

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-514488

(P2017-514488A)

(43) 公表日 平成29年6月8日(2017.6.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 9
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁)

(21) 出願番号	特願2016-565432 (P2016-565432)	(71) 出願人	507333649 タフツ ユニバーシティー アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 1 1 0 ポストン, ハリソン・アベニュー, 1 3 6
(86) (22) 出願日	平成27年5月1日 (2015.5.1)	(74) 代理人	100083806 弁理士 三好 秀和
(85) 翻訳文提出日	平成28年12月26日 (2016.12.26)	(74) 代理人	100095500 弁理士 伊藤 正和
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/028851	(74) 代理人	100111235 弁理士 原 裕子
(87) 国際公開番号	W02015/168600	(72) 発明者	ダリア、 アンカー ビー。 アメリカ合衆国 O 2 1 1 5 マサチュー セッツ州 ポストン パーク ドライブ 1 8 5
(87) 国際公開日	平成27年11月5日 (2015.11.5)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	61/987, 955		
(32) 優先日	平成26年5月2日 (2014.5.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 自然コンピテント細胞の形質転換のための方法および装置

(57) 【要約】

本発明は、自然コンピテント細胞を共形質転換する組成物および方法を含む。本発明の1つの態様において、複数の核酸配列を1つまたは複数の自然コンピテント細胞に並行して導入する方法が含まれる。他の態様において、共形質転換された自然コンピテント細胞の異型混交プール、および核酸配列の2つ以上の集団を自然コンピテント細胞の集団に並行して導入するための装置も含まれる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

核酸分子を1つまたは複数の細胞に並行して導入する方法であって、

(a) 自然コンピテント細胞を2つ以上の核酸分子と接触させるステップであって、核酸配列の少なくとも1つが選択可能マーカを含む、ステップと、

(b) そのマーカについて選択するステップと

を含む方法。

【請求項 2】

核酸分子を1つまたは複数の細胞に並行して導入する方法であって、

(a) 自然コンピテント細胞を静的条件でインキュベートするステップと、

(b) 細胞を2つ以上の核酸分子と接触させるステップであって、核酸配列の少なくとも1つが選択可能マーカを含む、ステップと、

(c) そのマーカについて選択するステップと

を含む方法。

【請求項 3】

自然コンピテント細胞が細菌細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

自然コンピテント細胞がグラム陰性またはグラム陽性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

自然コンピテント細胞がFirmicutes、Chroococcales、Bacteriodia、Chlorobi、Deinococci、Actinobacteria、Proteobacteria、およびEuryarchaeotaからなる群から選択される門に属する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

自然コンピテント細胞が、Bacillus、Cyanobacterium、Lactococcus、Acinetobacter、Neisseria、Haemophilus、Vibrio、またはStreptococcus細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

自然コンピテント細胞が、V. choleraeまたはS. pneumoniaeである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

自然コンピテント細胞が、表 1 に列挙された種から選択される、請求項 1 に記載の方法

。

【請求項 9】

核酸分子の少なくとも1つが、自然コンピテント細胞のゲノムの遺伝子座に対する少なくとも1つのホモロジーアームを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

ホモロジーアームが、約4 kb未満の長さを有する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

核酸分子の少なくとも1つが少なくとも1つのゲノム編集を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

ゲノム編集が自然形質転換に関与する遺伝子に導入される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

2つ以上の核酸分子が非連鎖遺伝子マーカを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

自然コンピテント細胞を2つ以上の核酸分子と接触させるステップが、自然形質転換を最適化する少なくとも1つのゲノム編集を導入することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

選択可能マーカが、レポーター遺伝子または薬物耐性遺伝子である、請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

薬物耐性遺伝子が、カナマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、およびペニシリン耐性遺伝子からなる群から選択される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

ステップ a) および b) を繰り返すステップをさらに含み、それぞれの繰り返しが異なる選択可能マーカを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

細胞が、グラム陰性またはグラム陽性細菌である、請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

核酸分子を 1 つまたは複数のポリヌクレオチド標的に並行して導入する方法であって、
 (a) ポリヌクレオチド標的を 2 つ以上の核酸分子と接触させるステップであって、核酸配列の少なくとも 1 つが選択可能マーカを含む、ステップと、
 (b) そのマーカについて選択するステップと
 を含む方法。

【請求項 20】

核酸分子が中立座に組み込まれる、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

核酸分子が不要な遺伝子を抗生物質耐性マーカと置き換える、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

ポリヌクレオチド標的が細菌人工染色体、酵母人工染色体、またはベクターである、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

ベクターが哺乳類発現ベクターである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

細胞を形質転換するステップをさらに含み、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 26】

細胞が、細菌細胞、酵母細胞、または哺乳類細胞である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

細胞の *t f o X*、*r e c A*、および / または *t f o X* 遺伝子に遺伝子変異を導入するステップを含む、自然コンピテント細胞の形質転換効率を最適化するための方法。

【請求項 28】

細胞がグラム陽性またはグラム陰性細胞である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

細胞が、*V. Cholerae* である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

共形質転換細胞の異型混交プールであって、
 2 つ以上の共形質転換された核酸分子を含み、
 細胞が、自然コンピテントであり、2 つ以上の核酸分子で共形質転換されており、核酸分子の少なくとも 1 つが選択可能マーカを含む、異型混交プール。

【請求項 31】

選択可能マーカが、レポーター遺伝子または薬物耐性遺伝子である、請求項 30 に記載の異型混交プール。

【請求項 32】

薬物耐性遺伝子が、カナマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、およびペニシリン耐性遺伝子からなる群から選択される、請求項 30 に記載の異型混交プール。

10

20

30

40

50

【請求項 33】

自然コンピテント細胞がFirmicutes、Chroococcales、Bacteriodia、Chlorobi、Deinococci、Actinobacteria、Proteobacteria、およびEuryarchaeotaからなる群から選択される、請求項30に記載の異型混交プール。

【請求項 34】

自然コンピテント細胞が、表1に列挙された種から選択される、請求項30に記載の異型混交プール。

【請求項 35】

2つ以上の核酸分子が非連鎖遺伝子マーカを含む、請求項30に記載の異型混交プール。

10

【請求項 36】

核酸分子の少なくとも1つが、自然コンピテント細胞のゲノムの遺伝子座に対する少なくとも1つのホモロジーアームを含む、請求項30に記載の異型混交プール。

【請求項 37】

ホモロジーアームが、約4kb未満の長さを有する、請求項30に記載の異型混交プール。

【請求項 38】

核酸分子の少なくとも1つが少なくとも1つのゲノム編集を含む、請求項30に記載の異型混交プール。

【請求項 39】

ゲノム編集が、自然形質転換に関与する遺伝子に導入される、請求項30に記載の異型混交プール。

20

【請求項 40】

2つ以上の共形質転換された核酸分子のすべての組合せを含む、請求項30に記載の異型混交プール。

【請求項 41】

核酸分子の2つ以上の集団を細胞の集団に並行して導入するための装置であって、自然コンピテンスを誘導する静的条件を生成するように構成された、1つまたは複数の自然コンピテント細胞を含むレセプタクルと、核酸分子の2つ以上の集団を含む容器であって、自然コンピテント細胞への共形質転換のために核酸分子の2つ以上の集団をレセプタクルに導入するようにレセプタクルと流体的につながっている、容器と、自然コンピテンス条件を、共形質転換細胞を選択するための選択的増殖培地と置き換えるために、選択的増殖培地を含む容器とを含む装置。

30

【請求項 42】

異なる選択的増殖培地を含む容器をさらに含む、請求項41に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、その内容が参照により本明細書に組み入れられる、2014年5月2日に提出された米国特許仮出願第61/987,955号の利益を主張する。

40

【0002】

(連邦政府助成研究または開発に関する声明)

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与されたAI055,058号およびAI045,746号の下で米国政府の支援を受けてなされた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

多重ゲノム編集、すなわちゲノムにおける多数の異なる部位での同時編集のためのツ-

50

ルは、数が限られており、現在は、モデル細菌において使用するために開発されているに過ぎない。

【背景技術】

【0004】

「多重自動ゲノム工学法」またはMAGEとして知られる方法が、Escherichia coliにおいて開発され、この種の「加速進化」において大いに成功を収めており、代謝工学および表現型工学応用のために利用されている。この技術はまた、すべてのUAG終始コドンが同義のUAAコドンと交換されたE. coliゲノムを「再コード化」するためにもきわめて重要であった。

【0005】

MAGEは、一本鎖DNA(ssDNA)オリゴヌクレオチドによる非常に効率的な組み換えに依存している。作用機序の点から、この方法は、DNA複製の際にラギング鎖にssDNAオリゴをアニールすることを必要として、約20%までの効率でゲノムに点突然変異または小さい挿入および欠失を導入することができる。この技術の重要な特徴は、変異に関してシスでの(in cis)選択がないことであり、これにより、得られた変異体プールに多重変異がランダムに分布することが可能となり、この集団における個々の細胞はあらゆる数および組合せのゲノム編集を有する。MAGEは、微生物系における多重ゲノム編集方法の有用性を証明するが、この方法は、非モデル微生物には容易に適合しない。

【0006】

最近、細菌のCRISPR/Casシステムに由来するCas-9エンドヌクレアーゼが、非モデル細菌微生物における標的化ゲノム工学のために利用されている。しかし、この方法は、編集されたゲノム座でのCas9選択を必要とする。それゆえ、CRISPR/Casによるゲノム編集は、MAGEに関して上記で述べた複雑な変異体プールを産生することができず、微生物系における表現型の加速進化のためにこの技術を使用することは制限される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

それゆえ、非モデル微生物である微生物系における多重ゲノム編集のための改善された方法が当技術分野において必要である。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、一般的に、2つ以上の核酸分子によって自然コンピテント微生物(自然にコンピテントである微生物)を同時に形質転換するための方法およびこれらの分子を含む細胞を特徴とする。

【0009】

1つの態様において、本発明は、一般的に、核酸分子を1つまたは複数の自然コンピテント細胞に並行して導入するための方法を提供する。他の態様において、核酸分子を1つまたは複数のポリヌクレオチド標的に並行して導入する方法、および自然コンピテント細胞の形質転換効率を最適化するための方法も含まれる。他の態様において、共形質転換された(co-transformed)自然コンピテント細胞の異型混交(heterogenic)プール、および核酸分子の2つ以上の集団を自然コンピテント細胞の集団に並行して導入するための装置も含まれる。

【0010】

1つの態様において、本発明は、核酸分子を1つまたは複数の細胞に並行して導入する方法であって、(a)自然コンピテント細胞を2つ以上の核酸分子と接触させるステップであって、核酸配列の少なくとも1つが選択可能マーカを含む、ステップと、(b)そのマーカについて選択するステップとを含む方法を含む。

【0011】

別の態様において、本発明は、核酸分子を1つまたは複数の細胞に並行して導入する方

10

20

30

40

50

法であって、(a) 自然コンピテント細胞を静的条件でインキュベートするステップと、(b) 細胞を2つ以上の核酸分子と接触させるステップであって、核酸配列の少なくとも1つが選択可能マーカを含む、ステップと、(c) そのマーカについて選択するステップとを含む方法を含む。

【0012】

別の態様において、本発明は、核酸分子を1つまたは複数のポリヌクレオチド標的に並行して導入する方法であって、(a) ポリヌクレオチド標的を2つ以上の核酸分子と接触させるステップであって、核酸配列の少なくとも1つが選択可能マーカを含む、ステップと、(b) そのマーカについて選択するステップとを含む方法を含む。

【0013】

別の態様において、本発明は、細胞の *tfoX*、*recA*、および/または *tfoX* 遺伝子に遺伝子変異を導入するステップを含む、自然コンピテント細胞の形質転換効率を最適化するための方法を含む。別の態様において、本発明は、共形質転換細胞の異型混交プールであって、2つ以上の共形質転換核酸分子を含み、細胞が自然コンピテントであって2つ以上の核酸配列によって共形質転換されており、核酸分子の少なくとも1つが選択可能マーカを含む、異型混交プールを含む。

【0014】

本明細書で述べる本発明の上記態様または他の任意の態様の様々な実施形態において、自然コンピテント細胞は細菌細胞である。1つの実施形態において、自然コンピテント細胞は、グラム陰性またはグラム陽性である。1つの実施形態において、自然コンピテント細胞は、Firmicutes、Chroococcales、Bacteriodia、Chlorobi、Deinococci、Actinobacteria、Proteobacteria、およびEuryarchaeotaからなる群から選択される門に属する。別の実施形態において、自然コンピテント細胞は、Bacillus、Cyanobacterium、Lactococcus、Acinetobacter、Neisseria、Haemophilus、Vibrio、またはStreptococcus細胞である。別の実施形態において、自然コンピテント細胞は、*V. cholerae*、または*S. pneumoniae*である。別の実施形態において、自然コンピテント細胞は表1に列挙された種から選択される。

【0015】

別の実施形態において、核酸分子の少なくとも1つは、自然コンピテント細胞のゲノムの遺伝子座に対する少なくとも1つのホモロジーアーム(一続きのホモロジー部分)を含む。いくつかの実施形態において、ホモロジーアームは、約4 kb未満の長さを有する。なお別の実施形態において、核酸分子の少なくとも1つは少なくとも1つのゲノム編集を含む。いくつかの実施形態において、ゲノム編集は、自然形質転換に関連する遺伝子に導入される。なお別の実施形態において、2つ以上の核酸配列は、非連鎖遺伝子マーカを含む。

【0016】

別の実施形態において、自然コンピテント細胞を2つ以上の核酸分子と接触させるステップは、自然形質転換を最適化する少なくとも1つのゲノム編集を導入するステップを含む。なお別の実施形態において、核酸分子を1つまたは複数の細胞に並行して導入する方法は、(a) 自然コンピテント細胞を2つ以上の核酸分子と接触させるステップであって、核酸配列の少なくとも1つが選択可能マーカを含む、ステップと、(b) そのマーカについて選択するステップとを、繰り返すステップであって、それぞれの繰り返しが異なる選択可能マーカを含むステップをさらに含む。

【0017】

別の実施形態において、核酸分子は中立(ニュートラルな)座に組み込まれる。なお別の実施形態において、核酸分子は不要な遺伝子を抗生物質耐性マーカと置き換える。別の実施形態において、ポリヌクレオチド標的は、細菌人工染色体、酵母人工染色体、またはベクターである。なお別の実施形態において、ベクターは、哺乳類発現ベクターである。別の実施形態において、核酸分子を1つまたは複数のポリヌクレオチド標的に並行して導入する方法は、細胞を形質転換するステップをさらに含む。なお別の実施形態において

10

20

30

40

50

、細胞は細菌細胞、酵母細胞、または哺乳類細胞である。

【0018】

なお別の実施形態において、共形質転換細胞の異型混交プールは、2つ以上の共形質転換された核酸配列のすべての組合せを含む。

【0019】

別の実施形態において、少なくとも1つの選択可能マーカーは、レポーター遺伝子または薬物耐性遺伝子である。いくつかの実施形態において、薬物耐性遺伝子は、カナマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、およびペニシリン耐性遺伝子からなる群から選択される。

10

【0020】

なお別の態様において、本発明は、核酸分子の2つ以上の集団を細胞の集団に並行して導入するための装置であって、自然コンピテンスを誘導する静的条件を生成するように構成され、1つまたは複数の自然コンピテント細胞を含む、レセプタクル(入れ物)と、自然コンピテント細胞への共形質転換のために核酸分子の2つ以上の集団をレセプタクルに導入するためにレセプタクルと流体的につながっている、核酸分子の2つ以上の集団を含む容器と、自然コンピテンス条件を、共形質転換細胞を選択するための選択的増殖培地と置き換えるために、選択的増殖培地を含む容器と、を含む装置を含む。

【0021】

発明の1つの実施形態において、装置は、異なる選択的増殖培地を含む容器をさらに含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1A】*Vibrio cholerae*における2つの非連鎖ゲノム位置での共形質転換の最適化を示す概略図である。A b^R(抗生物質耐性)マーカー(選択産物ともいう)との交換の標的とした中立座は、真正のフレームシフトを含むトランスポザーゼ偽遺伝子であるVC1807であった。

【0023】

【図1B】非選択核酸分子における相同性のサイズを変化させたアッセイにおける共形質転換率を示すグラフである。非選択核酸分子-PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)産物は、lacZ遺伝子に未成熟終止コドンを導入するトランスポージョン点突然変異を含んだ。反応は、30ng/mLの選択産物、および3μg/mLの非選択産物を含んだ。データは少なくとも2回の生物学的反復実験から得て、平均値±標準偏差として示す。

30

【0024】

【図1C】非選択PCR産物の濃度を変化させたアッセイにおける共形質転換率を示すグラフである。反応は、3kbのホモロジーアームを有するPCR産物、および30ng/mLの選択産物を含んだ。データは少なくとも2回の生物学的反復実験から得て、平均値±標準偏差として示す。

【0025】

【図1D】選択PCR産物の相同性サイズを変化させた場合の形質転換効率を示すグラフである。反応は、30ng/mLの選択産物、および3μg/mLの非選択産物を含んだ。データは少なくとも2回の生物学的反復実験から得て、平均値±標準偏差として示す。

40

【0026】

【図1E】選択産物の相同性のサイズを変化させた場合の共形質転換率を示すグラフである。反応は、30ng/mLの選択産物、および3μg/mLの非選択産物を含んだ。データは少なくとも2回の生物学的反復実験から得て、平均値±標準偏差として示す。

