

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6047505号
(P6047505)

(45) 発行日 平成28年12月21日(2016.12.21)

(24) 登録日 平成28年11月25日(2016.11.25)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 P 19/04 (2006.01)	C 1 2 P 19/04 C
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 41 (全 52 頁)

(21) 出願番号	特願2013-554607 (P2013-554607)	(73) 特許権者	513206809
(86) (22) 出願日	平成24年2月16日 (2012. 2. 16)		グリコシン リミテッド ライアビリティ
(65) 公表番号	特表2014-506474 (P2014-506474A)		ー カンパニー
(43) 公表日	平成26年3月17日 (2014. 3. 17)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウ
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/025450		ォルサム ウィンター ストリート 89
(87) 国際公開番号	W02012/112777		〇 スイート 208
(87) 国際公開日	平成24年8月23日 (2012. 8. 23)	(74) 代理人	100102978
審査請求日	平成26年12月25日 (2014. 12. 25)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	61/443, 470	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成23年2月16日 (2011. 2. 16)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 操作された細菌におけるヒト乳オリゴ糖の生合成

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 内因性の β -ガラクトシダーゼ遺伝子の欠損または機能的不活性化、
(ii) 野生型細菌のそれと比較して検出可能な低減されたレベルの β -ガラクトシダーゼ活性を含む外因性の機能的 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、
(iii) 外因性のラクトース-アクセプティング (lactose-accepting) フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、および
(iv) GDP-フコース合成経路
を含む細菌を提供する段階；

ラクトースの存在下で該細菌を培養する段階；および
該細菌からまたは該細菌の培養上清からフコシル化オリゴ糖を回収する段階、
を含む、細菌においてフコシル化オリゴ糖を産生する方法。

【請求項 2】

外因性の機能的 β -ガラクトシダーゼ遺伝子が大腸菌 (E. coli) lacZ 遺伝子を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記細菌が腸内細菌を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

前記細菌が、増加した細胞内ラクトースプールを蓄積し、該増加した細胞内ラクトースプールが少なくとも野生型細菌におけるラクトースレベルの 10% よりも多い、請求項1

10

20

記載の方法。

【請求項 5】

前記外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子が α (1,2)フコシルトランスフェラーゼまたは α (1,3)フコシルトランスフェラーゼをコードする、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

前記 α (1,2)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子がバクテロイデス・フラギリス (*Bacteroides fragilis*) wcfW遺伝子を含む、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

前記 α (1,3)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子が、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) 26695 futA遺伝子を含む、請求項5記載の方法。

10

【請求項 8】

前記細菌が、 α (1,2)フコシルトランスフェラーゼをコードする外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子および α (1,3)フコシルトランスフェラーゼをコードする外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子の両方を含む、請求項5記載の方法。

【請求項 9】

前記GDP-フコース合成経路が内因性の酵素または外因性の酵素を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

前記細菌が機能的ラクトースパーミターゼ遺伝子を含む、請求項1記載の方法であって、該機能的ラクトースパーミターゼ遺伝子が、内因性のラクトースパーミターゼ遺伝子または外因性のラクトースパーミターゼ遺伝子である、請求項1記載の方法。

20

【請求項 11】

(i)内因性の β -ガラクトシダーゼ遺伝子の欠損または機能的不活性化、
(ii)野生型細菌のそれと比較して検出可能な低減されたレベルの β -ガラクトシダーゼ活性を含む外因性の機能的 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、

(iii)外因性のラクトース-アクセプティング (lactose-accepting) フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、および

(iv)コラン酸合成遺伝子における変異

を含む腸内細菌を提供する段階；

ラクトースの存在下で該細菌を培養する段階；および

該細菌からまたは該細菌の培養上清からフコシル化オリゴ糖を回収する段階、を含む、細菌においてフコシル化オリゴ糖を産生する方法。

30

【請求項 12】

前記外因性の機能的 β -ガラクトシダーゼ遺伝子が、大腸菌 lacZ 遺伝子を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 13】

前記外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子が α (1,2)フコシルトランスフェラーゼまたは α (1,3)フコシルトランスフェラーゼをコードする、請求項11記載の方法。

【請求項 14】

前記腸内細菌が大腸菌細菌を含む、請求項11記載の方法。

40

【請求項 15】

前記コラン酸合成遺伝子が wcaJ、wzxG、wcaD、wza、wzb または wzc 遺伝子を含む、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

前記細菌が lon 遺伝子における変異をさらに含む、請求項14記載の方法。

【請求項 17】

前記細菌が内因性の lon 遺伝子に挿入された機能的な野生型大腸菌 lacZ⁺ 遺伝子を含む、請求項14記載の方法。

【請求項 18】

前記内因性の β -ガラクトシダーゼ遺伝子が 大腸菌の内因性の lacZ 遺伝子である、請求

50

項14記載の方法。

【請求項 19】

前記細菌が外因性の rcsA または rcsB 遺伝子をさらに含む、請求項14記載の方法。

【請求項 20】

前記細菌が lacA 遺伝子における変異をさらに含む、請求項14記載の方法。

【請求項 21】

(i) 内因性の β -ガラクトシダーゼ遺伝子の欠損または機能的不活性化、
 (ii) 野生型細菌のそれと比較して検出可能な低減されたレベルの β -ガラクトシダーゼ活性を含む外因性の機能的 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、
 (iii) 外因性のシアリル-トランスフェラーゼ遺伝子、外因性のラクトース-アクセプティング (lactose-accepting) フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、
 (iv) GDP-フコース合成経路、
 (v) 欠陥 (deficient) シアル酸異化経路、および
 (vi) シアル酸合成能
 を含む細菌を提供する段階；
 ラクトースの存在下で該細菌を培養する段階；および
 該細菌からまたは該細菌の培養上清から3'-S3FLを回収する段階、
 を含む、細菌において3'-シアリル-3-フコシルラクトース (3'-S3FL) を産生する方法。

10

【請求項 22】

前記外因性のシアリル-トランスフェラーゼ遺伝子が α (2,3) シアリル-トランスフェラーゼをコードする、請求項21記載の方法。

20

【請求項 23】

前記外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子が、 α (1,3) フコシルトランスフェラーゼをコードする、請求項21記載の方法。

【請求項 24】

前記欠陥シアル酸異化経路が内因性のN-アセチルノイラミネートリアーゼまたはN-アセチルマンノサミンキナーゼ遺伝子においてヌル変異を含む、請求項21記載の方法。

【請求項 25】

前記シアル酸合成能が、外因性のUDP-GlcNAc 2-エピメラーゼ遺伝子、外因性のNeu5Acシンターゼ遺伝子、または外因性のCMP-Neu5Acシンテターゼ遺伝子を含む、請求項21記載の方法。

30

【請求項 26】

前記外因性の機能的 β -ガラクトシダーゼ遺伝子が 大腸菌 lacZ 遺伝子を含む、請求項21記載の方法。

【請求項 27】

前記細菌が 内因性のコラン酸合成遺伝子における変異をさらに含む、請求項21記載の方法。

【請求項 28】

前記細菌が、機能的ラクトースパーミアーゼ遺伝子をさらに含む、請求項21記載の方法。

40

【請求項 29】

細菌細胞溶解物または細菌の細菌細胞培養上清からのフコシル化オリゴ糖をカーボンカラムに結合させる段階、および該カラムからフコシル化オリゴ糖を溶出させる段階を含む、請求項1記載の方法によって産生されたフコシル化オリゴ糖を精製する方法。

【請求項 30】

(i) 内因性の β -ガラクトシダーゼ遺伝子の欠損または機能的不活性化、
 (ii) 野生型細菌のそれと比較して検出可能な低減されたレベルの β -ガラクトシダーゼ活性を含む外因性の機能的 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、
 (iii) 欠陥コラン酸合成経路、および
 (iv) 外因性のラクトースアクセプティング (lactose-accepting) フコシルトランスフェ

50

ラーゼ遺伝子
を含む、単離された大腸菌細菌。

【請求項 3 1】

機能的ラクトースパーミアラーゼ遺伝子をさらに含む、請求項30記載の単離された大腸菌細菌。

【請求項 3 2】

前記 β -ガラクトシダーゼ活性のレベルが低レベル β -ガラクトシダーゼ活性であって、該低レベル β -ガラクトシダーゼが0.05から200単位、0.05から5単位、0.05から4単位、0.05から3単位、または0.05から2単位を含む、請求項30記載の単離された大腸菌細菌。

【請求項 3 3】

プラスミド発現ベクターを含む、請求項30記載の単離された大腸菌細菌。

【請求項 3 4】

外因性のシアリル-トランスフェラーゼ遺伝子をさらに含む、請求項30記載の単離された大腸菌細菌。

【請求項 3 5】

前記外因性のシアリル-トランスフェラーゼ遺伝子が α (2,3) シアリル-トランスフェラーゼをコードする、請求項30記載の単離された大腸菌細菌。

【請求項 3 6】

内因性のN-アセチルノイラミネートリアーゼまたはN-アセチルマンノサミンキナーゼ遺伝子においてヌル変異を含む欠陥シアル酸異化経路をさらに含む、請求項30記載の単離された大腸菌細菌。

【請求項 3 7】

前記細菌を培養する段階が抗生物質を含まない、請求項1記載の方法。

【請求項 3 8】

前記腸内細菌が大腸菌細菌を含む、請求項3記載の方法。

【請求項 3 9】

前記細菌を培養する段階および／または前記フコシル化オリゴ糖を回収する段階が β -ガラクトシダーゼ活性を有する細菌において残留ラクトースを細菌培養から枯渇させる工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 4 0】

前記フコシル化オリゴ糖がヒト乳において見出される、請求項1記載の方法。

【請求項 4 1】

前記細菌がlacA遺伝子において変異をさらに含む、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、35 U.S.C. § 119(e)の下で、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2011年2月16日に提出された米国特許仮出願第61/443,470号に対する優先権の恩典を主張する。

【0 0 0 2】

発明の分野

本発明は、精製オリゴ糖、特にヒト乳中に典型的に見いだされるある種のフコシル化および／またはシアリル化オリゴ糖を産生するための組成物および方法を提供する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

発明の背景

ヒト乳は、多様で豊富な一連の中性および酸性オリゴ糖（ヒト乳オリゴ糖、HMOS）を含む。これらの分子の多くは、乳児によって栄養として直接利用されないが、とはいえ健康な腸マイクロビオームの確立、疾患の予防、および免疫機能において重要な役割を果たす

10

20

30

40

50

。本明細書において記述される本発明より前では、HMOSを大規模で安価に産生する能力には問題があった。たとえば、化学合成によるHMOS産生は、立体特異性の問題、前駆体の利用能、生成物の不純物、および総じて高い費用により制限された。そのため、多様な商業的応用のために大量のHMOSを安価に製造するための新規戦略が緊急に必要である。

【発明の概要】

【0004】

本明細書において記述される本発明は、フコシル化およびシアリル化オリゴ糖を産生するための効率的で経済的な方法を特色とする。細菌においてフコシル化オリゴ糖を産生する方法は、以下の段階を含む：機能的な β -ガラクトシダーゼ遺伝子、外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子、GDP-フコース合成経路、および機能的ラクトースパーミラーゼ遺伝子を含む細菌を提供する段階；ラクトースの存在下で細菌を培養する段階；ならびに細菌からまたは細菌の培養上清からフコシル化オリゴ糖を回収する段階。

10

【0005】

生合成によってフコシル化オリゴ糖を産生するために、細菌は、内因性または外因性のグアノシン二リン酸 (GDP) -フコース合成経路を利用する。「GDP-フコース合成経路」とは、それによってGDP-フコースが合成される、通常、酵素によって制御および触媒される一連の反応を意味する。大腸菌 (*Escherichia coli*) における例示的なGDP-フコース合成経路を以下に記載する。以下に記載されるGDP-フコース合成経路において、GDP-フコース合成のための酵素は、1) manA=ホスホマンノースイソメラーゼ (PMI)、2) manB=ホスホマンノムターゼ (PMM)、3) manC=マンノース-1-リン酸グアニリルトランスフェラーゼ (GMP)、4) gmd=GDP-マンノース-4,6-デヒドラターゼ (GMD)、5) fcl=GDP-フコースシンターゼ (GFS)、および6) $\Delta wcaJ$ =変異UDP-グルコース脂質担体トランスフェラーゼを含む。

20

グルコース $\rightarrow$ Glc-6-P $\rightarrow$ Fru-6-P $\rightarrow$ ¹ Man-6-P $\rightarrow$ ² Man-1-P $\rightarrow$ ³ GDP-Man $\rightarrow$ ^{4,5} GDP-Fuc

~~→~~ ⁶ コラン酸。

【0006】

全ての生物の共通の代謝中間体であるフルクトース-6-リン酸からGDP-フコースへの合成経路は、5つの酵素的段階からなる：1) PMI (ホスホマンノースイソメラーゼ)、2) PMM (ホスホマンノムターゼ)、3) GMP (マンノース-1-リン酸グアニリルトランスフェラーゼ)、4) GMD (GDP-マンノース-4,6-デヒドラターゼ)、および5) GFS (GDP-フコースシンターゼ)。個々の細菌種は、GDP-フコース合成に関して本来保有する能力が異なる。たとえば、大腸菌は、5つ全ての段階を行うためにコンピテントである酵素を含むが、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) は、段階4および5を行うことができる酵素 (すなわち、GMDおよびGFS) を欠失している。任意の特定の細菌種において本来欠失しているGDP合成経路における任意の酵素が、組み換え型DNA構築物における遺伝子として提供され、プラスミド発現ベクターにおいてまたは宿主染色体に組み入れられる外因性の遺伝子のいずれかとして供給される。

30

【0007】

本明細書において記述される本発明は、それによってHMOSの高レベル合成が起こる、腸内細菌である大腸菌K12 (*E.coli*) またはプロバイオティック細菌などの細菌内での遺伝子および経路の操作について詳しく述べる。多様な細菌種、たとえば、エルウィニア・ハービコラ (*Erwinia herbicola*)、パントエア・アグロメランス (*Pantoea agglomerans*)、シトロバクター・フロインディ (*Citrobacter freundii*)、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*)、ペクトバクテリウム・カロトボラム (*Pectobacterium carotovorum*)、またはキサントモナス・キャンペストリス (*Xanthomonas campestris*) がオリゴ糖生合成法において用いられうる。枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・コアギュランス (*Bacillus coagulans*)、バチルス・サーモフィルス (*Bacillus thermophilus*)、バチルス・ラテロスポルス (*Bacillus laterosporus*)、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、バチルス・ミコイデス (*Bacillus mycoides*)

40

50

、バチルス・プミルス (*Bacillus pumilus*)、バチルス・レンタス (*Bacillus lentus*)、セレウス菌 (*Bacillus cereus*)、およびバチルス・サーキュランス (*Bacillus circulans*) を含むバチルス (*Bacillus*) 属の細菌も同様に用いられうる。同様に、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・ヘルベチクス (*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・デルブルッキー (*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・ブルガリクス (*Lactobacillus bulgaricus*)、ラクトバチルス・クリスパツス (*Lactobacillus crispatus*)、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・レウテリ (*Lactobacillus reuteri*)、イエンセン菌 (*Lactobacillus jensenii*)、およびラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) が挙げられるがこれらに限定されるわけではない乳酸杆菌 (*Lactobacillus*) およびラクトコッカス (*Lactococcus*) 属の細菌が、本発明の方法を用いて改変されうる。ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophiles*) およびプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ (*Propionibacterium freudenreichii*) も同様に、本明細書において記述される本発明にとって適した細菌種である。エンテロコッカス (*Enterococcus*) 属 (たとえば、エンテロコッカス・ファシウム (*Enterococcus faecium*) およびエンテロコッカス・サーモフィルス (*Enterococcus thermophiles*))、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属 (たとえば、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス (*Bifidobacterium infantis*)、およびビフィドバクテリウム・ビフィドゥム (*Bifidobacterium bifidum*))、スポロラクトバチルス (*Sporolactobacillus*) 種、ミクロモノスポラ (*Micromonospora*) 種、ミクロコッカス (*Micrococcus*) 種、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 種、およびシュードモナス (たとえば、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) および緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)) の株も、本明細書において記述されるように改変されて本発明の一部として含まれる。本明細書において記述される特徴を含む細菌は、ラクトースの存在下で培養され、フコシル化オリゴ糖は、細菌そのものまたは細菌の培養上清のいずれかから回収される。フコシル化オリゴ糖は、治療製剤もしくは栄養製品において用いるために精製されるか、または細菌はそのような製品において直接用いられる。

【0008】

細菌はまた、機能的 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を含む。 β -ガラクトシダーゼ遺伝子は、内因性の β -ガラクトシダーゼ遺伝子または外因性の β -ガラクトシダーゼ遺伝子である。たとえば、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子は、大腸菌 *lacZ* 遺伝子 (たとえば、GenBank アクセッション番号 V00296 (GI:41901)、参照により本明細書に組み入れられる) を含む。細菌は、増加した細胞内ラクトースプールを蓄積して、低レベルの β -ガラクトシダーゼを産生する。

【0009】

機能的なラクトースパーミターゼ遺伝子も同様に、細菌に存在する。ラクトースパーミターゼ遺伝子は、内因性のラクトースパーミターゼ遺伝子または外因性のラクトースパーミターゼ遺伝子である。たとえば、ラクトースパーミターゼ遺伝子は、大腸菌 *lacY* 遺伝子 (たとえば、GenBank アクセッション番号 V00295 (GI:41897)、参照により本明細書に組み入れられる) を含む。多くの細菌が、大腸菌ラクトースパーミターゼの相同体 (たとえば、バチルス・リケニフォルミスにおいて見いだされるように)、または遍在性PTS糖輸送体ファミリーメンバー (たとえば、ラクトバチルス・カゼイおよびラクトバチルス・ラムノサスにおいて見いだされるように) である輸送体のいずれかである輸送体タンパク質を利用することによって、ラクトースを増殖培地から細胞へと輸送する能力を本来保有している。細胞外ラクトースを細胞の細胞質へと輸送する能力が本来欠如している細菌の場合、この能力は、組み換え型DNA構築物において提供される外因性のラクトース輸送体遺伝子 (たとえば、大腸菌 *lacY*) によって付与されて、プラスミド発現ベクター上でまたは

宿主染色体に組み入れられる外因性の遺伝子のいずれかとして供給される。

【0010】

細菌は、外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む。たとえば、外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、 α (1,2)フコシルトランスフェラーゼおよび／または α (1,3)フコシルトランスフェラーゼをコードする。例示的な α (1,2)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、バクテロイデス・フラギリス (*Bacteroides fragilis*) NCTC 9343のwcfW遺伝子 (SEQ ID NO:4) である。例示的な α (1,3)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) 26695 futA遺伝子である。ヘリコバクター・ピロリfutA遺伝子の一例は、参照により本明細書に組み入れられる、GenBankアクセッション番号HV532291 (GI:365791177) において表される。

10

【0011】

または、生合成によってフコシル化オリゴ糖を産生する方法は、以下の段階を含む：機能的 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子、コラン酸合成遺伝子における変異、および機能的ラクトースパーミターゼ遺伝子を含む腸内細菌を提供する段階；ラクトースの存在下で細菌を培養する段階；および細菌または細菌の培養上清からフコシル化オリゴ糖を回収する段階。

【0012】

生合成によってフコシル化オリゴ糖を産生するために、細菌は、内因性のコラン酸（フコース含有エキソ多糖類）合成遺伝子において変異を含む。「コラン酸合成遺伝子」とは、コラン酸の合成が起こる、通常、酵素によって制御されて触媒される一連の反応に係る遺伝子を意味する。例示的なコラン酸合成遺伝子には、rcsA遺伝子（たとえば、GenBankアクセッション番号M58003 (GI: 1103316)、参照により本明細書に組み入れられる）、rcsB遺伝子（たとえば、GenBankアクセッション番号E04821 (GI:2173017)、参照により本明細書に組み入れられる）、wcaJ遺伝子（たとえば、GenBankアクセッション番号（アミノ酸）BAA15900 (GI: 1736749)、参照により本明細書に組み入れられる）、wzxC遺伝子（たとえば、GenBankアクセッション番号（アミノ酸）BAA15899 (GI:1736748)、参照により本明細書に組み入れられる）、wcaD遺伝子（たとえば、GenBankアクセッション番号（アミノ酸）BAE76573 (GI:85675202)、参照により本明細書に組み入れられる）、wza遺伝子（たとえば、GenBankアクセッション番号（アミノ酸）BAE76576 (GI:85675205)、参照により本明細書に組み入れられる）、wzb遺伝子（たとえば、GenBankアクセッション番号（アミノ酸）BAE76575 (GI:85675204)、参照により本明細書に組み入れられる）、およびwzc遺伝子（たとえば、GenBankアクセッション番号（アミノ酸）BAA15913 (GI:1736763)、参照により本明細書に組み入れられる）が挙げられる。

20

30

【0013】

これは、コラン酸前駆体生合成に直接関係する、またはコラン酸合成レギュロンの全体的な制御のいずれかに関係する内因性の大腸菌遺伝子の多数の遺伝子改変を通して得られる。具体的に、宿主大腸菌株が、細胞外莢膜多糖類であるコラン酸を合成する能力は、UDP-グルコース脂質担体トランスフェラーゼをコードするwcaJ遺伝子の欠失によって消失する。wcaJヌルバックグラウンドでは、GDP-フコースは大腸菌の細胞質に蓄積する。コラン酸合成経路における正の調節タンパク質であるRcsAの過剰発現によって、細胞内GDP-フコースレベルの増加が起こる。コラン酸生合成のさらなる正の調節因子、すなわちRcsBの過剰発現も同様に、細胞内GDP-フコースレベルを増加させるために、RcsAの過剰発現の代わりにまたはRcsAの過剰発現に加えて利用される。または、コラン酸生合成は、大腸菌lon遺伝子（たとえば、GenBankアクセッション番号L20572 (GI:304907)、参照により本明細書に組み入れられる）にヌル変異を導入した後に増加する。Lonは、大腸菌においてコラン酸生合成の正の転写調節因子として上記のRcsA分解の原因となるアデノシン-5'-三リン酸（ATP）依存的細胞内プロテアーゼである。lonヌルバックグラウンドでは、RcsAは安定化されて、RcsAレベルは増加し、大腸菌においてGDP-フコース合成の原因となる遺伝子はアップレギュレートされ、および細胞内GDP-フコース濃度は増強される。

40

【0014】

50

たとえば、細菌はさらに、内因性の遺伝子、たとえば大腸菌のlon遺伝子に挿入された機能的な野生型の大腸菌lacZ⁺遺伝子を含む。このようにして、細菌は、lon遺伝子において変異を含みうる。

【0015】

細菌はまた、機能的β-ガラクトシダーゼ遺伝子を含む。β-ガラクトシダーゼ遺伝子は、内因性のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子または外因性のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子である。たとえば、β-ガラクトシダーゼ遺伝子は、大腸菌lacZ遺伝子を含む。大腸菌の内因性のlacZ遺伝子は、欠失されるか、または下流のラクトースパーミアーゼ（lacY）遺伝子の発現が無傷のままであるように機能的に不活化される。

【0016】

細菌は、外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む。たとえば、外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、α(1,2)フコシルトランスフェラーゼおよび／またはα(1,3)フコシルトランスフェラーゼをコードする。例示的なα(1,2)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、バクテロイデス・フラギリスNCTC 9343のwcfW遺伝子（SEQ ID NO:4）である。例示的なα(1,3)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、ヘリコバクター・ピロリ26695 futA遺伝子である。ヘリコバクター・ピロリfutA遺伝子の一例は、参照により本明細書に組み入れられる、GenBankアクセッション番号HV532291（GI:365791177）において表される。

【0017】

機能的なラクトースパーミアーゼ遺伝子もまた、細菌に存在する。ラクトースパーミアーゼ遺伝子は、内因性のラクトースパーミアーゼ遺伝子または外因性のラクトースパーミアーゼ遺伝子である。たとえば、ラクトースパーミアーゼ遺伝子は、大腸菌のlacY遺伝子を含む。

【0018】

細菌はさらに、外因性のrcsAおよび／またはrcsB遺伝子を含みえて（たとえば、プラスミドなどの異所性の核酸構築物において）、および細菌は、任意でlacA遺伝子（たとえば、GenBankアクセッション番号X51872（GI:41891）、参照により本明細書に組み入れられる）において変異をさらに含む。

【0019】

本明細書において記述される特徴を含む細菌を、ラクトースの存在下で培養して、フコシル化オリゴ糖を、細菌そのものまたは細菌の培養上清から回収する。フコシル化オリゴ糖は、治療製剤もしくは栄養製品において用いるために精製されるか、または細菌はそのような製品において直接用いられる。

【0020】

HMOSを産生するために本明細書において用いられる細菌は、増加した細胞内グアノシン二リン酸（GDP）-フコースプール、増加した細胞内ラクトースプール（野生型と比較して）を含むように、およびフコシルトランスフェラーゼ活性を含むように遺伝子操作される。したがって、細菌は、wcaJ遺伝子などのコラン酸（フコース含有エキソ多糖類）合成経路遺伝子において変異を含み、それによって細胞内GDP-フコースプールの増強が起こる。細菌はさらに、内因性の遺伝子、たとえば大腸菌のlon遺伝子に挿入された機能的な野生型の大腸菌lacZ⁺遺伝子を含む。このようにして、細菌はさらに、lon遺伝子において変異を含みうる。大腸菌の内因性のlacZ遺伝子は、欠失されるか、または下流のラクトースパーミアーゼ（lacY）遺伝子の発現が無傷のままであるように機能的に不活化される。そのように操作された生物は、多様なさらなる目的にとって有用である細胞内β-ガラクトシダーゼ活性の低レベルを同様に維持しながら、増殖培地からラクトースを輸送する能力、およびオリゴ糖合成においてアクセプター糖として用いるために細胞内ラクトースプールを作製する能力を維持する。細菌はさらに、外因性のrcsAおよび／またはrcsB遺伝子（たとえば、プラスミドなどの異所性核酸構築物において）を含みえて、および細菌は任意でlacA遺伝子においてさらに変異を含む。好ましくは、細菌は、増加した細胞内ラクトースプールを蓄積して、低レベルβ-ガラクトシダーゼを産生する。

10

20

30

40

50

【0021】

細菌は、フコシルトランスフェラーゼ活性を保有する。たとえば、細菌は、 α (1,2) フコシルトランスフェラーゼをコードする外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子および α (1,3) フコシルトランスフェラーゼをコードする外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子の1つまたは両方を含む。例示的な α (1,2) フコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、バクテロイデス・フラギリス NCTC 9343 の wcfW 遺伝子 (SEQ ID NO:4) である。本発明の前までは、この wcfW 遺伝子は α (1,2) フコシルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードすることが知られておらず、さらにアクセプター糖としてラクトースを利用する能力を保有するとは考えられていなかった。アクセプター糖としてラクトースを用いる他の α (1,2) フコシルトランスフェラーゼ遺伝子 (たとえば、ヘリコバクター・ピロリ 26695 futC 遺伝子、または大腸菌 0128:B12 wbsJ 遺伝子) は、バクテロイデス・フラギリス wcfW に容易に置換されうる。ヘリコバクター・ピロリ futC 遺伝子の一例は、参照により本明細書に組み入れられる、GenBank アクセッション番号 EF452503 (GI:134142866) において表される。

10

【0022】

例示的な α (1,3) フコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、ヘリコバクター・ピロリ 26695 futA 遺伝子であるが、当技術分野において公知である他の α (1,3) フコシルトランスフェラーゼ遺伝子 (たとえば、ヘリコバクター・ヘパティクス (*Helicobacter hepaticus*) Hh 0072、ヘリコバクター・ビルス (*Helicobacter bilis*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、またはバクテロイデス種からの α (1,3) フコシルトランスフェラーゼ遺伝子) に置換してもよい。本発明は、上記の遺伝子の1つ、2つ、3つ、またはそれより多くを含む核酸構築物を含む。たとえば、本発明は、欠失された内因性の β -ガラクトシダーゼ (たとえば、lacZ) 遺伝子、低活性の置換機能的 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、GDP-フコース合成経路、機能的ラクトースパーミターゼ遺伝子、および欠失されたラクトースアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を含む細菌宿主株に形質転換された外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子 (α (1,2) フコシルトランスフェラーゼまたは α (1,3) フコシルトランスフェラーゼをコードする) を発現する核酸構築物を含む。

