

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和3年7月26日(2021.7.26)

【公表番号】特表2020-524490(P2020-524490A)

【公表日】令和2年8月20日(2020.8.20)

【年通号数】公開・登録公報2020-033

【出願番号】特願2019-567283(P2019-567283)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/10	(2006.01)
C 4 0 B	40/06	(2006.01)
C 1 2 Q	1/68	(2018.01)
C 1 2 N	15/31	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	15/52	(2006.01)
C 1 2 N	15/62	(2006.01)
C 1 2 N	15/113	(2010.01)
C 1 2 N	15/70	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/10	2 0 0 Z
C 4 0 B	40/06	Z N A
C 1 2 Q	1/68	
C 1 2 N	15/31	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	15/52	Z
C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/113	1 3 0 Z
C 1 2 N	15/113	Z
C 1 2 N	15/70	Z

【手続補正書】

【提出日】令和3年5月24日(2021.5.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

微生物宿主細胞における発現のための、異種遺伝子に作動可能に連結したキメラ合成プロモーターであって、長さが60～90ヌクレオチドであり、ラムダファージp_Rプロモーターの遠位部分、それぞれ長さが6ヌクレオチドであるラムダファージp_Lおよびp_Rプロモーターの可変-35および-10領域、ラムダファージp_Lおよびp_Rプロモーターのコア部分、ならびにラムダファージp_Rプロモーターの5'UTR/リボソーム結合部位(RBS)部分からなる、キメラ合成プロモーター。

【請求項2】

前記ラムダファージp_Rプロモーターの前記遠位部分、前記ラムダファージp_Lおよびp_Rプロモーターの前記可変-35および-10領域、前記ラムダファージp_Lおよびp_Rプロモーターの前記コア部分、ならびに前記ラムダファージp_Rプロモーターの前記5'UTR/リボソーム結合部位(RBS)部分の核酸配列が、表1.5に見出される核酸

配列から選択される、請求項1に記載のキメラ合成プロモーター。

【請求項3】

微生物宿主細胞における発現のための、異種遺伝子に作動可能に連結したキメラ合成プロモーターであって、長さが60～90ヌクレオチドであり、ラムダファージp_Rプロモーターの遠位部分、それぞれ長さが6ヌクレオチドであるラムダファージp_Lおよびp_Rプロモーターの可変-35および-10領域、ラムダファージp_Lおよびp_Rプロモーターのコア部分ならびにE.coli.acs遺伝子のプロモーターの5'UTR/リボソーム結合部位(RBS)部分からなる、キメラ合成プロモーター。

【請求項4】

前記ラムダファージp_Rプロモーターの前記遠位部分、前記ラムダファージp_Lおよびp_Rプロモーターの前記可変-35および-10領域、前記ラムダファージp_Lおよびp_Rプロモーターの前記コア部分、ならびに前記E.coli.acs遺伝子の前記プロモーターの前記5'UTR/リボソーム結合部位(RBS)部分の核酸配列が、表1.5に見出される核酸配列から選択される、請求項3に記載のキメラ合成プロモーター。

【請求項5】

配列番号132～152、159～160、162、165、174～175、188、190、199～201または207から選択される核酸配列からなる、請求項1から2までのいずれか一項に記載のキメラ合成プロモーター。

【請求項6】

配列番号153～158、161、163～164、166～173、176～187、189、191～198または202～206から選択される核酸配列からなる、請求項3から4までのいずれか一項に記載のキメラ合成プロモーター。

【請求項7】

前記微生物宿主細胞がE.coliである、請求項1から4までのいずれか一項に記載のキメラ合成プロモーター。

【請求項8】

前記異種遺伝子が、表2に見出される目的のタンパク質産物をコードする、請求項7に記載のキメラ合成プロモーター。

【請求項9】

前記異種遺伝子が、リシン生合成経路の一部である、リコピン生合成経路の一部である、生物学的製剤をコードするまたは生物学的製剤を生成するための経路内の遺伝子である、請求項7に記載のキメラ合成プロモーター。

【請求項10】

前記リシン生合成経路の一部である前記異種遺伝子が、asd遺伝子、ask遺伝子、hom遺伝子、dapA遺伝子、dapB遺伝子、dapD遺伝子、ddh遺伝子、argD遺伝子、dapE遺伝子、dapF遺伝子、lysA遺伝子、lysE遺伝子、zwf遺伝子、pgi遺伝子、ktk遺伝子、fbp遺伝子、ppc遺伝子、pck遺伝子、ddx遺伝子、pyc遺伝子またはicd遺伝子から選択される、請求項9に記載のキメラ合成プロモーター。

【請求項11】

前記リコピン生合成経路の一部である前記異種遺伝子が、dxs遺伝子、ispC遺伝子、ispE遺伝子、ispD遺伝子、ispF遺伝子、ispG遺伝子、ispH遺伝子、idh遺伝子、ispA遺伝子、ispB遺伝子、 crtE遺伝子、crtB遺伝子、crtI遺伝子、crtY遺伝子、ymgA遺伝子、dxr遺伝子、elbA遺伝子、gdhA遺伝子、appY遺伝子、elbB遺伝子、またはyngB遺伝子から選択される、請求項9に記載のキメラ合成プロモーター。

【請求項12】

前記生物学的製剤が、ヒューマリン(rhインスリン)、イントロンA(インターフェロンアルファ2b)、ロフェロン(インターフェロンアルファ2a)、ヒューマトローブ(ソマトロピンrh成長ホルモン)、ニューポジエン(フィルグラスチム)、ベタフェロ

ン（インターフェロンベータ - 1 b）、リスプロ（速効型インスリン）、ラピリシン（レテプラーゼ）、インフェルゲン（インターフェロンアルファコン - 1）、グルカゴン、ベロムン（タソネルミン）、オントック（デニロイキンジフチトクス）、ランタス（長時間作用型インスリングラルギン）、キネレット（アナキンラ）、ナトレコール（ネシリチド）、ソマバート（ペグビソマント）、カルシトニン（組換えカルシトニン サケ）、ルセンティス（ラニビズマブ）、プレオタクト（ヒト副甲状腺ホルモン）、クリステクサ（r h 尿酸オキシダーゼ、PEG化）、ニベスチム（フィルグラスチム、rhGCSF）、ボラキサゼ（グルカルピダーゼ）、またはプレオス（副甲状腺ホルモン）から選択される、請求項9に記載のキメラ合成プロモーター。

【請求項13】

配列番号132～207から選択される核酸配列を有するキメラ合成プロモーターに作用可能に連結した異種遺伝子。

【請求項14】

表2に見出される目的のタンパク質産物をコードする、請求項13に記載の異種遺伝子。

【請求項15】

リシン生合成経路の一部である、リコピン生合成経路の一部である、生物学的製剤をコードするまたは生物学的製剤を生成するための経路内の遺伝子である、請求項13に記載の異種遺伝子。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0093

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0093】

一部の実施形態では、生物学的製剤は、ヒューマリン（r hインスリン）、イントロンA（インターフェロンアルファ2b）、ロフェロン（インターフェロンアルファ2a）、ヒューマトロープ（ソマトロピンr h成長ホルモン）、ニューポジエン（フィルグラスチム）、ベタフェロン（インターフェロンベータ - 1 b）、リスプロ（速効型インスリン）、ラピリシン（レテプラーゼ）、インフェルゲン（インターフェロンアルファコン - 1）、グルカゴン、ベロムン（タソネルミン）、オントック（デニロイキンジフチトクス）、ランタス（長時間作用型インスリングラルギン）、キネレット（アナキンラ）、ナトレコール（ネシリチド）、ソマバート（ペグビソマント）、カルシトニン（組換えカルシトニン サケ）、ルセンティス（ラニビズマブ）、プレオタクト（ヒト副甲状腺ホルモン）、クリステクサ（r h 尿酸オキシダーゼ、PEG化）、ニベスチム（フィルグラスチム、rhGCSF）、ボラキサゼ（グルカルピダーゼ）、またはプレオス（副甲状腺ホルモン）から選択される。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

