

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年6月18日 (18.06.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/075111 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)

(74) 代理人: 廣田雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052
東京都港区赤坂二丁目8番5号若林ビル3階 Tokyo
(JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/003716

(22) 国際出願日: 2008年12月11日 (11.12.2008)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2007-320906
2007年12月12日 (12.12.2007) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人山口大学 (YAMAGUCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田1677-1 Yamaguchi (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山田守 (YAMADA, Mamoru) [JP/JP]; 〒7538515 山口県山口市吉田1677-1 国立大学法人山口大学農学部内 Yamaguchi (JP). 村田正之 (MURATA, Masayuki) [JP/JP]; 〒7538515 山口県山口市吉田1677-1 国立大学法人山口大学農学部内 Yamaguchi (JP).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: BACTERIOLYSIS-RESISTANT CELL AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称: 溶菌耐性細胞及びその作製方法

(57) Abstract: Disclosed is a prokaryotic cell having the resistance against bacteriolysis induced regardless of the presence or absence of an external direct stimulus such as the infection with a phage or the treatment with a chemical substance/an enzyme. Also disclosed is a method for producing the cell. Specifically disclosed is a cell in which an sRNA gene (a bacteriolytic gene) whose expression can be controlled by σ^E factor is disrupted to acquire a bacteriolysis-resistance trait. Also specifically disclosed is a method for producing a bacteriolysis-resistant cell, which comprises the steps of: inserting a gene encoding a protein into a nucleotide sequence for a bacteriolytic gene; and causing the protein to be expressed to separate a bacteriolysis-resistant cell from a non-bacteriolysis-resistant cell.

(57) 要約: 原核細胞においてファージの感染や薬剤/酵素処理など外部からの直接的な刺激によらずに起こる溶菌に対して抵抗性を有する細胞、及びその作製方法を提供することをその目的とする。本発明は、 σ^E 因子により発現調節を受ける sRNA 遺伝子 (溶菌原因遺伝子) が破壊され、溶菌耐性という形質を獲得した細胞、及び溶菌原因遺伝子の塩基配列中にタンパク質をコードした遺伝子を挿入する工程と、前記タンパク質を発現させることにより非溶菌耐性細胞から溶菌耐性細胞を選別する工程を含むことを特徴とする溶菌耐性細胞の作製方法を提供する。

WO 2009/075111 A1

明 細 書

溶菌耐性細胞及びその作製方法

技術分野

[0001] 本発明は、ゲノム上の低分子非翻訳型RNAが破壊されたことにより溶菌耐性を有する細胞及びその作製方法や、該溶菌耐性細胞の培養物を用いた有機物質の作製方法等に関する。

背景技術

[0002] 大腸菌や乳酸菌など種々の原核生物は、その物質生産能の多様性や培養の容易さなどから、組換えタンパク質の大量発現、代謝産物の蓄積、発酵などを通じ種々の有用物質生産に利用されてきた。これらの生物を用いた物質生産は、通常、適当な培地・培養液に菌株を接種した後、菌の増殖と共役的に行われるのが特徴である。菌の増殖は前期の対数増殖期（Log phase）と後期の定常期（Stationary Phase）に分けることができ、対数増殖期には活発な増殖と物質生産能を示し、一方で定常期には菌の増殖が停止し、代謝活性も低下することが知られている。また、定常期に特徴的に見られる現象として、増殖した菌の溶菌（Bacteriolysis）が起こることが知られている。溶菌自体はバクテリオファージなどが感染した細菌などで普遍的に観察される現象であるが、培養が定常期に到達した細菌の細胞集団においては、ファージの感染や薬剤／酵素処理といった外部からの直接的な刺激によらず、溶菌が起こることが明らかにされてきた（非特許文献1）。培養液中における溶菌は、細胞の内容物の放出を伴うものであり、特に細菌を用いた物質生産においては、放出された核酸やタンパク質など目的物以外の好ましくない物質が培養液中に大量に混入する原因となり、目的物の精製のために多大なコストが生じるなど大きな問題になっていた。

[0003] 細菌などの溶菌の問題を解決するための手段としては、これまで、主にバクテリオファージを用いた研究により、ファージ耐性菌とその作出方法（特許文献1）、ファージ溶菌耐性を持つ納豆菌の自然変異株（特許文献2）な

どが知られているが、これはファージ感染後の溶菌に対する抵抗性であって、他の要因による溶菌には適用できないという問題があった。また溶菌に係る遺伝子として、ある種のプラスミドにコードされた kil 遺伝子とその作用機序が解析され（非特許文献2）、これに対する抵抗性を有した系（特許文献3）などが開示されているが、プラスミドを持たない系には適用できないという問題点があった。更に溶菌に係る遺伝子としてエンドリシン、トランスグリコシラーゼ、リゾチーム等の遺伝子が大腸菌ゲノム中に導入し、効果的に溶菌を誘導する系も開示されているが（特許文献4）、これらは積極的に溶菌を起こす遺伝子を導入するものであって、その抑制が溶菌の抑制につながるというものではなかった。ファージ感染やプラスミドなどが関与しない定常期における溶菌が、原核生物の内在的な因子（遺伝子）の働きにより引き起こされると考えられることから、これらの溶菌に広く適用可能な手段を提供するものとして、溶菌及び溶菌の抑制に関与する遺伝子の解明が望まれていた。

[0004] これまでに、発明者らは、大腸菌を材料に用いて培養の定常期における種々の遺伝子発現を詳細に解析し、その中で転写調節因子 σ^E （Sigma E factor, σ^{24} とも呼ばれる）が定常期における溶菌に深く関わっていることを明らかにした（非特許文献3）。しかし、 σ^E 因子は原核生物に広く知られた転写調節因子であり、この σ^E 因子の遺伝子そのものを破壊することは、 σ^E 因子が種々の遺伝子の発現を調節するいわば「上流側」の調節因子であり、その破壊は溶菌だけでなく他の様々な生理活性、すなわちストレス応答やリポタンパク質の発現調節（非特許文献7、8）などにも大きな影響を与えるおそれがあるため、より下流側で溶菌の制御に直接またはそれに近い関連性をもつ遺伝子を破壊することが重要であると考えられた。

[0005] 特許文献1：特開昭64-080280号公報

特許文献2：特開平10-215861号公報

特許文献3：特開昭63-202375号公報

特許文献4：米国特許出願公開第2006/0040393号明細書

非特許文献1: Kabir S. and Yamada M. Survival and Death in Bacteria: 5
5-67 (2005)

非特許文献2: Miksch G. et al. Arch. Microbiol. 167: 143-150 (1999)

非特許文献3: Nitta T. et al. J. Bacteriol. 182: 5231-5237 (2000)

