

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6817966号
(P6817966)

(45) 発行日 令和3年1月20日(2021.1.20)

(24) 登録日 令和3年1月4日(2021.1.4)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21 Z N A
A 6 1 K 35/74 (2015.01)	A 6 1 K 35/74 A
A 6 1 K 35/741 (2015.01)	A 6 1 K 35/741
A 6 1 K 35/742 (2015.01)	A 6 1 K 35/742
A 6 1 K 35/744 (2015.01)	A 6 1 K 35/744

請求項の数 17 (全 305 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-564379 (P2017-564379)	(73) 特許権者 517196203 シンロジック オペレーティング カンパ ニー インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 1 4 2 ケンブリッジ ビニー ストリ ート 3 0 1 ナンバー 4 0 2
(86) (22) 出願日 平成28年5月25日 (2016. 5. 25)	(74) 代理人 100147485 弁理士 杉村 憲司
(65) 公表番号 特表2018-523978 (P2018-523978A)	(74) 代理人 230118913 弁護士 杉村 光嗣
(43) 公表日 平成30年8月30日 (2018. 8. 30)	(74) 代理人 100119530 弁理士 富田 和幸
(86) 国際出願番号 PCT/US2016/034200	
(87) 国際公開番号 W02016/200614	
(87) 国際公開日 平成28年12月15日 (2016. 12. 15)	
審査請求日 令和1年5月17日 (2019. 5. 17)	
(31) 優先権主張番号 62/256, 041	
(32) 優先日 平成27年11月16日 (2015. 11. 16)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	
(31) 優先権主張番号 62/184, 770	
(32) 優先日 平成27年6月25日 (2015. 6. 25)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高アンモニア血症に関連する疾患を治療するために操作された細菌

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルギニンレギュロンを含む遺伝子操作細菌であって、前記細菌が、同じ条件下の同じ細菌亜型の野生型 N - アセチルグルタミン酸シンターゼと比較して低いアルギニンフィードバック阻害を有する機能性 N - アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする遺伝子を含み、前記細菌が、機能性 Arg R を欠くように遺伝子操作されており、Arg A^f_br をコードする遺伝子の発現が、低酸素又は嫌気的条件下により誘導されるプロモーターにより制御されており、前記細菌が、短鎖脂肪酸を産生することができる生合成経路をコードする遺伝子カセットを含む、遺伝子操作細菌。

【請求項 2】

アルギニンフィードバック抵抗性 N - アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする前記遺伝子が、外因性環境条件により誘導されるプロモーターに作動可能に連結している、及び/又は、短鎖脂肪酸を産生することができる生合成経路をコードする前記遺伝子カセットが、外因性環境条件により誘導されるプロモーターに作動可能に連結している、請求項 1 に記載の遺伝子操作細菌。

【請求項 3】

前記低いアルギニンフィードバック阻害を有する機能性 N - アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする遺伝子に作動可能に連結したプロモーターと、短鎖脂肪酸を産生することができる生合成経路をコードする前記遺伝子カセットに作動可能に連結したプロモーターが、同じプロモーターの別個のコピーである、請求項 2 に記載の遺伝子操作細菌。

【請求項 4】

短鎖脂肪酸を産生することができる生合成経路をコードする前記遺伝子カセットが、前記低いアルギニンフィードバック阻害を有する機能性 N - アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする遺伝子に作動可能に連結したプロモーターと異なるプロモーターに作動可能に連結している、請求項 2 に記載の遺伝子操作細菌。

【請求項 5】

前記低いアルギニンフィードバック阻害を有する機能性 N - アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする遺伝子に作動可能に連結したプロモーターが、

- (a) 哺乳動物の小腸に見いだされる外因性環境条件により誘導される；
 - (b) 低酸素または嫌気的条件下で誘導される；又は
 - (c) 肝損傷を示す 1 つもしくは複数の分子または代謝物により誘導される、
- 請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の遺伝子操作細菌。

10

【請求項 6】

短鎖脂肪酸を産生することができる生合成経路をコードする前記遺伝子カセットに作動可能に連結したプロモーターが、

- (a) 哺乳動物の小腸に見いだされる外因性環境条件により誘導される；
 - (b) 低酸素または嫌気的条件下で誘導される；
 - (c) 肝損傷を示す 1 つもしくは複数の分子または代謝物により誘導される；
 - (d) 活性窒素種の存在により誘導される；
 - (e) 活性酸素種の存在により誘導される；又は
 - (f) 哺乳動物消化管に天然で存在しない環境因子により誘導される、
- 請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の遺伝子操作細菌。

20

【請求項 7】

前記低いアルギニンフィードバック阻害を有する機能性 N - アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする遺伝子及び/又は短鎖脂肪酸を産生することができる生合成経路をコードする前記遺伝子カセットが、細菌における染色体上又は細菌におけるプラスミド上に存在する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の遺伝子操作細菌。

【請求項 8】

対応する野生型細菌に通常存在する機能性 *argR* 遺伝子の各コピーが、1 つもしくは複数のヌクレオチドの欠失、挿入または置換により、独立に欠失したまたは不活性にされている、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の遺伝子操作細菌。

30

【請求項 9】

前記短鎖脂肪酸が、酪酸又はプロピオン酸である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の遺伝子操作細菌。

【請求項 10】

リファキシミンに対する耐性を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の遺伝子操作細菌。

【請求項 11】

前記細菌が、バクテロイデス属、ビフィドバクテリウム属、クロストリジウム属、大腸菌、乳酸桿菌属および乳酸球菌属からなる群から選択されるプロバイオティク細菌である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の細菌。

40

【請求項 12】

前記細菌が、大腸菌ニッスルである、請求項 11 に記載の細菌。

【請求項 13】

前記細菌は、

- (a) 細菌が、哺乳動物消化管内に存在する場合、補足される遺伝子における栄養要求体である；及び/又は
- (b) ジアミノピメリン酸またはチミン生合成経路における酵素における栄養要求体である、

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の細菌。

50

【請求項 14】

前記細菌は、細菌に対して有毒な物質をコードする追加の遺伝子を有するようにさらに操作され、前記追加の遺伝子が、哺乳動物消化管に天然で存在しない環境因子により直接的または間接的に誘導されるプロモーターの制御下にある、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の細菌。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の細菌および薬学的に許容される担体を含む、薬学的に許容される組成物。

【請求項 16】

高アンモニア血症を低減するまたは高アンモニア血症に関連する疾患を治療する方法における使用のための、請求項 15 に記載の組成物。

10

【請求項 17】

(a) 前記疾患が、尿素回路異常症である；

(b) 前記疾患が、アルギニノコハク酸尿症、アルギナーゼ欠損症、カルバモイルリン酸シンテターゼ欠損症、シトルリン血症、N - アセチルグルタミン酸シンテターゼ欠損症またはオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症である；

(c) 前記疾患が、肝臓障害；有機酸障害；イソ吉草酸尿症；3 - メチルクロトニルグリシン尿症；メチルマロン酸尿症；プロピオン酸尿症；脂肪酸酸化欠損；カルニチン回路欠損症；カルニチン欠損症； α -酸化欠損症；リシン尿性タンパク不耐症；ピロリン - 5 - カルボン酸シンテターゼ欠損症；ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損症；オルニチンアミノトランスフェラーゼ欠損症；炭酸脱水酵素欠損症；高インスリン症 - 高アンモニア血症症候群；ミトコンドリア障害；バルプロ酸療法；アスパラギナーゼ療法；完全腸管外栄養；グリシン含有溶液を用いた膀胱鏡検査；肺 / 骨髄移植後；門脈体静脈短絡；尿路感染症；尿管拡張；多発性骨髄腫；化学療法；感染；神経因性膀胱；または腸内細菌過剰増殖である；又は

20

(d) 前記疾患が、肝性脳症、急性肝不全または慢性肝不全である、

請求項 16 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2015年12月4日に提出した米国特許出願第14/960,333号の一部継続出願、2016年3月2日に提出したPCT出願第PCT/US2016/020530号の一部継続出願であり、開示の継続性を可能にするために参照によってそれらの全体として本明細書に組み込まれる、2015年6月10日に提出した米国特許仮出願第62/173,710号、2015年6月10日に提出した米国特許仮出願第62/173,706号、2015年6月24日に提出した米国特許仮出願第62/183,935号、2015年6月25日に提出した米国特許仮出願第62/184,811号、2015年6月25日に提出した米国特許仮出願第62/184,770号、2015年10月30日に提出した米国特許仮出願第62/248,805号、2015年11月16日に提出した米国特許仮出願第62/256,041号、2015年11月16日に提出した米国特許仮出願第62/256,039号、2015年11月16日に提出した米国特許仮出願第62/256,048号、2015年12月4日に提出した米国特許仮出願第62/263,329号、2016年2月4日に提出した米国特許仮出願第62/291,468号および2016年2月10日に提出した米国特許仮出願第62/293,749号の利益を主張するものである。

30

40

【背景技術】

【0002】

アンモニアは、非常に有毒であり、すべての臓器において代謝時に発生する(Walker、2012年)。哺乳動物では、健全な肝臓は、アンモニアを非毒性分子、例えば、尿素またはグルタミンに変換し、過剰な量のアンモニアが全身循環に入ることを妨げるこ

50

とによって身体を保護する。高アンモニア血症は、アンモニアの解毒作用の低下および/または産生の増加を特徴とする。哺乳動物では、尿素回路がアンモニアを尿素に酵素によって変換し、次いで尿素が尿中に除去されることによってアンモニアを解毒する。アンモニアの解毒作用の低下は、アルギニノコハク酸尿症、アルギナーゼ欠損症、カルバモイルリン酸シンテターゼ欠損症、シトルリン血症、N - アセチルグルタミン酸シンテターゼ欠損症およびオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症などの、尿素回路酵素が欠損している尿素回路異常症 (UCD) により引き起こされる可能性がある (Haberleら、2012年)。国立尿素回路異常症財団 (National Urea Cycle Disorders Foundation) は、UCDの罹患率が出生8,500人当たり1人であると推定している。さらに、肝性脳症、門脈体静脈短絡および有機酸代謝異常症などの、いくつかの非UCD障害も高アンモニア血症を引き起こし得る。高アンモニア血症は、神経症状、例えば、発作、運動失調、脳卒中様病変、昏睡、精神病、視力障害、急性脳症、脳浮腫ならびに嘔吐、呼吸性アルカローシス、低体温症または死亡をもたらし得る (Haberleら、2012年; Haberleら、2013年)。

10

【0003】

アンモニアは、様々な生合成経路により合成される、アミノ酸の窒素源でもある。例えば、アルギニン生合成は、1個の窒素原子を含むグルタミン酸を、4個の窒素原子を含むアルギニンに変換する。シトルリンなどの、アルギニン生合成経路において形成される中間代謝物も窒素を組み込む。したがって、高アンモニア血症に関連する状態をモジュレートまたは治療するためにアルギニン生合成の増強を用いて、体内の過剰な窒素を非毒性分子に組み込むことができる。同様に、ヒスチジン生合成、メチオニン生合成、リシン生合成、アスパラギン生合成、グルタミン生合成およびトリプトファン生合成も過剰の窒素を組み込むことができ、それらの経路の増強を用いて、高アンモニア血症に関連する状態をモジュレートまたは治療することができる。

20

【0004】

高アンモニア血症およびUCDの現行の療法は、アンモニアの過剰を低減することを目的としているが、最適とはいえないと広く考えられている (Nagamaniら、2012年); Hoffmannら、2013年; Torres-Vegaraら、2014年)。大部分のUCD患者は、タンパク質制限からなる実質的に改善された食事を必要とする。しかし、低タンパク食は、注意深くモニターしなければならず、タンパク質摂取が過度に制限される場合、身体は筋肉を分解し、その結果としてアンモニアを産生する。さらに、多くの患者は、フェニル酪酸ナトリウム、安息香酸ナトリウムおよびフェニル酪酸グリセロールなどのアンモニア捕捉薬の補給を必要とし、これらの薬物のうちの1つまたは複数

を1日3~4回投与しなければならない (Leonard、2006年; Diazら、2013年)。これらの薬物の副作用は、悪心、嘔吐、被刺激性、食欲不振および女性における月経障害を含む (Leonard、2006年)。小児では、食物および薬物の送達には、胃に外科的に植え込まれた医瘻管または鼻を経て胃に手作業により挿入された経鼻胃管を必要とし得る。これらの治療選択肢が奏功しない場合、肝臓移植が必要となり得る (国立尿素回路異常症財団)。したがって、尿素回路異常症を含む、高アンモニア血症に関連する障害の有効で、信頼でき、かつ/または長期の治療の重大な、満たされていない

30

40

【0005】

肝臓は、アミノ酸代謝ならびにタンパク質合成および分解に、ならびにいくつかの解毒過程、特に、アンモニアのような腸代謝の最終産物の解毒過程に中心的な役割を果たしている。高アンモニア血症をもたらす、肝機能障害は、肝機能障害を有する患者に認められる多種多様な潜在的に可逆性の精神神経異常 (無関係の神経および/または代謝異常の除外の後) を含む、肝性脳症 (HE) を引き起こし得る。HEにおいて、重度の肝不全 (例えば、肝硬変) および/または肝臓の周囲の血液の門脈体静脈短絡が、アンモニアの動脈レベルの上昇をもたらして、血液脳関門を通過させ (Williams、2006年)、脳機能の変化をもたらす。

50

【0006】

脳内のアンモニアの蓄積は、認知および運動障害、脳灌流の減少、ならびにアンモニアを代謝することができる脳細胞である、星状細胞の酸化ストレス媒介損傷をもたらす。脳内の過剰なアンモニアが、主要な抑制性神経伝達物質である - アミノ酪酸 (GABA) のレベルを変化させることによって神経伝達を乱すことを示唆する証拠が存在する (Ahboucha および Butterworth、2004)。脳マンガンの濃度の上昇およびマンガンの沈着も肝硬変患者の脳基底核において報告され、HE の臨床症状に寄与すると推測されている (Cashら、2010年; Rivera-Manciaら、2012年)。高アンモニア血症の一般的な神経症状は、発作、運動失調、脳卒中様病変、パーキンソン病様症状 (振戦など)、昏睡、精神病、視力障害、急性脳症、脳浮腫ならびに嘔吐、呼吸性アルカローシス、低体温症または死亡を含む (Haberleら、2012年; Haberleら、2013年)。

10

【0007】

アンモニア代謝異常だけでHEを有する患者に認められるすべての神経学的変化を説明し得ない。敗血症は、HEの周知の増悪因子である。全身性炎症反応症候群 (SIRS) は、炎症性サイトカインおよびメディエーターの放出および循環に起因する。肝硬変を有する患者では、SIRSは、腫瘍壊死因子 (TNF) およびインターロイキン6 (IL6) によって媒介され得る過程における軽微および顕性HEを有する患者の両方におけるHEの症状を悪化させる可能性がある。特に、活性窒素種 (RNS) および活性酸素種 (ROS) の産生の増大が、アンモニア、炎症性サイトカイン、低ナトリウム血またはベンゾジアゼピンに曝露されている培養星状細胞において起こる。

20

【0008】

高アンモニア血症は、脳内の核内/細胞質凝集体および細胞死を特徴とする常染色体優性疾患である、ハンチントン病の顕著な特徴でもある (Chenら、2015年; Chiangら、2007年)。実際、高アンモニア血症は、本明細書に記載の通り、すべてがアンモニアレベルを低下させることによって治療することができる、いくつかの他の障害の特徴である。

【0009】

肝性脳症、ハンチントン病ならびに過剰なアンモニアレベルに関連する他の疾患および障害に対する現行の療法は、不十分である (Cashら、2010年; Cordoba および Minguéz、2008年; Shannon および Frint、2015)。ハンチントン病において、抗精神病薬 (例えば、ハロペリドール、リスペリドン、クエチアピン) および不随意運動を抑制するために投与される薬物 (例えば、テトラベナジン、アマンタジン、レベチラセタム、クロナゼパム) の副作用は、患者における筋硬直および認知低下を悪化させ得る (Mayo Clinic)。ウレアーゼ産生細菌に対する抗体は、とりわけ長期にわたり投与した場合、腎毒性などの、高度な二次的影響を及ぼすことが示された (Blancら、1992年; Berk および Chalmers、1970年)。タンパク質制限は、タンパク質の分解および不良な栄養状態を促し得るものであり、死亡率の増大に関連付けられた (Kondrup および Muller、1997年; Vaqueróら、2003年) ことから、これもはや中心的な療法でない。タンパク質制限は、HEを有する肝硬変患者の3分の1に対してのみ適切である (Nguyen および Morgan、2014年)。したがって、肝性脳症およびハンチントン病の有効で、信頼でき、かつ/または長期の治療の重大な、満たされていない必要性がある。

30

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Walker、Severe hyperammonaemia in adults not explained by liver disease. Ann Clin Biochem、2012年5月; 49 (Pt 3): 214~28頁

【非特許文献2】Haberleら、Suggested guidelines fo

50

r the diagnosis and management of urea cycle disorders、Orphanet J Rare Dis、2012年5月29日、7巻:32頁

【非特許文献3】Haberle J.、Clinical and biochemical aspects of primary and secondary hyperammonemic disorders、Arch Biochem Biophys、2013年8月15日;536巻(2号):101~8頁

【非特許文献4】Nagamani \bar{b} 、Optimizing therapy for argininosuccinic aciduria、Mol Genet Metab、2012年9月;107巻(1~2号):10~4頁

10

【非特許文献5】Hoffmann \bar{b} 、Defects in amino acid catabolism and the urea cycle、Handb Clin Neurol、2013年;113巻:1755~73頁

【非特許文献6】Torres-Vega \bar{b} 、Delivery of glutamine synthetase gene by baculovirus vectors: a proof of concept for the treatment of acute hyperammonemia、Gene Ther、2014年10月23日;22巻(1号):58~64頁

【非特許文献7】Leonard(2006年)、Disorders of the urea cycle and related enzymes. Inborn Metabolic Diseases、第4版(263~272頁)、Springer Medizin Verlag Heidelberg

20

【非特許文献8】Diaz \bar{b} 、Ammonia control and neurocognitive outcome among urea cycle disorder patients treated with glycerol phenyl butyrate、Hepatology、2013年6月;57巻(6号):2171~9頁

【非特許文献9】Williams、2006年

【非特許文献10】AhbouchaおよびButterworthm、2004年

【非特許文献11】Cash \bar{b} 、Current concepts in the assessment and treatment of hepatic encephalopathy、QJM、.2010年1月;103巻(1号):9~16頁

30

【非特許文献12】Rivera-Mancia \bar{b} 、2012年

【非特許文献13】Chen、2015年

【非特許文献14】Chiang \bar{b} 、Dysregulation of C/EBP α by mutant Huntingtin causes the urea cycle deficiency in Huntington's disease、Hum Mol Genet、2007年3月1日;16巻(5号):483~498頁

【非特許文献15】CordobaおよびMinguez、Hepatic Encephalopathy、Semin Liver Dis.、2008年;28巻(1号):70~80頁

40

【非特許文献16】ShannonおよびFraint、2015年

【非特許文献17】Blanc \bar{b} 、Lactitol or lactulose in the treatment of chronic hepatic encephalopathy: results of a meta-analysis、Hepatology、1992年2月;15巻(2号):222~228頁

【非特許文献18】BerkおよびChalmers、Deafness complicating antibiotic therapy of hepatic encephalopathy、Ann Intern Med.、1970年9月;73巻(

50

3号) : 393 ~ 396頁

【非特許文献19】KondrupおよびMuller、1997年

【非特許文献20】Vaquerola、2003年

【非特許文献21】NguyenおよびMorgan、2014年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本開示は、過剰なアンモニアを減少させ、アンモニアおよび/または窒素を別の副産物に変換することができる遺伝子操作細菌を提供する。特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、過剰なアンモニアを減少させ、アンモニアおよび/または窒素を別の副産物に変換する。特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、非病原性であり、有毒なアンモニアを減少させるために消化管に導入することができる。高アンモニア血症患者において70%もの過剰なアンモニアが胃腸管に蓄積する。本発明の他の態様は、アンモニアおよび/または窒素の消費、あるいは非毒性副産物、例えば、アルギニンまたはシトルリンの産生のレベルの増加に基づいて遺伝子操作細菌を選択または標的にする方法を提供する。本発明はまた、遺伝子操作細菌を含む医薬組成物、ならびに高アンモニア血症に関連する障害、例えば、尿素回路異常症および肝性脳症をモジュレートおよび治療する方法を提供する。

10

【0012】

本開示はまた、過剰なアンモニアおよび他の有害な分子、例えば、GABA、マンガンを減少させることができる遺伝子操作細菌を提供する。特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、過剰なアンモニアを減少させ、アンモニアおよび/または窒素を別の副産物に変換する。特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、非病原性であり、有毒なアンモニアを減少させるために消化管に導入することができる。特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、過剰なアンモニアおよび他の有害な分子、例えば、GABA、マンガンを減少させることができ、1つまたは複数の消化管バリア増強分子、例えば、酪酸などの、1つまたは複数の短鎖脂肪酸を産生することもできる。本開示の他の態様は、アンモニアおよび/または窒素の消費、あるいは非毒性副産物、例えば、アルギニンまたはシトルリンの産生のレベルの増加に基づいて遺伝子操作細菌を選択または標的にする方法を提供する。本発明はまた、遺伝子操作細菌を含む医薬組成物、ならびに例えば、肝性脳症およびハンチントン病を含む、過剰なアンモニアに関連する障害をモジュレートおよび治療する方法を提供する。

20

30

【0013】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、1つまたは複数の作用機構を媒介する、1つまたは複数の天然または非天然構成要素を含む、1つまたは複数の遺伝子または遺伝子カセットまたは回路を含む。さらに、細菌染色体内の1つまたは複数の内因性遺伝子または調節領域は、突然変異または欠失させることができる。遺伝子操作細菌は、これらの遺伝子または遺伝子カセットまたは回路をプラスミド上に収容するか、あるいは、遺伝子/遺伝子カセットは、それらが本質的な遺伝子発現を妨げない、染色体の特定の領域に挿入された。

【0014】

これらの遺伝子(複数可)/遺伝子カセット(複数可)は、構成的または誘導性プロモーターの制御下にあってもよい。本明細書に記載の例示的誘導性プロモーターは、酸素レベル依存性プロモーター(例えば、FNR誘導性プロモーター)、HE特異的分子または肝損傷を示す代謝物(例えば、ビリルビン)に誘導されるプロモーター、炎症または炎症反応により誘導されるプロモーター(RNS、ROSプロモーター)ならびに消化管内に自然に存在し得るまたはし得ない(例えば、体外から加えることができる)代謝物、例えば、アラビノースおよびテトラサイクリンにより誘導されるプロモーターを含む。

40

【0015】

さらに、操作細菌は、(1)当技術分野で公知であり、本明細書で示す栄養要求性のいずれか、例えば、thyA栄養要求性などの、1つまたは複数の栄養要求性、(2)本明

50

細書に記載の、あるいは当技術分野で公知のキルスイッチのいずれかなどの、1つまたは複数のキルスイッチ回路、(3)1つまたは複数の抗生物質耐性回路、(4)本明細書に記載の、あるいは当技術分野で公知の輸送体のいずれかのような、生体分子または物質を移入する1つまたは複数の輸送体、(5)本明細書に記載の、あるいは当技術分野で公知の分泌回路のいずれかなどの、1つまたは複数の分泌回路、および(6)そのようなさらなる回路のうちの1つまたは複数の組合せうちの1つまたは複数をさらに含み得る。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1Aは、非誘導条件下での本発明のArgR欠失細菌の一実施形態におけるアルギニンレギュロンの状態を示す図である。アルギニン(楕円内の「Arg」)は、ArgA(くねった線)と相互作用してArgA活性を阻害し(「X」印で示す)、一方、酸素(O₂)は、FNR(点線の囲み線付きのFNR)が二量体化し、FNRプロモーター(灰色の四角囲みのFNR)およびその制御下のargA^{fbr}遺伝子を活性化することを妨げる(「X」印で示す)ため好氣的条件下で比較的により低いアルギニンの産生を示す。図1Bは、誘導条件下での本発明のArgR欠失細菌の一実施形態におけるアルギニンレギュロンの状態を示す図である。FNRが二量体化し(点線の囲み線付きの2つのFNR)、アルギニンによる阻害に抵抗性である、ArgA^{fbr}(argA^{fbr}上のくねった線)のFNRプロモーター(灰色の四角囲みのFNR)媒介発現を誘導するため嫌氣的条件下でのアルギニンの産生の上方制御を示す。これは、ArgA(argAを示す四角の上のくねった線)と相互作用するアルギニン(楕円内の「Arg」)により引き起こされる野生型ArgAの阻害を克服する(曲がった矢印)。アルギニンレギュロンにおける各遺伝子を遺伝子の名称を含む長方形によって示す。長方形の1つまたは集合に隣接する各矢印は、そのような遺伝子(複数可)の矢印の方向の転写を駆動することに関与するプロモーターを示す。1つまたは一連の長方形に隣接するより太い直線は、この細菌においてArgRが欠失しているため利用されないArgR結合部位を示す。各長方形の上の矢印は、各遺伝子の発現産物を示す。

【図2】図2Aは、本発明の代替の例示的实施形態を示す図である。好氣的条件下での実施形態を示し、酸素の存在下では、FNRタンパク質(四角囲みのFNR)は、単量体として留まり、アルギニンフィードバック抵抗性argA^{fbr}遺伝子の発現を駆動するFNRプロモーター(「FNR」)に結合し、活性化することができない。野生型ArgAタンパク質は、機能性であるが、アルギニンに結合することにより負のフィードバック抑制を受けやすく、それによりアルギニンレベルを正常以下に維持する。各アルギニン生合成遺伝子(argA、argE、argC、argB、argH、argD、argI、argG、carAおよびcarB)のプロモーター領域におけるアルギニンリプレッサー(ArgR)結合部位のすべてが突然変異して(黒色の線;黒色の「X」印)、ArgRへの結合を減少または消失させた。図2Bは、本発明の代替の例示的实施形態を示す図である。嫌氣的条件下での図2Aと同様の実施形態を示し、酸素の非存在下では、FNRタンパク質(四角囲みのFNR)は、二量体化し、FNRプロモーター(「FNR」)に結合し、活性化する。これは、アルギニン(楕円内の「Arg」)によるフィードバック抑制に抵抗性である、アルギニンフィードバック抵抗性argA^{fbr}遺伝子の発現を駆動する(黒色のくねった線() = argA^{fbr}遺伝子発現産物)。各アルギニン生合成遺伝子(argA、argE、argC、argB、argH、argD、argI、argG、carAおよびcarB)のプロモーター領域におけるアルギニンリプレッサー(ArgR)結合部位のすべてが突然変異して(黒色の線)、ArgRへの結合を減少または消失させ(黒色の「X」印)、ひいてはアルギニン-ArgR複合体による阻害を妨げた。これにより、アルギニンの高レベルの産生が可能となる。

【図3】本発明の他の実施形態を示す図である。この実施形態では、tetR遺伝子からのTetリプレッサー(TetR)の発現を駆動するプロモーターにおけるArgR結合部位(黒色の線)を含む構築物は、遺伝子Xの発現を駆動するTetR結合部位(TetRとXとの間の黒色の線)を含む第2のプロモーターに連結している。低アルギニン濃度

10

20

30

40

50

下では、T e t R が発現し、遺伝子 X の発現を阻害する。高アルギニン濃度では、A r g R がアルギニンと会合し、A r g R 結合部位に結合し、それにより、t e t R 遺伝子からの T e t R の発現を阻害する。これにより、ひいては T e t R による阻害が排除され、遺伝子 X の発現（黒色のくねった線（ ））が可能になる。

【図 4】本発明の他の実施形態を示す図である。この実施形態では、t e t R 遺伝子からの T e t R プレッサー（T e t R）の発現を駆動するプロモーターにおける A r g R 結合部位（黒色の線）を含む構築物は、緑色蛍光タンパク質（「G F P」）の発現を駆動する T e t R 結合部位（T e t R 楕円に結合した黒色の線）を含む第 2 のプロモーターに連結している。低アルギニン濃度下では、T e t R が発現し、G F P の発現を阻害する。高アルギニン濃度では、A r g R がアルギニンと会合し、A r g R 結合部位に結合し、それにより、t e t R 遺伝子からの T e t R の発現を阻害する。これにより、ひいては T e t R による阻害が排除され、G F P の発現が可能になる。この構築物を含む宿主を突然変異させることによって、蛍光活性化細胞選別（「F A C S」）を用いて G F P の発現に基づいて高アルギニン産生体を選択することができる。

10

【図 5】本発明の他の実施形態を示す図である。この実施形態では、t e t R 遺伝子からの T e t R プレッサーの発現（示さず）を駆動するプロモーターにおける A r g R 結合部位（A r g R - A r g 複合体により結合された黒色の線）を含む構築物は、宿主の生存に必要な栄養要求性タンパク質（「A U C」）の発現を駆動する T e t R 結合部位（黒色の線）を含む第 2 のプロモーターに連結している。高アルギニン濃度下では、A r g R - アルギニン複合体が A r g R 結合部位に結合し、それにより、t e t R 遺伝子からの T e t R の発現を阻害する。これにより、ひいては A U X の発現が可能となり、宿主が生存することが可能になる。低アルギニン濃度下では、T e t R が t e t R 遺伝子から発現し、A U X の発現を阻害し、ひいては宿主を殺滅する。図 5 における構築物は、A U X 発現のその制御により宿主細胞の生存のためにそれを必要にすることによって高アルギニン（「A r g」）産生を増強する。

20

【図 6】強いリボソーム結合部位に融合した例示的 F N R プロモーター（f n r S）の制御下の a r g A^{f b r} 遺伝子の概略図である。

【図 7】強いリボソーム結合部位に融合した例示的 F N R プロモーター（n i r B）の制御下の a r g A^{f b r} 遺伝子の他の概略図である。他の調節エレメントも存在し得る。

【図 8】弱いリボソーム結合部位に融合した例示的 F N R プロモーター（n i r B）の制御下の a r g A^{f b r} 遺伝子の概略図である。

30

【図 9】図 9 A は、C R P 結合部位に融合した F N R 反応性プロモーターの例示的实施形態を示す図である。F N R - C R P プロモーター領域のマップを示し、制限部位は太字で示す。図 9 B は、C R P 結合部位に融合した F N R 反応性プロモーターの例示的实施形態を示す図である。C R P 結合部位およびリボソーム結合部位の両方に融合した、例示的 F N R プロモーター（n i r B プロモーター）の制御下の a r g A^{f b r} 遺伝子の概略図を示す。他の調節エレメントも存在し得る。

【図 10】図 10 A は、C R P 結合部位に融合した F N R 応答性プロモーターの代替の例示的实施形態を示す図である。制限部位を太字で示した F N R - C R P プロモーター領域のマップを示す。図 10 B は、C R P 結合部位に融合した F N R 応答性プロモーターの代替の例示的实施形態を示す図である。C R P 結合部位およびリボソーム結合部位の両方に融合した、例示的 F N R プロモーター（f n r S プロモーター）の制御下の a r g A^{f b r} 遺伝子の概略図を示す。

40

【図 11】大腸菌ニッスル（E . c o l i N i s s l e）における構成的に発現した a r g G 構築物の例示的实施形態を示す図である。構成的プロモーターは、灰色の囲み線付きの B B a _ _ J 2 3 1 0 0 である。クローニングに用いる制限部位は太字である。

【図 12】大腸菌ニッスルの野生型 a r g G オペロンおよびその構成的に発現する突然変異体のマップを示す図である。四角囲みの A R G は、野生型オペロンに存在するが、突然変異体には存在しない。A r g G は、B B a _ _ J 2 3 1 0 0 プロモーターの制御下で構成的に発現する。

50

【図13】例示的BADプロモーター駆動 $argA^{fbr}$ 構築物の概略図である。この実施形態では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子が $araC$ 遺伝子と $araD$ 遺伝子との間に挿入されている。 $ArgA^{fbr}$ に、リボソーム結合部位、FRT部位および1つまたは複数の転写終結配列が隣接している。

【図14】 $argR$ 遺伝子が欠失し、フィードバック抵抗性 $argA^{fbr}$ 遺伝子を発現する操作細菌菌株の例示的实施形態を示す図である。いくつかの実施形態では、この菌株は、染色体上の1つまたは複数の栄養要求性の改変をさらに含む。この菌株は、アンモニアの消費およびアルギニンの産生に有用である。

【図15】 $argR$ および $argG$ 遺伝子が欠失し、フィードバック抵抗性 $argA^{fbr}$ 遺伝子を発現する操作細菌菌株の例示的实施形態を示す図である。いくつかの実施形態では、この菌株は、染色体上の1つまたは複数の栄養要求性の改変をさらに含む。この菌株は、アンモニアの消費およびシトルリンの産生に有用である。

【図16】 $ArgR$ 結合部位を欠き、フィードバック抵抗性 $argA^{fbr}$ 遺伝子を発現する操作細菌菌株の例示的实施形態を示す図である。いくつかの実施形態では、この菌株は、染色体上の1つまたは複数の栄養要求性の改変をさらに含む。この菌株は、アンモニアの消費およびアルギニンの産生に有用である。

【図17】 $argG$ を除くアルギニン生合成オペロンのすべてにおける $ArgR$ 結合部位を欠き、フィードバック抵抗性 $argA^{fbr}$ 遺伝子を発現する操作細菌菌株の例示的实施形態を示す図である。いくつかの実施形態では、この菌株は、染色体上の1つまたは複数の栄養要求性の改変をさらに含む。この菌株は、アンモニアの消費およびシトルリンの産生に有用である。

【図18】大腸菌1917ニッスル染色体内の例示的組込み部位のマップを示す図である。これらの部位は、本質的な遺伝子発現を妨げることなく、回路成分を染色体に挿入することができる領域を示す。バックスラッシュ(/)を用いて、挿入が発散的または収束的に発現する遺伝子間に起こることを示す。 $thyA$ などの生合成遺伝子内の挿入は、栄養要求性を作るのに有用であり得る。いくつかの実施形態では、個々の回路成分を複数の示された部位に挿入する。 $malE/K$ 部位を丸で囲む。本開示のいくつかの実施形態では、 $FNR-ArgA^{fbr}$ を $malEK$ 遺伝子座に挿入する。

【図19】赤色蛍光タンパク質(RFP)を構成的に発現する3つの細菌菌株を示す図である。菌株1~3において、 rfp 遺伝子が細菌染色体内の異なる部位に挿入され、蛍光灯下で様々な程度の輝度をもたらす。非改変大腸菌ニッスル(菌株4)は、非蛍光性である。

【図20】本開示の例示的構築物の遺伝子構成を示す図である。そのような構築物を含む菌株の非限定的な例は、 $SYN-UCD301$ および $SYN-UCD302$ を含む。 $SYN-UCD301$ は、 $malEK$ 遺伝子座において染色体に組み込まれた $ArgR$ 、 $PfnrS-ArgA^{fbr}$ 、野生型 $ThyA$ およびクロラムフェニコール耐性を含む。

【図21】本開示の例示的構築物の遺伝子構成を示す図である。そのような構築物を含む菌株の非限定的な例は、 $SYN-UCD303$ 、 $SYN-UCD306$ 、 $SYN-UCD307$ および $SYN-UCD309$ を含む。例えば、 $SYN-UCD303$ は、 $ArgR$ 、 $malEK$ 遺伝子座において染色体に組み込まれた $PfnrS-ArgA^{fbr}$ 、 $ThyA$ およびカナマイシン耐性を含む。

【図22】本開示の例示的構築物の遺伝子構成を示す図である。そのような構築物を含む菌株の非限定的な例は、 $SYN-UCD304$ 、 $SYN-UCD305$ 、 $SYN-UCD308$ および $SYN-UCD310$ を含む。例えば、 $SYN-UCD304$ は、 $ArgR$ 、 $malEK$ 遺伝子座において染色体に組み込まれた $PfnrS-ArgA^{fbr}$ 、野生型 $ThyA$ を含み、抗生物質耐性を含まない。 $SYN-UCD305$ は、 $ArgR$ 、 $malEK$ 遺伝子座において染色体に組み込まれた $PfnrS-ArgA^{fbr}$ 、 $ThyA$ を含み、抗生物質耐性を含まない。

【図23】誘導(+ATC)および非誘導(-ATC)条件下でストレプトマイシン耐性対照ニッスル($SYN-UCD103$)、 $SYN-UCD201$ 、 $SYN-UCD202$

10

20

30

40

50

およびSYN-UCD203により産生された*in vitro*でのアルギニンレベルの棒グラフである。SYN-UCD201は、ArgRを含み、argA^{f b r}を含まない。SYN-UCD202は、ArgRおよび高コピープラスミド上のテトラサイクリン誘導性argA^{f b r}を含む。SYN-UCD203は、ArgRおよび低コピープラスミド上のテトラサイクリン誘導性argA^{f b r}を含む。

【図24】誘導条件下でストレプトマイシン耐性対照ニッスル(SYN-UCD103)、SYN-UCD104、SYN-UCD204およびSYN-UCD105により産生された*in vitro*でのアルギニンおよびシトルリンレベルの棒グラフである。SYN-UCD104は、野生型ArgR、低コピープラスミド上のテトラサイクリン誘導性argA^{f b r}、テトラサイクリン誘導性argG、およびargGを除く各アルギニン生合成オペロンのそれぞれの四角囲みのARGにおける突然変異を含む。SYN-UCD204は、ArgRおよび低コピープラスミド上のテトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下で発現したargA^{f b r}を含む。SYN-UCD105は、野生型ArgR、低コピープラスミド上のテトラサイクリン誘導性argA^{f b r}、構成的に発現したargG(BBa_J23100構成的プロモーター)、およびargGを除く各アルギニン生合成オペロンのそれぞれの四角囲みのARGにおける突然変異を含む。

【図25】酸素の存在(+O₂)または非存在(-O₂)下で、誘導(+ATC)および非誘導(-ATC)条件下でストレプトマイシン耐性ニッスル(SYN-UCD103)、SYN-UCD205およびSYN-UCD204により産生された*in vitro*でのアルギニンレベルの棒グラフである。SYN-UCD103は、対照ニッスル構築物である。SYN-UCD205は、ArgRおよび低コピープラスミド上のFNR誘導性プロモーターの制御下で発現したargA^{f b r}を含む。SYN204は、ArgRおよび低コピープラスミド上のテトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下で発現したargA^{f b r}を含む。

【図26】ベースライン、2時間および4時間におけるSYN-UCD101、SYN-UCD102およびブランク対照からの培養培地中の*in vitro*でのアンモニアレベルの棒グラフである。SYN-UCD101およびSYN-UCD102の両方が*in vitro*でアンモニアを消費することができる。SYN-UCD101は、野生型ArgRおよび野生型ThyAを含み、ArgA^{f b r}を含まず、SYN-UCD102は、野生型ArgR、低コピープラスミド上のテトラサイクリン誘導性argA^{f b r}および野生型ThyAを含む。

【図27】ベースライン、2時間および4時間におけるSYN-UCD202、SYN-UCD203およびブランク対照からの培養培地中の*in vitro*でのアンモニアレベルの棒グラフである。SYN-UCD202およびSYN-UCD203の両方が*in vitro*でアンモニアを消費することができる。SYN-UCD202およびSYN-UCD203の両方がArgR、それぞれ高コピープラスミドまたは低コピープラスミド上のテトラサイクリン誘導性argA^{f b r}、Amp耐性および野生型ThyAを含む。

【図28】図28Aは、高アンモニア血症TAAマウスにおけるアンモニアレベルの棒グラフである。非改変対照ニッスルまたはArgリプレッサー遺伝子が欠失し、argA^{f b r}遺伝子が高コピープラスミド上のテトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下にある遺伝子操作菌株であるSYN-UCD202を投与した高アンモニア血症マウスにおけるアンモニアレベルの棒グラフを示す。合計96匹のマウスを試験した。エラーバーは、標準誤差を表す。SYN-UCD202を投与したマウスにおける血中アンモニア(BA)レベルは、4日目および5日目において非改変対照ニッスルを投与したマウスにおけるアンモニアレベルより低い(ニッスル、BA=220mM; SYN-UCD202、BA=105mM; BA_{Nissle}-BA_{SYN-UCD202}=115mM; 平均血液容積=1.5mL)。図28Bは、高アンモニア血症TAAマウスにおけるアンモニアレベルの棒グラフである。ストレプトマイシン耐性対照ニッスル(SYN-UCD103)および媒体のみの対照と比較して、TAAマウスモデルにおけるSYN-UCD204のi

10

20

30

40

50

n v i v oでの有効性(アンモニア消費)を示す棒グラフを示す。図28Cは、高アンモニア血症TAAマウスにおけるアンモニアレベルの棒グラフである。TAA処理後24~48時間目の血中アンモニア濃度の変化の百分率の棒グラフを示す。

【図29】高アンモニア血症s p f ^{a s h}マウスにおけるアンモニアレベルの棒グラフである。56匹のs p f ^{a s h}マウスを4群に分けた。群1に通常の飼料を与え、群2~4に初期の採血の後に70%タンパク質飼料を与えた。各群にストレプトマイシン耐性ニッスル対照(SYN-UCD103)またはSYN-UCD204を水とともに1日2回強制経口投与し、最初の強制経口投与の4時間後に血液を採取した。ArgRおよび低コピープラスミド上のテトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下で発現したargA^{f b r}を含む、SYN-UCD204は、血中アンモニアを高アンモニア血症閾値を下回るレベルに有意に低下させた。

10

【図30】高タンパク食を給餌した高アンモニア血症s p f ^{a s h}マウスにおけるアンモニアレベルの棒グラフである。マウスにSYN-UCD204(ArgR、低コピープラスミド上のPfnrS-ArgAfbbrおよび野生型ThyAを含む)、SYN-UCD206(ArgR、低コピープラスミド上のPfnrS-ArgAfbbrおよびThyAを含む)または水を投与し、次いで、2日後に高タンパク食に切り替えた。図30に見られるように、高タンパク食への切り替えの48時間後にアンモニアレベルがSYN-UCD205およびSYN-UCD206の両方において同様の程度に低下し、ThyA栄養要求性が高アンモニア血症に有意な影響を及ぼさないことがわかる。

【図31】図31Aは、嫌気性誘導後の様々な時点における培地中のアルギニンレベルの棒グラフである。0、30、60および120分目に測定したSYN-UCD205、SYN-UCD206およびSYN-UCD301のアルギニン産生のレベルの棒グラフを示す。図31Bは、嫌気性誘導後の様々な時点における培地中のアルギニンレベルの棒グラフである。SYN-UCD204(ArgR、低コピープラスミド上のPfnrS-ArgAfbbrおよび野生型ThyAを含む)、SYN-UCD301、SYN-UCD302およびSYN-UCD303(これらの3つすべてが組み込まれたFNR-ArgAfbbr構築物を含み、SYN-UCD301は、ArgRおよびwtThyAを含み、SYN303は、ArgRおよびThyAを含む)のアルギニン産生のレベルの棒グラフを示す。結果から、FNR ArgAfbbrの染色体組込みが、同じ構築物を発現する低コピープラスミド菌株で認められたのと同様のレベルのアルギニン産生をもたらすことがわかる。

20

30

【図32】図32Aは、通常(NC)または高タンパク(HP)食を給餌した高アンモニア血症s p f ^{a s h}マウスのアンモニアレベルおよび生存曲線の棒グラフである。FNR-ArgAfbbrの組み込まれたコピーを有し、1つ(SYN-UCD303)はThyA欠失を有し、1つ(SYN-UCD301)は有さない2つの菌株を比較した。通常(NC)または高タンパク(HP)食を給餌した高アンモニア血症s p f ^{a s h}マウスにおけるアンモニアレベルの棒グラフを示す。高タンパク食におけるs p f - a s hマウスのアンモニアレベルは、H₂O高タンパク食対照群と比較してSYN-UCD301およびSYN-UCD303群において低下した。アンモニアレベルの観測された低下は、SYN-UCD301およびSYN-UCD303の両方において同様であり、ThyA栄養要求性がSYN-UCD303の有効性に有意な影響を及ぼさないことがわかる。図32Bは、通常(NC)または高タンパク(HP)食を給餌した高アンモニア血症s p f ^{a s h}マウスの生存曲線を示す図であり、SYN-UCD301およびSYN-UCD303が対照と比較して生存期間の延長を示したことを表す。

40

【図33】通常(NC)または高タンパク(HP)食を給餌した高アンモニア血症s p f ^{a s h}マウスにおける血中アンモニアレベルの棒グラフである。SYN-UCD303について、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 および 1×10^{10} 細胞の用量を12日間にわたり毎日投与した。血中アンモニアレベルを5日目に測定した。 1×10^8 および 1×10^9 の両用量は、このモデルにおける血中アンモニアレベルの有意な低下をもたらすのに十分であった。SYN-UCD303は、ArgR、malEK遺伝子座において染

50

染色体に組み込まれた P f n r S - A r g A f b r、 T h y A およびカナマイシン耐性を含む。

【図34】ニッスルの *in vivo* での滞在を示すグラフである。ストレプトマイシン耐性ニッスルを、抗生物質を前投与せずに強制経口投与によりマウスに投与した。6匹すべてのマウスからの糞便ペレットを投与後にモニターして、マウスの胃腸管内に滞在している投与ニッスルの量を測定した。バーは、マウスに投与した細菌の数を表す。線は、10日間連日にわたる各日の糞便試料から回収されたニッスルの数を表す。

【図35】図35Aは、強制投与後1、4、8、12、24および30時間目の腸管の様々なコンパートメントにおける細菌の滞在の棒グラフである。マウスに約 10^9 CFU を投与し、各時点で動物 ($n = 4$) を安楽死させ、腸、盲腸および結腸を除去した。小腸を3つの部分に、大腸および結腸をそれぞれ2つの部分に切断した。腸溶出液を収集し、連続希釈平板培養により、各コンパートメントにおけるCFUsを決定した。SYN-UCD103 (ストレプトマイシン耐性ニッスル) の滞在の時間的推移の棒グラフを示す。図35Bは、強制投与後1、4、8、12、24および30時間目の腸管の様々なコンパートメントにおける細菌の滞在の棒グラフである。マウスに約 10^9 CFU を投与し、各時点で動物 ($n = 4$) を安楽死させ、腸、盲腸および結腸を除去した。小腸を3つの部分に、大腸および結腸をそれぞれ2つの部分に切断した。腸溶出液を収集し、連続希釈平板培養により、各コンパートメントにおけるCFUsを決定した。ArgRおよびThyAを含み、ArgAfb rを含まないSYN-UCD106の滞在の時間的推移の棒グラフを示す。図35Cは、強制投与後1、4、8、12、24および30時間目の腸管の様々なコンパートメントにおける細菌の滞在の棒グラフである。マウスに約 10^9 CFU を投与し、各時点で動物 ($n = 4$) を安楽死させ、腸、盲腸および結腸を除去した。小腸を3つの部分に、大腸および結腸をそれぞれ2つの部分に切断した。腸溶出液を収集し、連続希釈平板培養により、各コンパートメントにおけるCFUsを決定した。ArgR、malEK遺伝子座において染色体に組み込まれたPfnrS-ArgAfb rおよびThyAを含むSYN-UCD303の滞在の時間的推移の棒グラフを示す。

【図36】図36A、36Bおよび36Cは、生存細菌細胞およびアルギニン産生の棒グラフである。細胞を70%イソプロパノールまたは対照としてのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) とともに振盪しながら1時間インキュベートした。処理後、細胞を、0.5%グルコースおよび3mMチミジンを追加したM9培地中で特定の比率で混合し、振盪しながら37で2時間インキュベートした。図36Aおよび36Bに見られるように、培養中のイソプロパノール処理細胞と非処理細胞とのより大きい比率は、平板培養により決定されるより少ないCFUsおよびより低いレベルのアルギニンの産生をもたらす。存在する細菌の量に対するアルギニンの産生は、種々の培養にわたり一定のままであった (図36C)。これらの結果から、生存細菌のみがアルギニンの産生に寄与していることがわかる。

【図37】非ヒト霊長類毒性試験において採取した糞便試料中の定量された細菌の数を示すグラフである。SYN-UCD107 (カナマイシン耐性ニッスル) およびSYN-UCD303 (ArgR、malEK遺伝子座において染色体に組み込まれたPfnrS-ArgAfb r、ThyAおよびカナマイシン耐性を含む) の投与により得られた薬物動態および薬力学を50日にわたり比較した。結果から、これらの投与条件下では、糞便中に対照カナマイシン耐性ニッスルと同様の量の細菌が栄養要求体SYN-UCD303について回収されたことがわかる。同様の結果がマウスにおいて観測された。

【図38】肝性脳症および高アンモニア血症を特徴とする他の障害を治療するための例示的合成遺伝子回路を示す図である。アンモニア変換回路において、アンモニアが細菌 (例えば、大腸菌ニッスル) によって取り込まれ、グルタミン酸に変換され、グルタミン酸がその後アルギニンに代謝される。アルギニンは、最終的に細菌細胞から出ていく。

【図39】本発明の一実施形態を示す図である。この実施形態では、遺伝子操作細菌は、肝性脳症の治療のための4つの例示的回路を含む。1つの回路において、アンモニアが細菌によって取り込まれ、グルタミン酸に変換され、グルタミン酸がその後アルギニンに代

10

20

30

40

50

謝される。アルギニンは、最終的に細菌細胞から出ていく。第2の回路において、GABA膜輸送タンパク質(GabP)がgabP遺伝子により発現され、細胞内へのGABAの輸送を促進する。第3の回路において、細菌マンガン輸送タンパク質(MntH)がmntH遺伝子により発現され、細胞内へのマンガンの輸送を促進する。第4の回路において、酪酸遺伝子カセットの発現が酪酸の産生、およびこの消化管バリア増強分子の細胞外への放出をもたらす。いくつかの実施形態では、4つの回路すべてがそれぞれ同じ誘導性プロモーターの制御下にある。他の実施形態では、4つの回路が異なる誘導性プロモーターの制御下にある。例示的誘導性プロモーターは、酸素レベル依存性プロモーター(例えば、FNR誘導性プロモーター)、HE特異的分子または肝損傷を示す代謝物(例えば、ビリルビン)により誘導されるプロモーター、炎症または炎症反応により誘導される

10

プロモーター、および消化管内に自然に存在し得るまたはし得ない(例えば、外から加えることができる)代謝物、例えば、アラビノースにより誘導されるプロモーターを含む。
【図40】本発明の一実施形態を示す図である。この実施形態では、遺伝子操作細菌は、肝性脳症の治療のための2つの例示的回路を含む。1つの回路において、アンモニアが細菌によって取り込まれ、グルタミン酸に変換され、グルタミン酸がその後アルギニンに代謝される。アルギニンは、最終的に細菌細胞から出ていく。第2の回路において、GABA膜輸送タンパク質(GabP)がgabP遺伝子により発現され、細胞内へのGABAの輸送を促進する。いくつかの実施形態では、両回路が同じ誘導性プロモーターの制御下にある。他の実施形態では、2つの回路がそれぞれ異なる誘導性プロモーターの制御下にある。例示的誘導性プロモーターは、酸素レベル依存性プロモーター(例えば、FNR誘導性プロモーター)、HE特異的分子または肝損傷を示す代謝物(例えば、ビリルビン)により誘導されるプロモーター、炎症または炎症反応により誘導されるプロモーター、および消化管における天然に存在する可能性があるまたは可能性がない(例えば、外から加えることができる)代謝物、例えば、アラビノースにより誘導されるプロモーターを含む。他の実施形態では、遺伝子操作細菌は、GABAのレベルを低下させるための追加の回路、例えば、GABAを代謝する(異化する)ための回路をさらに含む。

20

【図41】図41Aは、合成遺伝子回路を含む遺伝子操作細菌への取込みの後のGABAの異化を示す図である。細胞への侵入により、GABAがGABA-ケトグルタル酸トランスアミナーゼ(GSST)によりスクシニルセミアルデヒドに変換される。次にコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(SSDH)が、GABA異化における第2および唯一の他の特定のステップである、スクシニルセミアルデヒドのコハク酸への酸化を触媒する。最終的に、コハク酸がクエン酸(TCA)回路の基質になる。GOT(グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ)は、アルファ-ケトグルタル酸をグルタミン酸に変換する。特定の実施形態では、本開示の遺伝子操作細菌は、GSST、SSDHおよびGOTのうちの1つまたは複数を含むが、これらに限定されないGABA消費回路を含む。図41Bは、大腸菌ニッスルにおけるGABA利用経路の概略図である。

30

【図42】本発明の一実施形態を示す図である。この実施形態では、遺伝子操作細菌は、肝性脳症の治療のための2つの例示的回路を含む。1つの回路において、アンモニアが細菌によって取り込まれ、グルタミン酸に変換され、グルタミン酸がその後アルギニンに代謝される。アルギニンは、最終的に細菌細胞から出ていく。第2の回路において、細菌マンガン輸送タンパク質(MntH)がmntH遺伝子により発現され、細胞内へのマンガンの輸送を促進する。いくつかの実施形態では、両回路が同じ誘導性プロモーターの制御下にある。他の実施形態では、2つの回路がそれぞれ異なる誘導性プロモーターの制御下にある。例示的誘導性プロモーターは、酸素レベル依存性プロモーター(例えば、FNR誘導性プロモーター)、HE特異的分子または肝損傷を示す代謝物(例えば、ビリルビン)により誘導されるプロモーター、炎症または炎症反応により誘導されるプロモーター、および消化管における天然に存在する可能性があるまたは可能性がない(例えば、外から加えることができる)代謝物、例えば、アラビノースにより誘導されるプロモーターを含む。

40

【図43】本発明の一実施形態を示す図である。この実施形態では、遺伝子操作細菌は、

50

肝性脳症の治療のための2つの例示的回路を含む。1つの回路において、アンモニアが細菌によって取り込まれ、グルタミン酸に変換され、グルタミン酸がその後アルギニンに代謝される。アルギニンは、最終的に細菌細胞から出ていく。第2の回路において、酪酸遺伝子カセットの発現が酪酸の産生、およびこの消化管バリア増強分子の細胞外への放出をもたらす。いくつかの実施形態では、両回路が同じ誘導性プロモーターの制御下にある。他の実施形態では、2つの回路がそれぞれ異なる誘導性プロモーターの制御下にあり得る。例示的誘導性プロモーターは、酸素レベル依存性プロモーター（例えば、FNR誘導性プロモーター）、HE特異的分子または肝損傷を示す代謝物（例えば、ビリルビン）により誘導されるプロモーター、炎症または炎症反応により誘導されるプロモーター、および消化管における天然に存在する可能性があるまたは可能性がない（例えば、外から加えることができる）代謝物、例えば、アラビノースにより誘導されるプロモーターを含む。本明細書に記載の酪酸カセットのうちの1つまたは複数は、アルギニン（および/またはシトルリン）産生回路を含む遺伝子操作細菌により発現させることができる。

10

【図44】複数の作用機構(MoAs)を含む大腸菌1917ニッスル染色体の例示的概略図である。

【図45】複数のMoAsを含む大腸菌1917ニッスル染色体の例示的概略図である。いくつかの実施形態では、アンモニア変換回路、酪酸産生回路、GABA輸送および/またはGABA代謝回路、ならびにマンガン輸送回路が4つまたはそれ以上の異なる染色体挿入部位に挿入されている。

【図46】図46Aは、複数のMoAsを含む大腸菌1917ニッスル染色体の例示的概略図である。アンモニア変換回路、酪酸産生回路、ならびにGABA輸送および/またはGABA代謝回路が3つの異なる染色体挿入部位に挿入されている。図46Bは、複数のMoAsを含む大腸菌1917ニッスル染色体の例示的概略図である。アンモニア変換回路、GABA輸送および/またはGABA代謝回路、ならびにマンガン輸送回路が3つまたはそれ以上の異なる染色体挿入部位に挿入されている。

20

【図47】図47Aは、複数のMoAsを含む大腸菌1917ニッスル染色体の例示的概略図である。アンモニア変換回路およびマンガン輸送回路が2つの異なる染色体挿入部位に挿入されている。図47Bは、複数のMoAsを含む大腸菌1917ニッスル染色体の例示的概略図である。アンモニア変換回路、ならびにGABA輸送および/またはGABA代謝回路が2つまたはそれ以上の異なる染色体挿入部位に挿入されている。

30

【図48】図48Aは、酪酸の産生のための代謝経路を示す。図48Bおよび図48Cは、両方がテトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下にある、2種の酪酸産生回路(SYN-UCD503およびSYN-UCD504に見いだされる)の概略図を示す。図48Dは、テトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下の第3の酪酸遺伝子カセット(SYN-UCD505に見いだされる)の概略図を示す。SYN-UCD503は、プラスミド上のtetプロモーターの制御下のbcd2酪酸カセットを含む。「bcd2カセット」または「bcd2酪酸カセット」は、少なくとも次の遺伝子を含む酪酸産生カセットを意味する: bcd2、etfB3、etfA3、hbd、crt2、pbtおよびbuk遺伝子。SYN-UCD504は、プラスミド上のtetプロモーターの制御下のter酪酸カセット(ter遺伝子がbcd2、etfB3およびetfA3遺伝子を置換する)を含む。「terカセット」または「ter酪酸カセット」は、少なくとも次の遺伝子を含む酪酸産生カセットを意味する: ter、thiA1、hbd、crt2、pbt、buk。SYN-UCD505は、プラスミド上のtetプロモーターの制御下のtesB酪酸カセット(ter遺伝子が存在し、tesB遺伝子がpbt遺伝子およびbuk遺伝子を置換する)を含む。「tesもしくはtesBカセット」または「tesもしくはtesB酪酸カセット」は、少なくともter、thiA1、hbd、crt2およびtesB遺伝子を含む酪酸産生カセットを意味する。本開示の代替酪酸カセットは、少なくともbcd2、etfB3、etfA3、thiA1、hbd、crt2およびtesB遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、tesまたはtesBカセットは、テトラサイクリン以外の誘導性プロモーターの制御下にある。tesBカセットの発現を制御し得

40

50

る例示的誘導性プロモーターは、酸素レベル依存性プロモーター（例えば、FNR誘導性プロモーター）、HE特異的分子または肝損傷を示す代謝物（例えば、ビリルビン）により誘導されるプロモーター、炎症または炎症反応により誘導されるプロモーター（RNS, ROSプロモーター）、ならびに消化管における天然に存在する可能性があるまたは可能性がない（例えば、外から加えることができる）代謝物、例えば、アラビノースおよびテトラサイクリンにより誘導されるプロモーターを含む。

【図49】本開示の例示的な操作細菌の遺伝子構成および酪酸の産生のための嫌気性または炎症条件下でのそれらの誘導を示す図である。図49Aおよび49Bに本発明の例示的組換え細菌の遺伝子構成および低酸素条件下でのその誘導を示す。図49Aに酸素（ O_2 ）が、FNR（灰色の四角囲みの「FNR」）が二量体化し、FNR応答性プロモーター（「FNRプロモーター」）を活性化することを妨げる（「X」印で示す）好氣的条件下での比較的到低い酪酸の産生を示す。したがって、酪酸生合成酵素（bcd2、etfB3、etfA3、thiA1、hbd、crt2、pbtおよびbuk；黒色の四角囲み）のいずれも発現しない。図49BにFNR二量体化（灰色の四角囲みの2つの「FNR」）、FNR応答性プロモーターに結合すること、および酪酸の産生をもたらす、酪酸生合成酵素の発現を誘導することによる低酸素条件下での酪酸の産生の増大を示す。図49Cおよび49Dに本発明の例示的組換え細菌の遺伝子構成および酸化窒素（NO）の存在下でのその抑制解除を示す。図49Cにおいて、NOの非存在下では、Ns r R転写因子（灰色の丸囲み、「Ns r R」）が対応する調節領域に結合し、抑制する。したがって、酪酸生合成酵素（bcd2、etfB3、etfA3、thiA1、hbd、crt2、pbt、buk；黒色の四角囲み）のいずれも発現しない。図49Dにおいて、NOの存在下では、Ns r R転写因子がNOと相互作用し、もはや調節領域に結合もせず、抑制もしない。これは、酪酸生合成酵素の発現（灰色の矢印および黒色のくねった線で示す）および最終的に酪酸の産生をもたらす。図49EおよびFに本発明の例示的組換え細菌の遺伝子構成および H_2O_2 の存在下でのその誘導を示す。図49Eにおいて、 H_2O_2 の非存在下では、Oxy R転写因子（灰色の丸囲み、「Oxy R」）がoxy Sプロモーターに結合するが、それを誘導しない。したがって、酪酸生合成酵素（bcd2、etfB3、etfA3、thiA1、hbd、crt2、pbt、buk；黒色の四角囲み）のいずれも発現しない。図49Fにおいて、 H_2O_2 の存在下では、Oxy R転写因子が H_2O_2 と相互作用し、次にoxy Sプロモーターを誘導することができる。これは、酪酸生合成酵素の発現（灰色の矢印および黒色のくねった線で示す）および最終的に酪酸の産生をもたらす。

【図50】本開示の例示的な組換え細菌の遺伝子構成および酪酸の産生のための嫌気性または炎症条件下でのそれらの誘導を示す図である。図50Aおよび50Bに本発明の例示的組換え細菌の遺伝子構成および低酸素条件下でのその誘導を示す。図50Aに酸素（ O_2 ）が、FNR（灰色の四角囲みの「FNR」）が二量体化し、FNR応答性プロモーター（「FNRプロモーター」）を活性化することを妨げる（「X」印で示す）好氣的条件下での比較的到低い酪酸の産生を示す。したがって、酪酸生合成酵素（ter、thiA1、hbd、crt2、pbtおよびbuk；黒色の四角囲み）のいずれも発現しない。図50BにFNR二量体化（灰色の四角囲みの2つの「FNR」）、FNR応答性プロモーターに結合すること、および酪酸の産生をもたらす、酪酸生合成酵素の発現を誘導することによる低酸素条件下での酪酸の産生の増大を示す。図50Cおよび50Dに本発明の他の例示的組換え細菌の遺伝子構成およびNOの存在下でのその抑制解除を示す。図50Cにおいて、NOの非存在下では、Ns r R転写因子（灰色の丸囲み、「Ns r R」）が対応する調節領域に結合し、抑制する。したがって、酪酸生合成酵素（ter、thiA1、hbd、crt2、pbt、buk；黒色の四角囲み）のいずれも発現しない。図50Dにおいて、NOの存在下では、Ns r R転写因子がNOと相互作用し、もはや調節配列に結合もせず、抑制もしない。これは、酪酸生合成酵素の発現（灰色の矢印および黒色のくねった線で示す）および最終的に酪酸の産生をもたらす。図50Eおよび50Fに本発明の他の例示的組換え細菌の遺伝子構成および H_2O_2 の存在下でのその誘導を示す。

10

20

30

40

50

図50Eにおいて、 H_2O_2 の非存在下では、 $OxyR$ 転写因子(灰色の丸囲み、「 $OxyR$ 」)が $oxyS$ プロモーターに結合するが、それを誘導しない。したがって、酪酸合成酵素(ter 、 $thiA1$ 、 hbd 、 $crt2$ 、 pbt 、 buk ; 黒色の四角囲み)のいずれも発現しない。図50Fにおいて、 H_2O_2 の存在下では、 $OxyR$ 転写因子が H_2O_2 と相互作用し、次に $oxyS$ プロモーターを誘導することができる。これは、酪酸合成酵素の発現(灰色の矢印および黒色のくねった線で示す)および最終的に酪酸の産生をもたらす。

【図51】図48に示した回路(SYN-UCD-503、SYN-UCD-504、SYN-UCD-505)を用いた酪酸産生のグラフである。細胞を0.2%グルコースを含むM9最少培地中で増殖させ、初期対数期にATCにより誘導した。図51Aに見られるように、好気性嫌気的条件下で各構築物について同様の量の酪酸が産生された。 ter 菌株は、全般的により多くの酪酸を産生する。SYN-UCD503は、 $pLogic031$ (プラスミド上の tet プロモーターの制御下の $bdc2$ 酪酸カセット)を含み、SYN-UCD504は、 $pLogic046$ (プラスミド上の tet プロモーターの制御下の ter 酪酸カセット)を含む。図51BにSYN-UCD504($pLogic046$ (プラスミド上の tet プロモーターの制御下の ter 酪酸カセット))ならびにSYN-UCD505(プラスミド $pLOGIC046$ -デルタ $pbt.buk/tesB+$ 、 $pbt.buk$ 遺伝子の欠失および $tesB$ 遺伝子によるそれらの置換を含む酪酸構築物を含むATC誘導性 ter を含むニッスル株)の酪酸の産生を示す。 $tesB$ 構築物は、より大きい酪酸の産生をもたらす。

【図52】 $nuoB$ 遺伝子の欠失を含む異なる酪酸産生回路を用いた酪酸の産生のグラフである。示した菌株は、SYN-UCD503、SYN-UCD504、SYN-UCD510(SYN-UCD510は、それが $nuoB$ 欠失をさらに含むことを除いてSYN-UCD503と同じである)およびSYN-UCD511(SYN-UCD511は、それが $nuoB$ 欠失をさらに含むことを除いてSYN-UCD504と同じである)である。 $NuoB$ 遺伝子の欠失は、酪酸産生菌株における野生型親対照と比較してより大きいレベルの酪酸産生をもたらす。 $NuoB$ は、呼吸成長時の $NADH$ の酸化に参与する主要なタンパク質複合体である。いくつかの実施形態では、 $NADH$ 酸化と電子伝達との共役を妨げることにより、酪酸の産生を維持するために用いられる $NADH$ の量が増加する。

【図53】図53Aは、 FNR プロモーターの制御下の酪酸産生回路の概略図である。図53Bは、酪酸産生の嫌気性誘導の棒グラフである。 FNR 応答性プロモーターを bcd または ter 回路を含む酪酸カセットに融合させた。形質転換細胞をLBにおいて初期対数期まで増殖させ、嫌気性チャンバー内に4時間入れて、酪酸遺伝子の発現を誘導した。細胞を洗浄し、0.5%グルコースを含む最少培地に再懸濁し、微好氣的にインキュベートして、酪酸の産生を経時的にモニターした。SYN-UCD501は、嫌気的条件下で有意な酪酸産生をもたらした。図53Cは、*in vitro*でのグルコースおよび酸素の存在下および非存在下でのSYN-UCD501についての棒グラフである。SYN-UCD501は、 $pSC101$ $PydfZ-ter$ 酪酸プラスミドを含み、SYN-UCD500は、 $pSC101$ $PydfZ-bcd$ 酪酸プラスミドを含み、SYN-UCD506は、 $pSC101$ $nirB-bcd$ 酪酸プラスミドを含む。図53Dは、HEの*in vivo*モデルにおける糞便試料を用いてELISAにより定量したマウスリポカリン2およびカルプロテクチンのレベルを示すグラフである。SYN-UCD501は、対照SYN-UCD103と比較して炎症を低減し、かつ/または消化管バリア機能を保護する。

【図54】(1)酪酸産生菌株、(2)アルギニン産生菌株(アンモニア消費菌株)ならびに(3)酪酸を産生し、アンモニアも消費する菌株についての*in vitro*でのアルギニン(図54A)および酪酸(図54B)産生を示す棒グラフである。SYN-UCD501($Logic156$ ($pSC101$ $PydfZ-ter$ 酪酸プラスミド; amp 耐性)を含む酪酸産生菌株)、ならびにSYN-UCD305($ArgR$ 、 $malE$ K 遺伝子座において染色体に組み込まれた $PfnrS-ArgA$ および $ThyA$

10

20

30

40

50

を含み、抗生物質耐性を含まないアルギニン産生/アンモニア消費菌株)、ならびにSYN-UCD601(ArgR、malEK遺伝子座において染色体に組み込まれたPfnrS-ArgAfbR、ThyAおよびLogic156(pSC101 PydfZ-ter 酪酸プラスミド; amp耐性)を含む酪酸産生およびアルギニン産生/アンモニア消費菌株)。データから、SYN-UCD601がin vitroでSYN-UCD305と同様のレベルのアルギニンを、またSYN-UCD501と同様のレベルの酪酸を産生することができることがわかる。

【図55】本発明の例示的な操作細菌の遺伝子構成およびプロピオン酸の産生のための低酸素条件下でのその誘導を示す図である。図55Aに酸素(O₂)が、FNR(灰色の四角囲みの「FNR」)が二量体化し、FNR応答性プロモーター(「FNRプロモーター」)を活性化することを妨げる(「X」印で示す)好氣的条件下での比較的により低いプロピオン酸の産生を示す。したがって、プロピオン酸生合成酵素(pct、lcdA、lcdB、lcdC、etfA、acrB、acrC; 黒色の四角囲み)のいずれも発現しない。図55BにFNR二量体化(灰色の四角囲みの2つの「FNR」)、FNR応答性プロモーターに結合すること、およびプロピオン酸の産生をもたらす、プロピオン酸生合成酵素の発現を誘導することによる低酸素条件下でのプロピオン酸の産生の増大を示す。

【図56】例示的なプロピオン酸生合成遺伝子カセットを示す図である。

【図57】図57A、57Bおよび57Cは、例示的な操作された細菌の遺伝子構成およびプロピオン酸の産生のための低酸素条件下でのその誘導を示す図である。図57Aに酸素(O₂)が、FNR(灰色の四角囲みの「FNR」)が二量体化し、FNR応答性プロモーター(「FNRプロモーター」)を活性化することを妨げる(「X」印で示す)好氣的条件下での比較的により低いプロピオン酸の産生を示す。したがって、プロピオン酸生合成酵素(thrA、thrB、thrC、ilvA、aceE、aceF、lpd; 黒色の四角囲み)のいずれも発現しない。図57BにFNR二量体化(灰色の四角囲みの2つの「FNR」)、FNR応答性プロモーターに結合すること、およびプロピオン酸の産生をもたらす、プロピオン酸生合成酵素の発現を誘導することによる低酸素条件下でのプロピオン酸の産生の増大を示す。図57Cに例示的なプロピオン酸生合成遺伝子カセットを示す。

【図58】本発明の例示的な操作細菌の遺伝子構成およびプロピオン酸の産生のための低酸素条件下でのその誘導を示す図である。図58Aに酸素(O₂)が、FNR(灰色の四角囲みの「FNR」)が二量体化し、FNR応答性プロモーター(「FNRプロモーター」)を活性化することを妨げる(「X」印で示す)好氣的条件下での比較的により低いプロピオン酸の産生を示す。したがって、プロピオン酸生合成酵素(thrA、thrB、thrC、ilvA、aceE、aceF、lpd、tesB; 黒色の四角囲み)のいずれも発現しない。図58BにFNR二量体化(灰色の四角囲みの2つの「FNR」)、FNR応答性プロモーターに結合すること、およびプロピオン酸の産生をもたらす、プロピオン酸生合成酵素の発現を誘導することによる低酸素条件下でのプロピオン酸の産生の増大を示す。

【図59】例示的なプロピオン酸生合成遺伝子カセットを示す図である。

【図60】図60Aおよび60Bは、正のフィードバック栄養要求体を作製し、高アルギニン産生のために選択するために用いることができる例示的な構築物を示す図である。図60AにthyAの発現を駆動するastCプロモーターのマップを示す。図60BにastCプロモーターの制御下のthyA遺伝子の概略図を示す。調節領域は、CRP、ArgRおよびRNAポリメラーゼ(RNAP)の結合部位を含み、追加の調節エレメントも含み得る。

【図61】アンモニアをシトルリンまたはアルギニンなどの所望の産物への変換により、尿素回路異常症(UCD)を標的にするための操作細菌菌株の他の例示的な実施形態を示す図である。該菌株は、argRが欠失し、フィードバック抵抗性argAfbR遺伝子を発現する。いくつかの実施形態では、この菌株は、染色体上の1つまたは複数の栄養要求性の改変をさらに含む。尿素回路異常症(UCD)を標的にするように操作された合成生

10

20

30

40

50

物も図65に記載するキルスイッチ実施形態を有する。この例では、IntリコンビナーゼおよびKid-Kis毒素抗毒素システムをUCDを治療するための組換え細菌細胞に用いる。組換え細菌細胞は、過剰のアンモニアを消費して、患者予後を改善するための有益な副産物を産生するように操作されている。組換え細菌細胞は、安全性を保証するための高度に制御可能なキルスイッチも含む。低酸素環境（例えば、消化管内に見いだされるような）に反応して、FNRプロモーターは、Intリコンビナーゼの発現を誘導し、Kis抗毒素の発現も誘導する。Intリコンビナーゼは、Kid毒素遺伝子を活性化立体配座に転換させるが、蓄積されたKis抗毒素の存在が発現Kid毒素の活性を抑制する。酸素の存在下（例えば、消化管外）では、抗毒素の発現は停止する。毒素は、構成的に発現するので、蓄積し続け、細菌細胞を殺滅する。高アンモニア血症は、他の病変にも寄

10

【図62】図62

【図63】図63

【図64】図64

【図65】図65

【図66】図66Aは、異種遺伝子の発現が外因性環境シグナルにより活性化される、本開示の他の非限定的な実施形態を示す図である。アラビノースの非存在下では、AraC転写因子は、転写を抑制する立体配座をとる。アラビノースの存在下では、AraC転写因子は、これをParaBADプロモーター（ParaBAD）に結合させ、それを活性化させる立体配座の変化を受け、これがTetリプレッサー（TetR）および抗毒素の発現を誘導する。抗毒素は、組換え細菌細胞内に蓄積し、一方、TetRは、毒素（TetR結合部位を有するプロモーターの制御下にある）の発現を妨げる。しかし、アラビノースが存在しない場合、抗毒素およびTetRの両方が発現しない。毒素の発現を抑制するTetRが存在しないので、毒素は、発現し、細胞を殺滅する。図66Aに組換え細菌に見いだされない必須遺伝子の発現が外因性環境シグナルによって活性化される、本開示の他の非限定的な実施形態も示す。アラビノースの非存在下では、AraC転写因子は、ParaBADプロモーターの制御下の必須遺伝子の転写を抑制する立体配座をとり、細菌細胞は生存することができない。アラビノースの存在下では、AraC転写因子は、これをParaBADプロモーターに結合させ、それを活性化させる立体配座の変化を受け、これが必須遺伝子の発現を誘導し、細菌細胞の生存能力を維持する。図66Bは、抗毒素が構成的プロモーターから発現し、異種遺伝子の発現が外因性環境シグナルにより活性化される、本開示の非限定的な実施形態を示す図である。アラビノースの非存在下では、AraC転写因子は、転写を抑制する立体配座をとる。アラビノースの存在下では、AraC転写因子は、これをParaBADプロモーターに結合させ、それを活性化させる立体配座の変化を受け、これがTetRの発現を誘導し、ひいては毒素の発現を妨げる。しかし、アラビノースが存在しない場合、TetRは、発現せず、毒素が発現し、最終的に抗毒素に打ち勝ち、細胞を殺滅する。抗毒素の発現を調節する構成的プロモーターは、毒素の発現を駆動するプロモーターより弱いプロモーターであるべきである。araC遺伝子は、この回路における構成的プロモーターの制御下にある。図66Cは、異種遺伝子の発現が外因性環境シグナルにより活性化される、本開示の他の非限定的な実施形態を示す図である。アラビノースの非存在下では、AraC転写因子は、転写を抑制する立体配座をとる。アラビノースの存在下では、AraC転写因子は、これをParaBADプロモーターに結合させ、それを活性化させる立体配座の変化を受け、これがTetリプレッサー（TetR）および抗毒素の発現を誘導する。抗毒素は、組換え細菌細胞内に蓄積し、一方、TetRは、毒素（TetR結合部位を有するプロモーターの制御下にある）の発現を妨げる。しかし、アラビノースが存在しない場合、抗毒素およびTetRの両方が発現しない。毒素の発現を抑制するTetRが存在しないので、毒素は、発現し、細胞を殺滅する。araC遺伝子は、この回路における構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター（例えば、AraCプロモーター）の制御下にある。

20

30

40

【図67】操作された安全構成要素としてのGeneGuardsの使用を示す図である

50

。すべての操作されたDNAは、条件付きで破壊することができるプラスミド上に存在する。例えば、Wrightら、「GeneGuard: A Modular Plasmid System Designed for Biosafety」、ACS Synthetic Biology (2015) 4巻、307~316頁を参照されたい。

【図68】短寿命抗毒素および長寿命毒素の両方を産生するプラスミドを含むプラスミド安定システムを含む、本開示の1つの非限定的な実施形態を示す図である。細胞がプラスミドを失った場合、抗毒素がもはや産生されず、毒素が細胞を殺滅する。一実施形態では、遺伝子操作細菌は、等量のHok毒素および短寿命Sok抗毒素を産生する。上のパネルにおいて、細胞は、等量の毒素および抗毒素を産生し、安定である。中間のパネルにおいて、細胞は、プラスミドを失い、抗毒素が崩壊し始める。下のパネルにおいて、抗毒素が完全に崩壊し、細胞が死ぬ。

10

【図69】細胞内で発現したキメラペプチドを内および外膜を越えて周囲宿主環境に移動させることができるようにペプチドを天然鞭毛成分のN末端鞭毛分泌シグナルに組換えにより融合させることによって、不完全鞭毛を用いて、目的の治療用ペプチド(星)を分泌する鞭毛III型分泌に基づく分泌システムの概略図である。

【図70】治療用ペプチド(星)をN末端分泌シグナル、リンカーおよび自己輸送体のベータ-ドメインに融合させることができる、組換えタンパク質の細胞外産生のためのV型分泌システムの概略図である。このシステムにおいて、N末端シグナル配列は、タンパク質を内膜を越えてペリプラズム内に移動させるSecA-YEGマシナリーにタンパク質を導き、その後、シグナル配列の切断が起こる。ベータ-ドメインは、Bam複合体に動員され、そこでベータ-ドメインが折りたたまれ、ベータ-バレル構造として外膜に挿入される。次いで治療用ペプチドは、リンカー配列の前にベータ-バレル構造の中空孔を通り抜ける。治療用ペプチドは、自触媒切断によってまたはリンカーにおける相補的プロテアーゼ切断部位への膜結合ペプチド(ハサミ)の標的化によってリンカーシステムから解放される。

20

【図71】内および外膜の両方を通るチャンネルを形成するHlyB(ATP結合カセット輸送体)、HlyD(膜融合タンパク質)およびTolC(外膜タンパク質)を用いてパッセンジャーペプチドを細胞質から細胞外腔に直接転位させる、I型分泌システムの概略図である。HlyAの分泌シグナル含有C末端部分を治療用ペプチド(星)のC末端部分に融合させて、このペプチドの分泌を媒介する。

30

【図72】漏出性または不安定化外膜を作製し、それにより、細胞外腔への治療用ポリペプチド、例えば、ジスルフィド結合を含む真核生物由来の治療用ポリペプチドの転位を促進するためのグラム陰性細菌の外および内膜、ならびにいくつかの欠失標的の概略図である。外膜をペプチドグリカン骨格につなぎ留めるタンパク質をコードする1つもしくは複数の遺伝子、例えば、lpp、ompC、ompA、ompF、tolA、tolB、pal、および/またはペリプラズムプロテアーゼをコードする1つもしくは複数の遺伝子、例えば、degS、degP、nlp1の不活性化突然変異は、漏出性表現型を発生させる。突然変異の組合せは、漏出性表現型を相乗的に増強させ得る。

【図73】細菌が消化管内腔に分泌治療用タンパク質を注入することを可能にする改変された3型分泌システム(T3SS)を示す図である。誘導性プロモーター(小矢印、上)、例えば、FNR誘導性プロモーターは、タグ付きペプチドを細胞外に分泌する装置を作るT3分泌システム遺伝子カセット(3つの大矢印、上)の発現を誘導する。誘導性プロモーター(小矢印、下)、例えば、FNR誘導性プロモーターは、次にタグ付き治療用ペプチド(六角形)の発現を活性化する、調節因子、例えば、T7ポリメラーゼの発現を駆動する。

40

【図74】例示的なL-ホモセリンおよびL-メチオニン生合成経路を示す図である。円形は、MetJにより抑制される遺伝子を表し、metJの欠失は、これらの遺伝子の構成的発現および経路の活性化をもたらす。

【図75】例示的なヒスチジン生合成経路を示す図である。

50

【図76】例示的なリシン生合成経路を示す図である。

【図77】例示的なアスパラギン生合成経路を示す図である。

【図78】例示的なグルタミン生合成経路を示す図である。

【図79】例示的なトリプトファン生合成経路を示す図である。

【図80】本開示の遺伝子操作細菌を設計し、作製する非限定的な方法の概略を示す図である。「定義する」ステップは、1. 微生物生理学および疾患生物学に基づく多様な候補アプローチの特定、2. 候補代謝経路を決定するためのバイオインフォマティクスの使用、最適化操作された合成生物の要求される性能目標を決定するための予測ツールの使用を含む。「設計する」ステップは、1. 経路構成のコンビナトリアル試験を可能にするための最先端のDNAアセンブリ、2. 経路の効率を予測するための数学モデル、3. 操作された回路の制御および調節を可能にする専用のスイッチおよび部品の内部安定の使用を含む。「構築する」ステップは、1. コア構造「シャーシー」を構築すること、2. 操作された回路を、効率的発現のための最適な染色体位置に安定に組み込むこと、3. 固有の機能アッセイを用いて、遺伝子回路の忠実性および活性を評価することを含む。「組み込む」ステップは、1. 動物モデルにおける合成生物の局在および通過時間のモニタリングを可能にする、染色体マーカーの使用、2. 特定の疾患状態がGI微生物叢および当環境における合成生物の挙動にどのように影響を及ぼすかの理解を拡大するための専門のマイクロバイオームネットワークおよびバイオインフォマティクスを利用すること、3. 開発候補の前臨床への速やかで、途切れのない移行を可能にする、発見段階における組織内での方法の開発研究および最適化を活発にすること、候補合成生物の用意周到で、高品質の試験を支援する、特殊疾患動物モデルの改良の広範な経験を利用することを含む。

【図81】図81A、B、C、DおよびEは、本開示の遺伝子操作細菌の上流および下流生産のための非限定的な製造方法の略図である。図81Aは、種培養1(SC1)のパラメーター：白金耳量 - グリセロール保存液、継続時間一夜、温度37℃、250rpmで振盪を示す。図81Bは、種培養2(SC2)のパラメーター：SC1からの1/100希釈、継続時間1.5時間、温度37℃、250rpmで振盪を示す。図81Cは、生産バイオリクターのパラメーター：接種物 - SC2、温度37℃、pH設定点7.00、pH不感帯0.05、溶存酸素設定点50%、溶存酸素カスケード攪拌/ガスFLO、攪拌限界300~1200rpm、ガスFLO限界1分当たり0.5~20標準リットル、継続時間24時間を示す。図81Dは、収集のパラメーター：4000rpmの速度および30分の継続時間での遠心分離、洗浄1×10%グリセロール/PBS、遠心分離、再懸濁10%グリセロール/PBSを示す。図81Eは、バイアル充填/貯蔵のパラメーター：1~2mLの小分け、-80℃を示す。

【図82】ATC(図82A)または酸化窒素誘導性(図82B)リポーター構築物を示す図である。これらの構築物は、それらの同種誘導物質により誘導された場合、GFPの発現をもたらす。対照、ATC誘導性 P_{tet} -GFPリポーター構築物または酸化窒素誘導性 P_{nsrR} -GFPリポーター構築物を含むプラスミドを含むニッセル細胞は、一連の濃度にわたり誘導した。プロモーター活性は、相対蛍光単位として表す。図82Cは、構築物の概略図を示す図である。

【図83】構成的プロモーターの制御下の $NsrR$ を発現するプラスミドおよび $NsrR$ 誘導性プロモーターの制御下のリポーター遺伝子 gfp (緑色蛍光タンパク質)を含む細菌のドットプロットを示す図である。DSS投与マウスをHEの例示的モデルとする。HE対象と同様に、マウスの消化管は、飲料水に2~3%のデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を添加することによって損傷する。化学発光は、DSS投与マウスにおいて誘導された $NsrR$ 調節プロモーターで示されている。

【図84】野生型ニッセルと比較してより多くの酪酸を産生する、 $pLogic031-nsrR-norB$ -酪酸構築物(SYN-UCD507)または $pLogic046-nsrR-norB$ -酪酸構築物(SYN-UCD508)を含む遺伝子操作ニッセルによる酪酸の産生を示す図である。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

本発明は、遺伝子操作細菌、その医薬組成物、ならびに高アンモニア血症に関連する障害、例えば、尿素回路異常症、肝性脳症および過剰のアンモニアもしくはアンモニアレベルの上昇に関連する他の障害をモジュレートまたは治療する方法を含む。遺伝子操作細菌は、とりわけ、哺乳動物消化管内におけるような、特定の環境条件下で、過剰のアンモニアを減少させることができる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、体内の過剰の窒素を非毒性分子、例えば、アルギニン、シトルリン、メチオニン、ヒスチジン、リシン、アスパラギン、グルタミンまたはトリプトファンに組み込むことによって過剰のアンモニアを減少させる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、過剰のアンモニアを減少させ、1つもしくは複数の他の有毒物質、例えば、GABAおよび/またはマンガンも減少させる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、過剰のアンモニアを減少させ、例えば、GABAを移入することによって、かつ/またはGABAを代謝することによって、GABAレベルも低下させる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、過剰のアンモニアを減少させ、例えば、マンガンを移入することによって、マンガンレベルも減少させる。遺伝子操作細菌は、消化管のバリア機能を改善するあるいはアンモニアの上昇に関連する障害（例えば、UCD、HE等）の症状を軽減する1つまたは複数の分子をさらに産生し得る。したがって、述べた実施形態のいずれかにおいて、遺伝子操作細菌は、消化管のバリア機能を改善するあるいはアンモニアの上昇に関連する障害の症状を軽減する1つまたは複数の分子も産生し得る。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、短鎖脂肪酸、例えば、酪酸、プロピオン酸および/または酢酸を産生する。いくつかの実施形態では、操作細菌は、過剰のアンモニアを減少させ、消化管のバリア機能を改善するあるいはアンモニアの上昇に関連する障害の症状を軽減する1つまたは複数の分子を産生する、例えば、酪酸、プロピオン酸および/または酢酸などの、短鎖脂肪酸を産生する。いくつかの実施形態では、操作細菌は、過剰のアンモニアを減少させ、1つもしくは複数の他の有毒物質、例えば、GABAおよび/またはマンガンを減少させ、消化管のバリア機能を改善するあるいはアンモニアの上昇に関連する障害の症状を軽減する1つもしくは複数の分子を産生する、例えば、酪酸、プロピオン酸および/または酢酸などの、短鎖脂肪酸を産生する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、過剰のアンモニアを減少させ、例えば、GABAを移入することによって、かつ/またはGABAを代謝することによって、GABAレベルを低下させ、消化管のバリア機能を改善するあるいはアンモニアの上昇に関連する障害の症状を軽減する1つもしくは複数の分子を産生する、例えば、酪酸、プロピオン酸および/または酢酸などの、短鎖脂肪酸を産生する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、過剰のアンモニアを減少させ、例えば、マンガンを移入することによって、マンガンレベルを低下させ、消化管のバリア機能を改善するあるいはアンモニアの上昇に関連する障害の症状を軽減する1つもしくは複数の分子を産生する、例えば、酪酸、プロピオン酸および/または酢酸などの、短鎖脂肪酸を産生する。

10

20

30

【 0 0 1 8 】

述べた実施形態のいずれかにおいて、操作細菌は、(1)当技術分野で公知であり、本明細書で示す栄養要求性のいずれか、例えば、thyA栄養要求性などの、1つまたは複数の栄養要求性、(2)本明細書に記載の、あるいは当技術分野で公知のキルスイッチのいずれかなどの、1つまたは複数のキルスイッチ回路、(3)1つまたは複数の抗生物質耐性回路、(4)本明細書に記載の、あるいは当技術分野で公知の輸送体のいずれかのような、生体分子または物質を移入する1つまたは複数の輸送体、(5)本明細書に記載の、あるいは当技術分野で公知の分泌回路のいずれかなどの、1つまたは複数の分泌回路、および(6)そのようなさらなる回路の1つまたは複数の組合せのうちの1つまたは複数を含み得る。

40

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態では、ペイロードもしくは治療回路（例えば、アンモニア消費、GABA減少、マンガン減少、短鎖脂肪酸産生回路）のうちのいずれか1つもしくは複数および/または追加の回路（例えば、栄養要求性、キルスイッチ回路、抗生物質耐性回路、

50

輸送体および分泌回路)のうちのいずれか1つもしくは複数のものは、構成的プロモーターにより調節することができる。いくつかの実施形態では、ペイロードもしくは治療回路(例えば、アンモニア消費、GABA減少、マンガン減少、短鎖脂肪酸産生回路)のうちのいずれか1つもしくは複数および/または追加の回路(例えば、栄養要求性、キルスイッチ回路、抗生物質耐性回路、輸送体および分泌回路)のうちのいずれか1つもしくは複数のものは、組織特異的プロモーターにより調節することができる。いくつかの実施形態では、ペイロードもしくは治療回路(例えば、アンモニア消費、GABA減少、マンガン減少、短鎖脂肪酸産生回路)のうちのいずれか1つもしくは複数および/または追加の回路(例えば、栄養要求性、キルスイッチ回路、抗生物質耐性回路、輸送体および分泌回路)のうちのいずれか1つもしくは複数のものは、誘導性プロモーターにより調節することができる。いくつかの実施形態では、ペイロードもしくは治療回路(例えば、アンモニア消費、GABA減少、マンガン減少、短鎖脂肪酸産生回路)のうちのいずれか1つもしくは複数および/または追加の回路(例えば、栄養要求性、キルスイッチ回路、抗生物質耐性回路、輸送体および分泌回路)のうちのいずれか1つもしくは複数のものは、環境条件、因子もしくはキュー、例えば、哺乳動物消化管に見いだされる環境条件、因子もしくはキューに反応する誘導性プロモーターにより調節することができる。例示的誘導性プロモーターは、酸素レベル依存性プロモーター(例えば、FNR誘導性プロモーター)、HE特異的分子または肝損傷を示す代謝物(例えば、ビリルビン)により誘導されるプロモーター、炎症または炎症反応により誘導されるプロモーター(RNS、ROSプロモーター)、ならびに消化管における天然に存在する可能性があるまたは可能性がない(例えば、外から加えることができる)代謝物、例えば、アラビノースおよびテトラサイクリンにより誘導されるプロモーターを含む。

10

20

【0020】

いくつかの実施形態では、ペイロードもしくは治療回路(例えば、アンモニア消費、GABA減少、マンガン減少、短鎖脂肪酸産生回路)のうちのいずれか1つもしくは複数および/または追加の回路(例えば、栄養要求性、キルスイッチ回路、抗生物質耐性回路、輸送体および分泌回路)のうちのいずれか1つもしくは複数のものは、1つもしくは複数の低コピーまたは高コピープラスミド上に存在し得る。いくつかの実施形態では、ペイロードもしくは治療回路(例えば、アンモニア消費、GABA減少、マンガン減少、短鎖脂肪酸産生回路)のうちのいずれか1つもしくは複数および/または追加の回路(例えば、栄養要求性、キルスイッチ回路、抗生物質耐性回路、輸送体および分泌回路)のうちのいずれか1つもしくは複数のものは、細菌の染色体に組み込むことができる。本開示をより容易に理解することができるために、特定の用語を最初に定義する。これらの定義は、本開示の残りの部分に照らして、また当業者により理解されているように読むべきである。別途定義しない限り、本明細書で用いるすべての技術および科学用語は、当業者により一般的に理解されているのと同じ意味を有する。さらなる定義は、この詳細な説明を通して示す。

30

【0021】

「高アンモニア血症」、「高アンモニア血」または「過剰アンモニア」は、体内のアンモニアの濃度の増加を指すために用いる。高アンモニア血症は、アンモニアの解毒の低下および/または産生の増加によって引き起こされる。解毒の低下は、アルギニノコハク酸尿症、アルギナーゼ欠損症、カルバモイルリン酸シンテターゼ欠損症、シトルリン血症、N-アセチルグルタミン酸シンテターゼ欠損症およびオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症などの、尿素回路異常症(UCD)に、あるいは肝臓のバイパス、例えば、開放肝管、および/またはグルタミンシンテターゼの欠損に起因し得る(Hoffmanら、2013年; Haberleら、2013年)。解毒の低下は、肝性脳症、急性肝不全または慢性肝不全などの肝臓障害およびハンチントン病などの神経変性疾患にも起因し得る(Chenら、2015年; Chiangら、2007年)。アンモニアの産生の増加は、感染、薬物、神経因性膀胱および消化管細菌過増殖に起因し得る(Haberleら、2013年)。高アンモニア血症に関連する他の障害および状態は、肝性脳症、急性肝不全

40

50

または慢性肝不全などの肝臓障害；有機酸障害；イソ吉草酸尿症；3 - メチルクロトニルグリシン尿症；メチルマロン酸尿症；プロピオン酸尿症；脂肪酸酸化欠損；カルニチン回路欠損症；カルニチン欠損症； α -酸化欠損症；リシン尿性タンパク不耐症；ピロリン - 5 - カルボン酸シンテターゼ欠損症；ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損症；オルニチンアミノトランスフェラーゼ欠損症；炭酸脱水酵素欠損症；高インスリン症 - 高アンモニア血症症候群；ミトコンドリア障害；バルプロ酸療法；アスパラギナーゼ療法；完全腸管外栄養；グリシン含有溶液を用いた膀胱鏡検査；肺 / 骨髄移植後；門脈体静脈短絡；尿路感染症；尿管拡張；多発性骨髄腫；および化学療法を含むが、これらに限定されない（Hoffmanら、2013年；Haberleら、2013年；Phamら、2013年；Lazierら、2014年）。健常者では、血漿アンモニア濃度は、一般的に約 $50 \mu\text{mol/L}$ 未満である（Leonard、2006年）。いくつかの実施形態では、高アンモニア血症の診断シグナルは、少なくとも約 $50 \mu\text{mol/L}$ 、少なくとも約 $80 \mu\text{mol/L}$ 、少なくとも約 $150 \mu\text{mol/L}$ 、少なくとも約 $180 \mu\text{mol/L}$ 、または少なくとも約 $200 \mu\text{mol/L}$ の血漿アンモニア濃度である（Leonard、2006年；Hoffmanら、2013年；Haberleら、2013年）。

10

【0022】

「アンモニア」は、気体アンモニア (NH_3)、イオン性アンモニア (NH_4^+) またはそれらの混合物を指すために用いられる。体液中では、気体アンモニアとイオン性アンモニアが以下のように平衡状態にある。



20

【0023】

いくつかの臨床検査で総アンモニア ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) を分析する（Walker、2012年）。本発明のいずれかの実施形態では、特に示さない限り、「アンモニア」は、気体アンモニア、イオン性アンモニアおよび / または総アンモニアを意味し得る。

【0024】

アンモニアの「解毒」は、有毒なアンモニアが除去され、かつ / またはアルギニン、シトルリン、メチオニン、ヒスチジン、リシン、アスパラギン、グルタミン、トリプトファンまたは尿素を含むが、これらに限定されない1つもしくは複数の非毒性分子に変換される、天然または合成の1つまたは複数の過程を指すために用いられる。例えば、尿素回路は、身体から尿中への除去のためにアンモニアを尿素に酵素的に変換する。アンモニアは、多くの生化学的経路を経て合成される、多くのアミノ酸の窒素源であるので、それらのアミノ酸生合成経路のうちの1つまたは複数の増強を用いて、過剰の窒素を非毒性分子に組み込むことができる。例えば、アルギニン生合成は、1個の窒素原子を含むグルタミン酸を4個の窒素原子を含むアルギニンに変換し、それにより、過剰の窒素を非毒性分子に組み込む。ヒトでは、アルギニンは、大腸から再吸収されず、結果として、大腸における過剰のアルギニンは、有害であるとみなされない。同様に、シトルリンは、大腸から再吸収されず、結果として、大腸における過剰のシトルリンは、有害であるとみなされない。アルギニン生合成は、シトルリンを最終産物として産生するように修正することもできる。シトルリンは、3個の窒素原子を含み、したがって、修正経路も過剰の窒素を非毒性分子に組み込むことができる。

30

40

【0025】

「アルギニンレギュロン」、「アルギニン生合成レギュロン」および「アルグレギュロン」は、同義で用いられ、アルギニン生合成経路において、グルタミン酸をアルギニンおよび / または中間代謝物、例えば、シトルリンに変換することに関与する酵素をコードする遺伝子を含む所定の細菌種におけるオペロンの集合を意味する。アルギニンレギュロンは、それらのオペロンに関連するオペレーター、プロモーター、ARGボックスおよび / または調節領域も含む。アルギニンレギュロンは、アルギニン生合成酵素であるN - アセチルグルタミン酸シンテターゼ、N - アセチルグルタミン酸キナーゼ、N - アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、N - アセチルオルニチナーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギノコハク酸シンターゼ、

50

アルギノコハク酸リアーゼ、カルバモイルリン酸シンターゼをコードするオペロン、そのオペレーター、そのプロモーター、そのARGボックスおよび/またはその調節領域を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、アルギニンレギュロンは、N - アセチルグルタミン酸シンターゼおよび/またはN - アセチルオルニチナーゼに加えてあるいはその代わりにオルニチンアセチルトランスフェラーゼをコードするオペロンならびに関連するオペレーター、プロモーター、ARGボックスおよび/または調節領域も含む。いくつかの実施形態では、アルギニンレギュロンの1つもしくは複数のオペロンまたは遺伝子は、細菌におけるプラスミド上に存在し得る。いくつかの実施形態では、細菌は、アルギニンレギュロンにおける任意の遺伝子またはオペロンの複数のコピーを含んでいてよく、1つもしくは複数のコピーは、本明細書に記載の通り突然変異させるか、あるいは変更することができる。

10

【0026】

1つの遺伝子は、1つの酵素、例えば、N - アセチルグルタミン酸シンターゼ (arg A) をコードし得る。2つまたはそれ以上の遺伝子は、1つの酵素の異なるサブユニット、例えば、カルバモイルリン酸シンターゼのサブユニットAおよびサブユニットB (car Aおよびcar B) をコードし得る。いくつかの細菌では、2つまたはそれ以上の遺伝子は、同じ酵素、例えば、オルニチントランスカルバミラーゼをそれぞれ独立にコードし得る (arg Fおよびarg I)。いくつかの細菌では、アルギニンレギュロンは、N - アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする、arg A ; N - アセチルグルタミン酸キナーゼをコードする、arg B ; N - アセチルグルタミルリン酸レダクターゼをコードする、arg C ; アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼをコードする、arg D ; N - アセチルオルニチナーゼをコードする、arg E ; アルギノコハク酸シンターゼをコードする、arg G ; アルギノコハク酸リアーゼをコードする、arg H ; それぞれがオルニチントランスカルバミラーゼを独立にコードする、arg Fおよびarg Iの1つまたは両方; カルバモイルリン酸シンターゼの小サブユニットをコードする、car A ; カルバモイルリン酸シンターゼの大サブユニットをコードする、car B ; そのオペロン; そのオペレーター、そのプロモーター、そのARGボックスおよび/またはその調節領域を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、アルギニンレギュロンは、オルニチンアミノトランスフェラーゼ (N - アセチルグルタミン酸シンターゼおよび/またはN - アセチルオルニチナーゼに加えてあるいはその代わりに) をコードする、arg J、そのオペロン、そのオペレーター、そのプロモーター、そのARGボックスおよび/またはその調節領域を含む。

20

30

【0027】

「アルギニンオペロン」、「アルギニン生合成オペロン」および「argオペロン」は、同義で用いられ、少なくとも1つのプロモーターおよび少なくとも1つのARGボックスを含む共有された調節領域の制御下のアルギニン生合成酵素をコードする遺伝子のうちの1つまたは複数のクラスターを意味する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の遺伝子は、共転写され、かつ/または共翻訳される。アルギニンの生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の任意の組合せを自然にまたは合成によりオペロンに組織化することができる。例えば、枯草菌 (*B. subtilis*) において、N - アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ、N - アセチルグルタミン酸キナーゼ、N - アセチルオルニチナーゼ、N - アセチルグルタミン酸キナーゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、カルバモイルリン酸シンターゼおよびオルニチントランスカルバミラーゼをコードする遺伝子をプロモーターおよびARGボックスを含む共有調節領域の制御下の単一オペロン arg CAEBD - car AB - arg F (例えば、表2参照) に組織化する。大腸菌 K12 およびニッスルにおいて、N - アセチルオルニチナーゼ、N - アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ、N - アセチルグルタミン酸キナーゼおよびアルギノコハク酸リアーゼをコードする遺伝子を2つの2極性オペロン arg ECBH に組織化する。アルギニン生合成に関与する酵素をコードするオペロンを染色体にわたる異なる遺伝子座に分配することができる。非改変細菌において、各オペロンは、Arg R を介してアルギニンにより抑

40

50

制することができる。いくつかの実施形態では、アルギニンおよび/または中間副産物の産生は、本発明の遺伝子操作細菌において、本明細書で示したアルギニン生合成オペロンによりコードされる酵素の発現を変化させることによって変化させることができる。各アルギニンオペロンは、プラスミドまたは細菌染色体上に存在し得る。さらに、任意のアルギニンオペロン、またはアルギニンオペロン内の遺伝子もしくは調節領域の複数のコピーは、細菌に存在し得るものであって、オペロンまたは遺伝子もしくは調節領域の1つもしくは複数のコピーは、本明細書に記載の通り突然変異させるか、あるいは変更することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、コピー数を増加させるために同じ産物（例えば、オペロンまたは遺伝子もしくは調節領域）の複数のコピーを含むようにまたは複数の異なる機能を果たすオペロンの複数の異なる構成要素を含むように操作されている。

10

【0028】

「ARGボックス共通配列」は、ARGボックス核酸配列を意味し、その核酸は、argR、argA、argB、argC、argD、argE、argF、argG、argH、argI、argJ、carAおよび/またはcarBの調節領域のうちの1つまたは複数に高頻度で存在することが公知である。上述のように、各argオペロンは、プロモーターと重複し、レプレッサータンパク質が結合しているARGボックスと呼ばれる少なくとも1つの18ヌクレオチド不完全回文構造配列を含む調節領域を含む（Tianら、1992年）。ARGボックスのヌクレオチド配列は、各オペロンごとに異なり得るものであり、共通ARGボックス配列は、 $\begin{matrix} A & / & T & & n & T & G & A & A & T & & A & / & T & & A & / & T & & T & / & A & & T & / & A & & A & T & T & C & A & n & & T & / & A \end{matrix}$ である（Maas、1994年）。アルギニンリプレッサーは、1つまたは複数のARGボックスに結合して、当1つまたは複数のARGボックスに作動可能に連結したアルギニン生合成酵素（複数可）の転写を能動的に阻害する。

20

【0029】

「突然変異アルギニンレギュロン」または「突然変異型アルギニンレギュロン」は、突然変異アルギニンレギュロンが、同じ条件下で同じ細菌亜型に由来する非改変レギュロンより多くのアルギニンおよび/または中間副産物を産生するように、アルギニン生合成経路における、グルタミン酸をアルギニンおよび/または中間副産物、例えば、シトルリンに変換することに関与する酵素をコードするオペロンのそれぞれのアルギニン媒介抑制を低減または消失させる1つまたは複数の核酸の突然変異を含むアルギニンレギュロンを指すために用いられる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体、例えば、argA^{fbr}ならびにアルギニン生合成酵素N-アセチルグルタミン酸キナーゼ、N-アセチルグルタミン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、N-アセチルオルニチナーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギニノコハク酸シンターゼ、アルギニノコハク酸リアーゼおよびカルバモイルリン酸シンターゼをコードするオペロンのうちの1つまたは複数の少なくとも1つのARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンレギュロンを含み、それにより、レギュロンを活性化し、アルギニンおよび/または中間副産物の生合成を増強する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンリプレッサー機能が低下もしくは不活性化し、または遺伝子操作細菌がアルギニンリプレッサーを有さず（例えば、アルギニンリプレッサー遺伝子が欠失し）、レギュロンの抑制解除ならびにアルギニンおよび/または中間副産物の生合成の増強がもたらされるように、1つもしくは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンリプレッサーを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体、例えば、argA^{fbr}、アルギニン生合成酵素をコードするオペロンのそれぞれの少なくとも1つのARGボックスにおける1つもしくは複数の核酸突然変異を含む、突然変異アルギニンレギュロンおよび/または突然変異もしくは欠失アルギニンリプレッサーを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体、例えば、argA^{fbr}およびアルギニン生合成酵素をコ

30

40

50

ードするオペロンのそれぞれに対する少なくとも1つのARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンレギュロンを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体、例えば、argA^{fbr}およびアルギニンリプレッサーの突然変異または欠失を含む。いくつかの実施形態では、突然変異アルギニンレギュロンは、野生型N-アセチルグルタミン酸シンターゼをコードするオペロンおよび前記オペロンの少なくとも1つのARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む。いくつかの実施形態では、突然変異アルギニンレギュロンは、野生型N-アセチルグルタミン酸シンターゼをコードするオペロンおよび突然変異または欠失アルギニンリプレッサーを含む。いくつかの実施形態では、突然変異アルギニンレギュロンは、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ(N-アセチルグルタミン酸シンターゼおよび/またはN-アセチルオルニチナーゼに加えてあるいはその代わりに)をコードするオペロンならびに前記オペロンの少なくとも1つのARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む。

10

【0030】

ARGボックスは、各アルギニン生合成オペロンの調節領域におけるプロモーターと重複する。突然変異アルギニンレギュロンにおいては、1つまたは複数のアルギニン生合成オペロンの調節領域は、回文構造ARGボックス配列を破壊し、ArgR結合を低減するのに十分に突然変異しているが、天然オペロン特異的プロモーターとして認識されるのに、非突然変異調節領域のプロモーターとの十分に高い相同性を依然として含む。オペロンは、ARGボックスおよびオペロンの調節領域へのArgR結合が低減または消失するように少なくとも1つのARGボックスにおける少なくとも1つの核酸突然変異を含む。いくつかの実施形態では、DNAメチル化から保護される塩基およびArgR結合時にヒドロキシルラジカル攻撃から保護される塩基は、ArgR結合を破壊するための突然変異の主要な標的である(例えば、表3参照)。突然変異調節領域のプロモーターは、RNAポリメラーゼが、作動可能に連結したアルギニン生合成酵素(複数可)の転写を促進するのに十分な親和性でそれに結合するように非突然変異調節領域のプロモーターとの十分に高い相同性を保持している。いくつかの実施形態では、突然変異体のプロモーターのG/C:A/T比は、野生型プロモーターのG/C:A/T比と10%以下異なっている。

20

【0031】

いくつかの実施形態では、複数のARGボックスが単一オペロンに存在し得る。これらの実施形態の一態様では、オペロンにおけるARGボックスのうちの少なくとも1つは、オペロンの調節領域へのArgR結合の必要な低減をもたらすように変更される。これらの実施形態の別の態様では、オペロンにおけるARGボックスのそれぞれは、オペロンの調節領域へのArgR結合の必要な低減をもたらすように変更される。

30

【0032】

ArgR結合の「低減」は、同じ条件下の同じ亜型の細菌における非改変ARGボックスおよび調節領域へのリプレッサー結合と比較して、オペロンにおけるARGボックスへのリプレッサー結合の低減または前記オペロンの調節領域への全リプレッサー結合の低減を指すために用いる。いくつかの実施形態では、オペロンの突然変異ARGボックスおよび調節領域へのArgR結合は、同じ条件下の同じ亜型の細菌における非改変ARGボックスおよび調節領域へのArgR結合より少なくとも約50%低い、少なくとも約60%低い、少なくとも約70%低い、少なくとも約80%低い、少なくとも約90%低い、または少なくとも約95%低い。いくつかの実施形態では、突然変異ARGボックスおよび調節領域へのArgR結合の低減は、オペロンにおける1つまたは複数の遺伝子のmRNA発現の少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約10倍、少なくとも約15倍、少なくとも約20倍、少なくとも約30倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍、少なくとも約600倍、少なくとも約700倍、少なくとも約800倍、少なくとも約900倍、少なくとも約1000倍、または少なくとも約1500倍の増加をもたらす。

40

50

【 0 0 3 3 】

「ArgR」または「アルギニンリプレッサー」は、アルギニンレギュロンにおけるアルギニン生合成遺伝子の転写を調節することによりアルギニン生合成を抑制することができるタンパク質を指すために用いられる。アルギニンリプレッサータンパク質をコードする遺伝子（「argR」）の発現が野生型細菌において増加する場合、アルギニン生合成が減少する。argRの発現が野生型細菌において減少する場合、またはargRが欠失しているかもしくはアルギニンリプレッサー機能を不活性化するように突然変異している場合、アルギニン生合成が増加する。

【 0 0 3 4 】

「機能し得るArgRを欠く」細菌および「ArgR欠失細菌」は、各アルギニンリプレッサーが、同じ条件下の同じ亜型の細菌の非改変アルギニンリプレッサーと比較して活性を著しく低下または消失した細菌を指すために用いられる。アルギニンリプレッサー活性の低下または消失は、例えば、アルギニン生合成遺伝子の転写の増加ならびに/またはアルギニンおよび/もしくは中間副産物、例えば、シトルリンの濃度の増加をもたらし得る。アルギニンリプレッサー活性が低下または消失している細菌は、細菌argR遺伝子を改変することによりまたはargR遺伝子の転写を改変することにより作製することができる。例えば、染色体argR遺伝子を欠失させることができ、突然変異させることができ、またはargR遺伝子を野生型リプレッサー活性を示さないargR遺伝子で置換することができる。

【 0 0 3 5 】

「作動可能に連結した」は、核酸配列の発現が例えば、シスで作動することを可能にする形で調節領域配列に連結している核酸配列、例えば、フィードバック抵抗性ArgAをコードする遺伝子に当てはまる。調節領域は、目的の遺伝子の転写を導くことができる核酸であり、プロモーター配列、エンハンサー配列、応答エレメント、タンパク質認識部位、誘導性エレメント、プロモーター制御エレメント、タンパク質結合配列、5'および3'非翻訳領域、転写開始部位、終結配列、ポリアデニル化配列ならびにイントロンを含むことができる。「誘導性プロモーター」は、1つまたは複数の遺伝子に作動可能に連結している調節領域を意味し、遺伝子の発現が前記調節領域のインデューサーの存在下で増加する。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、低酸素、微好気性または嫌気的条件下により誘導される酸素レベル依存性プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、分子もしくは代謝物、例えば、組織特異的分子もしくは代謝物または肝損傷を示す分子もしくは代謝物により誘導されるプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、代謝物は、腸特異的であり得る。いくつかの実施形態では、代謝物は、肝性脳症に関連付けることができ、例えば、ビリルビンであり得る。分子もしくは代謝物の非限定的な例は、それらの血液および腸における例えば、ビリルビン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、血液凝固因子II、VII、IXおよびX、アルカリホスファターゼ、ガンマグルトアミルトランスフェラーゼ、肝炎抗原および抗体、アルファフェトプロテイン、抗ミトコンドリア、平滑筋および抗核抗体、鉄、トランスフェリン、フェリチン、銅、セルロプラスミン、アンモニアならびにマンガンを含む。これらの分子またはそれらの代謝物のうちの1つに应答するプロモーターを本明細書で示した遺伝子操作細菌に用いることができる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、炎症または炎症反応により誘導されるプロモーター、例えば、RNSまたはROSプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、消化管内に自然に存在し得るまたはし得ない（例えば、体外から加えることができる）代謝物、例えば、アラビノースおよびテトラサイクリンにより誘導されるプロモーターを含む。

【 0 0 3 6 】

「外因性環境条件（複数可）」は、本明細書に記載のプロモーターが誘導される状況（複数可）または環境（複数可）を意味する。「外因性環境条件」という語句は、操作された微生物にとっては外部であるが、宿主対象の環境にとっては内因性または天然の環境条件を意味する。したがって、「外因性」および「内因性」は、同義で用いて、環境条件が

10

20

30

40

50

哺乳動物の身体に対して内因性であるが、完全な微生物細胞に対しては外部または外因性である環境条件を意味することができる。いくつかの実施形態では、外因性環境条件は、哺乳動物の消化管に固有のものである。いくつかの実施形態では、外因性環境条件は、哺乳動物の上部胃腸管に固有のものである。いくつかの実施形態では、外因性環境条件は、哺乳動物の下部胃腸管に固有のものである。いくつかの実施形態では、外因性環境条件は、哺乳動物の小腸に固有のものである。いくつかの実施形態では、外因性環境条件は、健康または疾患状態（例えば、HE）の哺乳動物の消化管に固有である分子もしくは代謝物の存在を意味する。いくつかの実施形態では、外因性環境条件は、哺乳動物の消化管の環境のような、低酸素、微好氣的または嫌氣的条件である。いくつかの実施形態では、外因性環境条件は、哺乳動物の消化管に固有である分子もしくは代謝物、例えば、プロピオネートである。いくつかの実施形態では、外因性環境条件は、組織に固有または疾患に固有の代謝物もしくは分子（複数可）である。いくつかの実施形態では、外因性環境条件は、低pH環境である。いくつかの実施形態では、本開示の遺伝子操作微生物は、pH依存性プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、本開示の遺伝子操作微生物は、酸素レベル依存性プロモーターを含む。いくつかの態様では、細菌は、酸素レベルを感知することができる転写因子を発達させた。異なるシグナル伝達経路は、異なる酸素レベルにより誘発され、異なる速度論で発生し得る。

10

【0037】

「酸素レベル依存性プロモーター」または「酸素レベル依存性調節領域」は、1つまたは複数の酸素レベル感知転写因子が結合することができる核酸配列を指し、ここで、対応する転写因子の結合および/または活性化が下流遺伝子発現を活性化する。

20

【0038】

酸素レベル依存性転写因子の例は、FNR、ANRおよびDNRを含むが、これらに限定されない。対応するFNR応答性プロモーター、ANR応答性プロモーターおよびDNR応答性プロモーターは、当技術分野で公知であり（例えば、Castiglioneら、2009年；Eiglmeierら、1989年；Galimandら、1991年；Hasegawaら、1998；Hoerenら、1993年；Salmonら、2003年参照）、非限定的な例を表1に示す。

【0039】

非限定的な例において、プロモーター（PfnrS）は、低または無環境酸素の条件下で高度に発現することが公知である大腸菌ニッスルフマル酸・硝酸レダクターゼ遺伝子S（fnrS）に由来していた（DurandおよびStorz、2010年；Boysenら、2010年）。PfnrSプロモーターは、ニッスルに天然で見いだされるグローバルな転写調節因子FNRにより嫌氣的条件下で活性化される。嫌氣的条件下では、FNRは、二量体を形成し、その制御下の特定の遺伝子のプロモーターにおける特定の配列に結合し、それにより、それらの発現を活性化する。しかし、好氣的条件下では、酸素がFNR二量体における鉄-硫黄クラスターと反応し、それらを不活性形に変換する。このようにして、PfnrS誘導性プロモーターは、タンパク質またはRNAの発現をモジュレートするために採用される。PfnrSは、本願書においてFNRS、fnrs、FNR、P-FNRSプロモーターおよびPfnrSプロモーターを示すための他のそのような

30

40

【0040】

【表 1】

表 1. 転写因子ならびに応答性遺伝子および調節領域の例

転写因子	例示的な応答性遺伝子、 プロモーターおよび/または調節領域
FNR	<i>nirB, ydfZ, pdhR, focA, ndH, hlyE, narK, narX, narG, yfiD, tdcD</i>
ANR	<i>arcDABC</i>
DNR	<i>norb, norC</i>

10

【0041】

「消化管バリア機能増強分子」は、短鎖脂肪酸、酪酸、プロピオン酸、酢酸、GLP-2、IL-10、IL-27、TGF-1、TGF-2、N-アシルホスファチジルエタノールアミン(NAPEs)、エラフィン(ペプチダーゼ阻害剤3およびSKALPとも呼ばれる)、トレフォイル因子、メラトニン、PGD2、キヌレン酸およびキヌレニンを含むが、これらに限定されない。消化管バリア機能増強分子は、単一遺伝子によりコードされ得る。例えば、エラフィンは、PI3遺伝子によりコードされる。あるいは、例えば、酪酸などの、消化管バリア機能増強分子は、複数の遺伝子を必要とする生合成経路により合成することができる。これらの分子は、治療用分子と呼ぶこともできる。

20

【0042】

本明細書で使用する場合、生合成経路をコードする「遺伝子カセット」または「オペロン」は、消化管バリア機能増強分子、例えば、酪酸、プロピオン酸を産生するために必要な2つまたはそれ以上の遺伝子を意味する。前記分子を産生することができる一組の遺伝子をコードすることに加えて、遺伝子カセットまたはオペロンは、さらなる転写および翻訳エレメント、例えば、リボソーム結合部位も含み得る。

30

【0043】

「酪酸生成遺伝子カセット」、「酪酸生合成遺伝子カセット」および「酪酸オペロン」は、同義で用いて、酪酸を生合成経路で生成することができる一組の遺伝子を意味する。内因性酪酸生合成経路を介して酪酸を産生することができる非改変細菌は、クロストリジウム属(*Clostridium*)、ペプトクロストリジウム属(*Peptoclostridium*)、フゾバクテリウム属(*Fusobacterium*)、ブチリビブリオ属(*Butyrivibrio*)、ユウバクテリウム属(*Eubacterium*)およびトレポネーマ属(*Treponema*)を含むが、これらに限定されず、これらの内因性酪酸生合成経路は、本発明の遺伝子操作細菌の遺伝子の起源であり得る。本発明の遺伝子操作細菌は、細菌の異なる種、菌株または亜菌株に由来する酪酸生合成遺伝子、あるいは細菌の異なる種、菌株および/または亜菌株に由来する酪酸生合成遺伝子の組合せを含み得る。酪酸生成遺伝子カセットは、例えば、ペプトクロストリジウム・ディフィシル(*Peptoclostridium difficile*) (クロストリジウム・ディフィシル(*Clostridium difficile*)とも呼ばれる)に由来する酪酸産生経路の8つの遺伝子:それぞれブチリルCoAデヒドロゲナーゼサブユニット、電子伝達フラビンタンパク質サブユニットベータ、電子伝達フラビンタンパク質サブユニットアルファ、アセチルCoA C-アセチルトランスフェラーゼ、3-ヒドロキシブチリルCoAデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、リン酸ブチリルトランスフェラーゼおよび酪酸キナーゼをコードするbcd2、etfB3、etfA3、thiA1、hbd、crt

40

50

2、pbtおよびbukを含み得る(Aboulnagaraら、2013年)。酪酸生合成遺伝子のうちの1つまたは複数を機能的に置換または改変することができる。ペプトクロストリジウム・ディフィシル630菌株および1296菌株は、両方が酪酸を産生することができるが、etfA3、thiA1、hbd、crt2、pbtおよびbukについて異なる核酸配列を含む。酪酸生合成遺伝子カセットは、ペプトクロストリジウム・ディフィシル630菌株に由来するbcd2、etfB3、etfA3およびthiA1ならびにペプトクロストリジウム・ディフィシル1296菌株に由来するhbd、crt2、pbtおよびbukを含み得る。あるいは、トレポネマ・デンティコラ(Treponema denticola)に由来する単一遺伝子(ter、トランス-2-エノイルCoAレダクターゼをコードする)は、ペプトクロストリジウム・ディフィシルに由来するbcd2、etfB3およびetfA3遺伝子の3つすべてを機能的に置換することができる。したがって、酪酸生合成遺伝子カセットは、ペプトクロストリジウム・ディフィシルに由来するthiA1、hbd、crt2、pbtおよびbukならびにトレポネマ・デンティコラに由来するterを含み得る。酪酸生合成遺伝子カセットは、酪酸の好氣的生合成の遺伝子および/または酪酸の嫌氣的もしくは微好氣的生合成の遺伝子を含み得る。

【0044】

同様に、「プロピオン酸遺伝子カセット」または「プロピオン酸オペロン」は、プロピオン酸を生合成経路で生成することができる一組の遺伝子を意味する。内因性プロピオン酸生合成経路を介してプロピオン酸を産生することができる非改変細菌は、クロストリジウム・プロピオニウム(Clostridium propionicum)、メガスファエラ・エルスデニイ(Megasphaera elsdenii)およびプレボテラ・ルミニコラ(Prevotella ruminicola)を含むが、これらに限定されず、これらの内因性プロピオン酸生合成経路は、本発明の遺伝子操作細菌の遺伝子の起源であり得る。本発明の遺伝子操作細菌は、細菌の異なる種、菌株または亜菌株に由来するプロピオン酸生合成遺伝子、あるいは細菌の異なる種、菌株および/または亜菌株に由来するプロピオン酸生合成遺伝子の組合せを含み得る。いくつかの実施形態では、プロピオン酸遺伝子カセットは、アクリル酸経路プロピオン酸生合成遺伝子、例えば、それぞれプロピオン酸CoAトランスフェラーゼ、ラクティルCoAデヒドラターゼA、ラクティルCoAデヒドラターゼB、ラクティルCoAデヒドラターゼC、電子伝達フラビンタンパク質サブユニットA、アクリロイルCoAレダクターゼBおよびアクリロイルCoAレダクターゼCをコードするpct、lcdA、lcdB、lcdC、etfA、acrBおよびacrCを含む(Hetzlerら、2003年、Selmerら、2002年)。代替実施形態では、プロピオン酸遺伝子カセットは、ピルビン酸経路プロピオン酸生合成遺伝子(例えば、TsengおよびPrather、2012年参照)、例えば、それぞれホモセリンデヒドロゲナーゼ1、ホモセリンキナーゼ、L-トレオニンシンターゼ、L-トレオニンデヒドラターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ジヒドロリポアミドアセチルトランスフェラーゼおよびジヒドロリポイルデヒドロゲナーゼをコードするthrA^{f b}、thrB、thrC、ilvA^{f b}、aceE、aceFおよびlpdを含む。いくつかの実施形態では、プロピオン酸遺伝子カセットは、アシルCoAチオエステラーゼをコードするtesBをさらに含む。プロピオン酸遺伝子カセットは、プロピオン酸の好氣的生合成の遺伝子および/またはプロピオン酸の嫌氣的もしくは微好氣的生合成の遺伝子を含み得る。プロピオン酸生合成遺伝子のうちの1つまたは複数を機能的に置換または改変する、例えば、コドン最適化することができる。

【0045】

「酢酸遺伝子カセット」または「酢酸オペロン」は、酢酸を生合成経路で生成することができる一組の遺伝子を意味する。細菌は、セルロース、リグニンおよび無機気体などの様々な基質を含む、「多くの炭素およびエネルギー源から酢酸を合成し」、当技術分野で公知である、種々の生合成機序および遺伝子を利用する(Ragsdaleら、2008年)。内因性酢酸生合成経路を介して酢酸を産生することができる非改変細菌は、本発明の遺伝子操作細菌の酢酸生合成遺伝子の起源であり得る。本発明の遺伝子操作細菌は、細