（項目1）

所望の表現型を獲得するためにE. coli微生物を進化させるゲノム操作のハイスクループット（HTP）方法であって、

a. 同じゲノム株バックグラウンドを有する最初の複数のE. coli微生物のゲノムを搅乱することによって、ユニークな遺伝的バリエーションを有する個々のE. coli株を含む最初のHTP遺伝子設計E. coli株ライプラリーを創製するステップと；

b. 前記最初のHTP遺伝子設計E. coli株ライプラリーの個々の株を、前記所望の表現型についてスクリーニングおよび選択するステップと；

c. それぞれが遺伝的バリエーションのユニークな組合せを含む後続の複数のE. coli微生物を提供することによって、後続のHTP遺伝子設計E. coli株ライプラリーを創製するステップであって、前記遺伝的バリエーションは、先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも2つの個々のE. coli株に存在する遺伝的バリエ

ーションから選択される、ステップと；

d. 前記後続のH T P 遺伝子設計 E . c o l i 株ライプラリーの個々の E . c o l i 株を、前記所望の表現型についてスクリーニングおよび選択するステップと；

e. E . c o l i 微生物が前記所望の表現型を獲得するまで、線形または非線形様式でステップ c) ~ d) を 1 回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、先行するH T P 遺伝子設計 E . c o l i 株ライプラリーの少なくとも 2 つの個々の E . c o l i 株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せであるユニークな遺伝的バリエーションを内包する個々の E . c o l i 株を含む新しいH T P 遺伝子設計 E . c o l i 株ライプラリーが創製される、ステップとを含む、方法。

(項目 2)

前記最初のH T P 遺伝子設計 E . c o l i 株ライプラリーが、プロモータースワップ微生物株ライプラリー、S N P スワップ微生物株ライプラリー、開始 / 停止コドン微生物株ライプラリー、最適化配列微生物株ライプラリー、ターミネータースワップ微生物株ライプラリー、タンパク質可溶性タグ微生物株ライプラリー、タンパク質分解タグ微生物株ライプラリー、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも 1 つのライプラリーを含む、項目 1 に記載のゲノム操作のH T P 方法。

(項目 3)

前記最初のH T P 遺伝子設計 E . c o l i 株ライプラリーが、プロモータースワップ微生物株ライプラリーを含む、項目 1 に記載のゲノム操作のH T P 方法。

(項目 4)

前記最初のH T P 遺伝子設計 E . c o l i 株ライプラリーが、少なくとも 1 つのバイシストロン設計 (B C D) 調節配列を含有するプロモータースワップ微生物株ライプラリーを含む、項目 1 または 2 に記載のゲノム操作のH T P 方法。

(項目 5)

前記最初のH T P 遺伝子設計 E . c o l i 株ライプラリーが、S N P スワップ微生物株ライプラリーを含む、項目 1 に記載のゲノム操作のH T P 方法。

(項目 6)

前記最初のH T P 遺伝子設計 E . c o l i 株ライプラリーが、
a. キメラ生合成酵素をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドであって、前記キメラ生合成酵素は、E . c o l i において調節経路に関与する酵素を含み、前記酵素に、D N A 結合部位に結合することができるD N A 結合ドメインが翻訳的に融合する、少なくとも 1 つのポリヌクレオチド；および

b. 前記D N A 結合部位を含む少なくとも 1 つのD N A 足場配列を含む微生物株ライプラリーを含む、項目 1 または 2 に記載のゲノム操作のH T P 方法。

(項目 7)

前記後続のH T P 遺伝子設計 E . c o l i 株ライプラリーが、前記最初のH T P 遺伝子設計 E . c o l i 株ライプラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアル株ライプラリーである、項目 1 に記載のゲノム操作のH T P 方法。

(項目 8)

前記後続のH T P 遺伝子設計 E . c o l i 株ライプラリーが、前記最初のH T P 遺伝子設計 E . c o l i 株ライプラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアル株ライプラリーのサブセットである、項目 1 に記載のゲノム操作のH T P 方法。

(項目 9)

前記後続のH T P 遺伝子設計 E . c o l i 株ライプラリーが、先行するH T P 遺伝子設計 E . c o l i 株ライプラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアル株ライプラリーである、項目 1 に記載のゲノム操作のH T P 方法。

(項目 10)

前記後続のH T P 遺伝子設計 E . c o l i 株ライプラリーが、先行するH T P 遺伝子設

計 E. coli 株ライブラリーにおける前記遺伝的バリエーションに由来する完全コンビナトリアル株ライブラリーのサブセットである、項目 1 に記載のゲノム操作の HTP 方法。

(項目 1 1)

前記ゲノムを搅乱するステップが、ランダム変異誘発、標的配列挿入、標的配列欠失、標的配列の置換、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも 1 つの方法を利用することを含む、項目 1 に記載のゲノム操作の HTP 方法。

(項目 1 2)

前記最初の複数の E. coli 微生物が、工業生産 E. coli 株に由来するユニークな遺伝的バリエーションを含む、項目 1 に記載のゲノム操作の HTP 方法。

(項目 1 3)

前記最初の複数の E. coli 微生物が、S₁Gen₁ で表される工業生産株微生物および S_nGen_n で表されるこれらに由来する任意の数の後続の微生物世代を含む、項目 1 に記載のゲノム操作の HTP 方法。

(項目 1 4)

SNP スワップ E. coli 株ライブラリーを生成するための方法であって、
a. 参照 E. coli 株および第 2 の E. coli 株を提供するステップであって、前記第 2 の E. coli 株は、前記参照 E. coli 株内に存在しない一塩基多型、DNA 挿入、および DNA 欠失から選択される複数の同定された遺伝的バリエーションを含む、ステップと；

b. 前記参照 E. coli 株または前記第 2 の E. coli 株のいずれかのゲノムを搅乱することによって、複数の個々の E. coli 株を含む最初の SNP スワップ E. coli 株ライブラリーを創製するステップであって、前記複数の個々の株の各株内にユニークな遺伝的バリエーションが見出され、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記参照 E. coli 株と前記第 2 の E. coli 株との間の前記複数の同定された遺伝的バリエーションから選択される単一の遺伝的バリエーションに対応する、ステップと

を含む、方法。

(項目 1 5)

前記参照 E. coli 株の前記ゲノムが搅乱されて、前記第 2 の E. coli 株内に見出される前記同定された一塩基多型、DNA 挿入、または DNA 欠失の 1 つまたは複数が付加される、項目 1 4 に記載の SNP スワップ E. coli 株ライブラリーを生成するための方法。

(項目 1 6)

前記第 2 の E. coli 株の前記ゲノムが搅乱されて、前記参照 E. coli 株内に見出されない前記同定された一塩基多型、DNA 挿入、または DNA 欠失の 1 つまたは複数が除去される、項目 1 4 に記載の SNP スワップ E. coli 株ライブラリーを生成するための方法。

(項目 1 7)

