記減少ゲノム大腸菌が、M D S 6 9 株である、項目 8 に記載の前記方法。

(項目 1 1)

前記減少ゲノム大腸菌が、機能 r e c A (b 2 6 9 9) 遺伝子を含む、項目 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目 1 2)

前記減少ゲノム大腸菌が、r e l A 遺伝子であって、前記 r e l A 遺伝子のコード配列の 5 4 7 または 5 4 8 位に少なくとも 1 つの点突然変異を有する r e l A 遺伝子を含み、前記突然変異が、5 4 7 位での G A 突然変異、5 4 7 位での G T 突然変異、5 4 8 位での C G 突然変異、または 5 4 8 位での C T 突然変異のうちの 1 つ以上から選択される、項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目 1 3)

前記減少ゲノム大腸菌が、機能 $p o l B (b 0 0 6 0)$ 、 $d i n B (b 0 2 3 1)$ 、及び任意に $u m u D C (b 1 1 8 3 - b 1 1 8 4)$ 遺伝子を欠く、項目 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目 1 4)

前記減少ゲノム大腸菌が、以下の修飾：(i) オロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ活性を強化するための $r p h$ 遺伝子の欠失、(i i) 活性アセトヒドロキシ酸シンターゼ I I を産生するための、 $i l v G$ 遺伝子における天然 - 2 フレームシフト突然変異を補完する突然変異の導入、ならびに (i i i) $i c l R$ 及び $a r p A$ 遺伝子の欠失を含む、項目 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目 1 5)

前記減少ゲノム大腸菌が、挿入配列を含まない、項目 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目 1 6)

前記 C R M 1 9 7 ヌクレオチド配列が、前記大腸菌宿主細胞における発現のために最適化される、項目 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目 1 7)

(a) 前記減少ゲノム大腸菌を成長させることと、

(b) C R M 1 9 7 の発現を誘導することと、を含む、項目 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目 1 8)

前記方法が、発酵装置内で実行される、項目 1 7 に記載の前記方法。

(項目 1 9)

工程 (a) が、前記減少ゲノム大腸菌を 3 7 で最大 1 9 時間成長させ、続いて工程 (b) の前及び後で、約 2 0 ~ 3 0 、好ましくは約 2 5 で成長させることを含む、項目 1 7 または 1 8 に記載の前記方法。

(項目 2 0)

工程 (a) 及び (b) が、血清、酵母抽出物、または他の動物由来の副産物を含まない成長培地中で行われる、項目 1 7 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目 2 1)

工程 (a) において、 $p H$ が、6 . 5 ~ 7 . 5 の範囲である、項目 1 8 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目 2 2)

前記 $p H$ が、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、またはヒスチジン緩衝液を用いて維持される、項目 1 7 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目 2 3)

前記緩衝液が、リン酸緩衝液である、項目 2 2 に記載の前記方法。

(項目 2 4)

発現が、工程 (b) において、好適な量の I P T G を添加することによって誘導される、項目 1 7 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目 2 5)

発現が、1 0 0 ~ 4 0 0、好ましくは 2 0 0 ~ 2 7 5、より好ましくは 2 3 0 ~ 2 5 0 の $O D_{600}$ で誘導される、項目 1 8 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目 2 6)

前記発酵装置が、0 . 5 ~ 5 0 , 0 0 0 リットルの培養物を含む、項目 1 8 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目 2 7)

(c) 洗剤の不在下で、前記培養した減少ゲノム大腸菌細胞を機械的に破砕し、前記得られた細胞溶解物を遠心分離して、可溶性画分を得る、さらなる工程を含む、項目 1 7 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目 2 8)

前記機械的破砕が、超音波処理または微細流動化を含む、項目 2 7 に記載の前記方法。

(項目 2 9)

C R M 1 9 7 が、1 つ以上の精製工程により、前記可溶性画分から精製される、項目 2 7 または 2 8 に記載の前記方法。

(項目 3 0)

前記 1 つ以上の精製工程が、疎水性相互作用クロマトグラフィー及び/または陰イオン交換クロマトグラフィーを含む、項目 2 9 に記載の前記方法。

(項目 3 1)

前記精製工程が、疎水性相互作用クロマトグラフィー、続いて陰イオン交換クロマトグラフィーを含む、項目 3 0 に記載の前記方法。

(項目 3 2)

C R M 1 9 7 タンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列が、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列に融合されず、それにより、1 リットル当たり約 2 グラム～1 リットル当たり約 2 0 グラムの不溶性 C R M 1 9 7 の収量が得られる、項目 1 に記載の前記方法。

(項目 3 3)

前記不溶性 C R M 1 9 7 が、1 つ以上の可溶化工程に供される、項目 3 2 に記載の前記方法。

(項目 3 4)