【0027】

【図1F】選択産物の濃度を変化させた場合の形質転換効率を示すグラフである。反応は、3kbのホモロジーアームを有するPCR産物、および3μg/mLの非選択産物を含んだ。データは少なくとも2回の生物学的反復実験から得て、平均値±標準偏差として示

50

す。

【0028】

【図1G】選択産物の濃度を变化させた場合の共形質転換率を示すグラフである。反応は、3 kbのホモロジーアームを有するPCR産物、および3 μg/mLの非選択産物を含んだ。データは少なくとも2回の生物学的反復実験から得て、平均値 ± 標準偏差として示す。

【0029】

【図1H】2つの異なる非選択遺伝子マーカーを使用するアッセイにおける共形質転換率を示すグラフであり、1つは、ゲノム上で選択マーカーから約500 kb離れたlacZに存在し、もう1つは、選択マーカーとは異なる染色体上に存在するVCA0063の上流に存在した。反応は、3 kbのホモロジーアームを有するPCR産物、30 ng/mLの選択産物、および3 μg/mLの非選択産物を含んだ。データは少なくとも2回の生物学的反復実験から得て、平均値 ± 標準偏差として示す。

10

【0030】

【図1I】lacZ遺伝子において表記のサイズの欠失を生成する非選択産物を使用するアッセイにおける共形質転換率を示すグラフである。反応は、3 kbのホモロジーアームを有するPCR産物、30 ng/mLの選択産物、および3 μg/mLの非選択産物を含んだ。データは少なくとも2回の生物学的反復実験から得て、平均値 ± 標準偏差として示す。

【0031】

【図1J】lacZにおける表記のサイズの欠失を有する株をWT（野生型）に復帰させることによって測定した、挿入変異の共形質転換率を示すグラフである。反応は、3 kbのホモロジーアームを有するPCR産物、30 ng/mLの選択産物、および3 μg/mLの非選択産物を含んだ。データは少なくとも2回の生物学的反復実験から得て、平均値 ± 標準偏差として示す。

20

【0032】

【図2A】共形質転換によってlacZ遺伝子における6 (N6) または30 (N30) 塩基対をランダム化するための、本明細書において記述されるアプローチ、およびN6またはN30領域のディープシーケンシングを示す概略図である。

【0033】

【図2B】N6およびN30 PCR産物による2つのサイクル(C1およびC2)の共形質転換後のlacZ遺伝子におけるランダム化塩基の数の頻度を示すグラフである。

30

【0034】

【図2C】WTコンセンサス配列からの配列の逸脱によって測定した、インプットPCR産物と得られた共形質転換体のプールにおけるN6領域の組成を示すグラフである。

【0035】

【図2D】WTコンセンサス配列からの配列の逸脱によって測定した、インプットPCR産物と得られた共形質転換体のプールにおけるN30領域の組成を示すグラフである。

【0036】

【図2E】N6 C1試料に関して、インプットPCR産物と得られた共形質転換体プールにおける、WT配列を除く4096個すべてのN6量体の量の直線回帰を示すグラフである。

40

【0037】

【図3A】共形質転換を使用して複雑な異型混交変異体集団を生成するための戦略、および本明細書において記述される実験において標的とされる5つの遺伝子座を示す概略図である。

【0038】

【図3B】V. choleraeの自然形質転換における標的座の役割を描写する概略図である。Tf oXおよびH a p Rは、表記のプロセスを制御する調節因子である。

【0039】

50

【図3C】2つのサイクルの共形質転換（C1およびC2）後、およびA b^R付与選択マーカーだけによる2つのラウンドの選択（R1およびR2）後の集団におけるゲノム編集の分布を示すグラフである。共形質転換を使用して、ゲノム編集を細胞の集団に多重に導入した。形質転換反応において、それぞれの変異のためのPCR産物を、選択可能マーカーと共に等モル濃度で混合した。それぞれのサイクルで中立座における抗生物質耐性カセットを改変させる選択産物を使用することによって、MuGENTの複数のサイクルを行った。マルチプレックス対立遺伝子特異的コロニー（MASC）PCRによって形質転換体をスクリーニングしたところ、1サイクルの共選択（C1）後に集団の約50%が少なくとも1つの遺伝子編集を有することが見いだされた。2サイクル目の共選択（C2/R0）後では、集団の約90%が少なくとも1つの編集を含み、約4%が5つすべての座で編集を有した。

10

【0040】

【図3D】選択後のそれぞれのゲノム編集の頻度を示すグラフである。

【0041】

【図3E】キッチン上での最終バイオマスおよび形質転換アッセイの形質転換効率を示すグラフのパネルである。X軸の下のグリッドは、株の遺伝子型を示す。塗りつぶされた四角はゲノム編集の存在を示し、色は編集されたRBS（リボソーム結合部位）の強さを示す。mutSに関しては黒色を使用するが、それはこの遺伝子が不活化の標的であったからである。データは、4回の独立した生物学的反復実験から得られ、平均値±標準偏差として示す。

20

【0042】

【図4A】1、3、および5ラウンドの共形質転換について、抗生物質耐性マーカーを用いた共形質転換後のWTの*Streptococcus pneumoniae*の4つのpht遺伝子におけるゲノム編集の頻度を示すグラフである。4つのpht遺伝子は、それぞれの座にタンデム終止コドンを導入するPCR産物を使用して標的化された。

【0043】

【図4B】MMR（ミスマッチ修復）欠損*S. pneumoniae*株における4つのpht遺伝子におけるゲノム編集の頻度を示すグラフである。

【0044】

【図4C】野生型バックグラウンドで作製された、可能性がある16個すべてのpht変異体株のMASC（マルチプレックス対立遺伝子特異的コロニー）PCRを示す電気泳動ゲルである。バンドは、ゲノム編集の存在を示す。

30

【0045】

【図5A】ランダム化された塩基を示すtfoX、recA、hapR、およびdprAでのRBS最適化の概略図である。それぞれの遺伝子に関して示される最初のRBSは、WT RBSを表す。示されるRBSの強さは、ribosome binding site calculatorから得られ、0~100,000の任意の尺度に基づく。

【0046】

【図5B】未成熟終止コドンをもたらす、lacZにおけるトランスポージョン（TAA）およびトランジション（TAG）変異の核酸配列設計の略図である。トランジション変異は、トランスポージョン変異と比較してMMRによってより効率的に修復される。

40

【0047】

【図5C】WTおよびMMR欠損mutS欠失株におけるこれらの変異に関する共形質転換率を示すグラフであり、*V. cholerae*の共形質転換に対してMMRがほとんどまたは全く影響を有しないことを証明する。データは、2回の生物学的反復実験から得られ、平均値±標準偏差として示す。

【0048】

【図6A】PCR産物から生成された選択マーカーおよび非選択マーカーによる細菌ゲノムの共形質転換および組み換えを示す概略図である。

【0049】

50

【図6B】PCR産物からの非選択マーカによる細菌ゲノムの組み換え、およびカナマイシン耐性に関する選択可能マーカを有するプラスミドの共形質転換を示す概略図である。

【0050】

【図6C】選択マーカが、VC1807がカナマイシン耐性遺伝子と交換されるPCR産物（左）、およびカナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドpBAD18（右）である、共形質転換率を示すグラフである。非選択マーカは図6Aおよび6Bに示される。

【0051】

【図6D】TG1 (recA+)細胞およびDH5 (recA-)細胞の形質転換効率を示すグラフである。

10

【0052】

【図7】V. cholerae宿主株における細菌人工染色体の共形質転換変異誘発における共形質転換率を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0053】

(定義)

特に定義されていなければ、本明細書において使用されるすべての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書において記述される方法および材料と類似または同等の任意の方法および材料が、本発明の試験のために実践において使用され得るが、好ましい材料および方法を本明細書において説明する。本発明の説明および特許請求の範囲において、以下の用語が使用される。

20

【0054】

「ホモロジーアーム」は、別の核酸配列と相同である核酸配列の部分を意味する。1つの実施形態において、核酸配列は、自然コンピテント細胞のゲノムの一部に対する少なくとも1つのホモロジーアームを含む。

【0055】

「共形質転換」は、2つ以上の核酸配列を細胞に導入することを意味する。

【0056】

「ゲノム編集」は、ゲノム座に対する変更を意味する。変更は、付加、欠失、置換、および再構成の1つまたは複数を含み得る。1つの実施形態において、ゲノム編集は、共形質転換を通して導入される。

30

【0057】

「ゲノム座」または「複数のゲノム座」とはそれぞれ、ゲノムにおける1つまたは複数の場所、位置、または配列を意味する。1つの実施形態において、ゲノム座の場所、位置、または配列は、遺伝子または遺伝子の調節領域に存在する。

【0058】

「遺伝子連鎖」または「連鎖遺伝子マーカ」とは、染色体またはゲノムにおいて互いに近位に位置する2つ以上の遺伝子座を意味する。連鎖遺伝子間の交叉頻度の減少は、それら遺伝子座を分離する距離がより小さいことを示している。

40

【0059】

「非連鎖遺伝子マーカ」とは、それら遺伝子座を分離する距離に依存しない組み換え頻度を有する、2つ以上の遺伝子座を意味する。

【0060】

「遺伝子座」または「複数の遺伝子座」はそれぞれ、遺伝子における1つまたは複数の場所、位置、または配列を意味する。

【0061】

本明細書において使用される「表現型」は、例えば任意の1つの形質または任意の群の形質を有する細胞の物理的、生化学的、および生理的構成全体を意味する。

【0062】

50

「相同組み換え」は、核酸配列が、DNAの2つの類似のまたは同一の分子間で交換される、あるタイプの遺伝子組み換えを意味する。

【0063】

「自然コンピテント細胞」は、細胞膜を機械的に透過性にすることなく、細胞外核酸配列を取り込むことができる細胞を意味する。コンピテンスは、高密度細胞培養および/または栄養制限によって、ならびに細菌増殖の静止相に関連する条件によって、細胞に導入され得る。

【0064】

「自然形質転換を最適化する」とは、すでに自然形質転換の能力を有する細胞が、形質転換をより容易にまたはより大きい効率で受けるように、自然形質転換の能力または潜在性を増加させることを意味する。そのような最適化の例には、自然形質転換能もしくは潜在性を促進する遺伝子の発現を増加させること、および/または自然形質転換能もしくは潜在性を阻害もしくは遮断する遺伝子の発現を減少させることが挙げられる。

10

【0065】

「選択可能剤」とは、その作用剤に曝露された細胞に選択圧を生じる作用剤を意味する。例えば、選択剤は、カナマイシン、スペクチノマイシン、ストレプトマイシン、アンピシリン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、およびペニシリンなどの抗生物質であり、抗生物質耐性遺伝子で形質転換された細胞の曝露は、その抗生物質に対して耐性である。

【0066】

「選択可能マーカー」とは、その選択可能マーカーを有する細胞に表現型または形質を付与する遺伝子を意味する。選択可能マーカーとしては、レポーター遺伝子（例えば、lacZ）および薬物耐性遺伝子（抗生物質耐性遺伝子）が挙げられ得るがこれらに限定されるわけではない。

20

【0067】

「選択的増殖培地」とは、1つまたは複数の選択可能剤を含む増殖培地を意味する。

【0068】

「静的条件」とは、細胞の増殖が最小限であり、増殖に関連する活性が減少するインキュベーションまたは培養の環境を意味する。

【0069】

本開示において、「含む (comprises)」、「含む (comprising)」、「含有する (containing)」および「有する (having)」などは、米国特許法においてそれらに割り当てられる意味を有し得、「含む (includes)」、「含む (including)」等を意味し得る。

30

「本質的に～からなる」または「本質的になる」等も同様に、米国特許法で割り当てられる意味を有し、用語は、非制限的であり、列挙されている内容の基本的または新規特徴が、列挙されている内容より多くが存在することによって変化しない限り、引用されている内容より多くの存在を許容するが、先行技術の実施形態は除外する。

【0070】

「塩基置換」は、相補的ヌクレオチド鎖の間のハイブリダイゼーションの有意な破壊を引き起こさない核酸塩基ポリマーの置換基を意味する。

40

【0071】

「断片」は、ポリヌクレオチドまたは核酸分子の一部を意味する。この一部は、好ましくは参照核酸の全長の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%を含む。断片は、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、または2,500（およびその間の任意の整数値）ヌクレオチドを含み得る。核酸分子に適用される場合の断片は、より大きい核酸の部分配列を意味する。核酸分子の「断片」は、長さが少なくとも約15ヌクレオチドであり得て、例えば、少なくとも約50ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、少なくとも約100～約500ヌクレオチド、少なくとも約500～約1,000ヌクレオ

50

チド、少なくとも約 1,000ヌクレオチド～約 1,500ヌクレオチド、または約 1,500ヌクレオチド～約 2,500ヌクレオチド、または約 2,500ヌクレオチド（およびその間の任意の整数値）であり得る。

【0072】

「相同な」は、2つのポリペプチド間または2つの核酸分子間の配列類似性または配列同一性を意味する。比較される2つの配列の両方におけるある位置が同じ塩基またはアミノ酸単量体サブユニットで占められている場合、例えば2つのDNA分子のそれぞれにおけるある位置がアデニンで占められている場合、それらの分子はその位置で相同である。2つの配列間の相同性のパーセントは、2つの配列によって共有されているマッチするまたは相同な位置の数を、比較される位置の数で除して、100を乗じたものの関数である。例えば、2つの配列における位置の10個中6個がマッチするまたは相同である場合、2つの配列は60%相同である。例として、DNA配列ATTGCCおよびTATGGCは、50%の相同性を共有する。一般的に、最大の相同性が得られるように2つの配列を整列させて比較を行う。

10

【0073】

本発明の文脈において、一般的に存在する核酸塩基に関して以下の略語を使用する。「A」はアデノシンを指し、「C」はシトシンを指し、「G」はグアノシンを指し、「T」はチミジンを指し、および「U」はウリジンを指す。

【0074】

「同一性」とは、目標配列と参照配列との間の核酸配列同一性を意味する。配列同一性は典型的に、配列分析ソフトウェア（例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, BLAST、BESTFIT、GAP、またはPILEUP/PRETTYBOXプログラム）を使用して測定される。そのようなソフトウェアは、様々な置換、欠失、および/または他の修飾に相同性の程度を割付することによって、同一または類似の配列をマッチさせる。同一性の程度を決定するための例示的なアプローチにおいて、BLASTプログラムが使用され得るが、そこでは確率スコア $e^{-3} \sim e^{-100}$ が近縁の配列を示す。

20

【0075】

用語「単離された」、「精製された」、または「生物学的に純粋な」は、その自然の状態で見いだされる場合にそれが通常伴う成分を様々な程度に含まない材料を意味する。「単離する」は、当初の起源または周囲からの分離の程度を示す。「精製する」は、単離より高い程度 of 分離を示す。すなわち、核酸は、それが組み換えDNA技術によって産生される場合には、細胞材料、ウイルス材料、もしくは培養培地を実質的に含まないときに、あるいは化学合成される場合には、化学物質前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まないときに、精製されていることになる。純度および均一性は、典型的に分析化学技術、例えばポリアクリルアミド電気泳動または高速液体クロマトグラフィーを使用して決定される。用語「精製された」は、核酸またはタンパク質が、電気泳動ゲルにおいて本質的に1つのバンドを生じることを示し得る。

30

【0076】

用語「核酸」は、一本鎖または二本鎖型のいずれかのそのデオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）を指す。特に具体的に制限されていなければ、用語は、参照核酸と類似の結合特性を有し、天然起源のヌクレオチドと類似の様式で代謝される、天然のヌクレオチドの公知のアナログを含む核酸を包含する。特に示していなければ、特定の核酸配列はまた、明示されている配列の他に、その保存的改変バリエーション（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オーソログ、SNP、および相補的配列を暗に包含する。詳細には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された（またはすべての）コドンの第3の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基に置換されている配列を生成することによって達成され得る（Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); and Rossolini et al., Mol. Cell.