ユニークな遺伝的バリエーションを有する結果として生じる前記複数の個々の E. coli 株が、前記参照 E. coli 株と前記第 2 の E. coli 株との間のすべての前記同定された遺伝的バリエーションの完全コンビナトリアルライブラリーと一緒に含む、項目 1 4 から 1 6 までのいずれか一項に記載の SNP スワップ E. coli 株ライブラリーを生成するための方法。

(項目 1 8)

ユニークな遺伝的バリエーションを有する結果として生じる前記複数の個々の E. coli 株が、前記参照 E. coli 株と前記第 2 の E. coli 株との間のすべての前記同定された遺伝的バリエーションの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットと一緒に含む、項目 1 4 から 1 6 までのいずれか一項に記載の SNP スワップ E. coli 株ライブラリーを生成するための方法。

(項目 19)

產生 *E. coli* 株の表現型性能を再建および改善するための方法であって、
a. 親系統 *E. coli* 株およびそれに由来する產生 *E. coli* 株を提供するステップであって、前記產生 *E. coli* 株は、前記親系統株内に存在しない一塩基多型、DNA 插入、およびDNA 欠失から選択される複数の同定された遺伝的バリエーションを含む、ステップと；
b. 前記親系統 *E. coli* 株または前記產生 *E. coli* 株のいずれかのゲノムを搅乱して、最初の *E. coli* 株のライブラリーを創製するステップであって、前記最初のライブラリーにおける各株は、前記親系統 *E. coli* 株と前記產生 *E. coli* 株との間の前記複数の同定された遺伝的バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションを含む、ステップと；
c. 参照 *E. coli* 株に対する表現型性能改善について前記最初のライブラリーの個々の株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；
d. 前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも 2 つの個々の *E. coli* 株に存在する遺伝的バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数の *E. coli* 微生物を提供することによって、*E. coli* 株の後続のライブラリーを創製するステップと；
e. 前記参照 *E. coli* 株に対する表現型性能改善について前記後続のライブラリーの個々の株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；
f. *E. coli* 株が、前記產生 *E. coli* 株の前記表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップ d) ~ e) を 1 回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、微生物株の新しいライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも 2 つの個々の *E. coli* 株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップとを含む、方法。

(項目 20)

前記最初の *E. coli* 株のライブラリーが、前記親系統 *E. coli* 株と前記產生 *E. coli* 株との間の前記同定された遺伝的バリエーションのすべてを含む完全コンピナトリアルライブラリーである、項目 19 に記載の產生 *E. coli* 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 21)

前記最初の *E. coli* 株のライブラリーが、前記親系統 *E. coli* 株と前記產生 *E. coli* 株との間の前記同定された遺伝的バリエーションのサブセットを含む完全コンピナトリアルライブラリーのサブセットである、項目 19 に記載の產生 *E. coli* 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 22)

前記後続の *E. coli* 株のライブラリーが、前記最初のライブラリーの完全コンピナトリアルライブラリーである、項目 19 に記載の產生 *E. coli* 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 23)

前記後続の *E. coli* 株のライブラリーが、前記最初のライブラリーの完全コンピナトリアルライブラリーのサブセットである、項目 19 に記載の產生 *E. coli* 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 24)

前記後続の *E. coli* 株のライブラリーが、先行するライブラリーの完全コンピナトリアルライブラリーである、項目 19 に記載の產生 *E. coli* 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目25)

前記後続のE. coli株のライブラリーが、先行するライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目19に記載の產生E. coli株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目26)

前記親系統E. coli株の前記ゲノムが搅乱されて、前記產生E. coli株内に見出される前記同定された一塩基多型、DNA挿入、またはDNA欠失の1つまたは複数が付加される、項目19に記載の產生E. coli株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目27)

前記產生E. coli株の前記ゲノムが搅乱されて、前記親系統E. coli株内に見出されない前記同定された一塩基多型、DNA挿入、またはDNA欠失の1つまたは複数が除去される、項目19に記載の產生E. coli株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目28)

前記ゲノムを搅乱するステップが、ランダム変異誘発、標的配列挿入、標的配列欠失、標的配列の置換、およびこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1つの方法を利用することを含む、項目19から25までのいずれか一項に記載の產生E. coli株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目29)

後続のライブラリーのE. coli株の前記表現型性能が、前記產生E. coli株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも10%の増加を呈するまで、ステップd)～e)を繰り返す、項目19に記載の產生E. coli株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目30)

後続のライブラリーのE. coli株の前記表現型性能が、前記產生E. coli株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも1倍の増加を呈するまで、ステップd)～e)を繰り返す、項目19に記載の產生E. coli株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目31)

ステップf)の表現型性能の改善が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目19に記載の產生E. coli株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目32)

ステップf)の表現型性能の改善が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目19に記載の產生E. coli株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目33)

前記同定された遺伝的バリエーションが、プロモータースワップライブラリー由来の人工プロモータースワップ遺伝的バリエーションをさらに含む、項目19に記載の產生E. coli株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目34)

前記最初のE. coli株のライブラリー、または後続のE. coli株のライブラリーのいずれかの少なくとも1つの微生物株のゲノムを、内在性E. coli標的遺伝子に作動可能に連結したプロモーターラダー由来の1つまたは複数のプロモーターを含むように操作するステップ

をさらに含む、項目 19 に記載の產生 E. coli 株の表現型性能を再建および改善するための方法。

(項目 35)

プロモータースワップ E. coli 株ライブラリーを生成するための方法であって、

a. 基準 E. coli 株に内在する複数の標的遺伝子、およびプロモーターラダーを提供するステップであって、前記プロモーターラダーは、前記基準 E. coli 株において異なる発現プロファイルを呈する複数のプロモーターを含む、ステップと；

b. 前記基準 E. coli 株のゲノムを操作することによって、複数の個々の E. coli 株を含む最初のプロモータースワップ E. coli 株ライブラリーを創製するステップであって、前記複数の個々の E. coli 株の各株内にユニークな遺伝的バリエーションが見出され、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準 E. coli 株に内在する前記標的遺伝子の 1 つに作動可能に連結した前記プロモーターラダー由來の前記プロモーターの 1 つまたは複数を含む、ステップと；

を含む、方法。

(項目 36)

前記複数のプロモーターの少なくとも 1 つが、バイリストロン設計 (B C D) 調節配列を含む、項目 35 に記載のプロモータースワップ E. coli 株ライブラリーを生成するための方法。

(項目 37)

產生 E. coli 株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法であって、

a. 基準 E. coli 株に内在する複数の標的遺伝子、およびプロモーターラダーを提供するステップであって、前記プロモーターラダーは、前記基準 E. coli 株において異なる発現プロファイルを呈する複数のプロモーターを含む、ステップと；

b. 前記基準 E. coli 株のゲノムを操作することによって、複数の個々の E. coli 株を含む最初のプロモータースワップ E. coli 株ライブラリーを創製するステップであって、前記複数の個々の E. coli 株の各株内にユニークな遺伝的バリエーションが見出され、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準 E. coli 株に内在する前記標的遺伝子の 1 つに作動可能に連結した前記プロモーターラダー由來の前記プロモーターの 1 つまたは複数を含む、ステップと；

c. 参照 E. coli 株に対する表現型性能改善について前記最初のプロモータースワップ E. coli 株ライブラリーの個々の E. coli 株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；

d. 前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも 2 つの個々の E. coli 株に存在する遺伝的バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれぞれが含む後続の複数の E. coli 微生物を提供することによって、後続のプロモータースワップ E. coli 株ライブラリーを創製するステップと；

e. 前記参照 E. coli 株に対する表現型性能改善について前記後続のプロモータースワップ E. coli 株ライブラリーの個々の E. coli 株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；

f. E. coli 株が、前記產生 E. coli 株の前記表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップ d) ~ e) を 1 回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、微生物株の新しいプロモータースワップ E. coli 株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも 2 つの個々の E. coli 株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと；

