

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年6月9日(09.06.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/118973 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2018.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C40B 40/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/044574
- (22) 国際出願日: 2021年12月3日(03.12.2021)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2020-202233 2020年12月4日(04.12.2020) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人神戸大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1 Hyogo (JP).
- (72) 発明者: 富永 将大 (TOMINAGA, Masahiro); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 石井 純 (ISHII, Jun); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo

(JP). 能崎 健太(NOZAKI, Kenta); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 近藤 昭彦(KONDO, Akihiko); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 山本 秀策, 外(YAMAMOTO, Shusaku et al.); 〒5300011 大阪府大阪市北区大深町 3-1 グランフロント大阪 タワーC Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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,

(54) Title: METHOD FOR SELECTING GENE SWITCH

(54) 発明の名称: 遺伝子スイッチを選抜する方法

(57) Abstract: Provided is an efficient method capable of dramatically enhancing the performance of an initial type of gene switch/sensor. A method for selecting a gene switch (transcriptional factor) in an organism comprises the steps of: (A) providing a DNA library containing a plurality of nucleic acid molecules in which random mutations are introduced into a promoter to which a gene switch expression sequence and/or a transcriptional factor encoded by the gene switch expression sequence are/is bound; (B) introducing the library into host cells; (C) exposing the host cells to an OFF condition for killing cells expressing a gene regulated by the promoter, and selecting surviving cells; (D) exposing the surviving cells to an ON condition for killing cells that do not express a gene regulated by the promoter and/or do not reach the desired expression level; and (E) selecting, as a gene switch (transcriptional factor), a nucleic acid molecule having the same nucleic acid sequence as that contained in the library contained in the surviving cells.

(57) 要約: 初期型の遺伝子スイッチ・センサの性能を劇的に高めることができる効率的な方法を提供すること。生物における遺伝子スイッチ(転写調節因子)を選抜する方法であって、(A) 遺伝子スイッチ発現配列および/または該遺伝子スイッチ発現配列によってコードされる転写調節因子が結合するプロモータにランダムな変異を導入した複数の核酸分子を含むDNAライブラリーを提供する工程と、(B) 該ライブラリーを宿主細胞に導入する工程と、(C) 該プロモータによって発現調節される遺伝子を発現する細胞を死滅させるOFF条件に該宿主細胞を曝露し、生存する細胞を選択する工程と、(D) 該生存する細胞を、前記プロモータによって発現調節される遺伝子を発現しない、及び/または目的の発現レベルに達していない細胞を死滅させるON条件に曝露し、生存する細胞を選択する工程と、(E) 該生存する細胞に含まれる該ライブラリーに含まれていたものと同じ核酸配列を有する核酸分子を遺伝子スイッチ(転写調節因子)として選択する工程とを含む、方法。

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称： 遺伝子スイッチを選抜する方法

技術分野

[0001] 本開示は、遺伝子スイッチを選抜または作出する方法に関する。より詳しくは、本開示は、従来の初期型の遺伝子スイッチ・センサの性能を劇的に高めることができる効率的な選択手法に関する。

背景技術

[0002] 近年、代謝物などの化合物に応答する遺伝子スイッチ・センサ（メタボライトセンサ）が注目を集めており、特に大腸菌などのバクテリアを中心にその開発が進められている。しかし、真核生物である酵母では、バクテリアに比べて転写制御領域が長く、その機能領域が曖昧なため、高性能な遺伝子スイッチ・センサを開発することが困難である。

[0003] ところで、遺伝子スイッチ・センサの開発においては、変異体において、遺伝子発現がONであるべき条件下で起動状態にあるもの、および／またはOFFであるべき条件下で抑制状態にあるものをその遺伝子発現量に対して選抜（ON選抜／OFF選抜）することが必須であるが、この2つの状態ともに適切な条件で選抜を実施することが重要となる。従来のFluorescence activating-cell sortingでは、選抜条件を変えることはできるものの、一度に一つの条件しか検討することができない。また、薬剤を用いた選抜技術では、選抜条件を変えること自体が困難である。

発明の概要

課題を解決するための手段

[0004] 本開示は、真核生物、特に酵母において構築した初期型の遺伝子スイッチ・センサ、およびそれを利用した遺伝子スイッチ系の性能を劇的に高めることができる効率的な方法を提供する。

[0005] したがって、本開示は以下を提供する。

(項目 X 1)

生物における転写調節因子を選抜する方法であって、(A) 遺伝子スイッチ発現配列および／または該遺伝子スイッチ発現配列によってコードされる転写調節因子が結合するプロモータにランダムな変異を導入した複数の核酸分子を含むDNAライブラリーを提供する工程と、(B) 該ライブラリーを宿主細胞に導入する工程と、(C) 該プロモータによって発現調節される遺伝子を発現する細胞を死滅させるOFF条件に該宿主細胞を曝露し、生存する細胞を選択する工程と、(D) (C) において該生存する細胞(OFF条件で生存する細胞)を、前記プロモータによって発現調節される遺伝子を発現しない、及び／または目的の発現レベルに達していない細胞を死滅させるON条件に曝露し、生存する細胞を選択する工程と、(E) (D) において該生存する細胞(ON条件で生存する細胞)に含まれる該ライブラリーに含まれていたものと同じ核酸配列を有する核酸分子を転写調節因子として選択する工程とを含む、方法。

(項目 X 2)

前記ON条件に用いられる遺伝子は、前記細胞に対して毒性を示す毒性物質に結合することで前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、上記項目に記載の方法。(項目 X 3)

前記ON条件に用いられる遺伝子は、前記毒性物質に対して触媒活性を有さない、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 4)

前記ON条件に用いられる遺伝子は、遺伝子産物の量に対して化学量論的に前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 5)

前記ON条件に用いられる遺伝子は、前記毒性物質との結合性を弱める変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 6)

前記ON条件に用いられる遺伝子はブレオマイシン耐性タンパク質（B l e）をコードする遺伝子配列を含み、前記変異はD 2 5 A変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

（項目X 6 A）

前記ブレオマイシン耐性タンパク質（B l e）がStreptoalloteichus hin dustanus由来である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

（項目X 7）

前記プロモータによって発現調節される遺伝子は、複数の遺伝子が融合された融合遺伝子である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

（項目X 8）

前記宿主細胞が、前記遺伝子スイッチ発現配列と、前記プロモータによって発現調節される遺伝子配列とを有する発現ベクターを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。（項目X 9）

前記プロモータによって発現調節される遺伝子は、前記転写調節因子と誘導因子が結合した複合体が、前記プロモータのオペレータ配列に結合することによって発現が調節される、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

（項目X 1 0）

前記転写調節因子が転写活性化因子である場合に、前記OFF条件が、前記転写活性化因子と結合する誘導因子の非存在下で、かつデオキシチミジン三リン酸（d T T P）のデノボ合成経路の阻害剤の存在下でのインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

（項目X 1 1）

前記転写調節因子が転写活性化因子である場合に、前記ON条件が、前記転写活性化因子と結合する誘導因子の存在下で、かつ前記毒性物質の存在下でのインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

（項目X 1 2）

前記転写調節因子が転写抑制因子である場合に、前記ON条件が、前記転写抑制因子と結合する誘導因子の非存在下で、かつ前記毒性物質の存在下で

のインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 1 3)

前記転写調節因子が転写抑制因子である場合に、前記 O F F 条件が、前記転写抑制因子と結合する誘導因子の存在下で、かつデオキシチミジン三リン酸 (d T T P) のデノボ合成経路の阻害剤の存在下でのインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 1 4)

前記プロモータによって発現調節される遺伝子が、ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 1 4 A)

前記プロモータによって発現調節される遺伝子が、ヒトヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 1 5)

前記デオキシチミジン三リン酸 (d T T P) のデノボ合成経路の阻害剤が、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (5 F d U) またはその誘導体である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 1 6)

前記毒性物質が抗生物質を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 1 7)

前記生物が真核生物である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 1 8)

前記生物がピキア酵母である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 1 8 A)

前記生物が原核生物である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 1 9)

さらに、工程 D の後に、該生存する細胞を、マーカー遺伝子の発現量に応

じてスクリーニングする工程を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 2 0)

前記生物がピキア酵母であり、前記プロモータがピキア酵母由来のものである、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 2 1)

前記プロモータが、その上流に任意の配列長の任意の配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 2 1 A)

前記任意の配列が、A R G 4 配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 2 2)

前記プロモータが、複数コピー数のオペレータ配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 X 2 2 A)

上記項目のいずれか一項に記載の方法によって選抜された遺伝子スイッチを含む遺伝子スイッチライブラリー。

(項目 Y 1)

転写調節因子をコードする遺伝子配列の中から転写調節因子をスクリーニングするための組み合わせ物であって、細胞と、毒性前駆物質と、毒性物質と、発現されることにより前記毒性前駆物質を、前記細胞に対する毒性を付与または強化するよう変換させる毒性付与強化遺伝子と、発現されることにより前記細胞に前記毒性物質に対する耐性を付与または強化する耐性付与強化遺伝子と、マーカー遺伝子とを含む組み合わせ物。

(項目 Y 2)

前記耐性付与強化遺伝子は、前記毒性物質に結合することで前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、上記項目に記載の組み合わせ物。

(項目 Y 3)

前記耐性付与強化遺伝子は、前記毒性物質に対して触媒活性を有さない、上記項目のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

(項目 Y 4)

前記耐性付与強化遺伝子は、遺伝子産物の量に対して化学量論的に前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、上記項目のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

(項目 Y 5)

前記耐性付与強化遺伝子は、前記毒性物質との結合性を弱める変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

(項目 Y 6)

前記耐性付与強化遺伝子はブレオマイシン耐性タンパク質 (B l e) をコードする遺伝子配列を含み、前記変異は D 2 5 A 変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

(項目 Y 6 A)

前記ブレオマイシン耐性タンパク質 (B l e) が *Streptoalloteichus hindustanus* 由来である、上記項目のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

(項目 Y 7)

さらに、デオキシチミジン三リン酸 (d T T P) のデノボ合成経路の阻害剤を含む、上記項目のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

(項目 Y 8)

さらに、前記転写調節因子と結合する誘導因子を含む、上記項目のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

(項目 Y 9)

前記毒性付与強化遺伝子が、ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

(項目 Y 9 A)

前記毒性付与強化遺伝子が、ヒトヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

(項目 Y 1 0)

前記デオキシチミジン三リン酸 (d T T P) のデノボ合成経路の阻害剤が、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (5 F d U) またはその誘導体である、上記項目のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

(項目 Y 1 1)

前記毒性物質が抗生物質を含む、上記項目のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

(項目 Z 1)

生物における転写調節因子を選抜する方法であって、(A) 候補転写調節因子をコードする遺伝子配列を含む発現ベクターを細胞に導入する工程と、(B) 毒性付与強化遺伝子と、耐性付与強化遺伝子と、マーカー遺伝子とを含む融合遺伝子を、該候補転写調節因子と結合するプロモータと作動可能に連結して前記細胞に導入する工程と、(C) 該毒性付与強化遺伝子の遺伝子産物によって毒性が付与または強化される毒性前駆物質の少なくとも1種の濃度の存在下に該細胞を配置し、生存する細胞を選択する工程と、(D) 該細胞に対して毒性を示す毒性物質であって、該耐性付与強化遺伝子の遺伝子産物によって耐性が付与または強化される毒性物質の少なくとも1種の濃度の存在下に該細胞を配置し、生存する細胞を選択する工程と、(E) (C) および (D) で生存した細胞を選択し、含まれる候補転写調節因子をコードする遺伝子配列を転写調節因子として選択する工程とを含む、方法。

(項目 Z 2)

前記耐性付与強化遺伝子は、前記毒性物質に結合することで前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、上記項目に記載の方法。

(項目 Z 3)

前記耐性付与強化遺伝子は、前記毒性物質に対して触媒活性を有さない、

上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 4)

前記耐性付与強化遺伝子は、遺伝子産物の量に対して化学量論的に前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 5)

前記耐性付与強化遺伝子は、前記毒性物質との結合性を弱める変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 6)

前記耐性付与遺伝子はブレオマイシン耐性タンパク質 (B l e) をコードする遺伝子配列を含み、前記変異は D 2 5 A 変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 6 A)

前記ブレオマイシン耐性タンパク質 (B l e) が *Streptoalloteichus hindustanus* 由来である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 7)

前記プロモータによって発現調節される遺伝子は、複数の遺伝子が融合された融合遺伝子である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 8)

前記転写調節因子が転写活性化因子である場合に、前記 (C) における配置が、前記転写活性化因子と結合する誘導因子の非存在下で、かつデオキシチミジン三リン酸 (d T T P) のデノボ合成経路の阻害剤の存在下でのインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 9)

前記転写調節因子が転写活性化因子である場合に、前記 (D) における配置が、前記転写活性化因子と結合する誘導因子の存在下で、かつ前記毒性物

質の存在下でのインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 1 0)

前記転写調節因子が転写抑制因子である場合に、前記 (D) における配置が、前記転写抑制因子と結合する誘導因子の非存在下で、かつ前記毒性物質の存在下でのインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 1 1)

前記転写調節因子が転写抑制因子である場合に、前記 (C) における配置が、前記転写抑制因子と結合する誘導因子の存在下で、かつデオキシチミジン三リン酸 (d T T P) のデノボ合成経路の阻害剤の存在下でのインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 1 2)

前記毒性付与強化遺伝子が、ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 1 2 A)

前記毒性付与強化遺伝子が、ヒトヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 1 3)

前記デオキシチミジン三リン酸 (d T T P) のデノボ合成経路の阻害剤が、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (5 F d U) またはその誘導体である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 1 4)

前記毒性物質が抗生物質を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 1 5)

前記生物が真核生物である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 1 6)

前記生物がピキア酵母である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 1 6 A)

前記生物が原核生物である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 1 7)

前記生物がピキア酵母であり、前記プロモータがピキア酵母由来のものである、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 1 8)

前記プロモータが、その上流に任意の配列長の任意の配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 1 8 A)

前記任意の配列が、A R G 4 配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 1 9)

前記プロモータが、複数コピー数のオペレータ配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 Z 1 9 A)

上記項目のいずれか一項に記載の方法によって選抜された転写調節因子を含む遺伝子スイッチライブラリー。

(項目 A 1)

生物における転写調節因子を選抜するシステムであって、(A) 遺伝子スイッチ発現配列および／または該遺伝子スイッチ発現配列によってコードされる転写調節因子が結合するプロモータにランダムな変異を導入した複数の核酸分子を含むDNAライブラリーと、(B) 該ライブラリーを宿主細胞に導入する手段と、(C) 該プロモータによって発現調節される遺伝子を発現する細胞を死滅させるOFF条件に該宿主細胞を曝露し、生存する細胞を選択する手段と、(D) (C) において該生存する細胞(OFF条件で生存する細胞)を、該プロモータによって発現調節される遺伝子を発現しない、及び／または目的の発現レベルに達していない細胞を死滅させるON条件に曝露し、生存する細胞を選択する手段と、(E) (D) において該生存する細胞

胞（ON条件で生存する細胞）に含まれる該ライブラリーに含まれていたものと同じ核酸配列を有する核酸分子を転写調節因子として選択する手段とを含む、システム。

（項目A1A）

生物における転写調節因子を選抜するシステムであって、該システムは、遺伝子スイッチ発現配列および／または該遺伝子スイッチ発現配列によってコードされる転写調節因子が結合するプロモータにランダムな変異を導入した複数の核酸分子を含むDNAライブラリーから該遺伝子スイッチを選抜するものであり、該システムは、（B）該ライブラリーを宿主細胞に導入する手段と、（C）該プロモータによって発現調節される遺伝子を発現する細胞を死滅させるOFF条件に該宿主細胞を曝露し、生存する細胞を選択する手段と、（D）（C）において該生存する細胞（OFF条件で生存する細胞）を、該プロモータによって発現調節される遺伝子を発現しない、及び／または目的の発現レベルに達していない細胞を死滅させるON条件に曝露する手段と、（E）（D）において該生存する細胞（ON条件で生存する細胞）に含まれる該ライブラリーに含まれていたものと同じ核酸配列を有する核酸分子を転写調節因子として選択する手段とを含む、システム。

（項目A2）

前記ON条件に用いられる遺伝子は、前記細胞に対して毒性を示す毒性物質に結合することで前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、上記項目に記載のシステム。

（項目A3）

前記ON条件に用いられる遺伝子は、前記毒性物質に対して触媒活性を有さない、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

（項目A4）

前記ON条件に用いられる遺伝子は、遺伝子産物の量に対して化学量論的に前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 5)

前記 O N 条件に用いられる遺伝子は、前記毒性物質との結合性を弱める変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 6)

前記 O N 条件に用いられる遺伝子はブレオマイシン耐性タンパク質 (B l e) をコードする遺伝子配列を含み、前記変異は D 2 5 A 変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 6 A)

前記ブレオマイシン耐性タンパク質 (B l e) が *Streptoalloteichus hindustanus* 由来である、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 7)

前記プロモータによって発現調節される遺伝子は、複数の遺伝子が融合された融合遺伝子である、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 8)

前記宿主細胞が、前記遺伝子スイッチ発現配列と、前記プロモータによって発現調節される遺伝子配列とを有する発現ベクターを含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 9)

前記プロモータによって発現調節される遺伝子は、前記転写調節因子と誘導因子が結合した複合体が、前記プロモータのオペレータ配列に結合することによって発現が調節される、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 1 0)

前記転写調節因子が転写活性化因子である場合に、前記 O F F 条件が、前記転写活性化因子と結合する誘導因子の非存在下で、かつデオキシチミジン三リン酸 (d T T P) のデノボ合成経路の阻害剤の存在下でのインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 1 1)

前記転写調節因子が転写活性化因子である場合に、前記 O N 条件が、前記

転写活性化因子と結合する誘導因子の存在下で、かつ前記毒性物質の存在下でのインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 1 2)

前記転写調節因子が転写抑制因子である場合に、前記 O N 条件が、前記転写抑制因子と結合する誘導因子の非存在下で、かつ前記毒性物質の存在下でのインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 1 3)

前記転写調節因子が転写抑制因子である場合に、前記 O F F 条件が、前記転写抑制因子と結合する誘導因子の存在下で、かつデオキシチミジン三リン酸 (d T T P) のデノボ合成経路の阻害剤の存在下でのインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 1 4)

前記プロモータによって発現調節される遺伝子が、ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 1 4 A)

前記プロモータによって発現調節される遺伝子が、ヒトヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 1 5)

前記デオキシチミジン三リン酸 (d T T P) のデノボ合成経路の阻害剤が、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (5 F d U) またはその誘導体である、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 1 6)

前記毒性物質が抗生物質を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 1 7)

前記生物が真核生物である、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 1 8)

前記生物がピキア酵母である、上記項目のいずれか一項に記載のシステム

。

(項目 A 1 9)

さらに、工程 D の後に、該生存する細胞を、マーカー遺伝子の発現量に応じてスクリーニングする工程を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 2 0)

前記生物がピキア酵母であり、前記プロモータがピキア酵母由来のものである、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 2 1)

前記プロモータが、その上流に任意の配列長の任意の配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 A 2 1 A)

前記任意の配列が、A R G 4 配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。(項目 A 2 2)

前記プロモータが、複数コピー数のオペレータ配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 B 1)

生物における転写調節因子を選抜するシステムであって、(A) 候補転写調節因子をコードする遺伝子配列を含む発現ベクターを細胞に導入する手段と、(B) 毒性付与強化遺伝子と、耐性付与強化遺伝子と、マーカー遺伝子とを含む融合遺伝子を、該候補転写調節因子と結合するプロモータと作動可能に連結して前記細胞に導入する手段と、(C) 該毒性付与強化遺伝子の遺伝子産物によって毒性が付与または強化される毒性前駆物質の少なくとも 1 種の濃度の存在下に該細胞を配置し、生存する細胞を選択する手段と、(D) 該細胞に対して毒性を示す毒性物質であって、該耐性付与強化遺伝子の遺

伝子産物によって耐性が付与または強化される毒性物質の少なくとも1種の濃度の存在下に該細胞を配置し、生存する細胞を選択する手段と、(E)(C)および(D)で生存した細胞を選択し、含まれる候補転写調節因子をコードする遺伝子配列を転写調節因子として選択する手段とを含む、システム。

(項目B2)

前記耐性付与強化遺伝子は、前記毒性物質に結合することで前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、上記項目に記載のシステム。

(項目B3)

前記耐性付与強化遺伝子は、前記毒性物質に対して触媒活性を有さない、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目B4)

前記耐性付与強化遺伝子は、遺伝子産物の量に対して化学量論的に前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目B5)

前記耐性付与強化遺伝子は、前記毒性物質との結合性を弱める変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目B6)

前記耐性付与遺伝子はブレオマイシン耐性タンパク質(B1e)をコードする遺伝子配列を含み、前記変異はD25A変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。(項目B6A)

前記ブレオマイシン耐性タンパク質(B1e)がStreptoalloteichus hindustanus由来である、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目B7)

前記プロモータによって発現調節される遺伝子は、複数の遺伝子が融合された融合遺伝子である、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目B8)

前記転写調節因子が転写活性化因子である場合に、前記（C）における配置が、前記転写活性化因子と結合する誘導因子の非存在下で、かつデオキシチミジン三リン酸（d T T P）のデノボ合成経路の阻害剤の存在下でのインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

（項目 B 9）

前記転写調節因子が転写活性化因子である場合に、前記（D）における配置が、前記転写活性化因子と結合する誘導因子の存在下で、かつ前記毒性物質の存在下でのインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

