

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5087741号  
(P5087741)

(45) 発行日 平成24年12月5日 (2012. 12. 5)

(24) 登録日 平成24年9月21日 (2012. 9. 21)

(51) Int. Cl.

F I

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

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 1 2 R 1/39 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:39

請求項の数 16 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-541422 (P2006-541422)  
 (86) (22) 出願日 平成16年11月19日 (2004. 11. 19)  
 (65) 公表番号 特表2007-511238 (P2007-511238A)  
 (43) 公表日 平成19年5月10日 (2007. 5. 10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/038884  
 (87) 国際公開番号 W02005/052151  
 (87) 国際公開日 平成17年6月9日 (2005. 6. 9)  
 審査請求日 平成19年11月13日 (2007. 11. 13)  
 (31) 優先権主張番号 60/523, 420  
 (32) 優先日 平成15年11月19日 (2003. 11. 19)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/537, 147  
 (32) 優先日 平成16年1月16日 (2004. 1. 16)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 511265969  
 フェネックス インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92  
 121, サンディエゴ, ローゼル ストリ  
 ート 10790  
 (74) 代理人 100092783  
 弁理士 小林 浩  
 (74) 代理人 100120134  
 弁理士 大森 規雄  
 (74) 代理人 100104282  
 弁理士 鈴木 康仁  
 (72) 発明者 シュナイダー, ジューン, シー,  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92  
 104, サンディエゴ, 32エヌディー  
 ストリート 2621

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良タンパク質発現系

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細菌発現系で使用するための蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 細胞であって、p y r F 遺伝子および / または p r o C 遺伝子を無効にすることによって産生された栄養要求性蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 宿主細胞に対し、

a . 前記栄養要求性宿主細胞においてヌクレオチド配列の発現を指示し得るプロモーターに作動可能に結合された組換えポリペプチドをコードする核酸と ;

b . 原栄養能を前記栄養要求性宿主細胞へ回復させる核酸であって、p y r F 遺伝子が無効にされている場合、オロトジン - 5 ' - ホスフェードデカルボキシラーゼをコードし配列番号 3 の配列に対して少なくとも 9 0 % 同一である核酸配列を含み、p r o C 遺伝子が無効にされている場合、<sup>1</sup> - ピロリン - 5 - カルボキシラートレダクターゼをコードし配列番号 8 の配列に対して少なくとも 9 0 % 同一である核酸配列を含み、p y r F 遺伝子および p r o C 遺伝子の両方が無効にされている場合、オロトジン - 5 ' - ホスフェードデカルボキシラーゼをコードし配列番号 3 の配列に対して少なくとも 9 0 % 同一である核酸配列および <sup>1</sup> - ピロリン - 5 - カルボキシラートレダクターゼをコードし配列番号 8 の配列に対して少なくとも 9 0 % 同一である核酸配列の両方を含む、核酸と ;

を含む核酸構築物を導入してなり、

前記栄養要求性宿主細胞が代謝産物に対して栄養要求性であり、該代謝産物がウラシルまたはプロリンまたはウラシルおよびプロリンの両方であり、b . の核酸を発現することにより原栄養能が回復し、前記栄養要求性代謝産物の欠乏した培地上で増殖させた場合、

10

20

前記 b . の核酸を発現する前記栄養要求性宿主細胞が少なくとも 20 g / L の乾燥細胞重量の細胞密度まで増殖し得る、蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 細胞。

【請求項 2】

組換えポリペプチドを産生するプロセスであって：

a . 少なくとも 1 つの代謝産物に対する栄養要求株であるように遺伝子改変された栄養要求性蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 宿主細胞において、組換えポリペプチドをコードする核酸および原栄養能を前記栄養要求性宿主細胞へ回復させるポリペプチドをコードする核酸を含む核酸構築物を発現させる工程であって、前記代謝産物がウラシルおよび/またはプロリンである、工程と；

b . 前記栄養要求性代謝産物の欠乏した培地上で工程 a . により原栄養能を回復した細胞を培養する工程であって、原栄養能を回復した前記細胞が少なくとも約 20 g / L の乾燥細胞重量の密度まで増殖される工程と；

を含み、

前記栄養要求性宿主細胞が、p y r F 遺伝子および/または p r o C 遺伝子が無効にすることによって産生されたものであり、p y r F 遺伝子が無効にされている場合、前記原栄養能を前記栄養要求性宿主細胞へ回復させるポリペプチドが、オロトジン - 5' - ホスフェートデカルボキシラーゼであって配列番号 3 の配列に対して少なくとも 90 % 同一である核酸配列によりコードされるポリペプチドであり、p r o C 遺伝子が無効にされている場合、前記栄養能を前記栄養要求性宿主細胞へ回復されるポリペプチドが、<sup>1</sup> - ピロリン - 5 - カルボキシラートレダクターゼであって配列番号 8 の配列に対して少なくとも 90 % 同一である核酸配列によりコードされるポリペプチドであり、p y r F 遺伝子および p r o C 遺伝子の両方が無効にされている場合、前記原栄養能を前記栄養要求性宿主細胞へ回復させるポリペプチドをコードする核酸は、オロトジン - 5' - ホスフェートデカルボキシラーゼをコードし配列番号 3 の配列に対して少なくとも 90 % 同一である核酸配列および <sup>1</sup> - ピロリン - 5 - カルボキシラートレダクターゼをコードし配列番号 8 の配列に対して少なくとも 90 % 同一である核酸配列の両方を含む、プロセス。

【請求項 3】

前記細胞がさらに染色体 l a c I 遺伝子インサートを含む、請求項 2 に記載のプロセス。

【請求項 4】

前記 l a c I 遺伝子が、完全または切断 P l a c - l a c I - l a c Z Y A オペロンの一部として以外のものである、請求項 3 に記載のプロセス。

【請求項 5】

前記 l a c I 遺伝子が l a c I、l a c I<sup>Q</sup>、および l a c I<sup>Q1</sup> からなる群から選択される、請求項 3 に記載のプロセス。

【請求項 6】

前記核酸構築物が少なくとも 1 つの l a c オペレーター配列または少なくとも 1 つの l a c O i d 配列をさらに含む、請求項 3 ~ 5 のいずれかに記載のプロセス。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つの l a c オペレーター配列または前記少なくとも 1 つの l a c O i d 配列がプロモーターの 3' 側もしくは 5' 側、または 3' 側および 5' 側の両方に位置する、請求項 6 に記載のプロセス。

【請求項 8】

前記組換えポリペプチドをコードする核酸が、少なくとも 1 つの l a c O i d 配列をさらに含み、前記少なくとも 1 つの l a c O i d 配列が配列番号 14 および配列番号 59 からなる群から選択される、請求項 3 ~ 7 のいずれかに記載のプロセス。

【請求項 9】

前記 l a c I 遺伝子がレバンスクラーゼ位置に挿入される、請求項 3 ~ 8 のいずれかに記載のプロセス。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

前記細胞がさらに染色体 *lacI* 遺伝子インサートを含む、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 11】

前記 *lacI* 遺伝子が、完全または切断 *P lac - lacI - lacZYA* オペロンの一部として以外のものである、請求項 10 に記載の細胞。

【請求項 12】

前記 *lacI* 遺伝子が *lacI*、*lacI<sup>Q</sup>*、および *lacI<sup>Q1</sup>* からなる群から選択される、請求項 10 に記載の細胞。

【請求項 13】

前記核酸構築物が少なくとも 1 つの *lac* オペレーター配列または少なくとも 1 つの *lacOid* 配列をさらに含む、請求項 10 ~ 12 のいずれかに記載の細胞。

10

【請求項 14】

前記少なくとも 1 つの *lac* オペレーター配列または前記少なくとも 1 つの *lacOid* 配列がプロモーターの 3' 側もしくは 5' 側、または 3' 側および 5' 側の両方に位置する、請求項 13 に記載の細胞。

【請求項 15】

前記組換えポリペプチドをコードする核酸が、少なくとも 1 つの *lacOid* 配列をさらに含み、前記少なくとも 1 つの *lacOid* 配列が配列番号 14 および配列番号 59 からなる群から選択される、請求項 10 ~ 14 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 16】

前記 *lacI* 遺伝子がレバンスクラーズ位置に挿入される、請求項 10 ~ 15 のいずれかに記載の細胞。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2003年11月19日に出願された、「Improved Pseudomonas Expression Systems with Auxotrophic Selection Markers」と題された米国仮特許出願シリアル番号第60/523,420号および2004年1月16日に出願された、「Bacterial Expressions with Improved Repression」と題された米国仮特許出願第60/537,147号に対して優先権を請求する。

30

【0002】

(発明の分野)

本発明は、栄養要求性選択マーカーを利用する、組換えポリペプチドの産生のための改良発現系を提供する。さらに、本発明は、改良された発現調節による宿主細胞での改良組換えタンパク質の産生も提供する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

タンパク質ベースの治療薬を製造するための細菌細胞の使用は、商業的な重要性を増している。細菌発現系を開発する目標の1つは、高品質の標的ポリペプチドを迅速、効率的および豊富に産生することである。そのような発現系に理想的な宿主細胞は、標的ポリペプチドの産生に炭素源を効率的に利用し、発酵反応において高い細胞密度まで迅速に増殖して、誘導されたときのみ標的ポリペプチドを発現し、規制および環境上の懸念のない培地上で増殖し得る。

40

【0004】

優れた宿主細胞の創出には多くの障害がある。第一に、組換えポリペプチドを産生するために、標的タンパク質をコードする発現ベクターを宿主細胞内へ挿入する必要がある。多くの細菌は、未形質転換状態に戻る事が可能であり、そこで発現ベクターは宿主から除去される。そのような復帰変異体は、所望の組換えポリペプチド産生の発酵効率を低下させ得る。

50

## 【 0 0 0 5 】

標的ペプチドをコードする発現ベクターは、典型的には、ベクター内に選択マーカーを含む。選択マーカーはしばしば、その産物が発酵プロセス中の生存のために必要な遺伝子である。選択マーカーを欠く宿主細胞、例えば、復帰変異体は、生存することができない。発酵プロセス中の選択マーカーの使用は、発現ベクターを含有する細菌のみが生存することを確実にするためであり、復帰変異体と形質転換体との競合を排除し、発酵効率を低下させる。

## 【 0 0 0 6 】

最も一般的に使用される選択マーカーは、抗生物質耐性遺伝子である。宿主細胞は、選択された抗生物質耐性遺伝子産物によって分解し得る抗生物質を添加した培地で増殖される。抗生物質耐性遺伝子を持つ発現ベクターを含有しない細胞は、抗生物質によって死滅させられる。代表的な抗生物質耐性遺伝子は、テトラサイクリン、ネオマイシン、カナマイシン、およびアンピシリンを含む。しかしながら、細菌宿主細胞中の抗生物質耐性遺伝子の存在は、環境上、規制上、および商業上の問題を呈する。例えば、抗生物質耐性遺伝子含有産物（そして抗生物質耐性遺伝子の使用によって産生された産物）は、環境、ヒト、および動物の健康にとって潜在的なバイオセーフティリスクとして認識されている。例えば、M. Droge et al., Horizontal Gene Transfer as a Biosafety issue: A natural phenomenon of public concern, J. Biotechnology. 64(1) : 75-90 (17 Sept. 1998) ; Gallagher, D. M. , and D. P. Sinn. 1983. Penicillin-induced anaphylaxis in a patient under hypotensive anaesthesia. Oral Surg Oral Med. Oral Pathol. 56: 361-364; Jorro, G. , C. Morales, J. V. Braso, and A. Pelaez. 1996. Anaphylaxis to erythromycin. Ann. Allergy Asthma Immunol. 77: 456-458; F. Gebhard & K. Smalla, Transformation of Acinetobacter sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA, Appl. & Environ. Microbiol. 64 (4): 1550-54 (Apr. 1998); T. Hoffmann et al., Foreign DNA sequences are received by a wild type strain of Aspergillus niger after co-culture with transgenic higher plants, Curr. Genet. 27(1) : 70-76 (Dec. 1994); DK Mercer et al., Fate of free DNA and transformation of the oral bacterium Streptococcus gordonii DL1 by plasmid DNA in human saliva, Appl. & Environ. Microbiol. 65(1) : 6-10 (Jan 1999); R. Schubbert et al. , Foreign(M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA, PNAS USA 94: 961- 66 (Feb. 4,1997) ; およびAA Salyers, Gene transfer in the mammalian intestinal tract, Curr. Opin.in Biotechnol. 4 (3): 294-98 (Jun 1993)を参照。

## 【 0 0 0 7 】

これらの懸念の結果として、多くの行政機関の食品、薬物、健康、および環境監督官庁は、多くのエンドユーザと同様に、商業における使用のために、抗生物質耐性遺伝子核酸が製品から除去される、または生物に存在しないことを要求している。加えて、規制当局の認可を確保するために、最終製品からの選択抗生物質の一掃を示す証拠が提供される必要がある。英国、カナダ、フランス、欧州連合、および米国はみな、食品、動物用飼料、薬物および組換え薬物生産を含む薬物生産での抗生物質耐性遺伝子の使用に対処してきた。これらの薬物の一掃、および特にそのような一掃を証明することは高価で、時間がかかり、効率も最小であるに過ぎない。

## 【 0 0 0 8 】

組換えポリペプチドの産生における選択のための抗生物質耐性遺伝子の使用に特有の懸念のために、別の選択方法が調査されている。

## 【 0 0 0 9 】

## 栄養要求性選択マーカー

栄養要求性選択マーカーは、一部の系で抗生物質選択の代案として利用されている。例えば、栄養要求性マーカーは、酵母で幅広く利用されている。主としてこれらの宿主細胞で抗生物質耐性選択マーカーが有効でないためである。例えば、JT Pronk, (2002) 「Aux

otrophic yeast strains in fundamental and applied research,」App. & Envir. Micro. 68 (5): 2095-2100; Boeke et al.,(1984)「A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast; 5-fluoro-orotic acid resistance,」Mol. Gen. Genet. 197: 345-346; Botstein & Davis, (1982)「Principles and practice of recombinant DNA research with yeast,」p.607-636, in JNStrathem, EW Jones. And JR Broach (ed.), The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Metabolism and gene expression, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; Cost & Boeke, (1996)「A useful colony color phenotype associated with the yeastselectable/counter selectable marker MET15,」Yeast 12: 939-941を参照。しかしながら酵母発現系は、細菌系が提供するように、標的タンパク質を産生する潜在的速度および効率を提供しない。

10

#### 【 0 0 1 0 】

細菌での栄養要求性マーカー選択も以前に記載されている。例えば、米国特許第 4 , 9 2 0 , 0 4 8 号、第 5 , 6 9 1 , 1 8 5 号、第 6 , 2 9 1 , 2 4 5 号、第 6 , 4 1 3 , 7 6 8 号、第 6 , 7 5 2 , 9 9 4 号、Struhl et al. (1976) PNAS USA 73; 1471-1475; MacCormick, C. A. , et al.,(1995)「Construction of a food-grade host/vector system for *Lactococcus lactis* based on the lactose operon,」FEMS Microbiol. Lett. 127: 105-109; Dickely et al.(1995),「Isolation of *Lactococcus lactis* nonsense suppressors and construction of a food-grade cloning vector,」Mol. Microbiol. 15: 839-847; Srensen et al.,(2000)「A food-grade cloning system for industrial strains of *Lactococcus lactis*,」Appl. Environ. Microbiol. 66: 1253-1258; Fiedler & Skerra,(2001)「proBA complementation of an auxotrophic *E. coli* strain improves plasmid stability and expression yield during fermenter production of a recombinant antibody fragment,」Gene 274: 111-118を参照。

20

#### 【 0 0 1 1 】

前述の商業スケールの細菌発酵系での栄養要求性選択マーカーの使用は、その使用を制限する欠点を有する。米国特許第 6 , 4 1 3 , 7 6 8 に記載されているような主な欠点は、栄養的な栄養要求性選択マーカー系が一般に栄養共生 (cross feeding) を被るということである。栄養共生という用語は、特定の代謝産物に対して栄養要求性である第 1 の細胞が代謝産物の非存在下で、その環境から、典型的には、細胞が栄養要求する培地から、代謝産物の排泄中間生成物、代謝産物自体、または培地に存在しない代謝産物に対して原栄養性である第 2 の細胞によって産生された原栄養可能分子 (prototrophic enabling molecule) を利用して、その代謝産物の供給を得ることによって生存する能力を指す。GR Barker et al., Biochem. J. 157(1) : 221-27 (1976) (cross feeding of thymine in *E. coli*); TJ Kerr & GJ Tritz, J. Bact. 115 (3): 982-86 (Sep. 1973) (cross feeding of NAD in *E. coli* auxotrophic for NAD synthesis); GA Sprenger et al. , FEMS Microbiol. Lett. 37 (3): 299-304 (1986) (selection of nalidixic acid to avoid the cross feeding problem)も参照。

30

#### 【 0 0 1 2 】

栄養共生は復帰変異細菌を生存させるため、栄養共生は、標的タンパク質産生宿主細胞の存在がより少ないために、所望のタンパク質を効率的で最大化されたレベルで産生する発酵プロセスの能力全体を低下させる。

40

#### 【 0 0 1 3 】

発現ベクター制御

理想的な宿主細胞の作製に対する別の障害は、発酵プロセスでの標的ポリペプチドの非効率的で低いレベルの産生である。最適な宿主細胞密度および発酵条件が達成されるまでの標的タンパク質の発現制御は、ポリペプチドのさらに効率的でより高い収率を可能にする。この理由は、いくつかあり、特定の炭素源のより効率的な利用および宿主細胞に対する拡張した代謝ストレスの低減を含む。

#### 【 0 0 1 4 】

50

しかしながら多くの場合では、細胞増殖中の標的タンパク質発現の抑制は不完全なことがあり、特定の誘導期前に著しい量の発現が引き起こされる。この「漏出性」の抑制は、宿主細胞ストレス、正常な細胞増殖から導入遺伝子へ転用される代謝エネルギーによる炭素源の非効率的な利用、および細胞密度誘導点への到達遅延を引き起こし、より長く高価な発酵作業、そしてしばしば標的タンパク質の収率低下を引き起こす。

【0015】

したがって本発明の目的は、効率的で調節可能であり、規制上および環境上の懸念を最小限に抑える培地中で実施される、標的タンパク質の産生のための改良発現系を提供することである。

【0016】

本発明の別の目的は、標的タンパク質の産生のための改良発現系における宿主細胞として使用するための生物を提供することである。

【0017】

本発明のなお別の目的は、標的タンパク質の改良された産生のためのプロセスである。

【0018】

本発明のさらに別の目的は、標的タンパク質の産生のための改良発現系で使用される新規な構築物および核酸を提供することである。

【発明の開示】

【0019】

(発明の要旨)

非抗生物質耐性の栄養要求性選択が可能である、および/または *lacI* 遺伝子の染色体インサートまたは誘導體を含有するシュードモナス (*Pseudomonad*) 生物を宿主細胞として選択することによって、細菌タンパク質産生を改良し得ることが発見されている。

【0020】

特にシュードモナス (*Pseudomonad*) 生物の蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) がこの目的に特に適していることが発見されている。このために、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) が、組換えポリペプチドの高細胞密度発酵中の栄養要求性選択の下で有害な栄養共生阻害を示さないことが驚くべきことに発見されている。そのような発見は、組換えポリペプチドの高レベルでの効率的な産生における栄養要求性蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) の宿主細胞としての使用を可能にして、抗生物質耐性選択マーカーの使用に固有の欠点および他の細菌発現系に存在する栄養要求性栄養共生の問題を克服する。

【0021】

シュードモナス (*Pseudomonad*) 内の完全または切断 *P lac - lacI - lacZYA* オペロンの一部として以外の *lacI* をコードする遺伝子の使用が、驚くべきことにブレインキューベーション組換えタンパク質発現の実質的に改良された抑制、商業スケールでの発酵におけるより高い細胞密度、および以前に教示された *lacI - lacZYA* シュードモナス (*Pseudomonad*) 染色体挿入 (米国特許第5,169,760) と比較して所望の産物のより高い収率をもたらすことも、驚くべきことに発見されている。この *lacI* 挿入は、*P lac - Ptac* ファミリープロモーター制御導入遺伝子の抑制において、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) において *lacI* リプレッサータンパク質をコードするマルチコピープラスミドと同じくらい有効であり、それにより *lacI* リプレッサータンパク質をコードする独立したプラスミドを細胞内に保持する必要がなくなり、そのような保持によって引き起こされる生産の非効率性が低減される。

【0022】

デュアル *lac* オペレーター配列の使用が、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) の誘導率の同時低下なしに、誘導前に組換えタンパク質発現の優れた抑制を提供することも発見されている。

【0023】

したがって本発明の1つの態様において、タンパク質の改良産生での宿主細胞として使用するために、シュードモナス (*Pseudomonad*) 生物が提供される。

## 【 0 0 2 4 】

1つの実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）生物は、栄養要求株を誘導するために遺伝的に改変されている。特定の実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）生物は、蛍光菌（Pseudomonas fluorescens）である。1つの実施形態において、栄養要求株は、少なくとも1つの窒素含有塩基化合物生合成遺伝子、または少なくとも1つのアミノ酸生合成遺伝子への遺伝子改変の結果である。さらなる実施形態において、遺伝子改変は、ウラシル生合成経路、チミジン生合成経路、またはプロリン生合成経路にて活性である酵素をコードする遺伝子に対してである。なおさらなる実施形態において、遺伝子改変は、オロチジン - 5' - ホスフェートデカルボキシラーゼをコードする *pyrF* 遺伝子、チミジラートシンターゼをコードする *thyA* 遺伝子、または 1 - プロリン - 5 - カルボキシラートレダクターゼをコードする *proC* 遺伝子に対してである。

10

## 【 0 0 2 5 】

別の実施形態において、本発明は、完全または切断 *Plac-lacI-lacZYA* オペロンの一部として以外の、ゲノムに挿入された *LacI* をコードする遺伝子の少なくとも1つのコピーを提供するために、遺伝子改変されたシュードモナス（Pseudomonad）生物を提供する。特定の実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）宿主細胞は、蛍光菌（Pseudomonas fluorescens）である。1つの実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）は、*LacI* リプレッサータンパク質をコードする天然の大腸菌（*E. coli*）*lacI* 遺伝子をコードする。別の実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）細胞は、*lacI<sup>Q</sup>* 遺伝子を含有する。なお別の実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）細胞は、*lacI<sup>Q1</sup>* 遺伝子を含有する。

20

## 【 0 0 2 6 】

別の実施形態において、導入遺伝子発現の抑制に関与する、少なくとも1つの *lacO* 配列を含む核酸を含有する核酸構築物を含むシュードモナス（Pseudomonad）生物が提供される。特定の実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）宿主細胞は、蛍光菌（Pseudomonas fluorescens）である。1つの実施形態において、核酸構築物は1つを超える *lacO* 配列を含む。別の実施形態において、核酸構築物は、少なくとも1つの、そして好ましくは1つを超える *lacOid* 配列を含む。1つの実施形態において、核酸構築物は *Plac* ファミリープロモーターの 3' に位置する *lacO* 配列、またはその誘導体、そして *Plac* ファミリープロモーターの 5' に位置する *lacO* 配列、またはその誘導体を含む。特定の実施形態において、*lacO* 誘導体は *lacOid* 配列である。

30

## 【 0 0 2 7 】

さらなる実施形態において、本発明は、栄養要求性を誘導するように遺伝子改変され、完全または切断 *Plac-lacI-lacZYA* オペロンの一部として以外の、天然の大腸菌（*E. coli*）*lacI* 遺伝子、*lacI<sup>Q</sup>* 遺伝子、または *lacI<sup>Q1</sup>* 遺伝子の染色体挿入を含有するようにさらに改変されたシュードモナス（Pseudomonad）生物を提供する。別の実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）生物は、導入遺伝子発現の抑制に関与する少なくとも1つの *lacO* 配列を含む核酸構築物を含有するようにさらに改変される。特定の実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）生物は、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）である。

40

## 【 0 0 2 8 】

本発明の別の態様において、タンパク質の改良産生で使用するための核酸配列が提供される。

## 【 0 0 2 9 】

1つの実施形態において、栄養要求性シュードモナス（Pseudomonad）宿主細胞で使用するための原栄養性回復酵素をコードする核酸配列が提供される。特定の実施形態において、生物蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）から窒素含有塩基化合物生合成酵素をコードする核酸配列が提供される。1つの実施形態において、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）中の *pyrF* 遺伝子をコードする核酸配列が提供される（配列番号1および3）。別の実施形態において、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）中の *thyA* 遺伝子をコー

50

ドする核酸配列が提供される（配列番号４）が提供される。なお別の実施形態において、生物蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）から精製されたアミノ酸生合成化合物をコードする核酸配列が提供される。特定の実施形態において、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）中の *proC* 遺伝子をコードする核酸配列が提供される（配列番号６および８）。

【００３０】

別の態様において、本発明は、新規な核酸発現の産物である、新規なアミノ酸配列を産生する。

【００３１】

本発明のなお別の態様において、ペプチドの改良された産生で使用するための核酸構築物が提供される。

【００３２】

１つの実施形態において、*a*）組換えポリペプチドをコードする核酸配列、および *b*）原栄養可能酵素（prototrophy-enabling enzyme）をコードする核酸配列を含むシュードモナス（*Pseudomonad*）宿主細胞の形質転換に使用するための核酸構築物が提供される。別の実施形態において、核酸構築物は、*c*）*Plac* - *Ptac* ファミリープロモーターをさらに含む。なお別の実施形態において、核酸構築物は、*d*）*lac* または *tac* ファミリープロモーターの 3' 側の少なくとも１つの *lacO* 配列、または誘導体をさらに含む。また別の実施形態において、核酸構築物は、*e*）*lac* または *tac* ファミリープロモーターの 5' 側の少なくとも１つの *lacO* 配列、または誘導体をさらに含む。１つの実施形態において、*lacO* 配列の誘導体は、*lacOid* 配列でもよい。特定の実施形態において、シュードモナス（*Pseudomonad*）生物は、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）である。

【００３３】

本発明の１つの実施形態において、*a*）組換えポリペプチドをコードする核酸配列、*b*）*Plac* - *Ptac* ファミリープロモーター、*c*）*lac* または *tac* ファミリープロモーターの 3' 側の少なくとも１つの *lacO* 配列、または誘導体、*d*）*lac* または *tac* ファミリープロモーターの 5' 側の少なくとも１つの *lacO* 配列、または誘導体を含む、シュードモナス（*Pseudomonad*）生物中の発現ベクターとして使用するための核酸構築物が提供される。１つの実施形態において、誘導体 *lacO* 配列は、*lacOid* 配列でもよい。１つの実施形態において、核酸構築物は、*e*）栄養要求性シュードモナス（*Pseudomonad*）細胞で使用するための原栄養可能（prototrophy-enabling）選択マーカーをさらに含む。特定の実施形態において、シュードモナス（*Pseudomonad*）生物は蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）である。

【００３４】

本発明の別の態様において、タンパク質の改良された産生で使用するための改変細胞が提供される。

【００３５】

１つの実施形態において、*i*）組換えポリペプチド、*ii*）原栄養可能（prototrophy-enabling）核酸を含む核酸構築物を有する、栄養要求性シュードモナス（*Pseudomonad*）細胞が提供される。別の実施形態において、核酸構築物は、*iii*）*Plac* - *Ptac* ファミリープロモーターをさらに含む。なお別の実施形態において、核酸構築物は、*iv*）１つを超える *lacO* 配列をさらに含む。１つの実施形態において、シュードモナス（*Pseudomonad*）は、栄養要求性蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）細胞である。さらなる実施形態において、本発明は、完全または切断 *Plac* - *lacI* - *lacZYA* オペロンの一部として以外の大腸菌（*E.coli*）*lacI* 遺伝子、*lacI<sup>Q</sup>* 遺伝子、または *lacI<sup>Q1</sup>* 遺伝子の染色体挿入を含むようにさらに遺伝子改変された、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）を含めた栄養要求性シュードモナス（*Pseudomonad*）生物をさらに含む。

【００３６】

別の実施形態において、染色体に挿入された、完全または切断 *Plac* - *lacI* - *l*

10

20

30

40

50



a c Z Y A オペロンの一部として以外の l a c I 導入遺伝子、またはその誘導体と、b ) i ) 組換えポリペプチドと、i i ) P l a c - P t a c ファミリープロモーターとを含む核酸構築物とを含む、シュードモナス (Pseudomonad) 細胞が提供される。なお別の実施形態において、核酸構築物は、i i i ) 少なくとも1つの l a c O 配列と、好ましくは1つを超える l a c O 配列とをさらに含む。つの実施形態において、l a c O 配列は l a c O i d 配列である。1つの実施形態において、シュードモナス (Pseudomonad) は、栄養要求性を誘導するようにさらに改変されている。1つの実施形態において、シュードモナス (Pseudomonad) 細胞は、蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) である。

【0037】

本発明の1つの態様において、改良されたタンパク質産生で使用するための組換えポリペプチドを発現させるプロセスが提供される。

【0038】

1つの実施形態において、プロセスは、a ) 組換えポリペプチドと、b ) 少なくとも1つの代謝産物に対して栄養要求性である、シュードモナス (Pseudomonad) 内の原栄養回復酵素とをコードする核酸を含む核酸構築物の発現を提供する。代替的な実施形態において、シュードモナス (Pseudomonad) は、1つを超える代謝産物に対して栄養要求性である。1つの実施形態において、シュードモナス (Pseudomonad) は、蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 細胞である。特定の実施形態において、組換えポリペプチドは、窒素含有塩基化合物およびアミノ酸からなる群から選択される代謝産物、または代謝産物の組合せに対して栄養要求性であるシュードモナス (Pseudomonad) 内で発現される。さらに特定の実施形態において、組換えポリペプチドは、ウラシル、プロリン、およびチミジンからなる群から選択される代謝産物に対して栄養要求性であるシュードモナス (Pseudomonad) 内で発現される。別の実施形態において、栄養要求性は、宿主 p y r F、p r o C、または t h y A 遺伝子それぞれのノックアウトによって産生し得る。代替的な実施形態である組換えポリペプチドは、P l a c I - l a c I - l a c Z Y A オペロンの一部として以外天然の大腸菌 (E.coli) l a c I 遺伝子、l a c I<sup>Q</sup>遺伝子、または l a c I<sup>Q1</sup>遺伝子の宿主細胞染色体への挿入を通じて、遺伝子改変された栄養要求性シュードモナス (Pseudomonad) 細胞内で発現される。1つの特定の実施形態において、栄養要求株内で発現される組換えポリペプチドを含有するベクターは、少なくとも1つの l a c O i d オペレーター配列を含む。1つの特定の実施形態において、栄養要求性宿主細胞内で発現される組換えポリペプチドを含有するベクターは、少なくとも2つの l a c オペレーター配列、またはその誘導体を含む。なおさらなる実施形態において、組換えポリペプチドは P l a c ファミリープロモーターによって駆動される。

【0039】

別の実施形態において、プロセスは、シュードモナス (Pseudomonad) 宿主細胞のゲノムへ挿入された l a c I をコードする遺伝子の少なくとも1つのコピーを提供するように遺伝子改変されたシュードモナス (Pseudomonad) 宿主細胞を含み、ここで l a c I をコードする遺伝子は、P l a c I - l a c I - l a c Z Y A オペロンの一部として以外である。1つの実施形態において、l a c リプレッサータンパク質をコードする遺伝子は、天然の大腸菌 (E.coli) l a c I 遺伝子のそれと同じである。別の実施形態において、l a c リプレッサータンパク質をコードする遺伝子は、l a c I<sup>Q</sup>遺伝子である。なお別の実施形態において、l a c リプレッサータンパク質をコードする遺伝子は、l a c l Q 1 遺伝子である。特定の実施形態において、シュードモナス (Pseudomonad) 宿主細胞は、蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) である。別の実施形態において、シュードモナス (Pseudomonad) は、栄養要求性細胞を産生するようにさらに遺伝子改変される。別の実施形態において、プロセスは、少なくとも約 3 g / L、4 g / L、5 g / L、6 g / L、7 g / L、8 g / L、9 g / L または少なくとも約 10 g / L の組換えポリペプチドレベルを産生する。別の実施形態において、組換えポリペプチドは、3 g / L ~ 100 g / L のレベルで発現される。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 0 】

1つの実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）生物は、栄養要求性を誘導するために遺伝子改変されている。特定の実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）生物は、蛍光菌（Pseudomonas fluorescens）である。1つの実施形態において、栄養要求株は、少なくとも1つの窒素含有塩基化合物生合成遺伝子、または少なくとも1つのアミノ酸生合成遺伝子に対する遺伝子改変の結果である。さらなる実施形態において、遺伝子改変は、ウラシル生合成経路、チミジン生合成経路、またはプロリン生合成経路において活性である酵素をコードする遺伝子に対してである。なおさらなる実施形態において、遺伝子改変は、オロチジン - 5' - ホスフェートデカルボキシラーゼをコードする *pyrF* 遺伝子、チミジラートシンターゼをコードする *thyA* 遺伝子、または 1 - プロリン - 5 - カルボキシラートレダクターゼをコードする *proC* 遺伝子に対してである。

10

## 【 0 0 4 1 】

別の実施形態において、本発明は、完全または切断 *Plac-lacI-lacZYA* オペロンの一部として以外の、ゲノムに挿入された *LacI* をコードする遺伝子の少なくとも1つのコピーを提供するために、遺伝子改変されたシュードモナス（Pseudomonad）生物を提供する。特定の実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）宿主細胞は、蛍光菌（Pseudomonas fluorescens）である。1つの実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）は、*LacI* リプレッサータンパク質をコードする天然の大腸菌（*E. coli*）*lacI* 遺伝子をコードする。別の実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）細胞は、*lacI<sup>Q</sup>* 遺伝子を含有する。なお別の実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）細胞は、*lacI<sup>Q1</sup>* 遺伝子を含有する。

20

## 【 0 0 4 2 】

別の実施形態において、導入遺伝子発現の抑制に関与する、少なくとも1つの *lacO* 配列を含む核酸を含有する核酸構築物を含むシュードモナス（Pseudomonad）生物が提供される。特定の実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）宿主細胞は、蛍光菌（Pseudomonas fluorescens）である。1つの実施形態において、核酸構築物は1つを超える *lacO* 配列を含む。別の実施形態において、核酸構築物は、少なくとも1つの、そして好ましくは1つを超える *lacOid* 配列を含む。1つの実施形態において、核酸構築物は *Plac* ファミリープロモーターの 3' に位置する *lacO* 配列、またはその誘導体、そして *Plac* ファミリープロモーターの 5' に位置する *lacO* 配列、またはその誘導体を含む。特定の実施形態において、*lacO* 誘導体は *lacOid* 配列である。

30

## 【 0 0 4 3 】

さらなる実施形態において、本発明は、栄養要求株を誘導するように遺伝子改変され、完全または切断 *Plac-lacI-lacZYA* オペロンの一部として以外の、天然の大腸菌（*E. coli*）*lacI* 遺伝子、*lacIQ* 遺伝子、または *lacIQ1* 遺伝子の染色体挿入を含有するようにさらに改変されたシュードモナス（Pseudomonad）生物を提供する。別の実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）生物は、導入遺伝子発現の抑制に関与する少なくとも1つの *lacO* 配列を含む核酸構築物を含有するようにさらに改変される。特定の実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）生物は、蛍光菌（Pseudomonas fluorescens）である。

40

## 【 0 0 4 4 】

組換えポリペプチドを産生する発現系で使用するために本発明で提供される宿主細胞は、「シュードモナス（Pseudomonad）および密接に関連する細菌」から、または以下で定義するようなそのサブグループから選択され得る。1つの実施形態において、宿主細胞はシュードモナス（Pseudomonas）属から選択される。特定の実施形態において、シュードモナス（Pseudomonas）の特定の種は、蛍光菌（*P. fluorescens*）である。特定の実施形態において、宿主細胞は、蛍光菌（Pseudomonas fluorescens）パイオタイプ A またはピオバル I である。

## 【 0 0 4 5 】

定義

50

「単離された」という用語は、例えば、細胞成分でありうる他の物質成分から実質的にまたは本質的に遊離した核酸、タンパク質、またはペプチドを指す。

【 0 0 4 6 】

「断片」という用語は、ヌクレオチド、タンパク質、またはペプチド配列の一部または部分配列を意味する。

【 0 0 4 7 】

本明細書で使用する場合「細胞タンパク質総パーセント」という用語は、凝集した細胞タンパク質のパーセンテージとしての宿主細胞中のタンパク質またはペプチドの量を意味する。

【 0 0 4 8 】

「作動可能に結合された」という用語は本明細書で使用する場合、転写および任意の翻訳調節要素が、宿主細胞の作用において、または作用によって調節要素がコード配列の発現を指示し得るようなコード配列に対する配置で、コード配列に共有結合される、いずれの構造も指す。

【 0 0 4 9 】

「栄養要求株」という用語は本明細書で使用する場合、増殖および代謝に必要な特定の物質を生成するその能力を除去または低減するように改変された細胞を指す。

【 0 0 5 0 】

本明細書で使用する場合、「細胞タンパク質総パーセント」という用語は、細胞によって発現された所与のタンパク質の相対量を表す総細胞タンパク質の分率の尺度である。

【 0 0 5 1 】

「原栄養能」という用語は本明細書で使用する場合、細胞が増殖および代謝に必要な特定の物質を生成し得ることを指す。

【 0 0 5 2 】

本明細書で使用する場合、「相同の」という用語は、i) 所与の元のタンパク質またはペプチドの配列と実質的に類似している（すなわち少なくとも70、75、80、85、90、95、または98%）アミノ酸配列を有し、そして元のタンパク質またはペプチドの所望の機能を保持するタンパク質またはペプチド、あるいはii) 所与の核酸の配列と実質的に類似している（すなわち少なくとも70、75、80、85、90、95、または98%）配列を有し、そして元の核酸配列の所望の機能を保持する核酸のいずれかを意味する。本発明および開示の実施形態のすべてにおいて、開示されたタンパク質、ペプチドまたは核酸はいずれも、所望の機能を保持する相同タンパク質または実質的に相同なタンパク質、ペプチドまたは核酸によって置換し得る。本発明および開示の実施形態のすべてにおいて、いずれかの核酸が開示されるとき、本発明が開示された核酸にハイブリダイズするすべての核酸も含むことを前提とすべきである。

【 0 0 5 3 】

1つの非制限的な実施形態において、相同なポリペプチドの同一でないアミノ酸配列は、表1に示す15の保存的または半保存的グループのいずれか1つの構成要素であるアミノ酸でありうる。

10

20

30

【表 1】

同様のアミノ酸置換基

保存基 (8)	準保存基 (7)
A r g, L y s	A r g, L y s, H i s
A s p, G l u	A s n, A s p, G l u, G l n
A s n, G l n	
I l e, L e u, V a l	I l e, L e u, V a l, M e t, P h e
A l a, G l y	A l a, G l y, P r o, S e r, T h r
S e r, T h r	S e r, T h r, T y r
P h e, T y r	P h e, T r p, T y r
C y s (非シスチン), S e r	C y s (非シスチン), S e r, T h r

10

本明細書で提供するアミノ酸配列は、以下の省略形で表される：

A	A l a	アラニン
P	P r o	プロリン
B		アスパルテートまたはアスパラギン
Q	G l n	グルタミン
C	C y s	システイン
R	A r g	アルギニン
D	A s p	アスパルテート
S	S e r	セリン
E	G l u	グルタメート
T	T h r	トレオニン
F	P h e	フェニルアラニン
G	G l y	グリシン
V	V a l	バリン
H	H i s	ヒスチジン
W	T r p	トリプトファン
I	I l e	イソロイシン
Y	T y r	チロシン
Z		グルタメートまたはグルタミン
K	L y s	リジン
L	L e u	ロイシン
M	M e t	メチオニン
N	A s n	アスパラギン

20

30

## 【0054】

I. シュードモナス (Pseudomonad) および関連細菌の宿主細胞としての選択

本発明は、タンパク質の改良された産生における、シュードモナス (Pseudomonad) および関連細菌の宿主細胞としての使用を提供する。

40

## 【0055】

栄養要求性選択効率

シュードモナス (Pseudomonad) が、他の系に通例関連する欠点、例えば、プラスミド不安定性および栄養共生を伴わずに、プラスミドを発現するタンパク質の保持に栄養要求性選択マーカーを利用する能力を有することが発見されている。