20

【0023】

同様に、上記の単離大腸菌細菌で、欠陥コラン酸合成経路、低減されたレベルの β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 活性、および外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子を含むと特徴付けされた単離大腸菌細菌も本発明に含まれる。本発明はまた、a) 低いが発現可能なレベルの β -ガラクトシダーゼ活性を生じるように操作された β -ガラクトシダーゼ (たとえば、lacZ) 遺伝子インサートを利用することによって、 β -ガラクトシダーゼ陰性宿主細胞における遺伝子座を表現型標識する方法、b) 細胞培養培地における細胞質 β -ガラクトシダーゼの放出および検出を通して発酵実行時の溶解バクテリオファージ混入を容易に検出する方法、および c) 産生実行終了時に残留ラクトースを細菌培養から枯渇させる方法を含み、a)、b)、および c) は各々、そうでなければ β -ガラクトシダーゼ陰性宿主細胞において低いが発現可能なレベルの β -ガラクトシダーゼ活性の発現を導くように注意深く操作された機能的 β -ガラクトシダーゼ (たとえば、lacZ) 遺伝子インサートを利用することによって行われる。

30

40

【0024】

上記の方法によって産生された精製フコシル化オリゴ糖もまた、本発明の範囲内である。精製オリゴ糖、たとえば 2'-FL、3FL、LDFT は、所望のオリゴ糖が、少なくとも 90 重量%、95 重量%、98 重量%、99 重量%、または 100 重量% (w/w) であるオリゴ糖である。純度は、任意の公知の方法、たとえば薄層クロマトグラフィーまたは当技術分野において公知の他の電気泳動もしくはクロマトグラフィー技術によって評価される。本発明は、細菌細胞抽出物もしくは溶解物、または細菌細胞培養上清中の混入物から所望のフコシル化オリゴ糖 (たとえば、2'-FL) を分離する段階を含む、上記の遺伝子操作細菌によって産生されたフコシル化オリゴ糖を精製する方法を含む。混入物は、細菌 DNA、タンパク質および細胞壁成分、時に培養培地中の自発的化学反应において形成される黄色/茶色の糖カラメ

50

ルを含む。

【0025】

オリゴ糖は精製されて、ヒトならびにコンパニオン動物（イヌ、ネコ）および家畜（ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、またはブタ動物と共に家禽）などの動物が消費するための多数の製品において用いられる。たとえば、精製2'-フコシルラクトース（2'-FL）、3-フコシルラクトース（3FL）、ラクトジフコテトラオース（LDFT）、または3'-シアリル-3-フコシルラクトース（3'-S3FL）、および賦形剤を含む薬学的組成物は、経口投与にとって適している。大量の2'-FL、3FL、LDFT、または3'-S3FLは、細菌宿主、たとえば異種 α (1,2) フコシルトランスフェラーゼ、異種 α (1,3) フコシルトランスフェラーゼ、または異種シアリルトランスフェラーゼ、またはその混合物を含む大腸菌細菌において産生される。ラクトース、GDP-フコース、およびCMP-Neu5Acの各々の増強された細胞質プールを含む大腸菌細菌は、そのような産生系において有用である。ラクトースおよびGDP-フコースの場合、内因性の大腸菌代謝経路および遺伝子は、野生型大腸菌において見いだされるレベルと比較してラクトースおよび／またはGDP-フコースの増加した細胞質濃度が生成されるように操作される。たとえば、細菌は、上記の遺伝子改変を欠如する対応する野生型細菌におけるレベルより少なくとも10%、20%、50%、2倍、5倍、10倍、またはそれより多くのレベルを含む。CMP-Neu5Acの場合、内因性のNeu5Ac異化遺伝子は不活化されて、大腸菌に導入された外因性のCMP-Neu5Ac生合成遺伝子によって野生型細菌では見いだされないCMP-Neu5Acの細胞質プールが生成される。精製HMOSを含む薬学的組成物を産生する方法は、上記の細菌を培養する段階、細菌によって産生されたHMOSを精製する段階、およびHMOSを賦形剤または担体と混合して経口投与のための栄養補助食品を生じる段階によって行われる。これらの組成物は、乳児および成人における腸管および／または呼吸器の疾患を予防または処置する方法において有用である。したがって、組成物は、そのような疾患を有する、またはそのような疾患を発症するリスクを有する対象に投与される。

【0026】

それゆえ、本発明は、生物の内因性のコラン酸生合成経路を操作することによって大腸菌における細胞内GDP-フコースレベルを増加させる方法を提供する。これは、コラン酸前駆体生合成に、またはコラン酸合成レギュロンの全体的な制御に直接関係する内因性の大腸菌遺伝子の多数の遺伝子改変を通して行われる。本発明はまた、ラクトースの流入、排出、および異化に関係する内因性の大腸菌遺伝子の操作を用いることによって、ラクトースの存在下で生育させた細胞に関して、大腸菌におけるラクトースの細胞内濃度を増加させることを提供する。特に、本明細書において、lacA変異を遺伝子改変大腸菌に組み入れることによってヒト乳のオリゴ糖を産生するように遺伝子操作された大腸菌において、細胞内ラクトースレベルを増加させる方法が記述される。lacA変異は細胞内アセチルラクトースの形成を防止して、このことはその後の精製から混入物としてのこの分子を除外するのみならず、大腸菌が過剰なラクトースをその細胞質から排出する能力を消失させ、このように大腸菌細胞内ラクトースプールの意図的な操作を非常に容易にする。

【0027】

本明細書において、たとえば機能的な組み換え型大腸菌lacZ遺伝子の導入によって、または任意の多数の他の生物からの β -ガラクトシダーゼ遺伝子（たとえば、クルイベロミセス・ラクチス（*Kluyveromyces lactis*）のlac4遺伝子（たとえば、GenBankアクセッション番号M84410（GI:173304）、参照により本明細書に組み入れられる）によって提供されるように、細胞質 β -ガラクトシダーゼ活性の低い機能的レベルを同時に保持しながら、細胞内ラクトースプールを蓄積する能力を有する細菌宿主細胞も記述される。細胞質 β -ガラクトシダーゼの低い機能的レベルは、0.05から200単位のあいだ、たとえば0.05から5単位、0.05から4単位、0.05から3単位、または0.05から2単位（単位の定義に関しては、参照により本明細書に組み入れられる、Miller JH, Laboratory CSH. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY; 1972を参照されたい）の β -ガラクトシダーゼ活性レベルを含む。この低レベルの細胞質 β -ガラクトシダーゼ活性は、細胞内ラクトースプールを有意に減損するほど十分に高くはないが、

それにもかかわらず、宿主細胞バックグラウンドの構築の際に所望の遺伝子座の表現型標識などの作業にとって、発酵プロセスにおける望ましくないバクテリオファージ混入による細胞溶解の検出にとって、または発酵終了時の望ましくない残留ラクトースの容易な除去にとって非常に有用である。

【0028】

1つの局面において、 α (1,2)フコシルトランスフェラーゼをコードする外因性の核酸分子を含む操作された細菌によって産生されたヒト乳オリゴ糖は、2'-FL (2'-フコシルラクトース) である。好ましくは、利用される α (1,2)フコシルトランスフェラーゼは、まだ完全には特徴付けされていない、本発明のバクテロイデス・フラギリスNCTC 9343のwcfW遺伝子であるか、またはヘリコバクター・ピロリ26695のfutC遺伝子もしくは大腸菌株0128:B12のwbsJ遺伝子、または糖アクセプター基質としてラクトースを用いることができる他の任意の α (1,2)フコシルトランスフェラーゼを2'-FL合成のために利用してもよい。もう1つの局面において、 α (1,3)フコシルトランスフェラーゼをコードする外因性の核酸分子を含む操作された細菌によって産生されたヒト乳オリゴ糖は、3FL (3-フコシルラクトース) であり、細菌細胞は、外因性の α (1,3)フコシルトランスフェラーゼをコードする外因性の核酸分子を含む。好ましくは、細菌細胞は大腸菌である。外因性の α (1,3)フコシルトランスフェラーゼは、たとえばヘリコバクター・ピロリ、H. ヘパティクス、H. ビリス、C. ジェジュニ、またはバクテロイデス種から単離される。1つの局面において、外因性の α (1,3)フコシルトランスフェラーゼは、H. ヘパティクスHh0072、H. ピロリ11639 FucTa、またはH. ピロリUA948 FucTa (たとえば、GenBankアクセッション番号AF194963 (GI:28436396)、参照により本明細書に組み入れられる) を含む。本発明はまた、ヒト乳四糖類ラクトジフコテトラオース (LDFT) を産生するように遺伝子操作された大腸菌を含む組成物を提供する。この例における大腸菌は、 α (1,2)フコシルトランスフェラーゼをコードする外因性の核酸分子および α (1,3)フコシルトランスフェラーゼをコードする外因性の核酸分子を含む。1つの局面において、大腸菌は、 α (1,2)フコシルトランスフェラーゼを発現するプラスミド、および／または α (1,3)フコシルトランスフェラーゼを発現するプラスミドによって形質転換される。もう1つの局面において、大腸菌は、 α (1,2)フコシルトランスフェラーゼおよび α (1,3)フコシルトランスフェラーゼの両方を発現するプラスミドによって形質転換される。または、大腸菌は、 α (1,2)フコシルトランスフェラーゼを発現する染色体組み込み体および α (1,3)フコシルトランスフェラーゼを発現する染色体組み込み体によって形質転換される。任意で、大腸菌は、プラスミドpG177によって形質転換される。

【0029】

α (2,3)シアリルトランスフェラーゼをコードする外因性のシアリルトランスフェラーゼ遺伝子、および α (1,3)フコシルトランスフェラーゼをコードする外因性のフコシルトランスフェラーゼを含む、ヒト乳オリゴ糖3'-S3FL (3'-シアリル-3-フコシルラクトース) を産生する細菌細胞を含む組成物も、本明細書において記述される。好ましくは、細菌細胞は大腸菌である。外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、たとえば、たとえばヘリコバクター・ピロリ、H. ヘパティクス、H. ビリス、C. ジェジュニ、またはバクテロイデス種から単離される。たとえば、外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、H. ヘパティクスHh0072、H. ピロリ11639 FucTa、またはH. ピロリUA948 FucTaを含む。3'-S3FL産生のために利用される外因性のシアリルトランスフェラーゼ遺伝子は、多数の起源の任意の1つ、たとえば髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) および淋菌 (*N. gonorrhoeae*) について記述される遺伝子から得られうる。好ましくは、細菌は、GDP-フコース合成経路を含む。

【0030】

さらに、細菌は、欠陥 (deficient) シアル酸異化経路を含む。「シアル酸異化経路」とは、それによってシアル酸の分解が起こる、通常、酵素によって制御されて触媒される一連の反応を意味する。大腸菌における例示的なシアル酸異化経路を本明細書において記述する。本明細書において記述されるシアル酸異化経路において、シアル酸 (Neu5Ac ; N-

10

20

30

40

50

アセチルノイラミン酸)は、酵素NanA (N-アセチルノイラミン酸リアーゼ) およびNanK (N-アセチルマンノサミンキナーゼ) によって分解される。たとえば、欠陥シアル酸異化経路は、内因性のnanA (N-アセチルノイラミネートリアーゼ) (たとえば、GenBankアクセッション番号D00067 (GI:216588)、参照により本明細書に組み入れられる) および/またはnanK (N-アセチルマンノサミンキナーゼ) 遺伝子 (たとえば、GenBankアクセッション番号 (アミノ酸) BAE77265 (GI:85676015)) におけるヌル変異を通じて大腸菌で操作される。シアル酸代謝の他の成分は: (nanT) シアル酸輸送体; (ManNAc-6-P) N-アセチルマンノサミン-6-リン酸; (GlcNAc-6-P) N-アセチルグルコサミン-6-リン酸; (GlcN-6-P) グルコサミン-6-リン酸; および (Fruc-6-P) フルクトース-6-リン酸を含む。

【0031】

10

その上、細菌 (たとえば、大腸菌) はまた、シアル酸合成能も含む。たとえば、細菌は、外因性のUDP-GlcNAc 2-エピメラーゼ (たとえば、カンピロバクター・ジェジュニのneu Cまたは同等物 (たとえば、GenBankアクセッション番号 (アミノ酸) AAG29921 (GI: 11095585)、参照により本明細書に組み入れられる)、Neu5Acシンターゼ (たとえば、C.ジェジュニのneuBまたは同等物、たとえばGenBankアクセッション番号 (アミノ酸) AAG29920 (GI:11095584)、参照により本明細書に組み入れられる)、および/またはCMP-Neu5Acシンテターゼ (たとえば、C.ジェジュニのneuAまたは同等物、たとえばGenBankアクセッション番号 (アミノ酸) ADN91474 (GI:307748204)、参照により本明細書に組み入れられる) の提供により、シアル酸合成能を含む。

【0032】

20

さらに、細菌はまた、機能的β-ガラクトシダーゼ遺伝子および機能的ラクトースパーミターゼ遺伝子も含む。本明細書において記述される特徴を含む細菌を、ラクトースの存在下で培養して、3'-シアリル-3-フコシルラクトースを、細菌そのものまたは細菌の培養上清から回収する。

【0033】

内因性のコラン酸合成遺伝子における変異、機能的lacZ遺伝子、機能的ラクトースパーミターゼ遺伝子、α(1,3)フコシルトランスフェラーゼをコードする外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子、およびα(2,3)シアリルトランスフェラーゼをコードする外因性のシアリルトランスフェラーゼ遺伝子を含む腸内細菌において、3'-シアリル-3-フコシルラクトース (3'-S3FL) を産生する方法も提供される。さらに、細菌は、欠陥シアル酸異化経路を含む。たとえば、細菌は、内因性のnanA (N-アセチルノイラミネートリアーゼ) および/またはnanK (N-アセチルマンノサミンキナーゼ) 遺伝子におけるヌル変異により、欠陥シアル酸異化経路を含む。細菌はまた、シアル酸合成能も含む。たとえば、細菌は、外因性のUDP-GlcNAc 2-エピメラーゼ (たとえば、C.ジェジュニのneuCまたは同等物)、Neu5Acシンターゼ (たとえば、C.ジェジュニのneuBまたは同等物)、および/またはCMP-Neu5Acシンテターゼ (たとえば、C.ジェジュニのneuAまたは同等物) の提供によるシアル酸合成能を含む。本明細書において記述される特徴を含む細菌を、ラクトースの存在下で培養して、3'-シアリル-3-フコシルラクトースを、細菌そのものまたは細菌の培養上清から回収する。

30

【0034】

40

低いが検出可能なレベルのβ-ガラクトシダーゼ活性を生じるように操作された挿入された組み換え型β-ガラクトシダーゼ (たとえば、lacZ) 遺伝子を利用することによって、その本来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子が欠失しているかまたは不活化されている宿主細胞において遺伝子座を表現型標識する方法も提供される。同様に、本発明はまた、低いが検出可能なレベルのβ-ガラクトシダーゼ活性を生じるように操作された挿入された組み換え型β-ガラクトシダーゼ (たとえば、lacZ) 遺伝子を利用することによって、その本来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子が欠失しているかまたは不活化されているβ-ガラクトシダーゼ陰性宿主細胞において残留ラクトースを細菌培養から枯渇させる方法も提供する。最後に、低いが検出可能なレベルのβ-ガラクトシダーゼ活性を生じるように操作された挿入された組み換え型β-ガラクトシダーゼ (たとえば、lacZ) 遺伝子を利用すること

50

によって、その本来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子が欠失しているかまたは不活化されている β -ガラクトシダーゼ陰性宿主細胞の培養物において細菌細胞溶解を検出する方法も提供される。

【0035】

本明細書において記述される方法によって産生されるフコシル化オリゴ糖を精製する方法は、細菌細胞溶解物または細菌の細菌細胞培養上清からのフコシル化オリゴ糖をカーボンカラムに結合させる段階、およびフコシル化オリゴ糖をカラムから溶出させる段階によって行われる。精製フコシル化オリゴ糖は、本明細書において記述される方法によって産生される。

【0036】

任意で、本発明は、ベクター、たとえば核酸を含むベクターを特色とする。ベクターはさらに、1つまたは複数の調節エレメント、たとえば異種プロモーターを含むことができる。調節エレメントは、タンパク質遺伝子、融合タンパク質遺伝子、または融合タンパク質を発現させるためにオペロンに連結された一連の遺伝子に機能的に連結させることができる。なおもう1つの局面において、本発明は、単離された組み換え型細胞、たとえば上記の核酸分子またはベクターを含む細菌細胞を含む。核酸配列は、任意でゲノムに組み入れることができる。

【0037】

所定のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはオリゴ糖に関連して「実質的に純粋な」という用語は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはオリゴ糖が他の生物学的高分子を実質的に含まないことを意味する。実質的に純粋なポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはオリゴ糖は、乾燥重量で少なくとも75%（たとえば、少なくとも80、85、95、または99%）純粋である。純度は、任意の適切な校正された標準法によって、たとえばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、薄層クロマトグラフィー（TLC）、またはHPLC分析によって測定することができる。

【0038】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、およびオリゴ糖は、精製および／または単離される。精製されたとは、ヒト対象に投与するために安全である無菌性の程度、たとえば感染物質または毒性物質を欠如することを定義する。具体的に、本明細書において用いられるように、「単離された」または「精製された」核酸分子、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、タンパク質、またはオリゴ糖は、組み換え技術によって産生される場合、他の細胞材料もしくは培養培地を実質的に含まず、または化学合成される場合には化学前駆物質もしくは他の化学物質を実質的に含まない。たとえば、精製HMOS組成物は、関心対象の化合物の少なくとも60重量%（乾燥重量）である。好ましくは、調製物は、関心対象化合物の少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも90重量%、および最も好ましくは少なくとも99重量%である。純度は、任意の適切な校正された標準法によって、たとえばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、薄層クロマトグラフィー（TLC）、またはHPLC分析によって測定される。たとえば、「精製タンパク質」は、天然に会合している他のタンパク質、脂質、および核酸から分離されているタンパク質を意味する。好ましくはタンパク質は、精製調製物の乾燥重量の少なくとも10、20、50、70、80、90、95、99～100%を構成する。

【0039】

「単離核酸」とは、そこから核酸が由来する生物の天然に存在するゲノムにおいてそれが隣接する遺伝子を含まない核酸を意味する。この用語はたとえば、（a）天然に存在するゲノムDNA分子の一部であるが、それが天然に存在する生物のゲノムにおいて分子のその部分に隣接する核酸配列の両方が隣接していないDNA；（b）得られた分子が、いかなる天然に存在するベクターまたはゲノムDNAとも同一でないように、ベクターに、または原核細胞もしくは真核細胞のゲノムDNAに組み入れられた核酸；（c）cDNA、ゲノム断片、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって産生された断片、または制限断片などの個別の分子；および（d）ハイブリッド遺伝子、すなわち融合タンパク質をコードする遺伝子の一部

10

20

30

40

50

である組み換え型ヌクレオチド配列を含む。本発明に従う単離核酸分子は、さらに、合成によって産生された分子、ならびに化学的に変化しているおよび／または改変骨格を有する任意の核酸を含む。たとえば、単離核酸は、精製cDNAまたはRNAポリヌクレオチドである。

【0040】

核酸配列に機能的に連結している場合、「異種プロモーター」は、核酸配列に天然では会合しないプロモーターを意味する。

【0041】

「発現する」および「過剰発現する」という用語は、いくつかの例において、本明細書の方法において有用な細胞が、産生するように遺伝子改変される因子のいくつかを本来発現しうる場合、この場合は、ポリヌクレオチド配列の付加によって因子の過剰発現が起こるという事実を指すために用いられる。すなわち、同じ条件下で、野生型細胞によって発現される場合より、変化した細胞によってより多くの因子が発現される。同様に、細胞が、産生するように遺伝子改変される因子を本来発現しない場合、用いられる用語は、野生型細胞が因子を全く発現しなかったことから、単に因子を「発現する」となるであろう。

【0042】

本明細書において用いられる「処置する」および「処置」という用語は、症状の重症度および／または回数の低減を行うために、症状および／またはその基礎となる原因をなくすために、および／または損傷の改善または矯正を容易にするために、有害な状態、障害、または疾患に罹患している臨床的に症候性の個体への物質または製剤の投与を意味する。「予防する」および「予防」という用語は、特定の有害な状態、障害、または疾患に対して感受性がある臨床的に無症候性の個体に対する物質または組成物の投与を意味し、このように症状および／またはその基礎となる原因の発生の予防に関する。

【0043】

本発明は、HMOSが病原体に結合して、対象が病原体に感染しているかまたは病原体による感染症のリスクを有する、本発明の組み換え型株の培養から精製されたヒト乳オリゴ糖を含む組成物を対象に投与する段階を含む、対象における感染症を処置、予防、またはリスクを低減させる方法を提供する。1つの局面において、感染症は、ノーウォーク様ウイルスまたはカンピロバクター・ジェジュニによって引き起こされる。対象は、好ましくはそのような処置を必要とする哺乳動物である。哺乳動物は、たとえば任意の哺乳動物、たとえばヒト、霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、またはブタである。好ましい態様において、哺乳動物はヒトである。たとえば、組成物は、コンパニオン動物、たとえばイヌまたはネコ、ならびに家禽または食用に消費するために生育させる動物、たとえばウシ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、およびヤギのための動物飼料（たとえば、ペレット、キブル、マッシュ）または動物飼料補助食品に調合されうる。好ましくは、精製HMOSは、粉末に調合されるか（たとえば、その各々が消費される前に水またはジュースなどの液体と混合される、幼動物用処方粉末または成体用栄養補助粉末）、または錠剤、カプセル剤、もしくはペーストの剤形で、またはミルク、クリーム、チーズ、ヨーグルト、またはケフィアなどの乳製品中の成分として、または任意の飲料における成分として、またはプレバイオティックスとして役立つように意図される生きた微生物培養物を含む調製物もしくはインビトロもしくはインビボのいずれかで有益な微生物の生育を増強することが意図されるプレバイオティックス調製物中に混合して組み入れられる。たとえば、精製糖（たとえば、2'-FL）を、プロバイオティック栄養組成物中でビフィドバクテリウムまたはラクトバチルスと混合することができる（すなわち、ビフィドバクテリアは、通常のヒト腸菌叢の有益な成分であり、生育のためにHMOSを利用することもまた知られている）。

【0044】

製剤または製剤成分の「有効量」および「治療的有效量」という用語は、所望の効果を提供するために製剤または成分の非毒性であるが十分量を意味する。

【0045】

「含む (comprising)」という移行語 (transitional term) は、「含む (including)」

10

20

30

40

50

」、「含有する (containing)」、「または「を特徴とする (characterized by)」という用語と同義であり、包括的または無制限であり、追加の引用されていない要素または方法の段階を除外しない。対照的に、「からなる (consisting of)」という移行句は、特許請求の範囲に明記されていないいかなる要素、段階または成分も除外する。「本質的にからなる」という接続句は、特許請求の範囲の範囲を、明記された材料または段階、ならびに特許請求される本発明の「基本的な新規特徴に物質的な影響を及ぼさない材料または段階」に制限する。

【0046】

[本発明1001]

機能的 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子、GDP-
-フコース合成経路、機能的ラクトースパーミターゼ遺伝子を含む細菌を提供する段階；

ラクトースの存在下で該細菌を培養する段階；および

該細菌からまたは該細菌の培養上清からフコシル化オリゴ糖を回収する段階、
を含む、細菌においてフコシル化オリゴ糖を産生する方法。

[本発明1002]

β -ガラクトシダーゼ遺伝子が大腸菌 (*E. coli*) lacZ遺伝子を含む、本発明1001の方法
。

[本発明1003]

β -ガラクトシダーゼ遺伝子が内因性の β -ガラクトシダーゼ遺伝子または外因性の β -
ガラクトシダーゼ遺伝子である、本発明1001の方法。

[本発明1004]

前記細菌が、増加した細胞内ラクトースプールを蓄積し、かつ低レベル β -ガラクトシ
ダーゼを産生する、本発明1001の方法。

[本発明1005]

前記外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子が α (1,2) フコシルトランスフェラー
ゼまたは α (1,3) フコシルトランスフェラーゼをコードする、本発明1001の方法。

[本発明1006]

前記 α (1,2) フコシルトランスフェラーゼ遺伝子がバクテロイデス・フラギリス (*Bacte
roides fragilis*) wcfW遺伝子を含む、本発明1005の方法。

[本発明1007]

前記 α (1,3) フコシルトランスフェラーゼ遺伝子が、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicob
acter pylori*) 26695 futA遺伝子を含む、本発明1005の方法。

[本発明1008]

前記細菌が、 α (1,2) フコシルトランスフェラーゼをコードする外因性のフコシルトラ
ンスフェラーゼ遺伝子および α (1,3) フコシルトランスフェラーゼをコードする外因性の
フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の両方を含む、本発明1005の方法。

[本発明1009]

前記GDP-フコース合成経路が内因性の酵素または外因性の酵素を含む、本発明1001の方
法。

[本発明1010]

前記ラクトースパーミターゼ遺伝子が、内因性のラクトースパーミターゼ遺伝子または
外因性のラクトースパーミターゼ遺伝子である、本発明1001の方法。

[本発明1011]

機能的 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子、コ
ラン酸合成遺伝子における変異、および機能的ラクトースパーミターゼ遺伝子を含む腸内
細菌を提供する段階；

ラクトースの存在下で該細菌を培養する段階；および

該細菌からまたは該細菌の培養上清からフコシル化オリゴ糖を回収する段階、
を含む、細菌においてフコシル化オリゴ糖を産生する方法。

[本発明1012]

前記 β -ガラクトシダーゼ遺伝子が、大腸菌 lacZ 遺伝子を含む、本発明1011の方法。

[本発明1013]

前記外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子が α (1,2) フコシルトランスフェラーゼまたは α (1,3) フコシルトランスフェラーゼをコードする、本発明1011の方法。

[本発明1014]

前記腸内細菌が大腸菌を含む、本発明1011の方法。

[本発明1015]

前記コラン酸合成遺伝子が wcaJ 遺伝子を含む、本発明1014の方法。

[本発明1016]

前記細菌が lon 遺伝子における変異をさらに含む、本発明1014の方法。

10

[本発明1017]

前記細菌が内因性の lon 遺伝子に挿入された機能的な野生型大腸菌 lacZ⁺ 遺伝子を含む、本発明1014の方法。

[本発明1018]

前記大腸菌の内因性の lacZ 遺伝子が欠失している、本発明1014の方法。

[本発明1019]

前記細菌が外因性の rcsA または rcsB 遺伝子をさらに含む、本発明1014の方法。

[本発明1020]

前記細菌が lacA 遺伝子における変異をさらに含む、本発明1014の方法。

20

[本発明1021]

機能的 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、外因性のシアリル-トランスフェラーゼ遺伝子、外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子、GDP-フコース合成経路、欠陥 (deficient) シアル酸異化経路、シアル酸合成能、および機能的ラクトースパーミターゼ遺伝子を含む細菌において、3'-シアリル-3-フコシルラクトース (3'-S3FL) を産生する方法：

ラクトースの存在下で該細菌を培養する段階；および

該細菌からまたは該細菌の培養上清から 3'-S3FL を回収する段階。

[本発明1022]

前記外因性のシアリル-トランスフェラーゼ遺伝子が α (2,3) シアリル-トランスフェラーゼをコードする、本発明1021の方法。

[本発明1023]

前記外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子が、 α (1,3) フコシルトランスフェラーゼをコードする、本発明1021の方法。

30

[本発明1024]

前記欠陥シアル酸異化経路が内因性の N-アセチルノイラミネートリアーゼまたは N-アセチルマンノサミンキナーゼ遺伝子においてヌル変異を含む、本発明1021の方法。

[本発明1025]

前記シアル酸合成能が、外因性の UDP-GlcNAc 2-エピメラーゼ遺伝子、外因性の Neu5Ac シンターゼ遺伝子、または外因性の CMP-Neu5Ac シンテターゼ遺伝子を含む、本発明1021の方法。

[本発明1026]

40

機能的 lacZ 遺伝子、外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子、外因性のシアリルトランスフェラーゼ遺伝子、内因性のコラン酸合成遺伝子における変異、機能的ラクトースパーミターゼ遺伝子、欠陥シアル酸異化経路、およびシアル酸合成能を含む腸内細菌において、3'-シアリル-3-フコシルラクトース (3'-S3FL) を産生する方法：

ラクトースの存在下で該細菌を培養する段階；および

該細菌からまたは該細菌の培養上清から 3'-S3FL を回収する段階。

[本発明1027]

前記外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子が α (1,3) フコシルトランスフェラーゼをコードする、本発明1026の方法。

[本発明1028]

50

前記外因性のシアリルトランスフェラーゼ遺伝子が α (2,3)シアリルトランスフェラーゼをコードする、本発明1026の方法。

[本発明1029]

前記欠陥シアル酸異化経路が、内因性のN-アセチルノイラミネートリアーゼまたはN-アセチルマンノサミンキナーゼ遺伝子においてヌル変異を含む、本発明1026の方法。

[本発明1030]