40

50

Probes 8:91-98 (1994))。

【0077】

「参照」とは、標準または対照条件を意味する。

【0078】

「参照配列」は、配列比較のための基礎として使用される定義された配列である。

【0079】

本明細書において提供される範囲は、範囲内のすべての値に関する簡略表記であると理解される。例えば、1～50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50からなる群から選択される任意の数、数の組合せ、または部分範囲を含むと理解される。

10

【0080】

また、本明細書において使用される用語は、特定の実施形態のみを説明する目的のためであり、制限的であると意図されないと理解される。

【0081】

本明細書において使用される冠詞「1つの(a)」および「1つの(an)」は、その冠詞の文法的目的語の1つまたは1つより多く(すなわち少なくとも1つ)を意味するために使用される。例として、「1つの要素」は、1つの要素または1つより多くの要素を意味する。

20

【0082】

量、時間の長さ等などの測定可能な値について言及する場合に本明細書において使用される用語「約」は、そのような変化が開示の方法を行うために適切であることから、明記された値の±20%の変動、または10%以内、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、もしくは0.01%以内の変動を包含することを意味する。本文からそれ以外であることが明白である場合を除き、本明細書において提供されるすべての数値は、用語「約」によって修飾される。

【0083】

本明細書における可変要素または態様に関する実施形態の詳述は、任意の1つの実施形態としての、または他の任意の実施形態もしくはその一部との組合せとしてのその実施形態を含む。

30

【0084】

本明細書において提供される任意の組成物または方法は、本明細書において提供される他の組成物および方法のいずれかの1つまたは複数と組み合わせることができる。

【0085】

(発明の詳細な説明)

本発明は一般的に、2つ以上の核酸分子によって自然コンピテント微生物を形質転換するための方法およびこれらの分子を含む細胞を特徴とする。

【0086】

本発明は、部分的に、自然コンピテント細胞が多数の核酸配列によって形質転換可能であるという発見に基づいている。

40

【0087】

細菌ゲノムの編集は、研究および合成生物学応用において必須のツールである。本明細書において、自然コンピテント微生物における非連鎖遺伝子マーカーの共形質転換に基づく加速進化法である、自然形質転換による多重ゲノム編集(Multiplex Genome Editing by Natural Transformation)(MuGENT)を説明する。選択および非選択核酸分子の自然共形質転換により、約50%という前例のない頻度で、非選択核酸分子の組み換えを介した痕跡のないゲノム編集が可能となることを見いだされた。ランダム化ヌクレオチドを有する核酸分子を使用することにより、自然共形質転換の際のバイアスの証拠は見いだ

50

されず、このことは、この方法を定向進化研究のために使用できることを示している。さらに、自然共形質転換は、多重（マルチプレックス）ゲノム編集にとって有効な方法であることが見いだされた。MuGENTは、編集された座においてシス（in cis）の選択を必要としないことから、得られる変異体プールは非常に複雑であり、各株は、多重ゲノム編集のあらゆる数および組合せを有する。本発明者らは、*V. cholerae*における自然形質転換を最適化することによって、代謝工学および表現型工学におけるこの技術の有用性を証明する。これは、遺伝子削除、プロモーター交換、ならびに自然コンピテンスおよび形質転換プロセスに関与する5つの遺伝子の翻訳開始を調節することにより、ゲノムを組合せ編集することによって達成された。MuGENTでは、複雑な変異体プールを1週間で生成することができ、自然形質転換の30倍の改善を有する遺伝子編集株の選択をもたらした。本発明者らはまた、*S. pneumoniae*においてもこの技術の有効性を証明し、MuGENTが多重遺伝子相互作用解析において使用される潜在性を強調する。このため、MuGENTは、多様な自然コンピテンス種における加速進化および遺伝子相互作用研究のための広く適用可能なプラットフォームである。

10

20

30

40

50

【0088】

（MuGENT）

変異体を作製できることは、微生物研究において必須である。細菌ゲノムにおいて定義された1つの変異を作製する方法は開発されているが、多数の定義された変異を同時に作製するための方法、すなわち、多重ゲノム編集は、*E. coli*などのモデル種に限定されている。多様な微生物種が、外部のDNAを自然に取り込んで、そのゲノムの中にそれらを組み込む能力、すなわち自然形質転換として知られるプロセスを有する。自然形質転換は、単一変異を作製するために利用されてきたが、これまで多重ゲノム編集のためには使用されていなかった。

【0089】

ゲノム編集を通しての定向進化は、微生物が生体分子を産生するまたは老廃物を分解する能力を改善するために薬学および工業研究において使用される、ますます重要な方法である。これは、典型的に、関連する生化学経路における遺伝子の発現の最適化を通して行われる。現在の微生物ゲノムの編集技術は面倒で、単一座の順次的編集に限定されており、それゆえ多数の座の同時編集を可能にする技術の開発は、社会にとって非常に貴重となるであろう。*E. coli*などの一握りのモデル細菌における多重ゲノム編集の技術が開発されているが、これらの技術は、産業的に重要な微生物には適していない。本明細書において、Multiplexed Genome Editing via Natural Transformation (MuGENT) と呼ばれる、自然形質転換可能な微生物における多数の座の同時編集を可能にする強力な技術を説明する。

【0090】

自然形質転換は、外部から添加されたDNAを取り込んで組み込む能力であり、ほとんどの産業的に重要な微生物が共有する形質である。MuGENTは、選択可能マーカーと、目標の表現型を改善するように設計された一連の無標の遺伝子改変座との共形質転換に基づく。例えば、最終産物の産生を最適化するために、ゲノム内のそれらの場所とは無関係に、生合成経路におけるそれぞれの遺伝子の発現レベルを同時に変化させることができる。原理証明実験において、5つの非連鎖遺伝子座が同時に編集された。それぞれの遺伝子変化は共形質転換の際に独立して起こることから、1回の実験で、可能なすべての変異の組合せを含む変異体のプールを生じる。これによってMuGENTは、微生物の定向進化のための非常に強力なプラットフォームとなる。何十もの遺伝子が関わる複雑な表現型の場合、MuGENTの繰り返しサイクルを行うことができる。これによって、1回の実験で試験することができるものよりもはるかに大きい変異空間を試験することができる。このようにMuGENTは、きわめて短い時間の尺度での微生物の加速定向進化にとって非常に有望である。

【0091】

（自然コンピテンス）

自然コンピテンスおよび形質転換は、多様な微生物種が共有する形質である。これは、細胞外環境からのDNAの取り込み後に、相同組み換えによってこのDNAがゲノムへ組み込まれることを伴う。自然形質転換の間、集団におけるごく一部の細胞のみがコンピテントとなり、形質転換される。非連鎖マーカーを自然コンピテント細菌において共形質転換することが可能であることはすでに証明されており、それぞれのコンピテント細胞が、複数のDNA分子の取り込み能を有することを示している。しかし、多重ゲノム編集アプリケーションのための共形質転換の使用はこれまで研究されていない。本明細書において、自然共形質転換を最適化して、自然コンピテント*V. cholerae*および*S. pneumoniae*における多重ゲノム編集のための方法としてのその使用を証明した。

【0092】

本発明は、一般的に、多数の核酸配列を1つまたは複数の自然コンピテント細胞に並行して導入するための方法を提供する。1つの態様において、本発明は、核酸分子を1つまたは複数の細胞に並行して導入する方法であって、i)自然コンピテント細胞を得るステップと、ii)自然コンピテント細胞を2つ以上の核酸配列と接触させるステップであって、核酸配列の少なくとも1つが選択可能マーカーを含む、ステップと、iii)選択可能マーカーについて選択的な増殖培地で細胞をインキュベートするステップとを含み、2つ以上の核酸配列が細胞に並行して導入される、方法を含む。1つの実施形態において、方法は、ステップii)およびiii)を繰り返すステップをさらに含み、それぞれの繰り返しは異なる選択可能マーカーを含む。1つの態様において、本発明は、核酸配列を1つまたは複数の細胞に並行して導入する方法であって、i)自然コンピテント細胞を得るステップと、ii)2つ以上の核酸配列を自然コンピテント細胞に添加するステップであって、核酸配列の少なくとも1つが選択可能マーカーを含む、ステップと、iii)選択可能マーカーについて選択的な増殖培地で細胞をインキュベートするステップとを含み、2つ以上の核酸配列が細胞に並行して導入される、を含む。別の態様において、本発明は、2つ以上の共形質転換核酸配列を含む共形質転換細胞の異型混交プールを作製するために、自然コンピテント細胞を2つ以上の核酸配列と接触させることを含み、ここで核酸配列の少なくとも1つは選択可能マーカーを含む。

【0093】

多くの細胞が自然コンピテントであるが、細胞は、多数の核酸配列を受容するためにさらに条件を整えられ得る。細胞は、細菌細胞、酵母細胞、または哺乳類細胞であり得る。別の実施形態において、自然コンピテント細胞を得るステップは、静的条件で細胞をインキュベートするステップを含む。静的条件は、細胞の増殖および活性を最小限にする条件であり得る。

【0094】

いくつかの実施形態において、自然コンピテント細胞は、Firmicutes、Chroococcales、Bacteroidia、Chlorobi、Deinococci、Actinobacteria、Proteobacteria、およびEuryarchaeotaからなる群から選択される。いくつかの他の実施形態において、自然コンピテント細胞は、表1に列挙された種から選択される。

【0095】

10

20

30

【表 1】

種系 統樹 順	門	種の名称	染色体アク セーション	シヨ ット ガン seq.	RefSeq	DprA Swiss Prot ID	DprA 遺伝子座タグ	ComEC Swiss Prot ID	ComEC 遺伝子座タグ
1	Firmicutes (other)	<i>Staphylococcus aureus Mu50</i>	BA000017.4		NC_002758	Q99UM2	SAV1249	Q99TR1	SAV1588
2	Firmicutes (Bacilli)	<i>Bacillus licheniformis DSM 13</i>	AE017333.1		NC_006322	Q65JN8	BLI01831	Q65H43	BLI02750
3		<i>Bacillus subtilis 168</i>	AL009126.3		NC_000964	P39813	BSU16110	P39695	BSU25570
4		<i>Bacillus amyloliquefacie ns FZB42</i>	CP000560.1		NC_009725	A7Z4N1	RBAM_015940	A7Z6X1	RBAM_023870
5	Firmicutes (other)	<i>Lactobacillus sakei 23K</i>	CR936503.1		NC_007576	Q38WY7	LCA_0992	Q38WR1	LCA_1069
6		<i>Leuconostoc carnosum JB16</i>	CP003851.1		NC_018673	K0D7D3	C270_04415	K0D947	C270_01930
7	Firmicutes (Streptococci)	<i>Streptococcus mutans UA159</i>	AE014133.2		NC_004350	Q8DUD4	SMU_1001	Q8DV79	SMU_626
8		<i>Streptococcus thermophilus</i>	CP000419.1		NC_008532	Q03KX5	STER_0922	Q03JE9	STER_1520
9		<i>Streptococcus salivarius</i>	FR873482.1			F8LQ76	SALIVA_1183	F8LRF3	SALIVA_1617

10

20

30

40

21	<i>gordonii</i> Challis	BA000039.2	NC_004113	Q8DJ00	tlr1431	Q8DI88	tlr1702
22	<i>Thermosynecho coccus elongatus</i> BP-1	BA000022.2	NC_000911	P73345	slr1197	P73100	slr1929
23	<i>Synechocystis spp. PCC6803</i>	AP008231.1	NC_006576	Q5N3V3	syc0827_c	Q5N114	syc1646_c
24	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	CP000510.1	NC_008709	Q7MXB1	PG_0295	Q7MUD5	PG_1594
25	<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	CP001097.1	NC_010803	B3EFC5	Clim_0314	B3EDH5	Clim_1551
26	<i>Chlorobium limicola</i> DSM 245	AE006470.1; AL646053.1	NC_002932	Q8KFR7	CT0255	Q8KCP6	CT1367
27	<i>Chlorobi</i> <i>Deinococcus radiodurans</i> R1	AE000513;A E001825		Q9RY31	DR_0120	Q9RTB1	DR_1854
28	<i>Thermus thermophilus HB27</i>	AE017221.1	NC_005835	Q72GH5	TT_C1873	Q72H92	TT_C1603
29a	<i>Streptomyces virginiae^b</i> (spp.)	CP002993.1	NC_015953	G2NJ75	SACTE_4823	G2NE25	SACTE_1980
29b	<i>SirexAA-E</i>						
	<i>Streptomyces kasugaensis</i>						

10

20

30

40

30	<i>Thiobacillus thioparus</i> DSM 505		<u>ARD</u> <u>U</u>									
31	<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	AL646052.1		NC_003295	Q8Y3B2	RSc0068	Q8Y0C4	RSc1120				
32	<i>Achromobacter</i> spp. SY8		<u>AGU</u> <u>F</u>									
33	Proteobacteria (b) <i>Neisseria meningitidis</i> MC58	AE002098.2		NC_003112	Q9K1K1	NMB0116	Q9K0B2	NMB0702				
34	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> FA 1090	AE004969.1		NC_002946	Q5F5Q2	NGO1865	Q5F9W1	NGO0276				
35	<i>Kingella kingae</i> ATCC 23330		<u>AFHS</u>									
36	<i>Kingella denitrificans</i> ATCC 3339		<u>AEW</u> <u>V</u>									
37	<i>Xylella fastidiosa</i> M12	CP000941.1		NC_010513	B0U4M6	Xfasm12_1931	B0U4R0	Xfasm12_0386				
38	Proteobacteria (g) <i>Legionella pneumophila Philadelphia 1</i>	AE017354.1		NC_002942	Q5ZSC2	lpg2597	Q5ZXV5	lpg0626				
39	<i>Acinetobacter baylyi</i> TG19579		<u>AMIC</u>									

10

20

30

40

40	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	CP000094.2	NC_007492	Q3KKE3	Pf01_0019	Q3K8I9	Pf01_4178
41	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	CP000304.1	NC_009434	A4VF10	PST_0023	A4VMT8	PST_2639
42	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ; ATCC BAA-1303	CP001157.1	NC_012560	C1DFW0	Avin_00190	C1DR16	Avin_14730
43	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp	CP000680.1; AE003853.1	NC_009439	A4XNB5	Pmen_0057	A4XSQ9	Pmen_1611
44	<i>Vibrio fischeri</i> ES114	CP000020.2; CP000021.2	NC_006840 ; NC_006841	Q5E1R0	VF_2541	Q5E0F3	VF_A0423
45	<i>Vibrio cholerae</i> N16961	AE003852.1	NC_002505 ; NC_002506	Q9KVU1	VC_0048	Q9KQW ₈	VC_1879
46	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	AE016795.3 ; AE016796.2	NC_004459 ; NC_004460	Q8DDE1	VV1_1050	Q8DAV3	VV1_2084
47	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> O3:K6	BA000032.2; BA000031.2	NC_004605 ; NC_004603	Q87KD7		Q87R17	
48	<i>Vibrio</i> spp. EX25	CP001805.1; CP001806.1	NC_013456 ; NC_013457	A7K4Z8	VEA_002059	A7K283	VEA_003988

10

20

30

40

49	<i>Escherichia coli</i> K-12	U00096.2	NC_000913	P30852	b4473	P37443	b0913
50	<i>Gallibacterium anatis</i> UMN179	CP002667.1	NC_015460	F4H9U4	UMN179_0123 1	F4HDN9	UMN179_0066 5
51	<i>Actinobacillus suis</i> H91-0380	CP003875.1	NC_018690	K0G6Q5	ASU2_09565	K0G559	ASU2_03145
52	<i>Actinobacillus pleuropneumoni</i> ae L20	CP000569.1	NC_009053	A3N310	APL_1712	A3N0C8	APL_0766
53	<i>Haemophilus parasuis</i> SH0165	CP001321.1	NC_011852	B8F725	HAPS_1573	B8F483	HAPS_0467
54	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20	L42023.1	NC_000907	P43862	HI_0985	P44408	HI_0061
55	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> T3T1	FQ312002.1	NC_015964	E1W3Z1	PARA_09770	E1W502	PARA_13430
56	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i> NJ8700	CP001607.1	NC_012913	C6AQ11	NT05HA_1586	C6ANC3	NT05HA_0957
57	<i>Aggregatibacter actinomycetemc</i> omitans D11S-1	CP001733.1	NC_013416	C9R1W7	D11S_0393	C9R469	D11S_1223
d	Firmicutes (Bacilli)						

10

20

30

40

これは、所望の表現型もしくは形質、または特定の組み換え産物の発現を有する細胞株を産生するために重要である。自然コンピテント微生物における非連鎖遺伝子マーカーの共形質転換に基づく加速進化は、多重ゲノム編集の1つのアプローチである。1つの実施形態において、核酸配列の2つ以上が非連鎖遺伝子マーカーを含む。

【0097】

1つの実施形態において、自然コンピテント細胞を、その自然コンピテント細胞のゲノムの遺伝子座に対する少なくとも1つのホモロジーアームを含む核酸配列の少なくとも1つと接触させる。ホモロジーアームは、約5 kb未満、4.5 kb未満、4 kb未満、3.5 kb未満、3 kb未満、2.5 kb未満、2 kb未満、1.5 kb未満、1 kb未満、900塩基未満、800塩基未満、700塩基未満、600塩基未満、500塩基未満、またはそれ未満の長さを有し得る。例示的な実施形態において、ホモロジーアームは、約4 kb未満の長さを有する。ホモロジーアームは、約1 kb ~ 約4 kb、および約1.5 kb ~ 約3 kbの範囲の長さを有し得る。

10

【0098】

本発明はまた、少なくとも1つのゲノム編集を含む核酸配列の少なくとも1つを含む。ある実施形態において、ゲノム編集は、自然形質転換に関する遺伝子に導入される。ゲノム編集の導入は、例えば自然形質転換を促進するための発現の増加など、遺伝子の活性を変化させることができる。別の実施形態において、自然コンピテント細胞を2つ以上の核酸配列と接触させるステップは、自然形質転換を最適化する少なくとも1つのゲノム編集を導入することを含む。

20

【0099】

選択可能マーカーは、その選択可能マーカーを有する細胞に表現型または形質を付与する遺伝子である。選択可能マーカーとしては、レポーター遺伝子（例えば、lacZ）および薬物耐性遺伝子（抗生物質耐性遺伝子）が挙げられ得るがこれらに限定されるわけではない。1つの実施形態において、薬物耐性遺伝子は、カナマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、およびペニシリン耐性遺伝子からなる群から選択される。