10

20

30

40

50

菌の異なる種、菌株または垂菌株に由来する酢酸生合成遺伝子、あるいは細菌の異なる種、菌株および/または垂菌株に由来する酢酸生合成遺伝子の組合せを含み得る。大腸菌は、好氣的増殖中にグルコースおよび酸素を消費して、酢酸および二酸化炭素を産生することができる (Klemanら、1994年)。アセチトマクラム属 (*Acetitoma culum*)、アセトアナエロビウム属 (*Acetoanaerobium*)、アセトハロビウム属 (*Acetohalobium*)、アセトネマ属 (*Acetonema*)、バルチア属 (*Balutia*)、ブチリバクテリウム属 (*Butyribacterium*)、クロストリジウム属、ムーレラ属 (*Moorella*)、オキソバクター属 (*Oxobacter*)、スポロムサ属 (*Sporomusa*) およびサーモアセトゲニウム属 (*Thermoacetogenium*) などの、いくつかの細菌は、例えば、Wood-Ljungdahl 経路を用いて、CO または $CO_2 + H_2$ を酢酸に変換することができる酢酸生成嫌気性菌である (Schiel-Bengelsdorfら、2012年)。様々な細菌種の Wood-Ljungdahl 経路における遺伝子は、当技術分野で公知である。酢酸遺伝子カセットは、酢酸の好氣的生合成の遺伝子および/または酢酸の嫌気的もしくは微好氣的生合成の遺伝子を含み得る。酢酸生合成遺伝子のうちの1つまたは複数を機能的に置換または改変することができる。

10

【0046】

「GABA」および「 γ -アミノ酪酸」は、哺乳動物中枢神経系における主要な抑制性神経伝達物質 ($C_4H_9NO_2$) を指すために用いられる。ヒトにおいては、GABAは、筋緊張の調節にも直接的に関与する。GABAは、リガンド開口型イオンチャンネル複合体の一部である、GABA_A受容体、ならびにGABA_B代謝調節型Gタンパク質共役受容体を活性化することができる。GABAを産生するニューロンは、「GABA作動性」ニューロンとして公知であり、GABA受容体の活性化は、GABA作動性トーンと表現される (すなわち、GABA受容体の活性化の増大は、GABA作動性トーンの増大を意味する)。

20

【0047】

「GABA輸送体」および「GabP」は、GABAを細菌細胞内に輸送することができる膜輸送タンパク質を指すために用いられる (例えば、Liら、2001年参照)。大腸菌では、gabP遺伝子は、GABAの輸送に関与する高親和性GABAパーミアーズをコードする (Liら、2001年)。いくつかの実施形態では、GABA輸送体は、枯草菌および大腸菌を含むが、これらに限定されない、細菌種に由来するgabP遺伝子によりコードされる。これらの内因性GABA輸送体遺伝子は、本発明の遺伝子操作細菌の遺伝子の起源であり得る。GABA輸送体をコードする任意の適切な遺伝子 (複数可) を用いることができる。

30

【0048】

「マンガ」は、記号「Mn」および原子番号25を有する化学元素を意味する。生体系においては、マンガは、必須微量元素であり、酵素媒介性触媒作用に重要な役割を果たすが、有害な作用も有し得る。細胞は、毒性を避けるためにマンガを厳格な恒常性制御下に維持する。高アンモニア血症に関連するいくつかの障害は、マンガのレベルの上昇を特徴とすることもあり得るものであり、マンガは、疾患病因 (例えば、肝性脳症) に寄与し得るものである (Rivera-Manciaら、2012年)。

40

【0049】

「マンガ輸送体」および「MntH」は、マンガを細菌細胞内に輸送することができる膜輸送タンパク質を指す (例えば、JensenおよびJensen、2014年参照)。大腸菌では、mntH遺伝子は、マンガの輸送に関与するプロトン刺激性2価金属陽イオン取込み系をコードする (Porcheronら、2013年)。いくつかの実施形態では、マンガ輸送体は、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、フレキシナー赤痢菌 (*Shigella flexneri*)、ペスト菌 (*Yersinia pestis*) および大腸菌を含むが、これらに限定されない、細菌種に由来するmntH遺伝子によりコードされる。これらの内因性マンガ輸送体遺伝

50

子は、本発明の遺伝子操作細菌の遺伝子の起源であり得る。マンガン輸送体をコードする任意の適切な遺伝子（複数可）を用いることができる。

【0050】

本明細書で使用する場合、「非天然」核酸配列は、通常細菌に存在しない核酸配列、例えば、内因性配列の余剰のコピー、あるいは細菌の異なる種、菌株または亜菌株に由来する配列などの異種配列、あるいは同じ亜型の細菌に由来する非改変配列と比較して改変され、かつ/または突然変異した配列を意味する。いくつかの実施形態では、非天然核酸配列は、合成非天然型配列である（例えば、Purcellら、2013年参照）。非天然核酸配列は、遺伝子カセットにおける調節領域、プロモーター、遺伝子および/または1つもしくは複数の遺伝子であり得る。いくつかの実施形態では、「非天然」は、天然で互いに同じ関係性が見いだされない2つまたはそれ以上の核酸配列を意味する。非天然核酸配列、例えば、遺伝子または遺伝子カセットは、プラスミドまたは細菌染色体上に存在し得る。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、天然において前記遺伝子カセットと関連していない誘導性プロモーター、例えば、酪酸生成遺伝子カセットまたはアルギニン産生カセットに作動可能に連結したFNR応答性プロモーターに直接的または間接的に作動可能に連結している遺伝子カセットを含む。さらに、遺伝子、遺伝子カセットまたは調節領域の複数のコピーが細菌に存在し、1つもしくは複数のコピーは、本明細書に記載の通り突然変異させるか、あるいは変更することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、コピー数を増大させるまたは複数の異なる機能を果たす遺伝子カセットの複数の異なる構成要素を構成するために、同じ非天然核酸配列、例えば、遺伝子、遺伝子カセットまたは調節領域の複数のコピーを含むように操作されている。

【0051】

「構成的プロモーター」は、その制御下の、かつ/またはそれが作動可能に連結したコード配列もしくは遺伝子の連続的転写を駆動することができるプロモーターを意味する。構成的プロモーターおよび変異体は、当技術分野で周知であり、BBa_J23100、構成的大腸菌⁵プロモーター（例えば、osmYプロモーター（International Genetically Engineered Machine (iGEM) Registry of Standard Biological Parts Name BBa_J45992; BBa_J45993）、構成的大腸菌³²プロモーター（例えば、httpG熱ショックプロモーター（BBa_J45504）、構成的大腸菌⁷⁰プロモーター（例えば、lacqプロモーター（BBa_J54200; BBa_J56015）、大腸菌CreABCDリン酸感知オペロンプロモーター（BBa_J64951）、GlnRSプロモーター（BBa_K088007）、lacZプロモーター（BBa_K119000; BBa_K119001）、M13K07遺伝子Iプロモーター（BBa_M13101）、M13K07遺伝子IIプロモーター（BBa_M13102）、M13K07遺伝子IIIプロモーター（BBa_M13103）、M13K07遺伝子IVプロモーター（BBa_M13104）、M13K07遺伝子Vプロモーター（BBa_M13105）、M13K07遺伝子VIIプロモーター（BBa_M13108）、M13110（BBa_M13110）、構成的枯草菌^Aプロモーター（例えば、プロモーターveg（BBa_K143013）、プロモーター43（BBa_K143013）、P_{liag}（BBa_K823000）、P_{lepA}（BBa_K823002）、P_{veg}（BBa_K823003）、構成的枯草菌^Bプロモーター（例えば、プロモーターctc（BBa_K143010）、プロモーターgsiB（BBa_K143011）、サルモネラ属（Salmonella）プロモーター（例えば、サルモネラ属に由来するP_{spv2}（BBa_K112706）、サルモネラ属に由来するP_{spv}（BBa_K112707）、バクテリオファージT7プロモーター（例えば、T7プロモーター（BBa_I712074; BBa_I719005; BBa_J34814; BBa_J64997; BBa_K113010; BBa_K113011; BBa_K113012; BBa_R0085; BBa_R0180; BBa_R0181

10

20

30

40

50

; B B a _ _ R 0 1 8 2 ; B B a _ _ R 0 1 8 3 ; B B a _ _ Z 0 2 5 1 ; B B a _ _ Z 0 2 5 2 ; B B a _ _ Z 0 2 5 3))、バクテリオファージ S P 6 プロモーター (例えば、S P 6 プロモーター (B B a _ _ J 6 4 9 9 8)) およびそれらの機能的断片を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 5 2 】

本明細書で使用する場合、アルギニンまたは中間副産物、例えば、シトルリンを「過剰産生する」遺伝子操作細菌は、突然変異アルギニンレギュロンを含む細菌を指す。例えば、操作細菌は、A r g A のフィードバック抵抗形を含み得るものであり、アルギニンフィードバック抵抗性 A r g A が発現する場合、同じ条件下で同じ亜型の非改変細菌より多くのアルギニンおよび/または中間副産物を産生することができる。遺伝子操作細菌は、アルギニン生合成酵素をコードするオペロンのそれぞれの少なくとも1つの A R G ボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンレギュロンを代わるべきものとしてまたはさらに含み得る。遺伝子操作細菌は、突然変異もしくは欠失アルギニンリプレッサーを代わるべきものとしてまたはさらに含み得る。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、同じ条件下で同じ亜型の非改変細菌の少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約10倍、少なくとも約15倍、少なくとも約20倍、少なくとも約30倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍、少なくとも約600倍、少なくとも約700倍、少なくとも約800倍、少なくとも約900倍、少なくとも約1000倍、または少なくとも約1500倍のアルギニンを産生する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、同じ条件下で同じ亜型の非改変細菌の少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約10倍、少なくとも約15倍、少なくとも約20倍、少なくとも約30倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍、少なくとも約600倍、少なくとも約700倍、少なくとも約800倍、少なくとも約900倍、少なくとも約1000倍、または少なくとも約1500倍のシトルリンまたは他の中間副産物を産生する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌におけるアルギニン生合成遺伝子のうちの1つまたは複数の m R N A 転写物レベルは、同じ条件下で同じ亜型の非改変細菌における m R N A 転写物レベルの少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約10倍、少なくとも約15倍、少なくとも約20倍、少なくとも約30倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍、少なくとも約600倍、少なくとも約700倍、少なくとも約800倍、少なくとも約900倍、少なくとも約1000倍、または少なくとも約1500倍である。特定の実施形態では、非改変細菌は、検出可能なレベルのアルギニン、中間副産物、および/またはそのようなオペロンにおける遺伝子(複数可)の転写を有さない。しかし、タンパク質ならびに/またはアルギニンおよび/もしくは中間副産物の転写レベルは、突然変異アルギニンレギュロンを有する対応する遺伝子操作細菌において検出可能である。転写レベルは、遺伝子の m R N A レベルを直接測定することによって検出することができる。アルギニンおよび/または中間副産物レベル、ならびにアルギニン生合成遺伝子から発現する転写物のレベルを測定する方法は、当技術分野で公知である。アルギニンおよびシトルリンは、例えば、質量分析により測定することができる。

【 0 0 5 3 】

「消化管」は、食物の輸送および消化、栄養素の吸収、ならびに廃物の排泄に関する器官、腺、路および系を意味する。ヒトにおいては、消化管は、口から始まり、肛門で終わり、食道、胃、小腸および大腸をさらに含む、胃腸管を含む。消化管は、脾臓、肝臓、胆嚢および膵臓などの、付属器官および腺も含む。上部胃腸管は、食道、胃および小腸の十二指腸を含む。下部胃腸管は、小腸の残りの部分、すなわち、空腸および回腸、ならびに大腸のすべて、すなわち、盲腸、結腸、直腸および肛門管を含む。細菌は、消化管を通して、例えば、胃腸管、とりわけ腸に見いだすことができる。

10

20

30

40

50

【0054】

本明細書で使用する場合、「遺伝子配列」という用語は、遺伝子配列、例えば、核酸配列を意味する。遺伝子配列 (gene sequence) または遺伝子配列 (genetic sequence) は、完全な遺伝子配列または部分的遺伝子配列を含むことを意味する。遺伝子配列 (gene sequence) または遺伝子配列 (genetic sequence) は、タンパク質またはポリペプチドをコードする配列を含むことを意味し、タンパク質またはポリペプチドをコードしない遺伝子配列、例えば、調節配列、リーダー配列、シグナル配列または他の非タンパク質コード配列を含むことも意味する。

【0055】

「微生物」は、一般的に単細胞からなる顕微鏡的、超顕微鏡的または極超微鏡的サイズの生物または微小生物を意味する。微生物の例は、細菌、ウイルス、寄生虫、真菌、特定の藻類および原虫を含む。いくつかの態様では、微生物は、1つまたは複数の治療用分子を生産するように操作される(「操作微生物」)。特定の態様では、微生物は、その環境、例えば、消化管からの特定の有毒な代謝物、基質または他の化合物を移入し、かつ/または異化するように操作される。特定の態様では、微生物は、有益な代謝物、分子または他の化合物(合成もしくは天然)を合成し、それらをその環境中に放出するように操作される。特定の実施形態では、操作微生物は、操作細菌である。特定の実施形態では、操作微生物は、操作ウイルスである。

【0056】

「非病原性細菌」は、宿主における疾患または有害な反応を引き起こす能力がない細菌を意味する。いくつかの実施形態では、非病原性細菌は、共生細菌である。非病原性細菌の例は、バシラス属 (*Bacillus*)、バクテロイデス属 (*Bacteroides*)、ビフィドバクテリウム属 (*Bifidobacterium*)、ブレビバクテリウム属 (*Brevibacteria*)、クロストリジウム属、腸球菌属 (*Enterococcus*)、大腸菌、乳酸桿菌属 (*Lactobacillus*)、乳酸球菌属 (*Lactococcus*)、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) およびスタフィロコッカス属 (*Staphylococcus*)、例えば、バシラス・コアグランス (*Bacillus coagulans*)、枯草菌、バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*)、バクテロイデス・ズブチリス (*Bacteroides subtilis*)、バクテロイデス・シータイオタオミクロン (*Bacteroides thetaiotaomicron*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス (*Bifidobacterium infantis*)、ビフィドバクテリウム・ラクティス (*Bifidobacterium lactis*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*)、エンテロコッカス・ファシウム (*Enterococcus faecium*)、ラクトバシラス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバシラス・ブルガリクス (*Lactobacillus bulgaricus*)、ラクトバシラス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバシラス・ジョンソニー (*Lactobacillus johnsonii*)、ラクトバシラス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*)、ラクトバシラス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバシラス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*)、ラクトバシラス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) およびサッカロミセス・ブラウディを含むが、これらに限定されない (Sonnenbornら、2009年; Dinleyiciら、2014年; 米国特許第6,835,376号; 米国特許第6,203,797号; 米国特許第5,589,168号; 米国特許第7,731,976号)。天然で病原性の細菌を遺伝子操作

10

20

30

40

50

して、病原性の低下または消失をもたらすことができる。

【0057】

本明細書で使用する場合、「ペイロード」は、細菌またはウイルスなどの、遺伝子操作微生物により産生される目的の1つもしくは複数のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドを意味する。いくつかの実施形態では、ペイロードは、遺伝子もしくは複数の遺伝子またはオペロンによりコードされる。いくつかの実施形態では、ペイロードを含む1つもしくは複数の遺伝子および/またはオペロンは、微生物に対して内因性である。いくつかの実施形態では、ペイロードの1つもしくは複数のエレメントは、異なる微生物および/または生物に由来する。いくつかの実施形態では、ペイロードは、治療用ペイロードである。いくつかの実施形態では、ペイロードは、分子の生合成のための遺伝子によりコードされる。いくつかの実施形態では、ペイロードは、分子の代謝、異化または分解のための遺伝子によりコードされる。いくつかの実施形態では、ペイロードは、分子の移入のための遺伝子によりコードされる。いくつかの実施形態では、ペイロードは、分子の輸出のための遺伝子によりコードされる。いくつかの実施形態では、ペイロードは、調節分子（複数可）、例えば、FNRのような転写調節因子である。いくつかの実施形態では、ペイロードは、プロモーターまたはリプレッサーのような、調節エレメントを含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、FNRSのような、誘導性プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、キルスイッチのような、リプレッサーエレメントを含む。代替実施形態では、ペイロードは、生合成または生化学的経路により生成されるものであって、生合成または生化学的経路は、任意選択で微生物に対して内因性であってもよい。いくつかの実施形態では、遺伝子操作微生物は、2つまたはそれ以上のペイロードを含む。ペイロード（複数可）の非限定的な例は、(1) ArgA f b r、(2) 突然変異 Argボックス、(3) 突然変異 Arg R、(4) 突然変異 Arg G、(5) 酪酸生合成カセット、(6) プロピオン酸生合成カセット、(7) 酢酸生合成カセット、(8) GABA代謝カセット、(9) GABA輸送体、(10) Mn輸送体のうちの1つまたは複数を含む。他の例示的ペイロードは、GLP-2、IL-10、IL-27、TGF-1、TGF-2、エラフィン（ペプチダーゼ阻害剤3またはSKALPとしても公知）、トレフォイル因子、メラトニン、PGD₂、キヌレン酸およびキヌレニンを含む。他の例示的ペイロードは、栄養要求性、例えば、thyA栄養要求性をもたらす突然変異配列（複数可）、キルスイッチ回路、抗生物質耐性回路、生体分子または基質を移入するための輸送体配列、分泌回路を含む。

【0058】

「プロバイオティク」は、適切な量の微生物を含む宿主生物に健康上の恩恵をもたらし得る、生存している非病原性微生物、例えば、細菌を指すために用いられる。いくつかの実施形態では、宿主生物は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、宿主生物は、ヒトである。非病原性細菌のいくつかの種、菌株および/または亜型は、現在プロバイオティク細菌と認識されている。プロバイオティク細菌の例は、ビフィドバクテリウム属、大腸菌、乳酸桿菌属およびサッカロミセス属、例えば、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、エンテロコッカス・ファシウム、大腸菌ニッスル、ラクトバシラス・アシドフィラス、ラクトバシラス・ブルガリクス、ラクトバシラス・パラカゼイ、ラクトバシラス・プランタルムおよびサッカロミセス・ブラウディを含むが、これらに限定されない(Dinleyiciら、2014年；米国特許第5,589,168号；米国特許第6,203,797号；米国特許第6,835,376号)。プロバイオティクは、細菌の変異または突然変異菌株であり得る(Arthurら、2012年；Cuevas-Ramosら、2010年；Olierら、2012年；Nougayredeら、2006年)。非病原性細菌を遺伝子操作して、所望の生物学的特性、例えば、生存性を増強または改善することができる。非病原性細菌を遺伝子操作して、プロバイオティク特性を与えることができる。プロバイオティク細菌を遺伝子操作して、プロバイオティク特性を増強または改善することができる。

【0059】

10

20

30

40

50

本明細書で使用する場合、「安定に維持された」または「安定な」細菌は、非天然遺伝物質が保持され、発現し、伝播するように、宿主ゲノムに組み込まれるまたは自己複製染色体外プラミド上に伝播する非天然遺伝物質、例えば、フィードバック抵抗性 *argA* 遺伝子、突然変異アルギニンリプレッサーおよび/または他の突然変異アルギニンレギュロンを有する細菌宿主細胞を指すために用いられる。安定な細菌は、*in vitro*での、例えば、培地中での、かつ/または *in vivo*での、例えば、消化管中での生存および/または増殖の能力がある。例えば、安定な細菌は、*argA^{fb}*を細菌において発現させることができ、細菌が *in vitro*で、かつ/または *in vivo*で生存し、かつ/または増殖することができるように、*argA^{fb}* 遺伝子を有するプラスミドまたは染色体が細菌において安定に維持されている、*argA^{fb}* 遺伝子を含む遺伝子操作細菌であり得る。

10

【0060】

本明細書で使用する場合、「モジュレートする」および「治療する」という用語ならびにそれらの同語源語は、疾患、障害および/または状態、あるいはその少なくとも1つの認識できる症状の改善を意味する。他の実施形態では、「モジュレートする」および「治療する」は、患者によって必ずしも認識できない、少なくとも1つの測定可能な物理的パラメーターの改善を意味する。他の実施形態では、「モジュレートする」および「治療する」は、疾患、障害および/または状態の進行を、物理的に（例えば、認識できる症状の安定化）、生理学的に（例えば、物理的パラメーターの安定化）または両方により、抑制することを意味する。他の実施形態では、「モジュレートする」および「治療する」は、疾患、障害および/または状態の進行を遅くすることまたは進行を逆転することを意味する。本明細書で使用する場合、「妨げる」およびその同語源語は、所定の疾患、障害および/または状態あるいはそのような疾患、障害および/または状態に関連する症状の発生を遅延させることまたはかかるリスクを低下させることを意味する。

20

【0061】

治療を必要とする人は、特定の医学的障害を既に有する人、障害を有するリスクがある、または最終的に障害にかかる可能性がある人を含み得る。治療の必要性は、例えば、障害の発生に関連する1つもしくは複数のリスクファクターの存在、障害の進行もしくは存在、または障害を有する対象の治療に対する生じ得る受容によって評価される。原発性高アンモニア血症は、公知の治療法が存在しない常染色体劣性またはX連鎖先天性代謝異常である、UCDによって引き起こされる。高アンモニア血症は、尿素回路の他の破壊、例えば、有毒代謝物、感染および/または基質欠損に二次的でもあり得る。高アンモニア血症は、他の病的状態にも寄与し得る。例えば、ハンチントン病は、公知の治療法が存在しない常染色体優性障害である。高アンモニア血症、高血中シトルリンおよび尿素回路酵素の抑制を特徴とする尿素回路異常は、公知の治療法が存在しない常染色体優性障害である、ハンチントン病の病状に寄与し得る。高アンモニア血症の治療は、過剰のアンモニアおよび/または随伴症状を低減または除去することを含み得るものであり、潜在する高アンモニア血症に関連する障害の除去を必ずしも含まない。

30

【0062】

本明細書で使用する場合、「医薬組成物」は、本発明の遺伝子操作細菌と生理学的に適切な担体および/または賦形剤のような他の成分との製剤を意味する。

40

【0063】

同義で用いることができる「生理学的に許容される担体」および「薬学的に許容される担体」という語句は、生物に対する著しい刺激を引き起こさず、投与された細菌化合物の生物学的活性および特性を無効にしない担体または希釈剤を意味する。アジュバントは、これらの語句のもとに含まれる。

【0064】

「賦形剤」という用語は、有効成分の投与をさらに促進するために医薬組成物に添加される不活性物質を意味する。例は、重炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖および種類のデンプン、セルロース誘導體、ゼラチン、植物油、ポリエチレングリコールなら

50

びに例えば、ポリソルベート 20 を含む、界面活性剤を含むが、これらに限定されない。

【0065】

「治療有効用量」および「治療有効量」という用語は、症状の発生の予防、遅延、または状態、例えば、高アンモニア血症の症状の改善をもたらす化合物の量を指すために用いられる。治療有効量は、例えば、アンモニア濃度の上昇に関連する障害の1つもしくは複数の症状を治療する、防止する、重症度を低下させる、発症を遅延させる、かつ/または発生のリスクを低下させるのに十分であり得る。治療有効量、ならびに治療有効投与頻度は、当技術分野で公知であり、下文で述べる方法により決定することができる。

【0066】

本明細書で使用する場合、「ポリペプチド」という用語は、「ポリペプチド」ならびに「(複数の)ポリペプチド」を含み、アミド結合(すなわち、ペプチド結合)により直線状に連結したアミノ酸単量体から構成される分子を意味する。「ポリペプチド」という用語は、2つまたはそれ以上のアミノ酸の1つまたは複数の鎖を意味し、特定の長さの生成物を意味しない。したがって、「ペプチド」、「ジペプチド」、「トリペプチド」、「オリゴペプチド」、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」または2つもしくはそれ以上のアミノ酸の1つもしくは複数の鎖を指すために用いられる任意の他の用語は、「ポリペプチド」の定義の範囲内に含まれ、「ポリペプチド」という用語は、これらの用語の代わりに、またはそれらと同義で用いることができる。「ポリペプチド」という用語は、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、誘導体化、タンパク質分解的切断または非天然アミノ酸による修飾を含むが、これらに限定されない、ポリペプチドの発現後修飾の生成物も指すものとする。ポリペプチドは、天然の生物学的供給源から得ることができ、または組換え技術により生成することができる。他の実施形態では、ポリペプチドは、本発明の遺伝子操作細菌またはウイルスにより産生される。本発明のポリペプチドは、約3もしくはそれ以上、5もしくはそれ以上、10もしくはそれ以上、20もしくはそれ以上、25もしくはそれ以上、50もしくはそれ以上、75もしくはそれ以上、100もしくはそれ以上、200もしくはそれ以上、500もしくはそれ以上、1000もしくはそれ以上、または2000もしくはそれ以上のアミノ酸のサイズであり得る。ポリペプチドは、必ずしもそのような構造を有さないが、定義された3次元構造を有し得る。定義された3次元構造を有するポリペプチドは、折りたたみと呼ばれ、定義された3次元構造を有せずに、多数の異なる立体配座をとり得るポリペプチドは、変性と呼ばれる。「ペプチド」または「ポリペプチド」という用語は、タンパク質もしくはタンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を意味し、または非タンパク質配列、例えば、調節ペプチド配列、リーダーペプチド配列、シグナルペプチド配列、リンカーペプチド配列および他のペプチド配列から選択される配列と一致するアミノ酸配列を意味し得る。

【0067】

「単離」ポリペプチドまたはその断片、変異体もしくは誘導体は、その天然環境中に存在しないポリペプチドを意味する。特定のレベルの精製は、要求されない。細菌または哺乳動物細胞を含むが、これらに限定されない宿主細胞において発現した組換えにより産生されたポリペプチドおよびタンパク質は、任意の適切な技術により分離され、分画され、または部分的もしくは実質的に精製された天然または組換えポリペプチドと同様に、本発明の目的のために単離されたと見なされる。

組換えペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、組換えDNA技術により産生された、すなわち、ポリペプチドをコードする外因性組換えDNA発現構築物により形質転換した、細胞、微生物または哺乳動物から産生されたペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を意味する。大部分の細菌培養において発現するタンパク質またはペプチドは、一般的にグリカンを含まない。前述のポリペプチドの断片、誘導体、類似体または変異体、およびそれらのいずれかの組合せもポリペプチドとして含まれる。「断片」、「変異体」、「誘導体」および「類似体」という用語は、最初のペプチドのアミノ酸配列と十分に類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、対応する最初のポリペプチドの少なくとも1つまたは複数の特性を保持している、任意のポリペプチドを含む。本発明のポリペプチド

10

20

30

40

50

の断片は、タンパク質分解性断片ならびに欠失断片を含む。断片は、本明細書に記載の任意のポリペプチドに由来する特異抗体または生物活性断片もしくは免疫学的に活性な断片も含む。変異体は、天然型または非天然型であり得る。非天然型変異体は、当技術分野で公知の突然変異誘発法を用いて生成することができる。変異型ポリペプチドは、同類もしくは非同類アミノ酸置換、欠失または付加を含み得る。

【0068】

ポリペプチドは、融合タンパク質も含む。本明細書で使用する場合、「変異体」という用語は、最初のペプチドのまたは最初のペプチドと十分に類似した配列を含む、融合タンパク質を含む。本明細書で使用する場合、「融合タンパク質」という用語は、2つまたはそれ以上の異なるタンパク質のアミノ酸配列を含むキメラタンパク質を意味する。一般的に、融合タンパク質は、周知の *in vitro* 組換え技術により得られる。融合タンパク質は、融合タンパク質の成分である個別の最初のタンパク質と類似の構造的機能（ただし必ずしも同じ程度でない）および/または類似の調節機能（ただし必ずしも同じ程度でない）および/または類似の生化学的機能（ただし必ずしも同じ程度でない）および/または免疫学的活性（ただし必ずしも同じ程度でない）を有し得る。「誘導體」は、20種の標準アミノ酸の1つまたは複数の天然アミノ酸誘導體を含む、ペプチドを含むが、これに限定されない。2つのペプチド間の「類似性」は、1つのペプチドのアミノ酸配列を第2のペプチドの配列と比較することによって決定される。それが同一または同類アミノ酸置換である場合、1つのペプチドのアミノ酸は、第2のペプチドの対応するアミノ酸と類似している。同類置換は、Dayhoff M.O. 編、The Atlas of Protein Sequence and Structure 5、National Biomedical Research Foundation、Washington D.C. (1978年) および Argos、EMBO J. 8 (1989年)、779~785頁に記載されているものを含む。例えば、以下の群の1つに属するアミノ酸は、保守的变化または置換を示す：- Ala、Pro、Gly、Gln、Asn、Ser、Thr；- Cys、Ser、Tyr、Thr；- Val、Ile、Leu、Met、Ala、Phe；- Lys、Arg、His；- Phe、Tyr、Trp、His；および - Asp、Glu。

【0069】

本明細書で使用する場合、「十分に類似している」という用語は、第1および第2のアミノ酸配列が共通の構造ドメインおよび/または共通の機能活性を有するように第2のアミノ酸配列と比べて十分なまたは最小限の数の同一または同等のアミノ酸残基を含む第1のアミノ酸配列を意味する。例えば、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または少なくとも約100%同一である共通の構造ドメインを含むアミノ酸配列は、本明細書で十分に類似していると定義される。好ましくは、変異体は、本発明のペプチドのアミノ酸配列と十分に類似している。そのような変異体は、一般的に本発明のペプチドの機能活性を保持している。変異体は、1つもしくは複数のアミノ酸欠失、付加および/または置換により、それぞれ天然および野生型ペプチドとアミノ酸配列が異なるペプチドを含む。これらは、天然に存在する変異体ならびに人工的に設計されたものであり得る。

【0070】

本明細書で使用する場合、「リンカー」、「リンカーペプチド」または「ペプチドリリンカー」または「リンカー」という用語は、2つのポリペプチド配列を結合または連結する、例えば、2つのポリペプチドドメインを連結する合成または非天然もしくは非天然型アミノ酸配列を意味する。本明細書で使用する場合、「合成」という用語は、天然に存在しないアミノ酸配列を意味する。例示的リンカーは、本明細書に記載されている。さらなる

10

20

30

40

50

例示的リンカーは、その内容がその全体として参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20140079701号に記載されている。

【0071】

本明細書で使用する場合、「コドン最適化配列」という用語は、例えば、コード配列から転写された転写物RNA分子の発現宿主細胞もしくは生物における翻訳を改善するために、またはコード配列の転写を改善するために、既存のコード配列から改変された、または設計された配列を意味する。コドン最適化は、発現宿主生物のコドン選択に適合するコード配列のコドンを選択することを含む過程を含むが、これに限定されない。

【0072】

多くの生物は、成長しつつあるポリペプチド鎖における特定のアミノ酸の挿入をコードする特定のコードの使用についてバイアスまたは選択を示す。コドン選択またはコドンバイアスは、生物間のコドン使用の差であり、遺伝コードの縮重によって可能になるものであり、多くの生物で十分に立証されている。コドンバイアスは、メッセンジャーRNA (mRNA) の翻訳の効率としばしば相関しており、これがひいては、とりわけ、翻訳されるコードの特性および特定の転移RNA (tRNA) 分子の利用可能性に依存すると考えられている。細胞における選択されるtRNAsが優位であることは、一般的にペプチド合成において最も高頻度で使用されるコードを反映するものである。したがって、コドン最適化に基づいて所定の生物における最適の遺伝子発現を得るために遺伝子を調整することができる。

【0073】

本明細書で使用する場合、「分泌システム」または「分泌タンパク質」という用語は、微生物、例えば、細菌細胞質から目的のタンパク質または治療用タンパク質を分泌または輸出することができる天然または非天然分泌機構を意味する。分泌システムは、単一タンパク質を含み、または複合体、例えば、HlyBDに集合する2つまたはそれ以上のタンパク質を含み得る。グラム陰性細菌の分泌システムの非限定的な例は、改変III型鞭毛、I型(例えば、ヘモリシン分泌システム)、II型、IV型、V型、VI型およびVII型分泌システム、レジスタンス-ノジュレーション-ディビジョン(resistance-nodulation-division)(RND)多剤排出ポンプ、様々な単一膜分泌システムを含む。グラム陽性細菌の分泌システムの非限定的な例は、SecおよびTAT分泌システムを含む。いくつかの実施形態では、目的のタンパク質(複数可)または治療用タンパク質(複数可)は、目的のタンパク質(複数可)または治療用タンパク質(複数可)を特定の分泌システムに導くためのRNAまたはペプチド起源の「分泌タグ」を含む。いくつかの実施形態では、分泌システムは、操作細菌から目的のタンパク質(複数可)または治療用タンパク質(複数可)を分泌する前にこのタグを除去することができる。例えば、V型自己分泌媒介性分泌では、N末端ペプチド分泌タグは、天然Secシステムにより「パッセンジャー」ペプチドの細胞質からペリプラズムコンパートメント内への転位時に除去される。さらに、自己分泌体が外膜を越えて転位したならば、C末端分泌タグを自己触媒またはプロテアーゼ触媒、例えば、OmpT切断によって除去し、それにより、目的のタンパク質(複数可)または治療用タンパク質(複数可)を細胞外環境中に放出することができる。

【0074】

本明細書で使用する場合、「輸送体」という用語は、分子、例えば、アミノ酸、毒素、代謝物、基質等を細胞外環境から微生物に移入するための機構、例えば、1つまたは複数のタンパク質を意味する。

【0075】

冠詞「a」および「an」は、本明細書で使用する場合、それに反することが明確に示されない限り、「少なくとも1つ」を意味することを理解すべきである。

【0076】

「および/または」という語句は、リストにおける要素の間に用いられる場合、(1)1つの列挙された要素のみが存在すること、または(2)リストの複数の要素が存在する

10

20

30

40

50

ことを意味するものとする。例えば、「A、Bおよび/またはC」は、選択がAのみ；Bのみ；Cのみ；AおよびB；AおよびC；BおよびC；またはA、BおよびCであり得ることを示している。「および/または」という語句は、リストにおける要素「のうちの少なくとも1つ」または「のうちの1つもしくは複数」と同義で用いることができる。

【0077】

細菌

本明細書で開示する遺伝子操作細菌は、過剰のアンモニアを減少させ、アンモニアおよび/または窒素を代替副産物に変換することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、天然で非病原性細菌である。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、共生細菌である。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、プロバイオティック細菌である。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、病原性を低下または消失させるように改変または突然変異させた天然で病原性の細菌である。例示的細菌は、バシラス属、バクテロイデス属、ビフィドバクテリウム属、プレバクテリウム属、クロストリジウム属、腸球菌属、大腸菌、乳酸桿菌属、乳酸球菌属、サッカロミセス属およびスタフィロコッカス属、例えば、バシラス・コアグランス、枯草菌、バクテロイデス・フラジリス、バクテロイデス・ズブチリス、バクテロイデス・シータイオタオミクロン、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・インファンティス、ビフィドバクテリウム・ラクティス、ビフィドバクテリウム・ロンガム、クロストリジウム・ブチリカム、エンテロコッカス・ファシウム、ラクトバシラス・アシドフィラス、ラクトバシラス・ブルガリクス、ラクトバシラス・カゼイ、ラクトバシラス・ジョンソニイ、ラクトバシラス・パラカゼイ、ラクトバシラス・プランタルム、ラクトバシラス・ロイテリ、ラクトバシラス・ラムノサス、ラクトコッカス・ラクティスおよびサッカロミセス・ブラウディを含むが、これらに限定されない。特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、バクテロイデス・フラジリス、バクテロイデス・シータイオタオミクロン、バクテロイデス・ズブチリス、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・インファンティス、ビフィドバクテリウム・ラクティス、クロストリジウム・ブチリカム、大腸菌ニッスル、ラクトバシラス・アシドフィラス、ラクトバシラス・プランタルム、ラクトバシラス・ロイテリおよびラクトコッカス・ラクティスからなる群から選択される。

【0078】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、最も十分に特徴付けられたプロバイオティックの1つに進化した腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae* family) のグラム陰性細菌である (Ukenaら、2007年)、大腸菌ニッスル1917株である。該菌株は、その完全な無害 (Schultz、2008年) を特徴とし、GRAS (一般的に安全と認識された (*generally recognized as safe*)) 状態 (Reisterら、2014年、強調は著者による) を有する。ゲノム配列決定により、大腸菌ニッスルが顕著な毒性因子 (例えば、大腸菌 - ヘモリシン、P線毛アドヘシン) を欠いていることが確認された (Schultz、2008)。さらに、大腸菌ニッスルが病原性接着因子を有さず、腸毒素または細胞毒素を産生せず、侵襲的でなく、尿路病原性でないことが示された (Sonnenbornら、2009年)。1917年という早期に、大腸菌ニッスルが治療用の *Mutafloor* と呼ばれた医薬カプセルに包装された。大腸菌ニッスルは、それ以来、*in vivo* でヒトにおける潰瘍性大腸炎を治療するために (Rembackenら、1999年)、*in vivo* でヒトにおける炎症性腸疾患、クローン病および回腸嚢炎を治療するために (Schultz、2008年)、また *in vitro* で腸管侵襲性サルモネラ属、レジオネラ属 (*Legionella*)、エルシニア属 (*Yersinia*) および赤痢菌属 (*Shigella*) を抑制するために (Altenhoeferら、2004年) 用いられている。大腸菌ニッスルの治療有効性および安全性が説得力をもって立証された (Ukenaら、2007年) ことは、一般的に受け入れられている。

【0079】

当業者は、本明細書で開示した遺伝子改変は、修正し、細菌の他の種、菌株および亜型

10

20

30

40

50

に適應することができることを十分に理解するであろう。例えば、アルギニン媒介調節は、非常に多様な細菌、すなわち、大腸菌、ネズミチフス菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)、サーモトガ門 (*Thermotoga*) およびモンテラ・プロファンダ (*Moritella profunda*) などのグラム陰性菌ならびに枯草菌、ゲオバシラス・ステアサーモフィルス (*Geobacillus stearothermophilus*) およびストレプトミセス・クラブリゲルス (*Streptomyces clavuligerus*) などのグラム陽性菌ならびに他の細菌において著しく十分に保存されていることが公知である (Nicoloff、2004年)。さらに、アルギニンリプレッサーは、細菌ゲノムにおいて普遍的に保存されており、弱い回文構造である、その認識シグナル (ARGボックス) もゲノム間に保存されている (Makarovaら、2001年)。

10

【0080】

非改変大腸菌ニッスルおよび本発明の遺伝子操作細菌は、例えば、消化管または血清中の防御因子により破壊することができる (Sonnenbornら、2009年)。in vivoでの細菌の滞留時間は、本明細書に記載の方法を用いて決定することができる。いくつかの実施形態では、滞留時間をヒト対象について計算する。野生型 ArgR および野生型アルギニン調節を含むストレプトマイシン耐性大腸菌ニッスルを用いる非限定的な例を本明細書で示す。いくつかの実施形態では、in vivoでの滞留時間を本発明の遺伝子操作細菌について計算する。

【0081】

20

過剰なアンモニアの低減
アルギニン生合成経路

大腸菌などの細菌において、アルギニン生合成経路は、N - アセチルグルタミン酸シンターゼ、N - アセチルグルタミン酸キナーゼ、N - アセチルグルタミン酸リン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、N - アセチルオルニチナーゼ、カルバモイルリン酸シンターゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギニノコハク酸シンターゼ、およびアルギニノコハク酸リアーゼを含む8ステップ酵素過程においてグルタミンをアルギニンに変換することができる (Cuninら、1986年)。最初の5ステップは、オルニチン前駆体を得るためのN - アセチル化を含む。第6のステップにおいて、オルニチントランスカルバミラーゼ (オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼとしても公知である) がシトルリンの形成を触媒する。最後の2ステップは、シトルリンからアルギニンを得るためのカルバモイルリン酸の利用を含む。

30

【0082】

いくつかの細菌、例えば、バシラス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) および淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) において、アルギニン生合成における第1および第5ステップは、二機能性酵素オルニチンアセチルトランスフェラーゼにより触媒され得る。オルニチンアセチルトランスフェラーゼ (argJ) が大腸菌におけるN - アセチルグルタミン酸シンターゼ (argA) およびN - アセチルオルニチナーゼ (argE) 栄養要求性遺伝子突然変異の両方を補完することが示された場合、この二機能性が最初に特定された (Mounta inら、1984年; Crabeelら、1997年)。

40

【0083】

argAは、N - アセチルグルタミン酸シンターゼをコードし、argBは、N - アセチルグルタミン酸キナーゼをコードし、argCは、N - アセチルグルタミン酸レダクターゼをコードし、argDは、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼをコードし、argEは、N - アセチルオルニチナーゼをコードし、argFは、オルニチントランスカルバミラーゼをコードし、argIもオルニチントランスカルバミラーゼをコードし、argGは、アルギノコハク酸シンターゼをコードし、argHは、アルギノコハク酸リアーゼをコードし、argJは、オルニチンアセチルトランスフェラーゼをコードする。carAは、グルタミナーゼ活性を有するカルバモイルリン酸シンターゼの小A

50

サブユニットをコードし、*carB*は、アンモニアからのカルバモイルリン酸の合成を触媒するカルバモイルリン酸シンターゼの大Bサブユニットをコードする。これらのアルギニン生合成遺伝子（すなわち、*argA*、*argB*、*argC*、*argD*、*argE*、*argF*、*argG*、*argH*、*argI*、*argJ*、*carA*および*carB*）のうちの1つまたは複数の異なる組合せを天然でまたは合成により、1つまたは複数のオペロンに組織化することができ、そのような組織化は、細菌の種、菌株および亜型間で異なり得る（例えば、表2参照）。各オペロンの調節領域は、少なくとも1つのARGボックスを含み、調節領域当たりのARGボックスの数は、オペロンおよび細菌間で異なり得る。

【0084】

これらの酵素をコードする遺伝子のすべてをArgRとのその相互作用を介してアルギニンによる抑制にかけて、各遺伝子の調節領域に結合し、転写を抑制する複合体を形成する。N-アセチルグルタミン酸シンターゼもアルギニンのみによるタンパク質レベルでのアロステリックフィードバック阻害にかける（Tuchmanら、1997年；Caldaraら、2006年；Caldaraら、2008年；Caldovicら、2010年）。

【0085】

細菌におけるアルギニン生合成を調節する遺伝子は、染色体にわたって散在しており、単一リプレッサーにより制御される複数のオペロンに組織化され、これは、MaasおよびClark（1964年）により「レギュロン」と名付けられた。各オペロンは、プロモーターと重複し、リプレッサータンパク質が結合しているARGボックスと呼ばれる、少なくとも1つの18ヌクレオチドの不完全回文構造配列を含む調節領域により調節される（Tianら、1992年；Tianら、1994年）。*argR*遺伝子は、1つまたは複数のARGボックスに結合している、リプレッサータンパク質をコードする（Limら、1987年）。アルギニンは、アルギニンリプレッサーを活性化する共リプレッサーとして機能する。各オペロンを調節するARGボックスは、同一でないことがあり、共通ARGボックス配列は、 $^A / _T n T G A A T ^A / _T ^A / _T ^T / _A ^T / _A A T T C A n ^T / _A$ である（Maas、1994年）。さらに、*argR*の調節領域は、2つのプロモーターを含み、そのうちの1つは、2つのARGボックスと重複し、自己制御性である。

【0086】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、突然変異アルギニンレギュロンを含み、同じ条件下で同じ亜型の非改変細菌より多くのアルギニンおよび/または中間副産物、例えば、シトロリンを産生する。突然変異アルギニンレギュロンは、アルギニン生合成経路におけるグルタミン酸をアルギニンに変換することに関与する酵素をコードするオペロンのうちの1つまたは複数の、ARGボックスへのArgRの結合および/またはN-アセチルグルタミン酸シンターゼへのアルギニンの結合を介した、アルギニン媒介抑制を低減または妨げ、それによりアルギニンおよび/または中間副産物の生合成を増大させる1つまたは複数の核酸突然変異を含む。

【0087】

代替実施形態では、細菌を、他の代謝経路、例えば、ヒスチジン生合成経路、メチオニン生合成経路、リシン生合成経路、アスパラギン生合成経路、グルタミン生合成経路およびトリプトファン生合成経路を介して過剰のアンモニアを消費するように遺伝子操作を施す。本明細書で使用する場合、「アンモニア変換回路」は、過剰のアンモニアを消費し、かつ/または減少させることができる代謝経路を意味する。

【0088】

ヒスチジン生合成経路

ヒスチジン生合成は、例えば、大腸菌における単一オペロン内にある8つの遺伝子により行われる。該オペロンの8つの遺伝子のうちの3つ（*hisD*、*hisB*および*hisI*）は、二機能性酵素をコードし、2つ（*hisH*および*hisF*）は、一緒に1つの酵素を形成して、合計10酵素反応の1つのステップを触媒するポリペプチド鎖をコードする（Alifanoら、1996年）。*hisG*遺伝子の産物であるATPホスホリボシ

10

20

30

40

50

ルトランスフェラーゼは、ヒスチジンによりタンパク質レベルで阻害される。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、フィードバック抵抗性 *hisG* を含む。細菌は、当技術分野で公知の技術を用いて突然変異を起こさせ、かつ/またはフィードバック抵抗性 *hisG* 突然変異体についてスクリーニングすることができる。フィードバック抵抗性 *hisG* を含むように操作された細菌は、ヒスチジンの産生のレベルの上昇を示し、ひいてはアンモニアの消費を増加させ、高アンモニア血を低下させることとなる。あるいは、ヒスチジン合成に必要な1つまたは複数の遺伝子を FNR 誘導性プロモーターなどの、誘導性プロモーターの制御下におき、律速酵素の産生の増大を可能にし得る。ヒスチジン合成経路の任意の他の適切な改変(複数可)を用いて、アンモニアの消費を増加させることができる。

10

【0089】

メチオニン生合成経路

細菌のメチオニンレギュロンは、ホモセリンからのメチオニンの3ステップ合成(すなわち、アシル化、スルフリル化およびメチル化)を制御する。*metJ* 遺伝子は、メチオニンまたはその誘導体と結合した場合、メチオニンレギュロン内の遺伝子の転写レベルでの抑制をもたらす調節タンパク質をコードする(Saint-Gironsら、1984年; Shoemanら、1985年)。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、*metJ* 遺伝子の欠失、破壊または突然変異を含む。*metJ* 遺伝子を欠失する、破壊または突然変異させるように操作された細菌は、メチオニンの産生のレベルの上昇を有し、ひいてはアンモニア消費を増加し、高アンモニア血を低下させる。メチオニン生合成経路の任意の他の適切な改変(複数可)を用いて、アンモニアの消費を増加させることができる。

20

【0090】

リシン生合成経路

微生物は、2つの経路の1つによりリシンを合成する。ジアミノピメリン酸(DAP)経路を用いて、アスパラギン酸およびピルビン酸からリシンを合成し(Dogovskiら、2012年)、アミノアジピン酸経路を用いて、アルファ-ケトグルタル酸およびアセチル補酵素Aからリシンを合成する。ジヒドロジピコリン酸シンターゼ(DHDPs)は、DAP経路の第1のステップを触媒し、リシンによるフィードバック阻害を受ける(Liuら、2010年; Reboulら、2012年)。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、フィードバック抵抗性 DHDPs を含む。フィードバック抵抗性 DHDPs を含むように操作された細菌は、ヒスチジン産生のレベルの上昇を示し、ひいてはアンモニア消費を増加し、高アンモニア血を低下させる。あるいは、リシン合成に必要な1つまたは複数の遺伝子を FNR 誘導性プロモーターなどの、誘導性プロモーターの制御下におくことによって、リシンの産生を最適化することができる可能性がある。リシン生合成経路の任意の他の適切な改変(複数可)を用いて、アンモニアの消費を増加させることができる。

30

【0091】

アスパラギン生合成経路

アスパラギンは、それぞれオキサロ酢酸トランスアミナーゼおよびアスパラギンシンターゼ酵素によりオキサロ酢酸およびアスパラギン酸から直接合成する。この経路の第2のステップにおいて、L-グルタミンまたはアンモニアがアミノ基ドナーとしての役割を果たす。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、同じ条件下で同じ垂型の非改変細菌と比較してアスパラギンを過剰産生し、それにより過剰のアンモニアを消費し、高アンモニア血を低下させる。あるいは、これらの遺伝子の1つまたは両方を FNR 誘導性プロモーターなどの、誘導性プロモーターの制御下におくことによって、アスパラギン合成を最適化することができる。アスパラギン生合成経路の任意の他の適切な改変(複数可)を用いて、アンモニアの消費を増加させることができる。

40

【0092】

グルタミン生合成経路

50

アンモニアおよびオキシグルタル酸からのグルタミンおよびグルタミン酸の合成は、3つの酵素により強固に調節される。グルタミン酸デヒドロゲナーゼは、オキシグルタル酸の還元的アミノ化を触媒して、単一ステップでグルタミン酸を生成させる。グルタミンシンターゼは、グルタミン酸およびアンモニアのATP依存性縮合を触媒して、グルタミンを形成させる(Lodeiroら、2008年)。グルタミンシンターゼはまた、サイクル反応においてグルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼ(グルタミン酸シンターゼとしても公知)とともに作用して、グルタミンおよびオキシグルタル酸からグルタミン酸を生成させる。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、同じ条件下で同じ亜型の非改変細菌と比較してグルタミンシンターゼを高いレベルで発現する。グルタミンシンターゼの発現の増大を示すように操作された細菌は、高いレベルのグルタミン産生を有し、ひいてはアンモニア消費を増加し、高アンモニア血を低下させる。あるいは、グルタミン酸デヒドロゲナーゼおよび/またはグルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼの発現を改変して、アンモニア消費を促進することができる。グルタミンシンターゼの産生が窒素により転写レベルで調節される(Fengら、1992年; van Heeswijkら、2013年)ので、グルタミンシンターゼ遺伝子をFNR誘導性プロモーターなどの、異なる誘導性プロモーターの制御下において用いて、グルタミンの産生を改善することもできる。グルタミンおよびグルタミン酸生合成経路の任意の他の適切な改変(複数可)を用いて、アンモニアの消費を増加させることができる。

10

【0093】

20

トリプトファン生合成経路

大部分の細菌において、コリスミ酸前駆体からのトリプトファンの合成に必要な遺伝子は、単一転写単位、trpオペロンとして組織化されている。trpオペロンは、高レベルのトリプトファンが存在する場合に、トリプトファンリプレッサー(TrpR)により阻害される単一プロモーターの制御下にある。trpオペロンの転写は、高レベルの荷電トリプトファンtRNAの存在下でも終結され得る。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、trpR遺伝子の欠失、破壊または突然変異を含む。trpR遺伝子の欠失、破壊または突然変異、および結果として生じるTrpR機能の不活性化は、トリプトファンの産生およびアンモニアの消費の両方のレベルの上昇をもたらす。あるいは、トリプトファン生合成に必要な1つまたは複数の酵素をFNR誘導性プロモーターなどの、誘導性プロモーターの制御下におくことができる可能性がある。トリプトファン生合成経路の任意の他の適切な改変(複数可)を用いて、アンモニアの消費を増加させることができる。

30

【0094】

突然変異アルギニンレギュロンを含む操作細菌

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニン生合成経路を含み、過剰のアンモニアを減少させることができる。より具体的な態様では、遺伝子操作細菌は、アルギニン生合成酵素(複数可)をコードする1つまたは複数のオペロンが活性化されて、同じ条件下の同じ亜型の非改変細菌より多くのアルギニンまたは中間副産物、例えば、シトルリンを産生する突然変異アルギニンレギュロンを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンを過剰産生する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、シトルリンを過剰産生し、これは、さらに有益であり得る。その理由は、シトルリンが現在、特定の尿素回路異常症の治療薬として使用されているからである(国立尿素回路異常症財団)。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、本明細書に記載の中間体のいずれかのような、アルギニン生合成経路における別の中間副産物を過剰産生する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、同じ条件下の同じ細菌亜型の非改変細菌より多くのアルギニン、シトルリンおよび/または他の中間副産物を産生することによって過剰のアンモニアを消費する。尿素回路異常症および肝性脳症を含む、高アンモニア血症に関連する状態を治療するために、アルギニンおよび/または中間副産物生合成の増強を用いて、体内の過剰の窒素を非毒性分子に組み込むことができる。

40

50

【 0 0 9 5 】

当業者は、オペロン内のアルギニン生合成遺伝子の構成 (o r g a n i z a t i o n) が、細菌の種、菌株および亜型、例えば、大腸菌 K 1 2 株における二極 *argECBH*、枯草菌における *argCAEBD-carAB-argF* および *L. plantarum* (*L. plantarum*) における二極 *carAB-argCJBD* にわたって異なることを理解するであろう。種々の細菌のオペロン構成の非限定的な例を表 2 に示す (いくつかの例では、遺伝子は、推測であり、かつ/または大腸菌における公知の配列との配列相同性により同定されている ; いくつかの例では、アルギニンレギュロンにおける遺伝子のすべてが公知かつ/または下に示されているとは限らない)。特定の例において、アルギニン生合成酵素は、細菌の種、菌株および亜型にわたって異なる。

10

【 0 0 9 6 】

【表 2】

表 2 : a r g オペロン構成の例

細菌	オペロン構成						
大腸菌ニッスル	<i>argA</i>	二極 <i>argECBH</i>		<i>argD</i>	<i>argI</i>	<i>argG</i>	<i>carAB</i>
バクテロイデス属	<i>argRGCD</i>	<i>argF</i>		<i>argB</i>	<i>argE</i>	<i>carAB</i>	
クロストリジウム属	<i>argR</i>		<i>argGH</i>		<i>argI</i>		
枯草菌	<i>argGH</i>		<i>argCAEBD-carAB-argF</i>				
枯草菌	<i>argGH</i>		<i>argCJBD-carAB-argF</i>				
ラクトバシラス・ プランタルム	<i>argGH</i>		二極 <i>carAB-argCJBD</i>				
ラクトバシラス属	<i>argE</i>	<i>carA</i>	<i>carB</i>	<i>argGH</i>	<i>argFBDJC</i>		

20

30

【 0 0 9 7 】

各オペロンは、前記オペロンにおけるアルギニン生合成遺伝子の抑制および発現を制御する、少なくとも 1 つのプロモーターおよび少なくとも 1 つの ARG ボックスを含む調節領域により調節される。

【 0 0 9 8 】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、アルギニン生合成経路におけるグルタミン酸をアルギニンおよび/または中間副産物に変換することに関与する酵素をコードするオペロンのうちの 1 つまたは複数のアルギニン媒介抑制を低減または消失させる 1 つまたは複数の核酸突然変異を含むアルギニンレギュロンを含む。アルギニン媒介抑制を低減または消失させることは、ArgR リプレッサー結合 (例えば、アルギニンリプレッサーを突然変異させるもしくは欠失させることにより、またはアルギニン生合成酵素をコードするオペロンのそれぞれに対する少なくとも 1 つの ARG ボックスを突然変異させることにより)、および/または N - アセチルグルタミン酸シンターゼへのアルギニンの結合 (例えば、アルギニンフィードバック抵抗性 N - アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体、例えば、*argA^{fbr}* を産生するために N - アセチルグルタミン酸シンターゼを突然変異させることにより) を低減または消失させることにより) を低減または消失させることにより) を低減または消失させることにより達成すること

40

50

ができる。

【0099】

ARGボックス

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニン生合成酵素N - アセチルグルタミン酸キナーゼ、N - アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、N - アセチルオルニチナーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギニノコハク酸シターゼ、アルギニノコハク酸リアーゼおよびカルバモイルリン酸シターゼをコードするオペロンのうちの1つまたは複数の少なくとも1つのARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンレギュロンを含み、それにより、レギュロンを活性化し、アルギニンおよび/または中間副産物の生合成を増強する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンリプレッサー機能が低下もしくは不活性化し、または遺伝子操作細菌がアルギニンリプレッサーを有さず(例えば、アルギニンリプレッサー遺伝子が欠失し)、レギュロンの抑制解除ならびにアルギニンおよび/または中間副産物の生合成の増強がもたらされるように、1つもしくは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンリプレッサーを含む。これらの実施形態のいずれかにおいて、遺伝子操作細菌は、アルギニンフィードバック抵抗性N - アセチルグルタミン酸シターゼ突然変異体、例えば、*arg A^{f b r}*をさらに含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニン生合成酵素をコードするオペロンのうちの1つまたは複数の少なくとも1つのARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンレギュロンおよびアルギニンフィードバック抵抗性N - アセチルグルタミン酸シターゼ突然変異体、例えば、*arg A^{f b r}*を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、突然変異または欠失アルギニンリプレッサーおよびアルギニンフィードバック抵抗性N - アセチルグルタミン酸シターゼ突然変異体、例えば、*arg A^{f b r}*を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンフィードバック抵抗性N - アセチルグルタミン酸シターゼ突然変異体、例えば、*arg A^{f b r}*、アルギニン生合成酵素をコードするオペロンのそれぞれの少なくとも1つのARGボックスにおける1つもしくは複数の核酸突然変異を含む、突然変異アルギニンレギュロンおよび/または突然変異もしくは欠失アルギニンリプレッサーを含む。

【0100】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、ArgR結合が低減もしくは消失し、それにより、レギュロンを活性化し、アルギニンおよび/または中間副産物生合成を増強するように、アルギニンフィードバック抵抗性N - アセチルグルタミン酸シターゼをコードし、N - アセチルグルタミン酸キナーゼ、N - アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、N - アセチルオルニチナーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギニノコハク酸シターゼ、アルギニノコハク酸リアーゼ、カルバモイルリン酸シターゼおよび野生型N - アセチルグルタミン酸シターゼをコードするオペロンのうちの1つまたは複数の各ARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンレギュロンをさらに含む。

【0101】

いくつかの実施形態では、アルギニノコハク酸シターゼ(*arg G*)をコードするオペロンのARGボックスは、ArgRに結合する能力を維持し、それにより、シトルリン生合成を駆動する。例えば、アルギニノコハク酸シターゼ(*arg G*)をコードするオペロンの調節領域は、構成的であり、それにより、アルギニン生合成を駆動し得る。代替実施形態では、1つまたは複数の代替オペロンの調節領域は、構成的であり得る。しかし、特定の細菌において、複数の酵素をコードする遺伝子は、二極オペロンにまたは共有調節領域の制御のもとに組織化することができ、これらの場合、活性調節領域を構成的に操作するために調節領域をデコンボリュートする(*deconvolute*)必要があり得る。例えば、大腸菌K12およびニッスルにおいて、*arg E*および/または*arg CBH*の構成的な型を得るために、*arg E*および*arg CBH*を2つの二極オペロンに組織化し、*arg ECBH*およびそれらの調節領域をデコンボリュートすることができる。

10

20

30

40

50

【0102】

いくつかの実施形態では、アルギニン生合成遺伝子を含む1つまたは複数のオペロンにおけるすべてのARGボックスを突然変異させて、ArgR結合を低減または消失させる。いくつかの実施形態では、アルギニン生合成酵素をコードする1つまたは複数のオペロンにおけるすべてのARGボックスを突然変異させて、ArgR結合を低減または消失させる。いくつかの実施形態では、アルギニン生合成遺伝子を含む各オペロンにおけるすべてのARGボックスを突然変異させて、ArgR結合を低減または消失させる。いくつかの実施形態では、アルギニン生合成酵素をコードする各オペロンにおけるすべてのARGボックスを突然変異させて、ArgR結合を低減または消失させる。

【0103】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、ArgR結合が低減もしくは消失し、それにより、レギュロンを活性化し、シトルリン生合成を増強するように、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ、ArgR抑制性調節領域により駆動されるアルギニノコハク酸シンターゼをコードし、N-アセチルグルタミン酸キナーゼ、N-アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、N-アセチルオルニチナーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギニノコハク酸シンターゼ、アルギニノコハク酸リアーゼ、カルバモイルリン酸シンターゼおよび任意選択で、野生型N-アセチルグルタミン酸シンターゼをコードするオペロンのそれぞれの各ARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンレギュロンをさらに含む。いくつかの実施形態では、シトルリンを産生することができる遺伝子操作細菌は、とりわけ好都合である。その理由は、シトルリンは、特定の尿素回路異常症の治療用の治療上有効な栄養補助食品としてさらに役割を果たすからである（国立尿素回路異常症財団）。

【0104】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、ArgR結合が低減もしくは消失し、それにより、レギュロンを活性化し、アルギニン生合成を増強するように、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ、構成的プロモーターにより駆動されるアルギニノコハク酸シンターゼをコードし、N-アセチルグルタミン酸キナーゼ、N-アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、N-アセチルオルニチナーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギニノコハク酸リアーゼ、カルバモイルリン酸シンターゼおよび任意選択で、野生型N-アセチルグルタミン酸シンターゼをコードするオペロンのそれぞれの各ARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンレギュロンをさらに含む。

【0105】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、突然変異アルギニンレギュロンおよびフィードバック抵抗性ArgAを含み、アルギニンフィードバック抵抗性ArgAが発現する場合、同じ条件下の同じ亜型の非改変細菌より多くのアルギニンおよび/または中間副産物を産生することができる。これらの実施形態のいずれかにおいて、突然変異アルギニンレギュロンおよび/またはフィードバック抵抗性ArgAは、細菌染色体の1つもしくは複数の組み込み部位に組み込むことができるかまたは1つもしくは複数のプラスミド上に存在していてもよい。

【0106】

アルギニンリプレッサー結合部位（ARGボックス）

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンレギュロンが活性化され、アルギニンおよび/または中間副産物、例えば、シトルリンの生合成が増強されるように、アルギニン生合成酵素N-アセチルグルタミン酸キナーゼ、N-アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、N-アセチルオルニチナーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギニノコハク酸シンターゼ、アルギニノコハク酸リアーゼおよびカルバモイルリン酸シンターゼをコードするオペロンのうちの1つまたは複数の少なくとも1つのARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変

10

20

30

40

50

異を含む突然変異アルギニンレギュロンをさらに含む。

【0107】

いくつかの実施形態では、突然変異アルギニンレギュロンは、オルニチンアセチルトランスフェラーゼをコードするオペロンおよび前記オペロンの少なくとも1つのARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む。1つまたは複数の核酸突然変異は、同じ条件下の同じ亜型の細菌における非改変ARGボックスおよび調節領域へのArgRの結合と比較して、当ARGボックスへのおよびオペロンの調節領域へのArgRの結合が低減または消失するように、回文構造ARGボックス配列の破壊をもたらす。いくつかの実施形態では、ArgR結合時にDNAメチル化およびヒドロキシルラジカル攻撃から保護される核酸は、ArgR結合を破壊するための突然変異の主要な標的である。いくつかの実施形態では、突然変異アルギニンレギュロンは、上述のアルギニン生合成酵素をコードするオペロンのそれぞれの1つまたは複数のARGボックスにおける少なくとも3つの核酸突然変異を含む。ARGボックスは、プロモーターと重複し、突然変異アルギニンレギュロンにおいて、突然変異プロモーター領域のG/C:A/T比は、野性型プロモーター領域のG/C:A/T比と10%以下異なる(表3)。プロモーターは、RNAポリメラーゼが転写を駆動するのに十分な親和性で結合するように非突然変異プロモーターとの十分に高い相同性を保持している。

10

【0108】

大腸菌ニッスルにおける各アルギニン生合成オペロンのARGボックスを含む野生型ゲノム配列およびその突然変異体を表3に示す。例示的野生型配列については、ARGボックスを斜体で示し、各遺伝子の開始コドンは囲み線付きである。RNAポリメラーゼ結合部位は、下線付きである(Cunin、1983年;Maas、1994年)。いくつかの実施形態では、下線付きの配列は、変化していない。ArgR結合時にDNAメチル化から保護される塩基は網掛け付きであり、ArgR結合時にヒドロキシルラジカル攻撃から保護される塩基は太字である(Charlierら、1992年)。網掛け付きの塩基および太字の塩基は、ArgR結合を破壊するための突然変異の主要な標的である。

20

【0109】

【表 3 - 1】

表 3

調節領域	配列
argA WT (配列番号 1)	GCAAAAAACAGCAATAAAAATACAATAATT TCGAATAATCATGCAAAGAGGTGTACC GTG
argA 突然変異 (配列番号 2)	gcaaaaaaacacttttaaaaacttaataatt tcctttaatcacttaagaggtgtaccgtg
argI WT (配列番号 3)	AGACTTGCAAATGAATAATCATCCATATAG ATTGAATTTTAATTCATTAAGGCGTTAGCC ACAGGAGGGATCT ATG
argI 突然変異 (配列番号 4)	agacttgcaaacttatacttatccatatag atdddgttttaattdgttaaggcgtttagcc acaggagggatctatg
argCBH WT (配列番号 5)	TCATTGTTGACACACCTCTGGTCATGATAG TATCAATAATTCATGCCAGTATTTATGAATAA AAATACACTAACGTTGAGCGTAATAAAACC CACCAGCCGTAAGGTGAATGTTTTACGTTT AACCTGGCAACCAGACATAAGAAGGTGAAT AGCCCCG ATG
argCBH 突然変異 (配列番号 6)	tcattgttgacacacctctggtcatgatag tatcaaacttcatgggatatttatctttaa aaatacttgaacggtgagcgtaataaaacc caccagccgtaaggtgaatgTTTTACGTTT aacctggcaaccagacataagaaggtgaat agccccgatg

10

20

30

【表 3 - 2】

調節領域	配列	
argE WT (配列番号 7)	CATCGGGGCTATTCACCTTCTTATGTCTGG TTGCCAGGTTAAACGTAAAACATTACCTT ACGGCTGGTGGGTTTTATTACGCTCAACGT T AGT <u>GTATTTTTATT</u> CATAAA TACTGC ATG A ATATT GATACTATCATGACCAGAGGTGTG TCAACA <u>ATGA</u>	10
argE 突然変異 (配列番号 8)	catcggggctattcaccttcttatgtctg ttgccaggttaaacgtaaaacattcacctt acggctggtgggttttattacgctcaacgt tcaagtatttttaaagataaatatcccatg aagtttgatactatcatgaccagaggtgtg tcaacaatga	
carAB WT (配列番号 9)	AGCAGATTTGCATTGATTTACGTCATCAT T GTGAAT <u>TAATAT</u> CCAAATAAAGT GAGTGAA TATT <u>CTCTGGAGGGTGT</u> <u>TTG</u>	20
carAB 突然変異 (配列番号 10)	agcagatttgcattgatttacgtcatcatt gtcttttaatatcttaataactggagtgac gtttctctggagggtgttttg	
argD WT (配列番号 11)	TTTCTGATTGCCATTCAGT <u>GATTTTTTATG</u> <u>CATATTT</u> <u>TGTGATTATAATTT</u> CATATTTAT TTATGCGTAACAGGGTGATCATGAGATG	30
argD 突然変異 (配列番号 12)	tttctgattgccattcagtccttttttact tatattttgtctttataatcttatatttat ttatgcgtaacaggggtgatcatgagatg	
argG WT (配列番号 13)	CTAATCA CGTGAATGAATA CCAGTT CACT TTCATTTGTTGAATACTTTTACCTTCTCCT GCTTTCCCTTAAGCGCATTATTTTACAAA AACACACTAAACTCTTCCTGTCTCCGATAA AAGATGATTAAATGAAA ACT CATTTAT TTT <u>GCATAAAAATT</u> CAGTGAAAGCAGAAATCCA GGCTCATCATCAGTTAATTAAGCAGGGTGT TATTTT <u>ATG</u>	40
argG 突然変異 (配列番号 14)	ctaataccttaatgaatcttcagttcact ttcatttggtgaataacttttaccttctct	

【表 3 - 3】

調節領域	配列
	gctttcccttaagcgcattattttacaaaa aacacactaaactcttcctgtctccgataa aagatgatccttatgaaaacctttttatttc ttataaaaatcttgtgaaagcagaaatcca ggctcatcatcagttaattaagcaggggtgt tattttatg
argG 突然変異 (配列番号 15)	cctgaaacgtggcaaattctactcgttttg ggtaaaaaatgcaaatactgctgggatttg gtgtaccgagacgggacgtaaaatctgcag gcattatagtgatccacgccacattttgtc aacgtttatttgctaattcattgacggctagc tcagtcctaggtacagtgctagcACCCGTT TTTTTGGGCTAGAAATAATTTTGTTTAACT TTAAGAAGGAGATATACATACCC

10

20

【0110】

いくつかの実施形態では、複数のARGボックスが単一オペロンに存在し得る。これらの実施形態の一態様では、オペロンの調節領域へのArgRの結合に必要な低減をもたらすためにオペロンにおけるARGボックスのうちの少なくとも1つを突然変異させる。これらの実施形態の代替態様では、オペロンの調節領域へのArgRの結合に必要な低減をもたらすためにオペロンにおけるARGボックスのそれぞれを突然変異させる。当業者は、調節領域当たりのARGボックスの数が各細菌で異なり、ARGボックスのヌクレオチド配列が各オペロンごとに異なり得ることを理解するであろう。例えば、大腸菌ニッスルにおけるcarABオペロンは、2つのARGボックスを含み、1つまたは両方のARGボックス配列を突然変異させることができる。大腸菌ニッスルにおけるargGオペロンは、3つのARGボックスを含み、1つ、2つまたは3つのARGボックス配列を突然変異させる、破壊する、または欠失させることができる。いくつかの実施形態では、3つすべてのARGボックス配列を突然変異させ、破壊し、または欠失させ、構成的プロモーター、例えば、BBa_J23100をargGオペロンの調節領域に挿入する。当業者は、調節領域当たりのARGボックスの数が各細菌で異なり、ARGボックスのヌクレオチド配列が各オペロンごとに異なり得ることを理解するであろう。

30

【0111】

大腸菌ニッスルにおける構成的に発現するargG構築物の例示的实施形態を表4に示す。表4に大腸菌ニッスルにおけるargG遺伝子の調節領域および5'部分の野生型ゲノム配列ならびにその構成的突然変異体を示す。各配列のプロモーター領域は下線付きであり、argG遺伝子の5'部分は囲み線付きである。野生型配列では、ArgR結合部位は大文字の下線付きである。突然変異配列では、5'非翻訳領域は大文字の下線付きである。構成的プロモーターの制御下でargGを発現する細菌は、アルギニンを産生することができる。野生型ArgR抑制性プロモーターの制御下でargGを発現する細菌は、シトルリンを産生することができる。大腸菌ニッスルの野生型argGオペロンおよびその構成的に発現する突然変異体のマップを図12に示す。

40

【0112】

50

【表 4 - 1】

表 4

<p>野生型 a r g G (配列番号 16)</p>	<p><u>gtgatccacgccacat</u>tttgtcaacgtttattgctaatacaCGTG</p>		
	<p><u>AATGAATATCCAGT</u>tcactttcatttgttgaatacttttacctt</p>		
	<p><u>ctcctgctttccctta</u>agcgcattatttacaaaaacacacta</p>		
	<p><u>aactcttctgtctcc</u>gataaaaagatgATTAAATGAAAACTCAT</p>		
	<p><u>TtatTTTGCATAAAA</u>ATTCAGTgaaagcagaaatccaggctcat</p>		
	<p><u>catcagttaattaag</u>caggggtgttattttatgacgacgattct</p>		10
	<p><u>caagcatctcccgg</u>taggtcaacgatttggatcgctttttcc</p>		
	<p><u>ggcggctctggac</u>accagtgccgcactgctgtggatgcgacaaa</p>		
	<p><u>agggagcggttc</u>cttatgcatatactgcaaacctgggcccagcc</p>		
	<p><u>agacgaagaggat</u>tatgatgcgatccctcgtcgtgccatggaa</p>		
	<p><u>tacggcgcgga</u>gagaacgcacgtctgatcgactgccgcaaacac</p>		
	<p><u>tgggtggccga</u>aggtattgccgctattcagtggtggcgcatttca</p>		20
	<p><u>taacaccactgg</u>tggactgacctatttcaacacgacgccgctg</p>		
	<p><u>ggccgcgccgt</u>gaccggcaccatgctggttgctgctatgaaag</p>		
	<p><u>aagatggcgtg</u>aataatctggggtgacggcagcacctataaagg</p>		
	<p><u>aaacgatatcg</u>aacgtttctaccgttacggctctgctgaccaat</p>		
	<p><u>gctgaactgc</u>agatttacaaccgctggcttgatactgacttta</p>		
	<p><u>ttgatgaactg</u>gggtggccgtcatgagatgtctgaatttatgat</p>		
	<p><u>tgcctgcggtt</u>tcgactacaaaatgtctgtcgaaaaagcttac</p>		30

少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍、少なくとも1000倍、または少なくとも1500倍増加させる。

【0114】

いくつかの実施形態では、定量的PCR (qPCR) を用いて、アルギニン生合成遺伝子のmRNA発現レベルを増幅し、検出し、かつ/または定量する。アルギニン生合成遺伝子、例えば、argA、argB、argC、argD、argE、argF、argG、argH、argI、argJ、carAおよびcarBに特異的プライマーを当技術分野で公知の方法 (Frageraら、2008年) に従って設計し、試料中のmRNAを検出するために用いることができる。いくつかの実施形態では、arg mRNAを含む可能性のある試料反応混合物に発蛍光団を加え、サーマルサイクラーを用いて、試料反応混合物に特定の波長の光を照射し、その後の発蛍光団による発光を検出する。反応混合物を所定の温度に所定の時間にわたり加熱し、冷却する。特定の実施形態では、加熱および冷却を所定のサイクル数繰り返す。いくつかの実施形態では、反応混合物を90~100、60~70 および30~50 に所定のサイクル回数にわたり加熱し、冷却する。特定の実施形態では、反応混合物を93~97、55~65 および35~45 に所定のサイクル回数にわたり加熱し、冷却する。いくつかの実施形態では、蓄積しつつあるアンプリコンをqPCRの各サイクルの後に定量する。蛍光が閾値を超えるサイクルの数は、閾値サイクル (C_T) である。各試料について少なくとも1つのC_T結果を発生させ、C_T結果 (複数可) を用いて、アルギニン生合成遺伝子のmRNA発現レベルを決定することができる。

10

20

【0115】

いくつかの実施形態では、アルギニン生合成酵素N-アセチルグルタミン酸キナーゼ、N-アセチルグルタミン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、N-アセチルオルニチナーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギニノコハク酸シンターゼ、アルギニノコハク酸リアーゼおよびカルバモイルリン酸シンターゼをコードするオペロンのうちの1つまたは複数の少なくとも1つのARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む遺伝子操作細菌は、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体、例えば、argA^{fbr}をさらに含む。

30

【0116】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、フィードバック抵抗型のArgA、ならびにアルギニン生合成酵素N-アセチルグルタミン酸キナーゼ、N-アセチルグルタミン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、N-アセチルオルニチナーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギニノコハク酸シンターゼ、アルギニノコハク酸リアーゼ、オルニチンアセチルトランスフェラーゼおよびカルバモイルリン酸シンターゼをコードするオペロンのうちの1つまたは複数の各ARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む。

【0117】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、フィードバック抵抗型のArgA、ArgR抑制性調節領域により駆動されるアルギノコハク酸シンターゼ、ならびにアルギニン生合成酵素N-アセチルグルタミン酸キナーゼ、N-アセチルグルタミン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、N-アセチルオルニチナーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギニノコハク酸リアーゼ、オルニチンアセチルトランスフェラーゼおよびカルバモイルリン酸シンターゼをコードするオペロンのそれぞれの各ARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む。これらの実施形態では、細菌は、シトルリンを産生することができる。

40

【0118】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、フィードバック抵抗型のArgA、構成的プロモーターから発現するアルギノコハク酸シンターゼ、ならびにアルギニン生合成酵

50

素 N - アセチルグルタミン酸キナーゼ、N - アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、N - アセチルオルニチナーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギニノコハク酸シンターゼ、アルギニノコハク酸リアーゼ、オルニチンアセチルトランスフェラーゼおよびカルバモイルリン酸シンターゼをコードするオペロンのそれぞれの各 ARG ボックスにおける 1 つまたは複数の核酸突然変異を含む。これらの実施形態では、細菌は、アルギニンを産生することができる。

【 0 1 1 9 】

表 3 に 1 つまたは複数の核酸突然変異がアルギニンオペロンのそれぞれのアルギニン媒介性抑制を低減または消失させる突然変異構築物の例を示す。突然変異構築物は、酸素レベル依存性プロモーター、例えば、FNR プロモーターにより駆動されるフィードバック抵抗型の ArgA を含む。各突然変異アルギニンレギュロンは、ArgR 結合が低減または消失し、それにより、アルギニンおよび/または中間副産物の生合成が増強されるように、N - アセチルグルタミン酸キナーゼ、N - アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、N - アセチルオルニチナーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギニノコハク酸シンターゼ、アルギニノコハク酸リアーゼ、カルバモイルリン酸シンターゼおよび野生型 N - アセチルグルタミン酸シンターゼをコードするオペロンのうちの 1 つまたは複数の少なくとも 1 つの ARG ボックスにおける 1 つまたは複数の核酸突然変異を含む。突然変異アルギニンレギュロン構築物の非限定的な例を表 5 に示す。

【 0 1 2 0 】

10

20

【表5】

表5：ARGボックス突然変異構築物の例

突然変異構築物は以下を含む：		例示的構築物（* 構成的を示す）：					
		構築物 ct 1	構築物 ct 2	構築物 ct 3	構築物 ct 4	構築物 ct 5	構築物 ct 6
酸素レベル依存性プロモーターにより駆動されるアルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ		✓	✓	✓	✓	✓	✓
野生型N-アセチルグルタミン酸シンターゼ		✓	✓		✓	✓	
次のものをコードするオペロンの中の少なくとも1つのARGボックスにおける突然変異（複数可）	野生型N-アセチルグルタミン酸シンターゼ	✓		✓	✓		✓
	N-アセチルグルタミン酸キナーゼ	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	N-アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	N-アセチルオルニチナーゼ	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	オルニチントランスカルバミラーゼ	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	アルギニノコハク酸シンターゼ	✓	✓	✓	✓*	✓*	✓*
	アルギニノコハク酸リアーゼ	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	オルニチンアセチルトランスフェラーゼ	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	カルバモイルリン酸シンターゼ	✓	✓	✓	✓	✓	✓

10

20

30

【0121】

突然変異は、プラスミドまたは染色体上に存在し得る。いくつかの実施形態では、アルギニンレギュロンは、単一リプレッサータンパク質により調節される。細菌の特定の種、菌株および/または亜型において、アルギニンレギュロンが2つの推定上のリプレッサーにより調節され得ることが提案された（Nicolfら、2004年）。したがって、特定の実施形態では、本発明のアルギニンレギュロンは、複数のリプレッサータンパク質により調節される。

【0122】

特定の実施形態では、突然変異アルギニンレギュロンは、遺伝子操作細菌の1つの種、菌株または亜型において発現する。代替実施形態では、突然変異アルギニンレギュロンは、遺伝子操作細菌の2つまたはそれ以上の種、菌株または亜型において発現する。

40

【0123】

アルギニンリプレッサー（ArgR）

本発明の遺伝子操作細菌は、アルギニン生合成経路におけるグルタミン酸をアルギニンおよび/または中間副産物に変換することに関与する酵素をコードするオペロンのうちの1つまたは複数のアルギニン媒介抑制を低減または消失させる1つまたは複数の核酸突然変異を含むアルギニンレギュロンを含む。いくつかの実施形態では、アルギニン媒介抑制を低減または消失は、ArgRリプレッサー結合を低減もしくは消失させることにより、例えば、アルギニン生合成酵素をコードするオペロンのうちの1つまたは複数の少なくと

50

も1つのARGボックスを突然変異させることにより(上で述べたように)またはアルギニンリプレッサーを突然変異もしくは欠失させることにより(ここで述べるように)かつ/またはN-アセチルグルタミン酸シンターゼへのアルギニンの結合を低減もしくは消失させることにより(例えば、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体、例えば、argA^{f b r}を生じるようにN-アセチルグルタミン酸シンターゼを突然変異させることにより)達成することができる。

【0124】

したがって、いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、機能し得るArgRリプレッサーを欠いており、したがって、アルギニン生合成オペロンのそれぞれのArgRリプレッサー媒介転写抑制が低減または消失している。いくつかの実施形態では、操作細菌は、アルギニンリプレッサー機能が低下するまたは不活性であるように1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンリプレッサーを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンリプレッサーを有さず(例えば、アルギニンリプレッサー遺伝子が欠失した)、レギュロンの活性化ならびにアルギニンおよび/または中間副産物の生合成の増強がもたらされる。いくつかの実施形態では、対応する野生型細菌に通常存在する機能性argR遺伝子の各コピーは、1つまたは複数のヌクレオチドの欠失、挿入または置換によって独立に欠失するかまたは不活性にされる。いくつかの実施形態では、対応する野生型細菌に通常存在する機能性argR遺伝子の各コピーが欠失している。

10

【0125】

いくつかの実施形態では、アルギニンレギュロンは、単一リプレッサータンパク質により調節される。細菌の特定の種、菌株および/または亜型において、アルギニンレギュロンが2つの異なる推定上のリプレッサーにより調節され得ることが提案された(Nicoloffら、2004年)。したがって、特定の実施形態では、それぞれが異なるアミノ酸配列を含む2つの異なるArgRタンパク質は、遺伝子操作細菌において突然変異または欠失している。

20

【0126】

いくつかの実施形態では、突然変異または欠失アルギニンリプレッサーを含む遺伝子改変細菌は、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体、例えば、argA^{f b r}をさらに含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、フィードバック抵抗型のArgAを含み、機能性アルギニンリプレッサーを欠き、アルギニンを産生することができる。特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、機能性ArgGをさらに欠き、シトルリンを産生することができる。いくつかの実施形態では、argR遺伝子を遺伝子操作細菌において欠失させる。いくつかの実施形態では、argR遺伝子を突然変異させて、ArgR機能を不活性化する。いくつかの実施形態では、argG遺伝子を遺伝子操作細菌において欠失させる。いくつかの実施形態では、argG遺伝子を突然変異させて、ArgR機能を不活性化する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、argA^{f b r}を含み、ArgRを欠失した。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、argA^{f b r}を含み、ArgRを欠失し、argGを欠失した。いくつかの実施形態では、いくつかの実施形態では、欠失ArgRおよび/または欠失argGが細菌ゲノムから欠失し、argA^{f b r}がプラスミドに存在する。いくつかの実施形態では、欠失ArgRおよび/または欠失argGが細菌ゲノムから欠失し、argA^{f b r}が染色体に組み込まれる。1つの特定の実施形態では、遺伝子改変細菌は、染色体に組み込まれたargA^{f b r}を含み、ゲノムArgRを欠失し、ゲノムargGを欠失した。他の特定の実施形態では、遺伝子改変細菌は、プラスミド上に存在するargA^{f b r}を含み、ゲノムArgRを欠失し、ゲノムargGを欠失した。argGが欠失している実施形態のいずれかにおいて、アルギニンではなく、シトルリンが産生される。

30

40

【0127】

いくつかの実施形態では、フィードバック抵抗型のArgAが発現する条件下で、本発明の遺伝子操作細菌は、同じ条件下の同じ亜型の非改変細菌と比較して少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約10倍、少なくとも約15倍、少なくとも約20

50

倍、少なくとも約30倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍、少なくとも約600倍、少なくとも約700倍、少なくとも約800倍、少なくとも約900倍、少なくとも約1000倍、または少なくとも約1500倍のアルギニン、シトルリン、他の中間副産物および/またはオペロンにおける遺伝子(複数可)の転写物を産生する。

【0128】

いくつかの実施形態では、定量的PCR(qPCR)を用いて、アルギニン生合成遺伝子のmRNA発現レベルを増幅し、検出し、かつ/または定量する。アルギニン生合成遺伝子、例えば、argA、argB、argC、argD、argE、argF、argG、argH、argI、argJ、carAおよびcarBに特異的プライマーを当技術分野で公知の方法(Fragara, 2008年)に従って設計し、試料中のmRNAを検出するために用いることができる。いくつかの実施形態では、arg mRNAを含む可能性がある試料反応混合物に発蛍光団を加え、サーマルサイクラーを用いて、試料反応混合物に特定の波長の光を照射し、その後の発蛍光団による発光を検出する。反応混合物を所定の温度に所定の時間にわたり加熱し、冷却する。特定の実施形態では、加熱および冷却を所定のサイクル数繰り返す。いくつかの実施形態では、反応混合物を90~100、60~70 および30~50 に所定のサイクル回数にわたり加熱し、冷却する。特定の実施形態では、反応混合物を93~97、55~65 および35~45 に所定のサイクル回数にわたり加熱し、冷却する。いくつかの実施形態では、蓄積しつつあるアンプリコンをqPCRの各サイクルの後に定量する。蛍光が閾値を超えるサイクルの数は、閾値サイクル(C_T)である。各試料について少なくとも1つのC_T結果を発生させ、C_T結果(複数可)を用いて、アルギニン生合成遺伝子のmRNA発現レベルを決定することができる。

【0129】

ArgRが突然変異しているこれらの実施形態のいずれかにおいて、突然変異ArgRおよび/またはフィードバック抵抗性ArgAは、1つもしくは複数の組込み部位において細菌染色体に組み込まれるかまたは1つもしくは複数のプラスミド上に存在し得る。

【0130】

フィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ変異体、例えば、argA^{fbr}を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンフィードバック抵抗性ArgAを含む突然変異アルギニンレギュロンを含み、アルギニンフィードバック抵抗性ArgAが発現する場合、同じ条件下の同じ亜型の非改変細菌より多くのアルギニンおよび/または中間副産物を産生することができる。アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼタンパク質(argA^{fbr})は、フィードバック感受性親系統の酵素よりL-アルギニンに対して著しく感受性が低い(例えば、Eckhardtら、1975年; Rajagopalら、1998年参照)。フィードバック抵抗性argA遺伝子は、プラスミドまたは染色体に存在し得る。いくつかの実施形態では、プラスミドからの発現は、argA^{fbr}発現を増大させるのに有用であり得る。いくつかの実施形態では、染色体からの発現は、argA^{fbr}発現の安定性を向上させるのに有用であり得る。

【0131】

いくつかの実施形態では、アルギニン生合成経路に関与する述べた突然変異配列(例えば、ArgR、argA^{fbr}、Argボックス配列)のいずれかを細菌染色体の1つまたは複数の組込み部位に組み込む。例えば、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする配列の1つまたは複数のコピーを細菌染色体に組み込むことができる。染色体に組み込まれたアルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼの複数のコピーを有することは、N-アセチルグルタミン酸シンターゼのより多くの産生が可能になり、発現のレベルの微調整も可能になる。或いは、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼに加えて、輸送体

10

20

30

40

50

またはキルスイッチ回路のいずれかのような、本明細書に記載の異なる回路を、複数の異なる機能を果たす1つまたは複数の異なる組込み部位において細菌染色体に組み込むことができよう。複数の異なるフィードバック抵抗性N - アセチルグルタミン酸シンターゼタンパク質は、当技術分野で公知であり、遺伝子操作細菌において組み合わせることができる。いくつかの実施形態では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子は、構成的プロモーターの制御下に発現させる。いくつかの実施形態では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子は、外因性環境条件により誘導されるプロモーターの制御下に発現させる。いくつかの実施形態では、外因性環境条件は、哺乳動物の消化管に固有のものである。いくつかの実施形態では、外因性環境条件は、健康または疾患状態の哺乳動物の消化管に固有である分子または代謝物、例えば、プロピオン酸である。いくつかの実施形態では、外因性環境条件は、哺乳動物消化管の環境のような、低酸素または嫌気的条件である。

10

【0132】

細菌は、酸素レベルを検知することができる転写因子を発達させた。異なるシグナル伝達経路は、異なる酸素レベルにより誘発され、異なる速度論で発生し得る。酸素レベル依存性プロモーターは、1つまたは複数の酸素レベル検知転写因子が結合することができる核酸配列であり、対応する転写因子の結合および/または活性化が下流の遺伝子発現を活性化する。一実施形態では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子は、酸素レベル依存性プロモーターの制御下にある。より具体的な態様では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子は、哺乳動物消化管の環境のような、低酸素または嫌気的環境下で活性化される酸素レベル依存性プロモーターの制御下にある。

20

【0133】

特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、フマル酸・硝酸レダクターゼ調節因子(FNR)プロモーターの制御下に発現する $argA^{fbr}$ を含む。大腸菌では、FNRは、好氣的代謝から嫌氣的代謝への切り替えを制御する主要な転写活性化因子である(Undernら、1997年)。嫌氣的状態では、FNRは、嫌気性増殖への適応に關与する数百もの遺伝子を活性化する活性DNA結合タンパク質に二量体化する。好氣的状態では、FNRは、酸素によって二量体化を妨げられ、不活性である。代替実施形態では、遺伝子操作細菌は、代替酸素レベル依存性プロモーターの制御下、例えば、アルギニンデイミニナーゼおよび硝酸還元ANRプロモーター(Rayら、1997年)、異化型硝酸呼吸調節因子DNRプロモーター(Trunkら、2010年)の嫌氣的調節下で発現する $argA^{fbr}$ を含む。これらの実施形態では、アルギニン生合成経路は、消化管内のような、低酸素または嫌気的環境下で特に活性化される。

30

【0134】

緑膿菌(*P. aeruginosa*)では、アルギニンデイミニナーゼおよび硝酸還元(ANR)転写調節因子の嫌氣的制御は、「酸素制限または嫌気的条件下で誘導性である生理学的機能の発現のために必要である」(Wintelerら、1996年; Sawers、1991年)。緑膿菌ANRは、大腸菌FNRと相同であり、「共通FNR部位(TTGAT - - - ATCAA)は、ANRおよびFNRにより効率的に認識された」(Wintelerら、1996年)。FNRと同様に、嫌氣的状態では、ANRは、嫌気性増殖への適応に關与する多くの遺伝子を活性化する。好氣的状態では、ANRは、不活性である。シュードモナス・フルオレッセンス(*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・シリング(*Pseudomonas syringae*)およびシュードモナス・メンドシナ(*Pseudomonas mendocina*)はすべて、ANRの機能性類似体を有する(Zimmermannら、1991年)。ANRにより制御されるプロモーターは、当技術分野で公知であり、例えば、arcDABCオペロンのプロモーターなどがある(例えば、Hasegawaraら、1998年参照)。

40

【0135】

FNRファミリーは、「緑膿菌の嫌気性硝酸呼吸」のためにANRとの結合に必要な転写調節因子である(Hasegawaraら、1998年)、異化型硝酸呼吸調節因子(

50

DNR)も含む(Araiら、1995年)。特定の遺伝子について、FNR結合モチーフは、「おそらくDNRのみによって認識される」(Hasegawaら、1998年)。外因性環境条件および対応する調節領域によって制御される任意の適切な転写調節因子を用いることができる。非限定的な例は、ArcA/B、ResD/E、NreA/B/CおよびAirSRならびに当技術分野で公知のその他を含む。

【0136】

FNRプロモーター配列は、当技術分野で公知であり、任意の適切なFNRプロモーター配列(複数可)を本発明の遺伝子操作細菌に用いることができる。任意の適切なFNRプロモーター(複数可)を任意の適切なargA^{fbr}と組み合わせることができる(例えば、例示的argA^{fbr}配列を表7に示す)。非限定的なFNRプロモーター配列を表6に示す。表6にFNR応答性プロモーター配列を含む例示的調節領域配列の核酸配列を示す。下線付きの配列は、予測されるリボソーム結合部位であり、太字の配列は、クローニングに用いられる制限部位である。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、配列番号18、配列番号19、nirB1プロモーター(配列番号20)、nirB2プロモーター(配列番号21)、nirB3プロモーター(配列番号22)、ydfZプロモーター(配列番号23)、強リボソーム結合部位に融合したnirBプロモーター(配列番号24)、強リボソーム結合部位に融合したydfZプロモーター(配列番号25)、嫌氣的に誘導される小RNA遺伝子であるfnrS(fnrs1プロモーター配列番号26またはfnrs2プロモーター配列番号27)、crp結合部位に融合したnirBプロモーター(配列番号28)およびcrp結合部位に融合したfnrS(配列番号29)のうちの1つまたは複数を含む。

10

20

【0137】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28もしくは29のDNA配列またはそれらの機能性断片と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%相同である核酸配列を含む。

【0138】

【表 6 - 1】

表 6

FNR 応答性 調節領域	12345678901234567890123456789012345678901234567890	
配列番号 18	ATCCCATCACTCTTGATGGAGATCAATTCCCCAAGCTGCTAGAGCGTTA CCTTGCCCTTAAACATTAGCAATGTCGATTTATCAGAGGGCCGACAGGCT CCCACAGGAGAAAACCG	10
配列番号 19	CTCTTGATCGTTATCAATTCCCACGCTGTTTTAGAGCGTTACCTTGCCCT TAAACATTAGCAATGTCGATTTATCAGAGGGCCGACAGGCTCCCACAGGA GAAAACCG	
<i>nirB1</i> 配列番号 20	GTCAGCATAACACCCTGACCTCTCATTAAATTGTTTCATGCCGGGCGGCACT ATCGTCGTCCGGCCTTTTCCTCTCTTACTCTGCTACGTACATCTATTTCT ATAAATCCGTTCAATTTGTCGTTTTTTGCACAAACATGAAATATCAGAC AATCCGTGACTTAAGAAAATTTATACAAATCAGCAATATACCCCTTAAG GAGTATATAAAGGTGAATTTGATTTACATCAATAAGCGGGTTGCTGAAT CGTTAAGGTAGGCGGTAATAGAAAAGAAATCGAGGCAAAA	20
<i>nirB2</i> 配列番号 21	CGGCCGATCGTTGAACATAGCGGTCCGCAGGCGGCACTGCTTACAGCAA ACGGTCTGTACGCTGTCGTCCTTGTGATGTGCTTCCTGTTAGGTTTTCGTC AGCCGTCACCGTCAGCATAACACCCTGACCTCTCATTAAATTGCTCATGCC GGACGGCACTATCGTCGTCCGGCCTTTTCCTCTCTTCCCCGCTACGTGC ATCTATTTCTATAAACCCTCATTTTGTCTATTTTTGCACAAACATGA AATATCAGACAATTCCGTGACTTAAGAAAATTTATACAAATCAGCAATAT ACCCATTAAGGAGTATATAAAGGTGAATTTGATTTACATCAATAAGCGGG GTTGCTGAATCGTTAAGGTAGGCGGTAATAGAAAAGAAATCGAGGCAAAA atgtttgtttaactttaagaaggagatatacat	
<i>nirB3</i> SEQ ID NO: 22	GTCAGCATAACACCCTGACCTCTCATTAAATTGCTCATGCCGGACGGCACT ATCGTCGTCCGGCCTTTTCCTCTCTTCCCCGCTACGTGCATCTATTTCT ATAAACCCTCATTTTGTCTATTTTTGCACAAACATGAAATATCAGAC AATCCGTGACTTAAGAAAATTTATACAAATCAGCAATATACCCATTAAG GAGTATATAAAGGTGAATTTGATTTACATCAATAAGCGGGTTGCTGAAT CGTTAAGGTAGGCGGTAATAGAAAAGAAATCGAGGCAAAA	30

【表 6 - 2】

<i>ydfZ</i> 配列番号 2 3	ATTTCTCTCATCCCATCCGGGGTGAGAGTCTTTTCCCCGACTTATGGC TCATGCATGCATCAAAAAAGATGTGAGCTTGATCAAAAACAAAAATATT TCACTCGACAGGAGTATTTATATTGCGCCCGTTACGTGGGCTTCGACTGT AAATCAGAAAGGAGAAAACACCT	
<i>nirB+RBS</i> 配列番号 2 4	GTCAGCATAACACCCTGACCTCTCATTAATTGTTTCATGCCGGGCGGCACT ATCGTCGTCCGGCCTTTTCTCTCTTACTCTGCTACGTACATCTATTTCT ATAAATCCGTTCAATTTGTCTGTTTTTGCACAAACATGAAATATCAGAC AATTCCGTGACTTAAGAAAATTTATACAAATCAGCAATATAACCCCTTAAG GAGTATATAAAGGTGAATTTGATTTACATCAATAAGCGGGGTTGCTGAAT CGTTAAGGATCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATA TACAT	10
<i>ydfZ+RBS</i> 配列番号 2 5	CATTTCTCTCATCCCATCCGGGGTGAGAGTCTTTTCCCCGACTTATGG CTCATGCATGCATCAAAAAAGATGTGAGCTTGATCAAAAACAAAAATAT TCACTCGACAGGAGTATTTATATTGCGCCCGGATCCCTCTAGAAATAAT TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT	
<i>fnrS1</i> 配列番号 2 6	AGTTGTTCTTATTGGTGGTGTGCTTTATGGTTGCATCGTAGTAAATGGT TGTAACAAAAGCAATTTTTCCGGCTGTCTGTATACAAAACGCCGTAAAG TTTGAGCGAAGTCAATAAACTCTCTACCCATTCAGGGCAATATCTCTCTT GGATCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT	20
<i>fnrS2</i> 配列番号 2 7	AGTTGTTCTTATTGGTGGTGTGCTTTATGGTTGCATCGTAGTAAATGGT TGTAACAAAAGCAATTTTTCCGGCTGTCTGTATACAAAACGCCGCAAAG TTTGAGCGAAGTCAATAAACTCTCTACCCATTCAGGGCAATATCTCTCTT GGATCCAAAGTGAACCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA TATACAT	
<i>nirB+crp</i> 配列番号 2 8	TCGTCTTTGTGATGTGCTTCCCTGTTAGGTTTCGTGAGCCGTCACCGTCAG CATAACACCCTGACCTCTCATTAATTGCTCATGCCGGACGGCACTATCGT CGTCCGGCCTTTTCTCTCTTCCCCCGCTACGTGCATCTATTTCTATAAA CCCGCTCATTTTGTCTATTTTTTGCACAAACATGAAATATCAGACAATTC CGTGACTTAAGAAAATTTATACAAATCAGCAATATAACCCATTAAGGAGTA TATAAAGGTGAATTTGATTTACATCAATAAGCGGGGTTGCTGAATCGTTA AGGTAGaaatgtgatctagttcacatttGCGGTAATAGAAAAGAAAATCGA GGCAAAAatgtttgtttaactttaagaaggagatatacat	30
<i>fnrS+crp</i> 配列番号 2 9	AGTTGTTCTTATTGGTGGTGTGCTTTATGGTTGCATCGTAGTAAATGGT TGTAACAAAAGCAATTTTTCCGGCTGTCTGTATACAAAACGCCGCAAAG TTTGAGCGAAGTCAATAAACTCTCTACCCATTCAGGGCAATATCTCTCaa atgtgatctagttcacattttttgtttaactttaagaaggagatatacat	40

【0139】

他の実施形態では、 $argA^{fbr}$ は、転写活性化因子、例えば、CRPの結合部位に融合した酸素レベル依存性プロモーターの制御下で発現する。CRP（環状AMP受容体タンパク質または異化代謝産物活性化タンパク質もしくはCAP）は、グルコースのような迅速代謝性炭水化物が存在する場合にさほど有益でない炭素源の取込み、代謝および同化に関する遺伝子を抑制することによって細菌における調節における主要な役割を果たす（Wuら、2015年）。このグルコースに対する選択は、グルコース抑制ならびに炭

素異化代謝産物抑制と呼ばれた (Deutscher, 2008年; GorkeおよびStulke, 2008年)。いくつかの実施形態では、 $argA^{fbr}$ の発現は、CRP結合部位に融合した酸素レベル依存性プロモーターにより制御される。いくつかの実施形態では、 $argA^{fbr}$ の発現は、CRP結合部位に融合したFNRプロモーターにより制御される。これらの実施形態では、グルコースが環境中に存在しない場合、環状AMPがCRPに結合する。この結合が、CRPにおける立体配座の変化を引き起こし、CRPがその結合部位に強固に結合することを可能にする。CRPの結合が次に、直接的なタンパク質間相互作用によるRNAポリメラーゼのFNRプロモーターへの動員をもたらすことによって $argA^{fbr}$ 遺伝子の転写を活性化する。グルコースの存在下では、環状AMPは、CRPに結合せず、 $argA^{fbr}$ 遺伝子の転写が抑制される。いくつかの実施形態では、転写活性化因子の結合部位に融合した酸素レベル依存性プロモーター (例えば、FNRプロモーター) を用いて、例えば、*in vitro* で増殖培地にグルコースを加えることにより、十分な量のグルコースが存在する場合に $argA^{fbr}$ が嫌気的条件下で発現しないことを保証する。

【0140】

いくつかの実施形態では、 $argA^{fbr}$ は、環境中、例えば、哺乳動物消化管内の特定の分子または代謝物に応答性である誘導性プロモーターの制御下で発現する。例えば、短鎖脂肪酸プロピオネートは、消化管に局在する主要な微生物発酵代謝物である (Hosseiniら, 2011年)。一実施形態では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子発現は、プロピオン酸誘導性プロモーターの制御下にある。より具体的な実施形態では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子発現は、哺乳動物消化管内のプロピオン酸の存在によって活性化されるプロピオン酸誘導性プロモーターの制御下にある。健常および/または疾患状態の、哺乳動物消化管内に見いだされる任意の分子または代謝物を用いて、 $argA^{fbr}$ 発現を誘導することができる。非限定的な例は、プロピオネート、ビリルビン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、血液凝固因子II、VII、IXおよびX、アルカリホスファターゼ、ガンマグルトミルトランスフェラーゼ、肝炎抗原および抗体、アルファ-フェトプロテイン、抗ミトコンドリア、平滑筋および抗核抗体、鉄、トランスフェリン、フェリチン、銅、セルロプラスミン、アンモニアならびにマンガンを含む。代替実施形態では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子発現は、アラビノース糖の存在下で活性化される、 $ParABAD$ プロモーターの制御下にある (例えば、図13参照)。

【0141】

肝性脳症 (HE) および他の肝臓疾患または障害を有する対象は、それらの血液および腸における高いアンモニアレベルをもたらす慢性肝損傷を有する。アンモニアに加えて、これらの患者は、それらの血液および腸におけるビリルビン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、血液凝固因子II、VII、IXおよびX、アルカリホスファターゼ、ガンマグルトミルトランスフェラーゼ、肝炎抗原および抗体、アルファ-フェトプロテイン、抗ミトコンドリア、平滑筋および抗核抗体、鉄、トランスフェリン、フェリチン、銅、セルロプラスミン、アンモニアならびにマンガンのレベルの上昇も有する。これらのHEに関連する分子またはそれらの代謝物のうちの1つに応答するプロモーターは、消化管内の $argA^{fbr}$ の発現を誘導するために遺伝子操作細菌に用いることができる。これらのプロモーターは、非HE患者において誘導されるとは予期されないものであろう。

【0142】

いくつかの実施形態では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子は、テトラサイクリンへの曝露により誘導されるプロモーターの制御下で発現する。いくつかの実施形態では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子は、炎症または炎症反応への曝露により誘導されるプロモーター (例えば、RNSまたはROSプロモーター) の制御下で発現する。いくつかの実施形態では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子は、アラビノースのような代謝物への曝露により誘導されるプロモーター (例えば、 $ArABAD$ プロモーター) の制御下で発現する。

【0143】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、例えば、リボソーム結合部位を最適化し、転写調節因子を操作し、かつ/または mRNA の安定性を向上させることによって、当技術分野で公知の方法により遺伝子発現をさらに最適化する。例示的 $argA^{fbr}$ 配列の核酸配列を表 7 に示す。例示的 $argA^{fbr}$ 配列のポリペプチド配列を表 8 に示す。

【 0 1 4 4 】

【表 7】

表 7

例示的 $argA^{fbr}$ 配列の核酸配列 (配列番号 30)		10
ATGGTAAAGGAACGTAAAACCGAGTTGGTTCGAGGGATTCCGCCATTCGGTTCCTGTA		
TCAATACCCACCGGGGAAAAACGTTTGTTCATCATGCTCGGCGGTGAAGCCATTGAGCA		
TGAGAATTTCTCCAGTATCGTTAATGATATCGGGTTGTTGCACAGCCTCGGCATCCGT		
CTGGTGGTGGTCTATGGCGCACGTCCGCAGATCGACGCAAATCTGGCTGCGCATCACC		
ACGAACCGCTGTATCACAAGAATATACGTGTGACCGACGCCAAAACACTGGAAGTGGT		
GAAGCAGGCTGCGGGAACATTGCAACTGGATATTACTGCTCGCCTGTGATGAGTCTC		
AATAACACGCCGCTGCAGGGCGCGCATATCAACGTCGTCAGTGGCAATTTTATTATTG		
CCCAGCCGCTGGGCGTTCGATGACGGCGTGGATTACTGCCATAGCGGGCGTATCCGGCG		
GATTGATGAAGACGCGATCCATCGTCAACTGGACAGCGGTGCAATAGTGCTAATGGGG		
CCGGTCGCTGTTTCAGTCACTGGCGAGAGCTTTAACCTGACCTCGGAAGAGATTGCCA	20	
CTCAACTGGCCATCAAACCTGAAAGCTGAAAAGATGATTGGTTTTTGTCTTCCCAGGG		
CGTCACTAATGACGACGGTGTATTTGTCTCCGAACCTTTCCCTAACGAAGCGCAAGCG		
CGGGTAGAAGCCCAGGAAGAGAAAGGCGATTACAACCTCCGGTACGGTGCCTTTTTTGC		
GTGGCGCAGTGAAAGCCTGCCGCAGCGCGTGCCTCGCTGTCAATTAATCAGTTATCA		
GGAAGATGGCGCGCTGTTGCAAGAGTTGTTCTCACGCGACGGTATCGGTACGCAGATT		
GTGATGGAAAGCGCCGAGCAGATTTCGTCGCGCAACAATCAACGATATTGGCGGTATTC		
TGGAGTTGATTTCGCCACTGGAGCAGCAAGGATTTCTGGTACGCCGTTCTCGCGAGCA		
GCTGGAGATGGAAATCGACAAATTCACCATTATTCAGCGCGATAACACGACTATTGCC		
TGCGCCGCGCTCTATCCGTTCCCAGGAAGAGAAGATTGGGGAAATGGCCTGTGTGGCAG		
TTCACCCGGATTACCGCAGTTCATCAAGGGTGAAGTTCTGCTGGAACGCATTGCCGC		
TCAGGCTAAGCAGAGCGGCTTAAGCAAATTTGTTTGTGCTGACCACGCGCAGTATTCAC		
TGGTCCAGGAACGTGGATTTACCCAGTGGATATTGATTTACTGCCCGAGAGCAAAA	30	
AGCAGTTGTACAACCTACCAGCGTAAATCCAAAGTGTGATGGCGGATTTAGGGTAA		

【 0 1 4 5 】

【表 8】

表 8

例示的 $argA^{fbr}$ 配列のポリペプチド配列 (配列番号 31)
MVKERKTELVEGFRHSVPCIN ^Y THR ^Y GKTFVIMLGGEAIEHENFSSIVNDIGLLHSLGIRLVVV YGAR ^Y PQIDANLAAHHHEPLYHKNIRVTD ^Y AKTLELVKQAAGTLQLDITARLSMSLNNTPLQGA HINVVSGNFIIAQPLGVDDGVDYCHSGRIRRIDEDAIHRQLDSGAIVLMGPVAVSVTGESFN LTSEEIATQLAIKLKAEKMGFCSSQGV ^Y TNDGDIVSELPNEAQAARVEAQEKG ^Y DYNSGTV RFLRGAVKACRSGVRRCHLISYQEDGALLQELFSRDGIGTQIVMESAEQIRRATINDIGGIL ELIRPLEQQGILVRRSREQLEMEIDKFTIIQRDNTTIACAALYPFPEEKIGEMACVAVHPDY RSSSRGEVLLERIAAQAKQSGLSKLFVLTTRS ^Y IHWFQERGF ^Y TPVDIDLLPESKKQLYNYQRK SKVLMADLG

10

太字下線 : フィードバック抵抗性をもたらす突然変異アミノ酸
(突然変異は Y19C)

【0146】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 30 の核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 30 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 30 の DNA 配列もしくはその機能性断片、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 30 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 相同である核酸配列を含む。

20

【0147】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 31 のポリペプチド配列またはその機能性断片をコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 31 またはその機能性断片に対する 1 つもしくは複数の同類アミノ酸置換を含む、ポリペプチドをコードするポリペプチド配列をコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 31 またはその機能性断片の DNA 配列と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 相同であるポリペプチド配列をコードする。

30

【0148】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌の N - アセチルグルタミン酸シンターゼのアルギニンフィードバック阻害は、アルギニンフィードバック抵抗性 N - アセチルグルタミン酸シンターゼが活性である場合、同じ条件下の同じ亜型の細菌の野生型 N - アセチルグルタミン酸シンターゼと比較して少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、または少なくとも約 95% 減少する。

40

【0149】

いくつかの実施形態では、 $argA^{fbr}$ を宿主細胞中で発現させることができ、宿主細胞が、*in vitro* で、例えば、培地中で、かつ/または *in vivo* で、例えば、消化管内で、生存し、かつ/または増殖することができるように、遺伝子操作細菌は、 $argA^{fbr}$ 遺伝子を有する安定に維持されたプラスミドまたは染色体を含む。いくつかの実施形態では、細菌は、フィードバック抵抗性 $argA$ 遺伝子の複数のコピーを含み得る。いくつかの実施形態では、フィードバック抵抗性 $argA$ 遺伝子を低コピープラスミド上で発現させる。いくつかの実施形態では、低コピープラスミドは、発現の安定性

50

を向上させるのに有用であり得る。いくつかの実施形態では、低コピープラスミドは、非誘導性条件下での漏出性発現を低下させるのに有用であり得る。いくつかの実施形態では、フィードバック抵抗性 *argA* 遺伝子を高コピープラスミド上で発現させる。いくつかの実施形態では、高コピープラスミドは、*argA^{fbr}* 発現を増加させるのに有用であり得る。いくつかの実施形態では、フィードバック抵抗性 *argA* 遺伝子を染色体上で発現させる。

【0150】

いくつかの実施形態では、複数の作用機構 (MOAs)、例えば、同じ産物の複数のコピーを産生する回路または複数の異なる機能を果たす回路を含むように細菌に遺伝子操作を施す。挿入部位の例は、*malE/K*、*insB/I*、*araC/BAD*、*lacZ*、*dapA*、*cea* および図 18 に示すその他を含むが、これらに限定されない。例えば、遺伝子操作細菌は、4 つの異なる挿入部位、例えば、*malE/K*、*insB/I*、*araC/BAD* および *lacZ* に挿入された *argA^{fbr}* の 4 つのコピーを含み得る。あるいは、遺伝子操作細菌は、3 つの異なる挿入部位、例えば、*malE/K*、*insB/I* および *lacZ* に挿入された *argA^{fbr}* の 3 つのコピーならびに 3 つの異なる挿入部位 *dapA*、*cea* および *araC/BAD* に挿入された、3 つの突然変異アルギニンレギュロン、例えば、シトルリンを産生する 2 つおよびアルギニンを産生する 1 つを含み得る。

【0151】

いくつかの実施形態では、プラスミドまたは染色体は、野生型 *ArgR* 結合部位、例えば、*ARG* ボックスも含む。いくつかの例では、機能性 *ArgR* の存在および/または集積は、遺伝子発現のオフターゲット変化をもたらし得る、*ARG* ボックス以外の部位におけるオフターゲット結合をもたらし得る。機能性 *ARG* ボックスをさらに含むプラスミドまたは染色体を用いて、すなわち、*ArgR* シンクとして作用することによって、オフターゲット *ArgR* 結合を低減または消失させることができる。いくつかの実施形態では、プラスミドまたは染色体は、機能性 *ArgR* 結合部位を含まず、例えば、プラスミドまたは染色体は、改変 *ARG* ボックスを含むかまたは *ARG* ボックスを含まない。

【0152】

いくつかの実施形態では、フィードバック抵抗性 *argA* 遺伝子は、プラスミド上に存在し、低酸素または嫌気的条件下で誘導されるプロモーターに作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、フィードバック抵抗性 *argA* 遺伝子は、染色体に存在し、低酸素または嫌気的条件下で誘導されるプロモーターに作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、フィードバック抵抗性 *argA* 遺伝子は、プラスミド上に存在し、哺乳動物消化管に特異的である分子または代謝物により誘導されるプロモーターに作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、フィードバック抵抗性 *argA* 遺伝子は、染色体上に存在し、哺乳動物消化管に特異的である分子または代謝物により誘導されるプロモーターに作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、フィードバック抵抗性 *argA* 遺伝子は、染色体上に存在し、テトラサイクリンへの曝露により誘導されるプロモーターに作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、フィードバック抵抗性 *argA* 遺伝子は、プラスミド上に存在し、テトラサイクリンへの曝露により誘導されるプロモーターに作動可能に連結する。

【0153】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、対応する酸素レベル依存性プロモーターに加えて、変異もしくは突然変異酸素レベル依存性転写調節因子、例えば、*FNR*、*ANR* または *DNR* を含む。変異もしくは突然変異酸素レベル依存性転写調節因子は、低酸素または嫌気性環境中の作動可能に連結した遺伝子の転写を増加させる。いくつかの実施形態では、対応する野生型転写調節因子は、野生型活性を保持している。代替実施形態では、対応する野生型転写調節因子を欠失または突然変異させて、野生型活性を低減または消失させる。特定の実施形態では、突然変異酸素レベル依存性転写調節因子は、二量体化および *FNR* 活性を増強するアミノ酸置換を含む *FNR* タンパク質である (例えば、*Mo* o

10

20

30

40

50

reら、2006年参照)。

【0154】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、低酸素または嫌気性環境中でアンモニアを減少させ、かつ/または消費する異なる細菌種に由来する酸素レベル依存性転写調節因子を含む。特定の実施形態では、突然変異酸素レベル依存性転写調節因子は、淋菌に由来するFNRタンパク質である(例えば、Isabellaら、2011年参照)。いくつかの実施形態では、対応する野生型転写調節因子は、完全なままであり、野生型活性を保持する。代替実施形態では、対応する野生型転写調節因子を欠失または突然変異させて、野生型活性を低減または消失させる。

【0155】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、酸素レベル依存性プロモーター、例えば、FNRプロモーターの制御下で発現する $argA^{fbr}$ 、ならびに上で述べた1つまたは複数のARGボックス突然変異を含む突然変異調節領域の制御下で発現する野生型 $argA$ を含む。特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、酸素レベル依存性プロモーター、例えば、FNRプロモーターの制御下で発現する $argA^{fbr}$ を含み、野生型 $argA$ を含まない。他の実施形態では、突然変異アルギニンレギュロンは、酸素レベル依存性プロモーター、例えば、FNRプロモーターの制御下で発現する $argA^{fbr}$ を含み、ARGボックス突然変異を含まない野生型 $argA$ をさらに含む。

【0156】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、プラスミドおよび/または染色体から $argA^{fbr}$ を発現する。いくつかの実施形態では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子は、構成的プロモーターの制御下で発現する。いくつかの実施形態では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子は、誘導性プロモーターの制御下で発現する。一実施形態では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子は、低酸素または嫌気性環境中で活性化される酸素レベル依存性プロモーター、例えば、FNRプロモーターの制御下で発現する。例示的FNRプロモーター駆動 $argA^{fbr}$ 配列の核酸配列を表9に示す。FNRプロモーター配列は太字であり、 $argA^{fbr}$ 配列は囲み線付きである。FNRプロモーター駆動 $argA^{fbr}$ プラスミドの核酸配列を表10に示し、FNRプロモーター配列は太字であり、 $argA^{fbr}$ 配列は囲み線付きである。表11に例示的pSC101プラスミドの核酸配列を示す。任意の適切なFNRプロモーター(複数可)を任意の適切なフィードバック抵抗性 $ArgA$ と組み合わせることができる。非限定的なFNRプロモーター配列を表6に示す。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、配列番号16、配列番号17、 $nirB1$ プロモーター(配列番号18)、 $nirB2$ プロモーター(配列番号19)、 $nirB3$ プロモーター(配列番号20)、 $ydfZ$ プロモーター(配列番号21)、強リポソーム結合部位に融合した $nirB$ プロモーター(配列番号22)、強リポソーム結合部位に融合した $ydfZ$ プロモーター(配列番号23)、嫌氣的に誘導された小RNA遺伝子 $fnrS$ ($fnrS1$ プロモーター配列番号24または $fnrS2$ プロモーター配列番号25)、 crp 結合部位に融合した $nirB$ プロモーター(配列番号26)および crp 結合部位に融合した $fnrS$ (配列番号27)のうちの1つまたは複数を含む。表12に例示的 $fnrS$ プロモーター駆動 $argA^{fbr}$ 配列の核酸配列を示す。FNRプロモーター配列は太字であり、リポソーム結合部位は網掛け付きであり、 $argA^{fbr}$ 配列は囲み線付きである。

【0157】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号32の核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号32と同じポリペプチドをコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号32のDNA配列、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号32と同じポリペプチドをコードする核酸配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%相同である核酸配列を含む。

【0158】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 33 の核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 33 と同じポリペプチドをコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 33 の DNA 配列、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 33 と同じポリペプチドをコードする核酸配列と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、または少なくとも約 99 % 相同である核酸配列を含む。

【 0 1 5 9 】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 35 の核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 35 と同じポリペプチドをコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 35 の DNA 配列、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 35 と同じポリペプチドをコードする核酸配列と少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、または少なくとも約 99 % 相同である核酸配列を含む。

【 0 1 6 0 】

【 表 9 】

表 9

例示的 FNR プロモーター駆動 $argA^{fbr}$ 配列 (配列番号 32)	
AGTTGTTCTTATTGGTGGTGTTCGTTTATGGTTGCATCGTAGTAAATGGTTGTAACAA	
AAGCAATTTTTCCGGCTGTCTGTATACAAAACGCCGCAAAGTTTGAGCGAAGTCAAT	
AAACTCTCTACCCATTTCAGGGCAATATCTCTCTTggatccaaagtgaactctagaaat	
aatTTTTgtTTaactTTaagaaggagatatacatATGGTAAAGGAACGTAAAACCGAG	
TTGGTCGAGGGATTCCGCCATTCGGTTCCTGTATCAATACCCACCGGGGAAAAACG	
TTTGTTCATCATGCTCGGCGGTGAAGCCATTGAGCATGAGAATTTCTCCAGTATCGTT	
AATGATATCGGGTTGTTGCACAGCCTCGGCATCCGTCTGGTGGTGGTCTATGGCGCA	
CGTCCGCAGATCGACGCAAATCTGGCTGCGCATCACCACGAACCGCTGTATCACAAG	
AATATACGTGTGACCGACGCCAAAACACTGGAAC TGGTGAAGCAGGCTGCGGGAACA	
TTGCAACTGGATATTACTGCTCGCCTGTTCGATGAGTCTCAATAACACGCCGCTGCAG	
GGCGCGCATATCAACGTCGTCAGTGGCAATTTTATTATTGCCAGCCGCTGGGCGTC	
GATGACGGCGTGGATTACTGCCATAGCGGGCGTATCCGGCGGATTGATGAAGACGG	
ATCCATCGTCAACTGGACAGCGGTGCAATAGTGCTAATGGGGCCGGTCGCTGTTTCA	
GTCACTGGCGAGAGCTTTAACCTGACCTCGGAAGAGATTGCCACTCAACTGGCCATC	
AAACTGAAAGCTGAAAAGATGATTGGTTTTTGTCTTCCCAGGGCGTCACTAATGAC	
GACGGTGATATTGTCTCCGAAC TTTCCCTAACGAAGCGCAAGCGGGTAGAAGCC	
CAGGAAGAGAAAGGCGATTACAAC TCCGGTACGGTGCGCTTTTGTGCGTGGCGCAGTG	
AAAGCCTGCCGAGCGGGCGTGCCTCGCTGTCATTTAATCAGTTATCAGGAAGATGGC	
GCGCTGTTGCAAGAGTTGTTCTCACGCGACGGTATCGGTACGCAGATTGTGATGGAA	
AGCGCCGAGCAGATTCGTCGCGCAACAATCAACGATATTGGCGGTATTCTGGAGTTG	
ATTCGCCCACTGGAGCAGCAAGGTATTCTGGTACGCCGTTCTCGCGAGCAGCTGGAG	
ATGGAAATCGACAAATTCACCATTATTCAGCGCGATAACACGACTATTGCCTGCGCC	
GCGCTCTATCCGTTCCC GGAAGAGAAGATTGGGGAAATGGCCTGTGTGGCAGTTCAC	
CCGGATTACCGCAGTTCATCAAGGGGTGAAGTTC TGCTGGAACGCATTGCCGCTCAG	
GCTAAGCAGAGCGGCTTAAGCAAATGTTTGTGCTGACCACGCGCAGTATTCACTGG	
TTCCAGGAACGTGGATTTACCCAGTGGATATTGATTTACTGCCCGAGAGCAAAAAG	
CAGTTGTACAAC TACCAGCGTAAATCCAAGTGTGATGGCGGATTTAGGGTAA	

【 0 1 6 1 】

【表 10 - 1】

表 10

FNRプロモーター駆動 <i>argA^{fbr}</i> プラスミドの例示的配列 (配列番号 33)
GTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCATCCCCATCACTCTTGATGGAGATCAA
TTCCCCAAGCTGCTAGAGCGTTACCTTGCCCTTAAACATTAGCAATGTCGATTTATCAGAGG
GCCGACAGGCTCCACAGGAGAAAACCGATGGTAAAGGAACGTAAAACCGAGTTGGTCGAGG
GATTCCGCCATTCGGTTCCTGTATCAATACCCACCGGGGAAAAACGTTTGTTCATCATGCTC
GGCGGTGAAGCCATTGAGCATGAGAATTTCTCCAGTATCGTTAATGATATCGGGTTGTTGCA
CAGCCTCGGCATCCGTCTGGTGGTGGTCTATGGCGCACGTCCGCAGATCGACGCAAATCTGG
CTGCGCATCACACGAACCGCTGTATCACAAGAATATACGTGTGACCGACGCCAAAACACTG
GAACTGGTGAAGCAGGCTGCGGGAACATTGCAACTGGATATTACTGCTCGCCTGTCGATGAG
TCTCAATAACACGCCGCTGCAGGGCGCGCATATCAACGTCGTCAGTGGCAATTTATTATTG
CCCAGCCGCTGGGCGTCGATGACGGCGTGGATTACTGCCATAGCGGGCGTATCCGGCGGATT