（項目 B 1 0）

前記転写調節因子が転写抑制因子である場合に、前記（D）における配置が、前記転写抑制因子と結合する誘導因子の非存在下で、かつ前記毒性物質の存在下でのインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

（項目 B 1 1）

前記転写調節因子が転写抑制因子である場合に、前記（C）における配置が、前記転写抑制因子と結合する誘導因子の存在下で、かつデオキシチミジン三リン酸（d T T P）のデノボ合成経路の阻害剤の存在下でのインキュベーションを含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

（項目 B 1 2）

前記毒性付与強化遺伝子が、ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

（項目 B 1 2 A）

前記毒性付与強化遺伝子が、ヒトヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 B 1 3)

前記デオキシチミジン三リン酸 (d T T P) のデノボ合成経路の阻害剤が、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (5 F d U) またはその誘導体である、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 B 1 4)

前記毒性物質が抗生物質を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 B 1 5)

前記生物が真核生物である、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 B 1 6)

前記生物がピキア酵母である、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 B 1 7)

前記生物がピキア酵母であり、前記プロモータがピキア酵母由来のものである、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 B 1 8)

前記プロモータが、その上流に任意の配列長の任意の配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 B 1 8 A)

前記任意の配列が、A R G 4 配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。(項目 B 1 9)

前記プロモータが、複数コピー数のオペレータ配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載のシステム。

(項目 C 1)

所望の特性を有する生物または細胞を育種する方法であって、前記方法は
A) 上記項目のいずれか一項に記載の転写調節因子を選抜する方法を用いて、所望の活性を有する転写調節因子を提供する工程と、
B) 前記転写調節因子を用いて、前記所望の特性を付与することに関与する

1 または複数の遺伝子を、所望の転写特性を持つように改変する工程と、
C) 工程 B で改変された所望の転写特性を有する遺伝子を、目的の細胞に導入する工程と、
D) 工程 C で得られた細胞の中から、所望の特性を有する細胞を選択する工程と
を包含する、方法。

(項目 C 2)

所望の特性を有する生物または細胞を育種する方法であって、前記方法は
A) 上記項目のいずれか一項に記載の遺伝子スイッチライブラリーを提供する工程であって、前記ライブラリーは、所望の活性を有する転写調節因子を有するように構成される、工程と、
B) 前記転写調節因子を用いて、前記所望の特性を付与することに関与する
1 または複数の遺伝子を、所望の転写特性を持つように改変する工程と、
C) 工程 B で改変された所望の転写特性を有する遺伝子を、目的の細胞に導入する工程と、
D) 工程 C で得られた細胞の中から、所望の特性を有する細胞を選択する工程と
を包含する、方法。

(項目 C 3)

所望の物質を生産する生物または細胞を育種する方法であって、前記方法は
A) 上記項目のいずれか一項に記載の転写調節因子を選抜する方法を用いて、所望の活性を有する転写調節因子を提供する工程と、
B) 前記転写調節因子を用いて、前記物質の生合成に関与する 1 または複数の遺伝子を、所望の転写特性を持つように改変する工程と、
C) 工程 B で改変された所望の転写特性を有する遺伝子を、目的となる細胞に導入する工程と、
D) 工程 C で得られた細胞の中から、所望の特性を有する細胞を選択する工

程と

を包含する、方法。

(項目 C 4)

上記項目のいずれか一項に記載の転写調節因子を選抜する方法を行う工程を含む、所望のプロモーターを生産する方法であって、該遺伝子スイッチの選抜において、所望の活性を有するものを選抜することを包含する、方法。

(項目 C 5)

上記項目のいずれか一項に記載の転写調節因子を選抜する方法を行う工程を含む、所望のプロモーターを生産する方法であって、該転写調節因子の選抜において、所望の細胞において活性を有するものを選抜することを包含する、方法。

(項目 C 6)

所望の特性を有する生物または細胞を選抜する方法であって、

A) 上記項目のいずれか一項に記載の遺伝子スイッチライブラリーを提供する工程であって、前記ライブラリーは、目的の代謝化合物に応答する転写調節因子を有するように構成される、工程と、

B) 前記転写調節因子を用いて、前記目的の代謝化合物への応答性を付与することに関与する 1 または複数の遺伝子を、所望の転写特性を持つように改変する工程と、

C) 工程 B で改変された所望の転写特性を有する遺伝子を、目的の細胞に導入する工程と、

D) 工程 C で得られた細胞の中から、所望の特性を有する細胞を選択する工程と

を包含する、方法。

(項目 C 7)

前記細胞は、真核生物由来の細胞である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 C 8)

前記細胞は、酵母を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 C 9)

前記細胞は、原核生物由来の細胞である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 C 10)

前記細胞は、細菌を含み、必要に応じて前記細菌は放線菌、大腸菌、枯草菌、糸状菌、および微細藻類を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[0006] 本開示において、上記の 1 つまたは複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせて提供され得ることが意図される。なお、本開示のさらなる実施形態および利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解すれば、当業者に認識される。

[0007] なお、上記した以外の本開示の特徴及び顕著な作用・効果は、以下の発明の実施形態の項及び図面を参照することで、当業者にとって明確となる。

発明の効果

[0008] 本開示の方法により、高効率に性能の高い遺伝子スイッチ・センサを取得することができる。特に酵母において改良型の遺伝子スイッチ・センサ、およびそれを利用した遺伝子スイッチ系を構築することができる点が有利である。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図 1 は、本開示の一実施形態における遺伝子スイッチ・センサを作出する方法のワークフローを説明する模式図である。図 1 Aでは、コアプロモーターとオペレーター配列を融合させた合成プロモーター (syn P) を示す。図 1 Bでは、遺伝子スイッチライブラリーからの所望の性質をもつ遺伝子スイッチの選抜手法を示した。

[図2]図 2 は、本開示の一実施形態において用いた $TB_{D25A}G$ の性能を評価した結果を示す模式図である。(A) Tet-ON 制御された $TB_{D25A}G$ 遺伝子発現の模式図を示す。ヌクレオシド (5 F d U または d P) は hENT1

を介して組み込まれ、 $T B_{D25A}G$ のキナーゼ活性によって毒素化される。ゼオシンは細胞に対して抗生物質活性を示すが、これは $T B_{D25A}G$ の発現によって緩和される。 $T B_{D25A}G$ の発現レベルは、GFP蛍光により定量することができる。(B~D) $T B_{D25A}G$ の機能を示す。Tet-ONシステムの制御下での $T B_{D25A}G$ の染色体発現を、(B)細胞GFP蛍光、(C)ゼオシン含有培地中での細胞生存率、または(D)5FdU含有培地中での細胞生存率によって測定した。エラーバーは、3つの独立した実験の平均±SDを表す。

[図3]図3は、本開示の一実施形態における改良したTet-ON型遺伝子スイッチのS/N比を示す。

[図4]図4は、本開示の一実施形態において開発した種々の遺伝子スイッチの変異箇所とそのS/N比を示す。

[図5]図5は、本開示の一実施形態において開発した遺伝子スイッチを用いたFPPから β -カロテンへのフラックス制御を示す模式図である。

[図6]図6は、本開示の一実施形態において進化させたDAPG-ONスイッチのrPhlTA発現カセットに見出されたヌクレオチドおよびアミノ酸(AA、括弧内に示す)変異を示す。

[図7]図7は、本開示の一実施形態において進化させたHSL-ONスイッチのLuxTA発現カセットに見出されたヌクレオチドおよびアミノ酸(AA、括弧内に示す)の変異を示す。

[図8]図8は、本開示の一実施形態において開発したピキア酵母における遺伝子スイッチの模式図である。

[図9]図9は、本開示の一実施形態におけるピキア酵母の遺伝子スイッチにおいて、phlOのコピー数の変化と発現量の変化との関係を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本開示を最良の形態を示しながら説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むこと

が理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本開示の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

[0011] 以下に本明細書において特に使用される用語の定義および／または基本的技術内容を適宜説明する。

[0012] 本明細書において、「約」とは、後に続く数値の±10%を意味する。

[0013] 本明細書において、「遺伝子スイッチ」または「遺伝子スイッチ・センサ」とは、交換可能に使用され、転写調節ドメインを含有する因子（例えば、分子、その複合体、またはそれらの融合物等）であって、対象となる遺伝子を構成する核酸に相互作用（例えば、結合）することにより当該因子を活性化し得る物質（例えば、活性化物質、または誘導因子）が相互作用（例えば、結合）する部位を有するものをいう。本明細書において、「遺伝子スイッチ」は「転写調節因子」と呼ぶ場合があり、相互互換的に使用することができる。このような因子は、誘導物質（活性化物質、または誘導因子）の相互作用（例えば、結合や解離）により活性が調節され、その機能を変化させることができる。遺伝子スイッチに誘導物質（活性化物質、または誘導因子）が相互作用（例えば、結合）することにより、遺伝子スイッチの標的配列へのその相互作用（例えば、結合）の程度または状態が変化し、その結果、目的の遺伝子の発現が抑制または誘導される。例えば、本明細書における「遺伝子スイッチ」は、転写活性化ドメインを含有する分子であって、結合することにより当該分子を活性化し得る物質（例えば、活性化物質、または誘導因子）が結合する部位を有し、該物質の結合により標的配列への結合もしくは解離が生じる分子が例示される。

- [0014] また本明細書において、「遺伝子スイッチ系」とは、上記のような遺伝子スイッチを用いた系の全体、すなわち転写調節因子とその結合配列（発現制御配列や調節DNAエレメントなど）、さらにはその下流のプロモータまでを含む全体を指す。
- [0015] 本明細書において、「遺伝子スイッチ発現配列」は、遺伝子スイッチ（転写調節因子）がタンパク質またはポリペプチドの場合、その遺伝子スイッチをコードする核酸配列を意味する。
- [0016] 本明細書において、「遺伝子スイッチの活性化物質」は、遺伝子スイッチ（転写調節因子）に相互作用（例えば、結合）することにより遺伝子スイッチを活性化させ、またはその機能を変化させ、その結果、直接的または間接的に、1または複数の遺伝子の発現の調節を誘導する物質をいい、例えばそのような化合物を意味する。本明細書において、「活性化物質」は「誘導因子」または「誘導物質」と呼ぶ場合があり、相互互換的に使用することができる。活性化物質は、遺伝子スイッチ（転写調節因子）ごとに異なるものとすることもできる。遺伝子スイッチと活性化物質との組み合わせとしては、例えば、rtetTAとDox、CamTAとD-Camphor、PhlTAとDAPG、LuxTAとHSLなどを挙げるができる。
- [0017] 本明細書において、「遺伝子スイッチの標的配列」は、目的のタンパク質をコードする遺伝子の5'上流に位置する核酸配列であって、標的遺伝子の転写を制御する核酸配列または調節DNAエレメントをいい、好ましくはプロモータ活性を有し、プロモータ配列や、オペレーター配列とコアプロモータとが融合された人工プロモータであってもよい。好ましくは、エンハンサが、遺伝子スイッチ（転写調節因子）の標的配列に間接的にまたは直接的に作用されることもできる。標的配列への遺伝子スイッチ（転写調節因子）の作用は誘導物質の添加により調節されることができ、それにより標的遺伝子の発現が制御され、標的配列に遺伝子スイッチ（転写調節因子）が作用しないと標的遺伝子は発現しない。例えば、遺伝子スイッチrtetTAは、その活性化物質Doxの添加により、その標的配列tetOプロモータ（tet

t Oを含む人工プロモータ) に作用し、該プロモータの下流に位置する標的遺伝子の転写を促進する。

[0018] 本明細書において、「プロモータ」とは、遺伝子の転写開始を制御し、またその転写の程度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、RNAポリメラーゼの結合により転写を開始する核酸配列をいう。プロモータは、使用する宿主細胞の種によって適宜選択して使用されることができる。酵母を宿主として使用する場合、プロモータとして、酵母などの宿主細胞中で発現できるものであれば特に限定されず、いずれを使用してもよい。例えば、プロモータとして、GAL1プロモータ、GAL10プロモータ、ヒートショックタンパク質プロモータ、MF α 1プロモータ、PHO5プロモータ、PGKプロモータ、GAPプロモータ、ADHプロモータ、TDHプロモータ、DAS1、およびAOX1プロモータなどを挙げることができる。

[0019] 遺伝子スイッチ（転写調節因子）の選抜において、遺伝子発現がONであるべき条件下で起動状態にあるものを選抜し（ON選抜）、および／またはOFFであるべき条件下で抑制状態にあるものを選抜すること（OFF選抜）により、任意の出力特性をもつ遺伝子スイッチ（転写調節因子）を取得することができる。このON／OFF選抜を連続して行うことで、さまざまな遺伝子スイッチ（転写調節因子）を迅速に開発することができる。

[0020] 本明細書において、「ON選抜」または「ON条件」とは、遺伝子発現がONであるべき条件下で起動状態にあるものを選抜すること、またはその条件をいい、例えば遺伝子スイッチ（転写調節因子）がON（起動状態）である条件下で、遺伝子発現がOFF（抑制状態）にある遺伝子スイッチ（転写調節因子）、及び／または目標とする起動レベルには達していない起動状態にある遺伝子スイッチ（転写調節因子）を除去することによる選抜をいうことができる。ON条件には、プロモータによって発現調節される遺伝子を発現しない、及び／または目標とする量の発現をしない細胞を死滅させる条件が含まれる。ON選抜を行うには、例えば、選抜対象となる遺伝子スイッチ（転写調節因子）の制御下に、「発現しないと宿主細胞が生存できない」、

及び／または「目標とする量だけ発現しないと宿主細胞が生存できない」遺伝子を配置する手法を挙げることができる。遺伝子スイッチがON（起動状態）である条件下で起動せずに下流の遺伝子を発現できない遺伝子スイッチ（転写調節因子）、及び／または目標とする起動レベルには達していない起動状態にある遺伝子スイッチ（転写調節因子）は、それを導入した細胞が死滅などすることにより除去することができる。ON選抜では、遺伝子スイッチ（転写調節因子）の作用により発現調節される遺伝子が発現することにより、及び／または目標とする量だけ発現することより、細胞死を回避することができる。

[0021] 本明細書において、「OFF選抜」または「OFF条件」とは、遺伝子発現がOFFであるべき条件下で抑制状態にあるものを選抜すること、またはその条件をいい、例えば遺伝子スイッチ（転写調節因子）がOFF（抑制状態）である条件下で、下流の遺伝子が発現してしまう遺伝子スイッチ（転写調節因子）、つまり漏出发現（リーク発現）のある遺伝子スイッチ（転写調節因子）を除去することによる選抜をいうことができる。OFF条件には、プロモータによって発現調節される遺伝子を発現する細胞を死滅させる条件が含まれる。OFF選抜を行うには、例えば、選抜対象である遺伝子スイッチ（転写調節因子）の制御下に、「発現すると、宿主細胞の細胞死を起こす」遺伝子を配置する手法を挙げることができる。遺伝子スイッチ（転写調節因子）がOFF（抑制状態）である条件下で、下流の遺伝子を発現させてしまう（リーク発現をさせてしまう）遺伝子スイッチ（転写調節因子）は、それを導入した細胞が死滅などすることにより除去することができる。OFF選抜では、遺伝子スイッチ（転写調節因子）の作用により発現調節される遺伝子の発現がOFF（減弱または消失）であるときに細胞死を回避することができる。

[0022] 本明細書において、「転写調節因子」は、プロモータなどの調節DNAエレメントに作用して働くタンパク質をいう。転写調節因子は転写抑制因子（リプレッサ）および転写活性化因子（アクチベータ）に大別される。転写抑

制因子は調節DNAエレメントに作用して遺伝子の転写を抑制し、遺伝子の発現量を低減させることができる。転写活性化因子は調節DNAエレメントに作用して遺伝子の転写を促進し、遺伝子の発現量を増加させることができる。本開示の一実施形態において、転写抑制因子および転写活性化因子は公知の各因子を使用することができる。転写調節因子が作用する調節DNAエレメントの下流に配置された遺伝子配列は、転写調節因子の作用によりその発現が抑制または促進される。遺伝子の発現とは、遺伝子の情報がmRNAに転写され、さらに該遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列として翻訳される一連の過程を意味する。発現が促進されれば遺伝子によりコードされるタンパク質が産生されてその量が増大し、発現が抑制されれば遺伝子によりコードされるタンパク質は産生されずその量は減少する。

[0023] 本明細書において、「候補転写調節因子」とは、転写調節因子の候補となり得る因子である。

[0024] 本明細書において、「誘導因子」、「誘導物質」または「誘導剤」とは、転写調節因子と結合することにより、転写調節因子を活性化させ、または不活性化させ、またはその機能を変化させ、その結果、1または複数の遺伝子の直接的または間接的な発現を調節することができる因子をいう。

[0025] 本明細書において、「DNAライブラリー」とは、天然から単離された核酸配列または合成の核酸配列を含む、核酸ライブラリーである。天然から単離された核酸配列の供給源としては、真核生物細胞、原核生物細胞、またはウイルス由来のゲノム配列やcDNA配列が挙げられるが、これらに限定されるものではない。天然から単離された配列に、任意の配列（例えば、シグナル、タグなど）を付加したライブラリーもまた、本開示のDNAライブラリーに含まれる。

[0026] 本明細書において、「宿主細胞」とは、異種（例えば、外因性）核酸またはタンパク質が導入された細胞を指す。宿主細胞には、特定の対象細胞だけでなく、当該細胞の子孫も含むことができる。宿主細胞は原核生物細胞または真核生物細胞を含み、異種の核酸またはタンパク質を受容して産生するた

めに適切な形質を有する任意の細胞である。例えば、原核生物および真核生物の細胞、細菌細胞、マイコバクテリア細胞、真菌細胞、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、非ヒト動物細胞、ヒト細胞、または、ハイブリドーマもしくはクアドローマなどの細胞融合物が含まれる。

[0027] 本明細書において、「発現ベクター」とは、宿主細胞に外部遺伝子を運搬するベクターDNAであって、宿主細胞中で目的遺伝子を発現させ得るDNAをいう。ベクターDNAは宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、宿主の種類および使用目的により適宜選択することができる。ベクターDNAは、天然に存在するDNAを抽出して得られたベクターDNAの他、複製に必要な部分以外のDNAの部分が一部欠落しているベクターDNAでもよい。代表的なベクターDNAとして、例えば、プラスミド、バクテリオファージ、およびウイルス由来のベクターDNAを挙げることができる。プラスミドDNAとして、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミドなどを使用することができる。バクテリオファージDNAとしては、λファージなどを挙げることができる。ウイルス由来のベクターDNAとしては、例えばレトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、パポバウイルス、SV40、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病ウイルスなどの動物ウイルス由来のベクター、あるいはバキュロウイルスなどの昆虫ウイルス由来のベクターを挙げることができる。その他、トランスポゾン由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来のベクターDNAなどを挙げることができる。あるいは、これらを組み合わせて作成したベクターDNA、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメントを組み合わせて作成したベクターDNA（コスミドやファージミドなど）を挙げることができる。ベクターDNAには、目的遺伝子が発現されるように目的遺伝子を組み込むことが必要であり、少なくとも目的遺伝子と調節DNAエレメント、例えばプロモータとをその構成要素とする。これら要素に加えて、所望によりさらに、複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列を組み合わせて公知の手法によりベクターDNAに組み込むこと

ができる。このような遺伝子配列として、例えば、リボソーム結合配列、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、および選択マーカー（ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子など）を挙げることができる。これらから選択した1種類または複数種類の遺伝子配列をベクターDNAに組み込むことができる。

[0028] 本明細書において、「融合遺伝子」とは、人工的にまたは自然に複数の遺伝子が連結されて生じる新たな遺伝子のことをいい、染色体の転座、挿入、逆位などの組換えの結果生じるものも含まれる。また、融合遺伝子は、融合タンパク質をコードしていることもある。融合遺伝子として機能的なタンパク質を生じさせることができるものであれば、融合遺伝子において連結される遺伝子の数は特に限られるものではない。融合遺伝子における各遺伝子の向きも特に限定されず、すべてがフォワード（本来の転写の向き）、すべてがリバース（本来の転写の向きと逆向き）、及びフォワードとリバースとの組み合わせのいずれであってもよい。また融合遺伝子において、各遺伝子はいずれの位置で連結されていてもよい。本明細書における「融合遺伝子」は、異なる遺伝子が連結しているものだけではなく、同一の遺伝子同士が連結しているものも含まれる。

[0029] 本明細書において、「作動可能に連結」とは、核酸にコードされたポリペプチドが、プロモーターなどのエレメントによる制御下に当該ポリペプチドの生物学的活性を示す状態で発現するようにエレメントに連結されていることを意味する。本明細書において、「作動可能に連結された」配列は、目的の遺伝子に隣接する発現制御配列または調節DNAエレメント、および目的の遺伝子を制御するためにトランスで、または距離をおいて作用する発現制御配列または調節DNAエレメントのいずれも含む。

[0030] 本明細書において、「ランダムな変異」とは、核酸配列において変異がランダムに入っていること、およびそのような変異を指し、変異の数は1個であってもよいし、2個以上であってもよい。ランダムな変異における変異は

、人工的に導入されたものであってもよく、または自然に発生した突然変異でもよい。

[0031] 本明細書において、「毒性物質」とは、細胞などの標的に対して、当該標的の生存や増殖に害を与える（死滅させることを含む）か、またはその生存や増殖を抑制させる性質を有する物質をいい、抗生物質であってもよい。