を含む、方法。

(項目38)

前記後続のプロモータースワップE.coli株ライプラリーが、前記最初のプロモータースワップE.coli株ライプラリーの完全コンビナトリアルライプラリーである、項目37に記載の產生E.coli株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

(項目39)

前記後続のプロモータースワップE.coli株ライプラリーが、前記最初のプロモータースワップE.coli株ライプラリーの完全コンビナトリアルライプラリーのサブセットである、項目37に記載の產生E.coli株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

(項目40)

前記後続のプロモータースワップE.coli株ライプラリーが、先行するプロモータースワップE.coli株ライプラリーの完全コンビナトリアルライプラリーである、項目37に記載の產生E.coli株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

(項目41)

前記後続のプロモータースワップE.coli株ライプラリーが、先行するプロモータースワップE.coli株ライプラリーの完全コンビナトリアルライプラリーのサブセットである、項目37に記載の產生E.coli株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

(項目42)

後続のプロモータースワップE.coli株ライプラリーのE.coli株の表現型性能が、前記產生E.coli株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも10%の増加を呈するまで、ステップd)~e)を繰り返す、項目37から41までのいずれか一項に記載の產生E.coli株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

(項目43)

後続のプロモータースワップE.coli株ライプラリーのE.coli株の表現型性能が、前記產生E.coli株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも1倍の増加を呈するまで、ステップd)~e)を繰り返す、項目37から41までのいずれか一項に記載の產生E.coli株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

(項目44)

ステップf)の表現型性能の改善が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目37に記載の產生E.coli株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

(項目45)

ステップf)の表現型性能の改善が、目的の産物の増大したまたはより効率的な產生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目37に記載の產生E.coli株の表現型性能を改善するためのプロモータースワップ方法。

(項目46)

ターミネータースワップE.coli株ライプラリーを生成するための方法であって、
a. 基準E.coli株に内在する複数の標的遺伝子、およびターミネーターラダーを提供するステップであって、前記ターミネーターラダーは、前記基準E.coli株において異なる発現プロファイルを呈する複数のターミネーターを含む、ステップと；
b. 前記基準E.coli株のゲノムを操作することによって、複数の個々のE.coli株を含む最初のターミネータースワップE.coli株ライプラリーを創製するステ

ップであって、前記複数の個々の E. coli 株の各株内にユニークな遺伝的バリエーションが見出され、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準 E. coli 株に内在する前記標的遺伝子の 1 つに作動可能に連結した前記ターミネーターラダーバ由來の前記ターミネーターの 1 つまたは複数を含む、ステップとを含む、方法。

(項目 47)

产生 E. coli 株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法であって、

a. 基準 E. coli 株に内在する複数の標的遺伝子、およびターミネーターラダーを提供するステップであって、前記ターミネーターラダーは、前記基準 E. coli 株において異なる発現プロファイルを呈する複数のターミネーターを含む、ステップと；

b. 前記基準 E. coli 株のゲノムを操作することによって、複数の個々の E. coli 株を含む最初のターミネータースワップ E. coli 株ライブラリーを創製するステップであって、前記複数の個々の E. coli 株の各株内にユニークな遺伝的バリエーションが見出され、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準 E. coli 株に内在する前記標的遺伝子の 1 つに作動可能に連結した前記ターミネーターラダーバ由來の前記ターミネーターの 1 つまたは複数を含む、ステップと；

c. 参照 E. coli 株に対する表現型性能改善について前記最初のターミネータースワップ E. coli 株ライブラリーの個々の E. coli 株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；

d. 前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも 2 つの個々の E. coli 株に存在する遺伝的バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれが含む後続の複数の E. coli 微生物を提供することによって、後続のターミネータースワップ E. coli 株ライブラリーを創製するステップと；

e. 前記参照 E. coli 株に対する表現型性能改善について前記後続のターミネータースワップ E. coli 株ライブラリーの個々の E. coli 株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；

f. E. coli 株が、前記产生 E. coli 株の前記表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップ d) ~ e) を 1 回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、微生物株の新しいターミネータースワップ E. coli 株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリーにおける各株は、先行するライブラリーの少なくとも 2 つの個々の E. coli 株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップと

を含む、方法。

(項目 48)

前記後続のターミネータースワップ E. coli 株ライブラリーが、前記最初のターミネータースワップ E. coli 株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目 47 に記載の产生 E. coli 株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

(項目 49)

前記後続のターミネータースワップ E. coli 株ライブラリーが、前記最初のターミネータースワップ E. coli 株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目 47 に記載の产生 E. coli 株の表現型性能を改善するためのターミネータースワップ方法。

(項目 50)

前記後続のターミネータースワップ E. coli 株ライブラリーが、先行するターミネータースワップ E. coli 株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである

、項目47に記載の產生E. coli株の表現型性能を改善するためのターミネータスワップ方法。

(項目51)

前記後続のターミネータスワップE. coli株ライブラリーが、先行するターミネータスワップE. coli株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目47に記載の產生E. coli株の表現型性能を改善するためのターミネータスワップ方法。

(項目52)

後続のターミネータスワップE. coli株ライブラリーのE. coli株の表現型性能が、前記產生E. coli株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも10%の増加を呈するまで、ステップd)~e)を繰り返す、項目47から51までのいずれか一項に記載の產生E. coli株の表現型性能を改善するためのターミネータスワップ方法。

(項目53)

後続のターミネータスワップE. coli株ライブラリーのE. coli株の表現型性能が、前記產生E. coli株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも1倍の増加を呈するまで、ステップd)~e)を繰り返す、項目47から51までのいずれか一項に記載の產生E. coli株の表現型性能を改善するためのターミネータスワップ方法。

(項目54)

ステップf)の表現型性能の改善が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目47に記載の產生E. coli株の表現型性能を改善するためのターミネータスワップ方法。

(項目55)

ステップf)の表現型性能の改善が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目47に記載の產生E. coli株の表現型性能を改善するためのターミネータスワップ方法。

(項目56)

E. coli宿主細胞における生合成経路由来の生合成酵素を共局在化させるためのシステムであって、

a. 酵素反応に関与する2種またはそれよりも多くのキメラ酵素タンパク質であって、各キメラ酵素タンパク質は、DNA結合ドメイン部分とカップリングした酵素部分を含む、2種またはそれよりも多くのキメラ酵素タンパク質；および

b.

i. 少なくとも1つの核酸スペーサーによって分離された2つまたはそれよりも多くの異なるDNA結合部位をそれぞれが含む1つまたは複数のサブユニットを含むDNA足場を含み、

前記キメラ酵素タンパク質は、そのそれぞれが、前記DNA足場内の少なくとも1つのDNA結合部位に結合する、該キメラ酵素タンパク質とカップリングしたDNA結合ドメイン部分によって前記DNA足場に補充される、システム。

(項目57)

前記キメラ酵素タンパク質の前記DNA結合ドメイン部分が、ジンクフィンガーDNA結合ドメインを含み、前記DNA足場の前記DNA結合部位が、対応するジンクフィンガーリンク配列を含む、項目56に記載のシステム。

(項目58)

前記 2 種またはそれよりも多くのキメラ酵素タンパク質のそれぞれの前記酵素部分が、そのそれぞれの DNA 結合ドメイン部分と、ポリペプチドリンカー配列を介してカップリングしている、項目 5 6 に記載のシステム。