## 【0056】

他の宿主細胞系の栄養要求性マーカーは、特にプラスミドの消失が無プラスミド細胞に選択的利点を与えて、大量の非増殖細胞の蓄積を引き起こし、産物形成を減少させる発酵の間には、各細胞内にプラスミドを保持するには必ずしも十分であるとは限らない。その

50

ような復帰変異菌株は、栄養要求性代謝産物に原栄養可能細菌 (prototrophic enabled bacteria) から栄養共生する能力を有する場合、特に厄介である。例えば、大腸菌 (*E. coli*) トリプトファン栄養要求株内のプラスミドでの *trp* オペロンの使用は、ほとんどの無プラスミド細胞が *val* S<sup>ts</sup> 宿主内の *val* S 遺伝子 (バリル t - RNA シンターゼをコードする) と結合するまで蓄積するのを防止するには十分でない (Skogman, S. G.; Nilsson, J., Temperature-dependent retention of a tryptophanoperon-bearing plasmid in *Escherichia coli*. *Gene* 1984, 31, (1-3), 117-22)。おそらくプラスミド上に *trp* オペロンを含有する細胞は、無プラスミド細胞の増殖を可能にするのに十分なトリプトファンまたは関連分子を分泌した。同様に、*leu2* ミュータント酵母内のキシリトールレダクターゼ産生プラスミド上の *LEU2* 遺伝子の使用は、プラスミドの消失を引き起こした；ロイシンはプラスミド含有細胞によってプロセス中に分泌されるため、供給バッチ培養物の 80% までが産生プラスミドなしの細胞より構成されていた (Meinander, N. Q.; Hahn-Haegerdal, B., Fed-batch xylitol production with two recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *XYL1* at different levels, using glucose as a co substrate: a comparison of production parameters and strain stability. *Biotechnology and Bioengineering* 1997, 54, (4), 391-399)。

#### 【0057】

蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) (Pf) が他の宿主細胞系、例えば、大腸菌 (*E. coli*) および酵母で観察された栄養共生に関連する固有の問題を示さないことが発見されている。特定の理論に縛られたくはないが、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) が宿主細胞として使用するのに特に適切な生物であることが考えられる。なぜなら、栄養要求性代謝産物を含有する添加培地上で原栄養可能 (prototrophic-enabling) プラスミドを含有する栄養要求性細胞に Pf 栄養要求性細胞が勝てないことが観察され、Pf 栄養要求株が必要な代謝産物を導入することが本来難しいことが示されるからである。このため、選択マーカープラスミドを喪失する Pf 栄養要求性細胞は、補助代謝産物の存在下でも、選択マーカーを含有する Pf 栄養要求性細胞に勝る選択的利点を得られず、栄養共生の潜在的影響を大きく低下させる。この栄養共生の影響の低下のため、発酵操作での組換えポリペプチドの産生収率は、非組換えポリペプチド産生細胞の存在により低下しない。

#### 【0058】

##### LacI インサート

シュードモナス (*Pseudomonas*) が完全または切断 *P lac - lacI - lacZYA* オペロンの一部として以外の単一コピーの *lacI* 導入遺伝子、染色体インサートを使用でき、誘導までタンパク質発現を効果的に抑制することが発見されている。

#### 【0059】

RNA ポリメラーゼによる調節プロモーターからの転写開始は、調節タンパク質の結合または解放によって活性化または脱活性化される。したがって、調節プロモーターは、目的の標的ポリペプチドをコードする遺伝子が、プロモーターが調節タンパク質 (すなわち「リプレッサー」タンパク質) を含まないときのみ発現される負の制御に参与するもの (すなわち抑制性プロモーター)、およびプロモーターが調節タンパク質 (すなわち「アクチベーター」タンパク質) によって結合されたときのみ遺伝子が発現される正の制御に参与するものを含む。

#### 【0060】

細菌発現系で使用される抑制性プロモーターの最も一般的なクラスの 1 つは、*P lac* ベースプロモーターの科である。*P lac* ベースプロモーターの科は、天然の大腸菌 (*E. coli*) ラクトースオペロンから発して、「*lac*」オペロンと呼ばれ、「*lacZYA*」として記号表示もされ、その発現は、*lacI* 遺伝子の発現産物によって調節される。オペロンの天然の大腸菌 (*E. coli*) 構造は、「*P lacI - lacI - P lacZ - lacZYA*」であり、ここで天然の大腸菌 (*E. coli*) *P lac* プロモーターは「*P lacZ*」によって表される («*P lacZYA*」とも呼ばれる。「*P lacI*」は、*lacI* 遺伝子の天然のプロモーターを表し、「*lacI*」は、*lac* リプレッサーをコードする遺伝子、

10

20

30

40

50

すなわち *LacI* タンパク質を表す。「*lacZYA*」は、ラクトース利用経路をコードするオペロンを表す。

#### 【0061】

*LacI* 調節プロモーターは特に、天然の大腸菌 (*E.coli*) ラクトースオペロンプロモーター (「*P<sub>lac</sub>*」) を含む。加えて改良ミュータントも、*P<sub>lac</sub>* のプロモーター内ハイブリッド、例えば、「*P<sub>tac</sub>*」プロモーター、「*P<sub>trc</sub>*」プロモーター、および「*P<sub>tacII</sub>*」プロモーターと同様に発見された。大腸菌 (*E.coli*) 中の *P<sub>tac</sub>* プロモーターは例えば、完全に抑制解除されたときに *P<sub>lac</sub>* プロモーターよりも3倍強力である。したがってそれは、大腸菌 (*E.coli*) での高レベルの調節遺伝子発現を促進するために頻繁に使用される。しかしながら *P<sub>lac</sub>* プロモーターは *LacI* によって1000倍抑制されるが、*P<sub>tac</sub>* プロモーターは同様の条件下では50倍のみ抑制される (Lanzer, M. & H. Bujard. 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 : 8973)。大腸菌 (*E.coli*) *P<sub>tac</sub>* プロモーターまたは他の *lac* 関連プロモーターの抑制は、リプレッサー、*LacI* の濃度に依存する (De Boer, et al., 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:21-25)。上記したように抑制からの解放は、その特異性 DNA 結合部位に対するリプレッサー、この場合、*lac* オペレーター (*lacO*) の親和性を低下させるインデューサの添加によって発生しうる。あるいは、プラスミドの特異性 DNA 結合部位のモル濃度に対するリプレッサーの濃度の低下も、プロモーターを抑制解除し得る。*LacI* 遺伝子が高コピー数クローニングプラスミドに位置する場合、そのような系で産生される大量のリプレッサーのために、発現を開始するためには大量のインデューサが必要である。

#### 【0062】

市販の産生系において、*lac* リプレッサーは、典型的には、発現が構成性、すなわち非調節性である遺伝子によってコードされ、したがって、所望の宿主細胞バイオマスまたは細胞密度が達成されるまで所望の標的タンパク質をコードする所望の導入遺伝子が抑制される細胞内環境を提供する。そのとき、その存在が導入遺伝子からリプレッサーを解離させるのに有効なインデューサとして公知の低分子が細胞培養物に少量添加されて、宿主細胞によって吸収され、それにより導入遺伝子の転写が可能になる。*lac* リプレッサータンパク質の場合、インデューサはラクトース、または非代謝性無償性インデューサ、例えば、イソプロピル - ベータ - D - チオ - ガラクトシド (「IPTG」) でありうる。インデューサが添加される選択された時点は、「誘導期」と呼ばれる。

#### 【0063】

種々の *lac* リプレッサー遺伝子が、組換えポリペプチド発現ベクターに存在する *P<sub>lac</sub>* ファミリープロモーターの抑制に有用であるとして認識されている。これらは、天然の大腸菌 (*E.coli*) *lacI* 遺伝子および/または同じ *LacI* タンパク質をコードするが、より高い発現レベルにおいてである、*lacI<sup>Q</sup>* および *lacI<sup>Q1</sup>* 遺伝子を含むその変異体を含む。例えば、*lacI<sup>Q</sup>* 変異は、プロモーター領域 *lacI* の - 35 における1回のCGからTAへの変化 (Calos, M. 1978. Nature 274:762) であり、これは大腸菌 (*E.coli*) における *LacI* 発現の10倍の上昇を引き起こす (Mueller-Hill, B., et al. 1968. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 59:1259)。野生型大腸菌 (*E.coli*) 細胞は、 $10^{-8}$  M または細胞当たり分子約10個の *LacI* 濃度を有し、タンパク質の99%はテトラマーとして存在する (Fickert, R. & B. Mueller-Hill 1992. J. Mol. Biol. 226: 59)。 *lacI<sup>Q</sup>* 変異を含有する細胞は、細胞当たり約分子100個または  $10^{-7}$  M *LacI* を含有する。結果として多数の細菌発現系が開発され、そこではプラスミド内に常在する *P<sub>lac</sub>* ファミリープロモーター制御導入遺伝子が *LacI* タンパク質を発現する宿主細胞内に種々のレベルで保持され、それによって細胞増殖の選択された「誘導期」まで所望の導入遺伝子が抑制される。

#### 【0064】

しかしながら、多くの場合では、細胞増殖中の標的タンパク質発現の抑制は不完全なことがあり、特定の誘導期前に著しい量の発現が引き起こされる。この「漏出性」の抑制は、宿主細胞ストレス、正常な細胞増殖から導入遺伝子へ転用される代謝エネルギーによる

10

20

30

40

50

炭素源の非効率的な利用、および細胞密度誘導点への到達遅延を引き起こし、より長く高価な発酵作業、そしてしばしば標的タンパク質の収率低下を引き起こす。

【 0 0 6 5 】

P l a c ファミリープロモーター駆動導入遺伝子の抑制を改善するための1つの一般的な方法は、P l a c ファミリープロモーター駆動標的遺伝子を持つプラスミド上にl a c I またはl a c I<sup>Q</sup>遺伝子を配置することであった(例えば、MJR Stark in Gene 51: 255-67 (1987) and E Amann et al. in Gene:301-15 (1988)を参照)。しかしながらこれはL a c リプレッサータンパク質の過剰産生を引き起こすことが多く、次に導入遺伝子の誘導レベルを回復して組換えタンパク質産生の低下を克服するために、なお一層高いインデューサ濃度の使用を必要とする。その上、P l a c ファミリープロモーター駆動標的遺伝子を含有するプラスミドとは独立したl a c I 遺伝子を含有する第2のプラスミドの使用は、発現宿主細胞内に両方のプラスミドを保持するために、2つの異なる選択マーカー遺伝子(2つの異なるプラスミドの各々に対して1つの選択マーカー遺伝子)の使用を必要とする。第2の選択マーカー遺伝子、すなわち第2のプラスミドの選択マーカー遺伝子の存在は次に、1) 抗生物質耐性選択マーカー遺伝子の場合には独立した抗生物質、これは費用がかかり、健康/安全性規制の観点から不都合である、; または2) 栄養要求性選択マーカー遺伝子の場合には宿主細胞ゲノムにおける独立した代謝不全、これは宿主細胞を変異させるというさらなる労力を必要とする、のいずれかの使用を必要とする。

【 0 0 6 6 】

驚くべきことに、完全または切断P l a c - l a c I - l a c Z Y A オペロンの一部として以外のl a c I 挿入が、蛍光菌(Pseudomonas fluorescens)内でL a c I リプレッサータンパク質をコードする多コピープラスミドとしてのP l a c - P t a c ファミリープロモーター制御導入遺伝子を抑制するのに有効であることが発見された。この驚くべき発見は、細胞内でL a c I リプレッサータンパク質をコードする独立したプラスミドを維持する必要をなくすか、またはさらなる栄養要求性選択マーカーを定義する必要をなくし、l a c I 含有プラスミドのそのような維持によって引き起こされる潜在的な産生非効率性をさらに減少させる。

【 0 0 6 7 】

シュードモナス(Pseudomonas)における導入遺伝子発現を調節する以前の試みでは、l a c Z プロモーター領域が欠失しているが、構成性P l a c I プロモーターを保持する大腸菌(E.coli) P l a c I - l a c I - l a c Z Y A オペロンを染色体に挿入した(米国特許第5,169,760号を参照)。欠失は、l a c オペロンの遺伝産物の構成発現を可能にする。しかしながら、挿入されたオペロンは、ラクトーストランスポータタンパク質ラクトースパーミアーゼをコードする大腸菌(E.coli) l a c Y 遺伝子を含有する。ラクトースパーミアーゼは、ラクトース、または同様の誘導体を培地から宿主細胞内に輸送することが可能である。ラクトースパーミアーゼの存在は、培地からのラクトース様汚染物質の移入増加を引き起こし、最終的に誘導前にP l a c ファミリープロモーターの抑制を生じさせる。さらにl a c オペロンl a c Z、l a c Y、およびl a c A 遺伝子産物の発現は、これらの産物への炭素利用源の不十分な利用をもたらして、細胞に対する代謝ストレスの増大を引き起こし、誘導のための高い細胞密度の定着を遅延させる。加えて、より大きなl a c I - l a c Z Y A 融合オペロンが、宿主細胞内での単独のl a c I インサートと比較して、メッセージ不安定性の上昇を生じる。

【 0 0 6 8 】

シュードモナス(Pseudomonad)内での完全または切断P l a c I - l a c I - l a c Z Y A オペロンの一部として以外のL a c I をコードする遺伝子の使用が、以前に教示されたZ a c l - l a c Z Y A シュードモナス(Pseudomonad)染色体挿入(米国特許第5,169,760号)と比較して、プレインキュベーション組換えタンパク質発現の実質的に改良された抑制、商業スケール発酵でのより高い細胞密度、および所望の産物のより高い収率を引き起こしたことが、驚くべきことに発見された。

【 0 0 6 9 】

プロモーター改変のために  $lac$  よりも高レベルで発現される誘導体  $lac I$  遺伝子、例えば、 $lac I^Q$  および  $lac I^{Q1}$  を利用するさらなる試みもまた記載されている。CG Glascock & MJ Weickert は、プラスミド保持  $Ptac$  駆動標的遺伝子の制御のレベルを評価する試みにおいて、独立した  $lac I$  タンパク質をコードする遺伝子が宿主細胞の染色体内に存在する大腸菌 (*E. coli*) 菌株について記載する。CG Glascock & MJ Weickert, 「Using chromosomal  $lacI^Q$  to control expression of gene on high-copy number プラスミド in *Escherichia coli*,」 *Gene* 223 (1-2): 221-31(1998) を参照; WO 97/04110 も参照。 $lac I$  タンパク質をコードする遺伝子のうち、 $lac I$ 、 $lac I^Q$ 、および  $lac I^{Q1}$  で試験を行った。 $lac I$  遺伝子および  $lac I^Q$  遺伝子について得られた結果は、高コピー数プラスミド上に存在するときに  $Ptac$  駆動標的遺伝子の抑制レベルの劣化を示し、プレ誘導標的遺伝子発現の実質的なレベルを生じさせた。高発現  $lac I^{Q1}$  遺伝子のみが、その系において実質的な抑制を与えた。

10

#### 【0070】

しかしながらそのような方法は、誘導時にプロモーターを十分に抑制解除するために必要なインデューサの量を増加させることによって、そしてインデューサが構成発現されたリプレッサータンパク質すべてを十分に結合することができないために収率が低下することによって、費用を増大させる可能性を有する。

#### 【0071】

比較上、驚くべきことに、単一コピーの  $lac I$  染色体インサートが  $P_{lac} - Ptac$  ファミリープロモーター駆動導入遺伝子発現を抑制するのに十分であることが発見された。そのような発見は、使用されるインデューサの量に関して潜在的な費用節約措置を可能にして、タンパク質の改良された産生における宿主細胞としての蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) の開発にさらに柔軟性を与える。

20

#### 【0072】

シュードモナス (*Pseudomonad*) 生物

シュードモナス (*Pseudomonad*) および密接に関連する細菌は、本明細書で使用する場合、本明細書で「グラム (-) プロテオバクテリア・サブグループ 1」として定義するグループと同じ範囲である。「グラム (-) プロテオバクテリア・サブグループ 1」は、さらに詳細には、R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, pp. 217-289 (8th ed., 1974) (The Williams & Wilkins Co., ボルチモア、メリーランド州、米国) (以下「Bergey(1974)」) によって「グラム陰性好気性桿菌および球菌」と呼ばれるその分類学上の「パート」に含まれるとして記載されている、科および/または属に属するプロテオバクテリアの群として定義される。表 4 は、この分類学的「パート」に挙げられた生物の科および属を表す。

30



表 1. 「グラム陰性好気性桿菌および球菌」のパートに挙げられた科および属 (IN BERGEY (1974))

科 I. シュードモナダセア (Pseudomonadaceae)	グルコノバクター (Gluconobacter) シュードモナス (Pseudomonas) キサントモナス (Xanthomonas) ゾーグレア (Zoogloea)
科 I I. アセトバクテラセア (Azotobacteraceae)	アゾモナス (Azomonas) アゾトバクター (Azotobacter) ベイエリンキア (Beijerinckia) デルキシア (Derxia)
科 I I I. リゾビアセア (Rhizobiaceae)	アグロバクテリウム (Agrobacterium) リゾビウム (Rhizobium)
科 I V. メチロモナダセア (Methylomonadaceae)	メチロコッカス (Methylococcus) メチロモナス (Methylomonas)
科 V. ハロバクテリアセア (Halobacteriaceae)	ハロバクテリウム (Halobacterium) ハロコッカス (Halococcus)
他の属	アセトバクター (Acetobacter) アルカリゲネス (Alcaligenes) ボルデテラ (Bordetella) ブルセラ (Brucella) フランシセラ (Francisella) サーマス (Thermus)

10

20

### 【 0 0 7 3 】

「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1」は、その分類学的「パート」を形成するのに使用された基準に従って分類されるすべてのプロテオバクテリアと同様に、その下で分類されるすべてのプロテオバクテリアを含有する。結果として、「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1」は、例えば、：すべてのグラム陽性細菌；この B e r g e y ( 1 9 7 4 ) の分類法の 1 9 「パート」のその他に分類される、グラム陰性細菌、例えば、エンテロバクテリアセア (Enterobacteriaceae)；アーキア (Archaea) の非細菌科として以前から認識されてきた科である、この B e r g e y ( 1 9 7 4 ) の「パート」の全体の「科 V. ハロバクテリアセア (Halobacteriaceae)」；および細菌の非プロテオバクテリア属として以前から認識されてきた属である、この B e r g e y ( 1 9 7 4 ) の「パート」で挙げられた属サーマス (Thermus) を除外する。

30

### 【 0 0 7 4 】

「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1」は、この B e r g e y ( 1 9 7 4 ) の「パート」で定義された属または科に属する (以前はその種と呼ばれた) プロテオバクテリアをさらに含み、他のプロテオバクテリア分類学的名を以前から与えられている。一部の 경우에는、このような再命名は、完全に新しいプロテオバクテリア属の作製を引き起こした。例えば、アシドボラックス (Acidovorax)、ブレバンジモナス (Brevundimonas)、ブルクホルデリア (Burkholderia)、ヒドロゲノファーガ (Hydrogenophaga)、オーシャンイモナス (Oceanimonas)、ラルストニア (Ralstonia)、およびステノトロホモナス (Stenotrophomonas) は、属シュードモナス (Pseudomonas) の属に属する (以前はその種と呼ばれた) 生物を、B e r g e y ( 1 9 7 4 ) で定義されたように再グループ化することによって作製された。同様に例えば、スフィンゴモナス (Sphingomonas) 属 (およびそれから由来するブラストモナス (Blastomonas) 属) は、キサントモナス (Xanthomonas) 属に属する (以前はその種と呼ばれた) 生物を B e r g e y ( 1 9 7 4 ) で定義されたように再グループ化することによって作製された。同様に例えば、アシドモナス (

40

50

Acidomonas) 属は、アセトバクター (Acetobacter) 属に属する (そして以前はその種と呼ばれた) 生物を B e r g e y ( 1 9 7 4 ) で定義されたように再グループ化することによって作製された。そのように続いて再割当された種も、本明細書で定義する「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1」に含まれる。

#### 【 0 0 7 5 】

他の場合では、この B e r g e y ( 1 9 7 4 ) の「パート」で定義された属および科に含まれるプロテオバクテリア種は、プロバクテリアの他の既存の属の下で単に再分類された。例えば、シュードモナス (Pseudomonas) 属の場合、シュードモナス・エナリア (Pseudomonas enalia) (ATCC 14393)、シュードモナス・ニグリファシエンス (Pseudomonas nigrifaciens) (ATCC 19375)、およびシュードモナス・プトレファシエンス (Pseudomonas putrefaciens) (ATCC 8071) は、アルテロモナス・ハロプランクティス (Alteromonas haloplanktis)、アルテロモナス・ニグリファシエンス (Alteromonas nigrifaciens)、およびアルテロモナス・プトレファシエンス (Alteromonas putrefaciens) としてそれぞれ以前から再分類されている。同様に例えば、シュードモナス・アシドボランス (Pseudomonas acidovorans) (ATCC 15668) およびシュードモナス・テストステロニ (Pseudomonas testosteroni) (ATCC 11996) は、コマモナス・アシドボランス (Comamonas acidovorans) およびコマモナス・テストステロニ (Comamonas testosteroni) としてそれぞれ以前から再分類されている；シュードモナス・ニグリファシエンス (Pseudomonas nigrifaciens) (ATCC 19375) およびシュードモナス・ピスキキダ (Pseudomonas piscicida) (ATCC 15057) は、シュードアルテロモナス・ニグリファシエンス (Pseudoalteromonas nigrifaciens) およびシュードアルテロモナス・ピスキキダ (Pseudoalteromonas piscicida) としてそれぞれ以前から再分類されている。そのように続いて再割当された種も、本明細書で定義する「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1」に含まれる。

#### 【 0 0 7 6 】

「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1」は、以前から発見された、または以前からこの B e r g e y ( 1 9 7 4 ) の「パート」の プロテオバクテリア科および / または属の中に属するとして再分類されているプロテオバクテリア種も含む。プロテオバクテリア科に関しては、「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1」は、科：シュードモナダセア (Pseudomonadaceae)、アセトバクテラセア (Azotobacteraceae) (今は同義語のシュードモナダセア (Pseudomonadaceae) の「アゾトバクター群」と呼ばれることが多い)、リゾピアセア (Rhizobiaceae)、およびメチロモナダセア (Methylomonadaceae) (今は同義語のメチロモナダセア (Methylomonadaceae) と呼ばれることが多い) のいずれかに属するとして分類されたプロテオバクテリアも含む。結果として、本明細書で記載された以外の属に加えて、「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1」に含まれる、さらなるプロテオバクテリア属は：1) アゾリゾフィラス (Azorhizophilus) 属のアゾトバクター群細菌；2) セルビブリオ (Cellvibrio)、オリゲラ (Oligella)、およびテレジニバクター (Teredinibacter) 属のシュードモナダセア (Pseudomonadaceae) 科細菌；3) キレートバクター (Chelatobacter)、エンサイファ (Ensifer)、リベリバクター (Liberibacter) (カンジダタス・リベリバクター (Candidatus Liberibacter) と呼ばれる)、およびシノリゾビウム (Sinorhizobium) 属のリゾピアセア (Rhizobiaceae) 科細菌；および 4) メチロバクター (Methylobacter)、メチロカルダム (Methylocaldum)、メチロミクロビウム (Methylomicrobium)、メチロサルシナ (Methylosarcina)、およびメチロスフェラ (Methylosphaera) 属のメチロコッカセア (Methylococcaceae) 科細菌を含む。

#### 【 0 0 7 7 】

1 つの実施形態において、宿主細胞は、上で定義したように「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1」から選択される。

#### 【 0 0 7 8 】

別の実施形態において、宿主細胞は「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ

2」から選択される。「グラム( - )プロテオバクテリア・サブグループ2」は、以下の属(カタログに記載され、公に入手可能な、その寄託株の総数をカッコ内に示し、別途示す場合を除いて、すべてATCCに寄託されている): アシドモナス(*Acidomonas*) (2); アセトバクター(*Acetobacter*) (93); グルコノバクター(*Gluconobacter*) (37); ブレバンジモナス(*Brevundimonas*) (23); ベイジェリンキア(*Beijerinckia*) (13); デルキシア(*Derxia*) (2); ブルセラ(*Brucella*) (4); アグロバクテリウム(*Agrobacterium*) (79); キレートバクター(*Chelatobacter*) (2); エンサイファ(*Ensifer*) (3); リゾビウム(*Rhizobium*) (144); シノリゾビウム(*Sinorhizobium*) (24); プラストモナス(*Blastomonas*) (1); スフィンゴモナス(*Sphingomonas*) (27); アルカリゲネス(*Alcaligenes*) (88); ボルデテラ(*Bordetella*) (43); ブルクホルデリア(*Burkholderia*) (73); ラルストニア(*Ralstonia*) (33); アシドボラックス(*Acidovorax*) (20); ヒドロゲノファーガ(*Hydrogenophaga*) (9); ゾーグレア(*Zoogloea*) (9); メチロバクター(*Methylobacter*) (2); メチロカルダム(*Methylocaldum*) (NCIMBにて1); メチロコッカス(*Methylococcus*) (2); メチロミクロビウム(*Methylomicrobium*) (2); メチロモナス(*Methylomonas*) (9); メチロサルシナ(*Methylosarcina*) (1); メチロスフェラ(*Metlaylosphaera*); アゾモナス(*Azomonas*) (9); アゾリゾフィラス(*Azorhizophilus*) (5); アゾトバクター(*Azotobacter*) (64); セルビブリオ(*Cellvibrio*) (3); オリゲラ(*Oligella*) (5); シュードモナス(*Pseudomonas*) (1139); フランシセラ(*Francisella*) (4); キサントモナス(*Xanthomonas*) (229); ステノトロホモナス(*Stenotrophomonas*) (50); およびオーシャンイモナス(*Oceanimonas*) (4)のプロテオバクテリアの群として定義される。

# 【0079】

「グラム( - )プロテオバクテリア・サブグループ2」の宿主細胞種の例は、これに限定されるわけではないが、以下の細菌(その菌株例のATCCまたは他の寄託番号をカッコ内に示す): アシドモナス・メタノリカ(*Acidomonas methanolica*) (ATCC 43581); アセトバクター・アセチ(*Acetobacter acetii*) (ATCC 15973); グルコノバクター・オキシダンス(*Gluconobacter oxydans*) (ATCC 19357); ブレバンジモナス・ディミニタ(*Brevundimonas diminuta*) (ATCC 11568); *Beijerinckia indica* (ATCC 9039およびATCC 19361); デルキシア*gummosa* (*Derxia gummosa*) (ATCC 15994); ブルセラ・メリテンシス(*Brucella melitensis*) (ATCC 23456)、ブルセラ・アボルツス(*Brucella abortus*) (ATCC 23448); アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*) (ATCC 23308)、アグロバクテリウム・ラジオバクター(*Agrobacterium radiobacter*) (ATCC 19358)、アグロバクテリウム・リゾゲネス(*Agrobacterium rhizogenes*) (ATCC 11325); キレートバクター*heintzii* (*Chelatobacter heintzii*) (ATCC 29600); エンサイファ・アドヘレンス(*Ensifer adhaerens*) (ATCC 33212); リゾビウム・レグミノサルム(*Rhizobium leguminosarum*) (ATCC 10004); シノリゾビウム*fredii* (*Sinorhizobium fredii*) (ATCC 35423); プラストモナス*natatoria* (*Blastomonas natatoria*) (ATCC 35951); スフィンゴモナス・パウシモビリス(*Sphingomonas paucimobilis*) (ATCC 29837); アルカリゲネス・フェカリス(*Alcaligenes faecalis*) (ATCC 8750); ボルデテラ・ペルタシス(*Bordetella pertussis*) (ATCC 9797); バークホルデリア・セパシア(*Burkholderia cepacia*) (ATCC 25416); ラルストニア・ピックティ(*Ralstonia pickettii*) (ATCC 27511); アシドボラックス・ファシリス(*Acidovorax facilis*) (ATCC 11228); ヒドロゲノファーガ・フラバ(*Hydrogenophaga flava*) (ATCC 33667); ゾーグレア・ラミゲラ(*Zoogloea ramigera*) (ATCC 19544); メチロバクター・ルテウス(*Methylobacter luteus*) (ATCC 49878); メチロカルダム・グラシル(*Methylocaldum gracile*) (NCIMB 11912); メチロコッカス・カプスラタス(*Methylococcus capsulatus*) (ATCC 19069); メチロミクロビウム*agile* (*Methylomicrobium agile*) (ATCC 35068); メチロモナス・メタニカ(*Methylomonas methanica*) (ATCC 35067); メチロサルシナ*fibrata* (*Methylosarcina fibrata*) (ATCC 700909); メチロスフェラ・ハンソニー(*Metlaylosphaera hansonii*) (ACAM 549); アゾモナス*agilis* (*Azomonas agilis*)

( ATCC 7494 ) ; アゾリゾフィラス *paspali* ( *Azorhizophilus paspali* ) ( ATCC 23833 ) ; アゾトバクター・クロロコッカム ( *Azotobacter Chroococcum* ) ( ATCC 9043 ) ; セルビブリオ・ミクスタス ( *Cellvibrio mixtus* ) ( UQM 2601 ) ; オリゲラ *urethralis* ( *Oligella urethralis* ) ( ATCC 17960 ) ; シュードモナス・エアルギノサ ( *Pseudomonas aeruginosa* ) ( ATCC 10145 ) ; 蛍光菌 ( *Pseudomonas fluorescens* ) ( ATCC 35858 ) ; フランシセラ・ツラレンシス ( *Francisella tularensis* ) ( ATCC 6223 ) ; ステノトロホモナス・マルトフィリア ( *Stenotrophomonas maltophilia* ) ( ATCC 13637 ) ; キサントモナス・カンペストリス ( *Xanthomonas campestris* ) ( ATCC 33913 ) ; およびオーシャンイモナス・ドウドロフフィ ( *Oceanimonas doudoroffii* ) ( ATCC 27123 ) を含む。

#### 【 0 0 8 0 】

別の実施形態において、宿主細胞は「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 3 」から選択される。「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 3 」は、以下の属：ブレバンジモナス ( *Brevundimonas* ) ; アグロバクテリウム ( *Agrobacterium* ) ; リゾビウム ( *Rhizobium* ) ; シノリゾビウム ( *Sinorhizobium* ) ; プラストモナス ( *Blastomonas* ) ; スフィンゴモナス ( *Sphingomonas* ) ; アルガリゲネス ( *Alcaligenes* ) ; ブルクホリデリア ( *Burkholderia* ) ; ラルストニア ( *Ralstonia* ) ; アシドボラックス ( *Acidovorax* ) ; ヒドロゲノファーガ ( *Hydrogenophaga* ) ; メチロバクター ( *Methylobacter* ) ; メチロカルダム ( *Methylocaldum* ) ; メチロコッカス ( *Methylococcus* ) ; メチロミクロビウム ( *Methylomicrobium* ) ; メチロモナス ( *Methylomonas* ) ; メチロサルシナ ( *Methylosarcina* ) ; メチロスフェラ ( *Metlaylosphaera* ) ; アゾモナス ( *Azomonas* ) ; アゾリゾフィラス ( *Azorhizophilus* ) ; アゾトバクター ( *Azotobacter* ) ; セルビブリオ ( *Cellvibrio* ) ; オリゲラ ( *Oligella* ) ; シュードモナス ( *Pseudomonas* ) ; テレジニバクター ( *Teredinibacter* ) ; フランシセラ ( *Francisella* ) ; ステノトロホモナス ( *Stenotrophomonas* ) ; キサントモナス ( *Xanthomonas* ) およびオーシャンイモナス ( *Oceanimonas* ) のプロテオバクテリアの群として定義される。

#### 【 0 0 8 1 】

別の実施形態において、宿主細胞は「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 4 」から選択される。「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 4 」は、以下の属：ブレバンジモナス ( *Brevundimonas* ) ; プラストモナス ( *Blastomonas* ) ; スフィンゴモナス ( *Sphingomonas* ) ; ブルクホリデリア ( *Burkholderia* ) ; ラルストニア ( *Ralstonia* ) ; アシドボラックス ( *Acidovorax* ) ; ヒドロゲノファーガ ( *Hydrogenophaga* ) ; メチロバクター ( *Methylobacter* ) ; メチロカルダム ( *Methylocaldum* ) ; メチロコッカス ( *Methylococcus* ) ; メチロミクロビウム ( *Methylomicrobium* ) ; メチロモナス ( *Methylomonas* ) ; メチロサルシナ ( *Methylosarcina* ) ; メチロスフェラ ( *Metlaylosphaera* ) ; アゾモナス ( *Azomonas* ) ; アゾリゾフィラス ( *Azorhizophilus* ) ; アゾトバクター ( *Azotobacter* ) ; セルビブリオ ( *Cellvibrio* ) ; オリゲラ ( *Oligella* ) ; シュードモナス ( *Pseudomonas* ) ; テレジニバクター ( *Teredinibacter* ) ; フランシセラ ( *Francisella* ) ; ステノトロホモナス ( *Stenotrophomonas* ) ; キサントモナス ( *Xanthomonas* ) およびオーシャンイモナス ( *Oceanimonas* ) のプロテオバクテリアの群として定義される。

#### 【 0 0 8 2 】

1 つの実施形態において、宿主細胞は「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 5 」から選択される。「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 5 」は、以下の属：メチロバクター ( *Methylobacter* ) ; メチロカルダム ( *Methylocaldum* ) ; メチロコッカス ( *Methylococcus* ) ; メチロミクロビウム ( *Methylomicrobium* ) ; メチロモナス ( *Methylomonas* ) ; メチロサルシナ ( *Methylosarcina* ) ; メチロスフェラ ( *Metlaylosphaera* ) ; アゾモナス ( *Azomonas* ) ; アゾリゾフィラス ( *Azorhizophilus* ) ; アゾトバクター ( *Azotobacter* ) ; セルビブリオ ( *Cellvibrio* ) ; オリゲラ ( *Oligella* ) ; シュードモナス ( *Pseudomonas* ) ; テレジニバクター ( *Teredinibacter* ) ; フランシセラ ( *Francisella* ) ; ステノトロホモナス ( *Stenotrophomonas* ) ; キサントモナス ( *Xanthomonas* ) およびオーシャンイモナス ( *Oceanimonas* ) のプロテオバクテリアの群として定義される。

## 【 0 0 8 3 】

宿主細胞は、「グラム（-）プロテオバクテリア・サブグループ 6」から選択され得る。「グラム（-）プロテオバクテリア・サブグループ 6」は、以下の属：ブレバンジモナス（*Brevundimonas*）；ブラストモナス（*Blastomonas*）；スフィンゴモナス（*Sphingomonas*）；ブルクホリデリア（*Burkholderia*）；ラルストニア（*Ralstonia*）；アシドボラックス（*Acidovorax*）；ヒドロゲノファーガ（*Hydrogenophaga*）；アゾモナス（*Azomonas*）；アゾリゾフィラス（*Azorhizophilus*）；アゾトバクター（*Azotobacter*）；セルビブリオ（*Cellvibrio*）；オリゲラ（*Oligella*）；シュードモナス（*Pseudomonas*）；テレジニバクター（*Teredinibacter*）；ステノトロホモナス（*Stenotrophomonas*）；キサントモナス（*Xanthomonas*）およびオーシャンイモナス（*Oceanimonas*）のプロテオバクテリアの群として定義される。

10

## 【 0 0 8 4 】

宿主細胞は、「グラム（-）プロテオバクテリア・サブグループ 7」から選択され得る。「グラム（-）プロテオバクテリア・サブグループ 7」は、以下の属：アゾモナス（*Azomonas*）；アゾリゾフィラス（*Azorhizophilus*）；アゾトバクター（*Azotobacter*）；セルビブリオ（*Cellvibrio*）；オリゲラ（*Oligella*）；シュードモナス（*Pseudomonas*）；テレジニバクター（*Teredinibacter*）；ステノトロホモナス（*Stenotrophomonas*）；キサントモナス（*Xanthomonas*）；およびオーシャンイモナス（*Oceanimonas*）のプロテオバクテリアの群として定義される。

20

## 【 0 0 8 5 】

宿主細胞は、「グラム（-）プロテオバクテリア・サブグループ 8」から選択され得る。「グラム（-）プロテオバクテリア・サブグループ 8」は、以下の属：ブレバンジモナス（*Brevundimonas*）；ブラストモナス（*Blastomonas*）；スフィンゴモナス（*Sphingomonas*）；ブルクホリデリア（*Burkholderia*）；ラルストニア（*Ralstonia*）；アシドボラックス（*Acidovorax*）；ヒドロゲノファーガ（*Hydrogenophaga*）；シュードモナス（*Pseudomonas*）；ステノトロホモナス（*Stenotrophomonas*）；キサントモナス（*Xanthomonas*）およびオーシャンイモナス（*Oceanimonas*）のプロテオバクテリアの群として定義される。

## 【 0 0 8 6 】

宿主細胞は、「グラム（-）プロテオバクテリア・サブグループ 9」から選択され得る。「グラム（-）プロテオバクテリア・サブグループ 9」は、以下の属：ブレバンジモナス（*Brevundimonas*）；ブルクホリデリア（*Burkholderia*）；ラルストニア（*Ralstonia*）；アシドボラックス（*Acidovorax*）；ヒドロゲノファーガ（*Hydrogenophaga*）；シュードモナス（*Pseudomonas*）；ステノトロホモナス（*Stenotrophomonas*）；およびオーシャンイモナス（*Oceanimonas*）のプロテオバクテリアの群として定義される。

30

## 【 0 0 8 7 】

宿主細胞は、「グラム（-）プロテオバクテリア・サブグループ 10」から選択され得る。「グラム（-）プロテオバクテリア・サブグループ 10」は、以下の属：ブルクホリデリア（*Burkholderia*）；ラルストニア（*Ralstonia*）；シュードモナス（*Pseudomonas*）；ステノトロホモナス（*Stenotrophomonas*）；および *Xanthomonas*（キサントモナス）のプロテオバクテリアの群として定義される。

40

## 【 0 0 8 8 】

宿主細胞は、「グラム（-）プロテオバクテリア・サブグループ 11」から選択され得る。「グラム（-）プロテオバクテリア・サブグループ 11」は、以下の属：シュードモナス（*Pseudomonas*）；ステノトロホモナス（*Stenotrophomonas*）；および *Xanthomonas*（キサントモナス）のプロテオバクテリアの群として定義される。

## 【 0 0 8 9 】

宿主細胞は、「グラム（-）プロテオバクテリア・サブグループ 12」から選択され得る。「グラム（-）プロテオバクテリア・サブグループ 12」は、以下の属：ブルクホリデリア（*Burkholderia*）；ラルストニア（*Ralstonia*）；シュードモナス（*Pseudomonas*）のプロテオバクテリアの群として定義される。

50

宿主細胞は、「グラム( - )プロテオバクテリア・サブグループ 1 3」から選択され得る。「グラム( - )プロテオバクテリア・サブグループ 1 3」は、以下の属：ブルクホリデリア (*Burkholderia*)；ラルストニア (*Ralstonia*)；シュードモナス (*Pseudomonas*) およびキサントモナス (*Xanthomonas*) のプロテオバクテリアの群として定義される。

【0090】

宿主細胞は、「グラム( - )プロテオバクテリア・サブグループ 1 4」から選択され得る。「グラム( - )プロテオバクテリア・サブグループ 1 4」は、以下の属：シュードモナス (*Pseudomonas*) およびキサントモナス (*Xanthomonas*) のプロテオバクテリアの群として定義される。

【0091】

宿主細胞は、「グラム( - )プロテオバクテリア・サブグループ 1 5」から選択され得る。「グラム( - )プロテオバクテリア・サブグループ 1 5」は、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属のプロテオバクテリアの群として定義される。

