

【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、周辺質へのCRM197タンパク質の移送を指向するompA、ompFまたはytfQ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、b4466-4468、b1137-b11

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 D N A 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mumDC(b1183-b1184)遺伝子の1つ以上を欠く、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記減少ゲノム大腸菌が、挿入配列を含まない、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記CRM197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1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

(a) 前記減少ゲノム大腸菌を成長させることと、

(b) CRM197の発現を誘導することと、を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記方法が、発酵装置内で実行される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

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37で最大19時間成長させ、続いて工程(b)の前及び後で、約20～30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内で行われる、(3)工程(a)において、pHが、6.5～7.5の範囲である、ならびに/あるいは(4)pH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14または15に記載の方法。

【請求項17】

前記緩衝液が、リン酸緩衝液である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

発現が、工程(b)において、好適な量のIPTGを添加することによって誘導される、請求項14～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

発現が、200～275のOD₆₀₀で誘導される、請求項14～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記発酵装置が、0.5～50,000リットルの培養物を含む、請求項15～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

(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14～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

CRM197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21に記載の方法。

【請求項23】

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22に記載の方法。

【請求項24】

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23に記載の方法。

【請求項25】

前記減少ゲノム大腸菌が、機能recA(b2699)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26】

周辺質へのCRM197タンパク質の移送を指向するompA、ompFまたはytf

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ス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、前記スクレオチド配列は、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 - b44
 27、b2441 - b2450、b2622 - b2654、b2657 - b2660、b
 4462、b1994 - b2008、b4435、b3322 - b3338、b2349
 - b2363、b1539 - b1579、b4269 - b4320、b2968 - b29
 72、b2975 - b2977、b2979 - b2987、b4466 - 4468、b1
 137 - b1172、b0537 - b0565、b0016 - b0022、b4412 -
 b4413、b0577 - b0582、b4415、b2389 - b2390、b239
 2 - b2395、b0358 - b0368、b0370 - b0380、b2856 - b2
 863、b3042 - b3048、b0656、b1325 - b1333、b2030 -
 b2062、b2190 - b2192、b3215 - b3219、b3504 - b350
 5、b1070 - b1083、b1878 - b1894、b1917 - b1950、b4
 324 - b4342、b4345 - b4358、b4486、b0497 - b0502、
 b0700 - b0706、b1456 - b1462、b3481 - b3484、b359
 2 - b3596、b0981 - b0988、b1021 - b1029、b2080 - b2
 096、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、(i
 i)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。
 例えは、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を產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ス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MG1655より約2%～約40%小さい、好ましくは約5%～約30%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-12株MG1655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、b4466-4468、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-12 MG1655株の少なくとも次のDNAセグメント：b0315-b0331、b0333-b0341、b0346-b0354、b2481-b2492、b2219-b2230、b4500、b3707-b3723、b0644-b0650、b4079-4090、b4487、b4092-b4106、b0730-b0732、b3572-b3587、b1653、b2735-b2740、b2405-b2407、b3896-b3900、b1202、b4263-b4268、b0611、b2364-b2366、b0839、b0488-b0500、及びb0502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、MDS42株である、項目7に記載の前記方法。

(項目10)

前記減少ゲノム大腸菌が、MDS69株である、項目8に記載の前記方法。

(項目11)

前記減少ゲノム大腸菌が、機能r e c A (b2699)遺伝子を含む、項目1～10のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目12)

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547または548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、547位でのG A突然変異、547位でのG T突然変異、548位でのC G突然変異、または548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1～11のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目13)

前記減少ゲノム大腸菌が、機能 p_{OLB} (b0060)、d_{inB} (b0231)、及び任意に u_{MUDC} (b1183 - b1184) 遺伝子を欠く、項目1～12のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目14)

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_{ph} 遺伝子の欠失、(ii) 活性アセトヒドロキシ酸シンターゼIIを産生するための、i_{lvG} 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(iii) i_{c1R} 及び a_{rpa} 遺伝子の欠失を含む、項目1～13のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目15)

前記減少ゲノム大腸菌が、挿入配列を含まない、項目1～14のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目16)

前記CRM197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1～15のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目17)

(a) 前記減少ゲノム大腸菌を成長させることと、
(b) CRM197の発現を誘導することと、を含む、項目1～16のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目18)

前記方法が、発酵装置内で実行される、項目17に記載の前記方法。

(項目19)

工程(a)が、前記減少ゲノム大腸菌を37で最大19時間成長させ、続いて工程(b)の前及び後で、約20～30、好ましくは約25で成長させることを含む、項目17または18に記載の前記方法。

(項目20)

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17～19のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目21)

工程(a)において、pHが、6.5～7.5の範囲である、項目18～21のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目22)

前記pH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17～21のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目23)

前記緩衝液が、リン酸緩衝液である、項目22に記載の前記方法。

(項目24)

発現が、工程(b)において、好適な量のIPTGを添加することによって誘導される、項目17～23のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目25)

発現が、100～400、好ましくは200～275、より好ましくは230～250のOD₆₀₀で誘導される、項目18～24のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目26)

前記発酵装置が、0.5～50,000リットルの培養物を含む、項目18～25のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目27)

(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、項目17～26のいずれか一項に記載の前記方法。

(項目28)

前記機械的破碎が、超音波処理または微細流動化を含む、項目27に記載の前記方法。

(項目29)

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27または28に記載の前記方法。

(項目30)

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29に記載の前記方法。

(項目31)

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30に記載の前記方法。

(項目32)

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20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33)

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32に記載の前記方法。

(項目34)

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、ompFまたはytfQ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-12 MG1655株の次の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、b4466-4468、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ク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を產生するための、ilvG遺伝子における天然-2フレームシフト突然変異を補完する突然変異の導入、ならびに(iv)iclR及びarpA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35)

前記減少ゲノム大腸菌宿主が、そこから、前記大腸菌K-12 MG1655株の少なくとも次のDNAセグメント：b0315-b0331、b0333-b0341、b0346-b0354、b2481-b2492、b2219-b2230、b4500-b3707-b3723、b0644-b0650、b4079-4090、b4487

、 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。