【表 10 - 2】

GATGAAGACGCGATCCATCGTCAACTGGACAGCGGTGCAATAGTGCTAATGGGGCCGGTTCGC	
TGTTTTAGTCACTGGCGAGAGCTTTAACCTGACCTCGGAAGAGATTGCCACTCAACTGGCCA	
TCAAAGTCAAAGCTGAAAAGATGATTGGTTTTTGGCTCTTCCAGGGCGTCACTAATGACGAC	
GGTGATATTGTCTCCGAACTTTTCCCTAACGAAGCGCAAGCGCGGGTAGAAGCCCAGGAAGA	
GAAAGGCGATTACAACCTCCGGTACGGTGCCTTTTTGCGTGGCGCAGTGAAAGCCTGCCGCA	
GCGGCGTGCCTCGCTGTCATTTAATCAGTTATCAGGAAGATGGCGCGCTGTTGCAAGAGTTG	
TTCTCACGCGACGGTATCGGTACGCAGATTGTGATGGAAAGCGCCGAGCAGATTCGTCCGCGC	
AACAATCAACGATATTGGCGGTATTCTGGAGTTGATTCGCCACTGGAGCAGCAAGGTATTC	
TGGTACGCCGTTCTCGCGAGCAGCTGGAGATGGAAAATCGACAAATTCACCATATTCAGCGC	
GATAACACGACTATTGCCTGCGCCGCGCTCTATCCGTTCCCGGAAGAGAAGATTGGGGAAAT	
GGCCTGTGTGGCAGTTCACCCGGATTACCCGAGTTCATCAAGGGGTGAAGTTCTGCTGGAAC	
GCATTGCCGCTCAGGCTAAGCAGAGCGGCTTAAGCAAATGTTTTGTGCTGACCACGCGCAGT	
ATTCAGTGGTTCAGGAACGTGGATTTACCCAGTGGATATTGATTTACTGCCCGAGAGCAA	
AAAGCAGTTGTACAACCTACCAGCGTAAATCCAAAGTGTGATGGCGGATTTAGGGTAAACAG	
AATAAAAATAACAATAATTCGAATAATCATGCAAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGT	
TTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATGTAC	
GGTTTTGCTGCCCGCAAACGGGCTGTTCTGGTGTGCTAGTTTGTATCAGAATCGCAGAT	
CCGGCTTCAGGTTTCCCGCTGAAAGCGCTATTTCTCCAGAATTGCCATGATTTTTTCCC	
ACGGGAGGCGTCACTGGCTCCCGTGTGTCGGCAGCTTTGATTCGATAAGCAGCATCGCCTG	
TTTCAGGCTGTCTATGTGTGACTGTTGAGCTGTAACAAGTTGTCTCAGGTGTTCAATTTTCA	
GTTCTAGTTGCTTTGTTTTACTGGTTTACCTGTTCTATTAGGTGTTACATGCTGTTTCACT	
GTTACATTGTGCATCTGTTTATGGTGAACAGCTTTAAATGCACCAAAAACCTCGTAAAAGCTC	
TGATGTATCTATCTTTTTTACACCGTTTTTATCTGTGCATATGGACAGTTTTTCCCTTTGATA	
TCTAACGGTGAACAGTTGTTCTACTTTTTGTTTGTAGTCTTGATGCTTCACTGATAGATA	
AGAGCCATAAGAACCTCAGATCCTTCCGTATTTAGCCAGTATGTTCTCTAGTGTGGTTCGTT	
GTTTTTGCCTGAGCCATGAGAACGAACATTGAGATCATGCTTACTTTGCATGTCACCTAAA	
AATTTTGCCTCAAAACTGGTGAAGTGAATTTTTGCAGTTAAAGCATCGTGTAGTGTTTTTCT	
TAGTCCGTTACGTAGGTAGGAATCTGATGTAATGGTTGTTGGTATTTTGTCAACCATTCATTT	
TTATCTGGTTGTTCTCAAGTTCGGTTACGAGATCCATTTGTCTATCTAGTTCAACTTGAAA	
ATCAACGTATCAGTCCGGCCGCTCGCTTATCAACCACCAATTTTCAATTTGCTGTAAGTGT	
TAAATCTTTACTTATTGGTTTCAAACCCATTGGTTAAGCCTTTTTAACTCATGGTAGTTAT	
TTTCAAGCATTAACATGAACCTTAAATTCATCAAGGCTAATCTCTATATTTGCCTTGTGAGTT	
TTCTTTTGTGTTAGTTCTTTTAATAACCACTCATAAATCCTCATAGAGTATTTGTTTTCAA	
AGACTTAACATGTTCCAGATTATATTTTTATGAATTTTTTAACTGGAAAAGATAAGGCAATA	
TCTTCTCACTAAAACTAATTTCTAATTTTTTCGCTTGAGAACTTGGCATAGTTTGTCCACTGG	
AAAATCTCAAAGCCTTTAACCAGGATTTCCTGATTTCCACAGTTCTCGTCATCAGCTCTCT	
GGTTGCTTTAGCTAATACACCATAAGCATTTCCTTACTGATGTTTATCATCTGAGCGTATT	
GGTTATAAGTGAACGATACCGTCCGTTCTTTCCCTTGTAGGGTTTTCAATCGTGGGGTTGAGT	
AGTGCCACACAGCATAAAAATTAGCTTGGTTTTCATGCTCCGTTAAGTCATAGCGACTAATCGC	
TAGTTCATTTGCTTTGAAAACAATAATTACAGACATACATCTCAATTGGTCTAGGTGATTTT	
AATCACTATACCAATTGAGATGGGCTAGTCAATGATAATTACTAGTCCTTTTTCCCTTTGAGTT	
GTGGGTATCTGTAAATTTCTGCTAGACCTTTGCTGGAAAACCTGTAAATTTCTGCTAGACCCTC	
TGTAAATTTCCGCTAGACCTTTGTGTGTTTTTTTTGTTTATATTCAAGTGGTTATAATTTATA	
GAATAAAGAAAGAATAAAAAAAGATAAAAAAGAATAGATCCCAGCCCTGTGTATAACTCACTA	
CTTTAGTCAGTTCGCGAGTATTACAAAAGGATGTCGCAAACGCTGTTTGTCTCTACAAAA	
CAGACCTTAAAACCTTAAAGGCTTAAAGTAGCACCTTCGCAAGCTCGGGCAAATCGCTGAATA	
TTCTTTTGTCTCCGACCATCAGGCACCTGAGTGCCTGTTCTTTTTCGTGACATTCAGTTCCG	
TGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGTAAATGGCACTACAGGCGCCTTTTATGGATTTC	
ATGCAAGGAAACTACCATAATACAAGAAAAGCCGTCACGGGCTTCTCAGGGCTTTTATG	

10

20

30

40

【表 10 - 3】

```

GCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGACTTTTTGCTGTTTACGAGTTTCTGCCCTCTGATTT
TCCAGTCTGACCACTTCGGATTATCCCGTGACAGGTCATTACAGACTGGCTAATGCACCCAGT
AAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGTCTTACTGTCTTTTCTACGGGGTCTGACGCT
CAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTAC
CTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTT
GGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGT
TCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATC
TGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAA
TAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATC
CAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAA
CGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCAATCA
GCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTT
AGTCCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGT
TATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTG
GTGAGTACTCAACCAAGTCATCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCG
GCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAA
ACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAAC
CCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTACGATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCA
AAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACT
CATACTCTTCCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGAT
ACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAA
GTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTAT
CACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGC
TCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGC
GCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGT
ACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCA
TCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCT
TCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCC
AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT

```

10

20

【 0 1 6 2 】

【表 11 - 1】

30

表 11

pSC101プラスミドの核酸配列 (配列番号34)	
ATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTATTGCGTTGCGCTCACTG	
CCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGC	
GGGGAGAGGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGC	
GCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAGTACGGGTT	
TTGCTGCCCCGAAACGGGCTGTTCTGGTGTGCTAGTTTGTATCAGAATCGCAGATCC	
GGCTTCAGGTTTGGCCGGCTGAAAGCGCTATTTCTTCCAGAATTGCCATGATTTTTCCC	
CACGGGAGGCGTCACTGGCTCCCCTGTTGTGCGCAGCTTTGATTTCGATAAGCAGCATCG	
CCTGTTTTCAGGCTGTCTATGTGTGACTGTTGAGCTGTAACAAGTTGTCTCAGGTGTTCA	
ATTTTCATGTTCTAGTTGCTTTGTTTTACTGGTTTTACCTGTTCTATTAGGTGTTACATG	
CTGTTTCATCTGTTACATTGTGATCTGTTTCATGGTGAACAGCTTTAAATGCACCAAAAA	
CTCGTAAAAGCTCTGATGTATCTATCTTTTTTACACCGTTTTTCATCTGTGCATATGGAC	
AGTTTTCCCTTTGATATCTAACGGTGAACAGTTGTTCTACTTTTTGTTTGTAGTCTTGA	
TGCTTCACTGATAGATAACAAGAGCCATAAGAACCTCAGATCCTTCCGTATTTAGCCAGT	
ATGTTCTCTAGTGTGGTTCGTTGTTTTTGGTGTGAGCCATGAGAACGAACCATTGAGATC	
ATGCTTACTTTGCATGTCACCTCAAAAATTTGCCTCAAAACTGGTGAGCTGAATTTTTG	
CAGTTAAAGCATCGTGTAGTGTTTTTCTTAGTCCGTTACGTAGGTAGGAATCTGATGTA	

40

【表 1 1 - 2】

ATGGTTGTTGGTATTTTGTCCACCATTCATTTTTATCTGGTTGTTCTCAAGTTCGGTTAC
 GAGATCCATTTGTCTATCTAGTTCAACTTGGAAAATCAACGTATCAGTCGGGCGGCCTC
 GCTTATCAACCACCAATTTTCATATTGCTGTAAGTGTAAATCTTTACTTATTGGTTTC
 AAAACCCATTGGTTAAGCCTTTTAAACTCATGGTAGTTATTTTCAAGCATTAACATGAA
 CTTAAATTCATCAAGGCTAATCTCTATATTTGTCCTTGTGAGTTTTCTTTTGTGTAGTT
 CTTTTAATAACCCTCATAAATCCTCATAGAGTATTTGTTTTCAAAGACTTAACATGT
 TCCAGATTATATTTTATGAATTTTTTAACTGGAAAAGATAAGGCAATATCTCTTCACT
 AAAACTAATTCTAATTTTTTCGCTTGAGAACTTGGCATAGTTTGTCCACTGGAAAATCT
 CAAAGCCTTTAACCAGGATTCTGATTTCCACAGTTCTCGTCATCAGCTCTCTGGTT
 GCTTTAGCTAATACACCATAAGCATTTTCCCTACTGATGTTTCATCATCTGAGCGTATTG
 GTTATAAGTGAACGATACCGTCCGTTCTTTCCCTGTAGGGTTTTCAATCGTGGGGTTGA
 GTAGTGCCACACAGCATAAAAATTAGCTTGGTTTCATGCTCCGTTAAGTCATAGCGACTA
 ATCGCTAGTTTCAATTTGCTTTGAAAACAATAATTAGACATACATCTCAATTGGTCTAG
 GTGATTTTAAATCACTATAACCAATTGAGATGGGCTAGTCAATGATAATTACTAGTCCTTT
 TCCTTTGAGTTGTGGGTATCTGTAAATTTCTGCTAGACCTTTGCTGGAAAACCTGTAAAT
 TCTGCTAGACCCTCTGTAAATTTCCGCTAGACCTTTGTGTGTTTTTTTTGTTTTATATCA
 AGTGGTTATAATTTATAGAATAAAGAAAAGAATAAAAAAAGATAAAAAAGAATAGATCCCA
 GCCCTGTGTATAACTCACTACTTTAGTCAGTTCCGCAGTATTACAAAAGGATGTCGCAA
 ACGCTGTTTGTCTCTACAAAACAGACCTTAAACCCTAAAGGCTTAAGTAGCACCT
 CGCAAGCTCGGGCAAATCGCTGAATATTCCTTTTGTCTCCGACCATCAGGCACCTGAGT
 CGCTGTCTTTTTTCGTGACATTCAGTTCGCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGG
 TAAATGGCACTACAGGCGCTTTTTATGGATTCATGCAAGGAACTACCCATAATACAAG
 AAAAGCCCGTCACGGGCTTCTCAGGGCGTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATC
 TGACTTTTTGCTGTTTACAGCAGTTTCTGCCCTCTGATTTTTCCAGTCTGACCACTTCGGAT
 TATCCCGTGACAGGTCATTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGGTATCATCA
 ACAGGCTTACCCGCTTACTGTCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAAC
 TCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTT
 AAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACA
 GTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTATCC
 ATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGG
 CCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAA
 TAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCC
 ATCCAGTCTATTAATGTTGCGGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTT
 GCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGG
 CTTCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGC
 AAAAAAGCGGTTAGTCTCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGT
 GTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAA
 GATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGG
 CGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAC
 TTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTAC
 CGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACGATCTTACGATCT
 TTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAA
 GGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTTAT
 GAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAA
 AATAAACAAATAGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGA
 ACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC
 TCGCGCGTTTTCCGGTATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTC
 ACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGG
 TGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAG
 TGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGG

10

20

30

40

【表 1 1 - 3】

CGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTC GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCG

【 0 1 6 3】

【表 1 2 - 1】

表 1 2

10

例示的 f n r S プロモーター駆動 a r g A ^f b ^r p S C 1 0 1 プラスミドの ヌクレオチド配列 (配列番号 3 5)	
ggtagc	AGTTGTTCTTATTGGTGGTGTGCTTTATGGTTGCATCGTAGTAAATGGTTGT
AACAAAAGCAATTTTTCCGGCTGTCTGTATACAAAAACGCCGCAAAGTTTGAGCGAAGT	
CAATAAACTCTCTACCCATTCAGGGCAATATCTCTCTTggatccaaagtgaactctaga	
aataaattttgtttaactttaagaaggagatatacat	ATGGTAAAGGAACGTAAAACCG
AGTTGGTCGAGGGATTCCGCCATTCGGTTCCTGTATCAATACCCACCGGGGAAAAAC	
GTTTGTGCATCATGCTCGGCGGTGAAGCCATTGAGCATGAGAATTTCTCCAGTATCGTT	
AATGATATCGGGTGTGGCACAGCCTCGGCATCCGTCTGGTGGTGGTCTATGGCGCAC	
GTCCGCAGATCGACGCAAATCTGGCTGCGCATCACACGAACCGCTGTATCACAAGAA	20
TATACGTGTGACCGACGCCAAAACACTGGAAGTGGTGAAGCAGGCTGCGGGAACATTG	
CAACTGGATATTACTGCTCGCCTGTCGATGAGTCTCAATAACACGCCGCTGCAGGGCG	
CGCATATCAACGTCGTCAGTGGCAATTTTATTATTGCCAGCCGCTGGGCGTCGATGA	
CGGCGTGGATTACTGCCATAGCGGGCGTATCCGGCGGATTGATGAAGACGCGATCCAT	
CGTCAACTGGACAGCGGTGCAATAGTGCTAATGGGGCCGGTCGCTGTTTCAGTCACTG	
GCGAGAGCTTTAACCTGACCTCGGAAGAGATTGCCACTCAACTGGCCATCAAACCTGAA	
AGCTGAAAAGATGATTGGTTTTTGTCTTCCCAGGGCGTCACTAATGACGACGGTGTAT	
ATTGTCTCCGAACTTTTCCCTAACGAAGCGCAAGCGCGGGTAGAAGCCAGGAAGAGA	
AAGGCGATTACAACCTCCGGTACGGTGCCTTTTTGCGTGGCGCAGTGAAAGCCTGCCG	
CAGCGGCGTGCCTGCTGTCATTTAATCAGTTATCAGGAAGATGGCGCGCTGTTGCAA	
GAGTTGTTCTCACGCGACGGTATCGGTACGCAGATTGTGATGGAAAGCGCCGAGCAGA	30
TTCTGTCGCGCAACAATCAACGATATTGGCGGTATTCGGAGTTGATTCCGCCACTGGA	
GCAGCAAGGTATTCTGGTACGCCGTTCTCGCGAGCAGCTGGAGATGGAAATCGACAAA	
TTCAACATTATTAGCGCGATAACACGACTATTGCCTGCGCCGCGCTCTATCCGTTCC	
CGGAAGAGAAGATTGGGGAAATGGCCTGTGTGGCAGTTCACCCGATTACCGCAGTTC	
ATCAAGGGGTGAAGTTCTGCTGGAACGCATTGCCGCTCAGGCTAAGCAGAGCGGCTTA	
AGCAAATTGTTTGTGCTGACCACGCGCAGTATTCAGTGGTTCCAGGAACGTGGATTTA	
CCCCAGTGGATATTGATTTACTGCCCGAGAGCAAAAAGCAGTTGTACAACCTACCAGCG	
TAAATCCAAAGTGTGATGGCGGATTTAGGGTAA	GGAAGTTTGTCTAGATCTCAGGCG
TGGATGGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC	
ACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATG	40
AGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACC	
TGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATT	
GGGCGCTCTTCCGCTTCCCTGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCG	
AGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAGTACGGGTTTTGCTGCCCGCAAACGGGCTGT	
TCTGGTGTGCTAGTTTGTATCAGAATCGCAGATCCGGCTTCAGGTTTCCGGCTGAA	
AGCGCTATTTCTTCCAGAATTGCCATGATTTTTTCCCACGGGAGGCGTCACTGGCTCC	
CGTGTGTGCGCAGCTTTGATTCCGATAAGCAGCATCGCCTGTTTCAGGCTGTCTATGTG	
TGACTGTTGAGCTGTAACAAGTTGTCTCAGGTGTTCAATTTTCATGTTCTAGTTGCTTTG	
TTTTACTGGTTTACCTGTTCTATTAGGTGTTACATGCTGTTTCATCTGTTACATTGTGCG	
ATCTGTTTCATGGTGAACAGCTTTAAATGCACCAAAAACCTCGTAAAAGCTCTGATGTATC	

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

TATCTTTTTTACACCGTTTTTCATCTGTGCATATGGACAGTTTTCCCTTTGATATCTAAC
GGTGAACAGTTGTTCTACTTTTTGTTTGTAGTCTTGATGCTTCACTGATAGATAACAAGA
GCCATAAGAACCTCAGATCCTTCCGTATTTAGCCAGTATGTTCTCTAGTGTGGTTCGTT
GTTTTTGCGTGAGCCATGAGAACGAACCATTGAGATCATGCTTACTTTGCATGTCACCTC
AAAAATTTTGCCTCAAAACTGGTGAGCTGAATTTTTGCAGTTAAAGCATCGTGTAGTGT
TTTTCTTAGTCCGTTACGTAGGTAGGAATCTGATGTAATGGTTGTTGGTATTTTTGTCAC
CATTCATTTTTATCTGGTTGTTCTCAAGTTCGGTTACGAGATCCATTTGTCTATCTAGT
TCAACTTGGAAAAATCAACGTATCAGTCGGGCGGCCTCGCTTATCAACCACCAATTTTCAT
ATTGCTGTAAGTGTAAATCTTTACTTATTGGTTTTCAAACCATTGGTTAAGCCTTT
TAAACTCATGGTAGTTATTTTTCAAGCATTAAACATGAACTTAAATTCATCAAGGCTAATC
TCTATATTTGCCTTGTGAGTTTTCTTTTGTGTTAGTTCTTTTAATAACCACTCATAAAT
CCTCATAGAGTATTTGTTTTCAAAGACTTAACATGTTCCAGATTATATTTTATGAATT
TTTTTAACTGGAAAAGATAAGGCAATATCTCTTCACTAAAAACTAATTCTAATTTTTTCG
CTTGAGAACTTGGCATAGTTTGTCCACTGGAAAATCTCAAAGCCTTTAACCAAAAGGATT
CCTGATTTCCACAGTTCCTCGTCATCAGCTCTCTGGTTGCTTTAGCTAATACACCATAAG
CATTTTCCCTACTGATGTTTCATCATCTGAGCGTATTGGTTATAAGTGAACGATACCGTC
CGTTCTTTCCCTTGTAGGGTTTTCAATCGTGGGGTTGAGTAGTGCCACACAGCATAAAAT
TAGCTTGGTTTTCATGCTCCGTTAAGTCATAGCGACTAATCGCTAGTTCATTTGCTTTGA
AAACAACATAATTCAGACATACATCTCAATTGGTCTAGGTGATTTAATCACTATAACCAA
TTGAGATGGGCTAGTCAATGATAATTACTAGTCCTTTTCCCTTTGAGTTGTGGGTATCTG
TAAATTCGCTAGACCTTTGCTGGAAAACCTGTAAATTCGCTAGACCCTCTGTAAATT
CCGCTAGACCTTTGTGTGTTTTTTTTGTTTATATTCAAGTGGTTATAATTTATAGAATA
AAGAAAGAATAAAAAAAGATAAAAAAGAATAGATCCAGCCCTGTGTATAACTCACTACT
TTAGTCAGTTCGCGAGTATTACAAAAGGATGTCGCAAACGCTGTTTGCTCCTCTACAAA
ACAGACCTTAAACCCTAAAGGCTTAAGTAGCACCCCTCGCAAGCTCGGGCAAATCGCTG
AATATTCCTTTTGTCTCCGACCATCAGGCACCTGAGTCGCTGTCTTTTTTCGTGACATTC
AGTTCGCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGGTAATGGCACTACAGGCGCCTT
TTATGGATTTCATGCAAGGAACTACCATAATACAAGAAAAGCCCGTCACGGGCTTCTC
AGGGCGTTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGTCTATCTGACTTTTTGCTGTTTACGAGT
TCCTGCCCTCTGATTTTCCAGTCTGACCCTTCCGATTATCCCGTGACAGGTCATTTCAG
ACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGCTTACTGT
CTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCA
TGAGATTATCAAAAAGGATCTTCCACTAGATCCTTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAA
TCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGA
GGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCCATCAGTTGCTGACTCCCCGTG
TGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCAGTGTGCAATGATACCG
CGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGC
CGAGCGCAGAAGTGGTCCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATGTTGCC
GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCT
ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCA
ACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCG
GTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCA
GCACTGCATAATCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGA
GTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGG
CGTCAATACGGGATAAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGA
AAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGAT
GTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTG
GGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGGAATAAGGGCGACACGGAAA
TGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTG
TCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGC

10

20

30

40

【表 1 2 - 3】

```
GCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTA
ACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGG
TGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATG
CCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTACAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGGCTGG
CTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAAT
ACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTTCGCCATTTCAGGCTGC
GCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAA
GGGGGATGTGCTGCAAGGCG
```

10

【0164】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、染色体に組み込まれた *argA^{fbr}* を含む。いくつかの実施形態では、組み込まれた *fbrArgA* は、*fnrS* プロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態では、抗生物質耐性カセットも同じ部位に存在する。いくつかの実施形態では、抗生物質耐性カセットは、存在しない。いくつかの実施形態では、抗生物質耐性は、クロラムフェニコールである。いくつかの実施形態では、抗生物質耐性は、カナマイシンである。いくつかの実施形態では、染色体に組み込まれた *argA^{fbr}* を含む遺伝子操作細菌は、*thyA* 栄養要求体である。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、染色体に組み込まれた *argA^{fbr}* を含み、*ArgR* 突然変異も含むかまたは *ArgR* の欠失を有する。1つの特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、*fnrS* プロモーターの制御下にあり、染色体に組み込まれた *argA^{fbr}* を含み、*ArgR* 突然変異を含むかまたは *ArgR* の欠失を有し、*thyA* 栄養要求性を含む。他の特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、*fnrS* プロモーターの制御下にあり、染色体に組み込まれた *argA^{fbr}* を含み、*ArgR* 突然変異を含むかまたは *ArgR* の欠失を有し、*thyA* 栄養要求性を含む、抗生物質耐性カセットを含む。他の特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、*fnrS* プロモーターの制御下にあり、染色体に組み込まれた *argA^{fbr}* を含み、*ArgR* 突然変異を含むかまたは *ArgR* の欠失を有し、*thyA* 栄養要求性を含む、カナマイシン耐性カセットを含む。1つの特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、SYN-UCD305 である。他の特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、SYN_UCD303 である。

20

30

【0165】

表 1 3 に染色体に組み込まれている *FNR S - fbrArgA* 構築物の非限定的な例を示す。

【0166】

配列番号 36 は、例えば、SYN-UCD301、SYN-UCD302 に含まれているような、*FNR S - fbrArgA* およびクロラムフェニコール耐性を含む。配列番号 37 は、例えば、SYN-UCD303、SYN-UCD306、SYN-UCD307 および SYN-UCD309 に含まれているような、*FNR S - fbrArgA* およびカナマイシン耐性を含む。配列番号 38 は、例えば、SYN-UCD305、SYN-UCD304、SYN-UCD308、SYN-UCD310 に含まれているような、*FNR S - fbrArgA* を含み、抗生物質耐性を含まない。

40

【0167】

【表 13 - 1】

組み込まれた $argA^{fbr}$ 配列の表 13

説明	配列	配列番号
FNRS- fbrArgA およびクロラム フェニコール 耐性、例えば、 SYN-UCD 301、SYN- UCD302； 構築物の概略図 を図20に示す； 大文字下線付き：	ctacgccccatcgttgctttgtgtgatctctgttacaga attggcggtaatgtggagatgcgcacataaaaatcgccat gatttttgcaagcaacatcacgaaattccttacatgacc tcggtttagttcacaggacgtcccatggctcgagCATGC GAGAGTAGGGAAGTCCAGGCAT <u>CAAATAAAAtGAAAGG</u> <u>CTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTT</u> <u>TGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGG</u> GAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCCGGAGGGT GGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAA TTAAGC <u>AGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTT</u> TGCGT GGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCAGATTGCAGCATTACAC GTCTTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC <u>GAAGTT</u> <u>CCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAAC</u> <u>TTCAATTTAAATGGCGCGCCTTACGCCCCGCCCTGCCACT</u> <u>CATCGCAGTACTGTTGTATTTCATTAAGCATCTGCCGACA</u> <u>TGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACCTGAATCGCC</u> AGCGGCATCAGCACCTTGTGCGCTTGCCTATAATATTTG CCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTG GCCACGTTTTAAATCAAACTGGTGAAACTCACCCAGGGA TTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCTTTA GGGAAATAGGCCAGGTTTTACCGTAACACGCCACATCT TGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAAATCGTCGTGG TATTCCTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCA TGGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATC ACCAGCTCACCGTCTTTTCATTGCCATACGTAATTCCGGA TGAGCATTATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCC GGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAA AAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTA CATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTA CGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTG ATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAAT CTCGACAACCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATT TCATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCA ACGTCTCATTTCGCCAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCCCG GTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATCTGCGAAG	配列番号 36
CmR 遺伝子； 大文字斜体； CmR プロ モーター； 大文字斜体 下線付き：		10
fnrS プロ モーター； 大文字太字； ArgA fbr； 大文字太字 下線付き；		20
終結配列； 大文字斜体太字； f r t 部位		30

【表 1 3 - 2】

	<p>TGATCTTCCGTCACAGGTAGGCGCGCCGAAGTTCCTATA C T T T C T A G A G A A T A G G A A C T T C G G A A T A G G A A C T A A G G A G G A T A T T C A T A T G G A C C A T G G C T A A T T C C C A G G T A C C A G T T G T T C T T A T T G G T G G T G T T G C T T T A T G G T T G C A T C G T A G T A A A T G G T T G T A A C A A A A G C A A T T T T T C C G G C T G T C T G T A T A C A A A A C G C C G T A A A G T T T G A G C G A A G T C A A T A A A C T C T C T A C C C A T T C A G G G C A A T A T C T C T C T T G G A T C C a a a g t g a a c t c t a g a a a t a a t t t t g t t t a a c t t t a a g a a g g a g a t a t a c a t A T G G T A A A G G A A C G T A A A A C C G A G T T G G T C G A G G G A T T C C G C C A T T C G G T T C C C T G T A T C A A T A C C C A C C G G G A A A A C G T T T G T C A T C A T G C T C G G C G G T G A A G C C A T T G A G C A T G A G A A T T T C T C C A G T A T C G T T A A T G A T A T C G G G T T G T T G C A C A G C C T C G G C A T C C G T C T G G T G G T G G T C T A T G G C G C A C G T C C G C A G A T C G A C G C A A A T C T G G C T G C G C A T C A C C A C G A A C C G C T G T A T C A C A A G A A T A T A C G T G T G A C C G A C G C C A A A C A C T G G A A C T G G T G A A G C A G G C T G C G G G A A C A T T G C A A C T G G A T A T T A C T G C T C G C C T G T C G A T G A G T C T C A A T A A C A C G C C G C T G C A G G G C G C G C A T A T C A A C G T C G T C A G T G G C A A T T T T A T T A T T G C C C A G C C G C T G G G C G T C G A T G A C G G C G T G G A T T A C T G C C A T A G C G G G C G T A T C C G G C G G A T T G A T G A A G A C G C G A T C C A T C G T C A A C T G G A C A G C G G T G C A A T A G T G C T A A T G G G G C C G G T C G C T G T T T C A G T C A C T G G C G A G A G C T T T A A C C T G A C C T C G G A A G A G A T T G C C A C T C A A C T G G C C A T C A A A C T G A A A G C T G A A A A G A T G A T T G G T T T T T G C T C T T C C C A G G G C G T C A C T A A T G A C G A C G G T G A T A T T G T C T C C G A A C T T T T C C C T A A C G A A G C G C A A G C G C G G G T A G A A G C C C A G G A A G A G A A A G G C G A T T A C A A C T C C G G T A C G G T G C G C T T T T T G C G T G G C G C A G T G A A A G C C T G C C G C A G C G G C G T G C G T C G C T G T C A T T T A A T C A G T T A T C A G G A A G A T G G C G C G C T G T T G C A A G A G T T G T T C T C A C G C G A C G G T A T C G G T A C G C A G A T T G T G A T G G A A A G C G C C G A G C A G A T T C G T C G C G C A A C A A T C A A C G A T A T T G G C G G T A T T C T G G A G T T G A T T C G C C C A C T G G A G C A G C A A G G T A T T C T G G T A C G C C G T T C T C G C G A G C A G C T G G A G A T G G A A A T C G A C A A A T T C A C C A T T A T T C A G C G C G A T A A C A C G A C T A T T G C C T G C G C C G C G C T C T A T C C G T T C C C G G A A G A G A A G A T T G G G G A A A T G G C C T G T G T G G C A G T T C A C C C G G A T T A C C G C A G T T C A T C A A G G G G T G A A G T T C T G C T G G A A C G C A T T G C C G C T C A G G C T A A G C A G A G C G G C T T A A G C A A A T T G T T T G T G C T G A C C A C G C G C A G T A T T C A C T G G T T C C A G G A A C G T G G A T T T A C C C C A G T G G A T A T T G A T T T A C T G C C C G A G A G C A A A A A G C A G T T G T A C A A C T A C C A G C G T A A A T C C A A A G T G T T G A T G G C G G A T T T A G G G T A A g t c g a c g c a t g c a t c g a t a a g c c g c g t t c t c a t c c t c c c g c e t c e t c c c c c a t a a a a a a g c c a g g g g g t g g a g g a t t t a a g c c a t c t c c t g a t g a c</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
<p>F N R S - f b r A r g A およびカナ マイシン耐性、</p>	<p>ctacgccccatcggttgctttgtgtgatctctgttacaga attggcggtaatgtggagatgcgcacataaaatcgccat gatttttgcaagcaacatcacgaaattccttacatgacc tcggtttagttcacaggacgtcccatggctcgagCATGC</p>	<p>配列番号 3 7</p>

【表 1 3 - 3】

<p>例えば、 SYN-UCD 303、SYN- UCD306； SYN- UCD307 およびSYN- UCD309； 構築物の概略図 を図21に示す； 小文字下線付き：</p>	<p>GAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAAATGAAAGG CTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTT TGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGG GAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCCGAGGGT GGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAA TTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGT GGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCAGATTGCAGCATTACAC GTCTTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTT CCTATACTTTCAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAAC TTCaagatcccctcacgctgccgcaagcactcagggcgc aagggctgctaaggaagcggaaacacgtagaaagccagt ccgcagaaacggtgctgaccccgatgaatgtcagctac tgggctatctggacaagggaaaacgcaagcgcaaagaga aagcaggtagcttgagtggtttacatggcgatagcta gactgggcggttttatggacagcaagcgaaccggaattg ccagctggggcgccctctggttaaggttgggaagccctgc aaagtaaactggatggctttcttgccgccaaggatctga tggcgcaggggatcaagatctgatcaagagacaggatga ggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgca ggttctccggcgccttgggtggagaggctattcggctat gactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgccc gtgttccggctgtcagcgcagggggcggcgggttctttt gtcaagaccgacctgtccgggtgccctgaatgaactgcag gacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggc gttccttgcgagctgtgctcgacgttgtcactgaagcg ggaagggactggctgctattgggcaagtgccggggcag gatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagta tccatcatggctgatgcaatgcccggctgcatacgctt gatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaaacat cgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggctctt gtcgtcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctc gcccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcatg cccagggcgaggatctcgtcgtgacctatggcgatgcc tgcttgccgaatatcatggtgaaaatggccgcttttct ggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgc tatcaggacatagcgttggctaccctgatattgctgaa gagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctt tacggtatcgccgctcccgatcgcagcgcacgccttc tatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactctgg ggttcgaaatgaccgaccaagcgacgccaacctgcat cacgagatttcgattccaccgccccttctatgaaaggt tgggcttcggaatcgttttccgggacgcccggctggatga tcctccagcgcgggatctcatgctggagttcttcgccc accccagcttcaaagcgctctGAAGTTCCTATACTTTC TAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATA TTCATATGGACCATGGCTAATCCAGATATGGTACCAG TTGTTCTTATGGTGGTGTGGCTTTATGGTTGCATCGTA GTAATGGTTGTAACAAAAGCAATTTTTCCGGCTGTCTG TATACAAAAACGCCGTAAGTTTTGAGCGAAGTCAATAAA CTCTCTACCCATTCAGGGCAATATCTCTCTTGGATCCaa</p>	<p>10</p>
<p>KanRプロ モーター； 小文字斜体； KanR遺伝子； 大文字下線付き：</p>	<p>aaagtaaactggatggctttcttgccgccaaggatctga tggcgcaggggatcaagatctgatcaagagacaggatga ggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgca ggttctccggcgccttgggtggagaggctattcggctat gactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgccc gtgttccggctgtcagcgcagggggcggcgggttctttt gtcaagaccgacctgtccgggtgccctgaatgaactgcag gacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggc gttccttgcgagctgtgctcgacgttgtcactgaagcg ggaagggactggctgctattgggcaagtgccggggcag gatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagta tccatcatggctgatgcaatgcccggctgcatacgctt gatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaaacat cgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggctctt gtcgtcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctc gcccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcatg cccagggcgaggatctcgtcgtgacctatggcgatgcc tgcttgccgaatatcatggtgaaaatggccgcttttct ggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgc tatcaggacatagcgttggctaccctgatattgctgaa gagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctt tacggtatcgccgctcccgatcgcagcgcacgccttc tatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactctgg ggttcgaaatgaccgaccaagcgacgccaacctgcat cacgagatttcgattccaccgccccttctatgaaaggt tgggcttcggaatcgttttccgggacgcccggctggatga tcctccagcgcgggatctcatgctggagttcttcgccc accccagcttcaaagcgctctGAAGTTCCTATACTTTC TAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATA TTCATATGGACCATGGCTAATCCAGATATGGTACCAG TTGTTCTTATGGTGGTGTGGCTTTATGGTTGCATCGTA GTAATGGTTGTAACAAAAGCAATTTTTCCGGCTGTCTG TATACAAAAACGCCGTAAGTTTTGAGCGAAGTCAATAAA CTCTCTACCCATTCAGGGCAATATCTCTCTTGGATCCaa</p>	<p>20</p>
<p>fnrSプロ モーター； 大文字肉太； ArgA f b r； 大文字肉太 下線付き； 終結配列； 大文字斜体肉太； f r t 部位</p>	<p>aaagtaaactggatggctttcttgccgccaaggatctga tggcgcaggggatcaagatctgatcaagagacaggatga ggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgca ggttctccggcgccttgggtggagaggctattcggctat gactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgccc gtgttccggctgtcagcgcagggggcggcgggttctttt gtcaagaccgacctgtccgggtgccctgaatgaactgcag gacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggc gttccttgcgagctgtgctcgacgttgtcactgaagcg ggaagggactggctgctattgggcaagtgccggggcag gatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagta tccatcatggctgatgcaatgcccggctgcatacgctt gatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaaacat cgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggctctt gtcgtcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctc gcccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcatg cccagggcgaggatctcgtcgtgacctatggcgatgcc tgcttgccgaatatcatggtgaaaatggccgcttttct ggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgc tatcaggacatagcgttggctaccctgatattgctgaa gagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctt tacggtatcgccgctcccgatcgcagcgcacgccttc tatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactctgg ggttcgaaatgaccgaccaagcgacgccaacctgcat cacgagatttcgattccaccgccccttctatgaaaggt tgggcttcggaatcgttttccgggacgcccggctggatga tcctccagcgcgggatctcatgctggagttcttcgccc accccagcttcaaagcgctctGAAGTTCCTATACTTTC TAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATA TTCATATGGACCATGGCTAATCCAGATATGGTACCAG TTGTTCTTATGGTGGTGTGGCTTTATGGTTGCATCGTA GTAATGGTTGTAACAAAAGCAATTTTTCCGGCTGTCTG TATACAAAAACGCCGTAAGTTTTGAGCGAAGTCAATAAA CTCTCTACCCATTCAGGGCAATATCTCTCTTGGATCCaa</p>	<p>30</p>
	<p>aaagtaaactggatggctttcttgccgccaaggatctga tggcgcaggggatcaagatctgatcaagagacaggatga ggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgca ggttctccggcgccttgggtggagaggctattcggctat gactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgccc gtgttccggctgtcagcgcagggggcggcgggttctttt gtcaagaccgacctgtccgggtgccctgaatgaactgcag gacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggc gttccttgcgagctgtgctcgacgttgtcactgaagcg ggaagggactggctgctattgggcaagtgccggggcag gatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagta tccatcatggctgatgcaatgcccggctgcatacgctt gatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaaacat cgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggctctt gtcgtcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctc gcccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcatg cccagggcgaggatctcgtcgtgacctatggcgatgcc tgcttgccgaatatcatggtgaaaatggccgcttttct ggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgc tatcaggacatagcgttggctaccctgatattgctgaa gagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctt tacggtatcgccgctcccgatcgcagcgcacgccttc tatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactctgg ggttcgaaatgaccgaccaagcgacgccaacctgcat cacgagatttcgattccaccgccccttctatgaaaggt tgggcttcggaatcgttttccgggacgcccggctggatga tcctccagcgcgggatctcatgctggagttcttcgccc accccagcttcaaagcgctctGAAGTTCCTATACTTTC TAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATA TTCATATGGACCATGGCTAATCCAGATATGGTACCAG TTGTTCTTATGGTGGTGTGGCTTTATGGTTGCATCGTA GTAATGGTTGTAACAAAAGCAATTTTTCCGGCTGTCTG TATACAAAAACGCCGTAAGTTTTGAGCGAAGTCAATAAA CTCTCTACCCATTCAGGGCAATATCTCTCTTGGATCCaa</p>	<p>40</p>

【表 1 3 - 4】

	<p>agtgaactctagaataatTTTTgtttaaactttaagaagg agatatacatATGGTAAAGGAACGTAAAACCGAGTTGGT CGAGGGATTCCGCCATTCCGTTCCCTGTATCAATACCCA CCGGGGAAAAACGTTTGTTCATCATGCTCGGCGGTGAAGC CATTGAGCATGAGAATTTCTCCAGTATCGTTAATGATAT CGGGTTGTTGCACAGCCTCGGCATCCGTCTGGTGGTGGT CTATGGCGCACGTCCGCAGATCGACGCAAATCTGGCTGC GCATCACCACGAACCGCTGTATCACAAGAATATACGTGT GACCGACGCCAAAACACTGGAACGGTGAAGCAGGCTGC GGGAACATTGCAACTGGATATTACTGCTCGCCTGTTCGAT GAGTCTCAATAACACGCCGCTGCAGGGCGCGCATATCAA CGTCGTGAGTGGCAATTTTATTATTGCCAGCCGCTGGG CGTCGATGACGGCGTGGATTACTGCCATAGCGGGCGTAT CCGGCGGATTGATGAAGACGCGATCCATCGTCAACTGGA CAGCGGTGCAATAGTGCTAATGGGGCCGGTTCGCTGTTTC AGTCACGGCGAGAGCTTTAACCTGACCTCGGAAGAGAT TGCCACTCAACTGGCCATCAAACCTGAAAGCTGAAAAGAT GATTGGTTTTTTGCTCTTCCCAGGGCGTCACTAATGACGA CGGTGATATTGTCTCCGAACTTTTCCCTAACGAAGCGCA AGCGCGGGTAGAAGCCAGGAAGAGAAAGGCGATTACAA CTCCGGTACGGTTCGCTTTTTTGGTGGCGCAGTGAAAGC CTGCCGCGAGCGGCGTGCCTGCTGCTCATTTAATCAGTTA TCAGGAAGATGGCGCGCTGTTGCAAGAGTTGTTCTCACG CGACGGTATCCGTACGCAGATTGTGATGGAAAGCGCCGA GCAGATTGCTCGCGCAACAATCAACGATATTGGCGGTAT TCTGGAGTTGATTGCGCCACTGGAGCAGCAAGGTATTCT GGTACGCCGTTCTCGCGAGCAGCTGGAGATGAAAATCGA CAAATTCACCATTATTCAGCGCGATAACACGACTATTGC CTGCGCGCGCTCTATCCGTTCCCGGAAGAGAAGATTGG GAAAATGGCCTGTGTGGCAGTTCAACCGGATTACCGCAG TTCATCAAGGGGTGAAGTTCTGCTGGAACGCATTGCCGC TCAGGCTAAGCAGAGCGGCTTAAGCAAATTTGTTTGTGCT GACCACGCGCAGTATTCAGTGGTTCCAGGAACGTGGATT TACCCAGTGGATATTGATTTACTGCCCCGAGAGCAAAAA GCAGTTGTACAACCTACCAGCGTAAATCCAAAGTGTGAT GGCGGATTTAGGGTAAgtcgacgcatgcatcgataagcc ggttctcatcctcccgcctcctccccataaaaaagcc agggggtggaggatttaagccatctcctgatgac</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
<p>F N R S - f b r A r g A および無抗生 物質耐性、 例えば、SYN- UCD305 SYN-UCD 304, SYN- UCD308, SYNUCD 310 ; 構築物の概略図を</p>	<p>ctacgccccatcgttgctttgtgtgatctctgttacaga attggcggtaatgtggagatgcgcacataaaatcgccat gatttttgcaagcaacatcacgaaattccttacatgacc tcggtttagttcacaggacgtcccattggctegagCATGC GAGAGTAGGGAACCTGCCAGGCATCAAATAAAATGAAAGG CTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCT GTTGTTTGTCCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATC CGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCCG GAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGC ATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTT TTGCGTGGCCAGTGCCAAGCTTGATGCAGATTGCAGCA</p>	<p>配列番号 3 8</p> <p>40</p>

含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 36 の DNA 配列もしくはその機能性断片、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 37 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 相同である核酸配列を含む。

【0169】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 37 の核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 37 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 37 の DNA 配列もしくはその機能性断片、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 37 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 相同である核酸配列を含む。

10

【0170】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 38 の核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 38 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 38 の DNA 配列もしくはその機能性断片、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 38 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 相同である核酸配列を含む。

20

【0171】

アルギニン異化

本発明を実施するうえでの重要な考慮すべき事柄は、アンモニアがアルギニンおよび/またはシトルリン異化の副産物として過剰産生されないことを保証することである。尿素回路の最終酵素ステップにおいて、アルギナーゼは、アルギニンのオルニチンおよび尿素への加水分解開裂を触媒する (Cuninら、1986年)。腸内細菌により産生される、ウレアーゼは、尿素の二酸化炭素およびアンモニアへの開裂を触媒する (Summerskill、1966年; Aoyagiら、1966年; Cuninら、1986年)。したがって、ウレアーゼ活性は、ヒト組織に対して有毒であり得るアンモニアを発生し得る (Koniecznaら、2012年)。大腸菌ニッスルを含む、いくつかの細菌において、arcD 遺伝子は、アンモニアも放出し得る、アルギニン/オルニチン対向輸送体をコードする (Vander Wauvenら、1984年; Gamperら、1991年; Mengら、1992年)。

30

【0172】

AstA は、アンモニアを放出する、コハク酸へのアルギニンの変換に関与する酵素である。SpeA は、さらに異化されてアンモニアを生成し得る、アグマチンへのアルギニンの変換に関与する酵素である。したがって、いくつかの例において、アルギニンの分解を防ぐことは、有益であり得る。いくつかの実施形態では、突然変異アルギニンレギュロンを含む遺伝子操作細菌は、アルギニン異化を低減または消失させ、それにより、さらなるアンモニアの産生を低減または消失させる突然変異をさらに含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、ArcD 活性を低減または消失させる突然変異も含む。特定の実施形態では、ArcD が欠失している。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、AstA 活性を低減または消失させる突然変異も含む。特定の実施形態では、AstA が欠失している。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、SpeA 活性を低減または消失させる突然変異も含む。特定の実施形態では、SpeA が欠失している。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギナーゼ活性を低減または消失させる突然変異も含む。特定の実施形態では、アルギナーゼが欠失している。いくつかの実施形態では、遺

40

50

伝子操作細菌は、ウレアーゼ活性を低減または消失させる突然変異も含む。特定の実施形態では、ウレアーゼが欠失している。いくつかの実施形態では、アルギニン異化に關与する1つまたは複数の他の遺伝子が突然変異または欠失している。

【0173】

他の高アンモニア血症

肝性脳症（HE）は、患者における神経認知変化を特徴とし、生化学的攪乱が病因に關連付けられた。具体的には、アンモニアレベルの上昇が疾患の病態生理に部分的に寄与していると推測されている。高アンモニア血症に加えて、脳GABAのレベルおよびマンガンレベルの上昇が認められ、臨床症状に寄与すると推測された。

【0174】

いくつかの実施形態では、本開示は、遺伝子操作微生物、例えば、細菌およびウイルス、その医薬組成物、ならびに高アンモニア血症に關連する疾患もしくは障害、例えば、肝性脳症およびハンチントン病をモジュレートまたは治療する方法を提供する。遺伝子操作細菌は、哺乳動物における過剰のアンモニアを減少させることができる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、体内の過剰の窒素を非毒性分子、例えば、アルギニン、シトルリン、メチオニン、ヒスチジン、リシン、アスパラギン、グルタミンまたはトリプトファンに組み込むことによって過剰のアンモニアを減少させる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、他の有毒または有害分子（複数可）、例えば、GABA、マンガンのレベルを低下させるための1つまたは複数の回路（遺伝子配列）をさらに含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、消化管バリア増強分子、例えば、酪酸、プロピオン酸および酢酸のような短鎖脂肪酸を産生する1つまたは複数の回路をさらに含む。本開示はまた、過剰のアンモニアならびに他の有害な分子、例えば、GABAおよびマンガンを減少させるための組成物および治療方法を提供する。特定の態様では、本開示は、過剰のアンモニアおよび他の有害な分子を減少させることができる遺伝子操作細菌を提供する。特定の態様では、本開示は、過剰のアンモニアおよび他の有害な分子を減少させ、消化管バリア機能増強分子、例えば、酪酸などの、1つまたは複数の治療用分子をさらに産生することができる遺伝子操作細菌を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、回路が誘導性プロモーター制御下にある過剰のアンモニアを減少させるための1つまたは複数の回路を含む遺伝子操作細菌を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、回路のうちの1つまたは複数が誘導性プロモーター制御下にある過剰のアンモニアを減少させるための1つまたは複数の回路および他の有害な分子を減少させるための1つまたは複数の回路を含む遺伝子操作細菌を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、回路のうちの1つまたは複数および/または治療用分子が誘導性プロモーター制御下にある過剰のアンモニアを減少させるための1つまたは複数の回路および他の有害な分子を減少させるための1つまたは複数の回路を含み、消化管バリア機能増強分子、例えば、酪酸などの、1つまたは複数の治療用分子をさらに産生する遺伝子操作細菌を提供する。特定の態様では、本明細書で開示する組成物および方法は、過剰のアンモニアに關連する疾患もしくは障害、例えば、肝性脳症もしくはハンチントン病、および/または肝性脳症もしくはハンチントン病などの、過剰のアンモニアに關連する疾患もしくは障害に隨伴する1つもしくは複数の症状を治療するために用いることができる。

【0175】

GABAの輸送および代謝

- アミノ酪酸（GABA）は、哺乳動物中枢神経系における主要な抑制性神経伝達物質である。ヒトにおいて、GABAは、リガンド開口型塩化物特異的イオンチャンネル複合体の一部である、シナプス後GABA_A受容体を活性化する。シナプス後ニューロン上のこの複合体の活性化により、塩化物イオンがニューロンに入り、抑制作用を及ぼすことが可能となる。そのようなGABA作動性神経伝達の変化は、てんかん（Jones - DavisおよびMacDonald、2003年）、ハンチントン病（Krogsgaard - Larsen、1992年）および肝性脳症（JonesおよびBasile、1997年）を含む、いくつかの神経障害の病態生理に關連付けられた。

10

20

30

40

50

【0176】

GABAによりモジュレートされる脳内のニューロンは、抑制性GABA作動性トーンのもとにあると言われる。この抑制性トーンは、十分に強力な興奮性刺激が受容されるまで、または抑制性トーンが別の方法で開放されるまで、ニューロン発火を妨げる。肝性脳症におけるGABA作動性トーンの増大は、ガラクトサミン誘発性肝不全を有するウサギおよびGABA_A受容体のアロステリックモジュレーター（例えば、ペントバルビタール、ジアゼパム）を投与したウサギにおける同様な視覚的応答パターンに基づいて、1980年代初頭に最初に記載された（JonesおよびBasile、1997年）。GABA_A受容体における高度に選択的なベンゾジアゼピンアンタゴニストであるフルマゼニルにより治療したHE患者における臨床的改善は、これらの所見をさらに確認するものであった（Banksyら、1985年；Scollo-LavizzariおよびSteinmann、1985年）。HEにおけるGABA作動性トーンの増大は、それ以来、（1）脳内のGABA濃度の上昇、（2）GABA_A受容体の完全性の変化、および/または（3）GABA_A受容体の内因性モジュレーターの濃度の上昇（AhbouchaおよびButterworth、2004年）のうちの1つまたは複数の結果であると提案された。

10

【0177】

大腸菌におけるGABAの取込みは、膜電位により駆動され、膜輸送タンパク質GABPにより促進される（Liら、2001年）。GABPは、二次性能動輸送体の2つの最大のファミリーの1つである、アミノ酸/ポリアミン/有機陽イオン（APC）輸送体スーパーファミリーのメンバーである（Jackら、2000年）。gabP遺伝子によりコードされる、GABPタンパク質は、466アミノ酸および12膜貫通アルファらせんからなり、NおよびC末端の両方が細胞質ゾルに面している（HuおよびKing、1998a）。GABP残基配列は、細菌から哺乳動物までのAPCファミリーのメンバー間で保存されている、共通両親媒性領域（CAR）も含む（HuおよびKing、1998b）。細胞への侵入により、GABAがGABA-ケトグルタル酸トランスアミナーゼ（GSST）によりスクシニルセミアルデヒド（SSA）に変換される。コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ（SSDH）がGABA異化における第2の唯一の他の特異的ステップである、スクシニルセミアルデヒドのコハク酸への酸化を触媒する（DoverおよびHalpern、1972年）。最終的に、コハク酸がクエン酸（TCA）回路の基質になる。

20

30

【0178】

いくつかの実施形態では、細菌は、本明細書に記載の代謝経路、例えば、アルギニン生合成経路、ヒスチジン生合成経路、メチオニン生合成経路、リシン生合成経路、アスパラギン生合成経路、グルタミン生合成経路またはトリプトファン生合成経路（「アンモニア変換回路」）により過剰のアンモニアを消費するように遺伝子操作されている。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニン生合成経路を含み、過剰のアンモニアを減少させることができる。いくつかの実施形態では、アンモニア変換回路は、誘導性プロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態では、アンモニア変換回路は、酸素レベル依存性プロモーター、例えば、FNR誘導性プロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態では、アンモニア変換回路は、肝性脳症に関連する分子または代謝物、例えば、ビリルビン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、トランスフェラーゼ、肝炎抗原および抗体、アルファ-フェトプロテイン、抗ミトコンドリア、平滑筋および抗核抗体、鉄、トランスフェリン、フェリチン、銅、セルロブラスミン、アンモニアまたマンガンにより誘導されるプロモーターの制御下にある。

40

【0179】

いくつかの実施形態では、アンモニア変換回路を含む遺伝子操作細菌は、1つまたは複数のGABA膜輸送タンパク質、例えば、GABPを産生するための1つまたは複数の回路をさらに含み、GABAを細胞内に輸送することができる（「GABA輸送回路」）（図41）。

50

【 0 1 8 0 】

いくつかの実施形態では、アンモニア変換回路を含む遺伝子操作細菌は、1つまたは複数のGABA異化酵素、例えば、GSST、SSDHおよび/またはCOTを産生するための1つまたは複数の回路(「GABA代謝回路」)をさらに含む(図49)。いくつかの実施形態では、アンモニア変換回路を含む遺伝子操作細菌は、1つまたは複数のGABA膜輸送タンパク質、例えば、GABPを産生するための1つまたは複数の回路および1つまたは複数のGABA異化酵素、例えば、GSST、SSDHおよび/またはCOTを産生するための1つまたは複数の回路(「GABA代謝回路」)をさらに含む(図41)。

【 0 1 8 1 】

より具体的な態様では、遺伝子操作細菌は、アンモニア変換回路、GABA輸送回路およびGABA代謝回路を含む。いくつかの実施形態では、アンモニア変換回路、GABA輸送回路およびGABA代謝回路は、同じプロモーターの制御下にある。代替実施形態では、アンモニア変換回路、GABA輸送回路およびGABA代謝回路は、異なるプロモーターの制御下にある。例示的プロモーターは、本明細書で開示するプロモーターのいずれかを含む。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、低酸素、微好気性または嫌氣的条件により誘導される酸素レベル依存性プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、分子もしくは代謝物、例えば、組織特異的分子もしくは代謝物または肝損傷を示す分子もしくは代謝物により誘導されるプロモーターを含む。分子もしくは代謝物の非限定的な例は、それらの血液および腸における例えば、ビリルビン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、血液凝固因子II、VII、IXおよびX、アルカリホスファターゼ、ガンマグルトミルトランスフェラーゼ、肝炎抗原および抗体、アルファフェトプロテイン、抗ミトコンドリア、平滑筋および抗核抗体、鉄、トランスフェリン、フェリチン、銅、セルロプラスミン、アンモニアならびにマンガンを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、炎症または炎症反応により誘導されるプロモーター、例えば、RNSまたはROSプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、消化管内に自然に存在し得るまたはし得ない(例えば、体外から加えることができる)代謝物、例えば、アラビノースおよびテトラサイクリンにより誘導されるプロモーターを含む。

【 0 1 8 2 】

例示的GABP輸送体のアミノ酸配列を表42に示す。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号105のアミノ酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号105と同じポリペプチドまたはその機能性断片をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号105のアミノ酸配列またはその機能性断片と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは少なくとも約99%相同であるアミノ酸配列、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号105と同じポリペプチドまたはその機能性断片をコードする核酸配列を含む。

【 0 1 8 3 】

ポリヌクレオチド配列の非限定的な例を表43(配列番号106)に示す。

【 0 1 8 4 】

マンガンの輸送

マンガンは、生物学的に重要な微量元素であり、大部分の生存生物の生存に必要である。哺乳動物において、マンガンは、胆汁中に排泄されるが、その除去は、肝不全を伴う肝臓から十二指腸への胆汁の流れの障害(すなわち、胆汁うっ滞)の影響を受ける。アンモニアと同様に、マンガンの濃度の上昇は、肝性脳症の発現に一定の役割を果たす(Rivera-Manciaら、2012年)。グルタミンシンターゼによって触媒される反応におけるアンモニアを解毒する脳内の星状細胞は、マンガンを補助因子として必要とし、したがって、この金属を蓄積する傾向を有する(Aschnerら、1999年)。i

10

20

30

40

50

*n vitro*試験で、マンガンがグルタミン酸の輸送の抑制 (Hazel 11およびNorenberg、1996年)、星状細胞の形態の異常 (Hazel 11ら、2006年) および細胞容積の増加 (Rama Raoら、2007年) をもたらし得るが示された。マンガンおよびアンモニアは、肝脳症の病因において相乗的に作用することも示された (Jayakumarら、2004年)。

【0185】

内部区画を欠く原核細胞における金属イオンの恒常性は、細胞膜を横切る金属イオンフラックスの厳格な調節により維持されている (JensenおよびJensen、2014年)。細菌におけるマンガンの取込みは、プロトン依存性Nramp関連輸送体および/またはATP依存性ABC輸送体の2つの主要な種類の輸送体が主として関与している。Nramp (天然抵抗性関連マクロファージタンパク質 (Natural resistance-associated macrophage protein)) 輸送体ファミリーは、植物、動物および酵母において最初に記載された (Cellierら、1996年) が、MntHは、それ以来、いくつかの細菌種において特徴付けがなされた (Porcheronら、2013年)。マンガンに対するNramp1輸送体の選択性が金属蓄積試験において示され、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) mntHの過剰発現が細胞結合マンガンのレベルの増加をもたらしたが、カルシウム、銅、鉄、マグネシウムまたは亜鉛の蓄積をもたらさなかった (Horsburghら、2002年)。さらに、mntH遺伝子の突然変異を含む枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 菌株は、マンガンの添加により救出された金属不含有培地中の増殖の障害を示した (QueおよびHelmann、2000年)。例示的MntH輸送体のアミノ酸配列を表44に示す。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号107のアミノ酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号36と同じポリペプチドまたはその機能性断片をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号107のアミノ酸配列またはその機能性断片と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは少なくとも約99%相同であるアミノ酸配列、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号107と同じポリペプチドまたはその機能性断片をコードする核酸配列を含む。ポリヌクレオチド配列の非限定的な例を表45 (配列番号108) に示す。

【0186】

マンガンの高親和性取込みは、ABC (ATP結合カセット (ATP-binding cassette)) 輸送体によっても媒介され得る。この輸送体スーパーファミリーのメンバーは、ATPの加水分解を利用して、イオンから巨大分子までの多様な基質の移入または輸出を増大させ、原核および真核細胞の両方の多剤耐性におけるそれらの役割について十分に特徴付けられている。マンガンの移入に関与する細菌ABC輸送体の非限定的な例は、MntABCD (枯草菌、黄色ブドウ球菌)、SitABCD (ネズミチフス菌、フレキシナー赤痢菌)、PsaABCD (肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)) およびYfeABCD (ペスト菌) を含む (BeardenおよびPerry、1999年; Kehresら、2002年; McAllisterら、2004年; Zhouら、1999年)。MntABCD輸送体複合体は、3つのサブユニットからなり、MntCおよびMntDは、パーミアーズサブユニットを含む内在性膜タンパク質であり、陽イオン輸送を媒介し、MntBは、ATPアーゼであり、MntAは、マンガンに結合し、パーミアーズサブユニットに送達する。sitABCD、psaABCDおよびyfeABCDなどの、他のABC輸送体オペロンは、同様のサブユニット構成および機能を示す (Higgins、1992年; Reesら、2009年)。

【0187】

いくつかの実施形態では、アンモニア変換回路を含む遺伝子操作細菌は、マンガン膜輸送タンパク質、例えば、MntHを産生するための1つまたは複数の回路をさらに含み、

マンガンイオンを細胞内に輸送することができる(「マンガン輸送回路」)(図42)。

【0188】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アンモニア変換回路、マンガン輸送回路およびGABA代謝回路を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アンモニア変換回路、マンガン輸送回路およびGABA輸送回路を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アンモニア変換回路、マンガン輸送回路、GABA輸送回路およびGABA代謝回路を含む。いくつかの実施形態では、各回路は、同じプロモーターの制御下にある。代替実施形態では、各回路は、異なるプロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、低酸素、微好気性または嫌気的条件下により誘導される酸素レベル依存性プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、分子もしくは代謝物、例えば、組織特異的分子もしくは代謝物または肝損傷を示す分子もしくは代謝物により誘導されるプロモーターを含む。分子もしくは代謝物の非限定的な例は、それらの血液および腸における例えば、ビリルビン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、血液凝固因子II、VII、IXおよびX、アルカリホスファターゼ、ガンマグルトミルトランスフェラーゼ、肝炎抗原および抗体、アルファフェトプロテイン、抗ミトコンドリア、平滑筋および抗核抗体、鉄、トランスフェリン、フェリチン、銅、セルロプラスミン、アンモニアならびにマンガンを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、炎症または炎症反応により誘導されるプロモーター、例えば、RNSまたはROSプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、消化管内に自然に存在し得るまたはし得ない(例えば、体外から加えることができる)代謝物、例えば、アラビノースおよびテトラサイクリンにより誘導されるプロモーターを含む。

【0189】

酪酸および他の消化管バリア機能増強分子の産生

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、消化管バリア機能増強分子をコードする遺伝子、または消化管バリア機能増強分子を産生することができる生合成経路をコードする遺伝子カセットをさらに含む。いくつかの実施形態では、該分子は、短鎖脂肪酸、酪酸、プロピオン酸、酢酸、GLP-2、IL-10、IL-27、TGF-1、TGF-2、エラフィン(ペプチダーゼ阻害剤3およびSKALPとも呼ばれる)、トレフォイル因子、メラトニン、PGD₂、キヌレン酸およびキヌレニンからなる群から選択される。

【0190】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、単一遺伝子によりコードされる消化管バリア機能増強分子を発現するものであり、例えば、該分子は、エラフィンであり、PI3遺伝子によりコードされる。代替実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、複数の遺伝子を必要とする生合成経路により合成される消化管バリア機能増強分子、例えば、酪酸またはプロピオン酸をコードする。

【0191】

遺伝子または遺伝子カセットは、高コピープラスミド、低コピープラスミドまたは染色体上で発現させることができる。いくつかの実施形態では、プラスミドからの発現は、消化管バリア機能増強分子の発現を増加させるのに有用であり得る。いくつかの実施形態では、染色体からの発現は、消化管バリア機能増強分子の発現の安定性を向上させるのに有用であり得る。いくつかの実施形態では、消化管バリア機能増強分子を産生するための遺伝子または遺伝子カセットを遺伝子操作細菌における1つまたは複数の組込み部位において細菌染色体に組み込む。例えば、酪酸生合成遺伝子カセットの1つまたは複数のコピーを細菌染色体に組み込むことができる。いくつかの実施形態では、消化管バリア機能増強分子を産生するための遺伝子または遺伝子カセットを遺伝子操作細菌におけるプラスミドから発現させる。いくつかの実施形態では、消化管バリア機能増強分子を産生するための遺伝子または遺伝子カセットを大腸菌ニッスルにおける以下の挿入部位: malE/K、araC/BAD、lacZ、thyA、malP/Tのうちの1つまたは複数において

細菌ゲノムに挿入する。任意の適切な挿入部位を用いることができる（例えば、図18参照）。挿入部位は、ゲノムにおけるどこでもよく、例えば、*thyA*（栄養要求体を創製するための）のような、生存および/または増殖に必要な遺伝子；ゲノム複製の部位の近くのような、ゲノムの活性領域；および/またはアラビノースオペロンの *Ar a B* と *Ar a C* との間のような、意図しない転写のリスクを低下させるために多様なプロモーターの間であってよい。

【0192】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、酪酸生成遺伝子カセットを含み、酪酸を産生することができる。遺伝子操作細菌は、適切な組の酪酸生成遺伝子を含み得る（例えば、表14参照）。酪酸生合成遺伝子を含む非改変細菌は、公知であり、ペプトクロストリジウム属、クロストリジウム属、フゾバクテリウム属、ブチリビブリオ属、ユウバクテリウム属およびトレボネーマ属を含むが、これらに限定されず、これらの内因性酪酸生合成経路は、本発明の遺伝子操作細菌の遺伝子の起源であり得る。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、細菌の異なる種、菌株または亜菌株に由来する酪酸生合成遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、ペプトクロストリジウム・ディフィシル、例えば、ペプトクロストリジウム・ディフィシル630株に由来する酪酸生合成経路の8つの遺伝子：*bcd2*、*etfB3*、*etfA3*、*thiA1*、*hbd*、*crt2*、*pbt*および*buk*を含み（*Aboulnaga*ら、2013年）、*HE* 特異的分子もしくは代謝物の存在下、肝損傷、炎症もしくは炎症反応に関連する分子もしくは代謝物の存在下、またはアラビノースのようなある種の他の代謝物に存在下で、低酸素条件下で酪酸を産生することができる。ペプトクロストリジウム・ディフィシル630菌株および1296菌株は、両方が酪酸を産生することができるが、*etfA3*、*thiA1*、*hbd*、*crt2*、*pbt*および*buk*について異なる核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、細菌の異なる種、菌株および/または亜菌株に由来する酪酸生成遺伝子の組合せを含み、低酸素条件下または*HE* 特異的分子もしくは代謝物の存在下で酪酸を産生することができる。例えば、いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、ペプトクロストリジウム・ディフィシル630菌株に由来する*bcd2*、*etfB3*、*etfA3*および*thiA1*ならびにペプトクロストリジウム・ディフィシル1296菌株に由来する*hbd*、*crt2*、*pbt*および*buk*を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、低酸素条件下または*HE* 特異的分子もしくは代謝物の存在下で酪酸生合成カセットを発現し、酪酸を産生することができる。遺伝子をコドン最適化することができる、翻訳および転写エレメントを加えることができる。表14に酪酸生合成遺伝子カセットにおける例示的遺伝子の核酸配列を示す。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号39、40、41、42、43、44、45、46、47もしくは48のDNA配列、その機能性断片と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%相同である核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号39、40、41、42、43、44、45、46、47もしくは48の核酸配列、またはその機能性断片を含む。

【0193】

10

20

30

【表 1 4 - 1】

表 1 4

説明	配列	
<p><i>bcd2</i> (配列番号 39)</p>	<p>ATGGATTTAAATTCATAAAAAATATCAGATGCTTAAAGAGCTATATGTAAG CTTCGCTGAAAATGAAGTTAAACCTTTAGCAACAGAACTTGATGAAGAAG AAAGATTTCCCTTATGAAACAGTGGAAAAAATGGCAAAAGCAGGAATGATG GGTATACCATATCCAAAAGAATATGGTGGAGAAGGTGGAGACACTGTAGG ATATATAATGGCAGTTGAAGAATTGTCTAGAGTTTGTGGTACTACAGGAG TTATATTATCAGCTCATACTCTCTTGGCTCATGGCCTATATATCAATAT GGTAATGAAGAACAACAAAACAAAATTCTTAAGACCCTAGCAAGTGGAGA AAAATTAGGAGCATTGGTCTTACTGAGCCTAATGCTGGTACAGATGCGT CTGGCCAACAACAACCTGCTGTTTTAGACGGGGATGAATACATACTTAAT GGCTCAAAAATATTTATAACAACGCAATAGCTGGTGACATATATGTAGT AATGGCAATGACTGATAAATCTAAGGGGAACAAAGGAATATCAGCATTTA TAGTTGAAAAGGAACCTCTGGGTTTAGCTTTGGAGTTAAAGAAAAGAAA ATGGGTATAAGAGGTTTCAGCTACGAGTGAATTAATATTTGAGGATTGCAG AATACCTAAAGAAAATTTACTTGGAAAAGAAGGTCAAGGATTTAAGATAG CAATGTCTACTCTTGATGGTGGTAGAATTGGTATAGCTGCACAAGCTTTA GGTTTAGCACAAGGTGCTCTTGATGAACTGTAAATATGTAAAAGAAAG AGTACAATTTGGTAGACCATTATCAAAATTCAAAATACACAATTCCAAT TAGCTGATATGGAAGTTAAGGTACAAGCGGCTAGACACCTTGTATATCAA GCAGCTATAAATAAAGACTTAGGAAAACCTTATGGAGTAGAAGCAGCAAT GGCAAAATTTATTTGCAGCTGAAACAGCTATGGAAGTTACTACAAAAGCTG TACAACCTCATGGAGGATATGGATACACTCGTGACTATCCAGTAGAAAGA ATGATGAGAGATGCTAAGATAACTGAAATATATGAAGGAAGTGTGAAGT TCAAAGAATGGTTATTTTCAGGAAAACCTATTAATAATAG</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p><i>etfB3</i> (配列番号 40)</p>	<p>ATGAATATAGTCGTTTGTATAAAAACAAGTTCCAGATACAACAGAAGTTAA ACTAGATCCTAATACAGGTACTTTAATTAGAGATGGAGTACCAAGTATAA TAAACCCTGATGATAAAGCAGGTTTAGAAGAAGCTATAAAATTTAAAAGAA GAAATGGGTGCTCATGTAACCTTTATAACAATGGGACCTCCTCAAGCAGA TATGGCTTTAAAAGAAGCTTTAGCAATGGGTGCAGATAGAGGTATATTAT TAACAGATAGAGCATTGCGGGTGTGATACTTGGGCAACTTCATCAGCA TTAGCAGGAGCATTAATAAATATAGATTTTGGATATTATAATAGCTGGAAG ACAGGCGATAGATGGAGATACTGCACAAGTTGGACCTCAAATAGCTGAAC ATTTAAATCTTCCATCAATAACATATGCTGAAGAAAATAAAAACCTGAAGGT GAATATGTATTAGTAAAAAGACAATTTGAAGATTGTTGCCATGACTTAAA AGTTAAATGCCATGCCTTATAACAACCTTTAAAGATATGAACACACCAA GATACATGAAAGTTGGAAGAATATATGATGCTTTCGAAAATGATGTAGTA GAAACATGGACTGTAAAAGATATAGAAGTTGACCCCTCTAATTTAGGTCT TAAAGGTTCTCCAACCTAGTGTATTTAAATCATTTACAAAATCAGTTAAAC CAGCTGGTACAATATACAATGAAGATGCGAAAACATCAGCTGGAATTATC ATAGATAAATTTAAAAGAGAAGTATATCATATAA</p>	<p>30</p>

【表 1 4 - 2】

説明	配列	
<p><i>effA3</i> (配列番号 4 1)</p>	<p>ATGGGTAACGTTTTAGTAGTAATAGAACAAAGAGAAAATGTAATTCAAAC TGTTTCTTTAGAATTACTAGGAAAGGCTACAGAAATAGCAAAAAGATTATG ATACAAAAGTTTTCTGCATTACTTTTAGGTAGTAAGGTAGAAGGTTAATA GATACATTAGCACACTATGGTGCAGATGAGGTAATAGTAGTAGATGATGA AGCTTTAGCAGTGTATACAACCTGAACCATATACAAAAGCAGCTTATGAAG CAATAAAAGCAGCTGACCCTATAGTTGTATTATTTGGTGCAACTTCAATA GGTAGAGATTTAGCGCCTAGAGTTTCTGCTAGAATACATACAGGTCTTAC TGCTGACTGTACAGGTCTTGCAGTAGCTGAAGATACAAAATTATTATTAA TGACAAGACCTGCCTTTGGTGGAAATATAATGGCAACAATAGTTTGTAAA GATTTTCAGACCTCAAATGTCTACAGTTAGACCAGGGGTTATGAAGAAAA TGAACCTGATGAACTAAAGAAGCTGTAATTAACCGTTTTCAAGGTAGAAT TTAATGATGCTGATAAATTAGTTCAAGTTGTACAAGTAATAAAAAGAAGCT AAAAACAAGTTAAAATAGAAAGATGCTAAGATATTAGTTTCTGCTGGACG TGGAATGGGTGGAAAAGAAAACCTAGACATACTTTATGAATTAGCTGAAA TTATAGGTGGAGAAGTTTCTGGTTCCTGCGCCACTATAGATGCAGGTTGG TTAGATAAAGCAAGACAAGTTGGTCAAACCTGGTAAAACCTGTAAGACCAGA CCTTTTATATAGCATGTGGTATATCTGGAGCAATACAACATATAGCTGGTA TGGAAGATGCTGAGTTTATAGTTGCTATAAATAAAAATCCAGAAGCTCCA ATATTTAAATATGCTGATGTGGTATAGTTGGAGATGTTCAATAAAGTGCT TCCAGAACTTATCAGTCAGTTAAGTGTGCAAAAAGAAAAGGTGAAGTTT TAGCTAACTAA</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p><i>thiA1</i> (配列番号 4 2)</p>	<p>ATGAGAGAAGTAGTAATTGCCAGTGCAGCTAGAACAGCAGTAGGAAGTTT TGGAGGAGCATTAAATCAGTTTCAGCGGTAGAGTTAGGGGTAACAGCAG CTAAAGAAGCTATAAAAAGAGCTAACATAACTCCAGATATGATAGATGAA TCTCTTTTAGGGGGAGTACTTACAGCAGGTCTTGGACAAAATATAGCAAG ACAAATAGCATTAGGAGCAGGAATACCAGTAGAAAAACCAGCTATGACTA TAAATATAGTTTGTGGTTCTGGATTAAAGATCTGTTTCAATGGCATCTCAA CTTATAGCATTAGGTGATGCTGATATAATGTTAGTTGGTGGAGCTGAAAA CATGAGTATGTCTCCTTATTTAGTACCAAGTGCGAGATATGGTGCAGAA TGGGTGATGCTGCTTTTGTGATTCAATGATAAAAGATGGATTATCAGAC ATATTTAATAACTATCACATGGGTATTACTGCTGAAAACATAGCAGAGCA ATGGAATATAACTAGAGAAGAACAAGATGAATTAGCTCTTGCAAGTCAAA ATAAAGCTGAAAAGCTCAAGCTGAAGGAAAATTTGATGAAGAAATAGTT CCTGTTGTTATAAAAAGGAAGAAAAGGTGACACTGTAGTAGATAAAGATGA ATATATTAAGCCTGGCACTACAATGGAGAACTTGCTAAGTTAAGACCTG CATTTAAAAAAGATGGAACAGTTACTGCTGGTAATGCATCAGGAATAAAT GATGGTGCTGCTATGTTAGTAGTAATGGCTAAAGAAAAAGCTGAAGAACT AGGAATAGAGCCTCTTGCAACTATAGTTTCTTATGGAACAGCTGGTGTG ACCCTAAAATAATGGGATATGGACCAGTTCAGCAACTAAAAAAGCTTTA GAAGCTGCTAATATGACTATGAAGATATAGATTTAGTTGAAGCTAATGA GGCATTTGCTGCCCAATCTGTAGCTGTAATAAGAGACTTAAATATAGATA TGAATAAAGTTAATGTTAATGGTGGAGCAATAGCTATAGGACATCCAATA GGATGCTCAGGAGCAAGAATACTTACTACACTTTTATATGAAATGAAGAG AAGAGATGCTAAAACCTGGTCTGCTACACTTTGTATAGGCGGTGGAATGG GAACTACTTTAATAGTTAAGAGATAG</p>	<p>30</p> <p>40</p>

【表 14 - 5】

説明	配列
	GCGTTGATGGAGAAAGTCACGGGTGAAAACGCAGAATCTCTCACTGACTT AGCGGGGTACCGCCATGATTTCTTAGCTAGTAACGGCTTTGATGTAGAAG GTATTAATTATGAAGCGGAAGTTGAACGCTTCGACCGTATCTGA
<i>tesB</i> (配列番号 48)	ATGAGTCAGGCGCTAAAAAATTTACTGACATTGTTAAATCTGGAAAAAAT TGAGGAAGGACTCTTTCGCGGCCAGAGTGAAGATTTAGGTTTACGCCAGG TGTTTTGGCGGCCAGGTCGTGGGTGAGGCCTTGATGCTGCAAAAGAGACC GTCCCTGAAGAGCGGCTGGTACATTCGTTTCACAGCTACTTCTTCGCC TGGCGATAGTAAGAAGCCGATTATTTATGATGTCGAAACGCTGCGTGACG GTAACAGCTTCAGCGCCCCGCCGGGTTGCTGCTATTCAAACGGCAAACCG ATTTTTTATATGACTGCCTCTTTCAGGCACCAGAAGCGGGTTTCGAACA TCAAAAAACAATGCCGTCCGCGCCAGCGCCTGATGGCCTCCCTTCGAAA CGCAAATCGCCAATCGCTGGCGCACCTGCTGCCGCCAGTGCTGAAAGAT AAATTCATCTGCGATCGTCCGCTGGAAGTCCGTCGGTGGAGTTTCATAA CCCCTGAAAGGTCACGTCGCAGAACCACATCGTCAGGTGTGGATCCGCG CAAATGGTAGCGTGCCGGATGACCTGCGCGTTCATCAGTATCTGCTCGGT TACGCTTCTGATCTTAACCTTCTGCCGGTAGCTCTACAGCCGCACGGCAT CGGTTTTCTCGAACCAGGGGATTCAGATTGCCACCATTGACCATTCCATGT GGTTCCATCGCCGTTTAAATTTGAATGAATGGCTGCTGTATAGCGTGGAG AGCACCTCGGCGTCCAGCGCACGTGGCTTTGTGCGCGGTGAGTTTTATAC CCAAGACGGCGTACTGGTTGCCTCGACCGTTCAGGAAGGGGTGATGCGTA ATCACAATTAA

10

20

【0194】

クロストリジウム・ディフィシルにおける *bcd2*、*etfA3* および *etfB3* 遺伝子の遺伝子産物は、酸素依存性共酸化剤として機能し得る、クロトニル CoA をブチリル CoA に変換する複合体を形成する。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、好気的または酸素制限環境、例えば、哺乳動物消化管内で酪酸を産生するように設計されているので、酸素依存性は、消化管内での酪酸の産生に負の影響を及ぼす可能性がある。トレポネーマ・デンティコラに由来する単一遺伝子 (*ter*、トランス-2-エノイル CoA レダクターゼをコードする) が、この 3 遺伝子複合体を酸素非依存的に機能的に置換し得ることが示された。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、例えば、ペプトクロストリジウム・ディフィシルに由来する *bcd2*、*etfB3* および *etfA3* 遺伝子の 3 つすべてを機能的に置換することができる、例えば、トレポネーマ・デンティコラに由来する *ter* 遺伝子を含む。この実施形態では、遺伝子操作細菌は、例えば、ペプトクロストリジウム・ディフィシルに由来する *thiA1*、*hbd*、*crt2*、*pbt* および *buk*、ならびに例えば、トレポネーマ・デンティコラに由来する *ter* を含み、HE 特異的分子もしくは代謝物の存在下、肝損傷、炎症もしくは炎症反応に関連する分子もしくは代謝物の存在下、またはアラビノースのような、消化管中に存在し得る、もしくは存在し得ないある種の他の代謝物の存在下で、低酸素条件で酪酸を産生することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、好气的酪酸生合成の遺伝子および/または嫌气的もしくは好气的酪酸生合成の遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、例えば、ペプトクロストリジウム・ディフィシルに由来する *thiA1*、*hbd*、*crt2*、*pbt* および *buk*、例えば、トレポネーマ・デンティコラに由来する *ter*、例えば、ペプトクロストリジウム・ディフィシルに由来する *bcd2*、*etfB3* および *etfA3* のうちの 1 つまたは複数を含み、低酸素条件で、または HE 特異的分子もしくは代謝物の存在下で酪酸を産生する。いくつかの実施形態では、低酸素条件でまたは HE 特異的分子もしくは代謝物、または肝損傷に関連する分子もしくは代

30

40

50

謝物の存在下、または炎症もしくは炎症反応のような他の条件（複数可）で、またはアラビノースのような、消化管中に存在し得るもしくは存在し得ないある種の他の代謝物の存在下で安定性を増大させ、かつ/または酪酸の産生を増加させるために、酪酸生合成遺伝子のうちの1つまたは複数を機能的に置換し、改変し、かつ/または突然変異させる。いくつかの実施形態では、酪酸の局所産生は、消化管内の調節T細胞の分化を誘導し、かつ/または結腸上皮細胞のバリア機能を増進させる。

【0195】

p b tおよびb u kの遺伝子産物は、ブチリルC o Aを酪酸に変換する。いくつかの実施形態では、p b tおよびb u k遺伝子は、t e s B遺伝子により置換することができる。t e s Bは、ブチリルC o AからC o Aを切り離すために用いることができる。一実施形態では、遺伝子操作細菌は、例えば、ペプトクロストリジウム・ディフィシルに由来するb c d 2、e t f B 3、e t f A 3、t h i A 1、h b dおよびc r t 2、ならびに大腸菌に由来するt e s Bを含み、HE特異的分子もしくは代謝物の存在下で、肝損傷、炎症もしくは炎症反応に関連する分子もしくは代謝物の存在下、またはアラビノースのような、消化管中に存在し得るもしくは存在し得ないある種の他の代謝物の存在下で、低酸素条件下で酪酸を産生する。一実施形態では、遺伝子操作細菌は、例えば、トレポネーマ・デントンテコラに由来するt e r遺伝子（トランス-2-エノイル-C o Aレダクターゼをコードする）、例えば、ペプトクロストリジウム・ディフィシルに由来するt h i A 1、h b d、c r t 2、p b tおよびb u k、ならびに大腸菌に由来するt e s Bを含み、HE特異的分子もしくは代謝物の存在下で、肝損傷、炎症もしくは炎症反応に関連する分子もしくは代謝物の存在下、またはアラビノースのような、消化管中に存在し得るもしくは存在し得ないある種の他の代謝物の存在下で、低酸素条件下で酪酸を産生する。いくつかの実施形態では、低酸素条件下でまたはHE特異的分子もしくは代謝物、または肝損傷に関連する分子もしくは代謝物の存在下、または炎症もしくは炎症反応のような他の条件（複数可）で、またはアラビノースのような、消化管中に存在し得るもしくは存在し得ないある種の他の代謝物の存在下で安定性を増大させ、かつ/または酪酸の産生を増加させるために、酪酸生合成遺伝子のうちの1つまたは複数を機能的に置換し、改変し、かつ/または突然変異させる。いくつかの実施形態では、酪酸の局所産生は、消化管内の調節T細胞の分化を誘導し、かつ/または結腸上皮細胞のバリア機能を増進させる。

【0196】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、プロピオン酸遺伝子カセットを含み、低酸素条件下でまたはHE特異的分子もしくは代謝物の存在下でプロピオン酸を産生することができる。遺伝子操作細菌は、任意の適切な組のプロピオン酸生合成遺伝子を発現し得る（例えば、表15参照）。内因性プロピオン酸生合成経路を介してプロピオン酸を産生することができる非改変細菌は、クロストリジウム・プロピオニクム、メガスフェラ・エルスデニイおよびプレボテラ・ルミニコラを含むが、これらに限定されず、これらの内因性プロピオン酸生合成経路は、本発明の遺伝子操作細菌の遺伝子の起源であり得る。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、細菌の異なる種、菌株または亜菌株に由来するプロピオン酸生合成遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、クロストリジウム・プロピオニクムに由来する遺伝子p c t、l c dおよびa c rを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、プロピオン酸生合成のためのアクリル酸経路遺伝子、例えば、p c t、l c d A、l c d B、l c d C、e t f A、a c r Bおよびa c r Cを含む。代替実施形態では、遺伝子操作細菌は、プロピオン酸生合成のためのピルビン酸経路遺伝子、例えば、t h r A^{f b r}、t h r B、t h r C、i l v A^{f b r}、a c e E、a c e Fおよびl p dを含み、t e s Bを任意選択でさらに含む。遺伝子は、コドンをも最適化することができ、翻訳および転写エレメントを加えることができる。表15にプロピオン酸生合成遺伝子カセットにおける例示的遺伝子の核酸配列を示す。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61もしくは62のDNA配列、その機能性断片と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少

10

20

30

40

50

なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 相同である核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61 もしくは 62 の核酸配列、またはその機能性断片を含む。

【0197】

【表15-1】

表 15

説明	配列
<p style="text-align: center;"><i>pct</i></p> <p>配列番号 49</p>	<p>ATGCGCAAAGTGCCGATTATCACGGCTGACGAGGCCGCAAACCTGATCAA GGACGGCGACACCGTGACAAC TAGCGGCTTTGTGGGTAACCGGATCCCTG AGGCCCTTGACCGTGCAGTCGAAAAGCGTTTCTGGAAACGGGCGAACCG AAGAACATTACTTATGTATATTGCGGCAGTCAGGGCAATCGCGACGGTTCG TGGCGCAGAACATTTGCGGCATGAAGGCCTGCTGAAACGTTATATCGCTG GCCATTGGGCGACCGTCCCGGCGTTAGGGAAAAATGGCCATGGAGAATAAA ATGGAGGCC TACAATGTCTCTCAGGGCGCCTTGTGTCATCTCTTTCGCGA TATTGCGAGCCATAAACCGGGTGTGTTACGAAAGTAGGAATCGGCACCT TCATTGATCCACGTAACGGTGGTGGGAAGGTCAACGATATTACCAAGGAA GATATCGTAGAACTGGTGGAAATTAAGGGCAGGAATACCTGTTTTATCC GGCGTTCCCGATCCATGTTCGCGCTGATTTCGTGGCACCTATGCGGACGAGA GTGGTAACATCACCTTTGAAAAAGAGGTAGCGCCTTTGGAAGGGACTTCT GTCTGTCAAGCGGTGAAGAACTCGGGTGGCATTGTTCGTGGTTCAGGTTGA GCGTGTTCGTCAAAGCAGGCACGCTGGATCCGCGCCATGTGAAAGTTCCGG GTATCTATGTAGATTACGTAGTCGTTCGCGGATCCGGAGGACCATCAACAG TCCCTTGACTGCGAATATGATCCTGCCCTTAGTGGAGAGCACCGTCGTCC GGAGGTGGTGGGTGAACCACTGCCTTTATCCGCGAAGAAAGTCATCGGCC GCCGTGGCGCGATTGAGCTCGAGAAAGACGTTGCAGTGAACCTTGGGGTA GGTGCACCTGAGTATGTGGCCTCCGTGGCCGATGAAGAAGGCATTGTGGA TTTTATGACTCTCACAGCGGAGTCCGGCGCTATCGGTGGCGTCCAGCCG GCGGTGTTTCGCTTTGGGGCGAGCTACAATGCTGACGCCTTGATCGACCAG GGCTACCAATTTGATTATTACGACGGTGGGGTCTGGATCTTTGTTACCT GGGTTTAGCTGAATGCGACGAAAAGGTAATATCAATGTTAGCCGCTTCG GTCCTCGTATCGCTGGGTGCGGCGGATTCATTAACATTACCCAAAACACG CCGAAAGTCTTCTTTTGTGGGACCTTTACAGCCGGGGGGCTGAAAGTGAA AATTGAAGATGGTAAGGTGATTATCGTTTCAGGAAGGGAAACAGAAGAAAT TCCTTAAGGCAGTGGAGCAAATCACCTTTAATGGAGACGTGGCCTTAGCG AACAAGCAACAAGTTACCTACATCACGGAGCGTTGCGTCTTCTCCTCAA AGAAGACGGTTTACACCTTTGCGAAATCGCGCCAGGCATCGATCTGCAGA CCCAGATTTTGGATGTTATGGACTTTGCCCGATCATTGATCGTGACGCA AACGGGCAGATTAACCTGATGGACGCGCGCTTATTCGCAGAAGGGCTGAT GGGCTTGAAAGAAATGAAGTCTTAA</p>

10

20

30

40

【表 15 - 3】

説明	配列	
	GCAGTCATTCGTCGAAATGCTTTAA	10
<i>lcdC</i> 配列番号 5 2	ATGTATACCTTGGGGATTGATGTCGGTCTGCCTCTAGTAAAGCGGTGAT TCTGAAAGATGGAAAAGATATTGTCGCTGCCGAGGTTGTCCAAGTCGGTA CCGGCTCCTCGGGTCCCCAACGCGCACTGGACAAAGCCTTTGAAGTCTCT GGCTTAAAAAAGGAAGACATCAGCTACACAGTAGCTACGGGCTATGGGCG CTTCAATTTTAGCGACGCGGATAAACAGATTCGGAAATTAGCTGTCATG CCAAAGGCATTTATTTCTTAGTACCAACTGCGCGCACTATTATTGACATT GGCGGCCAAGATGCGAAAGCCATCCGCCTGGACGACAAGGGGGTATTAA GCAATTCTTCATGAATGATAAATGCGCGCGGGCACGGGGCGTTTCCCTGG AAGTCATGGCTCGCGTACTTGAAACCACCCTGGATGAAATGGCTGAACTG GATGAACAGGCGACTGACACCGCTCCCATTTCAAGCACCTGCACGGTTTT CGCCGAAAGCGAAGTAATTAGCCAATTGAGCAATGGTGTCTCACGCAACA ACATCATTAAGGTGTCCATCTGAGCGTTGCGTCACGTGCGTGTGGTCTG GCGTATCGCGCGGTTTGGAGAAAGATGTTGTTATGACAGGTGGCGTGGC AAAAAATGCAGGGGTGGTGCAGCGGTTGGCGGGCGTTCTGAAGACCGATG TTATCGTTGCTCCGAATCCTCAGACGACCGGTGCACTGGGGGCAGCGCTG TATGCTTATGAGGCCGCCAGAAGAAGTA	20
<i>effA</i> 配列番号 5 3	ATGGCCTTCAATAGCGCAGATATTAATTCCTTCCGCGATATTTGGGTGTT TTGTGAACAGCGTGAGGGCAAACCTGATTAACACCGATTTCTGAATTAATTA GCGAAGGTCGTAAACTGGCTGACGAACGCGGAAGCAAACCTGGTTGGAATT TTGCTGGGGCACGAAGTTGAAGAAATCGCAAAAGAAATTAGGCGGCTATGG TGCGGACAAGGTAATTGTGTGCGATCATCCGGAACCTTAAATTTTACACTA CGGATGCTTATGCCAAAGTTTTATGTGACGTCGTGATGGAAGAGAAACCG GAGGTAATTTTATCGGTGCCACCAACATTTGGCCGTGATCTCGGACCGCG TTGTGCTGCACGCTTGACACGGGGCTGACGGCTGATTGCACGCACCTGG ATATTGATATGAATAAATATGTGGACTTCTTAGCACCAGTAGCACCTTG GATATCTCGTCGATGACTTTCCCTATGGAAGATACAAACCTTAAAAATGAC GCGCCCTGCATTTGGCGGACATCTGATGGCAACGATCATTGTCCACGCT TCCGTCCCTGTATGAGCACAGTGCGCCCGGAGTGATGAAGAAAGCGGAG TTCTCGCAGGAGATGGCGCAAGCATGTCAAGTAGTGACCCGTCACGTAAA TTTGTGCGATGAAGACCTTAAACTAAAGTAATTAATATCGTGAAGGAAA CGAAAAAGATTGTGGATCTGATCGGCGCAGAAATATTGTGTCAGTTGGT CGTGGTATCTCGAAAGATGTCCAAGGTGGAATTGCACTGGCTGAAAAACT TGCGGACGCATTTGGTAACGGTGTGCTGGGCGGCTCGCGCGCAGTGATTG ATTCCGGCTGGTTACCTGCGGATCATCAGGTTGGACAAACCGGTAAGACC GTGCACCCGAAAGTCTACGTGGCGCTGGGTATTAGTGGGGCTATCCAGCA TAAGGCTGGGATGCAAGACTCTGAACTGATCATTGCCGTCAACAAAGACG AAACGGCGCCTATCTTCGACTGCGCCGATTATGGCATCACCGGTGATTTA TTTAAAATCGTACCGATGATGATCGACGCGATCAAAGAGGGTAAAAACGC ATGA	30 40

【表 15 - 4】

説明	配列	
<p><i>acrB</i> 配列番号 5 4</p>	<p>ATGCGCATCTATGTGTGTGTGAAACAAGTCCCAGATACGAGCGGCAAGGT GGCCGTTAACCCCTGATGGGACCCTTAACCGTGCCTCAATGGCAGCGATTA TTAACCCGGACGATATGTCCGCGATCGAACAGGCATTA AAACTGAAAGAT GAAACCGGATGCCAGGTTACGGCGCTTACGATGGGTCCCTCCCTGCCGA GGGCATGTTGCGCGAAATTATTGCAATGGGGGCCGACGATGGTGTGCTGA TTTCGGCCCGTGAATTTGGGGGTCCGATACCTTCGCAACCAGTCAAATT ATTAGCGCGCAATCCATAAATTAGGCTTAAGCAATGAAGACATGATCTT TTGCGGTCTGTCAGGCCATTGACGGTGATACGGCCCAAGTCGGCCCTCAA TTGCCGAAAAACTGAGCATCCCACAGGTAACCTATGGCGCAGGAATCAA AAATCTGGTGATTTAGTGCTGGTGAAGCGTATGTTGGAGGATGGTTATAT GATGATCGAAGTCGAAACTCCATGTCTGATTACCTGCATTCAGGATAAAG CGGTAAAACCACGTTACATGACTCTCAACGGTATTATGGAATGCTACTCC AAGCCGCTCCTCGTTCTCGATTACGAAGCACTGAAAGATGAACCGCTGAT CGAACTTGATACCATTGGGCTTAAAGGCTCCCCGACGAATATCTTTAAAT CGTTTACGCCGCTCAGAAAGGCGTTGGTGTCTATGCTCCAAGGCACCGAT AAGGAAAAAGTCGAGGATCTGGTGGATAAGCTGATGCAGAAACATGTCAT CTAA</p>	10
<p><i>acrC</i> 配列番号 5 5</p>	<p>ATGTTCTTACTGAAGATTA AAAAAGAACGTATGAAACGCATGGACTTTAG TTTAACGCGTGAACAGGAGATGTTAAAAAACTGGCGGTCAGTTTGCTG AGATCGAGCTGGAACCGGTGGCCGAAGAGATTGATCGTGAGCACGTTTTT CCTGCAGAAAACCTTAAGAAGATGGCGGAAATTTGGCTTAACCGGCATTGG TATCCCGAAAGAATTTGGTGGCTCCGGTGGAGGCACCCTGGAGAAGGTCA TTGCCGTGTGAGAATTCGGCAAAAAGTGTATGGCTCAGCTTCCATTTTA AGCATTTCATCTTATCGCGCCCGCAGGCAATCTACAAATATGGGACCAAAGA ACAGAAAGAGACGTACCTGCCGCGTCTTACC AAAAGGTGGTGAAC TGGGCG CCTTTGCGCTGACAGAACCAAACGCCGGAAGCGATGCCGGCGCGGTA AAA ACGACCGCGATTCTGGACAGCCAGACAAACGAGTACGTGCTGAATGGCAC CAAATGCTTTATCAGCGGGGGCGGGCGCGGGTGTCTTGTAAATTTTTG CGCTTACTGAACCGAAAAAAGGTCTGAAAGGGATGAGCGGATTTATCGTG GAGAAAGGGACCCCGGGCTT CAGCATCGGCAAGGTGGAGAGCAAGATGGG GATCGCAGGTTTCGAAACCGCGGAACTTATCTTCGAAGATTGTCGCGTTC CGGCTGCCAACCTTTTAGGTAAAGAAGGCAAAGGCTTTAAAAATGCTATG GAAGCCCTGGATGGCGCCGATTGGCGTGGGCGCTCAAGCAATCGGAAT TGCCGAGGGGGCGATCGACCTGAGTGTGAAGTACGTT CACGAGCGCATTC AATTTGGTAAACCGATCGCGAATCTGCAGGGAATTC AATGGTATATCGCG GATATGGCGACCAAACCGCCGCGGCACGCGCACTTGT TGAGTTTGCAGC GTATCTTGAAGACGCGGGTAAACCGTTCACAAAAGGAATCTGCTATGTGCA AGCTGAACGCCTCCGAAAACGCGCGTTTTGTGACAAATTTAGCTCTGCAG ATTCACGGGGTTACGGTTATATGAAAGATTATCCGTTAGAGCGTATGTA TCGCGATGCTAAGATTACGGAATTTACGAGGGGACATCAGAAATCCATA AGGTGGTGATTGCGCGTGAAGTAATGAAACGCTAA</p>	20 30
<p><i>thrA^{fbr}</i> 配列番号 5 6</p>	<p>ATGCGAGTGTTGAAGTTCGGCGGTACATCAGTGGCAAATGCAGAACGTTT TCTGCGTGTTGCCGATATTCTGGAAAGCAATGCCAGGCAGGGCAGGTGG CCACCGTCTCTCTGCCCCGCCAAAATCACCAACCACCTGGTGGCGATG ATTGAAAAAACCATTAGCGGCCAGGATGCTTTACCCAATATCAGCGATGC CGAACGTATTTTTGCCGAACCTTTGACGGGACTCGCCGCCGCCAGCCGG GGTTCCCGCTGGCGCAATTGAAAACCTTTTCGTCGATCAGGAATTTGCCCAA ATAAAACATGTCCTGCATGGCATTAGTTTTGTTGGGGCAGTGCCCGGATAG</p>	40

【表 15 - 5】

説明	配列
	CATCAACGCTGCGCTGATTTGCCGTGGCGAGAAAATGTCGATCGCCATTA TGGCCGGCGTATTAGAAGCGCGCGGT CACAACGTTACTGTTATCGATCCG GTCGAAAAACTGCTGGCAGTGGGGCATTACCTCGAATCTACCGTCGATAT TGCTGAGTCCACCCGCCGTATTGCGGCAAGCCGCATTCCGGCTGATCACA TGGTGTGATGGCAGGTTTCACCGCCGGTAATGAAAAAGGCGAACTGGTG GTGCTTGGACGCAACGGTTCGACTACTCTGCTGCGGTGCTGGCTGCCTG TTTACGCGCCGATTGTTGCGAGATTTGGACGGACGTTGACGGGGTCTATA CCTGCGACCCGCGTCAGGTGCCCGATGCGAGGTTGTTGAAGTCGATGTCC TACCAGGAAGCGATGGAGCTTTCCTACTTCGGCGCTAAAGTTCTTCACCC CCGCACCATTACCCCATCGCCAGTTCAGATCCCTTGCTGATTAAAA ATACCGGAAAATCCTCAAGCACCAGGTACGCTCATTGGTGCCAGCCGTGAT GAAGACGAATTACCGGTCAAGGGCATTTCGAATCTGAATAACATGGCAAT GTTCAGCGTTTCTGGTCCGGGGATGAAAGGGATGGTCGGCATGGCGGCGC GCGTCTTTCAGCGATGTCACGCGCCCGTATTTCCGTGGTGCTGATTACG CAATCATCTTCCGAATACAGCATCAGTTTCTGCGTTCCACAAAGCGACTG TGTGCGAGCTGAACGGGCAATGCAGGAAGAGTTCTACCTGGAACGAAAG AAGGCTTACTGGAGCCGCTGGCAGTGACGGAACGGCTGGCCATTATCTCG GTGGTAGGTGATGGTATGCGCACCTTGGTGGGATCTCGGCGAAATTCTT TGCCGCACTGGCCCGCGCCAATATCAACATTGTCGCCATTGCTCAGAGAT CTTCTGAACGCTCAATCTCTGTCGTGGTAAATAACGATGATGCGACCACT GCGTGCAGGTTACTCATCAGATGCTGTTCAATACCGATCAGGTTATCGA AGTGTGTTGTGATTGGCGTGGTGGCGTTGGCGGTGCGCTGCTGGAGCAAC TGAAGCGTCAGCAAAGCTGGCTGAAGAATAAACATATCGACTTACGTGTC TGCGGTGTTGCCAACTCGAAGGCTCTGCTCACCAATGTACATGGCCTTAA TCTGGAAAACTGGCAGGAAGAACTGGCGCAAGCCAAAGAGCCGTTAATC TCGGGCGCTTAATTCGCCTCGTGAAAGAATATCATCTGCTGAACCCGGTC ATTTGTTGACTGCACCTCCAGCCAGGCAGTGGCGGATCAATATGCCGACTT CCTGCGGAAGGTTTCCACGTTGTCACGCCGAACAAAAAGGCCAACACCT CGTCGATGGATTACTACCATCAGTTGCGTTATGCGGCGGAAAAATCGCGG CGTAAATTCTCTATGACACCAACGTTGGGGCTGGATTACCGGTTATTGA GAACCTGCAAAAATCTGCTCAATGCAGGTGATGAATTGATGAAGTTCTCCG GCATTCTTTCTGGTTCGCTTTCTTATATCTTCGGCAAGTTAGACGAAGGC ATGAGTTTCTCCGAGGCGACCACGCTGGCGCGGAAATGGGTTATACCGA ACCGGACCCGCGAGATGATCTTCTGGTATGGATGTGGCGCGTAAACTAT TGATTCTCGCTCGTGAACGGGACGTGAACCTGGAGCTGGCGGATATTGAA ATTGAACCTGTGCTGCCCCGAGAGTTTAAACGCCGAGGGTATGTTGCCGC TTTTATGGCGAATCTGTCACAACTCGACGATCTTTTGCCGCGCGCGTGG CGAAGGCCCGTATGAAGGAAAAGTTTTGCGCTATGTTGGCAATATTGAT GAAGATGGCGTCTGCCGCGTGAAGATTGCCGAAGTGGATGGTAATGATCC GCTGTTCAAAGTAAAAATGGCGAAAACGCCCTGGCCTTCTATAGCCACT ATTATCAGCCGCTGCCGTTGGTACTGCGCGGATATGGTGCGGGCAATGAC GTTACAGCTGCCGTTGCTTTGCTGATCTGCTACGTACCCTCTCATGGAA GTTAGGAGTCTGA

10

20

30

40

【表 15 - 7】

説明	配列	
<p><i>ilvA^{fbr}</i> 配列番号 59</p>	<p>ATGAGTGAAACATACGTGTCTGAGAAAAGTCCAGGAGTGATGGCTAGCGG AGCGGAGCTGATTTCGTGCCGCCGACATTCAAACGGCGCAGGCACGAATTT CCTCCGTCATTGCACCAACTCCATTGCAGTATTGCCCTCGTCTTTCTGAG GAAACCGGAGCGGAAATCTACCTTAAGCGTGAGGATCTGCAGGATGTTTCG TTCCTACAAGATCCGCGGTGCGCTGAACTCTGGAGCGCAGCTCACCCAAG AGCAGCGCGATGCAGGTATCGTTGCCGCATCTGCAGGTAACCATGCCAG GGCGTGGCCTATGTGTGCAAGTCCCTTGGGCGTTCAGGGACGCATCTATGT TCCTGTGCAGACTCCAAAGCAAAGCGTGACCGCATCATGGTTCACGGCG GAGAGTTTGTCTCCTTGGTGGTCACTGGCAATAACTTCGACGAAGCATCG GCTGCAGCGCATGAAGATGCAGAGCGCACCGGCGCAACGCTGATCGAGCC TTTCGATGCTCGCAACACCGTCATCGGTTCAGGGCACCGTGGCTGCTGAGA TCTTGTGCGAGCTGACTTCCATGGGCAAGAGTGCAGATCACGTGATGGTT CCAGTCGGCGGTGGCGGACTTCTTGCAGGTGTGGTCAGCTACATGGCTGA TATGGCACCTCGCACTGCGATCGTTGGTATCGAACCAGCGGGAGCAGCAT CCATGCAGGCTGCATTGCACAATGGTGGACCAATCACTTTGGAGACTGTT GATCCCTTTGTGGACGGCGCAGCAGTCAAACGTGTCCGAGATCTCAACTA CACCATCGTGGAGAAGAACCAGGGTCGCGTGCACATGATGAGCGCGACCG AGGGCGCTGTGTGTACTGAGATGCTCGATCTTTACCAAACGAAGGCATC ATCGCGGAGCCTGCTGGCGCGCTGTCTATCGTGGGTTGAAGGAAATGTC CTTTGCACCTGGTTCTGCAGTGGTGTGCATCATCTCTGGTGGCAACAACG ATGTGCTGCGTTATGCGGAAATCGCTGAGCGCTCCTTGGTGCACCGCGGT TTGAAGCACTACTTCTTGGTGAAC TCCCGCAAAGCCTGGTCAGTTGCG TCACTTCTGGAAGATATCTTGGGACCGGATGATGACATCAGCTGTTTTG AGTACCTCAAGCGCAACAACCGTGAGACCGGTACTGCGTTGGTGGGTATT CACTTGAGTGAAGCATCAGGATTGGATTCTTTGCTGGAACGTATGGAGGA ATCGGCAATTGATTCCCGTCGCCTCGAGCCGGGCACCCCTGAGTACGAAT ACTTGACCTAA</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p><i>aceE</i> 配列番号 60</p>	<p>ATGTCAGAACGTTTCCCAAATGACGTGGATCCGATCGAAACTCGCGACTG GCTCCAGGCGATCGAATCGGTTCATCCGTGAAGAAGGTGTTGAGCGTGCTC AGTATCTGATCGACCAACTGCTTGTGAAGCCC GCAAAGGCGGTGTAAC GTAGCCGCAGGCACAGGTATCAGCAACTACATCAACACCATCCCCGTTGA AGAACAACCGGAGTATCCGGTAATCTGGAAC TGGAACGCCGTATTTCGTT CAGCTATCCGCTGGAACGCCATCATGACGGTGTGCGTGCCTCGAAAAAA GACCTCGAACTGGGCGGCCATATGGCGTCCCTCCAGTCTTCCGCAACCAT TTATGATGTGTGCTTTAACCCTTCTTCCGTGCACGCAACGAGCAGGATG GCGGCGACCTGGTTTACTTCCAGGGCCACATCTCCCCGGGCGTGTACGCT CGTGCTTTTCTGGAAGGTCGTCTGACTCAGGAGCAGCTGGATAACTTCCG TCAGGAAGTTCACGGCAATGGCCTCTCTTCC TATCCGCACCCGAAACTGA TGCCGGAATTCTGGCAGTTCCCGACCGTATCTATGGGTCTGGGTCCGATT GGTGCTATTTACCAGGCTAAATTCCTGAAATATCTGGAACACCGTGGCCT GAAAGATACCTCTAAACAAAACCGTTTACGCGTTCCTCGGTGACGGTGAAA TGGACGAACCGGAATCCAAAGGTGCGATCACCATCGCTACCCGTGAAAAA CTGGATAACCTGGTCTTCGTTATCAACTGTAACCTGCAGCGTCTTGACGG CCCCGTCACCGGTAACGGCAAGATCATCAACGAAC TGGAAGGCATCTTCG AAGGTGCTGGCTGGAACGTGATCAAAGT GATGTGGGGTAGCCGTTGGGAT GAAC TGTGCGTAAGGATACCAGCGGTAAACTGATCCAGCTGATGAACGA AACCGTTGACGGCGACTACCAGACCTTCAAATCGAAAGATGGTGCCTACG TTCGTGAACACTTCTTCGGTAAATATCTTGAAACCGCAGCACTGGTTGCA</p>	<p>30</p> <p>40</p>

【表 15 - 8】

説明	配列	
	<p>GACTGGACTGACGAGCAGATCTGGGCACTGAACCGTGGTGGTCACGATCC GAAGAAAATCTACGCTGCATTCAAGAAAGCGCAGGAAACCAAAGGCAAAG CGACAGTAATCCTTGCTCATAACCATTAAAGGTTACGGCATGGGCGACGCG GCTGAAGGTAAAAACATCGCGCACCAGGTTAAGAAAATGAACATGGACGG TGTGCGTCATATCCGCGACCGTTTCAATGTGCCGGTGTCTGATGCAGATA TCGAAAAACTGCCGTACATCACCTTCCCGGAAGGTTCTGAAGAGCATAACC TATCTGCACGCTCAGCGTCAGAAACTGCACGGTTATCTGCCAAGCCGTCA GCCGAACTTCACCGAGAAGCTTGAGCTGCCGAGCCTGCAAGACTTCGGCG CGCTGTTGGAAGAGCAGAGCAAAGAGATCTCTACCACTATCGCTTTCGTT CGTGCTCTGAACGTGATGCTGAAGAACAAGTCGATCAAAGATCGTCTGGT ACCGATCATCGCCGACGAAGCGCGTACTTTCGGTATGGAAGGTCTGTTCC GTCAGATTGGTATTTACAGCCGAACGGTCAGCAGTACACCCCGCAGGAC CGCGAGCAGGTTGCTTACTATAAAGAAGACGAGAAAGGTGAGATTCTGCA GGAAGGGATCAACGAGCTGGGCGCAGGTTGTTCCCTGGCTGGCAGCGGCGA CCTCTTACAGCACCAACAATCTGCCGATGATCCCGTTCTACATCTATTAC TCGATGTTCCGGCTTCCAGCGTATTGGCGATCTGTGCTGGGCGGCTGGCGA CCAGCAAGCGCGTGGCTTCCCTGATCGGCGGTACTTCCGGTTCGTACCACCC TGAACGGCGAAGGTCTGCAGCACGAAGATGGTCACAGCCACATTTCAGTCG CTGACTATCCCGAACTGTATCTCTTACGACCCGGCTTACGCTTACGAAGT TGCTGTCATCATGCATGACGGTCTGGAGCGTATGTACGGTGA AAAACAAG AGAACGTTTACTACTACATCACTACGCTGAACGAAAACCTACCACATGCCG GCAATGCCGGAAGGTGCTGAGGAAGGTATCCGTAAGGTATCTACAAACT CGAAACTATTGAAGGTAGCAAAGGTAAGTTTACGCTGCTCGGCTCCGGTT CTATCCTGCGTCACGTCCGTGAAGCAGCTGAGATCCTGGCGAAAGATTAC GGCGTAGGTTCTGACGTTTATAGCGTGACCTCCTTCCACCGAGCTGGCGCG TGATGGTCAGGATTGTGAACGCTGGAACATGCTGCACCCGCTGGAAACTC CGCGCGTTCCGTATATCGCTCAGGTGATGAACGACGCTCCGCGAGTGGCA TCTACCGACTATATGAACTGTTTCGCTGAGCAGGTCCGTACTTACGTACC GGCTGACGACTACCGGTACTGGGTACTGATGGCTTCCGGTTCGTCCGACA GCCGTGAGAACCCTGCGTCAACCTTTCGAAGTTGATGCTTCTTATGTGCTG GTTGCGGGCGCTGGGCGAACTGGCTAAACGTGGCGAAATCGATAAGAAAGT GGTTGCTGACGCAATCGCCAAATTCAACATCGATGCAGATAAAGTTAACC CGCGTCTGGCGTAA</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
<p><i>aceF</i> 配列番号 6 1</p>	<p>ATGGCTATCGAAATCAAAGTACCGGACATCGGGGCTGATGAAGTTGAAAT CACCGAGATCCTGGTCAAAGTGGGCGACAAAGTTGAAGCCGAACAGTCGC TGATCACCGTAGAAGGCGACAAAGCCTCTATGGAAGTTCCGTCTCCGCAG GCGGGTATCGTTAAAGAGATCAAAGTCTCTGTTGGCGATAAAACCCAGAC CGGCGCACTGATTATGATTTTCGATTCCGCCGACGGTGCAGCAGACGCTG CACCTGCTCAGGCAGAAGAGAAGAAAGAAGCAGCTCCGGCAGCAGCACCA GCGGCTGCGGCGGCAAAGACGTTAACGTTCCGGATATCGGCAGCGACGA AGTTGAAGTGACCGAAATCCTGGTGAAGTTGGCGATAAAGTTGAAGCTG AACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGGCGACAAGGCTTCTATGGAAGTTCCG GCTCCGTTTGTGGCACCGTGAAGAGATCAAAGTGAACGTGGGTGACAA AGTGCTACCGGCTCGCTGATTATGGTCTTTCGAAGTCGCGGGTGAAGCAG GCGCGGACAGCTCCGGCCGCTAAACAGGAAGCAGCTCCGGCAGCGGCCCT GCACCAGCGGCTGGCGTGAAGAAGTTAACGTTCCGGATATCGGCGGTGA CGAAGTTGAAGTACTGAAGTGATGGTGAAGTTGGGCGACAAAGTTGCCG CTGAACAGTCACTGATCACCGTAGAAGGCGACAAAGCTTCTATGGAAGTT</p>	<p>40</p>

【表 15 - 9】

説明	配列
	<p>CCGGCGCCGTTTGCAGGCGTCGTGAAGGAACTGAAAGTCAACGTTGGCGA TAAAGTGAAAACCTGGCTCGCTGATTATGATCTTCGAAGTTGAAGGCGCAG CGCCTGCGGCAGCTCCTGCGAAACAGGAAGCGGCAGCGCCGGCACCGGCA GCAAAAAGCTGAAGCCCCGGCAGCAGCACCAGCTGCGAAAGCGGAAGGCAA ATCTGAATTTGCTGAAAACGACGCTTATGTTACGCGACTCCGCTGATCC GCCGCTGGCACGCGAGTTTGGTGTAAACCTTGCGAAAGTGAAGGGCACT GGCCGTAAAGGTCGTATCCTGCGCGAAGACGTTTACGGCTTACGTGAAAGA AGCTATCAAACGTGCAGAAGCAGCTCCGGCAGCGACTGGCGGTGGTATCC CTGGCATGCTGCCGTGGCCGAAGGTGGACTTCAGCAAGTTTGGTGAAATC GAAGAAGTGGAACTGGGCCGCATCCAGAAAATCTCTGGTGCGAACCTGAG CCGTAACGGGTAATGATCCCGCATGTTACTCACTTCGACAAAACCGATA TCACCGAGTTGGAAGCGTTCGGTAAACAGCAGAACGAAGAAGCGGCGAAA CGTAAGCTGGATGTGAAGATCACCCCGTTGTCTTCATCATGAAAGCCGT TGCTGCAGCTCTTGAGCAGATGCCTCGCTTCAATAGTTTCGCTGTCGGAAG ACGGTCAGCGTCTGACCCTGAAGAAATACATCAACATCGGTGTGGCGGTG GATACCCCGAACGGTCTGGTTGTTCCGGTATTCAAAGACGTCAACAAGAA AGGCATCATCGAGCTGTCTCGCGAGCTGATGACTATTTCTAAGAAAAGCGC GTGACGGTAAGCTGACTGCGGGCGAAATGCAGGGCGGTTGCTTCACCATC TCCAGCATCGGCGGCCCTGGGTACTACCCACTTCGCGCCGATTGTGAACGC GCCGGAAGTGGCTATCCTCGGCGTTTCCAAGTCCGCGATGGAGCCGGTGT GGAAATGGTAAAGAGTTTCGTGCCGCGTCTGATGCTGCCGATTTCTCTCTCC TTCGACCACCGCGTGATCGACGGTGTGATGGTGCCCGTTTCATTACCAT CATTAACAACACGCTGTCTGACATTCGCCGTCTGGTGATGTAA</p>
<p><i>lpd</i> 配列番号 6 2</p>	<p>ATGAGTACTGAAATCAAAAACCTCAGGTCGTGGTACTTGGGGCAGGCCCCGC AGGTTACTCCGCTGCCTTCCGTTGCGCTGATTTAGGTCTGGAAACCGTAA TCGTAGAACGTTACAACACCCTTGGCGGTGTTTGCCTGAACGTCGGCTGT ATCCCTTCTAAAGCACTGCTGCACGTAGCAAAAAGTTATCGAAGAAGCCAA AGCGCTGGCTGAACACGGTATCGTCTTCGGCGAACCAGAAAACCGATATCG ACAAGATTTCGTACCTGGAAAGAGAAAGTGATCAATCAGCTGACCGGTGGT CTGGCTGGTATGGCGAAAGGCCGAAAGTCAAAGTGGTCAAACGGTCTGGG TAAATTCACCGGGGCTAACACCCTGGAAGTTGAAGGTGAGAACGGCAAAA CCGTGATCAACTTCGACAACCGGATCATTGCAGCGGGTTCTCGCCGATC CAACTGCCGTTTATTCGCGATGAAGATCCGCGTATCTGGGACTCCACTGA CGCGCTGGAACGAAAGAAGTACCAGAACGCCTGCTGGTAATGGGTGGCG GTATCATCGGTCTGGAAATGGGCACCGTTTACCACGCGCTGGGTTACAG ATTGACGTGGTTGAAATGTTTCGACCAGGTTATCCCGGCAGCTGACAAAAGA CATCGTTAAAGTCTTCACCAAGCGTATCAGCAAGAAATTC AACCTGATGC TGGAACCAAAGTTACCGCCGTTGAAGCGAAAGAAGACGGCATTATATGTG ACGATGGAAGGCAAAAAGCACCCGCTGAACCGCAGCGTTACGACGCCGT GCTGGTAGCGATTGGTCTGTGCCGAACGGTAAAAACCTCGACGCAGGCA AAGCAGGCGTGGAAAGTTGACGACCGTGGTTTTCATCCGCGTTGACAAAACAG CTGCGTACCAACGTACCGCACATCTTTGCTATCGGGGATATCGTCGGTCA ACCGATGCTGGCACACAAAGGTGTTACGAAGGTACGTTGCCGCTGAAG TTATCGCCGTAAGAAACTACTTCGATCCGAAAGTTATCCCGTCCATC GCCTATACCAAACCAGAAGTTGCATGGGTGGGTCTGACTGAGAAAGAAGC GAAAGAGAAAGGCATCAGCTATGAAACCGCCACCTTCCCGTGGGCTGCTT CTGGTCTGTGCTATCGCTTCCGACTGCGCAGACGGTATGACCAAGCTGATT TTCGACAAAGAATCTCACCGTGTGATCGGTGGTGCGATTGTCCGGTACTAA</p>

10

20

30

40

【表 15 - 10】

説明	配列
	CGGCGGCGAGCTGCTGGGTGAAATCGGCCTGGCAATCGAAATGGGTTGTG ATGCTGAAGACATCGCACTGACCATCCACGCGCACCCGACTCTGCACGAG TCTGTGGGCTGGCGGCAGAAGTGTTCGAAGGTAGCATTACCGACCTGCC GAACCCGAAAGCGAAGAAGAAGTAA
<i>tesB</i> 配列番号 48	ATGAGTCAGGCGCTAAAAAATTTACTGACATTGTTAAATCTGGAAAAAAT TGAGGAAGGACTCTTTCGCGGCCAGAGTGAAGATTTAGGTTTACGCCAGG TGTTTGGCGGCCAGGTCGTGGGTGAGCCTTGTATGCTGCAAAAGAGACC GTCCCTGAAGAGCGGCTGGTACATTGTTTTACAGCTACTTTCTTCGCC TGGCGATAGTAAGAAGCCGATTATTTATGATGTCGAAACGCTGCGTGACG GTAACAGCTTCAGCGCCCGCGGGTTGCTGCTATTCAAACGGCAAACCG ATTTTTTATATGACTGCCTCTTTCAGGCACCAGAAGCGGGTTTCGAACA TCAAAAAACAATGCCGTCCGCGCCAGCGCCTGATGGCTCCCTTCGGAAA CGCAAATCGCCCAATCGCTGGCGCACCTGCTGCCGCCAGTGTGAAAGAT AAATTCATCTGCGATCGTCCGCTGGAAGTCCGTCCGGTGGAGTTTCATAA CCCCTGAAAGGTCACGTCGCAGAACCACATCGTCAGGTGTGGATCCGCG CAAATGGTAGCGTGCCGGATGACCTGCGCGTTTCATCAGTATCTGCTCGGT TACGCTTCTGATCTTAACCTCCTGCCGGTAGCTCTACAGCCGCACGGCAT CGGTTTTCTCGAACCGGGGATTGAGATTGCCACCATGACCATTCCATGT GGTCCATCGCCGTTTAATTTGAATGAATGGCTGCTGTATAGCGTGGAG AGCACCTCGGCGTCCAGCGCACGTGGCTTTGTGCGCGGTGAGTTTTATAC CCAAGACGGCGTACTGGTTGCCTCGACCGTTCAGGAAGGGGTGATGCGTA ATCACAATTAA

10

20

【0198】

いくつかの実施形態では、プロピオン酸生合成遺伝子のうちの1つまたは複数は、合成プロピオン酸生合成遺伝子である。いくつかの実施形態では、プロピオン酸生合成遺伝子のうちの1つまたは複数は、大腸菌プロピオン酸生合成遺伝子である。いくつかの実施形態では、プロピオン酸生合成遺伝子のうちの1つまたは複数は、*C. glutamicum* プロピオン酸生合成遺伝子である。いくつかの実施形態では、プロピオン酸生合成遺伝子のうちの1つまたは複数は、*C. プロピオニウム* プロピオン酸生合成遺伝子である。プロピオン酸遺伝子カセットは、プロピオン酸の好氣的生合成のための遺伝子および/またはプロピオン酸の嫌氣的もしくは微好氣的生合成のための遺伝子を含み得る。プロピオン酸生合成遺伝子のうちの1つまたは複数は、機能的に置換または改変、例えば、コドンをも最適化することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、細菌の異なる種、菌株および/または垂菌株に由来するプロピオン酸生合成遺伝子の組合せを含み、HE特異的分子もしくは代謝物の存在下で、肝損傷、炎症もしくは炎症反応に関連する分子もしくは代謝物の存在下、またはアラビノースのような、消化管中に存在し得るもしくは存在し得ないある種の他の代謝物の存在下で、低酸素条件下でプロピオン酸を産生することができる。いくつかの実施形態では、HE特異的分子もしくは代謝物の存在下で、肝損傷、炎症もしくは炎症反応に関連する分子もしくは代謝物の存在下、またはアラビノースのような、消化管中に存在し得るもしくは存在し得ないある種の他の代謝物の存在下で、低酸素条件下で安定性を向上させ、かつ/またはプロピオン酸の産生を増加させるために、プロピオン酸生合成遺伝子のうちの1つまたは複数をも機能的に置換、改変、および/または突然変異させる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、HE

30

40

50

特異的分子もしくは代謝物の存在下で、肝損傷、炎症もしくは炎症反応に関連する分子もしくは代謝物の存在下、またはアラビノースのような、消化管中に存在し得るもしくは存在し得ないある種の他の代謝物の存在下で、低酸素条件下でプロピオン酸生合成カセットを発現し、プロピオン酸を産生することができる。

【0199】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、酢酸遺伝子カセットを含み、酢酸を産生する。遺伝子操作細菌は、適切な組の酢酸生合成遺伝子を含み得る。内因性酢酸生合成遺伝子を含む非改変細菌は、当技術分野で公知であり、好気的および/または嫌気的条件下で様々な基質を消費して、酢酸を産生することができる(例えば、Ragsdaleら、2008年参照)。これらの内因性酢酸生合成遺伝子は、本発明の遺伝子操作細菌の遺伝子の起源であり得る。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌の異なる種、菌株または亜菌株に由来する酢酸生合成遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌における天然酢酸生合成遺伝子は、増強されている。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、例えば、大腸菌に由来する好気性酢酸生合成遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、例えば、アセチトマクラム属、アセトアナエロビウム属、アセトハロビウム属、アセトネマ属、バルチア属、ブチリバクテリウム属、クロストリジウム属、ムーレラ属、オキシバクター属、スポロムサ属および/またはサーモアセトゲニウム属に由来する嫌気性酢酸生合成遺伝子を含む。遺伝子操作細菌は、好気性酢酸生合成の遺伝子または嫌気的もしくは微好気性酢酸生合成の遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、好気性および嫌気性または微好気性酢酸生合成遺伝子の両方を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、細菌の異なる種、菌株および/または亜菌株に由来する酢酸生合成遺伝子の組合せを含み、酢酸を産生することができる。いくつかの実施形態では、安定性および/または酢酸の産生を増大させるために、酢酸生合成遺伝子のうちの1つまたは複数を機能的に置換、改変、および/または突然変異させる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、低酸素条件下でまたはHE特異的分子もしくは代謝物の存在下で酢酸生合成カセットを発現し、酢酸を産生することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、代替短鎖脂肪酸を産生することができる。