前記シアル酸合成能が外因性のUDP-GlcNAc 2-エピメラーゼ遺伝子、外因性のNeu5Acシンターゼ遺伝子、または外因性のCMP-Neu5Acシンテターゼ遺伝子を含む、本発明1026の方法。

[本発明1031]

低いが検出可能なレベルの β -ガラクトシダーゼ活性を生じるように操作されている挿入された組み換え型 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を利用することによる、その本来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子が欠失しているかまたは不活化されている宿主細胞における遺伝子座の表現型標識 (phenotypic marking) 法。

[本発明1032]

低いが検出可能なレベルの β -ガラクトシダーゼ活性を生じるように操作されている挿入された組み換え型 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を利用することによって、その本来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子が欠失しているかまたは不活化されている β -ガラクトシダーゼ陰性宿主細胞において残留ラクトースを細菌培養から枯渇させる方法。

[本発明1033]

低いが検出可能なレベルの β -ガラクトシダーゼ活性を生じるように操作されている挿入された組み換え型 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を利用することによって、その本来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子が欠失しているかまたは不活化されている β -ガラクトシダーゼ陰性宿主細胞の培養物において細菌細胞の溶解を検出する方法。

[本発明1034]

細菌細胞溶解物または細菌の細菌細胞培養上清からのフコシル化オリゴ糖をカーボンカラムに結合させる段階、および該カラムからフコシル化オリゴ糖を溶出させる段階を含む、本発明1001の方法によって産生されたフコシル化オリゴ糖を精製する方法。

[本発明1035]

欠陥コラン酸合成経路、低減されたレベルの β -ガラクトシダーゼ活性、および外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む、単離された大腸菌細菌。

[本発明1036]

本発明1001の方法によって産生された精製フコシル化オリゴ糖。

[本発明1037]

欠失した内因性 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、低活性の置換機能的 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、GDP-フコース合成経路、機能的ラクトースパーミターゼ遺伝子、および欠失したラクトースアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を含む細菌宿主株に形質転換された外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む核酸構築物。

[本発明1038]

前記外因性のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子が、 α (1,2)フコシルトランスフェラーゼまたは α (1,3)フコシルトランスフェラーゼをコードする、本発明1037の核酸構築物。

本発明の他の特色および利点は、好ましい態様に関する以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかであろう。それ以外であると明記している場合を除き、本明細書において用いられる全ての科学技術用語は、本発明が属する当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書において記述される方法および材料と類似または同等の方法および材料を、本発明の実践または試験において用いることができるが、適した方法および材料を以下に記述する。本明細書において引用された公開された外国の特許および特許出願は全て、参照により本明細書に組み入れられる。本明細書において引用されたアクセッション番号によって示されるGenbankおよびNCBI提出物は、参照により本明細

10

20

30

40

50

書に組み入れられる。本明細書において引用された他の全ての公開された参考文献、文書、原稿および科学論文は、参照により本明細書に組み入れられる。矛盾する場合は、定義を含めて本明細書が優先するであろう。さらに、材料、方法、および実施例は説明するために限られ、制限的であると意図されない。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】 ヒト乳中に見いだされる主要な中性フコシル-オリゴ糖の合成経路を示す概略図である。

【図2】 ヒト乳中に見いだされる主要なシアリル-オリゴ糖の合成経路を示す概略図である。

10

【図3】 大腸菌 (E.coli) における2'-フコシルラクトース (2'-FL) 合成を操作するためにそれらに導入された代謝経路および変化を説明する概略図である。具体的に、ラクトース合成経路およびGDP-フコース合成経路が図示される。GDP-フコース合成経路において：manA=ホスホマンノースイソメラーゼ (PMI)、manB=ホスホマンノムターゼ (PMM)、manC=マンノース-1-リン酸グアニリルトランスフェラーゼ (GMP)、gmd=GDP-マンノース-4,6-デヒドラターゼ、fcl=GDP-フコースシンターゼ (GFS)、および Δ wcaJ=変異UDP-グルコース脂質担体トランスフェラーゼ。

【図4】 大腸菌において産生された精製2'-FLの薄層クロマトグラムの写真である。

【図5】 大腸菌における3'-シアリルラクトース (3'-SL) 合成を操作するためにそれらに導入された代謝経路および変化を説明する略図である。省略語は：(Neu5Ac) N-アセチルノイラミン酸、シアリ酸；(nanT) シアリ酸輸送体；(Δ nanA) 変異N-アセチルノイラミン酸リアーゼ；(ManNAc) N-アセチルマンノサミン；(Δ nanK) 変異N-アセチルマンノサミンキナーゼ；(ManNAc-6-P) N-アセチルマンノサミン-6-リン酸；(GlcNAc-6-P) N-アセチルグルコサミン-6-リン酸；(GlcN-6-P) グルコサミン-6-リン酸；(Fruc-6-P) フルクトース-6-リン酸；(neuA) CMP-N-アセチルノイラミン酸シンターゼ；(CMP-Neu5Ac) CMP-N-アセチルノイラミン酸；および (neuB) N-アセチルノイラミン酸シンターゼを含む。

20

【図6】 大腸菌における3-フコシルラクトース (3-FL) 合成を操作するためにそれらに導入された代謝経路および変化を説明する略図である。

【図7】 大腸菌 α (1,2)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子wbsJを発現するpG175のプラスミドマップである。

30

【図8】 pG175を含み、wbsJを発現する大腸菌の溶解物、およびwbsJの代わりにH.ピロリ26695 futC遺伝子を有し、futCを発現するpG175誘導プラスミドであるpG171を含む細胞の溶解物のウェスタンブロットの写真である。

【図9】 プラスミドpG176を含む大腸菌において産生され、トリプトファン付加によるH.ピロリ26695 α (1,3)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子futAの発現に関して誘導された3FLの薄層クロマトグラムの写真である。

【図10】 オペロンとして構成される、H.ピロリ26695 α (1,2)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子futCと、H.ピロリ26695 α (1,3)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子futAの両方を含むpG177のプラスミドマップである。

40

【図11】 プラスミドpG171、pG175 (2'-FL)、pG176 (3FL)、およびpG177 (LDFT、2'-FLおよび3FL) によって指示される、大腸菌において産生された2'-FL、3FL、およびLDFT (ラクトジフコテトラオース) の薄層クロマトグラムの写真である。

【図12】 大腸菌株E390におけるlon遺伝子の、カナマイシン耐性遺伝子 (トランスポゾンTn5に由来する) および野生型大腸菌lacZ+コード配列の両方を有するDNA断片への置換を示す図である。

【図13】 図12で図解したlon領域へのDNA挿入の注釈 (GenBankフォーマットで) 付きDNA配列である (SEQ ID NO:9~15)。

【図14】 本発明のいくつかの大腸菌株の遺伝子型を含む表である。

【図15】 コラン酸経路転写活性化遺伝子rcsBと共にオペロンにおいて α (1,2)フコシル

50

トランスフェラーゼ遺伝子futCを発現するpG186のプラスミドマップである。

【図16】wbsJの代わりにB.フラギリスwcfW遺伝子を有し、wcfWを発現するpG175誘導プラスミドであるpG180を含む大腸菌、およびwbsJの代わりにH.ピロリ26695 futC遺伝子を有し、futCを発現するpG175誘導プラスミドであるpG171を含む細胞の溶解物のウェスタンブロットの写真である。

【図17】プラスミドpG180またはpG171を有し、wcfWまたはfutCの発現に関してそれぞれ誘導した細胞による、大腸菌において産生された2'-FLの薄層クロマトグラムの写真である。

【図18】プラスミドpG171によって形質転換された大腸菌宿主株E403の10 Lバイオリアクターにおける2'-FL産生の速度論および程度を示す薄層クロマトグラムの写真である。

【図19】大腸菌において作製された2'-FLの試料のカーボンカラム上でのラクトース不純物からの分離に関するカラムクロマトグラムおよびTLC分析である。

【図20】細菌α(2,3)シアリルトランスフェラーゼ、ならびにneuA、neuB、およびneuCを発現するプラスミドを含む、大腸菌株E547によって産生された培養培地中の3'-SLを示す薄層クロマトグラムの写真である。

【発明を実施するための形態】

【0048】

発明の詳細な説明

オリゴ糖 (HMOS) とその複合糖質の両方を含むヒト乳グリカンは、ヒト乳児の保護および発育、ならびに特に乳児の消化管 (GI) において有意な役割を果たす。様々な哺乳動物において見いだされる乳オリゴ糖は大きく異なり、ヒトにおけるその組成は独自である (Hamosh M., 2001 *Pediatr Clin North Am*, 48:69-86; Newburg D.S., 2001 *Adv Exp Med Biol*, 501 :3-10)。その上、ヒト乳中のグリカンレベルは、授乳期間のあいだでも変化して、また個体間でも広く変化する (Morrow A.L. et al., 2004 *J Pediatr*, 145:297-303; Chaturvedi P et al., 2001 *Glycobiology*, 11 :365-372)。これまで、HMOSの役割を完全に調べることは、これらの化合物を適切に特徴付けして測定することができなかったために限られていた。近年、中性および酸性HMOSの両方を分析するための感度のよい再現性のよい定量的方法が開発されている (Erney, R., Hilty, M., Pickering, L., Ruiz-Palacios, G., and Prieto, P. (2001) *Adv Exp Med Biol* 501, 285-297. Bao, Y., and Newburg, D. S. (2008) *Electrophoresis* 29, 2508-2515)。およそ200個の別個のオリゴ糖がヒト乳中において同定されており、この多様性の原因となっているのは少数の単純なエピトープの組み合わせである (Newburg D.S., 1999 *Curr Med Chem*, 6:117-127; Ninonuevo M. et al, 2006 *J Agric Food Chem*, 54:7471-74801)。HMOSは、5種類の単糖類、すなわちD-グルコース (Glc)、D-ガラクトース (Gal)、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、L-フコース (Fuc)、およびシアリ酸 (N-アセチルノイラミン酸、Neu5Ac、NANA) で構成される。HMOSは、通常、その化学構造に従って2つの群、すなわちGlc、Gal、GlcNAcおよびFucを含み、ラクトース (Gal β 1-4 Glc) コアに結合した中性化合物と、同じ糖を含み、しばしば同じコア構造に加えてNANAを含む酸性化合物とに分けられる (Charlwood J. et al, 1999 *Anal Biochem*, 273:261-277; Martin-Sosa et al, 2003 *J Dairy Sci*, 86:52-59; Parkkinen J. and Finne J., 1987 *Methods Enzymol*, 138:289-300; Shen Z. et al, 2001 *J Chromatogr A*, 921:315-321)。ヒト乳中のオリゴ糖のおよそ70~80%がフコシル化され、その合成経路は、図1に示される経路と類似の様式で進行すると考えられる (タイプIおよびタイプII亜群は、異なる前駆体分子によって始まる)。ヒト乳中のオリゴ糖のより小さい割合がシアリル化されるか、またはフコシル化されてシアリル化される。図2は、シアリル化 (酸性) HMOSに関して可能性がある生合成経路を概要するが、ヒトにおける実際の合成経路はまだ完全には定義されていない。

【0049】

興味深いことに、クラスとしてのHMOSは、乳児の腸管内の通過に非常に効率よく残存する、これは腸壁を通しての輸送が不良でヒト腸管の酵素による消化に対して抵抗性である機能である (Chaturvedi, P., Warren, C. D., Buescher, C. R., Pickering, L. K. & N

10

20

30

40

50

ewburg, D. S. *Adv Exp Med Biol* 501, 315-323 (2001))。腸管においてこのように残存する1つの結果は、HMOSがプレバイオティクスとして機能することができること、すなわち腸管に常在する片利共生微生物が生育するための豊富な炭素源として役立つようにHMOSを利用できることである (Ward, R. E., Ninonuevo, M., Mills, D. A., Lebrilla, C. B., and German, J. B. (2007) *Mol Nutr Food Res* 51, 1398-1405)。最近、腸菌叢の組成の決定における、および腸菌叢とヒトの健康との関係の理解における、食事および食事プレバイオティック物質の役割に対する関心が急速に高まっている (Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M. J., Leotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., Neyrinck, A. M., and Meheust, A. (2010) *Br J Nutr* 104 Suppl 2, S1-63)。

10

【0050】

多数のヒト乳グリカンは、腸内病原体の細胞受容体と構造的相同性を保有して、分子受容体「デコイ」として作用することによって病原体防御において役割を果たす。たとえば、カンピロバクターの病原体株は、H-2エピトープを含むヒト乳中のグリカン、すなわち2'-フコシル-N-アセチルラクトサミンまたは2'-フコシルラクトース (2'-FL) に特異的に結合する。カンピロバクターの結合および感染性は、2'-FLおよびこのH-2エピトープを含む他のグリカンによって阻害される (Ruiz-Palacios, G. M., Cervantes, L. E., Ramos, P., Chavez-Munguia, B., and Newburg, D. S. (2003) *J Biol Chem* 278, 14112-14120)。同様に、いくつかの下痢原性大腸菌病原体は、インビボで2'-結合フコース部分を含むHMOSによって強く阻害される。ヒトカリシウイルスのいくつかの主要な株、特にノロウイルスもまた、2'-結合フコシル化グリカンに結合し、この結合は、ヒト乳2'-結合フコシル化グリカンによって阻害される。これらの2'-結合フコシル化オリゴ糖の高レベルを有するヒト乳の消費は、メキシコでの母乳で育てた小児のコホートにおいてノロウイルス、カンピロバクター、大腸菌関連下痢のST、および全ての原因による中等度から重度の下痢のより低いリスクに関連している (Newburg D.S. et al, 2004 *Glycobiology*, 14:253-263; Newburg D.S. et al, 1998 *Lancet*, 351 : 1160-1164)。インフルエンザ (Couceiro, J. N., Paulson, J. C. & Baum, L. G. *Virus Res* 29, 155-165 (1993))、パラインフルエンザ (Amonsén, M., Smith, D. F., Cummings, R. D. & Air, G. M. *J Virol* 81, 8341-8345 (2007))、およびロトウイルス (Kuhlenschmidt, T. B., Hanafin, W. P., Gelberg, H. B. & Kuhlenschmidt, M. S. *Adv Exp Med Biol* 473, 309-317 (1999)) などのいくつかの病原体も、その宿主受容体としてシアリル化グリカンを利用することが知られている。シアリル-ルイスXエピトープは、ヘリコバクター・ピロリ (Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., Olfat, F. O., et al. *Science* 297, 573-578 (2002))、緑膿菌 (Scharfman, A., Delmotte, P., Beau, J., Lamblin, G., et al. *Glycoconj J* 17, 735-740 (2000))、およびノロウイルスのいくつかの株 (Rydell, G. E., Nilsson, J., Rodriguez-Diaz, J., Ruvoen-Clouet, N., et al. *Glycobiology* 19, 309-320 (2009)) によって用いられる。

20

30

【0051】

ヒト乳グリカンをプレバイオティクスおよび抗菌抗接着物質として用いることができることが研究により示唆されているが、ヒトが消費するために適した品質のこれらの物質の適切な量を産生する難しさおよび費用により、その完全な規模での試験および認められた有用性は制限されている。必要であるのは、妥当な費用で十分量の適切なグリカンを産生するために適した方法である。本明細書において記述される本発明より前では、グリカンを合成するためにいくつかの個別の合成アプローチを用いることが試みられた。新規化学アプローチは、オリゴ糖を合成することができるが (Flowers, H. M. *Methods Enzymol* 50, 93-121 (1978); Seeberger, P. H. *Chem Commun (Camb)* 1115-1121 (2003))、これらの方法の反応物は、費用が高く、おそらく毒性である (Koeller, K. M. & Wong, C. H. *Chem Rev* 100, 4465-4494 (2000))。操作された生物から発現された酵素 (Albermann, C., Piepersberg, W. & Wehmeier, U. F. *Carbohydr Res* 334, 97-103 (2001); Bettler, E.

40

50

, Samain, E., Chazalet, V., Bosso, C, et al. Glycoconj J 16, 205-212 (1999); Johnson, K. F. Glycoconj J 16, 141-146 (1999); Palcic, M. M. Curr Opin Biotechnol 10, 616-624 (1999); Wymer, N. & Toone, E. J. Curr Opin Chem Biol 4, 110-119 (2000)) は、正確で効率的な合成を提供するが (Palcic, M. M. Curr Opin Biotechnol 10, 616-624 (1999)); Crout, D. H. & Vic, G. Curr Opin Chem Biol 2, 98-111 (1998))、反応物、特に糖ヌクレオチドの費用が高いために、低コストで大規模生産するためにはその有用性が制限される。微生物は、細菌の生得のヌクレオチド糖プールからオリゴ糖を合成するために必要なグリコシルトランスフェラーゼを発現するように遺伝子操作されている (Endo, T., Koizumi, S., Tabata, K., Kakita, S. & Ozaki, A. Carbohydr Res 330, 439-443 (2001); Endo, T., Koizumi, S., Tabata, K. & Ozaki, A. Appl Microbiol Biotechnol 53, 257-261 (2000); Endo, T. & Koizumi, S. Curr Opin Struct Biol 10, 536-541 (2000); Endo, T., Koizumi, S., Tabata, K., Kakita, S. & Ozaki, A. Carbohydr Res 316, 179-183 (1999); Koizumi, S., Endo, T., Tabata, K. & Ozaki, A. Nat Biotechnol 16, 847-850 (1998))。しかし、全体的な生成物の収率が低いことおよびプロセス複雑度が高いために、これらのアプローチの商業的有用性は限定されている。

10

【0052】

中性および酸性HMOSの大量の安価な製造を可能にする本明細書において記述される本発明より前では、このクラスの分子が病原体の結合を阻害する能力を十分に調べる、または可能性があるさらなる機能のその完全な範囲を実際に調査することは可能ではなかった。

【0053】

20

本明細書において記述される本発明の以前でも、HMOSの化学合成は可能であったが、立体特異性の問題、前駆体の利用能、生成物の不純物、および全体的に高い費用によって制限された (Flowers, H. M. Methods Enzymol 50, 93-121 (1978); Seeberger, P. H. Chem Commun (Camb) 1115-1121 (2003); Koeller, K. M. & Wong, C. H. Chem Rev 100, 4465-4494 (2000))。同様に、本明細書において記述される本発明より前では、インビトロ酵素的合成も同様に可能であったが、高価なヌクレオチド糖前駆物質を必要とするために限定的であった。本発明は、栄養補助食品として用いるために大量のヒト乳オリゴ糖を安価に製造する新規戦略を提供することによって、これらのこれまでの試みの短所を克服する。本明細書において記述される本発明は、2'-FL、3FL、LDFT、またはシアリル化フコシル-オリゴ糖を商業的に可能なレベルで産生するように操作された、操作された細菌である大腸菌 (または他の細菌) を利用し、たとえば本明細書において記述される方法は、2'-フコシル化ラクトースをバイオリアクターにおいて >50 g/L で産生することができる。

30

【実施例】

【0054】

実施例1. フコシル化ヒト乳オリゴ糖産生のための宿主株を作製するための大腸菌の操作

大腸菌K12原栄養体W3110を、フコシル化HMOS生合成のための親バックグラウンドとして選択した。この株は、トリプトファン誘導 P_{trpB} -cI+リプレッサー構築物の導入によってampC座で既に改変されており (McCoy, J. & Lavallie, E. Current protocols in molecular biology/edited by Frederick M. Ausubel...[et al.] (2001))、ミリモル濃度のトリプトファンによる誘導 (Mieschendahl, M., Petri, T. & Hanggi, U. Nature Biotechnology 4, 802-808 (1986)) を通して、ファージ λP_L プロモーターからの組み換え型タンパク質の経済的産生を可能にする (Sanger, F., Coulson, A. R., Hong, G. F., Hill, D. F. & Petersen, G. B. J Mol Biol 162, 729-773 (1982))。ampCにおいてトリプトファン誘導 P_{trpB} -cI+リプレッサー構築物を含む大腸菌W3110誘導体である株GI724を、さらなる大腸菌株操作の基礎として用いた (図14)。

40

【0055】

フコシル化HMOSの生合成には、ラクトースおよびGDP-フコースの両方の増強された細胞プールが生成されることが必要である (図3)。この増強は、株GI724において、 λ Red組み換え操作 (Court, D. L., Sawitzke, J. A. & Thomason, L. C. Annu Rev Genet 36, 361-388 (2002)) およびP1ファージ普通導入 (Thomason, L. C, Costantino, N. & Court,

50

D. L. Mol Biol Chapter 1, Unit 1.17 (2007)) を用いる染色体のいくつかの操作によって得られた。図14は、本発明のために構築されたいくつかの大腸菌株の遺伝子型を表す表である。大腸菌宿主株が細胞内ラクトースを蓄積する能力を、内因性の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) およびラクトースオペロンリプレッサー遺伝子 (lacI) を同時に欠失させることによって株E183 (図14) において最初に操作した。E183を作製するためのGI 724におけるこの欠失の構築の際に、lacIqプロモーターをラクトースパーミターゼ遺伝子 lacYのすぐ上流に配置した。このように改変株は、ラクトースを培養培地から輸送するその能力を維持するが (LacYにより)、ラクトース異化の原因であるlacZ (β -ガラクトシダーゼ) 遺伝子の野生型コピーが欠失している。それゆえ、外因性のラクトースの存在下で改変株を培養すると、細胞内ラクトースプールが作製される。

10

【0056】

次に、宿主大腸菌株が細胞外莢膜多糖類であるコラン酸を合成する能力を、株E183におけるUDP-グルコース脂質担体トランスフェラーゼ (Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M. & Reeves, P. R. J Bacteriol 178, 4885-4893 (1996)) をコードするwcaJ遺伝子の欠失により、株E205 (図14) において消失させた。wcaJヌルバックグラウンドにおいて、GDP-フコースは、大腸菌の細胞質に蓄積する (Dumon, C, Priem, B., Martin, S. L., Heyraud, A., et al. Glycoconj J 18, 465-474 (2001))。

【0057】

P1形質導入により、thyA (チミジンシンターゼ) 変異を株E205に導入して株E214 (図14) を作製した。外因性のチミジンが存在しなければ、thyA株は、DNAを作ることができず、死滅する。野生型thyA遺伝子をマルチコピープラスミドに供給することによって、欠損をトランスに補完することができる (Belfort, M., Maley, G. F. & Maley, F. Proceedings of the National Academy of Sciences 80, 1858 (1983))。この補完は、本明細書においてプラスミド維持の手段として用いられる (プラスミドコピー数を維持するためにより通常の抗生物質選択スキームの必要性がなくなる)。

20

【0058】

GDP-フコース産生の1つの戦略は、細菌細胞の天然の合成能を増強することである。たとえば、これはGDP-フコース消費に関係する酵素を不活化することによって、および／またはコラン酸 (フコース含有エキソ多糖類) 合成経路における正の調節タンパク質であるRcsAを過剰発現させることによって得られる増強である。全体として、この代謝操作戦略は、コラン酸合成の終点であるGDP-フコースの流れをオリゴ糖合成へと再度指向させる (図3)。「GDP-フコース合成経路」とは、それによってGDP-フコースの合成が起こる、通常、酵素によって制御されて触媒される一連の反応である。図3に記述したように大腸菌における例示的なGDP-フコース合成経路を以下に記載する。以下に記載するGDP-フコース合成経路において、GDP-フコース合成のための酵素は：1) manA=ホスホマンノースイソメラーゼ (PMI)、2) manB=ホスホマンノムターゼ (PMM)、3) manC=マンノース-1-リン酸グアニリルトランスフェラーゼ (GMP)、4) gmd=GDP-マンノース-4,6-デヒドラターゼ (GMD)、5) fcl=GDP-フコースシンターゼ (GFS)、および6) Δ wcaJ=変異UDP-グルコース脂質担体トランスフェラーゼを含む。

30

グルコース $\rightarrow$ Glc-6-P $\rightarrow$ Fru-6-P $\rightarrow$ ¹Man-6-P $\rightarrow$ ²Man-1-P $\rightarrow$ ³GDP-Man $\rightarrow$ ^{4,5}GDP-Fuc

40

$\rightarrow$ ⁶コラン酸。

【0059】

具体的に、株E214における細胞質GDP-フコースプールの大きさは、コラン酸生合成に関する大腸菌の正の転写調節因子であるRscA (Gottesman, S. & Stout, V. Mol Microbiol 5, 1599-1606 (1991)) を過剰発現させることによって増強される。RcsAのこの過剰発現は、そのプロモーター領域を含む野生型rscA遺伝子を、マルチコピープラスミドベクターに組み入れる段階、およびベクターを大腸菌宿主、たとえばE214に形質転換する段階によって得られる。このベクターは典型的に、さらなる遺伝子も有し、特にpLプロモーターの制御下の1つまたは2つのフコシルトランスフェラーゼ遺伝子、ならびにプラスミド選択お

50

よび維持のためのthyAおよび β -ラクタマーゼ遺伝子を有する。pG175 (SEQ ID NO:1および図7)、pG176 (SEQ ID NO:2)、pG177 (SEQ ID NO:3および図10)、pG171 (SEQ ID NO:5)、およびpG180 (SEQ ID NO:6)は全て、これらのプラスミドによって形質転換された大腸菌宿主の細胞内GDP-フコースプールを増加させる目的のための、各々が同様にrcsA遺伝子1コピーを有するフコシルトランスフェラーゼ発現ベクターの例である。コラン酸生合成のさらなる正の調節因子、すなわちRcsB (Gupte G, Woodward C, Stout V. Isolation and characterization of rcsb mutations that affect colanic acid capsule synthesis in Escherichia coli K-12. J Bacteriol 1997, Jul; 179(13):4328-35)の過剰発現も同様に、細胞内GDP-フコースレベルを増加させるためにRcsAの過剰発現の代わりにまたはRcsAの過剰発現に加えて利用することができる。rcsBの過剰発現はまた、マルチコピー発現ベクターにこの遺伝子を含めることによって得られる。pG186は、そのようなベクターである (SEQ ID NO:8および図15)。pG186は、pLプロモーターの制御下でfutCと共にオペロンにおいてrcsBを発現する。プラスミドはまた、自身のプロモーターによってドライブされてrcsAを発現する。pG186は、 α (1,2)FT (wbsJ) 配列がH.ピロリfutC遺伝子に置換されているpG175の誘導体である (FutCは、そのC-末端でMYCタグ付けされる)。さらに、futC CDSのすぐ3'のXhoI制限部位で、大腸菌rcsB遺伝子を挿入して、futCおよびrcsBがオペロンを形成するように、rcsB CDSの5'末端でのリボソーム結合部位により完成する。

【0060】

細胞内GDP-フコースプールを増加させるための第三の手段も同様に用いてもよい。コラン酸生合成は、大腸菌lon遺伝子にヌル変異を導入した後に増加する。Lonは、大腸菌におけるコラン酸生合成の正の転写調節因子として先に言及したRcsA分解の原因となるATP依存的細胞内プロテアーゼである (Gottesman, S. & Stout, V. Mol Microbiol 5, 1599-1606 (1991))。lonヌルバックグラウンドにおいて、RcsAは安定化されて、RcsAレベルは増加し、大腸菌におけるGDP-フコース合成の原因となる遺伝子はアップレギュレートされて、細胞内GDP-フコース濃度は増強される。lon遺伝子をほぼ完全に欠失させて、株E214において挿入された機能的な野生型のしかしプロモーターを有しない大腸菌lacZ⁺遺伝子 ($\Delta lon::(\text{kan}, \text{lacZ}^+)$) に置換して、株E390を作製した。 λ Red組み換え操作を用いて構築を行った。図12は、E390におけるlon座で操作された遺伝子の新規構成を表す。図13は、GenBankフォーマットでの注釈付きのその領域の完全なDNA配列を表す。大腸菌株E390におけるlon領域へのLacZ⁺挿入部位周囲のゲノムDNA配列を以下に記載する (SEQ ID NO:7)。

【0061】

E390におけるlon変異は、RcsAの細胞内レベルを増加させて、細胞内GDP-フコースプールを増強する。挿入されたlacZ⁺カセットは、lonをノックアウトするのみならず、lacZ⁻宿主をLacZ⁺遺伝子型および表現型へと戻すように変換する。改変された株は、 β -ガラクトシダーゼ活性の最小 (なおも容易に検出可能な) レベル (1~2単位) を生じ、これは産生実行の際のラクトース消費に対して非常にわずかな影響しか及ぼさないが、実行終了時に残留ラクトースを除去するために有用であり、lon変異をP1形質導入によって他のlacZ⁻大腸菌株に移動させるための容易に採点可能な表現型マーカーであり、およびバイオリアクターにおける産生実行の際の細胞溶解 (たとえば、望ましくないバクテリオファージ混入によって引き起こされる) に関する簡便な試験として用いることができる。