(項目 5 9)

前記 2 種またはそれよりも多くのキメラ酵素タンパク質のそれぞれの前記酵素部分が、そのそれぞれの DNA 結合ドメイン部分と、そのアミノ末端またはそのカルボキシ末端を介してカップリングしている、項目 5 6 に記載のシステム。

(項目 6 0)

前記 2 種またはそれよりも多くのキメラ酵素タンパク質が、アミノ酸生合成経路の酵素を含む、項目 5 6 に記載のシステム。

(項目 6 1)

- a . 作動可能に連結したプロモーター；
- b . 第 1 のリボソーム結合部位 (S D 1) ；
- c . 第 1 のシストロン配列 (C i s 1) ；
- d . 第 2 のリボソーム結合部位 (S D 2)

を順に含むバイシストロン設計調節 (B C D) 配列であって、

標的遺伝子配列 (C i s 2) に作動可能に連結している、 B C D 配列。

(項目 6 2)

S D 1 および S D 2 がそれぞれ N N N G G A N N N の配列を含む、項目 6 1 に記載の B C D 。

(項目 6 3)

S D 1 と S D 2 が異なる、項目 6 1 に記載の B C D 。

(項目 6 4)

C i s 1 が停止コドンを含み、 C i s 2 が開始コドンを含み、前記 C i s 1 停止コドンと前記 C i s 2 開始コドンが少なくとも 1 ヌクレオチド重複している、項目 6 1 に記載の B C D 。

(項目 6 5)

S D 2 が C i s 1 内に完全に組み込まれている、項目 6 1 に記載の B C D 。

(項目 6 6)

2 種の標的遺伝子タンパク質を宿主生物において発現させるための方法であって、

a . 前記宿主生物に、第 1 の標的遺伝子タンパク質をコードする第 1 のポリヌクレオチドを導入するステップであって、前記第 1 のポリヌクレオチドは、第 1 の項目 6 1 に記載のバイシストロン設計調節 (B C D) 配列に作動可能に連結している、ステップと；

b . 前記宿主生物に、第 2 の標的遺伝子タンパク質をコードする第 2 のポリヌクレオチドを導入するステップであって、前記第 2 のポリヌクレオチドは、第 2 の項目 6 1 に記載の B C D に作動可能に連結している、ステップと

を含み、

前記第 1 および第 2 の B C D は、それらのそれぞれの C i s 1 配列以外は同一であり、前記標的遺伝子タンパク質は、前記宿主生物においてそれぞれ第 1 および第 2 の発現レベルで発現される、方法。

(項目 6 7)

前記第 1 の発現レベルが前記第 2 の発現レベルの 1 . 5 倍以内である、項目 6 6 に記載の方法。

(項目 6 8)

前記第 1 および第 2 のポリヌクレオチドが、前記宿主細胞において、前記第 1 および第 2 のポリヌクレオチドが同一の B C D によって発現される対照宿主細胞と比較して低レベルの相同組換えを受ける、項目 6 6 に記載の方法。

(項目 6 9)

タンパク質可溶性タグスワップ E . c o l i 株ライブラリーを生成するための方法であって、

a. 基準 E. coli 株に内在する複数の標的遺伝子、および可溶性タグラダーを提供するステップであって、前記可溶性タグラダーは、前記基準 E. coli 株において異なる可溶性プロファイルを呈する複数の可溶性タグを含む、ステップと；

b. 前記基準 E. coli 株のゲノムを操作することによって、複数の個々の E. coli 株を含む最初の可溶性タグスワップ E. coli 株ライブラリーを創製するステップであって、前記複数の個々の E. coli 株の各株内にユニークな遺伝的バリエーションが見出され、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準 E. coli 株に内在する前記標的遺伝子の 1 つに作動可能に連結した前記可溶性タグラダー由来の前記可溶性タグの 1 つまたは複数を含む、ステップとを含む、方法。

(項目 70)

产生 E. coli 株の表現型性能を改善するためのタンパク質可溶性タグスワップ方法であって、

a. 基準 E. coli 株に内在する複数の標的遺伝子、および可溶性タグラダーを提供するステップであって、前記可溶性タグラダーは、前記基準 E. coli 株において異なる発現プロファイルを呈する複数の可溶性タグを含む、ステップと；

b. 前記基準 E. coli 株のゲノムを操作することによって、複数の個々の E. coli 株を含む最初の可溶性タグスワップ E. coli 株ライブラリーを創製するステップであって、前記複数の個々の E. coli 株の各株内にユニークな遺伝的バリエーションが見出され、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準 E. coli 株に内在する前記標的遺伝子の 1 つに作動可能に連結した前記可溶性タグラダー由来の前記可溶性タグの 1 つまたは複数を含む、ステップと；

c. 参照 E. coli 株に対する表現型性能改善について前記最初の可溶性タグスワップ E. coli 株ライブラリーの個々の E. coli 株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと；

d. 前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも 2 つの個々の E. coli 株に存在する遺伝的バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれが含む後続の複数の E. coli 微生物を提供することによって、後続の可溶性タグスワップ E. coli 株ライブラリーを創製するステップと；

e. 前記参照 E. coli 株に対する表現型性能改善について前記後続の可溶性タグスワップ E. coli 株ライブラリーの個々の E. coli 株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；

f. E. coli 株が、前記产生 E. coli 株の前記表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップ d) ~ e) を 1 回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、微生物株の新しい可溶性タグスワップ E. coli 株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリー内の各株は、先行するライブラリーの少なくとも 2 つの個々の E. coli 株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップとを含む、方法。

(項目 71)

前記後続の可溶性タグスワップ E. coli 株ライブラリーが、前記最初の可溶性タグスワップ E. coli 株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目 70 に記載の产生 E. coli 株の表現型性能を改善するための可溶性タグスワップ方法。

(項目 72)

前記後続の可溶性タグスワップ E. coli 株ライブラリーが、前記最初の可溶性タグスワップ E. coli 株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目 70 に記載の产生 E. coli 株の表現型性能を改善するための可溶性タグ

スワップ方法。(項目73)

前記後続の可溶性タグスワップE. coli株ライブラリーが、先行する可溶性タグスワップE. coli株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目70に記載の產生E. coli株の表現型性能を改善するための可溶性タグスワップ方法。

(項目74)

前記後続の可溶性タグスワップE. coli株ライブラリーが、先行する可溶性タグスワップE. coli株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目70に記載の產生E. coli株の表現型性能を改善するための可溶性タグスワップ方法。

(項目75)

後続の可溶性タグスワップE. coli株ライブラリーのE. coli株の表現型性能が、前記產生E. coli株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも10%の増加を呈するまで、ステップd)~e)を繰り返す、項目70から74までのいずれか一項に記載の產生E. coli株の表現型性能を改善するための可溶性タグスワップ方法。

(項目76)

後続の可溶性タグスワップE. coli株ライブラリーのE. coli株の表現型性能が、前記產生E. coli株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも1倍の増加を呈するまで、ステップd)~e)を繰り返す、項目70から74までのいずれか一項に記載の產生E. coli株の表現型性能を改善するための可溶性タグスワップ方法。

(項目77)

ステップf)の表現型性能の改善が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目70から74までのいずれか一項に記載の產生E. coli株の表現型性能を改善するための可溶性タグスワップ方法。

(項目78)

ステップf)の表現型性能の改善が、目的の産物の増大したまたはより効率的な產生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次的細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目70から74までのいずれか一項に記載の產生E. coli株の表現型性能を改善するための可溶性タグスワップ方法。