【0200】

当業者は、消化管バリア機能増強分子を産生することができるさらなる遺伝子および遺伝子カセットが当技術分野で公知であり、本発明の遺伝子操作細菌により発現させることができることを理解するであろう。いくつかの実施形態では、治療用分子を産生するための遺伝子または遺伝子カセットは、さらなる転写および翻訳エレメント、例えば、治療用分子の発現を増大させるための、リボソーム結合部位も含む。

【0201】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、2種またはそれ以上の消化管バリア機能増強分子を産生する。特定の実施形態では、2種またはそれ以上の消化管バリア機能増強分子は、相乗的に挙動して、消化管バリア機能を増強する。特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、酪酸およびプロピオン酸を発現する。

【0202】

いくつかの実施形態では、アンモニア変換回路を含む遺伝子操作細菌は、消化管バリア増強分子、例えば、酪酸を産生するための1つまたは複数の回路をさらに含む(図43)。

【0203】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アンモニア変換回路、GABA代謝回路および消化管バリア増強分子、例えば、酪酸を産生するための1つまたは複数の回路を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アンモニア変換回路、GABA輸送回路および消化管バリア増強分子、例えば、酪酸を産生するための1つまたは複数の回路を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アンモニア変換回路、GABA輸送回路、GABA代謝回路および消化管バリア増強分子、例えば、酪酸を産生するための1

10

20

30

40

50

つまたは複数の回路を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アンモニア変換回路、マンガン輸送回路、GABA代謝回路および消化管バリア増強分子、例えば、酪酸を産生するための1つまたは複数の回路を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アンモニア変換回路、マンガン輸送回路、GABA輸送回路および消化管バリア増強分子、例えば、酪酸を産生するための1つまたは複数の回路を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アンモニア変換回路、マンガン輸送回路、GABA輸送回路、GABA代謝回路および消化管バリア増強分子、例えば、酪酸を産生するための1つまたは複数の回路を含む。いくつかの実施形態では、各回路は、同じプロモーターの制御下にある。代替実施形態では、各回路は、異なるプロモーターの制御下にある。

【0204】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、HE特異的分子もしくは代謝物の存在下で、肝損傷、炎症もしくは炎症反応に関連する分子もしくは代謝物の存在下、またはアラビノースのような、消化管中に存在し得るもしくは存在し得ないある種の他の代謝物の存在下で、低酸素条件で、記載した回路のうちの1つまたは複数を経験することができる。いくつかの実施形態では、記載した回路のうちの1つまたは複数が1つもしくは複数のプラスミド（例えば、高コピーもしくは低コピー）上に存在するかまたは細菌染色体における1つもしくは複数の部位に組み込まれる。また、いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、記載した回路のうちの1つまたは複数を経験することができ、(1)当技術分野で公知であり、本明細書で示す栄養要求性のいずれか、例えば、thyA栄養要求性などの、1つまたは複数の栄養要求性、(2)本明細書に記載の、あるいは当技術分野
20
で公知のキルスイッチのいずれかなどの、1つまたは複数のキルスイッチ回路、(3)1つまたは複数の抗生物質耐性回路、(4)本明細書に記載の、あるいは当技術分野で公知の輸送体のいずれかのような、生体分子または物質を移入する1つまたは複数の輸送体、(5)本明細書に記載の、あるいは当技術分野で公知の分泌回路のいずれかなどの、1つまたは複数の分泌回路、および(6)そのようなさらなる回路のうちの1つまたは複数の組合せのうちの1つまたは複数を経験する。

【0205】

本明細書に記載の実施形態のいずれかにおいて、遺伝子操作細菌は、リファキシミンに対する耐性をさらに含み得る。リファキシミンに対する耐性は、rpoB遺伝子における突然変異によって主としてもたらされる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、
30
例えば、rpoB遺伝子における公知のリファキシミン耐性を含む。他の実施形態では、リファキシミン耐性をもたらす有用な突然変異を同定するために、遺伝子操作細菌を漸量のリファキシミンに曝露する、スクリーニングを用いることができる。

【0206】

誘導性プロモーター

いくつかの実施形態では、ペイロード（複数可）を宿主細胞において発現させることができ、宿主細胞が、*in vitro*で、例えば、培地中で、かつ/または*in vivo*で、例えば、消化管内で、生存し、かつ/または増殖することができるように、細菌細胞は、ペイロード（複数可）をコードする遺伝子（複数可）を有する安定に維持されたプラスミドまたは染色体を含む。いくつかの実施形態では、細菌細胞は、2種またはそれ以上
40
の異なるペイロードまたはオペロン、例えば、2種またはそれ以上のペイロード遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、細菌細胞は、3種またはそれ以上の異なる輸送体またはオペロン、例えば、3種またはそれ以上のペイロード遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、細菌細胞は、4、5、6、7、8、9、10種またはそれ以上の異なるペイロードまたはオペロン、例えば、4、5、6、7、8、9、10種またはそれ以上のペイロード遺伝子を含む。

【0207】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、同じペイロード遺伝子（複数可）の複数のコピーを含む。いくつかの実施形態では、ペイロードをコードする遺伝子は、プラスミド上に存在し、誘導性プロモーターに直接的または間接的に作動可能に連結する。いくつ
50

かの実施形態では、ペイロードをコードする遺伝子は、プラスミド上に存在し、低酸素または嫌気的条件下で誘導されるプロモーターに作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、ペイロードをコードする遺伝子は、染色体上に存在し、誘導性プロモーターに直接的または間接的に作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、ペイロードをコードする遺伝子は、染色体上に存在し、低酸素または嫌気的条件下で誘導されるプロモーターに作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、ペイロードをコードする遺伝子は、プラスミド上に存在し、テトラサイクリンまたはアラビノースへの曝露により誘導されるプロモーターに作動可能に連結する。

【0208】

いくつかの実施形態では、ペイロードをコードする遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターは、外因性環境条件により直接的に誘導される。いくつかの実施形態では、ペイロードをコードする遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターは、外因性環境条件により間接的に誘導される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、哺乳動物の消化管に固有の外因性環境条件により直接的または間接的に誘導される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、哺乳動物の小腸に固有の外因性環境条件により直接的または間接的に誘導される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、哺乳動物の消化管の環境のような低酸素または嫌気的条件下により直接的または間接的に誘導される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、哺乳動物の消化管に特有である分子または代謝物により直接的または間接的に誘導される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、細菌細胞と併用投与される分子により直接的または間接的に誘導される。

【0209】

特定の実施形態では、細菌細胞は、フマル酸・硝酸レダクターゼ調節因子 (FNR) 応答性プロモーターの制御下に発現するペイロードをコードする遺伝子を含む。大腸菌において、FNRは、好氣的代謝から嫌氣的代謝への切り替えを制御する主要な転写活性化因子である (Undenら、1997年)。嫌氣的状態では、FNRは、嫌氣的増殖への適応に関与する数百種の遺伝子を活性化する活性なDNA結合タンパク質に二量体化する。好氣的状態では、FNRは、酸素により二量体化することが妨げられ、不活性である。FNR応答性プロモーターは、下文の図表に示すFNR応答性プロモーターを含むが、これらに限定されない。下線付き配列は、予測されるリボソーム結合部位であり、太字の配列は、クローニングに用いられる制限部位である。

【0210】

FNRプロモーター配列は、当技術分野で公知であり、任意の適切なFNRプロモーター配列 (複数可) を本発明の遺伝子操作細菌に用いることができる。任意の適切なFNRプロモーター (複数可) を適切なペイロードと組み合わせることができる (例えば、例示的 $argA^{fbr}$ 配列を表7に示す)。非限定的なFNRプロモーター配列を表6に示す。表6にFNR応答性プロモーター配列を含む例示的調節領域配列の核酸配列を示す。下線付きの配列は、予測されるリボソーム結合部位であり、太字の配列は、クローニングに用いられる制限部位である。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、配列番号18、配列番号19、*nirB1*プロモーター (配列番号20)、*nirB2*プロモーター (配列番号21)、*nirB3*プロモーター (配列番号22)、*ydfZ*プロモーター (配列番号23)、強リボソーム結合部位に融合した*nirB*プロモーター (配列番号24)、強リボソーム結合部位に融合した*ydfZ*プロモーター (配列番号25)、嫌氣的に誘導される小RNA遺伝子である*fnrS* (*fnrS1*プロモーター配列番号26または*fnrS2*プロモーター配列番号27)、*crp*結合部位に融合した*nirB*プロモーター (配列番号28) および*crp*結合部位に融合した*fnrS* (配列番号29) のうちの1つまたは複数を含む。

【0211】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28もしくは29のDNA配列またはそれらの機能性断片と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約9

10

20

30

40

50

5%、または少なくとも約99%相同である核酸配列を含む。

【0212】

一実施形態では、FNR応答性プロモーターは、配列番号1を含む。他の実施形態では、FNR応答性プロモーターは、配列番号2を含む。他の実施形態では、FNR応答性プロモーターは、配列番号3を含む。他の実施形態では、FNR応答性プロモーターは、配列番号4を含む。他の実施形態では、FNR応答性プロモーターは、配列番号5を含む。

【0213】

いくつかの実施形態では、複数の異なるFNR核酸配列が遺伝子操作細菌に挿入されている。代替実施形態では、遺伝子操作細菌は、代替酸素レベル依存性プロモーター、例えば、DNR(Trunkら、2010年)またはANR(Rayら、1997年)の制御下に発現するペイロードをコードする遺伝子を含む。これらの実施形態では、ペイロード遺伝子の発現は、消化管内のような、低酸素または嫌気的環境において特に活性化される。いくつかの実施形態では、遺伝子発現は、当技術分野で公知の方法により、例えば、リボソーム結合部位を最適化し、かつ/またはmRNAの安定性を向上させることにより、さらに最適化される。一実施形態では、哺乳動物消化管は、ヒト哺乳動物消化管である。

【0214】

いくつかの実施形態では、細菌細胞は、酸素レベル依存性転写調節因子、例えば、FNR、ANRまたはDNR、および異なる細菌種に由来する対応するプロモーターを含む。異種酸素レベル依存性転写調節因子およびプロモーターは、同じ条件下の細菌における天然遺伝子(複数可)およびプロモーターと比較して、低酸素または嫌気的環境における、前記プロモーターに作動可能に連結した遺伝子、例えば、ペイロードをコードする遺伝子の転写を増加させる。特定の実施形態では、非天然酸素レベル依存性転写調節因子は、細菌に由来するFNRタンパク質である(例えば、Isabelleら、2011年参照)。いくつかの実施形態では、対応する野生型転写調節因子は、完全なままであり、野生型活性を保持している。代替実施形態では、対応する野生型転写調節因子は、野生型活性を低減または消失するように欠失または突然変異させる。

【0215】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、野生型酸素レベル依存性転写調節因子、例えば、FNR、ANRまたはDNR、および同じ亜型の細菌に由来する野生型プロモーターと比べて突然変異している対応するプロモーターを含む。突然変異プロモーターは、同じ条件下の野生型プロモーターと比較して、低酸素または嫌気的環境における、野生型転写調節因子への結合を増強させ、前記プロモーターに作動可能に連結した遺伝子、例えば、ペイロードをコードする遺伝子の転写を増加させる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、野生型酸素レベル依存性プロモーター、例えば、FNR、ANRまたはDNRプロモーター、および同じ亜型の細菌に由来する野生型転写調節因子と比べて突然変異している対応する転写調節因子を含む。突然変異転写調節因子は、同じ条件下の野生型転写調節因子と比較して、低酸素または嫌気的環境における、野生型プロモーターへの結合を増強させ、前記プロモーターに作動可能に連結した遺伝子、例えば、ペイロードをコードする遺伝子の転写を増加させる。特定の実施形態では、突然変異酸素レベル依存性転写調節因子は、二量体化およびFNR活性を増加させるアミノ酸置換を含むFNRタンパク質である(例えば、Mooreら、2006年参照)。

【0216】

いくつかの実施形態では、細菌細胞は、酸素レベル感知転写調節因子、例えば、FNR遺伝子をコードする内因性遺伝子の複数のコピーを含む。いくつかの実施形態では、酸素レベル感知転写調節因子をコードする遺伝子は、プラスミド上に存在する。いくつかの実施形態では、酸素レベル感知転写調節因子をコードする遺伝子およびペイロードをコードする遺伝子は、異なるプラスミド上に存在する。いくつかの実施形態では、酸素レベル感知転写調節因子をコードする遺伝子およびペイロードをコードする遺伝子は、同じプラスミド上に存在する。いくつかの実施形態では、酸素レベル感知転写調節因子をコードする遺伝子は、染色体上に存在する。いくつかの実施形態では、酸素レベル感知転写調節因子

10

20

30

40

50

をコードする遺伝子およびペイロードをコードする遺伝子は、異なる染色体上に存在する。いくつかの実施形態では、酸素レベル感知転写調節因子をコードする遺伝子およびペイロードをコードする遺伝子は、同じ異染色体上に存在する。いくつかの例では、発現安定性を向上させるために誘導性プロモーターの制御下で酸素レベル感知転写調節因子を発現させることは、有利であり得る。いくつかの実施形態では、転写調節因子の発現は、ペイロードをコードする遺伝子の発現を制御するプロモーターと異なるプロモーターにより制御される。いくつかの実施形態では、転写調節因子の発現は、ペイロードの発現を制御する同じプロモーターにより制御される。いくつかの実施形態では、転写調節因子およびペイロードは、プロモーター領域から分岐して転写される。

【0217】

RNS依存性調節

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌または遺伝子操作ウイルスは、誘導性プロモーターの制御下で発現するペイロードをコードする遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌または遺伝子操作ウイルスは、炎症状態により活性化されるプロモーターの制御下でペイロードを発現する。一実施形態では、ペイロードを産生するための遺伝子は、炎症性環境において活性化される炎症依存性プロモーター、例えば、活性窒素種またはRNSプロモーターの制御下に発現する。

【0218】

本明細書で使用する場合、「活性窒素種」および「RNS」は、同義で用い、分子状窒素に由来する高度に活性な分子、イオンおよび/またはラジカルを意味する。RNSは、ニトロソ化ストレスのような有害な細胞効果をもたらし得る。RNSは、酸化窒素($\text{NO}\cdot$)、ペルオキシ亜硝酸またはペルオキシ亜硝酸アニオン(ONOO^-)、二酸化窒素($\cdot\text{NO}_2$)、三酸化二窒素(N_2O_3)、ペルオキシ亜硝酸(ONOOH)およびニトロペルオキシカーボネート(ONOOCO_2^-)を含むが、これらに限定されない(不対電子を \cdot により示す)。細菌は、RNSレベルを感知することができる転写因子を発達させた。異なるRNSシグナル伝達経路は、異なるRNSレベルにより誘発され、異なる速度論で発生する。

【0219】

本明細書で使用する場合、「RNS誘導性調節領域」は、1つまたは複数のRNS感知転写因子が結合することができ、対応する転写因子の結合および/または活性化が下流の遺伝子発現を活性化する、核酸配列を意味し、RNSの存在下で、転写因子は、調節領域に結合し、かつ/またはそれを活性化する。いくつかの実施形態では、RNS誘導性調節領域は、プロモーター配列を含む。いくつかの実施形態では、転写因子は、RNSを感知し、その後、RNS誘導性調節領域に結合し、それにより、下流の遺伝子発現を活性化する。代替実施形態では、転写因子は、RNSの非存在下でRNS誘導性調節領域に結合し、RNSの存在下では、転写因子は、立体配座の変化を受け、それにより、下流の遺伝子発現を活性化する。RNS誘導性調節領域は、1つまたは複数の遺伝子、例えば、ペイロード遺伝子配列(複数可)、例えば、本明細書に記載のペイロードのいずれかに作動可能に連結することができる。例えば、RNSの存在下で、転写因子は、RNSを感知し、対応するRNS誘導性調節領域を活性化し、それにより、作動可能に連結した遺伝子配列の発現を駆動する。このように、RNSは、遺伝子または遺伝子配列の発現を誘導する。

【0220】

本明細書で使用する場合、「RNS抑制解除調節領域」は、1つまたは複数のRNS感知転写因子が結合することができ、対応する転写因子の結合が下流の遺伝子発現を抑制する、核酸配列を意味し、RNSの存在下では、転写因子は、調節領域に結合せず、抑制しない。いくつかの実施形態では、RNS抑制解除調節領域は、プロモーター配列を含む。RNS抑制解除調節領域は、1つまたは複数の遺伝子、例えば、ペイロード遺伝子配列(複数可)に作動可能に連結することができる。例えば、RNSの存在下では、転写因子は、RNSを感知し、調節領域にもはや結合し、かつ/または抑制することをせず、それにより、作動可能に連結した遺伝子配列または遺伝子カセットを活性化する。このように、

10

20

30

40

50

RNSは、1つまたは複数の遺伝子の発現を活性化する。

【0221】

本明細書で使用する場合、「RNS抑制性調節領域」は、1つまたは複数のRNS感知転写因子が結合することができ、対応する転写因子の結合が下流の遺伝子発現を抑制する、核酸配列を意味し、RNSの存在下では、転写因子は、調節領域に結合し、抑制する。いくつかの実施形態では、RNS抑制性調節領域は、プロモーター配列を含む。いくつかの実施形態では、RNSを感知する転写因子は、プロモーター配列の一部と重複する調節領域に結合することができる。代替実施形態では、RNSを感知する転写因子は、プロモーター配列の上流または下流である調節領域に結合することができる。RNS抑制性調節領域は、遺伝子配列または遺伝子カセットに作動可能に連結することができる。例えば、RNSの存在下では、転写因子は、RNSを感知し、対応するRNS抑制性調節領域に結合し、それにより、1つまたは複数の作動可能に連結した遺伝子配列の発現を阻止する。このように、RNSは、遺伝子または遺伝子配列の発現を抑制する。

10

【0222】

本明細書で使用する場合、「RNS応答性調節領域」は、RNS誘導性調節領域、RNS抑制性調節領域および/またはRNS抑制解除調節領域を意味する。いくつかの実施形態では、RNS応答性調節領域は、プロモーター配列を含む。各調節領域は、少なくとも1つの対応するRNS感知転写因子に結合することができる。RNSを感知する転写因子ならびにそれらの対応するRNS応答性遺伝子、プロモーターおよび/または調節領域の例は、表Aに示すものを含むが、これらに限定されない。

20

【0223】

【表A】

表A. RNS感知転写因子およびRNS応答性遺伝子の例

RNS感知転写因子	主として以下のものを感知することができる	応答性遺伝子、プロモーターおよび/または調節領域の例
NsrR	NO	<i>norB, aniA, nsrR, hmpA, ytfE, ygbA, hcp, hcr, nrfA, aox</i>
NorR	NO	<i>norVW, norR</i>
DNR	NO	<i>norCB, nir, nor, nos</i>

30

【0224】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、少なくとも1つの活性窒素種を感知することができる転写因子により直接的または間接的に制御される調整可能な調節領域を含む。調節可能な調節領域は、ペイロードの発現を直接的または間接的に駆動することができる1つまたは複数の遺伝子に作動可能に連結し、ひいてはRNSレベルに対してペイロードの発現を制御する。例えば、調節可能な調節領域は、RNS誘導性調節領域であり、ペイロードは、本明細書で示すペイロードのいずれかのような、ペイロードであり、例えば、炎症組織においてRNSが存在する場合、RNS感知転写因子は、調節領域に結合し、かつ/または活性化し、1つまたは複数のペイロード遺伝子の発現を駆動する。その後、炎症が改善し、RNAレベルが低下した場合、ペイロードの産生は、減少または消失する。

40

【0225】

いくつかの実施形態では、調節可能な調節領域は、RNS誘導性調節領域であり、RNSの存在下で、転写因子は、RNSを感知し、RNS誘導性調節領域を活性化し、それにより、1つまたは複数の作動可能に連結した遺伝子の発現を駆動する。いくつかの実施形

50

態では、転写因子は、RNSを感知し、その後、RNS誘導性調節領域に結合し、それにより、下流の遺伝子発現を活性化する。代替実施形態では、転写因子をRNSの非存在下でRNS誘導性調節領域に結合させ、転写因子がRNSを感知するとき、それは、立体配座の変化を受け、それにより、下流の遺伝子発現を誘導する。

【0226】

いくつかの実施形態では、調節可能な調節領域は、RNS誘導性調節領域であり、RNSを感知する転写因子は、NorRである。NorRは、「NOを亜酸化窒素に還元する、フラボルブレドキシンおよび関連フラビタンパク質をコードするnorVW遺伝子の発現を調節するNO応答性転写活性化因子である」(Spiro、2006年)。本発明の遺伝子操作細菌は、NorRによって活性化される遺伝子の任意の適切なRNA応答性調節領域を含み得る。NorRによって活性化することができる遺伝子は、当技術分野で公知である(例えば、Spiro、2006年; Vineら、2011年; Karlinsleyら、2012年参照)。特定の実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、1つまたは複数の遺伝子、例えば、1つまたは複数のペイロード遺伝子配列に作動可能に連結したnorVWに由来するRNS誘導性調節領域を含む。RNRの存在下で、NorR転写因子は、RNRを感知し、norVW調節領域を活性化し、それにより、作動可能に連結した遺伝子(複数可)の発現を駆動し、ペイロードを産生する。

10

【0227】

いくつかの実施形態では、調節可能な調節領域は、RNS誘導性調節領域であり、RNSを感知する転写因子は、DNRである。DNR(異化型硝酸呼吸調節因子)は、酸化窒素の存在下で「nir、norおよびnos遺伝子の発現を促進する」(Castiglioneら、2009年)。本発明の遺伝子操作細菌は、DNRによって活性化される遺伝子の任意の適切なRNS応答性調節領域を含み得る。DNRによって活性化することができる遺伝子は、当技術分野で公知である(例えば、Castiglioneら、2009年; Giardinaら、2008年参照)。特定の実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、遺伝子または遺伝子カセット、例えば、酪酸生成遺伝子カセットに作動可能に連結したnorCBのRNS誘導性調節領域を含む。RNRの存在下で、DNR転写因子は、RNSを感知し、norCB調節領域を活性化し、それにより、1つまたは複数の作動可能に連結した遺伝子の発現を駆動し、1つまたは複数のペイロードを産生する。いくつかの実施形態では、DNRは、緑膿菌DNRである。

20

30

【0228】

いくつかの実施形態では、調節可能な調節領域は、RNS抑制解除調節領域であり、対応する転写因子の結合が下流の遺伝子発現を抑制するものであり、RNSの存在下では、転写因子は、調節領域にもはや結合せず、それにより、作動可能に連結した遺伝子または遺伝子カセットを活性化する。

【0229】

いくつかの実施形態では、調節可能な調節領域は、RNS抑制解除調節領域であり、RNSを感知する転写因子は、NsrRである。NsrRは、「NOを感知し、NOの代謝に関与する遺伝子の発現を制御することができるRrf2型の転写リプレッサー」である(Isabelleraら、2009年)。本発明の遺伝子操作細菌は、NsrRによって抑制される遺伝子の適切なRNS応答性調節領域を含み得る。いくつかの実施形態では、NsrRは、淋菌NsrRである。NsrRによる抑制を受けることができる遺伝子は、当技術分野で公知である(例えば、Isabelleraら、2009年; Dunnら、2010年参照)。特定の実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、1つまたは複数の遺伝子、例えば、1つまたは複数のペイロード遺伝子に作動可能に連結したnorBのRNS抑制解除調節領域を含む。RNSの存在下で、NsrR転写因子は、RNSを感知し、norB調節領域にもはや結合せず、それにより、1つまたは複数の作動可能に連結したペイロード遺伝子を活性化し、ペイロードをコードするもの(the encoding payload(s))を生成する。

40

【0230】

50

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌が、細菌におけるかなりの数の天然遺伝子の発現を調節しないRNS感知転写因子を発現することは、有利である。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、転写因子が本発明の遺伝子操作細菌における調節配列に結合しない、細菌の異なる種、菌株または亜菌株に由来するRNS感知転写因子を発現する。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、大腸菌であり、RNS感知転写因子は、例えば、淋菌に由来するNsrRであり、ここで、大腸菌は、前記NsrRに対する結合部位を含まない。いくつかの実施形態では、異種転写因子は、遺伝子操作細菌における内因性調節領域および遺伝子に対するオフターゲット効果を最小限にまたは排除する。

【0231】

いくつかの実施形態では、調節可能な調節領域は、RNS抑制性調節領域であり、対応する転写因子の結合が下流の遺伝子発現を抑制するものであり、RNSの存在下では、転写因子は、RNSを感知し、RNS抑制性調節領域に結合し、それにより、作動可能に連結した遺伝子または遺伝子カセットの発現を抑制する。いくつかの実施形態では、RNS感知転写因子は、プロモーター配列の一部と重複する調節領域に結合することができる。代替実施形態では、RNS感知転写因子は、プロモーター配列の上流または下流である調節領域に結合することができる。

【0232】

これらの実施形態では、遺伝子操作細菌は、ペイロードを発現させるために用いる、2つのリプレッサー活性化調節回路を含み得る。2つのリプレッサー活性化調節回路は、第1のRNS感知リプレッサーおよび例えば、ペイロードをコードする遺伝子または遺伝子カセットに作動可能に連結した、第2のリプレッサーを含む。これらの実施形態の一態様では、RNS感知リプレッサーは、遺伝子または遺伝子カセットの転写を抑制する、第2のリプレッサーの転写を抑制する。これらの実施形態において有用な第2のリプレッサーの例は、TetR、C1およびLexAを含むが、これらに限定されない。第1のリプレッサーによる結合の非存在(RNSの非存在下で起こる)下では、第2のリプレッサーが転写され、これが1つまたは複数の遺伝子の発現を抑制する。第1のリプレッサーによる結合の存在(RNSの存在下で起こる)下では、第2のリプレッサーの発現が抑制され、1つまたは複数の遺伝子、例えば、1つまたは複数のペイロード遺伝子が発現する。

【0233】

RNS応答性転写因子は、遺伝子操作細菌において用いられる調節領域の配列によって遺伝子発現を誘導、活性化、または抑制し得る。1つまたは複数の種類のRNS感知転写因子および対応する調節領域配列が遺伝子操作細菌に存在し得る。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、1種類のRNS感知転写因子、例えば、NsrR、および例えば、norBに由来する1つの対応する調節領域配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、1種類のRNS感知転写因子、例えば、NsrR、ならびに例えば、norBおよびaniAに由来する、2つまたはそれ以上の異なる対応する調節領域配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、2またはそれ以上の種類のRNS感知転写因子、例えば、NsrRおよびNorR、ならびに例えば、それぞれnorBおよびnorRに由来する、2つまたはそれ以上の対応する調節領域配列を含む。1つのRNS応答性調節領域が複数の転写因子に結合できることがあり得る。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、2またはそれ以上の種類のRNS感知転写因子および1つの対応する調節領域配列を含む。いくつかのRNSにより調節される調節領域の核酸配列は、当技術分野で公知である(例えば、Spiro、2006年; Isabelら、2009年; Dunnら、2010年; Vineら、2011年; Karlinseyら、2012年)。

【0234】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、RNS感知転写因子をコードする遺伝子、例えば、その天然プロモーターにより制御されるnsrR遺伝子、誘導性プロモーター、天然プロモーターより強いプロモーター、例えば、GlnRSプロモーターも

10

20

30

40

50

しくはP (B l a) プロモーター、または構成的プロモーターを含む。いくつかの例では、発現安定性を向上させるために誘導性プロモーターの制御下のR N S感知転写因子を発現させることは、有利であり得る。いくつかの実施形態では、R N S感知転写因子の発現は、治療用分子の発現を制御するプロモーターと異なるプロモーターにより制御される。いくつかの実施形態では、R N S感知転写因子の発現は、治療用分子の発現を制御する同じプロモーターにより制御される。いくつかの実施形態では、R N S感知転写因子および治療用分子は、プロモーター領域から分岐して転写される。

【 0 2 3 5 】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、細菌の異なる種、菌株または亜菌株に由来するR N S感知転写因子の遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、細菌の異なる種、菌株または亜菌株に由来するR N S応答性調節領域を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、細菌の異なる種、菌株または亜菌株に由来するR N S感知転写因子および対応するR N S応答性調節領域を含む。異種R N S感知転写因子および調節領域は、同じ条件下の同じ亜型の細菌に由来する天然転写因子および調節領域と比較して、R N Sの存在下で前記調節領域に作動可能に連結した遺伝子の転写を増加させ得る。

10

【 0 2 3 6 】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、R N S感知転写因子N s r Rおよび淋菌に由来する対応する調節領域n s r Rを含む。いくつかの実施形態では、天然R N S感知転写因子、例えば、N s r Rは、完全なままであり、野生型活性を保持している。代替実施形態では、天然R N S感知転写因子、例えば、N s r Rは、野生型活性を低減または消失させるために欠失または突然変異させる。

20

【 0 2 3 7 】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、R N S感知転写因子をコードする内因性遺伝子、例えば、n s r R遺伝子の複数のコピーを含む。いくつかの実施形態では、R N S感知転写因子をコードする遺伝子は、プラスミド上に存在する。いくつかの実施形態では、R N S感知転写因子をコードする遺伝子および治療用分子を産生するための遺伝子または遺伝子カセットは、異なるプラスミド上に存在する。いくつかの実施形態では、R N S感知転写因子をコードする遺伝子および治療用分子を産生するための遺伝子または遺伝子カセットは、同じプラスミド上に存在する。いくつかの実施形態では、R N S感知転写因子をコードする遺伝子は、染色体上に存在する。いくつかの実施形態では、R N S感知転写因子をコードする遺伝子および治療用分子を産生するための遺伝子または遺伝子カセットは、異なる染色体上に存在する。いくつかの実施形態では、R N S感知転写因子をコードする遺伝子および治療用分子を産生するための遺伝子または遺伝子カセットは、同じ染色体上に存在する。

30

【 0 2 3 8 】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、R N S感知転写因子をコードする野生型遺伝子、例えば、N s r R遺伝子、同じ亜型の細菌の野生型調節領域と比べて突然変異している、対応する調節領域、例えば、n o r B調節領域を含む。突然変異調節領域は、同じ条件下の野生型調節領域と比較して、R N Sの存在下でペイロードの発現を増加させる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、野生型R N S応答性調節領域、例えば、n o r B調節領域、および同じ亜型の細菌の野生型転写因子と比べて突然変異している、対応する転写因子、例えば、N s r Rを含む。突然変異転写因子は、同じ条件下の野生型転写因子と比較して、R N Sの存在下でペイロードの発現を増加させる。いくつかの実施形態では、R N Sの存在下でのペイロードの発現を増加させるために、R N S感知転写因子および対応する調節領域の両方を同じ亜型の細菌の野生型配列と比べて突然変異させる。

40

【 0 2 3 9 】

いくつかの実施形態では、抗炎症および/または消化管バリア機能増強分子を産生するための遺伝子または遺伝子カセットは、プラスミド上に存在し、R N Sにより誘導される

50

プロモーターに作動可能に連結している。いくつかの実施形態では、当技術分野で公知の方法によって、例えば、リボソーム結合部位を最適化し、転写調節因子を操作し、かつ/または mRNA の安定性を増大させることによって、発現がさらに最適化される。

【0240】

いくつかの実施形態では、本開示の遺伝子（複数可）のいずれかを1つまたは複数の組込み部位において細菌染色体に組み込むことができる。例えば、ペイロード遺伝子（複数可）をコードする1つまたは複数の1つまたは複数のコピーを細菌染色体に組み込むことができる。染色体に組み込まれた1つまたは複数の遺伝子の複数のコピーを有することにより、ペイロード（複数可）のより多くの産生が可能となり、発現のレベルの微調整も可能となる。あるいは、複数の異なる機能を果たすために治療用遺伝子（複数可）または遺伝子カセット（複数可）に加えて、分泌または輸出回路のいずれかのような、本明細書に記載の異なる回路を細菌染色体の1つまたは複数の異なる組込み部位に組み込むことが可能である。

10

【0241】

ROS 依存性調節

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌または遺伝子操作ウイルスは、誘導性プロモーターの制御下で発現するペイロードを産生するための遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌または遺伝子操作ウイルスは、細胞損傷の状態により活性化されるプロモーターの制御下でペイロードを発現する。一実施形態では、ペイロードを産生するための遺伝子は、細胞もしくは組織損傷が存在する環境において活性化される細胞損傷依存性プロモーター、例えば、活性酸素種または ROS プロモーターの制御下で発現する。

20

【0242】

本明細書で使用する場合、「活性酸素種」および「ROS」は、同義で用いられ、分子状酸素に由来する高度に活性な分子、イオンおよび/またはラジカルを意味する。ROS は、好氣的呼吸または金属触媒酸化の副産物として産生され、酸化的損傷などの有害な細胞効果をもたらす。ROS は、過酸化水素 (H_2O_2)、有機過酸化物 ($ROOH$)、ヒドロキシルイオン (OH^-)、ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$)、スーパーオキシドまたはスーパーオキシドアニオン ($\cdot O_2^-$)、一重項酸素 ($1O_2$)、オゾン (O_3)、炭酸ラジカル、過酸化物またはペルオキシラジカル ($\cdot O_2-2$)、次亜塩素酸 ($HOCl$)、次亜塩素酸イオン (OCl^-)、次亜塩素酸ナトリウム ($NaOCl$)、酸化窒素 ($NO\cdot$) およびペルオキシ亜硝酸またはペルオキシ亜硝酸アニオン ($ONOO^-$) を含むが、これらに限定されない（対電子を \cdot により示す）。細菌は、ROS レベルを感知することができる転写因子を発達させた。異なる ROS シグナル伝達経路は、異なる ROS レベルによって誘発され、異なる速度論で発生する (Marinhoら、2014年)。

30

【0243】

本明細書で使用する場合、「ROS 誘導性調節領域」は、1つまたは複数の ROS 感知転写因子が結合することができ、対応する転写因子の結合および/または活性化が下流の遺伝子発現を活性化し、核酸配列を意味し、ROS の存在下で、転写因子は、調節領域に結合し、かつ/またはそれを活性化し、その後、ROS 誘導性調節領域に結合し、それにより、下流の遺伝子発現を活性化する。代替実施形態では、転写因子は、ROS の非存在下で ROS 誘導性調節領域に結合し、ROS の存在下では、転写因子は、立体配座の変化を受け、それにより、下流の遺伝子発現を活性化する。ROS 誘導性調節領域は、遺伝子配列または遺伝子配列、例えば、1つもしくは複数のペイロードをコードする1つまたは複数の遺伝子配列に作動可能に連結することができる。例えば、ROS の存在下で、転写因子、例えば、OxyR は、ROS を感知し、対応する ROS 誘導性調節領域を活性化し、それにより、1つまたは複数の作動可能に連結した遺伝子配列の発現を駆動する。このように、ROS は、1つまたは複数

40

50

の遺伝子の発現を誘導する。

【0244】

本明細書で使用する場合、「ROS抑制解除調節領域」は、1つまたは複数のROS感知転写因子が結合することができ、対応する転写因子の結合が下流の遺伝子発現を抑制する、核酸配列を意味し、ROSの存在下では、転写因子は、調節領域に結合せず、抑制しない。いくつかの実施形態では、ROS抑制解除調節領域は、プロモーター配列を含む。ROS抑制解除調節領域は、1つまたは複数の遺伝子、例えば、1つもしくは複数のペイロード（複数可）をコードする1つまたは複数の遺伝子に作動可能に連結することができる。例えば、ROSの存在下で、転写因子、例えば、OhrRは、ROSを感知し、もはや調節領域に結合し、かつ/または抑制することをせず、それにより、作動可能に連結した遺伝子配列または遺伝子カセットを活性化する。このように、ROSは、遺伝子または遺伝子カセットの発現を活性化する。

10

【0245】

本明細書で使用する場合、「ROS抑制性調節領域」は、1つまたは複数のROS感知転写因子が結合することができ、対応する転写因子の結合が下流の遺伝子発現を抑制する、核酸配列を意味し、ROSの存在下では、転写因子は、調節領域に結合し、抑制する。いくつかの実施形態では、ROS抑制性調節領域は、プロモーター配列を含む。いくつかの実施形態では、ROSを感知する転写因子は、プロモーター配列の一部と重複する調節領域に結合することができる。代替実施形態では、ROSを感知する転写因子は、プロモーター配列の上流または下流である調節領域に結合することができる。ROS抑制性調節領域は、1つまたは複数の遺伝子配列に作動可能に連結することができる。例えば、ROSの存在下では、転写因子、例えば、PerRは、ROSを感知し、対応するROS抑制性調節領域に結合し、それにより、1つまたは複数の作動可能に連結した遺伝子配列の発現を阻止する。このように、ROSは、1つまたは複数の遺伝子の発現を抑制する。

20

【0246】

本明細書で使用する場合、「ROS応答性調節領域」は、ROS誘導性調節領域、ROS抑制性調節領域および/またはROS抑制解除調節領域を意味する。いくつかの実施形態では、ROS応答性調節領域は、プロモーター配列を含む。各調節領域は、少なくとも1つの対応するROS感知転写因子に結合することができる。ROSを感知する転写因子ならびにそれらの対応するROS応答性遺伝子、プロモーターおよび/または調節領域の例は、表Bに示すものを含むが、それらに限定されない。

30

【0247】

【表 B】

表 B. ROS 感知転写因子および ROS 応答性遺伝子の例

ROS 感知転写因子	主として以下を感知することができる	応答性遺伝子、プロモーターおよび／または調節領域の例	
OxyR	H ₂ O ₂	<i>ahpC; ahpF; dps; dsbG; fhuF; flu; fur; gor; grxA; hemH; katG; oxyS; sufA; sufB; sufC; sufD; sufE; sufS; trxC; uxuA; yaaA; yaeH; yaiA; ybjM; ydcH; ydeN; ygaQ; yljA; ytfK</i>	10
PerR	H ₂ O ₂	<i>kata; ahpCF; mrgA; zoaA; fur; hemAXCDBL; srfA</i>	
OhrR	有機過酸化物質 NaOCl	<i>ohrA</i>	
SoxR	•O ₂ ⁻ NO• (H ₂ O ₂ も感知することができる)	<i>soxS</i>	20
RosR	H ₂ O ₂	<i>rbtT; tnp16a; rluC1; tnp5a; mscL; tnp2d; phoD; tnp15b; pstA; tnp5b; xylC; gabD1; rluC2; cgtS9; azlC; narKGHJI; rosR</i>	

【0248】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、少なくとも1つの活性酸素種を感知することができる転写因子に直接的または間接的に制御される調節可能な調節領域を含む。調節可能な調節領域は、ペイロードの発現を直接的または間接的に駆動することができる遺伝子または遺伝子カセットに作動可能に連結し、ひいてはROSレベルに対してペイロードの発現を制御する。例えば、調節可能な調節領域は、ROS誘導性調節領域であり、分子は、ペイロードであり、例えば、炎症組織にROSが存在する場合、ROS感知転写因子は、調節領域に結合し、かつ／または活性化し、ペイロードの遺伝子配列の発現を駆動し、それにより、ペイロードを生成する。その後、炎症が改善された場合、ROSレベルが低下し、ペイロードの産生が減少または消失する。

30

【0249】

いくつかの実施形態では、調節可能な調節領域は、ROS誘導性調節領域であり、ROSの存在下で、転写因子は、ROSを感知し、ROS誘導性調節領域を活性化し、それにより、作動可能に連結した遺伝子または遺伝子カセットの発現を駆動する。いくつかの実施形態では、転写因子は、ROSを感知し、その後、ROS誘導性調節領域に結合し、それにより、下流の遺伝子発現を活性化する。代替実施形態では、転写因子をROSの非存在下でROS誘導性調節領域に結合させ、転写因子がROSを感知するとき、それは、立体配座の変化を受け、それにより、下流の遺伝子発現を誘導する。

40

【0250】

いくつかの実施形態では、調節可能な調節領域は、ROS誘導性調節領域であり、ROSを感知する転写因子は、OxyRである。OxyRは、「過酸化物質ストレス反応のグローバルな調節因子として主として機能し」、多くの遺伝子、例えば、「H₂O₂の解毒 (katE、ahpCF)、ヘム生合成 (hemH)、還元剤供給 (grxA、gor、t

50

r x C)、チオール - ジスルフィド異性化 (d s b G)、F e - S 中心修復 (s u f A - E、s u f S)、鉄結合 (y a a A)、鉄移入システムの抑制 (f u r) に関与する遺伝子」および「小調節RNAであるO x y S」(D u b b s ら、2012年)を調節することができる。遺伝子操作細菌は、O x y R によって活性化される遺伝子の適切なROS 応答性調節領域を含み得る。O x y R による活性化を受けることができる遺伝子は、当技術分野で公知である(例えば、Z h e n g ら、2001年; D u b b s ら、2012年参照)。特定の実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、遺伝子、例えば、ペイロード遺伝子に作動可能に連結するo x y S のROS 誘導性調節領域を含む。ROS、例えば、H₂O₂ の存在下で、O x y R 転写因子は、ROS を感知し、o x y S 調節領域を活性化し、それにより、作動可能に連結したペイロード遺伝子の発現を駆動し、ペイロードを生成する。いくつかの実施形態では、O x y R は、大腸菌o x y R 遺伝子によりコードされる。いくつかの実施形態では、o x y S 調節領域は、大腸菌o x y S 調節領域である。いくつかの実施形態では、ROS 誘導性調節領域は、k a t G、d p s およびa h p C の調節領域から選択される。

10

【0251】

代替実施形態では、調節可能な調節領域は、ROS 誘導性調節領域であり、ROS を感知する対応する転写因子は、S o x R である。S o x R が「その[2 F e - 2 S] クラスターの酸化によって活性化される場合、それがS o x S の合成を増加させ、これがその標的遺伝子発現を活性化する」(K o o ら、2003年)。「S o x R は、スーパーオキシドおよび酸化窒素に主として応答することが公知であり」(K o o ら、2003年)、H₂O₂ に応答することもできる。本発明の遺伝子操作細菌は、S o x R により活性化される遺伝子の任意の適切なROS 応答性調節領域を含み得る。S o x R による活性化を受けることができる遺伝子は、当技術分野で公知である(例えば、K o o ら、2003年参照)。特定の実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、遺伝子、例えば、ペイロードに作動可能に連結しているs o x S のROS 誘導性調節領域を含む。ROS の存在下で、S o x R 転写因子は、ROS を感知し、s o x S 調節領域を活性化し、それにより、作動可能に連結したペイロード遺伝子の発現を駆動し、ペイロードを生成する。

20

【0252】

いくつかの実施形態では、調節可能な調節領域は、ROS 抑制解除調節領域であり、対応する転写因子の結合が下流の遺伝子発現を抑制するものであり、ROS の存在下では、転写因子は、調節領域にもはや結合せず、それにより、作動可能に連結した遺伝子または遺伝子カセットを活性化する。

30

【0253】

いくつかの実施形態では、調節可能な調節領域は、ROS 抑制解除調節領域であり、ROS を感知する転写因子は、O h r R である。O h r R は、「o h r A プロモーター部位と重複する逆方向反復DNA 配列の対に結合し、それにより、転写イベントを抑制する」が、酸化O h r R は、「そのDNA 標的に結合することが不可能である」(D u a r t e ら、2010年)。O h r R は、「有機過酸化物質およびN a O C l の両方を感知する転写リプレッサーであり」(D u b b s ら、2012年)、「H₂O₂ により弱く活性化されるが、有機ヒドロペルオキシドに対するはるかに高い反応性を示す」(D u a r t e ら、2010年)。本発明の遺伝子操作細菌は、O h r R により抑制される遺伝子の任意の適切なROS 応答性調節領域を含み得る。O h r R による抑制を受けることができる遺伝子は、当技術分野で公知である(例えば、D u b b s ら、2012年参照)。特定の実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、遺伝子または遺伝子カセット、例えば、ペイロード遺伝子に作動可能に連結されているo h r A のROS 抑制解除調節領域を含む。ROS、例えば、N a O C l の存在下で、O h r R 転写因子は、ROS を感知し、o h r A 調節領域にもはや結合せず、それにより、作動可能に連結したペイロード遺伝子を活性化し、ペイロードを生成する。

40

【0254】

O h r R は、ROS 応答性調節因子のM a r R ファミリーのメンバーである。「M a r

50

Rファミリーの大部分のメンバーは、転写リプレッサーであり、プロモーターにおける - 10または - 35領域にしばしば結合し、RNAポリメラーゼの結合の立体障害をもたらす」(Busmannら、2010年)。このファミリーの他のメンバーは、当技術分野で公知であり、OspR、MgrA、RosRおよびSarZを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ROSを感知する転写因子は、OspR、MgrA、RosRおよび/またはSarZであり、本発明の遺伝子操作細菌は、OspR、MgrA、RosRおよび/またはSarZにより抑制される遺伝子の1つまたは複数の対応する調節領域配列を含む。OspR、MgrA、RosRおよび/またはSarZによる抑制を受けることができる遺伝子は、当技術分野で公知である(例えば、Dubbsら、2012年参照)。

10

【0255】

いくつかの実施形態では、調節可能な調節領域は、ROS抑制解除調節領域であり、ROSを感知する対応する転写因子は、RosRである。RosRは、「共通配列TTGTTGAYRYRTCAACWAを有する18bp逆方向反復配列」に結合する「MarR型転写調節因子」であり、「酸化剤H₂O₂により可逆的に阻害される」(Busmannら、2010年)。RosRは、「推定ポリソプレノイド結合タンパク質(cg1322、rosRの上流で、異なる遺伝子)、感覚ヒスチジンキナーゼ(cgtS9)、Crp/FNRファミリーの推定転写調節因子(cg3291)、グルタチオンS-トランフェラーゼファミリーのタンパク質(cg1426)、2つの推定FMNレダクターゼ(cg1150およびcg1850)ならびに4つの推定モノオキシゲナーゼ(cg0823、cg1848、cg2329およびcg3084)」を含むが、これらに限定されない、多くの遺伝子および推定遺伝子を抑制することができる(Busmannら、2010年)。本発明の遺伝子操作細菌は、RosRにより抑制される遺伝子の任意の適切なROS応答性調節領域を含み得る。RosRによる抑制を受けることができる遺伝子は、当技術分野で公知である(例えば、Busmannら、2010年参照)。特定の実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、遺伝子または遺伝子カセット、例えば、ペイロードに作動可能に連結されているcgtS9のROS抑制解除調節領域を含む。ROS、例えば、H₂O₂の存在下で、RosR転写因子は、ROSを感知し、cgtS9調節領域にもはや結合せず、それにより、作動可能に連結したペイロード遺伝子を活性化し、ペイロードを生成する。

20

30

【0256】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌が、細菌におけるかなりの数の天然遺伝子の発現を調節しないROS感知転写因子を発現することは、有利である。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、転写因子が本発明の遺伝子操作細菌における調節配列に結合しない、細菌の異なる種、菌株または垂菌株に由来するROS感知転写因子を発現する。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、大腸菌であり、ROS感知転写因子は、例えば、コリネバクテリウム・グルタミクムに由来するRosRであり、大腸菌は、前記RosRに対する結合部位を含まない。いくつかの実施形態では、異種転写因子は、遺伝子操作細菌における内因性調節領域および遺伝子に対するオフターゲット効果を最小限にまたは排除する。

40

【0257】

いくつかの実施形態では、調節可能な調節領域は、ROS抑制性調節領域であり、対応する転写因子の結合が下流の遺伝子発現を抑制するものであり、ROSの存在下では、転写因子は、ROSを感知し、ROS抑制性調節領域に結合し、それにより、作動可能に連結した遺伝子または遺伝子カセットの発現を抑制する。いくつかの実施形態では、ROS感知転写因子は、プロモーター配列の一部と重複する調節領域に結合することができる。代替実施形態では、ROS感知転写因子は、プロモーター配列の上流または下流である調節領域に結合することができる。

【0258】

いくつかの実施形態では、調節可能な調節領域は、ROS抑制解除調節領域であり、R

50

OSを感知する転写因子は、Per Rである。枯草菌では、Per Rは、「DNAに結合した場合、酸化ストレス応答（katA、ahpCおよびmrpA）、金属恒常性（hemAXCDBL、furおよびzoaA）ならびにそれ自体の合成（perR）に関するタンパク質をコードする遺伝子を抑制する」（Marinhoら、2014年）。Per Rは、「主としてH₂O₂に反応するグローバルな調節因子であり」（Dubbsら、2012年）、「Per R制御遺伝子のプロモーター配列内および近くに存在する特定の回文構造共通配列（TTATAATNATTAATA）である、perボックスにおけるDNAと相互作用する」（Marinhoら、2014年）。Per Rは、「プロモーターの一部と重複するかまたはそのすぐ下流にある」調節領域に結合することができる（Dubbsら、2012年）。本発明の遺伝子操作細菌は、Per Rにより抑制される遺伝子の任意の適切なROS応答性調節領域を含み得る。Per Rによる抑制を受けることができる遺伝子は、当技術分野で公知である（例えば、Dubbsら、2012年参照）。

【0259】

これらの実施形態では、遺伝子操作細菌は、ペイロードを発現するために用いられる、2つのリプレッサー活性化調節回路を含み得る。2つのリプレッサー活性化調節回路は、第1のROS感知リプレッサー、例えば、Per R、および第2のリプレッサー、例えば、遺伝子または遺伝子カセット、例えば、ペイロードに作動可能に連結されている、Tet Rを含む。これらの実施形態の一態様では、ROS感知リプレッサーは、遺伝子または遺伝子カセットの転写を抑制する、第2のリプレッサーの転写を抑制する。これらの実施形態において有用な第2のリプレッサーの例は、Tet R、C1およびLex Aを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ROS感知リプレッサーは、Per Rである。いくつかの実施形態では、第2のリプレッサーは、Tet Rである。この実施形態では、Per R抑制性調節領域は、Tet Rの発現を駆動し、Tet R抑制性調節領域は、遺伝子または遺伝子カセット、例えば、ペイロードの発現を駆動する。Per R結合の非存在（ROSの非存在下で起こる）下では、tet Rが転写され、Tet Rが遺伝子または遺伝子カセット、例えば、ペイロードの発現を抑制する。Per R結合の存在（ROSの存在下で起こる）下では、tet Rの発現が抑制され、遺伝子または遺伝子カセット、例えば、ペイロードが発現する。

【0260】

ROS応答性転写因子は、遺伝子操作細菌において用いられる調節領域配列によって遺伝子発現を誘導、活性化または抑制し得る。例えば、「Oxy Rは、酸化条件下では主として転写活性化因子として考えられているが、Oxy Rは、酸化および還元の下でリプレッサーまたは活性化因子として機能することができ」（Dubbsら、2012年）、Oxy Rは、「それ自体のリプレッサーならびにfluF（第二鉄イオンレダクターゼをコードする）およびflu（抗原43外膜タンパク質をコードする）のそれであることが示された」（Zhengら、2001年）。本発明の遺伝子操作細菌は、Oxy Rにより抑制される遺伝子の任意の適切なROS応答性調節領域を含み得る。いくつかの実施形態では、Oxy Rは、上述のように、2つのリプレッサー活性化調節回路に用いられる。Oxy Rによる抑制を受けることができる遺伝子は、当技術分野で公知である（例えば、Zhengら、2001年参照）。または、例えば、Ros Rは、多くの遺伝子を抑制することができるが、それは、特定の遺伝子、例えば、narKGHJIオペロンを活性化することもできる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、Ros Rにより活性化される遺伝子の任意の適切なROS応答性調節領域を含む。さらに、「Per R媒介性の正の調節も認められ、遠隔上流部位へのPer Rの結合に関係すると思われる」（Dubbsら、2012年）。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、Per Rにより活性化される遺伝子の任意の適切なROS応答性調節領域を含む。

【0261】

1つまたは複数の種類のROS感知転写因子および対応する調節領域配列が遺伝子操作細菌に存在し得る。例えば、「Ohr Rは、グラム陽性およびグラム陰性細菌に認められ、Oxy RもしくはPer Rまたは両方と共存し得る」（Dubbsら、2012年）。い

10

20

30

40

50

くつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、1種類のROS感知転写因子、例えば、OxyR、および例えば、oxySに由来する1つの対応する調節領域配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、1種類のROS感知転写因子、例えば、OxyR、ならびに例えば、oxySおよびkatGに由来する2つまたはそれ以上の異なる対応する調節領域配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、2またはそれ以上の種類のROS感知転写因子、例えば、OxyRおよびPerR、ならびに例えば、oxySおよびkatAに由来する2つまたはそれ以上の対応する調節領域配列を含む。1つのROS応答性調節領域は、複数の転写因子に結合し得る。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、2またはそれ以上の種類のROS感知転写因子、および1つの対応する調節領域配列を含む。

10

【0262】

いくつかの例示的なOxyRにより調節される調節領域の核酸配列を表Cに示す。OxyR結合部位は、下線付きの太字である。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号63、64、65もしくは66のDNA配列またはその機能性断片と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%相同である核酸配列を含む。

【0263】

【表C】

表C. 例示的なOxyRにより調節される調節領域のヌクレオチド配列

20

調節配列	配列
<i>katG</i> (配列番号63)	TGTGGCTTTTATGAAAATCACACAGTGATCACAAATTTTAAACA GAGCACAAAATGCTGCCTCGAAATGAGGGCGGGAAAATAAGGT TATCAGCCTTGTTTTCTCCCTCATTACTTGAAGGATATGAAGCTA AAACCCTTTTTTATAAAGCATTGTCCGAATTCGGACATAATCA AAAAAGCTTAATTAAGATCAATTTGATCTACATCTCTTTAACCA ACAATATGTAAGATCTCAACTATCGCATCCGTGGATTAATTC <u>AATTATAACTTCTCTTAACGCTGTGTATCGTAACGGTAACACT</u> GTAGAGGGGAGCACATTGATGCGAATTCATTAAGAGGAGAAA GGTACC
<i>dps</i> (配列番号64)	TTCCGAAAATTCCTGGCGAGCAGATAAATAAGAATTGTTCTTAT CAATATATCTAACTCATTGAATCTTTATTAGTTTTGTTTTTCAGG <u>CTTGTTACCACTATTAGTGTGATAGGAACAGCCAGAAATAGCG</u> GAACACATAGCCGGTGCTATACTTAATCTCGTTAATTACTGGGA CATAACATCAAGAGGATATGAAATTCGAATTCATTAAGAGGA GAAAGGTACC
<i>ahpC</i> (配列番号65)	GCTTAGATCAGGTGATTGCCCTTTGTTTATGAGGGTGTGTGTAATC CATGTCGTTGTTGCATTTGTAAGGGCAACACCTCAGCCTGCAGG CAGGCACTGAAGATACCAAAGGGTAGTTCAGATTACACGGTCA CCTGGAAAGGGGGCCATTTACTTTTTATCGCCGCTGGCGGTGC AAAGTTCACAAAGTTGTCTTACGAAGGTTGTAAGGTAAAACCTT <u>ATCGATTTGATAATGGAAACGCATTAGCCGAATCGGCAAAAAT</u> TGGTTACCTTACATCTCATCGAAAACACGGAGGAAGTATAGATG CGAATTCATTAAGAGGAGAAAGGTACC
<i>oxyS</i> (配列番号66)	CTCGAGTTCATTATCCATCCTCCATCGCCACGATAGTTCATGGC <u>GATAGGTAGAATAGCAATGAACGATTATCCCTATCAAGCATTC</u> TGACTGATAATTGCTCACACGAATTCATTAAGAGGAGAAAGGT ACC

30

40

50

【0264】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、ROS感知転写因子をコードする遺伝子、例えば、その天然プロモーターにより制御されるoxyR遺伝子、誘導性プロモーター、天然プロモーターより強いプロモーター、例えば、GlnRSプロモーターもしくはP(Bla)プロモーター、または構成的プロモーターを含む。いくつかの例では、発現安定性を向上させるために誘導性プロモーターの制御下のROS感知転写因子を発現させることは、有利であり得る。いくつかの実施形態では、ROS感知転写因子の発現は、治療用分子の発現を制御するプロモーターと異なるプロモーターにより制御される。いくつかの実施形態では、ROS感知転写因子の発現は、治療用分子の発現を制御する同じプロモーターにより制御される。いくつかの実施形態では、ROS感知転写調節因子および治療用分子は、プロモーター領域から分岐して転写される。

10

【0265】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、細菌の異なる種、菌株または亜菌株に由来するROS感知転写因子の遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、細菌の異なる種、菌株または亜菌株に由来するROS応答性調節領域を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、細菌の異なる種、菌株または亜菌株に由来するROS感知転写因子および対応するROS応答性調節領域を含む。異種ROS感知転写因子および調節領域は、同じ条件下の同じ亜型の細菌に由来する天然転写因子および調節領域と比較して、ROSの存在下で前記調節領域に作動可能に連結した遺伝子の転写を増加させ得る。

20

【0266】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、ROS感知転写因子OxyR、および大腸菌に由来する対応する調節領域oxySを含む。いくつかの実施形態では、天然ROS感知転写因子、例えば、OxyRは、完全なままであり、野生型活性を保持している。代替実施形態では、天然ROS感知転写因子、例えば、OxyRは、野生型活性を低減または消失させるために欠失または突然変異させる。

【0267】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、ROS感知転写因子をコードする内因性遺伝子、例えば、oxyR遺伝子の複数のコピーを含む。いくつかの実施形態では、ROS感知転写因子をコードする遺伝子は、プラスミド上に存在する。いくつかの実施形態では、ROS感知転写因子をコードする遺伝子および治療用分子を産生するための遺伝子または遺伝子カセットは、異なるプラスミド上に存在する。いくつかの実施形態では、ROS感知転写因子をコードする遺伝子および治療用分子を産生するための遺伝子または遺伝子カセットは、同じプラスミド上に存在する。いくつかの実施形態では、ROS感知転写因子をコードする遺伝子は、染色体上に存在する。いくつかの実施形態では、ROS感知転写因子をコードする遺伝子および治療用分子を産生するための遺伝子または遺伝子カセットは、異なる染色体上に存在する。いくつかの実施形態では、ROS感知転写因子をコードする遺伝子および治療用分子を産生するための遺伝子または遺伝子カセットは、同じ染色体上に存在する。

30

【0268】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、ROS感知転写因子をコードする野生型遺伝子、例えば、soxR遺伝子、同じ亜型の細菌の野生型調節領域と比べて突然変異している、対応する調節領域、例えば、soxS調節領域を含む。突然変異調節領域は、同じ条件下の野生型調節領域と比較して、ROSの存在下でペイロードの発現を増加させる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、野生型ROS応答性調節領域、例えば、oxyS調節領域、および同じ亜型の細菌の野生型転写因子と比べて突然変異している、対応する転写因子、例えば、OxyRを含む。突然変異転写因子は、同じ条件下の野生型転写因子と比較して、ROSの存在下でペイロードの発現を増加させる。いくつかの実施形態では、ROSの存在下でのペイロードの発現を増加させるために、ROS感知転写因子および対応する調節領域の両方を同じ亜型の細菌の野生型配列と比べて突然変異させる

40

50

。

【0269】

いくつかの実施形態では、ペイロードを産生するための遺伝子または遺伝子カセットは、プラスミド上に存在し、ROSにより誘導されるプロモーターに作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、ペイロードを産生するための遺伝子または遺伝子カセットは、染色体上に存在し、ROSにより誘導されるプロモーターに作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、ペイロードを産生するための遺伝子または遺伝子カセットは、染色体上に存在し、テトラサイクリンへの曝露により誘導されるプロモーターに作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、ペイロードを産生するための遺伝子または遺伝子カセットは、プラスミド上に存在し、テトラサイクリンへの曝露により誘導されるプロモーターに作動可能に連結する。いくつかの実施形態では、当技術分野で公知の方法により、例えば、リボソーム結合部位を最適化し、転写調節因子を操作し、かつ/またはmRNAの安定性を増大させることにより、発現をさらに最適化する。

10

【0270】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、ペイロード（複数可）を産生することができる遺伝子（複数可）の複数のコピーを含み得る。いくつかの実施形態では、ペイロード（複数可）を産生することができる遺伝子（複数可）は、プラスミド上に存在し、ROS応答性調節領域に作動可能に連結している。いくつかの実施形態では、ペイロードを産生することができる遺伝子（複数可）は、染色体上に存在し、ROS応答性調節領域に作動可能に連結している。

20

【0271】

このように、いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌または遺伝子操作ウイルスは、酸素レベル依存性プロモーター、活性酸素種（ROS）依存性プロモーターまたは活性酸素種（RNS）依存性プロモーターおよび対応する転写因子の制御下で1つまたは複数のペイロードを産生する。

【0272】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、ペイロードを宿主細胞中で発現させることができ、宿主細胞が*in vitro*で、例えば、培地中で、かつ/または*in vivo*で生存し、かつ/または増殖することができるように、ペイロードを産生するための遺伝子を有する安定に維持されたプラスミドまたは染色体を含む。いくつかの実施形態では、細菌は、ペイロードをコードする遺伝子の複数のコピーを含み得る。いくつかの実施形態では、ペイロードをコードする遺伝子を低コピープラスミド上で発現させる。いくつかの実施形態では、低コピープラスミドは、発現の安定性を増大させるのに有用であり得る。いくつかの実施形態では、低コピープラスミドは、非誘導性条件下で漏出性発現を減少させるのに有用であり得る。いくつかの実施形態では、ペイロードをコードする遺伝子を高コピープラスミド上で発現させる。いくつかの実施形態では、高コピープラスミドは、ペイロードの発現を増加させるのに有用であり得る。いくつかの実施形態では、ペイロードをコードする遺伝子を染色体上で発現させる。

30

【0273】

いくつかの実施形態では、細菌に、複数の作用機構（MOAs）、例えば、同じ産物の複数のコピーを産生する回路（例えば、コピー数を増加させるため）または複数の異なる機能を果たす回路を含むように遺伝子操作を施す。例えば、遺伝子操作細菌は、4つの異なる挿入部位に挿入された特定のペイロードをコードする遺伝子の4つのコピーを含み得る。あるいは、遺伝子操作細菌は、3つの異なる挿入部位に挿入された特定のペイロードをコードする遺伝子の3つのコピーおよび3つの異なる挿入部位に挿入された異なるペイロードをコードする遺伝子の3つのコピーを含み得る。

40

【0274】

いくつかの実施形態では、ペイロードが発現する条件下で、本開示の遺伝子操作細菌は、同じ条件下の同じ亜型の非改変細菌と比較して少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約10倍、少なくとも約15倍、少なくとも約20倍、少なくとも約30

50

倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍、少なくとも約600倍、少なくとも約700倍、少なくとも約800倍、少なくとも約900倍、少なくとも約1000倍、または少なくとも約1500倍のペイロード、および/またはオペロンにおける遺伝子(複数可)の転写物を産生する。

【0275】

いくつかの実施形態では、定量的PCR(qPCR)を用いて、ペイロード遺伝子(複数可)のmRNA発現レベルを増幅し、検出し、かつ/または定量する。ペイロード遺伝子(複数可)に固有のプライマーは、当技術分野で公知の方法により設計し、試料中のmRNAを検出するために用いることができる。いくつかの実施形態では、ペイロードmRNAを含む可能性がある試料反応混合物に発蛍光団を加え、サーマルサイクラーを用いて、試料反応混合物に特定の波長の光を照射し、その後の発蛍光団による発光を検出する。反応混合物を所定の温度に所定の時間にわたり加熱し、冷却する。特定の実施形態では、加熱および冷却を所定のサイクル数繰り返す。いくつかの実施形態では、反応混合物を90~100、60~70 および30~50 に所定のサイクル回数にわたり加熱し、冷却する。特定の実施形態では、反応混合物を93~97、55~65 および35~45 に所定のサイクル回数にわたり加熱し、冷却する。いくつかの実施形態では、蓄積しつつあるアンプリコンをqPCRの各サイクルの後に定量する。蛍光が閾値を超えるサイクルの数は、閾値サイクル(C_T)である。各試料について少なくとも1つのC_T結果を発生させ、C_T結果(複数可)を用いて、ペイロード遺伝子(複数可)のmRNA発現レベルを決定することができる。

【0276】

いくつかの実施形態では、定量的PCR(qPCR)を用いて、ペイロード遺伝子(複数可)のmRNA発現レベルを増幅し、検出し、かつ/または定量する。ペイロード遺伝子(複数可)に固有のプライマーは、当技術分野で公知の方法により設計し、試料中のmRNAを検出するために用いることができる。いくつかの実施形態では、ペイロードmRNAを含む可能性がある試料反応混合物に発蛍光団を加え、サーマルサイクラーを用いて、試料反応混合物に特定の波長の光を照射し、その後の発蛍光団による発光を検出する。反応混合物を所定の温度に所定の時間にわたり加熱し、冷却する。特定の実施形態では、加熱および冷却を所定のサイクル数繰り返す。いくつかの実施形態では、反応混合物を90~100、60~70 および30~50 に所定のサイクル回数にわたり加熱し、冷却する。特定の実施形態では、反応混合物を93~97、55~65 および35~45 に所定のサイクル回数にわたり加熱し、冷却する。いくつかの実施形態では、蓄積しつつあるアンプリコンをqPCRの各サイクルの後に定量する。蛍光が閾値を超えるサイクルの数は、閾値サイクル(C_T)である。各試料について少なくとも1つのC_T結果を発生させ、C_T結果(複数可)を用いて、ペイロード遺伝子(複数可)のmRNA発現レベルを決定することができる。

【0277】

複数の作用機構

いくつかの実施形態では、細菌に、複数の作用機構(MOAs)、例えば、同じ産物の複数のコピーを産生する回路または複数の異なる機能を果たす回路を含むように遺伝子操作を施す。挿入部位の例は、malE/K、insB/I、araC/BAD、lacZ、dapA、ceaおよび図18に示すその他を含むが、これらに限定されない。例えば、遺伝子操作細菌は、4つの異なる挿入部位、例えば、malE/K、insB/I、araC/BADおよびlacZに挿入されたargA^{fbr}の4つのコピーを含み得る。あるいは、遺伝子操作細菌は、3つの異なる挿入部位、例えば、malE/K、insB/IおよびlacZに挿入されたargA^{fbr}の3つのコピーならびに3つの異なる挿入部位dapA、ceaおよびaraC/BADに挿入された、3つの突然変異アルギニンレギュロン、例えば、シトルリンを産生する2つおよびアルギニンを産生する1つを含み得る。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、1つまたは複数の異なる挿入部位

に挿入された1つまたは複数のアンモニア変換回路および1つまたは複数の他の挿入部位に挿入された1つまたは複数の追加の回路を含み得る。例えば、遺伝子操作細菌は、1つもしくは複数の異なる挿入部位に挿入された $argA^{fbr}$ の1つもしくは複数のコピー（および/または他のアンモニア変換回路（複数可））、ならびに他の挿入部位における1つもしくは複数の消化管バリア増強回路、例えば、1つもしくは複数の酪酸産生回路（または他の消化管バリア増強回路（複数可））を含み得る。他の例示的实施形態では、遺伝子操作細菌は、1つもしくは複数の異なる挿入部位に挿入された $argA^{fbr}$ の1つもしくは複数のコピー（および/または他のアンモニア変換回路（複数可））、ならびに他の挿入部位に挿入された、1つもしくは複数の $GABA$ 低減回路、例えば、 $GABA$ 輸送および/または $GABA$ 代謝回路（複数可））を含み得る。他の例示的实施形態では、遺伝子操作細菌は、1つもしくは複数の異なる挿入部位に挿入された $argA^{fbr}$ の1つもしくは複数のコピー（および/または他のアンモニア変換回路（複数可））、ならびに他の挿入部位に挿入された1つもしくは複数のマンガン輸送回路（図47A）を含み得る。いくつかの実施形態では、1つもしくは複数のアンモニア変換回路（例えば、 $argA^{fbr}$ および/または他のアンモニア変換回路（複数可））、1つもしくは複数の消化管バリア増強回路（例えば、酪酸、プロピオン酸、酢酸生合成回路（複数可））、1つもしくは複数の $GABA$ 低減回路（例えば、 $GABA$ 輸送および/または $GABA$ 代謝回路）、ならびに1つもしくは複数のマンガン輸送回路が4つまたはそれ以上の異なる染色体挿入部位に挿入されている（例えば、図45）。いくつかの実施形態では、アンモニア変換回路、消化管バリア増強回路、 $GABA$ 輸送および/または $GABA$ 代謝回路が3つの異なる染色体挿入部位に挿入されている。いくつかの実施形態では、アンモニア変換回路、 $GABA$ 輸送/ $GABA$ 代謝回路およびマンガン輸送回路が3つの異なる染色体挿入部位に挿入されている（図46B）。他の実施形態では、アンモニア変換回路およびマンガン輸送回路が2つの異なる染色体挿入部位に挿入されている（図47A）。他の実施形態では、アンモニア変換回路、ならびに $GABA$ 輸送および/または $GABA$ 代謝回路が2つの異なる染色体挿入部位に挿入されている。さらに他の実施形態では、アンモニア変換回路および消化管バリア増強回路が2つの異なる染色体挿入部位に挿入されている。さらに他の実施形態では、アンモニア変換回路およびマンガン低減回路が2つの異なる染色体挿入部位に挿入されている。

【0278】

表14に本開示の実施形態の非限定的な例を示す。

【0279】

10

20

30

【表 16 - 1】

表 14. 本開示の実施形態の非限定的な例

コード名	ARG ボックス	ArgR	argA ^{fb}	ThyA	抗生物質	その他
対照菌株						
SYN-UCD103	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	なし	野生型 ThyA	Strep	なし
SYN-UCD107	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	なし	野生型 ThyA	Kan	なし
ΔARG box						
SYN-UCD101	ΔARG ボックス	野生型 ArgR	なし	野生型 ThyA	なし	なし
SYN-UCD102	ΔARG ボックス	野生型 ArgR	低コピープラス ミド上テトラサイ クリン誘導性 argA ^{fb}	野生型 ThyA	Amp	なし
SYN-UCD104	ΔARG ボックス	野生型 ArgR	低コピープラス ミド上 (Amp) テトラサイ クリン誘導性 argA ^{fb}	野生型 ThyA	Amp, Cam	誘導性 ArgG
SYN-UCD105	ΔARG ボックス	野生型 ArgR	低コピープラス ミド上 (Amp) テトラサイ クリン誘導性 argA ^{fb}	野生型 ThyA	Amp	構成的に発現した argG (BBa_ J23100 構成的プロ モーター)
ΔArgR						
SYN-UCD106	野生型 ARG ボックス	ΔArgR	なし	ΔThyA	Cam	なし
SYN-UCD201/ SYN-UCD312	野生型 ARG ボックス	ΔArgR	なし	野生型 ThyA	なし	なし
SYN-UCD202	野生型 ARG ボックス	ΔArgR	高コピープラス ミド上 (Amp) テトラサイ クリン誘導性 argA ^{fb}	野生型 ThyA	Amp	なし

10

20

30

40

【表 16 - 2】

SYN-UCD203 f b r	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	低コピープラス ミド上 (Amp) テトラサイ クリン誘導性 a r g A f b r	野生型 ThyA	Amp	なし
SYN-UCD204	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	低コピープラス ミド上 (Amp) tet-ArgAfb r	野生型 ThyA	Amp	なし
SYN-UCD205	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	低コピープラス ミド上 (Amp) PfnrS- ArgAfb r	野生型 ThyA	Amp	なし
SYN-UCD206	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	低コピープラス ミド上 (Amp) PfnrS- ArgAfb r	Δ ThyA	Amp, Cam	なし
組み込まれた F N R S - a r g A f b r						
SYN-UCD301	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S - A r g A f b r	野生型 ThyA	Cam	なし
SYN-UCD302	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S - A r g A f b r	Δ ThyA	Cam	なし
SYN-UCD303	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S - A r g A f b r	Δ ThyA	Kan	なし
SYN-UCD305	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S - A r g A f b r	Δ ThyA	なし	なし
SYN-UCD304	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S - A r g A f b r	野生型 ThyA	なし	なし
SYN-UCD306	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S - A r g A f b r	野生型 ThyA	Kan	なし
SYN-UCD307	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた	Δ ThyA	Kan	なし

10

20

30

40

【表 16 - 3】

			P f n r S - A r g A f b r			
SYN-UCD308	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S - A r g A f b r	Δ ThyA	なし	なし
SYN-UCD309	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S - A r g A f b r	野生型 ThyA	Kan	なし
SYN-UCD310	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S - A r g A f b r	野生型 ThyA	なし	なし
SYN-UCD311	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	野生型 ThyA	Kan	なし
SYN-UCD312/ SYN-UCD201	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	野生型 ThyA	なし	なし
SYN-UCD313	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	Δ ThyA	Kan	なし
SYN-UCD314	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	Δ ThyA	なし	なし
リファキシミン耐性						
SYN-UCD403	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S - A r g A f b r	Δ ThyA	Kan	リファキシミン 耐性
SYN-UCD405	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S - A r g A f b r	Δ ThyA	なし	リファキシミン 耐性
SYN-UCD404	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S - A r g A f b r	野生型 ThyA	なし	リファキシミン 耐性
SYN-UCD406	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S - A r g A f b r	野生型 ThyA	Kan	リファキシミン 耐性

10

20

30

40

【表 16 - 4】

SYN-UCD407	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた PfnrS- ArgAfb r	Δ ThyA	Kan	リファキシミン 耐性	10	
SYN-UCD408	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた PfnrS- ArgAfb r	Δ ThyA	なし	リファキシミン 耐性		
SYN-UCD409	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた PfnrS- ArgAfb r	野生型 ThyA	Kan	リファキシミン 耐性		
SYN-UCD410	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた PfnrS- ArgAfb r	野生型 ThyA	なし	リファキシミン 耐性		
SYN-UCD411	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	野生型 ThyA	Kan	リファキシミン 耐性		20
SYN-UCD412	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	野生型 ThyA	なし	リファキシミン 耐性		
SYN-UCD413	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	Δ ThyA	Kan	リファキシミン 耐性		
SYN-UCD414	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	Δ ThyA	なし	リファキシミン 耐性		
酪酸回路								
SYN-UCD500	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	なし	野生型 ThyA	Amp	Logic156 (pSC101 PydfZ-Bcd 酪酸プラスミド; amp 耐性)	30	
SYN-UCD501	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	なし	野生型 ThyA	Amp	Logic156 (pSC101 PydfZ-ter 酪酸プラスミド; amp 耐性)		
SYN-UCD502	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	なし	野生型 ThyA	なし	染色体上に組み 込まれた PydfZ- ter 酪酸カセット		
SYN-UCD503	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	なし	野生型 ThyA	Amp	pLogic031 (プラスミド上 tet	40	

【表 16 - 5】

						プロモーターの制御下の <i>bdc2</i> 酪酸カセット)	
SYN-UCD504	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	なし	野生型 ThyA	なし	pLogic046 (プラスミド上 <i>tet</i> プロモーターの制御下の <i>ter</i> 酪酸カセット)	10
SYN-UCD505	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	なし	野生型 ThyA	Amp	pLOGIC046-delta, <i>pbt-buk/tesB+</i> (プラスミド上 <i>tet</i> プロモーターの制御下の <i>tesB</i> 酪酸カセット)	
SYN-UCD506	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	なし	野生型 ThyA	Amp	Logic156 (pSC101 <i>nirB-Bcd</i> 酪酸プラスミド; amp 耐性)	20
SYN-UCD507	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	なし	野生型 ThyA	Amp	pLogic031- <i>nsrR-norB</i> 構築物	
SYN-UCD508	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	なし	野生型 ThyA	Amp	pLogic046- <i>nsrR-norB</i> 構築物	
SYN-UCD509	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	なし	野生型 ThyA	Amp	FNR プロモーターの制御下の染色体に組み込まれた <i>tesB</i> 酪酸カセット	30
SYN-UCD510	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	なし	野生型 ThyA	なし	pLogic031 (プラスミド上 <i>tet</i> プロモーターの制御下の <i>pdc2</i> 酪酸カセット); <i>nuoB</i> 欠失	
SYN-UCD511	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	なし	野生型 ThyA	なし	pLogic046 (プラスミド上 <i>tet</i> プロモーターの制御下の <i>ter</i> 酪酸カセット); <i>nuoB</i> 欠失	40
酪酸およびアンモニウム回路							

【表 16 - 6】

SYN-UCD601	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbR	Δ ThyA	Amp	Logic156 (pSC101 PydfZ-ter 酪酸プラスミド; amp 耐性)	
SYN-UCD603	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbR	Δ ThyA	Kan	染色体上に組み込まれた PydfZ-ter 酪酸カセット	10
SYN-UCD605	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbR	Δ ThyA	なし	染色体上に組み込まれた PydfZ-ter 酪酸カセット	
SYN-UCD604	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbR	野生型 ThyA	なし	染色体上に組み込まれた PydfZ-ter 酪酸カセット	20
SYN-UCD606	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbR	野生型 ThyA	Kan	染色体上に組み込まれた PydfZ-ter 酪酸カセット	
SYN-UCD607	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbR	Δ ThyA	Kan	染色体上に組み込まれた PydfZ-ter 酪酸カセット	
SYN-UCD608	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbR	Δ ThyA	なし	染色体上に組み込まれた PydfZ-ter 酪酸カセット	30
SYN-UCD609	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbR	野生型 ThyA	Kan	染色体上に組み込まれた PydfZ-ter 酪酸カセット	
SYN-UCD610	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbR	野生型 ThyA	なし	染色体上に組み込まれた PydfZ-ter 酪酸カセット	40
SYN-UCD611	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	野生型 ThyA	Kan	染色体上に組み込まれた	

【表 16 - 7】

						Pyd f Z- t e r 酪酸カセット
SYN-UCD612	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	野生型 ThyA	なし	染色体上に組み 込まれた Pyd f Z- t e r 酪酸カセット
SYN-UCD613	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	Δ ThyA	Kan	染色体上に組み 込まれた Pyd f Z- t e r 酪酸カセット
SYN-UCD614	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	Δ ThyA	なし	染色体上に組み 込まれた Pyd f Z- t e r 酪酸カセット
SYN-UCD703	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S- A r g A f b r	Δ ThyA	Kan	染色体上に組み 込まれた Pyd f Z- t e r 酪酸カセット ; リファキシミン 耐性
SYN-UCD705	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S- A r g A f b r	Δ ThyA	なし	染色体上に組み 込まれた Pyd f Z- t e r 酪酸カセット ; リファキシミン 耐性
SYN-UCD704	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S- A r g A f b r	野生型 ThyA	なし	染色体上に組み 込まれた Pyd f Z- t e r 酪酸カセット ; リファキシミン 耐性
SYN-UCD706	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた P f n r S- A r g A f b r	野生型 ThyA	Kan	染色体上に組み 込まれた Pyd f Z- t e r 酪酸カセット ; リファキシミン 耐性
SYN-UCD707	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた	Δ ThyA	Kan	染色体上に組み 込まれた Pyd f Z- t e r 酪酸カセット ;

10

20

30

40

【表 16 - 8】

			PfnrS- ArgAfb r			リファキシミン 耐性	
SYN- UCD708	野生型ARG ボックス	野生型 ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた PfnrS- ArgAfb r	Δ ThyA	なし	染色体上に組み 込まれた Pyd f Z- ter 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	10
SYN- UCD709	野生型ARG ボックス	野生型 ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた PfnrS- ArgAfb r	野生型 ThyA	Kan	染色体上に組み 込まれた Pyd f Z- ter 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	
SYN- UCD710	野生型ARG ボックス	野生型 ArgR	ma l E K 遺伝子座 において染色体に 組み込まれた PfnrS- ArgAfb r	野生型 ThyA	なし	染色体上に組み 込まれた Pyd f Z- ter 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	20
SYN- UCD711	野生型ARG ボックス	Δ ArgR	なし	野生型 ThyA	Kan	染色体上に組み 込まれた Pyd f Z- ter 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	
SYN- UCD712	野生型ARG ボックス	Δ ArgR	なし	野生型 ThyA	なし	染色体上に組み 込まれた Pyd f Z- ter 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	30
SYN- UCD713	野生型ARG ボックス	Δ ArgR	なし	Δ ThyA	Kan	染色体上に組み 込まれた Pyd f Z- ter 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	
SYN- UCD714	野生型ARG ボックス	Δ ArgR	なし	Δ ThyA	なし	染色体上に組み 込まれた Pyd f Z- ter 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	40

【表 16 - 9】

SYN-UCD715	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbr	Δ ThyA	Kan	FNRプロモーターの制御下の染色体に組み込まれた tesB-酪酸カセット	
SYN-UCD716	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbr	Δ ThyA	なし	FNRプロモーターの制御下の染色体に組み込まれた tesB-酪酸カセット	10
SYN-UCD717	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbr	野生型 ThyA	なし	FNRプロモーターの制御下の染色体に組み込まれた tesB-酪酸カセット	
SYN-UCD718	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbr	野生型 ThyA	Kan	FNRプロモーターの制御下の染色体に組み込まれた tesB-酪酸カセット	20
SYN-UCD719	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbr	Δ ThyA	Kan	FNRプロモーターの制御下の染色体に組み込まれた tesB-酪酸カセット	
SYN-UCD720	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbr	Δ ThyA	なし	FNRプロモーターの制御下の染色体に組み込まれた tesB-酪酸カセット	30
SYN-UCD721	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbr	野生型 ThyA	Kan	FNRプロモーターの制御下の染色体に組み込まれた tesB-酪酸カセット	
SYN-UCD722	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK 遺伝子座において染色体に組み込まれた PfnrS-ArgAfbr	野生型 ThyA	なし	FNRプロモーターの制御下の染色体に組み込まれた tesB-酪酸カセット	40
SYN-UCD723	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	野生型 ThyA	Kan	FNRプロモーターの制御下の染色体に	

【表 16 - 10】

						組み込まれた tesB- 酪酸カセット	
SYN- UCD724	野生型ARG ボックス	Δ ArgR	なし	野生型 ThyA	なし	FNRプロ モーターの制御下 の染色体に組み込 まれたtesB- 酪酸カセット	10
SYN- UCD725	野生型ARG ボックス	Δ ArgR	なし	Δ ThyA	Kan	FNRプロ モーターの制御下 の染色体に組み込 まれたtesB- 酪酸カセット	
SYN- UCD726	野生型ARG ボックス	Δ ArgR	なし	Δ ThyA	なし	FNRプロ モーターの制御下 の染色体に組み込 まれたtesB- 酪酸カセット	20
SYN- UCD727	野生型ARG ボックス	Δ ArgR	maIEK遺伝子座 において染色体に 組み込まれた PfnrS- ArgAfbr	Δ ThyA	Kan	FNRプロ モーターの制御下 の染色体に組み込 まれたtesB- 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	
SYN- UCD728	野生型ARG ボックス	Δ ArgR	maIEK遺伝子座 において染色体に 組み込まれた PfnrS- ArgAfbr	Δ ThyA	なし	FNRプロ モーターの制御下 の染色体に組み込 まれたtesB- 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	30
SYN- UCD729	野生型ARG ボックス	Δ ArgR	maIEK遺伝子座 において染色体に 組み込まれた PfnrS- ArgAfbr	野生型 ThyA	なし	FNRプロ モーターの制御下 の染色体に組み込 まれたtesB- 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	
SYN- UCD730	野生型ARG ボックス	Δ ArgR	maIEK遺伝子座 において染色体に 組み込まれた PfnrS- ArgAfbr	野生型 ThyA	Kan	FNRプロ モーターの制御下 の染色体に組み込 まれたtesB- 酪酸カセット;	40

【表 16 - 11】

						リファキシミン 耐性	
SYN-UCD731	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK遺伝子座 において染色体に 組み込まれた PfnrS- ArgAfb r	Δ ThyA	Kan	FNRプロ モーターの制御下 の染色体に組み込 まれたtesB- 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	10
SYN-UCD732	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK遺伝子座 において染色体に 組み込まれた PfnrS- ArgAfb r	Δ ThyA	なし	FNRプロ モーターの制御下 の染色体に組み込 まれたtesB- 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	
SYN-UCD733	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK遺伝子座 において染色体に 組み込まれた PfnrS- ArgAfb r	野生型 ThyA	Kan	FNRプロ モーターの制御下 の染色体に組み込 まれたtesB- 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	20
SYN-UCD734	野生型 ARG ボックス	野生型 ArgR	maIEK遺伝子座 において染色体に 組み込まれた PfnrS- ArgAfb r	野生型 ThyA	なし	FNRプロ モーターの制御下 の染色体に組み込 まれたtesB- 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	30
SYN-UCD735	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	野生型 ThyA	Kan	FNRプロ モーターの制御下 の染色体に組み込 まれたtesB- 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	
SYN-UCD736	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	野生型 ThyA	なし	FNRプロ モーターの制御下 の染色体に組み込 まれたtesB- 酪酸カセット; リファキシミン 耐性	40
SYN-UCD737	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	Δ ThyA	Kan	FNRプロ モーターの制御下 の染色体に	

【表 16 - 12】

						組み込まれた tesB- 酪酸カセット; リファキシミン 耐性
SYN- UCD38	野生型 ARG ボックス	Δ ArgR	なし	Δ ThyA	なし	FNRプロ モーターの制御下 の染色体に組み込 まれた tesB- 酪酸カセット; リファキシミン 耐性

10

【0280】

20

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌による酪酸の産生は、さらなる改変によってさらに向上させることができる。嫌気的条件下の酪酸の産生は、内因性 NADH プールに依存する。いくつかの実施形態では、酪酸経路を経るフラックスは、NADH の利用の競合経路を除去することによって増加させることができる。非限定的な例は、NADH を利用して、ホスホエノールピルビン酸のコハク酸への変換を触媒する、*frdA* の突然変異 / 欠失である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の遺伝子操作細菌のいずれかは、NADH の利用の競合経路を除去する、突然変異、例えば、*frdA* の突然変異 / 欠失をさらにも含む。

【0281】

分泌

30

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、細菌細胞質から、目的のタンパク質（複数可）または治療用タンパク質（複数可）を分泌することができる天然分泌機構（例えば、グラム陽性細菌）または非天然分泌機構（例えば、グラム陰性細菌）をさらにも含む。多くの細菌が細菌細胞外被を越えて基質を輸送する高機能の分泌システムを発達させた。小分子、タンパク質および DNA のような、基質は、細胞外腔もしくはペリプラズム（消化管内腔もしくは他の腔など）中に放出し、標的細胞中に注入し、または細菌膜に結合させることができる。

【0282】

グラム陰性細菌では、分泌機構は、内および外膜の 1 つまたは両方にわたり得る。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、非天然二重膜スパンニング分泌システムをさらにも含む。二重膜スパンニング分泌システムは、I 型分泌システム (T1SS)、II 型分泌システム (T2SS)、III 型分泌システム (T3SS)、IV 型分泌システム (T4SS)、VI 型分泌システム (T6SS) およびレジスタンス - ノジュレーション - デイビジョン (RND) 多剤排出ポンプのファミリーを含むが、これらに限定されない (Pugsley, 1993 年; Gerlachら, 2007 年; Collinsonら, 2015 年; Costaら, 2015 年; Reevesら, 2015 年; 国際公開第 2014138324 号 A1、参照により本明細書に組み込まれる)。そのような分泌システムの例を図 69 ~ 73 に示す。グラム陰性様細胞外被を有する、マイコバクテリアも VII 型分泌システム (T7SS) をコードし得る (Stanleyら, 2003 年)。T2SS を除いて二重膜スパンニング分泌は、一般的に基質を細菌細胞質から細胞外腔または標

40

50

的細胞内に直接的に輸送する。対照的に、T2SSおよび外膜のみに及ぶ分泌システムは、2ステップ機構を使用し得るものであり、基質は、最初に内膜スパンニング輸送体によってペリプラズムに転位させられ、次に外膜に運ばれるかまたは細胞外腔に分泌される。外膜スパンニング分泌システムは、V型分泌または自己輸送システム(T5SS)、カーリー(curlin)分泌システムおよび線毛アセンブリのシャペロン-アッシャー経路を含むが、これらに限定されない(Saier、2006年;Costaら、2015年)。

【0283】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、赤痢菌属、サルモネラ属、大腸菌属、ビブリオ属(Bivrio)、バークホルデリア属(Burkholderia) 10
エルシニア属(Yersinia)、クラミジア属(Chlamydia)またはシュードモナス属(Pseudomonas)に由来するIII型またはIII型様分泌システム(T3SS)をさらに含む。T3SSは、ニードル複合体を介して細菌細胞質から宿主細胞質にタンパク質を輸送することができる。T3SSは、細菌細胞質から分子を分泌するが、宿主細胞質に分子を注入しないように、改変することができる。したがって、分子は、消化管内腔または他の細胞外腔に分泌される。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、前記改変T3SSを含み、細菌細胞質から目的のタンパク質(複数可)または治療用タンパク質(複数可)を分泌することができる。いくつかの実施形態では、異種タンパク質もしくはペプチド、例えば、目的のタンパク質または治療用タンパク質などの、分泌分子は、目的のタンパク質(複数可)または治療用タンパク質(複数可)が細菌から分 20
泌されることを可能にするIII型分泌配列を含む。

【0284】

いくつかの実施形態では、鞭毛III型分泌経路を用いて、目的の分子を分泌する。いくつかの実施形態では、ペプチドを天然鞭毛成分のN末端鞭毛分泌シグナルに組換えにより融合させることにより、不完全鞭毛を用いて、目的の治療用ペプチドを分泌する。この方法で、細胞内で発現したキメラペプチドを内および外膜を越えて周囲宿主環境中に移動させることができる。

【0285】

いくつかの実施形態では、V型自己輸送体分泌システム(Type V Autotransporter Secretion System)を用いて、治療用ペプチドを 30
分泌する。このマシナリーの単純さおよび比較的大きなタンパク質フラックスを扱う能力のため、V型分泌システムは、組換えタンパク質の細胞外産生に魅力的である。図70に示すように、治療用ペプチド(星)をN末端分泌シグナル、リンカーおよび自己輸送体のペータドメインに融合させることができる。N末端シグナル配列は、タンパク質を内膜を越えてペリプラズム内に移動させるSecA-YEGマシナリーにタンパク質を導き、その後、シグナル配列の切断が起こる。ペータドメインは、Bam複合体(「ベータ-バレルアセンブリマシナリー」)に動員され、そこでペータドメインが折りたたまれ、ベータ-バレル構造として外膜に挿入される。治療用ペプチドは、リンカー配列の前にベータ-バレル構造の中空孔を通り抜ける。細胞外環境に曝露したならば、治療用ペプチドは、自触媒切断(Bam複合体の左側)によってまたはリンカーにおける相補的プロテアーゼ 40
切断部位への膜結合ペプチド(黒いハサミ; Bam複合体の右側)の標的化によってリンカーシステムから解放される。このように、いくつかの実施形態では、異種タンパク質もしくはペプチド、例えば、目的のタンパク質または治療用タンパク質などの、分泌分子は、分子が細菌から分泌されるようにN末端分泌シグナル、リンカーおよび自己輸送体のペータドメインを含む。

【0286】

いくつかの実施形態では、ヘモリシンに基づく分泌システムを用いて、目的の分子を分泌する。I型分泌システムは、それらのパッセンジャーペプチドを細胞質から細胞外腔に直接に移動させ、他の分泌の種類2ステップ工程が不要となるという利点がある。図71に尿路病原性大腸菌のアルファ-ヘモリシン(HlyA)を示す。この経路は、ATP 50

結合カセット輸送体である、Hly B；膜融合タンパク質である、Hly D；および外膜タンパク質である、Tol Cを用いる。これらの3つのタンパク質の集合により、内および外膜の両方を通るチャンネルが形成される。天然では、このチャンネルは、Hly Aを分泌するために用いられるが、本開示の治療用ペプチドを分泌するために、Hly Aの分泌シグナル含有C末端部分を治療用ペプチド（星）のC末端部分に融合させて、このペプチドの分泌を媒介する。

【0287】

代替実施形態では、遺伝子操作細菌は、非天然単一膜スパンニング分泌システムをさらに含む。単一膜スパンニング輸送体は、分泌システムの構成要素としての役割を果たすか、または基質を独立して輸出し得る。そのような輸送体は、ATP結合カセットトランスロカーゼ、鞭毛ノビルレンス関連トランスロカーゼ、コンジュゲーション関連トランスロカーゼ、一般的分泌システム（例えば、大腸菌におけるSec YEG複合体）、マイコバクテリアおよびいくつかの種類のグラム陽性細菌（例えば、バシラス・アントラシス（*Bacillus anthracis*）、ラクトバシラス・ジョンソニイ、コリネバクテリウム・グルタミカム、ストレプトコッカス・ゴルドニイ（*Streptococcus gordonii*）、黄色ブドウ球菌における付随分泌システム、およびツイン-アルギニン転位（TAT）システムを含むが、これらに限定されない（Saier、2006年；RiegelおよびBraunstein、2008年；Albiniakら、2013年）。一般的分泌およびTATシステムは、両方が切断可能なN末端シグナルペプチドを用いて基質をペリプラズム内に輸出し得ることが公知であり、生物医薬の製造に関連して探究された。しかし、TATシステムは、とりわけ折りたたまれた基質を輸送することができ、それにより早発または不正折りたたみの可能性が解消される点で優位である。特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、TATまたはTAT様システムを含み、細菌細胞質から目的のタンパク質（複数可）または治療用タンパク質（複数可）を分泌することができる。当業者は、本明細書で開示した分泌システムは、細菌の種々の種、菌株および亜型において機能を発揮するように改変し、かつ/または種々のペイロードを送出するように構成することができることを理解するであろう。

【0288】

タンパク質、例えば、治療用ポリペプチドを細胞外腔に移動させるために、ポリペプチドは、最初に細胞内で移動させ、内膜を越えて移動させ、最後に外膜を越えて移動させなければならない。多くのエフェクタータンパク質（例えば、治療用ポリペプチド）-とりわけ真核生物由来のもの-は、3次および4次構造を安定化するためにジスルフィド結合を含む。これらの結合は、酸化ペリプラズムコンパートメント内でペリプラズムシャペロンの助けにより正しく形成することができるが、ポリペプチドを外膜を越えて移動させるために、ジスルフィド結合を還元し、タンパク質を再び広げなければならない。

【0289】

グラム陰性細菌-とりわけジスルフィド結合を必要とするもの-における適切に折りたたまれたタンパク質を分泌する1つの方法は、不安定な外膜を有する細菌におけるペリプラズムを標的にすることである。この方法により、タンパク質を酸化環境中に移動させ、適切に折りたたませる。調和のとれた細胞外分泌システムと対照的に、タンパク質は、膜の漏れによって正しく折りたたまれた形態でペリプラズム腔を脱出することができる。したがって、これらの「漏出性」グラム陰性突然変異体は、生物活性の、適切にジスルフィド結合したポリペプチドを分泌することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、「漏出性」または不安定な外膜を有する。漏れをもたらすために細菌の外膜を不安定にすることは、例えば、lpp、omp C、omp A、omp F、tol A、tol B、pal、deg S、deg Pおよびnlplを含む、外膜を強固なペプチドグリカン骨格につなぎ留めることに関与する遺伝子を欠失または突然変異を起こさせることによって達成することができる。Lppは、細胞当たり約500,000コピーで存在する細菌細胞中の最も豊富なポリペプチドであり、ペプチドグリカンへの細菌細胞壁の主要な「ステープル」として機能する（Silhavy T. J.、Kahne D.およびWa

10

20

30

40

50

lker S. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harb Perspect Biol 2, a000414 (2010年)。TolA-PALおよびOmpA複合体は、Lppと同様に機能し、漏出性表現型を得るための他の欠失標的である。さらに、漏出性表現型は、ペリプラズムプロテアーゼが不活性化した場合に認められた。ペリプラズムは、タンパク質とともに非常に密に充填されており、したがって、いくつかのペリプラズムタンパク質をコードして、タンパク質のターンオーバーを促進する。degS、degPまたはnlpIのようなペリプラズムプロテアーゼを除去することにより、ペリプラズムタンパク質の過剰な蓄積が促進されて、漏出性表現型がもたらされ得る。プロテアーゼの突然変異によっても、これらのプロテアーゼによる標的化分解が妨げられることによりエフェクターポリペプチドを保存することができる。さらに、これらの突然変異の組合せにより、細胞の生存の重大な犠牲を伴わずに細胞の漏出性表現型が相乗的に高められる可能性がある。したがって、いくつかの実施形態では、操作細菌は、1つもしくは複数の欠失または突然変異膜遺伝子を有する。いくつかの実施形態では、操作細菌は、欠失または突然変異lpp膜遺伝子を有する。いくつかの実施形態では、操作細菌は、ompC、ompAおよびompF遺伝子から選択される1つもしくは複数の欠失または突然変異遺伝子(複数可)を有する。いくつかの実施形態では、操作細菌は、tolA、tolBおよびpal遺伝子から選択される1つもしくは複数の欠失または突然変異遺伝子を有する。いくつかの実施形態では、操作細菌は、1つもしくは複数の欠失または突然変異ペリプラズムプロテアーゼ遺伝子を有する。いくつかの実施形態では、操作細菌は、degS、degPおよびnlpIから選択される1つもしくは複数の欠失または突然変異ペリプラズムプロテアーゼ遺伝子を有する。いくつかの実施形態では、操作細菌は、lpp、ompC、ompA、ompF、tolA、tolB、pal、degS、degPおよびnlpI遺伝子から選択される1つもしくは複数の欠失または突然変異遺伝子を有する。

【0290】

細胞の生存への擾乱を最小限にするために、例えば、lpp、ompC、ompA、ompF、tolA、tolB、pal、degS、degPおよびnlpIから選択される1つもしくは複数の膜またはペリプラズムプロテアーゼ遺伝子を誘導性プロモーターの制御下におくことによって漏出性表現型を誘導性に行うことができる。例えば、治療用ポリペプチドを送出(分泌)させる必要がある状態においてlppまたは他の細胞壁安定タンパク質またはペリプラズムプロテアーゼの発現を抑制することができる。例えば、誘導性条件下で、標的膜またはペリプラズムプロテアーゼ遺伝子の転写または翻訳を低減する転写リプレッサータンパク質または設計アンチセンスRNAを発現させることができる。逆に、特定のペプチドの過剰発現、例えば、コリシンまたはTolAの第3のトポロジードメインの過剰発現は、表現型の不安定化をもたらし得るものであり、治療用ポリペプチドを送出(分泌)させる必要がある状態においてペプチドの過剰発現を誘導することができる。これらの戦略の選別は、脆弱、漏出性表現型をバイオマス産生から切り離すものである。したがって、いくつかの実施形態では、操作細菌は、誘導性プロモーターの制御下の1つもしくは複数の膜および/またはペリプラズムプロテアーゼ遺伝子を有する。

【0291】

表15および表16にグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌の分泌システムを示す。これらは、操作細菌から目的のポリペプチド、タンパク質または治療用タンパク質(複数可)を分泌させるために用いることができ、これらは、その内容がその全体として参照により本明細書に組み込まれる、Milton H. Saier, Jr. Microbe / 1巻、1号、2006年、「Protein Secretion Systems in Gram-Negative Bacteria Gram-negative bacteria possess many protein secretion-membrane insertion systems that apparently evolved independently」に総説されている。

【0292】

10

20

30

40

50

【表 17】

表 15. グラム陽性細菌の分泌装置

細菌菌株	関連分泌装置
C. ノービーNT (C. novyi-NT) (グラム+)	Sec経路 ツイン-アルギニン (TAT) 経路
C. ブチリカム (C. butyricum) (グラム+)	Sec経路 ツイン-アルギニン (TAT) 経路
リステリア・モノサイトゲネス (Listeria monocytogenes) (グラム+)	Sec経路 ツイン-アルギニン (TAT) 経路

10

【0293】

【表 18 - 1】

表 16. グラム陰性細菌の分泌装置

グラム陰性細菌およびそれらの子孫におけるタンパク質分泌経路 (SP)							
種類 (略記)	名称	TC# ²	細菌	古細菌	真核生物	タンパク質/ 装置数	エネルギー源
IMPS-グラム陰性細菌内膜チャンネル形成トランスロカーゼ							
ABC (SIP)	ATP結合カセット トランスロカーゼ	3.A.1	+	+	+	3-4	ATP
SEC (IISP)	一般的分泌 トランスロカーゼ	3.A.5	+	+	+	~12	GTP OR ATP + PMF
Fla/Path (IIISP)	鞭毛/ピルレンス 関連トランス ロカーゼ	3.A.6	+	-	-	>10	ATP
Conj (IVSP)	コンジュゲーション 関連トランス ロカーゼ	3.A.7	+	-	-	>10	ATP
Tat (IISP)	ツイン-アルギニン 標的トランス ロカーゼ	2.A.6 4	+	+	+(クロロプラスト)	2-4	PMF
Oxa1 (YidC)	シトクロムオキシ ダーゼ生合成 ファミリー	2.A.9	+	+	+(ミトコンドリア クロロプラスト)	1	なし または PMF
MscL	高コンダクタンス 機械受容チャンネル ファミリー	1.A.2 2	+	+	+	1	なし

20

30

40

【表 18 - 2】

ホリン	ホリン機能スーパーファミリー	1.E.1 ●21	+	-	-	1	なし
真核オルガネラ							
MPT	ミトコンドリアタンパク質トランスロカーゼ	3.A.B	-	-	+(ミトコンドリア)	>20	ATP
CEPT	クロロプラストエンベロープタンパク質トランスロカーゼ	3.A.9	(+)	-	+(クロロプラスト)	≥3	GTP
Bcl-2	真核Bcl-2ファミリー (プログラム細胞死)	1.A.2 1	-	-	+	1?	なし
グラム陰性細菌外膜チャンネル形成トランスロカーゼ							
MTB (IISP)	一般分泌トランスロカーゼの主末端ブランチ	3.A.1 5	+ ^b	-	-	~14	ATP; PMF
FUP AT-1	線毛アッシャータンパク質自己輸送体1	1.B.1 1 1.B.1 2	+ ^b + ^b	-	-	1 1	なし なし
AT-2 OMF (ISP)	自己輸送体2	1.B.4 0 1.B.1 7	+ ^b + ^b	-	- +(?)	1 1	なし なし
TPSセクレチン (IISPおよびIISP)		1.B.2 0 1.B.2 2	+ + ^b	-	+ -	1 1	なし なし
OmpIP	外膜挿入ポーリン	1.B.3 3	+	-	+(ミトコンドリア; クロロプラスト)	≥4	なし?

10

20

30

【0294】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、治療用酵素の分泌のための本明細書に記載の天然または非天然分泌システムを含む。いくつかの実施形態では、分泌システムは、
 40 改変III型鞭毛、I型（例えば、ヘモリシン分泌システム）、II型、IV型、V型、VI型およびVII型分泌システム、レジスタンス-ノジュレーション-ディビジョン (RND) 多剤排出ポンプ、単一膜分泌システム、SecおよびTAT分泌システムから選択される。

【0295】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌により分泌される治療用タンパク質は、プロテアーゼ、例えば、腸プロテアーゼに対する抵抗性を増大させるように改変する。

【0296】

いくつかの実施形態では、分泌のための1つもしくは複数の目的のタンパク質または治療用タンパク質は、本明細書に記載の通り、誘導性プロモーターの制御下にある。一例では、1つもしくは複数の目的のタンパク質または治療用タンパク質は、FNRプロモータ
 50

一の制御下にあり、嫌氣的条件下で産生され、分泌される。いくつかの実施形態では、分泌のための1つもしくは複数の目的のタンパク質または治療用タンパク質は、構成的プロモーターの制御下にある。

【0297】

1つもしくは複数の目的のタンパク質または治療用タンパク質が微生物から分泌または輸出される、いくつかの実施形態では、操作微生物は、分泌タグを含む遺伝子配列（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、1つもしくは複数の目的のタンパク質または治療用タンパク質は、1つもしくは複数の目的のタンパク質または治療用タンパク質を特定の分泌システムに導くためのRNAまたはペプチド由来の「分泌タグ」を含む。例えば、I型ヘモリシン分泌システムの分泌タグは、アルファヘモリシンタンパク質（HlyA）のC末端53アミノ酸、HlyA分泌シグナルにコードされる。

10

【0298】

HlyBが内膜に挿入して、孔を形成し、HlyDがHlyBをTo1C（外膜孔）と一直線に並べ、それにより内および外膜を通るチャンネルを形成する。C末端分泌タグを自触媒またはプロテアーゼ触媒、例えば、OmpT切断により除去し、それにより、1つもしくは複数の目的のタンパク質または治療用タンパク質を細胞外環境中に放出することができる。

【0299】

V型自己分泌システムは、N末端Sec依存性ペプチドタグ（内膜）およびC末端タグ（外膜）を利用する。これは、Secシステムを用いて、細胞質からペリプラズムに移動する。C末端タグは、外膜に挿入して、「パッセンジャー」タンパク質が通る孔を形成する。外膜を越えたならば、パッセンジャー（抗癌分子）は、自触媒、インテイン様機構によりまたは膜結合プロテアーゼ（すなわち、OmpT）により膜埋込みC末端タグから放出される。N末端タグは、Secシステムにより除去される。したがって、いくつかの実施形態では、分泌システムは、1つもしくは複数の目的のタンパク質または治療用タンパク質を操作細菌から分泌する前にこのタグを除去することができる。V型自己分泌媒介分泌では、N末端ペプチド分泌タグは、天然Secシステムによる細胞質からペリプラズムコンパートメントへの「パッセンジャーペプチド」の転位時に除去される。さらに、自己分泌型が外膜を越えて転位したならば、C末端分泌タグは、自触媒またはプロテアーゼ触媒、例えば、OmpT切断により除去し、それにより抗癌分子（複数可）を細胞外環境中に放出させることができる。

20

30

【0300】

鞭毛改変III型分泌では、タグは、mRNAの5'非翻訳領域にコードされ、したがって、切断/除去すべきペプチドタグが存在しない。この改変システムは、「シリンジ」部分を含まず、その代わりに両膜を越え、形成鞭毛から出るための孔として鞭毛構造の基底小体を使用する。fliC/fliD遺伝子（鞭毛「尾」/むちをコードする）が破壊される場合、鞭毛が十分に形成し得ず、これが全体的な分泌を促進する。いくつかの実施形態では、尾部を完全に除去することができる。III型の伝統的なシステムでは、基底小体は、鞭毛に極めて類似しているが、「尾」/むちの代わりに伝統的なT3SSは、パッセンジャータンパク質を宿主細胞に注射するためのシリンジを有する。分泌タグは、N末端ペプチドによりコードされる（長さが変化し、いくつかの異なるタグが存在する、PCT/US14/020972参照）。N末端タグは、この分泌システムにおけるポリペプチドから除去されない。

40

【0301】

いくつかの実施形態では、1つもしくは複数の目的のタンパク質または治療用タンパク質は、大腸菌CFT073のアルファ-ヘモリシン（hlyA）のC末端の53アミノ酸を含む融合タンパク質として発現する（タグ）を含む（C末端分泌タグ）。

【0302】

必須遺伝子および栄養要求体

本明細書で使用する場合、「必須遺伝子」という語は、細胞の増殖および/または生存

50

に必要な遺伝子を意味する。細菌必須遺伝子は、当業者に周知であり、遺伝子の特異的欠失および/またはランダム突然変異誘発ならびにスクリーニングによって同定することができる(例えば、それぞれの全体の内容が参照により本明細書に明確に組み込まれる、ZhangおよびLin、2009年、DEG 5.0、a database of essential genes in both prokaryotes and eukaryotes、Nucl. Acids Res.、37巻:D455~D458頁ならびにGerdesら、Essential genes on metabolic maps、Curr. Opin. Biotechnol.、17巻(5号):448~456頁参照)。

【0303】

「必須遺伝子」は、生物が生存する状況および環境に依存し得る。例えば、必須遺伝子の突然変異、修飾または除去は、本開示の組換え細菌が栄養要求体になることをもたらし得る。栄養要求性の改変は、細菌が必須栄養素を産生するために必要な遺伝子(複数可)を欠いているため、生存または増殖に必須である、外部から加えられる栄養素の非存在下では細菌を死滅させることを意図するものである。

【0304】

栄養要求性菌株を作製するために破壊または除去することができる例示的細菌遺伝子を以下に示す。これらは、オリゴヌクレオチド合成、アミノ酸合成および細胞壁合成に必要な遺伝子を含むが、これらに限定されない。

【0305】

栄養要求性の改変は、細菌が必須栄養素を産生するために必要な遺伝子(複数可)を欠いているため、生存または増殖に必須である、外部から加えられる栄養素の非存在下では細菌を死滅させることを意図するものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の遺伝子操作細菌のいずれかは、細胞の生存および/または増殖に必要な遺伝子における欠失または突然変異も含む。一実施形態では、必須遺伝子は、DNA合成遺伝子、例えば、thyAである。他の実施形態では、必須遺伝子は、細胞壁合成遺伝子、例えば、dapAである。他の実施形態では、必須遺伝子は、アミノ酸遺伝子、例えば、serAまたはMetAである。対応する野生型遺伝子産物が細菌において産生されない限り、cysE、glnA、ilvD、leuB、lysA、serA、metA、glyA、hisB、ilvA、pheA、proA、thrC、trpC、tyrA、thyA、uraA、dapA、dapB、dapD、dapE、dapF、flhD、metB、metC、proAB、およびthi1を含むが、これらに限定されない、細胞の生存および/または増殖に必要な任意の遺伝子を標的にすることができる。表17に栄養要求性菌株を作製するために破壊または除去することができる例示的な細菌遺伝子を示す。これらは、オリゴヌクレオチド合成、アミノ酸合成および細胞壁合成に必要な遺伝子を含むが、これらに限定されない。

【0306】

10

20

30

【表 19】

表 17. 栄養要求性菌株の作製に有用な細菌遺伝子の非限定的な例

アミノ酸	オリゴヌクレオチド	細胞壁
cysE	thyA	dapA
glnA	uraA	dapB
ilvD		dapD
leuB		dapE
lysA		dapF
serA		
metA		
glyA		
hisB		
ilvA		
pheA		
proA		
thrC		
trpC		
tyrA		

【0307】

表 18 に強制経口投与後 24 時間および 48 時間目に検出されたマウス消化管内の種々のアミノ酸栄養要求体の生存を示す。これらの栄養要求体は、大腸菌の非ニッスル株である BW25113 を用いて作製した。

【0308】

10

20

30

40

【表 20】

表 18. マウス消化管内のアミノ酸栄養要求体の生存

遺伝子	AA 栄養要求体	強制経口投与前	24時間	48時間
argA	アルギニン	存在	存在	非存在
cysE	システイン	存在	存在	非存在
glnA	グルタミン	存在	存在	非存在
glyA	グリシン	存在	存在	非存在
hisB	ヒスチジン	存在	存在	存在
ilvA	イソロイシン	存在	存在	非存在
leuB	ロイシン	存在	存在	非存在
lysA	リシン	存在	存在	非存在
metA	メチオニン	存在	存在	存在
pheA	フェニルアラニン	存在	存在	存在
proA	プロリン	存在	存在	非存在
serA	セリン	存在	存在	存在
thrC	トレオニン	存在	存在	存在
trpC	トリプトファン	存在	存在	存在
tyrA	チロシン	存在	存在	存在
ilvD	バリン/イソロイシン/ ロイシン	存在	存在	非存在
thyA	チアミン	存在	非存在	非存在
uraA	ウラシル	存在	非存在	非存在
flhD	FlhD	存在	存在	存在

10

20

30

【0309】

例えば、チミンは、細菌細胞の増殖に必要な核酸であり、その非存在下では、細菌は、細胞死を受ける。thyA 遺伝子は、dUMP を dTMP に変換することによる、チミン合成における第1のステップを触媒する酵素であるチミジル酸シンターゼをコードする (Satra, 2003年)。いくつかの実施形態では、本開示の細菌細胞は、thyA 遺伝子が欠失し、かつ/または無関係の遺伝子で置換されている thyA 栄養要求体である。thyA 栄養要求体は、例えば、in vitro で増殖培地にチミンを加えることによって、または in vivo でヒト消化管内で天然で認められる高いチミンレベルの存在下で十分な量のチミンが存在する場合にのみ増殖することができる。いくつかの実施形態では、本開示の細菌細胞は、細菌が哺乳動物消化管内に存在する場合、補足される遺伝子における栄養要求体である。十分な量のチミンが存在しない場合、thyA 栄養要求体は、死滅する。いくつかの実施形態では、栄養要求性の改変を用いて、細菌細胞が栄養要求性遺伝子産物の非存在下 (例えば、消化管外) で生存しないことが確認される。

40

【0310】

ジアミノピメリン酸 (DAP) は、リシン生合成経路内で合成されるアミノ酸であり、細菌細胞壁の増殖に必要である (Meadowra, 1959年; Clarksonら, 1971年)。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の遺伝子操作細菌のいずれかは、dapD が欠失し、かつ/または無関係の遺伝子で置換されている dapD 栄養要求体である。dapD 栄養要求体は、例えば、DAP を in vitro で増殖培地に加えることによって、十分な量の DAP が存在する場合にのみ増殖することができる。十分な量の

50

DAPが存在しない場合、dapD栄養要求体は、死滅する。いくつかの実施形態では、栄養要求性の改変を用いて、細菌細胞が栄養要求性遺伝子産物の非存在下（例えば、消化管外）で生存しないことが確認される。

【0311】

他の実施形態では、本開示の遺伝子操作細菌は、uraAが欠失し、かつ/または無関係の遺伝子で置換されているuraA栄養要求体である。uraA遺伝子は、ピリミジンウラシルの取込みおよびその後の代謝を促進する膜結合輸送体であるUraAをコードする（Andersenら、1995年）。uraA栄養要求体は、例えば、ウラシルを*in vitro*で増殖培地に加えることによって十分な量のウラシルが存在する場合のみ増殖することができる。十分な量のウラシルが存在しない場合、uraA栄養要求体は、死滅する。いくつかの実施形態では、栄養要求性の改変を用いて、細菌が栄養要求性遺伝子産物の非存在下（例えば、消化管外）で生存しないことが確認される。

10

【0312】

複雑なコミュニティにおいて、細菌がDNAを共有することは可能である。非常にまれな状況では、栄養要求性細菌菌株は、ゲノム欠失を修復し、栄養要求体を永久的に救出する非栄養要求性菌株からDNAを受け取り得る。したがって、複数の栄養要求体を含む細菌菌株を操作することにより、DNA転移が栄養要求体を救出するのに十分な時間起こる可能性が著しく低くなり得る。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、細胞の生存および/または増殖に必要な2つまたはそれ以上の遺伝子の欠失または突然変異を含む。

20

【0313】

必須遺伝子の他の例は、yhbV、yagG、hemB、secD、secF、ribD、ribE、thiL、dxs、ispA、dnaX、adk、hemH、lpxH、cysS、fold、rplT、infC、thrS、nadE、gapA、yeaZ、aspS、argS、pgsA、yefM、metG、folE、yejM、gyrA、nrdA、nrdB、folC、accD、fabB、gltX、ligA、zipA、dapE、dapA、der、hisS、ispG、suhB、tadA、acpS、era、rnc、ftsB、eno、pyrG、chpR、lgt、fbaA、pgk、yqgD、metK、yqgF、plsC、ygiT、pare、ribB、cca、ygjD、tdcF、yral、yihA、ftsN、murI、murB、birA、secE、nusG、rplJ、rplL、rpoB、rpoC、ubiA、plsB、lexA、dnaB、ssb、alsK、groS、psd、orn、yjeE、rpsR、chpS、ppa、valS、yjpgP、yjpgQ、dnaC、ribF、lspA、ispH、dapB、folA、imp、yabQ、ftsL、ftsI、murE、murF、mraY、murD、ftsW、murG、murC、ftsQ、ftsA、ftsZ、lpxC、secM、secA、can、folK、hemL、yadR、dapD、map、rpsB、infB、nusA、ftsH、obgE、rpmA、rplU、ispB、murA、yrbB、yrbK、yhbN、rpsI、rplM、degS、mreD、mreC、mreB、accB、accC、yrdC、def、fmt、rplQ、rpoA、rpsD、rpsK、rpsM、entD、mrdB、mrdA、nadD、hlepb、rpoE、pssA、yfiO、rplS、trmD、rpsP、ffh、grpE、yfyB、csrA、ispF、ispD、rplW、rplD、rplC、rpsJ、fusA、rpsG、rpsL、trpS、yrfF、asd、rpoH、ftsX、ftsE、ftsY、frr、dxr、ispU、rfak、kdtA、coaD、rpmB、dfp、dut、gmK、spot、gyrB、dnaN、dnaA、rpmH、rnpA、yidC、tnaB、glmS、glmU、wzyE、hemD、hemC、yigP、ubiB、ubiD、hemG、secY、rplO、rpmD、rpsE、rplR、rplF、rpsH、rpsN、rplE、rplX、rplN、rpsQ、rpmC、rplP、rpsC、rplV、rpsS、rplB、cdsA、yaeL、yaeT、lpxD、fabZ、lpxA、lpxB、dnaE、ac

30

40

50

cA、tilS、proS、yafF、tsf、pyrH、olA、rlpB、leuS、lnt、glnS、fldA、cydA、infA、cydC、ftsK、lolA、serS、rpsA、msbA、lpxK、kdsB、mukF、mukE、mukB、asnS、fabA、mviN、rne、yceQ、fabD、fabG、acpP、tmk、holB、lolC、lolD、lolE、purB、ymfK、minE、mind、pth、rsa、ispE、lolB、hemA、prfA、prmC、kdsA、topA、ribA、fabI、racR、dicA、ydfB、tyrS、ribC、ydiL、pheT、pheS、yhhQ、bcsB、glyQ、yibJ、およびgpsAを含むが、これらに限定されない。他の必須遺伝子は、当業者に公知である。

【0314】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、合成リガンド依存性必須遺伝子(SLIDE)細菌細胞である。SLIDE細菌細胞は、特定のリガンドの存在下でのみ増殖する1つまたは複数の必須遺伝子における突然変異を有する合成栄養要求体である(その全体の内容が参照により本明細書に明確に組み込まれる、LopezおよびAnderson「Synthetic Auxotrophs with Ligand-Dependent Essential Genes for a BL21 DE3 Biosafety Strain」、ACS Synthetic Biology (2015) DOI: 10.1021/acssynbio.5b00085参照)。

【0315】

いくつかの実施形態では、SLIDE細菌細胞は、必須遺伝子における突然変異を含む。いくつかの実施形態では、必須遺伝子は、pheS、dnaN、tyrS、metGおよびadkからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、必須遺伝子は、次の突然変異:H191N、R240C、I317S、F319V、L340T、V347IおよびS345Cのうちの1つまたは複数を含むdnaNである。いくつかの実施形態では、必須遺伝子は、突然変異:H191N、R240C、I317S、F319V、L340T、V347IおよびS345Cを含むdnaNである。いくつかの実施形態では、必須遺伝子は、次の突然変異:F125G、P183T、P184A、R186AおよびI188Lのうちの1つまたは複数を含むpheSである。いくつかの実施形態では、必須遺伝子は、次の突然変異:F125G、P183T、P184A、R186AおよびI188Lを含むpheSである。いくつかの実施形態では、必須遺伝子は、突然変異:L36V、C38AおよびF40Gのうちの1つまたは複数を含むtyrSである。いくつかの実施形態では、必須遺伝子は、突然変異:L36V、C38AおよびF40Gを含むtyrSである。いくつかの実施形態では、必須遺伝子は、次の突然変異:E45Q、N47R、I49GおよびA51Cのうちの1つまたは複数を含むmetGである。いくつかの実施形態では、必須遺伝子は、突然変異:E45Q、N47R、I49GおよびA51Cを含むmetGである。いくつかの実施形態では、必須遺伝子は、次の突然変異:I4L、L5IおよびL6Gのうちの1つまたは複数を含むadkである。いくつかの実施形態では、必須遺伝子は、突然変異:I4L、L5IおよびL6Gを含むadkである。

【0316】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、リガンドにより補足されている。いくつかの実施形態では、リガンドは、ベンゾチアゾール、インドール、2-アミノベンゾチアゾール、インドール-3-酪酸、インドール-3-酢酸およびL-ヒスチジンメチルエステルからなる群から選択される。例えば、metG(E45Q、N47R、I49GおよびA51C)における突然変異を有する細菌細胞は、ベンゾチアゾール、インドール、2-アミノベンゾチアゾール、インドール-3-酪酸、インドール-3-酢酸またはL-ヒスチジンメチルエステルにより補足される。dnaN(H191N、R240C、I317S、F319V、L340T、V347IおよびS345C)における突然変異を有する細菌細胞は、ベンゾチアゾール、インドールまたは2-アミノベンゾチアゾールにより補足される。pheS(F125G、P183T、P184A、R186AおよびI18

10

20

30

40

50

8 L)における突然変異を有する細菌細胞は、ベンゾチアゾールまたは2 - アミノベンゾチアゾールにより補足される。tyrS (L36V、C38AおよびF40G)における突然変異を有する細菌細胞は、ベンゾチアゾールまたは2 - アミノベンゾチアゾールにより補足される。adk (I4L、L5IおよびL6G)における突然変異を有する細菌細胞は、ベンゾチアゾールまたはインドールにより補足される。

【0317】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、リガンドに対して栄養要求性にする複数の突然変異遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、細菌細胞は、2つの必須遺伝子における突然変異を含む。例えば、いくつかの実施形態では、細菌細胞は、tyrS (L36V、C38AおよびF40G)ならびにmetG (E45Q、N47R、I49GおよびA51C)における突然変異を含む。他の実施形態では、細菌細胞は、3つの必須遺伝子における突然変異を含む。例えば、いくつかの実施形態では、細菌細胞は、tyrS (L36V、C38AおよびF40G)、metG (E45Q、N47R、I49GおよびA51C)ならびにpheS (F125G、P183T、P184A、R186AおよびI188L)における突然変異を含む。

【0318】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、その必須遺伝子(複数可)が例えば、図66に示すアラビノース系を用いて置換されている条件付き栄養要求体である。

【0319】

いくつかの実施形態では、本開示の遺伝子操作細菌は、栄養要求体であり、本明細書に記載のキルスイッチ成分およびシステムのいずれかのような、キルスイッチ回路も含む。例えば、組換え細菌は、細胞の生存および/または増殖に必要な必須遺伝子における、例えば、DNA合成遺伝子、例えば、thyA、細胞壁合成遺伝子、例えば、dapAおよび/またはアミノ酸遺伝子、例えば、serAもしくはMetAにおける欠失もしくは突然変異を含み、環境条件(複数可)および/またはシグナル(複数可)(述べたアラビノース系のような)に反応して発現する1つもしくは複数の転写活性化因子により調節されるあるいは外因性環境条件(複数可)および/またはシグナル(複数可)を感知することにより発現する1つもしくは複数のリコンビナーゼ(本明細書および図62~65に記載するリコンビナーゼシステムのような)により調節される毒素遺伝子も含み得る。他の実施形態は、その全内容が参照により明確に本明細書に組み込まれる、Wrightら、「GeneGuard: A Modular Plasmid System Designed for Biosafety」、ACS Synthetic Biology (2015年)4巻:307~316頁に記載されている。いくつかの実施形態では、本開示の遺伝子操作細菌は、栄養要求体であり、本明細書に記載のキルスイッチ成分およびシステムのいずれかのような、キルスイッチ回路、ならびに条件複製起点のような、他のバイオセキュリティシステム(Wrightら、2015年)も含む。