【0092】

宿主細胞は、「グラム( - )プロテオバクテリア・サブグループ 1 6」から選択され得る。「グラム( - )プロテオバクテリア・サブグループ 1 6」は、以下のシュードモナス種（その菌株例のATCCまたは他の寄託番号をカッコ内に示す）：シュードモナス *abietaniphila* (*Pseudomonas abietaniphila*) (ATCC 700689)；シュードモナス・エアルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*) (ATCC 10145)；シュードモナス・アルカリゲネス (*Pseudomonas alcaligenes*) (ATCC 14909)；シュードモナス *anguilliseptica* (*Pseudomonas anguilliseptica*) (ATCC 33660)；シュードモナス *citronellolis* (*Pseudomonas citronellolis*) (ATCC 13674)；シュードモナス・フラベセンス (*Pseudomonas flavescens*) (ATCC 51555)；シュードモナス・メンドシナ (*Pseudomonas mendocina*) (ATCC 25411)；シュードモナス・ニトロレデュセンス (*Pseudomonas nitroreducens*) (ATCC 33634)；シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) (ATCC 8062)；シュードモナス・シュードアルカリゲネス (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) (ATCC 17440)；シュードモナス・レシノボランス (*Pseudomonas resinovorans*) (ATCC 14235)；シュードモナス・ストラミネア (*Pseudomonas straminea*) (ATCC 33636)；シュードモナス *agarici* (*Pseudomonas agarici*) (ATCC 25941)；シュードモナス・アルカリフィア (*Pseudomonas alcaliphila*)；シュードモナス *alginovora* (*Pseudomonas alginovora*)；シュードモナス・アンダーソニー (*Pseudomonas andersonii*)；シュードモナス *asplenii* (*Pseudomonas asplenii*) (ATCC 23835)；シュードモナス・アゼライカ (*Pseudomonas azelaica*) (ATCC 27162)；シュードモナス *beijerinckii* (*Pseudomonas beijerinckii*) (ATCC 19372)；シュードモナス・ボレアリス (*Pseudomonas borealis*)；シュードモナス・ボレオポリス (*Pseudomonas boreopolis*) (ATCC 33662)；シュードモナス *brassicacearum* (*Pseudomonas brassicacearum*)；シュードモナス *butanovora* (*Pseudomonas butanovora*) (ATCC 43655)；シュードモナス・セルローサ (*Pseudomonas cellulosa*) (ATCC 55703)；シュードモナス・オウランチアカ (*Pseudomonas aurantiaca*) (ATCC 33663)；シュードモナス・クロロラフィス (*Pseudomonas chlororaphis*) (ATCC 9446, ATCC 13985, ATCC 17418, ATCC 17461)；シュードモナス・フラギ (*Pseudomonas fragi*) (ATCC 4973)；シュードモナス *lundensis* (*Pseudomonas lundensis*) (ATCC 49968)；シュードモナス・タエトロレンス (*Pseudomonas taetrolens*) (ATCC 4683)；シュードモナス *cissicola* (*Pseudomonas cissicola*) (ATCC 33616)；シュードモナス・コロナファシエンス (*Pseudomonas coronafaciens*)；シュードモナス *diterpeniphila* (*Pseudomonas diterpeniphila*)；シュードモナス・エロンガタ (*Pseudomonas elongata*) (ATCC 10144)；シュードモナス *flectens* (*Pseudomonas flectens*) (ATCC 12775)；シュードモナス・アゾトフォルマン (*Pseudomonas azotoformans*)；シュードモナス *brenneri* (*Pseudomonas brenneri*)；シュードモナス *cedrella* (*Pseudomonas cedrella*)；シュードモナス *corrugata* (*Pseudomonas corrugata*) (ATCC 29736)；シュードモナス *extremorientalis* (*Pseudomonas extremorientalis*)；蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) (ATCC 35858)；シ

10

20

30

40

50

ユードモナスgessardii (*Pseudomonas gessardii*) ; シュードモナスlibanensis (*Pseudomonas libanensis*) ; シュードモナスmandelii (*Pseudomonas mandelii*) (ATCC 700871) ; シュードモナス・マルギナリス (*Pseudomonas marginalis*) (ATCC 10844) ; シュードモナスmigulae (*Pseudomonas migulae*) ; シュードモナスmucicolens (*Pseudomonas mucicolens*) (ATCC 4685) ; シュードモナス・オリエンタリス (*Pseudomonas orientalis*) ; シュードモナスrhodesiae (*Pseudomonas rhodesiae*) ; シュードモナスsynxantha (*Pseudomonas synxantha*) (ATCC 9890) ; シュードモナス・トラシイ (*Pseudomonas tolaasi*) (ATCC 33618) ; シュードモナスveronii (*Pseudomonas veronii*) (ATCC 700474) ; シュードモナスfrederiksbergensis (*Pseudomonas frederiksbergensis*) ; シュードモナスgeniculata (*Pseudomonas geniculata*) (ATCC 19374) ; シュードモナスgingers (*Pseudomonas gingers*) ; シュードモナス・グラミニス (*Pseudomonas graminis*) ; シュードモナスgrimontii (*Pseudomonas grimontii*) ; シュードモナス・ハロデニトリフィカンス (*Pseudomonas halodenitrificans*) ; シュードモナス・ハロフィラ (*Pseudomonas halophila*) ; シュードモナスhibiscicola (*Pseudomonas hibiscicola*) (ATCC 19867) ; シュードモナスhuttiensis (*Pseudomonas huttiensis*) (ATCC 14670) ; シュードモナスhydrogenovora (*Pseudomonas hydrogenovora*) ; シュードモナス・ジェッセニイ (*Pseudomonas jessenii*) (ATCC 700870) ; シュードモナスkilonensis (*Pseudomonas kilonensis*) ; シュードモナス・ランセオラータ (*Pseudomonas lanceolata*) (ATCC 14669) ; シュードモナス・リニ (*Pseudomonas lini*) ; シュードモナス・マルギナータ (*Pseudomonas marginata*) (ATCC 25417) ; シュードモナスmephitica (*Pseudomonas mephitica*) (ATCC 33665) ; シュードモナス・デニトリフィカンス (*Pseudomonas denitrificans*) (ATCC 19244) ; シュードモナスpertucinogena (*Pseudomonas pertucinogena*) (ATCC 190) ; シュードモナスpictorum (*Pseudomonas pictorum*) (ATCC 23328) ; シュードモナス・サイクロフィラム (*Pseudomonas psychrophila*) ; シュードモナス・フルバ (*Pseudomonas fulva*) (ATCC 31418) ; シュードモナスmonteilii (*Pseudomonas monteilii*) (ATCC 700476) ; シュードモナスmosselii (*Pseudomonas mosselii*) ; シュードモナス・オリジハビタンス (*Pseudomonas oryzae*) (ATCC 43272) ; シュードモナスplecoglossicida (*Pseudomonas plecoglossicida*) (ATCC 700383) ; シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) (ATCC 12633) ; シュードモナス・リアクタンツ (*Pseudomonas reactants*) ; シュードモナス・スピノサ (*Pseudomonas spinosa*) (ATCC 14606) ; シュードモナス・バレアリカ (*Pseudomonas balearica*) ; シュードモナス・ルテオラ (*Pseudomonas luteola*) (ATCC 43273) ; シュードモナス・スツツエリ (*Pseudomonas stutzeri*) (ATCC 17588) ; シュードモナス・amygdali (*Pseudomonas amygdali*) (ATCC 33614) ; シュードモナスavellanae (*Pseudomonas avellanae*) (ATCC 700331) ; シュードモナスcaricapapayae (*Pseudomonas caricapapayae*) (ATCC 33615) ; シュードモナス・チコリアイ (*Pseudomonas cichorii*) (ATCC 10857) ; シュードモナスficuserectae (*Pseudomonas ficuserectae*) (ATCC 35104) ; シュードモナスfuscovaginae (*Pseudomonas fuscovaginae*) ; シュードモナスmeliae (*Pseudomonas meliae*) (ATCC 33050) ; シュードモナス・シリング (*Pseudomonas syringe*) (ATCC 19310) ; シュードモナス・ビリジフラバ (*Pseudomonas viridiflava*) (ATCC 13223) ; シュードモナス・サーモカルボキシドボランス (*Pseudomonas thermocarboxydovorans*) (ATCC 35961) ; シュードモナス・サーモトレランス (*Pseudomonas thermotolerans*) ; シュードモナスthivervalensis (*Pseudomonas thivervalensis*) ; シュードモナスvancouverensis (*Pseudomonas vancouverensis*) (ATCC 700688) ; シュードモナスwisconsinensis (*Pseudomonas wisconsinensis*) ; およびシュードモナスxiamenensis (*Pseudomonas xiamenensis*) のプロテオバクテリアの群として定義される。

# **【 0 0 9 3 】**

宿主細胞「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 17」から選択され得る。「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 17」は、例えば、以下のシュードモナス (*Pseudomonas*) 種：シュードモナス・アゾトフォルマンス (*Pseudomonas azotoform*

10

20

30

40

50

ans) ; シュードモナス *brenneri* (*Pseudomonas brenneri*) ; シュードモナス *cedrella* (*Pseudomonas cedrella*) ; シュードモナス *corrugata* (*Pseudomonas corrugata*) ; シュードモナス *extremorientalis* (*Pseudomonas extremorientalis*) ; 蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) ; シュードモナス *gessardii* (*Pseudomonas gessardii*) ; シュードモナス *libanensis* (*Pseudomonas libanensis*) ; シュードモナス *mandelii* (*Pseudomonas mandelii*) ; シュードモナス・マルギナリス (*Pseudomonas marginalis*) ; シュードモナス *migulae* (*Pseudomonas migulae*) ; シュードモナス *mucicolens* (*Pseudomonas mucicolens*) ; シュードモナス・オリエンタリス (*Pseudomonas orientalis*) ; シュードモナス *rhodesiae* (*Pseudomonas rhodesiae*) ; シュードモナス *synxantha* (*Pseudomonas synxantha*) ; シュードモナス・トラシイ (*Pseudomonas tolaasii*) ; および シュードモナス *veronii* (*Pseudomonas veronii*) に属するものを含む、「フロオレッセント・シュードモナズ (fluorescent *Pseudomonads*)」として当該分野で公知のプロテオバクテリアの群として定義される。

10

#### 【 0 0 9 4 】

宿主細胞は、「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1 8」から選択され得る。「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1 8」は、例えば、以下 ( 菌株例の ATCC または他の寄託番号をカッコ内に示す ) : ピオバル 1 または ピオバル I と呼ばれる、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) バイオタイプ A ( ATCC13525 ) ; ピオバル 2 または ピオバル II と呼ばれる、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) バイオタイプ B ( ATCC 17816 ) ; ピオバル 3 または ピオバル III と呼ばれる、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) バイオタイプ C ( ATCC 17400 ) ; ピオバル 4 または ピオバル IV と呼ばれる、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) バイオタイプ F ( ATCC12983 ) ; ピオバル 5 または ピオバル V と呼ばれる、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) バイオタイプ G ( ATCC 17518 ) ; 蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) ピオバル VI ; 蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) P f O - 1 ; 蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) P f - 5 ( ATCC BAA-477 ) ; 蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) S B W 2 5 ; および 蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) subsp. *cellulosa* ( NCIMB 10462 ) に属するものを含む、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 種の亜種、変異体、菌株、および他のサブスペシャル単位すべての群として定義される。

20

#### 【 0 0 9 5 】

宿主細胞は、「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1 9」から選択され得る。「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1 9」は、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) バイオタイプ A のすべての菌株の群として定義し得る。このバイオタイプの特に特別な菌株は、蛍光菌 (*P. fluorescens*) 菌株 M B 1 0 1 ( Wilcox への米国特許第 5,169,760 を参照 )、およびその誘導体である。

30

#### 【 0 0 9 6 】

1 つの実施形態において、宿主細胞は、 シュードモナス目 (*Pseudomonadales*) の プロテオバクテリアのいずれかである。特定の実施形態において、宿主細胞は、 シュードモナダセア科 (*Pseudomonadaceae*) の プロテオバクテリアのいずれかである。

#### 【 0 0 9 7 】

特定の実施形態において、宿主細胞は、「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1」から選択される。特定の実施形態において、宿主細胞は、「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 2」から選択される。特定の実施形態において、宿主細胞は、「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 3」から選択される。特定の実施形態において、宿主細胞は、「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 5」から選択される。特定の実施形態において、宿主細胞は、「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 7」から選択される。特定の実施形態において、宿主細胞は、「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1 2」から選択される。特定の実施形態において、宿主細胞は、「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1 5」から選択される。特定の実施形態において、宿主細胞は、「グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ

40

50



「 プ 1 7 」 から選択される。特定の実施形態において、宿主細胞は、「 グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1 8 」 から選択される。特定の実施形態において、宿主細胞は、「 グラム ( - ) プロテオバクテリア・サブグループ 1 9 」 から選択される。

#### 【 0 0 9 8 】

本発明で使用され得るさらなる蛍光菌 (*P. fluorescens*) 菌株は、以下のATCC呼称: [NCIB 8286]; NRRL B-1244; NCIB 8865菌株C01; NCIB 8866菌株C02; 1291[ATCC 17458; IFO 15837; NCIB 8917; LA; NRRL B-1864; ピロリジン; PW2[ICMP 3966; NCPPB 967; NRRL B-899]; 13475; NCTC 10038; NRRL B-1603[6; IFO 15840]; 52-1C; CCEB 488-A[BU140]; CCEB 553[IEM15/47]; IAM 1008[AHH-27]; IAM 1055[AHH-23]; 1[IFO15842]; 12[ATCC 25323; NIH 11; den Dooren de Jong 216]; 18[IFO 15833; WRRRL P-7]; 93[TR-10]; 108[52-22; IFO 15832]; 143[IFO15836; PL]; 149[2-40-40; IFO 15838]; 182[IFO 3081; PJ 73]; 184[IFO 15830]; 185[W2 L-1]; 186[IFO 15829; PJ79]; 187[NCPPB 263]; 188[NCPPB 316]; 189[PJ227; 1208]; 191[IFO 15834; PJ 236; 22/1]; 194[Klinge R-60; PJ 253]; 196[PJ288]; 97[PJ 290]; 198[PJ302]; 201[PJ 368]; 202[PJ 372]; 203[PJ 376]; 204[IFO 15835; PJ 682]; 205[PJ 686]; 206[PJ 692]; 207[PJ 693]; 208[PJ 722]; 212[PJ 832]; 215[PJ 849]; 216[PJ 885]; 267[B-9]; 271[B-1612]; 401[C71A; IFO 15831; PJ 187]; NRRLB-3178[4; IFO 15841]; KY 8521; 3081; 30-21; [IFO 3081]; N; PYR; PW; D946-B83[BU 2183; FERM-P 3328]; P-2563[FERM-P 2894; IFO 13658]; IAM-1126[43F]; M-1; A506[A5-06]; A505[A5-05-1]; A526[A5-26]; B69; 72; NRRL B-4290; PMW6[NCIB 11615]; SC 12936; AI[IFO15839]; F 1847[CDC-EB]; F 1848[CDC 93]; NCIB 10586; P17; F-12; A mMS 257; PRA25; 6133D02; 6519E01; N1; SC15208; BNL-WVC; NCTC 2583[NCIB 8194]; H13; 1013[ATCC 11251; CCEB 295]; IFO 3903; 1062; またはPf-5を有する、蛍光菌*Migula* (*Pseudomonas fluorescens* Migula) および蛍光菌*Loitokitok* (*Pseudomonas fluorescens* Loitokitok) を含む。

#### 【 0 0 9 9 】

##### II. 栄養要求性選択マーカー

本発明は、少なくとも1つの代謝産物に対して栄養要求性を誘導するように遺伝子改変されたシュードモナス (*Pseudomonads*) および関連する細胞を提供する。遺伝子改変は、代謝経路、例えば、同化生合成経路または異化利用経路において作用する酵素をコードする1つまたは複数の遺伝子に対して可能である。好ましくは、宿主細胞は、生体触媒活性を確実に除去するために、除去または不活性化された所与の生体触媒活性をコードするすべての作用する遺伝子を有する。特定の実施形態において、シュードモナス (*Pseudomonad*) は、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 細胞である。

#### 【 0 1 0 0 】

1つまたはそれ以上の代謝活性が、ロックアウトまたは交換のために選択される。(複数の)天然の栄養要求株の場合、追加の代謝ロックアウトまたは交換を提供し得る。複数の活性を選択する場合、栄養要求株回復選択マーカーは、生合成型(同化)または利用型(異化)であり、あるいは、両方の型から選択され得る。選択した化合物の所与の生合成経路での例えば、1つまたはそれ以上の活性をロックアウトし得る;あるいは、それぞれ異なる生合成経路からの1つを超える活性をロックアウトし得る。次に、対応する1つまたは複数の活性は、細胞への形質転換時に細胞に対する原栄養性を回復する少なくとも1つの組換えベクターによって供給される。

#### 【 0 1 0 1 】

栄養要求性宿主細胞を産生するためにその生合成または利用が標的にし得る化合物および分子は:例えば、脂肪酸を含む脂質;例えば、グルコース、フルクトース、スクロース、グルコース-6-ホスフェート、およびグルコン酸、ならびにEntner-Doudoroffおよびペントースホスフェート経路中間体および生成物も含む、モノおよびジサッカライドならびにその置換誘導体;ヌクレオシド、ヌクレオチド、ジヌクレオチド(例えば、ATP、dCTP、FMN、FAD、NAD、NADPを含む)、窒素含有塩基(例えば、ピリジン、プリン、ピリミジン、プテリン、およびヒドロ-、デヒドロ-、お

よび／または置換窒素含有塩基誘導体、例えば、コファクター、例えば、ビオチン、コバマミド、リボフラビン、チアミンを含む)；有機酸ならびに解糖およびクエン酸回路中間体および生成物(例えば、ヒドロキシ酸およびアミノ酸を含む)；貯蔵炭水化物および貯蔵ポリ(ヒドロシアルカナート)ポリマー(例えば、セルロース、デンプン、アミロース、アミロペクチン、グリコーゲン、ポリヒドロキシブチラート、およびポリラクテートを含む)を含む。

#### 【0102】

1つの実施形態において、栄養要求性宿主細胞を産生するためにノックアウトされた生体触媒活性は：脂質；ヌクレオシド、ヌクレオチド、ジヌクレオチド、窒素含有塩基、および窒素含有塩基誘導体；有機酸ならびに解糖およびクエン酸回路中間体および生成物からなる群から選択される。好ましくは、ノックアウトされた生体触媒活性は：ヌクレオシド、ヌクレオチド、ジヌクレオチド、窒素含有塩基、および窒素含有塩基誘導体；有機酸ならびに解糖およびクエン酸回路中間体および生成物からなる群から選択される。より好ましくは、ノックアウトされた生体触媒活性は：ピリミジンヌクレオシド、ヌクレオチド、ジヌクレオチド、窒素含有塩基、および窒素含有塩基誘導体；アミノ酸からなる群から選択される。

#### 【0103】

所与のトランスジェニック宿主細胞は、1つまたはそれ以上の選択マーカーまたは選択マーカー系を使用する。例えば、本発明による1つまたはそれ以上の生合成選択マーカーまたは選択マーカー系は、互いに共に使用し得るか、および／または本発明による利用型選択マーカーまたは選択マーカー系と組み合わせて使用し得る。これらの原栄養可能(proto-trophy-enabling)実施形態のいずれの1つにおいても、宿主細胞は、1つまたはそれ以上の非栄養要求性選択マーカーまたは選択マーカー系も含むことがある。非栄養要求性選択マーカーおよび系の例は、例えば、：毒素耐性マーカー遺伝子、例えば、抗生物質を分解する酵素活性をコードする抗生物質耐性遺伝子；毒素耐性マーカー遺伝子、例えば、酵素をそのような変異を含有しない酵素の変異体によって示された毒素阻害に対して非感受性にする変異が発現される、アセトラクテートシンターゼ(「ALS」；EC 2.2.1.6)のイミダゾリノン耐性ミュータントを含む。化合物は、この効果を直接発揮する；または化合物は、例えば、化合物を毒素形態に変換する細胞の代謝作用の結果として、または化合物と少なくとも1つのさらなる化合物との組合せの結果として、この効果を間接的に発揮する。

#### 【0104】

そのようなマーカー酵素をコードする細菌性宿主作用遺伝子は、ノックアウト細胞の作製用に選択された細菌宿主細胞株から、他の細菌から、または他の生物から入手可能であり、天然の形態または改変(例えば、変異または配列組換え)形態で使用される。例えば、ノックアウト生体触媒活性を示す酵素のDNAをコードする配列は、1つまたはそれ以上の生物から入手され、次に宿主細胞内で作用するDNA調節要素に作動可能に結合される。特に、選択された酵素活性をコードする選択された宿主の細胞内遺伝子のすべてがノックアウトされる；次に細菌ノックアウト宿主を、細菌ノックアウトによって活性喪失を示す酵素をコードする、天然のまたは非天然の遺伝子の少なくとも1つの作用コピーを含むベクターによって形質転換する。

#### 【0105】

そのような酵素をコードする細菌および他の遺伝子は、当業者が利用し得る種々の供給源を通じて選択および入手され得る。これらは、酵素をコードする配列および種-作用DNA調節要素のヌクレオチド配列を含む。有用なオンライン・インターネットリソースは、例えば：(1)例えば、<http://us.expasy.org/>で入手され得る、Swiss Institute of Bioinformatics(Batiment Ecole de Pharmacie, Room 3041;Universite de Lausanne；1015 ローザンヌ-ドリーヌ；スイス)のExPASy proteomics facility(ENZYME and BIOCHEMICAL 経路S MAPS featuresを参照)；および(2)National Center for Biotechnology Information(NCBI, National Library of Medicine, National Institutes of

10

20

30

40

50

Health, U. S. Dept. of Health & Human Services; Building 38A; ベセズダ、メリーランド州米国) によって提供され、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi> にて入手され得る、GenBank facility および他の Entrez リソース (PUBMED, PROTEIN, NUCLEOTIDE, STRUCTURE, GENOME, et al. features を参照) を含む。

#### 【0106】

選択したコード配列は、その遺伝子コードを細菌宿主細胞によって利用される遺伝子コードに一致するように変更することによって改変され、そのコドン配列は、宿主によって利用されるコドン配列にさらに近づくように強化され得る。遺伝子コードの選択およびコドン頻度強化は、当業者に公知の種々の方法のいずれか、例えば、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発に従って実施され得る。このプロセスを補助するための有用なオンライン・インターネットリソースは、例えば：(1) かずさDNA研究所(千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7、292-0818、日本)の、<http://www.kazusa.or.jp/codon/> で利用され得る、Codon Usage Database; および(2) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi?mode=c> のNCBI Taxonomy database から Genetic Codes tables 利用され得るを含む。例えば、シュードモナス (*Pseudomonas*) 種は、NCBI Taxonomy サイトの Genetic Code 翻訳 Table 11 の利用して、かずさのサイトでは <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgibin/> に示された表のコドン使用頻度を示して報告されている。

#### 【0107】

特定の実施形態において、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) は、宿主細胞として使用され得る。1つの実施形態において、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) は、少なくとも1つの栄養要求性選択マーカー遺伝子を提供する。代替的な実施形態において、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) は、すべての栄養要求性選択マーカー遺伝子を提供する。特定の実施形態において、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) は、宿主細胞であるのと同時に、少なくとも1つの、好ましくはすべての栄養要求性選択マーカー遺伝子を提供し得る。

#### 【0108】

生合成ヌクレオシドおよび窒素含有塩基選択マーカー

1つの実施形態において、同化代謝に関与する生合成酵素は、栄養要求性選択マーカーとして選択され得る。特に生合成酵素は、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ジヌクレオチド、窒素含有塩基、および窒素含有塩基誘導体の生合成に関与するものから選択され得る。

#### 【0109】

特定の実施形態において、少なくとも1つのプリン型生合成酵素が栄養要求性選択マーカーとして選択され得る。そのようなプリン生合成酵素は、例えば、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、アデニロスクシナートリアーゼ、アデニロスクシナートシターゼ、GMPシターゼ、IMPシクロヒドロラーゼ、IMPデヒドロゲナーゼ、ホスホリボシルアミン-グリシンリガーゼ、ホスホリボシル-アミノイミダゾールカルボキサミドホルミルトランスフェラーゼ、ホスホリボシルアミノイミダゾールカルボキシラーゼ、ホスホリボシルアミノイミダゾールスクシノカルボキサミドシターゼ、ホスホリボシル-ホルミルグリシンアミジンシクロリガーゼ、ホスホリボシル-ホルミルグリシンアミジンシターゼ、ホスホリボシル-グリシンアミドホルミルトランスフェラーゼ、リボース-ホスフェートジホスホキナーゼ、およびリボース-5-ホスフェート-アンモニアリガーゼを含む。

#### 【0110】

別の特定の実施形態において、ピリミジン型生合成酵素を栄養要求性選択マーカーとして選択し得る。そのようなピリミジン型生合成は、UMPの生合成に関与する酵素、例えば、カルバメートキナーゼ (EC 2.7.2.2)、カルバモイル-ホスフェートシターゼ (EC 6.3.5.5)、アスパルテートカルバモイルトランスフェラーゼ (EC 2.1.3.2)、ジヒドロオロターゼ (EC 3.5.2.3)、ジヒドロオロタートデヒドロゲナーゼ (EC 1.3.3.1)、オロタートホスホリボシルトランスフェラーゼ (「OPRT」; EC 2.4.2.10)、およびオロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ (「ODCase」; EC 4.1.1.23) を含む。

## 【0111】

ピリミジン型生合成酵素をコードする遺伝子の例は周知である。UMPの細菌合成の場合、有用な遺伝子の例は：カルバメートキナーゼをコードするarcC遺伝子；カルバモイル-ホスフェートシンターゼを集合的に(collectively)コードするcarAおよびcarB遺伝子；アスパルテートカルバモイルトランスフェラーゼをコードするpyrB遺伝子；ジヒドロオロターゼをコードするpyrC遺伝子；ジヒドロオロタートデヒドロゲナーゼを単独でまたは集合的にコードするpyrD遺伝子；オロタートホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするpyrE遺伝子；およびオロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼをコードするpyrF遺伝子を含む。

## 【0112】

特定の実施形態において、本発明による発現系は、pyrF栄養要求性選択マーカー遺伝子を利用する。pyrF遺伝子は、細菌ピリミジンヌクレオチド生合成経路に必要な酵素であるODCaseをコードして、それにより細胞は、ピリミジンヌクレオチド(UTP、CTP)ならびにピリミジンデオキシヌクレオチド(dTTP、dCTP)のデノボ合成を適正に行う。経路の最初の反応物質は、ATP、アミノ基源(すなわちアンモニウムイオンまたはL-グルタミン)、およびカルボキシル基源(すなわち二酸化炭素または重炭酸イオン)である；経路の最後の生成物はdTTPであり、dCTP、UTP、およびCTPもプロセスで生成される。特に細菌デノボピリミジンヌクレオチド生合成経路は、カルバモイルホスフェートの生成で開始する。カルバモイルホスフェートは：(a) arcC遺伝子によってコードされるカルバメートキナーゼ(EC 2.7.2.2)の作用；またはさらに一般的には、(b) その小および大サブユニットがcarAおよびcarB遺伝子によってそれぞれコードされる、グルタミン加水分解されたカルバモイル-ホスフェートシンターゼ(EC 6.3.5.5)の作用のいずれかによって合成される。次にカルバモイルホスフェートは、以下の6ステップ経路によってUDPに変換される：1) pyrBによってコードされるアスパルテートカルバモイルトランスフェラーゼ(EC 2.1.3.2)による、カルバモイルホスフェートからN-カルバモイル-L-アスパルテートへの変換；次に2) pyrCによってコードされるジヒドロオロターゼ(EC 3.5.2.3)による、その(S)-ジヒドロオロタートへの変換；次に3) pyrD遺伝子によってコードされるジヒドロオロタートデヒドロゲナーゼ(EC 1.3.3.1)による、そのオロタートへの変換；次に4) pyrEによってコードされるオロタートホスホリボシルトランスフェラーゼ(「OPRT」；EC 2.4.2.10)による、そのオロチジン-5'-モノホスフェート(「OMP」)への変換；そして次に5) pyrFによってコードされるオロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ(「ODCase」；EC 4.1.1.23)による、そのウリジン-5'-モノホスフェート(「UMP」)への変換。次にピリミジンヌクレオチド(UTP、CTP、dTTP、dCTP)、核酸、核タンパク質、および他の細胞代謝産物の合成のための種々の経路によって、UMPを利用する。

## 【0113】

carA、carB、またはpyrB-pyrF遺伝子の1つまたはそれ以上が不活性化または消失する、あるいは非機能性酵素をコードするように変異される細菌において、細胞が機能するウラシル回収経路を含有するという条件で、ウラシルが培地に添加されるならば、細胞はなお増殖し得る。ほとんどの細菌は、シュードモナス(Pseudomonads)および関連種を含めて、天然のウラシル回収経路を含有する。ウラシル回収経路では、細胞は外来性ウラシルをUMPに導入および変換して、必要なピリミジンヌクレオチドを合成する。ここでは、ウラシルは5-ホスホリボシル-1-ピロホスフェートと反応して、upp遺伝子によってコードされるウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ(EC 2.4.2.9)、またはpyrRによってコードされる2官能性ピリミジンオペロン調節タンパク質(「pyrR 2官能性タンパク質」)のいずれかの作用によって、UMPを生成する。得られたUMPは上記したように、次にUDPに、そして続いてピリミジンヌクレオチドに変換される。

## 【0114】

結果として、p y r F ( - ) シュードモナス (Pseudomonad) または関連細胞は、ウラシル含有培地上で維持され得る。p y r F 遺伝子含有 DNA 構築物を p y r F ( - ) 細胞にトランスフェクトおよび発現させて、機能する O D C a s e 酵素を形成した後、得られた複合 p y r F ( + ) プラスミド - 宿主細胞系は、ウラシルが欠乏した培地で維持され得る。

#### 【 0 1 1 5 】

シュードモナス (Pseudomonad) または関連宿主細胞で使用するための p y r F 遺伝子のコード配列は、機能する O D C a s e を生成するために選択されたシュードモナス (Pseudomonad) または関連宿主細胞によってコード配列が転写、翻訳、そしてそうでなければ処理されるという条件で、オロチジン - 5' - ホスフェートデカルボキシラーゼ酵素 (「O D C a s e」) をコードするいずれの遺伝子によっても供給され得る。p y r F をコードする配列は天然の配列であるか、または、例えば、当該分野で公知の 1 つまたはそれ以上の配列変更、配列結合、および / または配列生成技術の利用から得られた操作配列である。p y r F 選択マーカー遺伝子の一部として使用する前に、選択したコード配列を選択したシュードモナス (Pseudomonad) または関連宿主細胞の遺伝子コードおよび / または、まずコドン使用頻度に従って改良または最適化され得る。発現可能なコード配列は、選択した宿主細胞内で機能し得る転写プロモーター、ならびに他の必要な転写および翻訳調節要素すべてに作動可能に結合される。上記の p y r F 遺伝子の天然のコード配列は、それが上記の要件を満足するという条件で、細菌から、または他の任意の生物から入手され得る。

#### 【 0 1 1 6 】

1 つの実施形態において、p y r F をコードする配列は、選択マーカーとして使用されることが意図されているシュードモナス (Pseudomonad) または関連宿主細胞から単離される。p y r F 遺伝子全体 (コード配列および周囲の調節領域を含む) は、そこから単離され得る。特定の実施形態において、p y r F 遺伝子またはコード配列を提供する細菌は、シュードモナス目 (Pseudomonadales) の構成要素 (member)、シュードモナス亜目 (Pseudomonadineae) の構成要素、シュードモナダセア科 (Pseudomonadaceae) の構成要素、シュードモナス族 (Pseudomonadeae) の構成要素、シュードモナス属 (Pseudomonas) の構成要素、および蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 種群の構成要素 (すなわち「フルオレッセント・シュードモナズ」) からなる群から選択される。特定の実施形態において、細菌は、種蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) に属する。

#### 【 0 1 1 7 】

特定の実施形態において、p y r F 遺伝子は、配列番号 1 の核酸配列 (表 2)、またはその変異体を含む。あるいは、p y r F 遺伝子によってコードされる O D C a s e は、本発明による所与の宿主細胞によって使用される遺伝子コードに従って、配列番号 2 のアミノ酸配列 (表 3)、その変異体、またはそれと重複するコドン配列を有する変異体を含む。

#### 【 0 1 1 8 】

あるいは、p y r F 遺伝子は、配列番号 1 に対して少なくとも 70%、75%、80%、85%、88%、90%、および 95% 相同である核酸配列からなる群から選択される、O D C a s e 酵素をコードする核酸配列を含む。同様に p y r F 遺伝子は、配列番号 2 に対して少なくとも 70%、75%、80%、85%、88%、90%、および 95% 相同であるアミノ酸配列からなる群から選択される O D C a s e をコードする。

#### 【 0 1 1 9 】

別の実施形態において、p y r F 遺伝子は、配列番号 1 のヌクレオチド 974 - 1669 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 90%、93%、95%、96%、97%、98% または 99% 相同であるヌクレオチド配列を有するコード配列を含むし得る。

#### 【 0 1 2 0 】

特定の実施形態において、p y r F 遺伝子は、ハイブリダイゼーションが高ストリンジェントな条件下で実施されたときに、配列番号 3 のアンチコドン配列 (表 4) にハイブリ

ダイズするコドン配列を有するコード配列を含有し得るか、またはそれと重複するコドン配列を有し得る。特に特定の実施形態において、p y r F 遺伝子は配列番号 3 のヌクレオチド配列を含有する。

【表 2】

・蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) p y r F 核酸配列

配列 番号 1	
gatcagttgaggagccttgggtcatccccagtttctgacgcaggcgacaccagcaagtcgatgctgcggtcga aagcctcgatggaacgccacggcgccggtccagcagctgttcgggctcagcacagccgggcttcgataa acaccacacaaacgaaactggcggttgacagcggcaccaccaggccgtcatcggccaccagctggcgagta cgctgttcaggcgccaagtgtcgaacgggataattggccgctgttcggcggtcgcacgacccggcgagga gtcgtgatacgcgcgaccagttccggggttcgaacggcttgacataatgctgtcgtcccccagttccaggccgatg atgcggctcgggtgggttcgacgcggcggtgagcatcaggatcggaatgtccgattcggcgcgagccagcgccac aatgtcagcccgcttcgccggcagcatcaggctgagcaccaccacatcgaaaggctccgcttgcatggcctggcg catggcgatgccgtcggtagcgcctgaggcgagaatattgaagcgtgccaggtatgcatcagcagttcgggatcg gcacgtcgtcgcacaatcagcgcgcggggtgtccagcgctgtcttcggcgatcaccgcgtctttggcgcttcgtt acagggtcgaagggtgatgcatagcgagggtatcgcctggtgtggtgctcagcataggcgccagttccagggc tggaagtgtcggcgggcggtcatgtgcgcgaggttagccggcgcggtattggggcggtgtcgtgaatgtatcg gcttgaacaattgcctgaatcgccggtattggcgcttgatcggtattaccgatcatcgatcccgcaacggcgctg ctgctcacaatccgcgcgatttcgactgcctgagagccattccaatgtccgtctccagactcctatcgtcgc ccttgattacccacccgtgacgcgcgactgaagctggctgaccagttggaccccaagcttgcggggtcaaggct ggcaaggaaattgtcaccagttgcgcggcggaatcgtgcacccctcgggacaaaggcttgaagtgttctcga cctcaaattccatgacatcccaacaccagcgcatggcgctcaagccgcggcgagatggcggttgatgggtc aatgtgcactgtccggtggcctgcgcgatgagcgccgtccggaagtgtggaacagcgagcgccccaaa ccgtgttgatcggcggtgaccgtgctcaccagcatggagcggaagacctggcgggcattggcctgatatcgagcc gcagggtcaagtgttcgcctggcagccctggcgagaaagccggcctcgcgcgctgtgtcagccctgga agccccaggccctgaaaaacgcacatccgtcgtcgaactggtgacaccgggtatccgtcctaccggcagcgccag gatgaccagcgccgtatcctgaccccgccagggccctggatcgggctctgactacctggtgatcgccggccga tcagccaggcgccggatcctgcaaaagcgttggcagcggtcgtcgcgagatcgccgtatttttagagtgcacaaa aatgtgggagctggcttgcctgcgatagtatcaactcggatcacttagaaaccgagttgcttgcacgcaggcaagcc agctccacattttttgtgtgtgtcagctgactttagcaccacacitcccgaagtctcgcggtgaacagcttcac agcgttccgggaatgtctcagcccttcgacaatcttctgtctttagccttggccatccagccggccatt tcctgaccgcgcgcggaagtgcgcgcgtggtccatcaccacaaagccttcatacgcgcaggtgaccagcaa tgacaggtagttcgcgggctttagccgttctgtgtgtactggctgattgcaccgcaaatcaccacgcgggcttt gagcgccaggcggtgagcaccgcgtcgagaatacgccggcgacgttatcgaatacacgtccacgccttgggg cactcgcgtttagggcgccggcgacgtcttcgtttgtatgtagggcggtcgaagccagctcatcgaccag gaacttgacttctcggcgccaccggcgatccccactacgcgacagcctttagcttagcgatctcccggcgatgct gccacggcaccggcgccggcgagatcaccaggtgtcaccggcttgcgtgcgcggcttccagcagagcaaa gtagggcgtcatcggtcatgccaggcgggacaggtagcgggcgagggcgccagcttggggtccacattata gaaaccacggggctcgcaaggaaagtaattcgcacgccagtgaccggtcacgtatgccccaccgggaaggtc ggatggttcgaggcaagcacttgcctacgccaggcgcgcatcacttccgcatgcctaccgggtgggatgtagg acttgccttattcatccagccagca	10
gatcagttgaggagccttgggtcatccccagtttctgacgcaggcgacaccagcaagtcgatgctgcggtcga aagcctcgatggaacgccacggcgccggtccagcagctgttcgggctcagcacagccgggcttcgataa acaccacacaaacgaaactggcggttgacagcggcaccaccaggccgtcatcggccaccagctggcgagta cgctgttcaggcgccaagtgtcgaacgggataattggccgctgttcggcggtcgcacgacccggcgagga gtcgtgatacgcgcgaccagttccggggttcgaacggcttgacataatgctgtcgtcccccagttccaggccgatg atgcggctcgggtgggttcgacgcggcggtgagcatcaggatcggaatgtccgattcggcgcgagccagcgccac aatgtcagcccgcttcgccggcagcatcaggctgagcaccaccacatcgaaaggctccgcttgcatggcctggcg catggcgatgccgtcggtagcgcctgaggcgagaatattgaagcgtgccaggtatgcatcagcagttcgggatcg gcacgtcgtcgcacaatcagcgcgcggggtgtccagcgctgtcttcggcgatcaccgcgtctttggcgcttcgtt acagggtcgaagggtgatgcatagcgagggtatcgcctggtgtggtgctcagcataggcgccagttccagggc tggaagtgtcggcgggcggtcatgtgcgcgaggttagccggcgcggtattggggcggtgtcgtgaatgtatcg gcttgaacaattgcctgaatcgccggtattggcgcttgatcggtattaccgatcatcgatcccgcaacggcgctg ctgctcacaatccgcgcgatttcgactgcctgagagccattccaatgtccgtctccagactcctatcgtcgc ccttgattacccacccgtgacgcgcgactgaagctggctgaccagttggaccccaagcttgcggggtcaaggct ggcaaggaaattgtcaccagttgcgcggcggaatcgtgcacccctcgggacaaaggcttgaagtgttctcga cctcaaattccatgacatcccaacaccagcgcatggcgctcaagccgcggcgagatggcggttgatgggtc aatgtgcactgtccggtggcctgcgcgatgagcgccgtccggaagtgtggaacagcgagcgccccaaa ccgtgttgatcggcggtgaccgtgctcaccagcatggagcggaagacctggcgggcattggcctgatatcgagcc gcagggtcaagtgttcgcctggcagccctggcgagaaagccggcctcgcgcgctgtgtcagccctgga agccccaggccctgaaaaacgcacatccgtcgtcgaactggtgacaccgggtatccgtcctaccggcagcgccag gatgaccagcgccgtatcctgaccccgccagggccctggatcgggctctgactacctggtgatcgccggccga tcagccaggcgccggatcctgcaaaagcgttggcagcggtcgtcgcgagatcgccgtatttttagagtgcacaaa aatgtgggagctggcttgcctgcgatagtatcaactcggatcacttagaaaccgagttgcttgcacgcaggcaagcc agctccacattttttgtgtgtgtcagctgactttagcaccacacitcccgaagtctcgcggtgaacagcttcac agcgttccgggaatgtctcagcccttcgacaatcttctgtctttagccttggccatccagccggccatt tcctgaccgcgcgcggaagtgcgcgcgtggtccatcaccacaaagccttcatacgcgcaggtgaccagcaa tgacaggtagttcgcgggctttagccgttctgtgtgtactggctgattgcaccgcaaatcaccacgcgggcttt gagcgccaggcggtgagcaccgcgtcgagaatacgccggcgacgttatcgaatacacgtccacgccttgggg cactcgcgtttagggcgccggcgacgtcttcgtttgtatgtagggcggtcgaagccagctcatcgaccag gaacttgacttctcggcgccaccggcgatccccactacgcgacagcctttagcttagcgatctcccggcgatgct gccacggcaccggcgccggcgagatcaccaggtgtcaccggcttgcgtgcgcggcttccagcagagcaaa gtagggcgtcatcggtcatgccaggcgggacaggtagcgggcgagggcgccagcttggggtccacattata gaaaccacggggctcgcaaggaaagtaattcgcacgccagtgaccggtcacgtatgccccaccgggaaggtc ggatggttcgaggcaagcacttgcctacgccaggcgcgcatcacttccgcatgcctaccgggtgggatgtagg acttgccttattcatccagccagca	20
gatcagttgaggagccttgggtcatccccagtttctgacgcaggcgacaccagcaagtcgatgctgcggtcga aagcctcgatggaacgccacggcgccggtccagcagctgttcgggctcagcacagccgggcttcgataa acaccacacaaacgaaactggcggttgacagcggcaccaccaggccgtcatcggccaccagctggcgagta cgctgttcaggcgccaagtgtcgaacgggataattggccgctgttcggcggtcgcacgacccggcgagga gtcgtgatacgcgcgaccagttccggggttcgaacggcttgacataatgctgtcgtcccccagttccaggccgatg atgcggctcgggtgggttcgacgcggcggtgagcatcaggatcggaatgtccgattcggcgcgagccagcgccac aatgtcagcccgcttcgccggcagcatcaggctgagcaccaccacatcgaaaggctccgcttgcatggcctggcg catggcgatgccgtcggtagcgcctgaggcgagaatattgaagcgtgccaggtatgcatcagcagttcgggatcg gcacgtcgtcgcacaatcagcgcgcggggtgtccagcgctgtcttcggcgatcaccgcgtctttggcgcttcgtt acagggtcgaagggtgatgcatagcgagggtatcgcctggtgtggtgctcagcataggcgccagttccagggc tggaagtgtcggcgggcggtcatgtgcgcgaggttagccggcgcggtattggggcggtgtcgtgaatgtatcg gcttgaacaattgcctgaatcgccggtattggcgcttgatcggtattaccgatcatcgatcccgcaacggcgctg ctgctcacaatccgcgcgatttcgactgcctgagagccattccaatgtccgtctccagactcctatcgtcgc ccttgattacccacccgtgacgcgcgactgaagctggctgaccagttggaccccaagcttgcggggtcaaggct ggcaaggaaattgtcaccagttgcgcggcggaatcgtgcacccctcgggacaaaggcttgaagtgttctcga cctcaaattccatgacatcccaacaccagcgcatggcgctcaagccgcggcgagatggcggttgatgggtc aatgtgcactgtccggtggcctgcgcgatgagcgccgtccggaagtgtggaacagcgagcgccccaaa ccgtgttgatcggcggtgaccgtgctcaccagcatggagcggaagacctggcgggcattggcctgatatcgagcc gcagggtcaagtgttcgcctggcagccctggcgagaaagccggcctcgcgcgctgtgtcagccctgga agccccaggccctgaaaaacgcacatccgtcgtcgaactggtgacaccgggtatccgtcctaccggcagcgccag gatgaccagcgccgtatcctgaccccgccagggccctggatcgggctctgactacctggtgatcgccggccga tcagccaggcgccggatcctgcaaaagcgttggcagcggtcgtcgcgagatcgccgtatttttagagtgcacaaa aatgtgggagctggcttgcctgcgatagtatcaactcggatcacttagaaaccgagttgcttgcacgcaggcaagcc agctccacattttttgtgtgtgtcagctgactttagcaccacacitcccgaagtctcgcggtgaacagcttcac agcgttccgggaatgtctcagcccttcgacaatcttctgtctttagccttggccatccagccggccatt tcctgaccgcgcgcggaagtgcgcgcgtggtccatcaccacaaagccttcatacgcgcaggtgaccagcaa tgacaggtagttcgcgggctttagccgttctgtgtgtactggctgattgcaccgcaaatcaccacgcgggcttt gagcgccaggcggtgagcaccgcgtcgagaatacgccggcgacgttatcgaatacacgtccacgccttgggg cactcgcgtttagggcgccggcgacgtcttcgtttgtatgtagggcggtcgaagccagctcatcgaccag gaacttgacttctcggcgccaccggcgatccccactacgcgacagcctttagcttagcgatctcccggcgatgct gccacggcaccggcgccggcgagatcaccaggtgtcaccggcttgcgtgcgcggcttccagcagagcaaa gtagggcgtcatcggtcatgccaggcgggacaggtagcgggcgagggcgccagcttggggtccacattata gaaaccacggggctcgcaaggaaagtaattcgcacgccagtgaccggtcacgtatgccccaccgggaaggtc ggatggttcgaggcaagcacttgcctacgccaggcgcgcatcacttccgcatgcctaccgggtgggatgtagg acttgccttattcatccagccagca	30