【0100】

（共形質転換された細胞）

また、核酸配列の導入後の自然コンピテント細胞の組成物も本発明に含まれる。1つの態様において、本発明は、2つ以上の共形質転換核酸配列を含む共形質転換細胞の異型混交プールを含み、ここで、細胞は自然コンピテントであって2つ以上の核酸配列によって共形質転換されており、核酸配列の少なくとも1つが選択可能マーカーを含む。

30

【0101】

1つの実施形態において、少なくとも1つの選択可能マーカーは、レポーター遺伝子または薬物耐性遺伝子である。選択可能マーカーが薬物耐性遺伝子である場合、薬物耐性遺伝子は、カナマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、およびペニシリン耐性遺伝子からなる群から選択される。

40

【0102】

共形質転換細胞の異型混交プールは、Firmicutes、Chroococcales、Bacteroidia、Chlorobi、Deinococci、Actinobacteria、Proteobacteria、およびEuryarchaeotaからなる群から選択される自然コンピテント細胞を含む。いくつかの他の実施形態において、共形質転換細胞の異型混交プールは、表1に列挙された種から選択される自然コンピテント細胞を含む。

【0103】

共形質転換された自然コンピテント細胞を産生するために使用される核酸配列は、非連鎖または連鎖遺伝子マーカーを含む2つ以上の核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、核酸配列の少なくとも1つは、自然コンピテント細胞のゲノムの遺伝子座に対

50

する少なくとも1つのホモロジーアームを含む。これらの例において、ホモロジーアームは、約5 kb未満、4.5 kb未満、4 kb未満、3.5 kb未満、3 kb未満、2.5 kb未満、2 kb未満、1.5 kb未満、1 kb未満、900塩基未満、800塩基未満、700塩基未満、600塩基未満、500塩基未満、またはそれ未満の長さを有し得る。例示的な実施形態において、ホモロジーアームは、約4 kb未満の長さを有する。ホモロジーアームは、約1 kb～約4 kb、および約1.5 kb～約3 kbの範囲の長さを有し得る。

【0104】

共形質転換された自然コンピテント細胞の異型混交プールは、少なくとも1つのゲノム編集を含む核酸配列の少なくとも1つを含み得る。ゲノム編集をさらに、自然形質転換に

10

【0105】

別の実施形態において、異型混交プールは、2つ以上の核酸配列の可能なすべての組合せを含む。従って、その共形質転換された細胞は、2つ以上の核酸配列に関するすべての組み換えの可能性を体現する。

【0106】

(装置)

別の実施形態において、本発明は、核酸配列の2つ以上の集団を細胞の集団に並行して導入するための装置であって、自然コンピテンスを誘導する静的条件を生成するように構成された、1つまたは複数の自然コンピテント細胞を含むレセプタクルと、自然コンピテント細胞への共形質転換のためにレセプタクルに核酸配列の2つ以上の集団を導入するようにレセプタクルと流体的につながっている、核酸配列の2つ以上の集団を含む容器と、自然コンピテンス条件を、共形質転換細胞を選択するための選択的増殖培地と置き換えるために、選択的増殖培地を含む容器とを含む、装置を含む。1つの実施形態において、装置は、異なる選択的増殖培地を含む容器をさらに含む。

20

【0107】

本発明の実践は、特に示していなければ、十分に当業者の技量の範囲内である分子生物学(組み換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の従来技術を使用する。そのような技術は、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, fourth edition (Sambrook, 2012); “Oligonucleotide Synthesis” (Gait, 1984); “Culture of Animal Cells” (Freshney, 2010); “Methods in Enzymology” “Handbook of Experimental Immunology” (Weir, 1997); “Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells” (Miller and Calos, 1987); “Short Protocols in Molecular Biology” (Ausubel, 2002); “Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications and Troubleshooting” (Babar, 2011); “Current Protocols in Immunology” (Coligan, 2002)などの文献において十分に説明されている。これらの技術は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの産生に応用可能であり、そのため、本発明の作製および実践において検討され得る。特定の実施形態に関して特に有用な技術を以下の章で考察する。

30

【0108】

以下の実施例は、本発明のアッセイ、スクリーニング、および治療方法をいかに作製し使用するかについての完全な開示および説明を当業者に提供するために記述されており、本発明者らが自らの発明であると考えるものの範囲を制限することは意図されていない。

40

【実施例】

【0109】

(実施例1：自然共形質転換の最適化)

第一段階として、V. choleraeにおける2つの非連鎖マーカの共形質転換を最適化し、そこでは、一方のマーカを選択して他方の組み込みに関してスクリーニングした。PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)産物を使用して、中立(ニュートラルな)遺伝子を抗生物質耐性(Ab^R)マーカ(選択)に置き換え、そしてPCR産物を使用してlacZに

50

ナンセンス点突然変異を導入した（非選択）（図 1 A および 6 A ~ 6 B）。

【 0 1 1 0 】

図 6 A は、PCR 産物由来の 2 つの選択可能マーカーを用いた細菌ゲノムの共形質転換および組み換えを示す概略図である。図 6 B は、PCR 産物由来の 1 つの選択可能マーカーを用いた細菌ゲノムの組み換え、およびカナマイシン耐性に関する選択可能マーカーを有するプラスミドの共形質転換を示す概略図である。図 6 C は、PCR 産物における VC 1 8 0 7 カナマイシン耐性遺伝子およびプラスミドカナマイシン耐性遺伝子のコングレッション (congression) あるいはランダムな取り込みを示すグラフである。図 6 D は、T G 1 (r e c A +) 細胞および D H 5 (r e c A -) 細胞の形質転換効率を示すグラフである。

10

【 0 1 1 1 】

非選択マーカーが 2 k b のホモロジーアームを有し、高濃度 (3 μ g / m L) で存在する場合に、最高の共形質転換率 (約 5 0 ~ 6 0 %) が得られた (図 1 B および 1 C) 。選択マーカーに対する制約はより少なかった。予想されたように、ホモロジーアームの長さまたは選択マーカーの量を増加させると、得られた形質転換体の数は増加したが (図 1 D および 1 F) 、これは、たとえ選択産物が非選択産物と等モル濃度で存在しても、共形質転換率を実質的に変化させなかった (図 1 E および 1 G) 。このことは、選択 : 非選択 DNA の比率ではなくて、形質転換反応における非選択 DNA の濃度を増加させることが、最適な共形質転換にとって重要であることを示した。また、異なる染色体上の非選択マーカーが l a c Z マーカーと同様の共形質転換率を示したことから、ゲノムにおける選択マーカーと非選択マーカーの間の距離も、共形質転換率を変化させなかった (図 1 H) 。5 0 ~ 1 , 1 6 6 b p の欠失および挿入がそれぞれ、約 6 0 % ~ 2 5 % の共形質転換率で得られたことから、遺伝子編集は点突然変異に限定されなかった (図 1 I および 1 J) 。

20

【 0 1 1 2 】

(実施例 2 : 自然共形質転換の際のバイアスの評価)

共形質転換実験の結果は、自然共形質転換を、1 つの遺伝子座での不偏定向進化のために使用できることを示している。l a c Z 遺伝子においてランダム化された 6 (N 6) ヌクレオチドまたは 3 0 (N 3 0) ヌクレオチドのいずれかを有する PCR 産物による共形質転換実験を行った。l a c Z 座での変異の複雑度を増加させるために、それぞれのサイクルで中立座における抗生物質耐性マーカーを変化させる選択産物を使用することにより、N 6 および N 3 0 非選択産物を用いて複数の共形質転換サイクルを行った (図 2 A および 2 B) 。投入した (インプット) PCR 産物および得られた形質転換体プールのディープシーケンシングに基づく、N 6 または N 3 0 試料のいずれに関しても、WT により近い配列について共形質転換率の増加は見いだされなかった (図 2 C および 2 D) 。さらに、投入した PCR プールにおける N 6 量体の量と、得られた形質転換体プールにおける N 6 量体の量との間に有意な相関が見いだされ、共形質転換の際にゲノムに組み換えられた N 6 量体においてバイアスがほとんどまたは全く存在しないことをさらに支持した (図 2 E) 。このように、これらのデータは、自然共形質転換を、1 つの遺伝子座での不偏定向進化のために使用できることを示唆している。

30

【 0 1 1 3 】

(実施例 3 : Multiplexed genome editing by natural transformation (MuGENT) は、V. cholerae における自然形質転換を最適化する)

選択の不在下で多重にゲノム編集することは、代謝経路および表現型を最適化するための「加速進化」のために使用することができる。従って、自然共形質転換を多重ゲノム編集のために使用することができるかを評価した。ゲノム編集は、選択を必要としないことから、得られた形質転換体はあらゆる数の編集を有し得、複数の共形質転換サイクルを使用することにより、最終形質転換体のプールにおいて遺伝子編集の複雑度は増加した (図 3 A) 。

40

【 0 1 1 4 】

概念実証として、自然形質転換およびその調節に関与する遺伝子の多くが十分に特徴づ

50

けされていることから、*V. cholerae*における自然形質転換の表現型を最適化した。このアプローチでは、ペリプラスムへの形質転換DNA (tDNA)の取り込み (tfoX)、内膜を超えた輸送 (tfoXおよびhapR)、細胞質一本鎖tDNAの保護 (dprA)、およびtDNAの相同性検索/組み込み (recA)を含む、自然形質転換の異なるステップに影響を及ぼす遺伝子座を標的とした(図3B)。tfoX、hapRおよびrecA遺伝子は、プロモーター交換(プロモーター構築物=LacI誘導型Ptac、およびrrnBアンチターミネーター)およびリボソーム結合部位(RBS)調節に関する標的とした一方、dprAは、この遺伝子がオペロン内に存在することから、RBS調節のみに関する標的とした。RBS調節は、これら4つの遺伝子のRBS内の2つの重要な位置の半ランダム化変異誘発によって行われた(図5A)。ミスマッチ修復(MMR: mismatch repair)システムは、組み込み後の遺伝子編集を阻止または修正し得る。それゆえ、MMRの重要な成分であるmutSも不活化の標的とした。全体で、これらのゲノム編集に関して1000個の可能な組合せが存在した。

10

【0115】

第一に、共形質転換を使用して、ゲノム編集を細胞の集団に多重に(マルチプレックスで)導入した。それぞれの変異のためのPCR産物を、形質転換反応において、選択可能マーカーと共に等モル濃度で混合した。それぞれのサイクルで中立座において抗生物質耐性カセットを変化させるよう選択された産物を使用して、複数サイクルのMuGENTを行った。マルチプレックス対立遺伝子特異的コロニー(MASC)PCRによって形質転換体をスクリーニングしたところ、1サイクルの共選択(C1)後、集団の約50%が少なくとも1つの遺伝子編集を有することが見いだされた(図3C)。2サイクルの共選択(C2/R0)後、集団の約90%が少なくとも1つの編集を含み、約4%が5つすべての座で編集を有した。共選択の両方のサイクルが1週間未満で完了した。このように、MuGENTは、既定の組の座において複雑な変異体プールを作製するための実現可能で非常に有効な戦略である。

20

【0116】

次に、目標は、改善された自然形質転換の表現型を有する編集された株を選択して特徴づけすることであった。従って、増加した自然形質転換性の表現型を有する株を濃縮するために、C2/R0変異体プールを、1つの選択マーカーのみを使用した自然形質転換の追加の2ラウンドに供した(R1およびR2)。これらの追加の2ラウンドの濃縮後、tfoXおよびrecAでの編集は、それぞれ集団の約100%および約90%に存在し、これらの編集が自然形質転換を増強したことを示唆した(図3D)。実際に、定義された編集株を、野生型RBSを用いて試験したところ、tfoX、recA、およびtfoXrecA株の形質転換効率は、親株より大きかった(図3E)。次に、ランダムに選択した7つのコロニーを最終濃縮プールから単離した。選択したコロニーはすべて、親株より高い形質転換効率を有し、多くのものは、あらゆる定義された1個所編集および2個所編集株と比較して改善されていた(図3E、下のパネル)。一般的に、hapRに編集を有する株はキチン上で改善された増殖を示し、このことは、2ラウンドの選択後に、tfoAおよびrecAのみが編集された株と比較して形質転換効率がより低いにもかかわらず(図3E)何故hapRを含む3~5個の編集を有する株に関する選択が行われていたかの理由を示す(図3C)。

30

40

【0117】

いずれにせよ、MuGENTは、親株と比較して約30倍までの上昇および任意の1個所編集株と比較して約6倍の上昇を表す、改善された自然形質転換表現型を有する多重編集株の迅速な単離を可能にした。これは、これらのRBS最適化ゲノム編集の組合せ効果におそらく起因した。これらの実験において踏査された組合せ空間を、古典的な技術を使用して順次的態様で評価したとすれば、過大な量の時間と努力を要するであろう。このように、これらの実験は、MuGENTが自然コンピテント微生物における加速進化のための優れたプラットフォームであることを証明している。

【0118】

50

(実施例4: M u G E N Tは、Streptococcus pneumoniaeにおいて、定義された遺伝子ファミリーの可能なすべての変異体の組合せを迅速に生成する)

遺伝子の冗長性は、生物において表現型を表出させることを妨害し得る。M u G E N Tを使用して、定義された変異体の組合せを有するプールを生成することによって冗長性を明らかにした。これを試験するために、および別の種においてM u G E N Tを実証するために、S. pneumoniaeにおける4つのp h t遺伝子を不活化の標的とした。これらの遺伝子は冗長な亜鉛結合タンパク質として以前に関連付けられている。M u G E N Tを使用して、未成熟なタンDEM終止コドンを、p h t A、p h t B、p h t D、およびp h t Eに組み合わせて導入した。共形質転換率は、S. pneumoniaeではV. choleraeと比較して低かった。これにもかかわらず、実施に要する期間が1週間である5サイクルのM u G E N T後、可能な16のすべての組合せがこれらのゲノム編集に関して得られた(図4Aおよび4C)。V. choleraeとS. pneumoniaeの間の編集頻度の差は、これらの細菌におけるミスマッチ修復(MMR)の効能の差によるものであり得る。このことを試験するために、MMRを欠損する株において組合せp h t遺伝子不活化実験を繰り返したところ、編集頻度が劇的に改善することが見いだされた(図4B)。

10

20

30

40

50

【0119】

これに対し、MMRは、V. choleraeにおいて試験した場合には最小の効果を示した(図5Aおよび5B)。このように効果が異なる根拠は現在のところ不明である。すなわち、MMR欠損S. pneumoniaeを使用するとM u G E N Tの速度が増加されたが、しかしながら、これはまた、ゲノムにおけるオフターゲット変異の頻度も増加させ得る。実際に、このことは、MMR欠損株において一般的に行われるM A G E(多重自動ゲノム編集)の際に観察された。最近、温度感受性MMR対立遺伝子を使用すると、オフターゲット変異を制限しながら、効率的なM A G Eが可能となることが証明された。S. pneumoniaeに条件つきMMR欠損を適用することもまた、オフターゲット効果を制限しながら、効率的なM u G E N Tを可能にし得る。

【0120】

M u G E N Tは、2つの自然形質転換可能な細菌、すなわちグラム陰性V. choleraeおよびグラム陽性S. pneumoniaeにおける多重ゲノム編集のために使用することができる。これらの微生物はいずれもヒト病原菌であり、M u G E N Tは、新規表現型を明らかにし、これらの細菌がどのようにしてその哺乳動物宿主と相互作用するかに関して深い洞察を提供する潜在性を有する。詳細には、M u G E N Tは、多数の定義された変異を有する株を迅速に生成するために必要なツールを提供すると共に、遺伝子相互作用試験のプラットフォームとして新規生物学を明らかにする潜在性を保有する。

【0121】

しかし、VibrioおよびStreptococciの非病原性の種もまた、加速進化のプラットフォームとしてのM u G E N Tから利益が得られ得る。Vibrio種は、水性環境において天然に見いだされる。キチンは、食品産業の廃棄物であり、水性環境における最も豊富な生体分子であり、Vibrioは、炭素および窒素源としてキチンを天然に分解して利用する。このように、これらの種は、投入炭素源としてキチンを使用する生物工学応用のために利用することができる。加えて、いくつかのVibrio種、すなわち、V. splendidusは、アルギン酸塩を分解および利用することができ、生物工学応用のために利用することができる可能な炭素源をさらに拡大する。現在、これらの種の制限的な特徴は、効率的な代謝および表現型工学のために必要な遺伝子ツールがないことである。今日まで、自然コンピテンスおよび自然形質転換が、多数のVibrio種において証明されている。このように、M u G E N Tは、多様な生物工学応用において使用するためのVibrio種を開発するために必要な遺伝子ツールを提供する。プロバイオティック微生物であるStreptococcus thermophilusは、乳産業界において一般的に使用され、自然コンピテントである。このように、M u G E N Tは、乳産業界におけるその使用を変革もしくは増強するために、ならびにこの種のプロバイオティック活性を増強するために、S. thermophilusにおける代謝工学のために使用され得る。

【 0 1 2 2 】

多数の多様な微生物種が、自然形質転換可能であることが公知であるかまたはバイオインフォマティクスに基づいて予測され、従って、MuGENTの使用のための候補であろう。これらには、Bacillus、Cyanobacterium、Lactococcus、Acinetobacter、Neisseria、およびHaemophilus種が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。このように、この方法は、多様な研究および生物学アプリケーションのために広く応用可能となるはずである。

【 0 1 2 3 】

(実施例 5 : V. cholerae 宿主株における細菌人工染色体の共形質転換変異誘発)