【0320】

他の実施形態では、栄養要求性の改変は、過剰のアンモニアを消費する突然変異細菌をスクリーニングするためにも用いることができる。より具体的な態様では、栄養要求性の改変は、アルギニンを過剰産生することによって過剰のアンモニアを消費する突然変異細菌をスクリーニングするためにも用いることができる。本明細書に記載の通り、アルギニン代謝に関与する多くの遺伝子は、ArgRとのその相互作用によるアルギニンによる抑制を受ける。astC遺伝子プロモーターは、アルギニン - ArgR複合体が、転写リプレッサーとは対照的に、転写活性化因子として作用する点で独特である。astCは、アンモニア産生アルギニンスクシニルトランスフェラーゼ(AST)経路の第3の酵素および大腸菌におけるastCADBEオペロンの第1の酵素である、スクシニルオルニチンアミノトランスフェラーゼをコードする(Schneiderら、1998年)。特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、ある遺伝子について栄養要求性であり、astCプロモーターの制御下で栄養要求性遺伝子産物を発現する。これらの実施形態では、栄養要求性は、正のフィードバック機構の支配下にあり、アルギニンを過剰産生することにより過剰の

10

20

30

40

50

アンモニアを消費する突然変異細菌を選択するために用いる。正のフィードバック栄養要求体の非限定的な例を図60Aおよび60Bに示す。

【0321】

遺伝子調節回路

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、本明細書に記載の構築物を発現するための重層的遺伝子調節回路を含む（例えば、その全体として参照により本明細書に組み込まれる、米国仮特許出願第62/184,811号参照）。

【0322】

特定の実施形態では、本発明は、アルギニンを過剰産生する遺伝子操作細菌を選択する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、代替代謝経路、例えば、ヒスチジン生合成経路、メチオニン生合成経路、リシン生合成経路、アスパラギン生合成経路、グルタミン生合成経路およびトリプトファン生合成経路により過剰のアンモニアを消費する遺伝子操作細菌を選択する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、突然変異アルギニンレギュロンおよびArgR調節2リプレッサー活性化遺伝子調節回路を含む遺伝子操作細菌を提供する。2リプレッサー活性化遺伝子調節回路は、アンモニアを減少させるまたは栄養要求体を救出する突然変異細菌についてスクリーニングするために有用である。いくつかの構築物において、高レベルのアルギニンおよびアルギニンによるArgRの結果として生じる活性化は、細胞の生存に必要な検出可能なレベルまたは必須遺伝子の発現をもたらし得る。

【0323】

2リプレッサー活性化調節回路は、第1のArgRおよび第2のリプレッサー、例えば、Tetリプレッサーを含む。これらの実施形態の一態様では、ArgRは、目的の特定の遺伝子の転写、例えば、過剰なアンモニアを消費する突然変異体、および/または細胞の生存に必要な必須遺伝子についてスクリーニングするために用いることができる、検出可能な産物を抑制する、第2のリプレッサーの転写を抑制する。ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼおよびGFPのような蛍光タンパク質を含むが、これらに限定されない、任意の検出可能な産物を用いることができる。いくつかの実施形態では、第2のリプレッサーは、Tetリプレッサータンパク質(TetR)である。この実施形態では、野生型ARGボックスを含むArgR抑制性プロモーターは、TetRの発現を駆動し、TetR抑制性プロモーターは、目的の少なくとも1つの遺伝子、例えば、GFPの発現を駆動する。ArgR結合の非存在（低アルギニン濃度で起こる）下では、tetRが転写され、TetRがGFPの発現を抑制する。ArgR結合の存在（高アルギニン濃度で起こる）下では、tetRの発現が抑制され、GFPが発生する。これらの実施形態に有用な他の第2のリプレッサーの例は、ArsR、AscG、LacI、CscR、DeoR、DgoR、FruR、GalR、GatR、CI、LexA、RafR、QacRおよびPtXS（米国特許出願公開第20030166191号）を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、いくつかの実施形態では、スイッチを含む突然変異アルギニンレギュロンを突然変異誘発にかけ、アルギニンを過剰産生することによってアンモニアを減少させる突然変異体を、例えば、フローサイトメトリー、検出可能な産物が蛍光を発する場合には蛍光活性化細胞選別(FACS)により、検出可能な産物のレベルに基づいて選択する。

【0324】

いくつかの実施形態では、目的の遺伝子は、細菌の生存および/または増殖に必要な遺伝子である。ArgRの制御下を除いて遺伝子産物を産生しないようにするために対応する野生型遺伝子が除去または突然変異を起こさせた限り、cysE、glnA、ilvD、leuB、lysA、serA、metA、glyA、hisB、ilvA、pheA、proA、thrC、trpC、tyrA、thyA、uraA、dapA、dapB、dapD、dapE、dapF、flhD、metB、metC、proAB、およびthi1を含むが、これらに限定されない、任意のそのような遺伝子を用いることができる。いくつかの実施形態では、野生型ARGボックスを含むArgR抑制性プロモーター

10

20

30

40

50

は、T e t Rタンパク質の発現を駆動し、T e t R抑制性プロモーターは、細菌の生存および/または増殖に必要な少なくとも1つの遺伝子、例えば、t h y A、u r a Aの発現を駆動する(S a tら、2003年)。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、細菌が哺乳動物消化管内に存在する場合、補足されない遺伝子において栄養要求性であり、前記遺伝子は、細菌に存在する第2の誘導性遺伝子により補足され、第2の遺伝子の転写は、A r g R抑制性であり、十分に高い濃度のアルギニンの存在下で誘導される(ひいては栄養要求性遺伝子を補足する)。いくつかの実施形態では、2リプレッサー活性化回路を含む突然変異アルギニンレギュロン突然変異誘発にかけ、過剰のアンモニアを減少させる突然変異体を、生存および/または増殖に必要な遺伝子産物の非存在下での増殖により選択する。いくつかの実施形態では、2リプレッサー活性化回路を含む突然変異アルギニンレギュロンを用いて、細菌が高レベルのアルギニンの非存在下(例えば、消化管外)で生存しないことを確認する。

10

【0325】

宿主 - プラスミド相互依存性

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、宿主 - プラスミド相互依存性をもたらすように改変されたプラスミドも含む。特定の実施形態では、相互依存性宿主 - プラスミドプラットフォームは、Gene Guardである(W r i g h tら、2015年)。いくつかの実施形態では、Gene Guardプラスミドは、(i) 必須の複製イニシエータータンパク質がトランスで配置されている、条件複製起点、(i i) ゲノム転位により宿主によって救出され、リッチ培地中の使用にも適合する栄養要求性の改変、および/または(i i i) 広域スペクトルの毒素をコードする核酸配列を含む。毒素遺伝子は、抗毒素を発現しない菌株(例えば、野生型細菌)に対してそれ自体不利であるプラスミドDNAを作製することによりプラスミドスプレッド(s p r e a d)を対照として選択するために用いることができる。いくつかの実施形態では、Gene Guardプラスミドは、抗体分泌なしで少なくとも100世代にわたり安定である。いくつかの実施形態では、Gene Guardプラスミドは、宿主の増殖を妨害しない。Gene Guardプラスミドは、本発明の遺伝子操作細菌における意図的でないプラスミドの増殖を著しく減少させるために用いられる。

20

【0326】

相互依存性宿主 - プラスミドプラットフォームは、単独で、または本明細書に記載のもの(例えば、キルスイッチ、栄養要求体)などの、他のバイオセフティ機能と組み合わせることができる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、Gene Guardプラスミドを含む。他の実施形態では、遺伝子操作細菌は、Gene Guardプラスミドおよび/または1つもしくは複数のキルスイッチを含む。他の実施形態では、遺伝子操作細菌は、Gene Guardプラスミドおよび/または1つもしくは複数の栄養要求体を含む。他の実施形態では、遺伝子操作細菌は、Gene Guardプラスミド、1つもしくは複数のキルスイッチおよび/または1つもしくは複数の栄養要求体を含む。

30

【0327】

プラスミド上の合成遺伝子回路発現は、短期では十分に機能し得るが、長期では能力および/または機能を失う(D a n i n oら、2015年)。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、長期間にわたって目的の遺伝子を発現するための安定な回路を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、消化管増強分子を産生することができ、毒素(h o k)および短寿命抗毒素(s o k)を同時に産生する毒素 - 抗毒素システムをさらに含み、プラスミドの喪失は、細胞が長寿命毒素により殺滅されることをもたらず(D a n i n oら、2015年; 図68)。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、枯草菌プラスミドp L 20に由来するa l p 7をさらに含み、細胞分裂中の等しい分離を保証するために細胞の極にプラスミドを押し出すことができるフィラメントを産生する(D a n i n oら、2015年)。

40

【0328】

キルスイッチ

50

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、キルスイッチも含む（例えば、それぞれが参照によりそれらの全体として本明細書に組み込まれる、米国仮特許出願第 62/183,935号、第62/263,329号および第62/277,654号参照）。キルスイッチは、外部刺激に反応して操作された微小生物を能動的に殺滅することを意図する。細菌が生存のための必須栄養素を欠いているために死ぬという栄養要求性突然変異と対照的に、キルスイッチは、細胞死を引き起こす微小生物内の有毒分子の産生を誘導する環境中の特定の因子によって誘発される。

【0329】

キルスイッチにより操作された細菌は、*in vitro* 研究目的のために、例えば、実験室環境の外部へのバイオ燃料産生微生物の広がりを制限するために操作された。疾患または障害を治療するための *in vivo* での投与のために操作された細菌は、1つまたは複数の異種遺伝子、例えば、治療用遺伝子（複数可）の発現および送達の後または対象が治療効果を経験した後の特定に時点で死ぬようにプログラムを組むこともできる。例えば、いくつかの実施形態では、キルスイッチは、 $arg^{A^f b^r}$ の酸素レベル依存性発現後の一定の期間の後に細菌を殺滅するように作動させる。いくつかの実施形態では、キルスイッチは、 $arg^{A^f b^r}$ の酸素レベル依存性発現後に例えば、アルギニンまたはシトルリンの産生の後に遅れて作動させる。あるいは、細菌は、細菌が疾患部位の外側に広がった後に死ぬように操作することができる。とりわけ、微生物による対象への長期住みつき、対象内の目的の範囲外への微生物の広がり（例えば、消化管の外側）、または対象の外側の微生物の環境中への広がり（例えば、対象の大便を介する環境への広がりを防ぐことは、有用であり得る。キルスイッチに用いることができるそのような毒素の例は、バクテリオシン、リシン、および細胞膜を溶解すること、細胞DNAを分解すること、または他の機構により細胞死を引き起こす他の分子を含むが、これらに限定されない。そのような毒素は、個別にまたは組み合わせて用いることができる。それらの産生を制御するスイッチは、例えば、転写活性化（トグルスイッチ；例えば、Gardnerら、2000年参照）、翻訳（リボレギュレーター）またはDNA組換え（リコンビナーゼベースのスイッチ）に基づくものであってよく、嫌気状態または活性酸素種のような環境刺激を検知することができる。これらのスイッチは、単一環境因子により作動させることができるか、または細胞死をもたらすためにAND、OR、NANDおよびNOR論理構成のいくつかの活性化因子を必要とし得る。例えば、ANDリボレギュレータースイッチは、細胞膜を透過性にし、細胞を殺滅するリシンの発現を誘導するためのテトラサイクリン、イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド（IPTG）およびアラビノースにより活性化される。IPTGは、エンドリシンおよびホリンmRNAの発現を誘導し、これらが次に、アラビノースおよびテトラサイクリンの添加によって活性化される。細胞死をもたらすために3つの誘導物質のすべてが存在しなければならない。キルスイッチの例は、当技術分野で公知である（Calluraら、2010年）。いくつかの実施形態では、キルスイッチは、 $arg^{A^f b^r}$ の酸素レベル依存性発現の後の期間後に細菌を殺滅するために作動させる。いくつかの実施形態では、キルスイッチは、 $arg^{A^f b^r}$ の酸素レベル依存性発現の後に遅らせて作動させる。

【0330】

キルスイッチは、毒素が環境条件もしくは外部シグナルに反応して産生される（例えば、細菌が外部キューに反応して殺滅される）ように設計する、または代わるべきものとして環境条件がもはや存在しなくなるもしくは外部シグナルが停止したならば、毒素が産生されるように設計することができる。

【0331】

したがって、いくつかの実施形態では、本開示の遺伝子操作細菌は、例えば、低酸素環境において外因性環境シグナルを感知した後に死ぬようにさらにプログラムされる。いくつかの実施形態では、本開示の遺伝子操作細菌、例えば、 $arg^{A^f b^r}$ およびリプラー $ArgR$ を発現する細菌は、1つまたは複数のリコンビナーゼをコードする1つまたは複数の遺伝子を含み、その発現は、環境条件またはシグナルに反応した誘導され、細胞

10

20

30

40

50

を殺滅する毒素の発現を最終的にもたらず1つまたは複数の組換え事象を引き起こす。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの組換え事象は、第1のレコンビナーゼによってフリップされた後に構成的に発現する細菌毒素をコードする逆方向異種遺伝子のフリッピングである。一実施形態では、細菌毒素の構成的発現は、遺伝子操作細菌を殺滅する。これらの種類のキルスイッチシステムでは、操作細菌が外因性環境条件を感知し、目的の異種遺伝子を発現したならば、組換え細菌細胞は、もはや生存しない。

【0332】

他の実施形態では、本開示の遺伝子操作細菌、例えば、 $argA^{fbr}$ およびリプレッサー $ArgR$ を発現する細菌が少なくとも1つの組換え事象を引き起こす環境条件またはシグナルに反応して1つまたは複数のリコンビナーゼを発現し、遺伝子操作細菌は、外因性環境条件またはシグナルに反応して抗毒素をコードする異種遺伝子をさらに発現する。一実施形態では、少なくとも1つの組換え事象は、第1のリコンビナーゼによる細菌毒素をコードする逆方向異種遺伝子のフリッピングである。一実施形態では、細菌毒素をコードする逆方向異種遺伝子は、第1のフォワードリコンビナーゼ認識配列と第1のリバースリコンビナーゼ認識配列との間に位置する。一実施形態では、細菌毒素をコードする異種遺伝子は、それが第1のリコンビナーゼによりフリップされた後に構成的に発現する。一実施形態では、抗毒素は、毒素の活性を阻害し、それにより遺伝子操作細菌の死を遅らせる。一実施形態では、外因性環境条件がもはや存在しない場合に抗毒素をコードする異種遺伝子がもはや発現しない場合、遺伝子操作細菌は、細菌毒素により殺滅される。

【0333】

他の実施形態では、少なくとも1つの組換え事象は、第1のリコンビナーゼによる第2のリコンビナーゼをコードする逆方向異種遺伝子のフリッピングとそれに続く第2のリコンビナーゼによる細菌毒素をコードする逆方向異種遺伝子のフリッピングである。一実施形態では、第2のリコンビナーゼをコードする逆方向異種遺伝子は、第1のフォワードリコンビナーゼ認識配列と第1のリバースリコンビナーゼ認識配列との間に位置する。一実施形態では、細菌毒素をコードする逆方向異種遺伝子は、第2のフォワードリコンビナーゼ認識配列と第2のリバースリコンビナーゼ認識配列との間に位置する。一実施形態では、第2のリコンビナーゼをコードする異種遺伝子は、それが第1のリコンビナーゼによりフリップした後に構成的に発現する。一実施形態では、細菌毒素をコードする異種遺伝子は、それが第2のリコンビナーゼによりフリップされた後に構成的に発現する。一実施形態では、遺伝子操作細菌は、細菌毒素により殺滅される。一実施形態では、遺伝子操作細菌は、外因性環境条件に反応して抗毒素をコードする異種遺伝子をさらに発現する。一実施形態では、抗毒素は、外因性環境条件が存在する場合に毒素の活性を阻害し、それにより遺伝子操作細菌の死を遅らせる。一実施形態では、外因性環境条件がもはや存在しない場合に抗毒素をコードする異種遺伝子がもはや発現しない場合、遺伝子操作細菌は、細菌毒素により殺滅される。

【0334】

一実施形態では、少なくとも1つの組換え事象は、第1のリコンビナーゼによる第2のリコンビナーゼをコードする逆方向異種遺伝子のフリッピングとそれに続く第2のリコンビナーゼによる第3のリコンビナーゼをコードする逆方向異種遺伝子のフリッピングとそれに続く第3のリコンビナーゼによる細菌毒素をコードする逆方向異種遺伝子のフリッピングである。

【0335】

一実施形態では、少なくとも1つの組換え事象は、第1のリコンビナーゼによる第1の切除酵素をコードする逆方向異種遺伝子のフリッピングである。一実施形態では、第1の切除酵素をコードする逆方向異種遺伝子は、第1のフォワードリコンビナーゼ認識配列と第1のリバースリコンビナーゼ認識配列との間に位置する。一実施形態では、第1の切除酵素をコードする異種遺伝子は、それが第1のリコンビナーゼによりフリップされた後に構成的に発現する。一実施形態では、第1の切除酵素は、第1の必須遺伝子を切除する。一実施形態では、プログラムされた組換え細菌細胞は、第1の必須遺伝子が切除された後

10

20

30

40

50

に生存しない。

【0336】

一実施形態では、第1のリコンビナーゼは、第2の切除酵素をコードする逆方向異種遺伝子をさらにフリップする。一実施形態では、第2の切除酵素をコードする逆方向異種遺伝子は、第2のフォワードリコンビナーゼ認識配列と第2のリバースリコンビナーゼ認識配列との間に位置する。一実施形態では、第2の切除酵素をコードする異種遺伝子は、それが第1のリコンビナーゼによりフリップされた後に構成的に発現する。一実施形態では、第1の必須遺伝子および第2必須遺伝子の両方が切除される場合、遺伝子操作細菌は、死ぬかまたはもはや生存できない。一実施形態では、第1のリコンビナーゼにより第1の必須遺伝子が切除されるかまたは第2の必須遺伝子が切除される場合、遺伝子操作細菌は、死ぬかまたはもはや生存できない。

10

【0337】

一実施形態では、遺伝子操作細菌は、少なくとも1つの組換え事象が起こった後に死ぬ。他の実施形態では、遺伝子操作細菌は、少なくとも1つの組換え事象が起こった後にもはや生存できない。

【0338】

これらの実施形態のいずれかにおいて、リコンビナーゼは、BxbI、PhiC31、TP901、BxbI、PhiC31、TP901、HK022、HP1、R4、Int1、Int2、Int3、Int4、Int5、Int6、Int7、Int8、Int9、Int10、Int11、Int12、Int13、Int14、Int15、Int16、Int17、Int18、Int19、Int20、Int21、Int22、Int23、Int24、Int25、Int26、Int27、Int28、Int29、Int30、Int31、Int32、Int33、およびInt34からなる群またはその生物学的活性な断片から選択されるリコンビナーゼであり得る。

20

【0339】

上述のキルスイッチ回路において、毒素は、環境因子またはシグナルの存在下で産生される。キルスイッチ回路の他の態様では、毒素は、環境因子の存在下で抑制され（産生されず）、環境条件または外部シグナルがもはや存在しなくなれば、産生され得る。毒素が環境因子またはシグナルの存在下で抑制され（かつ外部シグナルが除去されたならば活性化される）例示的キルスイッチを図66～68に示す。本開示は、外因性環境においてアラビノースまたは他の糖を感知することにより1つまたは複数の異種遺伝子を発現する組換え細菌細胞を提供する。この態様では、組換え細菌細胞は、AraC転写因子をコードする、araC遺伝子、ならびにaraBADプロモーターの制御下の1つまたは複数の遺伝子を含む。アラビノースの非存在下では、AraC転写因子は、araBADプロモーターの制御下の遺伝子の転写を抑制する立体配座をとる。アラビノースの存在下では、AraC転写因子は、所望の遺伝子、例えば、毒素遺伝子の発現を抑制するtetRの発現を誘導する、araBADプロモーターに結合し、活性化することを可能にする立体配座の変化を受ける。この実施形態では、毒素遺伝子は、アラビノースまたは他の糖の存在下で抑制される。アラビノースが存在しない環境においては、tetR遺伝子が活性化されず、毒素が発現し、それにより細菌を殺滅する。必須遺伝子がアラビノースまたは他の糖の存在下でのみ発現し、アラビノースまたは他の糖が環境に存在しない場合には発現しないという、アラビノース系を用いて、必須遺伝子を発現させることもできる。

30

40

【0340】

したがって、外因性環境中のアラビノースを感知することにより1つまたは複数の異種遺伝子が発現するいくつかの実施形態では、1つまたは複数の異種遺伝子は、直接的または間接的にaraBADプロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態では、発現異種遺伝子は、異種治療用遺伝子、抗毒素をコードする異種遺伝子、リプレッサタンパク質もしくはポリペプチド、例えば、TetRリプレッサーをコードする異種遺伝子、細菌細胞に見いだされない必須タンパク質をコードする異種遺伝子および/または調節タンパク質もしくはポリペプチドをコードする異種遺伝子のうちの1つまたは複数から選択され

50

る。

【0341】

いくつかの実施形態では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子は、直接的または間接的に $araBAD$ プロモーターの制御下にある。図13に例示的な BAD プロモーター駆動 $argA^{fbr}$ 構築物の概略図を示す。この実施形態では、 $argA^{fbr}$ 遺伝子は、 $araC$ 遺伝子と $araD$ 遺伝子との間に挿入されている。 $argA^{fbr}$ は、リボソーム結合部位、 FRT 部位および1つまたは複数の転写終結配列により隣接されている。例示的な BAD プロモーター駆動 $argA^{fbr}$ 構築物の核酸配列を表19に示す。すべての太字の配列はニッスルゲノムDNAである。 $araC$ 遺伝子の一部は太字の下線付きであり、 $argA^{fbr}$ 遺伝子は囲み線付きであり、間の太字の配列は、アラビノースの存在下で活性化されるプロモーターである。リボソーム結合部位は斜体であり、終結配列は網掛け付きであり、 FRT 部位は囲み線付きである。 $araD$ 遺伝子の一部は点線の囲み線付きである。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号67の BAD プロモーター配列またはその機能性断片と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%相同である核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号67の BAD プロモーター配列またはその機能性断片を含む。

【0342】

【表 2 1 - 1】

表 1 9

例示的なBADプロモーター駆動 $argA^{f^b r}$ のヌクレオチド配列 (配列番号67)	
<u>cgacggtggcgatagggcatccgggtggtgctcaaaagcagcttcgcctgactga</u>	
<u>tgcgctggtcctcgcgccagcttaatacgtaatccctaactgctggcggaaca</u>	10
<u>aatgcgacagacgcgacggcgacaggcagacatgctgtgacgctggcgataat</u>	
<u>caaaattactgtctgccagggtgatcgctgatgtactgacaagcctcgcgtaccc</u>	
<u>gattatccatcgggtggatggagcgactcggttaatcgcttccatgcccgcagta</u>	
<u>acaattgctcaagcagatttatcgccagcaattccgaatagcgcccttcccctt</u>	
<u>gtccggcattaatgatttgccaaacaggctcgctgaaatgcccgtggtgcgctt</u>	
<u>catccgggagaaagaaaccggtattggcaaatacgcagccagttaagccatt</u>	
<u>catgccagtagggcgcgaggagaaagtaaaccactggtgataccattcgtgag</u>	
<u>cctccggatgacgaccgtagtgatgaaatctctccaggcgaggaaacagcaaaat</u>	20
<u>caccggctcggcagacaaaattctcgtccctgattttaccaccccctgaccgc</u>	
<u>gaaatggtgagattgagaataaacctttcattcccagcggtcggtcgataaaaa</u>	
<u>aatcgagataaccgttggcctcaatcggcgtaaacccgccaccagatgggctg</u>	
<u>taaacgagtatcccggcagcaggggatcattttgccccttcagccatacttttca</u>	
<u>tactcccgcattcagagaagaaaccaattgtccatattgcatcagacattgcc</u>	
<u>gtcaactgctcttttactggctcttctcgttaacccaaccggttaaccccgtta</u>	
<u>ttaaaagcattctgtaaaaagcgggaccaaagccatgacaaaaacgcgtaaca</u>	30
<u>aaagtgtctataatcacggcagaaaagtcacattgattattgacggcggtca</u>	
<u>cactttgctatgccatagcatttttatccataagattagcggatccagcctgac</u>	
<u>gctttttttcgcaactctctactgtttctccatacccggtttttttggatggagt</u>	
<u>gaaacg</u> ATGGTAAAGGAACGTAAAACCGAGTTGGTCGAGGGATTCCGCCATTC	
GGTTCCCTGTATCAATACCCACCGGGGAAAAACGTTTGTTCATCATGCTCGGCG	
GTGAAGCCATTGAGCATGAGAATTTCTCCAGTATCGTTAATGATATCGGGTTG	
TTGCACAGCCTCGGCATCCGTCTGGTGGTGGTCTATGGCGCACGTCCGCAGAT	
CGACGCAAATCTGGCTGCGCATCACCACGAACCGCTGTATCACAAGAATATAC	40

【表 2 1 - 2】

GTGTGACCGACGCCAAAACACTGGAAC TGGTGAAGCAGGCTGCGGGAACATTG	
CAACTGGATATTACTGCTCGCCTGTCGATGAGTCTCAATAACACGCCGCTGCA	
GGGCGCGCATATCAACGTCGTCAGTGGCAATTTTATTATTGCCAGCCGCTGG	
GCGTCGATGACGGCGTGGATTACTGCCATAGCGGGCGTATCCGGCGGATTGAT	
GAAGACGCGATCCATCGTCAACTGGACAGCGGTGCAATAGTGCTAATGGGGCC	
GGTCGCTGTTTCAGTCACTGGCGAGAGCTTTAACCTGACCTCGGAAGAGATTG	10
CCACTCAACTGGCCATCAAAC TGAAGCTGAAAAGATGATTGGTTTTTGCTCT	
TCCCAGGGCGTCACTAATGACGACGGT GATATTGTCTCCGAAC TTTTCCCTAA	
CGAAGCGCAAGCGCGGGTAGAAGCCAGGAAGAGAAAGGCGATTACAAC TCCG	
GTACGGT GCGCTTTT TGC GTGGCGCAGT GAAAGCCTGCCGCAGCGGCGT GCGT	
CGCTGTCATTTAATCAGTTATCAGGAAGATGGCGCGCTGTTGCAAGAGTTGTT	
CTCACGCGACGGTATCGGTACGCAGATTGTGATGGAAAGCGCCGAGCAGATTC	
GTGCGCAACAATCAACGATATTGGCGGTATTCTGGAGTTGATTCGCCCACTG	20
GAGCAGCAAGGTATTCTGGTACGCCGTTCTCGCGAGCAGCTGGAGATGGAAAT	
CGACAAATTCACCATTATTCAGCGCGATAACACGACTATTGCCTGCGCCGCGC	
TCTATCCGTTCCCGGAAGAGAAGATTGGGGAAATGGCCTGTGTGGCAGTTCAC	
CCGGATTACCGCAGTTCATCAAGGGGTGAAGTTCTGCTGGAACGCATTGCCGC	
TCAGGCTAAGCAGAGCGGCTTAAGCAAATTGTTTGTGCTGACCACGCGCAGTA	
TTCACTGGTTCCAGGAACGTGGATT TACCCAGTGGATATTGATTTACTGCC	
GAGAGCAAAAAGCAGTTGTACAAC TACCAGCGTAAATCCAAAGTGTGATGGC	30
GGATTTAGGGTAA TGGGAATTAGCCATGGTCCATATGAATATCCTCCTTAGTT	
CCTATTCC gaagttcctattccgaagttcctattctctagaaagtataggac	
ttc GAAGCAGCTCCAGCCTACACAATCGCTCAAGACGTGTAATGCTGCAATCT	
GCATGCAAGCTTGGCACTGGCCACGCA AAAAGCCATCCGTGAGGATGGCGCTG	
TGCTTAATTTGATGCC TGGCAGTTTATGGCGGGCGTCTGCCCCGCCACCCTCCG	
GGCCGTTGCTTCGCAACGTTCAAATCCGCTCCCGGCGGATTGTTCTAATCAGG	
AGAGCGTTACCCACA AACCAACATAAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTCA	40
GCCCTGGTTTTATTGATGCCTGGCAGTTCCTACTCTCGCATGctcgagcca	
tgggacgtc caggtattagaagccaacctggcgctgccaaaacacaacctggt	
cacgctcacctggggcaatgtcagcgccgttgatcgcgggcgcgcgctcctgg	

【表 2 1 - 3】

```

tgatcaaaccttccggcgtcgactacagcatcatgaccgctgacgatatggtc
gtggtcagcatcgaaaccgggtgaagtgggtgaaggtagcggaaagccctcctc
cgacacgcctaactcaccggctgctctatcaggcattcccgtctattggcggca
ttgtgcacacacactcgcgccacgccaccatctgggcgagggggccagtcg
attccagcagccggcaccacccacgccgactatttctacggcaccattccctg
cacccgcaaaa tgaccgacgcgagaaatcaacgggtgaaatagagtgggaaaccg
gtaacgtcatcgtagaaaccttcgaaaaacagggtatcaatgcagcgcgaaatg
cccggcgtgctgggtccatttctacggccatttgcatggggaaaaaacgccga
agatgagggtgcataacgccatcgtgctggaagaagtgcgttataatggggatat
tctgccgtcagttagcggcagttaccggatagcagcaaacgctgctggat
aaacactatctgcgtaagcatggcgcggaaggcatattacgggcagtaa

```

10

20

【0343】

アラビノース誘導性プロモーターは、当技術分野で公知であり、P_{ara}A、P_{ara}B、P_{ara}C および P_{ara}B_AD を含む。一実施形態では、アラビノース誘導性プロモーターは、大腸菌に由来する。いくつかの実施形態では、P_{ara}C プロモーターおよび P_{ara}B_AD プロモーターは、二方向性プロモーターとして作動し、P_{ara}B_AD プロモーターは、1つの方向の異種遺伝子（複数可）の発現を制御し、P_{ara}C（P_{ara}B_AD プロモーターに近接し、それと反対側の鎖上の）は、他の方向の異種遺伝子（複数可）の発現を制御する。アラビノースの存在下では、両プロモーターからの両異種遺伝子の転写が誘導される。しかし、アラビノースの非存在下では、両プロモーターからの両異種遺伝子の転写は誘導されない。

30

【0344】

本開示の1つの例示的实施形態では、本開示の操作細菌は、少なくとも以下の配列：テトラサイクリンリプレッサータンパク質（TetR）をコードする異種遺伝子に作動可能に連結した P_{ara}B_AD プロモーター、AraC 転写因子をコードする異種遺伝子に作動可能に連結した P_{ara}C プロモーター、およびテトラサイクリンリプレッサータンパク質（P_{TetR}）により抑制されるプロモーターに作動可能に連結した細菌毒素をコードする異種遺伝子を有するキルスイッチを含む。アラビノースの存在下では、AraC 転写因子が P_{ara}B_AD プロモーターを活性化し、これが TetR タンパク質の転写を活性化し、これが次に毒素の転写を抑制する。しかし、アラビノースの非存在下では、AraC が P_{ara}B_AD プロモーターからの転写を抑制し、TetR タンパク質は発現しない。この場合、異種毒素遺伝子の発現が活性化され、毒素が発現する。毒素は、組換え細菌細胞中に蓄積し、組換え細菌細胞は殺滅される。一実施形態では、AraC 転写因子をコードする araC 遺伝子は、構成的プロモーターの制御下にあり、したがって、構成的に発現する。

40

【0345】

本開示の一実施形態では、組換え細菌細胞は、構成的プロモーターの制御下の抗毒素をさらに含む。この状況において、アラビノースの存在下では、TetR タンパク質による抑制のため、毒素が発現せず、抗毒素タンパク質が細胞中に蓄積する。しかし、アラビノースの非存在下では、TetR タンパク質は発現せず、毒素の発現が誘導される。毒素は

50

、組換え細菌細胞内に蓄積し始める。毒素タンパク質が細胞中の抗毒素タンパク質の量と等しいかまたはそれより多量に存在したならば、組換え細菌細胞がもはや生存できず、組換え細菌細胞は、毒素により殺滅される。

【0346】

本開示の他の実施形態では、組換え細菌細胞は、P_{a r a B A D}プロモーターの制御下の抗毒素をさらに含む。この状況において、アラビノースの存在下では、TetRおよび抗毒素が発現し、抗毒素が細胞中に蓄積し、TetRタンパク質による抑制により、毒素は、発現しない。しかし、アラビノースの非存在下では、TetRタンパク質および抗毒素の両方が発現せず、毒素の発現が誘導される。毒素は、組換え細菌細胞内に蓄積し始める。毒素タンパク質が発現したならば、組換え細菌細胞がもはや生存できず、組換え細菌細胞は、毒素により殺滅される。

10

【0347】

本開示の他の例示的实施形態では、本開示の操作細菌は、少なくとも以下の配列を有するキルスイッチを含む：組換え細菌細胞中に見いだされない（かつ生存に必要な）必須ポリペプチドをコードする異種遺伝子に作動可能に連結したP_{a r a B A D}プロモーターおよびAraC転写因子をコードする異種遺伝子に作動可能に連結したP_{a r a C}プロモーター。アラビノースの存在下では、AraC転写因子がP_{a r a B A D}プロモーターを活性化し、必須ポリペプチドをコードする異種遺伝子の転写を活性化し、組換え細菌細胞が生存することが可能になる。しかし、アラビノースの非存在下では、AraCがP_{a r a B A D}プロモーターからの転写を抑制し、生存に必要な必須タンパク質が発現しない。この場合、組換え細菌細胞は、アラビノースの非存在下で死ぬ。いくつかの実施形態では、組換え細菌細胞に見いだされない必須ポリペプチドをコードする異種遺伝子に作動可能に連結したP_{a r a B A D}プロモーターの配列は、直前に述べたTetR/毒素キルスイッチシステムとともに細菌細胞中に存在し得る。いくつかの実施形態では、組換え細菌細胞に見いだされない必須ポリペプチドをコードする異種遺伝子に作動可能に連結したP_{a r a B A D}プロモーターの配列は、直前に述べたTetR/毒素/抗毒素キルスイッチシステムとともに細菌細胞中に存在し得る。

20

【0348】

他の実施形態では、細菌は、短寿命抗毒素および長寿命毒素の両方を産生するプラスミドを含むプラスミド安定システムを含み得る。このシステムでは、細菌細胞は、毒素を中和するために等量の毒素および抗毒素を産生する。しかし、細胞がプラスミドを失うならば/場合、短寿命抗毒素は、減衰し始める。抗毒素が完全に減衰した場合、長寿命毒素が細胞を殺滅した結果として、細胞は死ぬ。

30

【0349】

いくつかの実施形態では、本開示の操作細菌、例えば、argA^{f b r}およびリプレッサーArgRを発現する細菌は、上述のキルスイッチ回路のいずれかの構成要素をコードする遺伝子（複数可）をさらに含む。

【0350】

上述の実施形態のいずれかにおいて、細菌毒素は、リシン、Hok、Fst、TisB、LdrD、Kid、SymE、MazF、FlmA、Ibs、XCV2162、dinJ、CcdB、MazF、ParE、YafO、Zeta、hicB、relB、yhaV、yoeB、chpBK、hipA、ミクロシンB、ミクロシンB17、ミクロシンC、ミクロシンC7-C51、ミクロシンJ25、ミクロシンColV、ミクロシン24、ミクロシンL、ミクロシンD93、ミクロシンL、ミクロシンE492、ミクロシンH47、ミクロシンI47、ミクロシンM、コリシンA、コリシンE1、コリシンK、コリシンN、コリシンU、コリシンB、コリシンIa、コリシンIb、コリシン5、コリシン10、コリシンS4、コリシンY、コリシンE2、コリシンE7、コリシンE8、コリシンE9、コリシンE3、コリシンE4、コリシンE6；コリシンE5、コリシンD、コリシンMおよびクロアシンDF13、またはその生物学的に活性な断片からなる群から選択される。

40

50

【0351】

上述の実施形態のいずれかにおいて、抗毒素は、抗リシン、Sok、RNAII、IstR、RdlD、Kis、SymR、MazE、FlmB、Sib、ptaRNA1、yafQ、CcdA、MazE、ParD、yafN、Epsilon、HicA、relE、prlF、yefM、chpBI、hipB、MccE、MccE^{CTD}、MccF、Cai、ImmE1、Cki、Cni、Cui、Cbi、Iia、Imm、Cfi、Imm10、Csi、Cyi、Im2、Im7、Im8、Im9、Im3、Im4、ImmE6、クロアシン免疫タンパク質(Cim)、ImmE5、ImmDおよびCmi、またはその生物学的に活性な断片からなる群から選択される。

【0352】

一実施形態では、細菌毒素は、遺伝子操作細菌に対して殺菌性である。一実施形態では、細菌毒素は、遺伝子操作細菌に対して静菌性である。

【0353】

いくつかの実施形態では、本明細書に示す操作細菌は、突然変異アルギニンレギュロンが同じ条件下の同じ細菌亜型の非改変レギュロンより多くのアルギニンおよび/または中間副産物を産生するように、アルギニン生合成経路における、グルタミン酸をアルギニンおよび/または中間副産物、例えば、シトルリンに変換することに関与する酵素をコードするオペロンのそれぞれのアルギニン媒介抑制を低減または消失させる1つまたは複数の核酸突然変異を含むアルギニンレギュロンを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体、例えば、argA^{fbr}を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニン生合成酵素N-アセチルグルタミン酸キナーゼ、N-アセチルグルタミン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ、N-アセチルオルニチナーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギニノコハク酸シンターゼアルギニノコハク酸リアーゼおよびカルバモイルリン酸シンターゼをコードする1つまたは複数のオペロンのそれぞれの少なくとも1つのARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンレギュロンを含み、それにより、レギュロンを活性化し、アルギニンおよび/または中間副産物の生合成を増強する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体をさらに含む。いくつかの実施形態では、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体は、酸素レベル依存性プロモーターにより制御される。いくつかの実施形態では、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体は、低酸素または嫌気的条件下で誘導されるプロモーターにより制御される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、フマル酸・硝酸レダクターゼ調節因子(FNR)プロモーター、アルギニンデイミナーゼおよび硝酸還元(ANR)プロモーターおよび異化型硝酸呼吸調節因子(DNR)プロモーターから選択される。いくつかの実施形態では、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体は、argA^{fbr}である。

【0354】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニン生合成酵素およびアルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体をコードするオペロンのそれぞれの少なくとも1つのARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンレギュロンを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、突然変異アルギニンレギュロンを含み、細菌は、同じ条件下の同じ細菌亜型の野生型N-アセチルグルタミン酸シンターゼと比較してアルギニンフィードバック阻害を減少させるように突然変異させた機能性N-アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする遺伝子を含み、突然変異N-アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする遺伝子の発現は、低酸素または嫌気的条件下で誘導されるプロモーターにより制御され、突然変異アルギニンレギュロンは、アルギニン合成酵素N-アセチルグルタミン酸キナーゼ、N-アセチルグルタミン酸レダクターゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ

10

20

30

40

50

、N - アセチルオルニチナーゼ、カルバモイルリン酸シンターゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギニノコハク酸シンターゼおよびアルギニノコハク酸リアーゼをコードする遺伝子を含む1つまたは複数のオペロンを含み、各オペロンは、ArgRリプレッサーの結合によりオペロンのアルギニン媒介抑制を低減させる1つまたは複数の核酸突然変異を特徴とする1つまたは複数の突然変異ARGボックスを含み、オペロンにおける遺伝子の転写を促進するのに十分な親和性を有するRNAポリメラーゼ結合を保持している。

【0355】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニン生合成酵素およびアルギニンフィードバック抵抗性N - アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体をコードするオペロンのそれぞれの少なくとも1つのARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンレギュロンを含む栄養要求体である。一実施形態では、アルギニン生合成酵素およびアルギニンフィードバック抵抗性N - アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体をコードするオペロンのそれぞれの少なくとも1つのARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンレギュロンを含む遺伝子操作細菌は、cysE、glnA、ilvD、leuB、lysA、serA、metA、glyA、hisB、ilvA、pheA、proA、thrC、trpC、tyrA、thyA、uraA、dapA、dapB、dapD、dapE、dapF、flhD、metB、metC、proAB、およびthi1栄養要求体から選択される栄養要求体である。いくつかの実施形態では、操作細菌は、複数の栄養要求性を有する。例えば、それらは、thyAおよびdapA栄養要求体であり得る。

【0356】

いくつかの実施形態では、アルギニン生合成酵素およびアルギニンフィードバック抵抗性N - アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体をコードするオペロンのそれぞれの少なくとも1つのARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンレギュロンを含む遺伝子操作細菌は、本明細書で示すキルスイッチ回路のいずれかのような、キルスイッチ回路をさらに含む。例えば、いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、誘導性プロモーターの制御下の1つまたは複数のリコンビナーゼをコードする1つまたは複数の遺伝子および逆方向毒素配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、抗毒素をコードする1つまたは複数の遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態では、操作細菌は、誘導性プロモーターの制御下の1つまたは複数のリコンビナーゼをコードする1つまたは複数の遺伝子および1つまたは複数の逆方向切除遺伝子をさらに含み、切除遺伝子(複数可)は、必須遺伝子を欠失させる酵素をコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、抗毒素をコードする1つまたは複数の遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態では、操作細菌は、TetRリプレッサー結合部位を有するプロモーターの制御下の毒素をコードする1つまたは複数の遺伝子およびParABのような、アラビノースにより誘導される誘導性プロモーターの制御下のTetRをコードする遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、抗毒素をコードする1つまたは複数の遺伝子をさらに含む。

【0357】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニン生合成酵素およびアルギニンフィードバック抵抗性N - アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体をコードするオペロンのそれぞれの少なくとも1つのARGボックスにおける1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンレギュロンを含み、本明細書に記載のキルスイッチ回路のいずれかのような、キルスイッチ回路をさらに含む栄養要求体である。

【0358】

上述の遺伝子操作細菌のいくつかの実施形態では、アルギニンフィードバック抵抗性N - アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする遺伝子は、細菌におけるプラスミド上に存在し、低酸素または嫌気的条件下で誘導されるプロモーターにプラスミド上で作動可能に連結されている。他の実施形態では、アルギニンフィードバック抵抗性N - アセチル

10

20

30

40

50

グルタミン酸シンターゼをコードする遺伝子は、細菌染色体に存在し、低酸素または嫌気的条件下で誘導されるプロモーターに染色体において作動可能に連結されている。

【0359】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンリプレッサー機能が低下もしくは不活性である、あるいは遺伝子操作細菌がアルギニンリプレッサーを有さず（例えば、アルギニンリプレッサー遺伝子が欠失した）、レギュロンの抑制解除ならびにアルギニンおよび/または中間副産物の生合成の増大をもたらすような1つまたは複数の核酸突然変異を含む突然変異アルギニンリプレッサーを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体をさらに含む。いくつかの実施形態では、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体は、酸素レベル依存性プロモーターにより制御される。いくつかの実施形態では、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体は、低酸素または嫌気的条件下で誘導されるプロモーターにより制御される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、フマル酸・硝酸レダクターゼ調節因子(FNR)プロモーター、アルギニンデイミナーゼおよび硝酸還元(ANR)プロモーターおよび異化型硝酸呼吸調節因子(DNR)プロモーターから選択される。いくつかの実施形態では、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体は、argA^{fbr}である。

10

【0360】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、突然変異または欠失アルギニンリプレッサーおよびアルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、アルギニンレギュロンを含み、細菌は、同じ条件下の同じ細菌亜型の野生型N-アセチルグルタミン酸シンターゼと比較して低いアルギニンフィードバック阻害を有する機能性N-アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする遺伝子を含み、アルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする遺伝子の発現は、外因性環境条件により誘導されるプロモーターにより制御され、細菌は、機能性ArgRリプレッサーを欠くように遺伝子操作された。

20

【0361】

いくつかの実施形態では、突然変異または欠失アルギニンリプレッサーおよびアルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体を含む遺伝子操作細菌は、栄養要求体である。一実施形態では、突然変異または欠失アルギニンリプレッサーおよびアルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体を含む遺伝子操作細菌は、cysE、glnA、ilvD、leuB、lysA、serA、metA、glyA、hisB、ilvA、pheA、proA、thrC、trpC、tyrA、thyA、uraA、dapA、dapB、dapD、dapE、dapF、flhD、metB、metC、proAB、およびthi1栄養要求体から選択される栄養要求体である。いくつかの実施形態では、操作細菌は、複数の栄養要求性を有する。例えば、それらは、thyAおよびdapA栄養要求体であり得る。

30

【0362】

いくつかの実施形態では、突然変異または欠失アルギニンリプレッサーおよびアルギニンフィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体を含む遺伝子操作細菌は、本明細書で示したキルスイッチ回路のいずれかのような、キルスイッチ回路をさらに含む。例えば、いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、誘導性プロモーターの制御下の1つまたは複数のリコンビナーゼをコードする1つまたは複数の遺伝子および逆方向毒素配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、抗毒素をコードする1つまたは複数の遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態では、操作細菌は、誘導性プロモーターの制御下の1つまたは複数のリコンビナーゼをコードする1つまたは複数の遺伝子および1つまたは複数の逆方向切除遺伝子をさらに含む、切除遺伝子(複数可)は、必須遺伝子を欠失させる酵素をコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子操

40

50

作細菌は、抗毒素をコードする1つまたは複数の遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態では、操作細菌は、T e t Rリプレッサー結合部位を有するプロモーターの制御下の毒素をコードする1つまたは複数の遺伝子およびP a r a B A Dのような、アラビノースにより誘導される誘導性プロモーターの制御下のT e t Rをコードする遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、抗毒素をコードする1つまたは複数の遺伝子をさらに含む。

【0363】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、突然変異または欠失アルギニンリプレッサーおよびアルギニンフィードバック抵抗性N - アセチルグルタミン酸シンターゼ突然変異体を含む栄養要求体であり、本明細書に記載のキルスイッチ回路のいずれかのような、キルスイッチ回路をさらに含む。

10

【0364】

上述の遺伝子操作細菌のいくつかの実施形態では、アルギニンフィードバック抵抗性N - アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする遺伝子は、細菌におけるプラスミド上に存在し、低酸素または嫌気的条件下で誘導されるプロモーターにプラスミド上で作動可能に連結されている。他の実施形態では、アルギニンフィードバック抵抗性N - アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする遺伝子は、細菌染色体に存在し、低酸素または嫌気的条件下で誘導されるプロモーターに染色体において作動可能に連結されている。

【0365】

アンモニア輸送体

20

細胞内へのアンモニアの輸送を増大させるために本発明の遺伝子操作細菌におけるアンモニア輸送体をさらに発現させるまたは改変することができる。A m t Bは、アンモニアを細菌細胞内に輸送する膜輸送タンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、天然a m t B遺伝子の複数のコピーも含む。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、異なる細菌種に由来するa m t B遺伝子も含む。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、異なる細菌種に由来するa m t B遺伝子の複数のコピーを含む。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌における天然a m t B遺伝子は、改変されていない。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、その天然プロモーター、誘導性プロモーター、または天然プロモーターより強いプロモーター、例えば、G l n R Sプロモーター、P (B l a)プロモーター、または構成的プロモーターにより制御されるa m t B遺伝子を含む。

30

【0366】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌における天然a m t B遺伝子は、改変されておらず、天然a m t B遺伝子の1つもしくは複数の追加のコピーが、a r g A^{f b r}の発現を制御する同じ誘導性プロモーター、例えば、F N Rプロモーター、またはa r g A^{f b r}の発現を制御するものと異なる誘導性プロモーター、または構成的プロモーターの制御下にゲノムに挿入されている。代替実施形態では、天然a m t B遺伝子は、改変されておらず、異なる細菌種に由来する非天然a m t B遺伝子のコピーが、a r g A^{f b r}の発現を制御する同じ誘導性プロモーター、例えば、F N Rプロモーター、またはa r g A^{f b r}の発現を制御するものと異なる誘導性プロモーター、または構成的プロモーターの制御下にゲノムに挿入されている。

40

【0367】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌における天然a m t B遺伝子は、改変されておらず、天然a m t B遺伝子の1つもしくは複数の追加のコピーが、細菌におけるプラスミド上に存在し、a r g A^{f b r}の発現を制御する同じ誘導性プロモーター、例えば、F N Rプロモーター、またはa r g A^{f b r}の発現を制御するものと異なる誘導性プロモーター、または構成的プロモーターの制御下にある。代替実施形態では、天然a m t B遺伝子は、改変されておらず、異なる細菌種に由来する非天然a m t B遺伝子のコピーが、細菌におけるプラスミド上に存在し、a r g A^{f b r}の発現を制御する同じ誘導性プロモーター、例えば、F N Rプロモーター、またはa r g A^{f b r}の発現を制御するものと異なる

50

る誘導性プロモーター、または構成的プロモーターの制御下にある。

【0368】

いくつかの実施形態では、天然 *amtB* 遺伝子に突然変異を起こさせ、アンモニア輸送の増加を示す突然変異体を選択し、突然変異体した *amtB* 遺伝子を単離し、遺伝子操作細菌に挿入する。いくつかの実施形態では、天然 *amtB* 遺伝子に突然変異を起こさせ、アンモニア輸送の増加を示す突然変異体を選択し、それらの突然変異体を用いて、本発明の細菌を作製する。本明細書に記載のアンモニア輸送体の改変は、プラスミドまたは染色体に存在し得る。

【0369】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、大腸菌ニッスルであり、大腸菌ニッスルにおける天然 *amtB* 遺伝子は、改変されておらず、天然大腸菌ニッスル *amtB* 遺伝子の1つもしくは複数の追加のコピーが、*argA^{fbr}* の発現を制御する同じ誘導性プロモーター、例えば、FNRプロモーター、または *argA^{fbr}* の発現を制御するものと異なる誘導性プロモーター、または構成的プロモーターの制御下に大腸菌ニッスルゲノムに挿入されている。代替実施形態では、大腸菌ニッスルにおける天然 *amtB* 遺伝子は、改変されておらず、異なる細菌、例えば、ラクトバシラス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) に由来する非天然 *amtB* 遺伝子のコピーが、*argA^{fbr}* の発現を制御する同じ誘導性プロモーター、例えば、FNRプロモーター、または *argA^{fbr}* の発現を制御するものと異なる誘導性プロモーター、または構成的プロモーターの制御下に大腸菌ニッスルゲノムに挿入されている。

【0370】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、大腸菌ニッスルであり、大腸菌ニッスルにおける天然 *amtB* 遺伝子は、改変されておらず、天然大腸菌ニッスル *amtB* 遺伝子の1つもしくは複数の追加のコピーが、細菌におけるプラスミド上に存在し、*argA^{fbr}* の発現を制御する同じ誘導性プロモーター、例えば、FNRプロモーター、または *argA^{fbr}* の発現を制御するものと異なる誘導性プロモーター、または構成的プロモーターの制御下にある。代替実施形態では、大腸菌ニッスルにおける天然 *amtB* 遺伝子は、改変されておらず、異なる細菌、例えば、ラクトバシラス・プランタルムに由来する非天然 *amtB* 遺伝子のコピーが、細菌におけるプラスミド上に存在し、*argA^{fbr}* の発現を制御する同じ誘導性プロモーター、例えば、FNRプロモーター、または *argA^{fbr}* の発現を制御するものと異なる誘導性プロモーター、または構成的プロモーターの制御下にある。

【0371】

医薬組成物および製剤

本明細書に記載の遺伝子操作細菌を含む医薬組成物は、高アンモニア血症に関連する障害または高アンモニア血症に随伴する症状（複数可）を治療する、管理する、改善する、かつ/または予防するために用いることができる。1つまたは複数の遺伝子操作細菌を、単独でまたは予防薬、治療薬および/または薬学的に許容される担体と一緒に含む医薬組成物を提供する。

【0372】

特定の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の遺伝子改変を含むように操作された細菌の1つの種、菌株または亜型を含む。代替実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載の遺伝子改変を含むように操作された細菌の2つまたはそれ以上の種、菌株および/または亜型を含む。

【0373】

本明細書に記載の医薬組成物は、有効成分を医薬用組成物に加工することを促進する、賦形剤および助剤を含む1つまたは複数の生理学的に許容される担体を用いて通常の方法で製剤化することができる。医薬組成物を製剤化する方法は、当技術分野で公知である（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Mack Publishing Co.、Easton、PA参照）。いくつかの

10

20

30

40

50

実施形態では、医薬組成物を打錠、凍結乾燥、直接圧縮、常法による混合、溶解、造粒、研和、乳化、カプセル封入、封入または噴霧乾燥にかけて、腸溶コーティングを施しても非被覆であってもよい、錠剤、顆粒剤、ナノ粒子、ナノカプセル、マイクロカプセル、微小錠剤、ペレット剤または散剤を形成する。適切な製剤は、投与経路に依存する。

【0374】

本明細書に記載の遺伝子操作細菌は、任意の適切な剤形（例えば、液剤、カプセル剤、サシェ剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、錠剤、腸溶性錠剤、懸濁散剤、顆粒剤または経口投与用のマトリックス持続放出製剤）の、および任意の適切な種類の投与（例えば、経口、局所、注射、即時放出、拍動性放出、遅延放出または持続放出）用の医薬組成物に製剤化することができる。遺伝子操作細菌の適切な投与量は、約 10^5 ~ 10^{12} 細菌、例えば、約 10^5 細菌、約 10^6 細菌、約 10^7 細菌、約 10^8 細菌、約 10^9 細菌、約 10^{10} 細菌、約 10^{11} 細菌または約 10^{11} 細菌の範囲であり得る。組成物は、1日、週または月1回もしくは複数回投与することができる。組成物は、食事の前、食事中または後に投与することができる。一実施形態では、対象が食事をとる前に医薬組成物を投与する。一実施形態では、医薬組成物を食事と同時に投与する。一実施形態では、対象が食事をとった後に医薬組成物を投与する。

【0375】

組成物は、日、週または月1回もしくは複数回投与することができる。遺伝子操作細菌は、1つまたは複数の薬学的に許容される担体、粘稠化剤、希釈剤、緩衝液、緩衝剤、界面活性剤、中性もしくは陽イオン性脂質、脂質複合体、リポソーム、浸透促進剤、担体化合物および他の薬学的に許容される担体または物質を含む医薬組成物に製剤化することができる。例えば、医薬組成物は、重炭酸カルシウム、重炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、様々な糖および種類のデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、ポリエチレングリコールならびに例えば、ポリソルベート20を含む界面活性剤の添加を含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、重炭酸ナトリウムの溶液、例えば、重炭酸ナトリウムの1モル溶液（例えば、胃などの、酸性細胞環境を緩衝するために）に製剤化することができる。遺伝子操作細菌は、中性または塩の形態として投与すること、かつ製剤化することができる。薬学的に許容される塩は、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等に由来するものなどの陰イオンとで形成されるものならびにナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等に由来するものなどの陽イオンとで形成されるものを含む。

【0376】

本明細書で開示した遺伝子操作細菌は、軟膏剤、クリーム剤、経皮貼付剤、ローション剤、ゲル剤、シャンプー、噴霧剤、エアゾール剤、液剤、乳剤の形態でまたは当業者に周知の他の形態で局所投与すること、かつ製剤化することができる。例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Mack Publishing Co.、Easton、PAを参照されたい。一実施形態では、非噴霧用局所剤形については、局所適用に適合性であり、水より大きい動粘度を有する担体または1つもしくは複数の賦形剤を含む粘稠から半固体または固体剤形が用いられる。適切な製剤は、滅菌することができるまたは様々な特性、例えば、浸透圧に影響を及ぼすための補助剤（例えば、保存剤、安定剤、湿潤剤、緩衝剤または塩）と混合することができる、液剤、懸濁剤、乳剤、クリーム剤、軟膏剤、散剤、塗布剤、軟膏剤等を含むが、これらに限定されない。他の適切な局所剤形は、有効成分が固体または液体不活性担体と一緒に加圧揮発性物質（例えば、フレオンなどのガス状噴射剤）との混合物でまたはスクイズボトルに包装されている噴霧用エアゾール製剤を含む。保湿剤または湿潤剤も医薬組成物および製剤に加えることができる。そのような付加的な成分の例は、当技術分野で周知である。一実施形態では、本発明の組換え細菌を含む医薬組成物は、衛生用品として製剤化することができる。例えば、衛生用品は、抗菌製剤または発酵プロスなどの発酵製品であり得る。衛生用品は、例えば、シャンプー、コンディショナー、クリーム、パスタ、ローシ

10

20

30

40

50

ョンおよびリップクリームであり得る。

【0377】

本明細書で開示した遺伝子操作細菌は、経口投与することができ、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー、懸濁剤等として製剤化することができる。経口用医薬組成物は、固体賦形剤を用い、得られた混合物を場合によっては粉碎し、所望の場合、適切な補助剤を加えた後に、顆粒剤の混合物を処理して、錠剤または糖衣錠コアを製造することができる。適切な賦形剤は、ラクトース、スクロース、マンニトールもしくはソルビトールを含む糖などの増量剤；トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボメチルセルロースナトリウムなどのセルロース組成物；および/またはポリビニルピロリドン（PVP）もしくはポリエチレングリコール（PEG）などの生理学的に許容されるポリマーを含むが、これらに限定されない。架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸またはアルギン酸ナトリウムなどのその塩などの崩壊剤も加えることもできる。

10

【0378】

錠剤またはカプセル剤は、結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコール、スクロース、グルコース、ソルビトール、デンプン、ゴム、カオリンおよびトラガント）；増量剤（例えば、ラクトース、結晶セルロースもしくはリン酸水素カルシウム）；滑沢剤（例えば、カルシウム、アルミニウム、亜鉛、ステアリン酸、ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、デンプン、安息香酸ナトリウム、L-ロイシン、ステアリン酸マグネシウム、タルクもしくはシリカ）；崩壊剤（例えば、デンプン、ジャガイモデンプン、デンプングリコール酸ナトリウム、糖、セルロース誘導体、シリカ粉末）；または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）などの薬学的に許容される賦形剤を用いて通常的手段により調製することができる。錠剤は、当技術分野で周知の方法により被覆することができる。コーティングシェルが存在していてもよく、一般的な膜は、ポリラクチド、ポリグリコール酸、ポリ無水物、他の生分解性ポリマー、アルギネート-ポリリシン-アルギネート（APA）、アルギネート-ポリメチレン-c o -グアニジン-アルギネート（A-PMCG-A）、ヒドロキシメチルアクリレート-メチルアクリレート（HEMA-MMA）、多層HEMA-MMA-MAA、ポリアクリロニトリル塩化ビニル（PAN-PVC）、アクリロニトリル/メチルスルホン酸ナトリウム（AN-69）、ポリエチレングリコール/ポリペンタメチルシクロペンタシロキサンのポリジメチルシロキサン（PEG/PD5/PDMS）、ポリN,N-ジメチルアクリルアミド（PDMAAm）、珪質カプセル化物、硫酸セルロース/アルギン酸ナトリウム/ポリメチレン-c o -グアニジン（CS/A/PMCG）、酢酸フタル酸セルロース、アルギン酸ナトリウム、k-カラギーナン-ローカストビーンガムゲルビーズ、ゲラン-キサタンビーズ、ポリ（ラクチド-c o グリコリド）、カラギーナン、デンプンポリ無水物、デンプンポリメタクリレート、ポリアミノ酸および腸溶コーティングポリマーを含むが、これらに限定されない。

20

30

【0379】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、消化管または消化管の特定の領域、例えば、大腸内への放出のために腸溶コーティングを施す。胃から結腸までの一般的なpHプロファイルは、約1~4（胃）、5.5~6（十二指腸）、7.3~8.0（回腸）および5.5~6.5（結腸）である。一部の疾患では、pHプロファイルを修正することができる。いくつかの実施形態では、コーティングは、放出部位を規定するために特定のpH環境において分解する。いくつかの実施形態では、少なくとも2種のコーティングを用いる。いくつかの実施形態では、外側コーティングおよび内側コーティングが異なるpHレベルで分解する。

40

【0380】

経口投与用の液体製剤は、液剤、シロップ剤、懸濁剤または使用前に水もしくは他の適

50

切な媒体で構成するための乾燥製剤の形態をとり得る。そのような液体製剤は、懸濁化剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または水素化食用脂肪）；乳化剤（例えば、レシチンまたはアラビアゴム）；非水性媒体（例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコールまたは分別植物油）；および保存剤（例えば、メチルもしくはプロピル - p - ヒドロキシベンゾエートまたはソルビン酸）などの薬学的に許容される物質を用いて通常的手段により調製することができる。製剤は、適宜、緩衝塩類、着香料、着色剤および甘味料も含み得る。経口投与用の製剤は、本明細書に記載の遺伝子操作細菌の徐放、制御放出または持続放出用に適切に製剤化することができる。

【0381】

一実施形態では、本開示の遺伝子操作細菌は、小児対象への投与に適する組成物に製剤化することができる。当技術分野で周知のように、小児は、胃排出速度、pH、消化管透過性等を含む多くの面で成人と異なる（Ivanovskaら、2014年）。さらに、投与経路および味覚特性などの、小児用製剤の受容性および好みは、容認できる小児のコンプライアンスを達成するために重要である。したがって、一実施形態では、小児対象への投与に適する組成物は、飲み込み易い若しくは溶ける剤形、または添加着香料、甘味料もしくは味覚ブロッカーを含む組成物などの、より味の良い組成物を含み得る。一実施形態では、小児対象への投与に適する組成物は、成人への投与に適するものでもあり得る。

10

【0382】

一実施形態では、小児対象への投与に適する組成物は、液剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤、懸濁剤もしくは液剤として再構成するための散剤、分散/発泡錠、咀嚼錠剤、グミキャンディー、ロリポップ、フリーザーポップ、トローチ剤、チューインガム、経口薄型ストリップ、口内崩壊錠剤、サシェ剤、軟ゼラチンカプセル剤、振りかけ経口散剤、または顆粒剤を含み得る。一実施形態では、組成物は、キャンディーに弾性、所望の噛みごたえのある堅さおよびより長い貯蔵寿命を与える、ゼラチン基剤から製造されるグミキャンディーである。いくつかの実施形態では、グミキャンディーは、甘味料または着香料も含み得る。

20

【0383】

一実施形態では、小児対象への投与に適する組成物は、着香料を含み得る。本明細書で使用する場合、「着香料」は、製剤に明白な風味および芳香をもたらす物質（液体または固体）である。着香料は、製剤の食味を改善する助けともなる。着香料は、イチゴ、パニラ、レモン、ブドウ、風船ガムおよびチェリーを含むが、これらに限定されない。

30

【0384】

特定の実施形態では、遺伝子操作細菌は、例えば、不活性希釈剤または同化可食性担体とともに経口投与することができる。この化合物は、硬もしくは軟シェルゼラチンカプセルに封入、錠剤に圧縮、または対象の食事に直接混入することもできる。経口治療投与のために、化合物は、賦形剤とともに組込み、摂食できる錠剤、口腔錠、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、ウエハースなどの形態で用いることができる。非経口投与以外により化合物を投与するためには、その不活性化を防ぐための材料で化合物を被覆すること、またはそれ共に化合物を同時投与することが必要であり得る。

40

【0385】

他の実施形態では、本発明の組換え細菌を含む医薬組成物は、摂食可能な製剤、例えば、食品であり得る。一実施形態では、食品は、乳、濃縮乳、発酵乳（ヨーグルト、酸乳、フローズンヨーグルト、乳酸菌発酵飲料）、粉乳、アイスクリーム、クリームチーズ、ドライチーズ、豆乳、発酵豆乳、野菜果実ジュース、果実ジュース、スポーツ飲料、菓子類、砂糖菓子、乳児食（乳児用ケーキなど）、栄養食品、動物飼料または栄養補助食品である。一実施形態では、食品は、発酵乳製品などの、発酵食品である。一実施形態では、発酵乳製品は、ヨーグルトである。他の実施形態では、発酵乳製品は、チーズ、乳、クリーム、アイスクリーム、ミルクセーキまたはケフィアである。他の実施形態では、本発明の組換え細菌は、プロバイオティクスとして機能することを意図する他の生菌細胞を含む製剤に組み込む。他の実施形態では、食品は、飲料である。一実施形態では、飲料は、果実

50

ジュースベースの飲料または植物もしくはハーブエキスを含む飲料である。他の実施形態では、食品は、ゼリーまたはプリンである。本発明の組換え細菌の投与に適する他の食品は、当技術分野で周知である。例えば、それぞれの内容が参照により本明細書に明確に組み込まれる、米国特許出願公開第2015/0359894号および米国特許出願公開第2015/0238545号を参照されたい。他の実施形態では、本発明の医薬組成物は、パン、ヨーグルトまたはチーズなどの、食品に注入、噴霧、または振りかける。

【0386】

いくつかの実施形態では、組成物は、腸溶コーティングを施したまたは非被覆の、ナノ粒子、ナノカプセル、マイクロカプセルまたは微小錠剤による、腸内投与、空腸内投与、十二指腸内投与、回腸内投与、胃シャント投与または結腸内投与用に製剤化する。医薬組成物は、例えば、ココアバターまたは他のグリセリドなどの通常の坐剤基剤を用いた、坐剤または停留かん腸剤などの直腸組成物に製剤化することもできる。組成物は、油性または水性媒体中懸濁剤、液剤または乳剤であってよく、懸濁化、安定化および/または分散剤を含み得る。

10

【0387】

本明細書に記載の遺伝子操作細菌は、エアゾールの形態、噴霧剤、ミストまたは滴剤の形態に製剤化して鼻腔内に投与し、また適切な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切なガス）を用いることにより、加圧パックまたはネブライザーからエアゾール噴霧剤の形態で好都合に送達することができる。加圧エアゾールの投与単位は、定量を送出するために弁を備えることによって決定することができる。吸入器または吹送器に用いるカプセルおよびカートリッジ（例えば、ゼラチンの）は、ラクトースまたはデンプンなどの化合物の粉末混合物および適切な粉末基剤を含むものを製剤化することができる。

20

【0388】

遺伝子操作細菌は、デポ製剤として投与し、製剤化することができる。そのような長時間作用性製剤は、埋め込みにより、または静脈内注射、皮下注射、局所注射、直接注射を含む注射、もしくは注入により投与することができる。組成物は、例えば、適切なポリマーもしくは疎水性材料（例えば、許容される油中乳剤として）またはイオン交換樹脂を用いて、あるいはわずかに溶ける誘導体として（例えば、わずかに溶ける塩として）製剤化することができる。

30

【0389】

いくつかの実施形態では、単一剤形の、薬学的に許容される組成物を本明細書で開示する。単一剤形は、液体または固形であり得る。単一剤形は、変更なしに患者に直接投与することができる、または投与前に希釈もしくは再構成することができる。特定の実施形態では、単一剤形は、ボーラス型で、例えば、単回注射で、複数の錠剤、カプセル剤、丸剤等を含む経口投与を含む、単回経口投与で投与することができる。代替実施形態では、単一剤形は、例えば、注入により、一定の時間にわたって投与することができる。

【0390】

医薬組成物の単一剤形は、医薬組成物を、より小さい分割量、一回量容器、一回量液体製剤、または腸溶コーティングを施しても非被覆であってよい、錠剤、顆粒剤、ナノ粒子、ナノカプセル、マイクロカプセル、微小錠剤、ペレット剤もしくは散剤などの、一回量固形製剤に分割することによって用意することができる。固形製剤の一回量は、患者への投与前に液体、一般的に滅菌水または生理食塩水を加えることにより再構成することができる。

40

【0391】

他の実施形態では、組成物は、制御放出または持続放出システムで送達することができる。一実施形態では、ポンプを用いて、本開示の治療薬の制御または持続放出を達成することができる（例えば、米国特許第5,989,463号参照）。持続放出製剤に用いられるポリマーの例は、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-c-o-酢酸ビニル)、ポリメタク

50

ルリル酸、ポリグリコリド (P L G)、ポリ酸無水物、ポリ (N - ビニルピロリドン)、ポリ (ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ (エチレングリコール)、ポリラクチド (P L A)、ポリ (ラクチド - c o - グリコリド) (P L G A)、ポリオルトエステルを含むが、これらに限定されない。持続放出製剤に用いられるポリマーは、不活性で、浸出性不純物を含まず、保存で安定で、滅菌で、生分解性であり得る。いくつかの実施形態では、制御または持続放出システムは、予防および治療標的の近くに配置することができ、したがって、全身投与量の一部を必要とするにすぎない。当業者に公知の任意の適切な技術を用いることができる。

【 0 3 9 2 】

投与計画は、治療反応をもたらすように調節することができる。投与は、疾患の重症度および反応性、投与経路、治療の時間経過 (数日から数カ月、さらには数年) ならびに疾患の改善までの時間などのいくつかの因子に依存し得る。例えば、単回ボラスは、1回で投与することができ、いくつかの分割量を所定の期間にわたって投与することができ、あるいは治療状況によって示される通りに減量または増量することができる。用量の明細は、活性化化合物の固有の特性および達成されるべき特定の治療効果によって決定づけられる。投与量は、緩和されるべき状態の種類および重症度によって異なり得る。個別の対象について、個々の必要および担当臨床医の専門的判断に従って具体的な投与計画を長期にわたって調節することができる。本明細書で示す化合物の毒性および治療有効性は、細胞培養または動物モデルにおける標準的な薬学的方法により判断することができる。例えば、 LD_{50} 、 ED_{50} 、 EC_{50} および IC_{50} を決定することができ、毒性および治療効果の間の用量比 (LD_{50} / ED_{50}) を治療指数として計算することができる。毒性副作用を示す組成物は、副作用を低減するために起こり得る被害を最小限にする注意深い修正を加えて用いることができる。投与は、最初に細胞培養アッセイおよび動物モデルから推定することができる。 *in vitro* および *in vivo* アッセイならびに動物試験から得られるデータは、ヒトに用いる一連の用量を策定するのに用いることができる。

【 0 3 9 3 】

成分は、例えば、活性薬剤の量を示したアンプルまたはサシェなどの密閉容器に入れた乾燥凍結乾燥粉末または水不含有濃縮物として、単位剤形で別個にまたは一緒に混合して供給される。投与方法が注射による場合、投与前に成分を混合することができるように、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルを用意することができる。

【 0 3 9 4 】

医薬組成物は、薬剤の量を示すアンプルまたはサシェなどの密閉容器に包装することができる。一実施形態では、医薬組成物のうちの1つまたは複数を密閉容器に入れた乾燥滅菌凍結乾燥粉末または水不含有濃縮物として供給し、対象への投与に適切な濃度に再構成することができる (例えば、水または生理食塩水で)。一実施形態では、予防もしくは治療薬または医薬組成物のうちの1つまたは複数を 2 ~ 8 で保存された密閉容器に入れた乾燥滅菌凍結乾燥粉末として供給し、再構成した後 1 時間以内、3 時間以内、5 時間以内、6 時間以内、12 時間以内、24 時間以内、48 時間以内、72 時間以内または 1 週間以内に投与する。凍結乾燥剤形について主として 0 ~ 10 % スクロース (最適には 0 . 5 ~ 1 . 0 %) などの凍結防止剤を含めることができる。他の適切な凍結防止剤は、トレハロースおよびラクトースを含む。他の適切な充填剤は、いずれかを 0 ~ 0 . 05 % の濃度で含めることができる、グリシンおよびアルギニン、ならびにポリソルベート 80 (0 . 005 ~ 0 . 01 % の濃度で任意選択で含める) を含む。さらなる界面活性剤は、ポリソルベート 20 および B R I J 界面活性剤を含むが、これらに限定されない。医薬組成物は、注射用容器として調製することができ、吸収または分散を高めるために用いられるもの、例えば、ヒアルロニダーゼなどの佐剤として有用な物質をさらに含み得る。

【 0 3 9 5 】

治療の方法

本発明の他の態様は、高アンモニア血症に関連する疾患または障害を治療する方法を提

10

20

30

40

50

供する。いくつかの実施形態では、本発明は、これらの疾患または障害に随伴する1つもしくは複数の症状を低減、改善または消失させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、障害は、アルギニノコハク酸尿症、アルギナーゼ欠損症、カルバモイルリン酸シテターゼ欠損症、シトルリン血症、N - アセチルグルタミン酸シテターゼ欠損症およびオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症などの尿素回路異常症である。代替実施形態では、障害は、肝性脳症、急性肝不全もしくは慢性肝不全などの肝臓障害；有機酸障害；イソ吉草酸尿症；3 - メチルクロトニルグリシン尿症；メチルマロン酸血症；プロピオン酸尿症；脂肪酸酸化欠損症；カルニチン回路欠損症；カルニチン欠乏症； β - 酸化欠損症；リジン尿性タンパク不耐症；ピロリン - 5 - カルボキシレートシテターゼ欠損症；ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損症；オルニチンアミノトランスフェラーゼ欠損症；炭酸脱水素酵素欠損症；インスリン過剰症高アンモニア血症症候群；ミトコンドリア障害；バルプロ酸療法；アスパラギナーゼ療法；完全腸管外栄養；グリシン含有溶液を用いる膀胱鏡検査；肺/骨髄移植後；門脈体静脈短絡；尿路感染症；尿管拡張症；多発性骨髄腫；化学療法；感染症；神経因性膀胱；または腸内細菌異常増殖である。いくつかの実施形態では、それに随伴する症状（複数可）は、発作、運動失調、脳卒中様病変、昏睡、精神病、視力障害、急性脳症、脳浮腫ならびに嘔吐、呼吸性アルカローシスおよび低体温症を含むが、これらに限定されない。

【0396】

方法は、本明細書に記載の細菌の少なくとも1つの遺伝子操作種、菌株または亜型を含む医薬組成物を調製し、治療有効量の医薬組成物を対象に投与することを含み得る。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、例えば、液体懸濁剤で経口投与する。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、ゲルキャップ中で凍結乾燥し、経口投与する。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、胃管または胃シャントにより投与する。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、直腸に、例えば、かん腸剤により投与する。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、局所、腸内、空腸内、十二指腸内、回腸内および/または結腸内投与する。

【0397】

特定の実施形態では、対象への医薬組成物の投与により、対象におけるアンモニア濃度が低下する。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、対象におけるアンモニア濃度を無処置または対照対象におけるレベルと比較して少なくとも約10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上低下させ得る。いくつかの実施形態では、低下は、医薬組成物の投与の前および後の対象におけるアンモニア濃度を比較することによって測定する。いくつかの実施形態では、高アンモニア血症を治療または改善する方法は、状態または障害の1つもしくは複数の症状が少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上改善することを可能にする。

【0398】

医薬組成物の投与前、投与中および後に、対象におけるアンモニア濃度は、血液、血清、血漿、尿、糞便物質、腹水、腸粘膜剥離物などの生物学的試料、組織から採取した試料、および/または胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肛門管のうちの1つもしくは複数の内容物から採取した試料について測定することができる。いくつかの実施形態では、方法は、対象におけるアンモニア濃度を、検出できないレベルに、または治療前の対象のアンモニア濃度の約1%、2%、5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%もしくは80%より低いレベルに低下させるための本発明の組成物の投与を含み得る。

【0399】

特定の実施形態では、突然変異アルギニンレギュロンを含む遺伝子操作細菌は、大腸菌ニッスルである。遺伝子操作細菌は、例えば、消化管内もしくは血清中の防御因子（Sonnenbornら、2009年）により、または投与の数時間もしくは数日後にキルスイッチの活性化により、殺滅することができる。したがって、突然変異アルギニンレギュ

10

20

30

40

50

ロンを含む医薬組成物は、治療有効量および頻度で再投与することができる。マウスにおける *in vivo*でのニッスルの滞留期間を図34および35に示す。代替実施形態では、遺伝子操作細菌は、投与後数時間または数日以内に殺滅されず、増殖し、消化管にコロニー形成し得る。

【0400】

医薬組成物は、単独で、またはフェニル酪酸ナトリウム、安息香酸ナトリウムおよびフェニル酪酸グリセロールを含むが、これらに限定されない、一つもしくは複数の追加の治療薬と併用して投与することができる。一つもしくは複数の追加の治療薬の選択に際して考慮すべき重要な事柄は、薬剤（複数可）が本発明の遺伝子操作細菌に適合すべきであること、例えば、薬剤（複数可）が細菌を殺滅してはならないことである。

10

【0401】

一実施形態では、遺伝子操作細菌は、HEの予防、治療または管理のために投与する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、HEの再発を防ぐための他の治療アプローチと併用して投与する。一実施形態では、遺伝子操作細菌は、分枝鎖アミノ酸補足と併用して投与する。一実施形態では、遺伝子操作細菌は、アセチル-1-カルニチンおよび/または安息香酸ナトリウムおよび/または亜鉛および/またはアカルボースおよび/またはオルニチンアスパラギン酸と併用して投与する。一実施形態では、遺伝子操作細菌は、患者におけるHEを治療し、かつ予防するために一般的に適用される、非吸収性二糖類と併用して投与する。一実施形態では、遺伝子操作細菌は、ラクトースおよび/またはラクチトールと併用して投与する。

20

【0402】

一実施形態では、遺伝子操作細菌は、例えば、HEの治療用の一つまたは複数の抗生物質と併用して投与する。そのような抗生物質の例は、アミノグリコシド、例えば、ネオマイシンおよび/またはパラモマイシンなどの、非吸収性抗生物質を含むが、これらに限定されない。一実施形態では、抗生物質は、リファマイシンである。一実施形態では、抗生物質は、リファマイシン誘導体、例えば、リファキシミンを含むが、これに限定されない、合成誘導体である。

【0403】

リファキシミンは、6カ月間にわたって、プラセボと比較して、肝性脳症のエピソードのリスクを著しく低下させることが示された(Bassら、Rifaximin Treatment in Hepatic Encephalopathy; *N Engl J Med* 2010; 362巻: 1071~1081頁)。リファキシミンは、リファンピンの半合成誘導体であり、細菌DNA依存性RNAポリメラーゼのベータサブユニットに結合することにより作用し、それによって転写を阻止する。結果として、細菌のタンパク質合成および増殖が抑制される。

30

【0404】

リファキシミンは、*in vitro*および臨床試験の両方において大腸菌に対して活性であることが示された。したがって、リファキシミンとの併用療法が有効であるために、遺伝子操作細菌がリファキシミン耐性をさらに含まなければならないことが理解される。

40

【0405】

リファキシミンに対する耐性は、*rpoB*遺伝子の突然変異によって主としてもたらされる。これは、DNA依存性RNAポリメラーゼ上の結合部位を変化させ、リファキシミン結合親和性を低下させ、それにより、有効性を低下させる。一実施形態では、リファキシミン耐性は、*rpoB*遺伝子における突然変異である。そのような突然変異の非限定的な例は、例えば、Rodriguez-Verdugo、Evolution of *Escherichia coli* rifampicin resistance in an antibiotic-free environment during thermal stress、*BMC Evol Biol.*、2013年2月22日、13巻: 50頁に記載されている。注目すべきことに、*rpoB*共通配列の同じ3コドン

50

における突然変異が数種の細菌種の無関係のリファキシミン耐性臨床分離株において反復して起こる (Goldstein, Resistance to rifampicin : 総説においてレビューされている ; その内容がその全体として参照により本明細書に組み込まれる、The Journal of Antibiotics (2014年)、1~6頁)。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、例えば、*rpoB* 遺伝子における公知のリファキシミン耐性突然変異を含む。他の実施形態では、リファキシミン耐性をもたらす有用な突然変異を同定するために、遺伝子操作細菌を漸増量のリファキシミンに曝露する、スクリーニングを用いることができる。

【0406】

いくつかの実施形態では、医薬組成物を食物とともに投与する。代替実施形態では、食物を摂食する前または後に医薬組成物を投与する。医薬組成物を、1つまたは複数の食事改善、例えば、低タンパク質食およびアミノ酸補給と併用して投与することができる。医薬組成物の用量および投与頻度は、症状の重症度および障害の進行に基づいて選択することができる。適切な治療有効量および/または投与頻度は、担当臨床医が選択することができる。

【0407】

表20に高アンモニア血症患者 (UCD < HE) におけるフェニルアラニンの平均レベルに基づく、標的分解速度の非限定的な例を示す。

【0408】

【表22】

表20. 標的アンモニア分解/アルギニン産生速度

パラメータ	値
高アンモニア血症患者における NH_4^+ (血液中) の最大負荷 (UCD < HE)	825 μmol 総過剰 NH_4^+ 総血中アンモニアレベル : およそ1000 μmol ; 5L血液 (成人)
アルギニン産生標的 : NH_4^+ 負荷	275 μmol /日 (1 Arg = 3 NH_4^+)
標的アルギニン産生速度 : NH_4^+ 負荷	275 μmol /日 / 10^{11} 細菌
実験室アッセイ標的 : NH_4^+ 負荷	0.11 μmol /時 / 10^9 細菌
現在のアルギニン産生速度	1.25 μmol /時 / 10^9 細菌
NH_4^+ の最大フラックス (結腸から血液中) ; 健常者において > UCD	800 μmol /時
アルギニン産生標的 : NH_4^+ フラックス	267 μmol /時
標的アルギニン産生速度 : NH_4^+ フラックス	267 μmol /時 / 10^{11} 細菌
実験室アッセイ標的 : NH_4^+ フラックス	2.67 μmol /時 / 10^9 細菌

【0409】

in vivoでの治療

本発明の遺伝子操作細菌は、in vivoで、例えば、動物モデルにおいて評価することができる。高アンモニア血症に関連する疾患または状態の任意の適切な動物モデル (例えば、Deignanら、2008年 ; Nicaiseら、2008年参照)、例えば、急性肝不全および高アンモニア血症のマウスモデルを用いることができる。この急性肝不全および高アンモニア血症は、チオールアセトアミド (TAA) による処理により誘発

することができる (Basileら、1990年; Nicaiseら、2008年)。あるいは、肝損傷は、物理的胆管結紮を用いてモデル化することができる (Rivera-Manciaら、2012年)。高アンモニア血症は、酢酸アンモニウムおよび/または塩化マグネシウムの経口補給によっても誘発することができる (Azorinら、1989年; Rivera-Manciaら、2012年)。

【0410】

さらに、 CCl_4 は、動物における肝線維症および肝硬変を誘発するためにしばしば用いられる (Nhungら、Establishment of a standardized mouse model of hepatic fibrosis for biomedical research; Biomedical Research and Therapy 2014年、1巻(2号): 43~49頁)。

10

【0411】

本発明の遺伝子操作細菌は、例えば、強制経口投与により動物に投与し、例えば、血液試料中のアンモニアおよび/または糞便試料中のアルギニン、シトルリンもしくは他の副産物を測定することによって治療有効性を判定することができる。

【0412】

本明細書を通して引用した参考文献の完全な典拠は、以下の通りである。

1. Alifano et al. Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiol Rev.* 1996 Mar; 60(1): 44-69. PMID: 8852895.
2. Altenhoefer et al. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004 Apr 9; 40(3): 223-229. PMID: 15039098.
3. Andersen et al. Uracil uptake in *Escherichia coli* K-12: isolation of *uraA* mutants and cloning of the gene. *J Bacteriol.* 1995 Apr; 177(8): 2008-2013. PMID: 7721693.
4. Arthur et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science.* 2012 Oct 5; 338(6103): 120-123. PMID: 22903521.
5. Aoyagi et al. Gastrointestinal urease in man. Activity of mucosal urease. *Gut.* 1966 Dec; 7(6): 631-635. PMID: 5957514.
6. Arai et al. Expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. *FEB S Lett.* 1995 Aug 28; 371(1): 73-76. PMID: 7664887.
7. Aschner et al. Manganese uptake and distribution in the central nervous system (CNS). *Neurotoxicology.* 1999 Apr-Jun; 20(2-3): 173-180. PMID: 10385881.
8. Azorin et al. A simple animal model of

20

30

40

50

- hyperammonemia. *Hepatology*. 1989 Sep; 10(3): 311-314. PMID: 2759549.
9. Banský et al. Reversal of hepatic coma by benzodiazepene antagonists (R015-1788). *Lancet*. 1985; 1: 1324-1325.
10. Basile et al. Brain concentrations of benzodiazepines are elevated in an animal model of hepatic encephalopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990 Jul; 87(14): 5263-5267. PMID: 1973539. 10
11. Bearden SW, Perry RD. The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Mol Microbiol*. 1999 Apr; 32(2): 403-414. PMID: 10231495.
12. Berk DP, Chalmers T. Deafness complicating antibiotic therapy of hepatic encephalopathy. *Ann Intern Med*. 1970 Sep; 73(3): 393-396. PMID: 5455989.
13. Blanc et al. Lactitol or lactulose in the treatment of chronic hepatic encephalopathy: results of a meta-analysis. *Hepatology*. 1992 Feb; 15(2): 222-228. PMID: 1531204. 20
14. Caldara et al. The arginine regulon of *Escherichia coli*: whole-system transcriptome analysis discovers new genes and provides an integrated view of arginine regulation. *Microbiology*. 2006 Nov; 152(Pt 11): 3343-3354. PMID: 17074904. 30
15. Caldara et al. Arginine biosynthesis in *Escherichia coli*: experimental perturbation and mathematical modeling. *J Biol Chem*. 2008 Mar 7; 283(10): 6347-6358. PMID: 18165237.
16. Caldovic et al. N-acetylglutamate synthase: structure, function and defects. *Mol Genet Metab*. 2010; 100 Suppl 1: S13-S19. Review. PMID: 20303810.
17. Callura et al. Tracking, tuning, and terminating microbial physiology using synthetic riboregulators. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 7; 107(36): 15898-15903. PMID: 20713708. 40
18. Cash et al. Current concepts in the assessment and treatment of hepatic encephalopathy. *QJM*. 2010 Jan; 103(1): 9-16. PMID: 19903725.
19. Castiglione et al. The transcription factor DNR from *Pseudomonas aeruginosa* sp 50

- ecifically requires nitric oxide and haem for the activation of a target promoter in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2009 Sep; 155 (Pt 9): 2838-2844. PMID: 19477902.
20. Cellier et al. Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of *Nramp*. *Trends Genet*. 1996 Jun; 12 (6): 201-204. PMID: 8928221.
21. Charlier et al. Arginine regulon of *Escherichia coli* K-12. A study of repressor-operator interactions and of in vitro binding affinities versus in vivo repression. *J Mol Biol*. 1992 Jul 20; 226 (2): 367-386. PMID: 1640456. 10
22. Chiang et al. Dysregulation of C/EBP α by mutant Huntingtin causes the urea cycle deficiency in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2007 Mar 1; 16 (5): 483-498. PMID: 17213233.
23. Collinson et al. Channel crossing: how are proteins shipped across the bacterial plasma membrane? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015; 370: 20150025. PMID: 26370937. 20
24. Cordoba J, Minguez B. Hepatic Encephalopathy. *Semin Liver Dis*. 2008; 28 (1): 70-80. PMID: 18293278.
25. Costa et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13 (6): 343-359. PMID: 25978706. 30
26. Crabeel et al. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ARG7 gene encoding ornithine acetyltransferase, an enzyme also endowed with acetylglutamate synthase activity. *Eur J Biochem*. 1997 Dec 1; 250 (2): 232-241. PMID: 9428669.
27. Cuevas-Ramos et al. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Jun 22; 107 (25): 11537-42. PMID: 20534522. 40
28. Cunin et al. Molecular basis for modulated regulation of gene expression in the arginine regulon of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res*. 1983 Aug 11; 11 (15): 5007-5019. PMID: 6348703.
29. Cunin et al. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev*. 1986 Sep; 50 (3): 314-52. Review. Erratum in 50

- : Microbiol Rev. 1987 Mar; 51(1): 178. PMID: 3534538.
30. Danino et al. Programmable probiotics for detection of cancer in urine. Sci Transl Med. 2015 May 27; 7(289): 289ra84. PMID: 26019220.
31. Deignan et al. Contrasting features of urea cycle disorders in human patients. Mol Genet Metab. 2008 Jan; 93(1): 7-14. PMID: 17933574. 10
32. Deutscher. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. Curr Opin Microbiol. 2008 Apr; 11(2): 87-93. PMID: 18359269.
33. Diaz et al. Ammonia control and neurocognitive outcome among urea cycle disorder patients treated with glycerol phenylbutyrate. Hepatology. 2013 Jun; 57(6): 2171-9. PMID: 22961727.
34. Dinleyici et al. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 in different clinical conditions. Expert Opin Biol Ther. 2014 Nov; 14(11): 1593-609. PMID: 24995675. 20
35. Doolittle. A new allele of the sparse fur gene in the mouse. J Hered. 1974 May-Jun; 65(3): 194-5. PMID: 4603259.
36. Eckhardt et al. Isolation and characterization of mutants with a feedback resistant N-acetylglutamate synthase in *Escherichia coli* K 12. Mol Gen Genet. 1975 Jun 19; 138(3): 225-32. PMID: 1102931. 30
37. Eiglmeier et al. Molecular genetic analysis of FNR-dependent promoters. Mol Microbiol. 1989 Jul; 3(7): 869-78. PMID: 2677602.
38. Fraga et al. (2008). Real-Time PCR. Current Protocols Essential Laboratory Techniques (10.3.1-10.3.33). John Wiley & Sons, Inc.
39. Galimand et al. Positive FNR-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 1991 Mar; 173(5): 1598-606. PMID: 1900277. 40
40. Gamper et al. Anaerobic regulation of transcription initiation in the arcDABC operon of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 1991 Aug; 173(15): 4742-50. PMID: 1906871.
41. Gardner et al. Construction of a genet 50

- ic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*. 2000; 403:339-42. PMID:10659857.
42. Gorke B et al. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Aug; 6(8):613-24. PMID:18628769.
43. Haberle et al. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. *Orphanet J Rare Dis*. 2012 May 29; 7:32. Review. PMID:22642880. 10
44. Haberle J. Clinical and biochemical aspects of primary and secondary hyperammonemic disorders. *Arch Biochem Biophys*. 2013 Aug 15; 536(2):101-8. Review. PMID:23628343.
45. Hasegawa et al. Activation of a consensus FNR-dependent promoter by DNR of *Pseudomonas aeruginosa* in response to nitrite. *FEMS Microbiol Lett*. 1998 Sep 15; 166(2):213-7. PMID:9770276. 20
46. Hodges et al. The spflash mouse: a missense mutation in the ornithine transcarbamylase gene also causes aberrant mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jun; 86(11):4142-6. PMID:2471197.
47. Hoeren et al. Sequence and expression of the gene encoding the respiratory nitrous-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem*. 1993 Nov 15; 218(1):49-57. PMID:8243476. 30
48. Hoffmann et al. Defects in amino acid catabolism and the urea cycle. *Handb Clin Neurol*. 2013; 113:1755-73. Review. PMID:23622399.
49. Hosseini et al. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutr Rev*. 2011 May; 69(5):245-58. PMID:21521227.
50. Isabella et al. Deep sequencing-based analysis of the anaerobic stimulon in *Neisseria gonorrhoeae*. *BMC Genomics*. 2011 Jan 20; 12:51. PMID:21251255. 40
51. Konieczna et al. Bacterial urease and its role in long-lasting human diseases. *Curr Protein Pept Sci*. 2012 Dec; 13(8):789-806. Review. PMID:23305365.
52. Lazier et al. Hyperammonemic encephalopathy in an adenocarcinoma patient managed with carglumic acid. *Curr Oncol*. 2014 Oct; 21(5):e736-9. PMID:25302046. 50

53. Leonard (2006). Disorders of the urea cycle and related enzymes. Inborn Metabolic Diseases, 4th ed (pp. 263 - 272). Springer Medizin Verlag Heidelberg.
54. Lim et al. Nucleotide sequence of the argR gene of Escherichia coli K-12 and isolation of its product, the arginine repressor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Oct; 84(19): 6697 - 701. PMID: 3116542.
55. Makarova et al. Conservation of the binding site for the arginine repressor in all bacterial lineages. Genome Biol. 2001; 2(4). PMID: 11305941. 10
56. Maas et al. Studies on the mechanism of repression of arginine biosynthesis in Escherichia coli. Dominance of repressibility in diploids. J Mol Biol. 1964 Mar; 8: 365 - 70. PMID: 14168690.
57. Maas. The arginine repressor of Escherichia coli. Microbiol Rev. 1994 Dec; 58(4): 631 - 40. PMID: 7854250. 20
58. Meng et al. Nucleotide sequence of the Escherichia coli cad operon: a system for neutralization of low extracellular pH. J Bacteriol. 1992 Apr; 174(8): 2659 - 69. PMID: 1556085.
59. Moore et al. Regulation of FNR dimerization by subunit charge repulsion. J Biol Chem. 2006 Nov 3; 281(44): 33268 - 75. PMID: 16959764. 30
60. Mountain et al. Cloning of a Bacillus subtilis restriction fragment complementing auxotrophic mutants of eight Escherichia coli genes of arginine biosynthesis. Mol Gen Genet. 1984; 197(1): 82 - 9. PMID: 6096675.
61. Nagamani et al. Optimizing therapy for argininosuccinic aciduria. Mol Genet Metab. 2012 Sep; 107(1-2): 10 - 4. Review. PMID: 22841516. 40
62. Nicaise et al. Control of acute, chronic, and constitutive hyperammonemia by wild-type and genetically engineered Lactobacillus plantarum in rodents. Hepatology. 2008 Oct; 48(4): 1184 - 92. PMID: 18697211.
63. Nicoloff et al. Two arginine repressor regulate arginine biosynthesis in Lactobacillus plantarum. J Bacteriol. 2004 Sep; 186(18): 6059 - 69. PMID: 15342575.
64. Nougayrede et al. Escherichia coli ind 50

- uces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*. 2006 Aug 11; 313(5788): 848-51. PMID: 16902142.
65. Olier et al. Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes*. 2012 Nov-Dec; 3(6): 501-9. PMID: 22895085.
66. Pham et al. Multiple myeloma-induced hyperammonemic encephalopathy: an entity associated with high in-patient mortality. *Leuk Res*. 2013 Oct; 37(10): 1229-32. Review. PMID: 23932549. 10
67. Rajagopal et al. Use of inducible feedback-resistant N-acetylglutamate synthetase (*argA*) genes for enhanced arginine biosynthesis by genetically engineered *Escherichia coli* K-12 strains. *Appl Environ Microbiol*. 1998 May; 64(5): 1805-11. PMID: 9572954. 20
68. Ray et al. The effects of mutation of the *anr* gene on the aerobic respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 1997 Nov 15; 156(2): 227-32. PMID: 9513270.
69. Reister et al. Complete genome sequence of the Gram-negative probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Biotechnol*. 2014 Oct 10; 187: 106-7. PMID: 25093936.
70. Rembacken et al. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet*. 1999 Aug 21; 354(9179): 635-9. PMID: 10466665. 30
71. Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd ed. Mack Publishing Co.
72. Salmon et al. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR. *J Biol Chem*. 2003 Aug 8; 278(32): 29837-55. PMID: 12754220. 40
73. Sat et al. The *Escherichia coli* *mazEF* suicide module mediates thymineless death. *J Bacteriol*. 2003 Mar; 185(6): 1803-7. PMID: 12618443.
74. Sawers. Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia* 50

- a coli. *Mol Microbiol*. 1991 Jun; 5(6): 1469-81. PMID: 1787797.
75. Schneider et al. Arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1998 Aug; 180(16): 4278-86. PMID: 9696779.
76. Schultz. Clinical use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Jul; 14(7): 1012-8. Review. PMID: 18240278. 10
77. Sonnenborn et al. The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 - features of a versatile probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2009; 21: 122-58.
78. Suiter et al. Fitness consequences of a regulatory polymorphism in a seasonal environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 28; 100(22): 12782-6. PMID: 14555766.
79. Summerskill. On the origin and transfer of ammonia in the human gastrointestinal tract. *Medicine (Baltimore)*. 1966 Nov; 45(6): 491-6. PMID: 5925900. 20
80. Szwajkajzer et al. Quantitative analysis of DNA binding by the *Escherichia coli* arginine repressor. *J Mol Biol*. 2001 Oct 5; 312(5): 949-62. PMID: 11580241.
81. Tian et al. Binding of the arginine repressor of *Escherichia coli* K12 to its operator sites. *J Mol Biol*. 1992 Jul 20; 226(2): 387-97. PMID: 1640457. 30
82. Tian et al. Explanation for different types of regulation of arginine biosynthesis in *Escherichia coli* B and *Escherichia coli* K12 caused by a difference between their arginine repressors. *J Mol Biol*. 1994 Jan 7; 235(1): 221-30. PMID: 8289243.
83. Torres-Vega et al. Delivery of glutamine synthetase gene by baculovirus vector: a proof of concept for the treatment of acute hyperammonemia. *Gene Ther*. 2014 Oct 23; 22(1): 58-64. PMID: 25338921. 40
84. Trunk et al. Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environ Microbiol*. 2010 Jun; 12(6): 1719-33. PMID: 20553552.
85. Tuchman et al. Enhanced production of arginine and urea by genetically engineered *Escherichia coli* K-12 strains. *Appl Environ Microbiol*. 1997 Jan; 63(1): 33-8. PMI 50

D : 8 9 7 9 3 3 6 .

86. Ukena et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One*. 2007 Dec 12; 2(12): e1308. PMID: 18074031.

87. Unden et al. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Jul 4; 1320(3): 217-34. Review. PMID: 9230919. 10

88. Vander Wauven et al. *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol*. 1984 Dec; 160(3): 928-34. PMID: 6438064.

89. Walker. Severe hyperammonaemia in adults not explained by liver disease. *Ann Clin Biochem*. 2012 May; 49(Pt 3): 214-28. Review. PMID: 22349554. 20

90. Winteler et al. The homologous regulators ANR of *Pseudomonas aeruginosa* and FNR of *Escherichia coli* have overlapping but distinct specificities for anaerobically inducible promoters. *Microbiology*. 1996 Mar; 142(Pt 3): 685-93. PMID: 8868444.

91. Wu et al. Direct regulation of the natural competence regulator gene *tfoX* by cyclic AMP (cAMP) and cAMP receptor protein in *Vibrios*. *Sci Rep*. 2015 Oct 7; 5: 14921. PMID: 26442598. 30

92. Zimmermann et al. Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* depend on *anr*, a regulatory gene homologous with *fnr* of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1991 Jun; 5(6): 1483-90. PMID: 1787798.

93. Wright O, Delmans M, Stan GB, Ellis T. GeneGuard: A modular plasmid system designed for biosafety. *ACS Synth Biol*. 2015 Mar 20; 4(3): 307-16. PMID: 24847673. 40

94. Liu Y, White RH, Whitman WB. Methanococci use the diaminopimelate aminotransferase (DapL) pathway for lysine biosynthesis. *J Bacteriol*. 2010 Jul; 192(13): 3304-10. PMID: 20418392.

95. Dogovski et al. (2012) *Enzymology of Bacterial Lysine Biosynthesis*, Biochemistry, Prof. Deniz Ekinçi (Ed.), ISBN: 978-953-51 50

- 0076 - 8 , InTech , Available from :
 96 . http : / / www . intechopen . com / books / biochemistry / enzymology - of - bacterial - lysine - biosynthesis .
- 97 . Feng et al . Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli* . J Bacteriol . 1992 Oct ; 174 (19) : 6061 - 70 . PMID : 1356964 .
- 98 . Lodeiro et al . Robustness in *Escherichia coli* glutamate and glutamine synthesis studied by a kinetic model . J Biol Phys . 2008 Apr ; 34 (1 - 2) : 91 - 106 . PMID : 19669495 .
- 99 . Reboul et al . Structural and dynamic requirements for optimal activity of the essential bacterial enzyme dihydrodipicolinate synthase . PLoS Comput Biol . 2012 ; 8 (6) : e1002537 . PMID : 22685390 .
- 100 . Saint - Girons et al . Structure and autoregulation of the metJ regulatory gene in *Escherichia coli* . J Biol Chem . 1984 Nov 25 ; 259 (22) : 14282 - 5 . PMID : 6094549 .
- 101 . Shoeman et al . Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli* : Effect of metJ gene product and S - adenosylmethionine on the expression of the metF gene . Proc Natl Acad Sci U S A . 1985 Jun ; 82 (11) : 3601 - 5 . PMID : 16593564 .
- 102 . van Heeswijk et al . Nitrogen assimilation in *Escherichia coli* : putting molecular data into a systems perspective . Microbiol Mol Biol Rev . 2013 Dec ; 77 (4) : 628 - 95 . PMID : 24296575 .

[実施例]

【0413】

以下の実施例は、本開示の例示の実施形態を示す。当業者は、本開示の精神または範囲を変更することなく実施することができる多くの変更形態および変形形態を認識する。そのような変更形態および変形形態は、本開示の範囲内に含まれる。実施例は、本開示を多少なりとも限定するものではない。

アルギニンリプレッサー結合部位 (ARGボックス)

[実施例1]

【0414】

ARGボックス突然変異

大腸菌ニッスルにおける各アルギニン生合成オペロンの Arg R 結合部位を含む野生型ゲノム配列を表3に示す。それらの配列の改変は、以下のパラグラフに従って設計される。各野生型配列については、ARGボックスを斜体で示す。アルギニンレギュロンのARGボックスは、各オペロンのプロモーター領域と重複する。下線付きの配列は、RNAポリメラーゼ結合部位を表し、それらの配列は、変更しなかった。Arg R 結合時にDNAメチル化から保護される塩基は網掛け付きであり、Arg R 結合時にヒドロキシルラジカル攻撃から保護される塩基は太字である。網掛け付きの塩基および太字の塩基は、Arg

R結合を破壊するための突然変異の主要な標的である。

[実施例2]

【0415】

ラムダレッド組換え

ラムダレッド組換えを用いて、染色体改変、例えば、ARGボックス突然変異を施した。ラムダレッドは、バクテリオファージラムダに由来する組換え酵素を用いて、カスタムDNAの断片を大腸菌の染色体に挿入する手法である。pKD46プラスミドを大腸菌ニッスル宿主株に導入する。大腸菌ニッスル細胞をLB培地中で一夜増殖させる。一夜培養を5mLのLB培地で1:100に希釈し、0.4~0.6のOD₆₀₀に達するまで増殖させる。すべての管、溶液およびキュベットを4℃に予冷する。大腸菌細胞を4℃で2,000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を1mLの4℃水に再懸濁する。大腸菌を4℃で2,000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を0.5mLの4℃水に再懸濁する。大腸菌を4℃で2,000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を0.1mLの4℃水に再懸濁する。エレクトロポレーターを2.5kVに設定した。1ngのpKD46プラスミドDNAを大腸菌細胞に加え、ピペティングし、滅菌済み冷却キュベット中にピペティングすることによって混合する。乾燥キュベットを試料チャンパーに入れ、電気パルスを印加する。1mLの室温SOC培地を直ちに追加、混合物を培養管に移し、30℃で1時間インキュベートする。細胞を選択培地プレート上に広げ、30℃で一夜インキュベートする。

10

【0416】

表3に示す所望のARGボックス配列を含むDNA配列を遺伝子合成会社に発注した。argAオペロンについては、突然変異調節領域は、以下の核酸配列(配列番号2)を含む: gcaaaaaaacCTTtaaaaaCTTaataatttcCTTtaatacaCTTaaagagggtgtaccgtg。

20

ラムダ酵素を用いて、この構築物を相同的組換えにより大腸菌ニッスルのゲノムに挿入する。構築物は、そのDNA配列に基づいて大腸菌ニッスルのゲノムにおける特定の部位に挿入される。構築物を特定の部位に挿入するために、構築物に隣接する相同DNA配列を識別する。DNAの相同配列は、突然変異配列の両側の約50塩基を含む。相同配列は、合成遺伝子の一部として注文する。あるいは、相同配列は、PCRにより加えることができる。構築物を用いて、大腸菌ニッスルにおけるargAの上流の天然配列を置換する。構築物は、組換えによって除去することができる抗生物質耐性マーカを含む。得られる突然変異argA構築物は、argAの上流の相同性の約50塩基、組換えによって除去することができるカナマイシン耐性マーカ、

30

gcaaaaaaacCTTtaaaaaCTTaataatttcCTTtaatacaCTTaaagagggtgtaccgtg、およびargAと相同性の約50塩基を含む。

【0417】

いくつかの実施形態では、ARGボックスは、上述のようにargG調節領域において突然変異させ、BBa_J23100構成的プロモーターをラムダレッド組換えを用いて調節領域に挿入した(SYN-UCD105)。これらの細菌は、アルギニンを産生することができた。代替実施形態では、argG調節領域(配列番号16)は、ArgR抑制性のままであり(SYN-UCD104)、細菌は、シトルリンを産生することができた。

40

[実施例3]

【0418】

大腸菌ニッスルの形質転換

突然変異ARGボックス構築物をpKD46を含む大腸菌ニッスルに導入する。すべての管、溶液およびキュベットを4℃に予冷する。一夜培養をアンピシリンを含む5mLのLB培地で1:100に希釈し、0.1のOD₆₀₀に達するまで増殖させる。0.05mLの100X L-アラビノース保存溶液を加えて、pKD46ラムダレッド発現を誘

50

導する。培養を0.4~0.6のOD₆₀₀に達するまで増殖させる。大腸菌細胞を4で2,000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を1mLの4水に再懸濁する。大腸菌を4で2,000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を0.5mLの4水に再懸濁する。大腸菌を4で2,000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を0.1mLの4水に再懸濁する。エレクトロポレーターを2.5kVに設定する。0.5μgの突然変異ARGボックス構築物を細胞に加え、ピペティングにより混合し、滅菌済み冷却キュベット中にピペティングする。乾燥キュベットを試料チャンパーに入れ、電気パルスを加す。1mLの室温SOC培地を直ちにに加え、混合物を培養管に移し、37で1時間インキュベートする。細胞をカナマイシンを含むLBプレート上に広げ、一夜インキュベートする。

10

[実施例4]

【0419】

突然変異体の確認

突然変異体の存在をコロニーPCRにより確認する。コロニーをピペットチップにより採取し、上下にピペティングすることによって20μLの冷ddH₂Oに再懸濁する。3μLの懸濁液を、後の使用のために適切な抗生物質を含むインデックスプレート上にピペットで移す。インデックスプレートを37で一夜増殖させる。5μLの10X PCR緩衝液、0.6μLの10mM dNTPs、0.4μLの50mM Mg₂SO₄、6.0μLの10Xエンハンサーおよび3.0μLのddH₂Oを用いてPCRマスターミックスを調製する(PCR反応当たり15μLのマスターミックス)。argA突然変異構築物に特有の2μLのプライマー(100μM保存液)を16μLのddH₂Oに混合することによって10μMプライマーミックスを調製する。各20μL反応について、15μLのPCRマスターミックス、2.0μLのコロニー懸濁液(鋳型)、2.0μLのプライマーミックスおよび1.0μLのPfx Platinum DNA Polを用いてPCR管中で混合する。PCRサーモサイクラーを次のようにプログラムし、ステップ2~4を34回反復する: 1) 5:00分に94、2) 0:15分に94、3) 0:30分に55、4) 2:00分に68、5) 7:00分にm68 および次に4に冷却する。10μLの各アンプリコンおよび2.5μLの5X染料を用いてPCR産物をゲル電気泳動により解析する。突然変異がゲノムに挿入された場合のみ、PCR産物が形成する。

20

30

[実施例5]

【0420】

選択マーカーの除去

抗生物質耐性遺伝子をpCP20で除去する。突然変異ARGボックスを有する各菌株を0.4~0.6のOD₆₀₀に達するまで抗生物質を含むLB培地中で37で増殖させる。すべての管、溶液およびキュベットを4に予冷する。細胞を4で2,000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を1mLの4水に再懸濁する。大腸菌を4で2,000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を0.5mLの4水に再懸濁する。大腸菌を4で2,000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を0.1mLの4水に再懸濁する。エレクトロポレーターを2.5kVに設定する。1ngのpCP20プラスミドDNAを細胞に加え、ピペティングにより混合し、滅菌済み冷却キュベット中にピペティングする。乾燥キュベットを試料チャンパーに入れ、電気パルスを加す。1mLの室温SOC培地を直ちにに加え、混合物を培養管に移し、30で1~3時間インキュベートする。細胞をカナマイシンを含むLBプレート上に広げ、一夜インキュベートする。一夜で十分なOD₆₀₀に増殖しないコロニーは、さらに24時間インキュベートする。200μLの細胞をアンピシリンプレート上に広げ、200μLの細胞をカナマイシンプレート上に広げ、両方を37で一夜増殖させる。アンピシリンプレートは、pCP20を有する細胞を含む。カナマイシンプレートは、いくつの細胞がエレクトロポレーションで生き残るかの兆候を示す。アンピシリンプレートからの形質転換細胞を43で非選択的に精製し、一夜増殖させる。

40

50

[実施例 6]

【0421】

形質転換細胞の確認

精製形質転換細胞をアンピシリンおよびカナマイシンに対する感受性について試験する。43 で増殖したプレートからのコロニーを採取し、10 μ L の LB 培地に再懸濁する。3 μ L の細胞懸濁液を次の3つのプレートのそれぞれにピペティングする。1) 宿主菌株のゲノムにおける kan^R 遺伝子の存否について試験する、カナマイシンを37 でインキュベートした LB プレート; 2) pCP20 プラスミドからの amp^R 遺伝子の存否について試験する、アンピシリンを37 でインキュベートした LB プレート; および 3) 37 でインキュベートした抗生物質を含まない LB プレート。個別のコロニーについてカナマイシンまたはアンピシリンプレート上に増殖が認められない場合、kan^R 遺伝子および pCP20 プラスミドの両方が失われたこととなり、さらなる解析のためにコロニーを残しておく。残しておいたコロニーを LB プレート上に再び画線して、単一コロニーを得て、37 で一夜増殖させる。突然変異ゲノム ARG ボックスの存在は、ゲノムの argA 領域の配列決定により確認する。

10

【0422】

ラムダレッド組換えの方法、大腸菌ニッスルの形質転換、突然変異の確認、選択マーカーの除去、および形質転換細胞の確認/配列決定を表3に示す ARG ボックス突然変異およびオペロンのそれぞれについて反復する。得られる細菌は、ARG ボックスへの ArgR の結合が減少し、オペロンの調節領域への全 ArgR 結合が減少するような、アルギニン生合成酵素をコードする1つまたは複数のオペロンの各 ARG ボックスにおける突然変異を含む。

20

[実施例 7]

【0423】

アルギニンフィードバック抵抗性 N - アセチルグルタミン酸シンターゼ (argA^{fbr})

上述の ARG ボックスの突然変異に加えて、大腸菌ニッスル細菌は、次のプロモーター: テトラサイクリン誘導性プロモーター、配列番号 18 ~ 29 から選択される FNR プロモーターのそれぞれの制御下に発現するアルギニンフィードバック抵抗性 N - アセチルグルタミン酸シンターゼ (argA^{fbr}、配列番号 30) 遺伝子をさらに含む。本明細書に記載の通り、他のプロモーターを用いることができる。

30

【0424】

argA^{fbr} 遺伝子は、高コピープラスミド、低コピープラスミドまたは染色体上に発現する。SYN - UCD101 は、プラスミド上の野生型 ArgR、野生型 ArgA、テトラサイクリン誘導性 argA^{fbr} ならびに各アルギニン生合成オペロンの各 ARG ボックスにおける突然変異を含む。プラスミドは、機能性 ArgR 結合部位、すなわち、ARG ボックスを含まない。SYN - UCD101 を用いて、プラスミド上の野生型 ArgR、野生型 ArgA、テトラサイクリン誘導性 argA^{fbr} ならびに各アルギニン生合成オペロンの各 ARG ボックスにおける突然変異を含む、SYN - UCD102 を作製した。該プラスミドは、機能性 ArgR 結合部位、すなわち、ARG ボックスをさらに含む。場合によっては、機能性 ArgR の存在および/または蓄積が ARG ボックス以外の部位におけるオフターゲット結合をもたらし得る。このプラスミドに機能性 ARG ボックスを導入することは、オフターゲット ArgR 結合を低減または消失させるのに、すなわち、ArgR シンクとしての役割を果たすことによって、有用なものであり得る。SYN - UCD104 は、低コピープラスミド上の野生型 ArgR、野生型 ArgA、テトラサイクリン誘導性 argA^{fbr}、テトラサイクリン誘導性 argG、および argG を除く各アルギニン生合成オペロンの各 ARG ボックスにおける突然変異を含む。SYN - UCD105 は、低コピープラスミド上の野生型 ArgR、野生型 ArgA、テトラサイクリン誘導性 argA^{fbr}、構成的に発現する argG (BBa_J23100 構成的プロモーターを含む配列番号 17) および各アルギニン生合成オペロンの各 ARG ボックス

40

50

における突然変異を含む。SYN - UCD 103は、対照ニッスル構築物である。

【0425】

argA^{f b r} 遺伝子を、大腸菌ニッスルにおける以下の挿入部位：malE/K、araC/BAD、lacZ、thyA、malP/Tのうちの1つまたは複数における細菌ゲノムに挿入する。任意の適切な挿入部位を用いることができる。例えば、図18を参照されたい。挿入部位は、ゲノムにおけるどこであってよく、例えば、thyA（栄養要求体を作製するため）などの、生存および/または増殖に必要な遺伝子；ゲノム複製の部位の近傍などの、ゲノムの活性部分；および/またはアラビノースオペロンのArABおよびArAC間などの、意図しない転写のリスクを低減するために多様なプロモーター間であってよい。挿入の部位において、挿入部位と、およびargA^{f b r} 構築物と相同であるDNAプライマーを設計する。標的部位との相同性を有する構築物を含む線状DNA断片をPCRにより作製し、ラムダレッド組換えを上述のように実施する。

10

【0426】

得られる大腸菌ニッスル細菌は、アルギニン生合成酵素をコードするオペロンのうちの1つまたは複数の、N-アセチルグルタミン酸シンテターゼへのArgR結合およびアルギニン結合を介した、アルギニン媒介抑制を減少させる核酸突然変異を含むように遺伝子操作されており、それによってアルギニンおよび/またはシトルリンの生合成が強化される。

【0427】

アルギニンリプレッサー（ArgR）配列 大腸菌ニッスルにおける野生型argRヌクレオチド配列およびargR欠失後のヌクレオチド配列を以下の表21および表22に示す。

20

【0428】

【表23】

表21. 野生型argRヌクレオチド配列

配列番号69	配列
argRヌクレオチド配列	atgcgaagctcggctaagcaagaagaactagttaaagcatttaaagcatt acttaaagaagagaaatttagctcccagggcgaaatcgtcgccgcttg caggagcaaggctttgacaatattaatcagtctaaagctcgcggatggtg accaagtttgggtgctgtacgtacacgcaatgccaaatggaaatggtttac tgcctgccagctgaactgggtgtaccaaccacctccagtcattgaagaa tctggtactggatatcgactacaacgatgcagttgtcgtgattcataccagc cctgggtcggcgcagttaattgctcgctgctggactactgggcaaagc agaaggtattctgggcaccatcgctggcgatgacaccatcttactacccc tgctaacggtttcaccgcaaaagagctgtacgaagcgatttagagctgttc gaccaggagcttaa

30

40

【0429】

【表 2 4】

表 2 2. a r g R 欠失後のヌクレオチド配列

配列番号 6 9	配列
a r g R 欠失のヌクレオチド配列	atgcgaagctcggctaagcaagaagagagctgttcgaccaggagcttta a

10

[実施例 9]

【0430】

A r g R の欠失

p K D 4 6 プラスミドを大腸菌ニッスル宿主株に導入する。大腸菌ニッスル細胞を L B 培地中で一夜増殖させる。一夜培養を 5 m L の L B 培地で 1 : 1 0 0 に希釈し、0 . 4 ~ 0 . 6 の O D ₆₀₀ に達するまで増殖させる。すべての管、溶液およびキュベットを 4 に予冷する。大腸菌細胞を 4 で 2 , 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を 1 m L の 4 水に再懸濁する。大腸菌を 4 で 2 , 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を 0 . 5 m L の 4 水に再懸濁する。大腸菌を 4 で 2 , 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を 0 . 1 m L の 4 水に再懸濁する。エレクトロポレーターを 2 . 5 k V に設定した。1 n g の p K D 4 6 プラスミド DNA を大腸菌細胞に加え、ピペティングし、滅菌済み冷却キュベット中にピペティングすることによって混合する。乾燥キュベットを試料チャンパーに入れ、電気パルスを加する。1 m L の室温 S O C 培地を直ちに加え、混合物を培養管に移し、3 0 で 1 時間インキュベートする。細胞を選択培地プレート上に広げ、3 0 で一夜インキュベートする。

20

【0431】

A r g R 遺伝子の上流および下流の相同性の約 5 0 塩基を P C R により p K D 4 プラスミドにおけるカナマイシン耐性遺伝子に加えて、次の K a n R 構築物：(A r g R の上流の約 5 0 塩基) (ターミネーター) (p K D 4 の F R T 部位により隣接された k a n R 遺伝子) (a r g R の下流の DNA) を作製する。

30

【0432】

いくつかの実施形態では、a r g R および a r g G 遺伝子の両方を上述のラムダレド組換えを用いて欠失させることにより、細菌は、シトルリンを産生することができる。

[実施例 1 0]

【0433】

アルギニンフィードバック抵抗性 N - アセチルグルタミン酸シンターゼ (a r g A ^{f b r}) および A r g R 欠失を有する細菌菌株

上述の A r g R 欠失に加えて、大腸菌ニッスル細菌は、以下のプロモーターのそれぞれの制御下に発現するアルギニンフィードバック抵抗性 N - アセチルグルタミン酸シンターゼ (a r g A ^{f b r})、配列番号 3 0) 遺伝子をさらに含む：テトラサイクリン誘導性プロモーター、配列番 1 8 ~ 2 9 から選択される F N R プロモーター。上述のように、他のプロモーターを用いることができる。

40

【0434】

a r g A ^{f b r} 遺伝子は、高コピープラスミド、低コピープラスミドまたは染色体上に発現する。A r g R は、S Y N - U C D 2 0 1、S Y N - U C D 2 0 2 および S Y N - U C D 2 0 3 のそれぞれにおいて欠失している (A r g R)。S Y N - U C D 2 0 1 は、野生型 a r g A をさらに含むが、誘導性 a r g A ^{f b r} を欠いている。S Y N - U C D 2 0 2 は、A r g R および高コピープラスミド上のテトラサイクリン誘導性プロモーター

50

の制御下に発現する $argA^{fbr}$ を含む。SYN-UCD203は、ArgRおよび低コピープラスミド上のテトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下に発現する $argA^{fbr}$ を含む。SYN-UCD204は、ArgRおよび低コピープラスミド上のテトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下に発現する $argA^{fbr}$ を含む。SYN-UCD205は、ArgRおよび低コピープラスミド上のFNR誘導性プロモーター ($fnrS2$) の制御下に発現する $argA^{fbr}$ を含む。

【0435】

$argA^{fbr}$ 遺伝子を、大腸菌ニッスルにおける以下の挿入部位： $malE/K$ 、 $araC/BAD$ 、 $lacZ$ 、 $thyA$ 、 $malP/T$ のうちの1つまたは複数における細菌ゲノムに挿入する。任意の適切な挿入部位を用いることができる。例えば、図18を参照されたい。挿入部位は、ゲノムにおけるどこであってよく、例えば、 $thyA$ (栄養要求体を作製するため) などの、生存および/または増殖に必要な遺伝子；ゲノム複製の部位の近傍などの、ゲノムの活性部分；および/またはアラビノースオペロンの $AraB$ および $AraC$ 間などの、意図しない転写のリスクを低減するために多様なプロモーター間であってもよい。挿入の部位において、挿入部位と、および $argA^{fbr}$ 構築物と相同であるDNAプライマーを設計する。標的部位との相同性を有する構築物を含む線状DNA断片をPCRにより作製し、ラムダレッド組換えを上述のように実施する。得られる大腸菌ニッスル細菌は、欠失ArgRおよび挿入フィードバック抵抗性N-アセチルグルタミン酸シンターゼを有し、それにより、アルギニンまたはシトルリン生合成を増加させる。

[実施例11]

【0436】

ThyAの発生

栄養要求性突然変異は、細菌が必須栄養素を産生するために必要な遺伝子(複数可)を欠いているため、生存または増殖に必須である、外部から加えられる栄養素の非存在下では細菌を死滅させる。栄養要求性の改変を有する遺伝子操作細菌を作製するために、オリゴヌクレオチド合成に必須の遺伝子である $thyA$ を欠失させた。大腸菌ニッスルにおける $thyA$ の欠失は、チミジンが補給されない限り、LBプレート上でコロニーを形成することができない菌株を生じさせる。

【0437】

$thyA$: : cam PCR断片を以下のように3ラウンドのPCRを用いて増幅した。100 μ mの濃度で用いたプライマーの配列は、表23に見いだされる。

【0438】

10

20

30

【表 2 5】

表 2 3. プライマー配列

名称	配列	説明	配列番号
SR36	tagaactgatgcaaaaagtgctcgacgaaggcacaca gaTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	ラウンド1： pKD3上に結合	配列番号 68
SR38	gtttcgtaattagatagccaccggcgctttaatgcccgga CATATGAATATCCTCCTTAG	ラウンド1： pKD3上に結合	配列番号 69
SR33	caacacgtttcctgaggaacctgaaacagtatttagaac tgatgcaaaaag	ラウンド2： ラウンド1の PCR産物に結合	配列番号 70
SR34	cgcacactggcgctggctctggcaggatgtttcgtaattag atagc	ラウンド2： ラウンド1の PCR産物に結合	配列番号 71
SR43	atatcgtcgcagcccacagcaaacacgtttcctgagg	ラウンド3： ラウンド2の PCR産物に結合	配列番号 72
SR44	aagaatttaacggaggggcaaaaaaacgacgcaca ctggcgctcggc	ラウンド3： ラウンド2の PCR産物に結合	配列番号 73

10

20

【0439】

第1のPCRラウンドについては、鋳型としての1 ng pKD3、25 μ l 2x phusion、0.2 μ l プライマーSR36およびSR38、ならびに0、0.2、0.4または6 μ l DMSOを含む4 x 50 μ l PCR反応物をヌクレアーゼ不含有水を用いて50 μ lとし、以下のサイクル条件下で増幅した。

30

- ステップ1：30秒間98c
- ステップ2：10秒間98c
- ステップ3：15秒間55c
- ステップ4：20秒間72c
- 反復ステップ2～4：30サイクル
- ステップ5：5分間72c

【0440】

その後、5 μ lのPCR反応をアガロースゲル上で行って、適切なサイズのPCR産物を確認した。Zymo cleanゲルDNA回収キットを用いて製造業者の指示に従って、残りのPCR反応からPCR産物を精製し、30 μ lのヌクレアーゼ不含有水で溶出した。

40

【0441】

第2のラウンドのPCRについては、ラウンド1からの1 μ lの精製PCR産物を、0.2 μ lのプライマーSR33およびSR34を除き、上で述べた4 x 50 μ l PCR反応における鋳型として用いた。サイクル条件は、第1のPCR反応について上述したのと同じであった。PCR産物をアガロースゲルにかけて、増幅を確認し、精製し、上述のように30 μ lで溶出した。