【表 3】

蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) O D C a s e アミノ酸配列

Met Ser Val Cys Gln Thr Pro Ile Ile Val Ala Leu Asp Tyr Pro Thr Arg Asp Ala Ala Leu Lys Leu Ala Asp Gln Leu Asp Pro Lys Leu Cys Arg Val Lys Val Gly Lys Glu Leu Phe Thr Ser Cys Ala Ala Glu Ile Val Gly Thr Leu Arg Asp Lys Gly Phe Glu Val Phe Leu Asp Leu Lys Phe His Asp Ile Pro Asn Thr Thr Ala Met Ala Val Lys Ala Ala Ala Glu Met Gly Val Trp Met Val Asn Val His Cys Ser Gly Gly Leu Arg Met Met Ser Ala Cys Arg Glu Val Leu Glu Gln Arg Ser Gly Pro Lys Pro Leu Leu Ile Gly Val Thr Val Leu Thr Ser Met Glu Arg Glu Asp Leu Ala Gly Ile Gly Leu Asp Ile Glu Pro Gln Val Gln Val Leu Arg Leu Ala Ala Leu Ala Gln Lys Ala Gly Leu Asp Gly Leu Val Cys Ser Ala Leu Glu Ala Gln Ala Leu Lys Asn Ala His Pro Ser Leu Gln Leu Val Thr Pro Gly Ile Arg Pro Thr Gly Ser Ala Gln Asp Asp Gln Arg Arg Ile Leu Thr Pro Arg Gln Ala Leu Asp Ala Gly Ser Asp Tyr Leu Val Ile Gly Arg Pro Ile Ser Gln Ala Ala Asp Pro Ala Lys Ala Leu Ala Ala Val Val Ala Glu Ile Ala	配列 番号 2
---	------------

10

【表 4】

蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) p y r F 核酸配列

atgtcgtctgtccagactcctatcatcgtcgccctggattacccccccgtgacgcccactgaag ctggtgaccagttggacccaagctttgccgggtcaaggtcggaaggaattgttcaccagttgc gcgccggaaatcgtcgccaccctgcccggacaaaggcttcgaagtgttcctcgacctcaaattccat gacatcccccaacaccacggcgatggccgtcaaagccgcccagatgggctgttgatggtcaat gtgactgctcgggtggcctgcccgtgatgagcgccctgcccgaagtgtggaacagcgagcggc cccaaacgcttgttgatcgccgtgaccgtgctcaccagcatggagcggaagacctggcgggcat ggcctggatatcgagccgaggtgcaagtgttgcgcctggcagccctggcgcagaaagccggcctc gacggcctgggtgtgctcagccctggaagcccagccctgaaaaacgcacatccgtcgctgcaactg gtgacaccgggtatccgtcctaccggcagcgcccaggtgaccagcgccgtatcctgaccccgcc caggccctggatgcccgtctgactacctggtgatcgccggcgatcagccaggcgccggatcct gcanaagcgttggcagcggtcgtcgccgagatcgc	配列 番号 3
---	------------

20

## 【0121】

代替的な実施形態において、本発明による発現系は、t h y A 栄養要求性選択マーカー遺伝子を利用する。t h y A 遺伝子は、細菌ピリミジンヌクレオチド生合成経路に必要な酵素の、チミジラートシンターゼ (EC 2.1.1.45) をコードする。DNA はウラシルの代わりにチミン (5 - メチルウラシル) を主要な塩基として含有するため、チミジンモノホスフェート (d T M P またはチミジラート) の合成は、d A T P、d G T P、および d C T P と共に、DNA 複製に必要な d T T P (チミジントリホスフェート) を供給するために不可欠である。5, 10 - メチレンテトラヒドロフォラートをメチル基源として利用する、チミジラートシンターゼによる d U M P のメチル化は、チミジラートを生成する。チミジラートシンターゼの除去、阻害、または破壊によって、チミジラート合成を中断、そして続いての DNA の合成を停止させ得る。

30

## 【0122】

t h y A 遺伝子が不活性化または消失する、あるいは非機能性酵素をコードするように変異される細菌において、外来性チミジンが培地に添加されるならば、細胞はなお増殖し得る。

40

## 【0123】

蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) において、外来性チミジンでの生存のためには、チミジンキナーゼをコードする大腸菌 (*E. coli*) t d k 遺伝子の添加が必要である。したがって選択の前に、t d k 遺伝子を含むプラスミドを使用して t h y A ( - ) 蛍光菌 (*P. fluorescens*) 宿主細胞を形質導入して、t h y A ( - ) / p t d k 細胞を産生させて、チミジン含有培地での生存を可能にし得る。あるいは、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) において外来性チミジンを利用し得る機能性チミジラートシンターゼ酵素を生成する

50





【表 6】

蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) TS アミノ酸配列

MKQYLELLNDVVTNGLTKGDRGTGTGTRAVFARQYRHLADGFPLLTTKKLHFKSIANELIWMLSG NTNIKWLNENGVKIWDEWATEDGDLGPFVYGEQWTAWPTKDGGKINQIDYMVHTLKTNPNSRRILF HGWNVEYLPDETKSPQENARNGKQALPPCHLLYQAFVHDGHLMSQLYIRSSDVFLGLPYNTAALA LLTHMLAQOCDLIPHEIIVTTGDTTHAYSNNHMEQIRTQLARTPKKLPELVIKRKPASIYDYKFEDF EIVGYDADPSIKADVAI	配列番号 5
--	--------

## 【0127】

## 生合成アミノ酸選択マーカー

代替的な実施形態において、栄養要求性選択マーカーとして選択された、同化代謝に関する生合成酵素は、アミノ酸の生合成ものから選択され得る。特定の実施形態において、生合成アミノ酸酵は：グルタメートファミリー（Glu；Gln、Pro、およびArg）；アスパルテートファミリー（Asp；Asn、Met、Thr、Lys、およびIle）；セリンファミリー（Ser；GlyおよびCys）；ピルベートファミリー（Ala、Val、およびLeu）；芳香族ファミリー（Trp、Phe、およびTyr）；およびヒスチジンファミリー（His）の生合成にて活性な酵素からなる群から選択される。これらの生合成経路に関連する遺伝子および酵素の例は：例えば、argA - argH、gdhA、glnA、proA、proCを含む、グルタメートファミリー構成要素arg、gdh、gln、およびpro遺伝子；例えば、asnA、asnB、aspC、dapA、dapB、dapD - dapF、lysA、lysC、metA - metC、metE、metH、metL、thrA - thrCを含む、アスパルテートファミリー構成要素asd、asn、asp、dap、lys、met、およびthr遺伝子；例えば、cysE、cysK、glyA、serA - serCを含む、セリンファミリー構成要素cys、gly、およびser遺伝子；例えば、aroA - aroH、aroK、aroL、trpA trpE、tyrA、およびtyrBを含む、芳香族ファミリー構成要素aro、phe、trp、およびtyr遺伝子；ならびにhisA - hisD、hisF - hisHを含む、ヒスチジンファミリー構成要素his遺伝子を含む。

## 【0128】

さらに特定の実施形態において、栄養要求性選択マーカーは、グルタメートファミリーの構成要素の生合成に関連する酵素から選択され得る。有用なグルタメートファミリー栄養要求性選択マーカーの例は、そのコード遺伝子の代表的な例と共に挙げた以下：N - アセチルグルタメートシンターゼ、アミノ酸アセチルトランスフェラーゼをコードする、argA；アセチルグルタメートキナーゼをコードする、argB；N - アセチル - ガンマグルタミルホスフェートレダクターゼをコードする、argC；アセチルオルニチンデルタ - アミノトランスフェラーゼをコードする、argD；アセチルオルニチンデアセチラーゼをコードする、argE；オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼをコードする、argFおよびargI；アルギニンスクシナートシンセターゼをコードする、argG；アルギニノスクシナートリアーゼをコードする、argH；グルタメートデヒドロゲナーゼをコードする、gdhA；グルタミンシンセターゼをコードする、glnA；ガンマグルタミルホスフェートレダクターゼをコードする、proA；ガンマグルタメートキナーゼをコードする、proB；およびピロリン - 5 - カルボキシラートレダクターゼをコードするproCを含む。

## 【0129】

1つの実施形態において、アミノ酸生合成選択マーカー遺伝子は、プロリン生合成ファミリーの少なくとも1つの構成要素、例えば、proA、proB、またはproCでありうる。特定の実施形態において、プロリン生合成選択マーカー遺伝子は、proC遺伝子を含みうる。proC遺伝子は、プロリン生合成経路の最終ステップを触媒する酵素をコードする。細菌では、プロリン（すなわちL - プロリン）生合成経路は、L - グルタミン酸で始まる3つの酵素プロセスを含む。このプロセスのステップは：1）proBによってコードされるグルタメート - 5 - キナーゼ（「GK」；EC 2.7.2.11）による、L -

10

20

30

40

50

グルタミン酸の L - グルタミル - 5 - ホスフェートへの変換 ; 次に 2 a ) proA によってコードされるグルタミル - 5 - ホスフェートレダクターゼ ( 「 G P R 」 ) としても公知の、グルタメート - 5 - セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ ( EC 1.2.1.41 ) による、その L - グルタメート - 5 - セミアルデヒドへの変換、続いて 2 b ) <sup>1</sup> - ピロリン - 5 - カルボキシラートを生成するための、その自発的環化 ; および次に 3 ) p r o C によってコードされる <sup>1</sup> - ピロリン - 5 - カルボキシラートレダクターゼ ( 「 P 5 C R 」 ; EC 1.5.1.2 ) による、その L - プロリンへの変換を含む。ほとんどの細菌では、p r o C は P 5 C R サブユニットをコードし、活性 P 5 C R 酵素は、そのホモマルチマーである。

#### 【 0 1 3 0 】

p r o A、p r o B、または p r o C 遺伝子の 1 つまたはそれ以上が不活性化または消失する、あるいは非機能性酵素をコードするように変異される細菌において、プロリンが培地に添加されるならば、細胞はなお増殖し得る。結果として、p r o C ( - ) シュードモナス ( Pseudomonad ) または関連細胞は、プロリン含有培地上で維持され得る。p r o C 遺伝子含有 DNA 構築物を p r o C ( - ) 細胞にトランスフェクションし、発現させて機能性 P 5 C R 酵素を生成した後に、得られた組み合わせた p r o C ( + ) プラスミド - 宿主細胞系は、プロリン欠乏培地中で維持され得る。

#### 【 0 1 3 1 】

シュードモナス ( Pseudomonad ) または関連宿主細胞で使用するための p r o C 遺伝子のコード配列は、機能性 P 5 C R を生成するために選択されたシュードモナス ( Pseudomonad ) または関連宿主細胞によってコード配列が転写、翻訳、そしてそうでなければ処理されるという条件で、<sup>1</sup> - ピロリン - 5 - カルボキシラートレダクターゼ酵素 ( P 5 C R ) をコードするいずれの遺伝子によっても供給され得る。p r o C をコードする配列は天然の配列であるか、または、例えば、当該分野で公知の 1 つまたはそれ以上の配列変更、配列結合、および / または配列生成技術の利用から生じた操作配列である。p r o C 選択マーカー遺伝子の一部として使用する前に、選択したコード配列を選択したシュードモナス ( Pseudomonad ) または関連宿主細胞の遺伝子コードおよび / またはコドン使用頻度に従って最初に改良または最適化され得る。発現可能なコード配列は、選択した宿主細胞内で機能し得る転写プロモーター、ならびに他の必要な転写および翻訳調節要素すべてに作動可能に結合される。p r o C 遺伝子の天然のコード配列は、それが上記の要件を満足するという条件で、細菌から、または他の任意の生物から入手され得る。

#### 【 0 1 3 2 】

1 つの実施形態において、p r o C をコードする配列は、選択マーカーとして使用されることが意図されているシュードモナス ( Pseudomonad ) または関連宿主細胞から単離される。p r o C 遺伝子全体 ( コード配列および周囲の調節領域を含む ) は、そこから単離され得る。特定の実施形態において、p r o C 遺伝子またはコード配列を提供する細菌は、シュードモナス目 ( Pseudomonadales ) の構成要素、シュードモナス亜目 ( Pseudomonadineae ) の構成要素、シュードモナダセア科 ( Pseudomonadaceae ) の構成要素、シュードモナス族 ( Pseudomonadeae ) の構成要素、シュードモナス属 ( Pseudomonas ) の構成要素、および蛍光菌 ( Pseudomonas fluorescens ) 種群の構成要素 ( すなわち 「 フルオレッセント・シュードモナズ 」 ) からなる群から選択される。特定の実施形態において、細菌は、種蛍光菌 ( Pseudomonas fluorescens ) に属する。

#### 【 0 1 3 3 】

特定の実施形態において、p r o C 遺伝子は、配列番号 6 の核酸配列 ( 表 7 )、またはその変異体を含む。あるいは、p r o C 遺伝子によってコードされる P 5 C R は、本発明による所与の宿主細胞によって使用される遺伝子コードに従って、配列番号 7 のアミノ酸配列 ( 表 8 )、その変異体、またはそれと重複するコドン配列を有する変異体を含む。

#### 【 0 1 3 4 】

あるいは、p r o C 遺伝子は、配列番号 6 に対して少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、88 %、90 %、および 95 % 相同である P 5 C R 酵素をコードする核酸配列

10

20

30

40

50

を含有する。同様に p r o C 遺伝子は、配列番号 7 に対して少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、88 %、90 %、および 95 % 相同である O D C a s e をコードする。

【0135】

別の実施形態において、p r o C 遺伝子は、配列番号 8 のヌクレオチド配列（表 9）に対して少なくとも 90 %、93 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % 相同であるコード配列を含有し得る。

【0136】

特定の実施形態において、p r o C 遺伝子は、ハイブリダイゼーションがストリンジェントな条件下で実施されたときに、配列番号 8 のアンチコドン配列にハイブリダイズするコドン配列を有するコード配列を含有し得るか、またはそれと重複するコドン配列を有し得る。特に特定の実施形態において、p r o C 遺伝子は配列番号 8 のヌクレオチド配列を含有する。

【表 7】

蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) p r o C 核酸配列

gcccttgagttggcacttcacggcccatcgaacaagactgtgccatgccgagcactcgttgggt gcactccgtggaccgctgaaatcgcaacgcctgtccgaacaacgccggcgacgtccgcccgtca atatctgcatccaggtaaatgtcagtgccgaagccagcaagtcgggtgcacgccgctgacgtccggccct ggccacagcgatcagcgccctgcgcgttgaagctgcgggctgatggcgattcccgagccgacgcaag accggggcgagcaggatgcggcgttcgccaggtgcgcgacttgcaagccagctgaacctggcgctggac acactttccatgggcatgagccacgacctgagtcggccattgcccaaggccacctgggtgcggatcggtta ccgccctgtttggcgcccgactacggccagccgtgaaatggctgacatccctgaaataaggacctgtcat gagcaacacgcgtattgcctttatcgccgcggtaacatggcggccagcctgacgggtgcctcggggcaa ggccctggagccgagcagatccgcccagcgacccgggtgccgaaacccgcgagcgctcagagccga acacggtatccagaccttcgccgataacgccgagccatccacggcgtcgtatgtatcgtgctggcggtcaag cccagggccatgaaggcgtgtgcgagagcctgagcccgagcctgcaacccatcaactgggtggtgcgatt gccgctggcatcacctgcgccagcatgaccaactggctcgggtgccagccattgtcgctgcatgcccaaca cccggcgctgctgcgccagggcgtagcggtttgtatgccactggcgaaatcaccgcgagcaacgtgacc agggccaggaactgctgtcgggtgggcatcgccgtgtggtcggagcaggaacagcaactggatgcggtc accgccgtctccggcagcgccggcgttacttctctgttgatcgaggccatgacggccgagggcgtaagc tgggcctgccccacgacgtggccgagcaactggcggaacaacccgcctggcgccgccaagatggcggt cggcagcgaggtggatccgcggaactgcgccgtcgcgtcacctgccaggtggtaacacacaagcggtta ttgagtcgtccagggcggggcttgaagccctgttggaacagcactgggtgcccgccacatcgttcagc cgagatggctgagcaactgggcaaatagtcgtcccttccaaggtaatcaaatgctcgaatcaatgacgt gccatttcatcatccagacctggggcagcctgtacctgtatcgtactgatcgctttatcctgcaactggtgc gtgcgaacttctacaacccgctgtgccagttcgtggtgaaggccaccaacccgtgctcaagccgctgcgccg ggtgatccgagcctgttcggcctggacatgtcgtcgtggtcgtgctgttgcgcagattttgtgtcgtg gtgatcctgatgtcaatggataccagggccttaccgtgctgctgttgcctgggctgatcgggattttcgc tgttctgaagatcattttctgtgatgatcatcagcgtgatcctgtcctgggtgcaccgggtagccgtagccc gggtgccgaattggtggctcagatcaccgagccggtgctggcaccccttcgtcgctgattccgaacctgggt ggctggatactcggcgtcttcgcgtttatc	配列 番号 6
--	------------

10

20

30

【表 8】

## 蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) P 5 C R アミノ酸配列

Met Ser Asn Thr Arg Ile Ala Phe Ile Gly Ala Gly Asn Met Ala Ala Ser Leu Ile Gly Gly Leu Arg Ala Lys Gly Leu Asp Ala Glu Gln Ile Arg Ala Ser Asp Pro Gly Ala Glu Thr Arg Glu Arg Val Arg Ala Glu His Gly Ile Gln Thr Phe	配列 番号 7
Ala Asp Asn Ala Glu Ala Ile His Gly Val Asp Val Ile Val Leu Ala Val Lys Pro Gln Ala Met Lys Ala Val Cys Glu Ser Leu Ser Pro Ser Leu Gln Pro His Gln Leu Val Val Ser Ile Ala Ala Gly Ile Thr Cys Ala Ser Met Thr Asn Trp Leu Gly Ala Gln Pro Ile Val Arg Cys Met Pro Asn Thr Pro Ala Leu Leu Arg Gln Gly Val Ser Gly Leu Tyr Ala Thr Gly Glu Val Thr Ala Gln Gln Arg Asp Gln Ala Gln Glu Leu Leu Ser Ala Val Gly Ile Ala Val Trp Leu Glu Gln Glu Gln Glu Leu Asp Ala Val Thr Ala Val Ser Gly Ser Gly Pro Ala Tyr Phe Phe Leu Leu Ile Glu Ala Met Thr Ala Ala Gly Val Lys Leu Gly Leu Pro His Asp Val Ala Glu Gln Leu Ala Glu Gln Thr Ala Leu Gly Ala Ala Lys Met Ala Val Gly Ser Glu Val Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Val Thr Ser Pro Gly Gly Thr Thr Gln Ala Ala Ile Glu Ser Phe Gln Ala Gly Gly Phe Glu Ala Leu Val Glu Thr Ala Leu Gly Ala Ala Ala His Arg Ser Ala Glu Met Ala Glu Gln Leu Gly Lys	

10

【表 9】

## 蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) p r o C 核酸配列

atgagcaacacggtattgcttttatcgccgcccgttaacatggcggccagcctgatcggtggc ctcggggccaagggcctggacgcccagcagatccgcgccagcgacccccggtgcccgaacccgc gagcgctcagagccgaacacggtatccagacctcgccgataacgcccaggccatccacggc gtcgatgtgatcgctgctggcggtcaagccccagccatgaaggccgtgtgagagagcctgagc ccgagcctgcaaccccatcaactggtggtgctgattgcccgtggcatcactgcccagcatg accaactggctcggtgcccagccattgtgctgcatgcccacaccccggtgctgctgctg cagggcgctcagcggtttgtatgccactggcgaagtcacccgcgcagcaacgtgaccagggccag gaactgctgtctcggtgggcatcgccgtgtggtggagcaggaacagcaactggatgctgctc accgcgctctccggcagcgcccggttacttcttctggtgatcgagccatgacggccgca ggcgtcaagctgggctgccccacgacgtggccgagcaactggcgggaacaaaccgcccgggc gcccgaagatggcggtcgccagcgaggtggatgccgccgaactgcccgtcgctcaactcg ccaggtggtaccacacagcggtattgagtcgttccagccgggggctttgaagccctggtg gaacacgactgggtgcccgcgcacatcggttcagccgagatgggtgagcaactgggcaaa	配列 番号 8
---	------------

30

【 0 1 3 7 】

## 選択マーカーの利用

1つの実施形態において、代謝産物の異化利用に関与する酵素は、栄養要求性選択マーカーとして選択され得る。特に酵素は、炭素源の利用に関与するものから選択され得る。そのような酵素の例は、例えば、スクラーゼ、ラクターゼ、マルターゼ、デンプン異化酵素、グリコーゲン異化酵素、セルラーゼ、およびポリ(ヒドロキシアルカノート)デポリメラーゼを含む。細菌宿主細胞が選択した型の天然の異化活性を示す場合、原栄養回復(protothrophy restoring)ベクターによる形質転換前にロックアウトされ得る。これらの化合物に対して天然の栄養要求性を示す細菌も、その形質転換のための天然の状態で使用され得る。細胞内へ移入または拡散できない化合物が選択され、培地に添加されるこれらの実施形態において、原栄養回復(protothrophy restoring)または原栄養可能(protothrophy-enabling)酵素が使用されるために分泌され得る。そのような場合、分泌された酵素は、選択した宿主細胞内で作用する分泌シグナルペプチドのためのコード配列を含むように酵素のコード配列を選択または設計することによって、化合物を細胞外で分解して、細胞内に拡散または移入可能であるより小さい化合物、例えば、グルコースを生成し得る。このような実施形態では、原栄養回復(protothrophy-restorative)遺伝子は、細胞膜を介した酵素の運搬を達成するために、選択した宿主細胞内で作用する分泌シグナルペプチドのためのコード配列を含むように選択または操作され得る。これらの実施形態、または選択した化合物が細胞内に移入または拡散可能である実施形態のいずれかで、細胞は、選択した化合物は別として、他の炭素源を供給しない培地中で増殖する。

40

50

## 【 0 1 3 8 】

炭素源利用ベースマーカー系において、各原栄養回復 (prototrophy-restorative) または原栄養可能 (prototrophy-enabling) 炭素源利用酵素は、ただ 1 つの炭素源の利用に  
関与し得る。例えば、同じ異化経路からの 2 つの遺伝子を、1 つのベクター上で共に発現  
させたり、または別のベクター上で別個に同時発現させたりして、原栄養性を提供する。  
そのような多遺伝子炭素源利用ベースマーカー系の特定の例は、例えば、グリコーゲンホ  
スホリラーゼおよび (アルファ - 1 , 4 ) グルカントランスフェラーゼの両方のトランス  
ジェニック発現による、唯一の炭素源としてのグリコーゲンの使用 ; ならびにアルファ -  
アミラーゼ、およびアルファ ( 1 6 ) グルコシダーゼの両方のトランスジェニック発現  
による、唯一の炭素源としてのデンプンの使用を含む。しかしながら、選択した単遺伝子  
または多遺伝子炭素源マーカー系は、細胞に供給された唯一の炭素源が炭素源異化選択マ  
ーカー系で使用するために選択された化合物であるという条件で、同じ宿主細胞内で他の  
種類のマーカー系と同時に使用され得る。

10

## 【 0 1 3 9 】

生化学利用型活性に有用な酵素の他の例は、当該分野で周知であり、細胞に供給された  
有用でない D - 炭素源を栄養性の L - 炭素源に供給し得るラセマーゼおよびエピマラーゼ  
を含み得る。これらの系の例は、例えば、 : 対応するラセマーゼのトランスジェニック発  
現によって使用された D - 酸または D - アシル化合物 ; およびトランスジェニック発現さ  
れたラクテートラセマーゼによって使用されたラクテートを含む。

20

## 【 0 1 4 0 】

同様に、マーカー系で使用するためにアミノ酸生合成活性が選択されている場合、栄養  
要求性は、細胞に、R - アミノ酸を、細胞が栄養要求性である対応する L - アミノ酸に変  
換する利用不可 R - アミノ酸および R - アミノ酸ラセマーゼまたはエピマラーゼ ( EC 5.1  
.1 ) の両方を供給することによっても克服し得る。

## 【 0 1 4 1 】

## 形質スタッキング

本発明による、標的遺伝子発現のための栄養要求性選択マーカー遺伝子の挿入の前後に  
、複数の表現型変化を宿主細胞に対して行い得る。例えば、細胞は、種々の増強された表  
現型形質を示すために、同時に、または連続的に遺伝子改変され得る。このプロセスは、  
「形質スタッキング」と呼ばれる。p r y F 欠失は、1 つのそのような表現型形質として  
存在し得る。そのような菌株において、本発明による p y r F 遺伝子は、他の所望の形質  
のクロスイン ( across-in ) / クロスアウト ( cross-out ) 対立遺伝子交換を行うために、  
自殺ベクター上で選択マーカーおよび対抗選択マーカーの両方として ( 5 ' - フルオロオ  
ロチン酸の存在下で ) 使用され得る。したがって本発明による p y r F 遺伝子は、宿主細胞  
を「形質スタッキングする」プロセスで使用され得る。そのようなプロセスでは、その  
ような p y r F 遺伝子を含有する自殺ベクターを複数の別個の形質転換において宿主細胞  
菌株に形質転換し得る ; そのような各手順では、p y r F 表現型の再確立を使用して、次  
の遺伝的に強化された ( genetically-enhancing ) 表現型変化を無限に作製し得る。した  
がって、p y r F 遺伝子自体は形質を提供され得るだけでなく、形質スタッキングのプロ  
セスでさらなる表現型形質を得るために使用され得る。

30

40

## 【 0 1 4 2 】

1 つの実施形態において、本発明は、追加の栄養要求株を誘導するためにさらに遺伝子  
改変された栄養要求性シュードモナス ( Pseudomonads ) および関連細菌を提供する。例え  
ば、p y r F ( - ) 栄養要求株は、例えば、p r o C 遺伝子または t h y A 遺伝子の不活  
性化を通じて、同化または異化経路に存在する別の生合成酵素を不活性化するためにさら  
に改変され得る。このようにして、宿主細胞中に複数の栄養要求株を産生し得る。

## 【 0 1 4 3 】

別の実施形態において、宿主細胞での組換えポリペプチドの発現を改良するために、宿  
主細胞に遺伝子改変を行い得る。さらなる改変は、特定の炭素源のさらに効率的な利用を  
可能にし、それにより発酵全体の全効率を最適化する遺伝子改変を含み得る。

50

## 【0144】

1つの特定の実施形態において、栄養要求性宿主細胞は、lacI含有導入遺伝子の宿主染色体への挿入によってさらに改変される。好ましくはlacI導入遺伝子、またはその誘導体は、完全または切断PlacI-lacI-lacZYA構築物の一部以外である。

## 【0145】

栄養要求株を誘導するための改変

本発明による発現系で使用するために選択されたシュードモナス(Pseudomonas)または関連宿主細胞は、選択した栄養要求性活性を示す、任意の機能性生体触媒を発現するその能力を欠損していてもよい。例えば、オロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ活性を選択した場合、宿主細胞はa)任意のpyrF遺伝子産物(すなわち任意の機能性ODCase酵素)、およびb)したがって、任意の有効な置換(すなわちODCase活性を有する他の生体触媒)を発現するその能力が欠損していてもよい。1つの実施形態において、宿主細胞は、標的栄養要求株に関与する機能性酵素(すなわちODCase)を発現できないようにするために、そのゲノム遺伝子を改変することによって、選択した活性が生体触媒によって不足するようにされる。言い換えれば、原栄養細胞(活性(+))細胞は、標的原栄養経路に関与する機能性酵素をコードする遺伝子の「ノックアウト」によって栄養要求株となる(すなわち活性(-))細胞)。この改変は、選択した活性をコードする遺伝子の細胞ゲノムコード配列を改変することによって行える。1つの実施形態において、コード配列改変は：コード配列読み枠を変化させる挿入または欠失変異；十分な数のコドンを変換する置換または反転変異；および/またはそこから非機能性酵素を産生し得る近接コドンの十分に大きな群を欠失させる欠失変異を導入することによって実施され得る。

## 【0146】

宿主細胞菌株がその中の選択マーカーとして使用するために栄養要求性遺伝子を提供した1つの実施形態において、好ましくは選択された遺伝子の転写プロモーターおよび/または転写ターミネーター要素はそれぞれ、欠失変異を含む変異の導入によって非活性化され得る。例えば、転写要素不活性化は場合により、上記のコード配列改変に加えて実施され得る。宿主細胞菌株がまた栄養要求性選択マーカー遺伝子を提供した1つの実施形態において、選択した遺伝子のDNAすべてを宿主細胞ゲノムから欠失させ得る。

## 【0147】

そのようなノックアウト菌株は、当該分野で有効であるとして公知の種々の方法のいずれかに従って調製され得る。例えば、所望の核酸欠失配列の相同標的遺伝子配列5'および3'を含有する相同組換えベクターを宿主細胞へ形質転換し得る。理想的には、相同組換え時に、所望の標的酵素遺伝子ノックアウトを産生し得る。

## 【0148】

遺伝子ノックアウト方法の特定の例は、例えば、：以前に記載されたポリヌクレオチドの挿入による遺伝子活性化を含む。例えば、DL Roeder & A Collier, Marker-exchange mutagenesis of a pectate lyase isozyme gene in Erwinia chrysanthemi, J Bacteriol. 164(1) : 51-56 (1985)を含む。あるいは、所望の表現型のためのトランスポゾン突然変異誘発および選択(例えば、ベンゾアートまたはアントラニートを代謝できないこと)を使用して、標的遺伝子が挿入によって不活性化された細菌株を単離し得る。例えば、K Nida & PP Cleary, Insertional inactivation of streptolysin S expression in Streptococcus pyogenes, J Bacteriol. 155 (3): 1156-61(1983)を参照。特定の遺伝子における特定の突然変異または欠失は、例えば、JA Wells et al., Cassette mutagenesis : an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, Gene 34 (2-3) : 315-23(1985)に記載されているように、カセット突然変異誘導を使用して作製し得る；それにより直接またはランダム変異は、遺伝子の選択した部分に行われ、次に相同組換えによる遺伝子の染色体コピー内へ包含させる。

## 【0149】

1つの実施形態において、選択マーカー遺伝子が得られる生物および選択マーカー遺伝子が利用される宿主細胞の両方は、原核生物から選択され得る。特定の実施形態において、選択マーカー遺伝子が得られる生物および選択マーカー遺伝子が利用される宿主細胞の両方が細菌から選択され得る。別の実施形態において、選択マーカー遺伝子が得られる細菌および選択マーカー遺伝子が利用される細菌宿主細胞の両方がプロテオバクテリアから選択される。なお別の実施形態において、選択マーカー遺伝子が得られる細菌および選択マーカー遺伝子が利用される細菌宿主細胞の両方が以下で定義されるように、シュードモナス (Pseudomonads) および密接に関連する細菌から、またはそのサブグループから選択され得る。

【0150】

10

特定の実施形態において、選択マーカー遺伝子源生物および宿主細胞の両方を同じ種から選択し得る。好ましくは、種は、原核生物；より好ましくは細菌、なおより好ましくはプロテオバクテリウムである。別の特定の実施形態において、選択マーカー遺伝子源生物および宿主細胞の両方が、以下で定義するようにシュードモナス (Pseudomonads) および密接に関連付けられる細菌から、またはそのサブグループから選択される属の同じ種から選択され得る。1つの実施形態において、選択マーカー遺伝子源生物および宿主細胞の両方が、シュードモナス (Pseudomonas) 俗の種、特に蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 種、そして好ましくは蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) バイオタイプ A 種から選択され得る。

【0151】

20

III. LACI 挿入

本発明は、完全または切断 P l a c - l a c I - l a c Z Y A オペロンの一部として以外の、染色体挿入 l a c I 導入遺伝子または誘導体を含有するように遺伝子改変されたシュードモナス (Pseudomonads) および関連細胞を提供する。1つの実施形態において、l a c I インサートは、ベクター上の l a c O 配列または誘導体を結合して、ベクター上の P l a c - P t a c ファミリープロモーターを阻害する、L a c I リプレッサータンパク質の発現によって厳密な発現ベクター制御を提供する。結果は、誘導前の組換えポリペプチド発現の低下した基底レベルである。

【0152】

1つの実施形態において、天然の大腸菌 (E.coli) l a c I 遺伝子の、または l a c I 遺伝子誘導体、例えば、l a c I<sup>Q</sup>または l a c I<sup>Q1</sup>の染色体挿入を含有するシュードモナス (Pseudomonad) 宿主細胞が提供され、l a c I インサートは、完全または切断構造遺伝子含有 P l a c I - l a c I - l a c Z Y A 構築物以外である。本発明で有用な他の誘導体 l a c I 導入遺伝子は；天然の l a c I 遺伝子とは異なる改変コドン配列を有する l a c I 誘導体（例えば、天然の大腸菌 (E.coli) l a c I 遺伝子は「g t g」開始コドンを含む、これは選択した発現宿主細胞での翻訳開始に有効な代替りの開始コドン、例えば、「a t g」によって置換される）；標的遺伝子誘導を達成するために温度の変化、例えば、42℃まで変化に反応する、温度感受性 l a c I ミュータント、例えば、l a c I t s（または「l a c I (T s)」）によってコードされるものを含む、変異アミノ酸配列を有する L a c I タンパク質をコードする l a c I 誘導体（例えば、Bukrinsky et al., Gene 70:415-17(1989); N Hasan & W Szybalski, Gene 163(1):35-40(1995); H Adari et al., DNA cell Biol. 14:945-50(1995)を参照）；誘導を達成するためにラクトース以外の代替りの糖、例えば、アラビノース、リボース、またはガラクトースの存在に反応する L a c I ミュータント（例えば、WO 99/27108 for Lac Repressor Proteins with Altered Responsivityを参照）；および少なくとも l a c オペレーターに対する野生型結合を示すが、インデューサ（例えば、IPTG）に対しては向上した感受性を示す、または l a c オペレーターに対しては向上した結合を示すが、少なくとも野生型脱抑制性を示す、L a c I ミュータント（例えば、L Swint-Kruse et al., Biochemistry 42(47):14004-16(2003)を参照）を含む。

【0153】

50

特定の実施形態において、染色体に挿入された *Lac* リプレッサータンパク質をコードする遺伝子は、天然の大腸菌 (*E. coli*) *Lac I* 遺伝子のそれと同一であり、配列番号 9 の核酸配列 (表 10) を有する。別の実施形態において、宿主染色体に挿入された遺伝子は、配列番号 10 のアミノ酸配列 (表 11) を有する *Lac* リプレッサータンパク質をコードする。