MuGENTは、細菌人工染色体の多重ゲノム編集のために使用することができる。細菌人工染色体 (B A C) は、細菌においてインサートDNAの大きいセグメント (1 0 0 k b ~ 3 5 0 k b) のクローニングを可能にする。DNAをBACにクローニング後、細菌系において利用可能な遺伝学的ツールを使用して遺伝子改変することができる。この理由から、BACは、トランスジェニック動物モデルを作製するためおよび大きいウイルス (ヘルペスウイルス、コロナウイルス、ポックスウイルス、およびフラボウイルス) の変異誘発のために広く使用されている。

【 0 1 2 4 】

現在、BACを維持するために使用される最も一般的な細菌宿主は、Escherichia coli であり、BACの変異誘発に利用可能な最善の方法は、「リコンビニアリング」として知られているものである。この方法は、細胞 1 0 , 0 0 0 ~ 1 0 0 , 0 0 0 個中に 1 個の効率でBACの変異誘発を可能にする (例えば、細胞の 0 . 0 1 % ~ 0 . 0 0 1 % が変異を含む) 。このようにして、選択可能マーカー (すなわち、抗生物質耐性遺伝子) が、しばしば、所望の変異体BACを含有する細菌細胞を単離するために使用される。しかし、多くの場合において、最終的なBACにおいてこれらの選択可能マーカーを有することは望ましくない。

【 0 1 2 5 】

得られたBACが選択可能マーカーを欠くようなBAC変異誘発を可能にする3つの方法がある。第1の方法においては、1) リコンビナーゼ標的部位が隣接する選択可能マーカーを使用してリコンビニアリングを行う。選択可能マーカーを使用して変異体BACを選択した後、次にマーカーを2) 部位特異的リコンビナーゼの発現によって特異的に切除する。この技法においては、得られたBACは選択可能マーカーを欠くが、複数のステップを必要とし、リコンビナーゼ標的配列の「痕跡」配列を含む。第2の方法では、選択可能マーカーとカウンター選択可能マーカーを含む遺伝子カセットをリコンビニアリングに使用する。この方法もまた、1) リコンビニアリングを行って、このカセットを所望の座に導入して、選択可能マーカーを介して選択するステップ、次に2) 遺伝子カセットを所望の変異と置き換える第2ラウンドのリコンビニアリングを行うステップという、2つのステップを有し、この変異は、カウンター選択可能マーカーを介して選択される (すなわち、現時点で遺伝子カセットを欠く細胞を選択する) 。ここでは、得られたBACは、選択可能マーカーを欠き、「痕跡がない」が、編集されたBACを得るために複数のステップを必要とする。第3の方法においては、1) いかなる選択可能マーカーも使用することなくリコンビニアリングを行って、まれな変異体BAC (0 . 0 0 1 %) を、2) リコンビニアリングされた集団の濃縮によって回収する。この濃縮は、これらのまれなBACを単離するために、多数の希釈ステップおよびPCRステップを必要とする。この方法は、1回のリコンビニアリング反応で、痕跡のないBAC変異誘発を可能にするが、しかしながらこの手順は、編集されたBACを濃縮する冗長なプロセスを必要とする。加えて、上記の方法の3つすべてについて、これらのBACにおいて複数の変異を生成する必要がある場合には、それらは、順次的に (すなわち、一度に一つずつ) 作製されなければならない。

【 0 1 2 6 】

本明細書において、1ステップでBACの多重変異誘発を可能にする新規変異誘発技法

10

20

30

40

50

を説明する。結果は、自然共形質転換を、細菌*Vibrio cholerae*における痕跡のないゲノム編集のために使用できることを証明している。この方法は、2つ以上のDNA産物のBACへの共形質転換に基づく。1つの産物は、中立座において組み込まれる選択可能マーカーを有し（例えば、不要な遺伝子を抗生物質耐性マーカーと置き換える）、他の産物は、目標の座において組み込まれる、痕跡のない変異を有する。*E. coli*において使用されるBACは*V. cholerae*においても増殖させることができる。

【0127】

予備試験の結果は、*V. cholerae*における共形質転換を使用して、BACが、細胞2.5個あたり約1個の効率で編集されることを示した（例えば、この変異誘発技法後に細胞の40%が所望の痕跡のない変異を含む）。図7は、*V. cholerae*宿主株におけるBACの共形質転換変異誘発における共形質転換率を示すグラフである。*V. cholerae*宿主株は、不活化lacZ遺伝子を有し、IPTG（イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド）誘導プロモーターからtfoXを過剰発現し、pBlueox（細菌人工染色体ベクター骨格）を有する。この株を、選択マーカー（*V. cholerae*染色体に組み込まれ、スペクチノマイシンに対する耐性を付与したPCR産物）、および、3つの点突然変異を導入するかまたはpBlueoxのlacZ遺伝子の50bpを削除する非選択産物と共に、100μM IPTGを含むLB（Luria培地）において形質転換した。変異特異的コロニーPCRによって、非選択産物の組み込みに関して形質転換体をスクリーニングした。データを2回の独立した生物学的反復実験から得た。

10

【0128】

この新規方法は、*V. cholerae*株、共形質転換の際の選択のために必要なDNA、およびBAC変異誘発のための陽性対照が供給されるBAC変異誘発キットの作製にふさわしいであろう。キットのユーザーは、編集を必要とするBACと、BACに組み込まれる目標の変異を含むPCR産物とを供給するだけでよいであろう。

20

【0129】

本明細書において記述される結果は、以下の方法および材料を使用して得られた。

【0130】

（細菌株および培養条件）

*V. cholerae*および*S. pneumoniae*の親株をすべて、表2に記載する。*V. cholerae*および*S. pneumoniae*を、正確に本明細書において記述される通りに、ルーチンで増殖させた。*V. cholerae*については、適宜、培地に50μg/mLカナマイシン、100μg/mLスペクチノマイシン、100μg/mLストレプトマイシン、または100μg/mLアンピシリンを添加した。*S. pneumoniae*については、適宜、培地に200μg/mLスペクチノマイシン、4μg/mLクロラムフェニコール、または100μg/mLストレプトマイシンを添加した。

30

【0131】

【表 2】

表 2: 親株

原稿での株の名称		遺伝子型および抗生物質耐性		説明
WT <i>V. cholerae</i>	E7946 Sm ^R			<i>V. cholerae</i> における同時形質転換を最適化するために使用した、野生型 <i>V. cholerae</i> O1 El Tor の Sm ^R 誘導体
<i>V. cholerae</i> MuGENT の親株	E7946 SmR ΔVC1807 <i>lacI^h::lacZ Kan^R</i>			<i>V. cholerae</i> における自然形質転換のために MuGENT において使用される P _{lac} プロモーターを調節する <i>lacI^h</i> を <i>lacZ</i> 遺伝子を含む。VC1807 をカナマイシン耐性マーカーと交換する選択産物による同時形質転換によって生成された
Δ <i>mutS</i> <i>V. cholerae</i>	E7946 SmR ΔVC0535 (<i>mutS</i>) Spec ^R			<i>V. cholerae</i> における同時形質転換に及ぼす MMR の効果を調べるために使用される Spec ^R マーカーと <i>mutS</i> 遺伝子を交換した
WT <i>S. pneumoniae</i>	TIGR4			<i>phl</i> MuGENT に使用した野生型ビルレント血清型 4 肺炎球菌単離体
MMR 欠損 <i>S. pneumoniae</i>	TIGR4 Sm ^R <i>magellan2::SP_2076 (hexA)</i>			MMR 欠損株における <i>phl</i> MuGENT のために使用した、 <i>S. pneumoniae</i> における MMR の重要な成分であるマリナートランスポゾンの <i>hexA</i> への挿入

10

20

30

40

【 0 1 3 2 】

(変異体構築物および株の作製)

50

本研究の全体を通して、選択および非選択PCR産物のための変異体構築物は、他のPCRポリメラーゼと比較して低いエラー率を有するPhusionポリメラーゼ(Thermo Scientific)を使用して、正確に本明細書において記述される通りにスプライシング・バイ・オーバーラップ伸長(SOE: splicing by overlap extension)PCRにより生成した。すべてのSOE産物を生成するために使用したプライマーを表3に列挙する。V. choleraeでは、選択産物が標的とする中立座は、真正フレームシフトを有するトランスポザーゼ偽遺伝子であるVC1807であり、これをスペクチノマイシン、カナマイシン、またはアンピシリン耐性マーカーと置き換えた。S. pneumoniaeでは、選択産物は、SP_1051をクロラムフェニコールまたはスペクチノマイシン耐性マーカーと置き換えた。V. choleraeにおけるMuGENTの際に使用したP_{tac}およびrrnBアンチターミネーターからなるプロモーター構築物は、以前に記述されたTn10トランスポゾンの末端に由来した。

【0133】

【表 3】

表 3: プライマーの一覧

プライマーの名称	配列 (5' → 3')	説明
変異体構築物のプライマー		
ABD346	GTAGAATAAGTGGCGGTTGAGCC	F1 oligo for 3 kb UP arm ΔVC1807 SOE
ABD344	GATTAGCAACGATTCTAGCGCAGGAG	F1 oligo for 2Kb UP arm ΔVC1807 SOE
ABD342	ATTTTCAGTTGGCCTACAATGCTTTCC	F1 oligo for 1Kb UP arm ΔVC1807 SOE
ABD340	gtcagggatccccggaatACGTTTCATTAGTCACCTCTATTGTTAACTTGTTC	R1 oligo for UP arm ΔVC1807 SOE
ABD341	gaagcagctccagcctacaTAGTCGAAAATAAAAAAAGAGGCTCGCCTC	F2 oligo for DOWN arm ΔVC1807 SOE
ABD343	CGATGAGGATAAAAAACACGTACAGGCC	R2 oligo for 1Kb DOWN arm ΔVC1807 SOE
ABD345	CTTGCTAACCCGTGGTGTACCAGC	R2 oligo for 2Kb DOWN arm ΔVC1807 SOE
ABD347	GCGCCCAATGTTGTCCCTTTGATG	R2 oligo for 3Kb DOWN arm ΔVC1807 SOE
ABD123	ATTCGGGGATCCGTCGAC	F oligo for Kan ^R , Amp ^R , and Spec ^R markers in <i>V. cholerae</i>
ABD124	TGTAGGCTGGAGCTGCTTC	R oligo for Kan ^R , Amp ^R , and Spec ^R markers in <i>V. cholerae</i>
ABD357	GCGCTGCCAAGTAGGTGAACG	F1 oligo for UP arm of Δ <i>mu</i> S SOE for <i>V. cholerae</i>
ABD358	gtcagggatccccggaatCATAATCTTATGTGCTGCTTATCATCATCTG	R1 oligo for UP arm of Δ <i>mu</i> S SOE for <i>V. cholerae</i>
ABD359	gaagcagctccagcctacaTAGTTATTGCCATATCTCAAGCATGGAATC	F2 oligo for UP arm of Δ <i>mu</i> S SOE for <i>V. cholerae</i>
ABD360	AGATCTTGCCGTGATGACGCTTTACTC	R2 oligo for UP arm of Δ <i>mu</i> S SOE for <i>V. cholerae</i>
ABD336	ACCCTAAGCGGTTCAATTTGTCGATG	F1 oligo for 3 kb <i>lacZ</i> UP arm
ABD334	AGTGTCCGGACTCTTTGCTCTG	F1 oligo for 2 kb <i>lacZ</i> UP arm
ABD332	GGCTGAACGTTGGTTGTCGAAAATGAC	F1 oligo for 1 kb <i>lacZ</i> UP arm
ABD333	ATCACATGCCCCAATTCGGGATG	R2 oligo for 1 kb <i>lacZ</i> DOWN arm
ABD335	CACGTCTACTAGCCGATGCAGTG	R2 oligo for 2 kb <i>lacZ</i> DOWN arm
ABD337	TGATCCGATGATCTTTTCGCCCCACC	R2 oligo for 3 kb <i>lacZ</i> DOWN arm
ABD329	GAACATGGGGTGTACGGGCAGTGCCCATTAACGATGTGCGGGTTTTTGCCCAATC TTG	R1 oligo for <i>lacZ</i> TAA transversion mutation
ABD328	CAAGATTGGCAAAAACCCGCACATCGTTTAATGGCACTGCCGTACACCCCATG TTG	F2 oligo for <i>lacZ</i> TAA transversion mutation
ABD331	GAACATGGGGTGTACGGCAGTGCATTTAACGATGTGCGGGTTTTTGCCCAATC TTG	R1 oligo for <i>lacZ</i> TAG transversion mutation
ABD330	CAAGATTGGCAAAAACCCGCACATCGTTAAATaGCACTGCCGTACACCCCAT GTTG	F2 oligo for <i>lacZ</i> TAG transversion mutation
ABD361	CCTCtccctatagtgagtcgtaataaatttAACGATGTGCGGGTTTTTGCCCAATC	R1 oligo for Δ50, Δ100, Δ464, and Δ1166 bp in <i>lacZ</i>
ABD362	CGTTAAATgaatttaaacgactactataggagaGAGGCICGTTTGGATGTTGGG	F2 oligo for Δ50 bp in <i>lacZ</i>

10

20

30

40

ABD363	CGTTAAATgaatfaataactactactataggagaGaGGTTTGCCTCTGTTTGAGAAGCC	F2 oligo for Δ100 bp in <i>lacZ</i>
ABD364	ATCGTTAAATgaatfaataactactactataggagaGAGGGTGAAAACCTGTTGGTGG	F2 oligo for Δ464 bp in <i>lacZ</i>
ABD365	CATCGTTAAATgaatfaataactactactataggagaGAGGCCAAATCTCGAAACCCAC	F2 oligo for Δ1166 bp in <i>lacZ</i>
ABD288	GCCAAATCGTGGAGTCGACCC	F1 oligo for a transversion point mutation upstream of VCA0063 that abolishes an MboI cleavage site
ABD069	AAATAAaATCAATTATCATTTGTGTTATTTAGAGC	R1 oligo for a transversion point mutation upstream of VCA0063 that abolishes an MboI cleavage site
ABD068	AAATGATAAATTGATYTTATTTAGATTTGTGTAGAGTGGCGAC	F2 oligo for a transversion point mutation upstream of VCA0063 that abolishes an MboI cleavage site
ABD289	CGTCACCTGAAGATTCCATCCGTC	R2 oligo for a transversion point mutation upstream of VCA0063 that abolishes an MboI cleavage site
ABD841	GGCACTGCCGTACACCCCATGTTCCGGTACCCCGACACCATCGAATG	F oligo to amplify <i>lacZ</i> with overlaps to insert into the <i>lacZ</i> gene of <i>V. cholerae</i> .
ABD842	GGCTCTCTGGCTTATTGTGGGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGC	R oligo to amplify <i>lacZ</i> with overlaps to insert into the <i>lacZ</i> gene of <i>V. cholerae</i> .
ABD840	TTAATTGCGTTGGCTCACTGCCCGACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTTGGC	F oligo for P_{lac} and <i>rrnB</i> promoter construct (i.e. the MIDDLE for the MuGENT PCR products of <i>tfoX</i> , <i>hapR</i> , and <i>recA</i>)
ABD625	CTGATGAAATCCCTAAATGATTTTTGG	R oligo for P_{lac} and <i>rrnB</i> promoter construct (i.e. the MIDDLE for the MuGENT PCR products of <i>tfoX</i> , <i>hapR</i> , and <i>recA</i>)
ABD808	GTGTGGCTTGTCGGTCGGCAAAGG	F1 oligo for UP arm of <i>tfoX</i> MuGENT SOE product
ABD809	CGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGCAATACTTTGGCCAGATTATG	R1 oligo for UP arm of <i>tfoX</i> MuGENT SOE product
ABD810	CAAAATCATTAGGGGATTCATCAGGGGAACTGATTAAGGAKsAATGGA TATGAATG	F2 oligo for DOWN arm of <i>tfoX</i> MuGENT SOE product
ABD811	GTTAGAAGAGCTTATCCATCACCG	R2 oligo for DOWN arm of <i>tfoX</i> MuGENT SOE product
ABD812	AAATGGAGTTTGATCGCATTGGC	F1 oligo for UP arm of <i>recA</i> MuGENT SOE product
ABD813	CGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAACCCCTGTATAGAAAAGTTTGGC	R1 oligo for UP arm of <i>recA</i> MuGENT SOE product
ABD814	CAAAATCATTAGGGGATTCATCAGGTGACTATCCSGAGRGAGTAAATGGAC GAGAATAAAC	F2 oligo for DOWN arm of <i>recA</i> MuGENT SOE product
ABD815	TGATCAGCGTTTGAATACGTCG	R2 oligo for DOWN arm of <i>recA</i> MuGENT SOE product
ABD816	AAAGCACCAATAATCCCGGACC	F1 oligo for UP arm of <i>hapR</i> MuGENT SOE product
ABD817	CGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAACCTGTGGTGAATAATGTGC	R1 oligo for UP arm of <i>hapR</i> MuGENT SOE product
ABD818	CAAAATCATTAGGGGATTCATCAGATTGGCAAGSAKATACCCCTATGGACG CATCAATCG	F2 oligo for DOWN arm of <i>hapR</i> MuGENT SOE product
ABD819	GGCTGCTTAGCAAATTTACCAG	R2 oligo for DOWN arm of <i>hapR</i> MuGENT SOE product
ABD820	CGCTCTTATCTGCTTGGATAATGG	F1 oligo for UP arm of <i>dprA</i> MuGENT SOE product
ABD821	GCCGCTAAATCCTGATCTTTCATTAACKSCATCATCAACCAAAATCGATTG TTC	R1 oligo for UP arm of <i>dprA</i> MuGENT SOE product