【0442】

第3のラウンドのPCRについては、ラウンド2からの1 μ lの精製PCR産物を、プ

50

ライマーSR43およびSR44を除いて、上で述べた4×50μl PCR反応における鑄型として用いた。サイクル条件は、ラウンド1および2について述べたのと同じであった。上述のように増幅を確認し、PCR産物を精製し、溶出した。濃度および純度は、分光光度計を用いて測定した。thyAの上流に相同の92bp、frrt部位により隣接されたクロラムフェニコールカセットおよびthyA遺伝子の下流に相同の98bpを含む、得られた線状DNA断片を組換えのために増殖させたpKD46を含む大腸菌ニッスル1917株に形質転換させた。エレクトロポレーションの後、3mMチミジンを含む1mlのSOC培地を加え、細胞を振盪しながら37℃で2時間回復させた。次いで細胞を10,000×gで1分間ペレット化し、上清を捨て、細胞ペレットを3mMチミジンを含む100μlのLBに再懸濁し、3mM thyおよび20μg/mlクロラムフェニコールを含むLB寒天プレート上に広げた。細胞を37℃で一夜インキュベートした。LBプレート上に出現したコロニーを再び画線した。+cam 20μg/ml+または-thy 3mM(thyA栄養要求体のみがthy 3mMを添加した培地中で増殖する)

10

【0443】

次に、pCP20形質転換によって抗生物質耐性を除去した。pCP20は、酵母FLP組換え遺伝子、FLP、クロラムフェニコールおよびアンピシリン耐性遺伝子および温度感受性複製を有する。細胞を選択抗生物質を含むLB培地中でOD₆₀₀ = 0.4~0.6となるまで37℃で増殖させた。1mlの細胞を次のように洗浄した。細胞を16,000×gで1分間ペレット化した。上清を捨て、ペレットを1ml氷冷10%グリセロールに再懸濁した。この洗浄ステップを3回反復した。最終ペレットを70μlの氷冷10%グリセロールに再懸濁した。次に、細胞を1ngのpCP20プラスミドDNAとともにエレクトロポレートし、3mMチミジンを添加した1mlのSOCを直ちにキュベットに加えた。細胞を再懸濁し、培養管に移し、30℃で1時間増殖させた。次に、細胞を10,000×gで1分間ペレット化し、上清を捨て、細胞ペレットを3mMチミジンを含む100μlのLBに再懸濁し、3mM thyおよび100μg/mlカルベニシリンを含むLB寒天プレート上に広げ、30℃で16~24時間増殖させた。次に、形質転換細胞を42℃で非選択的(無抗生物質)にコロニー精製した。

20

【0444】

コロニー精製形質転換細胞を試験するために、コロニーを42℃プレートからピペットチップで採取し、10μlのLBに再懸濁した。3μlの細胞懸濁液を次の一組の3つのプレート上にピペティングした: Cam(37℃; 宿主菌株のゲノムにおけるCamR遺伝子の存在/非存在について試験する)、Amp(30℃; pCP20プラスミドからのAmpRの存在/非存在について試験する)および37℃のLBのみ(クロラムフェニコールカセットおよびpCP20プラスミドを失った所望の細胞)。CamまたはAmpプレートのいずれにおいても増殖が存在しない場合、コロニーは治癒したとみなし、採取し、LBプレート上に再画線して、単一コロニーを得て、37℃で一夜増殖させた。

30

[実施例12]

【0445】

アンモニアの定量

上述の遺伝子操作細菌を5mlのLB中で一夜増殖させた。翌日、細胞をペレット化し、M9+グルコースで洗浄し、ペレット化し、3mlのM9+グルコースに再懸濁した。細胞培養を振盪(250rpm)しながら4時間インキュベートし、Coy嫌気性チャンバー(90%N₂、5%CO₂、5%H₂を供給)中で37℃で好氣的または嫌氣的にインキュベートした。各細胞の相対存在量を決定するために、ベースライン時(t=0)、2時間目および4時間目に各細胞培養のOD₆₀₀を測定した。

40

【0446】

培地中のアンモニアの濃度を決定するために、t=0、2時間および4時間目に各細胞培養の1mlアリコート Nova Biomedical Bioprofile Analyzer 300で分析した。SYN-UCD101およびSYN-UCD102

50

の両方が *in vitro* でアンモニアを消費することができた (図 26)。図 25、26 および 27 に SYN-UCD202、SYN-UCD204、SYN-UCD103 およびブランク対照を用いたアンモニア濃度の棒グラフを示す。

[実施例 13]

【0447】

アルギニンおよびシトルリンの定量

いくつかの実施形態では、上述の遺伝子操作細菌を LB 中で振盪しながら 37 °C で一夜増殖させる。細菌を 5 mL の LB で 1 : 100 に希釈し、振盪しながら 37 °C で 1.5 時間増殖させる。細菌培養を以下のように誘導する。(1) FNR 誘導性 *argA^{fbr}* を含む細菌を 37 °C の Coy 嫌気性チャンバー (90% N₂、5% CO₂、5% H₂ および 20 mM 硝酸塩を供給) 中で嫌気的条件下で LB 中で 37 °C で最長 4 時間誘導する。(2) テトラサイクリン誘導性 *argA^{fbr}* を含む細菌をアンヒドロテトラサイクリン (100 ng/mL) により誘導する。(3) アラビノース誘導性 *argA^{fbr}* を含む細菌をグルコース欠損培地中で 1% アラビノースにより誘導する。誘導後、細菌細胞をインキュベーターから除去し、最大速度で 5 分間遠沈する。細菌を 1 mL の M9 グルコースに再懸濁し、OD₆₀₀ を測定する。細胞を OD₆₀₀ が 0.6 ~ 0.8 となるまで希釈する。M9 グルコース培地中の再懸濁細胞を振盪しながら 37 °C で好氣的に増殖させる。100 μL の細胞再懸濁液を除去し、0 時間目に OD₆₀₀ を測定する。質量分析 (LC-MS/MS) のために 100 μL アリコート丸底 96 ウエルプレートで -20 °C で凍結する。その後の各時点に、100 μL の細胞懸濁液を除去し、OD₆₀₀ を測定し、質量分析のために 100 μL アリコート丸底 96 ウエルプレートで -20 °C で凍結する。試料は、アルギニンおよび/またはシトルリン濃度について分析する。各時点に、質量分析対 OD₆₀₀ により測定された標準化濃度を用いて、単位時間当たり細胞当たりのアルギニンおよび/またはシトルリンの産生の速度を決定する。

【0448】

いくつかの実施形態では、上述の遺伝子操作細菌を寒天上の単一コロニーのグリセロール保存液から画線する。コロニーを採取し、3 mL の LB 中で 4 時間または一夜増殖させ、次いで 2500 rpm で 5 分間遠心分離する。培養を 0.5% グルコースを含む M9 培地で洗浄する。培養を 0.5% グルコースを含む 3 mL の M9 培地に再懸濁し、OD₆₀₀ を測定する。すべての OD₆₀₀ が 0.4 ~ 0.5 となるように、培養を 0.5% グルコースを含み、ATC (100 ng/mL) を含みまたは含まず、20 mM グルタミンを含むまたは含まない M9 培地で希釈する。各試料の 0.5 mL アリコート丸底 96 ウエルプレートから除去し、14,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を除去し、残しておく。上清を -80 °C で凍結し、細胞ペレットを -80 °C で凍結する (t = 0)。残りの細胞を振盪 (250 rpm) しながら 4 ~ 6 時間増殖させ、Coy 嫌気性チャンバー (90% N₂、5% CO₂、5% H₂ を供給) 中で 37 °C で好氣的または嫌氣的にインキュベートする。1 つの 0.5 mL アリコート丸底 96 ウエルプレートから 2 時間ごとに除去し、OD₆₀₀ を測定する。アリコート丸底 96 ウエルプレートから 14,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を除去する。上清を -80 °C で凍結し、細胞ペレットを -80 °C で凍結する (t = 2、4 および 6 時間)。試料を氷上におき、質量分析を用いてアルギニンおよびシトルリンレベルを測定する。

【0449】

細菌培養上清について、水中 500、100、20、4 および 0.8 μg/mL アルギニンおよびシトルリン標準の試料を調製する。丸底 96 ウエルプレートにおいて、20 μL の試料 (細菌上清または標準) を、最終 2 μg/mL 濃度の L-アルギニン-¹³C₆、¹⁵N₄ (Sigma) および L-シトルリン-2,3,3,4,4,5,5-d₇ (CDN 同位体) 内部標準を含む 80 μL の水に加える。プレートに Pierce A Seal フォイルを用いて熱融着させ、十分に混合する。V 型底 96 ウエルポリプロピレンプレートにおいて、5 μL の希釈試料を 95 μL の誘導体化ミックス (85 μL の 10 mM NaHCO₃ pH 9.7 および 10 μL の 10 mg/mL 塩化ダンシル (アセトニトリルで希釈)) に加える。プレートに Thermo A Seal フォイルを用いて熱融着させ、

10

20

30

40

50

十分に混合する。試料を誘導化のために60 で45分間インキュベートし、4000 rpmで5分間遠心分離する。丸底96ウエルプレートにおいて、20 µLの誘導体化試料を0.1%ギ酸を含む180 µLの水に加える。プレートをClearASealシートを用いて熱融着させ、十分に混合する。

【0450】

アルギニンおよびシトルリンは、Thermo TSQ Quantum Max三連四重極質量分析計を用いたタンデム質量分析と連結した液体クロマトグラフィー(LC-MS/MS)により測定する。以下の表24にLC-MS/MS法の概要を示す。

【0451】

【表26】

10

表24. a LC-MS/MS法の要約

HPLC				
カラム	Luna C18(2) カラム, 5 µm (50 x 2.1 mm)			
移動相A	100% H ₂ O, 0.1% ギ酸			
移動相B	100% ACN, 0.1% ギ酸			
HPLC法	総時間(分)	流量(µL/分)	A%	B%
	0.00	400	90.0	10.0
	0.50	400	90.0	10.0
	2.00	400	10.0	90.0
	3.25	400	10.0	90.0
	3.26	400	90.0	10.0
	4.30	400	90.0	10.0
注入量	10µL			
タンデム質量分析				
イオン源	HESI-II			
極性	ポジティブ			
SRM遷移	L-アルギニン: 408.1/170.1			
	L-アルギニン- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄ : 418.1/170.0			
	L-シトルリン: 409.1/170.2			
	L-シトルリン-2,3,3,4,4,5,5-d7: 416.1/170.1			

20

30

【0452】

ATCもしくは嫌気性誘導物質の存在下または非存在下における遺伝子操作細菌における細胞内アルギニンおよび分泌(上清)アルギニン産生を測定し、同じ条件下の同じ菌株の対照細菌と比較する。

40

【0453】

ATCもしくは嫌気性誘導物質の存在下または非存在下における遺伝子操作細菌における6時間にわたる総アルギニン産生を測定し、同じ条件下の同じ菌株の対照細菌と比較する。

[実施例14]

【0454】

高アンモニア血症および急性肝不全のマウスモデルにおける遺伝子操作細菌の有効性

野生型C57BL/6Jマウスに急性肝不全および高アンモニア血症を引き起こす、チオールアセトアミド(TAA)を投与する(Nicaisera, 2008年)。TAAマウスモデルは、業界で受け入れられているHEのin vivoモデルである。マウスに

50

非改変対照ニッスル細菌または上述の高レベルのアルギニンもしくはシトルリンを産生するように操作されたニッスル細菌を投与する。

【0455】

1日目に、50 mLの細菌培養を一夜増殖させ、ペレット化する。ペレットを5 mLのPBSに約 10^{11} CFU/mLの最終濃度で再懸濁する。マウスにおける血中アンモニアレベルは、下顎採血により測定し、Pocket Chem Ammonia Analyzer (Arkray)によりアンモニアレベルを決定する。マウスに100 μ Lの細菌(約 10^{10} CFU)を強制経口投与する。マウスの飲料水を0.1 mg/mLのアンヒドロテトラサイクリン(ATC)および味を良くするための5%スクロースを含むように交換した。

10

【0456】

2日目に、細菌強制経口投与溶液を上述のように調製し、マウスに100 μ Lの細菌を強制経口投与する。マウスに0.1 mg/mLのATCおよび5%スクロースを含む飲料水を与え続ける。

【0457】

3日目に、細菌強制経口投与溶液を上述のように調製し、マウスに100 μ Lの細菌を強制経口投与する。マウスに0.1 mg/mLのATCおよび5%スクロースを含む飲料水を与え続ける。マウスは、100 μ LのTAA(0.5% NaCl中250 mg/kg体重)の腹腔内(IP)注射を受ける。

【0458】

4日目に、細菌強制経口投与溶液を上述のように調製し、マウスに100 μ Lの細菌を強制経口投与する。マウスに0.1 mg/mLのATCおよび5%スクロースを含む飲料水を与え続ける。マウスは、100 μ LのTAA(0.5% NaCl中250 mg/kg体重)のもう1回のIP注射を受ける。マウスにおける血中アンモニアレベルを下顎採血により測定し、Pocket Chem Ammonia Analyzer (Arkray)によりアンモニアレベルを決定する。

20

【0459】

5日目に、マウスにおける血中アンモニアレベルを下顎採血により測定し、Pocket Chem Ammonia Analyzer (Arkray)によりアンモニアレベルを決定する。糞便ペレットをマウスから採取して、液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS)によりアルギニン含量を測定する。遺伝子操作ニッスルおよび非改変対照ニッスルを投与したマウスにおけるアンモニアレベルを比較する。

30

[実施例15]

【0460】

高アンモニア血症およびUCDのマウスモデルにおける遺伝子操作細菌の有効性

オルニチントランスカルバミラーゼは、尿素回路酵素であり、spf - ash突然変異を含むマウスは、部分的オルニチントランスカルバミラーゼ欠損を示し、これがヒトUCDのモデルとしての役割を果たす。マウスに非改変対照ニッスル細菌または上述の高レベルのアルギニンもしくはシトルリンを産生するように操作されたニッスル細菌を投与する。

40

【0461】

60匹のspf - ashマウスに本発明の遺伝子操作細菌(SYN-UCD103、SYN-UCD204)またはH2O対照を100 μ L PO QDで投与した：H2O対照、通常食(n=15)；H2O対照、高タンパク質食(n=15)；SYN-UCD103、高タンパク質食(n=15)；SYN-UCD204、高タンパク質食(n=15)。1日目に、マウスの体重を測定し、各群に選別して、ケージ当たりのマウスの体重の変動を最小限にした。マウスに強制経口投与し、20 mg/L ATCを含む水をケージに加えた。2日目に、マウスに午前および午後に強制経口投与した。3日目に、マウスに朝に強制経口投与し、体重を測定し、投与後4時間目に血液を採取して、ベースラインアンモニアレベルを得た。マウスに午後に強制経口投与し、飼料を70%タンパク質飼料に

50

変更した。4日目に、マウスに朝および午後に強制経口投与した。5日目に、マウスに朝に強制経口投与し、体重を測定し、投与後4時間目に血液を採取して、アンモニアレベルを得た。6および7日目に、マウスに朝に強制経口投与した。8日目に、マウスに朝に強制経口投与し、体重を測定し、投与後4時間目に血液を採取して、アンモニアレベルを得た。9日目に、マウスに朝および午後に強制経口投与した。10日目に、マウスに朝に強制経口投与し、体重を測定し、投与後4時間目に血液を採取して、アンモニアレベルを得た。12日目に、マウスに朝および午後に強制経口投与した。13日目に、マウスに朝に強制経口投与し、体重を測定し、投与後4時間目に血液を採取して、アンモニアレベルを得た。血中アンモニアレベル、体重および生存率を解析する(図29)。

[実施例16]

【0462】

高タンパク質食で飼育した高アンモニア血症およびUCD(spf-ash)のマウスモデルにおける遺伝子操作細菌の有効性

実施例14で述べた高アンモニア血症/UCD(spf-ash)モデルを用いて、高タンパク質食の投与時のアンモニアレベルに対する低コピープラスミド上のfnrプロモーターにより駆動されるArgAfbRをコードする遺伝子操作細菌のin vivoでの有効性を評価した。

【0463】

低コピープラスミド上のfnrプロモーターにより駆動されるArgAfbRをコードする2つの菌株SYN-UCD206(ArgRおよびThyAならびに低コピープラスミド上のFNR誘導性プロモーター(fnrs2)の制御下に発現するargAfbRを含む)ならびにSYN-UCD205(ArgRおよび低コピープラスミド上のFNR誘導性プロモーター(fnrs2)の制御下に発現するargAfbRを含む)を比較して、チミジン栄養要求性が血液からのアンモニア除去の有効性に影響を及ぼし得るかどうかを判断した。

【0464】

Spf-ashマウスを遺伝子操作細菌(SYN-UCD205、SYN-UCD206)またはH2O対照の経口投与により治療した。通常または高タンパク質食を次のように与えた: SYN-UCD205、高タンパク質食(n=10); SYN-UCD206、高タンパク質食(n=10); H2O対照、通常食(n=10); H2O対照、高タンパク質食(n=10)。SYN-UCD205およびSYN-UCD206については、細菌を1回投与した1、5、6および7日目を除いて、 $> 1 \times 10^{10}$ 細胞/mlの100 μ lの用量を12日間にわたり1日2回投与した。1日目に、マウスの体重を測定し、無作為化した。T=0 NH₄レベルをPocketChem Ammonia Analyzer(Arkray)を用いて下顎採血により測定し、その後、マウスに強制経口投与した。2日目に、マウスに朝および午後に強制経口投与した。3日目に、マウスに朝および午後に強制経口投与し、飼料を通常飼料から70%タンパク質飼料に変更した。4日目に、マウスに朝および午後に強制経口投与した。5日目に、マウスに朝に強制経口投与し、体重を測定し、投与後4時間目に血液を採取して、アンモニアレベルを得た。8~12日目に、マウスに朝および午後に強制経口投与した。

【0465】

図30に見られるように、高タンパク質食におけるspf-ashマウスのアンモニアレベルは、SYN-UCD205およびSYN-UCD206群における高タンパク質食への切り替え後48時間目にH2O高タンパク質食対照群と比較して低下し、FNR誘導性プロモーターがArgAfbRの発現を駆動し、操作細菌を投与したマウスの血液中のアンモニアレベルの低下をもたらしたことがわかる。アンモニアレベルの観測された低下は、SYN-UCD205およびSYN-UCD206の両方において同様であり、ThyA栄養要求性がSYN-UCD206の有効性に有意な影響を有さないことが示唆される。

[実施例17]

10

20

30

40

50

【0466】

染色体挿入を用いた細菌菌株の操作

*ArgAfb r*がM A L E K部位においてF N R応答性プロモーターの制御下に大腸菌ニッスルのゲノムに直接組み込まれている細菌菌株を構築した。

【0467】

*PfnrS - ArgAfb r*をニッスルM a l EおよびM a l K遺伝子座において染色体に組み込むことができるベクターを作製するために、G i b s o nアセンブリを用いて、ニッスルM A L E / K遺伝子座と相同のDNAの1000bp配列をノックインノックアウト(K I K O)プラスミド上のフリッパーゼ組換え標的(F R T)部位フランクロラムフェニコール耐性(*cmR*)カセットの両側に加えた。次いでG i b s o nアセンブリを用いて、F R T - *cmR* - F R T部位に隣接する、これらの相同性アーム間の*PfnrS - ArgAfb r* DNA配列をクローニングした。断片の挿入の成功は、配列決定によってバリデートした。PCRを用いて、全M a l E K : : F R T - *cmR* - F R T : : *PfnrS - ArgAfb r* : : M a l K領域を増幅する。このノックインPCR断片を用いて、ラムダレドリコンピナーゼ遺伝子をコードする温度感受性プラスミドを含むエレクトロコンピテントニッスル菌株を形質転換した。形質転換の後、細胞を37 °Cで2時間増殖させた。37 °Cでの増殖により、温度感受性プラスミドが治癒する。該断片の染色体組込みの成功を有する形質転換細胞を20 μg/mLのクロラムフェニコールにより選択した。

10

【0468】

いくつかの実施形態では、リコンピナーゼベースのスイッチを用いて、*PfnrS - ArgAfb r*の発現を活性化することができる。リコンピナーゼベースのスイッチが*ArgAfb r*の発現を調節することを可能にする菌株を構築するために、*PfnrS*駆動Int5遺伝子および*rrnBUP*駆動のリコンピナーゼ部位フランク*ArgAfb r*をGeneWiz (Cambridge, MA)により合成した。G i b s o nアセンブリを用いて、*PfnrS - Int5*、*rrnBUP - ArgAfb r*配列の両側のニッスルm a l Eおよびm a l K遺伝子座と相同のDNAの1000bp配列を加え、相同性アーム間のこの配列をクローニングした。K I K Oプラスミドへの断片の挿入の成功は、配列決定によってバリデートする。PCRを用いて、全*PfnrS - Int5*、*rrnBUP - ArgAfb r*領域を増幅する。このノックインPCR断片を用いて、ラムダレドリコンピナーゼ遺伝子を発現するエレクトロコンピテントニッスル菌株を形質転換する。形質転換後、細胞を37 °Cで2時間増殖させる。m a l E K遺伝子間領域における*PfnrS - ArgAfb r*の組込みの成功を有する形質転換細胞を50 μg/mLのカナマイシンにより選択する。この戦略は、*ArgAfb r*発現のためにT7ポリメラーゼ活性を必要とするリコンピナーゼベースの菌株を構築するためにも用いることができる。

20

30

[実施例18]

【0469】

染色体挿入およびプラスミド保有操作細菌の*in vitro*有効性の比較

m a l E K遺伝子座における*fnr*誘導性プロモーターにより駆動される*ArgAfb r*の染色体挿入を有する遺伝子操作細菌菌株と*fnr*誘導性プロモーターにより駆動される*ArgAfb r*を含む低コピープラスミドを含む菌株との間の*in vitro*有効性を比較するために、嫌氣的誘導後の様々な時点に培地中のアルギニンレベルを測定した。さらに、チミジンに対する栄養要求性がアルギニン産生効率に対して影響を有し得るかどうかを評価するために、低コピープラスミド上にまたは染色体に組み込まれた*fnr - ArgAfb r*を含む、T h y A欠失を含むもしくは含まない操作細菌菌株のアルギニン産生を比較した。

40

【0470】

一夜培養をLBで1 : 100に希釈し、振盪(250rpm)しながら37 °Cで増殖させた。1.5時間の増殖の後に、細菌培養を以下のように誘導した。(1) F N R誘導性*argAfb r*を含む細菌を37 °CのC o y嫌気性チャンバー(90% N₂、5% C O₂)

50

、5% H₂ および 20 mM 硝酸塩を供給) 中で嫌気的条件下で LB 中 37 °C で 4 時間誘導した; (2) テトラサイクリン誘導性 *argA f b r* を含む細菌をアンヒドロテトラサイクリン (100 ng / mL) により誘導した。誘導後、細菌をインキュベーターから除去し、最大速度で 5 分間遠沈した。細胞を 1 mL の M9 グルコースに再懸濁し、OD₆₀₀ を測定した。細胞を OD₆₀₀ が 0.6 ~ 0.8 となるまで希釈した。M9 グルコース培地中再懸濁細胞を振盪しながら 37 °C で好氣的に増殖させた。100 μL の細胞再懸濁液を除去し、時間 = 0 における OD₆₀₀ を測定した。100 μL のアリコートを経過分析 (LC-MS / MS) のために丸底 96 ウエルプレートで -20 °C で凍結した。その後の各時点 (例えば、30、60 および 120 分) に、100 μL の細胞懸濁液を除去し、OD₆₀₀ を測定し、100 μL のアリコートを質量分析のために丸底 96 ウエルプレートで -20 °C で凍結した。試料をアルギニン濃度について分析した。各時点に、質量分析対 OD₆₀₀ により測定された標準化濃度を用いて、単位時間当たり細胞当たりのアルギニン産生の速度を決定した。LC-MS / MS 法の概要は、上に示されている。

10

【0471】

誘導後 30、60 および 120 分目におけるアルギニンの産生を、(1) SYN-UCD301 (SYN825; *ArgR* および *malE K* 遺伝子座において染色体に組み込まれた FNR 誘導性プロモーターの制御下に発現する *argA f b r* を含む)、(2) SYN-UCD205 (*ArgR* および低コピープラスミド上の FNR 誘導性プロモーターの制御下に発現する *argA f b r* を含む) ならびに (3) SYN-UCD206 (*ArgR* および *ThyA* ならびに低コピープラスミド上の FNR 誘導性プロモーターの制御下に発現する *argA f b r* を含む) の間で比較した。SYN-UCD103 を対照ニッスル構築物として用い、結果を図 31A に示す。

20

【0472】

図 31A に 0、30、60 および 120 分目に測定した SYN-UCD205、SYN-UCD206 および SYN-UCD301 のアルギニン産生のレベルを示す。アルギニンの産生は、3 菌株すべてで同等であり、最大のアルギニンの産生は、120 分目に SYN-UCD301 で認められ、FNR *ArgA f b r* の染色体組込みが、同じ構築物を発現する低コピープラスミド菌株で認められたのと同様のレベルのアルギニン産生をもたらす、アルギニンの産生の速度をわずかに増加させ得ることがわかる。SYN-UCD206 は、SYN-UCD205 および SYN-UCD301 と比較してアルギニン産生の低下 (60 分目により低いアルギニンレベル) を示したが、120 分目に同等のアルギニン産生レベルに達したことから、*ThyA* がアルギニン産生に対するわずかな減弱化作用を有し得ることがわかる。SYN-UCD103 対照については、アルギニン産生が検出されなかった。

30

【0473】

次に、試料を上述のように調製し、誘導後 120 分目におけるアルギニンの産生を、(1) SYN-UCD204 (*ArgR* および低コピープラスミド上のテトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下に発現する *argA f b r* を含む)、および (2) SYN-UCD301 (*ArgR*、*CmR* および *malE K* 遺伝子座において染色体に組み込まれた FNR 誘導性プロモーターの制御下に発現する *argA f b r* を含む)、(3) SYN-UCD302 (*ArgR*、*ThyA*、*CmR* (クロラムフェニコール耐性) および *malE K* 遺伝子座において染色体に組み込まれた FNR 誘導性プロモーターの制御下に発現する *argA f b r* を含む) および (4) SYN-UCD303 (*ArgR*、*ThyA*、*KanR* (カナマイシン耐性) および *malE K* 遺伝子座において染色体に組み込まれた FNR 誘導性プロモーターの制御下に発現する *argA f b r* を含む) の間で比較した。

40

【0474】

ArgR および *ThyA* を含む、SYN-UCD106 を対照ニッスル構築物として用いた。結果を図 31B に示す。図 31B に見られるように、アルギニンの産生は、0.7 ~ 0.9 μmol / 1 × 10⁹ 細胞に上昇し、アルギニンの産生が、プラスミド上に

50

ArgA f b rを有する菌株とArgA f b rの組み込まれたコピーを有する菌株で同様同じレベルであることがわかる。

[実施例 19]

【0475】

高タンパク質食で飼育した高アンモニア血症およびUCD (s p f - a s h) のマウスモデルにおける遺伝子操作細菌の有効性

実施例 14 で述べた高アンモニア血症 / UCD (s p f - a s h) モデルを用いて、高タンパク質食の投与時のアンモニアレベルに対する細菌染色体に組み込まれた f n r プロモーターにより駆動される ArgA f b r をコードする遺伝子操作細菌の i n v i v o での有効性を評価した。マウスを非改変対照ニッスル細菌または上述のように高レベルのアルギニンもしくはシトルリンを産生するように操作されたニッスル細菌により治療した。

10

【0476】

1 つは Thy A 欠失を含み (S Y N - U C D 3 0 3)、1 つは Thy A 欠失を含まない (S Y N - U C D 3 0 1)、2 つの菌株を有効性について試験し、 Thy A が、染色体 f n r - A r g A f b r を有するこれらの菌株による血液からのアンモニア除去の有効性に影響を及ぼし得るかどうかを判断するために比較した。

【0477】

S p f - a s h マウスを遺伝子操作細菌 (S Y N - U C D 3 0 1、S Y N - U C D 3 0 3) または H 2 O 対照の経口投与により治療した。通常または高タンパク質食を次のように与えた：S Y N - U C D 3 0 1、高タンパク質食 (n = 1 0)；S Y N - U C D 3 0 3、高タンパク質食 (n = 1 0)；H 2 O 対照、通常食 (n = 1 0)；H 2 O 対照、高タンパク質食 (n = 1 0)。S Y N - U C D 3 0 1、S Y N - U C D 3 0 3 および S Y N - U C D 1 0 6 については、細菌を 1 回投与した 1、5、6 および 7 日目を除いて、 $> 1 \times 1 0^{10}$ 細胞 / m l の $1 0 0 \mu l$ の用量を 1 2 日間にわたり 1 日 2 回投与した。実施例 16 で述べたのと本質的に同じプロトコールに従い、アンモニアレベルを得るために血液を 5 日目に採取した (図 3 2 A)。1 0 日目に、生存率を解析し、生存の時間的経過を図 3 2 B に示す。

20

【0478】

図 3 2 A に示すように、高タンパク質食における s p f - a s h マウスのアンモニアレベルは、H 2 O 高タンパク質食対照群と比較して S Y N - U C D 3 0 1 および S Y N - U C D 3 0 3 群において低下したことから、構築物が染色体に組み込まれた場合、F N R 誘導性プロモーターが ArgA f b r 発現を駆動し、操作細菌により治療したマウスの血液中のアンモニアレベルの低下をもたらすことがわかる。アンモニアレベルの観測された低下は、S Y N - U C D 3 0 1 および S Y N - U C D 3 0 3 の両方において同様であり、Thy A 栄養要求性が S Y N - U C D 3 0 3 の有効性に有意な影響を有さないことがわかる。図 3 2 B に見られるように、S Y N - U C D 3 0 1 および S Y N - U C D 3 0 3 は、対照と比較して長期の生存を示した。実験を 2 回連続して行ったところ、同様の結果が得られた。

30

[実施例 20]

【0479】

様々な用量における有効性の比較

実施例 14 で述べた高アンモニア血症 / UCD (s p f - a s h) モデルにおける最適アルギニン産生を達成しながら、用いることができる最低用量を決定するために、S Y N - U C D 3 0 3 の 3 用量を投与した。

S p f - a s h マウスを遺伝子操作細菌 (S Y N - U C D 3 0 3) または H 2 O 対照の強制経口投与により治療した。S Y N - U C D 3 0 3 については、 $1 \times 1 0^7$ 、 $1 \times 1 0^8$ 、 $1 \times 1 0^9$ および $1 \times 1 0^{10}$ C F U s の用量を、細菌を 1 回投与した 1、5、6 および 7 日目を除いて、1 2 日間にわたって 1 日 2 回 $1 0 0 \mu l$ の容量で投与した。通常食または高タンパク質食を次のように与えた：S Y N - U C D 3 0 3 ($1 \times 1 0^7$ C F U

40

50

)、高タンパク質食 (n = 10) ; SYN - UCD303 (1×10^8 CFU)、高タンパク質食 (n = 10) ; SYN - UCD303 (1×10^9 CFU)、高タンパク質食 (n = 10) ; H2O対照、通常食 (n = 10) ; H2O対照、高タンパク質食 (n = 10))。実施例16で述べたのと本質的に同じプロトコールに従い、アンモニアレベルを得るために血液を5日目に採取した。5日目に血中アンモニアレベルを各用量について解析した。結果を図33に示す。 1×10^8 および 1×10^9 の両用量は、このモデルにおける血中アンモニアレベルの有意な低下をもたらすのに十分であった。

[実施例21]

【0480】

ニッスルの滞留時間

非改変大腸菌ニッスルおよび本発明の遺伝子操作細菌は、例えば、消化管または血清中の防御因子により殺滅され得る。細菌の *in vivo* での滞留時間を計算することができる。大腸菌ニッスルのストレプトマイシン耐性菌株を用いる非限定的な例を以下に述べる。代替実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌の滞留時間を計算する。

【0481】

C57BL/6マウスを動物施設において1週間馴化させた。1週間の馴化後(すなわち、0日目)に、ストレプトマイシン耐性ニッスル(SYN-UCD103)を1~3日目に強制経口投与によりマウスに投与した。マウスに抗生物質を前投与しなかった。投与された細菌、すなわち、接種物の量を表25に示す。接種物のCFUを決定するために、接種物を連続希釈し、ストレプトマイシン(300 μ g/mL)を含むLBプレート上で平板培養した。プレートを37°Cで一晩インキュベートし、コロニーを計数した。

【0482】

【表27】

表25. 強制経口投与により投与したCFU

強制経口投与により投与したCFU			
菌株	1日目	2日目	3日目
SYN-UCD103	1.30E+08	8.50E+08	1.90E+09

【0483】

2~10日目に、最大で6匹のマウス(ID番号1~6;表14)から糞便ペレットを採取した。ペレットをPBSを含む管に量り入れ、ホモジナイズした。糞便ペレット中のニッスルのCFUを決定するために、ホモジナイズした糞便ペレットを連続希釈し、ストレプトマイシン(300 μ g/mL)を含むLBプレート上で平板培養した。プレートを37°Cで一晩インキュベートし、コロニーを計数した。

【0484】

1日目の糞便ペレットも採取し、ストレプトマイシン(300 μ g/mL)を含むLBプレート上で平板培養して、ストレプトマイシン耐性であったマウス胃腸管に固有の菌株が存在していたかどうかを判断した。マウス胃腸管内に依然として滞留していた投与ニッスルの時間経過および量を表26に示す。

図34に *in vivo* でのニッスルの滞留のグラフを示す。ストレプトマイシン耐性ニッスルを、抗生物質を前投与せず強制経口投与によりマウスに投与した。6匹すべてのマウスからの糞便ペレットを投与後にモニターして、マウスの胃腸管内に滞在している投与ニッスルの量を測定した。バーは、マウスに投与した細菌の数を表す。線は、10日間連日にわたる各日の糞便試料から回収されたニッスルの数を表す。

【 0 4 8 5 】

【 表 2 8 】

表 2 6 . ニッスルの *i n v i v o* での存在

ID	2 日 目	3 日 目	4 日 目	5 日 目
1	2.40E+05	6.50E+03	6.00E+04	2.00E+03
2	1.00E+05	1.00E+04	3.30E+04	3.00E+03
3	6.00E+04	1.70E+04	6.30E+04	2.00E+02
4	3.00E+04	1.50E+04	1.10E+05	3.00E+02
5		1.00E+04	3.00E+05	1.50E+04
6		1.00E+06	4.00E+05	2.30E+04
平均	1.08E+05	1.76E+05	1.61E+05	7.25E+03

10

ID	6 日 目	7 日 目	8 日 目	9 日 目	1 0 日 目
1	9.10E+03	1.70E+03	4.30E+03	6.40E+03	2.77E+03
2	6.00E+03	7.00E+02	6.00E+02	0.00E+00	0.00E+00
3	1.00E+02	2.00E+02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
4	1.50E+03	1.00E+02		0.00E+00	0.00E+00
5	3.10E+04	3.60E+03		0.00E+00	0.00E+00
6	1.50E+03	1.40E+03	4.20E+03	1.00E+02	0.00E+00
平均	8.20E+03	1.28E+03	2.28E+03	1.08E+03	4.62E+02

20

[実施例 2 2]

【 0 4 8 6 】

i n v i v o での細菌菌株の腸内滞留および生存

S Y N - U C D 3 0 3 (組込み *f n r S* 誘導性プロモーター駆動 *A r g A f b r*、カナマイシン耐性、*T h y A*、図 3 5 C) の局在および腸内滞留時間を S Y N - U C D 1 0 6 (*A r g R*、*T h y A* およびクロラムフェニコール耐性、図 3 5 B) および S Y N - U C D 1 0 3 (ストレプトマイシン耐性ニッスル、図 3 5 A) と比較した。マウスに強制経口投与し、様々な時点で屠殺し、流出物を小腸、盲腸および結腸の様々な部分から採取した。

【 0 4 8 7 】

細菌培養を一夜増殖させ、ペレット化した。ペレットを約 10^{10} C F U / m L の最終濃度で P B S に再懸濁した。マウス (C 5 7 B L 6 / J、10 ~ 12 週齢) に 100μ L の細菌 (約 10^9 C F U) を強制経口投与した。マウスの飲料水を 0.1 mg / mL のアンヒドロテトラサイクリン (A T C) および味を良くするための 5 % スクロースを含むように交換した。各時点 (強制経口投与後 1、4、8、12、24 および 30 時間目) に、動物 ($n = 4$) を安楽死させ、腸、盲腸および結腸を除去した。小腸を 3 つの部分に切断し、大腸および結腸をそれぞれ 2 つの部分に切断した。各部分を 0.5 mL の冷 P B S でフラッシュし、別個の 1.5 mL 管に収集した。盲腸を採取し、内容物をしぼり出し、 0.5 mL の冷 P B S でフラッシュし、 1.5 mL 管に収集した。腸流出物を連続希釈平板培養のために氷上においた。

40

【 0 4 8 8 】

各流出物中の細菌の C F U を決定するために、流出物を連続希釈し、カナマイシンを含

50

むLBプレート上で平板培養した。プレートを37℃で一夜インキュベートし、コロニーを計数した。各コンパートメントに認められた細菌の量ならびにSYN-UCD103、SYN-UCD106およびSYN-UCD303の滞留時間を図35に示す。図35に見られるように、3つの菌株すべてが同様に挙動する。図35Aを図35Bと比較すると、ThyA栄養要求性およびArgRは、滞留および通過時間に対する実質的な影響を有さないと思われる。

[実施例23]

【0489】

腸滞留時間に対する栄養要求性の影響

栄養要求性が局在および滞留時間に対して影響を有し得るかどうかを判断するために、上述のマウスモデルを用いて、SYN-UCD303(ThyA)の滞留をSYN-UCD304(野生型ThyA)と比較した。ArgR欠失およびargA f b rが滞留に対する影響を有するかどうかを判断するために、SYN-UCD103(ストレプトマイシン耐性対照ニッスル)を並行して投与する。

10

【0490】

実施例22で述べたように細菌を用意し、マウスに強制経口投与し、安楽死させ、様々な時点で腸流出物を採取する。各流出物中の細菌のCFUを決定するために、実施例20で述べたように流出物を連続希釈し、平板培養する。SYN-UCD103についてはストレプトマイシン含有プレートを、SYN-UCD301についてはクロラムフェニコール含有プレートを用いる。

20

[実施例24]

【0491】

高アンモニア血症のTAAモデル

マウスのTAA処理は、UCD、急性もしくは慢性肝臓疾患ならびにHEに随伴する血中アンモニアレベルの増加を模擬するために以前に文献において用いられた(Wallace MCら、Lab Anim.、2015年4月;49巻(増補1):21~9頁、Standard operating procedures in experimental liver research: thioacetamide model in mice and rats)。いくつかの実施形態では、高アンモニア血症のTAA誘発性マウスモデルを用いて、血中アンモニアレベルを低下させる遺伝子操作細菌の能力を検討する。TAAは、spf-ashモデルの代替としての役割を果たす。spf-ashモデルは、遺伝モデルであるため、マウスの数が限られており、したがって、野生型マウスにおける誘導性モデルを開発することは、目的の可能性のある菌株のin vivo試験を著しく促進することとなる。

30

【0492】

血中アンモニアの長期の上昇に対する操作細菌の影響を検討するために、300mpkの用量のチオアセトアミド(TAA)も投与するC57BL6マウスに細菌を投与する。

【0493】

C57BL6(10週齢)にSYN-UCD103もしくはSYN-UCD303(100μlの $>1 \times 10^{10}$ 細胞/ml)または媒体対照を1日1回投与する。あるいは、マウスに2-1日量の細菌(100μlの $>1 \times 10^{10}$ 細胞/ml)(各治療群につきn=5)を午前1回、午後1回投与する。細菌の前投与の3日後に、マウスに300mpkのチオアセトアミド(TAA)または対照としてのH₂Oを腹腔内投与する。あるいは、マウスに250mpkを1日2回、午前1回、午後1回投与する。試験の期間は、5日である。アンモニアレベルを測定し、全般的な健康状態、生存、体重変化をモニターする。

40

【0494】

手短に述べると、動物を7日間馴化する。時間経過の1日目に、動物の体重を測定し、採血して、ベースラインアンモニアを測定し、糞便ペレットを採取し(ケージごとに)、初期血中アンモニアレベルに基づいて無作為化する。動物にH₂O、SYN-UCD10

50

3またはSYN-UCD303(100 μ l/用量/動物)を1回または2回(午前および午後)強制経口投与により投与する。水をH₂O(+) 20mg/ml ATCに交換する。2日目に、動物にH₂O、SYN-UCD103またはSYN-UCD303(100 μ l/用量/動物)を1回または2回(午前および午後)強制経口投与により投与する。3日目に、動物の体重を測定し、H₂O、SYN-UCD103またはSYN-UCD303(100 μ l/用量/動物)を1回または2回(午前および午後)強制経口投与により投与する。さらに、動物に300mpk TAA(または生理食塩水対照)を腹腔内投与する。あるいは、動物に250mpk TAA(または生理食塩水対照)を事前に1回、午後1回投与する。4日目に、動物の体重を測定し、採血し、血中アンモニアを測定する。糞便ペレットをケージごと採取する。動物にH₂O、SYN-UCD103またはSYN-UCD303(100 μ l/用量/動物)を1回または2回(午前および午後)強制経口投与により投与する。動物に250mpkのTAA(または生理食塩水対照)も投与してもよい。5日目に、動物の体重を測定し、採血し、血中アンモニアを測定する。糞便ペレットを採取する(ケージごと)。動物にH₂O、SYN-UCD103またはSYN-UCD303(100 μ l/用量/動物)を1回または2回(午前および午後)強制経口投与により投与する。アンモニアレベル、糞便ペレットにおける細菌負荷ならびに全般的な健康状態、生存および体重変化をモニターする。

10

[実施例25]

【0495】

アルギナーゼ阻害剤を用いた高アンモニア血症のモデル

20

遺伝的spf-ashモデルの代替として、アルギナーゼ阻害剤+/-高タンパク質食を高アンモニア血症の誘導性モデルとして用いる。アルギナーゼ阻害剤は、少なくとも2つのクラスに分類される(Steppanら、Front Immunol.、2013年;4巻:278頁、Development of Novel Arginase Inhibitors for Therapy of Endothelial Dysfunctionに記載されている)。アルギナーゼ阻害剤の第1の群は、1-アルギニン(2)S-アミノ-6-ヘキサン酸(ABH)のポロン酸類似体およびS-2-BECからなり、その両方がアルギナーゼの触媒活性を阻害する。N-ヒドロキシ-1-アルギニン(NOHA)およびN-ヒドロキシ-ノル-1-アルギニン(ノル-NOHA)によって主として代表される、アルギナーゼ阻害剤の他のカテゴリーは、N-ヒドロキシ-グアニジニウム側鎖を特徴とし、アルギナーゼの金属架橋水酸化物イオンをそれらのN-ヒドロキシ基で置換することによってアルギナーゼを阻害する。モデル開発試験で、各群のアルギナーゼ阻害剤、BECおよびノル-NOHA+/-高タンパク質食(70%タンパク質)を用いる。

30

【0496】

操作細菌が血液中のアンモニアレベルを変化させることができるかどうかを判断するために、野生型マウスにおいて各群のアルギナーゼ阻害剤、BECおよびノル-NOHA、+/-高タンパク質食(70%タンパク質)を用いた誘導性モデルを用いる。C57BL/6(雌、8週)を遺伝子操作細菌(100 μ lの $>1 \times 10^{10}$ 細胞/ml)または媒体対照の強制経口投与およびBECまたはノルNOHAの腹腔内投与により治療し、通常食(治療群当たりn=5)または高タンパク質食(治療群当たりn=5)を与えて飼育する。投与群は、SYN-UCD303および媒体対照治療動物について次の通りである:通常食(n=5);高タンパク質食(70%タンパク質食;n=5);高タンパク質食(+)BEC(n=5);高タンパク質食(+)ノルNOHA(n=5)。

40

【0497】

時間経過の1日目に、動物の体重を測定し、採血して、ベースラインアンモニアを測定し、初期血中アンモニアレベルに基づいて無作為化する。糞便ペレットを採取する(ケージごと)。動物にH₂O、SYN-UCD303またはSYN-UCD103(100 μ l/用量/動物)の強制経口投与により投与する。水をH₂O(+) 20mg/ml ATCに交換する。2日目に、動物にH₂O、SYN-UCD303またはSYN-UCD

50

103 (100 μ l / 用量 / 動物) の1回または2回 (午前および午後) の強制経口投与により投与する。3日目に、動物の体重を測定し、H₂O、SYN-UCD303またはSYN-UCD103 (100 μ l / 用量 / 動物) の1回または2回 (午前および午後) の強制経口投与により投与する。さらに、動物にBEC (25 mpk) またはノルノHA (100 mpk) または生理食塩水対照を腹腔内投与する。高タンパク質食群について、飼料を通常食から70%タンパク質食に変更する。4日目に、動物の体重を測定し、採血し、血中アンモニアを測定する。糞便ペレットをケージごとに採取する。動物にH₂O、SYN-UCD303またはSYN-UCD103 (100 μ l / 用量 / 動物) の1回または2回 (午前および午後) の強制経口投与により投与する。動物にBEC (25 mpk) またはノルノHA (100 mpk) を腹腔内投与する。4日目に、動物にH₂O、SYN-UCD303またはSYN-UCD103 (100 μ l / 用量 / 動物) の1回または2回 (午前および午後) の強制経口投与により投与する。動物の体重を測定し、投与後1時間目に採血し、血中アンモニアを測定する。糞便ペレットをケージごとに採取する。動物にBEC (25 mpk) またはノルノHA (100 mpk) の腹腔内投与も行う。5日目に、動物にH₂O、SYN-UCD303またはSYN-UCD103 (100 μ l / 用量 / 動物) の1回または2回 (午前および午後) の強制経口投与により投与する。動物の体重を測定し、投与後1時間目に採血し、アンモニアレベルを測定する。

10

【0498】

SYN-UCD202、SYN-UCD204およびSYN-UCD103菌株を用いた同様の試験を行った。結果を図28に示す。

20

[実施例26]

【0499】

アルギニン産生に対する増殖能および代謝活性の影響

遺伝子操作細菌によるアルギニン産生のための細胞分裂および/または活性代謝の必要条件をSYNUCD-303菌株において検討した。

【0500】

SYNUCD-303を70%イソプロパノールまたは対照としてのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)とともに振盪しながら1時間インキュベートした。70%イソプロパノールは、細胞膜を破壊し、細胞分裂を妨げたが、細胞代謝を可能にする。PBSインキュベーションは、細胞に対して何の影響も有さなかった(示さず)。処理後、細胞を、0.5%グルコースおよび3mMチミジンを追加したM9培地中で特定の比で混合した。細胞を振盪しながら37℃で2時間インキュベートした。細胞は、M9培地に含まれていた塩化アンモニウムを用いてアルギニンを形成することができる。ゼロ時間目および2時間のインキュベーションの後に再度アルギニン濃度を培地中で測定し、10億個の細胞当たり1時間当たり産生されるアルギニンの量を計算した。図36Aおよび36Bに見られるように、培養中のイソプロパノール処理細胞と非処理細胞との比率がより大きい場合に、平板培養により決定されるより少数のCFUsおよびより低いレベルのアルギニン産生がもたらされる。存在する細菌の量に対するアルギニンの産生量は、様々な培養にわたり一定のままであった(図36C)。これらの結果は、生存細菌のみがアルギニン産生に寄与することを示すものである。

30

40

[実施例27]

【0501】

カニクイザルにおける28日間にわたり毎日経鼻胃管投与した後のSYN-UCD-303の反復投与薬物動態および薬力学試験(非GLP)

遺伝子操作細菌または大腸菌ニッスル単独の投与により生じる可能性がある毒性を評価するために、雌カニクイザルへの28日間にわたる毎日の経鼻胃管(NG)投与の後のSYN-UCD-303およびカナマイシン耐性を有する大腸菌ニッスル(SYN-UCD107)の薬物動態および薬力学を試験した。カニクイザルを選択した理由は、この種が系統発生的にかつ生理学的にヒトと密接に関連しており、非臨床的毒性評価に一般的に用いられる種であるためである。遺伝子操作細菌は、ヒトにおける提案された投与経路と

50

一致する、経鼻胃管により投与した。動物の全般的健康状態（臨床的観察）、体重、臨床病理（血清化学、血液学および凝固）を追跡した。糞便試料を細菌負荷について検査した。血漿をアンモニアレベルについて分析した。

【0502】

A. 材料、動物および投与計画：

本試験は、非臨床実験室試験に関する、米国食品医薬品局により公布された安全性試験の実施に関する基準（Good Laboratory Practice Regulations）（Title 21 of the Code of Federal Regulations、Part 58；1979年6月20日発効）およびOECD GLP原則（OECD Principles on Good Laboratory Practice）（C[97]186/最終；1997年発効）に従って実施された。動物は、実験動物の管理および使用に関する指針（Guide for the Care and Use of Laboratory Animals）（National Research Council 2011）に記載の勧告に基づいて個別收容した。

10

【0503】

本試験に用いた動物は、3～6kg（最初の身体検査）で、年齢3～8年（最初の身体検査）の雌パーパスブレッド非ナイーブカニクイザル（Macaca fascicularis）（SNBL USAストック、原産：Cambodia）であった。

【0504】

バイアスの制御のために、動物を、同様の群別体重分布が得られるように体重で層別して群に無作為化した。無作為化に選択された動物数ならびにそれらの体重および年齢を表27に含める。

20

【0505】

【表29】

表27. 無作為化に供した動物

性別	動物数	年齢	体重
雌	17	3～6歳	3.1～4.7Kg

動物は、個別の入れ墨数により識別した。

30

【0506】

17匹の動物を投与開始前の7日間馴化させ、15匹の動物を治療群に割り付けた。予備の動物を1日目に試験から除去した。

40

【0507】

試験期間中、動物にPMI Lab Diet（登録商標）Fiber-Plus（登録商標）Monkey Diet 5049ビスケットを毎日2回与えた。投与前の少なくとも2時間動物を絶食させ、投与後1時間以内に給餌した。動物はまた、特定の処置（例えば、血清化学検査のための採血、糞便採取の前）による必要に応じて絶食させた。飼料を汚染物質について定期的に分析しており、製造業者の規格の範囲内であることが認められた。試験の結果に支障を来たすようなレベルの汚染物質は存在するとは予期されない。

【0508】

新鮮な飲料水をすべての動物に供給し、自由に摂取させた。水を汚染物質について定期

50

的に分析した。試験の結果に支障を来たすようなレベルの汚染物質は存在しなかった。動物に試験中果実、野菜、他の補助食品およびケージエンリッチメントデバイスを与えた。

【0509】

事前に検疫した動物を投与の開始（1日目）の前の7日間試験室に馴化させた。最終投与は、28日目に行った。体重を組み込んだ層化無作為化スキームを用いて、動物を試験群に割り付けた。動物を群に割り付け、表28に示すように処置した。

【0510】

【表30】

表28. 群割り付け

群	用量				フラッシュ*		雌の数 (動物番号)
	被験/対照物質	用量レベル (cfu/動物)	濃度 (cfu/mL)	容積 (mL/動物)	重炭酸濃度 (M)	容積 (mL/動物)	
1	対照物質*	0	0	10	0.36	5	3 (1, 3, 5)
2	SYN-UCD107	1×10^9	1×10^9	1	0.12	14	3 (1, 3, 5)
3	SYN-UCD107	1×10^{12}	1×10^{11}	10	0.36	5	3 (1, 3, 5)
4	SYN-UCD303	1×10^9	1×10^9	1	0.12	14	3 (19, 21, 23)
5	SYN-UCD303	1×10^{12}	1×10^{11}	10	0.36	5	3 (25, 27, 29)

* 重炭酸ナトリウムの濃度：0.36Mまたは0.12M（対照物質については0.36M）

【0511】

SYN-UCD107およびSYN-UCD303保存液は、2.2%グルコースおよび3mMチミジンを含むXPBS中15%グリセロール中 1×10^9 cfu/mLおよび 1×10^{11} cfu/mLで調製し、86~-60 で保持した（表28参照）。重炭酸ナトリウムを含む20%グリセロールで調製したPBSを対照媒体として用いた。重炭酸濃度は、0.36Mであり、重炭酸ナトリウムについては0.12Mであった（表28参照）。投与当日に、細菌および媒体対照を冷凍庫から取り出し、氷上において解凍し、投与するまで氷上においた。

【0512】

動物に0、 1×10^9 または 1×10^{12} cfu/動物で投与した。すべての動物に28日間にわたり1日1回、経鼻胃管（NG）により投与した後、対照/媒体でフラッシュした。重炭酸塩の濃度および各群の容量を表28に明記する。バイアルは、注射器に投与液を吸引する前に少なくとも3回反転した。投与部位および投与時間（フラッシュ時間の

10

20

30

40

50

終了)を記録した。6日目に、群4(SYN-UCD303、 1×10^9 /動物)における動物19、21および23は、14 mLの代わりに5 mLの重炭酸塩フラッシュを、その後被験物質投与を受けた。

【0513】

B. 解析

全般的状態および重量

全般的状態：臨床的観察は、-6日目に開始して、44日目まで、1日2回実施した。第1の観察は、午前であった。第2の観察は、午前の観察の後4時間より早くない時点であった。投与期間中は、第2の観察は、投与後4時間(±10分)目を実施した。必要に応じて、追加の臨床的観察を実施した。

10

被験物質に関連した臨床的観察所見は、本試験では確認されなかった。

【0514】

同様に収容される動物に一般的に認められ、個体間で散発的に発生した偶発的かつ/または処置上の所見は、対照動物に認められ、馴化期間にも存在し、投与群間で重症度および発生率が増加しなかった。これらは、皮膚に関連する所見(痂皮/結痂、創傷、擦過傷、異常な皮膚変色、紫斑)、脱毛、曲尾、凹眼、食欲不振、嘔吐および泌尿生殖器分泌物を含む。

【0515】

重量：体重は、-6、1、8、11、15、22、29、36および43日目、適宜、最初の給餌および投与前に測定した。

20

【0516】

体重に対する被験物質に関連する影響は、本試験では確認されなかった。ベースライン(1日目)と比べて、36日目までに5~10%の体重の減少が、対照を含むすべての群にわたり明らかであり、試験処置に関連すると判断された。値はベースラインに完全には戻っていなかったが、36日目と比較して、上向き傾向が43日目の入手可能な体重データで認められた。

【0517】

臨床病理

血液採取：動物は、毎日の投与前に一夜ならびに血清化学および血漿生物分析用の試料を含む各一連の採取の少なくとも4時間前に絶食させた。これらの場合、関連する臨床病理評価は、絶食動物についてのものであった。血液は、拘束した覚醒動物の末梢静脈の静脈穿刺によって1回の採血(可能な場合)で採取し、分析用の適切な管に次のように分割した：血液学：約1.3 mL、K2EDTA管；凝固：約1.8 mL、3.2%クエン酸ナトリウム管；血清化学：約1.0 mL、血清分離管(SST)；血漿試料：約1.0 mL、ヘパリンリチウム；臨床病理評価用の血液は、SNBL USA SOPsに従って、血清もしくは血漿に処理するか、またはそのまま用いた。

30

【0518】

可能な場合には、血液は、1回の採血により採取し、次に適切に分割する。試料採取頻度を表29に要約する。

【0519】

40

【表 3 1】

表 2 9 : 試料採取頻度

時点	血液学	凝固	血清化学	血漿試料 (氷上)	糞便試料 (氷上)
馴化 1 週目	1x	1x	1x	1x	1x
投与 1 週目	2 日目 (投与前)	2 日目 (投与前)	2 日目 (投与前)	2 および 7 日目 (投与前)	2、4 および 7 日目 (投与前)
投与 2 週目	1 4 日目 (投与前)	1 4 日目 (投与前)	1 4 日目 (投与前)	1 4 日目 (投与前)	1 4 日目 (投与前)
投与 3 週目	-	-	-	-	1 8 ~ 2 1 日目 に 1 日 1 回 (投与前)
投与 4 週目	-	-	-	2 8 日目 (投与前)	2 2 ~ 2 8 日目 に 1 日 1 回 (投与前)
投与 5 週目	3 0 日目	3 0 日目	3 0 日目	3 0 日目	2 9、3 0 および 3 5 日目に 1 日 1 回
投与 6 週目	-	-	-	-	4 0 日目
投与 6 週目	-	-	-	-	4 6 および 5 0 日

- = 該当なし

X = 当該週内に実施された処置の回数

10

20

30

【 0 5 2 0 】

表 3 0 に臨床病理評価情報を要約する。

【 0 5 2 1 】

【表 3 2】

表 3 0. 臨床病理アッセイ情報

アッセイ	分析した試料の採取日	測定したパラメータ	残留試料処分
血液学	6、2、14 および30日目	ヘマトクリット、ヘモグロビン、 平均赤血球ヘモグロビン、 平均赤血球ヘモグロビン濃度、 平均赤血球容積、平均血小板容積、 血小板、赤血球、赤血球分布幅、 網状赤血球百分率、 白血球ならびに白血球百分率数： 好塩基球、好酸球、リンパ球、 単球および好中球	2～8℃で 保存する ^a
凝固	6、2、14 および30日目	活性化部分トロンボプラスチン時間、 フィブリノーゲンおよびプロトロンビン時間	-60～-86℃ で保存する ^a
血清化学	6、2、14 および30日目	アラニンアミノトランスフェラーゼ、 アルブミン、アルブミン/グロブリン比、 アルカリホスファターゼ、 アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、 血中尿素窒素、カルシウム、塩素、 クレアチンキナーゼ、クレアチニン、 ガンマグルタミルトランスフェラーゼ、 グロブリン、グルコース、無機リン、 カリウム、ナトリウム、総ビリルビン、 総コレステロール、総蛋白および トリグリセリド	-60～-86℃ で保存する ^a

^a 残留試料は、試験終了前に廃棄した。

【0522】

血液学、凝固および血清化学パラメーターにおける被験物質に関連した影響は、本試験では確認されなかった。

【0523】

血漿試料： 動物は、試料の除去の前の4時間絶食させた。約1 L mの血液を、-1および30日目に、ならびに2、7、14および28日目の投与前に大腿静脈から採取し、2 mLヘパリンリチウム管に移した。管内への標的容積の血液の採取後に、約0.05 (-1および2日目) または0.1 mL (7、14、28および30日目) の鉱油を加えて、管内の血液の表面を覆った。管は、反転せずに、湿潤氷上においた。

【0524】

試料を採取してから15分以内に2～8 で遠心分離して、血漿を得て、血漿は-60～-80 での保存の前にドライアイス上に保持した。

【0525】

試料の分析は、血中アンモニア分析機器を用いて行った。

【0526】

糞便試料の採取： 動物当たり2つの糞便試料を表29に示す標的時点に採取した。試料採取日時を記録した。約5 mLのPBSを含む50 mLファルコン管を容器として用い

10

20

30

40

50

た（糞便が液体である場合、PBSを加えない）。糞便試料の重量を得るために、容器の試料採取前後の重量を測定した。試料は、各動物のケージの底から採取した。新鮮で、非汚染試料を得るために、採取前に残存食物を除去し、ケージパンを掃除し、ゴムぞうきんをかけて、デブリおよび/または水を除去した。- 5、2、4、7および14日目に、最初の給餌および/または投与の後に食物除去およびパン掃除を実施した。18、20、24、28、30、35、40、46および50日目に、食物除去およびパン掃除を各採取の前の夜に実施した。視覚的に新鮮な糞便試料も臨床的観察を除く、処置を行う前の朝に採取した。

【0527】

糞便スワブ採取：糞便試料が予定日の終了までに採取されなかった場合、処置用ケージに拘束した動物の直腸から綿チップアプリケーションを用いて糞便スワブ試料を採取した。

10

試料は、採取直後に湿潤氷上においた。試料を分析時まで-20~-15で保存した。試料の分析は、実施例31で述べたPCR分析法を用いて行った。

【0528】

動物当たり2つの糞便試料を-5日目に、ならびに2、4、7および14日目の投与後に採取し、動物当たり3つの糞便試料を29、30、35、40、46および50日目に、ならびに18~28日目の投与前に採取した。約5mLのPBSを含む50mLファルコン管を-5~14日目の採取に用い、管1については約5mLのPBS、管2については20mLの50%グリセロールおよび10mMチミジン、管3については20mLの50%グリセロール/PBSを含む50mLファルコン管を18~50日目の採取に用いた。試料を採取直後に湿潤氷上におき、18~50日目に採取した各管の内容物を滅菌済み舌圧子を用いて破壊し、混合した。

20

【0529】

採取日の終了時までに表29に示した動物から糞便試料が採取されなかったので、動物当たり2つの糞便スワブ試料を採取した。試料の採取後、スワブの綿部分を1mLのPBSを含む5mLクリオバイアルに移し、直ちに湿潤氷上においた。

【0530】

結果を図37に示すが、糞便試料から定量した細菌の量がカナマイシン耐性対照ニッスル(SYN-UCD107)およびSYN-UCD303について類似したパターンに従うことが示されている。糞便試料中の細菌は、35日目までに糞便1mL当たり1000個未満の細菌のレベルに達する。結果から、これらの投与条件下では、糞便中の対照カナマイシン耐性ニッスルと同様の量の細菌が栄養要求体SYN-UCD303について回収されたことがわかる。同様の結果がマウスで観測された。結論として、SYN-UCD303は、ニッスル(SYN-UCD107)とほぼ同じ濃度でNHP糞便中に存在すると思われる。

30

【0531】

全体的結論として、被験物質であるSYN-UCD303は、 1×10^{12} CFU/動物までの用量で28日間毎日のNG投与後に雌カニクイザルによって十分に耐えられた。被験物質に関連した死亡は発生せず、臨床的観察、体重および臨床病理評価について被験物質に関連した影響は確認されなかった。

40

[実施例28]

【0532】

カニクイザルにおける28日間にわたり毎日経鼻胃管投与した後のSYN-UCD-303の反復投与薬物動態および薬力学試験(非GLP)

SYN-UCD303、SYN-UCD304、SYN-UCD305およびSYN-UCD306の薬物動態および薬力学は、実施例27で述べたのと本質的に同様に雌カニクイザルへの28日間にわたる毎日の経鼻胃管(NG)投与の後に試験する。カニクイザルを選択した理由は、この種が系統発生学的にかつ生理学的にヒトと密接に関連しており、非臨床的毒性評価に一般的に用いられる種であるためである。遺伝子操作細菌は、ヒト

50

における提案された投与経路と一致する、経鼻胃管により投与した。動物の全般的健康状態（臨床的観察）、体重、臨床病理（血清化学、血液学および凝固）を追跡する。血漿をアンモニアレベルについて分析し、糞便試料を細菌負荷について検査する。

[実施例 29]

【0533】

カニクイザルにおける2週間の回復期間を含む4週間の毒性試験（GLP）

遺伝子操作細菌の投与により生じる可能性がある毒性を評価するために、GLP条件下での雌カニクイザルへの28日間にわたる毎日の経鼻胃管（NG）投与の後のSYN-UCD303の薬物動態および薬力学を試験する。

【0534】

他の実施形態では、SYN-UCD304、SYN-UCD305および/またはSYN-UCD306について試験を行う。

【0535】

試験は、本試験は、非臨床実験室試験に関する、米国食品医薬品局により公布された安全性試験の実施に関する基準（Good Laboratory Practice Regulations）（Title 21 of the Code of Federal Regulations, Part 58; 1979年6月20日発効）およびOECD GLP原則（OECD Principles on Good Laboratory Practice）（C[97]186/最終; 1997年発効）に従って実施される。動物は、実験動物の管理および使用に関する指針（Guide for the Care and Use of Laboratory Animals）（National Research Council 2011）に記載の勧告に基づいて個別収容する。

【0536】

すべての材料がGMP基準に従って製造されることを除いて、実施例27で述べたのと本質的に同様に動物にSYN-UCD303または対照媒体を投与する。投与を表31に示す。さらに、動物を14日間馴化させ、投与期間は、毎日28日間であり、その後28日間の回復期間をおく。さらに、動物を試験の終了時に安楽死させて、組織学的分析を行う。

【0537】

10

20

30

【表 3 3】

表 3 1. 投与期間および計画

馴化	14日				
被験物質の調製	毎日				
投与期間	28日間毎日				
回復期間	28日				
規則	FDA GLP				
				動物の数	
群	被験物質	用量レベル	投与経路	雄 (♂)	雌 (♀)
1	媒体	0	NG	3^a+2^b	3^a+2^b
2	SYN-UCD303	1×10^9	NG	3^a	3^a
3	SYN-UCD303	1×10^{10}	NG	3^a	3^a
4	SYN-UCD303	1×10^{11}	NG	3^a+2^b	3^a+2^b

^a 終了剖検、29日目^b 回復剖検、56日目

【0538】

試験解析は、表 3 2 に示すように行う。血液学、凝固、血清化学および血漿試料パラメーターは、実施例 2 7 で述べたのと本質的に同様であり、実施例 2 7 で述べた方法を用いて解析する。糞便試料の採取および分析は、実施例 2 7 で述べたのと本質的に同様に行う。

【0539】

10

20

30

【表 3 4 - 1】

表 3 2. 試験解析

処置	時点
用量濃度解析	1日目および28日目
臨床観察	1日2回（症状観察）
摂餌量	1日1回（定性的）
体重	週1回
眼科学	馴化中1回、4週目および8週目
ECGs/HR/BP	馴化中1回、4週目および8週目
血液学	馴化中2回、2日目（投与前）、15日目（投与前）、 29日目、42日目および56日目
凝固	馴化中2回、2日目（投与前）、15日目（投与前）、 29日目、42日目および56日目
血清化学	馴化中2回、2日目（投与前）、15日目（投与前）、 29日目、42日目および56日目
体（直腸）温	馴化中2回（測定間に少なくとも7日をおく）、 投与前週1回（投与前およそ6時間） ならびに5および8週目

10

20

30

【表 3 4 - 2】

処置	時点
糞便試料採取（細菌培養）	馴化中 1 回、2、7 および 14 日目、29 日目、 33 日目ならびに 8 週目の投与前 直腸／糞便スワブを綿チップアプリケーターを 介して採取する；スワブの綿部分を適切なブロス/ 培地を含む管に移し、直ちに湿潤水上にのせる。 糞便試料を分析時まで 2～8℃で保存する。
サイトカイン血液採取	馴化中 1 回、1、3、7、14 および 28 日目 （投与後 6 時間）ならびに 56 日目
保管血液試料採取 （可能な分析用に保持すべき試料）	馴化中 1 回、1、3、7、14 および 28 日目 （投与後 6 時間）ならびに 56 日目；血液試料を 血清に処理して、試料を凍結保存する。
剖検および組織採取	全動物（例えば、結腸、腸、盲腸、肝臓、脾臓）
臓器重量	全動物
PK／PD 評価のための組織採取	全動物
組織病理学	全動物
統計解析	比較（Anova／Bartlett's）

10

20

30

【実施例 3 0】

【0 5 4 0】

マウスにおける 4 週間の回復期間を含む 4 週間の反復投与毒性試験（GLP）

遺伝子操作細菌の投与により生じる可能性がある毒性を評価するために、
GLP 条件下での 2 週間の回復を後続させる 4 週間にわたる毎日の経鼻胃管投与の後の S
YN - UCD 3 0 3 の薬物動態および薬力学を試験する。

【0 5 4 1】

すべての材料を GLP 条件下で製造する。試験開始時に 6～8 週齢の CD - 1 マウスを
7 日間馴化させる。雄および雌マウスの群を別個に試験する。SYN - UCD 3 0 3 また
は媒体対照を表 3 3 に示すように投与する。

40

【0 5 4 2】

特定の実施形態では、SYN - UCD 3 0 4、SYN - UCD 3 0 5 および / または S
YN - UCD 3 0 6 について試験を行う。

【0 5 4 3】

【表 3 5】

表 3 3. 試験デザイン

群	被験物質	用量レベル (MG/KG)	投与経路	動物数	
				雄 (♂)	雌 (♀)
1	媒体	0	NG	10 ^a +6 ^b	10 ^a +6 ^b
2	SYN-UCD303	1x10 ⁹	NG	10 ^a +6 ^b	10 ^a +6 ^b
3	SYN-UCD303	1x10 ¹⁰	NG	10 ^a +6 ^b	10 ^a +6 ^b
4	SYN-UCD303	1x10 ¹¹	NG	10 ^a +6 ^b	10 ^a +6 ^b

^a 毒性 (Tox) 動物、終了剖検 29 日目； 毒性^b(Tox) 動物、回復剖検 42 日目

【 0 5 4 4 】

試験解析は、表 3 4 に示す。血液学、凝固、血清化学および血漿試料パラメーターは、実施例 2 7 で述べたのと本質的に同様であり、実施例 2 7 で述べた方法を用いて解析する。糞便試料の採取および分析は、実施例 2 7 で述べたのと本質的に同様に行う。組織学は、実施例 2 9 と同様に行う。

【 0 5 4 5 】

【表 3 6 - 1】

表 3 4. 試験解析

処置	時点
用量濃度解析	1日目および28日目
臨床観察	1日1回（症状観察）
摂餌量	週1回（定量的）
体重	馴化中2回、試験および回復中週1回
眼科学	馴化中1回、4週目および8週目
血液学	各剖検時；29日目：5匹／性／群；42日目：3匹／性／群；実施例27と同様な標準パネル
凝固	各剖検時；29日目：5匹／性／群；42日目：3匹／性／群；実施例27と同様な標準パネル
血清化学	各剖検時；29日目：5匹／性／群；42日目：3匹／性／群；実施例27と同様な標準パネル
糞便試料採取（細菌培養）	馴化中1回、2、7、14、29、33および42日目。試料を2時間までの期間に採取する。

10

20

【表 3 6 - 2】

処置	時点
	試料採取のために、6匹の群としての動物を滅菌面にまたはその上にのせる。糞便ペレット（各性別および群ごと）を適切なブロス／培地を含む管に移し、直ちに湿潤水上にのせる。
剖検および組織採取	各剖検時実施例29と同様な標準パネル
臓器重量	各剖検時実施例29と同様な標準パネル
組織病理学	中毒動物；対照および高用量群のみ実施例29
統計解析	比較（Anova／Bartlett's）

30

40

[実施例 3 1]

【0546】

非ヒト霊長類の糞便試料中のニッスルの存在の決定

ニッスルの存在について非ヒト霊長類（NHPs）の糞便試料を分析するために、q P

50

CRを用いた試料中のDNAの量に基づいてNHP試料における細菌の数を定量した。いくつかの実施形態では、このプロトコールは、マウスおよびヒトを含むが、これらに限定されない、他の哺乳動物の糞便試料の分析に用いられる。

【0547】

試料の均質化：糞便試料（-20℃で保存）を室温で90分間解凍した。固体糞便試料については、適切な固体の容積を推定し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を容積の2倍まで加えた。液体糞便試料については、追加のPBSを加えなかった。次いで試料を管ごとに30秒間ボルテックスした。糞便試料をエッペンドルフチューブ中、PBS中で使い捨て乳棒（Fisher 12-141-363）を用いてホモジナイズし、後の処置のために氷上に保持する。

10

【0548】

DNAの精製：均質化試料（250μL）を、最初にグラデーションラインで切断された滅菌済みフィルターチップ（Racked Gilson Expert Sterilized Filter Tips）を用いて除去し、エッペンドルフチューブに移した。DNAは、製造業者のプロトコールに従ってMoBio PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit（12855-100）を用いて均質化試料（250μL）から精製した。各試料から回収された精製DNAの量は、Eppendorf Biospectrometer Basicで試料のOD260を測定することによって定量した。

20

【0549】

PCR反応：2つの反応（反応1および反応2）をアSEMBルし、3連で行った。第1の反応は、ニッスルの量を定量する役割を、第2の反応は、糞便試料中に存在する細菌の総量を定量する役割を果たす。第1のqPCR反応については、精製DNA（5ng）、0.4μLのプライマー1（10μM）、0.4μLのプライマー2（10μM）および10μLのSYBR Green PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific：4368577）を水で20μLとした。第2のqPCR反応については、精製DNA（5ng）、0.4μLのプライマー3（10μM）、0.4μLのプライマー4（10μM）および10μLのSYBR Green PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific：4368577）を水で20μLとした。

30

【0550】

10μMの濃度で反応に用いたプライマーの配列は、表35に見いだされる。

【0551】

【表37】

表35. プライマー配列

プライマー名	プライマー配列	産物のサイズ	識別	配列番号
1	GCAACTGGCCCGTAATTATCC	191 bp	ニッスル	74
2	ACGCATCGCACGTAGGTTT			75
3	ggcaggcctaacacatgcaag	240 bp	全細菌	76
4	gtcgcctaggtgagcctttacc			77

40

【0552】

増幅された細菌DNAの量の定量のために、各反応について標準曲線を作成した。標準曲線を得るために、断片#1（1組の濃度で合成した）（表36）を以下の量が得られる

50

、10倍連続希釈で、8ウエルが断片#1の 10^6 コピーを有するまで、希釈した：無DNA、断片#1の1コピー、断片#1の10コピー、断片#1の100コピーなど。次いで標準DNAsを反応#1のqPCR反応混合物に加えた。

【0553】

【表38】

表36. 標準DNA配列（断片#1）

説明	配列	配列番号
断片 t 1	gcaactggcccgaattatccatagctgtagtgatcactcgggccgaattaaa cgcaatgatggcgagctgagaacgattagcatcaaacgctttaacgaagat tttgaacgagtgagcatgatgagtatcgcaaaatgtgccgaaatagagc aggaacaacacctgaaaacctacgtgcgatgcgt	78

10

【0554】

標準曲線、ならびに反応1および2のPCR反応条件を表37に示す。

【0555】

【表39】

20

表37. PCR反応条件

温度 (°C)	時間 (秒)	遷移速度 (°C/秒)	反復
95	15	N/A	40
60	60	N/A	
融解曲線			
95	15	N/A	1
60	60	0.3	
95	15		

30

【0556】

品質管理処置として、試験qPCR反応の融解曲線を各プライマーセットの陽性対照と比較して、陽性対照の融解曲線が試験試料の融解曲線と一致することを保証した。ニッスルおよび総細菌の存在および量は、標準曲線と対照して、CT値（サイクル閾値）を解析することによって決定した。

40

[実施例32]

【0557】

酪酸を過剰産生するためのベクターの構築

上述のアンモニア変換回路、GABA輸送回路、GABA代謝回路および/またはマンガニン輸送回路に加えて、大腸菌ニッスル細菌は、消化管バリア増強分子を産生するための1つまたは複数の回路をさらに含む。

【0558】

大腸菌ニッスルにおける酪酸の誘導性産生を促進するために、ペプトクロストリジウム

50

・ディフィシル630に由来する酪酸産生経路の8つの遺伝子(*bcd2*、*etfB3*、*etfA3*、*thiA1*、*hbd*、*crt2*、*bpt*および*buk*;NCBI)、ならびに転写および翻訳エレメントを合成し(Gen9、Cambridge、MA)、ベクターpBR322にクローニングした。酪酸遺伝子カセットは、配列番号18~29(表6)から選択されるFNR調節領域の制御下におかれる。特定の構築物では、FNR応答性プロモーターは、強いリボソーム結合部位配列にさらに融合されている。酪酸遺伝子の効率的な翻訳のために、オペロンにおける各合成遺伝子を、T7プロモーター/翻訳開始部位に由来する15塩基対リボソーム結合部位によって分離させた。

【0559】

特定の構築物では、酪酸遺伝子カセットは、RNS応答性調節領域、例えば、*norB*の制御下におかれ、細菌は、対応するRNS応答性転写因子、例えば、*nsrR*をコードする遺伝子をさらに含む(例えば、表38および39参照)。特定の構築物では、酪酸遺伝子カセットは、ROS応答性調節領域、例えば、*oxyS*の制御下におかれ、細菌は、対応するROS応答性転写因子、例えば、*oxyR*をコードする遺伝子をさらに含む(例えば、表14~17参照)。特定の構築物では、酪酸遺伝子カセットは、テトラサイクリン誘導性または構成的プロモーターの制御下におかれる。

【0560】

【表 40 - 1】

表 38. pLogic031-nsrR-norB-酪酸構築物 (配列番号 79)

説明	pLogic031-nsrR-norB-酪酸構築物のヌクレオチド配列 (配列番号 79)
<p>nsrRをコードする遺伝子、norBの調節領域および酪酸生成遺伝子カセットを含む例示的RNS-調節構築物 (pLogic031-nsrR-norB-酪酸構築物; 配列番号 79) の核酸配列。NsrRをコードする配列は、<u>下線付き</u>で太字であり、NsrR結合部位、すなわち、norBの調節領域は、<u>囲み線付き</u>である。</p>	<p>ttatta<u>tcgcaccgcaatcgggattttcgattcataaagcaggt</u> <u>cgtaggctcggcttgttgagcaggtcttgcagcgtgaaaccgtcc</u> <u>agatacgtgaaaaacgacttcaattgcaccgccgagtatgccgt</u> <u>cagccggcaggacggcgtaatcaggcattcgttgttcgggccc</u> <u>tacactcgaccagctgcatcgggttcgaggtggcggacgaccg</u> <u>ccgataattgatgcgttcggggcggcgccagcctcagcccgcc</u> <u>gcctttcccgcgtagcgtgtgcaagaaccgcctttgaccagcg</u> <u>cggtaacaccatttcatcaaatggcctttggaaaagccgtaggtc</u> <u>gaggcgatggtggcgatattgaccagcgcgtcgtcgttgacggc</u> <u>ggtgtagatgaggacgcgcagcccgtagtcgggtagttgggtca</u> <u>gatacat</u>acaacctccttagtacatgcaaaattatcttagagc aacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgccta atgagttgagttgaggaattataacaggaagaaatattcctcat acgcttgtaattcctctatgggttgttgacaattaatcatcggct cgtataatg<u>tataacattcatat</u>tttgtgaattttaaactcta gaaataattttgtttaactttaagaaggagatatacatatggat ttaaattctaaaaaatatcagatgcttaaagagctatatgtaag cttcgctgaaaatgaagttaaacccttagcaacagaacttgatg aagaagaaagatttccttatgaaacagtggaaaaaatggcaaaa gcaggaatgatgggtataccatatccaaaagaatatggtggaga aggtggagacactgtaggatatataatggcagttgaagaattgt ctagagtttgtggtactacaggagttatattatcagctcataca tctcttggctcatggcctatatatcaatatggtaatgaagaaca aaaacaaaaatttctaagaccactagcaagtggagaaaaattag gagcatttggctcttactgagcctaatgctggtacagatgcgtct ggccaacaaacaactgctgttttagacggggatgaatacact taatggctcaaaaatatttataacaaacgcaatagctggtgaca tatatgtagtaatggcaatgactgataaatctaaggggaacaaa ggaatatcagcatttatagttgaaaaggaactcctgggttag ctttggagttaaagaaaagaaaatgggtataagaggttcagcta</p>

10

20

30

【表 40 - 2】

説明	pLogic031-nsrR-norB-酪酸構築物のヌクレオチド配列 (配列番号79)
	<p>cgagtgaattaatatgtgaggattgcagaatacctaagaaaat tacttgaaaagaaggcaaggatttaagatagcaatgtctac tcttgatggtagaattggtagctgcacaagcttaggtt tagcacaaggtgctcttgatgaaactgttaaataatgtaaaagaa agagtacaatttgtagaccattatcaaaattccaaaatacaca attccaattagctgatatggaagttaaggtaacaagcggctagac accttgatatacaagcagctataaataaagacttaggaaaacct tatggagtagaagcagcaatggcaaaattatgtcagctgaaac agctatggaagttactacaaaagctgtacaacttcatggaggat atggatacactcgtgactatccagtagaagaatgatgagagat gctaagataactgaaatataatgaaggaactagtgaagttcaaag aatggttatctcaggaaaactattaaaatagtaagaaggagata tacatatggaggaaggatttatgaatatagtcgtttgataaaa caagttccagatacaacagaagttaaactagatcctaatacagg tactttaattagagatggagtagcaagataaataaacctgatg ataaagcaggttagaagaagctataaaattaaaagaagaaatg gggctcatgtaactgttataacaatgggacctcctcaagcaga tatggctttaaaagaagcttttagcaatgggtgcagatagaggta tattattaacagatagagcatttgcgggtgctgatacttgggca acttcatcagcattagcaggagcattaaaaatatagattttga tattataatagctggaagacaggcagatagatggagatactgcac aagttggacctcaaatagctgaacatttaaacttccatcaata acatatgctgaagaaaataaaaactgaaggtgaatatgtattagt aaaagacaatttgaagattggtgcatgacttaaaagttaaaa tgccatgccttataacaactcttaagatatgaacacaccaaga tacatgaaagttggaagaatatatgatgctttcgaaaatgatgt agtagaaacatggactgtaaaagatatagaagttgacccttcta attaggtcttaaaaggttctccaactagtgtatttaaactcatt acaaaatcagttaaaccagctggtacaataatacaatgaagatgc gaaaacatcagctggaattatcatagataaattaaaagagaagt atatcatataataagaaggagatatacatatgggtaacgtttta gtagtaatagaacaaagagaaaatgtaattcaaactgtttcttt agaattactaggaaaggctacagaaaatagcaaaagattatgata caaaagtttctgcattacttttaggtagtaaggtagaaggttta atagatacattagcactatggtgcagatgaggtaatagtagt agatgatgaagcttttagcagtgtatacaactgaaccatatacaa aagcagcttatgaagcaataaaaagcagctgaccctatagttgta ttatgttggtgcaacttcaataggttagagatttagcgcctagagt ttctgctagaatacacaggtcttactgctgactgtacaggtc ttgcagtagctgaagatacaaaattattattaatgacaagacct gcctttggtggaaatataatggcaacaatagtttgtaaagattt cagacctcaaatgtctacagtttagaccaggggttatgaagaaaa atgaacctgatgaaactaaagaagctgtaattaaccgtttcaag gtagaatttaaatgatgctgataaattagttcaagttgtacaagt aataaaagaagctaaaaacaagttaaaatagaagatgctaaga tattagtttctgctggacgtggaatgggtggaaaagaaaactta</p>

10

20

30

40

【表 4 0 - 3】

説明	pLogic031-nsrR-norB-酪酸構築物のヌクレオチド配列 (配列番号79)
	<p>gacatactttatgaattagctgaaattataggtggagaagtttc tggttctcgtgccactatagatgcaggttggttagataaagcaa gacaagttggtcaaactggtaaaactgtaagaccagacctttat atagcatgtggtatatactggagcaatacaacatatagctggtat ggaagatgctgagtttatagttgctataaataaaaaatccagaag ctccaatatttaaatatgctgatggtggtatagttggagatggt cataaagtgcttccagaacttatcagtcagttaagtgttgcaaaa agaaaaaggtgaagttttagctaactaataagaaggagatatac atatgagagaagtagtaattgccagtgagctagaacagcagta ggaagttttggaggagcatttaaatcagtttcagcggtagagtt aggggtaacagcagctaaagaagctataaaaagagctaacataa ctccagatatgatagatgaatctcttttagggggagtaacttaca gcaggtcttggacaaaatagcaagacaaatagcattaggagc aggaataccagtagaaaaaccagctatgactataaatatagttt gtggttctggattaagatctgtttcaatggcatctcaacttata gcattaggtgatgctgatataatgtagttggtggagctgaaaa catgagtatgtctccttatttagtaccaagtgcgagatatggtg caagaatgggtgatgctgcttttgttgattcaatgataaaagat ggattatcagacataatttaataactatcacatgggtattactgc tgaaaacatagcagagcaatggaatataactagagaagaacaag atgaattagctcttgcaagtcaaaaataaagctgaaaaagctcaa gctgaaggaaaatttgatgaagaaatagttcctgtttggtataaa aggaagaaaaggtgacactgtagtagataaagatgaatatatta agcctggcactacaatggagaaacttgctaagttaagacctgca tttaaaaaagatggaacagttactgctggtaatgcatcaggaat aatgatggtgctgctatgtagtagtaatggctaaagaaaaag ctgaagaactaggaatagagcctcttgcaactatagtttcttat ggaacagctggtggtgacctaaaataatgggatatggaccagt tccagcaactaaaaaagctttagaagctgctaatatgactattg aagatatagatttagttgaagctaagtaggcatgctgccc tctgtagctgtaataagagacttaaatatagatatgaataaagt taatgtaatggtggagcaatagctataggacatccaataggat gctcaggagcaagaatacttactacacttttatatgaaatgaag agaagagatgctaaaactggtcttgctacactttgtataggcgg tggaatgggaactactttaatagtttaagagatagtaagaaggag atatacatatgaaattagctgtaataggtagtggaaactatggga agtggattgtacaaacttttgcaagttgtggacatgatgatg ttaaaagagtagaactcaaggtgctatagataaatgtttagctt tattagataaaaaatttaactaagtttagttactaagggaaaaatg gatgaagctacaaaagcagaaatattaagtcagtttagttcaac tactaattatgaagatttaaaagatatggatttaataatagaag catctgtagaagacatgaatataaagaaagatgttttcaagtta ctagatgaattatgtaagaagatactatcttggcaacaaatac ttcattatctataacagaaatagcttcttctactaagcggc cagataaagttataggaatgcatttctttaaattccagttcctatg atgaaattagttgaagttataagtggtcagttaacatcaaaagt</p>
	10
	20
	30
	40

【表 40 - 4】

説明	pLogic031-nsrR-norB-酪酸構築物のヌクレオチド配列 (配列番号79)
	<p>tacttttgatacagtatattgaattatctaagagtatcaataaag taccagtagatgtatctgaatctcctggatttgtagtaaataga atacttatacctatgataaatgaagctgttggtatataatgcaga tggtggtgcaagtaagaagaaatagatgaagctatgaaattag gagcaaacctccaatgggaccactagcattaggtgatttaatc ggattagatggtgttttagctataatgaacgttttatatactga atgtggagataactaaatatagacctcatccacttttagctaaaa tggttagagctaatcaattaggaagaaaaactaagataggattc tatgattataataaataaataagaaggagatatacatatgagtac aagtgatgttaaagtttatgagaatgtagctggtgaagtagatg gaaatataatgtacagtgaaaatgaatagacctaaagcccttaat gcaataaattcaaagactttagaagaactttatgaagtatttgt agatattaataatgatgaaactattgatggtgtaataattgacag gggaaggaaaggcattttagctgtagctggagcagatattgcatacatg aaagatttagatgctgtagctgctaaagatttttagtatcttagg agcaaaagcttttgagaaatagaaaatagtaaaaaagtagtga tagctgctgtaaacggatttgccttaggtggaggatgtgaactt gcaatggcatgtgatataagaattgcatctgctaaagctaaatt tggtcagccagaagtaactccttgaataactccaggataggag gaactcaaaggcttacaagattggttgaatggcaaaagcaaaa gaattaatctttacaggtcaagttataaaagctgatgaagctga aaaaatagggctagtaaatagagtcggtgagccagacattttaa tagaagaagttgagaaattagctaagataatagctaaaaatgct cagcttgcagttagatactctaaagaagcaatacaacttgggtgc tcaaactgatataaatactggaatagatatagaacttaatttat ttggtctttgtttttcaactaaagacccaaaaagaaggaatgtca gctttcgttgaaaagagagaagctaaactttataaaagggttaata agaaggagatatacatatgagaagttttgaagaagtaattaaagt ttgcaaaagaaagaggacctaaaactatatcagtagcatggttgc caagataaagaagttttaatggcagttgaaatggctagaaaaga aaaaatagcaaatgccatttttagtaggagatatagaaaagacta aagaaattgcaaaaagcatagacatggatcgcgaaaattatgaa ctgatagatataaaagatttagcagaagcatctctaaaatctgt tgaattagtttcacaaggaaaagccgacatggtaatgaaaggct tagtagacacatcaataataactaaaagcagttttaaataaagaa gtaggtcttagaactggaaatgtattaagtcacgtagcagattt tgatgtagagggatatgatagatttttttcgtaactgacgcag ctatgaacttagctcctgatacaaaataactaaaagcaaatcata gaaaatgcttgacagtagcacattcattagatataagtgaacc aaaagttgctgcaatatgcgcaaaagaaaaagtaaatccaaaaa tgaaagatacagttgaagctaaagaactagaagaaatgtatgaa agaggagaaatcaaaggttgatggttgggtgggccttttgcaat tgataatgcagtatctttagaagcagctaaacataaagggtataa atcatcctgtagcaggacgagctgatataattattagccccagat attgaaggtggtaacatattatataaagcttttggtattcttctc aaaatcaaaaaatgcaggagttatagttggggctaaagcaccaa</p>

10

20

30

40

【表 4 0 - 5】

説明	p L o g i c 0 3 1 - n s r R - n o r B - 酪酸構築物のヌクレオチド配列 (配列番号 7 9)
	taatattaacttctagagcagacagtgaagaaactaaactaaac tcaatagcttttaggtgttttaatggcagcaaaggcataataaga aggagatatacatatgagcaaaatattttaaactcttaacaataa atcctgggttcgacatcaactaaaatagctgtatttgataatgag gatttagtatttgaaaaactttaagacattcttcagaagaaat aggaaaatatgagaagggtgtctgaccaatttgaatttcgtaaac aagtaatagaagaagctctaaaagaagggtggagtaaaaacatct gaattagatgctgtagtaggttagaggaggacttcttaaactat aaaagggtgacttattcagtaagtgtctgctatgattgaagatt taaaagtgggagttttaggagaacacgcttcaaacctagggtgga ataatagcaaaacaaatagggtgaagaagtaaatgttccttcata catagtagacctgttgtttagatgaattagaagatggtgcta gaatttctggatgcctgaaataagtagagcaagtgtagtacat gctttaaataaaaaggcaatagcaagaagatatgctagagaaat aaacaagaaatatgaagatataaatcttatagttgcacacatgg gtggaggagtctctgttggagctcataaaaaatggtaaaatagta gatgttgcaaacgcattagatggagaaggaccttctctccaga aagaagtggtagactaccagtaggtgcattagtaaaaatgtgct ttagtggaaaatatactcaagatgaaattaaaagaaaataaaa ggtaatggcggactagttgcataacttaaacactaatgatgctag agaagttgaagaaagaattgaagctggtgatgaaaaagctaaat tagtatatgaagctatggcatatcaaactcttaagaaatagga gctagtgtgcagttcttaagggagatgtaaaagcaatattatt aactggtggaatcgcataattcaaaaatgtttacagaaatgattg cagatagagttaaatttatagcagatgtaaaagtttatccaggt gaagatgaaatgattgcattagctcaaggtggacttagagtttt aactggtgaagaagaggctcaagtttatgataactaataa

10

20

30

【 0 5 6 1】

【表 4 1 - 1】

表 3 9 . p L o g i c 0 4 6 - n s r R - n o r B - 酪酸構築物 (配列番号 7 9) のヌクレオチド配列

説明	p L o g i c 0 4 6 - n s r R - n o r B - 酪酸構築物 (配列番号 8 0) のヌクレオチド配列
n s r R をコードする遺伝子、n o r B の調節領域および酪酸生成遺伝子カセットを含む例示的 R N S - 調節構築物	<u>ttatta</u> <u>tcgcacccgcaatcgggattttcgattcataaagcaggtcgta</u> <u>ggtcggcttgttgagcaggctcttcagcgtgaaaccgtccagatacgt</u> <u>gaaaaacgacttcattgcaccgcccagtatgcccgtcagccggcagga</u> <u>cggcgtaatcaggcattcgttgttcgggcccatactcgaccagctg</u> <u>catcggttcgaggtggcggacgaccgcccgatattgatgcgttcggg</u> <u>cggcgcggccagcctcagcccgcgcctttcccgcgtacgctgtgcaa</u> <u>gaaccgcctttgaccagcggtaaccactttcatcaaatggctttt</u> <u>ggaaatgccgtaggtcgaggcgaatggtggcgaatattgaccagcgcgtc</u> <u>gtcgttgacggcgggtgtagatgaggacgcgcagcccgtagtcggtag</u> <u>ttgggtcagatacat</u> <u>acaacctccttagtacatgcaaaattatttcta</u>

40

【表 4 1 - 2】

説明	p L o g i c 0 4 6 - n s r R - n o r B - 酪酸構築物 (配列番号 8 0) のヌクレオチド配列
(p L o g i c 0 4 6 - n s r R - n o r B - 酪酸構築物 ; 配列番号 8 0) の核酸配列	<pre> gagcaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgccta atgagttgagttgaggaattataacaggaagaaatattcctcatacgc ttgtaattcctctatgggtgttgacaattaatcatcggctcgataat ggtataacattcatatTTTTGTGAATTTTAAACTctagaaataatTTTgt TTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGATCGTAAAACCTATGGTACG CAACAATATCTGCCTGAACGCCATCCTCAGGGCTGCAAGAAGGGAGT GGAAGATCAGATTGAATATACCAAGAAACGCATTACCGCAGAAGTCAA AGCTGGCGCAAAGCTCCAAAAAACGTTCTGGTGCTTGGCTGCTCAAA TGTTACGGCCTGGCGAGCCGCATTACTGCTGCGTTCGGATACGGGGC TGCACCACCGGATGGTACAATAATTTGGCATTGTGAAGCGGCAAA TGGTACACCGGGATGGTACAATAATTTGGCATTGTGAAGCGGCAAA ACGCGAGGGTCTTTATAGCGTGACGATCGACGGCGATGCGTTTTCCAGA CGAGATCAAGGCCAGGTAATTGAGGAAGCCAAAAAAAGGTATCAA ATTTGATCTGATCGTATACAGCTTGGCCAGCCAGTACGTACTGATCC TGATACAGGTATCATGCACAAAAGCGTTTTGAAACCCTTTGGAAAAAC GTTCCAGGCAAAACAGTAGATCCGTTTACTGGCGAGCTGAAGGAAAT CTCCGCGGAACCAGCAAATGACGAGGAAGCAGCCGCCACTGTTAAAGT TATGGGGGGTGAAGATTGGGAACGTTGGATTAAGCAGCTGTGCAAGGA AGGCCTCTTAGAAGAAGGCTGTATTACCTTGGCCTATAGTTATATTGG CCCTGAAGCTACCCAAGCTTTGTACCCTAAAGGCACAATCGGCAAGGC CAAAGAACACCTGGAGGCCACAGCACACCGTCTCAACAAAGAGAACC GTCAATCCGTGCCTTCGTGAGCGTGAATAAAGGCCTGGTAACCCGCGC AAGCGCCGTAATCCCGGTAATCCCTCTGTATCTCGCCAGCTTGTCAA AGTAATGAAAGAGAAGGGCAATCATGAAGGTTGTATTGAACAGATCAC GCGTCTGTACGCCGAGCGCTGTACCCTAAAGATGGTACAATCCAGT TGATGAGGAAAATCGCATTTCGATTGATGATTGGGAGTTAGAAGAAGA CGTCCAGAAAGCGGTATCCGCGTTGATGGAGAAAGTCACGGGTGAAAA CGCAGAATCTCTCACTGACTTAGCGGGGTACCGCCATGATTTCTTAGC TAGTAACGGCTTTGATGTAGAAGGTATTAATTATGAAGCGGAAGTTGA ACGCTTCGACCCTATCTGATAAGAAGGAGATATACATATGAGAGAAGT AGTAATTGCCAGTGCAGCTAGAACAGCAGTAGGAAGTTTGGAGGAGC ATTTAAATCAGTTTCAGCGGTAGAGTTAGGGGTAACAGCAGCTAAAGA AGCTATAAAAAGAGCTAACATAACTCCAGATATGATAGATGAATCTCT TTTAGGGGGAGTACTTACAGCAGGTCTTGGACAAAATATAGCAAGACA AATAGCATTAGGAGCAGGAATACCAGTAGAAAAACCAGCTATGACTAT AAATATAGTTTGTGGTTCTGGATTAAGATCTGTTTCAATGGCATCTCA ACTTATAGCATTAGGTGATGCTGATATAATGTTAGTTGGTGGAGCTGA AAACATGAGTATGTCTCCTTATTTAGTACCAAGTGCAGATATGGTGC AAGAATGGGTGATGCTGCTTTTGTGATTCAATGATAAAGATGGATT ATCAGACATATTTAATAACTATCACATGGGTATTACTGCTGAAAACAT AGCAGAGCAATGGAATATAACTAGAGAAGAACAAGATGAATTAGCTCT TGCAAGTCAAAAATAAGCTGAAAAAGCTCAAGCTGAAGGAAAATTTGA TGAAGAAATAGTTCTGTGTTATAAAAAGGAAGAAAAGGTGACACTGT AGTAGATAAAGATGAATATATTAAGCCTGGCACTACAATGGAGAAACT TGCTAAGTTAAGACCTGCATTTAAAAAAGATGGAACAGTTACTGCTGG TAATGCATCAGGAATAAATGATGGTGCTGCTATGTTAGTAGTAATGGC </pre>

10

20

30

40

【表 4 1 - 3】

説明	pLogic046-nsrR-norB-酪酸構築物 (配列番号80) のヌクレオチド配列
	<p>taaagaaaaagctgaagaactaggaatagagcctcttgcaactatagt ttcttatggaacagctgggtgtgaccctaaaataatgggatatggacc agttccagcaactaaaaagctttagaagctgctaatatgactattga agatatagatttagttgaagctaataagggcatttgctgcccaatctgt agctgtaataagagacttaaatatagatatgaataaagttaatgtaa 10 tggaggagcaatagctataggacatccaataggatgctcaggagcaag aatacttactacactttttatatgaaatgaagagaagagatgctaaaac tggctcttgctacacttttgatataggcgggtggaatgggaactactttaat agttaagagatagtaagaaggagatatacatatgaaattagctgtaat aggtagtggaactatgggaagtggattgtacaaaacttttgcaagttg tggacatgatgtatgttttaaagagtgaactcaaggtgctatagataa atgttttagctttattagataaaaatttaactaagttagttactaaggg aaaaatggatgaagctacaaaagcagaaatattaagtcatgttagttc aactactaattatgaagatttaaagatatggatttaataatagaagc atctgtagaagacatgaatataaagaaagatgttttcaagttactaga tgaattatgtaagaagatactatcttggcaacaaatacttcatcatt 20 atctataacagaaatagcttcttctactaagcgccagataaagttat aggaatgcatttctttaatccagttcctatgatgaaattagttgaagt tataagtggtcagttaacatcaaaagttacttttgatacagatattga attatctaagagtatcaataaagtaccagtagatgtatctgaatctcc tggatttgtagtaaatagaacttatacctatgataaatgaagctgt tggatataatgcagatgggtgtgcaagtaagaagaatagatgaagc tatgaaattaggagcaaacatccaatgggaccactagcattaggtga tttaatcggattagatgttgttttagctataatgaacgttttatatac tgaatttgagataactaaatatagacctcatccacttttagctaaaat ggttagagctaataataggaagaaaaactaagataggattctatga ttataataaataataagaaggagatatacatatgagtacaagtgatgt 30 taaagtttatgagaatgtagctgttgaagtagatggaaatatagtac agtgaaaatgaatagacctaaagcccttaatgcaataaattcaaagac tttagaagaactttatgaagatattgtagatattaataatgatgaaac tattgatgttgaatattgacaggggaaggaaaggcatttgtagctgg agcagatattgcatacatgaaagatttagatgctgtagctgctaaaga tttagtatcttaggagcaaaagcttttggagaaatagaaaatagtaa aaaagtagtgatagctgctgtaaacggatttgctttagggtggaggatg tgaacttgcaatggcatgtgatataagaattgcatctgctaaagctaa at ttgggtcagccagaagtaactcttgggaataactccaggatattggagg aactcaaaggcttacaagattggttggaatggcaaaagcaaaagaatt aatctttacaggtcaagttataaaaagctgatgaagctgaaaaatagg gctagtaaatagagtcggtgagccagacattttaatagaagaagttga 40 gaaattagctaaagataatagctaaaaatgctcagcttgcaagttagata ctctaaagaagcaatacaacttgggtgctcaaactgatataaatactgg aatagatatagaatctaattttatgggtctttgtttttcaactaaaga ccaaaaagaaggaatgtcagctttcgttgaaaagagagaagctaactt tataaaaaggtaataagaaggagatatacatatgagaagttttgaga agtaattaagtttgcaaaagaaaggacctaaaactatatcagtagc atgttgccaagataaagaagttttaatggcagttgaaatggctagaaa</p>

10

20

30

40

【表 4 1 - 4】

説明	p L o g i c 0 4 6 - n s r R - n o r B - 酪酸構築物 (配列番号 8 0) のヌクレオチド配列
	agaaaaaatagcaaatgccatttttagtaggagatatagaaaagactaa agaaattgcaaaaagcatagacatggatatcgaaaattatgaactgat agatataaaagatttttagcagaagcatctctaaaatctgttgaattagt 10 ttcacaaggaaaagccgacatggtaatgaaaggcttagtagacacatc aataatactaaaagcagttttaataaagaagtaggtcttagaactgg aaatgtattaagtcacgtagcagtatTTgatgtagagggatatgatag attatTTTTcgtaactgacgcagctatgaacttagctcctgatacaaa tactaaaaagcaaatcatagaaaatgcttgcacagtagcacattcatt agatataagtgaaccaaaagttgctgcaatatgCGcaaaagaaaaagt aaatccaaaaatgaaagatacagttgaagctaaagaactagaagaat gtatgaaagaggagaaatcaaaggTtgatggTtggtggcctTTTTgc aattgataatgcagtatctttagaagcagctaaacataaaggTataaa tcatcctgtagcaggacgagctgatataTTattagcccagatattga aggtggtaacatattatataaaagctTTggTattcttctcaaaatcaaa 20 aaatgcaggagttatagttggggctaaagcaccaataatattaacttc tagagcagacagtgaaactaaactaaactcaatagctTTtaggtgt tTTaatggcagcaaaaggcataataagaaggagatatacatatgagcaa aatattTaaaatcttaacaataaatcctggTtcgacatcaactaaaat agctgtatttgataatgaggatttagtattTgaaaaactTTaagaca ttcttcagaagaaataggaaaatatgagaaggTgtctgaccaattTga atttcgTaaacaagtaatagaagaagctctaaaagaaggTggagTaaa aacatctgaattagatgctgtagtaggtagaggaggacttctTaaacc tataaaaggTggtacttattcagtaagtgctgctatgattgaagattt aaaagTgggagTTTTaggagaacacgcttcaaaccTaggTggaataat agcaaaacaaataggTgaagaagTaaatgttccTtcatacatagTaga ccctgtTgtTgtagatgaattagaagatgtTgctagaatttctggTat gcctgaaataagtagagcaagTgtagtacatgctTTaaatcaaaaggc 30 aatagcaagaagatagctagagaaataaacaagaaatagagatat aaatcttatagttgcacacatgggtggaggagTTTTctgtTggagctca TaaaaatggTaaaatagtagatgtTgcaaacgcattagatggagaagg acTTTTctctccagaaagaagTggTggactaccagtaggtgcattagt aaaaatgtgctTTtagTgaaaatatactcaagatgaaattaaaaagaa aataaaaggTaatggcggactagttgcatactTaaactaatgatgc tagagaagTgaagaaagaattgaagctggTgatgaaaaagctaaatt agtatatgaagctatggcatatcaaTctctaaagaaataggagctag TgctgcagTtctTaaaggagatgTaaaagcaatattattaactggTgg aatcgcatattcaaaaatgtttacagaaatgattgcagatagagTtaa atttatagcagatgTaaaagTttatccaggtgaagatgaaatgattgc attagctcaaggTggacttagagTttTaaactggTgaagaaggagctca 40 agTTTTatgataactaataa

【 0 5 6 2】

b c d 2 - e t f A 3 - e t f B 3 遺伝子の遺伝子産物は、クロトニル - C o A をブチ
 リル - C o A に変換する複合体を形成し、共酸化剤として酸素に対する依存性を示し得る
 。本発明の組換え細菌は、酸素制限環境（例えば、哺乳動物消化管）において酪酸を産生

するように設計されているため、酸素に対する依存性は、消化管内の酪酸産生の負の影響を有し得る。トレポネーマ・デスティコラ、トランス-2-エノイルCoAレダクターゼに由来する単一遺伝子(ter)がこの3遺伝子複合体を酸素非依存的に機能的に置換することができることが示された。したがって、ter遺伝子が第1の酪酸カセットのbcd2-etfA3-etfB3遺伝子を置換した第2の酪酸遺伝子カセットを合成する(Genewiz、Cambridge、MA)。ter遺伝子は、Integrated DNA Technologiesオンラインコドン最適化ツール(<https://www.idtdna.com/CodonOpt>)を用いて大腸菌コドン使用のためにコドン最適化されている。第2の酪酸遺伝子カセット、ならびに転写および翻訳エレメントを合成し(Gen9、Cambridge、MA)、ベクターpBR322にクローニングする。第2の酪酸遺伝子カセットは、上述のFNR調節領域の制御下におかれる。特定の構築物では、酪酸遺伝子カセットは、RNS応答性調節領域、例えば、norBの制御下におかれ、細菌は、対応するRNS応答性転写因子、例えば、nsrRをコードする遺伝子をさらに含む(例えば、表38および39参照)。特定の構築物では、酪酸遺伝子カセットは、ROS応答性調節領域、例えば、oxySの制御下におかれ、細菌は、対応するROS応答性転写因子、例えば、oxyRをコードする遺伝子をさらに含む(例えば、表Cおよび表40参照)。

10

【0563】

【表42-1】

20

表40. ROS調節構築物、OxyR構築物、Tet調節構築物

説明	配列
pLogic031-oxyS-酪酸構築物(配列番号81)のヌクレオチド配列	ctcgagttcattatccatcctccatcgccacgatagttcatggcgataggtagaatagc aatgaacgattatccctatcaagcattctgactgataattgctcacacgaattcattaa agaggagaaaggtaccatggatttaaattctaaaaaatatcagatgcttaaagagctat atgtaagcttcgctgaaaatgaagttaaacccttagcaacagaacttgatgaagaagaa agatttccttatgaaacagtggaaaaaatggcaaaagcaggaatgatgggtataccata tccaaaagaatatggtggagaaggtggagacactgtaggatataatggcagttgaag aattgtctagagtttgtggtactacaggagttatattatcagctcatacatctcttggc tcatggcctatatatcaatatggtaatgaagaacaaaaacaaaaattcttaagaccact agcaagtggagaaaaattaggagcatttggcttactgagcctaattgctggtagatg cgtctggccaacaaacactgctggttttagacgggatgaatacacttaattggctca aaaatattataacaaacgcaatagctggtgacatatatgtagtaattggcaatgactga taaacttaaggggaacaaaggaatcagcatttatagttgaaaaggaaactcctgggt ttagctttggagttaaagaaaagaaaatgggtataagaggttcagctacgagtgaatta atatttgaggattgcagaatacctaagaaaatttacttggaaaagaaggtcaaggatt

30

【表 4 2 - 2】

説明	配列
	<p>taagatagcaatgtctactcttgatggtggtagaattggatagctgcacaagctttag gtttagcacaagtgctcttgatgaaactgttaaatatgtaaaagaagagtaacaattt ggtagaccattatcaaaattccaaaatacacaattccaattagctgatatggaagttaa ggtacaagcggctagacaccttgatatcaagcagctataaaataagacttaggaaaac cttatggagtagaagcagcaatggcaaaattatgtcagctgaaacagctatggaagtt actacaaaagctgtacaacttcatggaggatattggatacactcgtgactatccagtaga aagaatgatgagagatgctaagataactgaaatataatgaaggactagtgaagttcaaa gaatgggtattttcaggaaaactattaaaatagtaagaaggagatatacatatggaggaa ggatttatgaatagtcggttgataaaaacaagttccagatacaacagaagttaaact agatcctaatacaggtacttttaattagagatggagtaccaagtaataaaaccctgatg ataaagcaggtttagaagaagctataaaattaaaagaagaaatgggtgctcatgtaact ggtataacaatgggacctcctcaagcagatattggctttaaaagaagctttagcaatggg tcagatagaggtatattattaacagatagagcattttgctgggtgctgatactgggcaa cttcatcagcatttagcaggagcattaaaaatagattttgatattataatagctgga agacaggcagatagatggagatactgcacaagttggacctcaaatagctgaacatttaa tcttccatcaataacatagctgaagaaataaaaactgaaggtgaatatgtattagtaa aaagacaattttgaagattgttgccatgacttaaaagttaaaatgccatgccttataaca actcttaaagatagacacaccaagatacatgaaagttggaagaatataatgatgcttt cgaaaatgatgtagtagaacaatggactgtaaaagatataagaagttgaccttctaatt taggtcttaaaggttctccaactagtgattttaaatcattttcaaaaatcagttaaaaca gctggtacaatatacaatgaagatgcgaaaacatcagctggaattatcatagataaatt aaaagagaagtataatcatataataagaaggagatatacatatgggtaacgttttagtag taatagaacaaagagaaaatgtaattcaaacgtttctttagaattactaggaaggct acagaaatagcaaaagattatgatacaaaaagtttctgcattacttttaggtagtaaggt agaaggtttaatagatacattagcacactatggtgcagatgaggtaatagtagtagatg atgaaacttttagcagtgatatacaactgaaccatatacaaaagcagctatgaaagcaata aaagcagctgacctatagttgtattatgttggtgcaacttcaataggtagagatttagc gcctagagtttctgctagaatacatacaggtcttactgctgactgtacaggtcttgctgag tagctgaagatacaaaaattattatgaatgacaagacctgcctttgggtggaatataatg gcaacaatagtttgtaaagatttcagacctcaaatgtctacagtttagaccagggttat gaagaaaaatgaacctgatgaaactaaagaagctgtaattaacctgtttcaaggtagaat ttaatgtagctgataaatttagttcaagttgtacaagtaataaaagaagctaaaaacaa gttaaaatagaagatgctaagatattagtttctgctggacgtggaatgggtggaaga aaacttagacatactttatgaattagctgaaattataggtggagaagtttctggttctc gtgccactatagatgcaggttggttagataaagcaagcaagttggtcaaacctggtaaa actgtaagaccagacctttatagcatgtggtatatactggagcaatacaacatagc tggtatggaagatgctgagtttatagttgctataaaataaaaatccagaagctccaat ttaaataatgctgatgttggtatagttggagatgttcataaagtgcttccagaaccttatc gtcagttaaagttgcaaaagaaaaaggtgaaagtttttagctaaactaaatagaaggaga tatacatatgagagaagtagtaattgccagtgtagctagaacagcagtaggaagttttg gaggagcatttaaatcagtttcagcggtagagttaggggtaacagcagctaaagaagct ataaaaagagctaacataactccagatagatagatgaatctcttttagggggagtagt tacagcaggtcctggcaaaaatataagcaagacaaatagcattaggagcaggaataccag tagaaaaaccagctatgactataaaatagttttgtggttctggattaagactctgtttca atggcatctcaacttatagcattaggtgatgctgatataatgttagttggtgagctga aaacatgagtagtctccttatttagtaccaagtgcgagatattgggtgcaagaatgggtg atgctgctttttgtgattcaatgataaaagatggattatcagacatatttaataactat cacatgggtattactgctgaaaacatagcagagcaatggaatataactagagaagaaca agatgaattagctcttgcaagtcaaaataaagctgaaaaagctcaagctgaaggaaaat ttgatgaagaaatagttcctgtgtttataaaaaggaagaaaaggtgacactgtagtagat aaagatgaatatattaagcctggcactacaatggagaaacttgctaagttaaagcctgc atttaaaaaagatggaacagttactgctggttaatgcatcaggaaataatgatgggtgctg ctatgttagtagtaattggctaaagaaaagctgaagaactaggaatagagcctcttgca actatagtttcttatggaacagctgggtgttgacctaaaataatgggatagggaccagt tccagcaactaaaaaagctttagaagctgctaataatgactattgaagatatagatattag ttgaagctaattgaggtatgtgctgccaactctgtagctgtaataagagactaaaatata gatatgaataaagttaatgttaattgggtggagcaatagctataggacatccaataggatg</p>

10

20

30

40

【表 4 2 - 3】

説明	配列
	<p>ctcaggagcaagaatacttactacacttttatatgaaatgaagagaagagatgctaaaa ctggtcttgctacactttgtatagggcggggaatgggaactactttaatagttaagaga tagtaagaaggagataacatatgaaattagctgtaataggtagtggaactatgggaag tggtattgtacaaacttttgcaagttgtggacatgatgatgtttaagagtagaactc aaggtgctatagataaaatgtttagctttattagataaaaaatttaactaagttagttact aagggaaaaatggatgaagctacaaaagcagaaaatattaagtcagttagttcaactac taattatgaagatttaaaagatatggatttaataatagaagcatctgtagaagacatga atataaagaagaatgttttcaagttactagatgaattatgtaaaagaagatactatcttg gcaacaaatacttcatcattatctataacagaaaatagcttcttctactaagcgcagaga taaagttataggaatgcatttctttaaaccagttcctatgatgaaattagttgaagttta taagtggtcagttaacatcaaaagttacttttgatacagtatttgaattatctaagagt atcaataaagtaccagtagatgtatctgaatctcctggattttagtagtaaatagaact tatacctatgataaatgaagctgttggatatatgcagatgggtgttgcaagtaaagaag aaatagatgaagctatgaaattaggagcaaacatccaatgggaccactagcattaggt gatttaatcggattagatggttggtttagctataatgaacgcttttatataactgaatttgg agatactaaatatagacactcacttttagctaaaaatgggttagagctaactcaattag gaagaaaaactaagataggattctatgattataataaataaagaaggagataacat atgagtacaagtgatgttaaagttatgagaatgtagctggtgaagtagatggaaatat atgtacagtgaaaatgaatagacctaagccctaatgcaataaattcaagacttttag aagaactttatgaagtatgttagatattaataatgatgaaactattgatgttgaata ttgacaggggaaggaaagcattttagctggagcagatattgcatacatgaagattt agatgctgtagctgctaaagattttagtatcttaggagcaaaaagcttttggagaaatag aaaatagtaaaaaagtagtgatagctgctgtaaacggatttgcctttaggtggaggatgt gaacttgcattggcatgtgatataagaattgcatctgctaaagctaaatttggcagcc agaagtaactccttgaataactccaggatattggaggaactcaaaaggcttacaagattgg ttggaatggcaaaagcaaaagaattaatctttacaggtcaagttataaaagctgatgaa gctgaaaaaatagggctagtaaatagagtcggttgagccagacattttaatagaagaagt tgagaaattagctaaagataatagctaaaaatgctcagcttgcagttagatactctaag aagcaatacaacttgggtgctcaactgatataaataactggaaatagatatagaatcta ttatttggcttttgttttcaactaaagaccaaaaagaaggaaatgctcagctttcgttga aaagagagaagctaactttataaaagggtaataagaaggagataacatatgagaagtt ttgagaagtaattaagtttgcaaaagaaagagcctaaaaactatatcagtagcatgt tgccaagataaagaagttttaatggcagttgaaatggctagaaaaagaaaaatagcaaa tggcatttttagtaggagatatagaaaagactaaagaaattgcaaaaagcattagacatgg atcgaaaaattatgaactgatagataaaaagatttagcagaagcatctctaaaatct ggtgaattagtttcaaggaagcagacatggtaatgaaaggcttagtagacacatc aataactaaaagcagttttaataaagaagtaggtccttagaactggaaatgtattaa gtcagtagcagtatgttagtagaggatgatagattattttctogtaactgacgca gctatgaacttagctcctgatatacaataactaaaaagcaaatcatagaaaatgcttgcac agtagcacattcattagatataagtgaacccaaaagttgctgcaatatgacgcaaaagaaa aagtaaatccaaaaatgaaagatacagttgaaagctaaagaaactagaagaaatgtatgaa agaggagaaatcaaaagttgtatggttgggtggcccttttgcaattgataatgcagtatc tttagaagcagctaaacataaaggtataaatcatcctgtagcaggacgagctgatatat tattagcccagatattgaaggtggtaacatattatataaagctttggattctctca aaatcaaaaaatgcaggagttatagttggggctaaagcaccataatattaacttctag agcagacagtgaaagaaactaaactcaatagcttttaggtgttttaattggcagcaa aggcataataagaaggagatatacatatgagcaaaaatatttaaaatcttaacaataaat cctggttcgacatcaactaaaatagctgtatttgataatgaggatttagtattgaaaa aactttaagacattcttcagaagaaataggaaaatagagaaggtgctgaccaatttg aatttcgtaacaagtaatagaagaagctctaaaaagaaggtggagtaaaaaacatctgaa ttagatgctgtagtaggtagaggaggacttcttaaacctataaaaggtggtacttattc agtaagtgctgctatgattgaagatttaaaagtgaggatttttaggagaacacgcttcaa acctaggtggaataatagcaaaaataataggtgaaagaaatggttcttctcacaata gtagaccctgttgtgtgatgaattagaagatggttgcagaaatttctggtagcctga aataagtagagcaagtgtagtacatgctttaaatacaaaaggcaatagcaagaagatag ctagagaaataaacaagaaatagaaatataaatacttatagttgcacacatgggtgga ggagtttctggtgagctcataaaaatggtaaaaatagtagatgttgcaaacgcattaga</p>

10

20

30

40

【表 4 2 - 4】

説明	配列
	tggagaaggacctttctctccagaaagaagtgggtggactaccagtaggtgcattagtaa aaatgtgcttttagtgaaaaatatactcaagatgaaattaaaaagaaaataaaaggtaat ggcggactagttgcatacttaaacactaatgatgctagagaaagtgaagaaagaattga agctgggatgaaaaagctaaattagtatatgaagctatggcatatcaaactctctaaag aaataggagctagtgctgcagttcttaagggagatgtaaaagcaatattattaactggg ggaatcgcatattcaaaaatgtttacagaaatgattgcagatagagttaaatttatagc agatgtaaaagtttatccaggtgaagatgaaatgattgcattagctcaaggtggactta gagttttaactggggaagaagaggctcaagtttatgataactaataa
pLogic046- oxyS-酪酸構築物 (配列番号82)の ヌクレオチド配列	ctcgagttcattatccatcctccatcgccacgatagttcatggcgataggtagaatagc aatgaacgattatccctatcaagcattctgactgataattgctcacacgaattcattaa agaggagaagggtaccatgatcgtaaaaacctatggtaacgcaacaatatctgcctgaacg cccatcctcagggctgcaagaaggagtggaagatcagattgaatataccaagaaacgc attaccgcagaagtcaaagctggcgcaaaagctccaaaaacgttctgggtgcttggtg ctcaaaggttacggcctggcgagccgcattactgctgctggttcggatacggggctgca ccatcggcgtgctcctttgaaaaagcgggttcagaaaccaaataatggtacacgggatg tacaataatttggcatttgatgaagcggcaaaacgcgaggggtctttatagcgtgacgat cgacggcgatgctgtttcagacgagatcaaggccacggtaattgaggaagccaaaaaa aaggtatacaatttgatctgatcgtatacagcttggccagcccagctacgtactgatcct gatacaggtatcatgcaaaaagcgttttgaaacctttggaaaaacgttcacaggcaa aacagtagatccggttactggcgagctgaaggaaatctccgcggaaccagcaaatgacg aggaagcagccccaactgttaaagtatgggggtgaagattgggaacggttgattaa cagctgtcgaaggaaggcctcttagaagaaggctgtattaccttggcctatagttatat tggccctgaagctaccaagctttgtaccgtaaaaggcacaatcggaaggccaaaagac acctggaaggccacagcacaccgtctcaacaaagagaacccgtcaatccgtgcctctg agcgtgaataaaggcctggtaaccgcgcaagcgcgtaatcccggtaatccctctgta tctcgcagcttgttcaaagtaatgaaagagaaggcaatcatgaaggttgtattgaac agatcacgcgctgtacgcgcgagcctgtaccgtaaaagatggtacaactccagttgat gaggaaaaatcgcatctgattgatgattgggagttagaagaagcgtccagaaagcgg atcccgcttgatggagaagtcacgggtgaaaacgcagaatctctcactgacttagcgg ggtaccgccatgatttcttagctagtaacggctttgatgtagaaggtattaattatgaa gcggaagtgaacgcttcgaccgtatctgataagaaggagatatacatatgagagaagt agtaattgccagtgtagctagaacagcagtaggaagtttggaggagcattttaaactag tttcagcggtagagttaggggtaacagcagctaaagaagctataaaaagagctaacata actccagatatgatagatgaatctcttttagggggagtacttacagcaggtcttggaca aaatatagcaagacaaatagcattaggagcaggaataccagtagaaaaaccagctatga ctataaataatagtttgggttctggattaagatctggttcaatggcatctcaactata gcattaggatgctgatataatgtagttgggtgagctgaaaaatgagtagtctcc ttatttagtaccagtgcgagataggtgcaagaatgggtgatgctgcttttgggtgatt caatgataaaagatggattatcagacatatttaataactatcacatgggtattactgct gaaaaacatagcagagcaatggaataaactagagaagaacaagatgaattagctcttgc aagtcaaaaataaagctgaaaaagctcaagctgaaggaaaatttgatgaagaaatagttc ctggtgtataaaaaggaaagaaaggtgacactgtagtagataaagatgaatataatag cctggcactacaatggagaacttgctaagttaaagacctgcatttaaaaagatggaac agttactgctggtaatgcatcaggaataaatgatgggtgctgctatgtagtagtaatgg ctaaagaaaagctgaagaactaggaatagagcctcttgcaactatagtttcttatgga acagctgggtgtgaccctaaaataatgggatatggaccagttccagcaactaaaaaagc tttagaagctgctaataatgactattgaagatatagatttagttgaagctaatgagccat ttgctgcccaatctgtagctgtaataagagacttaaatatagatatgaataaagttaat gtaaatggtggagcaatagctataggacatccaataggatgctcaggagcaagaatact tactacacttttatatgaaatgaagagaagagatgctaaaactggctcttgctacacttt gtataggcggtggaatgggaactactttaatagtttaagagatagtaagaaggagata catatgaaattagctgtaataggtagtggaaactatgggaagtggtattgtacaacttt tgcaagttgtggacatgatgtatgtttaaagagtgaactcaaggtgctatagataaat gtttagctttattagataaaaatttaactaagttagttactaagggaaaaatggatgaa gctacaaaagcagaaatattaagtcattgtagttcaactactaatatgaagatttaa agatattgatttaataatagaagcatctgtagaagacatgaatataaagaaagatggtt tcaagttactagatgaattatgtaaaagaagatactatcttggcaacaaatacttcatca