[0032] 本明細書において、「毒性前駆物質」とは、それ自体では毒性を備えていないか、または備えていたとしても細胞などの標的に対して当該標的の生存や増殖に害を与えるものではないが、他の物質との結合やリン酸化などの内部または外部の要因により、毒性物質に変化するものをいう。

[0033] 本明細書において、「毒性付与強化遺伝子」とは、発現されることにより前記毒性前駆物質を、前記細胞に対する毒性を付与または強化するよう変換させる核酸配列または核酸分子をいう。

[0034] 本明細書において、「耐性付与強化遺伝子」とは、発現されることにより前記細胞に前記毒性物質に対する耐性を付与または強化する核酸配列または核酸分子をいう。例えば、毒性物質に結合することで前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生するものであってもよい。好ましくは、耐性付与強化遺伝子は、毒性物質に対して触媒活性を有さないか、毒性物質に対して触媒活性を有するものを発現しないものが有利である。あるいは、例えば、遺伝子産物の量に対して化学量論的に前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生するものであってもよい。あるいは、例えば毒性物質との結合性を弱める変異を含むものであってもよい。

[0035] 本明細書において、「マーカー遺伝子」とは、細胞内で翻訳されて、マーカーとして機能し、特定の条件を満たした細胞種の判別を可能にする任意のタンパク質をコードする遺伝子をいう。細胞内で翻訳されてマーカーとして機能しうるタンパク質であれば特に限られるものではなく、例えば、蛍光、発光、または呈色を示すもの、あるいは蛍光、発光、または呈色を補助することなどにより、視覚化し、定量化することができるタンパク質が含まれる。蛍光タンパク質としては、S i r i u s、E B F Pなどの青色蛍光蛋白質

; mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFPなどのシアン蛍光タンパク質; TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green（例えば、hmAG1）、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、Hyper、mUkG（UmikinoGreen）などの緑色蛍光タンパク質; TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBananaなどの黄色蛍光タンパク質; KusabiraOrange（例えば、hmKO2）、mOrangeなどの橙色蛍光タンパク質; TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberry、などの赤色蛍光タンパク質; TurboFP602、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed（例えば、hdKeimaRed）、mRaspberry、mPlumなどの近赤外蛍光タンパク質が挙げられるが、これらには限定されない。

[0036] 本明細書において、「組み合わせ物」とは、細胞、化合物、または遺伝子などの因子を組み合わせたものをいい、組み合わせ物には任意の因子を含むことができる。組み合わせ物は必ずしも組成物などの形態である必要はなく、その組み合わせ物を構成する各因子が別個のものとして存在していてもよく、例えばキットなども含むことができる。

[0037] 本明細書において、「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいい、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」を指すことがある。

[0038] （好ましい実施形態）

以下に本開示の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本開示のよりよい理解のために提供されるものであり、本開示の範囲は以下の記載に限定されるべきでない。したがって、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本開示の範囲内で適宜改変を行うことができることは明ら

かである。また、本開示の以下の実施形態は単独でも使用されあるいはそれらを組み合わせて使用することができる。

[0039] (遺伝子スイッチの作出)

本開示の一局面において、生物における遺伝子スイッチ（転写調節因子）を選抜する方法であって、（A）遺伝子スイッチ発現配列および／または該遺伝子スイッチ発現配列によってコードされる転写調節因子が結合するプロモータにランダムな変異を導入した複数の核酸分子を含むDNAライブラリーを提供する工程と、（B）該ライブラリーを宿主細胞に導入する工程と、（C）該プロモータによって発現調節される遺伝子を発現する細胞を死滅させるOFF条件に該宿主細胞を曝露し、生存する細胞を選択する工程と、（D）該生存する細胞を、前記プロモータによって発現調節される遺伝子を発現しない細胞を死滅させるON条件に曝露し、生存する細胞を選択する工程と、（E）該生存する細胞に含まれる遺伝子（ライブラリーに含まれていたものと同じ核酸配列を有する核酸分子）を遺伝子スイッチ（転写調節因子）として選択する工程とを含む、方法が提供される。ここで使用されるDNAライブラリーは、多様な性能を持つ。

[0040] 本開示の一実施形態において、遺伝子スイッチ（転写調節因子）、およびそれを利用した遺伝子スイッチ系は、有用タンパク質の大量生産に応用でき、タンパク質の生産においては、例えば、大腸菌などの宿主細胞に異種生物から得た標的タンパク質を強制発現させる手法が用いられる。宿主細胞にとって毒性を示すタンパク質を生産させる場合、宿主細胞を十分な数まで増殖させて、適切なタイミングで発現を誘導して強制発現させる。したがって、本開示の一実施形態に係る遺伝子スイッチ（転写調節因子）は、非誘導時の基底発現レベルが充分低く（すなわち、漏出发現が小さいこと）、および発現が誘導（ON）されたときに充分な遺伝子発現を行う（すなわち、ON／OFF時の発現レベル比が大きいこと）ものである。

[0041] また他の実施形態において、本開示の遺伝子スイッチ（転写調節因子）は、誘導因子の濃度が低い場合にも高感度で下流の遺伝子の発現を調節するこ

とができるものである。

[0042] 他の実施形態において、遺伝子スイッチ、およびそれを利用した遺伝子スイッチ系は、代謝工学の手段として使用することができる。代謝工学では、複数の酵素遺伝子を1つの宿主細胞の中で同時に発現させ、ある目的物質の生合成経路を構築する。構築した人工の生合成経路において最高の成果、例えば、バイオマスあたりの最終生成物の収量最大化、副産物の最少化などを目指す場合には、個々の遺伝子の発現レベルを詳細に、かつ独立して調節することが必要となる。そのため、本開示の一実施形態において、望みどおりのON/OFF切り替え特性をもち、複数の遺伝子の発現調節をひとつの細胞で同時に行う場合に、1つの遺伝子スイッチ（転写調節因子）の誘導物質が別の遺伝子スイッチ、およびそれを利用した遺伝子スイッチ系を誤作動させることなく、それぞれの遺伝子スイッチ（転写調節因子）による発現量を連続的に調節することができる遺伝子スイッチ（転写調節因子）を提供することができる。

[0043] 他の実施形態において、本開示の遺伝子スイッチ・センサ、およびそれを利用した遺伝子スイッチ系は、目的の代謝産物をHPLCやGCMSなどの分析手法を用いずに、GFP等で簡便かつ高速な生産量（濃度）測定を行うことができる。本開示の遺伝子スイッチ・センサ、およびそれを利用した遺伝子スイッチ系をメタボライトセンサとして用いる場合には、高感度化させた遺伝子スイッチ・センサ、およびそれを利用した遺伝子スイッチ系を用いて生産量が低い化合物を測定するだけでなく、低感度化させた遺伝子スイッチ・センサ、およびそれを利用した遺伝子スイッチ系を用いて生産量が高くなってきた株の生産量を測定することもでき、本開示の方法によれば、その感度調整を容易に行うことができる。

[0044] 本開示の一実施形態において、DNAライブラリーは公知の種々の方法を用いて作製することができ、遺伝子スイッチ発現配列および／または該遺伝子スイッチ発現配列によってコードされる転写調節因子が結合するプロモータにランダムな変異が導入されているものであれば特に限られるものではない。

い。本開示の一実施形態において、このようなDNAライブラリーを宿主細胞に導入する場合には、宿主細胞に発現ベクターを導入することによって行うことができる。また他の実施形態において、発現カセット（フラグメント）をゲノムに組み込むこともできる。「発現ベクター」は、宿主細胞に外部遺伝子を運搬するベクターDNAであって、宿主細胞中で目的遺伝子を発現させ得るDNAをいう。ベクターDNAは宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、宿主の種類および使用目的により適宜選択することができる。ベクターDNAは、天然に存在するDNAを抽出して得られたベクターDNAの他、複製に必要な部分以外のDNAの部分が一部欠落しているベクターDNAでもよい。代表的なベクターDNAとして、例えば、プラスミド、バクテリオファージ、およびウイルス由来のベクターDNAを挙げることができる。プラスミドDNAとして、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミドなどを使用することができる。バクテリオファージDNAとしては、λファージなどを挙げることができる。ウイルス由来のベクターDNAとしては、例えばレトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、パポバウイルス、SV40、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病ウイルスなどの動物ウイルス由来のベクター、あるいはバキュロウイルスなどの昆虫ウイルス由来のベクターを挙げることができる。その他、トランスポゾン由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来のベクターDNAなどを挙げることができる。あるいは、これらを組み合わせて作成したベクターDNA、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメントを組み合わせて作成したベクターDNA（コスミドやファージミドなど）を挙げることができる。ベクターDNAには、目的遺伝子が発現されるように目的遺伝子を組み込むことが必要であり、少なくとも目的遺伝子と調節DNAエレメント、例えばプロモータとをその構成要素とする。これら要素に加えて、所望によりさらに、複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列を組み合わせて公知の手法によりベクターDNAに組み込むことができる。このような遺伝子配列として、例えば、リボソーム

結合配列、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、および選択マーカー（ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子など）を挙げることができる。これらから選択した1種類または複数種類の遺伝子配列をベクターDNAに組み込むことができる。

[0045] ベクターDNAに目的遺伝子を組み込む方法は、公知の遺伝子工学的技術を適用することができる。例えば、目的遺伝子を適当な制限酵素により処理して特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターDNAと混合し、リガーゼにより再結合する手法を用いることもできる。あるいは、目的遺伝子に適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても所望のベクターDNAを得ることができる。

[0046] 宿主細胞への発現ベクターの導入方法は、宿主細胞にベクターDNAを導入して宿主細胞中で目的遺伝子を発現させ得る導入方法であれば特に限定されず、宿主細胞の種により適宜選択した公知の方法のいずれを使用してもよい。例えば、酢酸リチウム法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法などを挙げることができる。

[0047] 本開示の一実施形態において、プロモータによって発現調節される遺伝子を発現する細胞を死滅させるOFF条件、および／またはプロモータによって発現調節される遺伝子を発現しない細胞を死滅させるON条件は、例えば、人工または天然のプロモータの下流に、チミジンキナーゼ（例えば、hsvTK）、毒性物質に結合することで該毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物産生遺伝子（例えば、ble（ブレオマイシン耐性タンパク質））、及び蛍光タンパク質産生遺伝子（例えば、GFP（緑色蛍光タンパク質））を融合したレポーター遺伝子を作動可能に連結した発現カセットを細胞に導入して行うことができる。例えば、hsvTKは5FdUやdPなどの人工核酸をリン酸化して細胞毒性を付与するため、当該遺伝子カセットを含む発現ベクターを形質転換した細胞は、5FdUやdPなどの人工核酸の存在時に

h s v T Kを発現すると死滅する（O F F 選抜）。

[0048] 一方、上記発現ベクターを形質転換した細胞は、例えば、毒性物質として抗生物質であるゼオシンの存在化であっても、b l eを発現することでゼオシンへの耐性を獲得し、生存することができる（O N 選抜）。

[0049] 本開示の一実施形態において、発現配列と遺伝子スイッチ（転写調節因子）とを同一の発現ベクターに含む必要はなく、上記融合レポーター遺伝子の発現配列を含む発現ベクターと、遺伝子スイッチ（転写調節因子）を含む発現ベクターとを同一の細胞に共形質転換することにより実施することもできる。

[0050] 本開示の一実施形態において、チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列は、特に限定されず、哺乳動物細胞やウイルス由来のチミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を挙げることができ、ヒトヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ、大腸菌由来のチミジンキナーゼ、ショウジョウバエ（*D r o s o p h i l a*）由来のヌクレオシドキナーゼをコードする遺伝子配列を用いることもできる。より好ましくは、ヒトヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ（h s v T K）をコードする遺伝子配列を用いることができる。また、野生型チミジンキナーゼの遺伝子配列の他、該遺伝子配列において1個以上、例えば1～約100個、好ましくは1～約30個、より好ましくは1～約20個、さらに好ましくは1～約10個、さらにより好ましくは1個～数個のヌクレオチドの欠失、置換、付加または挿入などの変異が存在する遺伝子配列であって、野生型チミジンキナーゼと同質のキナーゼ活性を示すタンパク質をコードする遺伝子配列を使用することもできる。変異体のキナーゼ活性は、野生型キナーゼと比較して、同等または高いことが好ましい。変異体をコードする遺伝子配列における変異の程度およびそれらの位置などは、該変異を有する遺伝子配列が野生型チミジンキナーゼの遺伝子配列と同質のキナーゼ活性を示すタンパク質をコードする遺伝子配列である限り特に制限されない。変異を導入する手段は公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法、またはポリメラーゼ連鎖

反応などを単独でまたは適宜組合せて使用することができる。

[0051] チミジンキナーゼ（TK）は、デオキシチミジンのリン酸化反応を触媒する酵素であり、DNA合成の調節因子として重要な役割を果たす。人工核酸である5FdUやdPは、他のヌクレオシドと同様に、チミジンのサルベージ経路を経由してゲノムに取り込まれる。5FdUやdPはゲノムに取り込まれて遺伝子変異を頻発する変異原性ヌクレオシドである。したがって、チミジンキナーゼを発現する細胞は、5FdUやdPの添加により細胞死が誘導されるが、チミジンキナーゼを発現しない細胞では、5FdUやdPを添加しても細胞死は誘導されない。

[0052] 本開示の一実施形態において、変異原性ヌクレオシドは、遺伝子に取り込まれたときに遺伝子に変異を生じて細胞死を誘導するものであれば特に限定されず、天然に存在する変異原性ヌクレオシドであってもよく、人工的に作成されたものであってもよい。変異原性ヌクレオシドの濃度は、遺伝子に取り込まれたときに遺伝子に変異を生じて細胞死を誘導する濃度であれば特に限定されず、簡単な繰り返し実験により決定できる。例えば、dPは、50nM～1μM、より好ましくは100nMの濃度で使用する。変異原性ヌクレオシドと細胞とのインキュベーション時間は、細胞死が生じるような時間であれば特に限定されるものではなく、簡単な繰り返し実験により決定できる。dPを用いる場合、dPと細胞とのインキュベーションは、変異原性ヌクレオシドによる変異に起因する細胞死が惹起される時間であればよく、例えば約5分間～約24時間、好ましくは約15時間～約24時間とすることができる。

[0053] 本開示の一実施形態において、さらに、デオキシチミジン三リン酸(dTTP)のデノボ合成経路の阻害剤を含むことができる。デオキシチミジン三リン酸(dTTP)のデノボ合成経路の阻害剤は、デノボ合成経路を阻害してdTTPの産生を阻害し得る化合物であれば特に限定されず、例えば、5-フルオロウラシルおよびその誘導体を挙げることができる。より具体的には、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン(5FdU)を挙げることができる。

。5-フルオロウラシルおよびその誘導体の濃度は、dTTPのデノボ合成経路を阻害し得る濃度であればよく、簡単な繰り返し実験により決定できる。例えば、5FdUは、50 nM～1 μ M、好ましくは100 nMの濃度で 사용할 ことができる。dTTPのデノボ合成経路の阻害剤と細胞とのインキュベーション時間は、細胞死が生じるような時間であれば特に限定されるものではなく、簡単な繰り返し実験により決定できる。

[0054] 本開示の一実施形態において、dPおよび5FdUなどの人工核酸を細胞に取り込ませるために、細胞に広基質ヌクレオシドトランスポーター（平衡ヌクレオシドトランスポーター1（ENT1））（例えば、ヒト平衡ヌクレオシドトランスポーター1（hENT1））をコードする遺伝子をクローニングし、染色体に組み込むこともできる。例えば天然の酵母細胞はこれらの人工核酸を取り込むことができないため、このようなトランスポーターを組み込むことで、ヌクレオチドの取り込みを促進させることができる。本開示の一実施形態において、このようなトランスポーターは、1コピーだけクローニングしてもよく、または2コピー、3コピー、5コピー、7コピー、10コピーなど複数のトランスポーターをクローニングすることもでき、複数コピーをクローニングした場合には、スクリーニング効率が高まる（エスケープする細胞を排除できる）という利点も期待できる。

[0055] 本開示の一実施形態において、毒性物質に結合することで該毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物は、抗生物質などの毒性物質による細胞への毒性を減弱させることができるものであればよく、例えば、ble（ブレオマイシン耐性タンパク質）などを用いることができる。望ましくは、液体培養でのON選抜が可能であり、薬剤濃度の違いにより選抜するレポーター発現強度の域値を変えることができるものであり、結合性を弱める変異を含むことができ、例えばbleの場合、D25Aなどの変異を加えて選抜感度を調節することもできる。

[0056] 一実施形態において、OFF選抜にはhsvTK、ON選抜にはbleが好ましいが、他のレポーター遺伝子であっても、本開示で示される所望の効果

を発揮する限り、いずれのレポーター遺伝子をも用いることができる。

[0057] 本開示の一実施形態において、融合レポーターとして、融合タンパク質（hsvTK-Ble-GFP（TBG））を用いることができる。TBGをコードする遺伝子には、ON状態のセクターとしてStreptococcus hindustanus由来のゼオシン耐性遺伝子（ble）が含まれている。このタンパク質は、酵母におけるプラスミド維持および組換えのための陽性選択マーカーとして広く用いられている。Ble二量体は抗生物質を1：1のモル比で結合・隔離することでゼオシンを不活性化することができる。したがって、細胞のゼオシン耐性はBleの発現レベルを直接反映しているといえる。この選択機構があることにより、ゼオシンの量を変えるだけで、スイッチ出力（TBG発現）の選択閾値を自由に設定できることとなる。

[0058] 本開示の一実施形態において、上記のようなチミジンキナーゼなどを含むON選抜またはOFF選抜用のレポーター遺伝子配列の上流に該遺伝子配列に作動可能に連結されるプロモータ配列は、これらのレポーター遺伝子を発現させる機能を有し、かつ試験される遺伝子スイッチ（転写調節因子）の遺伝子産物が作用するプロモータ配列であれば特に限定されず、公知のプロモータ配列を使用することができる。

[0059] 本開示の一実施形態において、上記のようなレポーター遺伝子配列と前記プロモータ配列とを、公知の遺伝子工学的技術を用いて、公知の発現ベクターにクローニングすることにより、遺伝子スイッチ（転写調節因子）のスクリーニングに使用される発現ベクターを作成することができる。

[0060] このような発現ベクターは、これら配列に加えて、蛍光タンパク質をコードする遺伝子配列をさらに含むことが好ましい。蛍光タンパク質をコードする遺伝子が発現ベクター内に配置することにより、レポーター遺伝子の発現の有無によるON選抜およびOFF選抜を実施する場合に、該発現ベクター内のプロモータの起動状態を蛍光タンパク質の発現の有無により視認することができる。蛍光タンパク質をコードする遺伝子配列は、細胞内で蛍光を発

することができるタンパク質をコードするものであれば特に限定されないが、緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescence Protein、GFP)、黄色蛍光タンパク質(Yellow Fluorescence Protein、YFP)、シアン蛍光タンパク質(Cyan Fluorescence Protein、CFP)、および青色蛍光タンパク質(Blue Fluorescence Protein、CFP)、並びにこれら蛍光タンパク質の変異体、例えば、UV最適化緑色蛍光タンパク質(UV-optimized Green Fluorescence Protein、GFPuv)、強化緑色蛍光タンパク質(Enhanced Green Fluorescence Protein、EGFP)、強化黄色蛍光タンパク質(Enhanced Yellow Fluorescence Protein、EYFP)、強化シアン蛍光タンパク質(Enhanced Cyan Fluorescence Protein、ECFP)、および青色蛍光タンパク質(Enhanced Blue Fluorescence Protein、ECFP)を挙げることができる。

[0061] 本開示の一実施形態において、上記のようなチミジンキナーゼをコードする遺伝子配列、毒性物質に結合することで前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物をコードする遺伝子配列、および蛍光タンパク質をコードする遺伝子配列を含む発現ベクターとして、これらの遺伝子配列を含むプラスミドを用いることもできる。他の実施系多において、これらの遺伝子配列を融合レポーター遺伝子として、発現ベクターに導入することもできる。

[0062] 本開示において使用される細胞は、特に限定されるものではなく、酵母や大腸菌などの種々の細胞を用いることができる。本開示の一実施形態において、細胞死や細胞の死滅とは、増殖能などの細胞としての機能を消失している状態を意味する。例えば、酵母などの細胞を固形培地上で培養したとき、一個の細胞から増殖して可視的に計数できる一定以上の大きさの細胞集落(コロニー)を形成できる能力を消失している状態をさす。また他の実施形態において、細胞死や細胞の死滅には、生理的または病理的な要因により生じた不要な細胞や障害細胞などを積極的に除去する能動的細胞死(アポトーシス)および外的要因への反応による受動的細胞死(ネクローシス)も含まれ得る。

[0063] 本開示の一実施形態において、酵母としては、出芽酵母、分裂酵母などを用いることができる。出芽酵母としては、例えば、Saccharomyces属 (Saccha

romyces cerevisiaeなど)、Zygosaccharomyces属 (Zygosaccharomyces rouxiiなど) や、ピキア酵母 (Komagataella phaffii、Komagataella pastoris、Komagataella pseudopastoris)、メタノール資化性酵母 (Ogataea polymorpha、Hansenula polymorpha、Candidaboidinii、Ogataea minuta、Ogataea angusta、Pichia methanolica、Ogataea parapolyomorphaなど) などを用いることができる。分裂酵母としては、例えば、Zygosaccharomyces属 (Zygosaccharomyces rouxiiなど) を用いることができる。これらのうちでも特に好ましい酵母は、Saccharomyces cerevisiaeまたはピキア酵母 (Komagataella phaffii、Komagataella pastoris、Komagataella pseudopastoris) である。一実施形態において、メタノール資化性酵母とは、唯一の炭素源としてメタノールを利用して培養可能な酵母細胞と定義されるが、本来メタノール資化性酵母細胞であったが、人為的な改変あるいは変異によりメタノール資化性能を喪失した酵母細胞もメタノール資化性酵母細胞に包含される。