【0062】

産生宿主株E390は、上記の遺伝子改変の全てを組み入れて、以下の遺伝子型を有する：
ampC::(P_{trpB} λ cI⁺), $P_{\text{lacI}}^q(\Delta \text{lacI-lacZ})_{158} \text{lacY}^+$, ΔwcaJ , thyA₇₄₈::Tn10, $\Delta \text{lon}::(\text{kan}, \text{lacZ}^+)$

【0063】

遊離のラクトースの細胞質プール (およびそれゆえ2'-FLの最終収量) を増加させるために有用なE390のさらなる改変は、lacA変異の組み込みである。LacAは、高レベルのラクトースが大腸菌細胞質に蓄積する場合に限って活性であるラクトースアセチルトランスフェラーゼである。高い細胞内浸透圧 (たとえば、高い細胞内ラクトースプールによって引

10

20

30

40

50

き起こされた)は、細菌の生育を阻害することができ、このため大腸菌は、LacAを用いて過剰な細胞内ラクトースをアセチル基によって「タグ付け」した後、アセチル-ラクトースを細胞から能動的に排出することにより、ラクトースによって引き起こされる高い細胞内浸透圧から自身を保護するための機構を進化させている(Danchin, A. Bioessays 31, 769-773 (2009))。それゆえ、2'-FLまたは他のヒト乳オリゴ糖を産生するように操作された大腸菌においてアセチル-ラクトースが産生されることは望ましくない；これは全体的な収量を減少させる。その上、アセチル-ラクトースは、オリゴ糖精製スキームを複雑にする副産物である。lacA変異の組み込みはこれらの問題を解決する。株E403(図14)は、lacA遺伝子の欠失を有し、このようにアセチル-ラクトースを合成することができないE390の誘導体である。

10

【0064】

産生宿主株E403は、上記の遺伝子改変の全てを組み入れて、以下の遺伝子型を有する。
ampC::(P_{trpB} λ cl⁺), $P_{lacI}^q(\Delta lacI-lacZ)_{158} lacY^+$, $\Delta wcaJ$, $thyA_{748}::Tn10$, $\Delta lon::(kan, lacZ^+) \Delta lacA$

【0065】

実施例2. 小規模での2'-FL産生

様々な代替 α (1,2)フコシルトランスフェラーゼが糖アクセプターとしてラクトースを利用することができ、大腸菌E214、E390、またはE403において適切な培養条件で発現させる場合、2'-FL合成の目的にとって利用可能である。たとえば、プラスミドpG175 (ColE1, $thyA^+$, bla^+ , $P_{L2-wbsJ}$, $rcaA^+$) (SEQ ID NO: 1、図7)は、大腸菌株0128:B12のwbsJ α (1,2)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子を有し、大腸菌株E403において2'-FLの産生を指示することができる。もう1つの例において、プラスミドpG171 (ColE1, $thyA^+$, bla^+ , $P_{L2-futC}$, $rcaA^+$) (SEQ ID NO: 5)は、H.ピロリ26695. $futC \alpha$ (1,2)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子(Wang, G., Rasko, D. A., Sherburne, R. & Taylor, D. E. Mol Microbiol 31, 1265-1274 (1999))を有し、同様に株E403において2'-FLの産生を指示するであろう。好ましい例において、プラスミドpG180 (ColE1, $thyA^+$, bla^+ , $P_{L2-wcfW}$, $rcaA^+$) (SEQ ID NO: 6)は、本発明のこれまで特徴付けされていないバクテロイデス・フラギリスNCTC 9343 $wcfW \alpha$ (1,2)フコシルトランスフェラーゼ遺伝子を有し、大腸菌株E403において2'-FLの産生を指示する。

20

【0066】

プラスミドpG171、pG175、またはpG180のいずれか1つによって形質転換された、株E214、E390、またはE403の任意の1つの培養のラクトース含有培地にトリプトファンを添加すると、各々の特定の株/プラスミドの組み合わせに関して、宿主大腸菌トリプトファン利用リプレッサーTrpRの活性化が起こり、その後 P_{trpB} の抑制および細胞質cIレベルの減少が起こり、それによって P_L の抑制解除、それぞれ $futC$ 、 $wbsJ$ 、または $wcfW$ の発現、および2'-FLの産生が起こる。図8は、pG175を含み、 $wbsJ$ を発現する大腸菌、およびpG171を含み、 $futC$ を発現する細胞の溶解物のクーマシーブルー染色SDS PAGEゲルである。分子量およそ35 kDaの顕著な染色タンパク質バンドが、 P_L 誘導後(すなわち、トリプトファン添加後)4および6時間で $wbsJ$ および $futC$ の両方に関して認められる。図16は、pG180を含み、 $wcfW$ を発現する大腸菌、およびpG171を含み、H.ピロリ $futC$ を発現する細胞の溶解物のクーマシーブルー染色SDS PAGEゲルである。 P_L 誘導後(すなわち、増殖培地にトリプトファンを添加後)4時間および6時間で、 $wcfW$ および $futC$ の両方に関して、分子量およそ40 kDaで顕著な染色バンドが認められた。

30

40

【0067】

小規模実験的培養(<100 ml)における2'-FL産生に関して、チミジンおよびトリプトファンの両方を欠如する選択的培地(たとえば、M9塩、0.5%グルコース、0.4%カザミノ酸)において株を初期指数増殖相まで30°Cで生育させた。ラクトースをトリプトファン(200 μ M最終濃度)と共に最終濃度0.5または1%で添加して、 P_L プロモーターによってドライブされる α (1,2)フコシルトランスフェラーゼの発現を誘導した。誘導期間の終了時(〜24時間)、無細胞培養培地または細胞の熱抽出物(細胞内に含まれる糖を放出するため

50

に98℃で10分間の処置)のアリコートについてTLC分析を行った。図11は、pG175またはpG171によって形質転換された操作大腸菌細胞の細胞質抽出物のTLC分析を示す。細胞を、wb sJまたはfutCをそれぞれ発現するように誘導して、ラクトースの存在下で生育させた。2'-FLの産生は、いずれかのプラスミドを有する細胞の熱抽出物において明らかに認めることができる。図17は、pG180またはpG171によって形質転換された操作大腸菌細胞の細胞質抽出物のTLC分析を示す。細胞を、wcfWまたはfutCをそれぞれ発現するように誘導して、ラクトースの存在下で生育させた。2'-FLの産生は両方のプラスミドについて明白に認めることができる。本発明より前では、wcfW遺伝子が、証明された α (1,2)フコシルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードすることも、または糖アクセプター基質としてラクトースを利用することも決して示されていなかった。

10

【0068】

バクテロイデス・フラギリス株NCTC 9343 wcfW遺伝子のDNA配列 (タンパク質コード配列) を下に記載する (SEQ ID NO:4)。

【0069】

実施例3. バイオリアクターにおける2'-FLの産生

2'-FLは、プラスミドpG171、pG175、またはpG180のいずれか1つによって形質転換された、宿主大腸菌株E214、E390、またはE403のいずれか1つによってバイオリアクターにおいて産生することができる。形質転換株の生育は、10 L作業容量のバイオリアクターにおいて、溶存酸素、pH、ラクトース基質、消泡剤、および栄養レベルの制御下で最少の培地中で行われる。最少の「FERM」培地をバイオリアクターにおいて用い、これを以下に詳細に記述する。

20

Ferm (10リットル) : 以下を含む最少培地

40g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

100g KH_2PO_4

10g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

40g NaOH

微量元素:

1.3g NTA

0.5g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.09g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

0.09g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.01g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0.01g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.02g H_3BO_3

0.01g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH 6.8)

水を加えて10リットルにする

DF204消泡剤 (0.1ml/L)

グリセロール150 g (初回バッチ生育) の後に流加培養モードで90%グリセロール-1%M gSO_4 -1×微量元素を、様々な速度で様々な時間に与える。

30

【0070】

産生細胞密度 $A_{600} > 100$ は、これらのバイオリアクター実行においてルーチンで得られる。簡単に説明すると、小さい細菌培養物を、抗生物質または外因性のチミジンのいずれかの非存在下で「FERM」中で終夜生育させる。終夜培養 ($\sim 2 A_{600}$) を用いて、バイオリアクター (10 L作業容積、「FERM」を含む) に初回細胞密度 $\sim 0.2 A_{600}$ となるように接種した。グリセロールが枯渇するまで ($A_{600} \sim 20$) バイオマス 30°C でバッチモードで作製した後、有限の炭素源としてグリセロールを利用して流加培養相を開始する。 $A_{600} \sim 30$ で、0.2 g/Lトリプトファンを添加して α (1,2)フコシルトランスフェラーゼ合成を誘導する。初回ボラスのラクトースも同様にこの時点で添加する。5時間後、ラクトースの連続的なゆっくりとした供給をグリセロールの供給と平行して開始する。これらの条件を48時間 (2'-FL産生相) 継続する。この期間の終了時、ラクトースおよびグリセロール供給

40

50

の両方を終了させて、回収する前に、残留グリセロールおよびラクトースを最終発酵期間で消費する。2'-FLは、細胞質より、消費された発酵培地において30倍高い濃度で蓄積する。消費された培地における特異的収量は、正確な生育および誘導条件に応じて10から50 g/Lまで変化する。図18は、株E403に形質転換されたプラスミドpG171を利用した2'-FL産生実行時の様々な時間でバイオリアクターから採取した培養培地試料のTLCである。投入されたラクトースは全て、実行の終了までに生成物に変換され、生成物の収量はおよそ25 g/L 2'-FLであった。

【0071】

実施例4. 2'-フコシルラクトース精製

大腸菌発酵ブロスからの2'-FL精製は、5つの段階を通して行われる。

【0072】

1. 清澄化

発酵ブロスを回収して、細胞を6000×gで30分の分取遠心分離機での沈降によって除去する。各バイオリアクター実行は、部分的清澄化上清約5〜7 Lを生じる。清澄化上清は、発酵の過程で生じたカラメル化糖の分画により、特に発酵培地に存在するアンモニウムイオンによって促進される副反応により、茶色／オレンジ色の着色を有する。

【0073】

2. 粗目カーボンでの生成物の捕捉

粗目カーボン (Calgon 12×40 TR) を充填した容積〜1000 mlのカラム (寸法は、直径5 cm×長さ60 cm) を1カラム容積 (CV) の水によって平衡にして、清澄化培養上清を流速40 ml/分でロードする。このカラムは、糖 (ラクトース) 約120 gの全容量を有する。ローディングおよび糖の捕捉後、カラムを1.5 CVの水によって洗浄した後、50%エタノールまたは25%イソプロパノール (この段階では、生成物を溶出するためにはエタノールの低濃度 (25〜30%) で十分でありうる) の2.5 CVによって溶出する。この溶媒溶出段階は、カラム上の総結合糖の約95%および少量の着色体 (カラメル) を放出する。この最初の段階では、糖の最大量を捕捉することが主目的である。混入物の分離は目的ではない。カラムは、5 CVの水による洗浄によって再生することができる。

【0074】

3. エバポレーション

捕捉カラムからのエタノールまたはイソプロパノール溶出物の2.5 L量を56℃でロータリーエバポレートして、糖シロップ水を作製する (これは典型的に黄色-茶色である)。この段階のために用いられうる代替法には、凍結乾燥または噴霧乾燥が挙げられる。

【0075】

4. 細目カーボンおよびイオン交換培地でのフラッシュクロマトグラフィー

Biotage Isolera One FLASH Chromatography Systemに接続したカラム (GE Healthcare HiScale50/40、5×40 cm、最大圧20 bar) にDarco活性炭G60 (100メッシュ) : celite 535 (粗目) の1:1混合物750 mlを充填する (いずれのカラム充填剤もSigmaから得た)。カラムを5 CVの水によって平衡にして、Celiteローディングカートリッジまたは直接注射のいずれかを用いて、段階3からの糖 (混入ラクトースに対する2'-FLの比率に応じて10〜50 g) をロードする。クロマトグラフィーの際に溶出する糖のピークを検出するために、カラムを蒸発光散乱 (ELSD) 検出器に接続する。2'-FLを単糖 (存在すれば)、ラクトース、および着色体から分離するために、イソプロパノール、エタノール、またはメタノールの4段階勾配を行い、たとえばB=エタノールに関して: 段階1、2.5 CV 0%B; 段階2、4 CV 10%B (単糖類およびラクトース混入物を溶出); 段階3、4 CV 25%B (2'-FLを溶出); 段階4、5 CV 50%B (いくつかの着色体を溶出および部分的にカラムを再生する) である。さらなるカラム再生は、50%メタノールおよび50%イソプロパノールを用いて行われる。糖のピークに対応する分画を、120 mLボトルに自動的に採取して、プールし、段階5に向ける。通常より長い発酵からのある精製実行において、2'-FL含有分画を陰イオン交換および陽イオン交換カラムに通過させると、過剰なタンパク質/DNA/カラメル体混入物を除去することができる。この目的のために試験して成功した樹脂は、陰イオン交換樹

10

20

30

40

50

脂に関してDowex 22およびToyopearl Mono-Qであり、陽イオン交換樹脂に関してDowex 88である。Mixed bed Dowex樹脂は、それらが疎水性相互作用を介して高い親和性で糖を吸着する傾向があることから不適であることが証明された。図19は、フラッシュクロマトグラフィーモードで用いた場合に2'-フコシルラクトースからのラクトースの分離におけるD arco G60 : celiteの1 : 1混合物の性能を図示する。

【0076】

5. エバポレーション／凍結乾燥

25% B溶媒分画3.0 Lを、乾燥するまで56°Cでロータリーエバポレートする。固形糖の塊を最少量の水に溶解して、溶液を凍結した後、凍結乾燥する。プロセス終了時に、白色、結晶の甘い粉末 (2'-FL) が得られる。得られた2'-FLの純度は、95から99%のあいだである。

10

【0077】

糖は、アルミニウムを裏打ちしたシリカG60薄層クロマトグラフィープレート (10×20 cm; Macherey-Nagel) 上に1μlアリコートをしみこませることによって純度に関してルーチンで分析される。LDFT (Rf=0.18)、2'-FL (Rf=0.24)、ラクトース (Rf=0.30)、トレハロース (Rf=0.32)、アセチル-ラクトース (Rf=0.39) およびフコース (Rf=0.48) の混合物 (各糖に関して5 g/L濃度) を標準物質として同時に試験する。プレートを50% ブタノール : 25% 酢酸 : 25% 水溶媒中で、先端が上部から1 cm以内となるまで展開する。2回の連続実行を行って、実行のあいだにプレートを乾燥させることによって、改善された糖の分離を得ることができる。糖のスポットを、α-ナフトールの硫酸-エタノール溶液 (83% (v/v) エタノール、10.5% (v/v) 硫酸中にα-ナフトール2.4 g) を噴霧する段階、および120°Cで数分間加熱する段階によって可視化する。高分子量混入物 (DNA、タンパク質、カラメル) は、開始点に残るか、またはLDFTより低いRfのスメアを形成する。

20

【0078】

実施例5. 3FL産生

大腸菌宿主株E214、E390、またはE403の任意の1つを、糖アクセプター基質としてラクトースを用いることができるα(1,3)フコシルトランスフェラーゼを発現するプラスミドによって形質転換すると、ヒト乳オリゴ糖生成物、3-フコシルラクトース (3FL) を産生するであろう。図9は、3FLの産生を得るために本発明の操作された大腸菌株において利用される経路を図解する。たとえば、プラスミドpG176 (ColE1, thyA+, bla+, P_{L2}-futA, rcsA+) (SEQ ID NO: 2) は、α(1,2)FT (wbsJ) 配列がヘリコバクター・ピロリfutA遺伝子に置換されているpG175の誘導体である (Dumon, C, Bosso, C, Utille, J. P., Heyraud, A. & Samain, E. *Chembiochem* 7, 359-365 (2006))。pG176を、宿主大腸菌株E214、E390、またはE403の任意の1つにおいて形質転換すると、3FLの産生を指示するであろう。

30

図11は、pG176によって形質転換したE403の3FL産生のTLC分析を示す。さらに、3FLの合成を指示するために用いることができるヘリコバクター・ピロリにおいて同定されたいくつかの他の関連する細菌型α(1,3)フコシルトランスフェラーゼ、たとえば「11639 FucTa」

(Ge, Z., Chan, N. W., Palcic, M. M. & Taylor, D. E. *J Biol Chem* 272, 21357-21363 (1997); Martin, S. L., Edbrooke, M. R., Hodgman, T. C, van den Eijnden, D. H. & Bird, M. I. *J Biol Chem* 272, 21349-21356 (1997)) および「UA948 FucTa」 (Rasko, D. A., Wang, G., Palcic, M. M. & Taylor, D. E. *J Biol Chem* 275, 4988-4994 (2000)) が存在する。H.ピロリのα(1,3)フコシルトランスフェラーゼのほかに、ヘリコバクター・ヘパティクスから単離されたα(1,3)フコシルトランスフェラーゼ (Hh0072、配列アクセッションAAP76669) は、非シアリル化およびシアリル化タイプ2オリゴ糖アクセプター基質の両方に対して活性を示す (Zhang, L., Lau, K., Cheng, J., Yu, H., et al. *Glycobiology* (2010))。さらに、本発明の方法に従って3FLを作製するために用いられうるいくつかのさらなる細菌α(1,3)-フコシルトランスフェラーゼが存在する。たとえば、Hh0072の近縁の相同体は、H. H. ビリス (HRAG_01092遺伝子、配列アクセッション番号EE024035)、およびC. ジェジュニ (C1336_000250319遺伝子、配列アクセッション番号EFC31050) において見いだされる。

40

50

【0079】

3FL生成は、2'-FLに関して先に記述したように、培養チューブおよび培養フラスコにおいて小規模で、または溶存酸素、pH、ラクトース基質、消泡剤、および炭素:窒素バランスの制御を利用するバイオリアクター（10 L作業容積）において行われる。バイオリアクターでは細胞密度 $A_{600} \sim 100$ が得られ、3 g/Lまでの特異的3FL収量が得られている。産生された3FLのおよそ半分は、培養上清中に見いだされ、半分は細胞内で見いだされる。大腸菌培養上清からの3FLの精製は、2'-FLに関して先に記述した技法とほぼ同一の技法を用いて得られる。唯一の実質的な差は、3FLが、2'-FLの場合より低いアルコール濃度でカーボンカラムから溶出する点である。

【0080】

実施例6. 大腸菌におけるヒト乳オリゴ糖2'-フコシルラクトース（2'-FL）、3-フコシルラクトース（3FL）、およびラクトジフコヘキサオース（LDFT）の同時産生

大腸菌株E214、E390、およびE403は、先に考察したように、ラクトースおよびGDP-フコースの両方の細胞質プールを蓄積し、 $\alpha(1,2)$ フコシルトランスフェラーゼまたは $\alpha(1,3)$ フコシルトランスフェラーゼのいずれかを発現するプラスミドによって形質転換すると、それぞれ、ヒト乳オリゴ糖2'-FLまたは3FLを合成することができる。四糖類であるラクトジフコテトロース（LDFT）は、ヒト乳中に見いだされるもう1つの主要なフコシル化オリゴ糖であり、 $\alpha(1,2)$ -および $\alpha(1,3)$ -結合フコース残基の両方を含む。pG177（図10、SEQ ID NO:3）は、wbsJ遺伝子がヘリコバクター・ピロリfutA遺伝子およびヘリコバクター・ピロリfutC遺伝子を含む2つの遺伝子オペロン（すなわち、 $\alpha(1,3)$ -および $\alpha(1,2)$ -フコシルトランスフェラーゼの両方を含むオペロン）に置換されているpG175の誘導体である。大腸菌株E214、E390、およびE403は、プラスミドpG177によって形質転換され、上記のように小規模でまたはバイオリアクターにおいて生育させると、LDFTを産生する。図11において（レーンpG177）、pG177によって指示され、大腸菌において作製されるLDFTは、薄層クロマトグラフィーによる細胞抽出物の分析において観察された。

【0081】

実施例7. 大腸菌細胞質における3'-SL合成

大腸菌における3'-シアリルラクトース（3'-SL）産生の第一段階は、ラクトースおよびCMP-Neu5Ac（CMP-シアル酸）の両方の細胞質プールを蓄積する宿主バックグラウンド株の生成である。細胞質ラクトースの蓄積は、lacパーミターゼであるlacYに対する極性効果を最小限にするように注意しながら、ラクトースの存在下での生育および内因性の β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）の不活化によって得られる。ラクトースプールのこの蓄積は、2'-FL、3FL、およびLDFTを産生するよう操作されている大腸菌宿主において既に得られており、上記で記述されている。

【0082】

具体的に、当技術分野において公知の方法（たとえば、Ringenberg, M., Lichtensteiger, C. & Vimr, E. Glycobiology 11, 533-539 (2001); Fierfort, N. & Samain, E. J Biotechnol 134, 261-265 (2008)) から改変された、細胞質CMP-Neu5Acプールを生成するためのスキームを図5に示す。このスキームにおいて、内因性のnanA（N-アセチルノイラミネートリアーゼ）およびnanK（N-アセチルマンノサミンキナーゼ）遺伝子にヌル変異を導入することにより、大腸菌K12シアル酸異化経路を最初に破壊する。「シアル酸異化経路」とは、それによってシアル酸の分解が起こる、通常、酵素によって制御されて触媒される一連の反応を意味する。大腸菌における例示的なシアル酸異化経路を図5に記載する。図5におけるシアル酸異化経路において、シアル酸（Neu5Ac；N-アセチルノイラミン酸）は、酵素NanA（N-アセチルノイラミン酸リアーゼ）およびNanK（N-アセチルマンノサミンキナーゼ）によって分解される。図5におけるシアル酸異化経路の他の省略語は、（nanT）シアル酸輸送体；（ Δ nanA）変異N-アセチルノイラミン酸リアーゼ；（ Δ nanK）変異N-アセチルマンノサミンキナーゼ；（ManNAc-6-P）N-アセチルマンノサミン-6-リン酸；（GlcNAc-6-P）；N-アセチルグルコサミン-6-リン酸；（GlcN-6-P）グルコサミン-6-リン酸；（Fruc-6-P）フルクトース-6-リン酸；（neuA）CMP-N-アセチルノイラミン酸シンテタ

10

20

30

40

50

ーゼ；(CMP-Neu5Ac) CMP-N-アセチルノイラミン酸；および (neuB) N-アセチルノイラミン酸シンターゼを含む。

【0083】

次に、大腸菌K12は、デノボシアル酸合成経路を欠如することから、シアル酸合成能を、3つの組み換え型酵素の提供によって導入する；UDP-GlcNAc-2-エピメラーゼ（たとえば、neuC）、Neu5Acシンターゼ（たとえば、neuB）、およびCMP-Neu5Acシンターゼ（たとえば、neuA）。C.ジェジュニ、大腸菌K1、インフルエンザ菌（*H. influenzae*）、または髄膜炎菌からの同等の遺伝子を、この目的のために（互換的に）利用することができる。

【0084】

次に、3'-シアリルラクトースを作製するために、ラクトースの3'位置へのシアル酸の付加は、細菌型 α (2,3)シアリルトランスフェラーゼを利用して行われ、髄膜炎菌および淋菌の遺伝子を含む多数の候補遺伝子が記述されている（Gilbert, M., Watson, D. C, Cunningham, A. M., Jennings, M. P., et al. *J Biol Chem* 271, 28271-28276 (1996); Gilbert, M., Cunningham, A. M., Watson, D. C, Martin, A., et al. *Eur J Biochem* 249, 187-194 (1997)）。ナイセリア（*Neisseria*）の酵素は、アクセプター糖としてラクトースを用いることが既に知られている。組み換え型髄膜炎菌酵素は、操作された大腸菌において3'-シアリルラクトースを生成する（Fierfort, N. & Samain, E. *J Biotechnol* 134, 261-265 (2008)）。図20は、neuA、B、C、および細菌型 α (2,3)シアリルトランスフェラーゼを発現するプラスミドを有する大腸菌株E547 ($\text{amp}^{\text{C}}::(\text{P}_{\text{trpB}} \lambda \text{cI}^+)$, $\text{P}_{\text{lacI}}^{\text{q}}(\Delta \text{lacI-lacZ})_{158} \text{lacY}^+$, ΔlacA , Δnan) の培養から得た培養培地のTLC分析を示す。培養培地における3'-シアリルラクトース (3'-SL) の存在が、明らかに認められる。

【0085】

実施例8. 大腸菌におけるヒト乳オリゴ糖3'-シアリル-3-フコシルラクトース (3'-S3FL) の産生

本明細書において記述される本発明より前では、同じ細菌株において任意の特定のフコシルトランスフェラーゼ遺伝子と任意の特定のシアリルトランスフェラーゼ遺伝子を組み合わせることによって、3'-S3FLを生じることができるとは予想できなかった。以下に、同じ LacZ^+ 大腸菌株におけるフコシルトランスフェラーゼ遺伝子とシアリルトランスフェラーゼ遺伝子の組み合わせによって、3'-S3FLの産生が起こったことを証明する結果を記述する。これらの予想外の結果は、おそらく利用される特定のフコシルトランスフェラーゼおよびシアリルトランスフェラーゼ酵素の驚くほど緩い基質特異性による可能性がある。

【0086】

ヒトは、ヒトゲノムにおいてコードされる6つの α (1,3)フコシルトランスフェラーゼおよび6つの α (2,3)シアリルトランスフェラーゼの異なる組み合わせを利用してシアリル-ルイスXエピトープを合成する（de Vries, T., Knegtel, R. M., Holmes, E. H. & Macher, B. A. *Glycobiology* 11, 119R-128R (2001); Taniguchi, A. *Curr Drug Targets* 9, 310-316 (2008)）。これらの糖トランスフェラーゼは、その組織発現パターンが異なるのみならず、そのアクセプター特異性が異なる。たとえば、ヒト骨髓型 α (1,3)フコシルトランスフェラーゼ (FUT IV) はタイプ2 ($\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4 \text{ Glc/GlcNAc}$) 鎖に基づくアクセプターを、それらがシアリル化されていない場合に限ってフコシル化するであろう。対照的に、「血漿型」 α (1,3)フコシルトランスフェラーゼ (FUT VI) は、それらがシアリル化されるか否かによらず、タイプ2アクセプターを利用し、乳腺および腎臓において見いだされる無差別型 (promiscuous) 「ルイス」 α (1,3/4)フコシルトランスフェラーゼ (FUT II I) は、シアリル化および非シアリル化タイプ1 ($\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 3 \text{ GlcNAc}$) およびタイプ2アクセプター (Easton, E. W., Schiphorst, W. E., van Drunen, E., van der Schoot, C. E. & van den Eijnden, D. H. *Blood* 81, 2978-2986 (1993)) に作用するであろう。類似の状況は、異なる酵素がアクセプター特異性に大きい差を示すヒト α (2,3)シアリルトランスフェラーゼファミリーについても存在する (Legaigreur, P., Breton, C, El Battari, A., Guillemot, J. C, et al. *J Biol Chem* 276, 21608-21617 (2001); Jeanneau, C,

Chazalet, V., Auge, C, Soumpasis, D. M., et al. J Biol Chem 279, 13461-13468 (2004))。アクセプター特異性のこの多様性は、大腸菌における3'-シアリル-3-フコシルラクトース (3'-S3FL) の合成における重要な問題、すなわち協調的に作用して3'-S3FLを合成することができる (初回アクセプター糖としてラクトースを利用する) フコシル-およびシアリル-トランスフェラーゼの適した組み合わせを同定する際の重要な問題を強調する。しかし、ヒトおよび他の全ての真核生物のフコシルおよびシアリル-トランスフェラーゼは、ゴルジ体の内腔に位置する分泌型タンパク質であることから、それらは、細菌の細胞質における3'-S3FL生合成という作業にとってあまり適していない。

【0087】

いくつかの細菌病原体は、典型的に、宿主模倣および免疫回避の理由から、フコシル化および/またはシアリル化糖をその細胞エンベロープに組み入れることが知られている。たとえば、髄膜炎菌およびカンピロバクター・ジェジュニは、2,3-結合を通してシアル酸をその莢膜リポオリゴ糖 (LOS) におけるガラクトース部分に組み入れることができ (Tsa i, C. M., Kao, G. & Zhu, P. I Infection and Immunity 70, 407 (2002); Gilbert, M., Brisson, J. R., Karwaski, M. F., Michniewicz, J., et al. J Biol Chem 275, 3896-3906 (2000))、大腸菌のいくつかの株は、 α (1,2) フコース基をリポ多糖類 (LPS) に組み入れる (Li, M., Liu, X. W., Shao, J., Shen, J., et al. Biochemistry 47, 378-387 (2008); Li, M., Shen, J., Liu, X., Shao, J., et al. Biochemistry 47, 11590-11597 (2008))。ヘリコバクター・ピロリのある株は、 α (2,3)-シアリル基を組み入れることができるのみならず、 α (1,2)、 α (1,3)、および α (1,4)-フコシル基をLPSに組み入れることができ、このようにその細胞表面上に広範囲のヒトLewis型エピトープを示すことができる (Moran, A. P. Carbohydr Res 343, 1952-1965 (2008))。ほとんどの細菌のシアリルおよびフコシルトランスフェラーゼは、細胞質において作用し、すなわちそれらは本明細書において記述される方法によって、真核生物のゴルジ局在糖トランスフェラーゼより適している。