ABD822	AGTTAA TGAAAGATCAGGATTTAGCGGC	F2 oligo for DOWN arm of <i>dprA</i> MuGENT SOE product
ABD823	TGAAGTACAAGGCCAGTTACTGG	R2 oligo for DOWN arm of <i>dprA</i> MuGENT SOE product
ABD824	TTTAGCCCCATTGGCGAACTGGG	F1 oligo for UP arm of <i>mutS</i> MuGENT SOE product
ABD825	GAGTATCTTTGACGTA TTGGATC ^c teatattactaCATAATCTTATGTCGCTGCTTATC	R1 oligo for UP arm of <i>mutS</i> MuGENT SOE product
ABD826	GATAAGCAGCGACATAAAGATTATGtagtaataatgaGATCCAATACGTCAAAGATACTC	F2 oligo for DOWN arm of <i>mutS</i> MuGENT SOE product
ABD360	AGATCTTGCCCTGATGACGCTTTACTC	R2 oligo for DOWN arm of <i>mutS</i> MuGENT SOE product
Spn. cat F	CGGTATCGATAAAGCTTGATG	F oligo for SpecR and CmR markers in <i>S. pneumoniae</i>
Spn. cat R	TGGAGCTGTAATATAAAAACCTTCTTC	R oligo for SpecR and CmR markers in <i>S. pneumoniae</i>
ABD528	GGAGA ACTTAAATGAATTGTAGAGGACATG	F1 oligo for UP arm of ΔSP_1051 SOE
1051_R1	CATCAAGCTTATCGATACCGTTCCATTAGGCCACCATC	R1 oligo for UP arm of ΔSP_1051 SPE
1051_F2	GAAGAAGGTTTTTATATTACAGCTCCAGGGGAAAAGAGACTTAATG	F2 oligo for DOWN arm of ΔSP_1051 SOE
ABD529	CTATGTGTTCCAGCTGACTCCCATG	R2 oligo for DOWN arm of ΔSP_1051 SOE
ABD534	AAAAGTGCACGACAAAATAGCCC	F1 oligo for <i>phdD</i> inactivation MuGENT SOE product
ABD535	GACAATGTCTGAATCCTaCAACTGcTAAATTCGGATCTTTCATGAGGAGC	R1 oligo for <i>phdD</i> inactivation MuGENT SOE product
ABD536	GCTCCTCATGAAAGATCCGAATTA ^c gAGTTgAGGATTCAGACATTGTC	F2 oligo for <i>phdD</i> inactivation MuGENT SOE product
ABD539	GACAATATCAGCGTCTTaaAGTTGcTAGTTGGATCCTTCATCAAGAGTTCTT CAC	R2 oligo for <i>phdD</i> inactivation MuGENT SOE product
ABD536	GCTCCTCATGAAAGATCCGAATTA ^c gAGTTgAGGATTCAGACATTGTC	F1 oligo for <i>phdE</i> inactivation MuGENT SOE product
ABD539	GACAATATCAGCGTCTTaaAGTTGcTAGTTGGATCCTTCATCAAGAGTTCTT CAC	R1 oligo for <i>phdE</i> inactivation MuGENT SOE product
ABD540	GTGAAGAACTCTTGATGAAGGATCCAAACTa ^c gCAACTT ^c TAAGACGCTGATAT TGTC	F2 oligo for <i>phdE</i> inactivation MuGENT SOE product
ABD541	AAAGGATAAACACAGATCCAGCTGC	R2 oligo for <i>phdE</i> inactivation MuGENT SOE product
ABD548	GTTAATGAGGTCAAGGGTGGATAgTTATCTAGGTAGATGGAAAATACTATG	F1 oligo for <i>phdE</i> inactivation MuGENT SOE product
ABD543	GACAATGTCTGAATCCTaCAACTGcTAAATTCGGATCTTTCATGAGGAGC	R1 oligo for <i>phdE</i> inactivation MuGENT SOE product
ABD544	GCTCCTCATGAAAGATCCGAATTA ^c gCAGTTgAGGATTCAGACATTGTC	F2 oligo for <i>phdE</i> inactivation MuGENT SOE product
ABD545	TGCATAAAGCAATCCCTTCTGATTT	R2 oligo for <i>phdE</i> inactivation MuGENT SOE product
ABD546	GAGACATTATTACTGTCCAAAGAAACCG	F1 oligo for <i>phdE</i> inactivation MuGENT SOE product
ABD547	CATAGTATTTTCCATCTACCTaGATAAc ^c TATCCACCCTTGACCCTCATTAAC	R1 oligo for <i>phdE</i> inactivation MuGENT SOE product
ABD548	GTTAATGAGGTCAAGGGTGGATAgTTATCTAGGTAGATGGAAAATACTATG	F2 oligo for <i>phdE</i> inactivation MuGENT SOE product
ABD543	GACAATGTCTGAATCCTaCAACTGcTAAATTCGGATCTTTCATGAGGAGC	R2 oligo for <i>phdE</i> inactivation MuGENT SOE product
MASC PCR		
OLJ363	GTGTGGGCACCTCGACATATGACAAG	F oligo for <i>tfoX</i> , <i>hapR</i> , and <i>recA</i>
ABD845	CTGAATCGAGCGTTCAATAATCG	R oligo for <i>tfoX</i> = 407 bp product
ABD846	CATAAACATGTTCTGATCAGCAG	R oligo for <i>hapR</i> = 542 bp product
ABD847	TTCAGGGCCGAAGATCTCAAC	R oligo for <i>recA</i> = 306 bp product

ABD830	GATTTGGTTGATGATGta	F1 oligo for <i>dprA</i>
ABD831	CGATTTGGTTGATGATg	F2 oligo for <i>dprA</i>
ABD849	GCCGCTTGAGTGGTTAAAAACACC	R oligo for <i>dprA</i> = 205 bp
ABD833	GCGACATAAGATTATGtagtaataatg	F oligo for <i>mutS</i>
ABD848	AGGGTATCAATGCCGTGACG	R oligo for <i>mutS</i> = 704 bp
ABD553	AGATCCGAATTAgCAGTTat	F oligo for <i>phuD</i> and <i>phtB</i>
ABD569	AGCTGGTTGAGGATTTGGTGC	R oligo for <i>phuD</i> = 811 bp
ABD618	GCATTATCTGCTCTTGAGTT	R oligo for <i>phtB</i> = 194 bp
ABD607	GATCCAAACTAgCAACTct	F oligo for <i>phtE</i>
ABD617	GGCAGAAAAGCTTGCTGTAAG	R oligo for <i>phtE</i> = 646 bp
ABD562	TCAAGGGTGGATAgGTTAtt	F oligo for <i>phtA</i>
ABD619	TTTTGTCGGCGATAGGTTc	R oligo for <i>phtA</i> = 382 bp
N6およびN30ライブラリ調製プライマー		
ABD419	CTTATGCGCAACTTCTCCGATATTTCTTAGCCAAAGATTGGC	F oligo for PCR1, and also the sequencing oligo used for deep-sequencing
ABD408	GTGACTGGAGTTCAGACGGTGTGCTCTCCGATCTCCTTGCCATCTGCCAGTTA CTCCG	R oligo for PCR1
ABD420	AATGATACGGGACCCAGGAGATCTACACTCTTTCTTATGGCAACTTCTCC GATATCTTCTTAGCC	F oligo for PCR2
BC33- BC44	CAAGCAGAAAGACGGCATAACGAGATNNNNNNGTGACTGGAGTTCAGACGGTG TGCTCTTCCGATCT	R oligo for PCR2 (N ₆ region indicates the barcode sequence that is unique for each R oligo used)

10

20

30

40

【 0 1 3 4 】

(*V. cholerae*における自然形質転換およびM u G E N T)エビの殻由来のキチン上で増殖後の*V. cholerae*の自然形質転換を、本明細書において

50

記述されるように行った。簡単に説明すると、指数関数的増殖期中期の *V. cholera* 10^8 CFU (コロニー形成単位) を、定義された人工海水 (7 g/L) 1 mL 中のキチンフレーク 80 mg に添加した。培養物を静置して 16 ~ 24 時間インキュベートして、自然コンピテンスを誘導した。次に、上清を丁寧に除去して、新しい人工海水と置き換えて、*V. cholerae* によって天然に分泌された DNアーゼの存在を減少させた。次に、DNA を表記の濃度で添加して、30 でさらに 16 時間静置してインキュベートした。形質転換効率およびキチン上のバイオマスを評価するために、反応を Ab^R マーカー (すなわち、形質転換体) について選択的な培地に直接播種し、および抗生物質を欠く培地に直接播種して総生存 CFU を評価した (すなわち、キチン上の総バイオマス)。形質転換効率は、
形質転換体の CFU / 総生存 CFU
として定義された。

10

【0135】

lacZ への共形質転換については、細胞を、 Ab^R マーカーについて選択的であり $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - D - ガラクトピラノシド (X - gal) を含む培地に播種して、共形質転換率を評価した。

【0136】

MuGENT について、選択マーカーを含む、すべての PCR 産物は、形質転換反応に $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ で添加され、3 kb のホモロジーアームを有したが、これは共形質転換に関する最適なホモロジーアームの長さおよび濃度であることが見いだされたものである。これらの条件で、1 mL 反応物でのそれぞれのサイクルの MuGENT によって 10^5 個の形質転換体が生成された。反応物を DNA と共にインキュベートした後、試料を抗生物質の非存在下の LB プロスにおいて 1 時間増殖させた。反応物の少量のアリコート (約 1 / 10) を播種して形質転換効率を評価し、選択的プレートからの単コロニーを、MASC PCR のために使用した。それぞれの形質転換の残りを、形質転換体を選択するための適切な抗生物質を含む LB プロス 50 mL に接種して、通気しながら 37 で終夜増殖させた。翌日、この培養物を、抗生物質を欠く培地で 1 : 100 に希釈して、 OD_{600} が約 1.0 となるまで増殖させた。次に、これらの細胞を洗浄して、約 10^8 CFU をキチン上に播種して、別のサイクルの MuGENT を繰り返すか、または変異体プールから形質転換体を選択した。最初のサイクルの MuGENT の後、この変異体プールを用いたその後のすべての形質転換は、 $10 \mu\text{M}$ IPTG の存在下で行って、いくつかのゲノム編集において使用される P_{tac} プロモーターの発現を誘導した。編集された遺伝子 hapR の IPTG 誘導発現によって増殖の欠陥が起こることから、LB での増殖は常に、IPTG の非存在下で行った。

20

30

【0137】

(*S. pneumoniae* における自然形質転換および MuGENT)

S. pneumoniae における自然形質転換を、正確に本明細書に記述される通りに行った。簡単に説明すると、細菌を形質転換培地 (13mM HCl および 0.05% グリシンを含む THY プロス) において、開始 $OD_{600} = 0.02$ から $OD_{600} = 0.06$ となるまで増殖させた。培養物 $500 \mu\text{l}$ を、ガラス試験管中の予め加温した THY $500 \mu\text{l}$ に添加した。次に、NaOH (1 N 保存液) $10 \mu\text{l}$ 、BSA (8% 保存液) $25 \mu\text{l}$ 、CaCl₂ (1 M 保存液) $1 \mu\text{l}$ 、および CSP2 ($350 \text{ng}/\mu\text{l}$ 保存液) $1.6 \mu\text{l}$ を記載順に反応物に添加した。次に、反応を 37 で正確に 14 分間インキュベートした後、形質転換 DNA を添加した。MuGENT のために、それぞれの非選択産物 $1.5 \mu\text{g}$ および選択産物 300ng を、1 mL 形質転換反応物に添加した。すべての非選択産物は $2.5 \sim 3 \text{kb}$ のホモロジーアームを有した一方、選択産物は 1.5kb のホモロジーアームを有した。DNA の添加後、反応物を 37 の $5\% \text{CO}_2$ インキュベータにおいて 1 時間インキュベートした。それぞれの反応物の少量のアリコート (約 1 / 10) を播種して形質転換効率を評価し、選択プレートからの単コロニーを MASC PCR のために使用した。形質転換の残りを、形質転換体について選択的な培地において、単コロニーとなるように播種した。翌日、これらのプレートを THY 培地で浸して、コロニーを

40

50

再懸濁させた。次に、この細菌スラリーを、新しいTHY培地10 mLに $OD_{600} = 0.05$ となるように希釈して、 $OD_{600} = 約0.6$ となるまで増殖させた。次に、細胞を洗浄して希釈し、再度形質転換して、追加のMUGENTサイクルを行った。

【0138】

(MASC PCR)

MUGENTのそれぞれのサイクルにおいて、24~48個の単コロニーを、本質的に本明細書において記述される通りにMASC PCRによってゲノム編集に関して評価した。MASC PCRのために使用したオリゴは、すべて表3に記載されたものである。

【0139】

(自然共形質転換の際のバイアスを評価するためのハイスループットシーケンシングデータの分析)

*V. cholerae*のlacZ遺伝子における6個(N6)または30個(N30)の塩基をランダム化したPCR産物の共形質転換後、得られた形質転換体プールから精製したゲノムDNAから、ならびにインプットのPCRプライミング・バイ・オーバーラップ伸長(SOE)産物から、ディープシーケンシングのためのライブラリを生成した。これは、最初にABD419およびABD408を用いたPCR増幅を行うことによって達成された。次に、このPCRを、ABD420およびリバースプライマー(IlluminaHiSeqの1つのレーンと一緒に移動する試料を区別するために使用された固有の6bpバーコード配列を付加する)を使用する2ラウンド目のPCRの鋳型として使用した。シーケンシングライブラリを調製するために使用したすべてのプライマーは表3に見いだすことができる。

【0140】

シーケンシング後、データをTufts University Galaxyサーバーで分析した。最初に、「トリム」ツールを使用して、N30試料に関しては最初の6塩基を、あるいはN6試料に関しては17塩基を除去した。次に、クリップツールを使用して、すべての分子の3'末端における一定の配列を除去した(N6 = 5'-CACTGCCGTACACCCCATGTTTCCTTTGC-3' およびN30 = 5'-CCCCATGTTTCCTTTGC-3')。フィルターfastqを使用して、6塩基(N6)または30塩基(N30)の長さのリード、および最小クオリティスコア34(0~41の尺度上)を得た。それらがWTコンセンサスからどれほど逸脱しているかに関してこれらのリードの分布を定義するために、WT配列を参照として使用するバーコードスプリッターツールを使用して、任意の数(n = 1, 2, 3, ..., 30)のミスマッチを許容して、WT配列との差が1, 2, 3塩基等々である配列の分布を定義した。インプットおよび得られた形質転換体プールにおけるそれぞれのN6量体の正確な量を定義するために、バーコードスプリッターツールを、参照としてそれぞれのN6量体の配列を用いて使用して、0個のミスマッチを許容した。

【0141】

(*Vibrio Cholerae*の共形質転換プロトコール)

*V. Cholerae*培養物をローラードラム内で振とうさせて30で終夜増殖させた。翌朝、20 μ Lの二次培養物を5 mLの新しいLBに移して、 $OD_{600} = 0.4 \sim 1.0$ に達するまで30で増殖させた。1 mLアリコート中の細胞を18,000 rcfで1分間沈降させて(微量遠心)、上清を除去した。細胞を、等量の0.5 \times インスタント海水(IO)(7 g/L)で1回洗浄した後、0.5 \times IO中で $OD_{600} = 1.0$ となるように再懸濁させた。次に、900 μ Lの0.5 \times IOを採取して、それぞれの形質転換反応のためにキチン(エビ: Sigma-C7170)50 mgの上に載せた。キチン(乾燥)は予め2 mLチューブにおいてオートクレーブした。次に、ステップ4からの洗浄した細胞100 μ Lをそれぞれのチューブに添加して、ボルテックスミキサーで混合した。次に細胞を、30で16~24時間静置した。

【0142】

エキソおよびエンドヌクレアーゼ活性を最小限にするために、上清約500 μ Lを、沈降したキチンを乱さないように除去した。これを新しい0.5 \times IO 300 μ Lに置き

10

20

30

40

50

換えた。次に、非選択PCR産物3～5 μ gを添加した後、選択DNAを添加した。プラスミドに関しては、pBAD18Kan（プラスミドはrecA+宿主株（すなわち、TG1）において調製した）の場合、1 μ gが約 10^4 個の形質転換体を生じた。PCR産物に関しては、100ngが約 10^3 ～ 10^4 個の形質転換体を生じ、3 μ gが約 10^5 個の形質転換体を生じた。より長いホモロジーアームはより多くの形質転換体を生じた。次に反応物を2～3回穏やかに反転させて反応物を混合した。

【0143】

反応物を30の静置状態に戻し、細胞を16～24時間インキュベートした。形質転換反応物をボルテックスミキサーにより十分に混合し、500 μ Lを、LB 1mLを含む2mLエッペンドルフチューブに移した。変異体を解離させて分離するとともに細菌の塊を壊して各コロニーが確実にクローン性となるように、反応物を振とうさせながら37