【表 10】

天然の大腸菌 (*E. coli*) *LAC I* 遺伝子の核酸配列

Gacaccatcgaatggcgcaaaccttttcgcggtatggcatgatagcgcccggaagagagtca attcaggggtggtgaatgtgaaccagtaacggttatcagatgtcgcagagtatgccggtgtct cttatcagacggtttcccgcggtggtgaaccaggccagccacgtttctcgcaaacgcgggaa aaagtgggaagcggcgatggcgagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggc gggcaaacagtcggttgcgtgattggcggtgccacctccagtcctggccctgcacgcgcgtcgc aaattgtcgcgcggttaaatctcgcgcgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatg gtagaacgaagcggcgatgaagcgtgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgt cagtggtggtgatattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgct gcactaatgttccggcggttatcttctgtatgtctctgaccagacacccatcaacagttatt ttctcccatgaagacgggtacgcgactggcggtggagcatctggtgcattgggtcaccagca aatcgcgctgttagcgggccattagttctgtctcgcgcggtctgcgtctggtggtggtggt ataaatatctcactcgcaatcaaatcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgcc atgtccgggttttcaacaacacatgcaaatgctgaatgagggcatcggttccactgcgatgct ggttgcaacgatcagatggcggtggcggaatgcgcgcattaccagtcggtcggcggtgcgcg ttggtgcggatctcgcgtatgggatcgcgcataccgaagacagctcatgttatatcccg ccgtcaaccaccatcaaacaggattttcgccctgctggggcaaacagcgtggaccgcttgct gcaactctctcagggccagcggtgaagggaatcagctggttgcgcgtctcactggtgaaaa gaaaaaccacccctggcgcccaatacgcgaacccctctcccgcgcggttggcggttcatta atgcagctggcagcaggtttcccgactggaaagcggcgagtgagcgcaacgcaattaatg tgagtagctcactcattagggcaccacaggtttacactttatgcttccggctcgtatgttg tgtgaattgtgagcggtatacaaatctcacacaggaacagctatgaccatgattacggatt cactggcgctcggttttacaacgctcgta	配列番号 9
---	--------

10

20

【表 11】

*LAC I* リプレッサーのアミノ酸配列

Met Lys Pro Val Thr Leu Tyr Asp Val Ala Glu Tyr Ala Gly Val Ser Tyr Gln Thr Val Ser Arg Val Val Asn Gln Ala Ser His Val Ser Ala Lys Thr Arg Glu Lys Val Glu Ala Ala Met Ala Glu Leu Asn Tyr Ile Pro Asn Arg Val Ala Gln Gln Leu Ala Gly Lys Gln Ser Leu Leu Ile Gly Val Ala Thr Ser Ser Leu Ala Leu His Ala Pro Ser Gln Ile Val Ala Ala Ile Lys Ser Arg Ala Asp Gln Leu Gly Ala Ser Val Val Val Ser Met Val Glu Arg Ser Gly Val Glu Ala Cys Lys Ala Ala Val His Asn Leu Leu Ala Gln Arg Val Ser Gly Leu Ile Ile Asn Tyr Pro Leu Asp Asp Gln Asp Ala Ile Ala Val Glu Ala Ala Cys Thr Asn Val Pro Ala Leu Phe Leu Asp Val Ser Asp Gln Thr Pro Ile Asn Ser Ile Phe Ser His Glu Asp Gly Thr Arg Leu Gly Val Glu His Leu Val Ala Leu Gly His Gln Gln Ile Ala Leu Leu Ala Gly Pro Leu Ser Ser Val Ser Ala Arg Leu Arg Leu Ala Gly Trp His Lys Tyr Leu Thr Arg Asn Gln Ile Gln Pro Ile Ala Glu Arg Glu Gly Asp Trp Ser Ala Met Ser Gly Phe Gln Gln Thr Met Gln Met Leu Asn Glu Gly Ile Val Pro Thr Ala Met Leu Val Ala Asn Asp Gln Met Ala Leu Gly Ala Met Arg Ala Ile Thr Glu Ser Gly Leu Arg Val Gly Ala Asp Ile Ser Val Val Gly Tyr Asp Asp Thr Glu Asp Ser Ser Cys Tyr Ile Pro Pro Ser Thr Thr Ile Lys Gln Asp Phe Arg Leu Leu Gly Gln Thr Ser Val Asp Arg Leu Leu Gln Leu Ser Gln Gly Gln Ala Val Lys Gly Asn Gln Leu Leu Pro Val Ser Leu Val Lys Arg Lys Thr Thr Leu Ala Pro Asn Thr Gln Thr Ala Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asp Ser Leu Met Gln Leu Ala Arg Gln Val Ser Arg Leu Glu Ser Gly Gln	配列番号 10
--	---------

30

40

【0154】

代替的な実施形態において、挿入された *Lac I* 導入遺伝子は、天然の大腸菌 (*E. coli*) *Lac I* 遺伝子の誘導体である。1つの特定の実施形態において、*Lac I* 誘導体遺伝子は、配列番号 11 の核酸配列 (表 12) を有する *Lac I*<sup>Q</sup> 遺伝子である。*Lac I*<sup>Q</sup> 変異体は、大腸菌 (*E. coli*) 中の *Lac I* リプレッサーのレベルを 10 倍上昇させるプロモーターの -35 領域に単点変異を有することを除いて、天然の大腸菌 (*E. coli*) *Lac I* 遺伝子と同じである。例えば、MP Calos, Nature 274 (5673):762-65(1978)を参照。



【表 1 2】

l a c I<sup>Q</sup> 遺伝子の核酸配列

gacaccatcgaatgggtgcaaacctttcgcgggtatggcatgatagcgcccggaagagagtca attcaggggtgggtgaatgtgaaaccagtaacgttatagcatgtcgcagagtatgccgggtgtct ctatcagaccggtttcccgctgggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaa aaagtgggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggc gggcaaacagtcgtttgctgattggcgttgccacctccagtcctggccctgcacgcgcgtgcg aaattgtcgcggcgattaaatctcgcgcgatcaactgggtgccagcgtgggtgtcgatg gtagaacgaagcggcgctgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcgaacgcgt cagtgggtgatcattaaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgct gcaataatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatt ttctccatgaagacggtagcgcactgggcgtggagcatctggctgcattgggtcaccagca aatcgcgctgttagcggggccattaagttctgtctcgcgcgtctgcgtctggctggctggc ataatatctcactcgcgaatcaaatccagcgcgatagcgggaacgggaaggcagctggagtgc atgtccgggttttcaacaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttccactgcgatgct ggttgccaacgatcagatggcgtggcgcaatgcgcgcattaccagagtcggcgctgcgcg ttggtgcggtatctcggtagtgggatacgcagataccgaagacagctcatgttatatcccg cgtcaaccacccatcaaacaggatttccgctgctggggcaaacacagcgtggaccgcttgc gcaactctctcagggccaggcgggtgaagggcaatcagctgttgcgcgtctcactggtgaaaa gaaaaaccacccctggcgcccaatcgcgaacccctctcccgcgcttggcgattcatta atgcagctggcagcaggtttcccgactggaagcggcgagtgagcgcaacgcaattaatg tgagttagctcactcattagggaccccgagctttacactttatgcttccggctcgatgttg tgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacggatt cactggcgcgtcgttttac	配列番号 1 1
---	----------

10

【0 1 5 5】

なお別の実施形態において、l a c I 誘導体遺伝子は、配列番号 1 2 の核酸配列（表 13）を有する l a c I<sup>Q1</sup> 遺伝子である。l a c I<sup>Q1</sup> 変異体は、そのヌクレオチド配列が大腸菌（E.coli）- 3 5 領域コンセンサス配列と正確に一致する - 3 5 領域を置換する再構成であり、大腸菌（E.coli）での天然のプロモーターより 1 0 0 倍高い発現を引き起こす。例えば、MP Colas & JH Miller, Mol. & Gen. Genet. 183(3): 559-60(1980)。

20

【表 1 3】

l a c I<sup>Q1</sup> 遺伝子の核酸配列

agcggcatgcatttacgttgacaccacctttcgcgggtatggcatgatagcgcccggaagaga gtcaattcaggggtgggtgaatgtgaaaccagtaacgttatagcatgtcgcagagtatgccgggt gtctcttatcagaccggtttcccgctgggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcg ggaaaaagtgggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaac tggcgggcaaacagtcgtttgctgattggcgttgccacctccagtcctggccctgcacgcgcg tcgcaaatgtcgcggcgattaaatctcgcgcgatcaactgggtgccagcgtgggtgtg gatggttagaacgaagcggcgctgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcgaac gcgtcagttgggtgatcattaaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagct gctgcactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtat tattttctcccatgaagacggtagcgcactgggcgtggagcatctggctgcattgggtcacc agcaaatcgcgcgtgttagcggggccattaagttctgtctcggcgctctgcgtctggctggc tggcataaatatctcactcgcgaatcaaatccagcgcgatagcgggaacgggaaggcagctggag tgccatgtccgggttttcaacaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttccactgcga tgctggttgccaacgatcagatggcgtggcgcaatgcgcgcattaccagagtcggcgctg cgcgttgggtgaggatctcggtagtgggatacgcagataccgaagacagctcatgttatat cccgcgtcgaaccacccatcaaacaggatttccgctgctggggcaaacacagcgtggaccgct tgctgcaactctctcagggccaggcgggtgaagggcaatcagctgttgcgcgtctcactgggtg aaaagaaaaaccacccctggcgcccaatcgcgaacccctctcccgcgcttggcgattc ataatgcagctggcagcaggtttccgactggaagcggcgagtgagcgcaacgcaatt aatgtgagttagctcactcattagggaccccgagctttacactttatgcttccggctcgat gttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacg gattcactggcgcgtcgttttac	配列番号 1 2
--	----------

30

40

【0 1 5 6】

本発明において、宿主細胞染色体は、L a c I タンパク質をコードする遺伝子の少なくとも 1 つのコピーを含有する少なくとも 1 つの核酸配列の挿入によって改変可能であり、該遺伝子は、好ましくは、コードされる L a c I タンパク質、ならびに P l a c I - l a c I - l a c Z Y A 核酸配列以外である遺伝子を含有するポリヌクレオチド（すなわち P l a c I - l a c I - l a c Z Y A オペロンの P l a c ( - ) バージョン）または P l a c I - l a c I - l a c Z ポリヌクレオチド（すなわちそのような P l a c ( - ) オペロンの構造 l a c 利用オペロン遺伝子含有部分、例えば、P l a c I - l a c I - l a c Z Y A 核酸配列の少なくとも部分的に切断されたバージョン）を構成的に発現するために、

50

細胞による使用が可能である。

【0157】

選択した *LacI* タンパク質をコードする遺伝子は、好ましくは、構成的に発現される。これは選択した発現宿主細胞で構成的に発現される任意のプロモーターの使用によって達成され得る。例えば、天然の大腸菌 (*E. coli*) *PlacI* は、選択した *LacI* コード配列に作動可能に結合されるか、または別の構成的に発現されたプロモーターはそれに作動可能に結合される。ある場合では、調節されたプロモーターが発酵の間 *LacI* タンパク質がそれから連続される発現される状態で維持されるという条件で、調節されたプロモーターが使用され得る。特定の実施形態において、*P<sub>lac</sub>*、*P<sub>tac</sub>*、*P<sub>trc</sub>*、*P<sub>tacII</sub>*、*P<sub>lacUV5</sub>*、*lpp-P<sub>lacUV5</sub>*、*lpp-lac*、*nppM-lac*、*T7lac*、*T5lac*、*T3lac*、および *P<sub>mac</sub>* を含む、*lac* または *tac* ファミリープロモーターは、本発明で利用される。

10

【0158】

ゲノム挿入部位

染色体挿入は、当該分野で公知の任意の技術に従って実施され得る。例えば、:DS Toder, 「Gene replacement in *Pseudomonas aeruginosa*,」 *Methods in Enzymology* 235: 46-74(1994); and J Quandt & MF Hynes, 「Versatile suicide vector which allow direct selection for gene replacement in Gram negative bacteria,」 *Gene* 127(1):15-21(1993)を参照。当該分野で公知であるようなトランスポン型挿入技術、およびその後の選択も使用され得る：例えば、IY Goryshin & WS Reznikoff, 「Tn5 in vitro transposition,」 *Journal of Biological Chemistry* 273(13):7367-74(1998)を参照。あるいは、(非溶解)ファージ形質導入によるトランスフェクションも、染色体挿入に使用され得る：例えば、JH Miller, *Experiments in Molecular Genetics* (1972) (Cold Spring Harbor Lab., NY)を参照。

20

【0159】

*lacI* 遺伝子、またはその誘導体を挿入するのに有用な場所である細菌発現宿主細胞染色体内の部位は、使用した発酵条件下での細胞機能には必要とされない部位、例えば、存在、転写、または発現が、使用した発酵条件下での細胞の健全な機能にとって重要である任意の遺伝子内の任意の位置を含む。そのような挿入部位の実例は、これに限定されるわけではないが：スクロースインポートおよび代謝遺伝子（例えば、*sacB*）、フルクトースインポートおよび異化遺伝子（例えば、フルクトキナーゼ遺伝子、1-ホスホフルクトキナーゼ遺伝子）、芳香族炭素源インポートおよび利用遺伝子（例えば、アントラニラートオペロン遺伝子、例えば、*antABC* 遺伝子、ベンゾアートオペロン遺伝子、*benABCD* 遺伝子）、ベータラクタマーゼ遺伝子（例えば、*ampC*、*blb1*、*blc* 遺伝子、*blo* 遺伝子、*blp* 遺伝子）、アルカリホスファターゼ遺伝子（例えば、*phoA*）、ヌクレオベースまたはヌクレオチド生合成遺伝子（例えば、*pyrBCDEF* 遺伝子）、アミノ酸生合成遺伝子（例えば、*proABC* 遺伝子）、アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子（例えば、*asd*）、3-イソプロピルマラートデヒドロゲナーゼ遺伝子（例えば、*leuB*）、およびアントラニラートシンターゼ遺伝子（例えば、*trpE*）を含む。

30

40

【0160】

ゲノム挿入が栄養要求株をもたらしたか、または同時に生じる任意の実施形態において、致死効果を克服（および回避する）ために宿主細胞が有効な置換代謝産物を細胞に供給する培地中で培養されるか、または置換遺伝子に対応する原栄養能を回復させるのに有効である生体触媒を発現する宿主細胞内に、例えば、選択マーカー遺伝子として供給される。代謝栄養要求株の作製時に欠失または不活性化（すなわちノックアウト）のために選択された1つまたは複数の遺伝子は、代謝経路で作用する酵素をコードするいずれの遺伝子でもよい。酵素は、細胞生存に必要である分子の同化生合成に関与する酵素である。あるいは、酵素は、細胞生存に必要である分子の異化利用に関与する酵素でありうる。好ましくは、所与の生体触媒活性をコードするすべての作用遺伝子は、栄養要求性宿主細胞の作

50

製時に宿主細胞から標的酵素活性を確実に除去するために、欠失または不活性化される。あるいは、宿主細胞は、先在する栄養要求株（例えば、天然の栄養要求株）を示すことが可能であり、そこでは欠失または不活性化（ノックアウト）を介したさらなる遺伝子改変を実施する必要がない。

#### 【 0 1 6 1 】

例えば、アミノ酸生合成遺伝子（例えば、*proA*、*proB*または*proC*遺伝子）または、ヌクレオベースまたはヌクレオチド生合成遺伝子（例えば、*pyrB*、*pyrC*、*pyrD*、*pyrE*、または*pyrF*）は挿入部位として使用され、その場合に必要な生合成活性は通常、妨害されて、したがって栄養要求株を産生する。そのような場合：1）生合成経路への代謝依存を回避するために、プロリンまたはウラシル補給物と同様に、培地に添加されるか、；または2）栄養要求性宿主細胞が発現され、したがって生合成経路から消失する生体触媒を置換するさらなる遺伝子によって形質転換され、それによって代謝選択マーカー遺伝子、例えば、*proC*、*pyrF*、または*thyA*と同様に、細胞への原栄養性を回復するかのいずれかである。特定の実施形態において、*pyrF*、*thyA*、および*proC*からなる群から選択される遺伝子のノックアウト、または遺伝子の組合せによって同時にまたは続いて栄養要求的に誘導される*lacI*導入遺伝子、またはその変異体が細胞に挿入される。特定の実施形態において、天然の大腸菌（*E.coli*）*lacI*、*lacI<sup>Q</sup>*、または*lacI<sup>Q1</sup>*導入遺伝子は、*pyrF*のノックアウトによって同時にまたは続いて栄養要求性にされる細胞内へ挿入される。別の特定の実施形態において、天然の大腸菌（*E.coli*）*lacI*、*lacI<sup>Q</sup>*、または*lacI<sup>Q1</sup>*導入遺伝子は、*proC*のノックアウトによって同時にまたは続いて栄養要求性にされる細胞内に挿入される。なおさらなる実施形態において、天然の大腸菌（*E.coli*）*lacI*、*lacI<sup>Q</sup>*、または*lacI<sup>Q1</sup>*導入遺伝子は、*pyrF*および*proC*のノックアウトによって、同時にまたは続いて栄養要求性にされる細胞内に挿入される。

#### 【 0 1 6 2 】

別の実施形態において、天然の大腸菌（*E.coli*）*lacI*、*lacI<sup>Q</sup>*、または*lacI<sup>Q1</sup>*導入遺伝子、またはその誘導体を、宿主細胞のレバンスクラーズ位置に挿入し得る。例えば、1つの特定の実施形態において、天然の大腸菌（*E.coli*）*lacI*、*lacI<sup>Q</sup>*、または*lacI<sup>Q1</sup>*導入遺伝子、またはその誘導体を蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）のレバンスクラーズ遺伝子位置に挿入し得る。特に天然の大腸菌（*E.coli*）*lacI*、*lacI<sup>Q</sup>*、または*lacI<sup>Q1</sup>*導入遺伝子、またはその誘導体を、配列番号13の核酸配列（表14）を有する蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）のレバンスクラーズ遺伝子位置に挿入し得る。

【表 1 4】

## レバンスクラーゼ遺伝子位置の読み取り枠

ctaccagaacgaagatcagcgcccaatggcctcaagggtctactggatgattcagcc gaagtcgttgaggtgctgaacatgctgctggaatggaaggcgcccaagtgagcgccctcag cgaccctttgagcgcgcttgaaacagcccggtgacccattacgacgtgattattcggaca tcggcatgcccgaataatgaatggccatgagctgatgcagaagctgcgtaaagtaggccaactt cgacaggctcccgccatcgcccttaacgggctatggcgctggcaatgaccagaaaaaggcgac tgaatcgggctttaatgcgcgtgctcagcaaacccggttgccatgattcgctcatcacttga tcgaaaaactgtgcccgtcccgccctaggcgctggggcaggcgcttcaagggtagatgaactg agaaaaagcgacggacgcgcgcgttctggtcgcgacacctgggtatccacgctgccaccg tgtcgctgcgcaaggctcaggtacaacacggcctggcgcgctgtcactcagcatccagacg ctcacacctccccggcgccctggccttgagcggtgaggctgcagcatctcgatatgaa accgcgacgagctcaccgctcaactcgacctccagggttctctgggcttaccttgacat gaatcacccagcccatcgaggcgccatttgcgcaaaaaggcttggtactccacggcgaactgc ccatcgccactgcgcacctcgcggtgctcagcgcccgctggaaaaacagccctgccaaagt caagcgatcagcaccagcagcggtaccaaacccaccgctcaaagcgccagacctggcgt gcaaggccatgttttctgcacggataattgcggctgtgtgaagtcgtcagggtctgggtg ttcatagcggggcccggactcaacccttgctgtgctcgggagaagacggcccttggtgaca ccccgtggcgccggaatcgcccatatcgacgcccagaaacggcagcaccacgactaccgc actccagcctgcttgcctggcgagggttatcgctgcgcagatgctgttgatgatccacg catcgagcagtcagaggtacactgcccaggttatccagaagtaagtggtttgcagatgcac ctccagggttatgtaacttttggtgcggggtgcgggcagggttcattatttttaggttctct gcttggcgcttggtttgcggccatcatggcggaacttcggcgatctactaatgatcgaa ctcttcaaacagaagacaagctgaaacgtctcagctctataaaaaggccaatcagcaaat gcattttttgccttgaccacgggaatcgagctcttctaaagtcaaatcactgtatatgaatac agtaatttgatcccttcattgacgagacttactatgaaaagcacccttcgaaatttgga aaacaccccatcaaccagcctgtggacccgcgcgcatgcgtttaaagtgcagtcggacgac cccacacccacccagcgctggtcagcgcaacttcccggtattgagtgcaggggtgttat ctgggacaccatgcgctgcgtgatatcgacggcaacatcacctccgctcgatggctggcg tgatcttcacccctcaccgggatcgccaccggaacgacccgcaataacctcgatcagaatggc aactacgacgtcatcccgactggaacgatcgccatggccgggcaagatgtactactggt ctcccgacccggcaagactggaagctcgggcgccgagtgatggctgaaggggttcgccca ccgtgcgcgaatggggcgccgacgcccgatcctgttgaaacgagcaaggcggaagtagacctgtac tacaccgcccgtcagcccgccggcgacccatcgtaagggtgcgtggcgcggtgtgaccaccga gcatggcgctcagcctgggtgggtttgagaaggctcaagcgctgttcgagggcgacggcaaga tgtaccagaccgaagcgcaaatgcgttctggggctttcgcgatccatggcggttcgcgcgac ccgaaagacggcgaagctgtacatgctgttcgaaggtaacgtggccggcgcaacggcgctcgca caaggctcggttaaagccgaaatcggcgacgtgcgcgacgggttatgaagacgtcggttaactcg gcttcagactgctgcgtcggtatcgccgtggcccgcgacgaagacggcgacgactgggaa atgctgccaccgctgctgacccgggtggcggtcaacgacacagaccgaacgcccgcacttctg gttccaggacggcaagtaactacctgttcaccatcagccacaccttcacctacgcccagcgcg tgaccggcccgacggcggtgtacggcttcgtcgccgattcgctgttcgggtcggtatgtgcg ttgaacggctctggtctggtactgggcaacccgctcctcccaaccggttcagacctactcgca ctgcgtcatgcccacggcctggtgacctccttcacgacagcgtaccgacccgacgacacgg gcacgcagatccgtatcgccggcaccgaagcaccgaggtggccatcaagatcaaaggcgag caaacgttttggtcgctgagtactacgggttacatcccgccgatgctcgacgttacgct caagtaaccggaggtatgaggtagcggtttgagctcgatgacaaaccccggtgaatttt cgctgcacctgtggcgagggtgtgtcccggttggggccggacagccgcatcgacggcaa gacgctccacattttggttctcgggcgctcagggaggtatgtgtcggtgagggggcgctc acgggagcaagctccctcgccacaggttcaacagccattgggtggatattcaggaaataga aatgcctgcaccattgagttgagtc	配列番号 1 3
10	
20	
30	

## 【0 1 6 3】

## I V . L A C O 配列

プロモーターの漏出性を抑制する試みは、標的組換えポリペプチド発現の潜在的に同時に起こる低下によって平衡を保たせる必要がある。プロモーターをさらに抑制して、プロモーターの漏出性を低下させる1つの手法は、オペレーター配列として公知の調節要素を改変して、誘導時の標的組換えポリペプチドの潜在的発現を低下させることなく、関連するリプレッサータンパク質がオペレーター配列に結合する能力を向上させることである。

## 【0 1 6 4】

蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) におけるデュアル lac オペレーターの使用が、誘導されたタンパク質の収率を同時に低下させることなく、ブレインキュベーション組換えタンパク質発現の優れた抑制を提供することが発見されている。

## 【0 1 6 5】

1つの実施形態において、導入遺伝子発現の抑制に関与する少なくとも1つの lac O 配列を含む核酸を含有する核酸構築物を含むシュードモナス (Pseudomonad) 生物が提供される。特定の実施形態において、シュードモナス (Pseudomonad) 宿主細胞は、蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) である。1つの実施形態において、核酸構築物は1つを超える lac O 配列を含む。別の実施形態において、核酸構築物は少なくとも1つの、好まし

10

20

30

40

50

くは1つを超える *l a c O i d* 配列を含む。1つの実施形態において、核酸構築物は、プロモーターの3'側に位置する *l a c O* 配列、またはその誘導体、およびプロモーターの5'側に位置する *l a c O* 配列、またはその誘導体を含む。特定の実施形態において、*l a c O* 誘導体は *l a c O i d* 配列である。

#### 【0166】

本発明の別の実施形態において、シュードモナス (*Pseudomonad*) 宿主細胞に使用される1つを超える *l a c* オペレーター配列、またはその誘導体を含む核酸構築物が提供される。1つの実施形態において、少なくとも1つの *l a c* オペレーター配列は *l a c O i d* 配列である。

#### 【0167】

天然の大腸菌 (*E. coli*) *l a c* オペレーターは、インデューサの非存在下で *l a c* オペロンの発現をダウンレギュレートするように作用する。このため *l a c* オペレーターは、*L a c I* リプレッサータンパク質によって結合され、オペロンの転写を抑制する。*L a c I* タンパク質がDNA分子上の2つの *l a c* オペレーターを同時に結合され得ることが決定されている。例えば、Muller et al., (1996) 「Repression of lac promoter as a function of distance, phase, and quality of an auxiliary lac operator,」 *J. Mol. Biol.* 257: 21-29を参照。抑制は、is mediated by the プロモーターに隣接するオペレーター  $O_1$ 、ならびに *l a c Z* 遺伝子のコード領域内の  $O_1$  の下流の401塩基対、および  $O_1$  上流の92bpにそれぞれ位置する、2つの補助オペレーター  $O_2$  および  $O_3$  によって仲介される (図4を参照)。天然の大腸菌 (*E. coli*) *l a c* オペレーター配列の理想的な *l a c* オペレーター ( $O_{id}$ ) による置換は、大腸菌 (*E. coli*) における天然の *l a c* オペロンの抑制上昇を引き起こす。Muller et al., (1996) 「Repression of lac promoter as a function of distance, phase, and quality of an auxiliary lac operator,」 *J. Mol. Biol.* 257: 21-29を参照。

#### 【0168】

*l a c O* 配列または誘導体を、プロモーターに対して大腸菌 (*E. coli*) 天然の  $O_1$  位置に配置し得る。あるいは、*l a c O* 配列または誘導体をプロモーターに対して大腸菌 (*E. coli*)  $O_3$  位置に配置し得る。別の実施形態において、*l a c O* 配列または誘導体をプロモーターに関して大腸菌 (*E. coli*) 天然の  $O_1$  位置、天然の  $O_3$  位置、または両方に配置し得る。1つの実施形態において、核酸構築物は、プロモーター配列に対して5'側またはプロモーター配列に対して3'側に、少なくとも1つの *l a c O i d* 配列を含有する。特定の実施形態において、核酸構築物は、プロモーターの3'側に *l a c O i d* 配列、プロモーターの5'側に少なくとも1つの *l a c O* 配列、または誘導体を含有する。代替的な実施形態において、核酸構築物は、プロモーターの5'側に *l a c O i d* 配列、およびプロモーターの3'側に少なくとも1つの *l a c O* 配列、または誘導体を含有する。なお別の実施形態において、核酸構築物は、プロモーターの5'および3'側の両方の *l a c O i d* 配列を含有する。

#### 【0169】

特定の実施形態において、*l a c O* 配列は、配列番号14によって表される *l a c O i d*、または実質的に相同な配列である。別の実施形態において、配列番号59の *l a c O i d* 配列、または配列番号59に実質的に相同な配列が利用される。

#### 【表15】

*l a c O i d* 配列

5'-AATTGTGAGCGCTCACAATT-3'	配列番号14
5'-tgtgtggAATTGTGAGCGCTCACAATTccacaca-3'	配列番号59

#### 【0170】

#### V. 単離核酸およびアミノ酸

本発明の別の態様において、タンパク質の改良された生成法で使用される核酸配列が提

供される。

【0171】

1つの実施形態において、栄養要求性シュードモナス（*Pseudomonas*）宿主細胞で使用するのための原栄養回復酵素をコードする核酸配列が提供される。特定の実施形態において、生物蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）から生成された窒素含有塩基化合物生合成酵素をコードする核酸配列が提供される。1つの実施形態において、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）中の *p y r F* 遺伝子をコードする核酸配列が提供される（配列番号1および3）。別の実施形態において、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）内で *t h y A* 遺伝子をコードする核酸配列が提供される（配列番号4）。なお別の実施形態において、生物蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）から精製されたアミノ酸生合成化合物をコードする核酸配列が提供される。特定の実施形態において、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）内で *p r o C* 遺伝子をコードする核酸配列が提供される（配列番号6および8）。

10

【0172】

別の態様において、本発明は、タンパク質の改良された生成法に使用される新規なアミノ酸配列を提供する。

【0173】

1つの実施形態において、生物蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）から精製された窒素含有塩基化合物生合成酵素のアミノ酸配列が提供される。1つの実施形態において、配列番号2を含有するアミノ酸配列が提供される。別の実施形態において、配列番号5を含有するアミノ酸配列が提供される。なお別の実施形態において、生物蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）から精製されたアミノ酸生合成化合物のアミノ酸配列が提供される。特定の実施形態において、配列番号7を含有するアミノ酸配列が提供される。

20

【0174】

本発明の1つの実施形態は、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）*p y r F* 遺伝子の新規な単離核酸配列（表2、配列番号1；表4、配列番号3）である。本発明の別の態様は、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）*p y r F* 遺伝子の単離ペプチド配列（表3、配列番号2）を提供する。配列番号1、2、または3に対して少なくとも90、95、98または99%相同な核酸およびアミノ酸配列が提供される。さらに、配列番号1、2または3の、少なくとも10、15、17、20または25、30、40、50、75、100、150、250、350、500、または1000個の連続する核酸またはアミノ酸を含有するヌクレオチドおよびペプチド配列も提供される。配列番号1、2または3の断片、誘導体および類似体もさらに提供される。配列番号1、2または3の断片は、少なくとも約10bp、15bp、17bp、20bp、50bp、100bp、500bp、1kbp、5kbpまたは10kbpの任意の連続する核酸またはペプチド配列を含み得る。

30

【0175】

本発明の別の実施形態は、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）*t h y A* 遺伝子の新規な単離核酸配列（表5、配列番号4）である。本発明の別の態様は、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）*t h y A* 遺伝子の単離ペプチド配列（表6、配列番号5）を提供する。配列番号4または5に対して少なくとも90、95、98または99%相同な核酸およびアミノ酸配列が提供される。さらに、配列番号4または5の少なくとも10、15、17、20、または25、30、40、50、75、100、150、250、350、500、または1000個の連続する核酸またはアミノ酸のヌクレオチドおよびペプチド配列も提供される。さらに、配列番号4および5の断片、誘導体および類似体も提供される。配列番号4または5の断片は、少なくとも約10bp、15bp、17bp、20bp、50bp、100bp、500bp、1kbp、5kbpまたは10kbpを含む連続する核酸またはペプチド配列を含み得る。

40

【0176】

本発明の別の実施形態は、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）*p r o C* 遺伝子の新規な単離核酸配列（表7、配列番号6；表9、配列番号8）である。本発明の別の態様は、

50

蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) p r o C 遺伝子の新規な単離ペプチド配列 (表 8、配列番号 7) を提供する。配列番号 6、7、または 8 に対して少なくとも 90、95、98 または 99 % 相同な核酸およびアミノ酸配列が提供される。さらに、配列番号 6、7、または 8 の、少なくとも 10、15、17、20 または 25、30、40、50、75、100、150、250、350、500、または 1000 個の連続する核酸またはアミノ酸を含有するヌクレオチドおよびペプチド配列も提供される。配列番号 6、7、または 8 の断片、誘導体および類似体も提供される。配列番号 6、7、または 8 の断片は、少なくとも約 10 b p、15 b p、17 b p、20 b p、50 b p、100 b p、500 b p、1 k b p、5 k b p または 10 k b p を含む連続する核酸またはペプチド配列を含み得る。

10

#### 【0177】

##### 配列相同性

配列相同性は、当該分野で周知の種々の方法のいずれかに従って決定される。有用な配列アラインメントおよび相同性決定方法の例は、以下で記載するものを含む。

#### 【0178】

相同配列のアラインメントおよび検索は、U.S.National Center for Biotechnology Information (NCBI) プログラムの MegaBLAST (現在、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> で入手され得る) を使用して実施され得る。アミノ酸配列について 70 % に設定された、または 90 % に設定されたパーセント同一性のオプションを用いたこのプログラムの使用は、クエリー配列に対して 70 %、また 90 %、またはそれ以上の相同性を持つ配列を同定する。当該分野で公知の他のソフトウェアも、相同配列、例えば、本発明によるプロモーター塩基配列またはアクチベータ - タンパク質コード塩基配列を含有する情報ストリングに対して少なくとも 70 % または 90 % 相同である配列を配列比較および / または検索するために利用され得る。例えば、クエリー配列に対して少なくとも 70 % または 90 % 相同である配列を同定するための比較に関する配列アラインメントは、そこで規定されたデフォルトパラメータと、70 % または 90 % に設定した相同性の程度のパラメータと共に、GCG Sequence Analysis Software Package (Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, マジソン、ウィスコンシン州 53705 から入手され得る) で利用され得る GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、および TFASTA プログラムを使用することによって実施され得る。または、例えば、CLUSTAL プログラム (カリフォルニア州マウンテンビューの IntelliGenetics の PC/Gene software package で利用され得る) が使用され得る。

20

30

#### 【0179】

これらおよび他の配列アラインメント方法は当該分野で周知であり、手動アラインメントによって、目視検査によって、あるいは配列アラインメントアルゴリズム、例えば、上記のプログラムによって具現されるアルゴリズムの任意の手動または自動利用によって実施され得る。種々の有用なアルゴリズム、例えば、: W. R. Pearson & D. J. Lipman によって、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444-48 (Apr 1988) で記載されている類似性検索方法 ; T. F. Smith & M. S. Waterman によって、Adv. Appl. Math. 2: 482-89 (1981) および J. Molec. Biol. 147: 195-97 (1981) で記載されている局所相同性方法 ; S. B. Needleman & C. D. Wunsch によって、J. Molec. Biol. 48 (3): 443-53 (Mar 1970) で記載されている相同性アライメント方法 ; 例えば、W. R. Pearson によって、Genoinics 11 (3): 635-50 (Nov 1991) で ; W. R. Pearson によって、Methods Molec. Biol. 24: 307-31 and 25: 365-89 (1994) によって ; および D. G. Higgins & P. M. Sharp によって、Comp. Appl'n s in Biosci. 5: 151-53 (1989) および Gene 73(1) : 237-44 (15 Dec 1988) で記載されている種々の方法を含む。

40

#### 【0180】

高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で実施される核酸ハイブリダイゼーションも、本明細書で記載した十分に相同な配列を得るための有用な技術である。

#### 【0181】

50

## V I . 核酸構築物

本発明のなお別の態様において、ペプチドの改良された生成法で使用するための核酸構築物が提供される。

1つの実施形態において、a)組換えポリペプチドをコードする核酸配列と、b)原栄養可能 (prototrophy-enabling) 酵素をコードする核酸配列とを含む、シュードモナス (Pseudomonad) 宿主細胞を形質転換するために使用する核酸構築物が提供される。別の実施形態において、核酸構築物はc) P l a c - P t a c ファミリープロモーターをさらに含む。なお別の実施形態において、核酸構築物はd) l a c または t a c ファミリープロモーターの3'側の少なくとも1つの l a c O 配列、または誘導体をさらに含む。なお別の実施形態において、核酸構築物はe) l a c または t a c ファミリープロモーターの5'側の少なくとも1つの l a c O 配列、または誘導体をさらに含む。1つの実施形態において、誘導体 l a c O 配列は、l a c O i d 配列でありうる。特定の実施形態において、シュードモナス (Pseudomonad) 生物は蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) である。

## 【0182】

本発明の1つの実施形態において、a)組換えポリペプチドをコードする核酸配列と、b) P l a c - P t a c ファミリープロモーターと、c) l a c または t a c ファミリープロモーターの3'側の少なくとも1つの l a c O 配列、または誘導体と、d) l a c または t a c ファミリープロモーターの5'側の少なくとも1つの l a c O 配列、または誘導体を含む、シュードモナス (Pseudomonad) 生物内で発現ベクターとして使用するための核酸構築物が提供される。1つの実施形態において、誘導体 l a c O 配列は、l a c O i d 配列でありうる。1つの実施形態において、核酸構築物は、e) 栄養要求性シュードモナス (Pseudomonad) 細胞内で使用するための原栄養可能 (prototrophy-enabling) 選択マーカーをさらに含む。特定の実施形態において、シュードモナス (Pseudomonad) 生物は蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) である。

## 【0183】

本発明の1つの実施形態において、栄養要求性宿主細胞を原栄養能に形質転換し得る少なくとも1つの生合成酵素をコードする核酸を含む核酸構築物が提供される。生合成酵素は、生合成酵素の発現なしに宿主細胞が栄養要求性代謝不全のために生存できない選択培地上で、栄養要求性宿主細胞が生存し得るようにするいずれの酵素でもよい。そのようなものとして、生合成酵素は、非栄養要求性代謝産物添加培地上で増殖するために原栄養能力を回復することによって、栄養要求性宿主の代謝不全を補完する酵素でありうる。

## 【0184】

1つの特定の実施形態において、本発明は、p y r F ( - ) 栄養要求性宿主を補完する機能性オロトジン - 5' - ホスフェートデカルボキシラーゼ酵素をコードする核酸構築物を提供する。特定の実施形態において、核酸構築物は、配列番号1または3の核酸配列を含有する。代替的な実施形態において、核酸構築物は配列番号2のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含有する。

## 【0185】

別の特定の実施形態において、本発明は、t h y A ( - ) 栄養要求性宿主を補完する機能性チミジラートシンターゼ酵素をコードする核酸構築物を提供する。特定の実施形態において、核酸構築物は配列番号4の核酸配列を含有する。代替的な実施形態において、核酸構築物は、配列番号5のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含有する。

## 【0186】

さらなる特定の実施形態において、本発明は、p r o C ( - ) 栄養要求性宿主を補完する機能性<sup>1</sup> - ピロリン - 5 - カルボキシラートレダクターゼ酵素をコードする、核酸構築物を提供する。特定の実施形態において、核酸構築物は、配列番号6または8の核酸配列を含有する。代替的な実施形態において、核酸構築物は、配列番号7のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含有する。

## 【0187】

代替的な実施形態において、本発明は、栄養要求性宿主細胞を原栄養能および追加の非

10

20

30

40

50



栄養要求性選択マーカーに形質転換し得る少なくとも1つの生合成酵素をコードする、核酸構築物を提供する。非栄養要求性選択マーカーの例は当該分野で周知であり、比色/発色または蛍光反応を生じさせるマーカー（例えば、lacZ遺伝子、GUS遺伝子、CAT遺伝子、luxAB遺伝子）、抗生物質耐性選択マーカー（例えば、アンホテリシンB、バシトラシン、カルバペネム、セファロスポリン、エタンプトール、フルオロキノロン、イソニジド、セファロスポリン、メチシリン、オキサシリン、パノマイシン、ストレプトマイシン、キノリン、リファンピン、リファンピシン、スルホンアミド、アンピシリン、テトラサイクリン、ネオマイシン、セファロチン、エリスロマイシン、ストレプトマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、ペニシリン、およびクロラムフェニコール耐性遺伝子）、または他の一般に使用される非栄養要求性選択マーカーを含み得る。

10

#### 【0188】

別の実施形態において、発現ベクターは、栄養要求性宿主細胞を原栄養能に形質転換し得る、1つを超える生合成酵素を含み得る。生合成酵素は、生合成酵素の発現なしに宿主細胞が栄養要求性代謝不全のために生存できない選択培地上で、栄養要求性宿主細胞が生存し得るようにするいずれの酵素でもよい。生合成酵素は、非栄養要求性代謝産物添加培地上で増殖するために原栄養能力を回復することによって、栄養要求性宿主の代謝不全を補完する酵素でありうる。例えば、発現ベクターは、第1および第2の原栄養可能（prototrophy-enabling）選択マーカー遺伝子を含み、構築物を含有する宿主細胞が宿主細胞の生存が選択マーカー遺伝子の存在を必要とする条件のいずれか、または両方で維持されるようにする。マーカー-遺伝子依存性生存条件の一方のみが存在する場合、対応するマーカー遺伝子は発現される必要があり、次に他方のマーカー遺伝子は細胞が栄養要求性である必要すすべての栄養分は培地によってなお供給されるが、活性または不活性のいずれかである。このことは、宿主細胞が異なる条件間で移動されるときに、所望のトランスジェニック産物および/またはトランスジェニック活性をコードする同じ標的遺伝子、または共有結合された標的遺伝子の同じセットが宿主細胞内に連続して維持されるようにする。選択した選択マーカー遺伝子それぞれのコード配列は独立して、構成性または調節プロモーターのいずれかに作動可能に結合され得る。