非特許文献4: Shimoni Y. et al. Moleculara Systems Biology 3 :art. no.
138 (2007)

非特許文献5: Eddy SR. Nature Reviews Genetics 2: 919-929 (2001)

非特許文献6: Vogel J. and Papenfort K. Current Opinion in Microbiolog
y 9: 605-611 (2006)

非特許文献7: Alba BM. and Gross CA. Molecular Microbiology 52: 613-61
9 (2004)

非特許文献8: Onufryk C. et al. J. Bacteriology 187: 4552-4561 (2005)

非特許文献9: Udekwu KI. and Wagner EGH. Nucleic Acids Research 35: 12
79-1288 (2007)

非特許文献10: Sambrook J. et al. Molecular cloning: a laboratory manu
al (1989)

非特許文献11: Beckwith J. J. Bacteriology 177: 4121-4130 (1995)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] 上記の現状に鑑み、本発明は、原核細胞においてファージの感染や薬剤／
酵素処理など外部からの直接的な刺激によらずに起こる、定常期の溶菌に対
して抵抗性を有する細胞及びその作製方法を提供するとともに、該細胞を用
いた効率的な有機物の作製方法を提供することをその目的とする。

課題を解決するための手段

- [0007] 上記課題の解決のため、本発明者らは、 σ^E 因子のターゲットとなっている
種々の遺伝子を検討し、この中でomp (Outer membrane protein) と呼ば
れる膜タンパク質をコードした遺伝子の転写後調節に関わる、短い分子のR
NA (sRNA) をコードする遺伝子 (溶菌原因遺伝子) を破壊することで

、大腸菌細胞が溶菌耐性という新たな形質を獲得するという事実を見いだした。通常、タンパク質をコードする遺伝子の長さは300bp程度から数kb程度であるが、近年の遺伝子発現解析の結果、タンパク質をコードしない(non-coding)、100bp以下のsRNAが細胞内に多数存在することが明らかとなり、更にこれらの機能解析の結果、一部のsRNAについては転写後調節因子(Post-transcriptional regulation factor)としての機能を有することが明らかにされつつある(非特許文献4, 5)。本発明者らは、大腸菌の熱ショックをはじめとする環境ストレス応答において機能する、転写調節因子の一種 σ^E 因子(rpoE遺伝子)に着目し、溶菌時における σ^E 因子の機能解析、更には σ^E 因子の調節を受ける「下流」の遺伝子の解析を進め、 σ^E 因子の制御を受けるsRNAをコードする遺伝子(溶菌原因遺伝子)に変異を生じさせ破壊することによって、 σ^E 依存性の溶菌に対して耐性を有する細胞を作製できることを見出し、本発明を完成させた。

[0008] すなわち本発明は、[1] (A) 全長が100塩基以下であること；(B) σ^E 因子(Sigma E Factor)により発現が誘導されること；(C) omp(Outer membrane protein) 遺伝子のmRNAと相補的に結合する塩基配列を含み、且つomp遺伝子の転写後調節に関与すること；の(A)～(C)の特徴を備える低分子非翻訳型RNAの発現又は機能を喪失させることにより、低分子非翻訳型RNAを介した σ^E 因子依存性のomp遺伝子転写後調節が阻害されていることを特徴とする原核生物の溶菌耐性細胞や、[2] 低分子非翻訳型RNAが、micA、rseX、rybB、micC、micF、omrA、omrB及びipaXより選択される1以上の低分子非翻訳型RNAであることを特徴とする上記[1]記載の溶菌耐性細胞や、[3] 低分子非翻訳型RNAが、micA又はrybBであることを特徴とする上記[1]又は[2]記載の溶菌耐性細胞や、[4] 原核生物が、大腸菌(Escherichia coli)であることを特徴とする上記[1]～[3]のいずれかに記載の溶菌耐性細胞に関する。

[0009] さらに本発明は、[5] 上記[1]～[4]のいずれかに記載の溶菌耐性

細胞を作製する方法であって、（Ａ）全長が１００塩基以下であること；（Ｂ） σ^E 因子（Sigma E Factor）により発現が誘導されること；（Ｃ）omp（Outer membrane protein）遺伝子のmRNAと相補的に結合する塩基配列を含み、且つomp遺伝子の転写後調節に関与すること；の（Ａ）～（Ｃ）の特徴を備える低分子非翻訳型RNAをコードするゲノム領域に、マーカートンパク質をコードする遺伝子を挿入する工程と、該マーカートンパク質を発現させることにより溶菌耐性細胞を選別する工程とを含むことを特徴とする溶菌耐性細胞の作製方法や、〔６〕マーカートンパク質をコードする遺伝子を挿入する工程が、相同組換えにより挿入する工程であることを特徴とする上記〔５〕記載の溶菌耐性細胞の作製方法や、〔７〕上記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の溶菌耐性細胞を培地で培養し、培養物から所望の有機化合物を採取することを特徴とする有機化合物の製造方法に関する。

発明の効果

[0010] 本発明を利用することにより、大腸菌等の発酵産業に利用されている原核生物において、定常期における溶菌に対する耐性が付与された細胞を提供することが可能となる。下記実施例でも述べる通り、本発明の溶菌原因遺伝子を変異させることは細胞そのものの生存や生育には負の影響を与えず、これまでと同様の生産効率を有しかつ溶菌による細胞内容物の混入が抑えられた培養－物質生産系を構築することが可能となる。

発明を実施するための最良の形態

[0011] 本発明の原核生物の溶菌耐性細胞としては、（Ａ）全長が１００塩基以下であること；（Ｂ） σ^E 因子（Sigma E Factor）により発現が誘導されること；（Ｃ）omp（Outer membrane protein）遺伝子のmRNAと相補的に結合する塩基配列を含み、且つomp遺伝子の転写後調節に関与すること；の（Ａ）～（Ｃ）の特徴を備える低分子非翻訳型RNA（以下、「溶菌原因遺伝子」ということがある）の発現又は機能を喪失させることにより、溶菌原因遺伝子を介した σ^E 因子依存性のomp遺伝子転写後調節が阻害されている低分子非翻訳型（sRNA）を介した σ^E 因子依存性のomp遺伝子転写後調

節が阻害されている細胞であれば特に制限されるものではないが、上記溶菌原因遺伝子としては、例えば、*micA*、*rseX*、*rybB*、*micC*、*micF*、*omrA*、*omrB*、*ipaX*等を具体的に挙げることができるが、なかでも、配列番号1に示される塩基配列よりなる*micA*や、配列番号2に示される塩基配列よりなる*rybB*を特に好適に挙げることができる。また、溶菌原因遺伝子として、配列番号1、配列番号2等で表される*micA*、*rseX*、*rybB*、*micC*、*micF*、*omrA*、*omrB*、*ipaX*の塩基配列と80%以上、好ましくは90%以上の相同性を有する塩基配列からなり、上記(A)～(C)の特徴を備える遺伝子を挙げることができる。