[0064] ピキア酵母はメタノール資化性の性質をもち、主にタンパク質生産で産業的に広く使われている。このピキア酵母では、メタノール誘導システムとしてAOX1プロモータが広く用いられている。このAOX1プロモータは発現量が非常に強く、メタノール下で増殖した細胞では全mRNA量の5%がAOX1p由来といわれており、その発現はメタノールで厳密に制御することができる。

[0065] 本開示の一実施形態においては、人工転写活性化因子であるrPhITAと誘導剤としてDAPGを用いることで、AOX1プロモータに匹敵する新規誘導性プロモータを提供することができる。

[0066] 本開示の一局面において、転写調節因子をコードする遺伝子配列を中から遺伝子スイッチ (転写調節因子) をスクリーニングするための組み合わせ物であって、細胞と、毒性前駆物質と、毒性物質と、発現されることにより前記毒性前駆物質を、前記細胞に対する毒性を付与または強化するよう変換させる毒性付与強化遺伝子と、発現されることにより前記細胞に前記毒性物質

に対する耐性を付与または強化する耐性付与強化遺伝子と、マーカー遺伝子とを含む組み合わせ物が提供される。

[0067] 本開示の一実施形態において、耐性付与強化遺伝子は、毒性物質に結合することで毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生するものであり、好ましくは毒性物質に対して触媒活性を有さないものである。例えば、b l e（ブレオマイシン耐性タンパク質）などを用いることができる。望ましくは、液体培養でのON選抜が可能であり、薬剤濃度の違いにより選抜するレポーター発現強度の域値を変えることができるものであり、結合性を弱める変異を含むことができ、例えばb l eの場合、D 2 5 Aなどの変異を加えて選抜感度を調節することもできる。

[0068] 本開示の一実施形態において、耐性付与強化遺伝子は、遺伝子産物の量に対して化学量論的に毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生するものであり、例えば、B l e二量体は抗生物質を1 : 1のモル比で結合・隔離することでゼオシンを不活性化することができる。したがって、細胞のゼオシン耐性はB l eの発現レベルを直接反映しているといえる。

[0069] 一実施形態においては、さらに、転写調節因子と結合する誘導因子を含むこともできる。誘導因子は活性化物質とも呼ばれ、遺伝子スイッチ（転写調節因子）に結合することにより遺伝子スイッチ（転写調節因子）を活性化させ、またはその機能を変化させ、その結果、1または複数の遺伝子の直接的または間接的な発現の調節を誘導することができる。遺伝子スイッチ（転写調節因子）ごとに異なるものとすることもでき、遺伝子スイッチ（転写調節因子）と誘導因子との組み合わせとしては、例えば、r t e t T AとD o x、C a m T AとD - C a m p h o r、P h i T AとD A P G、L u x T AとH S Lなどを挙げることができる。

[0070] 本開示の他の局面において、生物における遺伝子スイッチ（転写調節因子）を選抜する方法であって、（A）候補転写調節因子をコードする遺伝子配列を含む発現ベクターを細胞に導入する工程と、（B）毒性付与強化遺伝子と、耐性付与強化遺伝子と、マーカー遺伝子とを含む融合遺伝子を、該候補

転写調節因子と結合するプロモータと作動可能に連結して前記細胞に導入する工程と、（C）該毒性付与強化遺伝子の遺伝子産物によって毒性が付与または強化される毒性前駆物質の少なくとも1種の濃度の存在下に該細胞を配置し、生存する細胞を選択する工程と（D）該細胞に対して毒性を示す毒性物質であって、該耐性付与強化遺伝子の遺伝子産物によって耐性が付与または強化される毒性物質の少なくとも1種の濃度の存在下に該細胞を配置し、生存する細胞を選択する工程と（E）（C）および（D）で生存した細胞を選択し、含まれる候補転写調節因子をコードする遺伝子配列を遺伝子スイッチ（転写調節因子）として選択する工程とを含む、方法が提供される。

[0071] 本開示の一実施形態において、転写調節因子が転写活性化因子である場合に、転写活性化因子と結合する誘導因子の非存在下で、かつデオキシチミジン三リン酸(d T T P)のデノボ合成経路の阻害剤の存在下でのインキュベーションをすることで、O F F 選抜を行うことができる。この場合、転写調節因子が転写活性化因子である場合に、転写活性化因子と結合する誘導因子の存在下で、かつ毒性物質の存在下でのインキュベーションをすることで、O N 選抜を行うことができる。

[0072] 本開示の他の実施形態において、転写調節因子が転写抑制因子である場合に、転写抑制因子と結合する誘導因子の非存在下で、かつ前記毒性物質の存在下でのインキュベーションをすることで、O F F 選抜を行うことができる。この場合、転写調節因子が転写抑制因子である場合に、転写抑制因子と結合する誘導因子の存在下で、かつデオキシチミジン三リン酸(d T T P)のデノボ合成経路の阻害剤の存在下でのインキュベーションをすることで、O N 選抜を行うことができる。

[0073] 本開示の一実施形態において、オペレーター配列とコアプロモーター領域を融合したD N A 配列と対応する転写因子を初期型のスイッチ・センサの構成要素として、それらの化合物に対する応答性能を簡便かつ劇的に高める手法を提供することができる。具体的には、本開示の一実施形態において、転写因子を発現するカセットと、オペレーター配列とコアプロモーター領

域を融合したDNA配列の下流にHSV-TK（チミジンキナーゼ）、Ble（ブレオマイシン耐性タンパク質）及びGFP（緑色蛍光タンパク質）を融合した遺伝子を挿入した発現カセットを準備し、そのいずれかもしくは両方に変異を導入した後に酵母へ導入し、ON/OFF選抜およびGFPスクリーニングを行う手法を提供することができる。

[0074] 一実施形態において、選抜薬剤（OFF選抜：5FdUやdPなど、ON選抜：Zeocinなど）の濃度や誘導剤の濃度などを変化させた様々なOFFおよびON選抜の条件で培養したのち、フローサイトメーター等でGFPの蛍光分布から変異体の濃縮状況を確認し、より望ましい条件で選抜した変異集団についてコロニー単離を行い、それぞれのコロニーのON/OFF両状態のGFP蛍光強度および変異配列を決定することができる。このような手法によって遺伝子スイッチ（転写調節因子）の選抜を行うことにより、様々な遺伝子スイッチ・センサ（転写調節因子）（テトラサイクリン応答型、ホモセリンラクトン（HSL）応答型、2，4-ジアセチルフロログルシノール（DAPG）応答型、など）の改良型を簡便に作出することができる。また初期型センサではほとんど応答の見られなかった遺伝子センサについても、有意な応答が見られるレベルにまで簡便に改良できる。また、逆転型のスイッチも簡単に構築することができる。さらに、オペレーター配列をタンデム化することで、さらなる劇的な応答性能の向上を達成している。

[0075] 遺伝子スイッチ系は、誘導プロモーターとして利用することができ、使用しにくい特性を持つ天然型の誘導プロモーターの欠点を克服した性能の良い人工の遺伝子スイッチ系はニーズが高い。また、遺伝子スイッチ系は生産物の簡便な間接定量評価や遺伝子発現の調節を行うことができるため、近年その利用ニーズが高まってきている。産業微生物としても有用な酵母において、本手法により、簡便に高性能遺伝子スイッチ・センサ、および／またはそれを利用した遺伝子スイッチ系を作ることができれば、菌株構築の時間を圧倒的に短縮したり、高度な代謝や遺伝子ネットワーク制御を行うことができる。そのため、特に代謝工学や合成生物学分野において産業応用が期待され

る。また本開示の遺伝子スイッチは、有用タンパク質の大量生産や毒性を示すタンパク質などの発現制御、代謝化合物の簡易的な濃度測定などに利用できる。

[0076] 本開示の一実施形態において、誘導プロモーターはタンパク質の誘導発現（分泌または細胞内での生産）に利用することができる。

[0077] 本開示の一実施形態において、S/N比に優れたTet-ON、DAPG-ON、HSL-ONは、代謝酵素の発現制御への利用を想定することができる。例えば代謝経路を分岐させる酵素への使用が考えられる。例えばテルペノイドの一種のスクアレンの生産において、スクアレン消費する下流のエルゴステロール経路の酵素を、スクアレンを高生産するタイミングでのみOFFにすることで、スクアレンの生産量を高めることができる。または他の実施形態において、細胞に強い毒性を示す有用タンパク質、例えば抗体タンパク質などを候補として挙げるることができる。抗体タンパク質の生産では、化学反応の変換プロセスを構築する代謝工学とはことなり、抗体タンパク質の発現量がそのまま生産量に比例する。そのため、発現量を限界まで高める必要があるが、発現誘導系のS/N比が低いと、発現の漏出が起き、タンパク質の過剰発現による細胞毒性のために酵母株を得ること自体不可能である。DAPG-ONやTet-ON、HSL-ONスイッチでは、その高いS/N比ゆえに、毒性タンパク質の高生産が見込まれる。

[0078] 一実施形態において、遺伝子スイッチ系は、特に細胞に対して毒性を示す遺伝子の発現のON/OFF切り替えに利用されることができる。医薬品としての利用が期待される抗体タンパク質、あるいは植物代謝物の合成を担う異種酵素遺伝子の酵母内発現は、過剰に発現させ過ぎると往々にして細胞毒性を示す。しかし、細胞増殖期には毒性を示す遺伝子であっても、増殖完了後の発現誘導であればその毒性が緩和されることがある。そこで、遺伝子スイッチ系を用いて、増殖期には毒性遺伝子の発現をOFF、増殖完了後にONにすることで、異種遺伝子の過剰発現による細胞毒性を回避できる。

[0079] 本開示の一実施形態において、遺伝子スイッチ系は、バイオコンピューテ

ィングの分野でも注目を集めている。複数の遺伝子スイッチ系の組み合わせで構成される「遺伝子回路」は、細胞に与えられた外部情報を処理する「電子回路」のアナロジーとして解釈することができる。実際に、合成生物学分野では、遺伝子回路を構築し、細胞に新規機能を付与すること目的として、実際のコンピュータに実装されている論理回路と同じトポロジーを持つ多数の遺伝子回路を設計・構築してきた。しかし、電子回路とは異なり、遺伝子スイッチのON／OFF切り替えはアナログであるため、遺伝子回路の組み合わせは数個に止まり、その拡張性を制限していた。OFFとONの比に優れた遺伝子スイッチによって遺伝子回路の抱えるこのような弱点を解決できる可能性がある。

[0080] 本開示の一実施形態において、酵母をメインとして、その他の真核生物や大腸菌を含む原核細胞など様々な生物種において、高性能な新たな遺伝子スイッチ系またはメタボライトセンサを作出するために本開示の方法を使用することができる。作出するスイッチ・センサをライセンス若しくはキットの一部としての販売する、あるいはスイッチ・センサの受託開発をすることもできる。また、作出した遺伝子スイッチ系は、安全かつ安価で使いやすい（たとえば防爆設備が不要、炭素源を限定しない、など）新たなタンパク質生産の誘導プロモーターとして利用したり、代謝経路中の遺伝子発現を厳密にコントロールしたり、遺伝子回路を組むことによって、実用プロセスまたは研究用途の高性能（高生産）な物質生産株を開発（自社開発・受託開発を含む）するために利用することもできる。また、開発したメタボライトセンサは、HPLCやGCMSの代わりに目的産物や副産物の生産量を簡易的にハイスループット定量するために利用し、高性能（高生産）な物質生産株の開発スピードを加速させることもできる。

[0081] 本開示の一実施形態において、より安価かつ安全な化合物を誘導剤とする遺伝子スイッチ（転写調節因子）、および／またはそれを利用した遺伝子スイッチ系を開発し、そのライセンス化やキットの一部としての販売を行うことができる。さまざまな生物種が持つ転写因子について、誘導剤の物性を指

標にスクリーニングを行い、これを用いた遺伝子スイッチ（転写調節因子）、および／またはそれを利用した遺伝子スイッチ系のプロトタイプを試作する。試作したプロトタイプについて、その構成要素にランダムな遺伝子変異を導入する。そうして作製した遺伝子スイッチライブラリに対して、OFF／ON選抜を行う。すなわち、遺伝子スイッチライブラリを保持する酵母株を、100 nMの5 F d U存在下で培養したのちに、誘導剤を加えた培地に移すことで、遺伝子発現を誘導する。培養液を1～3 mMのZ e o c i nと誘導剤を含む培地へと移すことで、ON選抜を行う。用途に合わせて誘導剤の濃度を調整することで、より低濃度の誘導剤に応答する遺伝子スイッチ（転写調節因子）変異体の単離（高感度化）も行う。開発した遺伝子スイッチ（転写調節因子）、および／またはそれを利用した遺伝子スイッチ系は、物質生産の鍵となる代謝酵素の発現制御や、細胞にとって負荷の大きいタンパク質の生産を誘導することに用いる。スイッチ・センサの受託開発においては、指定の誘導剤と転写因子のペアについて同様の進化分子工学サイクルを実施する。誘導剤・転写因子ペアについては、代謝工学上重要な化合物、例えば目的の生産物やあるいはその中間体などに応答するものを選定することで、これらの濃度を簡易モニタリングできるメタボライトセンサを開発する。こうして得たメタボライトセンサは、菌株開発のスピードアップに用いる。

[0082] 本開示の一局面において、生物における遺伝子スイッチ（転写調節因子）を選抜するシステムであって、（A）遺伝子スイッチ発現配列および／または該遺伝子スイッチ発現配列によってコードされる転写調節因子が結合するプロモータにランダムな変異を導入した複数の核酸分子を含むDNAライブラリーと、（B）該ライブラリーを宿主細胞に導入する手段と、（C）該プロモータによって発現調節される遺伝子を発現する細胞を死滅させるOFF条件に該宿主細胞を曝露し、生存する細胞を選択する手段と、（D）（C）において該生存する細胞（OFF条件で生存する細胞）を、該プロモータによって発現調節される遺伝子を発現しない、及び／または目的の発現レベル

に達していない細胞を死滅させる ON 条件に曝露し、生存する細胞を選択する手段と、(E) (D) において該生存する細胞 (ON 条件で生存する細胞) に含まれる該ライブラリーに含まれていたものと同じ核酸配列を有する核酸分子を遺伝子スイッチ (転写調節因子) として選択する手段とを含む、システムが提供される。

[0083] また他の局面において、生物における遺伝子スイッチ (転写調節因子) を選抜するシステムであって、該システムは、遺伝子スイッチ発現配列および／または該遺伝子スイッチ発現配列によってコードされる転写調節因子が結合するプロモータにランダムな変異を導入した複数の核酸分子を含む DNA ライブラリーから該遺伝子スイッチ (転写調節因子) を選抜するものであり、該システムは、(B) 該ライブラリーを宿主細胞に導入する手段と、(C) 該プロモータによって発現調節される遺伝子を発現する細胞を死滅させる OFF 条件に該宿主細胞を曝露し、生存する細胞を選択する手段と、(D) (C) において該生存する細胞 (OFF 条件で生存する細胞) を、該プロモータによって発現調節される遺伝子を発現しない、及び／または目的の発現レベルに達していない細胞を死滅させる ON 条件に曝露する手段と、(E) (D) において該生存する細胞 (ON 条件で生存する細胞) に含まれる該ライブラリーに含まれていたものと同じ核酸配列を有する核酸分子を遺伝子スイッチ (転写調節因子) として選択する手段とを含む、システム。

[0084] 一実施形態において、DNA ライブラリーは、DNA ライブラリーは公知の種々の方法を用いて作製することができ、遺伝子スイッチ発現配列および／または該遺伝子スイッチ発現配列によってコードされる転写調節因子が結合するプロモータにランダムな変異が導入されているものであれば特に限られるものではない。

[0085] 一実施形態において、該ライブラリーを宿主細胞に導入する手段は、宿主細胞に発現ベクターを導入したり、発現カセット (フラグメント) をゲノムに組み込むことができる種々の分子生物学的機器を挙げることができる。

[0086] 一実施形態において、(C) 該プロモータによって発現調節される遺伝子

を発現する細胞を死滅させるOFF条件に該宿主細胞を曝露し、生存する細胞を選択する手段、および（D）該プロモータによって発現調節される遺伝子が発現しない、及び／または目的の発現レベルに達していない細胞を死滅させるON条件に曝露し、生存する細胞を選択する手段は、例えば、種々の条件を設定して当該条件で細胞培養を行うことができる培養器などを挙げることができ、所定の条件下で細胞を培養し得るものであれば特に限られるものではない。

[0087] 一実施形態において、（E）（D）において該生存する細胞（ON条件で生存する細胞）に含まれる該ライブラリーに含まれていたものと同じ核酸配列を有する核酸分子を遺伝子スイッチ（転写調節因子）として選択する手段は、例えば、所定の条件下で生存する細胞から、当該細胞に含まれる核酸分子を抽出し、その核酸配列を決定することができるものであれば特に限られるものではなく、シーケンサーなどを含むことができる。他の実施形態において、生存する細胞に含まれる核酸分子がライブラリーに含まれていたものと同じ核酸配列を有することを確認するため、DNAライブラリーにおける各核酸分子の情報を、個々の培養細胞に紐づけて培養できる機器であってもよい。

[0088] （遺伝子スイッチライブラリー、およびそれによる生物または細胞の育種）

本開示の方法によれば、所望の性質の遺伝子スイッチ（転写調節因子）を選抜することができるため、目的の化合物や代謝産物に応じて、その発現強度や転写特性にバリエーションのあるプロモータをライブラリーとして提供することができる。したがって、本開示の一局面において、本開示の方法によって選抜された遺伝子スイッチ（転写調節因子）を含む遺伝子スイッチライブラリーを提供することができる。

[0089] またこのような誘導性プロモーターライブラリーを用いて微生物などの生物やその細胞の育種を行うことができ、代謝経路中の遺伝子を所望の発現強度となるように調節することで、当該微生物や細胞に目的の化合物を効率よ

く生産させることが可能となる。したがって、本開示の一局面において、所望の特性を有する生物または細胞を育種する方法であって、A) 本開示の遺伝子スイッチ（転写調節因子）を選抜する方法を用いて、所望の活性を有する遺伝子スイッチ（転写調節因子）を提供する工程と、B) 前記遺伝子スイッチ（転写調節因子）を用いて、前記所望の特性を付与することに関与する1または複数の遺伝子を、所望の転写特性を持つように改変する工程と、C) 工程Bで改変された所望の転写特性を有する遺伝子を、目的の細胞に導入する工程と、D) 工程Cで得られた細胞の中から、所望の特性を有する細胞を選択する工程とを包含する、方法が提供される。

[0090] また他の局面において、所望の特性を有する生物または細胞を育種する方法であって、A) 本開示の遺伝子スイッチライブラリーを提供する工程であって、前記ライブラリーは、所望の活性を有する遺伝子スイッチ（転写調節因子）を有するように構成される、工程と、B) 前記遺伝子スイッチ（転写調節因子）を用いて、前記所望の特性を付与することに関与する1または複数の遺伝子を、所望の転写特性を持つように改変する工程と、C) 工程Bで改変された所望の転写特性を有する遺伝子を、目的の細胞に導入する工程と、D) 工程Cで得られた細胞の中から、所望の特性を有する細胞を選択する工程とを包含する、方法が提供される。

[0091] さらに他の局面において、所望の物質を生産する生物または細胞を育種する方法であって、A) 本開示の遺伝子スイッチ（転写調節因子）を選抜する方法を用いて、所望の活性を有する遺伝子スイッチ（転写調節因子）を提供する工程と、B) 前記遺伝子スイッチ（転写調節因子）を用いて、前記物質の生合成に関与する1または複数の遺伝子を、所望の転写特性を持つように改変する工程と、C) 工程Bで改変された所望の転写特性を有する遺伝子を、目的となる細胞に導入する工程と、D) 工程Cで得られた細胞の中から、所望の特性を有する細胞を選択する工程とを包含する、方法が提供される。

[0092] 本開示の遺伝子スイッチ（転写調節因子）の選抜方法や、それを利用した遺伝子スイッチライブラリーを応用することで、目的の代謝化合物に応答し

て転写制御可能な遺伝子スイッチを発現する細胞を元にライブラリ（導入する遺伝子の種類や、由来する生物種の種類、各遺伝子の発現量など）を構築し、その中から所望の特性を有する細胞を選択することもできる。したがって、本開示の別の局面において、所望の特性を有する生物または細胞を選抜する方法であって、A) 本開示の遺伝子スイッチライブラリーを提供する工程であって、前記ライブラリーは、目的の代謝化合物に応答する転写調節因子を有するように構成される、工程と、B) 前記転写調節因子を用いて、前記目的の代謝化合物への応答性を付与することに関与する1または複数の遺伝子を、所望の転写特性を持つように改変する工程と、C) 工程Bで改変された所望の転写特性を有する遺伝子を、目的の細胞に導入する工程と、D) 工程Cで得られた細胞の中から、所望の特性を有する細胞を選択する工程とを包含する、方法が提供される。