C R M 1 9 7 タンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列が、o m p F または y t f Q シグナル配列に融合され、前記減少ゲノム大腸菌宿主が、次の修飾：(i) 前記大腸菌 K - 1 2 M G 1 6 5 5 株の次の DNA セグメント：b 0 2 4 5 - b 0 3 0 1、b 0 3 0 3 - b 0 3 1 0、b 1 3 3 6 - b 1 4 1 1、b 4 4 2 6 - b 4 4 2 7、b 2 4 4 1 - b 2 4 5 0、b 2 6 2 2 - b 2 6 5 4、b 2 6 5 7 - b 2 6 6 0、b 4 4 6 2、b 1 9 9 4 - b 2 0 0 8、b 4 4 3 5、b 3 3 2 2 - b 3 3 3 8、b 2 3 4 9 - b 2 3 6 3、b 1 5 3 9 - b 1 5 7 9、b 4 2 6 9 - b 4 3 2 0、b 2 9 6 8 - b 2 9 7 2、b 2 9 7 5 - b 2 9 7 7、b 2 9 7 9 - b 2 9 8 7、b 4 4 6 6 - 4 4 6 8、b 1 1 3 7 - b 1 1 7 2、b 0 5 3 7 - b 0 5 6 5、b 0 0 1 6 - b 0 0 2 2、b 4 4 1 2 - b 4 4 1 3、b 0 5 7 7 - b 0 5 8 2、b 4 4 1 5、b 2 3 8 9 - b 2 3 9 0、b 2 3 9 2 - b 2 3 9 5、b 0 3 5 8 - b 0 3 6 8、b 0 3 7 0 - b 0 3 8 0、b 2 8 5 6 - b 2 8 6 3、b 3 0 4 2 - b 3 0 4 8、b 0 6 5 6、b 1 3 2 5 - b 1 3 3 3、b 2 0 3 0 - b 2 0 6 2、b 2 1 9 0 - b 2 1 9 2、b 3 2 1 5 - b 3 2 1 9、b 3 5 0 4 - b 3 5 0 5、b 1 0 7 0 - b 1 0 8 3、b 1 8 7 8 - b 1 8 9 4、b 1 9 1 7 - b 1 9 5 0、b 4 3 2 4 - b 4 3 4 2、b 4 3 4 5 - b 4 3 5 8、b 4 4 8 6、b 0 4 9 7 - b 0 5 0 2、b 0 7 0 0 - b 0 7 0 6、b 1 4 5 6 - b 1 4 6 2、b 3 4 8 1 - b 3 4 8 4、b 3 5 9 2 - b 3 5 9 6、b 0 9 8 1 - b 0 9 8 8、b 1 0 2 1 - b 1 0 2 9、b 2 0 8 0 - b 2 0 9 6、b 4 4 3 8、b 3 4 4 0 - b 3 4 4 5、b 4 4 5 1、b 3 5 5 6 - b 3 5 5 8、b 4 4 5 5、b 1 7 8 6、b 0 1 5 0 - b 0 1 5 3、及び b 2 9 4 5 の欠失、(i i) オロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ活性を強化するための r p h 遺伝子の欠失、(i i i) 活性アセトヒドロキシ酸シンターゼ I I を産生するための、i l v G 遺伝子における天然 - 2 フレームシフト突然変異を補完する突然変異の導入、ならびに (i v) i c l R 及び a r p A 遺伝子の欠失を含み、

それにより、1 リットル当たり少なくとも 1 グラム、好ましくは 1 リットル当たり少なくとも 2 グラムの可溶性 C R M 1 9 7 の収量が得られる、項目 1 に記載の前記方法。

(項目 3 5)

前記減少ゲノム大腸菌宿主が、そこから、前記大腸菌 K - 1 2 M G 1 6 5 5 株の少なくとも次の DNA セグメント：b 0 3 1 5 - b 0 3 3 1、b 0 3 3 3 - b 0 3 4 1、b 0 3 4 6 - b 0 3 5 4、b 2 4 8 1 - b 2 4 9 2、b 2 2 1 9 - b 2 2 3 0、b 4 5 0 0、b 3 7 0 7 - b 3 7 2 3、b 0 6 4 4 - b 0 6 5 0、b 4 0 7 9 - 4 0 9 0、b 4 4 8 7

、 b 4 0 9 2 - b 4 1 0 6、 b 0 7 3 0 - b 0 7 3 2、 b 3 5 7 2 - b 3 5 8 7、 b 1 6 5 3、 b 2 7 3 5 - b 2 7 4 0、 b 2 4 0 5 - b 2 4 0 7、 b 3 8 9 6 - b 3 9 0 0、 b 1 2 0 2、 b 4 2 6 3 - b 4 2 6 8、 b 0 6 1 1、 b 2 3 6 4 - b 2 3 6 6、 b 0 8 3 9、 b 0 4 8 8 - b 0 5 0 0、及び b 0 5 0 2 をさらに欠失している、項目 3 4 に記載の前記方法。

(項目 3 6)

発現ベクターを含む減少ゲノム大腸菌宿主であって、前記発現ベクターが、前記大腸菌周辺質への C R M 1 9 7 の輸送を指向することが可能なアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする 5 ' シグナル配列部分と、その天然のシグナル配列を欠く前記 C R M 1 9 7 タンパク質をコードする 3 ' C R M 1 9 7 部分と、を含む核酸配列を含む、前記減少ゲノム大腸菌宿主。