10

20

30

40

【表 4 2 - 5】

説明	配列
	<p>ttatctataacagaaatagcttcttctactaagcgccagataaagttataggaatgca tttctttaatccagttcctatgatgaaattagttgaagttataagtggtcagttaacat caaaagttacttttgatacagatattgaattatctaagagatcaataaagtcaccagta gatgtatctgaatctcctggatttgtagtaaatagaatactttacctatgataaatga agctgttggtatataatgcagatggtggtgcaagtaaagaagaaatagatgaagctatga aattaggagcaaaccatccaatgggaccactagcattaggtgatttaatcggattagat gttgttttagctataatgaacgttttatatactgaatttgagatactaaatataagacc tcatccacttttagctaaaatggttagagctaatcaattaggaagaaaaactaagatag gattctatgattataataaataaagaaggagatacatatgagtacaagtgatggt aaagtttatgagaatgtagctgttgaagtagatggaatatatgtacagtgaaaaatgaa tagacctaaagccctaatgcaataaattcaaagactttagaagaactttatgaagtat ttgtagatattaataatgatgaaactattgatggtgtaatatgacaggggaaggaaag gcatttgtagctggagcagatattgcatacatgaaagatttagatgctgtagctgctaa agatttttagtatcttaggagcaaaagcttttgagaaatagaaaatagtaaaaaagtag tgatagctgctgtaaacggatttgctttaggtggaggatgtgaaacttgcaatggcatgt gataaagaattgcatctgctaaagctaaatttggtcagccagaagtaactcttggaat aactccaggatattggaggaactcaaaggcttacaagattggttggaaatggcaaaagcaa aagaattaatctttacaggtcaagttataaaagctgatgaagctgaaaaaatagggcta gtaaatagagtcgtagccagacatttttaataagaagaagttgagaaatagctaagat aatagctaaaaatgctcagcttgcaagttagatactctaaagaagcaatacaacttggtg ctcaactgatataaaactggaatagatatagaatctaatttatttggtctttggttt tcaactaaagaccaaaagaaggaatgtcagctttcggtgaaaaagagagaagctaacct tataaaagggtataaagaaggagatacatatgagaagttttgaaagaagtaataagtt ttgcaaaagaaagaggacctaaaactatcagtagcatggttccaagataaaagaagtt ttaatggcagttgaaatggctagaaaagaaaaatagcaaatgccatttttagtaggaga tatagaaaagactaaagaattgcaaaagcatagacatggatagcaaaatattgaac tgatagatataaaagatttagcagaagcatctctaaaatctggtgaattagttcaca ggaaaagccgacatggaatgaaaggcttagtagacacatcaataataactaaaagcagt tttaataaagaagtaggtcttagaactggaaatgtattaagtcacgtagcattttg atgtagaggatgatagattttttcgtaactgacgcagctatgaacttagctcct gatacaaaactaaaagcaaatcatagaaaatgcttgccacagtagcacattcattaga tataagtgaaccaaaagttgctgcaatatgcccgaagaaaaagtaaatccaaaaatga aagatacagttgaagctaaagaactagaagaatgtatgaaagaggagaaatcaaaggt tgatggttggtggccttttgcaattgataatgcagtagcttttagaagcagctaaaca taaagggtataaatcatcctgtagcaggacgagctgatatattatagccccagatattg aagtggttaacatattatataaagctttggtattctctcaaaatcaaaaaatgcagga ggtatagttggggctaaagccaataatattaactcttagagcagacagtgaaagaaac taaaactaaactcaatagcttttaggtgttttaatggcagcaaaaggcataataagaaggag atatacatatgagcaaaatatttaaaatcttaacaataaatcctggttcgacatcaact aaaaatagctgtatttgataatgaggatttagtatttgaaaaaactttaagacattcttc agaagaaataggaaaatagagaagggtgtctgaccaatttgaaatttcgtaaacagta tagaagaagctctaaaagaagggtggagtaaaaacatctgaattagatgctgtaggt agaggaggacttcttaaacctataaaagggtggtacttattcagtaagtgctgctatgat tgaagatttaaaagtgaggattttaggagaacacgcttcaaacctaggtggaataatag caaaacaaataggtgaagaagtaaatgttccttcatacatagtagaccctgtgttgta gatgaattagaagatggtgctagaatttctggtatgcctgaaataagtagagcaaggtg agtacatgctttaaatcaaaaggcaatagcaagaagatagctagagaaataaaacaaga aatatgaagatataaatcttatagttgacacatgggtggaggatttctgttgagct cataaaaaaggtaaaatagtagatggtgcaaacgcattagatggagaaggacctttctc tccagaaagaagtggtggactaccagtaggtgcattagtaaaaaatgtgcttttagtgaa aatatactcaagatgaaattaaaaagaaaataaaaggtaatggcggactagttgcatac ttaaacactaatgatgctagagaagttgaagaaagaattgaagctgggtgatgaaaaagc taaattagatatgaagctatggcatatcaaatctctaaagaaataggagctagtgctg cagttcttaaggagatgtaaaagcaatatttataactggtggaatcgcatattcaaaa atgtttacagaaatgattgcagatagagttaaatttatagcagatgtaaaagttatcc aggtgaagatgaaatgattgcattagctcaaggtggacttagagtttaactggtgaa aagggtcaagtttatgataactaataa</p>

10

20

30

40

【表 4 2 - 6】

説明	配列
<p>p Z A 2 2 - o x y R 構築物 (配列番号 8 3) の ヌクレオチド配列</p>	<pre> ctcgagatgctagcaattgtgagcggataacaattgacattgtgagcggataacaagat actgagcacatcagcaggacgcactgacctaattaaaagaattcattaagaggagaa aggtaccatgaatattcgtgatcttgagtagcctgggtggcattggctgaacaccgcatt ttcggcgtgcggcagattcctgcccacggttagccagccgacgcttagcgggcaaatcgt aagctggaagatgagctggcggtgatgttctggagcggaccagccgtaaagtgttgtt caccagggcgggaatgctgctgggtgatcaggcgcgtaccgtgctgctgaggtgaaag tccttaaagagatggcaagccagcaggggcgagacgatgtccggaccgctgcacattggt ttgatccccacagttggaccgtaacctgctaccgcatattatccctatgctgcaaccagac ctttccaaagctggaatgtatctgcatgaagcacagaccaccagttactggcggcaac tggacagcggcaaacctcgattgctgatcctcgcgctggtgaaagagagcgaagcattc attgaagtgcgctgtttgatgagccaatgttctggctatctatgaagatcaccgctg ggcgaccgcgaatgctgaccgatggccgatctggcaggggaaaaactgctgatgctgg aagatggctcactgtttgcgcgatcaggcaatgggtttctgttttgaagccggggcgat gaagatacacacttcgcgcgaccagcctggaaactctgcgcaacatggtggcggcagg tagcgggatcactttactgccagcgtggctgtgcccgcggagcggcaaacgcgatgggg ttgtttatctgcccgtgcattaaagccggaaccacgcgcaactattggcctggtttatcgt cctggctcaccgctgcgagccgctatgagcagctggcagaggccatccgcgcaagaat ggatggccatttcgataaagttttaaaacaggcgggttaaggatcccatggtacgctg ctagaggcatcaataaaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatct gttgtttgtcggtgaaacgctctcctgagtaggacaaatccgcgccttagacctagggg atataattccgcttcctcgctcactgactcgctacgctcggctcgttcgactgcggcgagc ggaaatggcttacgaacggggcggagatttcctggaagatgccaggaagatacttaaca ggaaagtgagagggccgcggcaaaagccggttttccataggctccgccccctgacaagc atcacgaaatctgacgctcaaatcagtggtggcgaaccgacaggactataaagatac caggcgtttccccctggcggctccctcgctgctctcctgttcctgcctttcggtttac cgggtgctattccgctggtatggccgctttgtctcattccaagcctgacactcagttcc ggtaggcagttcgtccaagctggactgtatgcaagcaacccccggttcagtcggaccg ctgccccttatccgtaactatcgtcttgagtcgaacccggaaagacatgcaaaagcac cactggcagcagccactggttaattgatttagaggagttagctctgaaagtcagcggcg ttaaggctaaactgaaaggacaagttttgggtgactgctcctccaagccagttacctc ggttcaaagagttggtagctcagagaaccttcgaaaaaccgcccctgcaaggcgggtttt tcgttttcagagcaagagattacgcgcgagacaaaacgatctcaagaagatcatcttat taatcagataaaaatatttctagatttcagtgcaatttatctcttcaaatgtagcacctg aagtcagccccatacgatataagttgttactagtgttggattctcaccaataaaaaac gcccggcggcaaccgagcgttctgaacaaatccagatggagttctgaggtcattactgg atctatcaaacaggagttccaagcgagctctcgaaccccagagtcggcctcagaagaactc gtcaagaaggcgatagaaggcgatgctgctgcaatcgggagcggcgataaccgtaaagca cgaggaagcgtcagccattcgcgcgcaagctcttcagcaatatcacgggtagccaac gctatgtcctgatagcggctccgccaccccagccggccacagtcgatgaatccagaaaa gcccgcattttccacatgatattcggcaagcaggcatcgccatgggtcagcagcagat cctcgcgctcgggcatgcccgccttgagcctggcgaacagttcggctggcgcgagcccc tgatgctcttcgtccagatcctcctgatcgacaagaccggttccatccgagtagcgtgc tcgctcgatgagatgtttcgttgggtggaatgggcaggtagccggatcaagcgtat gcagccgcccgatgcatcagccatgatggatactttctcggcaggagcaaggtgagat gacaggagatcctgccccgcaacttcgcccataagcagccagtccttcccgcttcagt gacaacgtcgagcacagctgccaaggaacgcccgtcgtggccagccacgatagccgctg ctgcccctcctcgtcagttcattcagggcaccggacaggtcggctcttgacaaaagaacc ggcgcgccctgctgacagccggaacacggcggcatcagagcagccgattgctgtgtg tgcccagtcatagccaatagcctctccaccaagcggccggagaacctgctgcaatc catctgttcaatcatgcaaacgatacctcatcctgtctcttgatcagatcttgatccc ctgcccctcagatccttggcggcaagaaagccatccagtttactttgcaagggttccc aaccttaccagagggcggccccagctggcaattccgacgtctaagaaaccattattatca tgacattaacctataaaaaataggcgtatcagagggcctttcgtcttcac </pre>
<p>p L o g i c 0 3 1 - t e t - 酪酸構築物</p>	<pre> gtaaaacgacggccagtgaattcgttaagaccactttcacatttaagttgtttttcta atccgcatatgatcaattcaaggccgaataagaaggctggctctgcaccttggtgatca aataattcgatagcttgtcgttaataatggcggcactatcagtagtaggtgtttccct ttctcttttagcgacttgatgctcttgatcttccaatacgcacctaagtaaaatgcc </pre>

10

20

30

40

【表 4 2 - 7】

説明	配列
<p>(配列番号 8 4) のヌクレオチド配列 T e t R をコードする配列は、 下線付きであり、 重複 t e t R / t e t A プロモーターは、 囲み線付きである。</p>	<pre> ccacagcgctgagtgcatataatgcattctctagtgaaaaaccttgttggcataaaaag gctaattgattttcgagagtttcatactgttttctgtaggccgtgtacctaataatgtac ttttgctccatcgcgatgacttagtaaaagcacatctaaaacttttagcgttattacgta aaaaatcttgccagctttccccttctaaagggcaaaagtgagtaggtgcctatctaac atctcaatggctaaggcgctcgagcaaaagcccgttattttttacatgccaatacaatgt aggctgctctacacctaagcttctggcgagtttacgggttgtaaaccttcgatccga cctcattaagcagctctaatagcgctgtaatacactttacttttatctaactagacatc attaattcctaatttttgttgacactctatcattgatagagttattttaccactcccta tcagtgatagagaaagtgaactctagaataatttgtttaactttaagaaggagata tacatatggatttaaatctaaaaaatatcagatgcttaaagagctatatgtaaagcttc gctgaaaaatgaagttaaaccttttagcaacagaacttgatgaagaagaaagattcctta tgaaacagtggaaaaaatggcaaaagcaggaatgatgggtataccatatccaaaagaat atgggtgagaaggtggagacactgtaggatataatggcagttgaagaattgtctaga gtttgtggtactacaggagttatattatcagctcatacatctcttggtcatggcctat atatcaatatggtaatgaagaacaaaaacaaaaattcttaagaccactagcaagtggag aaaaataggagcatttggcttactgagcctaagctggtacagatgagctctggccaa caacaactgctgttttagacgggatgaatacacttaataatggctcaaaaaattttat aacaacgcaatagctggtgacataatgtagtaatggcaatgactgataaatctaagg ggaacaaaggaatatcagcatttatagttgaaaaaggaactcctgggttagctttgga gttaaaagaaaagaaaatgggtataagaggttcagctacagagtaataatattgagga ttgcagaatacctaaagaaaatttacttggaagaaggtcaaggatttaagatagcaa tgtctactcttgatgggtgtagaattggtagctgcacaagcttaggtttagcacaa ggtgctcttgatgaaaactgttaaatatgtaaaagaaagagtaacaatttggtagaccat atcaaaaattccaaaatacacaattccaattagctgatatggaagttaaggtaacagcg ctagacaccttgatatacaagcagctataaataaagacttaggaaaaccttatggagta gaagcagcaatggcaaaattatgtcagctgaaacagctatggaagttactacaaaagc tgtacaacttcatggaggatattgatacactcgtgactatccagtagaaagaatgatga cagatgctaagataaactgaaatataatgaaggaactagtgaagttcaagaatggttatt tcaggaaaaactattaaaatagtaagaaggagatatacatatgggaaggatttatgaa tatagtcgtttgtataaaaacagttccagatacaacagaagttaaactagatcctaata caggtactttaattagagatggagtaaccaagtataataaacctgatgataaagcaggt ttagaagaagctataaaaataaaagaagaatgggtgctcatgtaactgttataacaat gggacctcctcaagcagatattggctttaaagaagctttagcaatgggtgcagatagag gtatattattaacagatagagcatttgcgggtgctgatacttgggcaacttcatcagca ttagcaggagcattaaaaatataagattttgatataataatagctggaagcagggcagat agatggagataactgcacaagttggacctcaaatagctgaacatttaaatcttccatcaa taacatatgctgaagaataaaaaactgaaggtgaatatgtattagtaaaaagacaattt gaagattgttgccatgacttaaaagttaaaatgccatgccttataacaactcttaaga tatgaacacaccaagatacatgaaagttggaagaatataatgatgctttcgaaaatgatg tagtagaaacatggactgtaaaagataatagaagttgacccttctaatttaggtcttaa ggttctccaactagtgatttaaatcatttacaaaatcagttaaaccagctggtaacaat atacaatgaagatgcgaaaaacatcagctggaattatcatagataaaataaaagagaag atatcatataataagaaggagatatacatatgggtaacggttttagtagtaatagaacaa agagaaaatgtaattcaaacgtttcttttagaattacttaggaaaggctacagaaatagc aaaagattatgatacaaaagtttctgcattacttttaggtagtaaggtagaaggttaa tagatacattagcactatgggtgcagatgaggttaatagtagtagatgatgaagcttta gcagtgatacaactgaaccatatacaaaagcagcttatgaagcaataaaagcagctga ccctatagttgtattatgttgcaacttcaataggtagagatttagcgcctagagttt ctgctagaatacatacaggtcttactgctgactgtacaggtccttgagtagctgaagat acaaaattattattaatgacaagacctgocctttgggtgaaatataatggcaacaatagt ttgtaaagatttcagacctcaaatgtctacagttagaccaggggttatgaagaaaaatg aacctgatgaaactaaagaagctgtaattaaccgtttcaaggtagaatttaatgatgct gataaattagttcaagttgtacaagtaataaaaagaagctaaaaaaacaagttaaaataga agatgctaagatattagttctgctggacgtggaatgggtggaagaaacacttagaca tactttatgaattagctgaaattataggtggagaagtttctggttctcgtgccatata gatgcaggttggttagataaagcaagaagttgggtcaaacctggtaaaactgtaagacc agaccttatatagcatgtggtatattctggagcaatacaacataatagctggatggaag </pre>

10

20

30

40

【表 4 2 - 8】

説明	配列
	<p>atgctgagtttatagttgctataaataaaaaatccagaagctccaatatttaaatatgct gatgttggtatagttggagatgttcataaagtgctccagaacttatcagtcagttaag tgttgcaaaagaaaaaggtgaagtttagctaaactaataagaaggagatatacatatga gagaagtagtaattgccagtgtagctagaacagcagtaggaagtttggaggagcattt aaatcagtttcagcggtagagtttagggtaacagcagctaaagaagctataaaaaagc taacataactccagatatgatagatgaatctcttttagggggagtaacttacagcaggtc ttggacaaaatatagcaagacaaatagcattaggagcaggaataaccagtagaaaacca gctatgactataaaatagtttgggttctggattaagatctgttcaatggcatctca acttatagcattaggtgatgctgataaatgtagttggtggagctgaaaaatgagta tgtctccttatttagtaccagtgtagatggtgcaagaatgggtgatgctgctttt gttgattcaatgataaaagatggattatcagacatatttaataactatcacatgggtat tactgctgaaaacatagcagagcaatggaatataactagagaagaacaagatgaattag ctcttgcaagtcaaaaataagctgaaaaagctcaagctgaaggaaaatttgatgaagaa atagttcctggtgtataaaaggaagaaaaggtgacactgtagtagataaagatgaata tattaagcctggcactacaatgggaaaacttgctaagttaagacctgcatttaaaaaag atggaacagttactgctggtaatgcatcaggaataaatgatgggtgctgctatgtagta gtaatggctaaagaaaaagctgaagaaactaggaatagagcctcttgcaactatagttc ttatggaacagctggtgttgaccctaaaataatgggatatggaccagttccagcacta aaaaagctttagaagctgctaataatgactattgaagatatagatttagttgaagctaat gaggcatttgctgccaatctgtagctgtaataagagacttaaatatagatatgaataa agttaatgttaatggtggagcaatagctataggacatccaataggatgctcaggagcaa gaatacttactacacttttatatgaaatgaagagaagagatgctaaaaactggctcttgct acctttgtataggcggtaggaatggaaactactttaatagttaagagatgaagagg agatatacatatgaaattagctgtaataggtagtggaactatgggaagtggtattgtac aaactttgcaagttgtggacatgatgtatgtttaaagagtagaactcaaggtgctata gataaatgttttagctttatagataaaaaatctaactaagtttagttactaagggaaaaat ggatgaagctacaaaagcagaaatattaagtcattgtagttcaactactaattatgaag atftaaaagatatggatttaataatagaagcatctgtagaagacatgaatataaagaaa aggttttcaagttactagatgaattatgtaagaagatactatcttggaacaaaatc ttcatcattatctataacagaaatagcttcttctactaagcgccagataaagttatag gaatgcatttctttaatccagttcctatgatgaaatagttgaagttataagtggtcag ttaacatcaaaagttacttttgatacagtatttgaattatctaagagtatcaataaagt accagtagatgtatctgaaatctcctggattttagtagtaaatagaatacttatacctatga taaatgaagctggtgtatataatgacagatgggtgtgcaagtaagaagaagaatagatgaa gctatgaaataggagcaaaccatccaatgggaccactagcattaggtgatttaacggt attagatggtgttttagctataatgaacggttttatatactgaatttggagatactaaat atagacctcatccacttttagctaaaatgggttagagctaatcaattaggaagaaaact aagataggattctatgattataataaataataagaaggagatatacatatgagtacaag tgatgttaaagtttatgagaatgtagctggtgaagtagatggaaatataatgtacagtg aaatgaatagacctaaagcccttaatgcaataaattcaaagactttagaagaactttat gaagtattgtagatattaataatgatgaaactattgatggtgtaaatattgacagggga aggaaggcattttgtagctggagcagatattgcatacatgaaagatttagatgctgtag ctgctaaaagatttttagtatcttaggagcaaaagcttttggagaaaatagaaaatgtaa aaagtagtgatagctgctgtaaaccggattttgcttttaggtggaggatgtgaaactgcaat ggcatgtgatataagaattgcatctgctaaagctaaatttggctcagccagaagtaactc ttggaataaactccaggataggggaactcaaaggcttacaagattgggtggaaatggca aaagcaaaagaattaatctttacaggtcaagttataaaagctgatgaagctgaaaaaat agggctagtaaatagagtgogttgagccagacattttatagaagaagttgagaaatag ctaagataatagctaaaaatgctcagcttgtagttagatactctaagaagcaatacaa cttgggtgctcaaaactgatataaataactggaatagatatagaatctaattttatttggct ttgtttttcaactaaagacaaaaagaaggaatgtagctttcgttgaaaagagagaag ctaactttataaaagggttaataagaaggagatatacatatgagaagttttgaagaagta attaagtttgcaaaagaagaggacctaaaactataatcagtagcatggttgccaagataa agaagttttaaaggcagttgaaatggctagaaaagaaaaaatagcaaatgccatttttag taggagatatagaaaagactaaagaattgcaaaaagcagtagacatggatatcgaaaat tatgaactgatagatataaaagatttagcagaagcatctctaaaatctggtgaaatag ttcacaaggaaaagccgacatggtaatgaaaggcttagtagacacatcaataactaa</p>

10

20

30

40

【表 4 2 - 9】

説明	配列	
	<p>aagcagttttaataaagaagtaggtccttagaactggaaatgtattaagtcacgtagca gtatttgatgtagaggatgatagattatTTTTTCGtaactgacgcagctatgaactt agctcctgatacaaaataactaaaaagcaaatcatagaaaatgcttgacagtagcacatt cattagatataaagtgaacccaaagtgtgctgcaatatgCGcaaaagaaaaagtaaatcca aaaaagaaagatacagttgaagctaaagaactagaagaaatgtatgaaagaggagaaat caaaggttgatggttgggtgggccttttgcaattgataatgcagtatcttttagaagcag ctaaacataaagggtataaatcatcctgtagcaggacgagctgatataatttagcccca gatatggaaggtggtaacatattatataaaagccttgggtattcttctcaaaatcaaaaaa tgacaggttatagttggggctaaagcaccaataatattaacttctagagcagacagtg aagaaactaaactaaactcaatagccttaggtgttttaattggcagcaaaaggcataataa gaaggagatatacatatgagcaaaatatttaaaatcttaacaataaatcctggttcgac atcaactaaaatagctgtatTTTGataatgaggatttagtatttgaaaaactttaagac attcttcagaagaaataggaaaatagagaaggtgtctgaccaatttgaatttcgtaa caagtaatagaagaagctctaaaagaaggtggagtaaaaaacatctgaattagatgctgt agtaggtagaggagacttcttaaacctataaaaagggtgacttattcagtaagtgcctg ctatgattgaagatttaaaagtgggagtttaggagaacacgcttcaaacctagggtga ataatgcaaaacaaataggtgaagaagtaaatgttcttcatacatagtagaccctgt tgtttagatgaattagaagatgttgctagaattctgggtatgctgaaataagtagag caagtgtagtacatgctttaaatacaaaaggcaatagcaagaagatagctagagaaata aacaagaaatagaagataaaatcttatagttgcacacatgggtggaggagtttctgt tggagctcataaaaaatggtaaaaatagtagatgttgcaaacgcattagatgggagaaggac cttctctccagaaaagaagtggtggactaccagtaggtgcattagtaaaaaatgtgctt agtggaaaatatactcaagatgaaataaaaagaaaaataaaaggtaatggcggactagt tgcatacttaaacactaatgatgctagagaagttgaagaaagaattgaagctggtgatg aaaaagctaaattagtatatgaagctatggcatatcaaatctctaaagaaataggagct agtgtgcagttcttaagggagatgtaaaagcaatattattaactggtggaatcgcata ttcaaaaatgtttacagaaatgattgcagatagagttaaatttagcagatgtaaaag tttaccaggtgaagatgaaatgattgcattagctcaaggtggacttagagttttaact ggtgaagaagaggctcaagtttatgataactaataa</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
<p>pLogic046- tet-酪酸構築物の ヌクレオチド配列 (配列番号85) TetRをコード する配列は 下線付きであり、 重複tetR/ tetAプロ モーターは、 囲み線付きである。</p>	<p>gtaaaacgacggccagtgaattcgTTAagaccactttcacatttaagttgTTTTCTa atccgcatatgatcaattcaaggccgaataagaaggctggctctgcaccttggtgatca aataattcgatagcttTgcgtaataatggcggcactatcagtagtaggtgttccct ttcttcttagcgacttgatgctcttgatcttccaatacgcacccaagtaaaatgcc ccacagcgtgagtgcatataatgcaattctctagtgaaaaacctgttgccataaaaaag gctaattgattttcgagagtttcactgTTTTCTgtagccggtgtacctaagtac TTTTgctccatcgcgatgacttagtaaagcacatctaaaacttttagcgttattacgta aaaaatcttgccagctttccccttctaaagggcaaaagtgagtatggtgcctatctaac atctcaatggctaaggcgtcgagcaaaagcccgttattttttacatgccaatacaatgt aggctgctctacacctagcttctggcgagtttacgggttgttaaacccttcgattccga cctcatgaagcagctctaattgcgctgTTAatcactttacttttatctaactagacatc attaattcctaattttTgttgacactctatcattgatagagttattttaccactcccta tcagtgatagagaaagtgaaactctagaataattttgtttaactttaagaaggagata tacatatgatcgtaaaacctatggtacgcaacaatatctgctgaaagcccatcctcag ggctgcaagaaggagtggaagatcagattgaatataccaagaaacgcattaccgcaga agtcaaaagctggcgaaaagctcaaaaaacgttctgggtgcttgctgctcaaatggtt acggcctggcgagccgacttactgctgctgctgggatacggggctgcgacctcggcgtg tcctttgaaaaagcgggttcagaaaccaaataatggtacaccgggatggtacaataattt ggcatttgatgaagcggcaaaacgcgagggctttatagcgtgacgatcgacggcgatg cgttttcagacgagatcaaggccaggtaattgaggaagccaaaaaaaagggtatcaaa tttgatctgatcgtatacagcttggccagcccagtaactgactgatcctgatacaggtat catgcacaaaagcgttttgaaacctttggaaaaacgcttcacaggcaaaacagtagatc cgtttactggcgagctgaaggaaatctcgcggaaaccagcaaatgacgaggaagcagcc gccactgttaaagttatgggggtgaagattgggaacggttgattaaagcagctgtcgaa ggaaggcctcttagaagaaggctgtattaccttgccctatagttatattggccctgaag ctaccaagctttgtaccgtaaaggcaaatcggcaaggccaaagaaacacctggaggcc acagcacaccgtctcaaaaagagaaccctgcaatccgtgccttcgtgagcgtgaataa</p>	<p>30</p> <p>40</p>

【表 4 2 - 1 0】

説明	配列
	<p>aggcctggtaaccgcgcaagcgcgtaatcccgtaatccctctgtatctcgccagct tgttcaaagtaatgaaagagaagggcaatcatgaaggttgattgaacagatcaocgct ctgtacgccgagcgcctgtaccgtaaagatggtaacaattccagttgatgaggaaaatcg cattcgcattgatgattgggagttagaagaagacgtccagaaaagcggtatccgcttga tggagaaagtcaagggtgaaaacgcagaatctctcactgacttagcgggtaccgccat gatttcttagctagtaacggctttgatgtagaaggtattaattatgaagcggaagtga acgcttcgaccgtatctgataagaaggagatatacatatgagagaagtagtaattgcca gtgcagctagaacagcagtaggaagttttggaggagcatttaaatcagtttcagcggta gagttaggggtaacagcagctaaagaagctataaaaagagctaacataactccagat gatagatgaatctcttttaggggagtacttacagcaggctctggacaaaatatagcaa gacaaaatagcattaggagcaggaataccagttagaaaaaccagctatgactataaatata gtttgtggttctggattaagatctgtttcaatggcatctcaacttatagcattaggtga tgctgatataatgttagttggtggagctgaaaacatgagtagtctccttatttagtac caagtgcgagataggtgcaagaatgggtgatgctgcttttggattcaatgataaaa gatggattatcagacatatttaataactatcacatgggtattactgctgaaaacatagc agagcaatggaatataactagagaagaacaagatgaattagctcttgcaagctaaaata aagctgaaaaagctcaagctgaaggaaaatttgatgaagaaaatagttcctgtgttata aaaggaagaaaaggtgacactgtagtagataaagatgaatataattaagcctggcactac aatggagaaacttgctaagttaagacctgcatttaaaaagatggaacagttactgctg gtaatgcatcaggaataaatgatgggtgctgctatgttagtagtaatggctaagaaaa gctgaagaactaggaatagagcctcttgcaactatagtttcttatggaacagctgggtg tgaccctaaaaataatgggataaggaccagttccagcaactaaaaagctttagaagctg ctaatatgactattgaaagataatagatttagttgaagctaatgagcatttgctgccc tctgtagctgtaataagagacttaaatatagatatgaataaagttaatgtaatgggtg agcaatagctataggacatccaataggatgctcaggagcaagaatacttactacacttt tataatgaaatgaagagaagagatgctaaaactggctcttgctacactttgtataggcgg ggaatgggaactactttaatagttaagagatagtaagaaggagatatacatatgaaatt agctgtaataggtagtggaactatgggaagtggatttgtacaaaacttttgcaagttgtg gacatgatgtatgtttaaagagttagaactcaaggtgctatagataaatgtttagcttta ttagataaaaaatttaactaagttagttactaagggaaaaatggatgaagctacaaaagc agaaatattaagtcagttagttcaactactaattatgaagattttaaagatagtgatt taataatagaagcatctgtagaagacatgaatataaagaaagatgttttcaagttacta gatgaattatgtaaagaagatactatcttgcaacaaatacttcatcattatctataac agaaatagcttcttactaagcgcagataaagttataggaatgcatttctttaaactc cagttcctatgatgaaattagttgaagttataagtggtcagttacatcaaaagttact tttgatacagatatttgaattatcgaagatcaataaagtaaccagtagatgtatctga atctcctggattttagtaaatagaatacttatacctatgataaatgaagctgttggtg tatatgcagatgggttgcaagtaagaagaaatagatgaagctatgaaataggagca aacatccaatgggaccactagcattaggtgatttaatcggattagatgttgttttagc tataatgaacgttttatatactgaatttgagagatacctaataatagacctcatccacttt tagctaaaatggtagagctaatcaattaggaagaaaaactaagataggattctatgat tataataaataataagaaggagatatacatatgagtacaagtgatgttaaagtttatga gaatgtagctgttgaagtagatggaaatatagtacagtgaaaaatgaatagacctaag ccttaatgcaataaattcaaagactttagaagaactttatgaagtattttagatatt aataatgatgaaactattgatgttgaatattgacaggggaaggaaaggcattttagc tggagcagatattgcatacatgaaagatttagatgctgtagctgtaaaagatttagta tcttaggagcaaaagcttttgagaaatagaaaatagtaaaaagtagtgatagctgct gaaaacggatttgccttaggtggagatgtgaacttgcaatggcatgtgataaagaat tgcatctgctaaagctaaatttggtcagccagaagtaactcttggaaataactccaggat atggaggaaactcaaaggcttacaagattgggtggaaatggcaaaagcaaaagaattaatc tttacaggtcaagttataaaagctgatgaagctgaaaaaatagggctagtaaatagagt cgttgagccagacattttaaagaagaagttgagaaatagctaaagataatagctaaaa atgctcagcttgcagttagatactctaaagaagcaatacaacttgggtgctcaactgat ataaatactggaatagatagaaactaatttatttggctcttggttttcaactaaaga ccaaaaagaaggaatgtcagcttctggtgaaaagagagaagctaaactttataaaaggt aataagaaggagatatacatatgagaagttttgagaagtaattaagtttgcaaaagaa agaggacctaaaactatcagtagcatgttgccaagataaagaagttttaaagtcag</p>

10

20

30

40

【表 4 2 - 1 1】

説明	配列
	tgaaatggctagaaaagaaaaatagcaaatgccatttttagtaggagatatagaaaaga ctaaagaattgcaaaaagcatagacatggatatcgaaaattatgaaactgatagata aaagattttagcagaagcatctctaaaatctggttgaattagtttcacaaggaagccga catggtaatgaaaggcttagtagacacatcaataactaaaagcagttttaataaag aagtaggtcttagaactgaaatgtattaagtacgtagcagtagtatttgatgtagaggga tatgatagattatcttctgtaactgacgcagctatgaaacttagctcctgatacaaac taaaagcaaatcatagaaaatgcttgacagtagcacattcattagatataagtgaac caaaagttgctgcaaatatgcgcaaaagaaaaagtaaatccaaaatgaaagatacagtt gaagctaaagaactagaagaaatgtatgaaagaggagaaaatcaaagggttgatgggttg tgggccttttgcaattgataatgcagtagctctttagaagcagctaaacataaaggataa atcatcctgtagcaggacgagctgatataattattagcccagatattgaagggtgtaac atattatataaagccttgggtattctctcaaatcaaaaaatgcaggagttatagttgg ggctaaagcaccataatattaacttctagagcagacagtgaagaaactaaactaaact caatagcttttaggtgttttaatggcagcaaggcataataagaaggagatatacatatg agcaaaatatttaaaatcttaacaataaatcctgggtcgacatcaactaaaatagctgt atttgataatgaggatttagtatttgaaaaaactttaagacattcttcagaagaaatag gaaaatagagaaggtgtctgaccaatttgaaatttcgtaaaacaagtaataagaagact ctaaaagaaggtggagtaaaaacatctgaatttagatgctgtagtaggttagaggaggact tcttaaacctataaaagggtggtacttattcagtaagtgtgctgctatgattgaagattta aagtgggagtttttaggagaacacgcttcaaacctaggtggaataatagcaaaacaaata ggtgaagaagtaaatgttccttcatacatagtagaccctgttggtgtagatgaattaga agatgttgctagaatctctggtatgctgaaataagtagagcaagtgtagtacatgctt taaatcaaaaggcaatagcaagaagatagcttagagaaataaacaagaaatagagat ataaatcttatagttgcacacatgggtggaggagttctggtggagctcataaaatgg taaaatagtagatggtgcaaacgcattagatggagaaggaccttctctccagaagaa gtggtggactaccagtaggtgcattagtaaaaatgtgcttttagtggaaaatataactcaa gatgaaattaaaaagaaaaataaaaggtaattggcggactagttgcataacttaaacactaa tgatgctagagaagttgaagaaagaattgaagctggtgatgaaaagctaaattagtat atgaagctatggcatatcaaatctctaaagaaataggagctagtgctgcagttcttaag ggagatgtaaagcaatattattaactggtggaatcgcatattcaaaaatgtttacaga aatgattgcagatagagttaaatctatagcagatgtaaaagtttatccaggtgaagatg aatgattgcattagctcaaggtggacttagagtttaactggtgagaagaggctcaa gtttatgataactaataa

10

20

30

【 0 5 6 4】

特定の構築物では、酪酸遺伝子カセットは、テトラサイクリン誘導性または構成的プロモーターの制御下におかれる。第3の酪酸遺伝子カセットでは、p b tおよびb u k遺伝子がt e s Bで置換されている。t e s Bは、プチリル - c o Aから酪酸を切り離し、それによりp b t - b u kの必要性を除去する大腸菌に見いだされるチオエステラーゼである。

【 0 5 6 5】

一実施形態では、t e s Bは、表6における配列のいずれかから選択されるF N R調節領域の制御下におかれる。代替実施形態では、t e s Bは、R N S応答性調節領域、例えば、n o r Bの制御下におかれ、細菌は、対応するR N S応答性転写因子、例えば、n s r Rをコードする遺伝子をさらに含む。他の実施形態では、t e s Bは、R O S応答性調節領域、例えば、o x y Sの制御下におかれ、細菌は、対応するR O S応答性転写因子、例えば、o x y Rをコードする遺伝子をさらに含む。特定の構築物では、異なる記載されている酪酸遺伝子カセットがそれぞれ、テトラサイクリン誘導性または構成的プロモーターの制御下におかれる。例えば、p b tおよびb u k遺伝子が硝酸応答性調節エレメントの制御下に発現するt e s Bで置換されている酪酸遺伝子カセットを含む遺伝子操作ニッスルを作製する。配列番号86は、淋菌に由来するn s r Rリプレッサー遺伝子の逆方向相補体（下線付き）、n s r Rおよび酪酸生成遺伝子カセットならびにそれらのそれぞれのR B Sを制御する多様なプロモーターを含む遺伝子間領域（太字）、ならびにR B Sに

40

50

よって分離された酪酸遺伝子 (t e r - t h i A - h b d - c r t - t e s B) を含む。

【 0 5 6 6 】

【表 4 3 - 1】

表 4 1 . 配列番号 8 6

配列番号 8 6	
ttattatcgcaaccgcaatcgggattttcgattcataaagcaggtcgtaggtcggcttgt	
tgagcaggtccttgacgctgaaaccgtccagatacgtgaaaaacgacttcattgcaccg	
ccgagtatgcccgctcagccggcaggacggcgtaatcaggcattcgttggtcgggccat	10
acactcgaccagctgcatcggttcgaggtggcggacgaccgcccgatattgatgcgtt	
cgggcggcgccgagcctcagcccggcctttcccgcgtacgctgtgcaagaaccg	
cctttgaccagcgcggttaaccactttcatcaaattggcttttggaaatgccgtaggtcga	
ggcgatggtggcgatattgaccagcgcgctcgtcgttgacggcgggtgtagatgaggacgc	
gcagcccgtagtcggtatggtgggtcagatacata acaacctccttagtacatgcaaaat	
tatttctagagcaacatacagaccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaag	
agttgagttgaggaattataacaggaagaaatattcctcatcagcttgtaattcctcta	
tggtgttgacaattaatcatcggctcgtataatgtataacattcataatgtgtgaatt	
ttaaactctagaaataatttgtttaactttaagaaggagataacataatgatcgtaaa	
acctatggtacgcaacaatatctgcctgaacgccatcctcagggctgcaagaaggag	
tggaagatcagattgaatataccaagaaacgcattaccgcagaagtcaaagctggcgca	20
aaagctccaaaaacgttctggtgcttggctgctcaaattggttacggcctggcgagccg	
cattactgctgcttccgatacggggctgcgaccatcggcgtgtcctttgaaaaagcgg	
gttcagaaaccaaataatggtacaccgggatggtacaataatggcatttgatgaagcg	
gcaaaacgcgaggggtctttatagcgtgacgatcgcggcgatgcgttttcagacgagat	
caaggcccaggttaattgaggaagccaaaaaaaaggatcaaatttgatctgatcgtat	
acagcttggccagcccagtagtactgatcctgatacaggtatcatgcacaaaagcgtt	
ttgaaaccctttgaaaaacgttcacaggcaaaacagtagatccgtttactggcgagct	
gaaggaaatctccgcggaaccagcaaatgacgaggaagcagccgccactgttaaagtta	
tgggggggtgaagattgggaacgttggattaagcagctgtcgaaggaaggcctcttagaa	
gaaggctgtattaccttggcctatagttatattggccctgaagctaccaagctttgta	
ccgtaaaggcacaatcggcaaggccaaagaacacctggaggccacagcacaccgtctca	30
acaaagagaaccgtaacatccgtgccttcgtgagcgtgaataaaggcctggtaaccgcg	
gcaagcgcgtaatcccggtaatccctctgtatctcgcagcttggtcaaagtaatgaa	
agagaagggcaatcatgaaggttgattgaacagatcacgcgtctgtacgccgagcgc	
tgtaccgtaaagatggtacaattccagttgatgaggaaaatcgcattcgcattgatgat	

【表 4 3 - 2】

```

tgggagttagaagaagacgtccagaaagcggatccgcgttgatggagaaagtcacggg
tgaaaacgcagaatctctcactgacttagcgggtaccgccatgatttcttagctagta
acggctttgatgtagaaggtattaattatgaagcgggaagttgaacgcttcgaccgtatc
tgataagaaggagatatacatatgagagaagtagtaattgccagtgagctagaacagc
agtaggaagtttggaggagcatttaaatcagtttcagcggtagagttaggggtaacag
cagctaaagaagctataaaaagagctaactccagatatgatagatgaatctctt
ttagggggagtaacttacagcaggtcttggacaaaatagcaagacaaatagcattagg
agcaggaataccagtagaaaaaccagctatgactataaatatagtttgtggttctggat
taagatctgtttcaatggcatctcaacttatagcattaggtgatgctgatataatgta
gttgggtggagctgaaaacatgagtagtctccttatttagtaccagtgcgagatgg
tgcaagaatgggtgatgctgcttttggttgattcaatgataaaagatggattatcgaca
tatttaataactatcacatgggtattactgctgaaaacatagcagagcaatggaatata
actagagaagaacaagatgaattagctcttgcaagtcaaaaataaagctgaaaagctca
agctgaaggaaaatttgatgaagaaatagttcctggttataaaaaggaagaaaaggtg
acactgtagtagataaagatgaatataattaagcctggcactacaatggagaaacttgct
aagttaagacctgcatttaaaaagatggaacagttactgctggtaatgcatcaggaat
aatgatggtgctgctatgtagtagtaatggcctaagaaaaagctgaagaactaggaa
tagagcctcttgcaactatagtttcttatggaacagctgggtggtgaccctaaaataatg
ggatatggaccagttccagcaactaaaaagccttagaagctgctaataatgactattga
agatatagatttagttgaagctaataaggcatttgctgcccaatctgtagctgtaataa
gagacttaaatatagatatgaataaagttaatgttaatgggtggagcaatagctatagga
catccaataggatgctcaggagcaagaatacttactacacttttatatgaaatgaagag
aagagatgctaaaactggcttgctacacttttgtagggcgggtggaatgggaactactt
taatagttaagagatagtaagaaggagatatacatatgaaattagctgtaataggttagt
ggaactatgggaagtgggtattgtacaaacttttgcaagttgtggacatgatgtatgttt
aaagagtagaactcaaggtgctatagataaatgttttagctttattagataaaaatttaa
ctaagttagttactaagggaaaaatggatgaagctacaaaagcagaaatattaagtcac
gttagttcaactactaattatgaagatttaaaagatatggatttaataatagaagcacc
tgtagaagacatgaatataaagaaagatgttttcaagttactagatgaattatgtaaag
aagatactatcttggcaacaaaacttcatcattatctataacagaaatagcttcttct
actaagcggccagataaaagttataggaatgcatttctttaatccagttcctatgatgaa
attagttgaagttataagtggtcagttaacatcaaaaagttacttttgatacagtatttg
aattatctaagagatcaataaagtagtagatgatctgaaatctcctggatttgta
gtaaatagaatacttatacctatgataaatgaagctggttggtatataatgcagatgggtg
tgcaagtaaaagaagaaatagatgaagctatgaaattaggagcaaaccatccaatgggac
cactagcattaggtgatttaacggattagatggtgttttagctataatgaacgtttta
tatactgaatttggagatactaaatatagacctcatccacttttagctaaaatgggttag
agctaatcaattaggaagaaaaactaagataggattctatgattataataaataaag
aaggagatatacatatgagtacaagtgatggttaaagtttatgagaatgtagctggtgaa
gtagatggaaatataatgtacagtgaaaatgaatagacctaaagccctaatgcaataaa
ttcaaagactttagaagaactttatgaagtatgttagatattaataatgatgaaacta
ttgatggtgtaatattgacaggggaaggaaaggcatttgtagctggagcagatattgca
tacatgaaagatttagatgctgtagctgctaaagatttttagtatcttaggagcaaaagc
ttttggagaaatagaaaatagtaaaaaagtagtgatagctgctgtaaaccggatttgctt
taggtggaggatgtgaacttgcaatggcatgtgatataagaattgcatctgctaaagct
aaatttggtcagccagaagtaactcttggaaataactccaggatatggaggaactcaaag
gcttacaagattggttggatggcaaaagcaaaagaattaatctttacaggtcaagtta
taaaagctgatgaagctgaaaaaatagggttagtaaatagagtggttgagccagacatt
ttaatagaagaagttgagaaatagctaagataatagctaaaaatgctcagcttgtagt
tagatactctaaagaagcaatacaacttgggtgctcaactgatataaataactggaatag

```

10

20

30

40

【表 4 3 - 3】

```

atatagaatctaattttatttgggtctttggttttttcaactaaagacccaaaaagaaggaatg
tcagcttttcggtgaaaagagagaagctaactttataaaagggttaataagaaggagatat
acatatgAGTCAGGCGCTAAAAAATTTACTGACATTGTTAAATCTGGAAAAAATTGAGG
AAGGACTCTTTTCGCGGCCAGAGTGAAGATTTAGGTTTACGCCAGGTGTTTGGCGGCCAG
GTCGTGGGTGAGGCCTTGTATGCTGCAAAAGAGACCGTCCCTGAAGAGCGGCTGGTACA
TTTCGTTTTCACAGCTACTTTCTTCGCCCTGGCGATAGTAAGAAGCCGATTATTTATGATG
TCGAAACGCTGCGTGACGGTAACAGCTTCAGCGCCCCGCCGGGTTGCTGCTATTCAAAAC
GGCAAACCGATTTTTTTATATGACTGCCTCTTTCCAGGCACCAGAAGCGGGTTTCGAACA
TCAAAAAACAATGCCGTCCGCGCCAGCGCCTGATGGCCTCCCTTCGAAACGCAAATCG
CCCAATCGCTGGCGCACCTGCTGCCGCCAGTGCTGAAAGATAAATTCATCTGCGATCGT
CCGCTGGAAGTCCGTCCGGTGGAGTTTCATAACCCACTGAAAGGTCACGTGCGAGAACC
ACATCGTCAGGTGTGGATCCGCGCAAATGGTAGCGTGCCGGATGACCTGCGCGTTCATC
AGTATCTGCTCGGTTACGCTTCTGATCTTAACTTCCTGCCGGTAGCTCTACAGCCGCAC
GGCATCGGTTTTCTCGAACCGGGGATTCAGATTGCCACCATTGACCATTCCATGTGGTT
CCATCGCCCGTTTAATTTGAATGAATGGCTGCTGTATAGCGTGGAGAGCACCTCGGCGT
CCAGCGCACGTGGCTTTGTGCGCGGTGAGTTTATAACCAAGACGGCGTACTGGTTGCC
TCGACCGTTCAGGAAGGGGTGATGCGTAATCACAATtaa

```

10

20

【実施例 3 3】

【0 5 6 7】

t e t 誘導性プロモーター用いる酪酸を過剰産生するためのベクターの構築

大腸菌ニッスルにおける酪酸の誘導性産生を促進するために、ペプトクロストリジウム・ディフィシルに由来する酪酸産生経路の 8 つの遺伝子 (b c d、e t f B、e t f A、t h i A、h b d、c r t、b p t および b u k ; N C B I)、ならびに転写および翻訳エレメントを合成し (G e n、C a m b r i d g e、M A)、ベクター p B R にクローニングし、p L o g i c を作製した。合成されたとき、遺伝子を、t e t 誘導性合成酪酸オペロンから分岐した、構成的に発現する t e t リプレッサー (t e t R) を含む、テトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下においた。酪酸遺伝子の効率的な翻訳のために、オペロンにおける各合成遺伝子を、T プロモーターに由来する塩基対リボソーム結合部位によって分離させた。

30

【0 5 6 8】

b c d - e t f A - e t f B の遺伝子産物は、クロトニル - C o A をブチリル - C o A に変換する複合体を形成し、共酸化剤として酸素に対する依存性を示し得る。有効なプロバイオティクは酸素制限環境 (例えば、哺乳動物消化管) で機能することができるため、またトレポネーマ・デンティコラの単一遺伝子がこの 3 遺伝子複合体を酸素非依存的に機能的に置換することができる (トランス - エノイル - C o A レダクターゼ ; t e r) ことが示されたので、我々は、大腸菌において酪酸の産生の能力のある第 2 のプラスミドを作製した。逆 P C R を用いて、b c d - e t f A - e t f B 領域の外側の p L o g i c の全配列を増幅した。t e r 遺伝子を I n t e g r a t e d D N A T e c h n o l o g i e s オンラインコドン最適化ツール (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>) を用いて大腸菌コドン使用のためにコドン最適化し、合成し (G e n e w i z、C a m b r i d g e、M A)、G i b s o n アセンブリを用いてこの逆 P C R 断片にクローニングして、p L o g i c を作製した。

40

【実施例 3 4】

【0 5 6 9】

大腸菌の形質転換

50

各プラスミドを大腸菌ニッスルまたは大腸菌DH5aに形質転換する。すべての管、溶液およびキュベットを4℃に予冷する。大腸菌ニッスルまたは大腸菌DH5aの一夜培養を5mLの溶原培地(LB)で1:100に希釈し、0.4~0.6のOD600に達するまで増殖させる。細胞培養培地は、選択マーカー、例えば、プラスミドに適するアンピシリンを含む。次いで大腸菌を4℃で2,000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を1mLの4℃水に再懸濁する。大腸菌を再び4℃で2,000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を0.5mLの4℃水に再懸濁する。大腸菌を再び4℃で2,000rpmで5分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を最後に0.1mLの4℃水に再懸濁する。エレクトロポレーターを2.5kVに設定する。0.5μgの上記のプラスミドの1つを細胞に加え、ピペティングにより混合し、滅菌済み冷却キュベットにピペティングする。乾燥キュベットを試料チャンバーに入れ、電気パルスを印加する。1mLの室温SOC培地を直ちにに加え、混合物を培養管に移し、37℃で1時間インキュベートする。細胞をアンピシリンを含むLBプレート上に広げ、一夜インキュベートする。

10

【0570】

代替実施形態では、酪酸カセットを相同的組換えによりニッスルゲノムに挿入することができる(Genewiz, Cambridge, MA)。構築物およびヌクレオチド配列の構成を本明細書に示す。合成酪酸カセット構築物を染色体に組み込むことができるベクターを作製するために、まず、Gibsonアセンブリを用いて、ニッスルlacZ遺伝子座に相同のDNAの1000bp配列をR6K起源プラスミドpKD3に加えた。これは、ニッスルゲノムにおけるlacZ遺伝子座に組み込まれるこれらの相同性アーム間にクローニングされるDNAを標的とする。Gibsonアセンブリを用いて、これらのアーム間の断片をクローニングした。PCRを用いて、相同性アームの全配列、ならびにそれらの間の酪酸カセットを含むこのプラスミドの領域を増幅する。このPCR断片を用いて、ラムダレドレコンピナーゼ遺伝子をコードする温度感受性プラスミドを含む菌株である、エレクトロコンピテントニッスル-pKD46を形質転換する。形質転換後、20μg/mLのクロラムフェニコール上で37℃で平板培養する前に細胞を2時間増殖させた。37℃での増殖もpKD46プラスミドを治癒させる。カセットを含む形質転換細胞は、クロラムフェニコール耐性であり、lacマイナス(lac-)である。

20

[実施例35]

30

【0571】

組換え大腸菌における酪酸の産生

酪酸産生に対する酸素の影響を判断するために、上述の酪酸カセットを含む大腸菌ニッスルにおける酪酸の産生を評価する。すべてのインキュベーションを37℃で実施する。酪酸カセットで形質転換した大腸菌菌株DH5aおよびニッスルの培養をLB中で一夜増殖させ、4mLの0.5%グルコース含有M9最少培地で1:200に希釈する。細胞を振盪(250rpm)しながら4~6時間増殖させ、Coy嫌気性チャンバー(90%N₂、5%CO₂、5%H₂を供給)中で好氣的または嫌氣的にインキュベートする。1mLの培養アリコートを用いて1.5mL栓付き管に入れて用意し、培養の曝気を制限するために静的インキュベーター中でインキュベートする。1本の管を各時点(0、1、2、4および20時間)に除去し、LC-MSにより酪酸濃度について分析して、これらの組換え菌株における酪酸産生を低酸素環境で達成することができることを確認する。

40

[実施例36]

【0572】

組換え大腸菌における酪酸の産生

酪酸産生に対する酸素の影響を判断するために、上述の酪酸カセットを含む大腸菌ニッスルにおける酪酸の産生を評価する。すべてのインキュベーションを37℃で実施する。酪酸カセットで形質転換した大腸菌菌株DH5aおよびニッスルの培養をLB中で一夜増殖させ、4mLの0.5%グルコース含有M9最少培地で1:200に希釈する。細胞を振盪(250rpm)しながら4~6時間増殖させ、Coy嫌気性チャンバー(90%N

50

2 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $5\% \text{H}_2$ を供給)中で好氣的または嫌氣的にインキュベートする。1 mLの培養アリコート(1.5 mL栓付き管)に入れて用意し、培養の曝氣を制限するために靜的インキュベーター中でインキュベートする。1本の管を各時点(0、1、2、4および20時間)に除去し、LC-MSにより酪酸濃度について分析して、これらの組換え菌株における酪酸産生を低酸素環境で達成することができることを確認する。

[実施例37]

【0573】

tet誘導性プロモーターを用いた組換え大腸菌における酪酸の産生

図48にtet誘導性プロモーターの制御下の上述の酪酸カセットを示す。下文の実施例40で述べる方法を用いて酪酸の産生を評価する。試験したtet誘導性カセットは、(1)8遺伝子すべてを含むtet-酪酸カセット(pLOGIC031);(2)terが置換されているtet-酪酸カセット(pLOGIC046)ならびに(3)tesBがpbtおよびbuk遺伝子の代わりに置換されているtet-酪酸カセットを含む。図51Aに酪酸産生の有意な差がない、酸素の存在下および非存在下でのpLOGIC031およびpLOGIC046菌株における酪酸産生を示す。酪酸産生の増大が、最終2遺伝子(pbt-buk)の欠失および内因性大腸菌tesB遺伝子(ブチリルCoAから酪酸部分を切り離すチオエステラーゼ)によるそれらの置換を含むpLOGIC046を発現する低コピープラスミドにおけるニッスルで示された。

10

【0574】

細胞の一夜培養をLbで1:100に希釈し、初期対数期に達するまで1.5時間増殖させ、その時点に無水tetを100 ng/mLの最終濃度で加えて、プラスミドの発現を誘導した。2時間の誘導後、細胞を洗浄し、0.5%グルコースを含むM9最少培地にOD600=0.5で再懸濁した。試料を表示時間に除去し、細胞を遠沈した。上清をLC-MSを用いて酪酸の産生について試験した。図51Bにter置換(pLOGIC046)またはtesB置換(pbt-buk欠失)を有するtet-酪酸カセットを含む菌株における酪酸の産生を示すが、tesB置換菌株がより大きい酪酸産生を有することが実証された。

20

【0575】

図52に一般的クローニング菌株であり、大腸菌突然変異体のKEIO集合のバックグラウンドである、大腸菌のBW25113菌株を示す。NuoB欠失を有するNuoB突然変異体を得られた。NuoBは、呼吸成長時(電子伝達を必要とする成長の形)のNADHの酸化に關与するタンパク質複合体である。NADH酸化の電子伝達へのカップリングを妨げることにより、酪酸産生を維持するために用いられるNADHの量が増加する。図52に野生型ニッスルと比較して、NuoBの欠失が酪酸のより多くの産生をもたらすことを示す。

30

【0576】

【表 4 4 - 1】

表 4 2. p L O G I C 0 4 6 - t e s B - 酪 酸

p L O G I C 0 4 6 - t e s B - 酪 酸 : 配 列 番 号 8 7

<p>gtaaaacgacggccagtgaattcgttaagaccactttcacatttaagtgttttctc atccgcataatgatcaattcaaggccgaataagaaggctggctctgcaccttggatca aataattcgatagcttgtcgtataaatggcggcactatcagtagtaggtgttccct ttcttcttagcgcacttgatgctcttgatcttccaatacgcacctaagtaaaatgcc ccacagcgtgagtgcatataatgcattctctagtgaaaaaccttgttggcataaaaag gctaattgattttcgagagtttcatactgtttttctgtaggccgtgtacctaataatgtac tttgctccatcgcgatgacttagtaaaagcacatctaaaacttttagcgttattacgta aaaaatcttgccagctttccccttctaaagggcaaaaagtgagtatgggtgcctatctaac atctcaatggctaaggcgtcgagcaaagcccgttattttttacatgccaatacaatgt aggctgctctacacctagcttctggggcagtttacgggttgtaaaccttcgattccga cctcattaagcagctctaatagcgctgttaatcactttacttttatctaacttagacatc attaattcctaattttgttgacactctatcattgatagagttatttaccactcccta tcagtgatagagaaaagtgaactctagaaataatttgtttaactttaagaaggagata tacatatgatcgtaaaacctatggtacgcaacaatatctgcctgaacgccatcctcag ggctgcaagaagggagtggaagatcagattgaatataccaagaaacgcattaccgcaga agtcaaagctggcgcaaaagctccaaaaaacgttctgggtgcttggctgctcaaatggtt acggcctggcgagccgcattactgctgcttcggataggggctgcgaccatcggcgtg tcctttgaaaaagcgggttcagaaaccaaatatggtacaccgggatggtacaataattt ggcatttgatgaagcggcaaaaacgcgagggcttttatagcgtgacgatcagcggcgatg cgttttcagacgagatcaaggcccaggtaattgaggaagccaaaaaaaaggatcaaa tttgatctgatcgtatacagcttggccagcccagtagctactgatcctgatacaggtat catgcacaaaagcgttttgaaaccctttgaaaaacgttcacaggcaaaaacagtagatc cgtttactggcgagctgaaggaaatctccgcggaaccagcaaatgacgaggaagcagcc gccactgttaaagttatggggggtgaagattgggaacgttggattaagcagctgtcgaa ggaaggcctcttagaagaaggctgtattaccttggcctatagttatattggccctgaag ctaccaagctttgtaccgtaaaggcacaatcggcaaggccaaagaacacctggaggcc acagcacaccgtctcaacaaagagaaccctcaatccgtgccttcgtgagcgtgaataa aggcctggtaaccgcgcaagcgcgtaatcccggtaatccctctgtatctcggcagct tgttcaaagtaatgaaagagaagggaatcatgaaggttgattgaacagatcacgcgt ctgtacgccgagcgcctgtaccgtaaagatggtacaattccagttgatgaggaaaatcg cattcgcattgatgattgggagttagaagaagacgtccagaaagcggatccgcgttga tgagaaaagtcacgggtgaaaacgcagaatctctcactgacttagcggggtaccgccat gatttcttagctagtaacggctttgatgtagaaggatattaattatgaagcgggaagtga acgcttcgaccgtatctgataagaaggagatatacatatgagagaagtagtaattgcca gtgcagctagaacagcagtaggaagttttggaggagcatttaaatcagtttcagcggta gagttaggggtaacagcagctaaagaagctataaaaagagctaacataactccagatat gatagatgaatctcttttagggggagtacttacagcaggtcttggacaaaatatagcaa gacaaatagcattaggagcaggaataaccagtagaaaaaccagctatgactataaatata</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------

【表 4 4 - 2】

gtttgtggttctggattaagatctgtttcaatggcatctcaacttatagcattagggtga
 tgctgatataatgttagttggaggctgaaaacatgagtatgtctccttatttagtac
 caagtgcgagatatggtgcaagaatgggtgatgctgcttttgattcaatgataaaa
 gatggattatcagacataatataactatcacatgggtattactgctgaaaacatagc
 agagcaatggaatataactagagaagaacaagatgaattagctcttgcaagtcaaaata
 aagctgaaaaagctcaagctgaaggaaaatttgatgaagaaatagttcctggtgttata
 aaaggaagaaaaggtgacactgtagtagataaagatgaatatattaagcctggcactac
 aatggagaaaacttgctaagttaagacctgcatttaaaaaagatggaacagttactgctg
 gtaatgcatcaggaataaatgatgggtgctgctatgtagtagtaatggcctaagaaaaa
 gctgaagaactaggaatagagcctcttgcaactatagtttcttatggaacagctgggtg
 tgacctaaaataatgggatatggaccagttccagcaactaaaaaagctttagaagctg
 ctaatatgactattgaagatatagatttagttgaagctaagaggcatttgctgccc
 tctgtagctgtaataagagacttaaatatagatatgaataaagttaatgtaatgggtg
 agcaatagctataggacatccaataggatgctcaggagcaagaatacttactacacttt
 tataatgaaatgaagagaagagatgctaaaactggctctgctacactttgtataggcgt
 ggaatgggaactactttaatagttgaagatagtaagaaggagatatacatatgaaatt
 agctgtaataggtagtggaaactatgggaagtggattgtacaaacttttgcaagttgtg
 gacatgatgatgtttaagagtagaactcaaggtgctatagataaatgttagcttta
 ttagataaaaatttaactaagtttagttactaagggaaaaatggatgaagctacaaaagc
 agaaatattaagtcagttagttcaactactaattatgaagatttaaaagataggatt
 taataatagaagcatctgtagaagacatgaatataaagaaagatgttttcaagttacta
 gatgaattatgtaagaagatactatcttggaacaaatacttcatcattatctataac
 agaaatagcttcttactaagcgccagataaagttataggaatgcatttctttaatc
 cagttcctatgatgaaatagttgaagttataagtggtcagttaacatcaaaagttact
 tttgatacagtatttgaattatctaagagtatcaataaagtaccagtagatgatctga
 atctcctggattttagtagtaaatagaactttatacctatgataaatgaagctgttggt
 tataatgcagatgggtgttgcaagtaagaagaaatagatgaagctatgaaataggagca
 aacctccaatgggaccactagcattaggtgatttaatcggattagatggtgttttagc
 tataatgaacgttttatatactgaatttggagatactaaatatagacctcatccacttt
 tagctaaaatggttagagctaatcaatagggaagaaaactaagataggattctatgat
 tataataaataataagaaggagatatacatatgagtacaagtgatgttaaagttatga
 gaatgtagctgttgaaagtagatggaaatataatgtacagtgaaaatgaatagacctaaag
 cccttaatgcaataaattcaaagactttagaagaactttatgaagattttgtagatatt
 aataatgatgaaactattgatgttgtaatatgtacaggggaaggaaaggcattttagc
 tggagcagatattgcatacatgaaagatttagatgctgtagctgctaaagattttagta
 tcttaggagcaaaagcttttgagaaatagaaaatagtaaaaaagtagttagctgct
 gtaaaccgatttggcttttaggtggaggatgtgaacttgcaatggcatgtgatataagaat
 tgcacatctgctaaagctaaatttggcagccagaagtaactcttggaataactccaggat
 atggaggaactcaaaggcttacaagattgggttggaatggcaaaagcaaaagaattaatc
 tttacaggtcaagttataaaagctgatgaagctgaaaaaatagggttagtaaatagagt
 cgttgagccagacattttaatagaagaagttgagaaattagctaagataatagctaaaa
 atgctcagcttgacagtttagatactctaaagaagcaatacaacttggtgctcaactgat
 ataaatactggaatagatatagaatctaatttatttggctcttggttttcaactaaaga
 ccaaaaagaaggatgtcagctttcgttgaaaagagagaagctaactttataaaaggt
 aataagaaggagatatacatatgAGTCAGGCGCTAAAAAATTTACTGACATTGTTAAAT
 CTGGAAAAAATTGAGGAAGGACTCTTTCGCGGCCAGAGTGAAGATTTAGGTTTACGCCA
 GGTGTTTGGCGGCCAGGTTCGTGGGTTCAGGCCTTGTATGCTGCAAAAGAGACCGTCCCTG
 AAGAGCGGCTGGTACATTCGTTTCACAGCTACTTCTTCGCCCTGGCGATAGTAAGAAG
 CCGATTATTTATGATGTCGAAACGCTGCGTGACGGTAACAGCTTCAGCGCCCGCCGGGT
 TGCTGCTATTCAAACGGCAAACCGATTTTTTATATGACTGCCTCTTTCAGGCACCAG

10

20

30

40

【表 4 4 - 3】

```
AAGCGGGTTTCGAACATCAAAAAACAATGCCGTCCGCGCCAGCGCCTGATGGCCTCCCT
TCGGAAACGCAAAATCGCCCAATCGCTGGCGCACCTGCTGCCGCCAGTGCTGAAAGATAA
ATTCATCTGCGATCGTCCGCTGGAAGTCCGTCCGGTGGAGTTTCATAACCCACTGAAAG
GTCACGTTCGAGAACCACATCGTCAGGTGTGGATCCGCGCAAATGGTAGCGTGCCGGAT
GACCTGCGCGTTCATCAGTATCTGCTCGGTTACGCTTCTGATCTTAACTTCCTGCCGGT
AGCTCTACAGCCGCACGGCATCGGTTTTCTCGAACCAGGGGATTTCAGATTGCCACCATTG
ACCATTCCATGTGGTTCCATCGCCCGTTAATTTGAATGAATGGCTGCTGTATAGCGTG
GAGAGCACCTCGGCGTCCAGCGCACGTGGCTTTGTGCGCGGTGAGTTTTATACCCAAGA
CGGCGTACTGGTTGCCTCGACCGTTTCAGGAAGGGGTGATGCGTAATCACAATtaa
```

10

[実施例 3 8]

【0577】

組換え大腸菌における酪酸の産生

酪酸産生に対する酸素の影響を判断するために、上述の酪酸カセットを含む大腸菌ニッスルにおける酪酸の産生を評価する。すべてのインキュベーションを 37 で実施する。酪酸カセットで形質転換した大腸菌菌株 DH5a およびニッスルの培養を LB 中で一夜増殖させ、4 mL の 0.5% グルコース含有 M9 最少培地で 1:200 に希釈する。細胞を振盪 (250 rpm) しながら 4~6 時間増殖させ、Coy 嫌気性チャンバー (90% N₂、5% CO₂、5% H₂ を供給) 中で好氣的または嫌氣的にインキュベートする。1 mL の培養アリコート を 1.5 mL 栓付き管に入れて用意し、培養の曝気を制限するために静的インキュベーター中でインキュベートする。1本の管を各時点 (0、1、2、4 および 20 時間) に除去し、LC-MS により酪酸濃度について分析して、これらの組換え菌株における酪酸産生を低酸素環境で達成することができることを確認する。

20

【0578】

代替実施形態では、一夜細菌培養を新鮮な LB で 1:100 に希釈し、1.5 時間増殖させて、初期対数期に入ることを可能にした。この時点で、長半減期酸化窒素ドナー (DET A-NO; ジエチレントリアミン-酸化窒素付加体) を 0.3 mM の最終濃度で培養に加えて、プラスミドからの発現を誘導した。2 時間の誘導後、細胞を遠沈し、上清を捨て、細胞を 0.5% グルコースを含む M9 最少培地に再懸濁した。次いで培養上清を表示時点に分析して、酪酸の産生のレベルを評価した。(pLogic031-nsrR-norB-酪酸オペロン構築物; SYN-UCD507) または (pLogic046-nsrR-norB-酪酸オペロン構築物; SYN-UCD508) を含む遺伝子操作ニッスルは、野生型ニッスルと比較して有意に多くの酪酸を産生する。

30

【0579】

pbt および buk 遺伝子がテトラサイクリンプロモーターの制御下に発現する tesB (配列番号 48) で置換されている酪酸遺伝子カセット (pLOGIC046-tesB-酪酸; 配列番号 88) を含む遺伝子操作ニッスルを作製した。配列番号 88 は、tetR リプレッサーの逆方向相補体 (下線付き)、tetR ならびに酪酸オペロンおよびそれらのそれぞれの RBS を制御する多様なプロモーターを含む遺伝子間領域 (太字)、ならびに RBS により分離された酪酸遺伝子 (ter-thiA1-hbd-crt2-tesB) を含む。

40

【0580】

【表 4 5 - 1】

表 4 3. p L O G I C 0 4 6 - t e s B - 酪酸配列

配列番号 8 8	
gtaaacgacggccagtgaattcgttaagaccactttcacatttaagttgtttttcta	
atccgcatatgatcaattcaaggccgaataagaaggctggctctgcaccttggatca	
aataattcgatagcttgtcgttaataatggcggcatactatcagtagtaggtgtttccct	
ttcttcttttagcgacttgatgctcttgatcttccaatacgcaacctaaagtaaaatgcc	10
ccacagcgctgagtgcatataatgcattctctagtgaaaaaccttggtggcataaaaag	
gctaattgattttcgagagtttcatactgtttttctgtaggccgtgtacctaaatgtac	
ttttgctccatcgcgatgacttagtaagcacatctaaaacttttagcgttattacgta	
aaaaatcttgccagctttccccttctaaagggcaaaagtgagtatggtgcctatctaac	
atctcaatggctaaggcgctcgagcaaagcccgcttattttttacatgccaatacaatgt	
aggctgctctacacctagcttctggcgagtttacgggttggttaaaccttcgattccga	
cctcattaagcagctctaatacgcgctgttaatcactttacttttatctaactagacatc	
attaattcctaatttttgttgacactctatcattgatagagttattttaccactcccta	
tcagtgatagagaaaagtgaactctagaaaataatttgtttaactttaagaaggagata	
tacatatgatcgtaaaacctatggtacgcaacaatatctgcctgaacgcccatcctcag	
ggctgcaagaaggagtggaagatcagattgaatataccaagaacgcattaccgcaga	20
agtcaaagctggcgcaaaagctccaaaaacggttctggtgcttggctgctcaaattggtt	
acggcctggcgagccgcattactgctgcttcggataggggctgcgaccatcggcgtg	
tcctttgaaaaagcgggttcagaaaccaaataatggtacaccgggatggtacaataattt	
ggcatttgatgaagcggcaaaacgcgagggcttttatagcgtgacgatcgacggcgatg	
cgttttcagacgagatcaaggccaggttaattgaggaagccaaaaaaaaaggatcaaa	
tttgatctgatcgtatacagcttggccagcccagtagctactgatcctgatacaggtat	
catgcacaaaagcgttttgaaaccctttggaaaaacgttcacaggcaaaacagtagatc	
cgtttactggcgagctgaaggaaatctccgcggaaccagcaaatgacgaggaagcagcc	
gccactgttaaagttatggggggtgaagattgggaacgttggattaagcagctgtcgaa	
ggaaggcctcttagaagaaggctgtattaccttggcctatagttatattggccctgaag	
ctaccaagctttgtaccgtaaaggcacaatcggcaaggccaaagaacacctggaggcc	30
acagcacaccgtctcaacaaagagaacccgtcaatccgtgccttcgtgagcgtgaataa	
aggcctggtaaccgcgcaagcgcgtaatcccggtaatccctctgtatctcgccagct	
tgttcaaagtaatgaaagagaagggaatcatgaaggttgattgaacagatcacgcgt	
ctgtacgccgagcgctgtaccgtaaagatggtacaattccagttgatgaggaaaatcg	

【表 4 5 - 2】

```

cattcgcattgatgattgggagttagaagaagacgtccagaaagcggatccgcggtga
tggagaaagtcacgggtgaaaacgcagaatctctcactgacttagcgggtaccgccat
gatttcttagctagtaacggccttgatgtagaaggtattaattatgaagcggaggtga
acgcttcgaccgtatctgataagaaggagatatacatatgagagaagtagtaattgcca
gtgcagctagaacagcagtaggaagttttggaggagcatttaaatcagtttcagcggta
gagttaggggtaacagcagctaaagaagctataaaaagagctaacataactccagatat
gatagatgaatctcttttaggggagtagcttacagcaggtcttgacaaaatatagcaa
gacaaatagcattaggagcaggaataccagtagaaaaaccagctatgactataaatata
gtttgtggttctggattaagatctgtttcaatggcatctcaacttatagcattagggtga
tgctgatataatgtagttggtggagctgaaaacatgagtatgtctccttatttagtac
caagtgcgagatatggtgcaagaatgggtgatgctgcttttggtgattcaatgataaaa
gatggattatcagacataathtaataactatcacatgggtattactgctgaaaacatagc
agagcaatggaatataactagagaagaacaagatgaattagctcttgcaagtcaaaata
aagctgaaaaagctcaagctgaaggaaaatttgatgaagaaatagttcctgtttgtata
aaaggaagaaaaggtgacactgtagtagataaagatgaatatattaagcctggcactac
aatggagaaaacttgctaagttaagacctgcatttaaaaaagatggaacagttactgctg
gtaatgcatcaggaataaatgatgggtgctatggttagtagtaaatggctaagaaaaa
gctgaagaactaggaatagagcctcttgcaactatagtttcttatggaacagctgggtg
tgaccctaaaaatgggatatggaccagttccagcaactaaaaaagctttagaagctg
ctaatatgactattgaagatatagatttagttgaagctaattgaggcatttgctgcccaa
tctgtagctgtaataagagacttaaatatagatatgaataaagttaatgttaatgggtgg
agcaatagctataggacatccaataggatgctcaggagcaagaataacttactacacttt
tatatgaaatgaagagaagagatgctaaaactggtcttgctacactttgtataggcgg
ggaatgggaactactttaatagtttaagagatagtaagaaggagatatacatatgaaatt
agctgtaataggtagtggaactatgggaagtggtattgtacaaaacttttgcaagttgtg
gacatgatgatgttttaagagtagaactcaaggtgctatagataaatgtttagcttta
ttagataaaaaathtaactaagtttagttactaagggaaaaaatggatgaagctacaaaagc
agaaatattaagtcattgtagttcaactactaattatgaagatttaaaagatatggatt
taataatagaagcatctgtagaagacatgaatataaagaaagatgttttcaagttacta
gatgaattatgtaagaagatactatcttggaacaaaataacttcatcattatctataac
agaaatagcttcttctactaagcgcagataaaagttataggaatgcatttctttaatc
cagttcctatgatgaaattagttgaagttataagtggtcagttacatcaaaagttact
tttgatacagtatttgaattatctaagagatcaataaagtaccagtagatgtatctga
atctcctggatttgtagtaaatagaatacttatacctatgataaatgaagctggttggt
tatatgcagatgggtggtgcaagtaagaagaaatagatgaagctatgaaattaggagca
aaccatccaatgggaccactagcattaggtgatttaatcggattagatggtggttttagc
tataatgaacgttttatatactgaatttgagataactaaatatagacctcatccacttt
tagctaaaatggtttagagctaatcaattaggaagaaaaactaagataggattctatgat
tataataaataataagaaggagatatacatatgagtacaagtgatgttaaagtttatga
gaatgtagctggtgaagtagatggaaatataatgtacagtgaaaatgaatagacctaaag
cccttaatgcaataaattcaaagactttagaagaactttatgaagtatttgtagatatt
aataatgatgaaactattgatggtgtaatatgtacaggggaaggaaaggcatttgtagc
tggagcagatattgcatacatgaaagatttagatgctgtagctgctaaagatttttagta
tcttaggagcaaaaagcttttgagaaaatagaaaatagtaaaaaagtagtgatagctgct
gtaaaccgatttgcttttaggtggaggatgtgaaacttgcaatggcatgtgatataagaat
tgcatctgctaaagctaaaattgggtcagccagaagtaactcttggaataactccaggat
atggaggaactcaaaggcttacaagattgggttggaatggcaaaaagcaaaagaattaatc
tttacaggtcaagttataaaagctgatgaagctgaaaaaatagggctagtaaatagagt
cgttgagccagacattttaatagaagaagttgagaaattagctaagataatagctaaaa
atgctcagcttgtagtagatacttaagaagcaatacaacttggtgctcaactgat

```

10

20

30

40

【表 4 5 - 3】

```

ataaatactggaatagatatagaatctaatttatttgggtctttgtttttcaactaaaga
ccaaaaagaaggaatgtcagcttttcggtgaaaagagagaagctaactttataaaaggt
aataagaaggagatatacatatgAGTCAGGCGCTAAAAAATTTACTGACATTGTTAAAT
CTGGAAAAAATTGAGGAAGGACTCTTTCGCGGCCAGAGTGAAGATTTAGGTTTACGCCA
GGTGTGTTGGCGGCCAGGTCGTGGGTGAGGCCTTGTATGCTGCAAAAAGAGACCGTCCCTG
AAGAGCGGCTGGTACATTTCGTTTTACAGCTACTTTCTTCGCCCTGGCGATAGTAAGAAG
CCGATTATTTATGATGTCGAAACGCTGCGTGACGGTAACAGCTTCAGCGCCCGCCGGGT
TGCTGCTATTCAAACGGCAAACCGATTTTTTATATGACTGCCTCTTTCCAGGCACCAG
AAGCGGGTTTTCGAACATCAAAAAACAATGCCGTCCGCGCCAGCGCTGATGGCCTCCCT
TCGGAAACGCAAATCGCCCAATCGCTGGCGCACCTGCTGCCGCCAGTCTGAAAGATAA
ATTCATCTGCGATCGTCCGCTGGAAGTCCGTCCGGTGGAGTTTCATAACCCACTGAAAG
GTCACGTCGCAGAACCACATCGTCAGGTGTGGATCCGCGCAAATGGTAGCGTGCCGGAT
GACCTGCGCGTTCATCAGTATCTGCTCGGTTACGCTTCTGATCTTAACCTCCTGCCGGT
AGCTCTACAGCCGCACGGCATCGGTTTTCTCGAACCGGGGATTGAGATTGCCACCATTG
ACCATTCCATGTGGTTCATCGCCCGTTTTAATTTGAATGAATGGCTGCTGTATAGCGTG
GAGAGCACCTCGGCGTCCAGCGCACGTGGCTTTGTGCGCGGTGAGTTTTATACCCAAGA
CGGCGTACTGGTTGCCTCGACCGTTCAGGAAGGGGTGATGCGTAATCACAATtaa

```

10

20

【 0 5 8 1】

一夜細菌培養を新鮮なLBで1:100に希釈し、1.5時間増殖させて、初期対数期に入ることを可能にした。この時点で、無水テトラサイクリン(ATC)を100ng/mlの最終濃度で培養に加えて、プラスミドからの酪酸遺伝子の発現を誘導した。2時間の誘導後、細胞を遠沈し、上清を捨て、細胞を0.5%グルコースを含むM9最少培地に再懸濁した。次いで培養上清を表示時点に分析して、酪酸の産生のレベルを評価した。pbtおよびbukのtesBによる置換が、より大きいレベルの酪酸産生をもたらす。

【 0 5 8 2】

図53Cにグルコースおよび酸素の存在下/非存在下でのFNR-酪酸カセットsyn363(ter置換を有する)を含む菌株における酪酸産生を示す。図53Cは、細菌がFNRプロモーターからの酪酸産生のためにグルコースおよび嫌気的条件下の両方を必要とすることを示している。細胞は、グルコース不含有培地(LB)中または0.5%グルコース含有培地(RMC)中で好氣的または嫌氣的に増殖させた。培養試料を表示時点に採取し、上清の一部をLC-MSを用いて酪酸濃度について評価した。これらのデータから、SYN363が酪酸の産生のためにグルコースを必要とし、グルコースの存在下では、嫌気性FNR調節ydfZプロモーターの制御下にある場合、嫌気的条件下で酪酸の産生を増大させることができることがわかる。

[実施例39]

【 0 5 8 3】

アンモニア代謝および酪酸産生回路を含む細菌菌株の*in vitro*活性

アンモニアの取込みおよびアルギニンへの変換ならびに酪酸の産生を1つの菌株において達成することができるかどうかを判断するために、酪酸産生カセット構築物を含むプラスミド(Logic156)を最初の概念実証実験に用いた。以下の菌株をプラスミドを用いて作製した: SYN-UCD501(Logic156(pSC101 PydfZ-ter酪酸プラスミド; am耐性)を含む); およびSYN-UCD-305であり、Logic156をさらに含むSYN-UCD601(すなわち、SYN-UCD601は、ArgR、maleK遺伝子座において染色体に組み込まれたPfnrS-ArgAfbR、ThyAおよびLogic156(pSC101 PydfZ-ter酪酸

30

40

50

プラスミド；amp耐性）を含む）。酪酸のみの産生菌SYN-UCD501、アルギニンのみの産生菌SYN-UCD305および複合酪酸/アルギニン産生菌SYN-UCD-601の間でアルギニンおよび酪酸の産生を比較した。用いた酪酸カセットの配列を表38に示す。

【0584】

手短に述べると、凍結グリセロールストックからの細菌を含む3mlのLB（選択的抗生物質（SYN-UCD501およびSYN-UCD601についてAmp）ならびにSYN-UCD305およびSYN-UCD601について3mMチミジンを含む）。細菌を振盪しながら37℃で一夜増殖させた。一夜培養を125mlのバッフル付きフラスコ中で10mlのLB（上記のように必要な場合、抗生物質およびチミジンを含む）に1：100の希釈度で希釈した。培養を振盪しながら37℃で好氣的に約1.5時間増殖させ、次いで37℃の嫌氣的チャンバーに4時間移した。細菌（ 2×10^8 CFU）を小遠心管中50mM MOPSを0.5%グルコースとともに含む1mlのM9培地に加えた。細胞を平板培養して、細胞数を測定した。アッセイ管を37℃の嫌氣性チャンバーに入れた。表示時間（1、2、24時間）に、120μlの細胞を除去し、14,000rpmで1分間ペレット化し、100μlの上清を96ウエルアッセイプレートに移し、アルミニウムフイルで密封し、アルギニンおよび酪酸濃度のLC-MS（実施例13および実施例40で述べる）による分析時まで-80℃で保存した。

10

【0585】

結果を図53Aおよび図53Bに示す。SYN-UCD601は、*in vitro*でSYN-UCD305と同様のレベルのアルギニンを、SYN-UCD501と同様のレベルの酪酸を産生することができることが示されている。

20

【0586】

【表 4 6 - 1】

表 4 4 . 酪酸カセット配列

説明	配列	配列番号
ydfZ +RBS (RBSは太字である)	CATTTCTCTCATCCCATCCGGGGTGAGAGTCTTTTC CCCCGACTTATGGCTCATGCATGCATCAAAAAAGATG TGAGCTTGATCAAAAACAAAAAATTTTCACTCGACA GGAGTATTTATATTGCGCCCGGATCCCTCTAGAAATA ATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT	配列番号 89
Ter (ポリヌクレオチド配列)	atgatcgtaaacctatggtacgcaacaatatctgctgaacgccatcctca gggctgcaagaagggagtggaagatcagattgaatataccaagaaacgca ttaccgcagaagtcaaagctggcgcaaaagctccaaaaacgttctggtgctt ggctgctcaaatggttacggcctggcgagccgactactgctgcttggatac ggggctgcgacctcggcgtgctcttgaaaaagcgggtcagaaaccaaat atggtacaccgggatggtacaataattggcattgatgaagcggcaaacgc gagggtcttatagcgtgacgatcgacggcgatgcgtttcagacgagatcaa ggcccaggtaattgaggaagccaaaaaaaaggtatcaaattgatctgatc gtatacagcttgccagcccagctactgatcctgatacaggtatcatgcac aaaagcgtttgaaaccttgaaaaacgttcacaggcaaacagtagatc cgttactggcgagctgaaggaaatctccgcggaaccagcaaatgacgagg aagcagccgactgtaaagttatgggggtgaagattgggaacgttgatt aagcagctgtcgaaggaaggcctctagaagaaggctgattaccttgcccta tagttatattggccctgaagctaccaagctttgtaccgtaaaggcacaatcgg caaggccaaagaacacctggaggccacagcacaccgtctcaacaaagag aaccgtcaatccgtgcttctgtgagcgtgaataaaggcctgtaaccgcg caagcggcgaatcccggaatccctctgtatctgccagctgttcaaagta gaaagagaagggcaatcatgaaggtgattgaacagatcacgcgtctgtac gccgagcgctgtaccgtaaagatggtacaattccagttgatgaggaaaatc gcattcgattgatgattgggagttagaagaagacgtccagaaagcggatcc gcgtgatggagaaagtcacgggtgaaaacgcagaatctctactgacttag cggggtaccgcatgattcttagctagtaacggcttggatgtagaaggtatta tatgaagcgggaagttgaacgcttcgaccgtatctga	配列番号 90
Ter (ポリペプチド配列)	MIVKPMVRNNICLNAHPQGCKKGVEDQIEYTKKRITAEV KAGAKAPKNLVLGCSNGYGLASRITAAGFYGAATIGV SFEKAGSETKYGTPGWYNNLAFDEAAKREGLYSVTIDG DAFSDEIKAQVIEEAKKKGKIFDLIVYSLASPVRTDPDTGI MHKSVLKPFGKFTGKTVDPFTEGELKEISAEPANDEEA AATVKVMGGEDWERWIKQLSKEGLLEEGCITLAYSIG PEATQALYRKGTIGKAKEHLEATAHRLNKENPSIRAFVS V NKGLVTRASAVIPVIPLYLASLFKVMKEKGNHEGCIEQI TRLYAERLYRKDG TIPVDEENRIRIDDWELEEDVQKAVS ALMEKVTGENAESLTDLAGYRHDFLASNGFDVEGINYE	配列番号 91

10

20

30

40

【表 4 6 - 2】

	AEVERFDRI	
ThiA (ポリヌクレオチド配列)	atgagagaagtagtaattgccagtcgagctagaacagcagtaggaagtttg gaggagcatttaaatacagtttcagcggtagagttaggggtaacagcagctaa agaagctataaaaagagctaacataactccagatatgatagatgaatctctttt agggggagtagcttacagcaggtctggacaaaatatagcaagacaaaatagc attaggagcaggaataaccagtagaaaaaccagctatgactataaataatagttt gtggttctggattaagatctgttcaatggcatctcaactatagcattaggtgatg ctgatataatgtagtggggagctgaaaacatgagtagtctccttatttagtac caagtgcgagataggtgcaagaatgggtgatgctgctttgttgattcaatgat aaaagatggattatcagacataattaataactatcacatgggtattactgctgaa aacatagcagagcaatggaataaactagagaagaacaagatgaattagct cttgaagctcaaaaataaagctgaaaaagctcaagctgaaggaaaatttgatg aagaaatagttcctgtttataaaaaggaagaaaaggtgacactgtagtagat aaagatgaatataaagcctggcactacaatggagaaactgctaagttaag acctgcatttaaaaagatggaacagttactgctgtaatgcatcaggaataa atgatggtgctgctatgtagtagtaatggctaaagaaaagctgaagaacta ggaatagagcctctgcaactatagtttctatggaacagctggtgttgacccta aaataatgggatagaccagttccagcaactaaaaagctttagaagctgct aatatgactattgaagatatagatttagttgaagctaagtaggcatttgctgcc aatctgtagctgtaataagagactaaatatagatatgaataaagttaatgtaat ggtaggagcaatagctataggacatccaataggatgctcaggagcaagaata cttactacacttttatgaaatgaagagaagagatgctaaaactggtctgcta cactttgtataggcgggtggaatgggaactacttaatagttaagagatag	配列番号 9 2
		10
		20
ThiA (ポリペプチド配列)	MREVVIIASARTAVGSFGGAFKSVSAVELGVTAAKEAIK RANITPDMIDESLLGGVLTAGLGQNIARQIALGAGIPVEK PAMTINIVCGSGLRSVSMASQLIALGDADIMLVGGAENM SMSPYLVP SARYGARMGDAAFVDSMIKDGLSDIFNNYH MGITAENIAEQWNITREEQDELALASQNKAEKAQAEGK FDEEIVPVVIGRKGDTVVDKDEYIKPGTTMEKLA LRP AFKKDGTVTAGNASGINDGAAMLVVMMAKEKAEELGIEP LATIVSYGTAGVDPKIMGYGPVPATKKALEANMTIEDID LVEANFAAAQSVAVIRDLNIDMNKVVNNGGAIAGHPIG CSGARILTLLYEMKRRDAKTGLATLCIGGGMGTTLIVK R	配列番号 9 3
		30
Hbd (ポリヌクレオチド配列)	atgaaattagctgtaataggtagtggaactatgggaagtggtattgtacaaactt ttgcaagttgtggacatgatgatgtttaaagagtagaactcaaggtgctataga taaattgttagcttattagataaaaaatttaactaagttagttactaagggaaaaat ggatgaagctacaaaagcagaaatattaagtcagtttagttcaactactaatta tgaagatttaaaagatatggatttaataatagaagcatctgtagaagacatgaa tataaagaaagatgtttcaagttactagatgaattatgtaaagaagatactatct tggcaacaaatacttcatcattatctataacagaaatagcttcttactaagcgc ccagataaagttataggaatgcatttcttaataccagttcctatgatgaaattagt gaagttataagtggtcagttaacatcaaaaagttacttttgatacagattttgaatta tctaagagatcaataaagtagcagtagatgtatctgaatctcctggattgtagt aaatagaactatatacctatgataaatgaagctgttggtatatagcagatggg gttgaagtaaaagaagaaatagatgaagctatgaaataggagcaaacat ccaatgggaccactagcattaggtgatttaacggattagatgtgttttagctata atgaacgtttatatactgaattggagatactaaatatagacctcatccacttta gctaaaatggtagagcctaataataggaagaaaaactaagataggattcta	配列番号 9 4
		40

【表 4 6 - 3】

	tgattataataaataa		
Hbd (ポリペプチド配列)	MKLAVIGSGTMGSGIVQTFASCGHDVCLKSRTQGAIK CLALLDKNLTKLVTKGKMDKAEILSHVSSTTNYEDL KDMDLIEASVEDMNIKKDVFLLDELCKEDTILATNTSS LSITEIASSTKRDPKVIGMHFFNPVPMMLVEVISGQLTS KVTFDTVFELSKSINKVPVDVSESPGFVVRILIPMINEA VGIYADGVASKEEIDEAMKLGANHPMGPLALGDLIGLDV VLAIMNVLYTEFGDTKYRPHPLAKMVRANQLGRKTKIG FYDYNK	配列番号 95	10
Crt2 (ポリヌクレオチド配列)	atgagtacaagtgatgtaaagttatgagaatgtagctgtgaagtagatgga aatatatgtacagtgaaaatgaatagacctaaagccctaatgcaataaattca aagactttagaagaactttatgaagttttgtagatattaataatgatgaaactatt gatgttgaatattgacaggggaaggaaaggcattgtagctggagcagatatt gcatacatgaaagatttagatgctgtagctgctaaagatttttagtatcttaggag caaaagctttggagaaatagaaaatagtaaaaagtagttagatgctgctga aacggattgcttaggtggaggatgtgaactgcaatggcatgtgataaga attgcatctgctaaagctaaatttggctagccagaagtaactcttggataactc caggatattggagaaactcaaggctacaagattggttgaatggcaaaag caaaagaattaatcttacaggtcaagttataaaagctgatgaagctgaaaaa atagggctagtaaatagagctgtagccagacatttaataagaagaagtga gaaattagctaaagataatagctaaaaatgctcagcttcagcttagataacttaa agaagcaatacaactggctcaaaactgatataaatactggaatagatag aatctaattttgctctttgcttcaactaaagacaaaaagaaggaatgtca gcttctgtgaaaagagagaagctaaactttataaaagggtaa	配列番号 96	20
Crt2 (ポリペプチド配列)	MSTSDVKVYENVAVEVDGNICTVKMNRPKALNAINSKT LEELYEVFVDINDETIDWILTGEGKAFVAGADIAYMKD LDAVAAKDFSILGAKAFGEIENSKKVIAAVNGFALGGG CELAMACDIRIASAKAFQPEVTLGITPGYGGTQRLTR LVGMAKAKELIFTGQVIKADEAEKIGLVNRVVEPDILIEEV EKLAKIIAKNAQLAVRYSKEAIQLGAQTDINTGIDIESNLF GLCFSTKDQKEGMSAFVEKREANFIKG	配列番号 97	
Pbt (ポリヌクレオチド配列)	atgagaagtttgaagaagtaattaagtttgcataaagaaaggacctaataa ctatatcagtagcatgttgccaagataaagaagttttaaaggcagttgaaatgg ctagaaaagaaaaatagcaaatgccatttttagtaggagatagaaaaga ctaaagaaattgcaaaaagcatagacatggatcgaaaattatgaactgat agatataaaagatttagcagaagcatctctaaaatctgttgaattagttcaca ggaaaagccgacatgtaataaaggcttagtagacacatcaataactaa aagcagtttaataaagaagtaggtcttagaactggaaatgattaagtcacg tagcagttttgatgtagagggatgatagatttttctgtaactgacgcagct atgaacttagctctgatatacaataactaaaaagcaaatcatagaaaatgcttg cacagtagcacattcattagatataagtgaaacaaaagttgctgcaatgctg caaaagaaaaagtaaatcaaaaatgaaagatacagttgaagctaaagaa ctagaagaaatgatgaaagaggagaaatcaaaaggttatggttggggc ctttgcaattgataatgcagatctttagaagcagctaaacataaagggtataa tcatcctgtagcaggacgagctgataatatttagcccagatattgaaggtggt aacatattatataaagctttggtattctctcaaaaatcaaaaatgcaggagttat agttggggctaaagcaccaataatattaactcttagagcagacagtgaaagaa actaaactaaactcaatagcttaggttttaaggcagcaaaaggcataa	配列番号 98	30
Pbt (ポリペプチド)	MRSFEEVIKFAKERGPKTISVACCQDKEVLMVEMARK	配列	40

【表 4 6 - 4】

配列)	EKIANAILVGDIEKTKEIAKSIDMDIENYELIDIKDLAEASL KSVELVSQ GKADMVMKGLVDTSIILKAVLNKEVGLRTG NVLSHVAVFDVEGYDRLFFVTDAAAMNLPDTNTKKQIIE NACTVAHSLDISEPKVAAICAKEKVNPKMKDTVEAKELE EMYERGEIKGCMVGGPFAIDNAVSLEAAKHKGINHPVA GRADILLAPDIEGGNILYKALVFFSKSKNAGVIVGAKAPII LTSRADSEETKLNSIALGVLMAAKA	番号 99	
Buk (ポリヌクレオチド配列)	atgagcaaaatattaaaatctaacaataaaatcctggttcgacatcaactaaa atagctgtattgataatgaggatttagtattgaaaaacttaagacattctca gaagaaataggaaaatagagaaggtgtctgaccaatttgaatttcgtaaca agtaatagaagaagctctaaaagaaggtggagtaaaaacatctgaattagat gctgtagtaggtagaggaggacttctaaacctataaaagggtgactattca gtaagtgtctatgattgaagattaaaagtgaggagtttaggagaacacgctt caaacctagggtgaataatagcaaaacaaataggtgaagaagtaaatgttc cttcatacatagtagaccctgtttagtagatgaattagaagattgctagaattt ctggtatgcctgaaataagtagagcaaggttagtacctgcttaaatcaaaag gcaatagcaagaagatatgctagagaaataaacaagaaatgaagatata aatcttatagttgcacacatgggtggaggagttctgttgagctcataaaatg gtaaaatagtagatgtgcaaacgcattagatggagaaggaccttctccag aaagaagtggtgactaccagtaggtgcattagtaaaaatgtgctttagtgga aaatatactcaagatgaaattaaaagaaaataaaaggtaatggcggacta gttgcatactaaacactaatgatgctagagaagttgaagaaagaattgaagc tggtgatgaaaaagctaaattagtatgaagctatggcatatcaaatcttaa agaaataggagctagtgctgcagttctaaggagatgaaaagcaatattatt aactggtggaatcgcatattcaaaaatgttacagaaatgattgcagatagagt taaatatagcagatgtaaaagttatccaggtgaagatgaaatgattgcatta gctcaaggtggacttagagtttaactggtgaagaagaggctcaagttatgat aactaa	配列番号 100	10
Buk (ポリペプチド配列)	MSKIFKILTINPGSTSTKIAVFDNEDLVFEKTLRHSSEEIG KYEKVSDQFEFRKQVIEEALKEGGVKTSELDAVVGRGG LLKPIKGGTYSVSAAMIEDLKVGVLGEHASNLGGIIAKQI GEEVNVPSYIVDPVVVDELEDVARISGMPEISRASVVHA LNQKAIARRYAREINKKYEDINLIVAHMGGGVSVGAHKN GKIVDVANALDGEGPFSPERSGGLPVGALVKMCFSGK YTQDEIKKKIKGNGGLVAYLNTNDAREVEERIEAGDEKA KLVYEAMAYQISKEIGASAAVLKGDVKAILLTGGIAYSKM FTEMIADRVKFIADVKVYPGEDEMIALAQQGLRVLTGEE EAQVYDN	配列番号 101	30
第1のRBS (ydfZ= RBSにおける)	TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA	配列番号 102	
遺伝子間内部RBS	taagaaggagatatacat	配列番号 103	
ydfZ プロモーターの 制御下の酪酸カセット	CATTTCTCTCATCCATCCGGGGTGAGAGTCTTTTC CCCCGACTTATGGCTCATGCATGCATCAAAAAGATG TGAGCTTGATCAAAAACAAAAAATATTTCACTCGACA GGAGATTTATATTGCGCCCGGATCCCTCTAGAAATA ATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATatgatcgt	配列番号 104	40

【表 4 6 - 5】

<p>(大文字：y d f Z プロモーター、 太字のRBSを含む； 小文字：以下の順序の コード領域：t e r、 t h i A、h b d、 c r t 2、p b t、 b u k、内部RBS (大文字かつ下線付き) により分離</p>	<pre> aaaacctatggtacgcaacaatatctgcctgaacgcccatcctcagggctgc aagaagggagtggaagatcagattgaatataccaagaaacgcattaccgca gaaglcaaagctggcgcaaaagctccaaaaaacggtctggctgctggctgctc aaatggttacggcctggcgagccgcattactgctgcgttcggatacggggctg cgaccatcggcgtgtcctttgaaaaagcgggttcagaaaccaaataatggttac accgggatggtacaataatftggcatttgaatgaagcggcaaaacgcgagggt ctttatagcgtgacgatcgacggcgatgcgttttcagacgagatcaaggccca ggtattgaggaagccaaaaaaaagggtatcaaattgatctgatcgtataca gcttggccagcccagtagctactgatcctgatacaggtatcatgcacaaaagc gttttgaaccctttgaaaaacggttcacaggcaaaacagtagatccgtttact ggcgagctgaaggaaatctccgcggaaccagcaaatgacgaggaagcag ccgccactgttaaagttatggggggtgaagattgggaacgttggattaagcag ctgtcgaaggaaggcctcttagaagaaggctgtattacctggcctatagtata ttggcctgaagctaccaagctttgtaccgtaaaggcacaatcgccaagggc caaagaacacctggaggccacagcacaccgtctcaaaaagagaaccgg tcaatccgtgcctcgtgagcgtgaataaaggcctggtaacccgcgcaagcg ccgtaatcccggtaatccctctgtatctcgccagctgttcaaagtaatgaaaga gaagggcaatcatgaaggttattgaacagatcacgcgtctgtacgcccag cgctgtaccgtaaagatggtacaattccagttgatgaggaatcgaltcg cattgatgattgggagttagaagaagcgtccgaaagcggatccgctgtga tggagaaagtcacgggtgaaaacgcagaatctctactgacttagcggggta ccgcatgatttcttagctagtaacggctttgatgtagaaggtattaattatgaag cggaagttgaacgcttcgaccgtatctga<u>TAAGAAGGAGATATACA</u> <u>T</u>atgagagaagtagtaattgccagtgacgctagaacagcagtaggaagtttt ggaggagcatttaaatcagtttcagcggtagagttaggggtaacagcagcta aagaagctataaaaagagctaacataactccagatatgatagatgaatctctt tagggggagtagcttacagcaggtcttgacaaaatatagcaagacaaatagc attaggagcaggaataaccagtagaaaaaccagctatgactataaatatagttt gtggtctggattaagatctgtttcaatggcatctcaactatagcattagtgatg ctgatataatgtagtgggagctgaaaacatgagtatgtctccttatttagtac caagtgcgagatattggaagaatgggtgatgctgctttgttgattcaatgat aaaagatggattatcagacatattaataactatcacatgggtattactgctgaa aacatagcagagcaatggaatataactagagaagaacaagatgaattagct cttgcaagcaaaaataagctgaaaaagctcaagctgaaggaaaatttgatg aagaaatagttcctgtttataaaaaggaagaaaaggtgacactgtagtagat aaagatgaatatattaagcctggcactacaatggagaaactgctaagttaag acctgatttaaaaagatggaacagttactgctggtaatgcatcaggaataa atgatggtgctgctatgttagtagtaatggctaaagaaaaagctgaagaacta ggaatagagcctctgcaactatagtttctatggaacagctgggttgacccta aaataatgggatattgaccagttccagcaactaaaaaacgtttagaagctgct aatatgactattgaagatagatttagttgaagctaagaggcatttgctgccc aatctgtagctgtaataagagacttaaatatagatatgaataaagttaatgttaat ggaggagcaatagctataggacatccaataggatgctcaggagcaagaata ctactacacttttatgaaatgaagagaagagatgctaaaactggcttgcta cacttgtagaggcgggtggaatgggaactactttaatagttgaagatag<u>TAA</u> <u>GAAGGAGATATACAT</u>atgaaattagctgtaaataggtagtggaactat gggaagtggtattgtacaaaactttgcaagttgggacatgatgatgtttaaaga gtagaactcaaggctatagataaatgttagctttattagataaaaatttaact aagtagttactaagggaaaaatggatgaagctacaaaagcagaatattaa </pre>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------

【表 4 6 - 6】

	<p>gtcatgttagtcaactactaattatgaagatttaaagatatggatttaataatag aagcatctgtagaagacatgaatataaagaaagatgtttcaagttactagatg aattatgtaaagaagatactatcttgcaacaaatacttcatcattatctataaca gaaatagcttcttactaagcgccagataaagttataggaatgcatttcttaa tccagttcctatgatgaaattagttgaagtataagtggtcagttaacatcaaaa gttactttgatagcagatttgaattatctaagagatcaataaagtagcagtagat gtatctgaatctcctggattttagtaaatagaatacttatacctatgataaatga agctgttggtatataatgcagatggtgtgcaagtaaagaagaagaatagatgaag ctatgaaataggagcaaaccatccaatgggaccactagcattaggtgattta atcggattagatgtgttttagctataatgaacgtttatatactgaatttggagata ctaaatatagacctcatccacttttagctaaaaatggttagagctaatcaatagg aagaaaaactaagataggattctatgattataataaataaTAAGAAGGA GATATACATatgagtacaagtgatgtaaaagttatgagaatgtagctgtt aagtagatggaaatataatgtacagtgaaaatgaatagacctaaagccctaat gcaataaattcaaagactttagaagaactttatgaagtattgtatgataataa tgatgaaactattgatgttgaatattgacaggggaaggaaaggcattgtagct ggagcagatattgcatacatgaaagatttagatgctgtagctgctaaagatttta gtatcttaggagcaaaagctttggagaaatagaaaatagtaaaaaagtagtg atagctgctgtaaacggatttcttaggtggaggatgtgaactgcaatggcat gtgataagaattgcactgctaaagctaaatttggtagccagaagtaactct tggataactccaggatattggaggaaactcaaaggcttacaagattggttggga atggcaaaagcaaaagaattaatctttacaggtcaagttataaaagctgatga agctgaaaaaataaggctagtaaatagagtcgttagccagacatttgaatag aagaagttgagaatagctagataaatagctaaaaatgctcagcttgcagtt agatacttaaagaagcaatacaactggtgctcaaactgatataaatactgg aatagatatagaatctaatttattggtctttgtttcaactaaagaccaaaaaaga aggaatgtagcttctgttgaagagagagaagtaactttataaaagggttaaT AAGAAGGAGATATACATatgagaagtttgaagaagtaattaagttt gcaaaagaagaggacctaaaactatatacagtagcatgttccaagataaa gaagtttaattgtagcttgaatggctagaaaagaaaaaatagcaaatgcca tttttagtaggagatatagaaaagactaaagaaattgcaaaaagcatagacat ggatatcgaaaattatgaactgatagataaaaagatttagcagaagcatctct aaaatctgtgaattagttcacaaggaaaagccgacatggtaatgaaaggct tagtagacacatcaataataactaaaagcagtttaataaagaagtaggtctta gaactggaaatgtattaagtcacgtagcagtagtattgatgtagaggatgata gattattttcgtactgacgcagctatgaacttagctcctgatacaataactaaa aagcaaatcatagaaaatgcttgcacagtagcacattcattagatataagtg accaaaagtgtgcaatatgcgcaaaagaaaaagtaaatcaaaaatgaa agatacagttgaagctaaagaactagaagaaatgtatgaaagaggagaat caaaggttgtatggttggggcctttgcaattgataatgcagtagctttagaag cagctaaacataaaggatataatcatctgtagcaggacgagctgatataat tagcccagatattgaaggtgtaacatattatataaagcttggattcttctcaa aatcaaaaaatgcaggagttatagttggggctaaagcaccaataatattaact tctagagcagacagtgaaagaactaaactaaactcaatagcttttaggtgttta atggcagcaaaaggcataaTAAGAAGGAGATATACATatgagcaa aatatttaaaatcttaacaataaatcctggttcgacatcaactaaaatagctgat ttgataatgaggatttagtattgaaaaactttaagacattctcagaagaata ggaaaatagagaaggtgtctgaccaatttgaattcgtaaacaagtaataga agaagctcaaaagaaggtggagtaaaaacatctgaattagatgctgtagta</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------

【表 4 6 - 7】

	<p>ggtagaggaggacttctaaacctataaaaagggtgacttattcagtaagtct gctatgattgaagattfaaaagggtggagtttaggagaacacgcttcaaacct ggtggaataatagcaaaacaaatagggtgaagaagtaaatgttccttcatacat agtagaccctgttgttagatgaattagaagatgttgctagaatttctggtatgc ctgaaataagtagagcaagtgtagtacatgctttaaataaaaaggcaatagc aagaagatatgctagagaaataaacaagaaatatgaagatataaatcttata gttgcacacatgggtggaggagtttctgtggagctcataaaaatggtaaata gtagatgttgcaaacgcattagatggagaaggaccttctccagaaagaag tggggactaccagtaggtgcattagtaaaaaatgtgcttagtggaataatact caagatgaaataaaaagaaaataaaaaggtaatggcggactagttgcatact taaacactaatgatgctagagaagttgaagaaagaattgaagctggtaga aaaagctaaattagtataagaagctatggcatatcaaatctctaaagaaatag gagctagtgtgcagttcttaagggagatgtaaagcaatattattaactggg gaatcgcatattcaaaaatgttacagaaatgattgcagatagagttaaattat agcagatgaaaagttatccaggtgaagatgaaatgattgcattagctcaag gtggacttagagtttaactgggtgaagaagaggctcaagttatgataactaata a</p>	
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

10

20

【 0 5 8 7 】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 9 0 の核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 9 0 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 9 0 の DNA 配列もしくはその機能性断片、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 9 0 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 9 % 相同である核酸配列を含む。

30

【 0 5 8 8 】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 9 2 の核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 9 2 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 9 2 の DNA 配列もしくはその機能性断片、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 9 2 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 9 % 相同である核酸配列を含む。

40

【 0 5 8 9 】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 9 4 の核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 9 4 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 9 4 の DNA 配列もしくはその機能性断片、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 9 4 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 9 % 相同である核酸配列を含む。

【 0 5 9 0 】

50

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 96 の核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 96 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 96 の DNA 配列もしくはその機能性断片、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 96 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 相同である核酸配列を含む。

【0591】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 98 の核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 98 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 98 の DNA 配列もしくはその機能性断片、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 98 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 相同である核酸配列を含む。

10

【0592】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 100 の核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 100 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 100 の DNA 配列もしくはその機能性断片、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 100 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 相同である核酸配列を含む。

20

【0593】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 104 の核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 104 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 104 の DNA 配列もしくはその機能性断片、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 104 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 相同である核酸配列を含む。

30

【0594】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 48 の核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 48 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 48 の DNA 配列もしくはその機能性断片、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 48 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 相同である核酸配列を含む。

40

【0595】

代替実施形態では、p b t および b u k が T e s B (配列番号 48) で置換されている。

いくつかの実施形態では、酪酸カセットは、誘導性プロモーターにより駆動される。例えば、配列番号における y d f Z の代わりに他の F N R プロモーターを用いることができる。

50

【0596】

非限定的なFNRプロモーター配列を本明細書に示す。いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子操作細菌は、表6に見いだされるプロモーター配列、例えば、nirBプロモーター、ydfZプロモーター、強いリボソーム結合部位に融合したnirB、強いリボソーム結合部位に融合したydfZプロモーター、嫌氣的に誘導される小RNA遺伝子(fnrSプロモーター)である、fnrS、crp結合部位に融合したnirBプロモーター、およびcrp結合部位に融合したfnrSのうちの1つまたは複数の制御下の酪酸カセットを含む。

【0597】

いくつかの実施形態では、酪酸カセットは、消化管内に存在する代謝物により誘導されるプロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態では、酪酸カセットは、HP特異的分子または肝損傷を示す代謝物、例えば、ビリルビンにより誘導される。いくつかの実施形態では、酪酸カセットは、炎症または炎症反応により誘導性である、プロモーター(例えば、RNSまたはROSプロモーター)の制御下におかれる。

10

【0598】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、それらの血液および腸における分子または代謝物、例えば、ビリルビン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、血液凝固因子II、VII、IXおよびX、アルカリホスファターゼ、ガンマグルトアミルトランスフェラーゼ、肝炎抗原および抗体、アルファフェトプロテイン、抗ミトコンドリア、平滑筋および抗核抗体、鉄、トランスフェリン、フェリチン、銅、セルロプラスミン、アンモニアならびにマンガンにより誘導されたプロモーターにより駆動される酪酸カセットを含む。これらの分子またはそれらの代謝物の1つに応答するプロモーターは、本明細書で示した遺伝子操作細菌に用いることができる。

20

【0599】

いくつかの実施形態では、酪酸カセットは、アラビノースにより誘導性であり、Arabadプロモーターにより駆動される。

[実施例40]

【0600】

LC-MS/MSによる酪酸の定量

実施例37における酪酸の測定値を得るために、酪酸の定量のためのLC-MS/MSプロトコルを用いた。

30

【0601】

試料の調製

最初に、新鮮な酪酸ナトリウム保存溶液(10mg/m)ならびに1000、500、250、100、20、4および0.8μg/mLの酪酸ナトリウム標準を水を用いて調製した。次いで、10μLの試料(細菌上清および標準)をV型底ポリプロピレン96ウエルプレートにピペティングし、最終溶液中4μg/mLの酪酸-d7(CDN同位体)内部標準を含む90μLの67%ACN(反応当たり60μL ACN+30μL水)を各試料に加えた。プレートを熱融着させ、十分に混合し、4000rpmで5分間遠心分離した。丸底96ウエルポリプロピレンプレートにおいて、20μLの希釈試料を、10mM MES pH4.5、20mM EDC(N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド)および20mM TFEA(2,2,2-トリフルオロエチルアミン)を含む180μLの緩衝液に加えた。プレートを再び熱融着させ、十分に混合し、試料を室温で1時間インキュベートした。

40

【0602】

LC-MS/MS法

酪酸は、Thermo TSQ Quantum Max三連四重極質量分析計を用いたタンデム質量分析と連結した液体クロマトグラフィー(LC-MS/MS)により測定した。HPLCの詳細を表45および表46に示す。タンデム質量分析の詳細は、表47に見いだされる。

50

【 0 6 0 3 】

【 表 4 7 】

表 4 5. H P L C の 詳 細

カラム	Thermo Aquasil C18 カラム , 5 μm (50 x 2.1 mm)
移動相 A	100% H ₂ O, 0.1% ギ酸
移動相 B	100% ACN, 0.1% ギ酸
注入量	10uL

10

【 0 6 0 4 】

【 表 4 8 】

表 4 6. H P L C 法

総時間 (分)	流量 (μ L / 分)	A%	B%
0	0.5	100	0
1	0.5	100	0
2	0.5	10	90
4	0.5	10	90
4.01	0.5	100	0
4.25	0.5	100	0

30

40

【 0 6 0 5 】

【表 4 9】

表 4 7. タンデム質量分析の詳細

イオン源	HESI-II
極性	ポジティブ
SRM遷移	酪酸 170.0 / 71.1 酪酸 d7 177.1/78.3

10

[実施例 4 1]

【0606】

胆管結紮モデルにおけるアルギニンおよび/または酪酸を産生する遺伝子操作細菌の有効性

20

げっ歯類における総胆管の結紮は、肝臓胆汁うっ滞および線維症を誘発する多年にわたる研究における実験的処置として用いられている(例えば、Tagら、Bile Duct Ligation in Mice: Induction of Inflammatory Liver Injury and Fibrosis by Obstructive Cholestasis、Journal of Visualized Experiments、2015年2月; 96; e52438頁、その中の参考文献参照)。

【0607】

肝臓炎症および線維症の症状の低減におけるアルギニンおよび酪酸産生回路を含む菌株の有効性を判定するために、胆管結紮モデルを用いる。ニッスル対照(SYN-UCD107、カナマイシン耐性ニッスル)、アルギニン産生菌株(SYN-UCD305)、酪酸産生菌株(SYN-UCD502)ならびに酪酸およびアルギニンの両方を産生する菌株(SYN-UCD605)を本試験で比較する。ALT/ASTレベル、線維症(門脈、類洞周囲および総)ならびに肝炎が本試験の主要なエンドポイントであり、動物の全般的な健康状態が本試験の副次的エンドポイントである。

30

【0608】

動物(C57BL6、8週)は、H2O対照(n=12)、またはSYN-UCD107(n=12; カナマイシン耐性ニッスル)、またはアルギニン産生SYN-UCD305(n=12; ArgR、malEK遺伝子座において染色体に組み込まれたPfnrS-ArgAfbR、ThyAおよび無抗生物質耐性を含む)、または酪酸産生SYN-UCD502(n=12; 染色体に組み込まれたPydfZ-ter酪酸カセットを含む)、またはSYN-UCD605(n=12; ArgR、malEK遺伝子座において染色体に組み込まれたPfnrS-ArgAfbR、ThyAおよび染色体に組み込まれたPydfZ-ter酪酸カセット、ならびに無抗生物質耐性を含む)の強制経口投与により治療する。細菌を $>10e10$ 細胞/mlの用量で投与する。

40

【0609】

いくつかの実施形態では、SYN-UCD501(野生型ArgR、無FNR-ArgAfbR、野生型ThyAおよびLogic156(pSC101 PydfZ-ter酪酸プラスミド; amp耐性を含む)ならびにSYN-UCD602(ArgR、malEK遺伝子座において染色体に組み込まれたPfnrS-ArgAfbR、ThyA

50

およびLogic156(pSC101 PydfZ-ter 酪酸プラスミド; amp 耐性を含む)をSYN-UCD502およびSYN-UCD605の代わりに用いる。

【0610】

0日目に、胆管結紮手術を実施例40で述べたように実施する。1日目に、マウスの体重を測定し、無作為化する。マウスに100 μ lのH₂O、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605を午前および午後に強制経口投与する。2日目に、マウスに100 μ lのH₂O、SYN798およびSYN993を午前および午後に強制経口投与する。3日目に、マウスに100 μ lのH₂O、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605を午前および午後に強制経口投与する。午前の投与の4時間後に、ALT / ASTの分析のために血液を採取する。4~6日目に、マウスに100 μ lのH₂O、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605を午前および午後に強制経口投与する。7日目に、マウスに100 μ lのH₂O、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605を午前および午後に強制経口投与する。午前の投与の4時間後に、ALT / ASTの分析のために血液を採取する。8~9日目に、マウスに100 μ lのH₂O、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605を午前および午後に強制経口投与する。10日目に、マウスに100 μ lのH₂O、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605を午前および午後に強制経口投与する。午前の投与の4時間後に、ALT / ASTの分析のために血液を採取する。11~13日目に、マウスに100 μ lのH₂O、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605を午前および午後に強制経口投与する。14日目に、動物に100 μ lのH₂O、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605を午前に強制経口投与する。次いで、投与の4時間後に動物を安楽死させ、ALT / ASTの分析のために心臓採血により血液を採取する。組織学的評価による線維症の分析のために肝臓組織を採取する。

[実施例42]

【0611】

胆管結紮処置

胆管結紮

手術前の準備:

完全な実験中に、動物を麻酔システムに永続的に接続された、37 $^{\circ}$ Cの温度の加温プレート上に保持し、手術野を液体浸透性の自己接着性ドレープで全体的に覆う。

【0612】

マウスは、麻酔の誘導のための4L/分の流量の100%酸素中4容積%イソフルランの吸入により麻酔する。麻酔の深さは、次のバイタル基準に達する場合、十分である: 規則的な自発呼吸、指間疼痛刺激の無反射および疼痛への無反応。マウスの腹部の被毛を電気ファースターで剃毛し、眼および鼻軟膏を用いて眼を乾燥から保護する。マウスを37 $^{\circ}$ Cの加熱ホットプレート上にのせ、マウスの鼻をFluovac麻酔システムのFluovacマスクに挿入し、動物の脚を絹テープのストライプで固定する。マウスの麻酔は、1L/分の流量の100%酸素中1.5~3容積%イソフルランの吸入により維持し、ブプレノルフィン溶液(0.9% NaCl溶液に溶解した0.1mg/kg BW)の腹腔内注射により周術期の鎮痛を誘導する。

【0613】

剃毛腹部皮膚を皮膚の術前処置用の調製済みの標準消毒アルコール溶液で湿らせたガーゼスワブ滅菌する。

【0614】

外科手術

11.5cm外科用鋏で真皮と筋膜を同時に切断することにより約2cmの長さの正中

10

20

30

40

50

線開腹術により腹部を開く。鉗を延展器として用いることによって腹膜の上部の結合組織を切開した。腹膜を白線に沿って切断して、腹腔を開く。保持縫合糸を胸骨に挿入し、縫合糸のフィラメントを持ち上げることによって腔を拡大し、それをFluovacマスクの上部に固定する。Colibri牽引器を腹腔に挿入することによって手術野を広げる。その腹側が横隔膜に向かって突き出て、門が明瞭に見えるように、湿らせた(0.9% NaCl溶液)綿スワブで肝臓を持ち上げる。腸の尾側移動による胆管を露出させる。小鋸歯状鉗子を用いて胆管を隣接門脈静脈および肝動脈から注意深く分離する。5-0縫合糸を胆管の周囲に設置し、2つの外科結びにより固定する。結び目を作る場合、牽引力を連続的に増加させて、胆管を断ち切ることなく効果的な閉塞を保証する。第2の頭側結紮を間の胆管を切断することなく同様な方法で加える。縫合糸の末端を切断し、胸骨を下げ、牽引器を除去する。腹腔を0.9% NaCl溶液ですすぎ、腹部臓器を生理的位置に戻す。両腹部層(腹膜および真皮と筋膜)を6-0 Mersilkを用いた別個の連続縫合によって閉鎖する。縫合糸の末端を切断し、手術野を消毒溶液で湿らせたガーゼスワブで滅菌する。

10

【0615】

術後処置およびフォローアップ:

マウスが十分に覚醒し、活動的になるまで、マウスを赤外ランプで加温されたケージ内で回復させる。その後、マウスを通常のケージに移動させ、水および食物を自由に摂取させる。手術後、内部動物管理使用委員会の現地の勧告に従って、動物を定期的にモニターし、適切な鎮痛薬(例えば、ブプレノルフィン溶液)を用いてフォローアップ術後処置を行う。動物に実験の終了まで食物および水を自由に摂取させることを維持した。

20

[実施例43]

【0616】

肝性脳症のTAAモデル

UCD、急性および慢性肝疾患ならびにHEに関連する血中アンモニアレベルの増加を模擬するためのマウスのTAA処理は、文献において以前に用いられた(Wallace MCら、Lab Anim.、2015年4月;49巻(増補1):21~9頁、Standard operating procedures in experimental liver research: thioacetamide model in mice and rats)。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌の活性の持続時間を検討し、肝性脳症の治療へのこのアプローチを支援するための追加データを得るために高アンモニア血症のTAA誘発マウスモデルを用いる。

30

【0617】

肝臓炎症および線維症の症状を軽減するアルギニンおよび酪酸産生回路を含む菌株の有効性を判定するために、ニッスル対照(SYN-UCD107、カナマイシン耐性ニッスル)、アルギニン産生菌株(SYN-UCD305)、酪酸産生菌株(SYN-UCD502)ならびに酪酸およびアルギニンの両方を産生する菌株(SYN-UCD605)をTTAモデル試験において比較する。ALT/ASTレベル、線維症(門脈、類洞周囲および総)ならびに肝炎が本試験の主要なエンドポイントである。動物の全般的な健康状態が本試験の副次的エンドポイントである。

40

【0618】

血中アンモニアの長期の上昇に対する操作細菌の影響を検討するために、300mpkの用量のチオアセトアミド(TAA)も投与するC57BL6マウスに細菌を投与する。

【0619】

C57BL6(10週齢)にSYN-UCD107、またはSYN-UCD305(n=12)、SYN-UCD502(n=12)、もしくはSYN-UCD605(n=12)(100 μ lの $>1 \times 10^{10}$ 細胞/ml)または媒体対照の一日量を投与する。あるいは、マウスに2-1日量の細菌(100 μ lの $>1 \times 10^{10}$ 細胞/ml)(各治療群につきn=5)を午前中に1回、午後1回投与する。細菌の前投与の3日後に、マウスに300mpkのチオアセトアミド(TAA)または対照としてのH₂Oを腹腔内投与する

50

。あるいは、マウスに250mpkを1日2回、午前に1回、午後に1回投与する。試験の期間は、5日である。アンモニアレベルを測定し、全般的な健康状態、生存、体重変化をモニターする。

【0620】

手短に述べると、動物を7日間馴化させる。時間経過の1日目に、動物の体重を測定し、ベースラインALT/ASTを測定するために採血し、糞便ペレット(ケージごと)を採取し、ALT/ASTレベルに基づいて無作為化する。動物にH₂O、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605(100μl/用量/動物)を1回または2回(午前および午後)の強制経口投与により投与する。水をH₂O(+)20mg/ml ATCに変更する。2日目に、動物にH₂O、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605(100μl/用量/動物)を1回または2回(午前および午後)の強制経口投与により投与する。3日目に、動物の体重を測定し、H₂O、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605(100μl/用量/動物)を1回または2回(午前および午後)の強制経口投与により投与する。さらに、動物に300mpkのTAA(または生理食塩水対照)を腹腔内投与する。あるいは、動物に250mpkのTAA(または生理食塩水対照)を午前に1回、午後に1回投与する。4日目に、動物の体重を測定し、ALT/ASTの分析のために血液を採取する。糞便ペレットをケージごとに採取する。動物にH₂O、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605(100μl/用量/動物)を1回または2回(午前および午後)の強制経口投与により投与する。動物に250mpkのTAA(または生理食塩水対照)も投与することができる。5日目に、動物の体重を測定し、ALT/ASTの分析のために血液を採取する。糞便ペレットを採取する(ケージごと)。動物にH₂O、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605(100μl/用量/動物)を1回または2回(午前および午後)の強制経口投与により投与する。ALT/ASTレベル、糞便ペレット中の細菌負荷ならびに全般的な健康生存期間および体重変化をモニターする。組織学的評価による線維症の分析のために肝臓組織を採取する。

[実施例44]

【0621】

肝性脳症の四塩化炭素(CCl₄)モデル

CCl₄は、動物における肝線維症および肝硬変を誘発するためにしばしば用いられる。その理由は、基礎をなす生化学的機構および組織学的特性がヒト肝硬変に認められるものに類似しているからである(Nhungら、Establishment of a standardized mouse model of hepatic fibrosis for biomedical research; Biomedical Research and Therapy 2014年、1巻(2号):43~49頁)。

【0622】

CYP2E1は、細静脈周囲肝細胞において発現し、CCl₄をCCl₃+ラジカルに変換する酵素である。CCl₃+ラジカルの蓄積は、小葉中心性壊死ならびに肝細胞形質およびミトコンドリア膜の透過性の変化を引き起こす。結果として、炎症および線維形成の増加、ならびに細胞外マトリックスの沈着が認められる。慢性CCl₄曝露は、創傷治癒過程の産物である、小結節の形成および線維症をもたらす。CCl₄処理は、2~4週後に線維症、5~7週後に著しい架橋線維症、9~11週後に硬変および10~20週後に小結節性硬変を引き起こすことが示された(Nhungら、Establishment of a standardized mouse model of hepatic fibrosis for biomedical research; Biomedical Research and Therapy 2014年、1巻(2号):43~49頁、およびそれにおける参考文献)。