[0093] 一実施形態において、所望の物質としては、例えば、アミノ酸やポリ乳酸等の有用物質を合成するための酵素、目的の化合物（例えば、PETなどの難分解性化合物）を分解するための酵素、抗生物質などの抗菌性の物質を合成するための酵素、標的タンパク質と特異的に相互作用する抗体タンパク質などを挙げることができる。

[0094] また本開示の一実施形態において、育種の対象となる生物や細胞としては、真核生物および原核生物を含み、どのような細胞であってもよいが、例えば、酵母（ピキア酵母、出芽酵母）、大腸菌、枯草菌、乳酸菌、コリネ菌、糸状菌、および微細藻類などを挙げることができる。

[0095] また本開示の一局面において、本開示の遺伝子スイッチ（転写調節因子）を選抜する方法を用いることで、所望の活性を有するプロモータを選抜することができ、これにより、所望のプロモーターを生産する方法を提供することができる。またこの際に、上記のような所望の細胞において活性を有するものを選抜することも可能である。

[0096] 本開示の別の局面において、本開示の遺伝子スイッチ（転写調節因子）を選抜する方法およびこれによって得られるスイッチなどの産物および加工物

は、いわゆるDBTL（デザイン、ビルド、テスト、ローン）サイクルによる高機能な生体物質（例えば、抗体、代謝物、その他タンパク、脂質、糖などの各種物質、オルガネラなど）の高生産株を迅速に創出することができる。

[0097] ここで、デザインの側面では、生体物質（例えば、抗体）の配列や構造・改変細胞のデザインが想定される。例えば、生体物質（例えば、抗体）の構造安定性や発現量最適化のシミュレーション、候補配列提案のためのアルゴリズムなどを設計することができ、本開示の遺伝子スイッチ（転写調節因子）を選抜する方法およびこれによって得られるスイッチなどの産物および加工物を利用することができる。

[0098] ビルドの側面では、設計した生体物質（例えば、抗体）の候補配列やゲノム改変細胞の並列・迅速作出を行うことができる。ここでは、自動DNA合成や自動タンパク質精製システムが利用され得、更なるプロセス自動化と最適化・拡張を行うことができ、本開示の遺伝子スイッチ（転写調節因子）を選抜する方法およびこれによって得られるスイッチなどの産物および加工物を利用することができる。

[0099] テストの側面では、生体物質（例えば、抗体）の機能や生産性評価を行うことができる。ここでは、自動化や次世代シーケンサー（NGS）、マイクロ流体システム等による超ハイスループット（HTP）評価系の開発を行うことができる。これによって得られた評価をもとに、本開示の遺伝子スイッチ（転写調節因子）を選抜する方法およびこれによって得られるスイッチなどの産物および加工物を用いて更なる改良を行ってもよい。

[0100] ラーンでは、機械学習やルール抽出を行い、学習をさせる。データ管理や、生体物質（例えば、抗体）設計に適した学習アルゴリズム、膨大なデータの管理システム開発を行うことができ、本開示の遺伝子スイッチ（転写調節因子）を選抜する方法およびこれによって得られるスイッチなどの産物および加工物を組み合わせることで、高機能な生体物質（例えば、抗体）の高生産株を迅速に創出することができる。

[0101] 一例として、本開示の遺伝子スイッチ（転写調節因子）を選抜する方法およびこれによって得られるスイッチなどの産物および加工物を組み合わせることで、微生物によるバイオ医薬品フェドバッチ生産技術の改良を行うことができ、多品種製造に適したフェドバッチ生産技術を改良することもできる。

[0102] 別の例として、微生物によるバイオ医薬品の生産が挙げられ、本開示の遺伝子スイッチ（転写調節因子）を選抜する方法およびこれによって得られるスイッチなどの産物および加工物を組み合わせることで、改良することができる。例えば、連続生産技術の開発により、あるいは大量製造に適した連続生産技術を開発することができる。

[0103] （一般技術）

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Sambrook J. et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F. M. (1989). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Innis, M. A. (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992). *Short*

Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995). PCR Strategies, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, and annual updates; Sninsky, J. J. et al. (1999).

PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分（全部であり得る）が参考として援用される。

[0104] 人工的に合成した遺伝子を作製するためのDNA合成技術および核酸化学については、例えばGeneArt、GenScript、Integrated DNA Technologies (IDT)などの遺伝子合成やフラグメント合成サービスを用いることもでき、その他、例えば、Gait, M. J. (1985). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Gait, M. J. (1990). Oligonucle

otide Synthesis: A Practical Approach, IRL

Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Pressなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

- [0105] 本明細書において「または」は、文章中に列挙されている事項の「少なくとも1つ以上」を採用できるときに使用される。「もしくは」も同様である。本明細書において「2つの値」の「範囲内」と明記した場合、その範囲には2つの値自体も含む。
- [0106] 本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。
- [0107] 以上、本開示を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本開示を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本開示を限定する目的で提供したのではない。従って、本開示の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される

。

実施例

[0108] (実施例 1 : 融合レポーター遺伝子の構築)

OFF 選抜用のタンパク質として単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (h s v T K)、ON 選抜用のタンパク質としてゼオシン耐性タンパク質 (B l e)、および蛍光レポーター (緑色蛍光タンパク質、G F P) の 3 つの機能の融合タンパク質を使用して、酵母の遺伝子スイッチの迅速な並列構築／進化のための進化プラットフォームを構築した (図 1 A)。この融合タンパク質である h s v T K-B l e-G F P (以下、T B G) は、3 つの利点を提供する。第 1 に、T B G は、改良された遺伝子スイッチの連続的な選択を可能にする。第 2 に、すべての工程がリキッドハンドリングのみで完了できることを考えると、マルチウェルプレートを用いて複数の選択条件を並行して試験することができる。第 3 に、選択されたすべての変異体を蛍光分析によりシームレスに特徴づけることができ、異なる仕様の酵母遺伝子スイッチを系統的に生成することが可能である。

[0109] 図 1 A に示すように、コアプロモーターとオペレーター配列を融合させた合成プロモーター (s y n P) を構築した。これにより、合成転写アクチベーター (s T A) が誘導因子に正または負の反応で結合し、遺伝子スイッチの出力である融合タンパク質 (h s v T K-B l e-G F P (T B G)) をコードする下流遺伝子の転写を活性化させる。次いで、所望の遺伝子スイッチ変異体を、種々の OFF / ON 選抜で濃縮した。OFF 選抜としては、不適切なスイッチ出力 (リーク発現)、つまり h s v T K 発現を持つ変異体は 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (5 F d U) または 6-(β -D-2-デオキシリボフラノシル)-3, 4-ジヒドロ-8H-ピリミド [4, 5-c] [1, 2] オキサジン-7-オン (d P) をリン酸化し、その後ヌクレオシドリン酸塩 (5 F d UMP および d PMP) の毒性効果により死滅させた。ON 選抜としては、スイッチ出力 (B l e 発現) が不十分な変異体はゼオシンで死滅させた。

[0110] 続いて、図1Bに示すように、酵母遺伝子スイッチの誘導進化を以下のように行なった。まず酵母細胞を、ランダムに変異させた成分（例えば、sTAをコードする発現カセット）からなる遺伝子スイッチライブラリーで最初に形質転換し、次いで5FdUまたはdPによるOFF選抜をおこなった。次に、得られた細胞プールに、異なる濃度の誘導剤を添加し、様々な濃度のゼオシンを用いたON選抜をおこなった。得られた細胞集団を、フローサイトメトリーを用いて誘導因子依存性の蛍光シフトについて評価し、所望のスイッチ変異体について濃縮された集団をスクリーニングした。以上のように、OFF状態とON状態の両方で個々の細胞のGFP蛍光を評価することによって、最良のパフォーマンスを持つ変異体を分離した。

（実施例2：遺伝子スイッチの選抜）

実施例1のようにして構築したTGBをコードする遺伝子を、*S. cerevisiae* GAL1コアプロモーター（ p_{GAL1-c} ）に融合した大腸菌tetオペレーター（tetO）を7コピーつなげたsynP（ p_{tetO7} ）の下流に配置した（図2A）。TGBをコードするコンストラクトは、*S. cerevisiae*ゲノムのV番染色体に組み込んだ。逆バクテリア転写抑制因子rTetRと3コピーのウイルス転写活性化モチーフ（ $3 \times VP16$ 、 $VP48$ ）との融合体であるrTetTA（sTA、rtTA^{2S}-M2ともいう）が p_{tetO7} に結合し、さらにDoxが結合するとTGBコード遺伝子の転写が始まる。得られた細胞株の細胞蛍光はDoxに応答しており（図2B）、この結果から、TGBがプロモーターの強度を示すレポーターとして有用であることがわかった。

[0111] p_{tetO7} はリーク発現を示し、rTetTAの非存在下でも、低いものの検出可能な活性を有していた。プラスミドを用いてrTetTAを発現させた場合、Doxの非存在下でも細胞蛍光は4倍に上昇した。このようにOFF状態の出力が高いため、Doxを添加した場合には3倍程度の蛍光上昇しか得られなかった（図2B）。

（実施例3：Ble変異体の評価）

T B GコンストラクトのONセクターとしての性能を評価した。野生型のb l e遺伝子を組み込んだT B G（すなわちT B_{WT} G）では、D o xによって誘導されるプロモーター強度における3倍の差を識別することができなかった。プラスミドから発現させたr T e t T Aを用いた場合、T B_{WT} Gコンストラクトをもつ細胞は、試験したすべての濃度のゼオシンで増殖し、T B_{WT} Gの細胞性B l e活性はすでにO F F状態で飽和していることを示していた。そのため、B l eに1つのアミノ酸置換（D 2 5 A）を導入し、このタンパク質の機能がわずかに損なわれるようにした。その結果、T B_{D 2 5 A} Gを持つ細胞は、優れたONセクターであることが判明した。すなわち、2 m Mゼオシンを含む培地では、T B_{D 2 5 A} Gを持つ細胞の生存率は、細胞の蛍光から推定されるT B G発現レベルに実質的に比例していた（図2 C）。

（実施例4：d Pおよび5 F d Uの取り込み）

h s v T Kは、6 - (β - D - 2 - デオキシリボフラノシル) - 3, 4 - ジヒドロ - 8 H - ピリミド [4, 5 - c] [1, 2] オキサジン - 7 - オン (d P) や5 - フルオロ - 2' - デオキシウリジン (5 F d U) に対して優れたキナーゼであることが示されており、大腸菌の負の選抜マーカーとして利用されている。T B G遺伝子をO F Fセクターとして評価する前に、効率的なO F F選択を行うためには、酵母細胞を改変する必要がある。具体的には、広基質ヌクレオシドトランスポーター（ヒト平衡ヌクレオシドトランスポーター1（h E N T 1））をコードする遺伝子をクローニングし、酵母染色体に組み込むことで、細胞によるヌクレオシドの取り込みを促進させた。T B G発現細胞ではd Pの細胞毒性が非常に高いため、p_{t e t O 7} - T B Gを発現させた酵母細胞は、D o xやr T e t T Aを添加しなくても、低濃度（～5 0 n M）のd Pだけでも生存率が低下した。T B G / d Pは、ほぼゼロに近い漏出發現を示す非常に厳格な遺伝子スイッチを選択するのに適しているものの、既存の誘導系のほとんどは、ある程度の漏出發現を示す。このような場合には、5 F d Uを選択剤として用いて変異体を選択する必要がある。図2 Dに示したとおり、5 F d Uを用いた結果、5 F d Uは用量依存的な

効果を示し、100 nMの5 F d Uを培地に添加した場合には、r T e t T Aをもつ酵母はD o xの存在下では生存しなくなり（高モード）、一方、この細胞は、D o xの非存在下では生存率が低下した（低モード）。これは図2 Cで示したように、蛍光で観察された漏出（非誘導）によるT B G発現を反映している。

（実施例5：T e t - O N型遺伝子スイッチのS / N比の評価）

T e t - O N型遺伝子スイッチは、以前の研究により、D o x添加時に3倍の誘導しか示さなかったことがわかっているが、これはr t T e t T Aがt e t Oに非特異的に結合したこと、およびp_{t e t O7}の上流でのプロモーターの偶然の出現によるものと考えられている。t e t Oへの非特異的結合を減少させるために、r T e t T A発現カセットの全領域を、エラーを起こしやすいP C R（e p P C R）によってランダムに変異させ、その結果得られたP C R産物を、G A P修復クローニングによって、p_{t e t O7}-T B Gをもつ細胞内のプラスミドに直接クローニングした（図3 A）。得られた形質転換体（〜10⁵個のユニークなクローン）を、D o xを含まない5 F d U含有液体培地で培養することにより、漏出の（すなわち、D o xに依存しない）T B G発現を有する変異体を除去してO F F選抜を行った。次に、非機能性バリエーションを除去し、これにより良好なスイッチを濃縮するために、様々な条件下でO N選抜を行った。具体的には、O F F選抜された細胞のプールを、D o x（0.01〜10 μg / mL）とゼオシン（1または2 mM）の様々な組み合わせを含む14本の試験管に分注し、サンプルを一晩振盪した。

[0112] 14本のO N選抜された細胞混合物のそれぞれをフローサイトメトリーを用いて分析した（図3 A）。機能的なスイッチを、様々な選抜条件下で異なる程度に濃縮した。すべての場合において、試験したゼロではない濃度のD o xにおいて、望ましい（D o x誘導性）変異体の有意な濃縮が観察された（図3 A）。一般に、誘導条件（D o x+）の下での出力シグナルは、低い選択圧（ラン1〜7；1 mMゼオシン）の下でのそれぞれの対応するプールよりも、より高い選択圧（2 mMゼオシン）がO N条件の下で適用されたラ

ン8～14からのプールの方が高かった。しかし、2 mMゼオシンでON選抜されたプールは、Doxの非存在下でも高い蛍光シグナルを示した高割合の「常にON」のバリエーションで汚染されていた。2 mMのゼオシンを用いたON選抜は、Dox誘導時に高い出力を持つ陽性（望ましい）クローンにも毒性効果を及ぼし、それによって「常にON」の表現型を持つ非スイッチング変異体（スーパーアクチベーター）と比較してスイッチング変異体の割合を減少させたことがわかった。いずれの場合にも、低濃度のDox、特に0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の濃度では、プール内に漏出発現のあるバリエーションが徐々に蓄積される結果となった。この特定のケースでは、機能的スイッチの最も効率的な濃縮は、ラン9および11（プール#9および#11）で達成された。最高の誘導出力と最高のストリンジェンシーの両方を持つバリエーションを分離するため、その後のスクリーニングにはラン8と11を用いた。

[0113] 選択された2つのプールから、93個のクローンをランダムに選び、96ウェルプレートで蛍光スクリーニングを行った（図3B）。試験したクローンの合計48%（45/93）は、Dox（10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で5倍以上の誘導を示し、最高のrTetTA変異体（rTetTA_{K8N, L131L}）は、0.3および10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のDoxの存在下でそれぞれ8倍および11倍の誘導を示した（図3C）。

[0114] 図3Aに示すように、Tet-ONスイッチのrTetTAをコードする発現カセットにランダムな変異を導入し、得られたライブラリーを異なる選抜条件でOFF/ON選抜の並列操作を行った。スイッチバリエーションが濃縮される条件をスクリーニングするために、得られた細胞集団をDox依存性の蛍光シフトについて評価した。緑と青で示した領域は、望ましくない挙動、すなわち漏出発現のあるバリエーション（Doxが存在しない場合に10⁴以上のGFP蛍光を持つ細胞）と不活性バリエーション（10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のDoxの存在下で10⁴未満のGFP蛍光を持つ細胞）のそれぞれ相対的な量（%）を示す。スイッチングバリエーションの相対的な量（%）は、これらの2つの数値の両方を100%から差し引くことによって得られた。破線は、rTetT

Aを含まないプラスミドをもつ酵母株から得られたヒストグラムを示す。図3Bでは、Tet-ONバリエーションの96ウェルプレートでの蛍光スクリーニングの結果を示した。また図3Cでは、選択された変異体のトランスファ機能を示した。エラーバーは、3つの独立した実験の平均±SDを表す。50%有効濃度（EC₅₀）値は、最小二乗法によりヒル式に適合した用量反応曲線から計算した。上のパネルは、野生型および進化させたTet-ONスイッチ（rTetTA_{K8N, L13L}）をもつ酵母株の細胞ペレットを10μg/mLのDoxの有無にかかわらずインキュベートした場合の蛍光画像を示す。

（実施例6：遺伝子スイッチの改良）

Tet-ONシステムを開発するためのプロトコルに従って、任意の転写因子を真核生物の転写スイッチの構成要素として使用することができる。しかし、異なる転写因子の場合、安定性、DNA結合親和性、およびsTAを生成するために他のタンパク質またはドメインと融合したときにそれらの機能がどのように変化するのかがそれぞれ異なるため、得られるスイッチの性能は予測不可能である。さらに、sTAのスイッチング挙動は、種々の要因（発現レベル、プロモーターの位置およびコピー数、および株の種類）に大きく依存する。実際には、それぞれの条件において適切な性能を確保するために、新しいシステムを再進化させる必要がある。

[0115] 負に制御された真核生物の遺伝子スイッチを改良するため、2つの酵母の転写スイッチを再構築した。2, 4-ジアセチルフログシノール（DAPG）-repressible（DAPG-OFF）スイッチとD-Camphor-repressible（Camphor-OFF）スイッチ（図4A）。具体的には、DAPGおよびD-Camphor応答性細菌リプレッサー（PhlFおよびCamR）をVP48活性化ドメインおよび核局在化シグナル（NLS）と融合させ、公表されている配列と同一のタンパク質配列を有するsTA（それぞれPhlTAおよびCamTA）を生成した。また、7コピーのtetOの代わりに、PhlFとCamRのシングルオ

ペレーター（それぞれ p_{hIO} と p_{camO} ）を p_{GAL1-c} に融合させ、合成プロモーター（それぞれ $p_{p_{hIO1}}$ と $p_{p_{camO1}}$ ）を作製した。本発明者らの手法は可能な限り報告された方法と一致していたものの、初期のコンストラクトは、報告されているように機能しなかった。これはおそらく sTA の発現を駆動するために使用されるシス制御エレメント（プロモーター／ターミネーター）のわずかな違いに起因するものと思われた。さらに、本発明者らは $PhITA$ 発現プラスミドで高い毒性を観察した。プラスミドを酵母に形質転換したところ、 $DAPG$ に感受性のない数個の生存可能なコロニーのみが得られた（図4B）。これらの単離株は、 $VP16$ を過剰に発現させた場合の毒性効果を緩和すると思われる $PhITA$ 発現プラスミドの自然発生的なダウンチューニング変異を持つ突然変異体と考えられた。 $CamTA$ 発現プラスミドは、酵母においてより低い毒性を示したが、再構成された $Camphor-OFF$ スイッチは、 $D-camphor$ の存在下で有意な漏出发現を示した（図4C）。

[0116] $epPCR$ を用いて、 $PhITA$ および $CamTA$ 発現カセット全体を変異させ、得られたライブラリーを ON/OFF 選抜をおこなった。この選抜により、 $DAPG$ 添加時に4倍の発現低下を示した機能的な $DAPG-OFF$ 変異体（1-2E および 1-6H）（図4B）、ならびに $D-Camphor$ に対する応答性が S/N 比で2倍に改善された $Camphor-OFF$ スイッチ変異体（1-8D）（図4C）を迅速に単離することができた。特筆すべきことに、新たに単離された変異体については、酵母において明らかな毒性は観察されなかった。最良の性能を有する $Camphor-OFF$ スイッチのうちの5つは、完全な NLS を無効にするフレームシフト変異（A695del）を共有していた。その一方で、最良の性能を有する $DAPG-OFF$ スイッチのうちの4つは、無傷の NLS を保持していたが、 $PhITA$ 発現カセットに同じ変異を有していた。これらの観察から、 $D-camphor$ の存在下で漏出の TBG 発現がないか、またはそれ以下であることを確実にするために、最適な $CamTA$ 活性のためには、 NLS 機能（およ

びおそらく核内局在性)の部分的な障害が必要であることが示唆された。コントロール実験では、NL Sを欠いたCamTAによる転写活性化は検出されなかった。

[0117] 図4に酵母転写スイッチの作出と進化方法を示す模式図を示した(S/N比、感度、行動タイプで評価)。図4Aに本開示で開発した酵母遺伝子スイッチを示す。特定されたsTA変異体のプラスミド発現によって、宿主細胞において p_{phlO1} 、 p_{camO1} 、または p_{luxO1} の制御下に置かれた用量依存的な活性化遺伝子が発現した。図4B～図4Fに、DAPG-OFFスイッチ(図4B)、Camphor-OFFスイッチ(図4C)、DAPG-ONスイッチ(図4D)、およびHSL-ONスイッチ(図4F)の親および変異体のトランスファー機能を示した。TBG由来のGFP蛍光は、各誘導剤濃度の関数としてプロットした。示されているエラーバーは、3つの独立した実験の平均±SDを表している。OFF/ON選抜中に添加された誘導剤の濃度は、矢印および破線で示した。 EC_{50} 値は、最小二乗法によりヒル式に適合した用量反応曲線から計算され、マイクロモル濃度単位で表した。図4Eおよび図4Gには、それぞれPhlTAを反転/増感させ、LuxTAを増感させる、PhlFおよびLuxRにおける変異の構造マッピングを示した。PhlFとLuxRの構造は、それぞれTetRファミリーの転写調節因子SCO0332(PDB:2ZB9)とクォーラムセンサータンパク質TraR(PDB:1L3L)の結晶構造をもとに、Swiss-Modelサーバーを用いてモデル化した。DNA構造は対応する参照結晶構造から引用した。