(項目79)

タンパク質分解タグスワップE. coli株ライブラリーを生成するための方法であって、

a. 基準E. coli株に内在する複数の標的遺伝子、および分解タグラダーを提供するステップであって、前記分解タグラダーは、前記基準E. coli株において異なる溶解性プロファイルを呈する複数の分解タグを含む、ステップと；

b. 前記基準E. coli株のゲノムを操作することによって、複数の個々のE. coli株を含む最初の分解タグスワップE. coli株ライブラリーを創製するステップであって、前記複数の個々のE. coli株の各株内にユニークな遺伝的バリエーションが見出され、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準E. coli株に内在する前記標的遺伝子の1つに作動可能に連結した前記分解タグラダー由来の前記分解タグの1つまたは複数を含む、ステップと

を含む、方法。

(項目80)

產生E. coli株の表現型性能を改善するためのタンパク質分解タグスワップ方法であって、

a. 基準 E. coli 株に内在する複数の標的遺伝子、および分解タグラダーを提供するステップであって、前記分解タグラダーは、前記基準 E. coli 株において異なる発現プロファイルを呈する複数の分解タグを含む、ステップと；

b. 前記基準 E. coli 株のゲノムを操作することによって、複数の個々の E. coli 株を含む最初の分解タグスワップ E. coli 株ライブラリーを創製するステップであって、前記複数の個々の E. coli 株の各株内にユニークな遺伝的バリエーションが見出され、前記ユニークな遺伝的バリエーションのそれぞれは、前記基準 E. coli 株に内在する前記標的遺伝子の 1 つに作動可能に連結した前記分解タグラダー由来の前記分解タグの 1 つまたは複数を含む、ステップと；

c. 参照 E. coli 株に対する表現型性能改善について前記最初の分解タグスワップ E. coli 株ライブラリーの個々の E. coli 株をスクリーニングおよび選択することによって、表現型性能改善をもたらすユニークな遺伝的バリエーションを同定するステップと、

d. 前記先行するステップにおいてスクリーニングされた少なくとも 2 つの個々の E. coli 株に存在する遺伝的バリエーションからのユニークな遺伝的バリエーションの組合せをそれが含む後続の複数の E. coli 微生物を提供することによって、後続の分解タグスワップ E. coli 株ライブラリーを創製するステップと；

e. 前記参照 E. coli 株に対する表現型性能改善について前記後続の分解タグスワップ E. coli 株ライブラリーの個々の E. coli 株をスクリーニングおよび選択することによって、追加の表現型性能改善をもたらす遺伝的バリエーションのユニークな組合せを同定するステップと；

f. E. coli 株が、前記產生 E. coli 株の前記表現型性能と比較して、所望のレベルの表現型性能の改善を呈するまで、線形または非線形様式でステップ d) ~ e) を 1 回または複数回繰り返すステップであって、各後続の反復により、微生物株の新しい分解タグスワップ E. coli 株ライブラリーが創製され、前記新しいライブラリー内の各株は、先行するライブラリーの少なくとも 2 つの個々の E. coli 株の中から選択される遺伝的バリエーションの組合せである遺伝的バリエーションを含む、ステップとを含む、方法。

(項目 8 1)

前記後続の分解タグスワップ E. coli 株ライブラリーが、前記最初の分解タグスワップ E. coli 株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目 8 0 に記載の產生 E. coli 株の表現型性能を改善するための分解タグスワップ方法。

(項目 8 2)

前記後続の分解タグスワップ E. coli 株ライブラリーが、前記最初の分解タグスワップ E. coli 株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目 8 0 に記載の產生 E. coli 株の表現型性能を改善するための分解タグスワップ方法。

(項目 8 3)

前記後続の分解タグスワップ E. coli 株ライブラリーが、先行する分解タグスワップ E. coli 株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーである、項目 8 0 に記載の產生 E. coli 株の表現型性能を改善するための分解タグスワップ方法。

(項目 8 4)

前記後続の分解タグスワップ E. coli 株ライブラリーが、先行する分解タグスワップ E. coli 株ライブラリーの完全コンビナトリアルライブラリーのサブセットである、項目 8 0 に記載の產生 E. coli 株の表現型性能を改善するための分解タグスワップ方法。

(項目 8 5)

後続の分解タグスワップ E. coli 株ライブラリーの E. coli 株の表現型性能が、前記產生 E. coli 株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも 10 % の増加を呈するまで、ステップ d) ~ e) を繰り返す、項目 8 0 から 8

4までのいずれか一項に記載の產生 E . c o l i 株の表現型性能を改善するための分解タグスワップ方法。

(項目 8 6)

後続の分解タグスワップ E . c o l i 株ライブラリーの E . c o l i 株の表現型性能が、前記產生 E . c o l i 株の前記表現型性能と比較して、測定された表現型変数における少なくとも 1 倍の増加を呈するまで、ステップ d) ~ e) を繰り返す、項目 8 0 から 8 4 までのいずれか一項に記載の產生 E . c o l i 株の表現型性能を改善するための分解タグスワップ方法。

(項目 8 7)

ステップ f) の表現型性能の改善が、目的の産物の体積生産性、目的の産物の比生産性、目的の産物の収率、目的の産物の力価、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目 8 0 から 8 4 までのいずれか一項に記載の產生 E . c o l i 株の表現型性能を改善するための分解タグスワップ方法。

(項目 8 8)

ステップ f) の表現型性能の改善が、目的の産物の増大したまたはより効率的な産生であり、前記目的の産物は、低分子、酵素、ペプチド、アミノ酸、有機酸、合成化合物、燃料、アルコール、一次細胞外代謝産物、二次的細胞外代謝産物、細胞内コンポーネント分子、およびこれらの組合せからなる群から選択される、項目 8 0 から 8 4 までのいずれか一項に記載の產生 E . c o l i 株の表現型性能を改善するための分解タグスワップ方法。

(項目 8 9)

微生物宿主細胞における発現のための、異種遺伝子に作動可能に連結したキメラ合成プロモーターであって、長さが 60 ~ 90 ヌクレオチドであり、ラムダファージ p_R プロモーターの遠位部分、それぞれ長さが 6 ヌクレオチドであるラムダファージ p_L および p_R プロモーターの可変 - 35 および - 10 領域、ラムダファージ p_L および p_R プロモーターのコア部分、ならびにラムダファージ p_R プロモーターの 5' UTR / リボソーム結合部位 (RBS) 部分からなる、キメラ合成プロモーター。

(項目 9 0)

前記ラムダファージ p_R プロモーターの前記遠位部分、前記ラムダファージ p_L および p_R プロモーターの前記可変 - 35 および - 10 領域、前記ラムダファージ p_L および p_R プロモーターの前記コア部分、ならびに前記ラムダファージ p_R プロモーターの前記 5' UTR / リボソーム結合部位 (RBS) 部分の核酸配列が、表 1 . 5 に見出される核酸配列から選択される、項目 8 9 に記載のキメラ合成プロモーター。

(項目 9 1)

微生物宿主細胞における発現のための、異種遺伝子に作動可能に連結したキメラ合成プロモーターであって、長さが 60 ~ 90 ヌクレオチドであり、ラムダファージ p_R プロモーターの遠位部分、それぞれ長さが 6 ヌクレオチドであるラムダファージ p_L および p_R プロモーターの可変 - 35 および - 10 領域、ラムダファージ p_L および p_R プロモーターのコア部分ならびに E . c o l i a c s 遺伝子のプロモーターの 5' UTR / リボソーム結合部位 (RBS) 部分からなる、キメラ合成プロモーター。