【0623】

肝臓炎症および線維症の症状を軽減するアルギニンおよび酪酸産生回路を含む菌株の有効性を判定するために、肝硬変の CCl_4 マウスモデルを用いる。ニッスル対照(SYN-UCD107、カナマイシン耐性ニッスル)、アルギニン産生菌株(SYN-UCD305)、酪酸産生菌株(SYN-UCD502)ならびに酪酸およびアルギニンの両方を産生する菌株(SYN-UCD605)を本試験において比較する。ALT/ASTレベル、線維症(門脈、類洞周囲および総)ならびに肝炎が本試験の主要なエンドポイントである。動物の全般的な健康状態が本試験の副次的エンドポイントである。試験期間は8週間である。

【0624】

動物(C57BL6、8週齢)を H_2O 対照($n=12$)またはSYN-UCD107($n=12$;カナマイシン耐性ニッスル)、もしくはアルギニン産生SYN-UCD305($n=12$; ArgR、malEK遺伝子座において染色体に組み込まれたPfnrS-ArgAfb r、ThyAを含み、抗生物質耐性を含まない)もしくは酪酸産生SYN-UCD502($n=12$;野生型ArgR、無FNR-ArgAfb r、野生型ThyA、および染色体に組み込まれたPydfZ-ter酪酸カセットを含む)もしくはSYN-UCD605($n=12$; ArgR、malEK遺伝子座において染色体に組み込まれたPfnrS-ArgAfb r、ThyA、染色体に組み込まれたPydfZ-ter酪酸カセットを含み、抗生物質耐性を含まない)の強制経口投与により治療する。細菌は、 $100\mu l$ の容量で $>10e10$ 細胞/mlの用量で投与する。

【0625】

いくつかの実施形態では、SYN-UCD501(野生型ArgR、無FNR-ArgAfb r、野生型ThyAおよびLogic156(pSC101 PydfZ-ter酪酸プラスミド; amp耐性)を含む)ならびにSYN-UCD602(ArgR、malEK遺伝子座において染色体に組み込まれたPfnrS-ArgAfb r、ThyAおよびLogic156(pSC101 PydfZ-ter酪酸プラスミド; amp耐性)を含む)をSYN-UCD502およびSYN-UCD605の代わりに用いる。

【0626】

1日目に、マウスの体重を測定し、無作為化する。動物に $100\mu l$ の H_2O 、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605を午前に強制経口投与する。さらに、動物にオリーブ油(擬似対照)またはオリーブ油中 $1ml/kg$ CCl_4 (他のすべての治療群)を強制経口投与する。動物に $100\mu l$ の H_2O 、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605を午後に強制経口投与する。

【0627】

1~8週目に、動物に $100\mu l$ の H_2O 、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605を1日2回強制経口投与する。さらに、動物にオリーブ油(擬似対照)またはオリーブ油中 $1ml/kg$ CCl_4 (他のすべての治療群)を3x/週、強制経口投与する。動物の体重を3x/週測定し、ALT/AST分析用の血液を1x/週採取する。

【0628】

8週目の終了時に、動物に $100\mu l$ の H_2O 、SYN-UCD107、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605を午前に強制経口投与する。投与の4時間後に、動物の体重を測定し、安楽死させ、ALT/AST分析のために心臓採血により血液を採取する。組織学的評価による線維症の分析のために肝臓を採取する。

[実施例45]

【0629】

DSSマウスモデルにおける酪酸発現細菌の有効性

10

20

30

40

50

上述の酪酸カセットを含む細菌をLB中で一夜増殖させた。次いで細菌を適切な選択マーカー、例えば、アンピシリンを含むLBで1:100に希釈し、0.4~0.5の光学濃度まで増殖させ、次いで遠心分離によりペレット化する。細菌をリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁し、100 μ lをマウスに強制経口投与する。細菌の強制経口投与前の7日間にわたり3%デキストラン硫酸ナトリウムを含む飲料水を補給することによってマウスにおける消化管の損傷を誘発させる。マウスを1週間にわたり毎日処理し、糞便ホモジネートを適切な選択マーカー、例えば、アンピシリンを添加した寒天プレート上で平板培養することによって糞便試料中の細菌を検出する。5日間の細菌処理の後、内視鏡法を用いて生存マウスにおける消化管の損傷を採点する。内視鏡的損傷スコアは、結腸の透過性、フィブリン付着、粘膜および血管の病変、および/または糞便の特性を評価することにより確定する。マウスを屠殺し、結腸組織を単離する。遠位結腸切片を固定し、炎症および潰瘍形成について採点する。結腸組織をホモジネートし、酵素アッセイキットを用いてミエロペルオキシダーゼ活性ならびにサイトカインレベル(IL-1、TNF-、IL-6、IFN- およびIL-10)について測定を行う。

10

[実施例46]

【0630】

HEのDSS誘導マウスモデルの作製

述べた遺伝子操作細菌は、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発マウスモデルにおいて試験することができる。動物へのDSSの投与は、炎症誘発性腸内容物(例えば、内腔抗原、腸内細菌、細菌産物)に炎症を伝播させ、誘発させる、腸上皮の化学的損傷をもたらす(Lowら、2013年)。DSS処理用のマウスを準備するために、マウスを耳パンチまたは任意の他の適切な標識法を用いて標識する。マウスは、DSS誘導に対して異なる感受性および反応性を示すので、個々のマウスを標識することにより、研究者が各マウスにおける疾患の進行を追跡することができる。次いでマウスの体重を測定し、必要な場合、群間の任意の有意な体重差を解消するために平均群体重を均衡させる。後のアッセイの対照として、DSSの投与の前に糞便も採取する。炎症の糞便マーカー(例えば、サイトカインレベルまたはミエロペルオキシダーゼ活性)の例示的アッセイを以下に述べる。

20

【0631】

DSSの投与のために、高圧滅菌水中DSS(MP Biomedicals、Santa Ana、CA;カタログ番号160110)の3%溶液を調製する。次に、ケージの水ボトルに100mLのDSS水を満たし、対照マウスにDSSの補給のない同じ量の水を与える。この量は、一般的に5匹のマウスに対して2~3日間は十分なものである。DSSは室温で安定であるが、両方の種類の水を2日ごと、またはボトル内の濁りが認められた場合に交換する。

30

【0632】

腸炎症の急性、慢性および集束性モデルは、DSSの用量(通常1~5%)およびDSS投与の期間を変更することによって達成される(Chassaignら、2014年)。例えば、急性および集束性消化管損傷は、1週間以下にわたるDSSへの単一連続曝露後に達成することができるのに対して、慢性消化管損傷は、回復期間により中断されるDSSの周期的投与(例えば、4サイクルの7日間のDSS処理、と続く7~10日の水)によって一般的に誘導される。

40

【0633】

図53DにFNRプロモーターの制御下のDSSマウスモデルにおいて*in vivo*で産生された酪酸が消化管防衛的であり得ることが示されている。LCN2およびカルプロテクチンは、両方が消化管バリアの破壊(このアッセイでELISAにより測定される)の尺度である。図53DにSyn363(ter置換)がSyn94(野生型ニッスル)と比較して炎症を低減し、かつ/または消化管バリアを保護することが示されている。

[実施例47]

【0634】

50

疾患の進行の *in vivo*でのモニタリング

DSSの初回投与後、単一マウスを空のケージ（床敷き材料を含まない）に15～30分間入れることにより、糞便を各動物から毎日採取する。しかし、DSSの投与が進み、炎症が強くなるにつれて、採取に必要な時間が長くなる。糞便試料は、滅菌済み鉗子を用いて採取し、遠心管に入れる。単一ペレットを用いて、以下の採点法に従って潜血をモニターする：0、正常な糞便の堅さと潜血陰性；1、軟便で、潜血陽性；2、非常に軟便で、微量の血液；および3、水様便で、可視直腸出血。この採点基準は、腸出血の比較解析に用いられる。すべての残存糞便は、炎症マーカーの測定のために確保し、-20℃で凍結する。

【0635】

各動物の体重も毎日測定する。体重は、最初のDSSの投与後の最初の3日間にわずかに増加し、次いで出血の開始後徐々に減少し始める。急性大腸炎のマウスモデルについては、DSSは、一般的に7日間投与する。しかし、この期間は、研究者の裁量で変更することができる。

[実施例48]

【0636】

DSS誘導後の遺伝子操作細菌の *in vivo*有効性

本明細書に記載の遺伝子操作細菌は、HEのDSS誘導動物モデルにおいて試験することができる。細菌は、適切な抗生物質を添加したLB中で一夜増殖させる。次いで細菌を選択抗生物質を含む新鮮なLBで1:100に希釈し、0.4～0.5の光学濃度まで増殖させ、遠心分離によりペレット化する。次いで細菌をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に再懸濁する。細菌の強制経口投与前の7日間にわたり3%DSSを含む飲料水を補給することによって、マウスにおける消化管損傷を誘発させる。DSS処理の7日目に、100μLの細菌（または媒体）をマウスに強制経口投与により投与する。細菌処理を1週間にわたり毎日1回反復し、糞便ホモジネートを選択寒天プレート上で平板培養することによって糞便試料中の細菌を検出する。

【0637】

細菌処理の5日後に、Coloviewシステム(Karl Storz Veterinary Endoscopy, Goleta, CA)を用いて生存マウスにおける消化管損傷を採点する。1.5～2.0%イソフルラン麻酔下のマウスにおいて、結腸を空気で拡張し、近位結腸の約3cmを視覚化することができる(Chassaingら、2014年)。内視鏡的損傷は、最大スコアが18となる、結腸の透過性(スコア0～3)、腸壁へのフィブリンの付着(スコア0～3)、粘膜顆粒度(スコア0～3)、血管病変(スコア0～3)、糞便の特性(正常～下痢；スコア0～3)および内腔における血液の存在(スコア0～3)を評価することにより採点する。マウスを屠殺し、実施例8および9で述べたプロトコルを用いて結腸組織を単離する。遠位結腸切片を固定し、炎症および潰瘍形成について採点する。残りの結腸組織をホモジナイズし、サイトカインレベル(例えば、IL-1、TNF-、IL-6、IFN- およびIL-10)ならびにミエロペルオキシダーゼ活性を下で述べる方法を用いて測定する。

[実施例49]

【0638】

HEのげっ歯類モデルの安楽死処置法

屠殺の4および24時間前に、5-ブromo-2'-デオキシウリジン(BrdU)(Invitrogen, Waltham, MA; カタログ番号B23151)を供給業者の推奨の通りに、マウスに腹腔内投与することができる。BrdUを用いて、標準抗BrdU抗体(Abcam, Cambridge, MA)を用いた免疫組織化学により腸上皮細胞の増殖および/または移動をモニターする。

【0639】

屠殺の当日に、マウスに4時間絶食させ、次いでFITC-デキストラントレーサー(4kDa、0.6mg/g体重)を強制経口投与する。糞便ペレットを採取し、FITC

10

20

30

40

50

- デキストラン投与後3時間目にマウスを安楽死させる。次いで動物の心臓から採血して、無溶血血清を採取する。腸透過性は、適切に希釈された血清の蛍光強度（励起488nm、発光520nm）と相関しており、分光光度法を用いて測定する。マウス血清中の既知量のFITC-デキストランの連続希釈を用いて、標準曲線を作成する。

【0640】

あるいは、腸炎症は、血清ケラチノサイト由来ケモカイン（KC）、リポカリン2、カルプロラクチンおよび/またはCRP-1のレベルにより定量する。これらのタンパク質は、炎症性疾患の活動性の信頼できるバイオマーカーであり、製造業者の指示に従って、DuoSet ELISAキット（R&D Systems、Minneapolis、MN）を用いて測定する。これらのアッセイについては、対照血清試料は、KCについて1:2または1:4に、リポカリン2について1:200に希釈する。DSS処理マウスからの試料は、相当高い希釈を必要とする。

10

[実施例50]

【0641】

肝性脳症の非肥満糖尿病（NOD）モデル

NODマウスは、消化管バリア増強回路、例えば、酪酸生合成カセットを含む細菌の有効性を試験するための*in vivo*モデルとして用いることができる。

その理由は、これらのマウスは、密着結合タンパク質（例えば、オクルジン、ゾニユラオクルジン、ムチン、E-カドヘリン）のレベルの低下によって明らかである、顕著な「漏出性消化管」表現型を示すからである。

20

【0642】

「漏出性消化管」に関連する症状を軽減するアルギニンおよび酪酸産生回路を含む菌株の有効性を判定するために、NODマウスモデルを用いる。NODマウスは、脾臓細胞の自己免疫性破壊に起因する。ニッスル対照（SYN-UCD107、カナマイシン耐性ニッスル）、アルギニン産生菌株（SYN-UCD305）、酪酸産生菌株（SYN-UCD502）ならびに酪酸およびアルギニンの両方を産生する菌株（SYN-UCD605）を本試験において比較する。消化管上皮の完全性（オクルジンおよび他の密着結合マーカー）ならびに消化管炎症（炎症性バイオマーカー、例えば、IL-1A、IL-6、TNF α 、IL-21）が本試験の主要なエンドポイントである。動物の全般的な健康状態が本試験の副次的エンドポイントである。試験の期間は、8週間である。

30

【0643】

動物（C57BL6、8週齢）をH₂O対照（n=12）または酪酸100mM（n=12）、もしくはアルギニン産生SYN-UCD305（n=12；ArgR、malEK遺伝子座において染色体に組み込まれたPfnrS-ArgAfbbr、ThyAを含み、抗生物質耐性を含まない）もしくは酪酸産生SYN-UCD502（n=12；野生型ArgR、無FNR-ArgAfbbr、野生型ThyA、および染色体に組み込まれたPydfZ-ter酪酸カセットを含む）もしくはSYN-UCD605（n=12；ArgR、malEK遺伝子座において染色体に組み込まれたPfnrS-ArgAfbbr、ThyA、染色体に組み込まれたPydfZ-ter酪酸カセットを含み、抗生物質耐性を含まない）の強制経口投与により治療する。細菌は、100 μ lの容量で $>10e10$ 細胞/mlの用量で投与する。

40

【0644】

いくつかの実施形態では、SYN-UCD501（野生型ArgR、無FNR-ArgAfbbr、野生型ThyAおよびLogic156（pSC101 PydfZ-ter酪酸プラスミド；amp耐性）を含む）ならびにSYN-UCD602（ArgR、malEK遺伝子座において染色体に組み込まれたPfnrS-ArgAfbbr、ThyAおよびLogic156（pSC101 PydfZ-ter酪酸プラスミド；amp耐性）を含む）をSYN-UCD502およびSYN-UCD605の代わりに用いる。

【0645】

50

1日目に、マウスの体重を測定し、無作為化する。動物に100 μ lのH₂O、100mM酪酸、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605を午前に強制経口投与する。動物に100 μ lのH₂O、100mM酪酸、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605を午後に強制経口投与する。動物に100 μ lのH₂O、100mM酪酸、SYN-UCD305、SYN-UCD502またはSYN-UCD605を1日2回強制経口投与する。動物の体重を毎日測定する。

【0646】

5日目に、マウスを4時間絶食させ、次いで0.6mg/g FITC-デキストラン(40kD)を強制経口投与する。FITC-dexの投与後3時間目にマウス体重を測定し、心臓採血により血液を採取し、結腸および糞便ペレットを採取する。

10

【0647】

ハプトグロビン/ゾヌリンおよびLcn2を測定する。TJP1、OCLN、CLDN25およびEPCAMのRNAレベルを結腸試料において測定する(これらのマーカーのレベルの増加は治療効果を示す)。炎症バイオマーカーのRNAレベルを血液試料において測定する(これらのマーカーのレベルの低下は治療効果を示す)。

[実施例51]

【0648】

GABA輸送および代謝回路

上述のアンモニア変換回路に加えて、大腸菌ニッスル細菌は、1つもしくは複数のGABA輸送および/または1つもしくは複数のGABA代謝回路をさらに含む。少なくとも1つのGABA輸送回路を含む遺伝子操作菌株は、GabP(配列番号105、表48;配列番号106、表49)などの、例示的GABA輸送タンパク質をコードする遺伝子を含み、上述の方法を用いて構築される。少なくとも1つのGABA代謝回路を含む遺伝子操作菌株は、GSSTおよびSSDHを含むが、これらに限定されない、GABA代謝に必要な酵素をコードする遺伝子を含み、上述の方法を用いて構築される。

20

【0649】

GabP、GSSTおよびSSDHをコードする遺伝子は、テトラサイクリン誘導性プロモーター、配列番号18~29から選択されるFNRプロモーターまたはHE関連分子もしくは代謝物により誘導されるプロモーターの制御下に発現する。GabP、GSSTおよびSSDHをコードする遺伝子は、同じまたは異なるプロモーターの制御下に発現し得る。本明細書に記載の通り、他のプロモーターを用いることができる。GabP、GSSTおよびSSDHをコードする遺伝子は、高コピープラスミド、低コピープラスミドまたは染色体上に発現する。GabP、GSSTおよびSSDHをコードする遺伝子は、大腸菌ニッスルにおける次の挿入部位:malE/K、araC/BAD、lacZ、thyA、malP/Tのうちの1つまたは複数において細菌ゲノムに挿入される。任意の適切な挿入部位を用いることができる。例えば、図18を参照されたい。

30

【0650】

【表 5 0】

表 4 8

G a b P 輸送体のアミノ酸配列 (配列番号 1 0 5)	
MGQSSQPHELGGGLKSRHVTMLSIAGVIGASLFGVSSVAIAEAGPAVLLAYLFAGLLVV	
MIMRMLAEMAVATPDTGSFSTYADKAIGRWAGYTIWLYWVFWLVIPLEANIAAMILH	
SWVPGIPIWFLSLVITLALTGSNLLSVKNYGEFEFWLALCKVIAILAFIFLGAVAISGF	
YPYAEVSGISRLWDSGGFMPNGFGAVLSAMLITMFSFMGAEIVTIAAAESDTPEKHIVR	
ATNSVIWRISIFYLCSIFVVVALIPWNMPGLKAVGSYRSVLELLNIPHAKLIMDCVILL	
SVTSCLNALYTAARMLYLSRREGDAPAVMGKINRSKTPYVAVLLSTGAAFLTVVVNYY	10
APAKVFKFLIDSSGAIALLVYLVIQVLRMRKILRAEGSEIRLRMWLYPWLTLVIGF	
ITFVLVVMLFRPAQOLEVISTGLLAIGIICTVPIMARWKKLVLWQKTPVHNTR	

【表 5 1 - 1】

表 4 9

G a b P 輸送体のコドン最適化ポリヌクレオチド配列 (配列番号 1 0 6)	
ATGGGACAGTCTTACAACACACGAACCTGGGGGTGGATTGAAATCGCGCCATGTGAC	
CATGTTAAGTATCGCAGGCGTGATTGGCGCCTCCTTATTTGTGGGGTCCCGTGGCGA	20
TTGCAGAGGCGGGTCCGGCTGTACTTTTGGCATATCTTTTTGCGGGTTACTGGTTGTG	
ATGATCATGCGCATGCTTGCCGAAATGGCTGTGGCCACGCCGACACGGGGTCATTTTC	
CACTTATGCGGACAAGGCGATTGGCCGCTGGGCCGGGTACACAATCGGGTGGCTGTATT	
GGTGGTTCTGGGTGTTAGTTATCCCCTTGGAGGCCAACATCGCCGCAATGATTCTGCAC	
TCCGGGTTCCGGGTATCCCGATCTGGCTGTTCAGCTTGGTGATCACCTGGCACTGAC	
GGGCAGCAACTTATTGAGTGTGAAAACTATGGAGAGTTTGAATTTTGGCTGGCCCTGT	
GTAAAGTCATTGCTATCTTGGCATTCAATTTTTTAGGAGCGGTAGCAATCAGTGGCTTC	
TACCTTATGCAGAAGTTTCGGGGATTTCCCGTCTTTGGGATAGTGGCGGATTCATGCC	
AAACGGGTTTGGAGCTGTACTGTCAGCCATGTTGATTACCATGTTTAGCTTTATGGGTG	
CCGAGATCGTGACAATCGCCGCAGCCGAGAGTGATACCCCGGAAAAGCACATTGTTCGT	30

【表 5 1 - 2】

GCGACGAATTCGGTAATTTGGCGTATTTTCGATTTTTTACTTATGCTCCATTTTCGTTGT	
GGTTCGCCCTTATCCCCTGGAACATGCCAGGCTTAAAAGCAGTAGGCAGCTACCGCTCAG	
TCCTGGAATTACTGAACATTCTCACGCGAAGTTAATTATGGATTGCGTAATCCTGTTA	
TCGGTAACGAGCTGCCTTAACAGTGCTCTGTACACGGCTTACGTATGCTGTACTCTTT	
AAGTCGCCCGTGGCGATGCACCTGCCGTTATGGGCAAGATTAACCGCAGTAAGACGCCGT	
ATGTAGCTGTTTTGCTGTGCGACTGGAGCTGCGTTTTCTTACAGTCGTAGTAAACTATTAC	40
GCACCAGCTAAAGTTTTCAAATTCCTTATTGATTTCGCTGGGGCAATCGCACTTCTGGT	
GTACCTGGTCATCGCGGTGTCACAACCTTCGCATGCGCAAGATCTTGGCTGCGGAGGGCA	
GTGAGATTCGTTTTCGCTATGTGGCTGTATCCGTGGCTGACGTGGCTTGTATTGGTTTC	
ATTACTTTTGTGTTGGTAGTGATGCTGTTTCGTCCAGCGCAACAGCTGGAGGTGATTTTC	
TACCGGACTGTTGGCAATCGGCATCATCTGTACCGTCCCAATCATGGCTCGCTGGAAAA	
AGTTGGTCTTATGGCAGAAGACCCCTGTACACAACACCCGT	

【 0 6 5 1】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 106 の核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 106 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 106 の DNA 配列もしくはその機能性断片、または遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 106 と同じポリペプチドをコードする核酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 相同である核酸配列を含む。

[実施例 52]

【0652】

マンガン輸送回路

上述の回路に加えて、大腸菌ニッスル細菌は、1つもしくは複数のマンガン輸送回路をさらに含む。少なくとも1つのマンガン輸送回路を含む遺伝子操作菌株は、MntH (配列番号 107、表 50; 配列番号 108、表 51) などの、例示的マンガン輸送タンパク質をコードする遺伝子を含み、上述の方法を用いて構築される。

【0653】

MntH をコードする遺伝子は、テトラサイクリン誘導性プロモーター、配列番号 18 ~ 29 から選択される FNR プロモーターまたは HE 関連分子もしくは代謝物により誘導されるプロモーターの制御下に発現する。本明細書に記載の通り、他のプロモーターを用いることができる。MntH をコードする遺伝子は、高コピープラスミド、低コピープラスミドまたは染色体上に発現する。MntH をコードする遺伝子は、大腸菌ニッスルにおける次の挿入部位: malE/K、araC/BAD、lacZ、thyA、malP/T のうちの1つまたは複数において細菌ゲノムに挿入される。任意の適切な挿入部位を用いることができる。例えば、図 18 を参照されたい。

【0654】

【表 52】

表 50

MntH 輸送体のアミノ酸配列 (配列番号 107)
MTNYRVESSSGRAARKMRLALMGPAFIAAIGYIDPGNFATNIQAGASFGYQLLWVVVWA
N
LMAMLIQILSAKLG IATGKNLAEQIRDHYPRPVVWFYVWQAEI IAMATDLAEFIGAAIG
F
KLILGVSL LQGA VLTGIATFLILMLQRRGQKPLEKVIGGLLLFVAAAYIVELIFSQPNL
A
QLGKGMVIPS LPTSEAVFLAAGVLGATIMPHVIY L HSSLTQH LHGGSRQQRYSATKWDV
A
IAMTIAGFVN LAMMATAAAAFHFSGHTGVADLDEAYLTLQPLL SHAAATVFGLSLVAAG
L
SSTVVGTLA GQVVMQGFIRFHIPLWVRRRTVTMLPSFIVILMGLDPTRILVMSQVLLSFG
I
ALALVPLLIFTSDSKLMGDLVNSKRVKQTGWVIVVLLVVALNIWLLVGTALGL

【0655】

10

20

30

40

【表 5 3】

表 5 1

M n t H 輸送体のポリヌクレオチド配列 (配列番号 1 0 8)	
ATGACCAATTATCGTGTTGAAAGTAGTAGTGGCCGCGCGGCTCGTAAAATGCGTCTGGC	
CTTAATGGGCCCGGCGTTTTATTGCTGCGATTGGATACATTGATCCGGGCAATTTTCGCTA	
CAAACATCCAAGCAGGTGCATCCTTCGGTTACCAGCTTCTGTGGGTAGTGGTATGGGCT	
AACCTGATGGCCATGCTTATTCAAATTCCTTCAGCTAAGCTTGGTATTGCCACAGGAAA	
GAATTTAGCCGAGCAGATTTCGTGACCACTATCCCCGCCCGTGGTCTGGTTCTATTGGG	
TCCAGGCAGAGATTATCGCGATGGCGACTGATTTAGCCGAATTTATTGGGGCAGCTATT	10
GGATTTAAGCTGATCCTTGGCGTATCTCTGTGCAAGGCGCGGTATTGACCGGAATTGC	
AACCTTTTGGATTCTTATGTTGCAACGTTCGTGGGCAGAAGCCTCTGGAAAAAGTCATCG	
GCGGGTTATTGCTTTTGTGGCCGCGGCTACATTGTGGAAGTCTTTTCTCAACCT	
AACCTGGCGCAGCTTGGTAAAGGCATGGTAATCCCGTCACTTCCTACATCTGAGGCAGT	
ATTCTTAGCAGCCGGCGTCTTGGGCGCAACTATCATGCCCCATGTCATCTACTTACACA	
GTTCTCTGACTCAGCACTTACACGGTGGGTTCGCGCAACAGCGTTACTCCGCAACAAAG	
TGGGACGTTGCAATTGCCATGACCATTGCCGGTTTTGTAACTGGCGATGATGGCCAC	
GGCTGCTGCCGCTTTCATTTTCAGTGGCCACACTGGTGTAGCCGATCTGGATGAGGCAT	
ACCTGACCTTGCAGCCTCTGTTGTCTCATGCAGCCGCCACCGTTTTTGGTTTAAGCTTA	
GTAGCCCGCGGCTTGAGTAGCACGGTGGTAGGCACATTGGCTGGACAGGTCGTGATGCA	
AGGTTTTATTTCGTTTCCATATTCCGTTATGGGTACGTCGCACGGTAACGATGCTGCCGT	20
CATTTATCGTCATCCTGATGGGATTAGACCCGACGCGCATCCTGGTAATGTCGCAAGTT	
TTACTGAGCTTTGGAATCGCGTTGGCCCTGGTGCCATTACTTATCTTCACTAGCGATAG	
TAAGTTGATGGGTGATCTTGTCAATAGCAAACGTGTGAAGCAAACAGGCTGGGTCATTG	
TGGTACTGGTTGTGGCCTTAAACATTTGGTTGTTAGTGGGCACGGCCCTTGGCTTG	

[実施例 5 3]

【 0 6 5 6 】

T e s B を含む回路

T e s B の核酸配列は、以下のように翻訳される。

【 0 6 5 7 】

10

20

30

【表 5 4】

表 5 2 T e s B 配列

<p><i>tesB</i> 配列番号 4 8</p>	<p>ATGAGTCAGGCGCTAAAAAATTTACTGACATTGTTAAATCTGGAAAAAAT TGAGGAAGGACTCTTTTCGCGGCCAGAGTGAAGATTTAGGTTTACGCCAGG TGTTTGGCGGCCAGGTTCGTGGGTTCAGGCCTTGTATGCTGCAAAGAGACC GTCCTGAAGAGCGGCTGGTACATTCGTTTCACAGCTACTTTCTTCGCC TGGCGATAGTAAGAAGCCGATTATTTATGATGTCGAAACGCTGCGTGACG GTAACAGCTTCAGCGCCCGCGGGTTGCTGCTATTCAAACGGCAAACCG ATTTTTTATATGACTGCCTCTTTCCAGGCACCAGAAGCGGGTTTCGAACA TCAAAAAACAATGCCGTCCGCGCCAGCGCCTGATGGCCTCCCTTCGAAAA CGCAAATCGCCCAATCGCTGGCGCACCTGCTGCCGCCAGTGCTGAAAGAT AAATTCATCTGCGATCGTCCGCTGGAAGTCCGTCGGTGGAGTTTCATAA CCCCTGAAAAGTTCAGTTCGAGAACCACATCGTCAGGTGTGGATCCGCG CAAATGGTAGCGTGCCGGATGACCTGCGCGTTCATCAGTATCTGCTCGGT TACGCTTCTGATCTTAACTTCTGCCGGTAGCTCTACAGCCGCACGGCAT CGTTTTTCTCGAACCGGGGATTCAGATTGCCACCATTGACCATTCCATGT GGTTCATCGCCCGTTTAAATTTGAATGAATGGCTGCTGTATAGCGTGGAG AGCACCTCGGCGTCCAGCGCACGTGGCTTTGTGCGCGGTGAGTTTTATAC CCAAGACGGCGTACTGGTTGCCTCGACCGTTCAGGAAGGGGTGATGCGTA ATCACAATTAA</p>	10
<p><i>tesB</i>: 配列番号 1 0 9</p>	<p>MSQALKNLLTLLNLEKIEEGLFRGQSEDLGLRQVFGGQVVGQALYAAKET VPEERLVHSFHSYFLRPGDSKKPIIYDVETLRDGNFSFARRVAAIQNGKP IFYMTASFQAPEAGFEHQKTMPSAPAPDGLPSETQIAQSLAHLPPVLKD KFICDRPLEVRPVEFHNPLKGHVAEPHRQVWIRANGSVPDDLVRVHQLLLG YASDLNFLPVALQPHGIGFLEPGIQIATIDHSMWFHRPFNLNEWLLYSVE STSASSARGFVRGEFYTDQDGLVLAHVQEGVMRHNH</p>	20

【 0 6 5 8 】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 1 0 9 のアミノ酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 1 0 9 のアミノ酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 9 % 相同であるアミノ酸配列、あるいは、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 1 0 9 と同じポリペプチドまたはその機能性断片をコードする核酸配列を含む。

【 0 6 5 9 】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 9 1 のアミノ酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 9 1 のアミノ酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 9 % 相同であるアミノ酸配列、あるいは、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 9 1 と同じポリペプチドまたはその機能性断片をコードする核酸配列を含む。

【 0 6 6 0 】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 9 3 のアミノ酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 9 3 のアミノ酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 9 % 相同であるアミノ酸配列、あるいは、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 9 3 と同じポリペプチドまたはその機能性断片をコードする核酸配列を含む。

30

40

50

【 0 6 6 1 】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 95 のアミノ酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 95 のアミノ酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 相同であるアミノ酸配列、あるいは、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 95 と同じポリペプチドまたはその機能性断片をコードする核酸配列を含む。

【 0 6 6 2 】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 97 のアミノ酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 97 のアミノ酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 相同であるアミノ酸配列、あるいは、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 97 と同じポリペプチドまたはその機能性断片をコードする核酸配列を含む。

10

【 0 6 6 3 】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 99 のアミノ酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号 99 のアミノ酸配列またはその機能性断片と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 相同であるアミノ酸配列、あるいは、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号 99 と同じポリペプチドまたはその機能性断片をコードする核酸配列を含む。

20

【 0 6 6 4 】

【表 5 5 - 1】

表 5 3. FNRS - f b r A r g A および無抗生物質耐性

説明	配列	配列番号
ターミネーター 配列	<u>CAAATAAAATGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCC</u> <u>TTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTTCGGTGAACGCTCTC</u> <u>CTGAGTAGGACAAAT</u>	配列番号 110
ターミネーター	<u>AGAAGGCCATCTGACGGATGGCCTTTT</u>	配列番号 111
FRT 部位	<u>GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGG</u> <u>AATAGGAACTA</u>	配列番号 112
FNRS プロモーター	<u>GTACCAGTTGTTCTTATTGGTGGTGTGCTTTATGG</u> <u>TTGCATCGTAGTAAATGGTTGTAACAAAAGCAATTT</u> <u>TTCCGGCTGTCTGTATACAAAAACGCCGTAAAGTTT</u> <u>GAGCGAAGTCAATAAACTCTCTACCCATTCAGGGCA</u> <u>ATATCTCTCTTGGATCC</u>	配列番号 113
ArgAfbr	<u>ATGGTAAAGGAACGTA AAACCGAGTTGGTTCGAGGGA</u> <u>TTCCGCCATTCGGTTC CCTGTATCAATACCCACCGG</u> <u>GGAAAACGTTTGT CATCATGCTCGGCCGGTGAAGCC</u> <u>ATTGAGCATGAGAA TTTCTCCAGTATCGTTAATGAT</u> <u>ATCGGGTTGTTGCACAGCCTCGGCATCCGCTCGGTG</u> <u>GTGGTCTATGGCGCACGTCCGCAGATCGACGCAAAT</u> <u>CTGGCTGCGCATCACCACGAACCGCTGTATCACAAG</u> <u>AATATACGTGTGACCGACGCCAAAACACTGGAAC TG</u> <u>GTGAAGCAGGCTGCGGGAACATTGCAACTGGATATT</u> <u>ACTGCTCGCCTGTCGATGAGTCTCAATAACACGCCG</u> <u>CTGCAGGGCGCGCATATCAACGTCGTCAGTGGCAAT</u> <u>TTTATTATTGCCAGCCGCTGGGCGTCGATGACGGC</u> <u>GTGGATTACTGCCATAGCGGGCGTATCCGGCGGATT</u> <u>GATGAAGACCGGATCCATCGTCAAC TGGACAGCGGT</u> <u>GCAATAGTGCTAATGGGGCCGGTCGCTGTTTCAGTC</u> <u>ACTGGCGAGAGCTTTAACCTGACCTCGGAAGAGATT</u> <u>GCCACTCAACTGGCCATCAAAC TGAAGCTGAAAAG</u> <u>ATGATTGGTTTTTGTCTTTCCAGGGCGTCACTAAT</u> <u>GACGACGGTGATATTGTCTCCGAAC TTTTCCCTAAC</u> <u>GAAGCGCAAGCGCGGGTAGAAGCCAGGAAGAGAAA</u> <u>GGCGATTACAAC TCCGGTACGGTGCCTTTTTGCGT</u> <u>GGCGCAGTGAAAAGCCTGCCGCAGCGGCGTGCGTCGC</u> <u>TGTCATTTAATCAGTTATCAGGAAGATGGCGCGCTG</u> <u>TTGCAAGAGTTGTTCTCACGCGACGGTATCGGTACG</u> <u>CAGATTGTGATGGAAAGCGCCGAGCAGATTCGTCGC</u> <u>GCAACAATCAACGATATTGGCGGTATTCTGGAGTTG</u> <u>ATTCGCCCACTGGAGCAGCAAGGTATTCTGGTACGC</u> <u>CGTTCGCGAGCAGCTGGAGATGGAAATCGACAAA</u> <u>TTACCATTATTCAGCGCGATAACACGACTATTGCC</u> <u>TGCGCCGCGCTCTATCCGTTCCCGGAAGAGAAGATT</u>	配列番号 114

10

20

30

40

【表 5 5 - 2】

	GGGAAATGGCCTGTGTGGCAGTTCACCCGGATTAC CGCAGTTCATCAAGGGGTGAAGTTCCTGCTGGAACGC ATTGCCGCTCAGGCTAAGCAGAGCGGCTTAAGCAAA TTGTTTGTGCTGACCACGCGCAGTATTCCTGTTTC CAGGAACGTGGATTTACCCAGTGGATATTGATTTA CTGCCGAGAGCAAAAAGCAGTTGTACAACCTACCAG CGTAAATCCAAAGTGTGATGGCGGATTTAGGGTAA		
	<u>GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGG AATAGGAACTTC</u>	配列番号 115	10
KanR遺伝子	<i>atgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccg gccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgg gcacaacagacaatcggctgctctgatgccgctg ttccggctgtcagcgcagggcgcccgggtcttttt gtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactg caggacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacg acgggcttcttgcgcagctgtgctcgactgtgct actgaagcgggaaggactggctgctattgggcgaa gtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgct cctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatg cggcggctgcatacgttgatccggctacctgcca ttcgaccaccaagcgaacatcgcatcgagcgagca cgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggat gatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagcc gaactgttcgccaggctcaaggcgcgcatgcccgac ggcgaggatctcgtcgtgacctatggcgatgcctgc ttgccgaatatcatggtggaatggccgcttttct ggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggac cgctatcaggacatagcgttggctacctgataatt gctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttc ctcgtgctttacggtatcggcgtcccgattcgcag cgcatcgccttctatcgccttcttgacgagttcttc tgagcgggactctggggttcgaaatgaccgaccaag cgacgcccacactgccatcacgagatttcgattcca ccgccccttctatgaaaggttgggcttcggaatcg ttttccgggacgccggctggatgatcctccagcgcg gggatctcatgctggagtcttcgcccaccccagct tcaaaagcgctct</i>	配列番号 116	20
KanR プロモーター	<u>ggttgggaagccctgcaaagtaaactggatggcttt cttgccgccaaggatctgatggcgcaggggatcaag atctgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgc</u>	配列番号 117	30
CamR遺伝子	<u>TCATCGCAGTACTGTTGTATTTCATTAAGCATCTGCC GACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACCTG AATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCCT ATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGCGAAGAA GTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAACTGGT GAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACAT ATTCTCAATAAACCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTT TTCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTG TAGAACTGCCGGAATCGTCGTGGTATTCACTCCA GAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAAC</u>	配列番号 118	40

【表 5 5 - 3】

	GGTGTAAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAG CTCACCGTCTTTTCATTGCCATACGTAATCCGGATG AGCATTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGC CGGATAAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTT TAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTT ATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAA ATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGT GGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCAT	
CamR プロモーター	TTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGACAACCTC AAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTCATTATG GTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTC TCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCCCAGG ATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCTGCGAA GTGATCTTCCGTACAGGTAGGCGCGCC G	配列番号 119

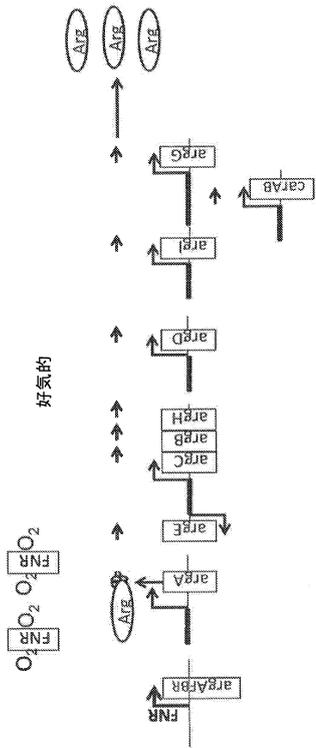
10

20

【0665】

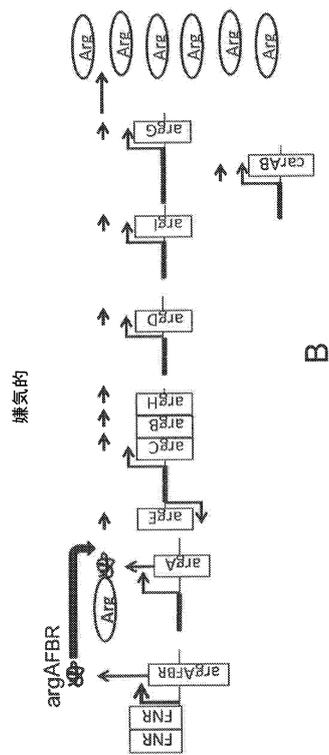
いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号101のアミノ酸配列またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作細菌は、配列番号101のアミノ酸配列またはその機能性断片と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%相同であるアミノ酸配列、あるいは、遺伝コードの重複性を別とすれば、配列番号101と同じポリペプチドまたはその機能性断片をコードする核酸配列を含む。

【 図 1 - 1 】



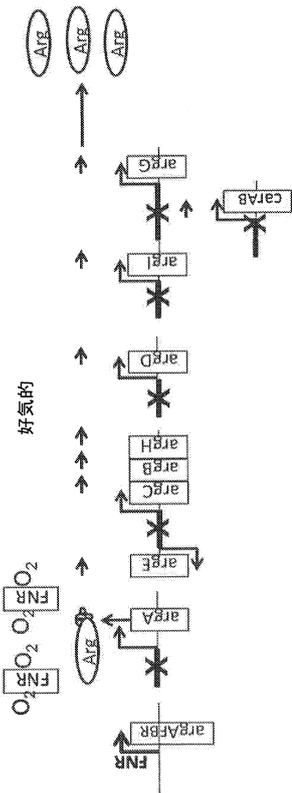
A

【 図 1 - 2 】



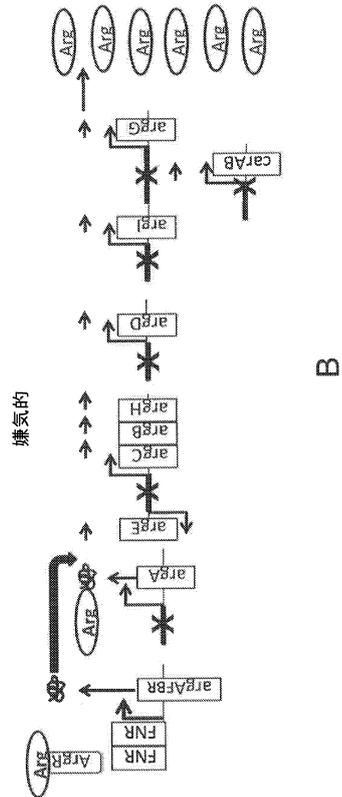
B

【 図 2 - 1 】



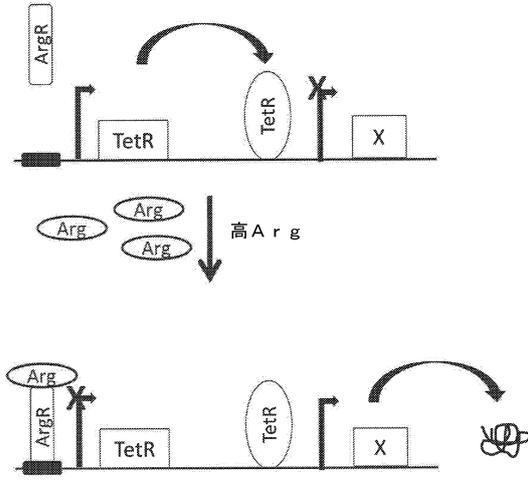
A

【 図 2 - 2 】

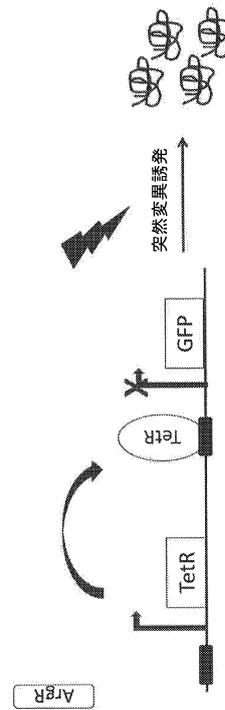


B

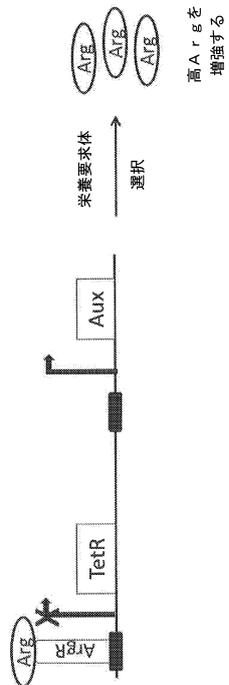
【 図 3 】



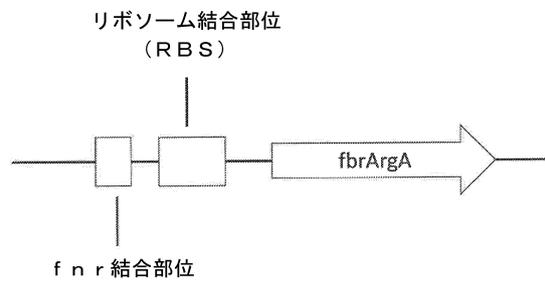
【 図 4 】



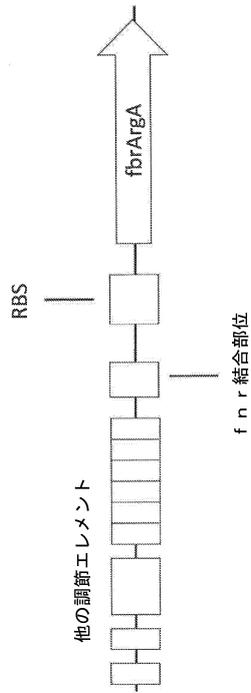
【 図 5 】



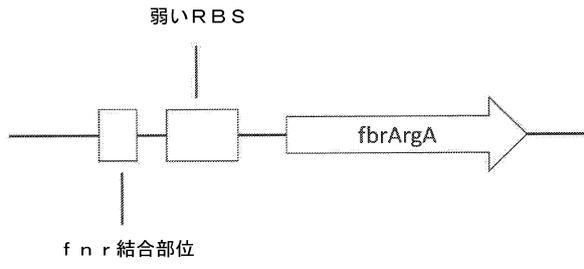
【 図 6 】



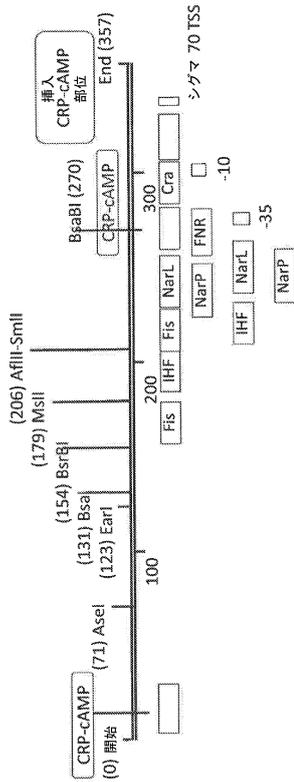
【 図 7 】



【 図 8 】

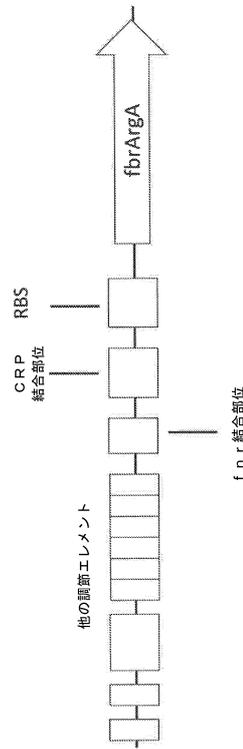


【 図 9 - 1 】



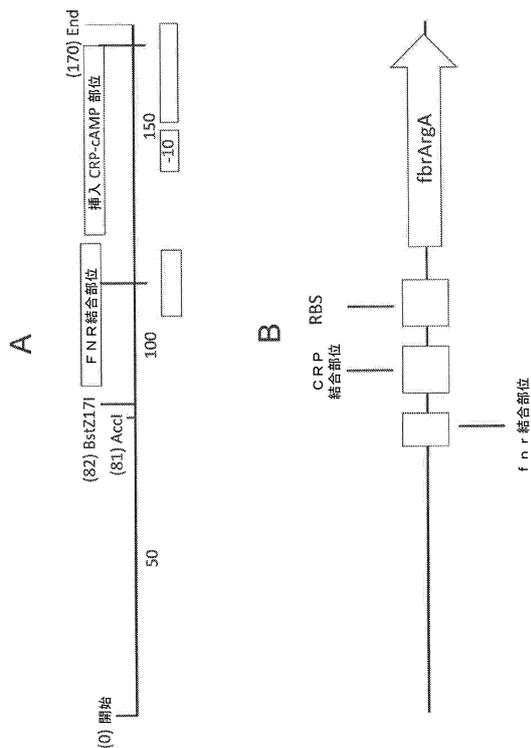
【 図 9 - 2 】

A

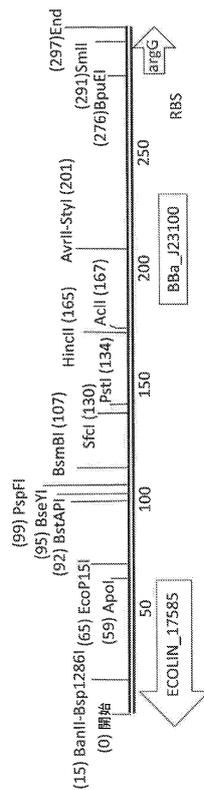


B

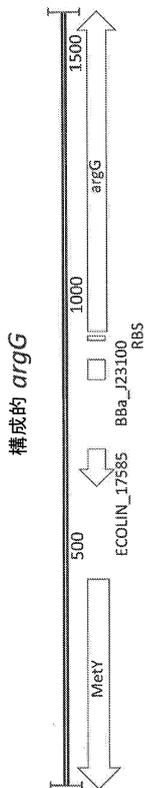
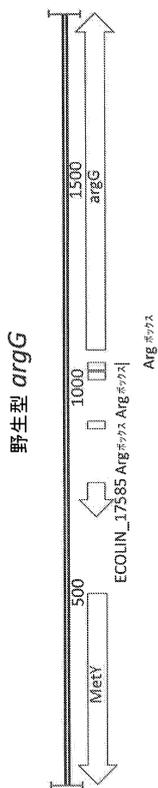
【 図 1 0 】



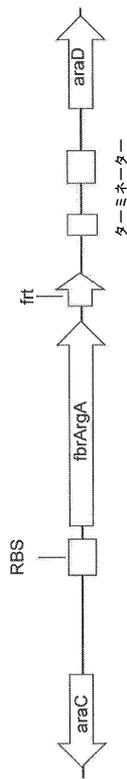
【 図 1 1 】



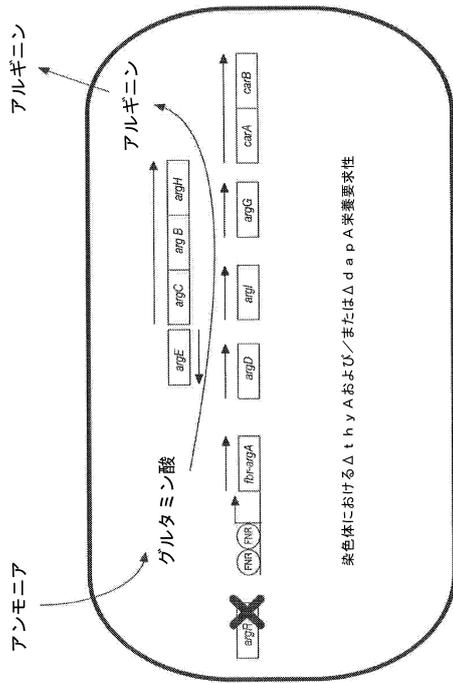
【 図 1 2 】



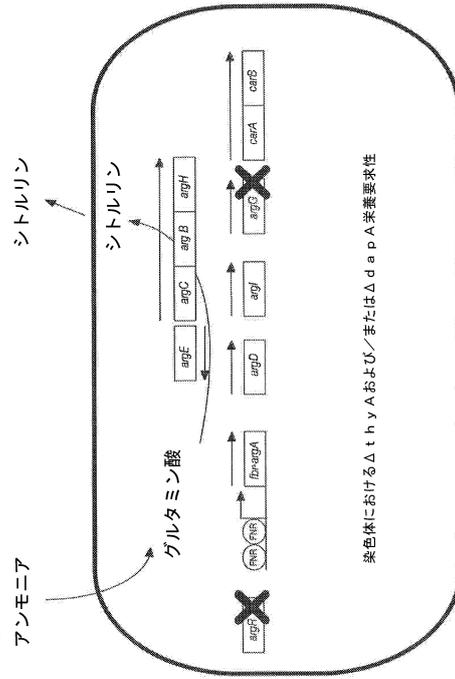
【 図 1 3 】



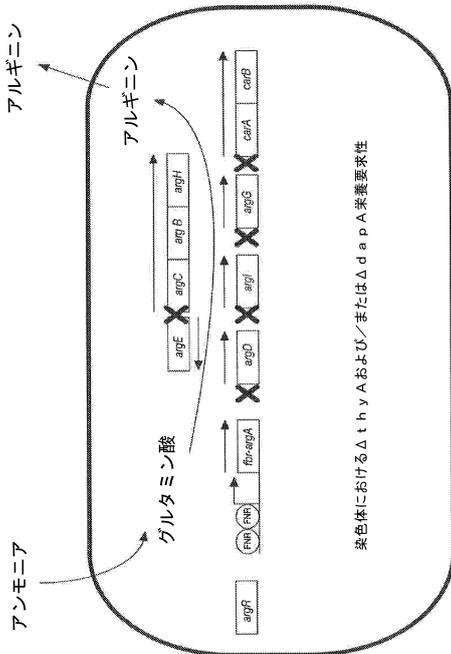
【 図 1 4 】



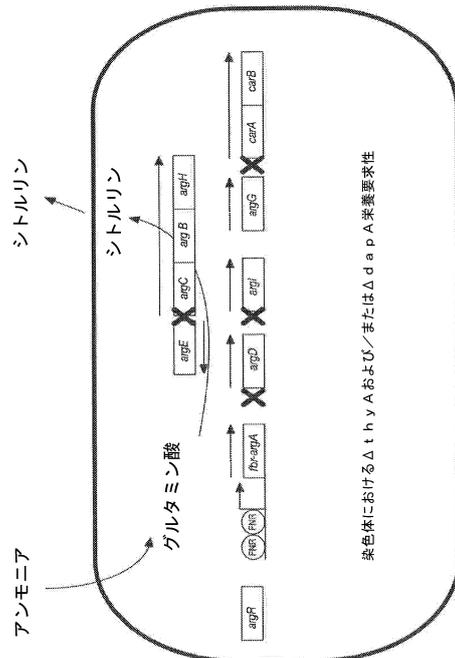
【 図 1 5 】



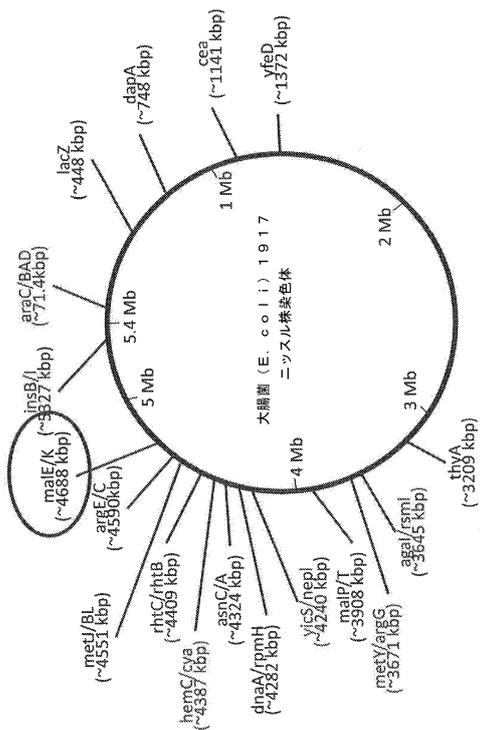
【 図 1 6 】



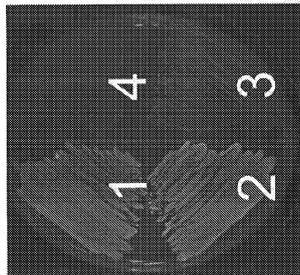
【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



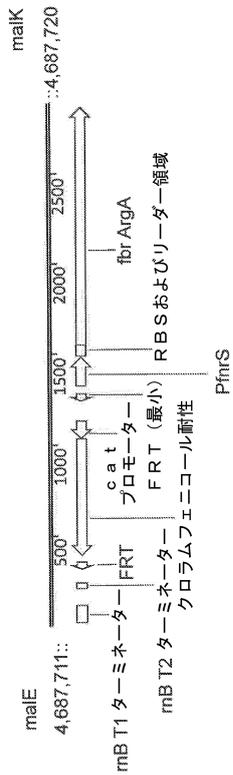
【 図 1 9 】



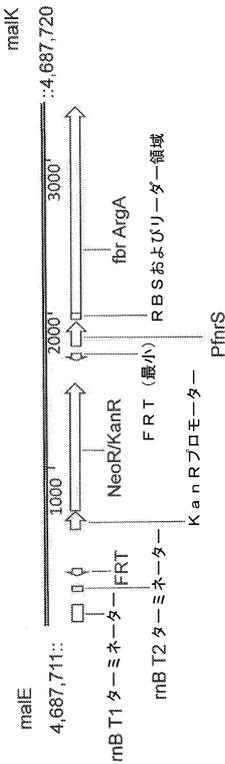
以下の3つの位置に組み込まれた
構成的RFPの輝度:

1. AraB/C
2. MalE/K
3. MetY/ArgG
4. ニッスル (非蛍光)

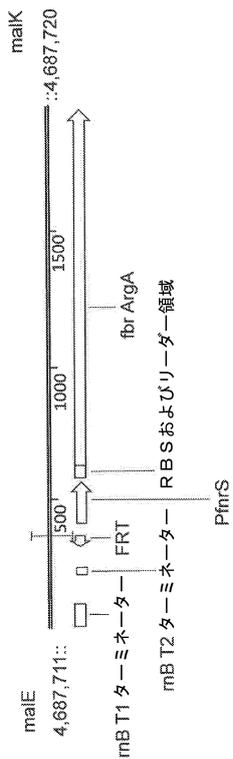
【 図 2 0 】



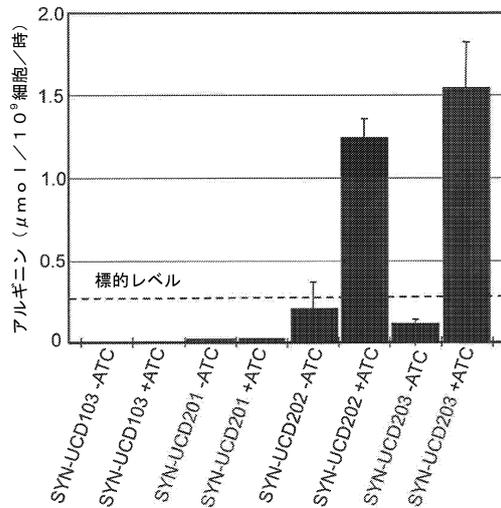
【 図 2 1 】



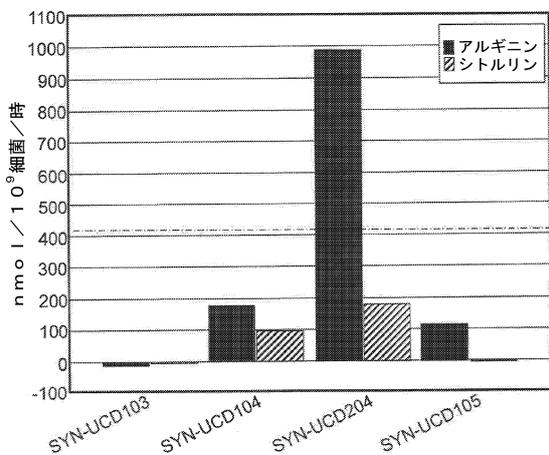
【 図 2 2 】



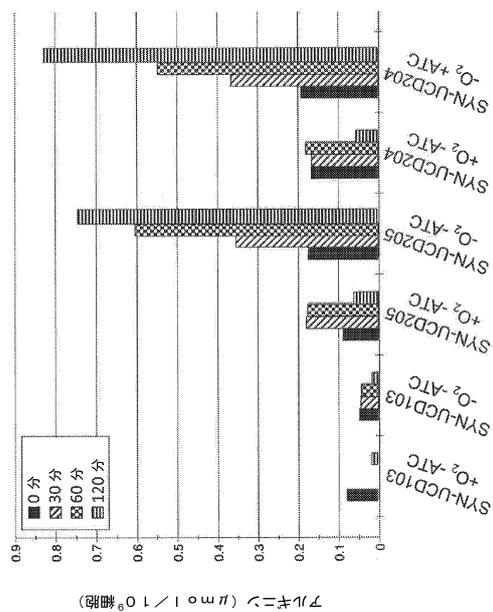
【 図 2 3 】



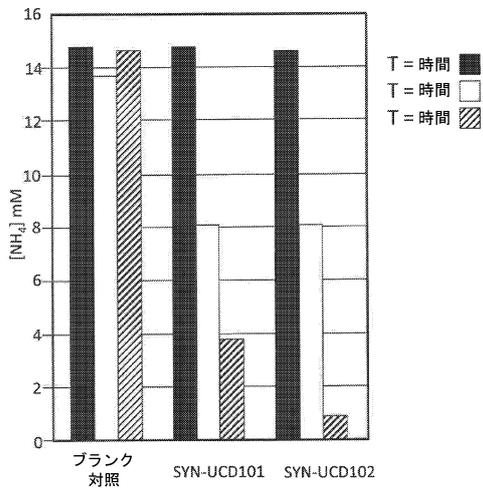
【 図 2 4 】



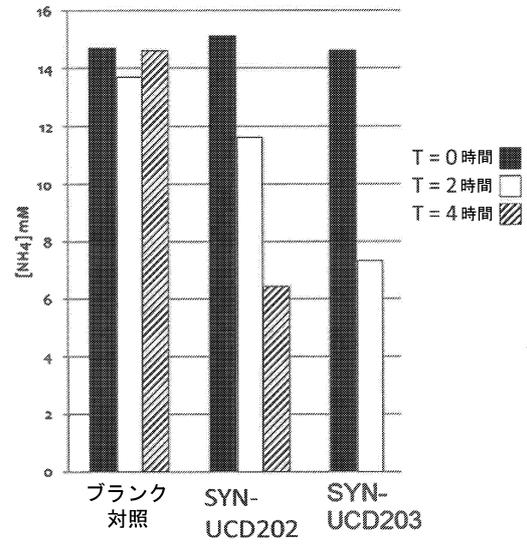
【 図 2 5 】



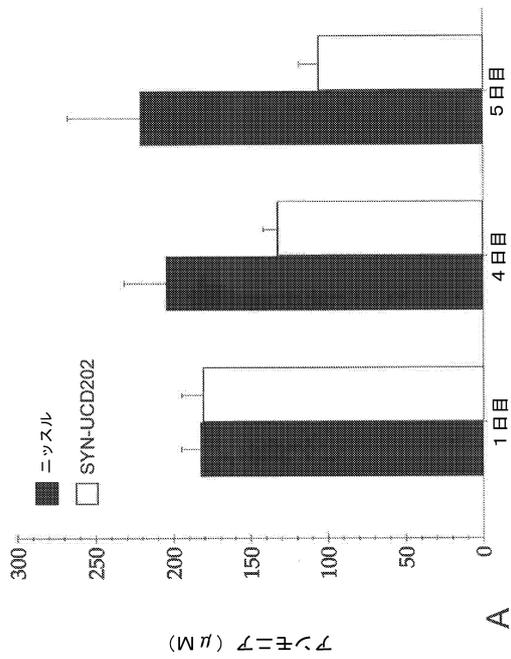
【図26】



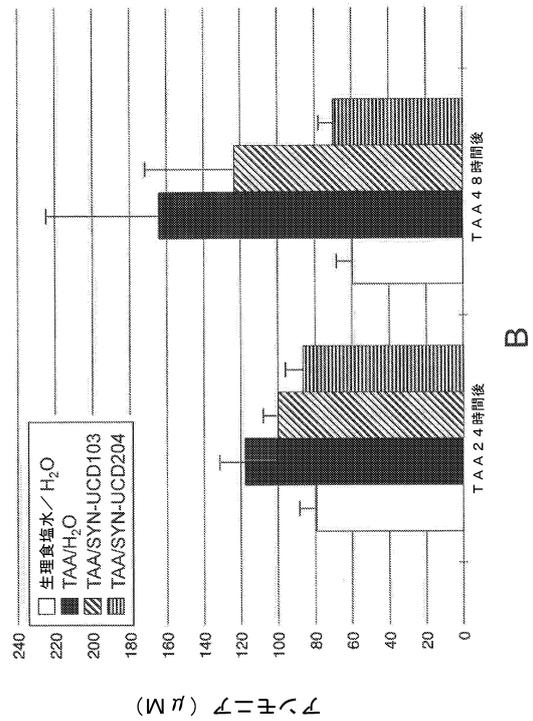
【図27】



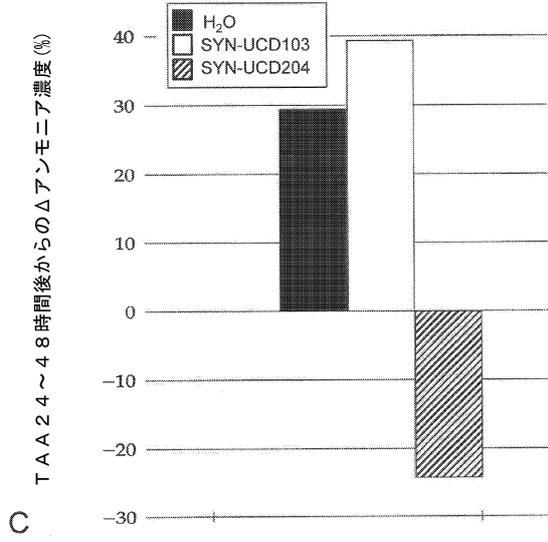
【図28-1】



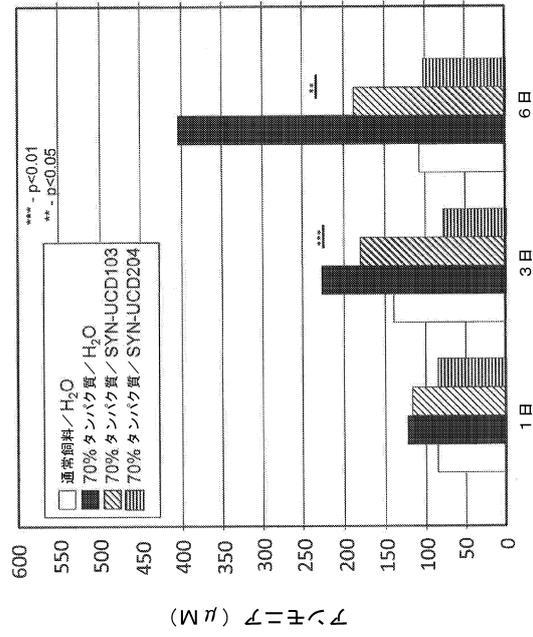
【図28-2】



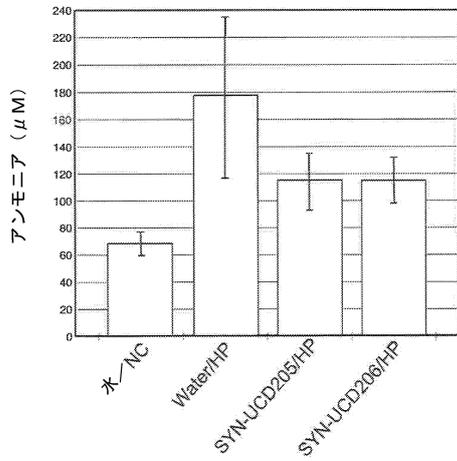
【図 28 - 3】



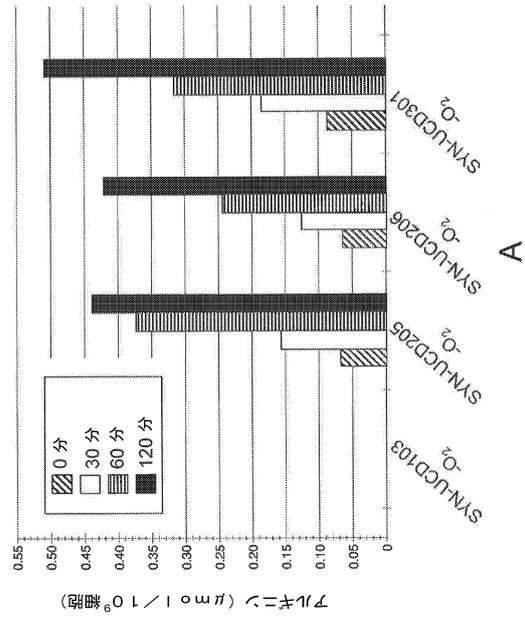
【図 29】



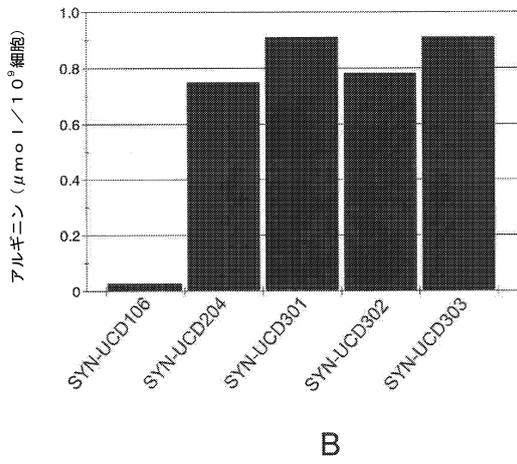
【図 30】



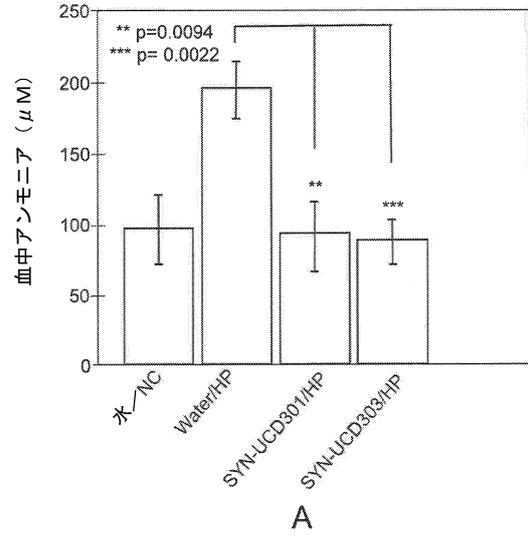
【図 31 - 1】



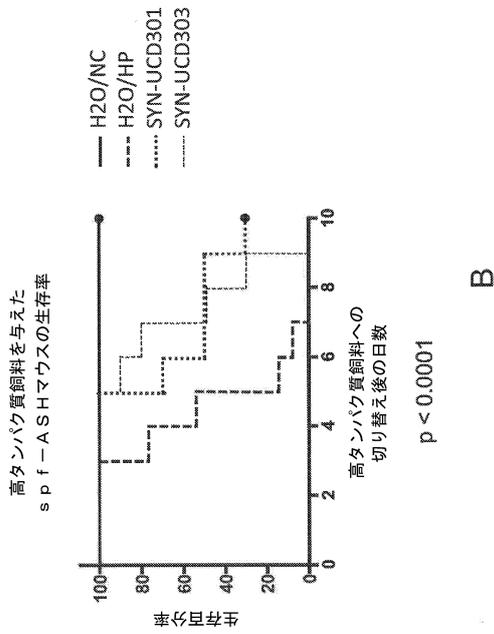
【 図 3 1 - 2 】



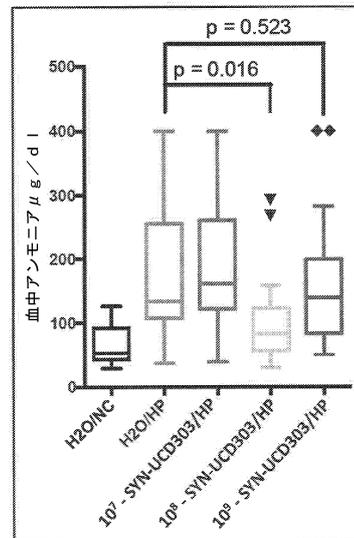
【 図 3 2 - 1 】



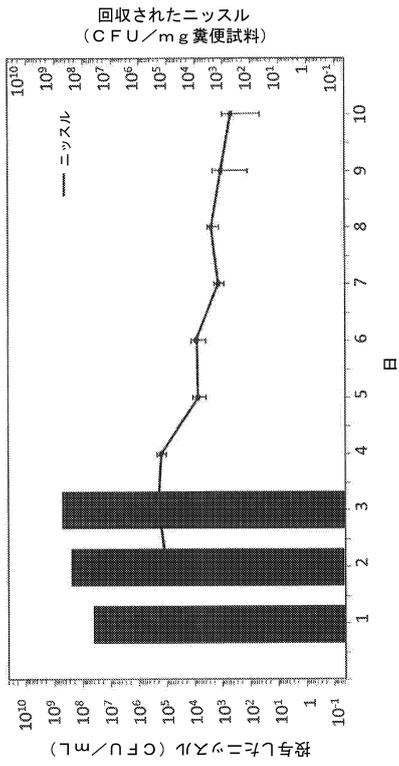
【 図 3 2 - 2 】



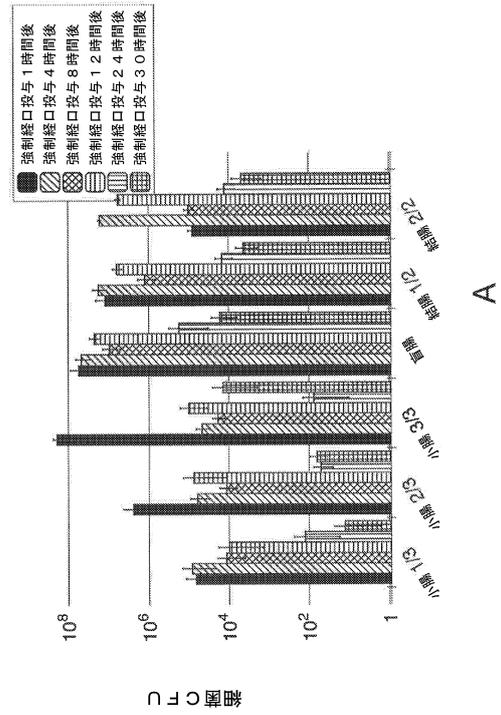
【 図 3 3 】



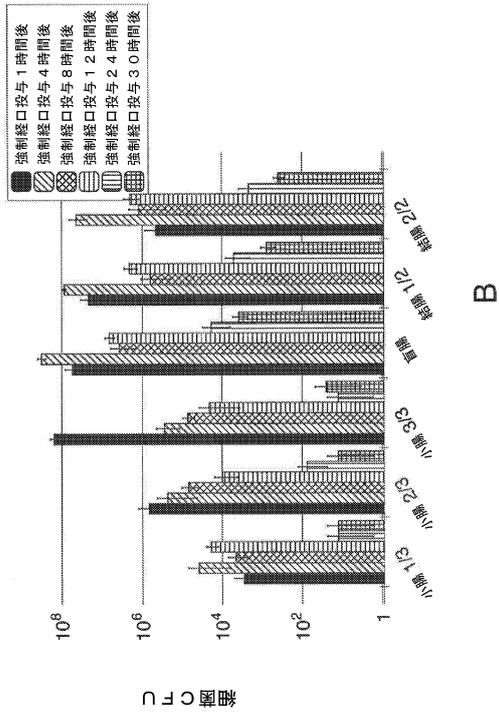
【 図 3 4 】



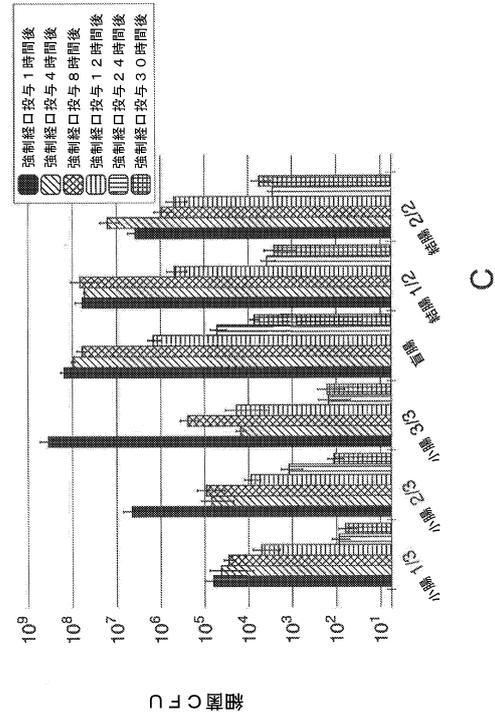
【 図 3 5 - 1 】



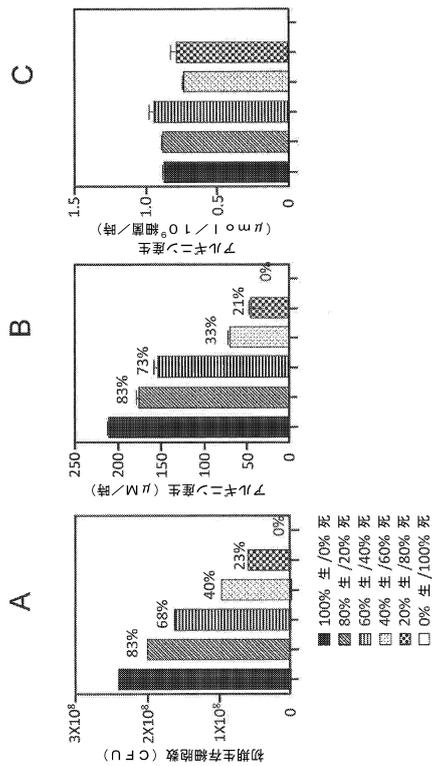
【 図 3 5 - 2 】



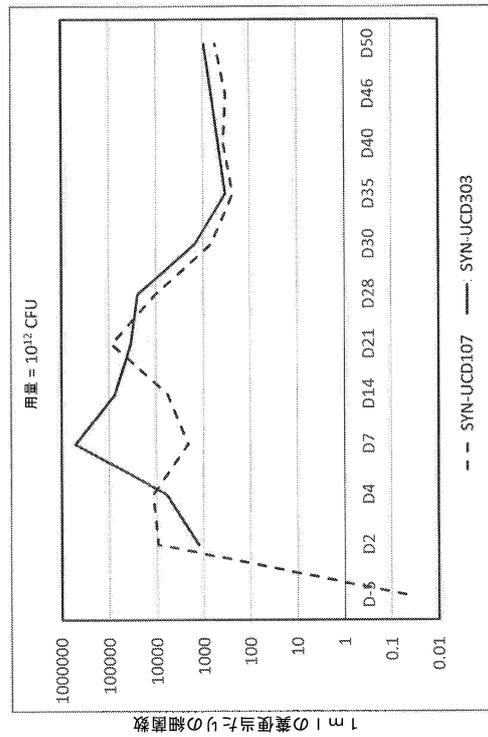
【 図 3 5 - 3 】



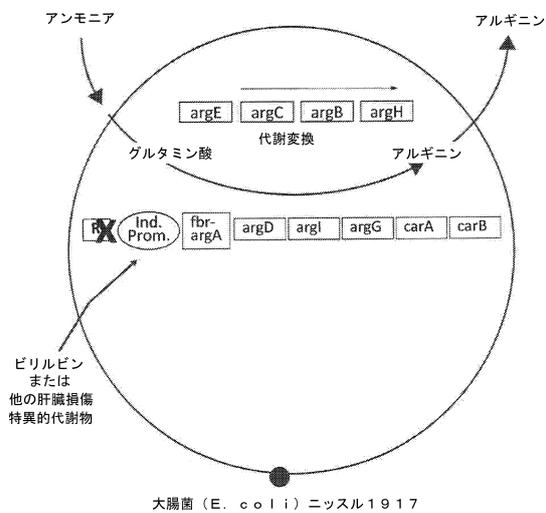
【 図 3 6 】



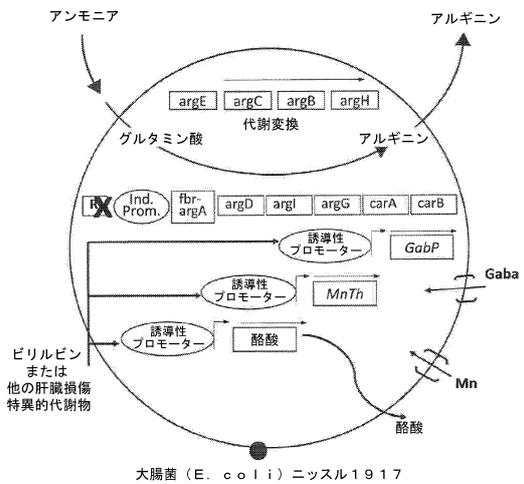
【 図 3 7 】



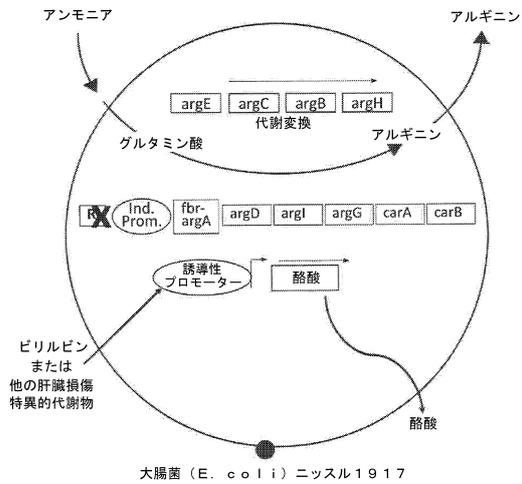
【 図 3 8 】



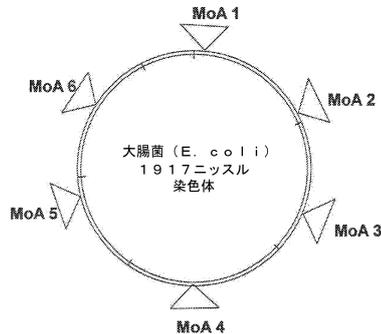
【 図 3 9 】



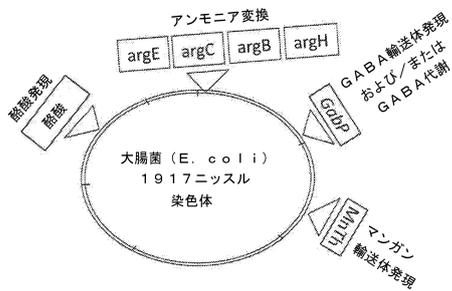
【 図 4 3 】



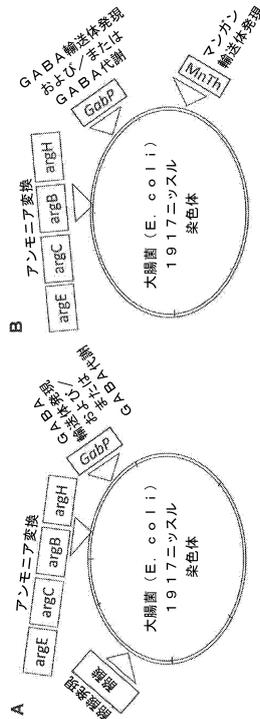
【 図 4 4 】



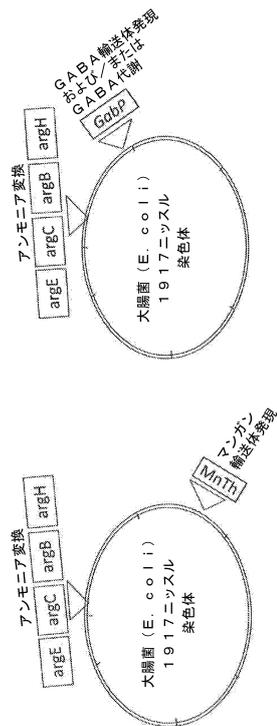
【 図 4 5 】



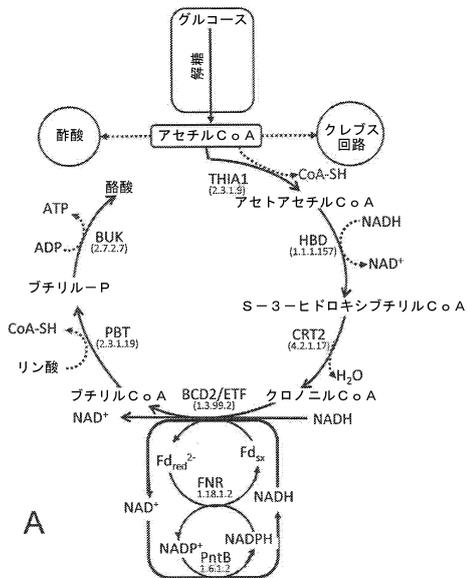
【 図 4 6 】



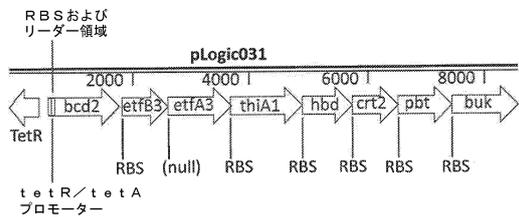
【 図 4 7 】



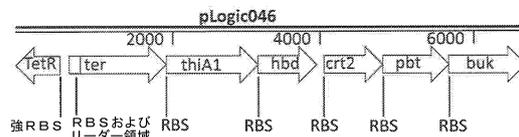
【 図 4 8 - 1 】



【 図 4 8 - 2 】



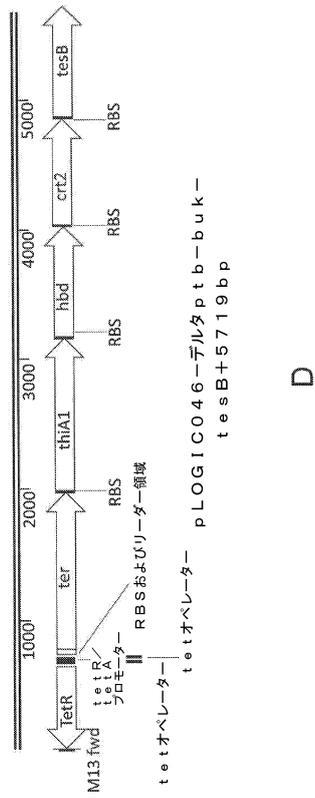
【 図 4 8 - 3 】



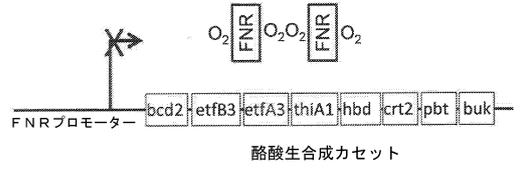
B

C

【 図 4 8 - 4 】

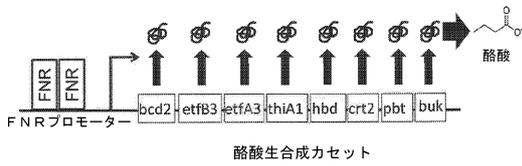


【 図 4 9 - 1 】



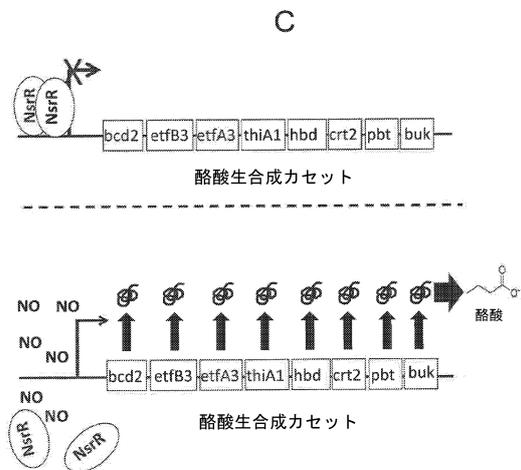
A

【 図 4 9 - 2 】



B

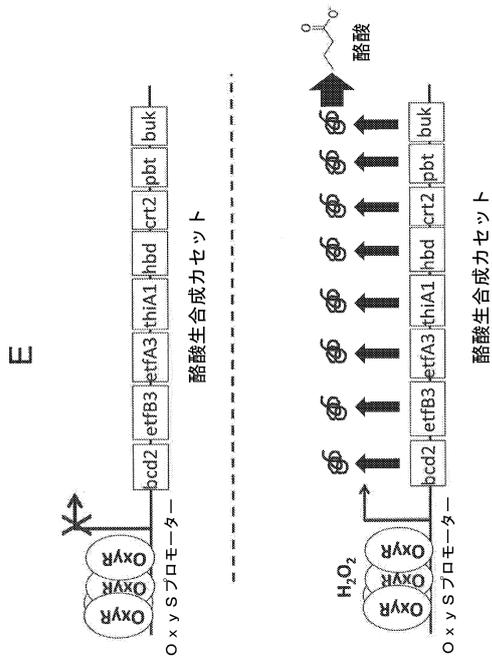
【 図 4 9 - 3 】



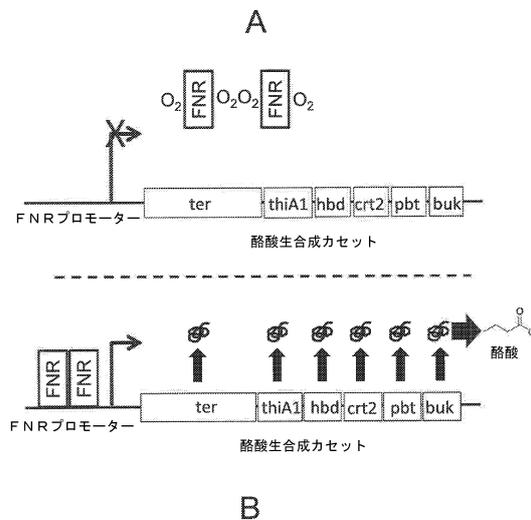
C

D

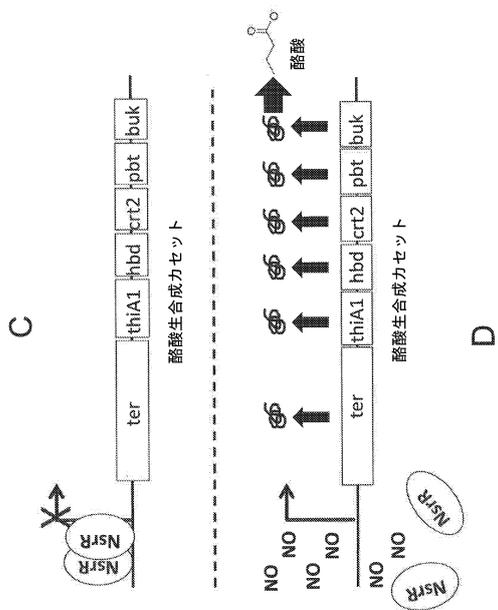
【図49-4】



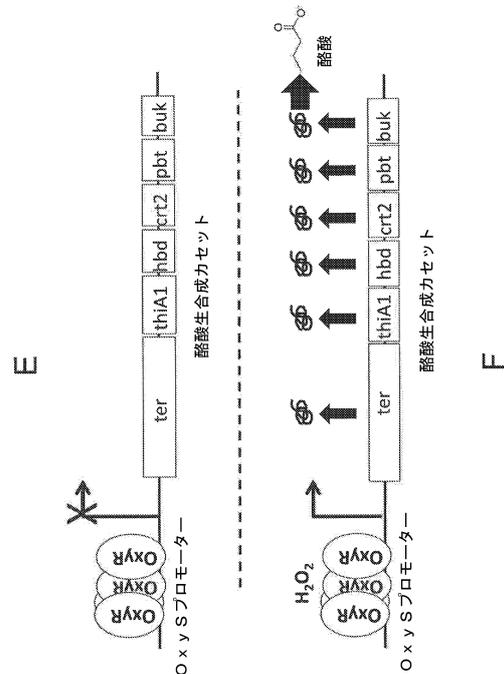
【図50-1】



【図50-2】

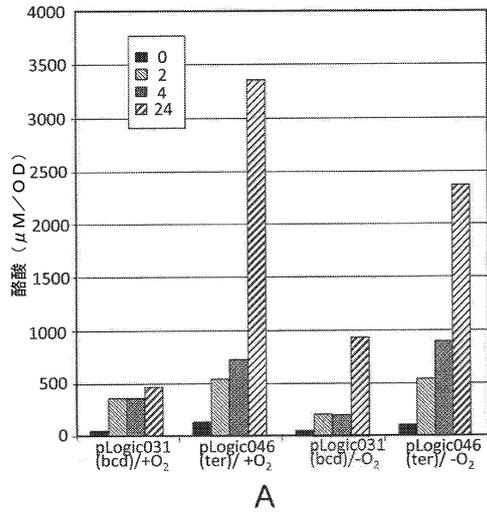


【図50-3】

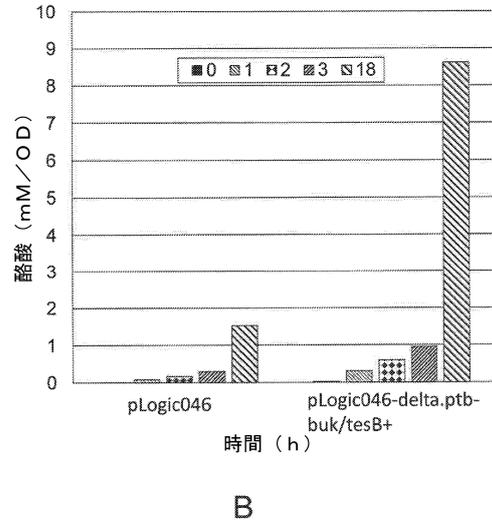


F

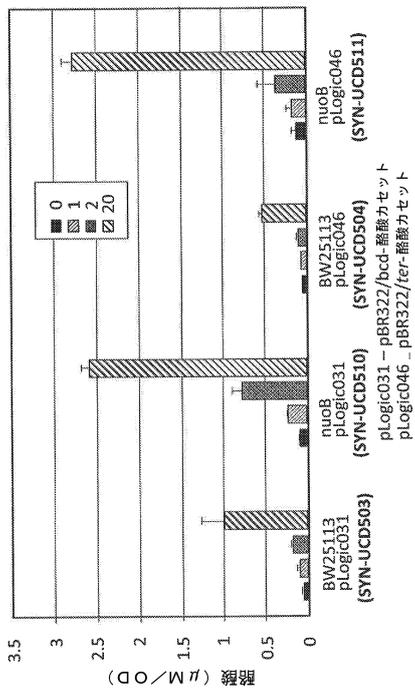
【 図 5 1 - 1 】



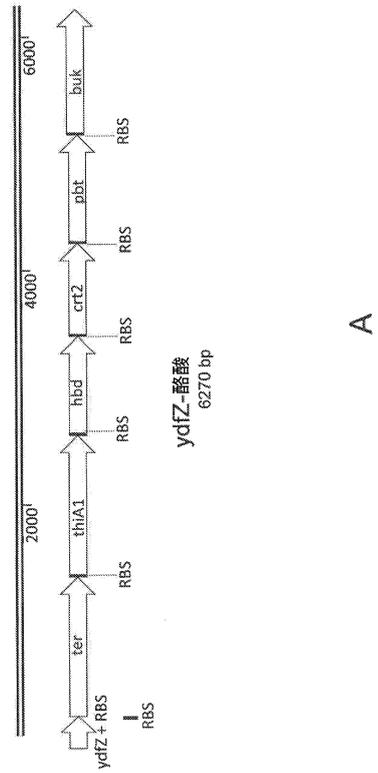
【 図 5 1 - 2 】



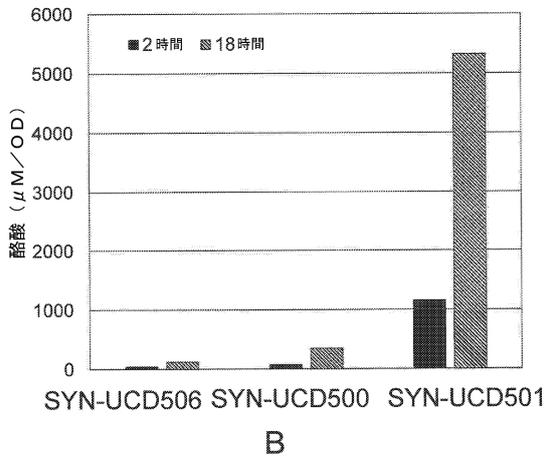
【 図 5 2 】



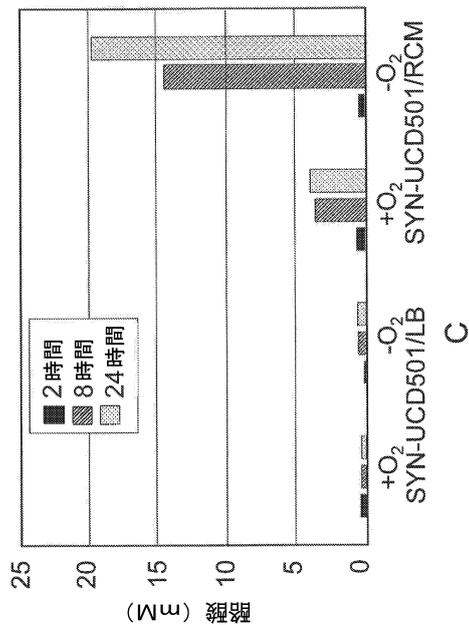
【 図 5 3 - 1 】



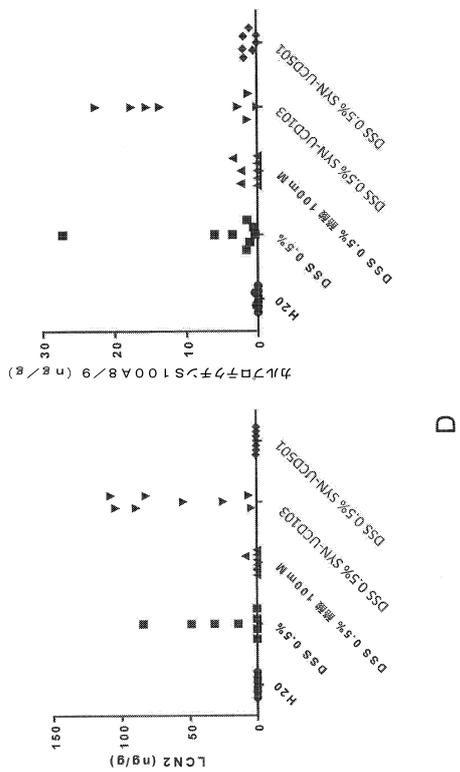
【 図 5 3 - 2 】



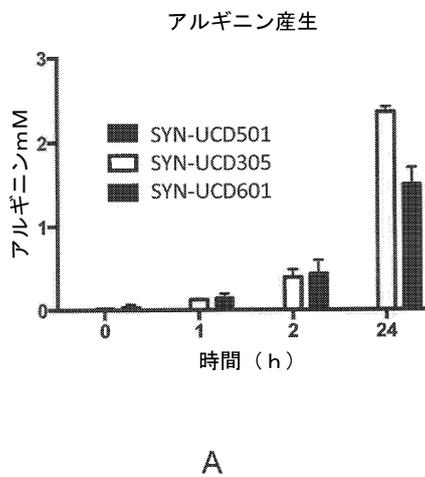
【 図 5 3 - 3 】



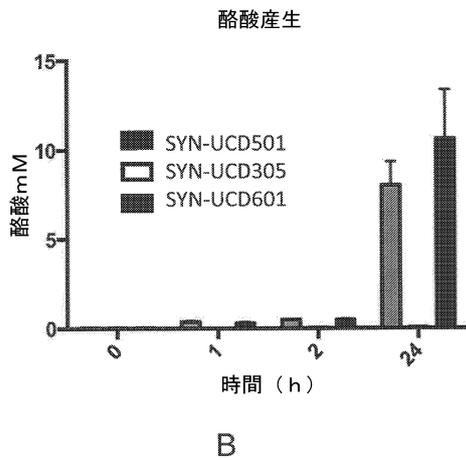
【 図 5 3 - 4 】



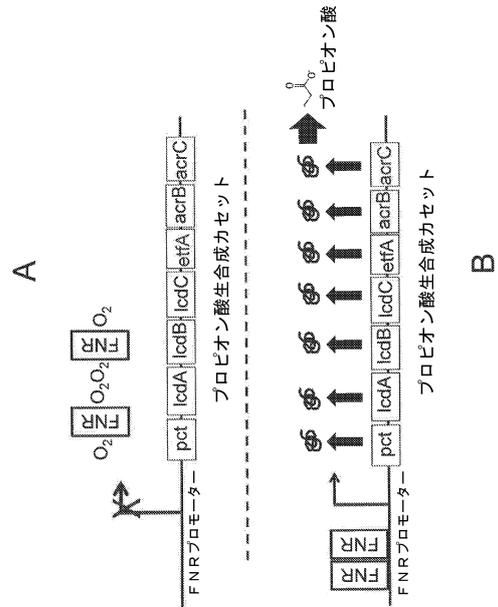
【 図 5 4 - 1 】



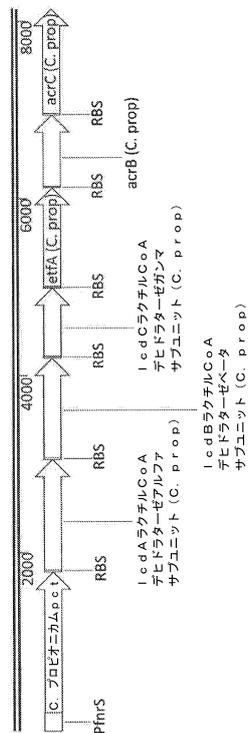
【 図 5 4 - 2 】



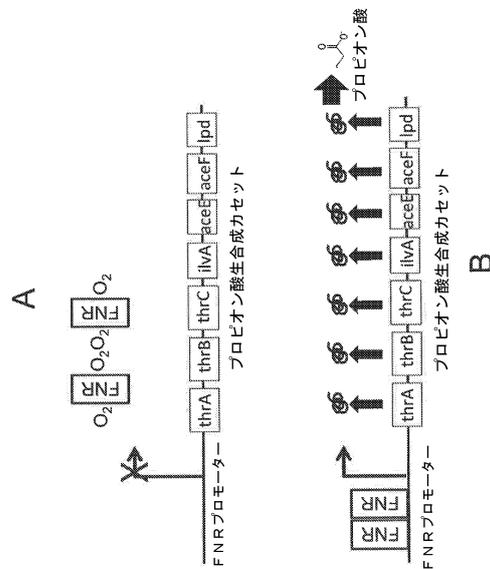
【 図 5 5 】



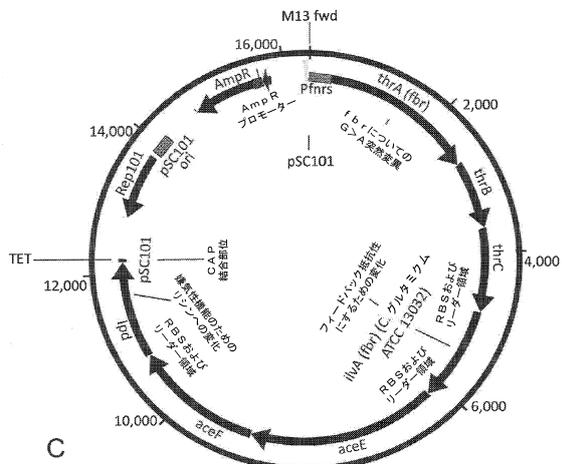
【 図 5 6 】



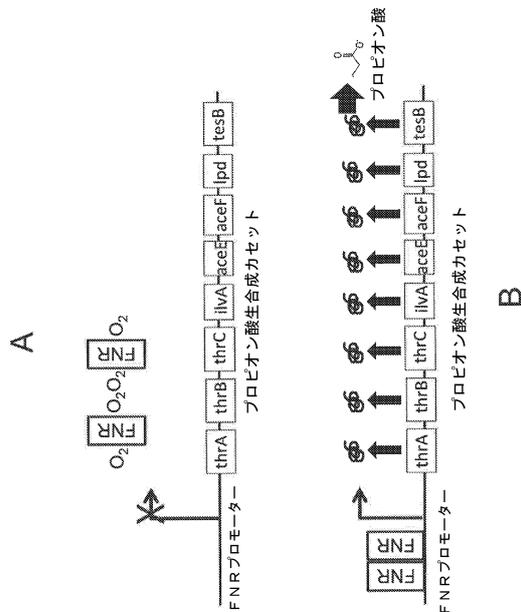
【 図 5 7 - 1 】



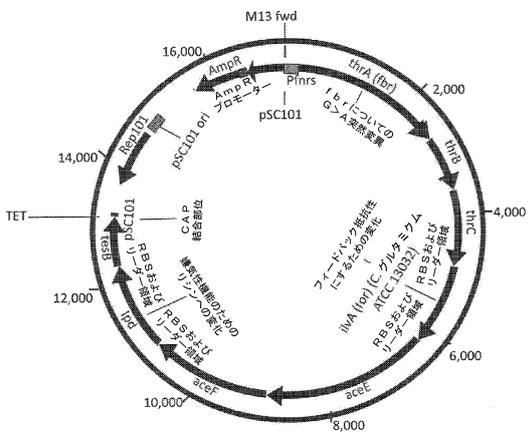
【 図 57 - 2 】



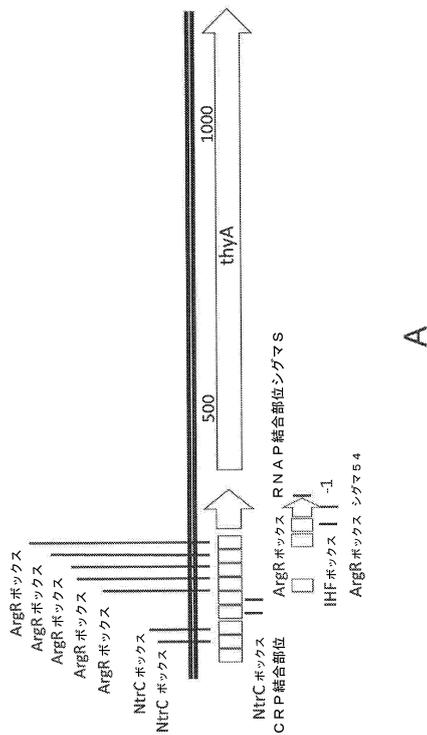
【 図 58 】



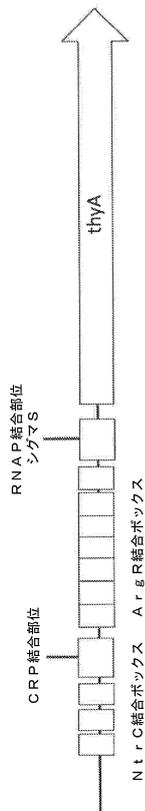
【 図 59 】



【 図 60 - 1 】

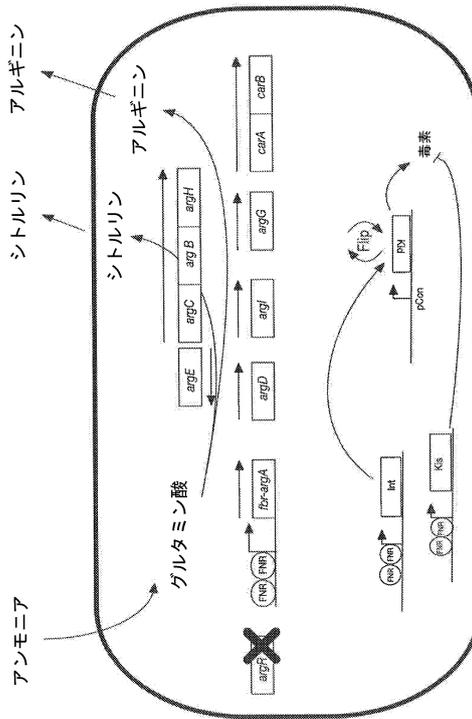


【 図 6 0 - 2 】

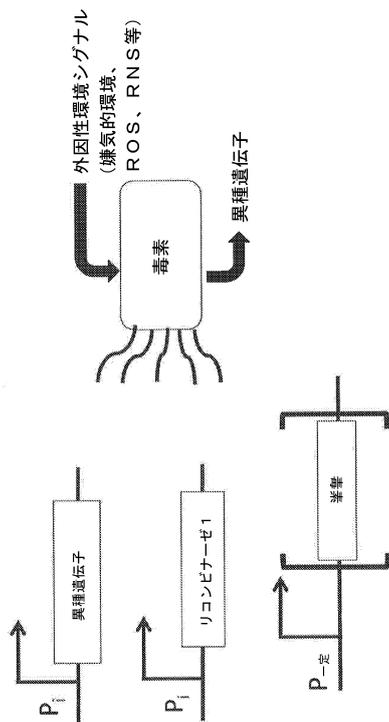


B

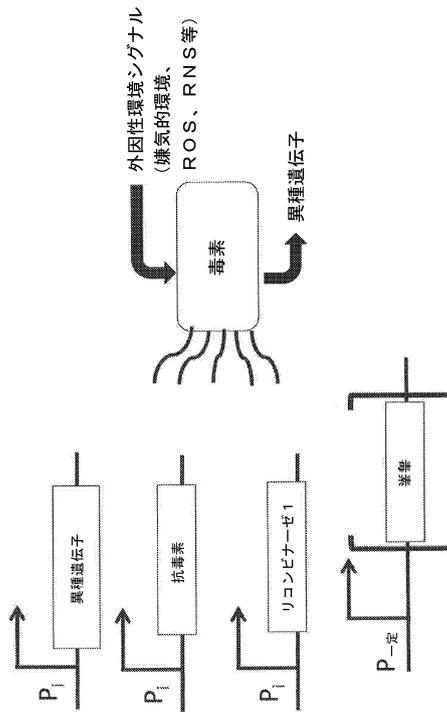
【 図 6 1 】



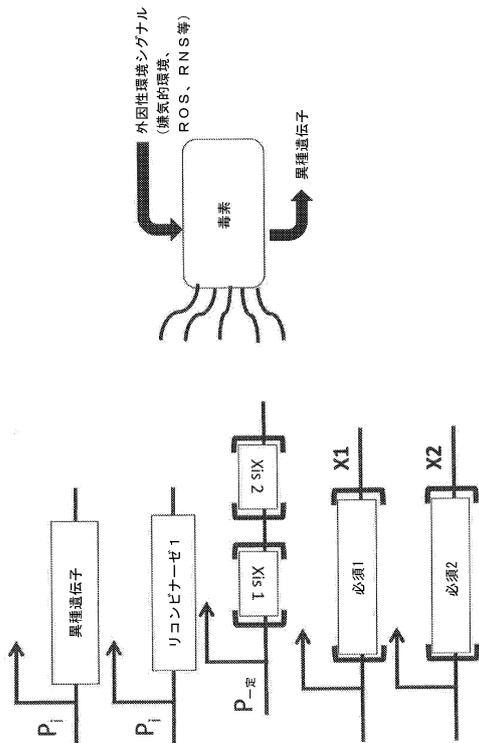
【 図 6 2 】



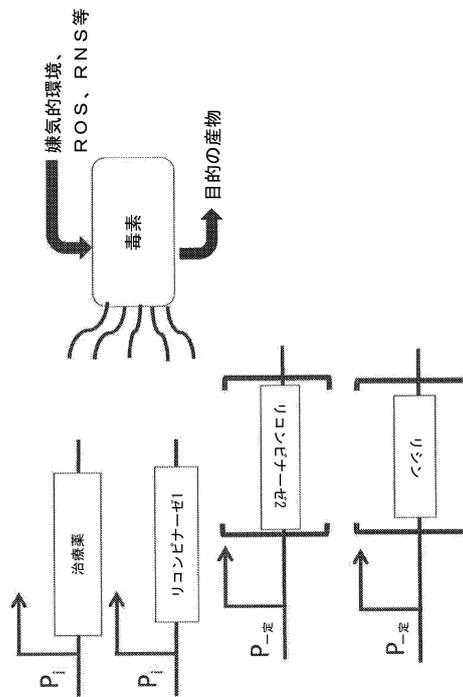
【 図 6 3 】



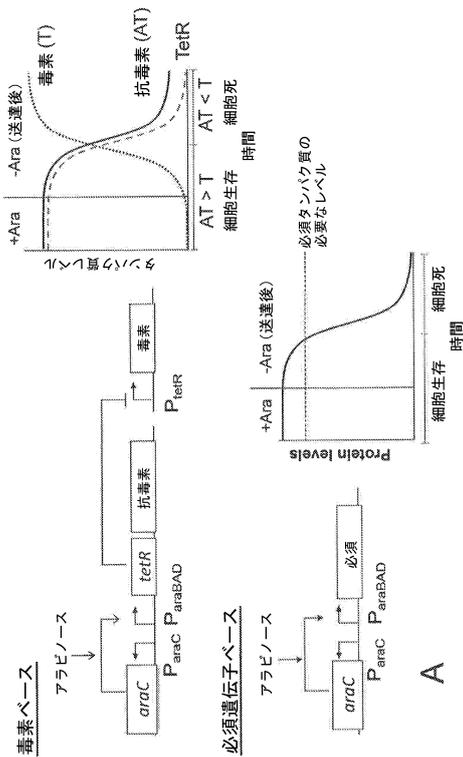
【 図 6 4 】



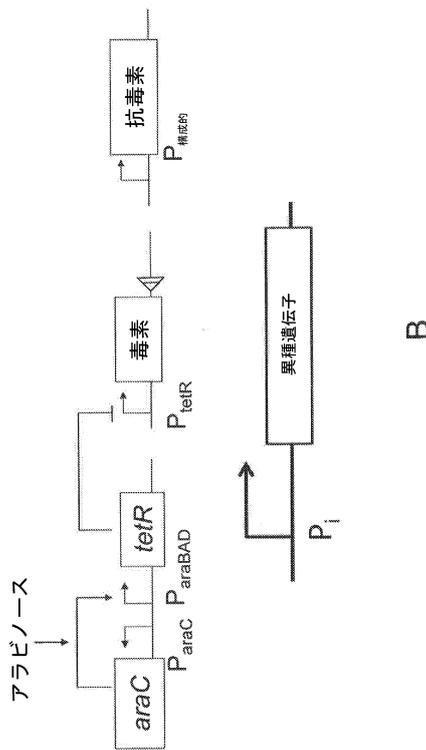
【 図 6 5 】



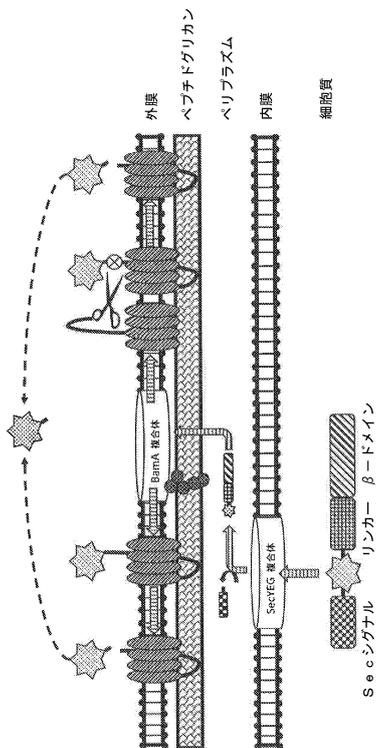
【 図 6 6 - 1 】



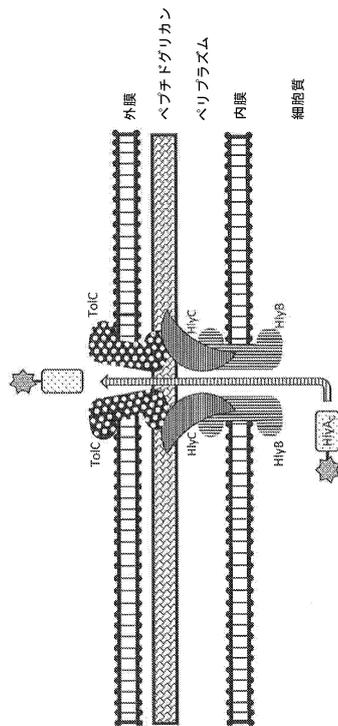
【 図 6 6 - 2 】



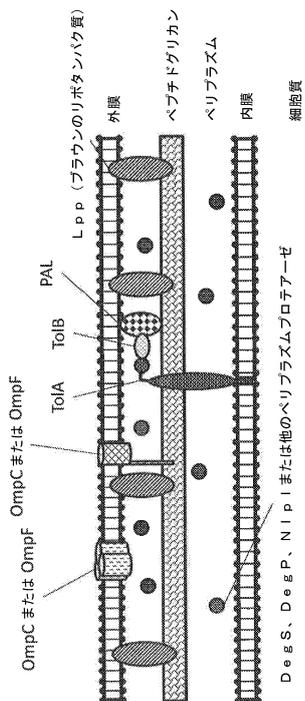
【図70】



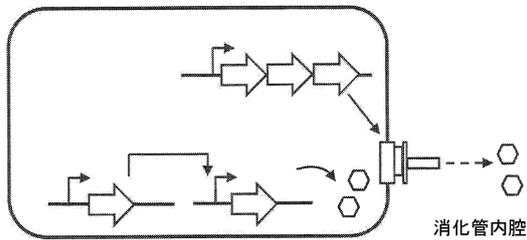
【図71】



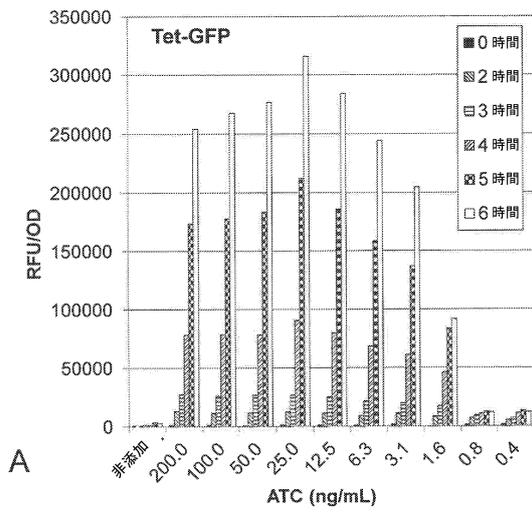
【図72】



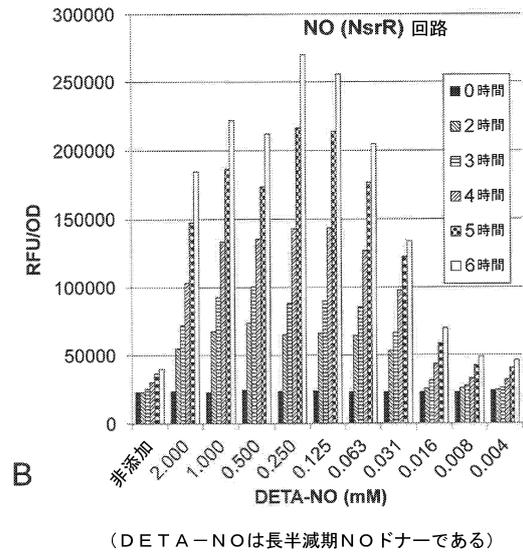
【図73】



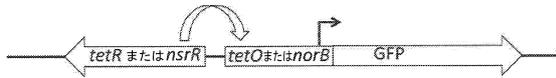
【 図 8 2 - 1 】



【 図 8 2 - 2 】

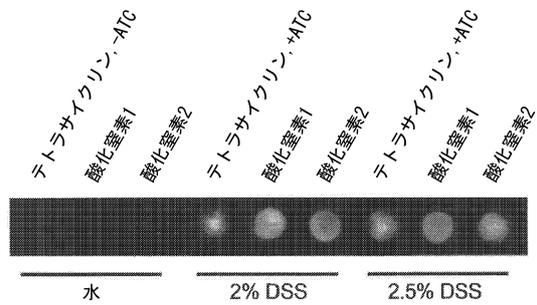


【 図 8 2 - 3 】

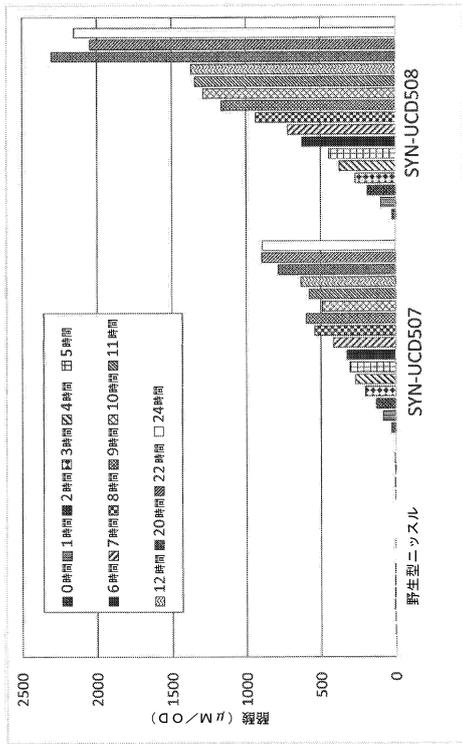


C

【 図 8 3 】



【 図 8 4 】



【 配列表 】

0006817966000001.app

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I			
A 6 1 K	35/745	(2015.01)	A 6 1 K	35/745	
A 6 1 P	7/08	(2006.01)	A 6 1 P	7/08	
C 1 2 N	9/10	(2006.01)	C 1 2 N	9/10	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z

- (31)優先権主張番号 62/293,749
(32)優先日 平成28年2月10日(2016.2.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/173,710
(32)優先日 平成27年6月10日(2015.6.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/263,329
(32)優先日 平成27年12月4日(2015.12.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/248,805
(32)優先日 平成27年10月30日(2015.10.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US2016/020530
(32)優先日 平成28年3月2日(2016.3.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/183,935
(32)優先日 平成27年6月24日(2015.6.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/173,706
(32)優先日 平成27年6月10日(2015.6.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/256,048
(32)優先日 平成27年11月16日(2015.11.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/291,468
(32)優先日 平成28年2月4日(2016.2.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 62/184,811
(32)優先日 平成27年6月25日(2015.6.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 14/960,333
(32)優先日 平成27年12月4日(2015.12.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/256,039

(32)優先日 平成27年11月16日(2015.11.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/277,654

(32)優先日 平成28年1月12日(2016.1.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 ディーン ファルブ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01770 シャーボーン レイク ストリート 180

(72)発明者 ピンセント エム イザベラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139 ケンブリッジ パットナム アベニュー 4
65 ユニット 1

(72)発明者 ジョナサン ダヴリユー コツラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02143 サマービル ワシントン ストリート 34
5

(72)発明者 ポール エフ ミラー

アメリカ合衆国 コネチカット州 06420 セーレム エメラルド グレン レーン 39

(72)発明者 スーマン マシナーニ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139 ケンブリッジ センター ストリート 18
ユニット 302

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 国際公開第2009/123029(WO, A1)

特開平04-166079(JP, A)

特開平10-226645(JP, A)

国際公開第2015/051323(WO, A1)

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 1998年 5月, Vol. 64, No. 5, pp. 1805-1811

BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 2013年 4月22日, Vol. 110, No. 10, pp. 2790-2794

JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY, 2015年 5月 7日, Vol. 42, No. 7, pp. 1057-1072

Jundishapur Journal of Microbiology, 2014年 7月 1日, Vol. 7, No. 7, e15942

ACS Synthetic Biology, 2014年 5月13日, Vol. 4, pp. 307-316

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 7/08

C12N 9/00 - 9/99

A61K 35/00 - 35/768

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS/WPIX(STN)