[0012] 本発明の溶菌耐性細胞は、ファージの感染や酵素または薬剤など外部からの直接的な刺激によらないで起こる、定常期の溶菌に対して耐性を有しており、特に、 σ^E 因子依存的に起こる溶菌に対して優れた耐性を示す。本発明の溶菌耐性細胞の細胞の種類としては、原核生物の細胞であれば特に制限されないが、グラム陰性の細菌であることが好ましく、具体的には、大腸菌、サルモネラ等の腸内細菌 (Enterobacteriaceae)、シュードモナス、モラクセラ、ヘリコバクター、ステノトロフォモナス、ビブリオ、酢酸菌、レジオネラなどのプロテオバクテリアのグループ、シアノバクテリア、ナイセリア、ヘモフィルス、クレブシエラ、ブルセラ、ボルデテラ、スピロヘータ等を例として挙げることができるが、なかでも、種々の物質生産に利用されていることから大腸菌であることが特に好ましい。

[0013] 本発明の溶菌耐性細胞の作製方法としては、上記溶菌原因遺伝子の発現又は機能を喪失させることを含む方法であれば特に制限されず、例えば、相同性組換えや、RNA干渉やアンチセンス鎖をコードしたプラスミドの導入、ゲノム上の当該配列の破壊など、分子生物学分野で通常用いられるものの中から適宜選択することができるが、なかでも、溶菌原因遺伝子をコードするゲノム領域に、マーカートンパク質をコードする遺伝子を相同組換え等により挿入する工程と、該マーカートンパク質を発現させることにより非溶菌耐

性細胞から溶菌耐性細胞を選別する工程とを含むことを特徴とする溶菌耐性細胞の作製方法であることが好ましく、上記マーカートンパク質としては特に制限されるものではなく、分子遺伝学分野において通常用いられる、既知の発光タンパク質、発色タンパク質、栄養要求性タンパク質、抗生物質耐性タンパク質等の中から適宜選択することができる。

[0014] 本発明の有機化合物の製造方法としては、本発明の溶菌耐性細胞を培地で培養し、培養細胞や培養液等の培養物から所望の有機化合物を採取する方法であれば特に制限されるものではなく、上記溶菌耐性細胞に目的とする遺伝子を導入し、目的とする遺伝子を発現させることにより得られる、組換えペプチド・タンパク質や、抗生物質等の所望の有機化合物を効率的に製造することができる。これらのなかでも、実施例にも示すように、溶菌耐性細胞として*m i c A*又は*r y b B*破壊株を用いた製造方法は、定常期における溶菌が抑制され、より効率的な有機化合物の製造が可能である。

[0015] 以下に本発明の実施例を述べるが、本発明は実施例にのみ限定されるものではない。

実施例 1

[0016] (材料と培養法)

実験には、大腸菌 (*Escherichia coli*) W3 1 1 0 株を用いた。菌株の培養には、LB液体培地 (1%バクトトリプトン、0.5%酵母抽出物、0.5%NaCl) を用い、温度37℃、振とう100 times/min、好氣的環境の条件下にて培養した。細胞の増殖実験においては、予め培養しておいた菌入り培養液を新しいLB培養液に0.1%の分量となるよう接種し、増殖 (Cell growth) は培養液の懸濁度 (OD600) の一定時間ごとの値により測定した。本実施例において用いた抗生物質の最終濃度は、アンピシリン (100 μg/ml) 及びカナマイシン (40 μg/ml) である。

[0017] (*m i c A*又は*r y b B*破壊株の作製)

W3 1 1 0 株にσ^E因子を強発現させる目的で、プラスミドpBAD24 (非特許文献11) にプロモーター領域を含むσ^E遺伝子を導入したpBADP

ROEプラスミドを作製し、これをW3110株に導入した。形質転換細胞はpBAD24プラスミドに予めコードされているアンピシリン耐性によりスクリーニングした。pBADPROEプラスミドは、アラビノースの存在下で導入した遺伝子（ここでは σ^E 遺伝子）を誘導発現するベクターであり、ここで構築した系は定常期に達した細胞にアラビノースを添加することによって σ^E 因子を大量に発現させ、溶菌を誘導する系である。大腸菌ゲノム上のmicA遺伝子の破壊は、非特許文献10に記載の相同組換え法によって行った。具体的には、カナマイシン耐性遺伝子(km)の5'上流にmicA遺伝子の5'側の配列を、3'下流にmicA遺伝子の3'側の配列を結合した相同組換え用DNA断片を調製し、これを細胞に導入してゲノム上のmicA遺伝子との間に相同組換えを起こさせ、micA遺伝子を破壊した(micA::kmで表す)。遺伝子破壊細胞はカナマイシン耐性によりスクリーニングした。rybB遺伝子の破壊(rybB::kmで表す)もmicA遺伝子と同じ方法で行った。

[0018] (溶菌の誘導)

表1に示す6種類の菌株を、約30mlのLB培養液にそれぞれ接種し、6時間ごとに培養液のOD600を計測して増殖曲線用のデータとした。A. はW3110株をプラスミドpBAD24で形質転換したものであり、プラスミド自体の効果を確認するための対照として用いた。B. はW3110株をプラスミドpBADPROEにより形質転換したものであり、アラビノース添加により σ^E 因子を大量発現し溶菌を起こす系である。C. 及びD. はそれぞれmicA遺伝子破壊株(micA::km)をpBAD24(C.)、pBADPROE(D.)により形質転換したものである。E. 及びF. はそれぞれ、rybB遺伝子破壊株(rybB::km)をpBAD24(E.)、pBADPROE(F.)により形質転換したものである。各サンプルについて、培養開始後12時間後にアラビノースを添加して60時間まで培養を行い、6時間ごとのOD600を基に増殖曲線を作成した。

[表1]

溶菌誘導実験に用いたサンプル

サンプル (株) *	プラスミド	ゲノム	説明
A.	pBAD24	WT**	コントロール
B.	pBADRPOE	WT	アラビノース添加により σ^E 因子を大量発現
C.	pBAD24	micA::km	micA 遺伝子をカナマイシン(km) 耐性遺伝子の挿入により破壊
D.	pBADRPOE	micA::km	
E.	pBAD24	rybB::km	rybB 遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子の挿入により破壊
F.	pBADRPOE	rybB::km	