【0088】

上記のトランスフェラーゼを発現するように操作された大腸菌の株は、ラクトースの細胞質プールを蓄積すると共に、ヌクレオチド糖GDP-フコースまたはヌクレオチド糖CMP-Neu5Ac (CMP-シアル酸) のいずれかのさらなるプールを蓄積する。これらの糖のラクトースアクセプターへの付加は、候補組み換え型 α (1,3)-フコシルまたは α (2,3)-シアリルトランスフェラーゼを用いてこれらの操作された宿主において行われ、3-フコシルラクトースおよび3'-シアリルラクトースをそれぞれ生成する。最後に、2つの合成能を1つの大腸菌に組み合わせて、3'-S3FLを産生する。

【0089】

ラクトースおよびGDP-フコースの両方の細胞質プールを蓄積する大腸菌株が開発されている。この株は、 α (1,2) フコシルトランスフェラーゼを過剰発現するプラスミドによって形質転換されると、2'-フコシルラクトース (2'-FL) を $\sim 10\sim 50$ g/L細菌培養培地のレベルで産生する。この宿主の α (1,2) フコシルトランスフェラーゼを適切な α (1,3) フコシルトランスフェラーゼに置換すると、3-フコシルラクトース (3FL) が産生される。次に、細菌 α (1,3) フコシルトランスフェラーゼは、細菌 α (2,3) シアリルトランスフェラーゼと共に作用して、所望の生成物、すなわち3'-S3FLを産生する。

【0090】

ヘリコバクター・ヘパティクスから単離された α (1,3) フコシルトランスフェラーゼ (Hh0072) は、非シアリル化およびシアリル化タイプ2オリゴ糖アクセプター基質の両方に対して活性を示す (Zhang, L., Lau, K., Cheng, J., Yu, H., et al. Glycobiology (2010))。ラクトースアクセプターの利用を測定するために、この酵素をクローニングして、発現させ、および評価して、現在のGDP-フコース産生大腸菌宿主の状況において3FLの産生を評価する。Hh0072をまた、3'-S3FL合成におけるそのコンピテンスに関して、様々な細菌 α (2,3) シアリルトランスフェラーゼと共に調べる。Hh0072の代わりとして、ヘリコバクター・ピロリにおいて同定された2つの特徴付けされた相同な細菌のタイプ3-フコシ

ルトランスフェラーゼ、すなわち「11639 FucTa」 (Ge, Z., Chan, N. W., Palcic, M. M. & Taylor, D. E. J Biol Chem 272, 21357-21363 (1997); Martin, S. L., Edbrooke, M. R., Hodgman, T. C, van den Eijnden, D. H. & Bird, M. I. J Biol Chem 272, 21349-21356 (1997))、および「UA948 FucTa」 (Rasko, D. A., Wang, G., Palcic, M. M. & Taylor, D. E. J Biol Chem 275, 4988-4994 (2000)) が存在する。これらの2つのパラログは、異なるアクセプター特異性を示し、「11639FucTa」は、タイプ2アクセプターのみを利用し、厳密な α (1,3)フコシルトランスフェラーゼであるのに対し、「UA948 FucTa」は、緩いアクセプター特異性を有し (タイプ1およびタイプ2アクセプターの両方を利用する)、 α (1,3)-および α (1,4)-フコシル結合の両方を生成することができる。この特異性の差に関する正確な分子的基础を決定して (Ma, B., Lau, L. H., Palcic, M. M., Hazes, B. & Taylor, D. E. J Biol Chem 280, 36848-36856 (2005))、多様なさらなるH.ピロリ株からのいくつかのさらなる α (1,3)フコシルトランスフェラーゼパラログの特徴付けにより、株によって有意なアクセプター特異性の多様性があることが判明した。

10

【0091】

H.ピロリおよびH.ヘパティクスからの酵素に加えて、他の細菌 α (1,3)-フコシルトランスフェラーゼが任意で用いられる。たとえば、Hh0072の近縁の相同体は、H.ピリス (HRAG_01092遺伝子、配列アクセッション番号EE024035)、およびC.ジェジュニ (C1336_000250319遺伝子、配列アクセッション番号EFC31050) において見いだされる。

【0092】

以下に、大腸菌における3'-S3FL合成を記述する。これに向けての第1段階は、1つの大腸菌株に、先に概要した3-フコシルラクトース合成能と、同様に先に概要した3'-シアリルラクトースの作製能を合わせることである。先に考察した染色体遺伝子改変の全てを新しい宿主株に導入すると、3つの特異的前駆体、すなわちラクトース、GDP-フコース、およびCMP-Neu5Acの細胞質プールを同時に蓄積するであろう。次に、この「複合」株バックグラウンドを用いて、遺伝子発現を両立できる2つのマルチコピープラスミドによってドライブするか、または両方の酵素遺伝子を人工オペロンと同じプラスミド上に配置することにより、 α (1,3)フコシルトランスフェラーゼと α (2,3)シアリルトランスフェラーゼの宿主同時産生を行う。細菌 α (1,3)フコシルトランスフェラーゼと α (2,3)シアリルトランスフェラーゼのいくつかのアクセプター特異性を、特に3'-シアリルラクトースのフコシル化および3-フコシルラクトースのシアリル化に関して、ならびに α (1,3)フコシルトランスフェラーゼと α (2,3)シアリルトランスフェラーゼ酵素の異なる組み合わせに関して評価する。3'-SL、3FL、および3'-S3FLの産生レベルおよび比を、たとえばTLCによってモニターして、NMRによって同一性を確認し、特異的イオンモニタリングを利用する校正された質量分析、またはキャピラリー電気泳動のいずれかによって正確な定量を行う (Bao, Y., Zhu, L. & Newburg, D. S. Simultaneous quantification of sialyloligosaccharides from human milk by capillary electrophoresis. Anal Biochem 370, 206-214 (2007))。

20

30

【0093】

本明細書において記述されるSEQ ID NOに対応する配列を以下に提供する。

【0094】

PG175の配列を以下に記述する (SEQ ID NO:1) :

40

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCA
CAGCTTGTCTGTAAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTG
TTGGCGGGTGTCTGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC
ACCATATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCG
CCTCCTCAACCTGTATATTCGTAAACCACGCCAATGGGAGCTGTCTCAGGTTTGTTCCT
GATTGGTTACGGCGCGTTTCGCATCATTGTTGAGTTTTTCCGCCAGCCGACGCGCAGTT
TACCGGTGCGTGGGTGCAGTACATCAGCATGGGGCAAATTCCTTCCATCCCGATGATTGT
CGCGGGTGTGATCATGATGGTCTGGGCATATCGTTCGCAGCCACAGCAACACGTTTCCTG
AGGAACCATGAAACAGTATTTAGAACTGATGCAAAAAGTGCTCGACGAAGGCACACAGAA
AAACGACCGTACCGBAACCGGAACGCTTTCCATTTTTGGTCATCAGATGCGTTTTAACCT
GCAAGATGGATTCCCGCTGGTGACAATAAACGTTGCCACCTGCGTTCCATCATCCATGA
ACTGCTGTGGTTTTCTGCAGGGCGACACTAACATTGCTTATCTACACGAAAACAAATGTCAC
CATCTGGGACGAATGGGCCGATGAAAACGGCGACCTCGGGCCAGTGTATGGTAAACAGTG
GCGCGCCTGGCCAACGCCAGATGGTTCGTATATTGACCAGATCACTACGGTACTGAACCA
GCTGAAAAACGACCCGGATTTCGCGCCGCAATTATTGTTTCAGCGTGGAACGTAGGCGAACT
GGATAAAATGGCGCTGGCACCCTGCCATTCCTTCCAGTTCTATGTGGCAGACGGCAA
ACTCTCTTGCCAGCTTTATCAGCGCTCCTGTGACGTCTTCTCGGCCTGCCGTTCAACAT
TGCCAGCTACGCGTTATTGGTGCATATGATGGCGCAGCAGTGCGATCTGGAAGTGGGTGA
TTTTGTCTGGACCGTGGCGACACGCATCTGTACAGCAACCATAATGGATCAAACATCATCT
GCAATTAAGCCGCGAACCGCGTCCGCTGCCGAAGTTGATTATCAAACGTAAACCCGAATC
CATCTTCGACTACCGTTTCGAAGACTTTGAGATTGAAGGCTACGATCCGCATCCGGGCAT
TAAAGCGCCGGTGGCTATCTAATTACGAAACATCTGCCAGAGCCGACGCCAGTGTGCGT
CGGTTTTTTTTACCTCCGTTAAATTCCTTCGAGACGCCTTCCCGAAGGCGCCATTCCGCCAT
TCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGC
TGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGT
CACGACGTTGTAAACGACGGGCCAGTGCCAAGCTTCTTTAATGAAGCAGGGCATCAGGA
CGGTATCTTTGTGGAGAAAAGCAGAGTAATCTTATTCAGCCTGACTGGTGGGAAACCACCA
GTCAGAATGTGTTAGCGCATGTTGACAAAAATACCATTAGTCACATTATCCGTCAGTCGG
ACGACATGGTAGATAACCTGTTTATTATGCGTTTTGATCTTACGTTTAATATTACCTTTA
TGCGATGAAACGGTCTTGGCTTTGATATTCAATTTGGTCAGAGATTGGAATGGTTCCTGA
CCTGCCATCCACATTTCGCAACATACTCGATTTCGGTTCGGCTCAATGATAACGTCGCGATA
TTTTAAAACGAGGTTATCGTTGTCTCTTTTTTTCAGAATATCGCCAAGGATATCGTCGAGA
GATTCCGGTTTTAATCGATTTAGAATGATCAATAAAATTTTTCTGACCAATAGATATTCA
TCAAAATGAACATTGGCAATTGCCATAAAAACGATAAAATAACGTATTGGGATGTTGATTA
ATGATAGCTTTGATACGCTGACTGTTAGAAGCATCGTGGATGAAACAGTCTCATTAATA
AACACCACTGAAGGCGCTGTGAATCACAAGCTATGGCAAGGTCATCAACGGTTTCAATG
TCGTTGATTTCTCTTTTTTTAACCCTCTACTCAACAGATAACCGGTTAAACCTAGTCGG
GTGTAACCTACATAAATCCATAATAATCGTTGACATGGCATAACCTCACTCAATGCGTAAC
GATAATTCCCCTTACCTGAATATTTTCATCATGACTAAACGGAACAACATGGGTACACCTAA
TGCGCCACTCTCGCGATTTTTTCAGGCGGACTTACTATCCCGTAAAGTGTGTATAATTTG
CCTGGAATTGTCTTAAAGTAAAGTAAATGTTGCGATATGTGAGTGAGCTTAAACAAAATA
TTTCGCTGCGAGGATATCTCGGAAGATGTTCTGTAGAAGCTTACTGCTCACAAGAAAAAG
GCACGTCATCTGACGTGCCTTTTTTATTGTTACTACCTGTACGATTACTGCAGCTCGAG
TTATTATAATTTTACCCACGATTTCGGGAATAATATCATGTTTAATATCTTTCTTAAACCA
TTTACTCGGAGCAATTACTGTTTTATTTTTTATTTTCATTTAACCAGCAGCCCACT
GAAAGAATATTTGAAATATATTTATTTTTTACATTTACTCATAAGCAGCATATCTAATTC
AACATGATAAGCATCACCTTGAACAAAACATATTTGATTATTAATAAATATATTTTCCCT
GCACCACTTTATATCATCAGAAAAAATGAAGAGAAGGGTTTTTTTTTATTAATAACACCTTT
ATTCATCAAATAATCAATGGCACGTTCAAATATTTTTCACTACATGTGCCATGAGTTTC
ATTTGCTATTTTACTGGAACATAATCACCTCTTCTAATATGTAATGAACAAGTATCATT
TTCCTTTATCAACTCATGCCTAAATTCCTTAAAAATTTTTTCAGTTTGAAAATAACCGAC
GATTTTTTTTATTTTACTTTTGGTATCAATATCTGGATCATACTTAACTTTTCTCAAC
GTAATGCTTTTCTGAACATTCTTTTTTTCATGAAAATGTGGGATTTTTTTCGGAAAAATAAGTA
TTTTTCAAATGGCCATGCTTTTTTTTACAAATTCTGAACTACAAGATAATTCAACTAATCT
TAATGGATGAGTTTTATTTTTTACTGCATCAGATATATCAACAGTCAAATTTTGATGAGT
TCTTTTTGCAATAGCAAATGCAGTTGCATACTGAAACATTTGATTACCAAGACCACCAAT
AATTTTAACTTCCATATGTATATCTCTTCTTCTAGAATTCTAAAAATTGATTGAATGTA
TGCAATAAATGCATACCCATAGGTGTGGTTTAAATTTGATGCCCTTTTTTCAGGGCTGGA
ATGTGTAAGAGCGGGGTTATTTATGCTGTTGTTTTTTGTTACTCGGGAAGGGCTTTACC

10

20

30

40

TCTTCCGCATAAACGCTTCCATCAGCGTTTATAGTTAAAAAATCTTTCGGAACCTGGTTT
TGCGCTTACCCCAACCAACAGGGGATTTGCTGCTTCCATTGAGCCTGTTTCTCTGCGCG
ACGTTTCGCGGCGCGGTGTTTGTGCATCCATCTGGATTCTCCTGTCAGTTAGCTTTGGTGG
TGTGTGGCAGTTGTAGTCTGAACGAAAACCCCCCGGATTGGCACATTGGCAGCTAATC
CGGAATCGCACTTACGGCCAATGCTTCGTTTCGTATCACACACCCCAAAGCCTTCTGCTT
TGAATGCTGCCCTTCTCAGGGCTTAATTTTTAAGAGCGTCACCTTCATGGTGGTCAGTG
CGTCTGCTGATGTGCTCAGTATCACCGCCAGTGGTATTTATGTCAACACCGCCAGAGAT
AATTTATCACCGCAGATGGTTATCTGTATGTTTTTATATGAATTTATTTTTTGCAGGGG
GGCATTGTTTGGTAGGTGAGAGATCAATTCGTCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGA
GAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGG
TCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAG
AATCAGGGGATAACCGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACC
GTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACA
AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGT
TTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCTGCGGCTTACCGGATACC
TGTCCGCGTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATC
TCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGC
CCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACT
TATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGGTG
CTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTA
TCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA
AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAA
AAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACG
AAAATCAGCTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCC
TTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATAGTAACCTTGGTCTG
ACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTAT
CCATAGTTGCCGTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTG
GCCCCAGTGTGCAATGATAACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAA
TAAACCAGCCAGCCGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCGCAACTTTATCCGCTCCA
TCCAGTCTATTAATGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC
GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTT
CATTACAGCTCCGTTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAA
AAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCTCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTAT
CACTCATGGTTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCT
TTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCAATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGA
GTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAGTTTAAAAAG
TGCTCATCATTGGAACCGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGA
GATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCA
CCAGCGTTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGG
CGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATC
AGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAG
GGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCA
TGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

10

20

30

40

【0095】

pG176の配列を以下に記載する (SEQ ID NO:2) :

TCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGT
AAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTA
ACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGT
AAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATGAAACAGTATTTAGAACTGATGCAAAAAGTGCTCGACGAAGGCA
CACAGAAAAACGACCGTACCGGAACCGGAACGCTTCCATTTTTGGTTCATCAGATGCGTTTTAACCTGCAAG
ATGGATTCCCGCTGGTGACAATAAACGTTGCCACCTGCGTTCCATCATCCATGAACTGCTGTGGTTTCTGCG
AGGGCGACACTAACATTGCTTATCTACACGAAAAACAATGTACCATCTGGGACGAATGGGCCGATGAAAACG
GCGACCTCGGGCCAGTGATGGTAACAGTGGCGCGCTGGCCAACGCCAGATGGTCTCATATTGACCAGA
TCACTACGGTACTGAACCAGCTGAAAAACGACCCGGATTGCGCGCGCATTATTGTTTCAGCGTGGAACGTAG
GCGAACTGGATAAAAATGGCGCTGGCACCGTGCCATGCATTCTTCCAGTTCTATGTGGCAGACGGCAAACCTCT
CTTGCCAGCTTTATCAGCGCTCCTGTGACGCTCTTCTCGGCTGCGGTTCAACATTGCCAGCTACGCGTTAT
TGGTGCATATGATGGCGCAGCAGTGCATCTGGAAGTGGGTGATTTTGTCTGGACCGGTGGCGACACGCATC
TGTACAGCAACCATATGGATCAAACCTATCTGCAATTAAGCCGCGAACCGCGTCCGCTGCCGAAGTTGATTA
TCAAACGTAAACCCGAATCCATCTTCGACTACCGTTTCAAGACTTTGAGATTGAAGGCTACGATCCGCATC

CGGGCATTAAAGCGCCGGTGGCTATCTAAGGCGCCATTGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCG
ATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGT
AACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTTCTTTAATGAAGCAGGG
CATCAGGACGGTATCTTTGTGGAGAAAGCAGAGTAATCTTATTACGCTGACTGGTGGGAAACCACAGTCA
GAATGTGTTAGCGCATGTTGACAAAAATACCATTAGTCACATTATCCGTCAGTCGGACGACATGGTAGATAA
CCTGTTTTATTATGCGTTTTGATCTTACGTTTTAATATTACCTTTATGCGATGAAACGGTCTTGGCTTTGATAT
TCATTTGGTCAGAGATTTGAATGGTTCCCTGACCTGCCATCCACATTTCGCAACATACTCGATTTCGGTTCCGG
TCAATGATAACGTCGGCATATTTAAAAACGAGGTTATCGTTGTCTCTTTTTTTCAGAATATCGCCAAGGATAT
CGTCGAGAGATTCCGGTTTAAATCGATTTAGAAGTATCAATAAATTTTTTCTGACCAATAGATATTCATCAA
AATGAACATTGGCAATTGCCATAAAACGATAAAATACGATTGGGATGTTGATTAATGATGAGCTTGATAC
GCTGACTGTTAGAAGCATCGTGGATGAAACAGTCCTCATTAATAAACACCACTGAAGGGCGCTGTGAATCAC
AAGCTATGGCAAGGTCATCAACGGTTTTCAATGTCGTTGATTTCTCTTTTTTTAAACCCCTCTACTCAACAGAT
ACCCGGTTAAACCTAGTCGGGTGTAACATACATAAATCCATAATAATCGTTGACATGGCATACCCCTCACTCAA
TGCGTAACGATAAATCCCTTACCTGAATATTTTCATCATGACTAAACGGAACAACATGGGTACCTAATGCG
CCACTCTCGGATTTTTTCAGGCGGACTTACTAICCCGTAAAGTGTGTATAATTTGCCTGGAATTGTCTTAA
AGTAAAGTAAATGTGCGATATGTGAGTGAGCTTAAAAACAAATATTTTCGCTGCAGGAGTATCCTGGAAGATG
TTCGTAGAAGCTTACTGCTCACAAGAAAAAGGCACGTCATCTGACGTGCCTTTTTTATTTGTACTACCCTG
TACGATTACTGCAGCTCGAGTTAATTCAAATCTTCTTCAGAAATCAATTTTTTGTTCACAAACCAATTTTTTA
ACCAACTTTCTCACCGCGCGCAACAAAGGCAAGGATTTTTGATAAGCTTTGCGATAGATTTTAAAGTGGTG
TTTTGAGAGAGTTCTAATAAAGGCGAAGCGTTTTGTAAAGCCGGTCATAATTAACCCCTCAAATCATCATAA
TTAACCCCTCAAATCATCAATGGATACTAACGGCTTATGCGATCGTACTCCACATGAAAGATGTTGAGAAT
TTGTGATAAATCGTATCGTTTTCTAAATCGTTTTAAAAAATCTAGGATTTTTTTAAAACTCAAATCTTGG
TAAAGTAAGCTTTCCCATCAAGGTTGTTTTAAAGGTTTTTCATAGAGCATGCTAAATAAGCGTTTGGGTGC
GTGTGAGGATTTTATGATATAATCAATCGCTTCATCAAAGTTGTTGAAATCATGCACATTCACAAACTTTTA
GGGTAAATCTTTTCGCCAGCTGGGACTCCCCCAATAATAGGAATGGTATGGCTAAATACGCATCAAGG
ATTTTTTCGGTTACATAGCCATAACCTTGCAGTTTTTCAAAACAGAGATTGAACCTGTATTGGCTTAAAAAC
TCGCTTTTTGTTTTCAACCTTATAGCCTAAAGTGTCTTCTACACTTCTCCCCCAGTAACTGGCTCTATGGAA
TTTAGAGCGTCATAAAAAGCGTTCCTCATAGGAGCGTTAGCGTTGCTCGCTACAAAACCTGGCAAACCCCTCTT
TTTAAAGATCGCTCTCATCTTCACTACTGCGCACAAATTAGGGTGGTTTTCTTTAAATGATGAGAGGGT
TTTTTTAAAGCATAAAGGCTGTGTCTTTGAGTTGTAGGGCGCAGTGGTGTCTAATAACAGCTCGGCTTTA
TAGTGCAAATGGGCATAATACAAAGGCATTCTCAAATAACGATCATTAATAATCCAATTCATCAAAGCCTATG
GCGTAATCAAAGAGGTTGAAATTAGGTGATTCGTTTTACCGGTGTAAACACTCGTTTAGTGTTTTGATAA
GATAAATCTTTCTAGCCGCTCCAAGAGGATTGCTAAAAACTAGATCTGAAAATTCATTGGGGTTTTGGTGG
AGGGTATGTCGTAGCTTTGGCTTAGGATAAAATAAAGAACGCTCTTTTTTAAATCTTTAATTTCTTCATCT
CCCCACCAATTTCGCCACAGCGATTTTTAGGGGGGGGGGGGAGATTTAGAGGCCATTTTTCAATGGAAGCG
CTTTCTATAAAGGCGTCTAATAGGGTTGGAACATATGTATATCTCCTTCTGAATCTAAAAATTGATTGA
ATGTATGCAATAAATGCATACACCATAGGTGIGGTTAATTTGATGCCCTTTTTTCAGGGCTGGAATGTGTA
AGAGCGGGGTTATTTATGCTGTGTTTTTTTTGTTACTCGGGAAGGGCTTTACCTCTCCGCATAAACGCTTC
CATCAGCGTTTTATAGTTAAAAAATCTTTTCGGAACGTTTTCGCTTACCCCAACCAACAGGGGATTGCT
GCTTTCCATTGAGCCTGTTTCTCTGCGCGACGTTTCGCGCGCGCGTGTGTTGTGCATCCATCTGGATTCTCCTG
TCAGTTAGCTTTGGTGGTGTGTGGCAGTTGTAGTCTGAACGAAAACCCCCCGGATTGGCACATTGGCAGC
TAATCCGGAATCGCACTTACGGCCAATGCTTCGTTTCGTATCACACACCCCAAGCCTCTGCTTTGAATGC
TGCCCTTCTTCAGGGCTTAATTTTTAAGAGCGTACCTTCATGGTGGTCAGTGCCTCTGCTGTGCTCA
GTATCACCGCCAGTGGTATTTATGTCAACACCGCCAGAGATAATTTATCACCGCAGATGGTTATCTGTATGT
TTTTTATATGAATTTATTTTTTGAGGGGGGCATTGTTTGGTAGGTGAGAGATCAATTCTGCATTAATGAAT
CGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCG
CTCGGTCTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGG
GGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCT
GGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCT
GCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAG
GTAICTCAGTTTCGGTGTAGGTGTTTCGCTCCAAGCTGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCCCGACC
CTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC
CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTA
CGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGG
TAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCACCGTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCG
CAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTC
ACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATAAAAATGAAG
TTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACC
TATCTCAGCGAICTGTCTATTTTCGTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACG
GGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATC

10

20

30

40

AGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTC
TATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGC
TACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCG
AGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTAA
GTTGGCCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAG
ATGCTTTTCTGTGACTGGTGTAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTC
TTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACG
TTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTGTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACC
CAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGC
AAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCAT
TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCC
GCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAA
TAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTC

10

【0096】

pG177の配列を以下に記載する (SEQ ID NO:3) :

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGT
AAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTA
ACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCATATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGT
AAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATGAAACAGTATTTAGAAGTATGCAAAAAAGTGCTCGACGAAGGCA
CACAGAAAAACGACCGTACCGGAACCGGAACGCTTTCCATTTTGGTTCATCAGATGCGTTTTAACCTGCAAG
ATGGATTCCCGCTGGTGACAATAACGTTGCCACCTGCGTTCCATCATCCATGAAGTGTGTGGTTTCTGTC
AGGGCGACACTAACATTGCTTATCTACACGAAAAACAATGTCACCATCTGGGACGAATGGGCCGATGAAAACG
GCGACCTCGGGCCAGTGTATGGTAAACAGTGGCGCGCTGGCCAACGCCAGATGGTCGTCATATTGACCAGA
TCACTACGGTACTGAACCAAGTGAACCAAGTGGCGCGCTGGCCAACGCCAGATGGTCGTCATATTGACCAGA
GCGAATGGATAAAAAATGGCGCTGGCACCCTGCCATGCATTTCTCCAGTTCTATGTGGCAGACGGCAACCTCT
CTTGCCAGCTTTATCAGCGCTCTGTGACGTCTTCTCGGCCCTGCCGTTCAACATTGCCAGCTACGCGTTAT
TGGTGCATATGATGGCGCAGCAGTGCATCTGGAAGTGGGTGATTTTGTCTGGACCGGTGGCGACACGCATC
TGTACAGCAACCATATGGATCAAACCTCATCTGCAATTAAGCCGCGAACCGCGTCCGCTGCCGAAGTTGATTA
TCAAACGTAAACCCGAATCCATCTTCGACTACCGTTTCGAAGACTTTGAGATTGAAGGCTACGATCCGCATC
CGGGCATTAAAGCGCCGGTGGCTATCTAAGGCGCCATTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCG
ATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGT
AACGCCAGGGTTTTCCAGTACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTTCTTTAATGAAGCAGGG
CATCAGGACGGTATCTTTGTGGAGAAAGCAGAGTAACTTATTCAGCCTGACTGGTGGGAAACCACAGTCA
GAATGTGTTAGCGCATGTTGACAAAAATACCATTAGTCACATTATCCGTCAGTCGGACGACATGGTAGATAA
CCTGTTTATTATGCGTTTTGTATCTTACGTTTAAATATACCTTTATGCGATGAAACGGTCTTGGCTTTGATAT
TCATTTGGTTCAGAGATTTGAATGGTTCCCTGACCTGCCATCCACATTGCAACATACTCGATTTCGGTTTCGGC
TCAATGATAACGTCGGCATATTTAAAAACGAGGTTATCGTTGTCTCTTTTTTTCAGAAATATCGCCAAGGATAT
CGTCGAGAGATTCCGGTTTAAATCGATTTAGAACTGATCAATAAATTTTTTCTGACCAATAGATATTCATCAA
AATGAACATTGGCAATTGCCATAAAAACGATAAAATACGTATTGGGATGTTGATTAAATGATGAGCTTGATAC
GCTGACTGTTAGAACATCGTGGATGAAACAGTCTCATTAATAAACACCACTGAAGGGCGCTGTGAATCAC
AAGCTATGGCAAGGTCATCAACGGTTTTCAATGTCGTTGATTTCTCTTTTTTTAACCCCTCTACTCAACAGAT
ACCCGGTTAAACCTAGTCGGGTGTAACCTACATAAATCCATAATAATCGTTGACATGGCATACCTCACTCAA
TGCCTAACGATAATTCCTTACCTGAATATTTTCATCATGACTAAACGGAACAACATGGGTCACCTAATGCG
CCACTCTCGCGATTTTTCAGGCGGACTTACTATCCCGTAAAGTGTGTATAATTTGCTTGAATTTGTCTTAA
AGTAAAGTAAATGTTGCGATATGTGAGTGAGCTTAAAAACAAATATTTTCGCTGCAGGAGTATCCTGGAAGATG
TTCGTAGAAGCTTACTGCTCACAAGAAAAAAGGCACGTCATCTGACGTGCCTTTTTTTATTTGTACTACCCTG
TACGATTACTGCAGCTCGAGTTAATTCAAATCTTCTCAGAAATCAATTTTTTGTTCAGCGTTATACTTTTGG
GATTTTACCTCAAATGGGATTCTATTTTACCCACTCCTTACAAAGGATATTCTCATGCCCCAAAAGCCAG
TGTTTGGGGCCAAATGATTTTTTCTGGATTTTCTATCAAATAGGCCGCCACCAGCTATAAGTGCTATTA
GCGATAATGCCATGCTGACAAGATTGCATGAGCAGCATGTCCCAATACGCCTCTTCTTCTTTATCCCTAGTG
GTCATGTCCATAAAAAGGGTAGCCAAGATCAAGATTTGCGTGAATTTCTAAGTCTTCGCAAAACACAAAAAGC
TCCATGTTTGGCAGCGCTTTGCCATATACTCAAGCGCCTTTTTTTGATAGTCAATACCAAGCTGACAGCCA
ATCCCCACATAATCCCTCTTCTTATATGCACAAACACGCTGTTTTTAGCGGCTAAAATCAAAGAAAGCTTG
CACTGATATTCTTCTCTTTTTTTATTATTATTCTTATTATTTTCGGGTGGTGGTGGTAGAGTGAAGGTTTGC
TTGATTAAAGGGGATATAGCATCAAAGTATCGTGGATCTTGGAATAGCCAAAAAATAAGTCAAGCGGCTT
GGCTTTAGCAATTTAGGCTCGTATTCAAACAGATTCTTGACTCACCTTATCAAATCCCATGCATTTGAGC
GCGTCTCTTACTAGCTTGGGGAGGTGTTGCATTTAGCTATAGCGATTTCTTTTCGCGCTCGCATAGGGCAAA
TCAATAGGGAAAAAGTTCTAATTGCATTTTCTATCGCTCCAATCAAAGAAGTGATATCTAACAGCACAGGC
GTATTAGAGTGTTTTGCAAACTTTTAGCGAAAGCGTATTGAAACATTTGATTCCCAAGCCCTCCGCAATTT