10

【0144】

次に、選択マーカーについて選択するための抗生物質を有する培地に培養物を播種して、30で終夜置いた。コロニーを採取して、抗生物質を含むブロス200 μ L（96ウェルプレート）で増殖させ、同時に、コロニーPCRによってコロニーを変異に関してスクリーニングした（すなわち、コロニーを滅菌チップで採取して、選択培地200 μ Lに軽く漬けた後、コロニーの残りを水50 μ Lの中で粉碎して、後者を煮沸して、2～3 μ LをTaqポリメラーゼによる25 μ LのコロニーPCRのために使用した）。反応物を96ウェルプレート中で37にて静置した。陽性ウェル（すなわち、目標の変異を含むウェル）を、再び選択培地上で単コロニーとなるように筋状に再塗付し、この筋状再塗付物からの単コロニーの遺伝子型を再確認した。

20

【0145】

（他の態様）

本明細書における可変要素の任意の定義における要素の列挙の記載は、いずれか単一の要素または列記された要素の組合せ（または部分組合せ）としてのその可変要素の定義を包含する。本明細書における実施形態の列挙は、いずれか単一の実施形態または任意の他の実施形態もしくはその一部との組合せとしてその実施形態を含む。

【0146】

本明細書において引用された特許、特許出願、および刊行物の開示はいずれも、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。本発明は、特定の実施形態を参照して開示されているが、本発明の真の趣旨および範囲から逸脱することなく本発明の他の実施形態および変更が当業者によって工夫され得ることは明らかである。添付の特許請求の範囲は、そのような実施形態および同等の変更のすべてを含むと解釈されることが意図される。

30

【 図 1 A 】

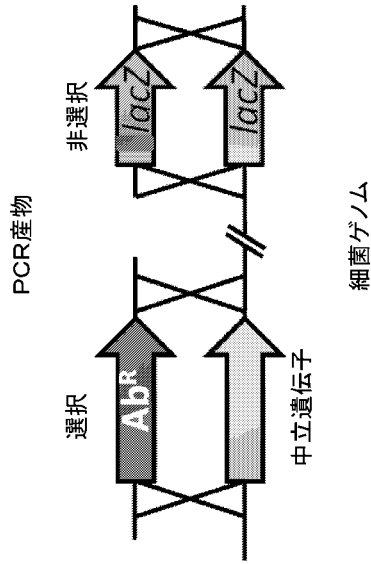


Figure 1A

【 図 1 B 】

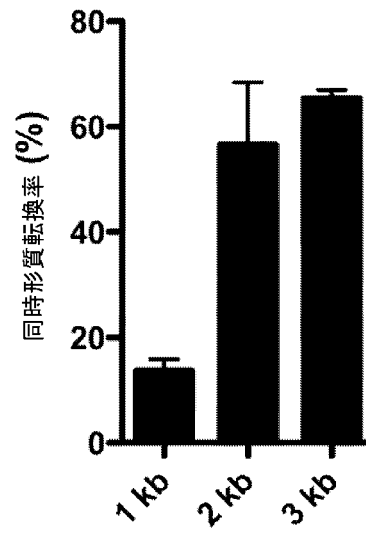


Figure 1B

【 図 1 C 】

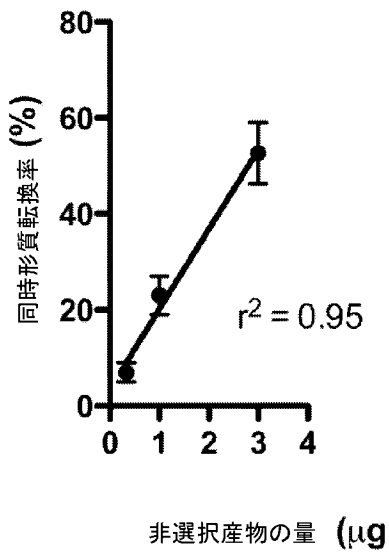


Figure 1C

【 図 1 D 】

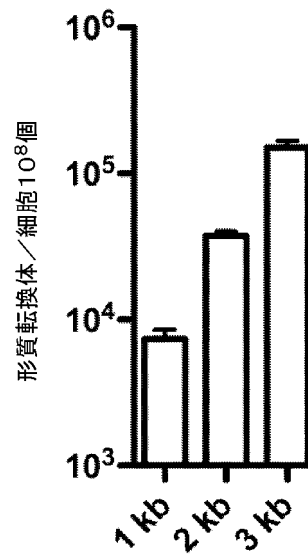


Figure 1D

【 図 1 E 】

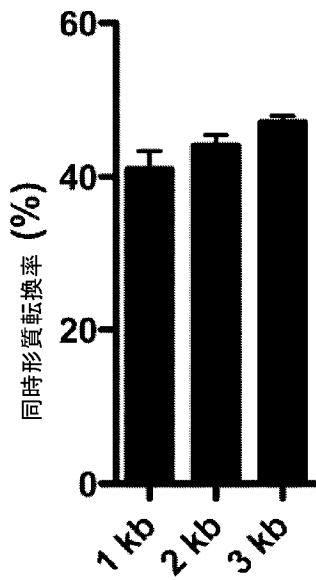


Figure 1E

【 図 1 F 】

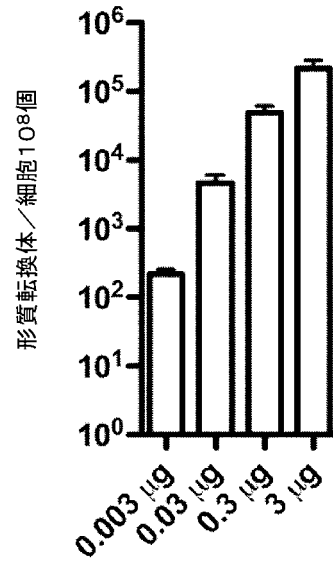


Figure 1F

【 図 1 G 】

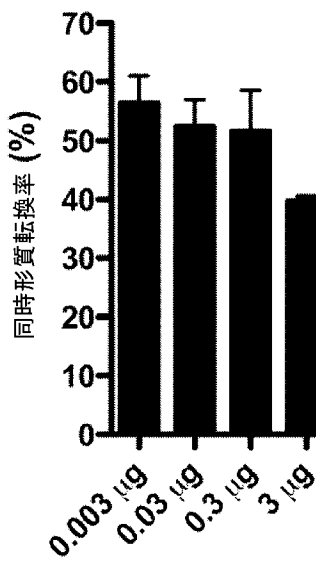


Figure 1G

【 図 1 H 】

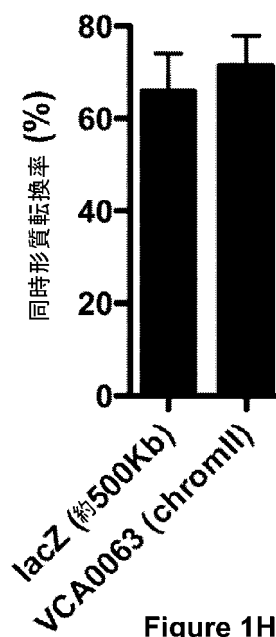


Figure 1H

【 図 1 I 】

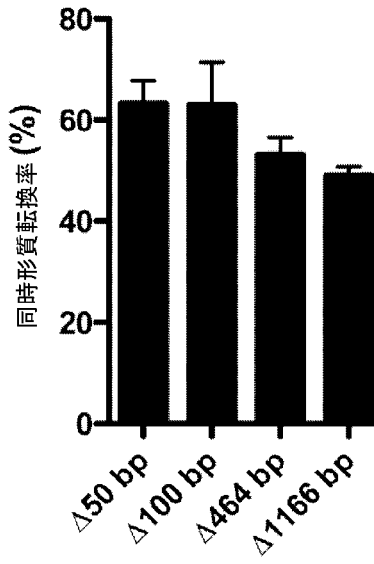


Figure 1I

【 図 1 J 】

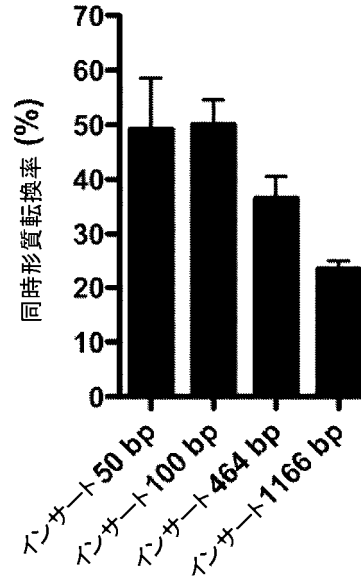
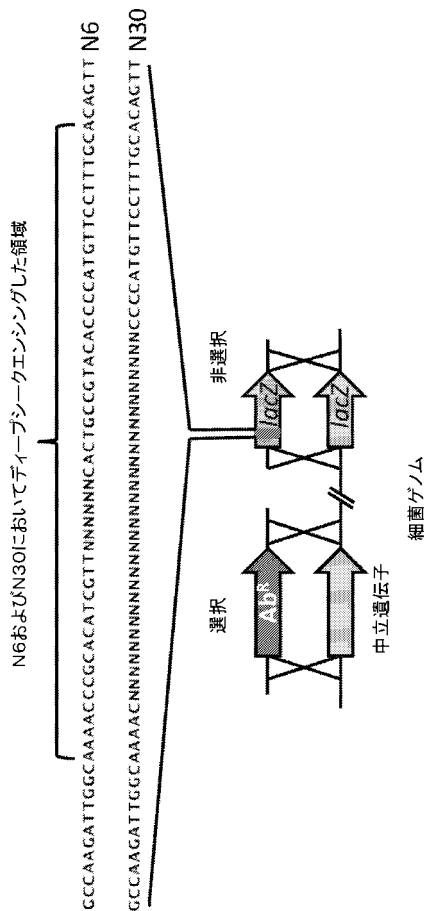


Figure 1J

【 図 2 A 】



【 図 2 B 】

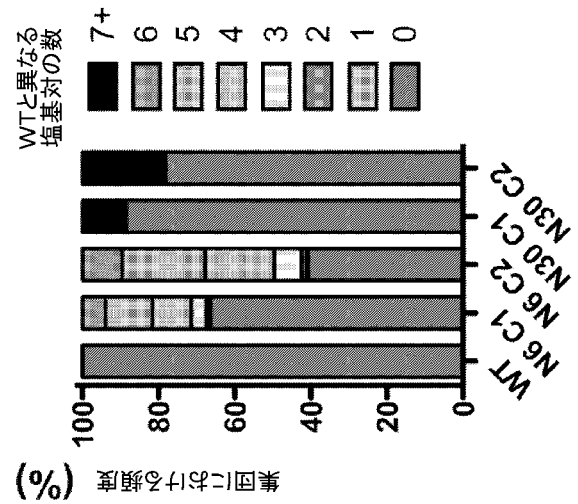
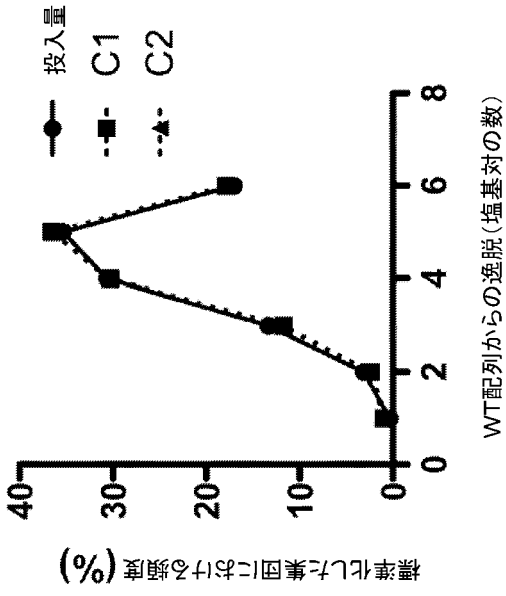