* 用いた株は全てW 3 1 1 0 株由来

** Wild Type (野生型)

[0019] 各株の誘導実験の結果を、図1に示す。グラフ縦軸は培養液中の菌体密度の指標としてのOD600値を、横軸は培養開始からの時間経過(h)をそれぞれ示す。またグラフ中のシンボル—●—はA. を、—○—はB. を、—▲—はC. を、—△—はD. を、—■—はE. を、—□—はF. をそれぞれ表している。また矢印araで示した時点(12時間)でアラビノースを添加した。A. で示す野生型の増殖曲線では、培養開始から18時間で定常期に達し、36時間まで定常期が続いた後ゆるやかに菌体密度が低下しており、これは自然状態で起こる溶菌の結果と考えられた。一方B. で示す σ^E 大量発現株では、OD600値が極大に達した18時間後から急激に菌体密度が低下し、培養開始後60時間ではA. の野生型のOD600値が4.1であったのに対してB. では1.9にまで低下していた。これは大量発現した σ^E 因子が溶菌を誘導した結果と考えられた。

[0020] σ^E 因子を大量発現させたmicA破壊株(D.)では、溶菌の程度がB. に比べて遙かにゆるやかであり、60時間後におけるOD600値が4.0とA. に近い値であり、micA遺伝子の破壊によって σ^E 因子の大量発現による溶菌が抑えられていることが示された。同様に σ^E 因子を大量発現させたrybB破壊株(F.)についても、micA破壊株に比べて低いものの溶菌の抑制が観察され、60時間後のOD600値は3.7とB. に比べれば

遙かに高かった。m i c A破壊株、r y b B破壊株はともに、 σ^E 因子による溶菌に対して耐性を持つ株であることが示された。

更に、 σ^E 因子を大量発現していないm i c A破壊株（C.）については、60時間後のOD600値が5.0と野生型に比べても高い値を示し、このことから自然状態における溶菌に対しても抵抗性を持つことが示唆された。r y b B破壊株（D.）についても野生株と同様のOD600値を示した。

A. からF. のいずれの株においても、極大に達するまでの増殖曲線には明瞭な差が見られず、m i c A、r y b Bいずれの遺伝子破壊株も細胞の増殖そのものには大きな影響が無いことが示された。

[0021] （溶菌に伴い培養液中に溶出するタンパク質の分析）

培養開始後12時間、36時間、60時間の各時点について、A, B（野生型）、C, D（m i c A破壊株）のそれぞれから0.3mlの培養液を採取し、14000rpmで2分間遠心して菌体などを完全に沈澱させ、上清を得た。この上清にトリクロロ酢酸（終濃度5%）を加えてタンパク質を沈澱させ、遠心して上清を除き、20mM Tris-HCl（pH7.0）にタンパク質を再懸濁して、12%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにより、溶菌により培養液中に溶出したタンパク質の分析を行った。

SDS-PAGEの結果を図2-図4に示す。各図レーンMは分子量マーカーを示し、左端の数字が各マーカーの分子量（kDa）を示している。図2は野生型の結果であり、pBAD24形質転換株（A）とpBADRPOE形質転換株（B）のそれぞれの培養において培養液中に溶出するタンパク質を示している。対照のA. では、12, 36, 60時間後のいずれにおいても明瞭なタンパク質のバンドが見られなかったが、 σ^E 因子を大量発現したB. では36時間、60時間後に多くのタンパク質のバンドが確認され、 σ^E 因子により溶菌が誘導され大量のタンパク質が培養液中に溶出していることが示された。

[0022] 一方、m i c A遺伝子破壊株（図3）においては、pBAD24形質転換

株（C）、pBADRPOE形質転換株（D）のいずれにおいても大量のタンパク質のバンドは観察されず、特にD. の σ^E 因子大量発現系においてB. の様なタンパク質の溶出が観察されないことから、 σ^E 因子が大量に発現している様な条件下でも溶菌が起こっていないことが示された。更に、rybB遺伝子破壊株（図4）においても、micA遺伝子破壊株と同様、培養液中に放出されるタンパク質が観察されず、rybB遺伝子破壊によっても溶菌が抑制されることが示された。これらの結果から、micAをはじめとする溶菌原因遺伝子を破壊することにより、本発明の提供する溶菌耐性細胞を作製可能である事が明らかとなった。

実施例 2

[0023] （ σ^E 因子を大量発現しない系における検討）

溶菌原因遺伝子の破壊が定常期における溶菌に与える影響を、プラスミドを持たない野生型とmicA破壊株、rybB破壊株のそれぞれについて検討した。野生型としてはW3110株を用い、ゲノム上のmicA遺伝子を相同組換えにより破壊しカナマイシン耐性遺伝子を挿入したmicA破壊株（micA::km）とrybB破壊株（rybB::km）を実施例1と同様にして作製し、LB培地にて培養を行い、12時間ごとの培養液のOD600値を計測して増殖曲線を作成した。培養条件などは実施例1に準じた。

図5に、本実施例における各株の増殖曲線を示す。グラフ縦軸はOD600値を、横軸は培養開始からの時間経過を示し、シンボル—●—は野生型を、—△—はmicA破壊株を、—□—はrybB破壊株をそれぞれ表している。野生型では培養開始から24時間で定常期に達しその後ゆるやかにOD600値が減少したが、micA破壊株、rybB破壊株とも24時間以降のOD600値の減少が見られなかった。すなわち、 σ^E 因子を大量発現しない系においても、micA破壊株、rybB破壊株はともに定常期における溶菌に対して耐性を有していることが示された。

[0024] （タンパク質の溶出の検討）

実施例 1 のタンパク質の溶出の検討では、野生型でのタンパク質の溶出が観察されなかったため、100ml スケールの培養系から採取する培養液の量を実施例 1 の 10 倍の 3ml として、培養開始後 12 時間、36 時間、60 時間において培養液中に溶出するタンパク質を SDS-PAGE にて検出した。タンパク質試料の調製方法は実施例 1 に記載の方法に準じた。

図 6 に、SDS-PAGE の結果を示す。図中レーン M は分子量マーカを表しており、左端の数字は各マーカの分子量 (kDa) を表している。野生型である W3110 レーンでは、60 時間後の試料でタンパク質のバンドが多数観察された。採取する培養液の分量を増やすことで 60 時間後における溶菌をタンパク質レベルで検出できた。一方、micA 破壊株である W3110 (micA::kan) レーン及び rybB 破壊株である W3110 (rybB::kan) レーンでは、micA 破壊株の 60 時間後でわずかにタンパク質のバンドが観察されるもののその分量は野生型に比べ遙かに少なく、定常期に自然条件下で起こる溶菌に対してもこれらの遺伝子破壊株が耐性を持っていることが明らかとなった。

これらの結果から、本発明の提供する溶菌耐性株が、通常の培養条件下において定常期に起こる溶菌に対しても耐性を有していることが確認された。

実施例 3

[0025] (溶菌耐性細胞を用いた物質生産)