(実施例7: DAPG-OFFシステムからDAPG-ONシステムへの変換)

突然変異によって、新規なスイッチング動作を持つ転写因子を出現させることができる。様々な細菌のリプレッサーは、いくつかの突然変異が生じることによって、それらのリガンド応答を反転させることが知られている。したがって、前述のDAPG-OFFスイッチをコードする遺伝子に変異を誘

発させることにより、DAPG-ONスイッチにコンストラクトを変換することができるかどうかを確認した。この目的のために、DAPG-OFFスイッチの単離に使用したのと同じPhlTAライブラリーを、DAPGの非存在下でOFF選抜にかけ、次いでこの化合物（5 μ M）の存在下でON選抜にかけた。生存プールから、30のバリエーションをランダムに選択し、OFF/OFFスクリーニングを行った結果、DAPG-ONバリエーション（1-11E、1-11G）を単離し、8倍のDAPG依存性の蛍光増加を示した（図4D、図6A）。このバリエーションの変異解析を行ったところ、3つの新規変異の存在を明らかにした。そのうちの1つ（Q117R）は、PhlTA（rPhlTA）の機能の反転に必須であり、他の2つの変異（E143Kおよび/またはK86T）は、反転したスイッチの応答性（感度および倍数変化の両方）の改善に必須であった（図4E）。ON選抜のためのより低い濃度のDAPG（0.5 μ M）を用いた別のサイクルの突然変異誘発、選抜、およびスクリーニングによって、最大1/8倍に減少したEC₅₀値を示す3つの第2世代バリエーション（2-1E、2-4E、および2-7E）を得た（図4D）。これらの第2世代バリエーションはすべて、DAPGに対する感受性の増加の原因となった新規変異（F109L）を共有していた（図4E）。PhlFはこれまでに、大腸菌においてDAPGに対する感度および選択性を改変されているが、本実施例において反転PhlF（rPhlF）機能を示す変異は、これまでに報告されていない。同様に、rPhlFの感度をあげる変異はこれまで報告されていない。

[0118] 図6に進化させたDAPG-ONスイッチのrPhlTA発現カセットに見出されたヌクレオチドおよびアミノ酸（AA、括弧内に示す）変異を示した。その変異が親である（1-11E）変異体にも見出された第二世代の変異体を除いて、第一世代（図6A）および第二世代（図6B）のrPhlTA発現カセットに見出された変異を赤線で示した。フォールドチェンジは、10 μ MのDAPGの存在下および非存在下での蛍光強度の平均 $\pm$ SD比として、図4Dに示すデータから計算した。

[0119] (実施例 8 : その他の新規なスイッチ)

これまでのところ、原核生物の転写活性化因子は酵母の転写活性化因子として利用されていない。そこで、3-オキソーヘキサノイルホモセリンラクトン (HSL) 誘導細菌転写活性化因子である *Vibrio fischeri* LuxR を誘導成分として用いて、sTA の生成を試みた。LuxTA (LuxR、VP48、および NLS の融合体、図 4A) の単純なプラスミド発現では、p_{LuxO1} (LuxR 結合ボックス (LuxO) と融合した GAL1 コアプロモーター) の制御下では、TBG の HSL 依存性発現はみられなかった (図 4F)。この非機能的な親を出発材料として、誘導剤の濃度を段階的に減少させながら 2 ラウンドの突然変異誘発および選抜を行い (1 ラウンド目、10 μ M の HSL ; 2 ラウンド目、1 μ M の HSL)、機能的な HSL-ON のバリエーションを同定することに成功した。このようにして、迅速に、酵母が細菌のシグナルを感知し、応答することを初めて可能にした。

[0120] 3 μ M の HSL を添加したときに TBG 発現の 6 倍の増強を示した最高のパフォーマンスのバリエーション (図 4F) は、2 つの非同義変異 (S116Y、W201R) を持っていた (図 4G、図 7)。酵母の HSL-ON スwitch では、いずれの変異も、程度は異なるものの、LuxTA を単独で HSL に増感させるのに十分であった。しかし、それぞれの変異は大腸菌では全く異なる挙動を示した。酵母で見られるように、LuxR 構造のリガンド結合領域に位置する S116Y 変異は、大腸菌では LuxR / p_{Lux} 転写制御因子の HSL 感度を増加させた。一方、大腸菌 RNA ポリメラーゼと相互作用することが知られている LuxR の表面に位置するもう一つの変異 (W201R) は、大腸菌における Lux プロモーターからの発現を著しく低下させた。W201R 置換が RNA ポリメラーゼのリクルーターとしての LuxR の機能に負の影響を与えられられるが、これはこの変異がこれまでに HSL による活性化のためにタンパク質を増感させる LuxR 変異を見つけるためのスクリーニングで見落とされていた理由となり得ると考えられる。酵母の HSL-ON スwitch では、LuxR の役割は、HSL によって誘導され

たDNA結合を促進することとなる。したがって、この増感性変異は酵母の遺伝子スイッチでのみ同定できると考えられる。

[0121] 図7は進化させたHSL-ONスイッチのLuxTA発現カセットに見出されたヌクレオチドおよびアミノ酸(AA、括弧内に示す)の変異を示す。その変異が親である(1-4A)変異体にも見出された第2世代の変異体を除いて、第1世代(図7A)および第2世代(図7B)のLuxTA発現カセットに見出された変異は赤線で示した。フォールドチェンジは、100μMのHSL(2-4Fについては3μM)の存在下および非存在下での蛍光強度の平均±SD比として、図4Fに示すデータから計算した。

(実施例9：酵母スイッチ変異体のANDゲートβ-カロテン生合成経路への統合)

酵母では、S/N比を向上させた一連の遺伝子スイッチを開発してきたので、これらの構造をパスウェイ・フラックス制御に応用することを試みた。単離された3つのsTA(DAPG-ON_{2-1E}、HSL-ON_{2-4F}、およびTet-ON_{1-11F})を酵母の異なる染色体に統合した(図5A)。得られた株を、それぞれのsynPの下流にgfp遺伝子がクローニングされたプラスミド(p_{tet07}、p_{ph106}、およびp_{lux05})で形質転換した。なお、synPの500以上上流のベクター配列に含まれる潜在的なプロモーター配列は削除し、ph10およびlux0の繰り返し数を増加させた。得られた細胞のGFP蛍光は、それらの同族の誘導剤の存在下でのみ誘導され、10²以上の因子によって誘導された(図5B)。これらの合成プロモーターはいずれもストリンジェントであり、すなわち、誘導剤が存在しない場合には低い基底TBG発現を示した。

[0122] これらのスイッチをβ-カロテン生合成経路の調節因子として利用することで、直交的な調節能を利用することを試みた。そのために、*S. cerevisiae* Bts1pを用い、*Xanthophyllomyces dendrorous*のCrtYBおよびCrtIタンパク質と組み合わせた3つの酵素の作用による9段階のプロセスでβ-カロテンの合成を行った

(図5C)。

[0123] 3つの遺伝子(BTS1、crtYB、およびcrtI)をすべて発現するプラスミドを構成プロモーターの制御下で酵母を形質転換すると、誘導剤の有無にかかわらず、酵母は β -カロテンを産生した(図5D)。BTS1とcrtYBのプロモーターをそれぞれ p_{phl06} と p_{tet07} で置換した。これらの3つの遺伝子のすべてが発現する必要があったので、 β -カロテン産生は、DAPGとDoxの両方の存在下でのみ期待された(AND-ゲート制御)。しかし、 p_{tet07} プロモーターによる漏出发現は、おそらくCrtYBの強力な触媒活性のために、無視できないことが判明し、Doxの非存在下では有意な誤った色素沈着をもたらした。この漏出发現は、crtYBを制御するために使用される遺伝子スイッチを p_{tet07} から p_{lux05} に変換することによって緩和され、 β -カロテン生合成経路はHSLとDAPGの組み合わせによってANDゲート制御下に置かれた。この株では、 β -カロテンの生合成はDAPGとHSLの両方の存在下でのみ見られるという、期待されたANDゲートの挙動が観察された。同様の戦略を、 β -カロテン生合成経路をANDゲート下に配置した株の構築においても採用した。

[0124] 図5に新たに開発した遺伝子スイッチを用いたFPPから β -カロテンへのフラックス制御を示した。図5Aでは、カロテノイド生合成のANDゲート制御に用いた酵母株を示す。DAPG-ON_{2-1E}、HSL-ON_{2-4F}、およびTet-ON_{K8N, L131L}スイッチで使用するためのsTAを発現する3つのプラスミドを染色体統合した。各synPの下流の遺伝子(p_{phl06} 、 p_{tet07} 、および p_{lux05})は、対応する誘導剤(それぞれ、DAPG、Dox、およびHSL)の存在下でのみ発現した。図5Bに、Dox、DAPG、およびHSLを用いた直交GFPP発現制御をフローサイトメトリーで測定した結果を示す。図5Cに β -カロテンへの合成経路を示す。FPPはファルネシルニリン酸を、GGPPはゲラニルゲラニルニリン酸を示す。図5Dに、定常的な β -カロテン生合成とANDゲート制御による β -カロテン生合成の模式図を示した。図5D左パネルに示す組み合わせで構成的プロモータ

—または $s y n P$ (p_{phl06} 、 p_{tet07} 、および p_{lux05}) の制御下で ($B T S 1$ 、 $c r t Y B$ 、および $c r t I$) を発現する酵母株 (図5 D 右パネル) の細胞ペレットを示す。これらの菌株を、異なる組み合わせの誘導剤 ($D o x$ 、 $D A P G$ 、および $H S L$) を含む液体培地に接種し、 $30^{\circ}C$ で24時間培養した。誘導剤の濃度は、 $D A P G$ ($3 \mu M$)、 $H S L$ ($3 \mu M$)、および $D o x$ ($10 \mu g / mL$) であった。

(実施例10: ピキア酵母での遺伝子スイッチの開発)

本実施例ではピキア酵母を用いて遺伝子スイッチを開発した。具体的には、図8 A に示すとおり、 $D A P G$ 応答性細菌リプレッサー ($P h l F$) を $V P 48$ 活性化ドメインおよび核局在化シグナル ($N L S$) と融合させて人工の転写活性化因子 ($r P h l T A$) を生成し、 $G A P$ プロモータと $A O X 1$ ターミネータの間にクローニングした。また $P h l F$ のオペレーター ($p h l O$) を1個あるいはタンデムに18個つなげたものを、 $A O X 1$

$c o r e$ プロモータに融合させ、合成プロモーター (p_{phl01} および p_{phl018}) を作製し、 $E G F P$ 遺伝子上流にクローニングした。 $E G F P$ の下流には $A O X 1$ ターミネータを配置した。以上の $r P h l T A$ の発現カセットと人工プロモータカセットを、*Komagataella phaffii* CBS 7435 株の $T 38473$ と $A R G 4$ 座位に組み込んだ (図8 A)。

[0125] その結果、図8 B に示すとおり、 $r P h l T A$ を $A R G 4$ 座位、人工プロモータ p_{phl01} または p_{phl018} を含む $E G F P$ カセットを $T 38473$ 座位に組み込んだ場合において、それぞれおよそ600および3000倍の S / N 比を示した。これは従来の天然のプロモータの性能と匹敵し、さらに培地成分 (主に糖源) の制約がなく、また従来の低性能の人工プロモータと比較して極めて高い S / N 比を示すことがわかった。

[0126] 図8 C に示すとおり、 $r P h l T A$ を $T 38473$ 座位、人工プロモータ p_{phl01} または p_{phl018} を含む $E G F P$ カセットを $T 38473$ 座位に組み込んだ場合では、 $D A P G$ $0 \mu M$ のときの $G F P$ 発現が大きく増加し、 S

／N比がおおよそ7および300倍にまで低下した。

[0127] ARG4 遺伝子の全部（約1.6 kbp）または部分（1 kbp）を、人工プロモータ p_{phlO1} または p_{phlO18} の上流にクローニングすると、図8Dに示すとおり、DAPG 0 μ Mのときの発現量のGFP発現のみが低下し、 p_{phlO1} を用いた場合において、S／N比が300倍に回復した。このことから、人工プロモータの上流に1 kbp以上の配列を挿入しておくことが、導入されるゲノム上の座位に依らず高いS／N比を実現するために必要であることがわかった。図8Eに示すとおり、同様の効果は $phlO$ のコピー数を48に増やし、 $phlO$ のタンデムリピート全体で約1.6 kbpにまで伸ばしたときにも確認され、3000倍を超えるS／N比を示すことがわかった。

[0128] ピキア酵母を含む酵母用の遺伝子スイッチは、人工の転写活性化因子だけでなく、VP16の代わりに転写抑制モチーフ、例えばMxi1（転写抑制因子）を融合することで、制御様式を反転することができる。

[0129] ピキア酵母用の遺伝子スイッチでは、人工プロモータとして、*Saccharomyces cerevisiae* 由来のGAL1 coreを用いるよりも、AOX1 coreやDAS1 coreを用いたほうが効率よく遺伝子の発現を制御することができる。ピキア酵母においては、GAL1 coreを用いた人工プロモーターは活性が極めて低く、ピキア酵母由来のAOX1やDAS1（強力なメタノール誘導プロモーター）やGAPなどのコアプロモーターに変えることでON（遺伝子発現誘導）の際の値が極めて大きくなる。

[0130] また上記のとおり、 $phlO$ のコピー数を48に増やした場合には高いS／N比を達成している一方で、1、6、12、18、24コピーでも応答性は高い。ON（遺伝子発現誘導）の際の最大の発現量は大きく変わらないものの、 $phlO$ のコピー数が増えるにつれて、漏出发現が大きく低減することがわかった（図8B、図8E、図9）。これはプロモーター上流のDNAの長さが漏出发現の低減に影響している可能性がある。上流からの何等かの転写が漏出发現の原因となっており、上流からの距離が遠くなるとその影響

が低減され、漏出発現が減少していると考えられる。このような上流配列に起因する漏出発現については、上流配列を変更したり、または上流からの距離を遠くさせるなどによって、漏出発現のほばない人工プロモーターを開発することができる。

[0131] また、p h l Oタンデムコピー（48コピー）の代わりに、A R G 4をオペレーター配列の上流に置いて同じように漏出発現が極めて小さくなる。これはA R G 4がi n s u l a t o rとして機能していると考えられる。A R G 4を1000bpくらいまで削ってもi n s u l a t o rとして機能する。p h l O 1でも600倍程度のS/N比を達成することができる（図8C、図8D）。オペレーターのコピー数を増やして配列を長くしても同じように漏出発現が低減することから、上流からの距離の長さが影響していると考えられる。

[0132] （注記）

以上のように、本開示の好ましい実施形態を用いて本開示を例示してきたが、本開示は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願及び他の文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。本願は、日本国特許庁に2020年12月4日出願された特願2020-202233に対して優先権主張をするものであり、その内容はその全体があたかも本願の内容を構成するのと同様に参考として援用される。

産業上の利用可能性

[0133] 本開示の方法によって、産業微生物としても有用な酵母において簡便に高性能遺伝子スイッチ・センサを作出することができ、有用タンパク質の大量生産や毒性を示すタンパク質などの発現制御、代謝化合物の簡易的な濃度測定などに利用できる。これにより、バイオ医薬品や産業酵素の生産性を大きく高めたり、菌株構築の時間を圧倒的に短縮させることができ、高度な代謝や遺伝子ネットワーク制御を行うことができる。そのため、特に代謝工学や

合成生物学分野において産業応用が期待される。

請求の範囲

- [請求項1] 生物における転写調節因子を選抜する方法であって、
- (A) 遺伝子スイッチ発現配列および／または該遺伝子スイッチ発現配列によってコードされる転写調節因子が結合するプロモータにランダムな変異を導入した複数の核酸分子を含むDNAライブラリーを提供する工程と、
 - (B) 該ライブラリーを宿主細胞に導入する工程と、
 - (C) 該プロモータによって発現調節される遺伝子を発現する細胞を死滅させるOFF条件に該宿主細胞を曝露し、生存する細胞を選択する工程と、
 - (D) (C)において該生存する細胞を、前記プロモータによって発現調節される遺伝子を発現しない、及び／または目的の発現レベルに達していない細胞を死滅させるON条件に曝露し、生存する細胞を選択する工程と、
 - (E) (D)において該生存する細胞に含まれる該ライブラリーに含まれていたものと同じ核酸配列を有する核酸分子を転写調節因子として選択する工程と
- を含む、方法。
- [請求項2] 前記ON条件に用いられる遺伝子は、前記細胞に対して毒性を示す毒性物質に結合することで前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記ON条件に用いられる遺伝子は、前記毒性物質に対して触媒活性を有さない、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記ON条件に用いられる遺伝子は、遺伝子産物の量に対して化学量論的に前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 前記ON条件に用いられる遺伝子は、前記毒性物質との結合性を弱める変異を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

- [請求項6] 前記ON条件に用いられる遺伝子はブレオマイシン耐性タンパク質 (B l e) をコードする遺伝子配列を含み、前記変異はD 2 5 A変異を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 前記ブレオマイシン耐性タンパク質 (B l e) がStreptoalloteich us hindustanus由来である、請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 前記プロモータによって発現調節される遺伝子は、複数の遺伝子が融合された融合遺伝子である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] 前記宿主細胞が、前記遺伝子スイッチ発現配列と、前記プロモータによって発現調節される遺伝子配列とを有する発現ベクターを含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項10] 前記プロモータによって発現調節される遺伝子は、前記転写調節因子と誘導因子が結合した複合体が、前記プロモータのオペレータ配列に結合することによって発現が調節される、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項11] 前記転写調節因子が転写活性化因子である場合に、前記OFF条件が、前記転写活性化因子と結合する誘導因子の非存在下で、かつデオキシチミジン三リン酸(d T T P)のデノボ合成経路の阻害剤の存在下でのインキュベーションを含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項12] 前記転写調節因子が転写活性化因子である場合に、前記ON条件が、前記転写活性化因子と結合する誘導因子の存在下で、かつ前記毒性物質の存在下でのインキュベーションを含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項13] 前記転写調節因子が転写抑制因子である場合に、前記ON条件が、前記転写抑制因子と結合する誘導因子の非存在下で、かつ前記毒性物質の存在下でのインキュベーションを含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

- [請求項14] 前記転写調節因子が転写抑制因子である場合に、前記OFF条件が、前記転写抑制因子と結合する誘導因子の存在下で、かつデオキシチミジン三リン酸（dTTP）のデノボ合成経路の阻害剤の存在下でのインキュベーションを含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項15] 前記プロモータによって発現調節される遺伝子が、ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項16] 前記プロモータによって発現調節される遺伝子が、ヒトヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項17] 前記デオキシチミジン三リン酸（dTTP）のデノボ合成経路の阻害剤が、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン（5FdU）またはその誘導体である、請求項11～16のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項18] 前記毒性物質が抗生物質を含む、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項19] 前記生物が真核生物である、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項20] 前記生物がピキア酵母である、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項21] 前記生物が原核生物である、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項22] さらに、工程Dの後に、該生存する細胞を、マーカー遺伝子の発現量に応じてスクリーニングする工程を含む、請求項1～21のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項23] 請求項1～22のいずれか一項に記載の方法によって選抜された遺伝子スイッチを含む遺伝子スイッチライブラリー。
- [請求項24] 転写調節因子をコードする遺伝子配列の中から目的の転写調節因子

をスクリーニングするための組み合わせ物であって、
細胞と、
毒性前駆物質と、
毒性物質と、
発現されることにより前記毒性前駆物質を、前記細胞に対する毒性を付与または強化するよう変換させる毒性付与強化遺伝子と、
発現されることにより前記細胞に前記毒性物質に対する耐性を付与または強化する耐性付与強化遺伝子と、
マーカー遺伝子と
を含む組み合わせ物。

[請求項25] 前記耐性付与強化遺伝子は、前記毒性物質に結合することで前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、請求項24に記載の組み合わせ物。

[請求項26] 前記耐性付与強化遺伝子は、前記毒性物質に対して触媒活性を有さない、請求項24または25に記載の組み合わせ物。

[請求項27] 前記耐性付与強化遺伝子は、遺伝子産物の量に対して化学量論的に前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、請求項24～26のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

[請求項28] 前記耐性付与強化遺伝子は、前記毒性物質との結合性を弱める変異を含む、請求項24～27のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

[請求項29] 前記耐性付与強化遺伝子はブレオマイシン耐性タンパク質（Ble）をコードする遺伝子配列を含み、前記変異はD25A変異を含む、請求項24～28のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

[請求項30] 前記ブレオマイシン耐性タンパク質（Ble）がStreptoalloteichus hindustanus由来である、請求項29に記載の組み合わせ物。

[請求項31] さらに、デオキシチミジン三リン酸（dTTP）のデノボ合成経路の阻害剤を含む、請求項24～30のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