20

30

40

TGCACCACCTTAAAAGCCATATGTATATCTCCTTCTTGCTCGAGTTAATTCAAATCTTCTTCAGAAATCAAT
TTTTGTGTTCCAAACCAATTTTTTAACCAACTTTCTACCGCGCGCAACAAAGGCAAGGATTTTTGATAAGCT
TTGCGATAGATTTTAAAAGTGGTGTGTTTGGAGAGAGTTCTAATAAAGGCGAAGCGTTTTGTAAAAGCCGGTCA
TAATTAACCCCTCAATCATCATAATTAACCCCTCAATCATCAATGGATACTAACGGCTTATGCAGATCGTAC
TCCCACATGAAAGATGTTGAGAAATTTGTGATAAATCGTATCGTTTTCTAAAATCGTTTTAAAAAATCTAGG
ATTTTTTTAAAACCTCAATCTTGGTAAAAGTAAGCTTTCCCATCAAGGGTGTGTTAAAGGGTTTTCATAGAGC
ATGCTCAAATAAGCGTTTGGGTGCGTGTGCAGGTATTTGATATAATCAATCGCTTCATCAAAGTTGTTGAAA
TCATGCACATTCACAAAACTTTTAGGGTTAAAATCTTTTCGCCACGCTGGGACTCCCCCAATAAATAGGAATG
GTATGGCTAAAATACGCATCAAGGATTTTTTCGGTTACATAGCCATAACCTTGCGAGTTTTCAAACAGAGA
TTGAACCTGTATTGGCTTAAAAACTCGTTTTTGTTCACACCTTATAGCCTAAAGTGTTCCTCACACTTCCT
CCCCAGTAACCTGGCTCTATGGAATTTAGAGCGTCATAAAAAGCGTTCCCTCATAGGAGCGTTAGCGTTGCTC
GCTACAAAACCTGGCAAACCCCTCTTTTTAAAAGATCGCTCTCATCATTCACTACTGCGCACAAATTAGGGTGG
TTTTCTTTAAAATGATGAGAGGGTTTTTTTTAAAGCATAAAGGCTGTTGTCTTTGAGTTTGTAGGGCGCAGTG
GTGTCATTAACAAGCTCGGCTTTATAGTGCAAATGGGCATAATACAAAGGCATTCTCAAATAACGATCATTAA
AAATCCAATTCATCAAAGCCTATGGCGTAATCAAAGAGGTTGAAATTAGGTGATTCGTTTTACCGGTGTAA
AACACTCGTTTTAGTGTGTTTGAATAAGATAAAAATCTTTCTAGCCGCTCCAAGAGGATTGCTAAAAACTAGATCT
GAAAATTCATTGGGTGTTTTGGTGGAGGGTGATTGCGTAGCGTTGGCTTAGGATAAAAATAAAGAACGCTCTTT
TTAAATCTTTAATTTCTTCATCTCCCCACCAATTCGCCACAGCGATTTTTAGGGGGGGGGGGGAGATTTA
GAGGCCATTTTTCAATGGAAGCGCTTTCTATAAAGGCGTCTAATAGGGGTGGAACATATGTATATCTCCT
TCTTGAATTCATAAATGATTGAATGTATGCAAATAAATGCATACACCATAGGTGTGGTTAATTTGATGC
CCTTTTTCAGGGCTGGAATGTGTAAGAGCGGGGTATTTATGCTGTTGTTTTTGTACTCGGGAAGGGCT
TTACCTCTTCCGCATAAACGCTTCCATCAGCGTTTATAGTTAAAAAATCTTTTCGGAACCTGGTTTTGCGCTT
ACCCCAACCAACAGGGGATTTGCTGCTTTCCATTGAGCCTGTTTTCTCTGCGCGACGTTTCGCGGCGGCGTGT
TGTGCATCCATCTGGAATCTCCTGTCTAGTTAGCTTTGGTGGTGTGTGGCAGTTGTAGTCTGTAACGAAAC
CCCCGCGATTGGCAGATTGGCAGCTAATCCGGAATCGCACTTACGGCCAATGCTTCGTTTCGATACACAC
CCCAAAGCCTTCTGCTTTGAATGCTGCCCTTCTTCAGGGCTTAATTTTTAAGAGCGTCACCTTCATGGTGGT
CAGTGCCTCTGCTGATGTGCTCAGTATCACCGCCAGTGGTATTTATGTCAACACCGCCAGAGATAATTTAT
CACCGCAGATGGTTATCTGTATGTTTTTATATGAATTTATTTTTTGCAGGGGGGCATTGTTTGGTAGGTGA
GAGATCAATTCGTGATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGC
TTCTTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGT
AATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCGAGGAAAGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAG
GAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCG
ACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAAGGCGTTTCCCTTGAAGCTCCCT
CGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGC
GCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCA
CGAACCCCCCGTTACAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCGGTAAGACA
CGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGA
GTTCTTGAAGTGGTGGCTTAACCTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCC
AGTTACCTTCGGAAGAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTT
TGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTC
TGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTA
GATCTTTTTAAATAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTA
CCAAIGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCIGACTCCC
CGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCC
ACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGTC
AACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTGCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAG
TTTGCAGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCACTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTAG
CTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGG
TCCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTC
TCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATA
GTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTT
AAAAGTGTCTATCATTGGAACACGTTCTTCGGGGCGAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAG
TTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGC
AAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTT
CCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTTA
GAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTCTAAGAAACCATTAT
TATCATGACATTAACTATAAAAATAGGCGTATCAGAGGCCCTTTTCGTC

10

20

30

40

【0097】

バクテロイデス・フラギリスNCTC 9343 wcfW CDS DNAの配列を以下に記載する (SEQ ID NO:4) :

ATGATTGTATCATCTTTGCGAGGAGGATTGGGAATCAAATGTTTATTTACGCTATGGTG
AAGGCCATGGCATTAAAGAAACAATGTACCATTGCTTTAATTTGACTACTGATTTTGCA
AATGATGAAGTTTATAAAAGGAAACTTTTATTATCATATTTTGCAATTAGACTTGCCTGAA
AATAAAAAATTAACATTTGATTTTTTCATATGGGAATTATTATAGAAGGCTAAGTCGTAAT
TTAGGTTGTATATACTTCATCCATCATATCGTTATATTTGCGAAGAGCGCCCTCCCCAC
TTTGAATCAAGGTTAATTAGTTC TAAGATTACAAATGCTTTTCTGGAAGGATATTGGCAG
TCAGAAAAATATTTTCTTGATTATAAACAAGAGATAAAAGAGGACTTTGTAATACAAAA
AAATTAGAATACACATCGTATTTGGAATTGGAAGAAATAAAATTGCTAGATAAGAATGCC
ATAATGATTGGGGTTAGACGGTATCAGGAAAGTGATGTAGCTCCTGGTGGAGTGTTAGAA
GATGATTACTATAAATGTGCTATGGATATTATGGCATCAAAAGTTACTTCTCCTGTTTTT
TTTTGTTTTTTCACAAGATTTAGAATGGGTTGAAAAACATCTAGCGGGAAAAATATCCTGTT
CGTTTGATAAGTAAAAAGGAGGATGATAGTGGTACTATAGATGATATGTTTCTAATGATG
CATTTTCGTAATTATATAATATCGAATAGCTCTTTTACTGGTGGGGAGCATGGCTTTTCG
AAATATGATGATAAGCTGGTGATTGCTCCAGGTAATTTTATAAATAAGGATTCTGTACCA
GAATCTTGGTTTAAATTGAATGTAAGATAA

10

【 0 0 9 8 】

pG171の配列を以下に記載する (SEQ ID NO:5) :

TCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCA
CAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTG
TTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC
ACCATATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCG
CCTCCTCAACCTGTATATTCGTAAACCACGCCCAATGGGAGCTGTCTCAGGTTTGTTCCT
GATTGGTTACGGCGCGTTTCGCATCATTGTTGAGTTTTTCCGCCAGCCGACGCGCAGTT
TACCGGTGCCCTGGGTGCGAGTACATCAGCATGGGGCAAATTCTTTCCATCCCGATGATTGT
CGCGGGTGTGATCATGATGGTCTGGGCATATCGTCGCAGCCACAGCAACACGTTTTCCTG
AGGAACCATGAAACAGTATTTAGAACTGATGCAAAAAGTGCTCGACGAAGGCACACAGAA
AAACGACCGTACCGGAACCGGAACGCTTTCCATTTTTGGTCATCAGATGCGTTTTAACCT
GCAAGATGGATTCCCGCTGGTGACAACATAACGTTGCCACCTGCGTTCCATCATCCATGA
ACTGCTGTGGTTTTCTGCAGGGCGACACTAACATTGCTTATCTACACGAAAACAATGTCAC
CATCTGGGACGAATGGGCCGATGAAAACGGCGACCTCGGGCCAGTGTATGGTAAACAGTG
GCGCGCCTGGCCAACGCCAGATGGTCTGTCATATTGACCAGATCACTACGGTACTGAACCA
GCTGAAAAACGACCCGATTTCGCGCCGCTATTATTGTTTCAGCGTGGAACGTAGGCGAACT
GGATAAAATGGCGCTGGCACCGTGCCATGCATTCTTCCAGTTCTATGTGGCAGACGGCAA
ACTCTCTTGCCAGCTTTATCAGCGCTCCTGTGACGCTCTTCTCGGCCTGCCGTTCAACAT
TGCCAGCTACGCGTTATTGGTGCATATGATGGCGCAGCAGTGCGATCTGGAAGTGGGTGA
TTTTGTCTGGACCGGTGGCGACACGCATCTGTACAGCAACCATATGGATCAAACATCATCT
GCAATTAAGCCGCGAACC CGCTCCGCTGCCGAAGTTGATTATCAAACGTAAACCCGAATC
CATCTTCGACTACCGTTTCGAAGACTTTGAGATTGAAGGCTACGATCCGCATCCGGGCAT
TAAAGCGCCGGTGCTATCTAATTACGAAACATCCTGCCAGAGCCGACGCCAGTGTGCGT
CGGTTTTTTTTACCCTCCGTTAAATTTCTTCGAGACGCCTTCCCGAAGGCGCCATTTCGCCAT
TCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGC
TGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGT
CACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTTCTTTAATGAAGCAGGGCATCAGGA
CGGTATCTTTGTGGAGAAAGCAGAGTAATCTTATTCAGCCTGACTGGTGGGAAACCACCA
GTCAGAATGTGTTAGCGCATGTTGACAAAAATACCATTAGTCACATTATCCGTCAGTCGG
ACGACATGGTAGATAACCTGTTTATTATGCGTTTTTGATCTTACGTTTAATATTACCTTTA
TGCGATGAAACGCTCTGGCTTTGATATTCATTTGGTCAGAGATTGGAATGGTTCCCTGA
CCTGCCATCCACATTCGCAACATACTCGATTCCGTTCCGGCTCAATGATAACGTCGGCATA
TTTAAAAACGAGGTTATCGTTGTCTCTTTTTTTCAGAATATCGCCAAGGATATCGTCGAGA
GATTCGGTTTTAATCGATTTAGAATGATCAATAAAATTTTTCTGACCAATAGATATTCA
TCAAAATGAACATTGGCAATTGCCATAAAAACGATAAATAACGTATTGGGATGTTGATTA
ATGATGAGCTTGATACGCTGACTGTTAGAAGCATCGTGGATGAAACAGTCTCATTAATA
AACACCACTGAAGGGCGCTGTGAATCACAAGCTATGGCAAGGTATCAACGGTTTCAATG
TCGTTGATTTCTCTTTTTTAAACCCCTCTACTCAACAGATAACCCGTTAAACCTAGTCGG
GTGTAACCTACATAAATCCATAATAATCGTTGACATGGCATACCCTCACTCAATGCGTAAC
GATAATTCCCCTTACCTGAATATTTTCATCATGACTAAACGGAACAACATGGGTACCTAA

20

30

40

TGCGCCACTCTCGCGATTTTTTCAGGCGGACTTACTATCCCGTAAAGTGTTGTATAATTTG
CCTGGAATTGTCTTAAAGTAAAGTAAATGTTGCGATATGTGAGTGAGCTTAAACAAATA
TTTCGCTGCAGGAGTATCCTGGAAGATGTTCTGTAGAAGCTTACTGCTCACAAGAAAAAG
GCACGTCATCTGACGTGCCTTTTTTATTGTACTACCTGTACGATTACTGCAGCTCGAG
TTTAATTCAAATCTCTTCAGAAATCAATTTTTGTTTCAGCGTTATACTTTTGGGATTTTA
CCTCAAAATGGGATTCATTTTTACCCACTCCTTACAAAGGATATTCTCATGCCAAAAA
GCCAGTGTTTTGGGGCCAATAATGATTTTTTCTGGATTTTCTATCAAAATAGGCCGCCACC
AGCTATAAGTGCTATTAGCGATAATGCCATGTGACAAGATTGCATGAGCAGCATGTCCC
AATACGCCCTCTTCTCTTTATCCCTAGTGGTCATGTCCATAAAAGGGTAGCCAAGATCAA
GATTTTGCCTGAATTCTAAGTCTTCGCAAAACAAAAAGCTCCATGTTTGGCAGCGCT
TTGCCATATACTCAAGCGCCTTTTTTTGATAGTCAATACCAAGCTGACAGCCAATCCCCA
CATAATCCCCCTCTTCTTATATGCACAAACACGCTGTTTTTAGCGGCTAAAATCAAAGAAA
GCTTGCAGTGAATCTTCTCTTTTTTATTATTATTCTTATTATTTTCGGGTGGTGGTG
GTAGAGTGAAGGTTTGCTTGATTAAAGGGGATATAGCATCAAAGTATCGTGGATCTTGGA
AATAGCCAAAAAATAAGTCAAGCGGCTTGGCTTAGCAATTTAGGCTCGTATTCAAAAA
CGATTTCTTGACTCACCTATCAAAATCCCATGCAATTGAGCGCGTCTCTTACTAGCTTGG
GGAGGTGTTGCATTTTAGCTATAGCGATTTCTTTTCGCGCTCGCATAGGGCAAATCAATAG
GGAAAAGTTCTAATTGCATTTTCTATCGTCCAATCAAAAGAAGTGATATCTAACAGCA
CAGGCGTATTAGAGTGTTTTTGCAAACTTTTAGCGAAAGCGTATTGAAACATTTGATTCC
CAAGCCCTCCGCAAAATTTGCACCACCTTAAAAGCCATATGTATATCTCCTTCTGAATTC
TAAAAATTGATTGAATGTATGCAATAAATGCATACCCATAGGTGTGGTTTTAATTGAT
GCCCTTTTTCAGGGCTGGAATGTGTAAGAGCGGGGTATTTATGCTGTTGTTTTTTGTT
ACTCGGGAAGGGCTTTACCTCTTCCGCATAAACGCTTCCATCAGCGTTTATAGTTAAAAA
AATCTTTTCGGAACCTGGTTTTGCGCTTACCCCAACCAACAGGGGATTTGCTGCTTTCCATT
GAGCCGTGTTTTCTGCGCGACGTTTCGCGCGCGCTGTTTGTGCATCCATCTGGATTCTCC
TGTCAGTTAGCTTTGGTGGTGTGTGGCAGTTGTAGTCTGAACGAAAACCCCCCGCGATT
GGCACATTGGCAGCTAATCCGGAATCGCACTTACGGCCAATGCTTCGTTTCGTATCACAC
ACCCCAAAGCCTTCTGCTTTGAATGCTGCCCTTCTTCAGGGCTTAATTTTTAAGAGCGTC
ACCTTCATGGTGGTCAGTGCGTCCGTGCTGATGTGCTCAGTATCACCGCCAGTGGTATTTA
TGTCAACACCGCCAGAGATAATTTATCACCGCAGATGGTTATCTGTATGTTTTTATATG
AATTTATTTTTTGCAGGGGGGCATTGTTTGGTAGGTGAGAGATCAATTCGTCATTAATGA
ATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTC
ACTGACTCGTTCGCTCGGCTGCTTGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCG
GTAATACGGTTTATCCACAGATAACAGGGGATAACGCAAGGAAAGACATGTGAGCAAAAGGC
CAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTTCATAGGCTCCGC
CCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA
CTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACC
CTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCAT
AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTG
CACGAACCCCCCGTTACGCCCAGCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCC
AACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACT
AGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCGCTGAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTT
GGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAG
CAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGG
TCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAA
AGGATCTTCACCTAGATCCTTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA
TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCG
ATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCGACTCCCCGCTGCTGTAGATAACTACGATA
CGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCG
GCTCCAGATTTTATCAGCAATAAACACGAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCT
GCAACTTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGT
TCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACACGC
TCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGA
TCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCTCGATCGTTGTGAGAAGT
AAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTC
ATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAA
TAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCA
CATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGGAACCGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCA
AGGATCTTACCCTGTGTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCT
TCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCC
GCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTCAA
TATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATT
TAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC
TAAGAAACCATTATATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACAGGCCCTTT
CGTC

10

20

30

40

pG180の配列を以下に記載する (SEQ ID NO:6) :

TCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCA
CAGCTTGTCTGTAAACGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTG
TTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC
ACCATATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCG
CCTCCTCAACCTGTATATTCGTAAACCACGCCCAATGGGAGCTGTCTCAGGTTTGTTCCT
GATTGGTTACGGCGCGTTTTCGCATCATTGTTGAGTTTTTCCGCCAGCCCGACGCGCAGTT
TACCGGTGCCCTGGGTGCAGTACATCAGCATGGGGCAAATTCCTTCCATCCCGATGATTGT
CGCGGGTGTGATCATGATGGTCTGGGCATATCGTCGAGCCCACAGCAACACGTTTCCTG
AGGAACCATGAAACAGTATTTAGAACTGATGCAAAAAGTGCTCGACGAAGGCACACAGAA
AAACGACCGTACCGGAACCGGAACGCTTTCCATTTTGGTCATCAGATGCGTTTTAACCT
GCAAGATGGATTCCCGCTGGTGACAATAAACGTTGCCACCTGCGTTCCATCATCCATGA
ACTGCTGTGGTTTTCTGCAGGGCGACACTAACATTGCTTATCTACACGAAAACAATGTCAC
CATCTGGGACGAATGGGCCGATGAAAACGGCGACCTCGGGCCAGTGTATGGTAAACAGTG
GCGCGCCTGGCCAACGCCAGATGGTCGTATATTGACCAGATCACTACGGTACTGAACCA
GCTGAAAAACGACCCGGATTTCGCGCCGCATTATTGTTTTCAGCGTGGAACGTAGGCGAACT
GGATAAAATGGCGCTGGCACCGTGCCATGCATTCTTCCAGTTCTATGTGGCAGACGGCAA
ACTCTCTTGCCAGCTTTATCAGCGCTCCTGTGACGTCTTCTCGGCCGTCGCGTTCAACAT
TGCCAGCTACGCGTTATTGGTGATATGATGGCGCAGCAGTGCGATCTGGAAGTGGGTGA
TTTTGTCTGGACCGGTGGCGACACGCATCTGTACAGCAACCATATGGATCAAACCTCATCT
GCAATTAAGCCGCGAACCAGCTCCGCTGCCGAAGTTGATTATCAAACGTAAACCCGAATC
CATCTTCGACTACCGTTTCGAAGACTTTGAGATTGAAGGCTACGATCCGCATCCGGGCAT
TAAAGCGCCGGTGGCTATCTAATTACGAAACATCCTGCCAGAGCCGACGCCAGTGTGCGT
CGGTTTTTTTTACCTCCGTTAAATTCCTCGAGACGCCTTCCCGAAGGCGCCATTGCGCAT
TCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGC
TGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAACGCCAGGTTTTCCCAGT
CAGCAGTTTGTAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTCTTTAATGAAGCAGGGCATCAGGA
CGGTATCTTTGTGGAGAAAGCAGAGTAATCTTATTCAGCCTGACTGGTGGGAAACCACCA
GTCAGAATGTGTTAGCGCATGTTGACAAAAATACCATTAGTCACATTATCCGTCAGTCGG
ACGACATGGTAGATAACCTGTTTTATTATGCGTTTTGATCTTACGTTTAAATATTACCTTTA
TGCGATGAAACGGTCTTGGCTTTGATATTCAATTTGGTCAGAGATTTGAATGGTTCCTGA
CCTGCCATCCACATTCGCAACATACTCGATTGCGTTCGGCTCAATGATAACGTCGGCATA
TTTTAAACAGAGTTATCGTTGTCTCTTTTTTTCAGAATATCGCCAAGGATATCGTCGAGA
GATTCCGGTTTTAATCGATTTAGAAGTATCAATAAAATTTTTCTGACCAATAGATATTCA
TCAAAATGAACATTGGCAATTGCCATAAAAACGATAAAATAACGTATTGGGATGTTGATTA
ATGATGAGCTTGATACGCTGACTGTTAGAAGCATCGTGATGAAACAGTCCCTCATTAATA
AACACCACTGAAGGGCGCTGTGAATCACAAGCTATGGCAAGGTCATCAACGGTTTTCAATG
TCGTTGATTTCTCTTTTTTTAACCCCTCTACTCAACAGATAACCGGTTAAACCTAGTCGG
GTGTAACCTACATAAATCCATAATAATCGTTGACATGGCATAACCTCACTCAATGCGTAAC
GATAATTCCCTTACCTGAATATTTTCATCATGACTAAACGGAACAACATGGGTCACCTAA
TGCGCCACTCTCGCATTTTTTCAGGCGGACTTACTATCCCGTAAAGTGTGTATTAATTTG
CCTGGAATTGTCTTAAAGTAAAGTAAATGTTGCGATATGTGAGTGAGCTTAAACAAATA
TTTCGCTGCAGGAGTATCCTGGAAGATGTTGCTAGAAGCTTACTGCTCACAAGAAAAAG
GCAGTCTATCTGACGTGCCTTTTTTTATTTGTACTACCTGTACGATTACTGCAGCTCGAG
TTTAATTCAAATCTCTTCAGAAATCAATTTTGTCTCTTACATTCAATTTAAACCAAG
ATTCTGGTACAGAACTCTTATTTATAAAATTACCTGGAGCAATCACCAGCTTATCATCAT
ATTTGAAAGCCATGCTCCCCACCAGTAAAAAGAGCTATTCGATATTATATAATTACGAA
AATGCATCATTAGAAACATATCATCTATAGTACCACTATCATCCTCCTTTTTTACTTATCA
AACGAACAGGATATTTCCCGCTAGATGTTTTTCAACCCATTCTAAATCTTGTGAAAAAC
AAAAGAAAACAGGAGAAGTAACCTTTTGATGCCATAATATCCATAGCACATTTATAGTAAT
CATCTTCTAACACTCCACCAGGAGTACATCACTTCTTGATAACCGTCTAACCCCAATCA
TTATGGCATTCTTATCTAGCAATTTTATTTCTTCCAATTCCAAATACGATGTGTATTCTA
ATTTTTTTTGTATTACAAAGTCCCTCTTTTATCTCTTGTATTATAATCAAGAAAATATTTTT

10

20

30

40

CTGACTGCCAATATCCTTCCAGAAAAGCATTGTGTAATCTTAGAACTAATTAACCTTGATT
CAAAGTGGGGAGGGCGCTCTTCGCAAATATAACGATATGATGGATGAAGTATATGACAAAC
CTAAATTACGACTTAGCCTTCTATAATAATTCCCATATGAAAAATCAAATGTTAATTTTT
TATTTTCAGGCAAGTCTAATGCAAAATATGATAATAAAAGTTTCCTTTTATAAACTTCAT
CATTTGCAAAATCAGTAGTCAAATTAAGCGAATGGTACATTGTTTCTTAATGCCATGG
CCTTCACCATAGCGTAAATAAACATTTGATTCCCAATCCTCCTCGCAAAGATGATACAA
TCATATGTATATCTCCTTCTTGTCTAGAATTCTAAAAATTGATTGAATGTATGCAAAATA
ATGCATACACCATAGGTGTGGTTTTAATTTGATGCCCTTTTTTCAGGGCTGGAATGTGTAAG
AGCGGGGTTATTTATGCTGTTGTTTTTTTTGTTACTCGGGAAGGGCTTTACCTCTTCCGCA
TAAACGCTTCCATCAGCGTTTATAGTTAAAAAATCTTTCGGAACCTGGTTTTGCGCTTAC
CCCAACCAACAGGGGATTTGCTGCTTTCCATTGAGCCTGTTTCTCTGCGCGACGTTGCGG
GCGGCGTGTGTTGTGCATCCATCTGGATTCTCCTGTCTAGTTAGCTTTGGTGGTGTGTGGCA
GTTGTAGTCTGAACGAAAACCCCCGCGATTGGCACATTGGCAGCTAATCCGGAATCGC
ACTTACGGCCAATGCTTCGTTTCGTATCACACACCCCAAAGCCTTCTGCTTTGAATGCTG
CCCTTCTTCAGGGCTTAATTTTTAAGAGCGTCACCTTCATGGTGGTCAGTGCCTCTGCT
GATGTGCTCAGTATCACCGCCAGTGGTATTTATGTCAACACCGCCAGAGATAATTTATCA
CCGCAGATGGTTATCTGTATGTTTTTTATATGAATTTATTTTTTGCAGGGGGGCATTGTT
TGGTAGGTGAGAGATCAATTCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTT
TGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCTGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGC
TGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGG
ATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGG
CCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGAC
GCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTG
GAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCT
TTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGG
TGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCGACCGCT
GCGCCTTATCCGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCAC
TGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGT
TCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTC
TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA
CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGAT
CTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCAC
GTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAAT
AAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACC
AATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTG
CCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTG
CTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGC
CAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTTCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTA
TTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTG
TTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACGCT
CCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTA
GCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCTAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCAIGG
TTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGA
CTGGTGAGTACTCAACCAAGTCACTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT
GCCGCGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCA
TTGGAACAGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT
CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTTACCAGCGTTT
CTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA
AATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATT
GTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGC
GCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTTAAGAAACCATTTATTCATGACATTAA
CCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTC

10

20

30

40

【0100】

W3110 Δlon::Kan::lacZ with RBS 大腸菌株K-12垂株W3110の配列を以下に記載する (SEQ ID NO:7) :