20

#### 【0189】

特定の実施形態において、核酸ベクターは、pyrF(-)栄養要求性宿主細胞、proC(-)栄養要求性宿主細胞、またはpyrF(-)/proC(-)デュアル栄養要求性宿主細胞を補完し得る機能性オロトジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ酵素および機能性<sup>1</sup>-ピロリン-5'-カルボキシラートレダクターゼ酵素をコードする、核酸構築物を含む。特定の実施形態において、核酸構築物は、配列番号1または3、および配列番号6または8の核酸配列を含む。代替的な実施形態において、核酸構築物は配列番号2および7のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含有する。

30

#### 【0190】

代替的な特定の実施形態において、核酸ベクターは、pyrF(-)栄養要求性宿主細胞、thyA(-)栄養要求性宿主細胞、またはpyrF(-)/thyA(-)デュアル栄養要求性宿主細胞を補完し得る機能性オロトジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ酵素および機能性チミジラートシンターゼ酵素をコードする、核酸構築物を含む。特定の実施形態において、核酸構築物は、配列番号1または3、および配列番号4の核酸配列を含む。代替的な実施形態において、核酸構築物は、配列番号2および5のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含有する。

40

#### 【0191】

特定の実施形態において、核酸ベクターは、proC(-)栄養要求性宿主細胞、thyA(-)栄養要求性宿主細胞、またはproC(-)/thyA(-)デュアル栄養要求性宿主細胞を補完し得る機能性<sup>1</sup>-ピロリン-5'-カルボキシラートレダクターゼ酵素およびチミジラートシンターゼ酵素をコードする、核酸構築物を含む。特定の実施形態において、核酸構築物は、配列番号4、および配列番号6または8の核酸配列を含む。代替的な実施形態において、核酸構築物は、配列番号5および7のアミノ酸配列をコードす

50

る核酸配列を含有する。

#### 【 0 1 9 2 】

##### プロモーター

発酵プロセスにおいて、標的組換えポリペプチドの発現が誘導されると、発現系の効率を最大限にするために、高レベルの産生を有することが理想的である。プロモーターは、転写を開始させ、一般にリボソーム結合部位の 10 ~ 100 ヌクレオチド上流に位置する。プロモーターは理想的に、宿主細胞の細胞タンパク質全体の約 50 % の組換えポリペプチド蓄積を可能にするのに十分強力となり、厳密な調節を受け、容易に（安価に）誘導される。

#### 【 0 1 9 3 】

本発明によって使用したプロモーターは、構成性プロモーターまたは調節プロモーターである。一般に使用される誘導性プロモーターおよびその続いてのインデュースは、lac (IPTG)、lacUV5 (IPTG)、tac (IPTG)、trc (IPTG)、Psyn (IPTG)、trp (トリプトファン飢餓)、araBAD (1 - アラビノース)、lpp<sup>a</sup> (IPTG)、lpp-lac (IPTG)、phoA (ホスフェート飢餓)、recA (ナリジクス酸)、proU (容量オスモル濃度)、cst-1 (グルコース飢餓)、tetA (テトラサイクリン)、cadA (pH)、nar (嫌気性条件)、PL (42 °C への熱移動)、cspA (20 °C への熱移動)、T7 (熱誘導)、T7-lac オペレーター (IPTG)、T3-lac オペレーター (IPTG)、T5-lac オペレーター (IPTG)、T4 遺伝子 32 (T4 感染)、nprM-lac オペレーター (IPTG)、Pm (アルキル - またはハロ - ベンゾアート)、Pu (アルキル - またはハロ - トルエン)、Psal (サリチラート)、および VHb (酸素) を含む。例えば、Makrides, S. C. (1996) Microbiol. Rev. 60,512-538 ; Hannig G. & Makrides, S. C. (1998) TIBTECH 16,54-60 ; Stevens, R. C. (2000) Structures 8,R177-R185を参照。例えば、: J. Sanchez-Romero & V. De Lorenzo, Genetic Engineering of Nonpathogenic Pseudomonas strains as Biocatalysts for Industrial and Environmental processes, in Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology (A. Demain & J. Davies, eds.) pp. 460-74 (1999) (ASM Press, Washington, D. C.); H. Schweizer, Vectors to express foreign gene and techniques to monitor gene expression for Pseudomonads, Current Opinion in Biotechnology, 12: 439-445 (2001); and R. Slater & R. Williams, The Expression of Foreign DNA in Bacteria, in Molecular Biology and Biotechnology (J. Walker & R. Rapley, eds.) pp.125-54 (2000) (The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK) を参照。

#### 【 0 1 9 4 】

選択した細菌宿主細胞に対して天然のプロモーターのヌクレオチド配列を有するプロモーター（例えば、シュードモナス (Pseudomonas) アントラニラートまたはベンゾアートオペロンプロモータ (Pant、Pben)）はまた、標的ポリペプチドをコードする導入遺伝子の発現を制御するために使用され得る。1つを超えるプロモーターが相互に別のプロモーターに共有結合されているタンデムプロモータ、例えば、Pant-Pbentタンデムプロモータ（プロモーター間ハイブリッド）または Plac-Plac タンデムプロモータも、配列が同じでも異なっても使用し得る。

#### 【 0 1 9 5 】

調節プロモーターは、プロモーターが部分である遺伝子の転写を制御するために、プロモーター調節タンパク質を利用する。本明細書で調節プロモーターを使用する場合、対応するプロモーター調節タンパク質も本発明による発現系の部分となる。プロモーター調節タンパク質の例は：アクチベータタンパク質、例えば、大腸菌 (E.coli) 異化産物アクチベータタンパク質、MaITタンパク質；AraCファミリー転写アクチベーター；リプレッサータンパク質、例えば、大腸菌 (E.coli) LacIタンパク質；およびデュアルファクション (dual-faction) 調節タンパク質、例えば、大腸菌 (E.coli) NagCタンパク質を含む。多くの調節プロモーター/プロモーター調節タンパク質の対は当該分野で公

10

20

30

40

50

知である。

#### 【0196】

プロモーター調節タンパク質は、プロモーターの制御下にある遺伝子の少なくとも1つのDNA転写調節領域を放出させるか、または該領域に結合させて、それにより遺伝子の転写を開始するときトランスクリプターゼ酵素の作用を許容または遮断するために、エフェクタ化合物、すなわち調節タンパク質と可逆的または非可逆的に結合する化合物と相互作用する。エフェクタ化合物は、インデューサまたはコリプレッサーのいずれかとして分類され、これらの化合物は天然のエフェクタ化合物および無償性インデューサ化合物を含む。多くの調節プロモーター/プロモーター調節タンパク質/エフェクタ化合物トリオは、当該分野で公知である。エフェクタ化合物は、細胞培養または発酵の間に使用され得るが、調節プロモーターを使用する特定の実施形態において、宿主細胞バイオマスの所望の量または密度の増殖後、所望の標的遺伝子の発現を直接または間接的に引き起こすために、適切なエフェクタ化合物が培養物に添加される。

10

#### 【0197】

一例として、lacファミリープロモーターを利用する場合、lacI遺伝子、またはその誘導体、例えば、lacI<sup>Q</sup>またはlacI<sup>Q1</sup>遺伝子も系に存在し得る。(通常は)構成的に発現された遺伝子であるlacI遺伝子は、これらのプロモーターのlacオペレーターに結合するlacリプレッサータンパク質(lacIタンパク質)をコードする。したがってlacファミリープロモーターを利用する場合、lacI遺伝子も発現系に包含させて発現させ得る。lacプロモーターファミリー構成要素、例えば、tacプロモーターの場合、エフェクタ化合物はインデューサ、好ましくは無償性インデューサ、例えば、IPTG(イソプロピル-P-D-1-チオガラクトピラノシド、「イソプロピルチオガラクトシド」とも呼ばれる)である。

20

#### 【0198】

特定の実施形態において、本発明では、Plac、Ptac、Ptrc、PtacII、PlacUV5、lpp-PlacUV5、lpp-lac、nprM-lac、T7lac、T5lac、T3lac、およびPmacを含むlacまたはtacファミリープロモーターが利用される。

#### 【0199】

他の要素

30

上記したようにlacO配列および誘導体を含む他の調節要素を、発現構築物に含め得る。そのような要素は、これに限定されるわけではないが、例えば、転写エンハンサー配列、翻訳エンハンサー配列、他のプロモーター、アクチベーター、翻訳開始および停止シグナル、転写ターミネーター、シストロン性レギュレーター、ポリシストロン性レギュレーター、ヌクレオチド配列「tags」および「tag」ペプチドコード配列(発現されたポリペプチドの同定、分離、精製、または単離を促進するtag配列、例えば、His-tag、Flag-tag、T7-tag、S-tag、HSV-tag、B-tag、Strept-tagを含む)、ポリアルギニン、ポリシステイン、ポリフェニルアラニン、ポリアスパラギン酸(Ala-Trp-Trp-Pro)n、チオレドキシン、ベータガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、シクロマルトデキストリングルコノトランスフェラーゼ、CTP: CMP-3-デオキシ-D-マンノ-オクツロソナートシチジルトランスフェラーゼ、trpEまたはtrpLE、アビジン、ストレプトアビジン、T7遺伝子10、T4gp55、スタヒロコッカスタンパク質A、ストレプトコッカスタンパク質G、GST、DHFR、CBP、MBP、ガラクトース結合ドメイン、カルモジュリン結合ドメイン、GFP、KSI、c-myc、ompT、ompA、pelB、NusA、ユビキチン、およびヘモシリニンAを含む。

40

#### 【0200】

最低でも、本発明のタンパク質コード遺伝子は、タンパク質コード配列に加えて、それに作動可能に結合した以下の調節要素: プロモーター、リボソーム結合部位(RBS)転写ターミネーター、翻訳開始および停止シグナルを含み得る。有用なRBSは、本発明に

50

よる発現系内の宿主細胞として有用な種のいずれかから、好ましくは選択した宿主細胞から得られる。多くの特異的な種々のコンセンサスRBS、例えば、D.Frishman et al., Starts of bacterial genes: estimating the reliability of computer predictions, Gene 234 (2): 257-65 (8 Jul 1999);およびB. E. Suzek et al., A probabilistic method for identifying start codons in bacterial genomes, Bioinformatics 17 (12): 1123-30 (Dec 2001)によって説明および引用されたものが公知である。さらに、天然のまたは合成RBSのいずれか、例えば、: EP 0207459 (合成RBS); O. Ikehata et al., Primary structure of nitrile hydratase deduced from the nucleotide sequence of a Rhodococcus species and its expression in Escherichia coli, Eur. J. Biochem. 181 (3): 563-70 (1989) (AAGGAAGの天然のRBS配列)に記載されているものが使用される。本発明で有用な方法、ベクター、ならびに翻訳および転写要素、ならびに他の要素のさらなる例が、例えば、: Gilroyへの米国特許第5,055,294およびGilroy et al.への米国特許第5,128,130号; Rammler et al.への米国特許第5,281,532号; Barnes et al.へのUS Patent Nos. 4,695,455および4,861,595; Gray et al.への米国特許第4,755,465号; およびWilcoxへの米国特許第5,169,760号に記載されている。

#### 【0201】

ベクター

シュードモナス (Pseudomonad) 宿主による本発明の酵素をコードするDNAの転写は、エンハンサー配列をベクターまたはプラスミドに挿入することによってさらに向上させ得る。代表的なエンハンサーは、プロモーターに作用してその転写を向上させる通常10~300bpのサイズの、DNAのcis作用要素である。

#### 【0202】

一般に、組換え発現ベクターは、シュードモナス (Pseudomonad) 宿主細胞、例えば、本発明の栄養要求株回復遺伝子の形質転換を可能にする複製起点および選択マーカー、ならびに下流構造配列の転写を指示する、高度に発現された遺伝子に由来するプロモーターを含む。そのようなプロモーターは、上記されている。非相同配列構造配列は適切な期に翻訳開始および終止配列によって構築され、ある実施形態において、リーダー配列が翻訳ポリペプチドの分泌を指示し得る。場合により本発明に従って、非相同配列は、所望の特徴、例えば、発現された組換え産物の安定化または単純化された精製を付与する、N末端同定ペプチドを含む融合ポリペプチドをコードし得る。

#### 【0203】

酵素の発現で蛍光菌 (P. fluorescens) によって使用するための有用な発現ベクターは、所望の標的ポリペプチドをコードする構造DNA配列を、適切な翻訳開始および終止シグナルと共に、作動可能な読み取りフェーズ (reading phase) に機能性プロモーターとともに挿入することによって作製される。ベクターは、ベクターを確実に維持して、所望ならば宿主内での増幅を提供するために、1つまたはそれ以上の表現型選択マーカーおよび複製起点を含む。本開示による形質転換に適切な宿主は、シュードモナス (Pseudomonas) 属内の多様な種を含み、特に蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) の宿主細胞株である。

#### 【0204】

ベクターは当該分野では、宿主細胞内で組換えタンパク質を発現させるのに有用であるとして公知であり、これらのいずれも改変され、本発明による遺伝子を発現するために使用され得る。そのようなベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、およびファージ発現ベクターを含む。本発明で使用するために改変され得る有用なプラスミドベクターの例は、これに限定されるわけではないが、発現プラスミドpBBR1MCS、pDSK519、pKT240、pML122、pPS10、RK2、RK6、pRO1600、およびRSF1010を含む。さらなる例は、pALTER-Ex1、pALTER-Ex2、pBAD/His、pBAD/Myc-His、pBAD/gIII、pCal-n、pCal-n-EK、pCal-c、pCal-Kc、pcDNA2.1、pDUAL、pET-3a-c、pET9a-d、pET-11a-d、pET-12a-c、p

ET - 14 b、pET15 b、pET - 16 b、pET - 17 b、pET - 19 b、pET - 20 b (+)、pET - 21 a - d (+)、pET - 22 b (+)、pET - 23 a - d (+)、pET24 a - d (+)、pET - 25 b (+)、pET - 26 b (+)、pET - 27 b (+)、pET28 a - c (+)、pET - 29 a - c (+)、pET - 30 a - c (+)、pET31 b (+)、pET - 32 a - c (+)、pET - 33 b (+)、pET - 34 b (+)、pET35 b (+)、pET - 36 b (+)、pET - 37 b (+)、pET - 38 b (+)、pET - 39 b (+)、pET - 40 b (+)、pET - 41 a - c (+)、pET - 42 a - c (+)、pET - 43 a - c (+)、pETBlue - 1、pETBlue - 2、pETBlue - 3、pGEMEX - 1、pGEMEX - 2、pGEX1 T、pGEX - 2T、pGEX - 2TK、pGEX - 3X、pGEX - 4T、pGEX - 5X、pGEX - 6P、pHAT10 / 11 / 12、pHAT20、pHAT - GFPuv、pKK223 - 3、pLEX、pMAL - c2X、pMAL - c2E、pMAL - c2g、pMAL - p2X、pMAL - p2E、pMAL - p2G、pProEX HT、pPROLar . A、pPROTet . E、pQE - 9、pQE - 16、pQE - 30 / 31 / 32、pQE - 40、pQE - 50、pQE - 70、pQE - 80 / 81 / 82L、pQE - 100、pRSET、およびpSE280、pSE380、pSE420、pThioHis、pTrc99A、pTrcHis、pTrcHis2、pTriEx - 1、pTriEx - 2、pTrxFusを含み得る。そのように有用なベクターの他の例は、例えば、: N. Hayase, in Appl. Environ. Microbiol. 60 (9): 3336-42 (Sep 1994); A. A. Lushnikov et al., in Basic Life Sci. 30: 657-62 (1985); S. Graupner & W. Wackernagel, in Biomolec. Eng. 17(1) : 11-16. (Oct 2000); H. P. Schweizer, in Curr. Opin. Biotech. 12(5): 439-45 (Oct 2001); M. Bagdasarian & K. N. Timmis, in Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96: 47-67 (1982); T. Ishii et al., in FEMS Microbiol. Lett. 116(3): 307-13 (Mar 1, 1994); I. N. Olekhovich & Y. K. Fomichev, in Gene 140(1) : 63-65 (Mar 11, 1994) ; M. Tsuda & T. Nakazawa, in Gene 136(1-2): 257-6 (Dec 22, 1993); C. Nieto et al., in Gene 87(1) : 145-49 (Mar 1, 1990) ; J. D. Jones & N. Guttererson, in Gene 61(3): 299-306 (1987); M. Bagdasarian et al., in Gene 16(1-3): 237-47 (Dec 1981); H. P. Schweizer et al., in Gene t. Eng. (NY) 23: 69-81 (2001); P. Mukhopadhyay et al., in J. Bact. 172(1) : 477-80 (Jan 1990); D. O. Wood et al., in J. Bact. 145(3): 1448-51 (Mar 1981); and R. Holtwick et al., in Microbiology 147(Pt 2): 337-44 (Feb 2001)に記載されているものを含む。

#### 【 0 2 0 5 】

シュードモナス (Pseudomonas) 宿主細胞で使用され得る発現ベクターのさらなる例は、示されたレプリコンに由来するような、表 16 に示した発現ベクターを含む。

10

20

30

【表 16】

## 有用な発現ベクターのいくつかの例

レプリコン	ベクター
pPS10	pCN39, pCN51
RSF1010	pKT261-3
	pMMB66EH
	pEB8
	pPLGN1
	pMYC1050
RK2/RP1	pRK415
	pJB653
pRO1600	pUCP
	pBSP

10

20

## 【0206】

発現プラスミドRSF1010は、例えば、F. Heffron et al.によってproC. Nat'l A cad. Sci. USA 72(9):3623-27(Sep 1975)に、K. Nagahari & K. Sakaguchiによって、J. Bact. 133(3): 1527-29(Mar1978)に記載されている。プラスミドRSF1010およびその誘導体は、本発明の特に有用なベクターである。当該分野で公知のRSF1010の有用な誘導体の例は、例えば、pKT212、pKT214、pKT231および関連プラスミド、ならびにpMYC1050および関連プラスミド（例えば、Thompson et al.へのUS Patent Nos.5,527,883および5,840,554）、例えば、pMYC1803を含む。プラスミドpMYC1803は、調節テトラサイクリン耐性マーカーならびにRSF1010プラスミドからの複製および起動位置を保持する、RSF1010ベースのプラスミドpTJS260に由来する（WilcoxへのUS Patent No.5,169,760を参照）。他の有用なベクターの例は、Puhler et al.へのUS Patent No.4,680,264に記載されているものを含む。

30

## 【0207】

1つの実施形態において、発現プラスミドは発現ベクターとして使用される。別の実施形態において、RSF1010またはその誘導体は、発現ベクターとして使用される。なお別の実施形態において、pMYC1050またはその誘導体、あるいはpMYC1803またはその誘導体は、発現ベクターとして使用される。

## 【0208】

VII. シュードモナス（Pseudomonad）宿主細胞における組換えポリペプチドの発現

本発明の1つの態様において、改良されたタンパク質生成に使用するための、組換えポリペプチドを発現させるプロセスが提供される。

40

## 【0209】

1つの実施形態において、プロセスは、少なくとも1つの代謝産物に対して栄養要求性であるシュードモナス（Pseudomonad）において、a）組換えポリペプチドと、b）原栄養性回復酵素とをコードする核酸を含む核酸構築物の発現を提供する。代替的な実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）は、1つを超える代謝産物に対して栄養要求性である。1つの実施形態において、シュードモナス（Pseudomonad）は、蛍光菌（Pseudomonas fluorescens）細胞である。特定の実施形態において、組換えポリペプチドは、窒素含有塩基化合物およびアミノ酸からなる群から選択される代謝産物、または代謝産物の組合せに対して栄養要求性であるシュードモナス（Pseudomonad）において発現される。

50

さらに特定の実施形態において、組換えポリペプチドは、ウラシル、プロリン、およびチミジンからなる群から選択される代謝産物に対して栄養要求性であるシュードモナス (*Pseudomonad*) において発現される。別の実施形態において、栄養要求株は、宿主 *p y r F*、*p r o C*、または *t h y A* 遺伝子それぞれのノックアウトによって產生され得る。代替的な実施形態、組換えポリペプチドは、*P l a c I - l a c I - l a c Z Y A* オペロンの一部として以外の、天然の大腸菌 (*E.coli*) *l a c I* 遺伝子、*l a c I<sup>Q</sup>* 遺伝子、または *l a c I<sup>Q1</sup>* 遺伝子の、宿主細胞の染色体への挿入によって遺伝子改変された栄養要求性シュードモナス (*Pseudomonad*) 細胞において発現される。1つの特定の実施形態において、栄養要求性宿主細胞で発現された組換えポリペプチドを含有するベクターは、少なくとも2つの *l a c* オペレーター配列、またはその誘導体を含む。なおさらなる実施形態において、組換えポリペプチドは *P l a c* ファミリープロモーターによって駆動される。

10

#### 【0210】

別の実施形態において、プロセスは、シュードモナス (*Pseudomonad*) 宿主細胞ゲノムに挿入された *l a c I* コード遺伝子の少なくとも1つのコピーを提供するように遺伝子改変されたシュードモナス (*Pseudomonad*) 宿主細胞の使用を含み、ここで *l a c I* コード遺伝子は、*P l a c I - l a c I - l a c Z Y A* オペロンの一部として以外である。1つの実施形態において、*l a c* リプレッサタンパク質をコードする遺伝子は、天然の大腸菌 (*E.coli*) *l a c I* 遺伝子のそれと同じである。別の実施形態において、*Lac* リプレッサタンパク質をコードする遺伝子は、*l a c I<sup>Q</sup>* 遺伝子である。なお別の実施形態において、*l a c* リプレッサタンパク質をコードする遺伝子は、*l a c I<sup>Q1</sup>* 遺伝子である。特定の実施形態において、シュードモナス (*Pseudomonad*) 宿主細胞は、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 細胞である。別の実施形態において、シュードモナス (*Pseudomonad*) は、栄養要求性細胞を產生するためにさらに遺伝子改変される。別の実施形態において、プロセスは、少なくとも約 3 g / L、4 g / L、5 g / L、6 g / L、7 g / L、8 g / L、9 g / L または少なくとも約 10 g / L の組換えポリペプチドレベルを生じる。別の実施形態において、組換えポリペプチドは、3 g / L ~ 100 g / L のレベルで発現される。

20

#### 【0211】

方法は一般に：

- a) 本発明で記載するようなシュードモナス (*Pseudomonad*) 宿主細胞、好ましくは蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) を提供する工程；
  - b) i) 目的の標的組換えポリペプチド、および栄養要求性宿主を利用する場合には、ii) 発現されたときに宿主細胞の栄養要求性を克服する原栄養可能 (*prototrophy enabling*) 酵素をコードする遺伝子、を含む少なくとも1つの核酸発現ベクターで宿主細胞をトランスフェクションする工程；
  - c) 宿主細胞中に目的の組換えポリペプチドを含有する核酸発現ベクターを維持するために有効な選択圧を供給する増殖培地で宿主細胞を増殖させる工程；ならびに
  - d) 目的の標的組換えポリペプチドを発現させる工程；
- を含む。

30

#### 【0212】

方法は、宿主細胞に、iii) *P l a c* ファミリープロモーター、および場合により iv) 1つを超える *l a c* オペレーター配列をさらに含む発現ベクターによって少なくとも1回トランスフェクションする工程をさらに含み得る。1つの実施形態において、少なくとも1つの *l a c* オペレーター配列は、*l a c O i d* 配列でありうる。好ましくは、発現系は、少なくとも 1 g / L ~ 少なくとも 80 g / L のポリペプチド総生産性にて標的ポリペプチドを発現し得る。特定の実施形態において、組換えポリペプチドは、少なくとも 3 g / L、4 g / L、5 g / L、6 g / L、7 g / L、8 g / L、9 g / L、10 g / L、12 g / L、15 g / L、20 g / L、25 g / L、30 g / L、35 g / L、40 g / L、45 g / L、50 g / L、60 g / L、70 g / L、または少なくとも 80 g / L のレベルで発現される。特定の実施形態において、*P l a c*、*P t a c*、*P t r c*、*P t a*

40

50

c I I、P I a c U V 5、l p p - P l a c U V 5、l p p - l a c、n p r M - l a c、T 7 1 a c、T 5 1 a c、T 3 1 a c、および P m a c を含む、l a c または t a c フォミリープロモーターが本発明で利用される。

#### 【 0 2 1 3 】

1つの実施形態において、少なくとも1つの組換えポリペプチドは、1つの代謝産物に対して栄養要求性であるシュードモナス (Pseudomonad) 細胞にて発現させることが可能であり、ここで該栄養要求株は、目的のポリペプチドおよび原栄養可能 (prototrophy-enabling) 酵素をコードする核酸発現ベクターの維持のための選択マーカーとして作用する。あるいは、1つを超える組換えポリペプチドは、1つの代謝産物に対して栄養要求性であるシュードモナス (Pseudomonad) 細胞にて発現させることが可能であり、ここで組換えポリペプチドをコードする該核酸は、同じベクターに、あるいは複数のベクターに含有されることが可能である。

10

#### 【 0 2 1 4 】

なお別の実施形態において、異なる標的ポリペプチドをコードする1つを超える発現ベクターを少なくとも1つの代謝産物に対して栄養要求性であるシュードモナス (Pseudomonad) 宿主細胞内に維持することが可能であり、ここで1つの発現ベクターは、原栄養可能 (prototrophic-enabling) 酵素および目的の第1の標的ポリペプチドをコードする核酸を含有し、第2の発現ベクターは、代替りの非栄養要求性選択マーカーおよび目的の第2のポリペプチドをコードする核酸を含有する。

#### 【 0 2 1 5 】

20

別の実施形態において、少なくとも1つの組換えポリペプチドは、1つを超える代謝産物に対して栄養要求性であるシュードモナス (Pseudomonad) 細胞において発現させることが可能であり、ここで複数の原栄養能は、核酸発現ベクターの維持のための選択マーカーとして作用する。例えば、第1および第2の原栄養可能 (prototrophy-enabling) 選択マーカー遺伝子が存在する発現ベクターが利用され得る。両方のマーカー遺伝子が同じDNA構築物に存在する場合、構築物を含有する宿主細胞は、宿主細胞の生存が選択マーカー遺伝子の存在を必要とする条件のいずれかまたは両方の下で維持される。マーカー - 遺伝子依存性生存条件の一方のみが存在する場合、対応するマーカー遺伝子は発現される必要があり、他方のマーカー遺伝子は、細胞が栄養要求性のままである必要なすべての栄養素は培地によってなお供給されるが、活性または不活性のいずれかである。このことは、宿主細胞が異なる条件間で移動されるときに、所望のトランスジェニック産物および/または所望のトランスジェニック活性をコードする同じ標的遺伝子、または共有結合された標的遺伝子の同じセットが宿主細胞内に連続して維持されるようにする。2つの選択マーカー遺伝子それぞれが別のDNA構築物に位置する場合、宿主細胞内にDNA構築物の両方を維持するために、マーカー - 遺伝子依存性生存条件の両方が存在し、対応するマーカー遺伝子の両方が発現される必要がある。このことは、1つを超える非共有結合標的遺伝子または標的遺伝子のセットが宿主細胞内で別個に維持されるようにする。選択した選択マーカー遺伝子それぞれのコード配列は独立して、構成性または調節プロモーターのいずれかに作動可能に結合され得る。

30

#### 【 0 2 1 6 】

40

そのような多標的遺伝子系の二重標的遺伝子の例は、これに限定されるわけではないが：(1) 標的遺伝子の一方の発現産物が他方の標的遺伝子事態と相互作用する系；(2) 標的遺伝子の一方の発現産物がもう一方の標的遺伝子の発現産物、例えば、タンパク質およびその結合タンパク質または n - n タンパク質の - および - ポリペプチドと相互作用する系；(3) 2つの遺伝子両方の2つの発現産物が第3の成分、例えば、宿主細胞内に存在する第3の成分と相互作用する系；(4) 2つの遺伝子両方の発現産物が一般的な生体触媒経路に関与する系；および(5) 2つの遺伝子の2つの発現産物が相互に独立して機能する系、例えば、バイクローナル抗体発現系を含む。

#### 【 0 2 1 7 】

上に挙げたタイプ(1)の二重標的遺伝子系の1つの例において、第1の標的遺伝子は

50



、所望の標的タンパク質をコードし、ここで第 1 の標的遺伝子は調節プロモーターの制御下にあり；次に第 2 の標的遺伝子は第 1 の標的遺伝子のプロモーターの調節に關与するタンパク質をコードし、例えば、第 2 の標的遺伝子は、第 1 の標的遺伝子のプロモーターアクチベータまたはリプレッサータンパク質をコードする。第 2 の遺伝子が第 1 の遺伝子のプロモーター調節タンパク質をコードする例において、第 2 の遺伝子のコード配列は、構成性プロモーターの制御下にありうる。1 つの実施形態において、第 2 の遺伝子は、細胞内に高コピー数構築物として維持される独立した DNA 構築物の一部となり、少なくとも 10、20、30、40、50 のコピー数、または 50 コピー超が宿主細胞内に維持される。

#### 【0218】

別の実施形態において、本発明は、シュードモナス (Pseudomonads)、特に蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 中での組換えポリペプチドの産生における発現ベクター上の 1 つを超える lacO 配列の使用を提供する。

#### 【0219】

別の態様において、本発明は、lacI 導入遺伝子、またはその誘導体、例えば、lacI<sup>Q</sup>または lacI<sup>Q1</sup>をコードする lacI リプレッサータンパク質の少なくとも 1 つの染色体挿入されたコピーを有する、シュードモナス (Pseudomonads) および密接に関連した細菌の構成要素である細菌宿主細胞を形質転換する工程を含む、組換えポリペプチドを産生する方法を提供し、該導入遺伝子は、PlacI-lacI-lacZYA 構築物を少なくとも 1 つの標的組換えポリペプチドをコードする核酸構築物と共に含有する完全または切断構造遺伝子の一部以外である。少なくとも 1 つの標的組換えポリペプチドをコードする核酸は、Placファミリープロモーターに作動可能に結合することが可能であり、宿主細胞内に存在する Placファミリープロモーターはすべて、染色体に挿入された lacI 導入遺伝子から唯一発現される lacI リプレッサータンパク質によって調節される。場合により、発現系は、少なくとも 3 g/L ~ 少なくとも 10 g/L のポリペプチド総生産性にて標的ポリペプチドを発現し得る。好ましくは発現系は、少なくとも 3 g/L、4 g/L、5 g/L、6 g/L、7 g/L、8 g/L、9 g/L、または少なくとも 10 g/L のポリペプチド総生産性にて標的ポリペプチドを発現し得る。

#### 【0220】

1 つの実施形態において、本発明は、PlacI-lacI-lacZYA オペロンの一部として以外の、細胞のゲノム内に挿入された lacI コード遺伝子の少なくとも 1 つのコピーを提供するようにさらに遺伝子改変された栄養要求性シュードモナス (Pseudomonad) または関連細菌を利用する発現系において組換えポリペプチドを発現させる方法を提供する。特定の実施形態において、組換えポリペプチドは、lacI 導入遺伝子インサートを含有する栄養要求性蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 宿主細胞にて発現される。別の特定の実施形態において、組換えポリペプチドは、lacI<sup>Q</sup>導入遺伝子インサートを含有する栄養要求性蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 宿主細胞にて発現される。なお別の特定の実施形態において、組換えポリペプチドは、lacI<sup>Q1</sup>導入遺伝子インサートを含有する栄養要求性蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 宿主細胞にて発現される。蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 宿主は、生存のために細胞によって要求される生化学物質に対して栄養要求性でありうる。特定の実施形態において、蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 細胞は、窒素含有塩基に対して栄養要求性である。特定の実施形態において、蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) は、チミンおよびウラシルからなる群から選択される窒素含有塩基に対して栄養要求性である。特に特定の実施形態において、蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 宿主細胞の栄養要求性は、関連するコード産物を非機能性にする pyrF または thyA 遺伝子への遺伝子改変によって誘導される。代替的な実施形態において、蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 細胞は、アミノ酸に対して栄養要求性である。特定の実施形態において、蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) は、アミノ酸プロリンに対して栄養要求性である。特に特定の実施形態において、蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) 宿主細胞の栄養要求性は、関連するコード産物を非機能性にする proC

10

20

30

40

50

遺伝子への遺伝子改変によって誘導される。

#### 【0221】

##### 形質転換

シュドモナス (Pseudomonad) 宿主細胞のベクターによる形質転換は、当該分野で公知の任意の形質転換方法を使用して実施され、細菌宿主細胞は、無傷の細胞として、またはプロトプラスト (すなわちサイトプラストを含む) として形質転換され得る。形質転換方法の例は、穿孔方法 (例えば、電気穿孔)、プロトプラスト融合、細菌結合、および2価カチオン処理 (例えば、カルシウムクロライド処理または  $\text{CaCl}_2/\text{Mg}^{2+}$  処理)、あるいは当該分野で周知の他の方法を含む。例えば、Morrison, J. Bact., 132:349-351(1977); Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology, 101:347-362(Wu et al., eds, 1983), Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual(2nd ed.1989); Krieger, Gene Transfer and 発現: A Laboratory Manual(1990); and Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994))を参照。

10

#### 【0222】

##### 選択

好ましくは、うまく形質転換されない細胞は、形質転換の後に、および発酵中に連続的に選択される。選択マーカーは、栄養要求性選択マーカーまたは従来の抗生物質選択マーカーでありうる。細胞が多数の栄養化合物に対して栄養要求性である場合、栄養要求性細胞は、原栄養回復ベクターによって形質転換されるまで、これらの栄養化合物すべてが添加された培地上で培養され得る。宿主細胞は、多数の生合成活性を欠いているか、または欠くようにされている場合、原栄養回復マーカー系は、1つまたはそれ以上のまたはすべての生合成活性を回復させるために選択可能であり、残りは、培地中になお欠乏している栄養の供給を継続することによって補償される。1つを超える生合成活性、および/または1つを超える原栄養能が回復される選択マーカー系において、複数の選択マーカー遺伝子が1つのベクター上で共に発現されるか、または異なるベクター上で別個に同時発現される。単一の代謝産物が選択マーカー系の標的である場合、多数の生合成活性を選択マーカー系に包含させ得る。例えば、同じ同化経路から活性をコードする2つまたはそれ以上の遺伝子は、経路の生成物である化合物の生合成に関して原栄養能を回復させるために、1つのベクター上で共に発現されるか、または異なるベクター上で別個に同時発現される。

20

30

#### 【0223】

選択マーカーが抗生物質耐性遺伝子である場合、当該分野で周知であるように、非形質転換および復帰変異体細胞を淘汰するために関連抗生物質を培地に添加し得る。

#### 【0224】

##### 発酵

本明細書で使用する場合、「発酵」という用語は、文字通りの発酵が利用される実施形態および他の非発酵培養方式が利用される実施形態の両方を含む。発酵は、任意のスケールで実施され得る。1つの実施形態において、発酵培地は富栄養培地、最少培地、無機塩培地から選択される; 富栄養培地が使用され得るが、好ましくは回避される。別の実施形態では、最少培地または無機塩培地のいずれかが選択される。なお別の実施形態において、最少培地が選択される。また別の実施形態において、無機塩培地が選択される。無機塩培地が特に特別である。

40

#### 【0225】

原栄養可能 (prototrophic enabling) 酵素をコードする核酸構築物による宿主細胞の形質転換の前に、宿主細胞を、栄養要求株を補完する補助代謝産物、またはその類似体を含む培地中に維持し得る。形質転換の後に、宿主細胞を宿主細胞が栄養要求性である補助代謝産物の欠乏した培地で培養し得る。このようにして、原栄養性を可能にする選択マーカーを含有しない宿主細胞は淘汰される。同様に抗生物質耐性選択マーカー遺伝子を含有する発現ベクターから組換えタンパク質を発現する細胞を、形質転換の前に選択のために、関連抗生物質が欠乏した培地上に維持し得る。形質転換後および発酵の間に、非形質転

50

換および復帰変異体細胞を淘汰するために、抗生物質を当該分野で公知の濃度で培地に添加し得る。

【0226】

無機塩培地は、無機塩および炭素源、例えば、グルコース、スクロース、またはグリセロールから成る。無機塩培地の例は、例えば、M9培地、シュードモナス (Pseudomonas) 培地 (ATCC 179)、Davis and Mingioli培地 (BD Davis & ES Mingioli, in J. Bact. 60: 17-28 (1950)を参照)を含む。無機塩培地を作製するのに使用する無機塩は、例えば、リン酸カリウム、硫酸アンモニウムまたは塩化アンモニウム、硫酸マグネシウムまたは塩化マグネシウム、および微量無機物、例えば、塩化カルシウム、ホウ酸塩、および鉄、銅、マンガン、および亜鉛の硫酸塩から選択されるものを含む。有機窒素源、例えば、ペントン、トリプトン、アミノ酸、または酵母抽出物は、無機塩培地には含まれていない。代わりに無機窒素源が使用され、例えば、アンモニウム塩、水性アンモニア、およびガス状アンモニアから選択され得る。特定の無機塩培地は、グルコースを炭素源として含有する。無機塩培地と比較すると、最少培地は無機塩および炭素源も含有し得るが、例えば、低レベルのアミノ酸、ビタミン、ペプトン、または他の成分を、これらは最小限のレベルで添加されるが添加し得る。

【0227】

1つの実施形態において、培地は以下の表16に挙げた成分を使用して調製され得る。成分は以下の順序で添加され得る：最初に  $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  およびクエン酸を蒸留水約30リットルに溶解させ得る；次に微量元素の溶液を添加して、消泡剤、例えば、Ucolub N 115の添加を続ける。次に加熱滅菌（例えば、約121 にて）の後、グルコース  $\text{MgSO}_4$  およびチアミン-HCLの滅菌溶液を添加され得る。約6.8でのpHの制御は、水性アンモニアを使用して実施され得る。次に滅菌蒸留水を添加して、371マイナスグリコールストック（123mL）の初期体積まで調整する。化学薬品は、種々の供給者、たとえばMerckから入手され得る。この培地は、シュードモナス (Pseudomonas) 種および関連細菌の増殖のための高細胞密度培養 (HCD) を可能にし得る。HCDは、バッチプロセスとして開始可能であり、2相バッチ供給培養が続く。バッチ部の制限されない増殖の後、増殖は、低下した比増殖速度にて、バイオマス濃度が数倍上昇可能である3倍増時間の期間に渡って制御され得る。そのような培養プロセスのさらなる詳細は、Riesenber, D.; Schulz, V.; Knorre, W. A.; Pohl, H. D.; Korz, D.; Sanders, E. A.; Ross, A.; Deckwer, W. D. (1991) 「High cell density cultivation of Escherichia coli at controlled specific growth rate」 J Biotechnol:20(1)17-27によって記載されている。

【0228】

本発明による発現系は、いずれの発酵形式でも培養され得る。例えば、本明細書では、バッチ、供給バッチ、半連続、および連続発酵方式が利用され得る。

【0229】

本発明による発現系は、いずれの発酵スケール（例えば、体積）でも導入遺伝子発現に有用である。したがって、例えば、マイクロリットルスケール、センチリットルスケール、およびデシリットルスケール発酵体積が使用され得る；そして1リットルスケールおよびそれ以上の発酵体積が使用され得る。1つの実施形態において、発酵体積は、1リットルまたはそれ以上となる。別の実施形態において、発酵体積は約5リットル、10リットル、15リットル、20リットル、25リットル、50リットル、75リットル、100リットル、200リットル、500リットル、1,000リットル、2000リットル、5,000リットル、10,000リットルあるいは50,000リットルまたはそれ以上となる。

【0230】

本発明において、形質転換宿主細胞の増殖、培養、および/または発酵は、宿主細胞の生存を可能にする温度範囲、好ましくは約4 ~ 約55（その温度を含む）の範囲内の温度で実施される。