(項目 9 2)

前記ラムダファージ p_R プロモーターの前記遠位部分、前記ラムダファージ p_L および p_R プロモーターの前記可変 - 35 および - 10 領域、前記ラムダファージ p_L および p_R プロモーターの前記コア部分、ならびに前記 E . c o l i a c s 遺伝子の前記プロモーターの前記 5' UTR / リボソーム結合部位 (RBS) 部分の核酸配列が、表 1 . 5 に見出される核酸配列から選択される、項目 9 1 に記載のキメラ合成プロモーター。

(項目 9 3)

配列番号 132 ~ 152、159 ~ 160、162、165、174 ~ 175、188、190、199 ~ 201 または 207 から選択される核酸配列からなる、項目 8 9 から 9 0 までのいずれかに記載のキメラ合成プロモーター。

(項目 9 4)

配列番号 153～158、161、163～164、166～173、176～187、189、191～198または202～206から選択される核酸配列からなる、項目91から92までのいずれかに記載のキメラ合成プロモーター。

(項目95)

前記微生物宿主細胞が *E. coli* である、項目89から92までのいずれかに記載のキメラ合成プロモーター。

(項目96)

前記異種遺伝子が、表2に見出される目的のタンパク質産物をコードする、項目95に記載のキメラ合成プロモーター。

(項目97)

前記異種遺伝子が、リシン生合成経路の一部である遺伝子である、項目95に記載のキメラ合成プロモーター。

(項目98)

前記異種遺伝子が、*asd* 遺伝子、*ask* 遺伝子、*hom* 遺伝子、*dapA* 遺伝子、*dapB* 遺伝子、*dapD* 遺伝子、*ddh* 遺伝子、*argD* 遺伝子、*dapE* 遺伝子、*dapF* 遺伝子、*lysA* 遺伝子、*lysE* 遺伝子、*zwf* 遺伝子、*pgi* 遺伝子、*ktk* 遺伝子、*fbp* 遺伝子、*ppc* 遺伝子、*pck* 遺伝子、*ddx* 遺伝子、*pyc* 遺伝子または*icd* 遺伝子から選択される、項目97に記載のキメラ合成プロモーター。

(項目99)

前記異種遺伝子が、リコピン生合成経路の一部である遺伝子である、項目95に記載のキメラ合成プロモーター。

(項目100)

前記異種遺伝子が、*dxs* 遺伝子、*ispC* 遺伝子、*ispE* 遺伝子、*ispD* 遺伝子、*ispF* 遺伝子、*ispG* 遺伝子、*ispH* 遺伝子、*idi* 遺伝子、*ispA* 遺伝子、*ispB* 遺伝子、 *crtE* 遺伝子、*crtB* 遺伝子、*crtI* 遺伝子、*crtY* 遺伝子、*ymgA* 遺伝子、*dxr* 遺伝子、*elbA* 遺伝子、*gdhA* 遺伝子、*appY* 遺伝子、*elbB* 遺伝子、または*ymgB* 遺伝子から選択される、項目99に記載のキメラ合成プロモーター。

(項目101)

前記異種遺伝子が、生物学的製剤をコードするまたは生物学的製剤を生成するための経路内の遺伝子である、項目95に記載のキメラ合成プロモーター。

(項目102)

前記生物学的製剤が、ヒューマリン(*r h*インスリン)、イントロンA(インターフェロンアルファ2b)、ロフェロン(インターフェロンアルファ2a)、ヒューマトロープ(ソマトロビン*r h*成長ホルモン)、ニューポジエン(フィルグラスチム)、ベタフェロン(インターフェロンベータ-1b)、リスプロ(速効型インスリン)、ラピリシン(レテプラーゼ)、インフェルゲン(インターフェロンアルファコン-1)、グルカゴン、ベロムン(タソネルミン)、オントック(デニロイキンジフチトクス)、ランタス(長時間作用型インスリングラルギン)、キネレット(アナキンラ)、ナトレコール(ネシリチド)、ソマバート(ペグビソマント)、カルシトニン(組換えカルシトニン サケ)、ルセンティス(ラニビズマブ)、プレオタクト(ヒト副甲状腺ホルモン)、クリステクサ(*r h*尿酸オキシダーゼ、PEG化)、ニベスチム(フィルグラスチム、*r h* GCSF)、ボラキサゼ(グルカルピダーゼ)、またはプレオス(副甲状腺ホルモン)から選択される、項目99に記載のキメラ合成プロモーター。

(項目103)

配列番号132～207から選択される核酸配列を有するキメラ合成プロモーターに作動可能に連結した異種遺伝子。

(項目104)

表2に見出される目的のタンパク質産物をコードする、項目103に記載の異種遺伝子。

(項目105)

リシン生合成経路の一部である遺伝子である、項目103に記載の異種遺伝子。

(項目106)

a s d 遺伝子、a s k 遺伝子、h o m 遺伝子、d a p A 遺伝子、d a p B 遺伝子、d a p D 遺伝子、d d h 遺伝子、a r g D 遺伝子、d a p E 遺伝子、d a p F 遺伝子、l y s A 遺伝子、l y s E 遺伝子、z w f 遺伝子、p g i 遺伝子、k t k 遺伝子、f b p 遺伝子、p p c 遺伝子、p c k 遺伝子、d d x 遺伝子、p y c 遺伝子またはi c d 遺伝子から選択される、項目105に記載の異種遺伝子。

(項目107)

リコピン生合成経路の一部である遺伝子である、項目103に記載の異種遺伝子。

(項目108)

d x s 遺伝子、i s p C 遺伝子、i s p E 遺伝子、i s p D 遺伝子、i s p F 遺伝子、i s p G 遺伝子、i s p H 遺伝子、i d i 遺伝子、i s p A 遺伝子、i s p B 遺伝子、c r t E 遺伝子、c r t B 遺伝子、c r t I 遺伝子、c r t Y 遺伝子、y m g A 遺伝子、d x r 遺伝子、e l b A 遺伝子、g d h A 遺伝子、a p p Y 遺伝子、e l b B 遺伝子、またはy m g B 遺伝子から選択される、項目107に記載の異種遺伝子。

(項目109)

生物学的製剤をコードするまたは生物学的製剤を生成するための経路内の遺伝子である、項目103に記載の異種遺伝子。

(項目110)

前記生物学的製剤が、ヒューマリン(r hインスリン)、イントロンA(インターフェロンアルファ2b)、ロフェロン(インターフェロンアルファ2a)、ヒューマトローブ(ソマトロビンr h成長ホルモン)、ニューポジエン(フィルグラスチム)、ベタフェロン(インターフェロンベータ-1b)、リスプロ(速効型インスリン)、ラピリシン(レテプラーゼ)、インフェルゲン(インターフェロンアルファコン-1)、グルカゴン、ベロムン(タソネルミン)、オントック(デニロイキンジフチトクス)、ランタス(長時間作用型インスリングラルギン)、キネレット(アナキンラ)、ナトレコール(ネシリチド)、ソマバート(ペグビソマント)、カルシトニン(組換えカルシトニン サケ)、ルセンティス(ラニビズマブ)、プレオタクト(ヒト副甲状腺ホルモン)、クリステクサ(r h尿酸オキシダーゼ、PEG化)、ニベスチム(フィルグラスチム、r h G C S F)、ボラキサゼ(グルカルピダーゼ)、またはプレオス(副甲状腺ホルモン)から選択される、項目109に記載の異種遺伝子。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0433