GTCCATGGAAGACGTCGAAAAAGTGGTTATCGACGAGTCGGTAATTGATGGTCAAAGCAA
ACCGTTGCTGATTATGCGCAAGCCGGAAGCGCAACAGGCATCTGGTGAATAATTAACCAT
TCCCATAACAATTAGTTAACCAAAAAGGGGGGATTTTATCTCCCTTTAATTTTTCTCTA
TTCTCGGCGTTGAATGTGGGGGAAACATCCCCATATACTGACGTACATGTTAATAGATGG
CGTGAAGCACAGTCGTGTCTGATTACCTGGCGGAAATTAAACTAAGAGAGAGCTCTA
TGATTCCGGGGATCCGTCGACCTGCAGTTCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAAGTATAGGAA
CTTCAGAGCGCTTTTGAAGCTCACGCTGCCGCAAGCACTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAA
GGAAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCA
GCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAAGCAGGTAGCTTGCA
GTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCAGGAAT
TGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTT
TCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAG
GATCGTTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGG
AGAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAACTGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGT
TCCGGCTGTACAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCC
TGAATGAACTGCAGGACAGGCGAGCGCGGCTATCTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCCT
GCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAG
TGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGG
CTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTGACCACCAAG
CGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATG
ATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACCTGTTGCCAGGCTCAAGGCGC
GCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGGCGAATATCA
TGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCTGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACC
GCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGG
CTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCT
ATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTAATAAGGGGATCTTGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCC
TATTCTCTAGAAAAGTATAGGAACCTCGAAGCAGCTCCAGCCTACATAAAGCGGCCGCTTA
TTTTTGACACCAGACCAACTGGTAATGGTAGCGACCGGCGCTCAGCTGGAATTCCGCCGA
TACTGACGGGCTCCAGGAGTCGTGCGCCACCAATCCCATATGGAACCGTCGATATTGAG
CCATGTGCCTTCTTCCGCGTGACGAGATGGCGATGGCTGGTTTTCCATCAGTTGCTGTTG
ACTGTAGCGGCTGATGTTGAACTGGAAGTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTCAA
TTCGCGCGTCCCGCAGCGCAGACCGTTTTTCGCTCGGGAAGACGTACGGGGTATACATGTC
TGACAAATGGCAGATCCGACGGTCAAAACAGGCGGCAGTAAGGCGGTGCGGATAGTTTTCT
TTGCGGCCCTTAATCCGAGCCAGTTTTACCCGCTCTGCTACCTGCGCCAGCTGGCAGTTGAG
GCCAATCCGCGCCGATGCGGTGTATCGCTCGCCACTTCAACATCAACGTAATCGCCAT
TTGACCACTACCATCAATCCGGTAGGTTTTCCGGCTGATAAATAAGGTTTTCCCTGATG
CTGCCACGCGTGAGCGGTGTAATCAGCACCGCATCAGCAAGTGTATCTGCCGTGCACTG
CAACAACGCTGCTTCCGCGCTGGTAATGGCCCGCCGCTTCCAGCGTTTCGACCCAGGCGTT
AGGGTCAATGCGGGTTCGCTTCACTTACGCCAATGTCGTTATCCAGCGGTGCACGGGTGAA
CTGATCGCGCAGCGGCTCAGCAGTTGTTTTTATCGCCAATCCACATCTGTGAAAGAAA
GCCTGACTGGCGGTTAAATTGCCAACGCTTATTACCCAGCTCGATGCAAAAATCCATTTT
GCTGGTGGTCAGATGCGGGATGGCGTGGGACGCGGCGGGAGCGTACACTGAGGTTTTT
CGCCAGACGCCACTGCTGCCAGGCGCTGATGTGCCCGGCTTCTGACCATGCGGTGCGGTT
CGGTTGCACTACGCGTACTGTGAGCCAGAGTTGCCCGGCGCTCTCCGGCTGCGGTAGTTC
AGGCAGTTCAATCAACTGTTTTACCTTGTGGAGCGACATCCAGAGGCACTTACCCTTGC
CAGCGGCTTACCATCCAGCGCCACCATCCAGTGCAGGAGCTCGTTATCGCTATGACGGAA
CAGGTATTGCTGGTCACTTCGATGGTTTTGCCCGGATAAACGGAAGTGGAAAACTGCTG
CTGGTGTGTTTTGCTTCCGTCAGCGCTGGATGCGGCGTGGGTCGGCAAAGACCAGACCGTT
CATACAGAACTGGCGATCGTTCCGGCTATCGCCAAAATCACCGCCGTAAGCCGACACGG
GTTGCCGTTTTTCATCATATTTAATCAGCGACTGATCCACCCAGTCCAGACGAAGCCGCC
CTGTAAACGGGGATAGTACGAAACGCCTGCCAGTATTAGCGAAACCGCCAAGACTGTT
ACCCATCGCGTGGGCGTATTGCAAAAGGATCAGCGGGCGCGTCTCTCCAGGTAGCGAAAG
CCATTTTTTGATGGACCATTTGCGCACAGCCGGGAAGGGCTGGTCTTCATCCACGCGCGC
GTACATCGGGCAAATAATATCGGTGGCCGTGGTGTGGGCTCCGCCGCTTCATACTGCAC
CGGGCGGGAAGGATCGACAGATTTGATCCAGCGATACAGCGCGTCTGTGATTAGCGCCGTG
GCCTGATTTCATCCCCAGCGACAGATGATCACACTCGGGTGATTACGATCGCGCTGCAC
CATTCGCGTTACGCGTTCGCTCATCGCCGGTAGCCAGCGCGGATCATCGGTGACAGGATT
CATTTGGCACCATGCCGTGGGTTTTCAATATTGGCTTCATCCACCACATACAGGCCGTAGCG
GTCGCACAGCGTGTACCACAGCGGATGGTTCCGGATAATGCGAACAGCGCACGGCGTTAAA
GTTGTTCTGCTTCATCAGCAGGATATCTGCAACATCGTCTGCTCATCCATGACCTGACC
ATGCAGAGGATGATGCTCGTGACGGTTAACGCCCTCGAATCAGCAACGGCTTGCCGTTGAG
CAGCAGCAGACCATTTTTCAATCCGCACCTCGCGGAAACCGACATCGCAGGCTTCTGCTTC
AATCAGCGTGCCGTGGGCGGTGTGCAGTTCAACCACCGCACGATAGAGATTCCGGATTTC

10

20

30

40

GGCGCTCCACAGTTTCGGGTTTTTCGACGTTTCAGACGTAGTGTGACGCGATCGGCATAACC
ACCACGCTCATCGATAATTTACCGCCGAAAGGCGCGGTGCCGCTGGCGACCTGCGTTTC
ACCCTGCCATAAAGAACTGTTACCCGTAGGTAGTCACGCAACTCGCCGCACATCTGAAC
TTCAGCCTCCAGTACAGCGCGGTGAAATCATCATTAAAGCGAGTGGCAACATGGAAATC
GCTGATTTGTGTAGTCGGTTTTATGCAGCAACGAGACGTACGGAAAAATGCCGTCATCCG
CCACATATCCTGATCTTCCAGATAACTGCCGTCACCTCCAGCGCAGCACCATCACCAGGAG
GCGGTTTTCTCCGCGCGGTAAAAATGCGCTCAGGTCAAATTCAGACGGCAAACGACGTCTC
CTGGCCGTAACCGACCCAGCGCCCGTTGCACCACAGATGAAACGCCGAGTTAACGCCATC
AAAAATAATTCGCGTCTGGCCTTCTGTAGCCAGCTTTCATCAACATTAAATGTGAGCGA
GTAACAACCCGTCGGATTCTCCGTGGGAACAAACGGCGGATTGACCGTAATGGGATAGGT
CACGTTGGTGTAGATGGGCGCATCGTAACCGTGCATCTGCCAGTTTGAGGGGACGACGAC
AGTATCGGCCCTCAGGAAGATCGCACTCCAGCCAGCTTCCGGCACCGCTTCTGGTGCCGG
AAACCAGGCAAAGCGCCATTTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGT
GCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAG
TTGGGTAACGCCAGGGTTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATCCGT
AATCATAGTCTATAGTAGGTTTTCTCAGGTTGTGACTGCAAAATAGTGACCTCGCGCAAAA
TGCACTAATAAAAAACAGGGCTGGCAGGCTAATTCGGGCTTGCCAGCCTTTTTTTGTCTCG
CTAAGTTAGATGGCGGATCGGGCTTGCCCTTATTAAGGGGTGTTGTAAGGGGATGGCTGG
CCTGATATAACTGCTGCGCGTTCTGACCTTGAAGGATTCAAGTGCATATAAATTATAAA
GAGGAAGAGAAGAGTGAATAAATCTCAATTGATCGACAAGATTGCTGCAGGGGCTGATAT
CTCTAAAGCTGCGGCTGGCCGTGCGTTAGATGCTATTATTGCTTCCGTAACCTGAATCTCT
GAAAGAAGG

10

【0101】

pG186の配列を以下に記載する (SEQ ID NO:8) :

TCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCA
CAGCTTGTCTGTAAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTG
TTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC
ACCATATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCG
CCTCCTCAACCTGTATATTCGTAAACCACGCCCAATGGGAGCTGTCTCAGGTTTGTTCCT
GATTGGTTACGGCGCGTTTCGCATCATTGTTGAGTTTTTCCGCCAGCCCGACGCGCAGTT
TACCGGTGCGTGGGTGCAGTACATCAGCATGGGGCAAATTCCTTCCATCCCGATGATTGT
CGCGGGTGTGATCATGATGGTCTGGGCATATCGTCGCAGCCACAGCAACACGTTTCTTG
AGGAACCATGAAACAGTATTTAGAACTGATGCAAAAAGTGCTCGACGAAGGCACACAGAA
AAACGACCGTACCGGAACCGGAACGCTTTCCATTTTTTGGTCATCAGATGCGTTTTAACCT
GCAAGATGGATTCCCGCTGGTGACAACCTAAACGTTGCCACCTGCGTTCCATCATCCATGA
ACTGCTGTGGTTTTCTGCAGGGCGACACTAACATTGCTTATCTACACGAAAACAATGTCAC
CATCTGGGACGAATGGGCCGATGAAAACGGCGACCTCGGGCCAGTGTATGGTAAACAGTG
GCGCGCCTGGCCAACGCCAGATGGTTCGTATATTGACCAGATCACTACGGTACTGAACCA
GCTGAAAAACGACCCGATTTCGCGCCGCATTATTGTTTCAGCGTGGAACGTAGGCGAACT
GGATAAAATGGCGCTGGCACCGTGCCATGCTTCCAGTTCTATGTGGCAGACGGCAA
ACTCTCTTGCCAGCTTTATCAGCGCTCCTGTGACGTCTTCTCGGCCGCGGTTCAACAT
TGCCAGCTACGCGTTATTGGTGCATATGATGGCGCAGCAGTGCGATCTGGAAGTGGGTGA
TTTTGTCTGGACCGTGGCGACACGCATCTGTACAGCAACCATATGGATCAAACCTCATCT
GCAATTAAGCCGCGAACCAGCTCCGCTGCCGAAGTTGATTATCAAACGTAAACCCGAATC
CATCTTCGACTACCGTTTCGAAGACTTTGAGATTGAAGGCTACGATCCGCATCCGGGCAT
TAAAGCGCCGGTGGCTATCTAATTACGAAACATCCTGCCAGAGCCGACGCCAGTGTGCGT
CGGTTTTTTTTACCTCCGTTAAATTCCTTCGAGACGCCCTCCCGAAGGCGCCATTTCGCCAT
TCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGC
TGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTTCCAGT
CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTCTTTAATGAAGCAGGGCATCAGGA
CGGTATCTTTGTGGAGAAAGCAGAGTAATCTTATTCAGCCTGACTGGTGGGAAACCA
GTCAGAATGTGTTAGCGCATGTTGACAAAAATACCATTAGTCACATTATCCGTCAGTCGG
ACGACATGGTAGATAACCTGTTTATTATGCGTTTTTGATCTTACGTTTAAATATTACCTTTA
TGCGATGAAACGGTCTTGCGTTTGATATTCAATTTGGTCAGAGATTGAAATGGTTCCTGA
CCTGCCATCCACATTCGCAACATACTCGATTTCGGTTCGGCTCAATGATAACGTCGGCATA
TTTAAAAACGAGGTTATCGTTGTCTCTTTTTTTCAGAAATATCGCCAAGGATATCGTCGAGA
GATTCCGGTTTTAATCGATTAGAACTGATCAATAAATTTTTCTGACCAATAGATATTCA
TCAAAATGAACATTGGCAATTGCCATAAAAACGATAAAACGATTTGGGATGTTGATTA
ATGATGAGCTTGATACGCTGACTGTTAGAAGCATCGTGATGAAACAGTCTCATTAATA

20

30

40

AACACCACTGAAGGGCGCTGTGAATCACAAGCTATGGCAAGGTCATCAACGGTTTCAATG
TCGTTGATTTCTCTTTTTTAAACCCCTCTACTCAACAGATACCCGGTTAAACCTAGTCGG
GTGTAACACTACATAAATCCATAATAATCGTTGACATGGCATAACCTCACTCAATGCGTAAC
GATAATTCCCCCTACCTGAATATTTTCATCATGACTAAACGGAACAACATGGGTCACCTAA
TGCGCCACTCTCGCGATTTTTTCAGGCGGACTTACTATCCCGTAAAGTGTGTATAATTTG
CCTGGAATTGTCTTAAAGTAAAGTAAATGTTGCGATATGTGAGTGAGCTTAAACAAATA
TTTCGCTGCAGGAGTATCCTGGAAGATGTTTCGTAGAAGCTTACTGCTCACAAGAAAAAAG
GCACGTCATCTGACGTGCCTTTTTTATTTGTACTACCTGTACGATTACTGCAGCTCGAG
TTAGTCTTTATCTGCCGACTTAAGGTCACGTAAGAGAGATAATTCAGCAGGGCGATATC
GTTCTCGACACCCAGCTTCATCATCGCAGATTTCTTCTGGCTACTGATGGTTTTAATACT
GCGGTTTCAGCTTTTATAGCATCTCGGTCACCAGGAAGCCTTCCGCAAACAGGCGCAGAAC
TTCACICTCTTTTGGCGAGAGACGCTTGTACCGTAACCACCAGCACTGATTTTTTCCAA
CAGGCGAGAAACGCTTTCCGGGGTAAATTTCTTCCCTTTCTGCAGCGCGGCGAGAGCTTT
CGGCAGATCGGTGCGTGCACCTTGTTTCAGCACGATCCCTTCGATATCCAGATCCAATAC
CGCACTAAGAATCGCCGGGTTGTTGTTTCATAGTCAGAACAATGATCGACAGGCTTGGGAA
ATGGCGCTTGTGTACTTTGATTAAGGTAATGCCATCGCCGTACTTATCGCCAGGCAATGGA
GAGATCGGTAATCAACACATGCGCATCCAGTTTCGGCAGGTTGTTGATCAGTGCTGTAGA
GTCTTCAAATTCGCCGACAACATTACCCACTCAATTTGCTCAAGTGATTGCGAATACC
GAACAAGACTATCGGATGGTCATCGGCAATAATTACGTTTCATATTGTTTCATTGTATATCT
CCTTCTTCTCGAGTTAATTCAAATCTTCTTCAGAAATCAATTTTTGTTTCAGCGTTATAC
TTTTGGGATTTTACCTCAAAATGGGATTCTATTTTACCCACTCCTTACAAAGGATATTC
TCATGCCCAAAAAAGCCAGTGTTTGGGGCCAATAATGATTTTTTCTGATTTTCTATCAAA
TAGGCCGCCACCAGCTATAAGTGCTATTAGCGATAATGCCATGCTGACAAGATTGCATG
AGCAGCATGTCCCAATACGCCTCTTCTCTTTATCCCTAGTGGTCATGTCCATAAAAGGG
TAGCCAAGATCAAGATTTTTCGTGAATTCTAAGTCTTCGCAAAACACAAAAAGCTCCATG
TTTGGCAGCGCTTTGCCATATACTCAAGCGCTTTTTTTGATAGTCAATACCAAGCTGA
CAGCCAATCCCCACATAATCCCTCTTCTTATATGCACAAACACGCTGTTTTTAGCGGCT
AAAATCAAAGAAAGCTTGCATGATATTCTTCTCTTTTTTATTATTCTTATTATTT
TCGGGTGGTGGTGGTAGAGTGAAGGTTTGCTTGATTAAAGGGGATATAGCATCAAAGTAT
CGTGGATCTTGAAATAGCCAAAAAATAAGTCAAGCGGCTTGGCTTTAGCAATTTAGGC
TCGTATTCAAAAACGATTTCTTGACTACCCCTATCAAAATCCCATGCATTTGAGCGCTCT
CTTACTAGCTTGGGGAGGTGTTGCATTTTAGCTATAGCGATTTCTTTTCGCGCTCGCATAG
GGCAAATCAATAGGGAAGGTTCTAATTGCATTTTCCTATCGCTCCAATCAAAAGAGTG
ATATCTAACAGCACAGCGCTATTAGAGTGTTTTTGCAAACCTTTTAGCGAAAGCGTATTGA
AACATTTGATTCCCAAGCCCTCCGCAAATTTGCACCACCTTAAAGCCATATGTATATCT
CCTTCTTGAATTCTAAAAATTGATTGAATGTATGCAAAATAATGCATACACCATAGGTGT
GGTTTAATTTGATGCCCTTTTTTCAGGGCTGGAATGTGTAAGAGCGGGGTTATTTATGCTG
TTGTTTTTTTTGTACTCGGGAAGGGCTTTACCTCTTCCGCATAAACGCTTCCATCAGCGT
TTATAGTTAAAAAATCTTTTCGGAAGTGGTTTTGCGCTTACCCCAACCAACAGGGGATTT
GCTGCTTTCCATTGAGCCTGTTTTCTCTGCGCGACGTTTCGCGGCGGCGTGTTTGTGCATCC
ATCTGGATTCTCCTGTCAAGTTAGCTTTGGTGGTGTGTTGGCAGTTGTAGTCTGAACGAAA
ACCCCGCGGATTGGCACATTGGCAGCTAATCCGGAATCGCACTTACGGCCATGCTTCG
TTTTGATACACACACCCCAAGCCTTCTGCTTTGAAATGCTGCCCTTCTTCAGGGCTTAAT
TTTTAAGAGCGTCACTTTCATGGTGGTCAAGTGCCTGCTGATGTGCTCAGTATCACCG
CCAGTGGTATTTATGTCAACACCGCCAGAGATAATTTATCACCGCAGATGGTTATCTGTA
TGTTTTTTTATATGAATTTATTTTTTGCAGGGGGCATTTGTTTGGTAGGTGAGAGATCAAT
TCTGCATTAAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGCATTTGGGCGCTCTTC
CGCTTCTCTGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGC
TCACTCAAAGCGGTAATACGTTTATCCACAGAAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACAT
GTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTT
CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCG
AAACCCGACAGGACTATAAAGATACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTC
TCCGTGTTCCGACCTTCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGT
GGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGTTTCGCTCCAA
GCTGGGCTGTGTGCAGAACCCCCCGTTACGCCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACATA
TCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAA
CAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTTGAAGTGGTGGCTAA
CTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTT
CGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTT
TTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTTGAT
CTTTCTACGGGCTGTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCAGTTAAGGGATTTTGGTCAT

10

20

30

40

GAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATC
AATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC
ACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTA
GATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGA
CCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCG
CAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGC
TAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCAT
CGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAG
GCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGAT
CGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAA
TTCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAA
GTCATTCTGAGAAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGA
TAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAACGTTCTTCGGG
GCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGC
ACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGG
AAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACT
CTTCCTTTTTCATATTTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGCTCATGAGCGGATACAT
ATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGT
GCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATTCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTAT
CACGAGGCCCTTTTCGTC

【0102】

他の態様

本発明は、その詳細な説明と共に記述してきたが、前述の説明は、添付の特許請求の範囲の範囲によって定義される、本発明の範囲を例証するのであって、制限すると意図されない。他の局面、長所、および変更は以下の特許請求の範囲の範囲内である。

【0103】

本明細書において言及された特許および科学論文は、当業者に入手可能である知識を確立する。本明細書において引用される全ての米国特許および公開されたまたはまだ公開されていない米国特許出願が、参照により組み入れられる。本明細書において引用された全ての公開された外国特許および特許出願は、参照により本明細書に組み入れられる。アクセッション番号によって示されるGenBankおよびNCBI提出物は、参照により本明細書に組み入れられる。本明細書において引用された他の全ての公表された参考文献、文書、原稿、および科学論文は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0104】

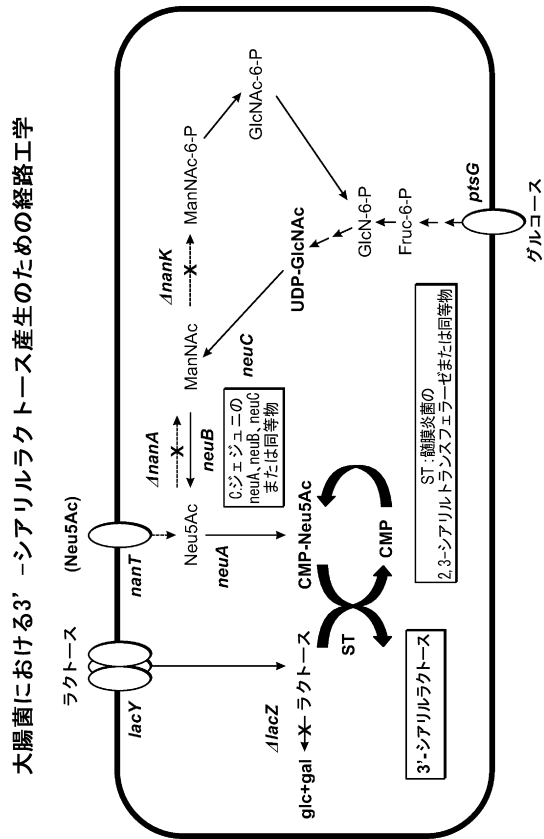
本発明は、その好ましい態様に関連して特に示され、記述されているが、形状および詳細において様々な変更がなされてもよく、それらも添付の特許請求の範囲によって包含される本発明の範囲に含まれることは当業者によって理解されるであろう。

10

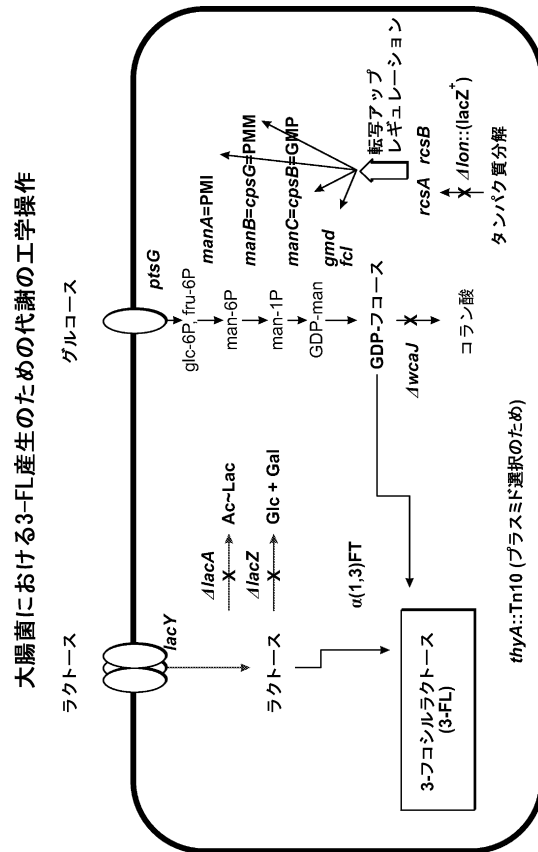
20

30

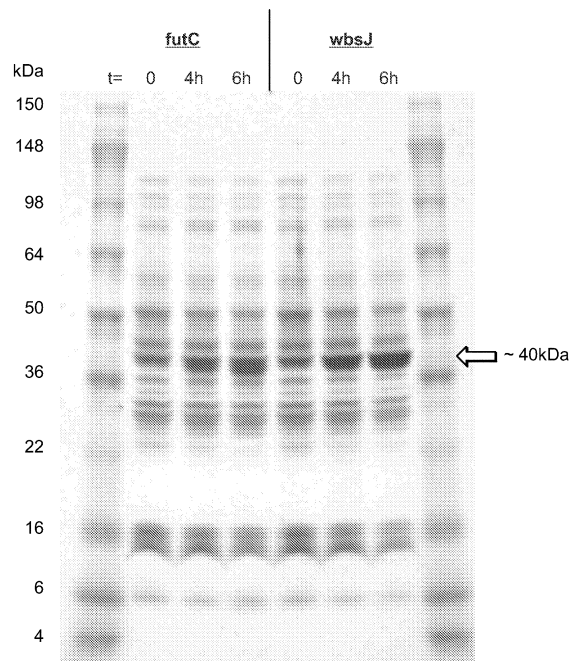
【図 5】



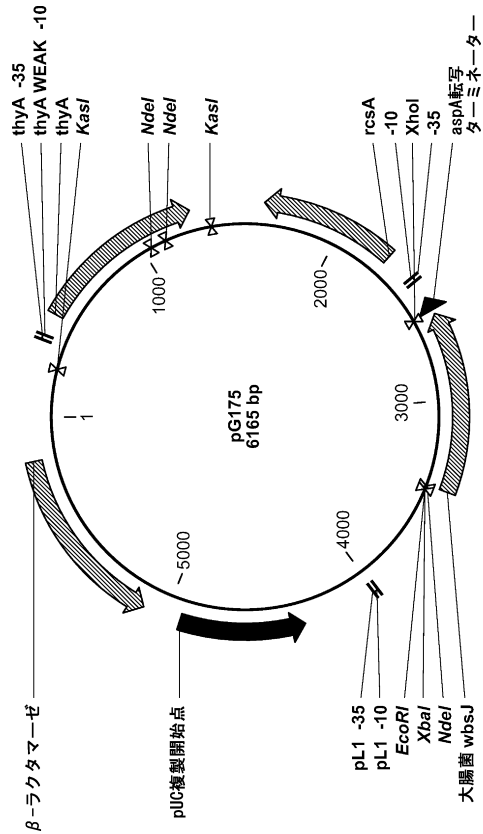
【図 6】



【图 8】



【圖 7】



【図13-2】

```
DPARLADTTAAHMPILKLADQSQVLEMSDVNERLEYLHAMMESEIDLLQVEKRIRNRVK
KQMEKSQREYYLNEQMKRAIQELGEMDDAPDENRALKKRIIDAAKMPKEAKKAEAELO
KLKMMSPMGAETVVRGVIYDNMVQVPMNARSKVKKDLRQAQEILDTHYGLERVKDRIR
LEYLAVQSRVNIKIGPILCLVGGPGVGKTSLGQSIAKATGGRKYVRMALGGVRDEAIEIR
GHRRTYIGSMFGKLIQKMAKVGVKNPLFLDEIDKMSDMRGDPASALLEVLDPQONV
AFSDHYLEVVDYLDSDVMFVATGNSMNIAPLLDRMEVIRLGGYTEDEKLNTAKRHLLP
KQIERNALKKGELTVDDSAIIGIRYRYTREAQVGLERLEISKLCHRAVQKLLDKSLK
HIEINGONLHDYLVQRFYDGRADNBNRVQVGTGLAWTVBGGDLTITETACVPGSGKLL
TYTGSLEVMQESIQALTVVRARAELKGINDFYEKRDIHVHVPEGATPKDQPSAGI
AMCTALVSLCIGIPVRADVAMTGEITLGGVLPICGGLKEKLLAAHRRGSIKTVLIPFEN
KRDLKEIPDNVIADLDIHPVKRIEEVLTALQNEPSGMQVVTAR" (SEQ ID NO: 10)
only remains" /label="lon N-terminus (initiator methionine codon
repeat_unit 303..330
/label="Flp site"
primer_bind 303..322
/label="P4 wanner=P1 Baba and Mori"
source complement(303..1605)
/organism="Template plasmid pKD13"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:170493"
misc_feature complement(303..4704)
/label="Insert
/notes="originates from KanR-lacZRSB-"
repeat_unit 331..364
/label="34 nt Flp site scar"
repeat_unit 331..342
/label="Flp site"
repeat_unit complement(353..364)
/label="FLP site"
Region 365..1586
/label="excised region upon pCP20 introduction"
KAN_resistance 732..1526
/notes="kanamycin resistance"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="Tns neomycin phosphotransferase"
/protein_id="AA02037.1"
/db_xref="GI:15554336"

/translation="MIEQDGLHAGSPAAMVERHFGYDWAQQTIGCSDAAVFLSAQGR
PVLVFKTDLGALNELQDEAARLGNLATGTGVCADVLDVVTAGRDWLLGLGVEPGQDL
LSHGLAPAEKVSIMADAMRRLHLDTPATCFPDQAKHRIETARTRMEAGLVDDQDLDE
EHQGLAPAEFLARLKARMPDGEDLVVTHGDACLPNIMVNRGRFSGFIGDGRGLVADRY
QDIALATRDIAEELGGEWADRFVLVYGIAAPDSQRIAFYRLLEDEFF" (SEQ ID NO: 11)
repeat_unit 1539..1550
/label="Flp site"
misc_feature 1539..1586
/label="natural FRT site"
repeat_unit 1553..1564
/label="Flp site"
repeat_unit complement(1575..1586)
/label="FLP site"
primer_bind complement(1586..1605)
/label="P1 Wanner=P2 Baba et al"
repeat_unit 1587..1605
/label="Flp site downstream scar Baba et al"
Site join(1615..1616,1610..1617)
/notes="Name: NotI"
/notes="Pattern: ggcgccgc"
/notes="cut_0_on_positive_strand: 3083'3084"
```