## 【 0 2 3 1 】

## 細胞密度

組換えタンパク質の発現で蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) を使用するさらなる利点には、大腸菌 (*E. coli*) または他の細胞発現系と比較して、高い細胞密度で増殖する蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) の能力が含まれる。このために、本発明による蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 発現系は、約 20 g / L またはそれ以上の細胞密度を供給し得る。本発明による蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 発現系は同様に、容量当たりのバイオマスによって示すように、少なくとも約 70 g / L の細胞密度を提供することが可能であり、バイオマスは、乾燥細胞重量として測定される。

## 【 0 2 3 2 】

1つの実施形態において、細胞密度は、少なくとも 20 g / L である。別の実施形態において、細胞密度は少なくとも 25 g / L、30 g / L、35 g / L、40 g / L、45 g / L、50 g / L、60 g / L、70 g / L、80 g / L、90 g / L、100 g / L、110 g / L、120 g / L、130 g / L、140 g / L、または少なくとも 150 g / L である。

## 【 0 2 3 3 】

別の実施形態において、誘導時の細胞密度は、20 g / L ~ 150 g / L ; 20 g / L ~ 120 g / L ; 20 g / L ~ 80 g / L ; 25 g / L ~ 80 g / L ; 30 g / L ~ 80 g / L ; 35 g / L ~ 80 g / L ; 40 g / L ~ 80 g / L ; 45 g / L ~ 80 g / L ; 50 g / L ~ 80 g / L ; 50 g / L ~ 75 g / L ; 50 g / L ~ 70 g / L ; 40 g / L ~ 80 g / L である。

## 【 0 2 3 4 】

## 組換えタンパク質の発現レベル

本発明による発現系は、トランスジェニックポリペプチドを全細胞タンパク質 (%tcp) 5 % ~ 80 % のレベルで発現し得る。1つの実施形態において、発現レベルは、5 %、8 %、10 %、12 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、または 80 % tcp またはそれ以上である。

## 【 0 2 3 5 】

## 単離および精製

本発明によって生成された組換えタンパク質は、これに限定されるわけではないが、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ニッケルクロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィー、分取用電気泳動、界面活性剤可溶化、カラムクロマトグラフィーなどの物質を用いた選択的沈殿、免疫精製法、およびその他を含む、当該分野で周知の標準技術によって単離され、実質的に純粋になるまで精製される。例えば、確立された分子接着特性を有するタンパク質は、ガンドを可逆的に融合し得る。適切なリガンドを用いると、タンパク質は精製カラムに選択的に吸着され、次に比較的純粋な形でカラムから遊離され得る。次に融合タンパク質は、酵素活性によって除去される。さらに、タンパク質は、免疫アフィニティカラムまたは Ni-NTA カラムを使用して精製され得る。一般技術はさらに、例えば、R. Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag: N. Y. (1982); Deutscher, *Guide to Protein Purification*, Academic Press (1990); U. S. Pat. No. 4,511, 503; S. Roe, *Protein Purification Techniques: A Practical Approach* (Practical Approach Series), Oxford Press (2001); D. Bollag, et al., *Protein Methods*, Wiley-Liss, Inc. (1996); AK Patra et al., *Protein Expr Purif*, 18(2): p/182-92 (2000); および R. Mukhija, et al., *Gene* 165(2): p.303-6 (1995) に記載されている。例えば、Ausubel, et al. (1987 and periodic supplements); Deutscher (1990) 「*Guide to Protein Purification*,」 *Methods in Enzymology* vol. 182, およびこのシリーズの他の巻; Coligan,

10

20

30

40

50

et al.(1996 and periodic Supplements) Current Protocols in Protein ScienceWiley/Greene, NY;およびタンパク質精製製品の使用に関するメーカーの文献、例えば、Pharmacia, Piscataway, N.J., またはBio-Rad, Richmond, Califも参照。組換え技術との組合せは、適切なセグメントへの、例えば、FLAG配列またはプロテアーゼ除去型配列を介して融合され得る同等物への融合を可能にする。例えば、Hochuli(1989) *Chemische Industrie* 12: 69-70; Hochuli(1990) 「Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent」 in Setlow(ed.) *Genetic Engineering, Principle and Methods* 12: 87-98, Plenum Press, NY; and Crowe, et al.(1992) *QIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System* QUIAGEN, Inc., Chatsworth, Calif.も参照。

10

#### 【0236】

発現タンパク質の検出は、当該分野で公知の方法によって実施され、例えば、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロッティング技術または免疫沈降を含む。

#### 【0237】

組換え生成および発現酵素は、組換え細胞培養物から種々の方法によって回収および精製可能であり、例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、必要に応じて最終精製ステップで利用され得る。

#### 【0238】

本発明で発現されるあるタンパク質は、不溶性凝集体(「封入体」)を形成する。複数のプロトコルが封入体からのタンパク質の精製に適している。例えば、封入体の精製は、典型的には、宿主細胞の破壊によって、例えば、50 mM TRIS / HCL pH 7.5、50 mM NaCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、0.1 mM ATP、および1 mM PMSFの緩衝液中でのインキュベーションによって、封入体の抽出、分離および/または精製を包含する。細胞懸濁物は、典型的には、フレンチプレスによって2~3継代を使用して溶解させる。細胞懸濁物は、Polytron (Brinkman Instruments) を使用してホモジナイズするか、または氷上で超音波処理され得る。細菌を溶解する代替の方法は、当業者には明らかである(例えば、Sambrook et al., supra; Ausubel et al., supra)を参照。

20

#### 【0239】

必要ならば封入体は溶解させることが可能であり、典型的には、溶解された細胞懸濁物を遠心分離にかけて望ましくない不溶性物質を除去する。封入体を形成するタンパク質は、適合性緩衝液を用いた希釈または透析によって復元され得る。適切な溶媒は、これに限定されるわけではないが、尿素(約4 M~約8 M)、ホルムアミド(少なくとも約80%、体積/体積ベース)、およびグアニジンヒドロクロライド(約4 M~約8 M)を含む。グアニジンヒドロクロライドおよび同様の薬剤は変性剤であるが、この変性は非可逆的であり、変性は変性剤の除去(例えば、透析による)または希釈時に起こり、免疫および/または生物活性タンパク質の再生成を可能にする。他の適切な緩衝液は当業者に公知である。

30

#### 【0240】

あるいは、宿主周辺質からの組換えタンパク質またはペプチドを精製することが可能である。宿主細胞の溶解後、組換えタンパク質が宿主細胞の周辺質に搬出されるときに、細菌の周辺質画分を、当業者に公知の他の方法に加え、低温浸透圧衝撃によって単離し得る。例えば、周辺質から組換えタンパク質を単離するために、細菌細胞を遠心分離してペレットを作製し得る。ペレットは、20%スクロースを含有する緩衝液中に再懸濁させ得る。細胞を溶解させるために、細菌を遠心分離することが可能であり、ペレットを氷冷5 mM MgSO<sub>4</sub>に再懸濁させて、氷浴で約10分間保持し得る。細胞懸濁物を遠心分離して、上澄みをデカンテーションして、保存し得る。上澄み中に存在する組換えタンパク質は、当業者に周知の標準分離技術によって宿主タンパク質から分離され得る。

40

#### 【0241】

初期塩画分は、望ましくない宿主細胞タンパク質(または細胞培養培地に由来するタン

50

パク質)の多くを目的の組換えタンパク質から分離し得る。1つのそのような例は、硫酸アンモニウムでありうる。硫酸アンモニウムは、タンパク質混合物中の水の量を効果的に減少させることによってタンパク質を沈殿させる。次にタンパク質はその溶解度に基づいて沈殿する。タンパク質が疎水性になればなるほど、より低い硫酸アンモニウム濃度でより沈殿しやすくなる。代表的なプロトコルは、得られる硫酸アンモニウム濃度が20~30%となるように、飽和硫酸アンモニウムをタンパク質溶液に添加することを含む。この濃度は、最も疎水性のタンパク質を沈殿させる。次に沈殿物を廃棄して(目的のタンパク質が疎水性でない限り)、硫酸アンモニウムを、目的のタンパク質を沈殿させることが公知である喉まで上澄みに添加する。次に沈殿物を緩衝液に可溶化させて、過剰な塩を必要に応じて透析またはダイアフィルトレーションのいずれかによって除去する。タンパク質の溶解度に依存する他の方法、例えば、冷エタノール沈殿は、当業者に周知であり、複合タンパク質混合物を分画するために使用され得る。

10

#### 【0242】

組換えタンパク質の分子量は、種々の孔径の膜(例えば、AmiconまたはMillipore膜)を通じた限外濾過を通じて、それをより大きいまたはより小さいサイズのタンパク質から単離するために使用され得る。第1のステップとして、タンパク質混合物は、目的のタンパク質の分子量よりも低い分子量カットオフを有する孔径を備えた膜を通じて濾過し得る。次に限外濾過の保持液を目的のタンパク質の分子量よりも大きい分子量カットオフを備えた膜に対して限外濾過し得る。組換えタンパク質は、膜を通じて濾液中へ通過する。次に濾液を以下で記載するようにクロマトグラフにかけ得る。

20

#### 【0243】

組換えタンパク質は、そのサイズ、正味の表面電荷、疎水性、およびリガンドへの親和性に基づいて、他のタンパク質から分離し得る。さらに、タンパク質に対して産生された抗体は、カラムマトリクスおよび免疫精製されたタンパク質に結合し得る。これらの方法すべては、当該分野で周知である。クロマトグラフ技術がいずれのスケールでも、多くの種々メーカー(例えば、Pharmacia Biotech)からの機器を使用して実施し得ることは、当業者に明らかとなる。

#### 【0244】

復元および再折畳み

不溶性タンパク質は、2級または3級タンパク質構造配座を生成するために復元または再折畳みし得る。組換え産物の形態を完成させるために、タンパク質再折畳みステップを必要に応じて使用し得る。再折畳みおよび復元は、タンパク質の解離/会合を促進するために、当該分野で公知の薬剤を使用して実施され得る。例えば、タンパク質は、チオスレイトールを用いてインキュベートすることが可能であり、酸化グルタチオンジナトリウム塩によるインキュベーションが続き、再折畳み剤、例えば、尿素を含有する緩衝液によるインキュベーションが続く。

30

#### 【0245】

組換えタンパク質も、例えば、それをホスフェート緩衝食塩水(PBS)または50 mM Na-アセテート、pH 6緩衝液プラス200 mM NaClに対して透析することによって復元され得る。あるいは、タンパク質を再折畳みして、同時にプロテアーゼインヒビタを含有する500 mM NaCl、20%グリセロール、20 mM Tris/HCl pH 7.4中の直鎖6 M~1 M尿素勾配を使用して、カラム、例えば、Ni-NTAカラムに固定化し得る。復元は、1.5時間またはそれ以上の期間に渡って実施され得る。復元後、タンパク質は、250 mM イミダゾールの添加によって溶離され得る。イミダゾールは、PBSまたは50 mM ナトリウムアセテート、pH 6緩衝液プラス200 mM NaClに対する最終透析ステップによって除去され得る。精製タンパク質は、4にて保管または-80にて凍結され得る。

40

#### 【0246】

他の方法は、MH Lee et al., Protein Expr. Purif., 25(1): p.166-73(2002), W. K. Cho et al., J. Biotechnology, 77(2-3): p.169-78(2000), Ausubel, et al. (1987 an

50

d periodic supplements), Deutscher(1990) 「Guide to Protein Purification,」 Methods in Enzymology vol.182, and other volumes in this series, Coligan, et al. (1996 and periodic Supplements) Current Protocols in Protein Science Wiley/Greene, NY, S. Roe, Protein Purification Techniques: A Practical Approach (Practical Approach Series), Oxford Press(2001); D. Bollag, et al., Protein Methods, Wiley-Liss, Inc. (1996)に記載されているものを含む。

#### 【 0 2 4 7 】

##### V I . 組換えポリペプチド

本発明は、細菌発現系における改良されたタンパク質生成法を提供する。本発明で利用され得る組換えポリペプチドの例は、原核および真核生物に由来するポリペプチドを含む。そのような生物は、原生生物、菌類、植物、および動物界からの生物を含む、古細菌、細菌、真核生物ドメインからの生物が挙げられる。

#### 【 0 2 4 8 】

本発明で利用され得るタンパク質の種類は、非制限的な例であるが、例えば、生細胞の数千の化学反応の触媒に関与する酵素；構造または支持タンパク質の重要な型であるケラチン、エラスチン、およびコラーゲン；ヘモグロビンおよび他の気体運搬タンパク質；オボアルブミン、カゼイン、および他の栄養分子；免疫系の分子である抗体；代謝を調節するタンパク質ホルモン；および機械的作業を遂行するタンパク質（例えば、収縮筋タンパク質であるアクチンおよびミオシン）が挙げられる。

#### 【 0 2 4 9 】

他の特定の非制限的なポリペプチドは、分子、例えば、ヒト成長ホルモンを含む成長ホルモンである、レニン；ウシ成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポタンパク質；アルファ1 - 抗トリプシン；インスリンA鎖；インスリンB鎖；プロインスリン；トロノボポイエチン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；凝固因子（例えば、因子V I I I C、因子I X、組織因子、およびvon Willebrands因子）；抗凝固因子（例えば、プロテインC）；心房性ナトリウム利尿因子；肺表面活性剤；プラスミノゲンアクチベータ（例えば、ウロキナーゼまたはヒト尿または組織型プラスミノゲンアクチベータ（t - P A））；ボンベシン；トロロピン；造血増殖因子；腫瘍壊死因子 - アルファおよび - ベータ；エンケファリナーゼ；血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン；ミューラー阻害物質；レラキシンA鎖；レラキシンB鎖；プロレラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；細菌性タンパク質、例えば、ベータラクタマーゼ；D n a s e；インヒビリン；アクチビン；血管内皮増殖因子（VEGF）；ホルモンまたは増殖因子のレセプタ；インテグリン；プロテインAまたはD；リウマチ因子；神経栄養因子（例えば、脳由来神経栄養因子（B D N F）、ニューロトロフィン - 3、 - 4、 - 5、または - 6（N T - 3、N T - 4、N T - 5、またはN T - 6））、あるいは神経増殖因子（例えば、N G F - ベータ）；カルジオトロピン（心臓肥大因子）（例えば、カルジオトロピン - 1（CT-1））；血小板由来増殖因子（P D G F）；線維芽細胞増殖因子（例えば、aFGFおよびbFGF）；上皮増殖因子（E G F）；形質転換増殖因子（T G F）（例えば、T G F - アルファおよびT G F - ベータ1、T G F - ベータ2、T G F - ベータ3、T G F - ベータ4、またはT G F - ベータ5を含む、T G F - ベータ）；インスリン様増殖因子 - Iおよび - I I（I G F - IおよびI F - I I）；d e s（1 - 3） - I G F - I（脳I G F - I）、インスリン様増殖因子結合タンパク質；C Dタンパク質（例えば、C D - 3、C D - 4、C D - 8、およびC D - 19）；エリスロポエチン；骨誘導因子；免疫毒素；骨形成タンパク質（B M P）；インターフェロン、例えば、インターフェロン - アルファ、 - ベータ、および - ガンマ；コロニー刺激因子（C S F）（例えば、M - C S F、G M - C S F、およびG - C S F）；インターロイキン（I L s）（例えば、I L - 1 ~ I L - 10）；抗H E R - 2抗体；スーパーオキシドジスムターゼ；T細胞レセプタ；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；ウィルス抗体、例えば、A I D Sエンベロープの部分；輸送タンパク質；ホーミングレセプタ；アドレシン；調節タンパク質；抗体；および上に挙げたポリペプチドのいずれかの断片を含む。

## 【0250】

本発明に従って発現される組換えペプチドは、標的ポリペプチドコード配列が転写および翻訳調節要素に作動可能に結合され、宿主細胞がタンパク質またはペプチドを発現し得る機能性遺伝子を形成するポリヌクレオチドから発現されることが可能である。コード配列は、利用可能な場合には標的ポリペプチドの天然のコード配列でありうるが、より好ましくは、選択した発現宿主細胞で使用するために選択、改良または最適化されたコード配列となる：例えば、シュードモナス（*Pseudomonas*）種、例えば、蛍光菌（*Pseudomonas fluorescens*）のコードン使用バイアス（codon use bias）を反映するために遺伝子を合成することによる。生じる遺伝子は、1つまたはそれ以上のベクター内で作製されるか、1つまたはそれ以上のベクター内に挿入され、次に発現宿主細胞に形質転換される。「発現可能な形態」で供給されると記載された核酸またはポリヌクレオチドは、選択した細菌発現宿主細胞によって発現させ得る少なくとも1つの遺伝子を含有する核酸またはポリヌクレオチドを意味する。

10

## 【0251】

分子遺伝学および遺伝子工学技術に必要な広範囲に渡る配列情報は、幅広く公に入手され得る。ヒトと同様に哺乳類のヌクレオチド配列、遺伝子、cDNA配列、アミノ酸配列およびゲノムの入手は、GenBankからURLアドレス<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>にて達成され得る。追加情報も、Weizmann Institute of Science Genome and Bioinformatics (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards/>) による、遺伝子およびその産物に関する情報ならびに生物医学用途を統合する電子百科事典であるGeneCardsから得られ、ヌクレオチド配列情報も、EMBLヌクレオチド配列データベース (<http://www.ebi.ac.uk/emb1/>) またはDNA Databank of Japan (DDBJ、<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) から入手され得る；アミノ酸配列に関する情報の追加サイトは、Georgetown's protein information resource website (<http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) およびSwiss-Prot (<http://au.expasy.org/sprot/sprot-top.html>) を含む。

20

## 【実施例1】

## 【0252】

蛍光菌（*P. fluorescens*）宿主細胞発現系のpyrF選択マーカ系の作製

試薬は、別途記載しない限りSigma-Aldrich（セントルイス、ミズーリ州）より入手した。LBは、ゼラチンカプセル（BIO 101）内の10g/Lトリプトン、5g/L酵母抽出物および5g/L NaClである。必要な場合、ウラシル（BIO 101より、カールスバッド、カリフォルニア州）またはL-プロリンを最終濃度250ug/mLまで添加し、テトラサイクリンを15ug/mLまで添加した。LB/5-FOAプレートは、LBを250mM ウラシルおよび0.5mg/mL 5-フルオロオロチン酸（5-FOA）と共に含有している。M9培地は、6g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、3g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1g/L NH<sub>4</sub>Cl、0.5g/L NaCl、10mM MgSO<sub>4</sub>、1xHoLe微量元素溶液、pH7より成る。グルコースを最終濃度1%まで添加した。1000xHoLe微量元素溶液は、2.85g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、1.8g/L MnCl<sub>2</sub>・4H<sub>2</sub>O、1.77g/L ナトリウムタートレート、1.36g/L FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.04g/L CoCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O、0.027g/L CuCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O、0.025g/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O、0.02g/L ZnCl<sub>2</sub>である。

30

40

## 【0253】

本明細書で使用するオリゴヌクレオチド

MB214pyrF1（NotI部位は太字）

5' GCGGCCGCTTTGGCGCTTCGTTTACAGG-3'（配列番号14）

MB214pyrR1（PvuI部位は太字；KpnI部位は下線付き太字）

5' CGATCGGGTACCTGTCGAAGGGCTGGAGACAT-3'（配列番号15）

pyrFPstF（PstI部位は太字）

50



5' - A A C T G C A G G A T C A G T T G C G G A G C C T T G G - 3' (配列番号 16)

pyrF overlap

5' - T G C T C A C T C T A A A A A T C T G G A A T G G G C T C T C A G G C - 3' (配列番号 17)

pyrFXbaR2 (XbaI 部位は太字)

5' - G C T C T A G A T G C G T G G C T G G A T G A A T G A A - 3' (配列番号 18)

pyranalF

5' - G G C G T C G A A C A G G T A G C C T T - 3' (配列番号 19)

pyranalR

5' - C T C G C C T C C T G C C A C A T C A A - 3' (配列番号 20)

M13F (-40)

5' - C A G G G T T T T C C C A G T C A C G A - 3' (配列番号 21)

【0254】

蛍光菌 (*P. fluorescens*) からの pyrF 遺伝子のクローニング

pyrF 遺伝子は、蛍光菌 (*P. fluorescens*) からポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅によって、それぞれ pyrF 遺伝子開始コドンから 297 bp 上流、およびその停止コドンから 212 bp 下流をそれぞれ結合するプライマー MB214pyrF1 および MB214pyrR1 を使用してクローニングされる。制限部位は、プライマーの 5' 端に含まれて、クローニング反応をさらに促進する。pyrF 読み取り枠 (ORF) 上流の増幅領域は、pyrF の上流を含む天然のプロモーターを含むのに十分な長さとして判断される。転写ターミネーターであり得る ORF の 14 ~ 117 bp 下流の強力なステムループ構造も、下流フランキング領域に含まれていた。

【0255】

pyrF 遺伝子を PCR 増幅するために、高忠実度 PROOFSTART DNA ポリメラーゼを、メーカー (Qiagen、バレンシア、カリフォルニア州) によって供給された緩衝液、0.3 mM dNTP (Promega、マジソン、ウィスコンシン州)、MB214pyrF1 および MB214pyrR1 プライマー各 1 μM、および蛍光菌 (*P. fluorescens*) MB214 からのゲノム DNA 約 0.3 μg を含有する反応体積 50 μL 中で混合した。増幅条件は、95 °C にて 5 分間、続いて 94 °C にて変性 30 秒間、57 °C にてアニーリング 30 秒間、および 72 °C にて伸長 2 分間の 35 サイクル、続いて 72 °C にて 10 分間の最終ステップであった。反応物を SEAKEM GTG アガロースの 1% ゲル (BioWhittaker Molecular Applications より、ロックランド、メイン州) 上で分離した。予想された 1.2 kb バンドをゲルから切除して、Millipore (ベッドフォード、マサチューセッツ州) カラムからの ULTRAFREEE-D 遠心分離ゲルネブライザでの抽出によって精製し、MICROBIO SPIN 6 P-6 ポリアクリルアミドスピンカラム (Bio-Rad より、ハーキュリーズ、カリフォルニア州) を用いて Tris-HCl 緩衝液中へ脱塩した。

【0256】

クローニングした遺伝子は、オロチジン 5' ホスフェートデカルボキシラーゼをコードする単一の ORF を含有していた。遺伝子の同一性は、以前に報告されているように (Strych et al., 1994)、P. アエルギノーサ (*P. aeruginosa*) 由来の pyrF 遺伝子に対する遺伝子全長に沿ったその高い類似性 (3.3 × 10<sup>-78</sup> の P 値) (232 残基中 209) によって、pyrF としてさらに確認された。使用した蛍光菌 (*P. fluorescens*) 菌株は、いずれの pyrF 遺伝子の他のコピーも含有しないことが見出された。

【0257】

配列決定は、Dow Chemical Company が実施した。pyrF 配列は、配列番号 1 内に示される。

【0258】

10

20

30

40

50

p y r F ( - ) 蛍光菌 ( *P. fluorescens* ) の作製

p y r F ( - ) 蛍光菌 ( *P. fluorescens* ) を作製するために、細胞のゲノム p y r F 遺伝子を、間のORFを欠失させて、遺伝子の開始および停止コドンを含めることにより改変した。欠失は、試験管内で非複製プラスミド上の p y r F 領域に隣接する上流および下流領域を融合させて、次に対立遺伝子交換、すなわち相同組換えを使用して、MB 101 内因性 p y r F 遺伝子を欠失対立遺伝子と置換することによって行った。

【 0 2 5 9 】

フランキング領域の融合物を作製するために、「メガプライマー」法 ( Barik 1997 ) を使用して、それにより所望の欠失の上流、そして次に下流の領域を P C R により、所望の欠失の両側で相同性を備えた重複プライマーを使用して続いて増幅させて、フランキング領域が結合して、p y r F O R F を除外させる。上流領域は、Proofstartポリメラーゼ ( Qiagen ) を上記のように使用して、プライマー p y r F P s t F および p y r F o v e r l a p を用いて、伸長時間 1 分間で MB 214 ゲノム DNA から増幅した。グラスミルク ( Bio 101 による GENE CLEAN Spin Kit 、カールスバッド、カリフォルニア州、米国 ) への結合を使用したゲル精製の後、1 k B 産物を第 2 の増幅の「メガプライマー」として使用した。

【 0 2 6 0 】

この第 2 のステップで所望の産物を増幅するのが困難であったため、テンプレート品質を向上させるために、ゲノム p y r F 領域を含有するテンプレートを P C R 増幅によって作製した。H O T S T A R T A Q DNAポリメラーゼ ( Qiagen より、バレンシア、カリフォルニア州 ) は、蛍光菌 ( *P. fluorescens* ) ゲノム DNA ならびに p y r F P s t F および p y r F X b a R 2 プライマーと共に使用した。次にメガプライマーおよび p y r F X b a R 2 プライマーをこのテンプレートおよび H O T S T A R T A Q ポリメラーゼと共に使用して、欠失産物を P C R によって、95 にて 15 分間、続いて 94 にて変性 30 秒間、59 にてアニーリング 30 秒間、および 72 にて伸長 2 分間の 30 サイクル、続いて 72 にて 3 分間の最終ステップの反応条件を使用して増幅された。予想された 2 k B バンドを多数の他の産物からゲル電気泳動によって分離して、次に上記のようにゲル精製し、メーカーの指示に従ってプラスミド p C R 2 . 1 T o p o ( Invitrogen より、カールスバッド、カリフォルニア州 ) 内ヘクローニングして、p D O W 1 2 1 5 - 7 を形成した。p D O W 1 2 1 5 - 7 の P C R 増幅領域の配列決定は、増幅プロセスによって導入された 3 つの変異があることを示した ; 3 つの変化はすべて、p y r F の停止コドンの下流 112 b p 以内であった。この区域の配列決定は、反応プロセスがこの区域内で停止したため困難であった。この区域によってコードされる RNA の 2 次構造の M - F O L D ( G C G ) による解析は、非常に安定なステムループ構造および r h o 独立転写ターミネーターを特徴とする一連のウリジン残基の存在を示した。読み取り枠内では、変異は発生しなかった。

【 0 2 6 1 】

p D O W 1 2 1 5 - 7 を MB 101 内で染色体 p y r F 遺伝子を欠失させるために使用した。これをするために、最初に、Artiguenave et al. (1997) の手順に従って作製したエレクトロコンピテント蛍光菌 ( *P. fluorescens* ) 細胞を、精製プラスミド 0.5 μ g を用いて形質転換した。形質転換体は、カナマイシン 50 μ g / m L を含む LB 培地で平板培養することによって選択した。このプラスミドは、蛍光菌 ( *P. fluorescens* ) 内で複製できず、したがってカナマイシン耐性コロニーは、染色体に組み込まれるプラスミドから生じる。プラスミドの組み込み部位は、H O T S T A R T A Q ポリメラーゼおよびプライマー p r y a n a 1 F および M 13 F ( ~ 40 ) を使用して、57 でのアニーリングおよび伸長時間 4 分間で P C R によって解析した。10 個の単離体のうち 1 個 ( MB 101 : : p D O W 1 2 1 5 - 7 # ) が下流領域への p D O W 1 2 1 5 - 7 の挿入を含有し ( 2.8 k b 解析産物 ) 、残りの 9 個は上流領域であった ( 2.1 k b 解析産物 ) 。

【 0 2 6 2 】

第 2 に、相同領域間の組換えによって組み込みプラスミドを失った菌株を同定するため

10

20

30

40

50

に、以下の解析PCR手順を使用した：単一のコロニーからのMB101::pDOW1215-7#2を250mMウラシルを添加したLBに接種して、一晚増殖させて、次にLB-ウラシルおよび500μg/mL 5-フルオロオロチン酸(5-FOA-Zymo Research、オレンジ、カリフォルニア州)上で平板培養した。8個のコロニーを、57℃でのアニーリングおよび伸長4分で、HOTSTARTAQならびにプライマーpyrana1Fおよびpyrana1Rを用いてPCRによって解析した。親MB101からの増幅産物の予想サイズは3.2kBであり、pyrF遺伝子が欠失している場合には、2.5kBであった。各コロニーは、pyrFの欠失から予想された2.5kBバンドを発生させた。第1の3つの単離体を精製して、PFG116、PFG117、およびPFG118(DC36としても公知)と命名した。3つの単離体は、pyrF欠失から予想される表現型を示し、すなわちそれらはカナマイシンに感受性であり、ウラシルは増殖に必要であり、それらは5-FOAに対して耐性である。PFG118のDNA配列は、pDOW1215-7内の増幅領域の配列と同じであった；すなわち、pyrFからすぐ下流のステムループ構造内の3つの変異が、pyrF欠失に沿ってPFG118ゲノム内に包含される。

#### 【0263】

蛍光菌(*P.fluorescens*)発現系における選択マーカーとしてのpyrF遺伝子の使用  
pyrF遺伝子が選択マーカーとして作用する能力は、tacプロモーターの制御下で既存のテトラサイクリン耐性マーカーおよび標的酵素コード配列の両方を含有するpMYC発現プラスミド内へクローニングすることによって試験した。このために、プラスミドpMYC5088を、ウシ血清アルブミン(BSA)(New England Biolabsより、ピバリー、マサチューセッツ州)のNEB緩衝液4および0.1mg/mLを使用して、反応物50μL中でSnaBIを用いて37℃にて2時間消化した。次に反応混合物を70℃にて20分間処理して酵素を不活性化し、次に上記のようにゲル精製した。SnaBI消化pMYC5088 60ngは、FAST-LINK DNAライゲーションキット(Epicentre Technologies、マジソン、ウィスコンシン州)を使用して、MB214pyrF1-MB214pyrR1 PCR産物 50ngに連結させた。25℃での1時間後、混合物を70℃にて20分間処理することによって、反応を停止させた。次に結果は、メーカーが推奨する条件を使用して、ケミカルコンピテントJM109大腸菌(*E.coli*)細胞(Promega Corp.、マジソン、ウィスコンシン州)に形質転換した。

#### 【0264】

形質転換体は、テトラサイクリンを15μg/mLで含有するLB培地上で選択した。プラスミドDNAをQiaPrep Spin Miniprep Kit(Qiagen、バレンシア、カリフォルニア州)を使用して12個の単離体から調製し、NotIおよびEcoRIを用いてスクリーニングして、このことは1個の単離体が所望のクローンpDOW1249-2を含むことを示した(図2)。プラスミドpDOW1249-2を、lacIリプレッサー発現カセットおよびカナマイシン耐性マーカー遺伝子を含有するpCNプラスミドを含有するpyrF(-)蛍光菌(*P.fluorescens*)内へ形質転換した。単離体を振とうフラスコおよび20L発酵槽内で試験した。

#### 【0265】

DOW1249-2プラスミドへの選択圧のみがプラスミドのpyrF遺伝子が染色体内のpyrF欠失を補完する能力によって供給されるように、単離体をテトラサイクリンを含まない、最小塩培地およびカナマイシン中で培養した。SDS-PAGE解析によって決定されるように、振盪フラスコ試験で新しい菌株によって産生された標的タンパク質の量は、pDOW1249-2内のpyrF遺伝子の非存在を除いて、対照菌株である、同じ2つのプラスミドを含有するゲノムpyrF(+)蛍光菌(*P.fluorescens*)対照系の量と同様であり、同じであるが、プラスミドを維持するためにテトラサイクリンをさらに添加した培地上で増殖した(データは示さず)。20Lスケールでのさらなる解析のために、2つの菌株をSDS-PAGEゲルで見られた標的タンパク質の量および振とうフラスコ内でのOD<sub>575</sub>値に基づいて選択した。両方の菌株が、対照菌株で見られる正常範

10

20

30

40

50

図内の標的タンパク質の蓄積レベルを示した（図１）。

## 【実施例２】

### 【０２６６】

蛍光菌（*P.fluorescens*）宿主細胞発現系における *p y r F - p r o C* デュアル栄養要求性選択マーカー系の作製

本明細書で使用したオリゴヌクレオチド

*p r o C 1*

5' - A T A T G A G C T C C G A C C T T G A G T C G G C C A T T G - 3'（配列番号 22）

*p r o C 2*

5' - A T A T G A G C T C G G A T C C A G T A C G A T C A G C A G G T A C A G - 3'（配列番号 23）

*p r o C 3*

5' - A G C A A C A C G C G T A T T G C C T T - 3'（配列番号 24）

*p r o C 5*

5' - G C C C T T G A G T T G G C A C T T C A T C G - 3'（配列番号 25）

5' - G A T A A A C G C G A A G A T C G G C G A G A T A - 3'（配列番号 26）

*p r o C 7*

5' - C C G A G C A T G T T T G A T T A G A C A G G T C C T T A T T T C G A - 3'（配列番号 27）

*p r o C 8*

5' - T G C A A C G T G A C G C A A G C A G C A T C C A - 3'（配列番号 28）

*p r o C 9*

5' - G G A A C G A T C A G C A C A A G C C A T G C T A - 3'（配列番号 29）

*g e n F 2*

5' - A T A T G A G C T C T G C C G T G A T C G A A A T C C A G A - 3'（配列番号 30）

*g e n R 2*

5' - A T A T G G A T C C C G G C G T T G T G A C A A T T T A C C - 3'（配列番号 31）

*X b a N o t D r a U 2* リンカー

5' - T C T A G A G C G G C C G C G T T - 3'（配列番号 32）

*X b a N o t D r a L* リンカー

5' - G C G G C C G C T C T A G A A A C - 3'（配列番号 33）

### 【０２６７】

蛍光菌（*P.fluorescens*）からの *p r o C* のクローニングおよび *p r o C* を含有する *p C N* 発現プラスミドの作製

*p r o C* を含む *p C N 5 1 1 a c I* への抗生物質耐性遺伝子の配置

*p r o C* O R F および隣接する上流および下流配列の約 100bp を MB101 ゲノム DNA から、*p r o C 1* および *p r o C 2* を使用して、アニーリング温度 56 および伸長 1 分間で増幅させた。1kB 産物のゲル精製および *SacI* を用いた消化の後、断片を *S a c I* 消化 *p D O W 1 2 4 3*（ポリリンカーの添加および *k a n R* のゲンタマイシン耐性遺伝子との置換による、*p C N 5 1 1 a c I* に由来するプラスミド）内へクローニングして、*p D O W 1 2 6 4 - 2* を作製した。このプラスミドを *p r o C*（-）ミュータント株 *P F G 9 3 2* 内で、*p D O W 1 2 4 9 - 2* からのアミラーゼ合成を調節するその能力について試験した。20L スケールでの発現標的酵素産生レベルは、デュアル抗生物質耐性マーカー対照菌株 *D C 8 8* のレベルと同様であった（データは示さず）。

### 【０２６８】

次に *g e n R* 抗生物質マーカー遺伝子は *p D O W 1 2 6 4 - 2*（図 3）から除去して、*p r o C* および *l a c I* を持つ、抗生物質マーカーを含まないプラスミドを作製した。g

10

20

30

40

50

e n R 遺伝子の除去は、p D O W 1 2 6 4 - 2 の B a m H I による制限消化、6 . 1 k B 断片の精製、それ自体への連結、および p r o C ( - ) 蛍光菌 ( P . fluorescens ) 宿主 P F G 1 0 1 6 内への電気泳動によって実施される。単離体は、E c o R I を使用した制限消化によって確認した。得られたプラスミドを p D O W 1 3 0 6 - 6 と命名した。E c o R I を用いた分析制限消化および B a m H I 接合部に渡る配列決定は、プラスミドの同一性およびその中の遺伝子の適正な定位を裏付けた。

#### 【 0 2 6 9 】

配列決定は、ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー ( The Dow Chemical Company ) が実施した。p r o C 配列は、配列番号 4 内に示される。

#### 【 0 2 7 0 】

抗生物質耐性マーカーの代わりに p y r F マーカーを含有する標的酵素発現プラスミドの作製

t a c プロモーター制御下の標的酵素コード遺伝子を含有する抗生物質マーカーを含まない生成プラスミド、p D O W 1 2 6 9 - 2 を、t e t R / t e t A 遺伝子を除去するために P v u I を用いた p D O W 1 2 4 9 - 2 の制限消化によって作製した。M B 2 1 4 からの p y r F 遺伝子の挿入により p M Y C 5 0 8 8 に由来する p D O W 1 2 4 9 - 2 は、実施例 1 で記載するように作製した。10 . 6 k B P v u I 断片をゲル精製して、それ自体に連結させて、電気穿孔によって P F G 1 1 8 / p C N 5 1 1 a c I へ形質転換させて、( p C N 5 1 1 a c I を維持するために ) カナマイシンを含有する M 9 グルコース培地上に広げた。プラスミド DNA を単離して、N c o I を用いて解析制限消化を実施した ; 2 つの単離体は、予想されたバンドと一致する制限消化を示した。どちらの単離体も P v u I 接合部に渡って配列決定し、そのことはプラスミドの同一性およびその中の遺伝子の適正な定位を裏付けた。

#### 【 0 2 7 1 】

p y r F および p r o C のゲノム欠失による蛍光菌 ( Pseudomonas fluorescens ) 菌株の作製

p y r F が欠失した蛍光菌 ( P . fluorescens ) M B 1 0 1 菌株である PFG118 は、実施例 1 で記載した。

#### 【 0 2 7 2 】

遺伝子交換および欠失のためのベクター、p D O W 1 2 6 1 - 2 の作製

ベクター p D O W 1 2 6 1 - 2 は、以下の特性を組み合わせることによって、クロスイン / クロスアウト法 ( Toder 1994 ; Davison 2002 ) によるマーカー交換を使用して、ゲノム DNA の清浄な欠失を作製するように設計された :

- ・大腸菌 ( E . coli ) のみで機能し、蛍光菌 ( P . fluorescens ) では機能しない ColEI 複製起点 ;
- ・プラスミドの染色体内への組み込みのための選択マーカー ( t e t R / t e t A ) ;
- ・挿入プラスミドの消失の選択を可能にする対抗選択マーカー ( p y r F ) ( 宿主菌株が p y r F - である限り ) ; p y r F 遺伝子を失った細胞は、5 - F O A に対して耐性である ;
- ・一般的でない 8 b p 認識部位を有する平滑末端クローニング部位 S r f I - 所望のインサートが該部位を欠く場合、インサートなしで連結するベクターを再開裂させるために S r f I ( Stratagene、ラホーヤ、カリフォルニア州 ) を連結反応に添加することによって挿入の効率を上昇させ得る。

#### 【 0 2 7 3 】

このベクターを作製するために、t e t R、t e t A、および p y r F 遺伝子を含有する 5 k B P s t I - E c o R I 断片を、P s t I および E c o R I によって消化された p C R S c r i p t C A M ( Stratagene、ラホーヤ、カリフォルニア州 ) 内にクローニングして、p D O W 1 2 6 1 - 2 を作製した。

#### 【 0 2 7 4 】

p r o C を染色体から欠失させるベクターの作製

p r o C の欠失を作製するために、p r o C 遺伝子の上流および下流のフランキング領域のコピーを P C R によって連結して、次に p D O W 1 2 6 1 - 2 遺伝子置換ベクター内にクローニングした。ATG開始コドンからTAG停止コドンまでのコード配列全体を欠失させるために、p r o C O R F を架橋する p r o C 7 プライマーが設計された。停止コドンの下流のさらなる 1 6 b p も欠失に含めた。

#### 【 0 2 7 5 】

p r o C から上流および下流の領域の P C R 融合物を作製するために、P C R 増幅のメガプライマー法を使用した (Barik 1997)。メガプライマーを作製するために、p r o C 読み取り枠のすぐ上流の 0 . 5 k B 領域を、プライマー p r o C 5 および p r o C 7 を使用して、M B 2 1 4 ゲノム D N A から P C R によって増幅した。プライマー p r o C 7 は、p r o C O R F の上流および下流の領域と重複する。ポリメラーゼ連鎖反応は、ベンダーが推奨する緩衝液中でプライマー 1 u M、4 つの d N T P 各 2 0 0 u M、および Herculase ハイフィディリティポリメラーゼ (Stratagene、ラホーヤ、カリフォルニア州) を用いて実施した。Herculase は、平滑末端を残す、ほとんど P f u ポリメラーゼより成るハイフィディリティ酵素である。増幅プログラムは、9 5 にて 2 分、k B 当たり 9 5 にて 3 0 秒、5 0 にて 5 0 、および 7 2 にて 1 分の 3 0 サイクル、続いて 7 2 にて 1 0 分であった。増幅産物は、T B E 中での 1 % アガロースゲル電気泳動によって分離して、チジウムブロミドを使用して描出した。D N A を含有するゲルスライスをゲルから切り出して、上記のように精製した。