- [請求項32] さらに、前記転写調節因子と結合する誘導因子を含む、請求項24～31のいずれか一項に記載の組み合わせ物。
- [請求項33] 前記毒性付与強化遺伝子が、ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、請求項24～32のいずれか一項に記載の組み合わせ物。
- [請求項34] 前記毒性付与強化遺伝子が、ヒトヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、請求項24～33のいずれか一項に記載の組み合わせ物。
- [請求項35] 前記デオキシチミジン三リン酸（dTTP）のデノボ合成経路の阻害剤が、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン（5FdU）またはその誘導体である、請求項29～34のいずれか一項に記載の組み合わせ物。
- [請求項36] 前記毒性物質が抗生物質を含む、請求項24～35のいずれか一項に記載の組み合わせ物。
- [請求項37] 生物における転写調節因子を選抜する方法であって、
（A）候補転写調節因子をコードする遺伝子配列を含む発現ベクターを細胞に導入する工程と、
（B）毒性付与強化遺伝子と、耐性付与強化遺伝子と、マーカー遺伝子とを含む融合遺伝子を、該候補転写調節因子と結合するプロモータと作動可能に連結して前記細胞に導入する工程と、
（C）該毒性付与強化遺伝子の遺伝子産物によって毒性が付与または強化される毒性前駆物質の少なくとも1種の濃度の存在下に該細胞を配置し、生存する細胞を選択する工程と（D）該細胞に対して毒性を示す毒性物質であって、該耐性付与強化遺伝子の遺伝子産物によって耐性が付与または強化される毒性物質の少なくとも1種の濃度の存在下に該細胞を配置し、生存する細胞を選択する工程と
（E）（C）および（D）で生存した細胞を選択し、含まれる候補転写調節因子をコードする遺伝子配列を転写調節因子として選択する工

程と

を含む、方法。

- [請求項38] 前記耐性付与強化遺伝子は、前記毒性物質に結合することで前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、請求項37に記載の方法。
- [請求項39] 前記耐性付与強化遺伝子は、前記毒性物質に対して触媒活性を有さない、請求項37または38に記載の方法。
- [請求項40] 前記耐性付与強化遺伝子は、遺伝子産物の量に対して化学量論的に前記毒性物質の毒性を減弱させる遺伝子産物を産生する、請求項37～39のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項41] 前記耐性付与強化遺伝子は、前記毒性物質との結合性を弱める変異を含む、請求項37～40のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項42] 前記耐性付与遺伝子はブレオマイシン耐性タンパク質（Ble）をコードする遺伝子配列を含み、前記変異はD25A変異を含む、請求項37～41のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項43] 前記ブレオマイシン耐性タンパク質（Ble）がStreptoalloteichus hindustanus由来である、請求項42に記載の方法。
- [請求項44] 前記プロモータによって発現調節される遺伝子は、複数の遺伝子が融合された融合遺伝子である、請求項37～43のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項45] 前記転写調節因子が転写活性化因子である場合に、前記（C）における配置が、前記転写活性化因子と結合する誘導因子の非存在下で、かつデオキシチミジン三リン酸（dTTP）のデノボ合成経路の阻害剤の存在下でのインキュベーションを含む、請求項37～44のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項46] 前記転写調節因子が転写活性化因子である場合に、前記（D）における配置が、前記転写活性化因子と結合する誘導因子の存在下で、かつ前記毒性物質の存在下でのインキュベーションを含む、請求項37

～45のいずれか一項に記載の方法。

- [請求項47] 前記転写調節因子が転写抑制因子である場合に、前記（D）における配置が、前記転写抑制因子と結合する誘導因子の非存在下で、かつ前記毒性物質の存在下でのインキュベーションを含む、請求項37～44のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項48] 前記転写調節因子が転写抑制因子である場合に、前記（C）における配置が、前記転写抑制因子と結合する誘導因子の存在下で、かつデオキシチミジン三リン酸（dTTP）のデノボ合成経路の阻害剤の存在下でのインキュベーションを含む、請求項37～45のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項49] 前記毒性付与強化遺伝子が、ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、請求項37～48のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項50] 前記毒性付与強化遺伝子が、ヒトヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼをコードする遺伝子配列を含む、請求項37～49のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項51] 前記デオキシチミジン三リン酸（dTTP）のデノボ合成経路の阻害剤が、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン（5FdU）またはその誘導体である、請求項45～50のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項52] 前記毒性物質が抗生物質を含む、請求項37～51のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項53] 前記生物が真核生物である、請求項37～52のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項54] 前記生物がピキア酵母である、請求項37～53のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項55] 前記生物が原核生物である、請求項37～52のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項56] 請求項37～55のいずれか一項に記載の方法によって選抜された

転写調節因子を含む遺伝子スイッチライブラリー。

[請求項57] 所望の特性を有する生物または細胞を育種する方法であって、前記方法は

A) 請求項 1 ～ 2 2 または 3 7 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の転写調節因子を選抜する方法を用いて、所望の活性を有する転写調節因子を提供する工程と、

B) 前記転写調節因子を用いて、前記所望の特性を付与することに関与する 1 または複数の遺伝子を、所望の転写特性を持つように改変する工程と、

C) 工程 B で改変された所望の転写特性を有する遺伝子を、目的の細胞に導入する工程と、

D) 工程 C で得られた細胞の中から、所望の特性を有する細胞を選択する工程と

を包含する、方法。

[請求項58] 所望の特性を有する生物または細胞を育種する方法であって、前記方法は

A) 請求項 2 3 または 5 6 に記載の遺伝子スイッチライブラリーを提供する工程であって、前記ライブラリーは、所望の活性を有する転写調節因子を有するように構成される、工程と、

B) 前記転写調節因子を用いて、前記所望の特性を付与することに関与する 1 または複数の遺伝子を、所望の転写特性を持つように改変する工程と、

C) 工程 B で改変された所望の転写特性を有する遺伝子を、目的の細胞に導入する工程と、

D) 工程 C で得られた細胞の中から、所望の特性を有する細胞を選択する工程と

を包含する、方法。

[請求項59] 所望の物質を生産する生物または細胞を育種する方法であって、前

記方法は

A) 請求項 1 ～ 2 2 または 3 7 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の転写調節因子を選抜する方法を用いて、所望の活性を有する転写調節因子を提供する工程と、

B) 前記転写調節因子を用いて、前記物質の生合成に関与する 1 または複数の遺伝子を、所望の転写特性を持つように改変する工程と、

C) 工程 B で改変された所望の転写特性を有する遺伝子を、目的となる細胞に導入する工程と、

D) 工程 C で得られた細胞の中から、所望の特性を有する細胞を選択する工程と

を包含する、方法。

[請求項60] 請求項 1 ～ 2 2 または 3 7 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の転写調節因子を選抜する方法を行う工程を含む、所望のプロモーターを生産する方法であって、該遺伝子スイッチの選抜において、所望の活性を有するものを選抜することを包含する、方法。

[請求項61] 請求項 1 ～ 2 2 または 3 7 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の転写調節因子を選抜する方法を行う工程を含む、所望のプロモーターを生産する方法であって、該転写調節因子の選抜において、所望の細胞において活性を有するものを選抜することを包含する、方法。

[請求項62] 所望の特性を有する生物または細胞を選抜する方法であって、
A) 請求項 2 3 または 5 6 に記載の遺伝子スイッチライブラリーを提供する工程であって、前記ライブラリーは、目的の代謝化合物に応答する転写調節因子を有するように構成される、工程と、
B) 前記転写調節因子を用いて、前記目的の代謝化合物への応答性を付与することに関与する 1 または複数の遺伝子を、所望の転写特性を持つように改変する工程と、
C) 工程 B で改変された所望の転写特性を有する遺伝子を、目的の細胞に導入する工程と、

D) 工程Cで得られた細胞の中から、所望の特性を有する細胞を選択する工程と
を包含する、方法。

[請求項63] 前記細胞は、真核生物由来の細胞である、請求項57～62のいずれか一項に記載の方法。

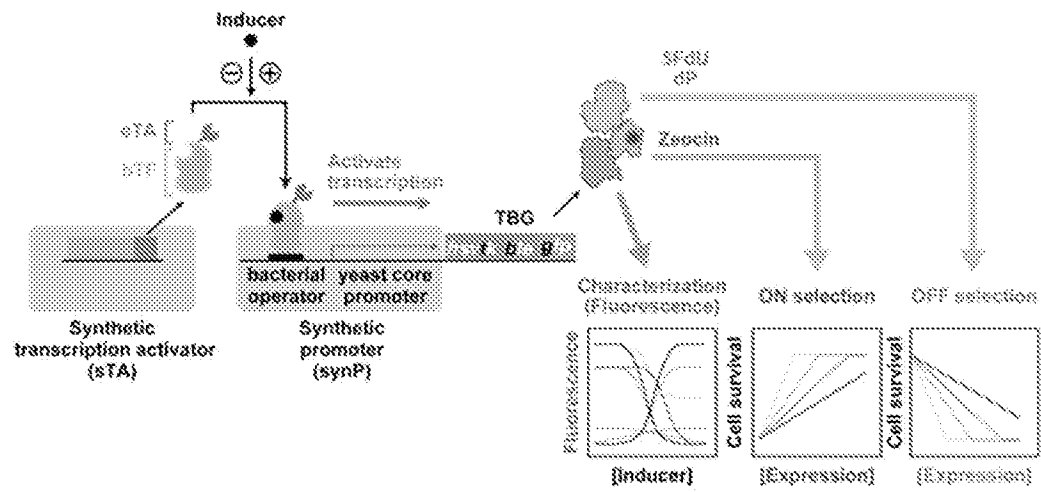
[請求項64] 前記細胞は、酵母を含む、請求項57～63のいずれか一項に記載の方法。

[請求項65] 前記細胞は、原核生物由来の細胞である、請求項57～62のいずれか一項に記載の方法。

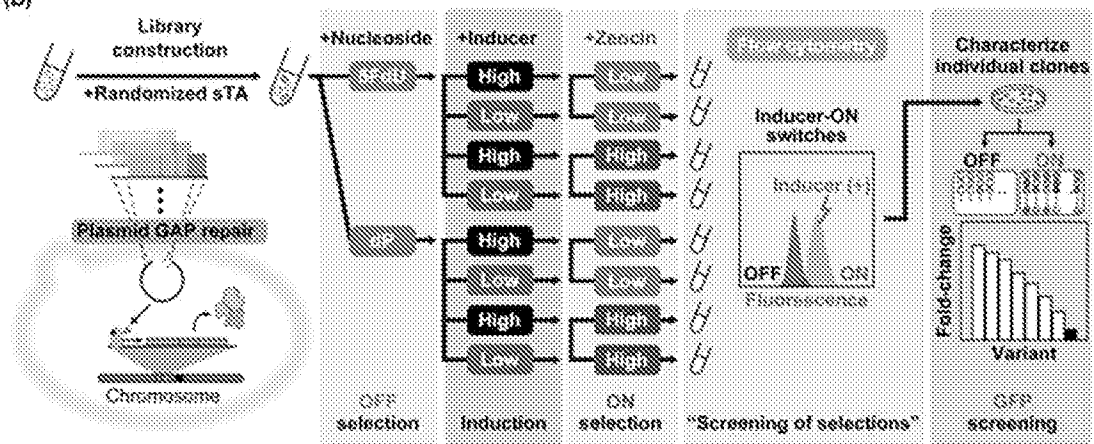
[請求項66] 前記細胞は、細菌を含み、必要に応じて前記細菌は放線菌、大腸菌、枯草菌、糸状菌、および微細藻類を含む、請求項57～62、及び65のいずれか一項に記載の方法。

[図1]

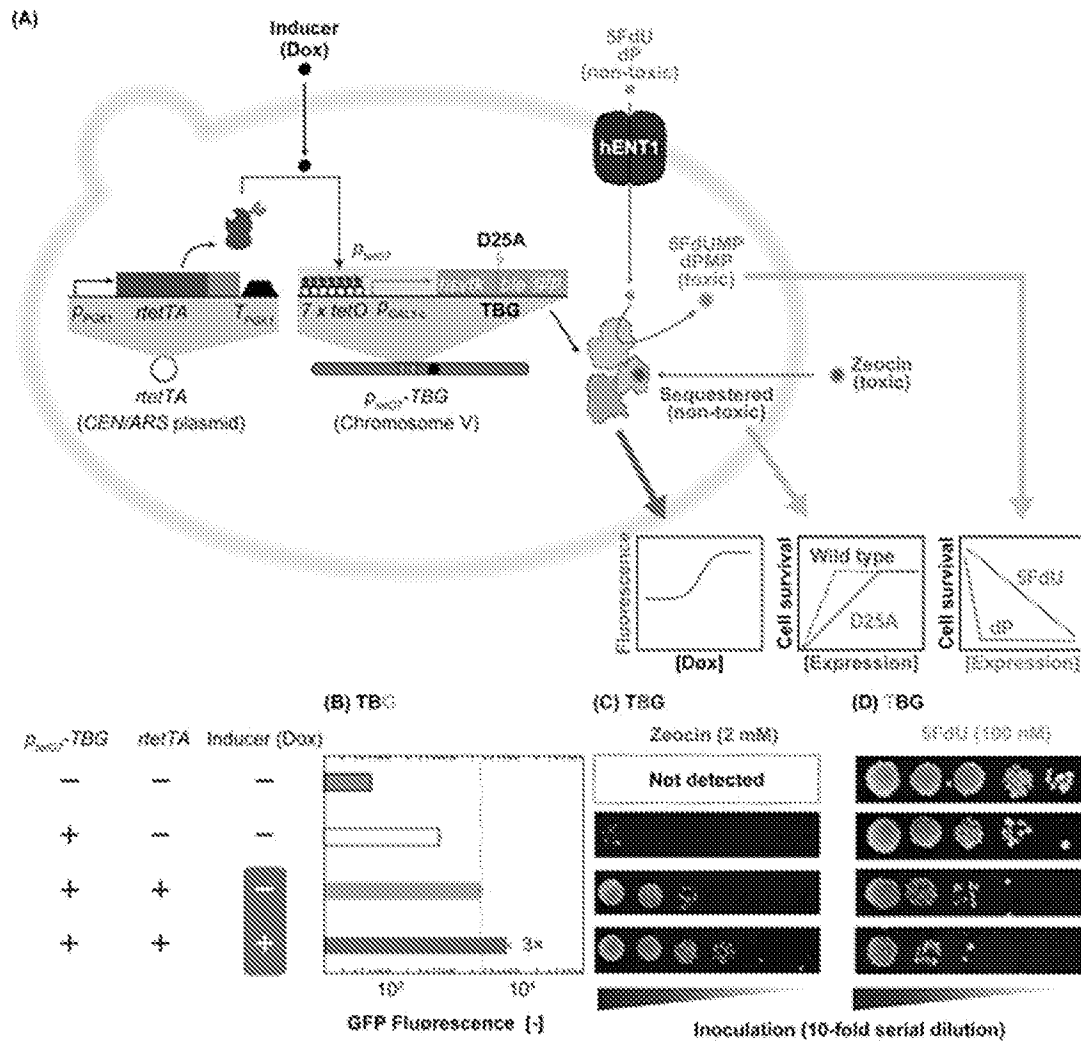
(A)



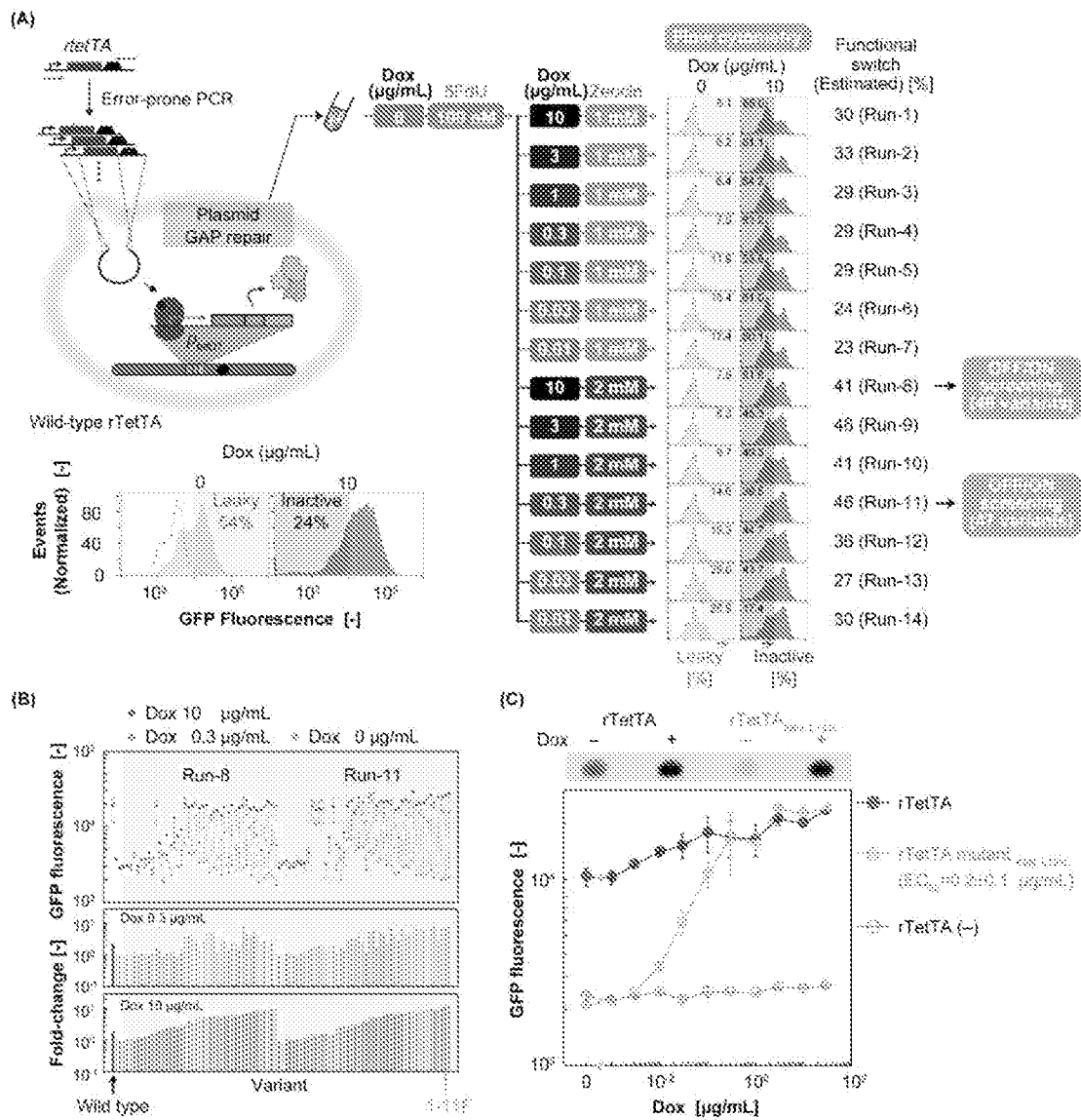
(B)



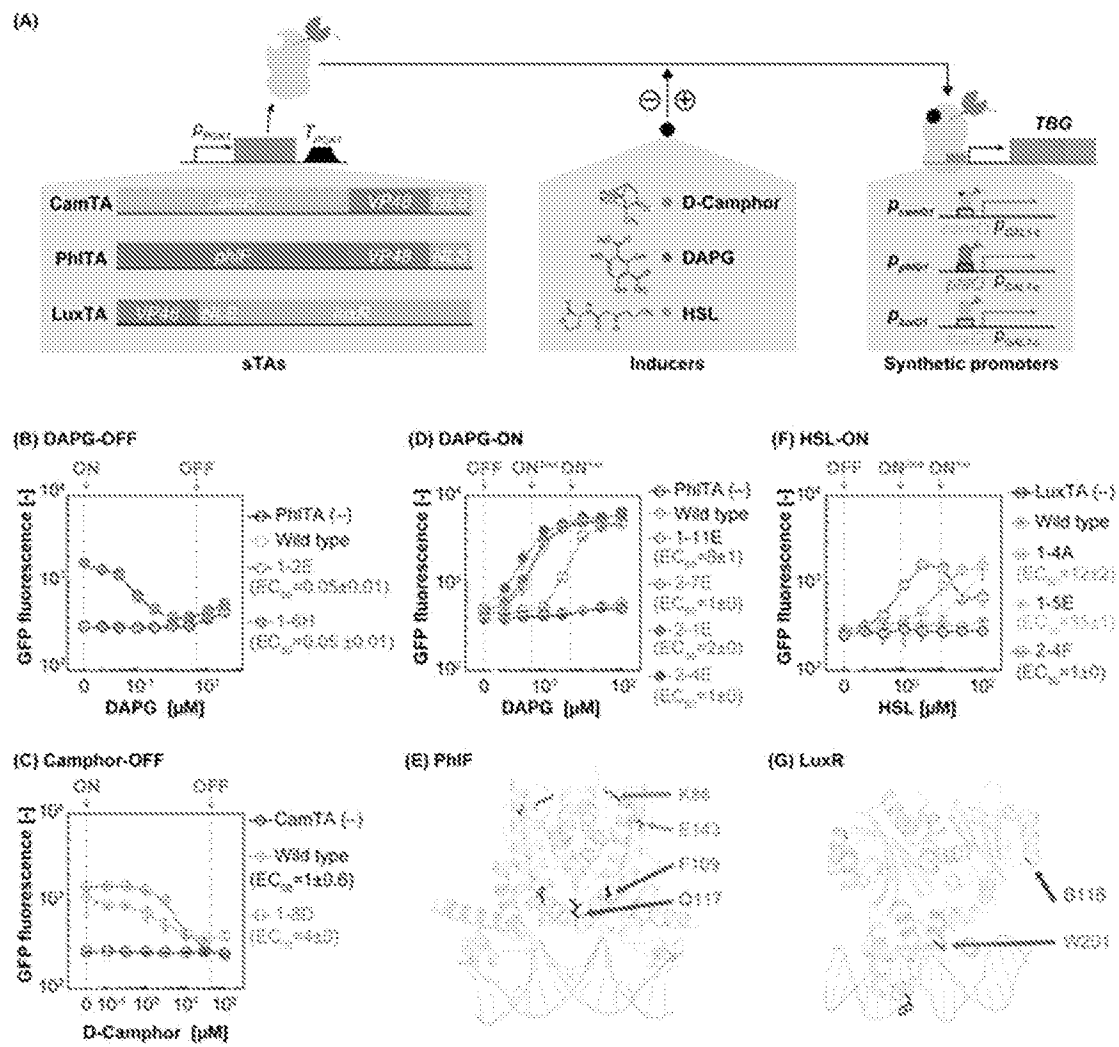
[図2]