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0433】

本開示のプロモーターの非網羅的なリストを、以下の表1および/または表1.4に提供する。プロモーター配列のそれぞれは、異種プロモーターまたは異種プロモーターポリヌクレオチドと呼ぶことができる。

【表1】

表1. 本開示の選択されたプロモーター配列

配列番号	プロモーター省略名	プロモーターナ
1	P1	Pcg0007_lib_39
2	P2	Pcg0007
3	P3	Pcg1860
4	P4	Pcg0755
5	P5	Pcg0007_265
6	P6	Pcg3381
7	P7	Pcg0007_119
8	P8	Pcg3121

【表1.4-1】

表1.4 本開示の追加のプロモーター配列。

プロモーター名	配列番号	タイプ*
b0904_プロモーター	71	生来の
b2405_プロモーター	72	生来の
b0096_プロモーター	73	生来の
b0576_プロモーター	74	生来の
b2017_プロモーター	75	生来の
b1278_プロモーター	76	生来の
b4255_プロモーター	77	生来の
b0786_プロモーター	78	生来の
b0605_プロモーター	79	生来の
b1824_プロモーター	80	生来の
b1061_プロモーター	81	生来の
b0313_プロモーター	82	生来の
b0814_プロモーター	83	生来の
b4133_プロモーター	84	生来の
b4268_プロモーター	85	生来の
b0345_プロモーター	86	生来の
b2096_プロモーター	87	生来の
b1277_プロモーター	88	生来の
b1646_プロモーター	89	生来の
b4177_プロモーター	90	生来の
b0369_プロモーター	91	生来の
b1920_プロモーター	92	生来の
b3742_プロモーター	93	生来の
b3929_プロモーター	94	生来の
b3743_プロモーター	95	生来の
b1613_プロモーター	96	生来の

【表1.4-2】

b1749_プロモーター	97	生来の
b2478_プロモーター	98	生来の
b0031_プロモーター	99	生来の
b2414_プロモーター	100	生来の
b1183_プロモーター	101	生来の
b0159_プロモーター	102	生来の
b2837_プロモーター	103	生来の
b3237_プロモーター	104	生来の
b3778_プロモーター	105	生来の
b2349_プロモーター	106	生来の
b1434_プロモーター	107	生来の
b3617_プロモーター	108	生来の
b0237_プロモーター	109	生来の
b4063_プロモーター	110	生来の
b0564_プロモーター	111	生来の
b0019_プロモーター	112	生来の
b2375_プロモーター	113	生来の
b1187_プロモーター	114	生来の
b2388_プロモーター	115	生来の
b1051_プロモーター	116	生来の
b4241_プロモーター	117	生来の
b4054_プロモーター	118	生来の
b2425_プロモーター	119	生来の
b0995_プロモーター	120	生来の
b1399_プロモーター	121	生来の
b3298_プロモーター	122	生来の
b2114_プロモーター	123	生来の
b2779_プロモーター	124	生来の
b1114_プロモーター	125	生来の
b3730_プロモーター	126	生来の
b3025_プロモーター	127	生来の
b0850_プロモーター	128	生来の

【表1.4-3】

b2365_プロモーター	129	生来の
b4117_プロモーター	130	生来の
b2213_プロモーター	131	生来の
pMB029_プロモーター	132	合成
pMB023_プロモーター	133	合成
pMB025_プロモーター	134	合成
pMB019_プロモーター	135	合成
pMB008_プロモーター	136	合成
pMB020_プロモーター	137	合成
pMB022_プロモーター	138	合成
pMB089_プロモーター	139	合成
pMB001_プロモーター	140	合成
pMB051_プロモーター	141	合成
pMB070_プロモーター	142	合成
pMB074_プロモーター	143	合成
pMB046_プロモーター	144	合成
pMB071_プロモーター	145	合成
pMB013_プロモーター	146	合成
pMB080_プロモーター	147	合成
pMB038_プロモーター	148	合成
pMB060_プロモーター	149	合成
pMB064_プロモーター	150	合成
pMB058_プロモーター	151	合成
pMB085_プロモーター	152	合成
pMB081_プロモーター	153	合成
pMB091_プロモーター	154	合成
pMB027_プロモーター	155	合成
pMB048_プロモーター	156	合成
pMB055_プロモーター	157	合成
pMB006_プロモーター	158	合成
pMB012_プロモーター	159	合成
pMB014_プロモーター	160	合成

【表 1 . 4 - 4】

pMB028_プロモーター	161	合成
pMB059_プロモーター	162	合成
pMB061_プロモーター	163	合成
pMB043_プロモーター	164	合成
pMB066_プロモーター	165	合成
pMB079_プロモーター	166	合成
pMB032_プロモーター	167	合成
pMB068_プロモーター	168	合成
pMB082_プロモーター	169	合成
pMB030_プロモーター	170	合成
pMB067_プロモーター	171	合成
pMB050_プロモーター	172	合成
pMB069_プロモーター	173	合成
pMB017_プロモーター	174	合成
pMB039_プロモーター	175	合成
pMB011_プロモーター	176	合成
pMB072_プロモーター	177	合成
pMB016_プロモーター	178	合成
pMB077_プロモーター	179	合成
pMB047_プロモーター	180	合成
pMB052_プロモーター	181	合成
pMB090_プロモーター	182	合成
pMB035_プロモーター	183	合成
pMB073_プロモーター	184	合成
pMB004_プロモーター	185	合成
pMB054_プロモーター	186	合成
pMB024_プロモーター	187	合成
pMB007_プロモーター	188	合成
pMB005_プロモーター	189	合成
pMB003_プロモーター	190	合成
pMB088_プロモーター	191	合成
pMB065_プロモーター	192	合成

【表1.4-5】

pMB037_プロモーター	193	合成
pMB009_プロモーター	194	合成
pMB041_プロモーター	195	合成
pMB036_プロモーター	196	合成
pMB049_プロモーター	197	合成
pMB044_プロモーター	198	合成
pMB042_プロモーター	199	合成
pMB086_プロモーター	200	合成
pMB053_プロモーター	201	合成
pMB057_プロモーター	202	合成
pMB018_プロモーター	203	合成
pMB002_プロモーター	204	合成
pMB015_プロモーター	205	合成
pMB087_プロモーター	206	合成
pMB063_プロモーター	207	合成

*Escherichia coli 由来の生来のプロモーター

【表1.5-1】

表1.5.コンビナトリアル合成プロモーター-5'UTRライブラリーに使用される配列部分

部分名	部分配列	起源
遠位	ACCGTGCGTG (配列番号 208)	λ ファージ、 P_R プロモーター
-35	TTTACA	バリエーション
	TTGACT	λ ファージ、 P_R プロモーター
	TTGACCA	λ ファージ、 P_L プロモーター
	TAGGCT	バリエーション
	TAGACT	バリエーション
コア	ATTTTACCTCTGGCGGT (配列番号 209)	λ ファージ、 P_R プロモーター
	TAAATACCACTGGCGGT (配列番号 210)	λ ファージ、 P_L プロモーター
-10	GATAAT	λ ファージ、 P_R プロモーター
	GATACT	λ ファージ、 P_L プロモーター
	TAGAGT	バリエーション
	TATAAT	バリエーション
	TATTTT	バリエーション

【表1.5-2】

5'- UTR/RBS	GGTTGCATGTACTAAGGAGGTTGT (配列番号 211)	λ ファージ、 P_R プロモーター
	TAACATCCTACAAGGAGAACAAAAGC (配列番号 212)	<i>E. coli, acs</i> 遺伝子のプロモーター