本発明の提供する溶菌耐性細胞を用い、物質生産 (組換えタンパク質) への利用可能性を検討した。菌株としては実施例 2 と同様、野生株 W3110 株、W3110 株の micA 破壊株 (micA::kan)、W3110 株の rybB 破壊株 (rybB::kan) の 3 株と、これらの株に pUC118 プラスミドを導入した株である W3110 (pUC118)、W3110 (micA::kan, pUC118)、W3110 (rybB::kan, pUC118) の 3 株の合計 6 株で比較を行った。比較対象は pUC118 プラスミド中にコードされた β -ラクタマーゼで、培養液中に放出される β -ラクタマーゼタンパク質と他のタンパク質の相対的な比較により、本

発明の提供する溶菌耐性細胞が定常期における溶菌とそれに伴う細胞内タンパク質の放出を抑えつつ目的とするタンパク質を生産可能かどうか検証した。

[0026] 菌株の培養方法については、実施例 1 と同様の方法で行った。定常期に入った各株の培養液を遠心し、菌体を除いた上清を得、この中に含まれるタンパク質を T C A (トリクロロ酢酸) で濃縮してサンプルとした。サンプルを S D S - P A G E により泳動し、この中に含まれるタンパク質の種類や量などから溶菌の有無や β -ラクタマーゼの有無について検討した。なお β -ラクタマーゼの分子量は 27 k D a である。

[0027] 電気泳動の結果を、図 7 に示す。図中レーン M は分子量マーカーで、左端の数字は分子量 (k D a) を示す。レーン 1 - 3 はプラスミドを導入しない対照で、レーン 1 が野生株 W 3 1 1 0 株、レーン 2 が W 3 1 1 0 株の *m i c A* 破壊株 (*m i c A* : : *k a n*)、レーン 3 が W 3 1 1 0 株の *r y b B* 破壊株 (*r y b B* : : *k a n*) の各培養液に含まれるタンパク質 (溶出タンパク質) を示している。またレーン 4 - 6 はプラスミド p U C 1 1 8 を導入したもので、レーン 4 が W 3 1 1 0 (p U C 1 1 8) 株、レーン 5 が W 3 1 1 0 (*m i c A* : : *k a n*, p U C 1 1 8) 株、レーン 6 が W 3 1 1 0 (*r y b B* : : *k a n*, p U C 1 1 8) 株の各培養液に含まれるタンパク質 (溶出タンパク質) をそれぞれ示している。

[0028] レーン 1 - 3 では、野生株で定常期における溶菌が起こり多量のタンパク質が溶出しているのに対し、溶菌原因遺伝子 (*m i c A*、*r y b B*) 破壊株では溶出したタンパク質が見られず、実施例 1、2 の結果と一致した。プラスミド p U C 1 1 8 を導入した株では、野生株で β -ラクタマーゼ (図中四角枠で示す) のバンドが観察され (レーン 4)、 β -ラクタマーゼが生産されている一方、他のタンパク質のバンドも多量に観察され、溶菌も対照と同様に起こっていることが示されたが、溶菌原因遺伝子破壊株では β -ラクタマーゼのバンドが野生株と同様に観察される一方、溶菌に伴うタンパク質は野生株に比べて遙かに少なく、目的とする物質が効果的に産生されているこ

とが示された。

なお本実施例で用いた β -ラクタマーゼはその多くがペリプラズムへ移行する分泌性タンパク質であるが、細胞外へ分泌される有用物質生産の際にはさらに培養液中への放出を促す等の改変を施すのが望ましい。

産業上の利用可能性

[0029] 本発明は、大腸菌をはじめとする原核生物を用いた物質の生産において、培養定常期における溶菌を起こさない細胞及びその作製方法を提供するものである。定常期における溶菌は目的とする生産物の精製コストの増大に結びついており、本発明を用いることで有用物質を低コストで生産することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0030] [図1]本発明の溶菌耐性細胞（*m i c A* 遺伝子破壊株、*r y b B* 遺伝子破壊株）の増殖曲線を、野生型と比較して示す。

[図2] σ^E 因子を大量発現する野生株の培養において、培養液中に溶出するタンパク質のSDS-PAGEの結果を示す。

[図3] σ^E 因子を大量発現する*m i c A* 遺伝子破壊株の培養において、培養液中に溶出するタンパク質のSDS-PAGEの結果を示す。

[図4] σ^E 因子を大量発現する*r y b B* 遺伝子破壊株の培養において、培養液中に溶出するタンパク質のSDS-PAGEの結果を示す。

[図5] σ^E 因子を大量発現しない系における野生型と*m i c A* 遺伝子破壊株、*r y b B* 遺伝子破壊株の増殖曲線を示す。

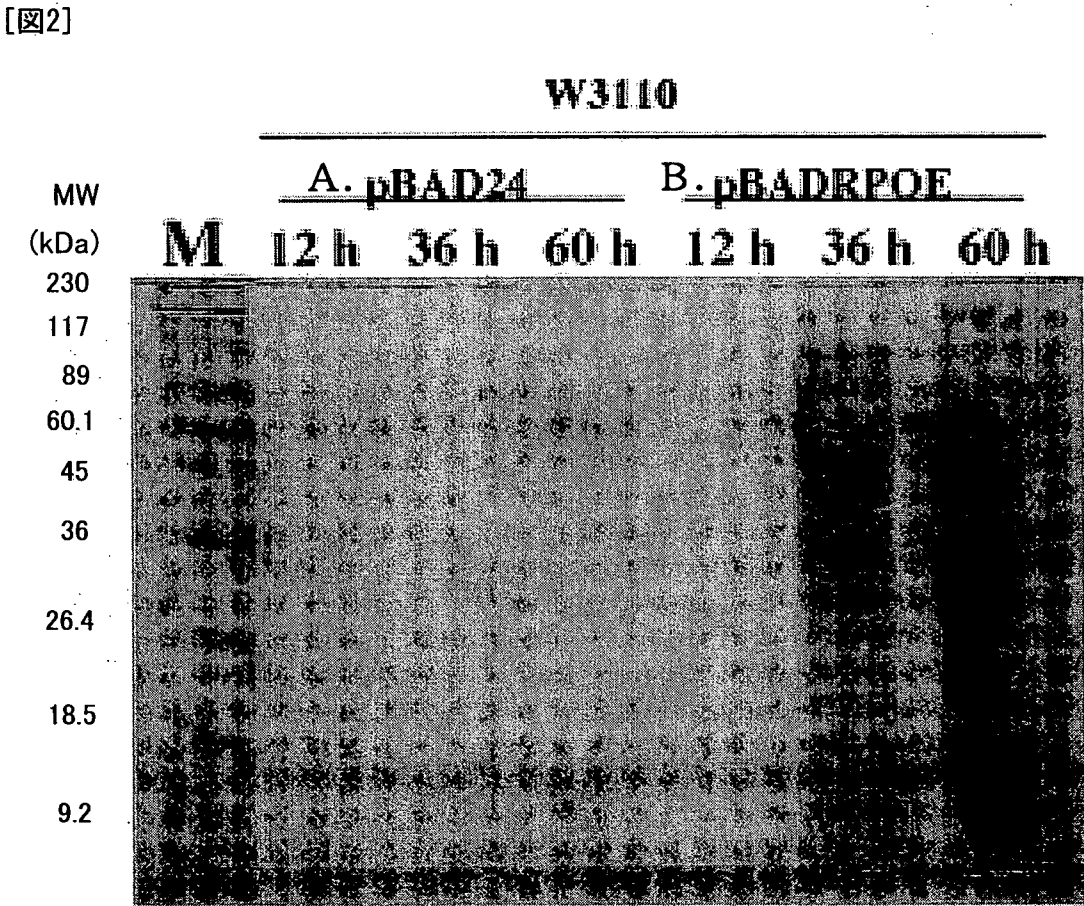
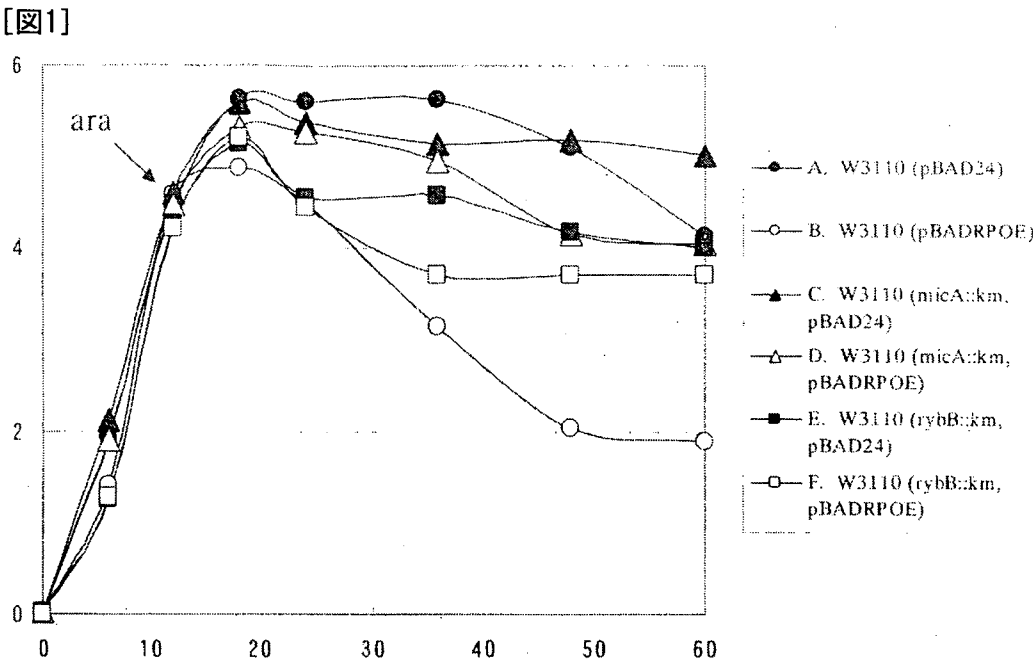
[図6] σ^E 因子を大量発現しない系における野生型、*m i c A* 遺伝子破壊株、*r y b B* 遺伝子破壊株の培養において、培養液中に溶出するタンパク質のSDS-PAGEの結果を示す。

[図7]本発明の溶菌耐性細胞と野生株における、遺伝子導入による物質生産能の比較例を示す。

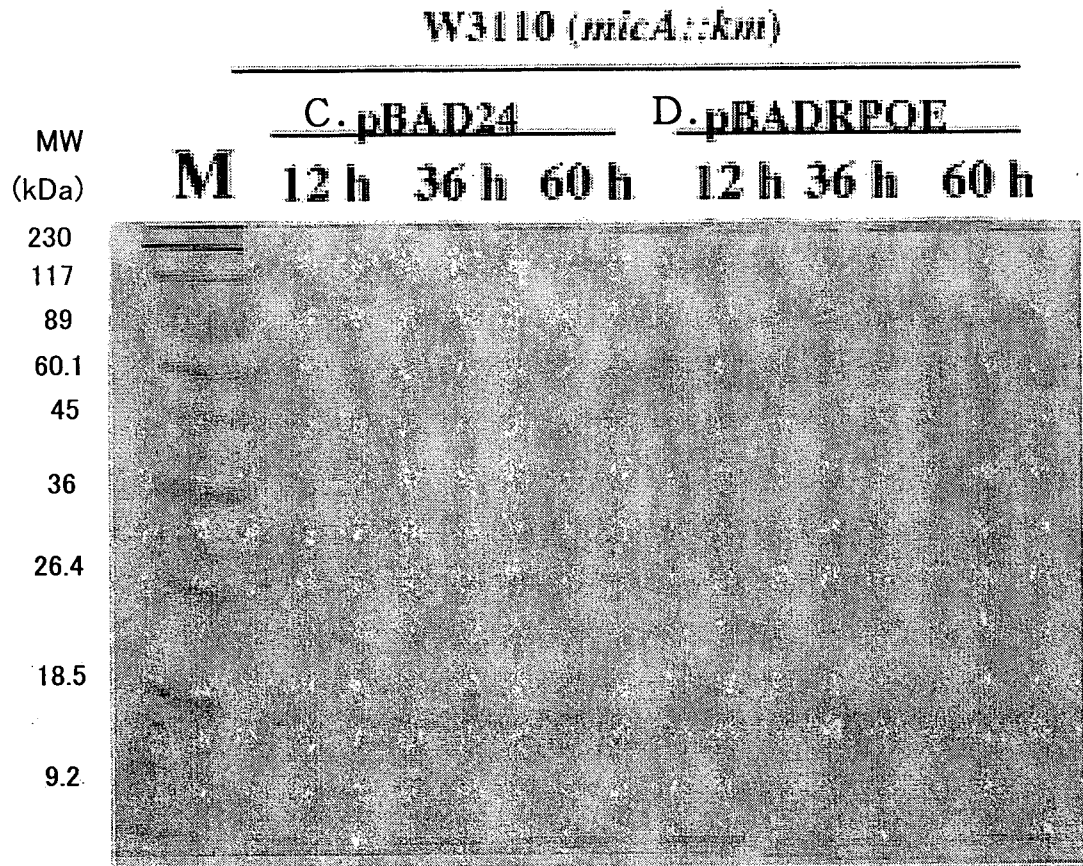
請求の範囲

- [1] 以下の（Ａ）～（Ｃ）の特徴を備える低分子非翻訳型RNAの発現又は機能を喪失させることにより、低分子非翻訳型RNAを介した σ^E 因子依存性のomp遺伝子転写後調節が阻害されていることを特徴とする原核生物の溶菌耐性細胞。
- （Ａ）全長が100塩基以下であること；
- （Ｂ） σ^E 因子（Sigma E Factor）により発現が誘導されること；
- （Ｃ）omp（Outer membrane protein）遺伝子のmRNAと相補的に結合する塩基配列を含み、且つomp遺伝子の転写後調節に関与すること；
- [2] 低分子非翻訳型RNAが、micA、rseX、rybB、micC、micF、omrA、omrB及びipaXより選択される1以上の低分子非翻訳型RNAであることを特徴とする請求項1記載の溶菌耐性細胞。
- [3] 低分子非翻訳型RNAが、micA又はrybBであることを特徴とする請求項1又は2記載の溶菌耐性細胞。
- [4] 原核生物が、大腸菌（Escherichia coli）であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の溶菌耐性細胞。
- [5] 請求項1～4のいずれかに記載の溶菌耐性細胞を作製する方法であって、以下の（Ａ）～（Ｃ）の特徴を備える低分子非翻訳型RNAをコードするゲノム領域に、マーカートンパク質をコードする遺伝子を挿入する工程と、該マーカートンパク質を発現させることにより溶菌耐性細胞を選別する工程とを含むことを特徴とする溶菌耐性細胞の作製方法。
- （Ａ）全長が100塩基以下であること；
- （Ｂ） σ^E 因子（Sigma E Factor）により発現が誘導されること；
- （Ｃ）omp（Outer membrane protein）遺伝子のmRNAと相補的に結合する塩基配列を含み、且つomp遺伝子の転写後調節に関与すること；
- [6] マーカートンパク質をコードする遺伝子を挿入する工程が、相同組換えにより挿入する工程であることを特徴とする請求項5記載の溶菌耐性細胞の作製方法。

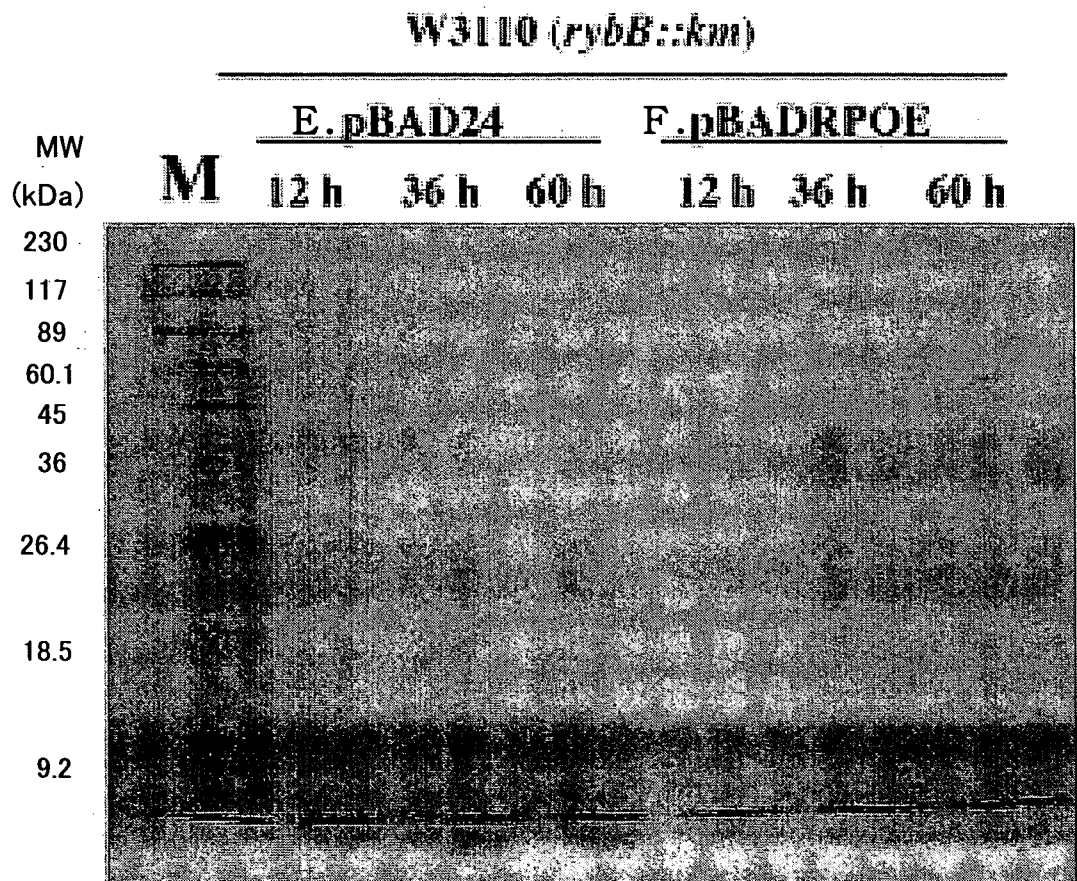
- [7] 請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の溶菌耐性細胞を培地で培養し、培養物から所望の有機化合物を採取することを特徴とする有機化合物の製造方法。

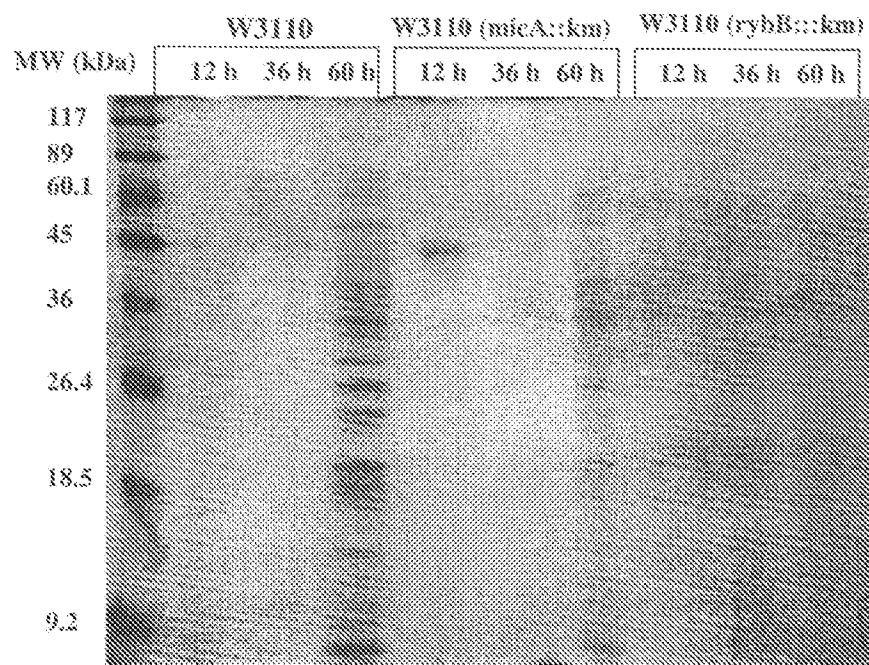
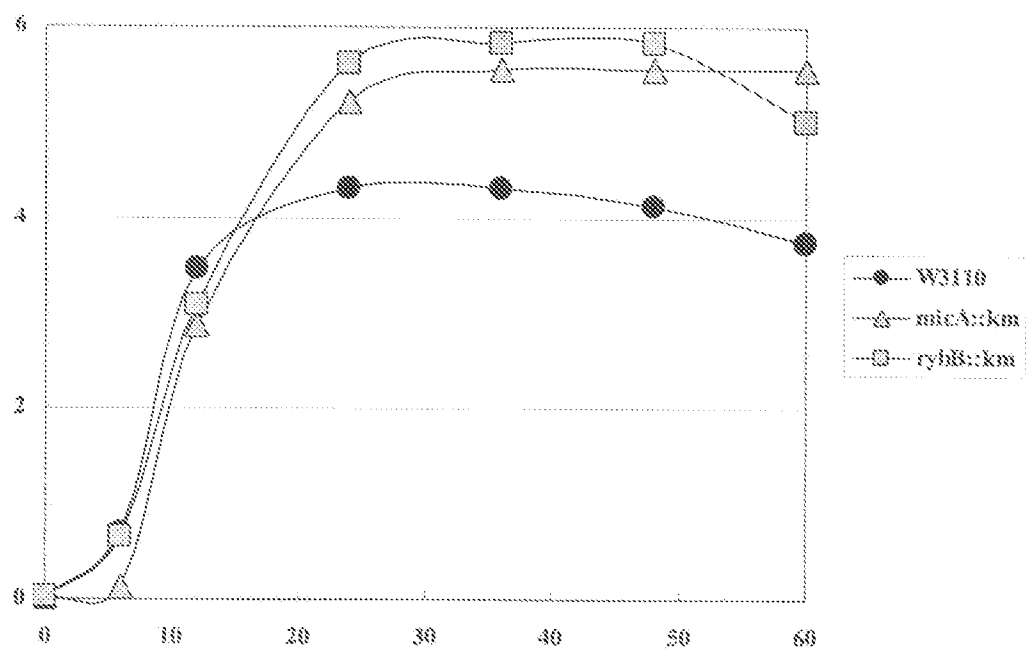


[図3]

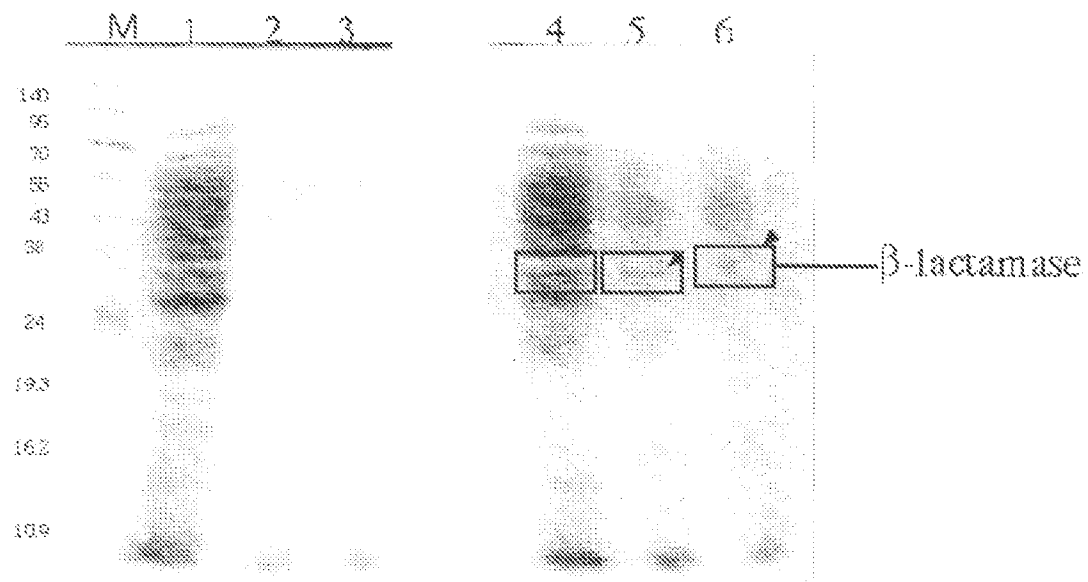


[図4]





[図7]



1. W3110
2. W3110 (*micA::kan*)
3. W3110 (*ybdD::kan*)

4. W3110 (pUC118)
5. W3110 (*micA::kan*, pUC118)
6. W3110 (*ybdD::kan*, pUC118)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/003716

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/21, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KABIR MS., et al., Cell lysis directed by sigmaE in early stationary phase and effect of induction of the rpoE gene on global gene expression in Escherichia coli., Microbiology, 2005, vol. 151, p. 2721-2735, Abstract, Discussion	1-7
Y	JOHANSEN J., et al., Conserved small non-coding RNAs that belong to the sigmaE regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins., J. Mol. Biol., 2006, vol. 364, no. 1, p. 1-8, Abstract, Fig. 4	1-7
P, X	Masayuki MURATA et al., "Bacteria no Program-shi to non-coding small RNA", Kagaku to Seibutsu, 01 August, 2008 (01.08.08), Vol.46, No.8, pages 550 to 556	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 January, 2009 (06.01.09)Date of mailing of the international search report
13 January, 2009 (13.01.09)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N1/21, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	KABIR MS., et al., Cell lysis directed by sigmaE in early stationary phase and effect of induction of the rpoE gene on global gene expression in Escherichia coli., Microbiology, 2005, vol. 151, p. 2721-2735, Abstract, Discussion	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 6 . 0 1 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

1 3 . 0 1 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

中野 あい

4 B

3 7 5 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JOHANSEN J., et al., Conserved small non-coding RNAs that belong to the sigmaE regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins., J. Mol. Biol., 2006, vol. 364, no. 1, p. 1-8, Abstract, Fig. 4	1-7
PX	村田正之他 バクテリアのプログラム死と non-coding small RNA, 化学と生物, 2008.08.01, vol. 46, no. 8, p. 550-556	1-7