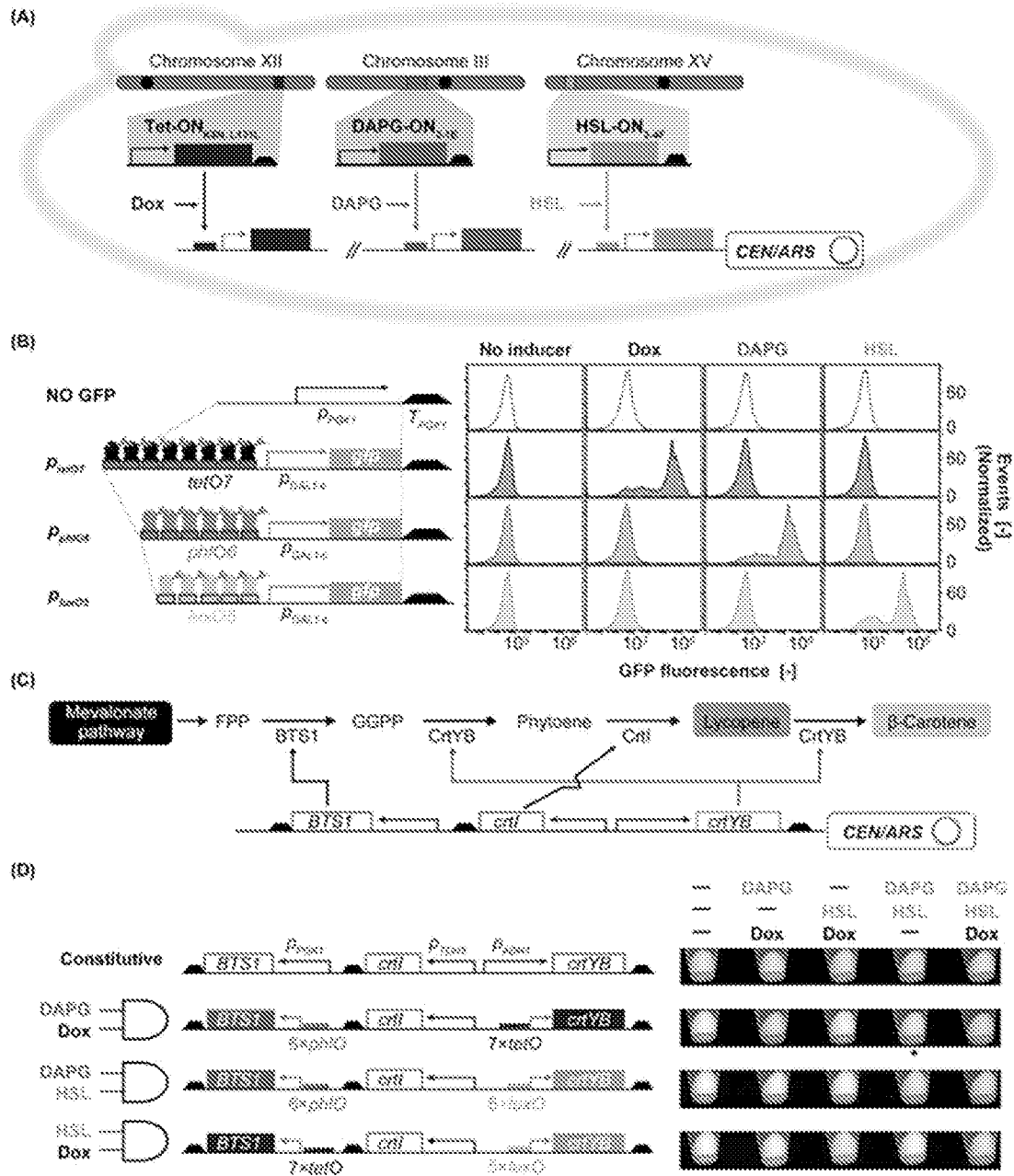
[図3]



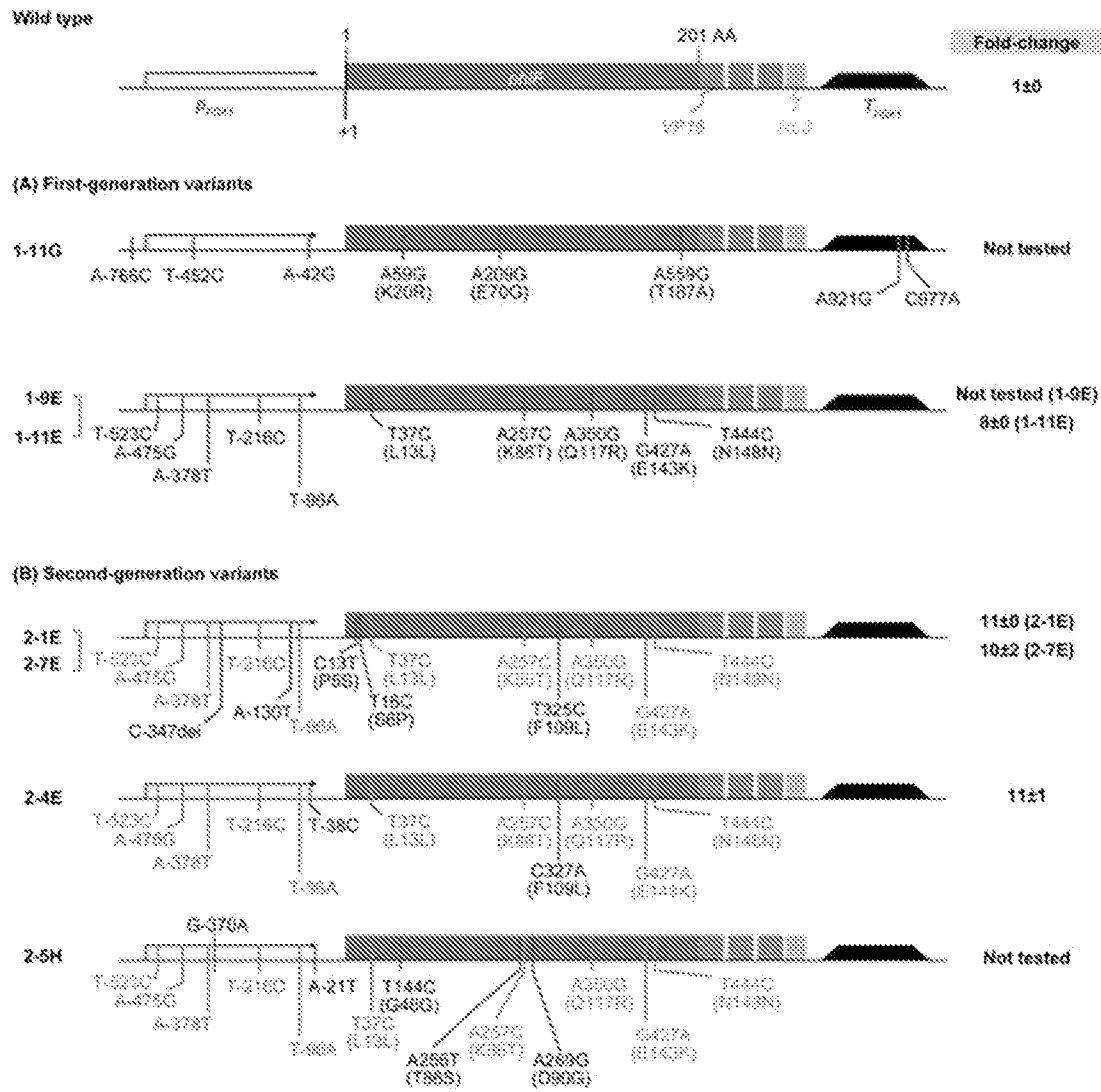
[図4]



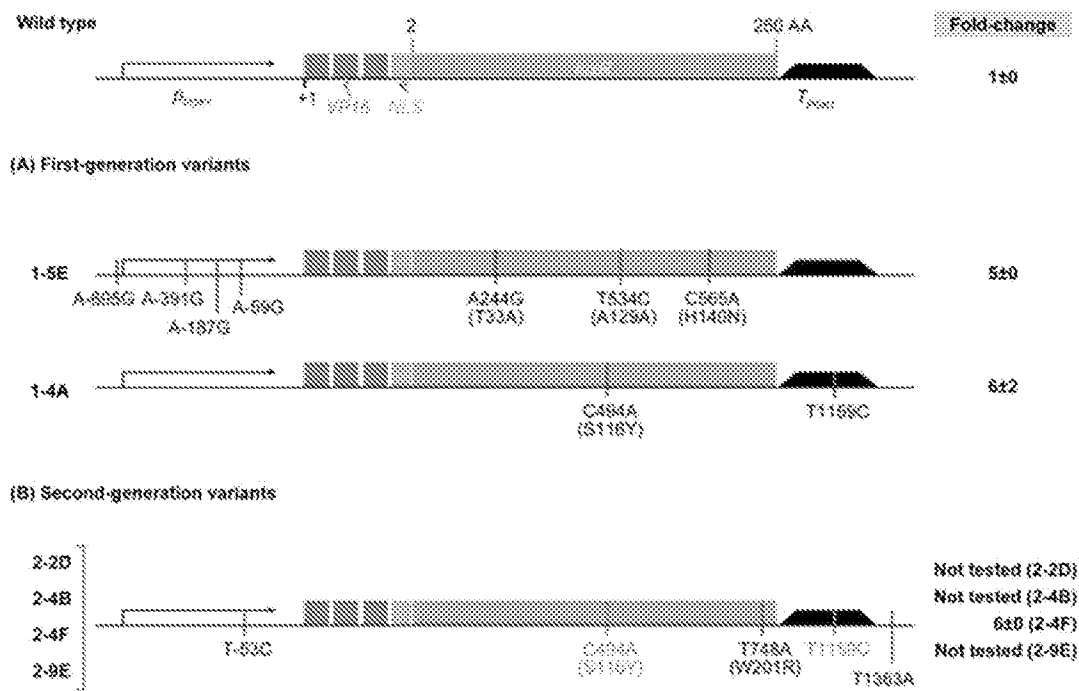
[図5]



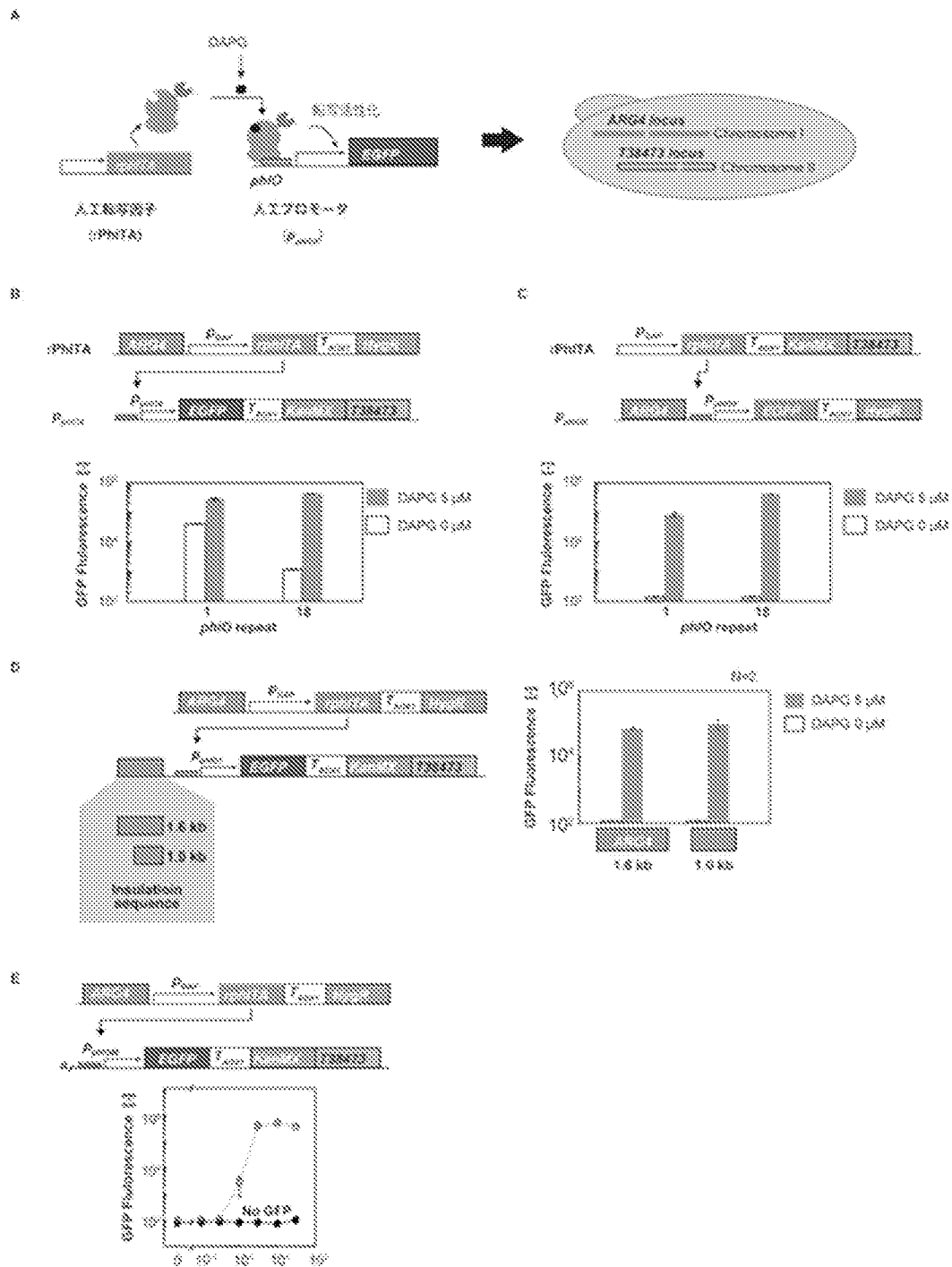
[図6]



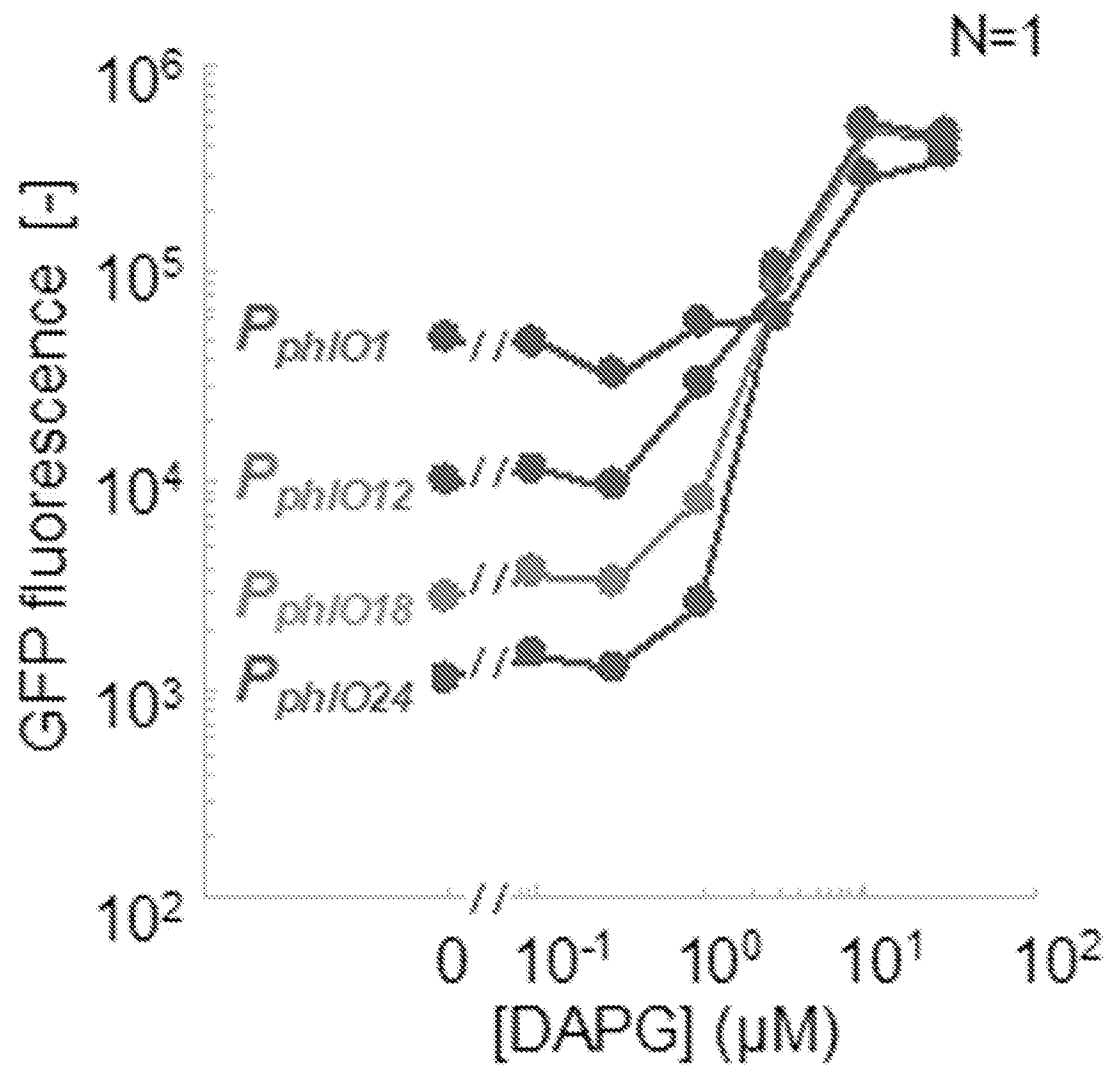
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/044574

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C12Q 1/68*(2018.01)i; *C12N 1/19*(2006.01)i; *C12N 15/09*(2006.01)i; *C40B 40/06*(2006.01)i

FI: C12Q1/68; C40B40/06; C12N15/09 Z; C12N1/19

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)

C12Q1/68; C12N1/19; C12N15/09; C40B40/06

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	能崎健太ほか、新規な3機能性融合マーカーを用いた酵母遺伝子スイッチの組織的開発、日本農芸化学会 関西支部 第511回講演会 講演要旨集、07 December 2019 p. 10, (NOSAKI, Kenta et al.), non-official translation (Systematic Development of yeast genetic switches using a novel trifunctional fusion marker. Lecture abstracts of 511th Lecture Meeting of JSBBA KANSAI.)	23-66
Y		1-22
Y	JP 2011-125333 A (CHIBA UNIV) 30 June 2011 (2011-06-30) paragraph [0140]	1-22
A	WO 2012/060407 A1 (CHIBA UNIV) 10 May 2012 (2012-05-10) entire text	1-66
A	TASHIRO, Y. et al. A nucleoside kinase as a dual selector for genetic switches and circuits. Nucleic Acids Res. 2011, vol. 39, no. 3, e12 entire text	1-66

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

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 February 2022

Date of mailing of the international search report

15 February 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/044574

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	TOMINAGA, M. et al. Robust and flexible platform for directed evolution of yeast genetic switches. Nat. Commun. 2021, vol. 12, no. 1846 entire text	1-66

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/044574

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2011-125333	A	30 June 2011	(Family: none)	
WO	2012/060407	A1	10 May 2012	US	2013/0267011 A1

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/68(2018.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C40B 40/06(2006.01)i FI: C12Q1/68; C40B40/06; C12N15/09 Z; C12N1/19										
B. 調査を行った分野										
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12Q1/68; C12N1/19; C12N15/09; C40B40/06										
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2022年									
日本国実用新案登録公報	1996-2022年									
日本国登録実用新案公報	1994-2022年									
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X	能崎健太ほか、新規な3機能性融合マーカーを用いた酵母遺伝子スイッチの組織的開発、日本農芸化学会 関西支部 第511回講演会 講演要旨集、2019.12.07 第10頁	23-66								
Y		1-22								
Y	JP 2011-125333 A (国立大学法人 千葉大学) 30.06.2011 (2011-06-30) [0140]	1-22								
A	WO 2012/060407 A1 (国立大学法人 千葉大学) 10.05.2012 (2012-05-10) 全文	1-66								
A	TASHIRO, Y., et al., A nucleoside kinase as a dual selector for genetic switches and circuits, Nucleic Acids Res., 2011, Vol. 39, No. 3, e12 全文	1-66								
P, X	TOMINAGA, M., et al., Robust and flexible platform for directed evolution of yeast genetic switches, Nat. Commun., 2021, Vol. 12, No. 1846 全文	1-66								
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。										
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日 04.02.2022		国際調査報告の発送日 15.02.2022								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 川合 理恵 4B 4046 電話番号 03-3581-1101 内線 3488								

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/044574

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2011-125333	A	30.06.2011	(ファミリーなし)	
WO	2012/060407	A1	10.05.2012	US	2013/0267011 A1