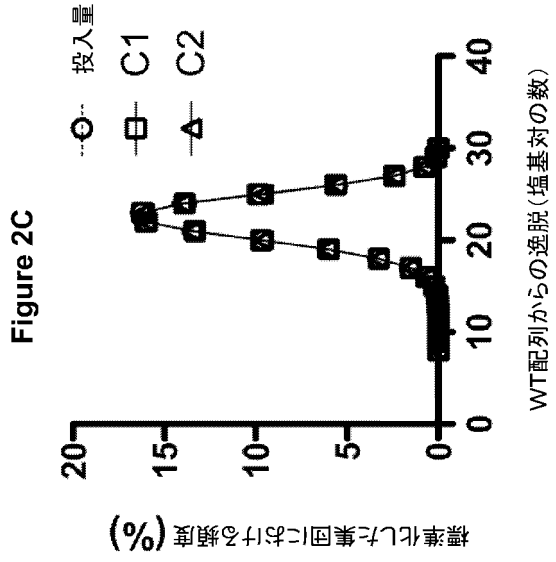
Figure 2A

Figure 2B

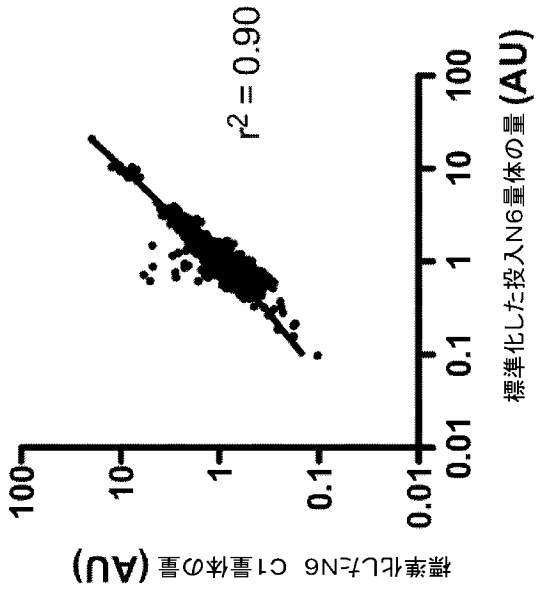
【 図 2 C 】



【 図 2 D 】



【 図 2 E 】



【 図 3 A 】

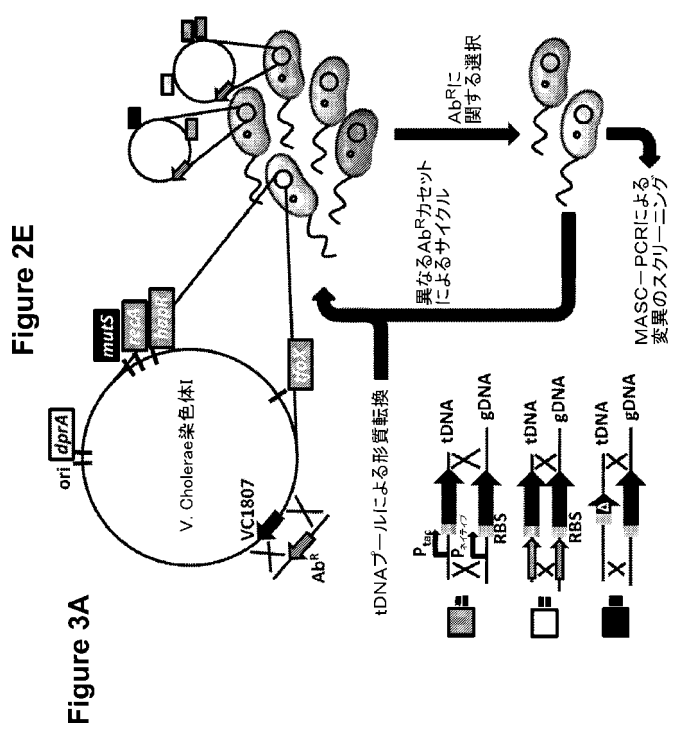


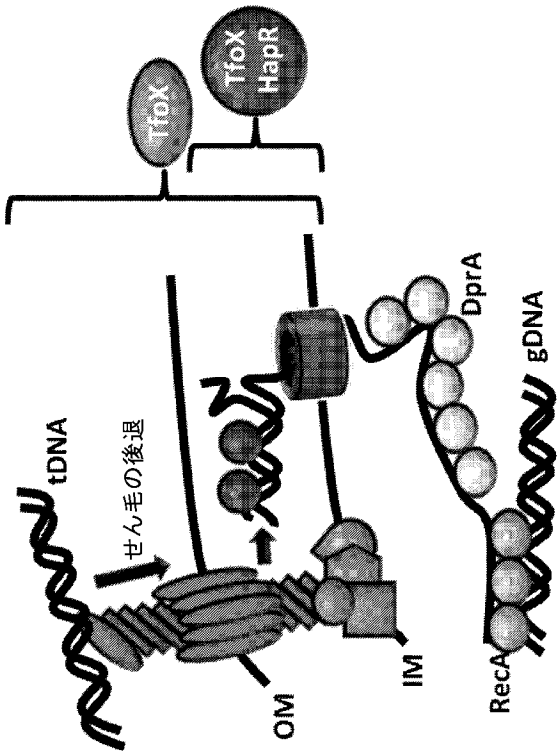
Figure 2D

Figure 2C

Figure 2E

Figure 3A

【図 3 B】



【図 3 C】

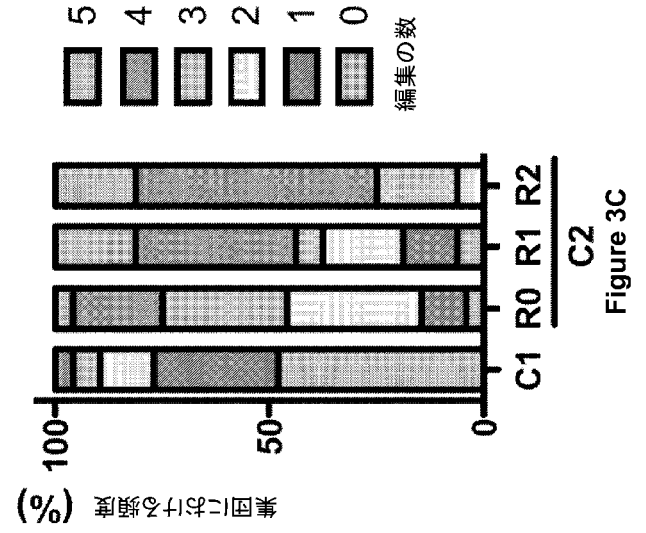


Figure 3B

Figure 3C

【図 3 D】

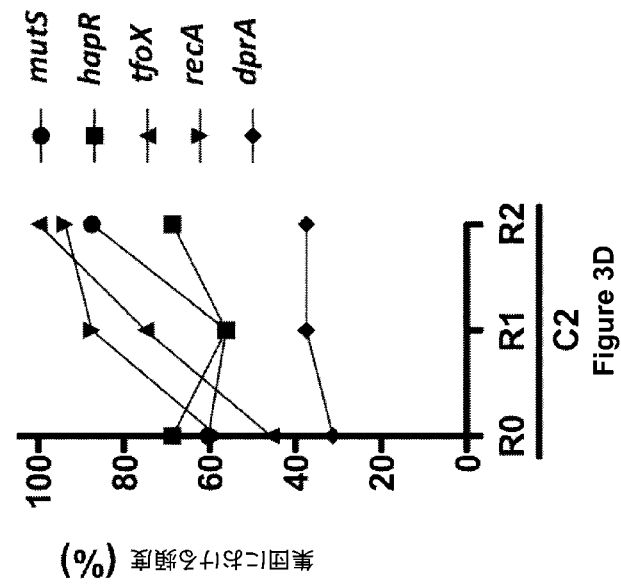


Figure 3D

【図 3 E】

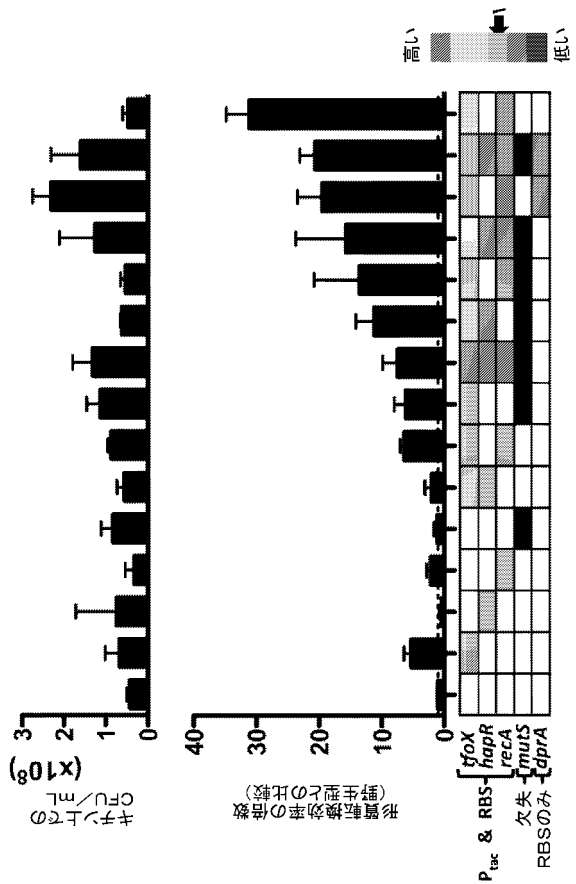


Figure 3E

【 図 4 A 】

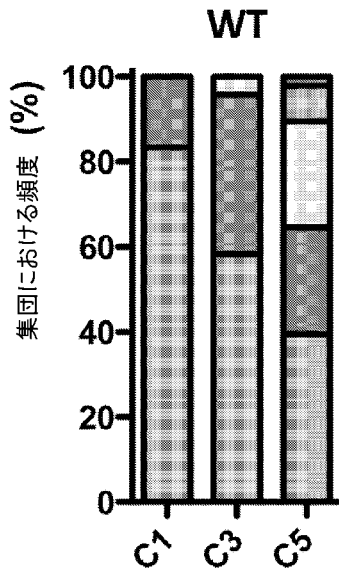


Figure 4A

【 図 4 B 】

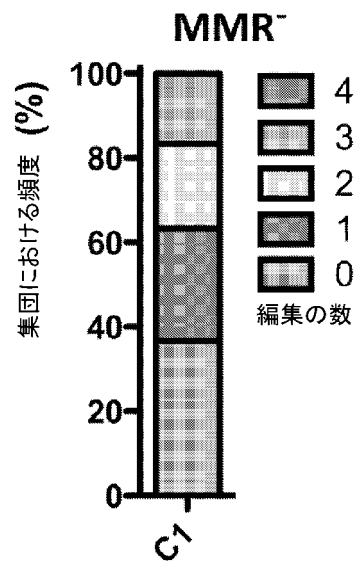


Figure 4B

【 図 4 C 】

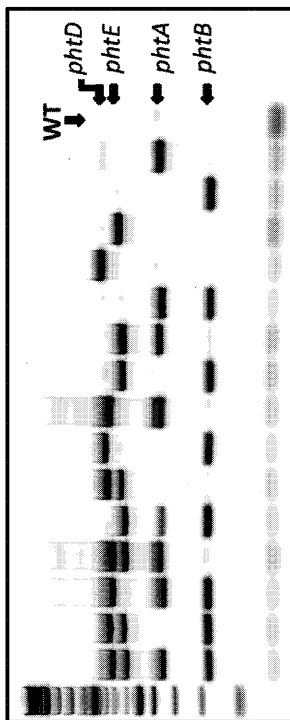


Figure 4C

【 図 5 A 】

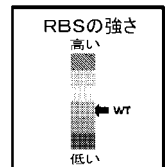
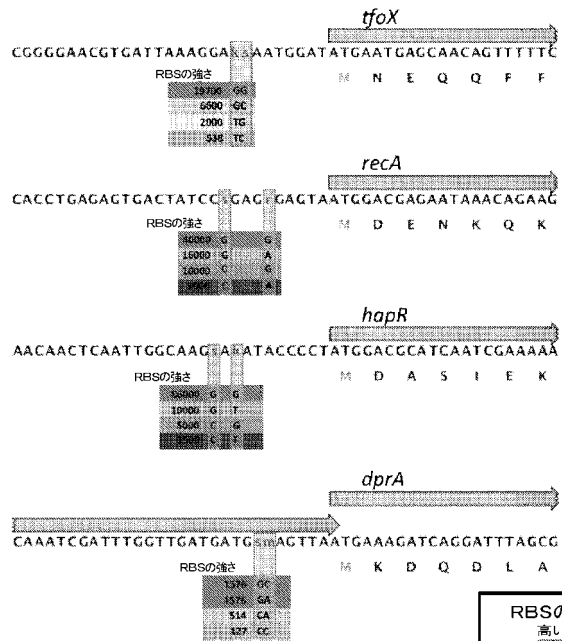


Figure 5A

【 図 5 B 】

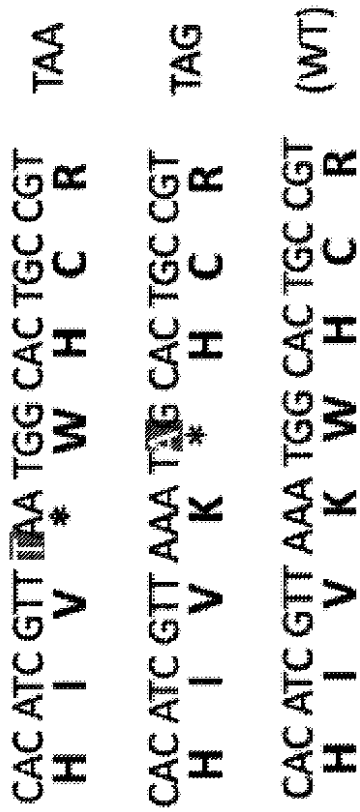


Figure 5B

【 図 5 C 】

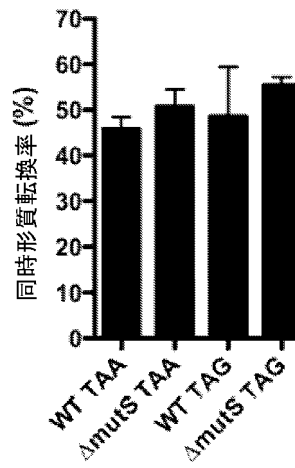


Figure 5C

【 図 6 A 】

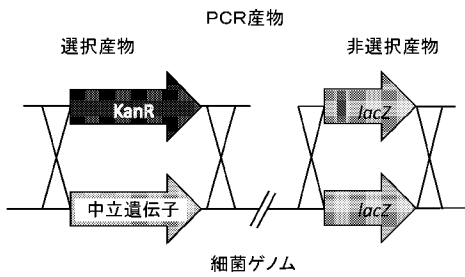


Figure 6A

【 図 6 C 】

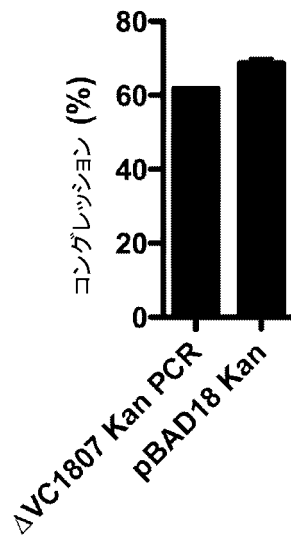


Figure 6C

【 図 6 B 】

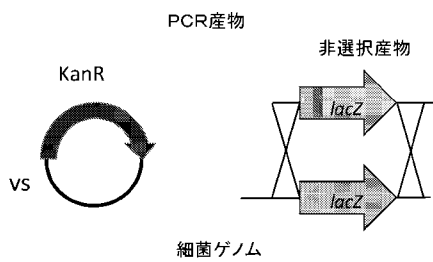


Figure 6B

【 図 6 D 】

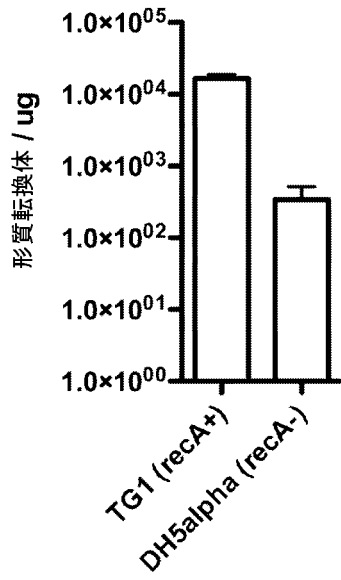


Figure 6D

【 図 7 】

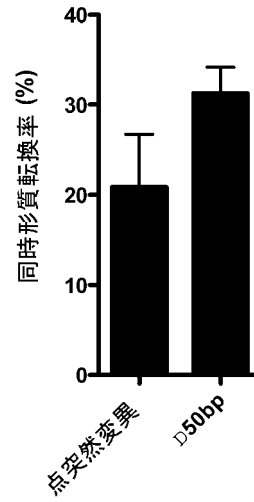


Figure 7

【 配列表 】

2017514488000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/28851
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 1/20, C12N 15/00, C12N 15/87 (2015.01) CPC - A61K 38/00, C12N 15/86, C12N 15/85 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12N 1/20, C12N 15/00, C12N 15/87 (2015.01) CPC: A61K 38/00, C12N 15/86, C12N 15/85 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/252.3, 435/465, 435/320.1 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google Web, search terms: multiplexed automated genome engineering, Cas 9, naturally competent, transformation, heterogenic pool, bacterial, gram negative or gram positive, Firmicutes, Neisseria, Haemophilus, Vibrio, arm of homology, genetic locus, genome edit, unlinked genetic markers, optimize transformant		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2005/0124010 A1 (SHORT et al.) 09 June 2005 (09.06.2005) para [0102], [0103], [1791], [1793], [1796], [1821], [1955], [2290], [2343], [2345], [2346], [2347], [2352], [2353], [2359], [2749], [3574]	1, 3-10, 13, 15-17, 18/(1,3-10,13,15-17), 19, 30-38, 40 2, 11-12, 14, 18/(2,11-12,14), 39
Y	SUCKOW et al. Quorum Sensing Contributes to Natural Transformation of <i>Vibrio cholerae</i> in a Species-Specific Manner. J. Bacteriol. (September 2011) vol 193, no 18, pp 4914-4924, pg 4914, col 1, para 2, pg 4917, col 2, para 1	2, 18/2
Y	US 2002/0068363 A1 (STEMMER) 06 June 2002 (06.06.2002) para [0002]-[0005]	11-12, 14, 18/(11-12,14), 39
A	US 6,207,384 B1 (MEKALANOS et al.) 27 March 2001 (27.03.2001) col 7, ln 33-52, col 8, ln 27-38	1.
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 October 2015 (05.10.2015)		Date of mailing of the international search report 02 NOV 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/28851

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.: 20-26
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

***** See Supplemental Sheet to continue *****

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-19, 30-40

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/28851

Continuation of Box No. III, Observations where unity of invention is lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: claims 1-19, 30-40, drawn to a method of introducing nucleic acid molecules into one or more cells in parallel and a heterogenic pool of co-transformed cells.

Group II: claims 27-29, drawn to a method of introducing a genetic mutation into a *tfoX*, *recA* and/or *tfoX* gene of the cell.

Group III: claims 41, 42, drawn to an apparatus comprising a receptacle configured to produce static condition; a container that is fluidically coupled to the receptacle; and a container comprising selective growth media.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I includes the special technical feature of (a) contacting naturally competent cells with two or more nucleic acid molecules, wherein at least one of the nucleic acid sequences comprises a selectable marker; and (b) selecting for that marker, not required by Groups II and III.

Group II includes the special technical feature of a genetic mutation in a *tfoX*, *recA* and/or *tfoX* gene, not required by Groups I and III.

Group III includes the special technical feature of an apparatus, not required by Groups I and II.

Common Technical Features

The inventions of Groups I-III share the technical feature of transforming a naturally competent cell. Groups I and III share the technical feature of introducing nucleic acid molecules into one or more cells in parallel comprising:

- (a) incubating naturally competent cells under static conditions;
- (b) contacting the cells with two or more nucleic acid molecules.

However, these shared technical feature do not represent a contribution over prior art in view of US 6,207,384 B1 to Mekalanos et al. (hereinafter Mekalanos) and the article entitled "Quorum Sensing Contributes to Natural Transformation of *Vibrio cholerae* in a Species-Specific Manner" by Suckow et al. (hereinafter Suckow).

Mekalanos teaches introducing nucleic acid molecules into one or more cells in parallel comprising: (a) transforming naturally competent cells; (b) contacting the cells with two or more nucleic acid molecules (col 7, in 33-52 "Here we describe a simple system for performing transposon mutagenesis to rapidly identify essential or conditionally essential DNA segments. ... This system takes advantage of the ability of naturally competent cells such as bacteria to efficiently take up DNA added to cultures and incorporate it by homologous recombination into their chromosome ... To test our system we chose *H. influenzae* and *Streptococcus (S.) pneumoniae*, both of which are transformable", col 8, in 27-38 "To conduct such highly-saturated mutagenesis we targeted specific genomic segments for transposition. First, oligonucleotide primers were synthesized and used to amplify about 10 kb regions of the chromosome, using the polymerase chain reaction (PCR). The resulting PCR products were purified and used as templates for in vitro mariner transposon mutagenesis. Each mutagenized pool of DNA was transformed into competent bacteria and plated on rich medium containing appropriate antibiotic, resulting in libraries of about 400-800 mutants, all of which contained insertions within the target chromosomal segment."). Mekalanos does not expressly teach that said transformed bacteria were incubated under static conditions, however, Suckow teaches said incubating (pg 4914, col 1, para 2 "*V. cholerae* commonly lives in aquatic ecosystems, its true habitat, where it intimately associates with zooplankton and their chitinous exoskeleton ... Chitin induces natural competence for transformation, a mode of horizontal gene transfer in this organism ... During transformation, the bacterium can import and recombine DNA from the environment, thus rendering the organism naturally transformed.", pg 4817, col 2, para 1 "for a more quantitative measurement of the DNA uptake process, cultures of *V. cholerae* strains ... were grown as described above. Aliquots taken at an OD600 of 1.0 ... were supplemented with 2 ug of purified gDNA and further incubated statically for 2 h at 30C. The bacteria were then harvested"). Based on Suckow's teaching, it would have been obvious to an artisan of ordinary skill to include static incubation among the transformation method of Mekalanos, because as taught by Suckow, it improved quantitative measurement of transformation, which is useful in optimizing protocols.

As said technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I-III therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 カミリ、 アンドリュー

アメリカ合衆国 02067 マサチューセッツ州 シャロン ムース ヒル パークウェイ 5
Fターム(参考) 4B029 AA23 BB02
4B065 AA49X AA55X AB01 BA01 BA16 BB03 BB18 BB37 BC03 BC07
BC11 BD15 CA60