【図13-4】

```
LEYLAVQSRVNIKIGPILCLVGGPGVGKTSLGQSIAKATGRKYVRMALGGVRDEAIEIR
GHRRTYIGSMFGKLIQKMAKVGVKNPLFLDEIDKMSDMRGDPASALLEVLDPQONV
AFSDHYLEVVDYLDSDVMFVATGNSMNIAPLLDRMEVIRLGGYTEDEKLNTAKRHLLP
KQIERNALKKGELTVDDSAIIGIRYRYTREAQVGLERLEISKLCHRAVQKLLDKSLK
HIEINGONLHDYLVQRFYDGRADNBNRVQVGTGLAWTVBGGDLTITETACVPGSGKLL
TYTGSLEVMQESIQALTVVRARAELKGINDFYEKRDIHVHVPEGATPKDQPSAGI
AMCTALVSLCIGIPVRADVAMTGEITLGGVLPICGGLKEKLLAAHRRGSIKTVLIPFEN
KRDLKEIPDNVIADLDIHPVKRIEEVLTALQNEPSGMQVVTAR" (SEQ ID NO: 13)
residues)" /label="lon C-terminus (encodes 6 C-terminal
host_DNA 4705..5049
/label="E. coli W3110 chromosome"
source <4705..5049
/organism="Escherichia coli str. K-12 substr.
W3110"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="K-12"
/sub_strain="W3110"
/db_xref="taxon:316407"
primer complement(4705..4749)
/label="lon-H2 homology region for lambda red"
gene 4934..5049
/genes="hupB"
4934..5049
/genes="hupB"
/notes="ECK0434:JW0430:b0440"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="HU, DNA-binding transcriptional
regulator, beta subunit"
/protein_id="AP_001090.1"
/db_xref="GI:89107309"

/translation="MNKSQLDKIAAGADISKAAAGRALDAIAGVTESLKEGDDVAL
VGFGTFAVKERAARTGRNFTQKEITIAAKVPSPFRAGALKKDAVN" (SEQ ID NO: 14)
ORIGIN
1 GTCCATGGAA GACGCTGAAA AAGTGGTATT GCAGCAGTGC GTAATTGATG
GTCAAAGCAA
61 ACCGTGTGCT GTATTATGGCA AGCCGGGAAG GCAACAGGCA TCTGTTGAAT
AATTAACCAT
121 TCCCATACAA TIAGTTAAAC AAAAAGGGGG GATTITATCT CCCCTTTAAT
TTTTCTCTTA
181 TTCTCGCGCT TGAATGTGGG GGAACATCC CCATATAGCT AGCTACATGT
TAATATAGTG
241 CGTGAAGAC AGTCGTGTCA TCTGATTACC TGCGCGGAAT TAAACTAAGA
GAGAGCTCTA
301 TGATTCCGGG GATCCGTCGA CTGCAGTTC GAAGTTCCTA TTCTCTAGAA
AGTATAGGAA
361 CTTCAGAGCG CTTITGAAGC TCACGTGCC GCAAGCACTC AGGGCGCAAG
GGCTGCTAAA
421 GGAAGCGGAA CACGTAGAAA GCCAGTCCGC AGAAGCCGTG CTGACCCCGG
ATGAATGTCA
481 GCTACTGGGC TATCTGAGCA AGGGAAAAGC CAAGCCGAAA GAGAAAGCAG
GTAGCTTGCA
541 GTGGGCTTAC ATGGCGATAG CTAGACTGGG CGGTTTTATG GACAGCAAGC
GAACCGGAAT
601 TGCCAGCTGG GGGCGCCCTT GGTAAGGTTG GGAAGCCCTG CAAAGTAAAC
TGGATGGCTT
661 TTCTCGCGCC AAGGATCTGA TGCGCAGGG GATCAAGATC TGATCAAGAG
ACAGGATGAG
```

【図13-3】

```
source 1618..4704
/organism="Escherichia coli W3110"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="K-12"
/sub_strain="W3110"
/db_xref="taxon:316407"
/notes="synonym: Escherichia coli str. K12 substr.
W3110"
wild_type_CDS complement(1618..4692)
/genes="lacZ"
/notes="ECK0341:JW0335:b0344"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="beta-D-galactosidase"
/protein_id="BAE76126.1"
/db_xref="GI:85674486"

/translation="MTMITDSLAVVLQRRDWNPGVQTLNRLAAHPPFASWRNSEEAR
TDPSQQRLSLNGEWRFAWFPAPPAEVPSPWLECDLPEADTVVPSNWMQHGVDAPITY
NVTYPIVNPFPVTENPTGTCYSLTFNVDSENLQGCQTRIFDGVNGAFHLWNCGRWV
GYGQDRLPSEFDLSAFLRAGENRLAVMVLWNSDGSYLEDDQDMWRMSGIFRDVSLHK
PTQISDFHVATRFNDDFSRVLEAEVQMGELRDYLRVTVSLWQGETQVAGSTAPFG
GEIIDERGVADRVTLRLMVENPLKGAEPHILFVAVVELHTADGTLEAEACDVGRF
EVRINGLLLNGKPLLIHGVNRHEHPLHGVMDQTMVQDILMKQHNFAVRKESH
YNNPLMYLTCDRYGLVVVDIETHGMVPMNRLTDDPRLNLPAMSERVTMVQRDRN
HESVIINSLGNSGSGHANHDALYRWIKSVDPGRPVQYEGGADTTAIDICPMYARVD
EDQFFPAVPKNSIKWMLSLPGETRPLILCEYAHAMGNSLGGFAKYNQAFRQYPRLQGG
FVMDVWDQSLIKYDENGPNWYAGGDFDGTDPNDRQFCMNGLVFADTRPHALTEAKHQ
QQFQFRLGGQTIEVTSEYFLRHSDELLHMWVALDGPLASGEVPLDVAPOGQLIE
LPFLPQESAGQLWLTVRVVPNATANGSEAGHISAWQNRILAENSVTLPAASHAIPH
LITSEMDFCIELGNRWQFNRRQSGFLSQMGIGDKQLLTPRLDQFTRAPLDNDIGVSE
ATRLSEHFAVERWRKAGHIOAEALLQCTATLADAVLITTAHAWQOQKFLTIRKTI
YRIDGSGMAITVDVEVACDHPHAPRIELGCLQAQVAFRVNMLGLGPEPDRITAA
CFDRNDPLSLDMYTPYVFFSENGLRGCTRELNVGPHQNRGDFQNIISRYSQQLMETS
HRLHLLHAEEGTNLINDGFHMGICGDDSHSPVSAAEQLSAGRYHYQLVWCK" (SEQ ID NO: 12)
/label="wild-type lacZ CDS"
epitope_tag complement(4671..4704)
/label="LacFpKnInoRBS cloning primer"
RBS complement(4693..4704)
gene <4705..4725
/genes="lon"
CDS <4705..4725
/genes="lon"
/notes="ECK0433:JW0429:b0439"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="DNA-binding ATP-dependent protease La"
/protein_id="AP_001089.1"
/db_xref="GI:89107309"

/translation="MNPERSERIEIPVLPLRDVVVPHMVIPFLVGREKSIRCLEAAM
DHRKIMLVAGREASTDEFGVNDLEFVTVGSVILQMLRLPDGTVRVVLVGLQARISA
LQNIENHFAKAEYLEQTIIDREQRELVWRTAISQREYVILANKRIPPEVLTSNISID
DEPARLADTTAAHMPILKLADQSQVLEMSDVNERLEYLHAMMESEIDLLQVEKRIRNRVK
KQMEKSQREYYLNEQMKRAIQELGEMDDAPDENRALKKRIIDAAKMPKEAKKAEAELO
KLKMMSPMGAETVVRGVIYDNMVQVPMNARSKVKDLRQAQEILDTHYGLERVKDRIR
```

【図13-5】

```
721 GATCGTTTCG CATGATTGAA CAAGATGGAT TGCACGAGS TTCTCCGGCC
GCTTGGGTGG
781 AGAGGCGTATT CGGCTATGAC TGGGCACAC AGACAATCGG CTGCTCTGAT
CGCCCGCGCTG
841 TCCGCGCTGC AGCGCAGGGG CGCCCGGTC TTTTGTCAA GACCACGCTG
TCCGCGTCCC
901 TGAATGAAC TACGAGCAGG GCAGCGCGCG TATCGTGGCT GCCCACGAG
CGCGTCTCCTT
961 CGCCAGCTGT GCTCGACGTT GTCACTGAAG CGGGAAGGGA CTGGCTGCTA
TTGGCGGAAG
1021 TGCCGGGGCA GGATCTCCTG TCATCTCACC TTGCTCCTGC CGAGAAGTA
TCCATCATGG
1081 CTGATGCAAT CGCGCGGCTG CATACGCTTG ATCCCGCATC CTGCCCATTC
GACCACCAAG
1141 CGAAACATCG CATCGACGCA GCAGCTACT GAGTGAAGAG CGGCTTTGCT
GATCAGGATG
1201 ATCTGACGCA AGAGCATCAG GGGCTCGCGC CAGCCGAAC GTTCGCCAGG
CTCAAGGCGC
1261 GCATGCCGA CGCGCAGGAT CTCGTCTGTA CCATATGCCA TGCTCTGCTG
CCGAATATCA
1321 TGGTGGAAAA TGCGCGCTTT TCTGGATTCA TCGACTGTGG CCGGCTGGGT
GTGCGGAGCC
1381 GCTATCAGGA CATAGCGTTG GCTACCGCTG ATATTGCTGA AGAGCTTGGC
GGCGAATGG
1441 CTGACCGCTT CCTCTGCTTT TACGGTATCG CGCGTCCCGA TCGCAGCGC
ATCGCTCTCT
1501 ATCGCTCTCT TGACGAGTCT TTCTAATAAG GGGATCTTGA AGTTCCTATT
CCGAAGTTCC
1561 TATTTCTTAG AAGATATAGG AACTTCCAAG CAGCTCCAGC CTACATAAAG
CGGCCGCTTA
1621 TTTTGTACAC CAGACCAACT GGTAAATGTA CGCAGCGGCG CATCAGTGGa
ATTCCGCCGA
1681 TACTGACGGG CTCCAGGAGT GCTCGCACCA AATCCCAATA TGGAAACCGT
CGATATTACG
1741 CCATGTGCTT TCTTCCGCTT GCAGCAGATG GCGATGGCTG GTTTCATCA
GTGTCTGTG
1801 ACTGTAGCGG CTGATGTGA ACTGGAAGTC GCCCGGCCAC TGGTGTGGG
CATAATTCAA
1861 TCTCGCGCTC CCGCAGCGCA GACCGTTTTT GCTCGGGAAG ACGTACGGGG
TATACATGTC
1921 TGACAAATGC AGATCCACGC GGTCAAACA GCGCGCAGTA AGGCGGTCTG
GATAGTTTTT
1981 TTGGGGCCCT AATCCGAGCG AGTTTACCGC CTCTGCTACC TGCGCCAGCT
GGCAGTTCAG
2041 GCCAATCCGC GCGCGATGCG GTGATTCGCT CGCCACTTCA ACATCAACGG
TAATCGCCAT
2101 TTGACCACTA CCATCAATCC GGTAGGTTTT CGCGTCGATA AATAAGGTTT
TCCCTGATG
2161 CTGCCACGCG TGAGCGGTGC TAATCAGCAC CGCATCAGCA AGTGTATCTG
CCGTGCACTG
2221 CAACAACGCT GCTTCGCGCT GGTAAATGSC CGCGCGCTTC CAGCTTTCGA
CCCAGGCGTT
2281 AGGGTCAAAG CGGGTCGCTT CACTTACGCC AATGTCGITA TCCAGCGGTG
CACGGGTGAA
2341 CTGATCGCGC AGCGCGCTCA GCAGTTGTTT TTTATCGCCA ATCCACATCT
GTGAAAGAAA
2401 GCTTGACTGG CGGTTAAAT GCCAACGCTT ATTACCCAGC TCGATGCAAA
AATCCATTTC
2461 CTGSGTGGTC AGATGCGGGA TGCGGTGGA CCGCGCGGGG AGCGTACAC
TGAGGTTTTT
```

【図 1 3－6】

2521 CGCCAGACGC CACTGCTGCC AGCGCTGAT GTGCCCGGCT TCTGACCATG
CGGTGCGGTT
2581 CGGTGTCAC TACGCTACTG TGAGCCAGAG TTGCCCGGCG CTCTCCGGCT
CGGGTAGTTC
2641 AGGCAGITCA ATCAACTGTT TACCTTGTG AGCGACATCC AGAGGCACIT
CACCGCTTGC
2701 CAGCGGCTTA CCATCCAGCG CCACCATCCA GTGCAGGAGC TCGTTCATCG
TATGACGGAA
2761 CAGGTATTTC GTTGTCACIT CGATGGTTTG CCCGGATAAA CGGAACGGGA
AAACTGCTG
2821 CTGGTGTITT GTTCCGTCA GCGCTGGATG CGGCGTGCGG TCGGCAAGA
CCAGACCGTT
2881 CATAACAAG TGGCGATCGT TCGGCGTATG GCCAAAATCA CGCGCGTAAG
CCGACCACGG
2941 GTTCCGTTT TCATCATATT TAATCAGCGA CTGATCCACC CAGTCCCAGA
CGAAGCCGCG
3001 CTGTAAACGG GGATACTGAC GAAACCGCTG CCAATATTTA GCGAAACCGC
CAAGACTGTT
3061 ACCCATCGCG TGGCGTATT CGCAAAGGAT CAGCGGCGCG GTCTCTCCAG
GTAGCGAAG
3121 CCATTTTITG ATGGACATT TCGGCAACAG CGGGAAGGGC TGGTCTTCAT
CCACGCGCGC
3181 GTACATCGGG CAATAATAT CGGTGGCGCT GGTGTGCGCT CCGCCGCCIT
CATACTGCAC
3241 CGGGGGGGAA GGATCGACAG ATTIGATCCA CGGATACAGC GCGTCGTGAT
TAGCGCCGTT
3301 GCCTGATTCA TTCCCCAGCG ACCAGATGAT CACACTCGGG TGATTACGAT
CGCGCTGCAC
3361 CATTGCGGTT ACGCGTTTCG TCATCGCCGG TAGCCAGCGC GGATCATCGG
TCAGACGATT
3421 CATTGGCACC ATGCCGTGGG TTCAATATT GGGTTTCATCC ACCACATACA
GGCCGTAGCG
3481 GTCGCACAGC GTGTACCACA GCGGATGGTT CGGATAATGC GAACAGCGCA
CGGCGTTAAA
3541 GTTGTTCCTG TTCATCAGCA GGATATCTGT CACCATCGTC TGCTCATCCA
TGACCTGACC
3601 ATGCAGAGGA TGATGCTCGT GACGGTTAAC GCCTCGAATC AGCAACGGCT
TGCCGTTGAG
3661 CAGCAGCAGA CCAATTTCAA TCCGCACCTC GCGGAACCGC ACATCGCAGG
CTTCTGCTTC
3721 AATCAGCGTG CCGTCGCGGG TGTGCAGTTC AACCAACGCA CGATAGAGAT
TCGGGATTTC
3781 GCGGCTCCAC AGTTTCGGGT TTTGACGTT CAGACGTAGT GTGACGGGAT
CGGCATAACC
3841 ACCACGCTCA TCGATAATT CACCAGCGAA AGCGCGGGTG CCGCTGGCGA
CTTCGCTTTC
3901 ACCCTGGCAI AAGAAACTG TTACCGTAG GTAGTCACGC AACTCGCCGC
ACATCTGAAC
3961 TTCAGCTCC AGTACAGCGC GGTGAAATC ATCATTAAAG CGAGTGCCAA
CATGGAAATC
4021 GCTGATTGT GTAGTCGGTT TATGCAGCAA CGAGACGTCA CGGAAATGC
CGCTCATTCG
4081 CCACATATCC TGAATCTCCA GATAACTGCC GTCACCTCCAG CGCAGCACCA
TCACCGCGAG
4141 GCGGTTTTCT CGGCGCGSTA AAAATGCGCT CAGGTCAAAT TCAGACGGCA
AACGACTGTC
4201 CTGGCCGTAA CCGACCCAGC GCCCGTTGCA CCACAGATGA AACGCCGAGT
TAACGCCATC
4261 AAAAATAATT CGCGTCTGGC CTTCCTGTAG CCAGCTTTCA TCAACATTAA
ATGTGAGCGA

【図 1 3－7】

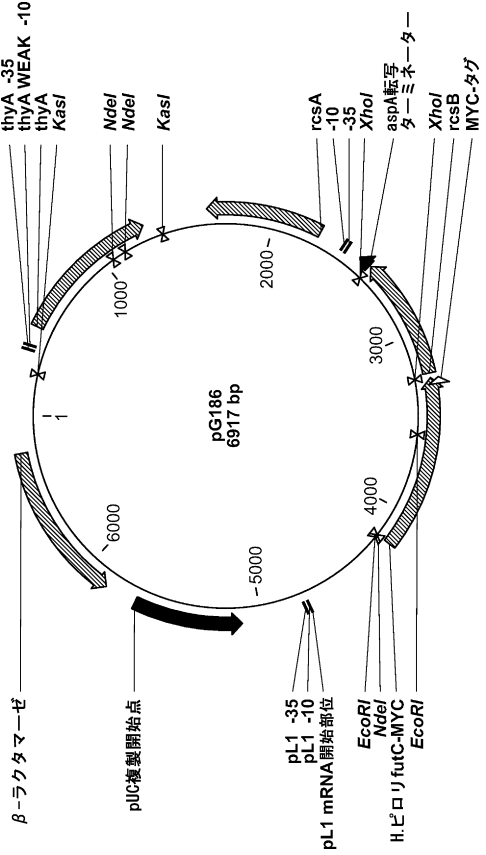
4321 GTAACAACCC GTCGATTCT CCGTGGGAAC AAACGGCGGA TTGACCGTAA
TGGGATAGGT
4381 CACGTTGGTG TAGATGGGCG CATCGTAACC GTGCACTTCG CAGTTTGAGG
GGACGACGAC
4441 AGTATCGGCC TCAGGAAGAT CGCACTCCAG CCAGCTTTCC GGCACCGCTT
CTGGTGCCGG
4501 AAACCAAGCA AAGCGCATT CGCCATTGAG GCTGCGCAAC TGTGGGAAG
GGCGATCGGT
4561 GCGGGCTCT TCGCTATTAC GCCAGCTGCG GAAAGGGGGA TGTGCTGAA
GGCGATTAG
4621 TTGGGTAACG CCAGGGTTTT CCCAGTCACG ACGTTGTAAA ACGACGGCCA
GTGAATCCGT
4681 AATCATGGTC ATagtaggtt tctCAGGTT GTGACTGCAA AATAGTGACC
TCGCGCAAAA
4741 TGCCTAATA AAAACAAGGC TGCGAGGCTA ATTGCGGCTT GCCAGCCTTT
TTTTGTCTCG
4801 CTAAGTTAGA TGCGGGATCG GCGTTGCCCT TATTAAGGGG TGTGTGAAG
GGATGCTGCG
4861 CCTGATATA CTGCTGCGCG TTCGTACCTT GAAGGATTCA AGTGCATAT
AAATTATATA
4921 GAGGAAGAGA AGAGTGAATA AATCTCAATT GATCGACAAG ATTGCTGCAG
GGGCTGATAT
4981 CTCTAAAGCT GCGGCTGGCC GTGCGTTAGA TGCTATTATT GCTTCCTGTA
CTGAATCTCT
5041 GAAAGAAGG (SEQ ID NO: 15)

【図 1 4】

E100 (G174)	ampC::(<i>P</i> _{tpB} ⁺ /cl ⁺)	lac ^q lac <i>P</i> _{L8}					Δ <i>lacA</i>
	ampC::(<i>P</i> _{tpB} ⁺ /cl ⁺)	<i>P</i> _{lac^q} (Δ <i>lacI-lacZ</i>) ₁₅₈ lacY ⁺					
	ampC::(<i>P</i> _{tpB} ⁺ /cl ⁺)	<i>P</i> _{lac^q} (Δ <i>lacI-lacZ</i>) ₁₅₈ lacY ⁺	Δ <i>wcaJ</i>				
	ampC::(<i>P</i> _{tpB} ⁺ /cl ⁺)	<i>P</i> _{lac^q} (Δ <i>lacI-lacZ</i>) ₁₅₈ lacY ⁺	Δ <i>wcaJ</i>	thyA ₇₄₈ ::Tn10		Δ <i>lon</i> ::(kan,lacZ ⁺)	
	ampC::(<i>P</i> _{tpB} ⁺ /cl ⁺)	<i>P</i> _{lac^q} (Δ <i>lacI-lacZ</i>) ₁₅₈ lacY ⁺	Δ <i>wcaJ</i>	thyA ₇₄₈ ::Tn10		Δ <i>lon</i> ::(kan,lacZ ⁺)	
	ampC::(<i>P</i> _{tpB} ⁺ /cl ⁺)	<i>P</i> _{lac^q} (Δ <i>lacI-lacZ</i>) ₁₅₈ lacY ⁺	Δ <i>wcaJ</i>	thyA ₇₄₈ ::Tn10		Δ <i>lon</i> ::(kan,lacZ ⁺)	

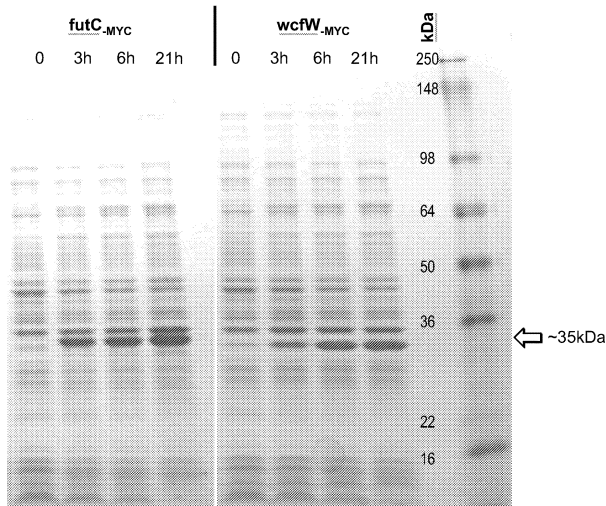
本発明の大腸菌株

【図 1 5】



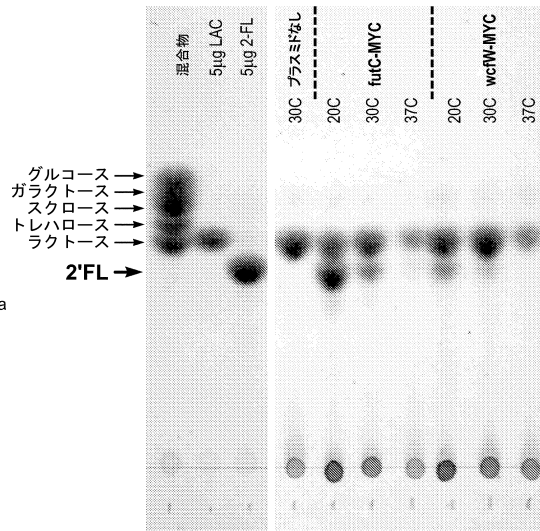
【図 16】

大腸菌株E390における *futC* および *wcfW* の
37°Cでの発現レベルの比較



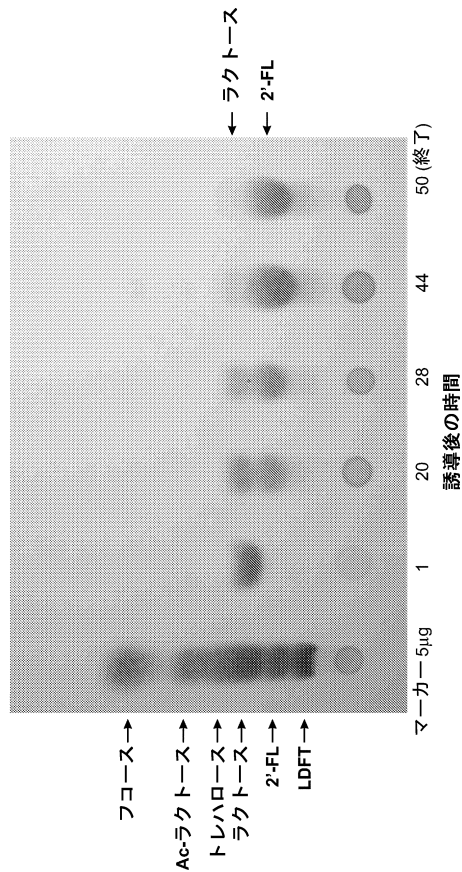
【図 17】

大腸菌株E390におけるpG171(*futC*-MYC)または
pG180(*wcfW*-MYC)によって指示される2'-FL産生
誘導を20°C、30°C、または37°Cで行い、
細胞質抽出物をTLCにおいて展開した



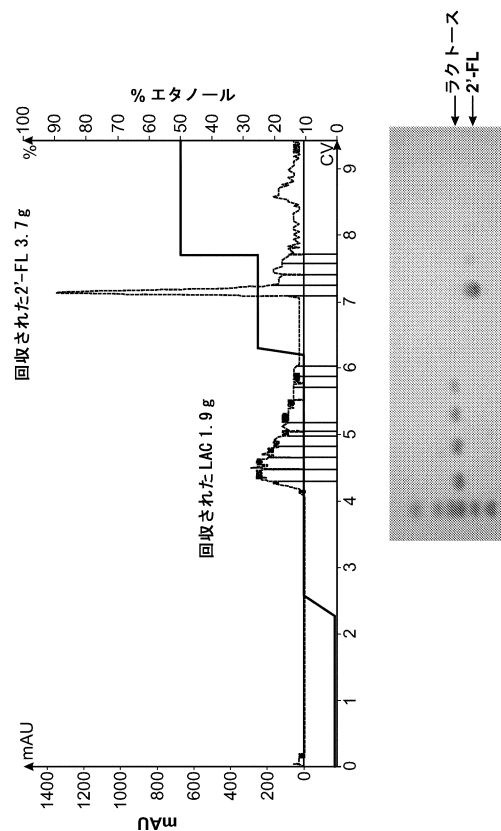
【図 18】

pG171によって形質転換した大腸菌宿主株E403の
バイオリアクター培養における2'-FL産生の速度論

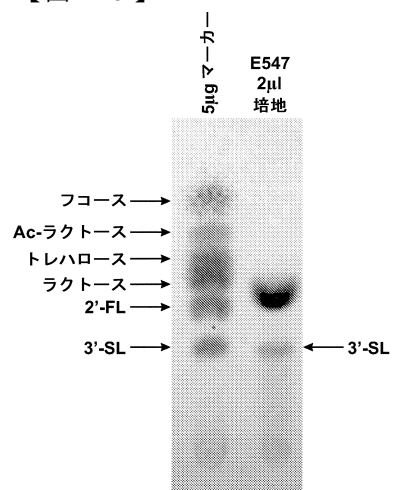


【図 19】

カーボンクロマトグラフィーによるラクトースからの2'-FLの精製



【図 20】



【配列表】

0006047505000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 メリヒ マッシモ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 サマービル ベントン ロード 38 アパートメント2
- (72)発明者 マッコイ ジョン エム.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 リーディング ハワード ストリート 56
- (72)発明者 ハイトマン マシュー イアン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブライトン サウス ストリート 15 アパートメント
2

審査官 福岡 信子

- (56)参考文献 国際公開第2012/097950 (WO, A1)
Biotechnol. Prog. 2004, vol.20, p.412-419
Bacteroides fragilis NCTC 9343 PS B capsular polysaccharide biosynthesis locus, complete sequence, GenBank Accession No.AF285774.2, [検索日:2015年11月27日], URL, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/18152896?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=5FGC9YUX015&from=18698&to=19567](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/18152896?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=5FGC9YUX015&from=18698&to=19567)
Infect. Immun., 2000, vol.68, p.6176-6181
Glycoconjugate J, 2001, vol.18, p.465-474
Mol. Microbiol., 1991, vol.5, p.1599-1606

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-90
Caplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)