#### 【 0 2 7 6 】

p r o C 遺伝子から下流の 1 . 3 k B 領域は、プライマー p r o C 3 および p r o C 6 を使用して増幅され、続いての反応のテンプレートとして作用した。6 0 のアニーリング温度を除いて、同じ増幅プロトコルを使用した。反応物はアガロースゲル上で確認し、StrataPrep P C R 精製キット (Stratagene、ラホーヤ、カリフォルニア州) を使用して精製した。

#### 【 0 2 7 7 】

欠失融合物を作製する第 2 のステップにおいて、p r o C 6 と共に、そしてテンプレートとしての p r o C 3 - p r o C 6 P C R 反応物と共に、メガプライマーを P C R 反応におけるプライマーの 1 つとして使用した。6 1 のアニーリング温度および 2 分間の伸長時間を使用した。1 k B P C R 産物を精製し、S r f I によって消化された自殺ベクター p D O W 1 2 6 1 - 2 に平滑末端連結させた。ベクターの再ライゲーションによって引き起こされたバックグラウンドを低下させるために、メーカーからの説明書 (pCRScriptCam クローニングキット - Stratagene、ラホーヤ、カリフォルニア州) に従って、S r f I をライゲーションに含めた。ライゲーションを電気穿孔 DH10 (2 m M ギャップキューベット、2 5 μ F、2 . 2 5 k V、2 0 0 オーム) によって、DH10 (Gibco BRL Life Technologies、現在は Invitrogen、カールスバッド、カリフォルニア州) に形質転換させて (Artiguenave et al. 1997)、D r a I I I 制限酵素を使用して単離体をスクリーニングした。それぞれの単離体の P C R 増幅領域はザ・ダウ・ケミカル・カンパニー (The Dow Chemical Company) が配列決定した；単離体 p D O W 1 3 0 5 - 6 は、正しいゲノム D N A 配列を含有しているとして検証された。

#### 【 0 2 7 8 】

蛍光菌 (P.fluorescens) p y r F - p r o C 二重欠失の作製

二重欠失菌株を作製するために、P F G 1 1 8 を p D O W 1 3 0 5 - 6 を用いて上記のように電気穿孔によって形質転換した。HotStarTaq (Qiagen、バレンシア、カリフォルニア州)、アニーリング温度 5 9 および伸長時間 4 分間を用いた、プライマー p r o C 8 および M 1 3 / p U C 逆配列決定プライマー (Reverse Sequencing Primer) (- 4 8) (プラスミドのみにハイブリダイズする) (New England Biolabs、ピバリー、マサチューセッツ州) を含むコロニーに対する解析 P C R は、2 2 個の単離体のうち 9 個が p r o C の上流の領域に組み込まれたプラスミドを有し、2 2 個のうち 7 個が下流に組み込まれたプラスミドを有することを示した (データは示さず)。各定位のうち 3 つを 1 個のコロ

ニーまで精製した。3つの単離体 P F G 1 1 8 : : 1 3 0 5 - 6 . 1、- 6 . 8、- 6 . 1 0 は、上流の領域に挿入を有し、3つの単離体 P F G 1 1 8 : : 1 3 0 5 - 6 . 2、- 6 . 3、- 6 . 9 は、下流の領域に挿入を有する。

#### 【 0 2 7 9 】

プラスミドと染色体遺伝子との間で相同組換えを実施して、それにより欠失を残す細胞を選択するために、P F G 1 1 8 : : 1 3 0 5 - 6 . 1 および - 6 . 2 をウラシルおよびプロリン添加を含む L B 5 0 m L 中で静止期まで増殖させ、次にウラシルおよびプロリン添加を含む L B - 5 - F O A 上で平板培養した。組み込まれたプラスミドを組換えによって失う細胞は、p y r F 遺伝子も失い、したがってそうでなければ毒性化合物に変換される5-FOAに対して耐性であることが予想される。プラスミドを失って、元の配列を再生させた細胞と、欠失を残した細胞とを区別するために、p r o C 8 および p r o C 9 を用いた P C R 解析を実施した。予想された 1 . 3 k B を有する2つの単離体を2つの選択物からそれぞれ選択して、P F G 1 0 1 3、P F G 1 0 1 4、P F G 1 0 1 5 および P F G 1 0 1 6 ( D C 1 6 4 としても公知) と命名した。4つの単離体はすべて、プロリンおよびウラシルが添加されない限り M 9 グルコース上で増殖することができず、テトラサイクリン感受性であった。P F G 1 1 8 (野生型 p r o C) および P F G 1 0 1 6 ( p r o C 欠失) のゲノム領域を P C R (プライマー p r o C 8 および p r o C 9、HotStarTaqポリメラーゼ、アニーリング 6 3 および伸長 3 分) によって増幅して、配列した。菌株 P F G 1 0 1 の p r o C 5 と p r o C 6 との間の領域は、予想された 8 3 5 b p 欠失を除いて、親と同一であった。

#### 【 0 2 8 0 】

デュアル栄養要求性選択マーカー発現系 P F G 1 0 1 6 / p D O W 1 3 0 6 - 6 p D O W 1 2 6 9 - 2 の作製

プラスミドを菌株 P F G 1 1 8 p C N 5 1 l a c I p D O W 1 2 6 9 - 2 から HISPEE D Plasmid Midiキット (Qiagen、バレンシア、カリフォルニア州) によって単離した。p D O W 1 2 6 9 - 2 を p C N 5 1 l a c I からアガロース電気泳動によって部分的に精製して、次に P F G 1 0 1 6 p D O W 1 3 0 6 - 6 内へ電気穿孔した。形質転換体を添加物なしの M 9 / グルコース上で選択した。p D O W 1 2 6 9 - 2 調製物を汚染する p C N 5 1 l a c I の一部が細胞内へ同時形質転換される可能性もあるため、各形質転換からの3つの単離体を、p C N 5 1 l a c I に保持されている抗生物質マーカーであるカナマイシンへの感受性について試験した；6つすべてが感受性であることが見出された。標的酵素活性の試験では、6つの菌株すべてが標的酵素を発現することが見出された。P C R 解析は、6つすべてが染色体 p r o C 欠失を含有することを示した。

#### 【 0 2 8 1 】

形質転換体から単離したプラスミドの制限消化は、予想したパターンと一致した。

#### 【 0 2 8 2 】

振とうフラスコでのデュアル栄養要求性マーカー発現系の性能試験

次に、6つの菌株を実施例 1 で記載したように振とうフラスコ内で試験した。標的酵素発現の誘導は、I P T G の添加により 2 6 時間にて開始した。6つすべての菌株の O D<sub>575</sub> は、デュアル抗生物質耐性マーカー発現系対照 D C 8 8 の O D<sub>575</sub> と匹敵していた。6つすべての標的酵素産生レベルも、S D S - P A G E によって評価されるように、対照の産生レベルに匹敵していた。さらなるキャラクタリゼーションのために、最高の O D<sub>575</sub> を達成した2つの菌株である、菌株 1 0 4 6 および 1 0 4 8 を選択した。

#### 【 0 2 8 3 】

デュアル栄養要求性マーカー発現系の 2 0 L バイオリアクターでの性能試験

続いて、菌株 1 0 4 6 および 1 0 4 8 を 2 0 L バイオリアクターで試験した。標的酵素発現の誘導は、I P T G の添加により 2 6 時間にて開始した。両方の菌株が、O D<sub>575</sub> および標的酵素活性の両方について、D C 8 8 対照菌株の正常範囲内のレベルを達成した。これらの2つの菌株の性能平均を図 1 に示す。播種段階および 2 6 時間の誘導開始の直前に採取したサンプルから調製したプラスミドの制限消化は、予想と一致したパターンを

示した。同じサンプルに実施したゲノムDNAの解析PCRは、*pyrF*欠失および*pyrF*欠失の保持を示した。25時間サンプルの分割量をテトラサイクリン - 、ゲンタマイシン、またはカナマイシン - 添加培地上で平板培養した；細胞増殖は観察されず、したがって抗生物質耐性遺伝子活性の非存在が確認された。

#### 【0284】

20Lバイオリアクターでの菌株1046 (DC167としても公知)の解析は、同様の結果で2回反復した。播種段階および発酵の25時間後(誘導の直前)におけるプラスミド安定性は、希釈して完全培地で平板培養したサンプルからのレプリカ平板法によって試験した。どちらのプラスミドも検査したコロニーの97%超に存在し、プラスミドなしで生存し得る栄養共生復帰変異体の欠如および蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 内での発現ベクターの安定的維持が示された。

10

#### 【0285】

##### 結果

*pyrF*発現系のどちらも、抗生物質耐性マーカーのみが使用される対照系(図1)と同様に作用した。対照菌株では、溶解細胞からの外来性代謝産物の移入が培地中の抗生物質から供給された選択圧を低減または除去しないため、栄養共生の負の影響はなかった。2つの*pyrF*発現系に対する栄養共生の結果として予想された、性能の予想される低下は驚くべきことに観察されなかった。

#### 【実施例3】

#### 【0286】

20

蛍光菌 (*P. fluorescens*) での *lacI*、*lacI<sup>Q</sup>* および *lacI<sup>Q1</sup>* の染色体組み込み染色体に組み込まれた3つの異なるdifferentエシェリキア・コリ *lacI* 対立遺伝子、*lacI* (配列番号9)、*lacI<sup>Q</sup>* (配列番号11)、および *lacI<sup>Q1</sup>* (配列番号12) のうちの1つをそれぞれ用いて、3つの蛍光菌 (*P. fluorescens*) 菌株を作製した。3つの菌株は、*lacI* リプレッサー蓄積の異なる量を示した。各菌株は、その *lacI* 遺伝子の1個のコピーを、上記のようにその *pyrF* 遺伝子を欠失させることによって形成されたMB101誘導體 (TD Landry et al., 「Safety evaluation of an  $\alpha$ -amylase enzyme preparation derived from the archaeal order Thermococcales as expressed in *Pseudomonas fluorescens* biovar I,」 *Regulator Toxicology and Pharmacology* 37(1): 149-168 (2003) を参照) である、蛍光菌 (*P. fluorescens*) DC36のレバンスクラーズ位置 (配列番号13) に保持している。

30

#### 【0287】

ベクターまたは他のDNA配列は、菌株内に残っていない。菌株は抗生物質耐性遺伝子を含まず、*pyrF*欠失も含み、ウラシル未添加培地での増殖中の、*pyrF*+遺伝子を持つ発現プラスミドの維持を可能にする。タンパク質産生は、抗生物質耐性遺伝子および抗生物質を完全に含まない。

#### 【0288】

MB214は、U.S. Pat. 5,169,760で記載された *lacI* - *lacZYA* 染色体インサートを含有する。MB214は、*lacI* リプレッサーの分子量に約10kDaを添加する、*lacI* タンパク質のC末端に重複も含有する。

40

#### 【0289】

レバンスクラーズ位置への遺伝子挿入のためのベクター pDOW1266-1 の作製  
 プラスミド pDOW1266-1 を、レバンスクラーズに関する蛍光菌 (*P. fluorescens*) 遺伝子上流および中の領域 (配列番号13) のPCR増幅によって作製し、メガプライマー方法を使用して開始コドンを *XbaI* 部位で置換した、ABarik, 「Mutagenesis and Gene Fusion by Megaprimer PCR,」 in BA White, PCR Cloning Protocols 173-182 (1997) (Humana) を参照。PCRは、HERCULASEポリメラーゼ (Stratagene、マジソン、ウィスコンシン州、米国) を使用して、プライマー LEV1 (配列番号34) および LEV2 (配列番号35)、ならびに蛍光菌 (*P. fluorescens*) MB214ゲノムDNAをテンプレートとして使用して実施した (オリゴヌクレオチド配列については以下を参照)。プラ

50



イマーLEV2（配列番号35）は、XbaI部位を挿入する配列を含有する。反応は、95 で2分間、[ 95 で30秒間、58 で30秒間、72 で1分間 ] の35サイクル、続いて72 で10分間で実施した。1 k B産物をゲル精製して、次の反応でテンプレートとしてのMB214ゲノムDNAおよび伸長時間が2分間であることを除く同じ条件を使用して、LEV3（配列番号36）と共にプライマーの1つとして使用した。品質を向上させるために、2 k B産物をゲル精製して、LEV2（配列番号35）およびLEV3（配列番号36）を用いて再増幅した。

# 【0290】

使用したオリゴヌクレオチド

LEV1（配列番号34）

5' - TTCGAAGGGGTGCTTTTCTAGAAAGTAAGTCTCGTCC  
ATGA

LEV2（配列番号35）

5' - CGCAAGGTCAGGTACAAACAC

LEV3（配列番号36）

5' - TACCAGACCAGAGCCGTTCA

LEV7（配列番号37）

5' - CTACCCAGAACGAAGATCAG

LEV8（配列番号38）

5' - GACTCAACTCAATGGTGCAAGG

BglXbaLacF（配列番号39）

5' - AGATCTCTAGAGAAAGGCGAAGCGGCATGCATTTACG

lacIR4（配列番号40）

5' - ATATTCTAGAGACAACCTCGCGCTAACTTACATTAATT  
GC

Lacpro9（配列番号41）

5' - ATATTCTAGAAATGGTGCAAAACCTTTCGCGGTATGGC  
ATGA

LacIQF（配列番号42）

5' - GCTCTAGAAAGCGGCATGCATTTACGTTGACACC

LacINXR（配列番号43）

5' - AGCTAGCTCTAGAAAGTTGGGTAAACGCCAGGGT

lacIQ1（配列番号44）

5' - AGTAAAGCGGCCGCGAGCGGCATGCATTTACGTTGACAC  
CACCTTTCGCGGTATGGCATG

# 【0291】

以下のオリゴヌクレオチドは、解析配列決定のみに使用した。

lacIF1（配列番号45）

5' - ACAATCTTCTCGCGCAACGC

lacIF2（配列番号46）

5' - ATGTTATATCCCGCCGTTAA

lacIR1（配列番号47）

5' - CCGCTATCGGCTGAATTTGA

lacIR2（配列番号48）

5' - TGTAAATTCAGCTCCGCCATC

SeqLev5AS（配列番号49）

5' - TATCGAGATGCTGCGAGCCTC

SeqLev3S（配列番号50）

5' - ACACCTTCACCTACGCCGAC

LEV10（配列番号51）

5' - T C T A C T T C G C C T T G C T C G T T  
【 0 2 9 2 】

L E V 2 - L E V 3 増幅産物は、クロスアウトの選択を促進するために、蛍光菌 (P. fluorescens) p y r F + 遺伝子を選択マーカーとして含有する自殺ベクターである p D O W 1 2 6 1 - 2 の S r f I 部位内にクローニングした。新しいプラスミドを p D O W 1 2 6 6 - 1 と命名した。増幅領域を配列した。

【 0 2 9 3 】

l a c I 遺伝子の挿入ベクター p D O W 1 2 6 6 - 1 へのクローニング

大腸菌 (E.coli) l a c I 遺伝子を、プライマー B g l X b a l a c F (配列番号 3 9) および l a c I R 4 (配列番号 4 0) を有する p C N 5 1 l a c I から、HERCULASE ポリメラーゼ (6 2 でのアニーリングおよび 2 分間の伸長時間) を使用して増幅した。ゲル精製および X b a I を用いた消化の後、l a c I 遺伝子を p D O W 1 2 6 6 - 1 の X b a I 部位へクローニングして、p D O W 1 3 1 0 を作製した。l a c I<sup>Q</sup> 遺伝子は、テンプレートとしての p C N 5 1 l a c I を 1 5 のプライマー l a c p r o 9 (配列番号 4 1) および l a c I R 4 (配列番号 4 0) と共に使用して、HERCULASE ポリメラーゼ (6 2 でのアニーリングおよび 2 分間の伸長時間) を使用して、P C R 増幅によって作製した。ゲル精製および X b a I を用いた消化の後、l a c I 遺伝子を p D O W 1 2 6 6 - 1 の X b a I 部位へクローニングして、p D O W 1 3 1 1 を作製した。

【 0 2 9 4 】

l a c I<sup>Q1</sup> 遺伝子は、プライマー l a c I Q 1 (配列番号 4 4) および C V X R (配列番号 4 3) を用いて大腸菌 (E.coli) K12 (ATCC47076) からの l a c I 遺伝子を増幅することによって作製し、p C R 2 - 1 T o p o (Invitrogen、カルスバッド、カリフォルニア州、米国) 内へクローニングして、p C R 2 - l a c I Q 1 を作製した。l a c I<sup>Q1</sup> 遺伝子は、プライマー l a c I Q F (配列番号 4 2) および l a c I N X R (配列番号 4 3) を Herculase ポリメラーゼ (6 1 でのアニーリング、3 分間の伸長時間、3 5 サイクル) と共に使用して、p C R 2 - l a c I Q 1 から再増幅した。ゲル精製および X b a I を用いた消化の後、P C R 産物を p D O W 1 2 6 6 - 1 の X b a I 部位へクローニングして、p D O W 1 3 0 9 を作製した。

【 0 2 9 5 】

p C R 2 - l a c I Q 1 内の P C R 増幅インサート p D O W 1 3 1 0、p D O W 1 3 1 1、および p D O W 1 3 0 9 を配列決定して (プライマー l a c I F 1 (配列番号 4 5)、l a c I F 2 (配列番号 4 6)、l a c I R 1 (配列番号 4 7)、l a c I R 2 (配列番号 4 8)、S e q L e v 5 A S (配列番号 4 9)、S e q L e v 3 S (配列番号 5 0)、および L E V 1 0 (配列番号 5 1) を使用して)、P C R 反応によって変異が導入されていないことを確認した。それぞれの場合で、l a c I がレバンスクラゼ遺伝子と同じ方向で転写される定位を選択した。レバンスクラゼプロモータは l a c I の転写を潜在的に制御され得るが、プロモーターは、使用した発酵条件では非存在であるスクロースの存在下のみで活性である。

【 0 2 9 6 】

レバンスクラゼ位置に組み込み l a c I 遺伝子を有する蛍光菌菌株の作製

ベクター p D O W 1 3 0 9、p D O W 1 3 1 0、および p D O W 1 3 1 1 を電気穿孔によって DC36 内に導入して、最初にベクターのテトラサイクリン耐性を持つゲノムへの組み込みに関して選択した。コロニーをスクリーニングして、ベクターがプライマー L E V 7 (配列番号 3 7) および M 1 3 R (New England Biolabs より、グロスター、マサチューセッツ州、米国) を用いた P C R によってレバンスクラゼ位置に組み込まれたことを決定した。l a c I 遺伝子をゲノム内に残す第 2 のクロスオーバーに関して選択するために、単離体を 5' - フルオロオロチン酸の存在下で、そしてテトラサイクリンの非存在下で増殖させた。ゲノム内の複製領域間の組換えは、親遺伝子型を復元するか、または l a c I 遺伝子を残すかのいずれかである。生じた単離体は、ウラシルの非存在下で培養して、プライマー L E V 7 (配列番号 3 7) および L E V 8 (配列番号 3 8) を用いた P C R によってテトラサイクリンに対する感受性についてスクリーニングした。新しい菌株の名称

を表17に示す。ゲノム領域の配列情報を得るために、PCR産物を直接配列決定した、E Werle, 「Direct sequencing of polymerase chain reaction products,」 Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA 163-174 (1997)を参照。各菌株では、配列決定がプロモーターの同一性、フランキング領域に対する *lacI* 変異体の定位、および親配列に対する点変異の存在または非存在を確認した。DC202およびDC206の配列は予想通りであった。DC204の配列は、*lacI*<sup>Q</sup>下流の、レバンスクラーズ読み取り枠内に点変異を示し、これはコード配列を変更せず、したがって重要度が低い。

【表17】

ゲノムに組み込まれた *lacI* 対立遺伝子を有する蛍光菌株

菌株名称	<i>lacI</i> 挿入を作製するために使用したプラスミド	遺伝子型
DC202	pDOW1310-1	<i>pyrF lev::lacI</i>
DC204	pDOW1311-4	<i>pyrF lev::lacI</i> <sup>Q</sup>
DC206	pDOW1309oriA	<i>pyrF lev::lacI</i> <sup>Q1</sup>

【0297】

pCN51 *lacI* と比較した、*lacI* 組込み体における *lacI* の相対濃度の解析 UnBlotは、ウェスタン解析と類似した方法であり、フィルタへ移動する必要なしにタンパク質がゲル中で検出される。該技術は、メーカーであるPierce Biotechnology (ロックフォード、イリノイ州、米国) の指示に従って実施した。UnBlotを使用した解析は、新しい組込み体菌株それぞれの *lacI* の量はMB214より多いことを示した。MB214は、U.S. Pat. 5,169,760で記載された *lacI* - *lacZYA* インサートを含有する。*lacI*<sup>Q</sup>および *lacI*<sup>Q1</sup> 組込み体中の *lacI* の相対濃度は、*lacI* を含有する多コピープラスミドである、pCN51 *lacI* を保持する菌株とほぼ同じであった。図5を参照。

【0298】

MB214、DC202 (*lacI* 組込み) およびDC206 (*lacI* 組込み) 中の *lacI* 濃度の相対差をより正確に評価するために、希釈シリーズを実施した。MB101 pCN51 *lacI*、DC204およびDC206は、MB214の約100倍の *lacI* を有するのに対して、DC202は約5倍を有する。

【実施例4】

【0299】

ニトリラーゼ発現および転写

菌株DC140は、蛍光菌 (*P. fluorescens*) MB214内に、ニトリラーゼ遺伝子 (G DeSanthis et al., J. Amer. Chem. Soc. 125: 11476-77(2003)) が *Ptac* プロモーターの制御下で挿入されたテトラサイクリン耐性広域宿主域プラスミドである、pMYC1803 (WO 2003/068926) を導入することによって作製された。DC202およびDC206内の標的遺伝子のMB214による未誘導発現の調節を比較するために、同じニトリラーゼ遺伝子を、テトラサイクリン耐性遺伝子が *pyrF* 選択マーカーによって置換されたpMYC1803誘導体へクローニングした。次に新しいプラスミドpDOW2415をDC202およびDC204内へそれぞれ電気穿孔した。DC140、DC239およびDC240を20L発酵槽内で、グルコースまたはグリセロールを添加した無機塩培地での増殖によって、最終的に約20g/L ~ 70g/L 超の乾燥細胞重量の範囲内のバイオマスを与える細胞密度まで培養した (WO2003/068926を参照)。発現を誘導するために、*Ptac* プロモーターの無償性インデューサ、IPTGを添加した。

【0300】

DC140対DC239対DC240のブレインキュベーションニトリラーゼ活性の比

10

20

30

40

50

は、6 : 2 : 1であった。同じサンプルのノザンプロットによるRNA解析は、抑制解除の同じランキングを明らかにした。濃度測定に基づいて、DC140 : DC239 : DC240の非誘導転写レベルの比は、2 . 4 : 1 . 4 : 1 . 0であった。0 . 3 mM IPTGによる誘導（30分間）の直後、すべての菌株の転写レベルは同じであった。誘導後のニトリラーゼ生産性も同程度であった。このことは、使用したインデューサの濃度が、その異なるlacIタンパク質レベルにもかかわらず、これら3つの菌株においてPtacプロモーターを完全に誘導するのに十分であったことを示す。しかしながら最も抑制解除された菌株DC140の発酵は、誘導の約24時間後のニトリラーゼ活性の損失に伴う著しい細胞溶解を被った。改良された、より厳密に調節された菌株DC239およびDC240の誘導は、高いニトリラーゼ生産性を維持しながら誘導後48時間超まで延長可能であり、最終的な結果としてニトリラーゼ収率が2倍となった。図6を参照。

10

#### 【0301】

##### 結果

実施例は、シュードモナス（Pseudomonads）における完全または切断Plac-lacI-lacZYAオペロンの一部として以外のlacIコード遺伝子の使用が、以前に教示したlacI-lacZYAシュードモナス（Pseudomonad）染色体挿入（米国特許第5,169,760号）と比較して、ブレインキュベーション組換えタンパク質発現の実質的に改良された抑制、商業スケール発酵でのより高い細胞密度、および所望の産物のより高い収率をもたらしたことを示している。結果は、lacI挿入が蛍光菌（Pseudomonas fluorescens）中でのlacIリプレッサータンパク質の産生にも有効であり、それによって細胞内にlacIリプレッサータンパク質をコードする独立したプラスミドを維持する必要がなくなり、そのような維持によって引き起こされる潜在的な産生非効率性が低減されることも示した。

20

抗生物質を含まないことに加えて、DC239およびDC240での増殖段階中の抑制解除は、MB214菌株の10分の1未満までであった。DC239およびDC240のブレインキュベーションニトリラーゼ活性レベルは、13を超える独立した発酵で平均して0.4 U/mlに達し、DC239およびDC240における細胞密度およびニトリラーゼ発現は、DC140のように延長された誘導期の間に低下しなかった。より高い抑制解除を与えると、DC239およびDC240発酵作業は、増殖期の時間を30%超短縮して、発酵コストを低減させた。

30

#### 【実施例5】

#### 【0302】

1個の最適なlacオペレーターを有する、および2個のlacオペレーターを有する、tacプロモーターの作製

天然のtacプロモーターは、1個の天然のlacオペレーターAATTGTGAGCGGATAACAATTのみをO1位置（図4）に有する。第1の構築物pDOW1418において、天然のオペレーターをさらに対称なlacOidオペレーター配列5' - AATTGTGAGC GCTCACAAATT - 3'（配列番号14）と置換した（JR. Sadtler, H. Sasmor and J.L. Betz. PNAS. 1983 Nov; 80 (22): 6785-9）。tacプロモーターおよび天然のlacO配列を含有する289bp HindIII/SpeI断片をpMYC1803誘導体のpDOW2118から除去して、対称lacOid配列を含有するSOE PCR増幅産物から単離したHindIII/SpeI断片によって置換した。SOE PCRプライマー（RC-3およびRC-9）は、最適化/対称lacO配列を産生した4つのヌクレオチド変化（3個の塩基対置換および1個の塩基対欠失）を包含していた。得られたプラスミドpDOW2201のHindIII/SpeIプロモーター断片をpMYC1803をベースとするニトリラーゼ発現プラスミド内へクローニングして、天然のtacプロモーターを置換してpDOW1414を生じさせた。次にこの発現カセットをpyrF(+)プラスミドpDOW1269上へ移動して、DraI/XhoI断片を交換することによってpDOW1418を生じさせた。次にプラスミドpDOW1418を宿主菌株DC206に形質転換させて、菌株DC281を生じさせた（図

40

50

4を参照)。

#### 【0303】

使用したオリゴヌクレオチド

RC-3 (配列番号52)

5' - GTGAGCGCTCACAAATTCCACACAGGAAACAG

RC-4 (配列番号53)

5' - TTCGGGTGGAAGTCCAGGTAGTTGGCGGTGTA

RC-9 (配列番号54)

5' - GAATTGTGAGCGCTCACAAATTCCACACATTATACGAGC

RC-10 (配列番号55)

5' - ATTCAGCGCATGTTCAACGG

#### 【0304】

第2の構築物pDOW1416において、lacOidオペレーター5' - AATTGTGAGCGCTCACAAATT-3' (配列番号14)を既存の天然のlacO1の52ヌクレオチド上流(5')にPCRによって挿入した。メガプライマー法を使用するプロモーター領域のPCR増幅は、pMYC1803誘導体のpMYC5088、ならびに以下のプライマーAKB-1およびAKB-2を第1段階として使用した。得られたPCR産物を同じテンプレートを使用する2回目のPCR増幅において、プライマーAKB-3と組み合わせた。精製ならびにHindIIIおよびSpeIによる消化の後、デュアルオペレーターを含有するプロモーター断片をプラスミドpMYC5088HindIIIおよびSpeI部位内へクローニングして、pDOW1411を生じた。第2のオペレーターの導入は、独自のMfeI部位を最適オペレーターのすぐ上流に導入した。次にpDOW1411のプロモーター領域を持つXhoI/SpeIベクター断片をニトリラーゼ遺伝子を保持するpMYC1803誘導体の適合性断片に連結して、DOW1413を形成する。pDOW1413のMfeI/XhoI発現カセット断片の、pDOW1269の適合性ベクター断片への続いてのライゲーションは、pDOW1416を生じた；これをDC206へ形質転換すると、菌株DC262が形成された。

#### 【0305】

使用したオリゴヌクレオチド

AKB-1 (配列番号56)

5' - ACGGTTCTGGCAAAACAATTGTGAGCGCTCACAAATTTATTTCTGAATGAGC

AKB-2 (配列番号57)

5' - GCGTGGGCGGTGTTTATCATGTTTC

AKB-3 (配列番号58)

5' - TACTGCA CGCACAAAGCCTGAACA

#### 【0306】

ニトリラーゼ抑制解除

ノザンプロット解析を誘導前および誘導後にMB214、DC202、およびDC206に対して実施した。MB214、DC202、およびDC206は上記したように、野生型lacO配列をtacプロモーターの3'側のO1位置に含有するニトリラーゼ発現ベクターを用いて形質転換して、MB214wtO1、DC202wtO<sub>1</sub>(DC239)、およびDC206wtO<sub>1</sub>(DC240)を作製した。DC206は、上記のようなtacプロモーターの3'側のO<sub>1</sub>位置における野生型lacO配列の代わりにlacOid配列を含有するニトリラーゼ発現ベクターによって形質転換して、DC206oid(DC281)を作製した。DC206もtacプロモーターの3'側のO<sub>1</sub>位置に野生型lacO配列を、tacプロモーターの5'側のO3位置にlacOid配列を含有するニトリラーゼ発現ベクターを用いて形質転換して、DC206wtO<sub>1</sub>O<sub>3</sub>id(DC263)を含有するデュアルlacOを作製した。

## 【 0 3 0 7 】

ノザンプロット解析は、誘導前にデュアル *l a c O* 配列 ( *D C 2 0 6 w t O<sub>1</sub>O<sub>3</sub>i d* ( *D C 2 6 3* ) ) カセットを含有する菌株による、より大きな抑制を示した。ブレインキュベーション発現のより大きな抑制は、ブレインキュベーション毒性タンパク質の基底レベルが細胞の増殖期への移行遅延、そして潜在的に産物のより低い全体的な収率を生じさせるため、毒性タンパク質を産生するときに特に有用である。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 3 0 8 】

【図 1】抗生物質耐性マーカー（黒菱形）のみを使用する蛍光菌 (*P. fluorescens*) デュアルプラスミド発現系の性能に対する、*p y r F*（白抜き三角および白抜き四角）を使用する蛍光菌 (*P. fluorescens*) デュアルプラスミド発現系の性能の比較を表す。示したすべてのデータは、*I P T G* が中対数期の間に標的酵素発現を誘導するために添加された、9 回の代表的な *2 0 - L* 発酵の平均である。上部の 3 本の曲線のセットは、左垂直軸に対して読み取られる相対細胞密度データを表す。下部の 3 本の曲線のセットは、対応する発酵で産生された標的酵素の相対酵素活性データを表し、右垂直軸に対して読み取られる。（黒菱形）- *t a c* プロモーター制御標的酵素発現カセットおよびテトラサイクリン耐性マーカー遺伝子を有する *p M Y C* プラスミド、ならびに *l a c I* リプレッサー発現カセットおよびカナマイシン耐性マーカー遺伝子を有する *p C N* プラスミドを含有する、蛍光菌 (*P. fluorescens*)。表示された分散バーはこれらのデータ点 ( $n = 4$ ) のためであり、種々の発酵作業のうち、この発現系で通例観察される正規分散を表す。（白抜き三角）- *t a c* プロモーター制御標的酵素発現カセットおよび *p y r F* 栄養要求性マーカー遺伝子を有する *p M Y C* プラスミドを含有する、ならびに *l a c I* リプレッサー発現カセットおよびカナマイシン耐性マーカー遺伝子を有する *p C N* プラスミドを含有する不活性化ゲノム *p y r F* を備えた、蛍光菌 (*P. fluorescens*) 菌株。（白抜き四角）- *t a c* プロモーター制御標的酵素発現カセットおよび *p y r F* 栄養要求性マーカー遺伝子を有する *p M Y C* プラスミドを含有する、ならびに *l a c I* リプレッサー発現カセットおよび *p r o C* 栄養要求性マーカー遺伝子を有する *p C N* プラスミドを含有する不活性化ゲノム *p y r F* および *p r o C* を備えた、蛍光菌 (*P. fluorescens*) 菌株。

【図 2】プラスミド *p D O W 1 2 4 9 - 2* のマップを表す。

【図 3】プラスミド *p D O W 1 2 6 9 - 2* のマップを表す。

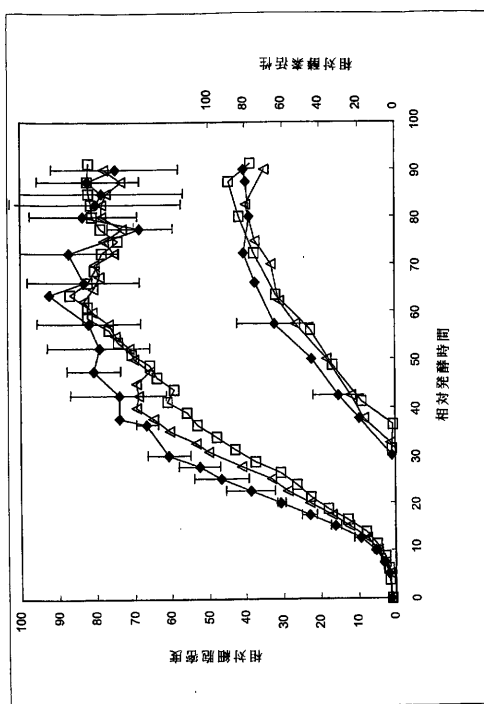
【図 4】*l a c* オペレーター構築物の概略図を表す。*L a c Z* は、天然の大腸菌 (*E. coli*) *l a c O* 配列の位置を表す。*t a c D C 2 3 9*、*D C 2 4 0* は、*t a c* プロモーターおよびニトリラーゼコード核酸を含む構築物上の天然の大腸菌 (*E. coli*) *l a c* オペレーターの位置を表す。*O p t l a c O D C 2 8 1* は、*t a c* プロモーターおよびニトリラーゼコード核酸を含む構築物上の *l a c O i d* オペレーター配列の位置を表す。デュアル *l a c O D C 2 6 2* は、ニトリラーゼコード核酸をさらに含む構築物上の、*t a c* プロモーターの *l a c O i d* オペレーター配列 5'、および野生型 *l a c* オペレーター配列 3' の位置を表す。

【図 5】振盪フラスコ遺伝子発現培地で増殖させた *l a c I* 成分菌株内の *L a c I* タンパク質蓄積のウェスタンブロット解析 (UnBlot) を表す。プロサンプルを LDS NuPAGE サンプル緩衝液 (Invitrogen) 50 mM D T T と合せて *O D 6 0 0* に標準化して、95 にて 40 分間加熱し、次に短時間遠心分離にかけた。分割量 20  $\mu$ L を内部チャンバ内での、抗酸化剤を含む M O P S での 10%、1 mm NuPAGE B i s - T r i s ゲル作業へ装填した。*L a c I* タンパク質の検出は、ゲル内ハイブリダイゼーション法 (「UnBlot」, Pierce) によって、1 : 1000 のポリクローナルウサギ抗体を、*L a d* (Stratagene cat. no. 217449-51) に対して 1 : 1000 で、二次抗体安定化ヤギ抗ウサギホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗体 (Pierce) に対して 1 : 500 で使用して実施した。ホースラディッシュペルオキシダーゼは、UnBlot キットの UnBlot 安定ペルオキシドおよび UnBlot ルミノールエンハンサーを用いて描出した。

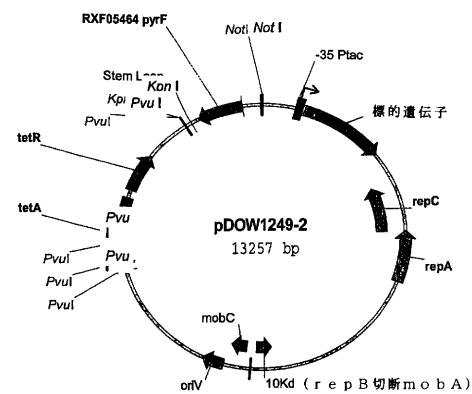
【図 6】*D C 1 4 0*、*D C 2 3 9* および *D C 2 4 0* のニトリラーゼ蓄積特性の合成を表す

。データはDC140 ( $n=5$ )、DC239 ( $n=5$ ) および DC240 ( $n=4$ ) 作業から集めた。DC140は、黒四角で表す。DC239は、白抜き四角で表す。DC240は、白抜き四角で表す。発酵作業は48時間の期間に渡って実施した。

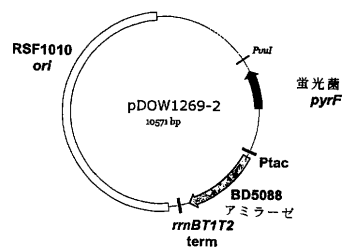
【図1】



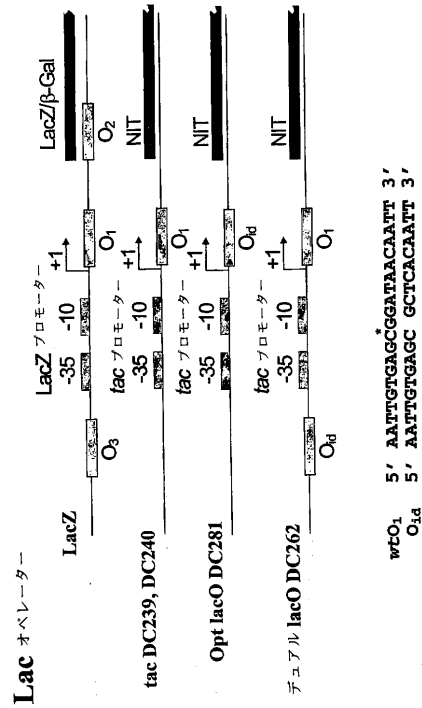
【図2】



【図3】



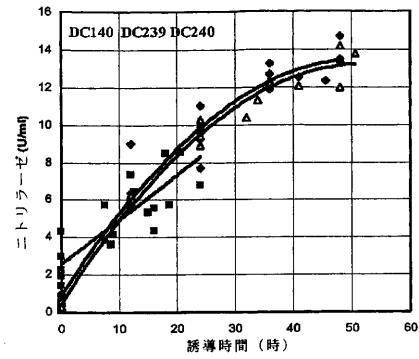
【図 4】



【図 5】



【図 6】





## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 P 21/02

C

C 1 2 R 1:39

(72)発明者 チュー, ローレンス, シー.

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 1 3 0, サンディエゴ, ウィローミア レーン 5 5 9  
0

(72)発明者 バグレー, アン, キャスリーン

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 0 6 4, ポウエイ, オールド ポメラド ロード 1 2  
0 2 3

(72)発明者 ラムセイアー, トーマス, マーティン

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 0 6 4, ポウエイ, ボマード ウェイ 1 3 0 3 3

審査官 鶴 剛史

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 3 / 0 6 8 9 2 6 ( W O , A 1 )

特開平 0 3 - 0 7 6 5 8 2 ( J P , A )

特開昭 6 1 - 1 3 9 3 9 2 ( J P , A )

特開 2 0 0 0 - 0 5 0 8 8 8 ( J P , A )

特開 2 0 0 3 - 2 9 9 4 9 1 ( J P , A )

Curr. Microbiol., 29[6](1994) p.353-359

Plasmid, 37[2](1997) p.129-140

Mol. Gen. Genet., 203[3] (1986) p.421-429

Appl. Environ. Microbiol., 66[12] (2000) p.5469-5471

Gene, 223[3](1998) p.221-231

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80[22](1983) p.6785-6789

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 1/21

C12P 21/02

C12N 15/09

C12R 1/39

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq