

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6151704号
(P6151704)

(45) 発行日 平成29年6月21日(2017.6.21)

(24) 登録日 平成29年6月2日(2017.6.2)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21 Z N A
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 7 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2014-537289 (P2014-537289)	(73) 特許権者	508314607
(86) (22) 出願日	平成24年10月19日(2012.10.19)		スカラブ ゲノミクス, エルエルシー
(65) 公表番号	特表2014-530625 (P2014-530625A)		アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537
(43) 公表日	平成26年11月20日(2014.11.20)		13, マディソン, アン ストリート
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/061027		1202
(87) 国際公開番号	W02013/059595	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成25年4月25日(2013.4.25)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成27年9月9日(2015.9.9)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	61/549,375		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成23年10月20日(2011.10.20)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74) 代理人	230113332
			弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝的安定性が向上したゲノム縮小化細菌

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも以下の遺伝子：b 0 2 4 5 - b 0 3 0 1、b 0 3 0 3 - b 0 3 1 0、b 1 3 3 6 - b 1 4 1 1、b 4 4 2 6 - b 4 4 2 7、b 2 4 4 1 - b 2 4 5 0、b 2 6 2 2 - b 2 6 5 4、b 2 6 5 7 - b 2 6 6 0、b 4 4 6 2、b 1 9 9 4 - b 2 0 0 8、b 4 4 3 5、b 3 3 2 2 - b 3 3 3 8、b 2 3 4 9 - b 2 3 6 3、b 1 5 3 9 - b 1 5 7 9、b 4 2 6 9 - b 4 3 2 0、b 2 9 6 8 - b 2 9 7 2、b 2 9 7 5 - b 2 9 7 7、b 2 9 7 9 - b 2 9 8 7、b 4 4 6 6 - 4 4 6 8、b 1 1 3 7 - b 1 1 7 2、b 0 5 3 7 - b 0 5 6 5、b 0 0 1 6 - b 0 0 2 2、b 4 4 1 2 - b 4 4 1 3、b 0 5 7 7 - b 0 5 8 2、b 4 4 1 5、b 2 3 8 9 - b 2 3 9 0、b 2 3 9 2 - b 2 3 9 5、b 0 3 5 8 - b 0 3 6 8、b 0 3 7 0 - b 0 3 8 0、b 2 8 5 6 - b 2 8 6 3、b 3 0 4 2 - b 3 0 4 8、b 0 6 5 6、b 1 3 2 5 - b 1 3 3 3、b 2 0 3 0 - b 2 0 6 2、b 2 1 9 0 - b 2 1 9 2、b 3 2 1 5 - b 3 2 1 9、b 3 5 0 4 - b 3 5 0 5、b 1 0 7 0 - b 1 0 8 3、b 1 8 7 8 - b 1 8 9 4、b 1 9 1 7 - b 1 9 5 0、b 4 3 2 4 - b 4 3 4 2、b 4 3 4 5 - b 4 3 5 8、b 4 4 8 6、b 0 4 9 7 - b 0 5 0 2、b 0 7 0 0 - b 0 7 0 6、b 1 4 5 6 - b 1 4 6 2、b 3 4 8 1 - b 3 4 8 4、b 3 5 9 2 - b 3 5 9 6、b 0 9 8 1 - b 0 9 8 8、b 1 0 2 1 - b 1 0 2 9、b 2 0 8 0 - b 2 0 9 6、b 4 4 3 8、b 3 4 4 0 - b 3 4 4 5、b 4 4 5 1、b 3 5 5 6 - b 3 5 5 8、b 4 4 5 5、b 1 7 8 6、b 0 1 5 0 - b 0 1 5 3 および b 2 9 4 5 を欠失するように遺伝子操作されたゲノムを有する、ゲノム縮小化大腸菌 K 1 2 株 M G 1 6 5 5 細菌であって、挿入配列を全て欠き、機能する p o l B 遺伝子

10

20

を欠き、機能する *d i n B* 遺伝子を欠く、ゲノム縮小化大腸菌 *K 1 2 株 M G 1 6 5 5* 細菌。

【請求項 2】

機能する *u m u D C* 遺伝子をさらに欠く、請求項 1 に記載の細菌。

【請求項 3】

前記細菌が、前記 *p o l B* 遺伝子および前記 *d i n B* 遺伝子を機能しないようにさせることにより、*M D S 4 2* から作製される、請求項 1 に記載の細菌。

【請求項 4】

前記細菌が、前記 *p o l B* 遺伝子、前記 *d i n B* 遺伝子および前記 *u m u D C* 遺伝子を機能しないようにさせることにより、*M D S 4 2* から作製される、請求項 2 に記載の細菌。

10

【請求項 5】

異種核酸を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の細菌。

【請求項 6】

前記異種核酸が、発現制御配列に作動的に連結されたポリペプチドをコードする核酸を含む、請求項 5 に記載の細菌。

【請求項 7】

ポリペプチドを製造するための方法であって、ポリペプチドの発現に好適な条件下で請求項 6 に記載の細菌をインキュベートすることと、該ポリペプチドを回収することを含む、方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) の下で、2011 年 10 月 20 日に出願された米国仮出願第 61 / 549 , 375 号の利益を主張するものであり、その全内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

本発明は、突然変異率が極めて低いゲノム縮小化細菌および該ゲノム縮小化細菌の使用方法に関する。該ゲノム縮小化細菌は、核酸の忠実度の高い維持および細菌宿主でのクローニングが困難であることが判明している遺伝子の安定な発現に特に有用である。

30

【背景技術】

【0003】

自然界に存在する動的に変化する環境条件での細菌集団の生存には多様性を生み出す内在機構が重要である。しかしながら、実験室の制御された環境では、これらの機構は不要な遺伝子型および表現型の変化を引き起こすことがあり、確立された生産株またはクローンライブラリーの自発的遺伝子改変は一般的に極めて望ましくない。

【0004】

大腸菌 (*E s c h e r i c h i a c o l i*、*E . c o l i*) は、汎用的なクローニング宿主であり、研究と産業の両方においてタンパク質、代謝産物および二次代謝産物の生産に使用される最も一般的な生物である。これらの背景において大腸菌宿主の性能を向上させるためにいくつかの改変がなされてきたが、それらは全て、不要な副産物の低減とともに所与の生体材料を増産するための代謝経路合理化の基本原則に従うものであった。これらの方針に沿って、様々な非必須遺伝子が大腸菌バックグラウンドから除去され、増殖の著しい低下がほとんどないかまたは全くない実現性のあるゲノム縮小化大腸菌株が作製されてきた。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

これらのゲノム縮小化細菌は多くの点で有益であることが判明しているが、一部の遺伝子は、それらの機能する形態で、ゲノム縮小化細菌の場合であっても細菌ベクター内での

50

クローニングは依然として困難であるかまたは不可能である。従って、遺伝子がクローニング可能な、突然変異率が極めて低い安定な細菌宿主が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、3つの 変異しやすいDNAポリメラーゼ、Pol II、Pol IVおよびPol Vの少なくとも1つをコードする遺伝子が機能しないゲノム縮小化細菌を提供する。好ましい実施形態では、Pol IIおよびPol IVをコードする遺伝子は機能せず、Pol Vをコードする遺伝子は機能するかあるいは機能しない。特に好ましい実施形態では、これらの遺伝子のうちで該ゲノム縮小化細菌において機能するものが存在しない。これらの遺伝子は、該細菌のゲノムからの遺伝子の部分的または完全な欠失によって機能しないようにさせても、あるいはこれらの遺伝子の破壊によっても機能しないようにさせてもよい。

10

【0007】

一実施形態では、ゲノム縮小化細菌のゲノムは、その天然親株のゲノムよりも約5%～約30%縮小するように遺伝子操作されたゲノムを有し、全ての挿入配列を欠いている。ゲノム縮小化細菌は、細菌の天然親株から選択された遺伝子を欠失させることにより作製することも、または、例えば、事前に選択された遺伝子の集合体として完全合成することでもできる。本明細書における考察から容易に分かるように、ゲノム縮小化細菌は、比較対象の天然親株で見出される遺伝子の全要素よりも少なく、天然親株と特定の必須遺伝子を共有している。

20

【0008】

また、前記ゲノム縮小化細菌を用いたポリペプチド生産方法も提供する。一実施形態では、該ポリペプチドは、Pol II、Pol IVおよびPol Vをコードする遺伝子からなる群から選択される1以上の機能しない遺伝子を有し、さらに、発現制御配列と機能し得る形で連結された、ポリペプチドをコードする核酸を含むゲノム縮小化細菌を、該ポリペプチド (polypeptide) の発現に好適な条件下で培養することにより生産される。関連の実施形態では、該核酸は、機能する遺伝子Pol II、Pol IVおよびPol Vを有する細菌内でのクローニングが困難であるかまたは不可能である「毒性」ポリペプチドをコードする。

30

【0009】

本発明のこれらおよび他の実施形態を本明細書の以下にさらに詳細に記載する。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

天然親株のゲノムよりも約5%～約30%縮小するように遺伝子操作されたゲノムを有するゲノム縮小化大腸菌であって、全ての挿入配列を欠き、polB、dinBおよびumuDCからなる群から選択される少なくとも1つの機能しない遺伝子を含む、ゲノム縮小化大腸菌細菌。

(項目2)

少なくとも、大腸菌K-12株MG1655のb0245-b0301、b0303-b0310、b1336-b1411、b4426-b4427、b2441-b2450、b2622-b2654、b2657-b2660、b4462、b1994-b2008、b4435、b3322-b3338、b2349-b2363、b1539-b1579、b4269-b4320、b2968-b2972、b2975-b2977、b2979-b2987、b4466-b4468、b1137-b1172、b0537-b0565、b0016-b0022、b4412-b4413、b0577-b0582、b4415、b2389-b2390、b2392-b2395、b0358-b0368、b0370-b0380、b2856-b2863、b3042-b3048、b0656、b1325-b1333、b2030-b2062、b2190-b2192、b3215-b3219、b3504-b3505、b1070-b1083、b1878-b1894、b1917-b1950、b4324-b4342、b43

40

50

4 5 - b 4 3 5 8、b 4 4 8 6、b 0 4 9 7 - b 0 5 0 2、b 0 7 0 0 - b 0 7 0 6、b 1 4 5 6 - b 1 4 6 2、b 3 4 8 1 - b 3 4 8 4、b 3 5 9 2 - b 3 5 9 6、b 0 9 8 1 - b 0 9 8 8、b 1 0 2 1 - b 1 0 2 9、b 2 0 8 0 - b 2 0 9 6、b 4 4 3 8、b 3 4 4 0 - b 3 4 4 5、b 4 4 5 1、b 3 5 5 6 - b 3 5 5 8、b 4 4 5 5、b 1 7 8 6、b 0 1 5 0 - b 0 1 5 3 および b 2 9 4 5 の DNA セグメントが欠失している、項目 1 に記載の細菌。

(項目 3)

前記細菌の天然親株が B 株である、項目 2 に記載の細菌。

(項目 4)

前記細菌の天然親株が株 B L 2 1 (D E 3) である、項目 3 に記載の細菌。

10

(項目 5)

前記細菌の天然親株が K 1 2 株である、項目 2 に記載の細菌。

(項目 6)

前記細菌の天然親株が K 1 2 株 M G 1 6 5 5 である、項目 5 に記載の細菌。

(項目 7)

前記細菌が M D S 4 2 である、項目 6 に記載の細菌。

(項目 8)

前記細菌が M D S 6 6 である、項目 6 に記載の細菌。

(項目 9)

p o l B、d i n B および u m u D C からなる群から選択される少なくとも 2 つの機能しない遺伝子を有する、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の細菌。

20

(項目 10)

機能しない遺伝子 p o l B および d i n B を有する、項目 9 に記載の細菌。

(項目 11)

機能する遺伝子 u m u D C を有する、項目 10 に記載の細菌。

(項目 12)

機能しない遺伝子 u m u D C を有する、項目 10 に記載の細菌。

(項目 13)

異種核酸を含む、項目 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の細菌。

(項目 14)

前記異種核酸が、発現制御配列に作動的に連結されたポリペプチドをコードする核酸を含む、項目 12 に記載の細菌。

30

(項目 15)

ポリペプチドを製造するための方法であって、ポリペプチドの発現に好適な条件下で項目 14 に記載の細菌をインキュベートすることと、該ポリペプチドを回収することを含む、方法。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図 1】機能しない(この場合は欠失)遺伝子 d i n B、p o l B および u m u D C を、単独および考えられる全ての組合せで含むゲノム縮小化細菌(M D S 4 2)の自然突然変異率を、対照である M D S 4 2 および M G 1 6 5 5 と比較して示す。突然変異率は、c y c A で起こる突然変異についての揺動解析により決定した。野生型 M G 1 6 5 5 から M D S 4 2 の間での突然変異率の減少は挿入事象が起こらないことによるが、M D S 4 2 から種々の変異しやすいポリメラーゼ変異体へのさらなる減少は点突然変異率の低下による。値は 4 つの独立した測定値の平均である。

40

【図 2】様々な株の突然変異率に及ぼす種々のストレスの影響を示す。緑色蛍光タンパク質(G F P)の過剰生産、p S G - O R F 2 3 8 からの毒性ペプチドの過剰生産、およびマイトマイシン C 処理によって受けるストレスの影響を示している。測定は全て、c y c A 揺動アッセイを用いて行い、値はそれぞれ 3 つの独立した測定値の平均である。B L 2 1 (D E 3) および M D S 4 2 r e c A は 0 . 1 μ g / m l マイトマイシン C の存在下で

50

増殖することができなかった。

【図3】様々な株の突然変異スペクトルの比較を示す。棒グラフは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）解析によって検出されたcycA突然変異型の分布を示す。MG1655、MDS42およびMDS42 polB dinB umuDCにおける欠失の割合は低すぎではっきりしないが、BL21（DE3）では欠失は全く検出されなかった。

【図4】リファンピシン耐性アッセイによって測定したMDS42およびMDS42 polB dinB umuDCの突然変異率を示す。値はそれぞれ3つの独立した測定値の平均である。

【図5】MDS42-T7（mcrBC⁻）宿主の増殖に対するSinI酵素の過剰生産の毒性作用を示す。SinIはIPTG誘導性pSin32プラスミドから過剰生産された。両測定値は、Bioscreen C自動機器を使用して5分毎に測定された、それぞれ25の独立したコロニーのOD₅₄₀値の平均である。

10

【図6】突然変異率に及ぼすSinIメチルトランスフェラーゼ過剰生産の影響を示す図である。SinIメチルトランスフェラーゼ酵素はpSin32プラスミドから過剰生産された。突然変異率はcycA揺動アッセイを用いて測定した。値はそれぞれ3つの独立した測定値の平均である。

【図7】様々な宿主における突然変異sinIを有するプラスミドの蓄積を示す。SinIメチルトランスフェラーゼはpSin32から発現された。プラスミドは様々な間隔で単離し、該酵素の機能喪失を引き起こす突然変異についてスクリーニングした（宿主McrBC⁺およびMcrBC⁻での形質転換による）。値はそれぞれ3つの独立した測定値の平均である。

20

【図8】SinIを発現する様々な株の培養物がOD = 0.7まで増殖するために必要な時間を示す。OD = 0.2（0分）時点においてIPTGで誘導した、pSin32を保有する株の増殖曲線を求めた。あるサンプルが過剰生産されたSinIメチルトランスフェラーゼの毒性作用を克服したことを示したことを示すカットオフとしてOD = 0.7を選択した。示した値は各株の50の独立したサンプルについての測定値の平均である。

【図9】MG1655を形質転換することができるpSin32プラスミドにおいて保有されているsinIにおける突然変異を示す。McrBC⁺宿主から単離した8つのpSin32プラスミドサンプルを配列決定した。それらのうちの7サンプルは、sinIにおいて新たな停止コドン（182位、183位、194位、195位、196位、208位および862位）を生み出すフレームシフト突然変異を有していた。これらの突然変異の1つは、Asn-Thr変化（880位）につながるA-C変異であった。各突然変異のヌクレオチド位置はsinIの最初のヌクレオチドに対して示している。

30

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は様々な形態で実施することが可能であるが、本開示は本発明の例示と考えられるべきであり、本発明を例示される特定の実施形態に限定するものではないという理解で、一部の実施形態を以下に説明する。見出しは単に便宜上示すものであり、本発明を何ら限定するものと解釈されるべきでない。見出しの下に例示される実施形態は、他の見出しの下に例示される実施形態と組み合わせることができる。

40

【0012】

本出願において明記される様々な範囲の数値の使用は、特に明示しない限り、記載される範囲内の最小値および最大値の両方の前に「約」という単語を付けて近似値として記載されている。このように、記載された範囲からのわずかな上下変動は、その範囲内の値と実質的に同じ結果を達成するために使用することができる。本明細書において使用する場合、「約」および「およそ」という用語は、数値について使用する場合、対象とする関連技術における当業者にとってそれらの平易かつ通常の意味を有するものとする。また、範囲の開示は、列挙された最小値と最大値の間のあらゆる値ならびにそのような値によって形成され得る任意の範囲を含む連続範囲として意図される。これは、形成され得る、有限の上限および/または下限を含むまたは含まない範囲を含む。また、これは、ある開示数

50

字で別の開示数字を割ることにより導き出すことができる割合も含む。従って、当業者ならば、多くのそのような割合、範囲、および割合の範囲は、本明細書において提示したデータと数字から明確に導き出すことができ、全てが本発明の様々な実施形態を表すことができるであろう。

【0013】

本明細書における「ゲノム縮小化細菌」という用語は、当該ゲノム（例えば、タンパク質コード遺伝子）の約1%～約75%が欠失している、例えば、ゲノムの約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%または約60%が欠失している細菌を意味する。一実施形態では、本発明の実施において使用されるゲノム縮小化細菌は、好ましくは、天然親株のゲノムよりも少なくとも2パーセント（2%）～最大20パーセント（20%）（その間の任意の数を含む）縮小するように遺伝子操作されたゲノムを有する。好ましくは、該ゲノムは天然親株のゲノムよりも少なくとも5パーセント（5%）～最大30パーセント（30%）小さい。より好ましくは、該ゲノムは天然親株のゲノムよりも8パーセント（8%）～14パーセント（14%）～20パーセント（20%）（その間の任意の数を含む）またはそれ以上小さい。あるいは、該ゲノムは天然親株のゲノムよりも20%未満、30%未満、40%未満または50%未満縮小するように操作してもよい。「天然親株」という用語は、科学界で一般的に理解されている自然または天然の環境で見出される細菌株であって、より小さいゲノムを有する細菌株を作製するためにそのゲノムにおいて一連の欠失を作り出すことができる細菌株を意味する。また、天然親株とは、操作された株が比較される株を指し、その操作株は天然親株の全要素よりも少ない。一連の欠失後にゲノムが縮小化されたパーセンテージは、「全ての欠失後に欠失した塩基対の総数」を「全ての欠失前のゲノム中の塩基対の総数」で割った後、100を掛けることによって算出される。同様に、ゲノムが天然親株よりも縮小化されるパーセンテージは、ゲノムがより小さい株のヌクレオチド総数（それが作出されたプロセスとは無関係）を天然親株のヌクレオチド総数で割った後、100を掛けることによって算出される。

【0014】

一実施形態では、「ゲノム縮小化細菌」という用語は、上記ゲノム量の除去が最少培地での該生物の増殖能力に許容できない影響を及ぼさない細菌を指す。本文脈において、2以上の遺伝子の除去が最少培地での該生物の増殖能力に「許容できない影響を及ぼす」かどうかは、具体的な用途に依存する。例えば、増殖速度の30%減はある適用には許容されるが別の適用には許容されないという場合がある。さらに、ゲノムからのDNA配列を欠失させる悪影響は、培養条件を変更するなどの手段によっても軽減させることができる。このような手段は、それ以外の点では許容できない悪影響も許容されるものへと変えることができる。一実施形態では、増殖速度は親株とほぼ同じである。しかしながら、親株よりも約5%、10%、15%、20%、30%、40%から約50%までの範囲で低い増殖速度も本発明の範囲内である。より詳細には、本発明の細菌の倍加時間は約5分から約3時間までの範囲であり得る。好適なゲノム縮小化細菌の非限定的な例、ならびに大腸菌などの細菌からDNAを欠失させる方法は、米国特許第6,989,265号および同第7,303,906号、米国特許出願公開第20060270043号、同第2006/0199257号および同第2007/0054358号ならびに国際公開第2003/070880号に開示されており、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる。

【0015】

一部の実施形態では、DNAポリメラーゼII、DNAポリメラーゼIVおよびDNAポリメラーゼVをコードする遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの機能しない遺伝子を有するゲノム縮小化細菌が提供される。これらの遺伝子のうち1以上が機能しないゲノム縮小化細菌は、同じ遺伝的背景を有するがこれらの遺伝子が機能する細菌と比べて、遺伝的安定性の実質的な向上を示す。一態様では、遺伝子は、欠失によって、例えば、米国特許第6,989,265号の第8段45行～第14段41行に記載されている「傷跡のない（scarless）」欠失法によって機能しないとされる。これらの方法

は、欠失プロセスによるDNA挿入が起こらず、標的遺伝子の正確な欠失（すなわち、「傷跡のない」欠失）を引き起こすため、好ましい欠失方法である。しかしながら、当技術分野で公知の、標的遺伝子を完全にまたは部分的に欠失させる任意の方法を用いて、DNAポリメラーゼII、DNAポリメラーゼIVおよびDNAポリメラーゼVをコードする遺伝子の1以上を機能させないようにすることも理解すべきである。あるいは、DNAポリメラーゼII、DNAポリメラーゼIVおよびDNAポリメラーゼVをコードする遺伝子の1以上を、当技術分野で公知の任意の技術を用いることにより該遺伝子を破壊することによって機能させないようにしてもよい。例えば、標的遺伝子は、相同組換えにより該遺伝子を機能しない対立遺伝子と置き換えることによって破壊し得る。破壊と欠失を併用して、該細菌においてDNAポリメラーゼII、DNAポリメラーゼIVおよびDNAポリメラーゼVをコードする機能しない遺伝子の任意の組合せを作り出してもよい。

10

【0016】

一実施形態では、DNAポリメラーゼII、DNAポリメラーゼIVおよびDNAポリメラーゼVをコードする遺伝子のいずれか1つは機能せず、残り2つの遺伝子は機能してもよい。他の実施形態では、ゲノム縮小化細菌において、DNAポリメラーゼII、DNAポリメラーゼIVおよびDNAポリメラーゼVをコードする遺伝子のうちの2つの遺伝子の任意の組合せは機能せず、残りの遺伝子は機能してもよい。例えば、DNAポリメラーゼIIおよびDNAポリメラーゼIVをコードする遺伝子は機能せず、DNAポリメラーゼVをコードする遺伝子は機能してもよい。あるいは、DNAポリメラーゼIIおよびDNAポリメラーゼVをコードする遺伝子は機能せず、DNAポリメラーゼIVをコードする遺伝子は機能してもよい。あるいは、DNAポリメラーゼIVおよびDNAポリメラーゼVをコードする遺伝子は機能せず、DNAポリメラーゼIIをコードする遺伝子は機能してもよい。好ましい実施形態では、ゲノム縮小化細菌において、DNAポリメラーゼIIおよびDNAポリメラーゼIVをコードする遺伝子は機能せず、DNAポリメラーゼVをコードする遺伝子は機能するかあるいは機能しない。特に好ましい実施形態では、ゲノム縮小化細菌において、DNAポリメラーゼII、DNAポリメラーゼIVおよびDNAポリメラーゼVをコードする遺伝子が全て機能しない。

20

【0017】

別の好ましい実施形態では、DNAポリメラーゼII、DNAポリメラーゼIVおよびDNAポリメラーゼVをコードする遺伝子からなる群から選択される1以上の機能しない遺伝子を有するゲノム縮小化細菌は、天然親株のゲノムよりも少なくとも5パーセント（5%）～最大30パーセント（30%）（その間の任意の数を含む）縮小するように遺伝子操作されたゲノムを有する。別の好ましい実施形態では、ゲノム縮小化細菌は、4.41Mb～3.71Mbの間、4.41Mb～3.25Mbの間または4.41Mb～2.78Mbの間のゲノムを有する。

30

【0018】

本発明のゲノム縮小化細菌の親株はいずれの細菌株であってもよい。好ましい実施形態では、本発明のゲノム縮小化細菌の親株は大腸菌株、例えば、大腸菌株K-12またはBである。大腸菌K12株には、MG1655、W3110、DH1、DH10B、DH5、Inv、Top10、Top10F、JM103、JM105、JM109、MC1061、MC4100、XL1-Blue、EC100、BW2952またはEC300などの誘導株が含まれる。大腸菌B株には、REL606、BL/RおよびBL21(DE3)が含まれる。

40

【0019】

親株のゲノムのヌクレオチド配列は部分的または完全に既知であり得る。いくつかの大腸菌および他の一般的に使用される研究用微生物の全ゲノム配列は既知である（例えば、Blattnerらの、Science, 277: 1453-74 (1997); GenBank 受託番号U00096; NCBIデータベース受託番号AP009048、Pernaらの、Nature, 409, 529-533 (2001); Hayashiらの、DNA Res., 8, 11-22 (2001); Welch

50

らの、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 99:17020-17024 (2002)、GenBank受託番号AE014075、EMBL受託番号CP000948、EMBL受託番号CP001637、EMBL受託番号CP001396、EMBL受託番号CP000819およびEMBL受託番号CP001509（これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる）を参照）。

【0020】

好ましい実施形態では、本発明のゲノム縮小化細菌の親株は、ゲノムが4,639,674塩基対を有する大腸菌株K12 MG1655（注釈付きのm56）、（NCBI受託番号U000961）である。別の好ましい実施形態では、該ゲノム縮小化細菌の親株は、ゲノムが4,557,508塩基対を有する大腸菌株BL21（DE3）（EMBL受託番号CP001509）である。大腸菌K12 MG1655ゲノムにおけるDNAポリメラーゼIIをコードする遺伝子（polB）、DNAポリメラーゼIVをコードする遺伝子（dinB）およびDNAポリメラーゼVをコードする遺伝子（umuDC）の座標を表1に示す。

10

【0021】

表1

【表1】

遺伝子	座標
polB (b0060)	63429-65780
dinB (b0231)	250898-251953
umuDC (b1183-b1184)	1229990-1231677

20

【0022】

特に好ましい実施形態では、ゲノム縮小化大腸菌細菌は、天然親株のゲノムよりも5パーセント（5%）～30パーセント（30%）縮小しているゲノムを有し、全ての挿入配列（IS）要素を欠いており、DNAポリメラーゼII、DNAポリメラーゼIVおよびDNAポリメラーゼVをコードする遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの機能しない遺伝子を有するものが提供される。大腸菌MG1655（注釈付きの54）のゲノムマップ上のIS要素の位置は、米国特許出願公開第2003/138937号の図1および表2に示されており、これらの記載内容は参照により本明細書に組み入れられる。一般的に大腸菌において存在する、除去し得る挿入配列要素としては、限定されるものではないが、IS1、IS2、IS3、IS4、IS5、IS30、IS150、IS186、IS600、IS911およびIS10が挙げられる。特に好ましい実施形態では、ゲノム縮小化大腸菌は、全ての挿入配列を欠いており、機能しない遺伝子polBおよびdinBを有し、さらに好ましくは、機能しない遺伝子polB、dinBおよびumuDCを有するものが提供される。

30

【0023】

関連実施形態では、ゲノム縮小化細菌は、少なくとも次の遺伝子（Blattnerらの、Science, 277:1453-74およびGenBank受託番号400096に記載されている名称に基づいて「b」番号で識別される）：b0245-b0301、b0303-b0310、b1336-b1411、b4426-b4427、b2441-b2450、b2622-b2654、b2657-b2660、b4462、b1994-b2008、b4435、b3322-b3338、b2349-b2363、b1539-b1579、b4269-b4320、b2968-b2972、b2975-b2977、b2979-b2987、b4466-b4468、b1137-b1172、b0537-b0565、b0016-b0022、b4412-b4413、b0577-b0582、b4415、b2389-b2390、b2392-b2395、b0358-b0368、b0370-b0380、b2856-b2863、b3042-b3048、b0656、b1325-b1333、b2030-b20

40

50

62、b2190 - b2192、b3215 - b3219、b3504 - b3505、b1070 - b1083、b1878 - b1894、b1917 - b1950、b4324 - b4342、b4345 - b4358、b4486、b0497 - b0502、b0700 - b0706、b1456 - b1462、b3481 - b3484、b3592 - b3596、b0981 - b0988、b1021 - b1029、b2080 - b2096、b4438、b3440 - b3445、b4451、b3556 - b3558、b4455、b1786、b0150 - b0153およびb2945を欠いており、さらに、polB、dinBおよびumuDCから選択される1以上の機能しない遺伝子を有する大腸菌細菌である。特に好ましい実施形態では、polBおよびdinBは機能せず、さらに好ましくは、polB、dinBおよびumuDCは全て機能しない。ゲノム縮小化大腸菌細菌は株MDS42であってよく、このゲノムは全ての挿入配列を欠いており、1以上の機能しない遺伝子polB、dinBおよびumuDCを有する、好ましくは、機能しない遺伝子polBおよびdinBを有する、さらに好ましくは、3つ全ての遺伝子が機能しない。また、ゲノム縮小株はMDS43株またはMDS66株（あるいは任意の誘導株）であってよく、1以上の機能しない遺伝子polB、dinBおよびumuDCを有する、好ましくは、3つ全ての遺伝子が機能しない。

【0024】

様々なタンパク質コード遺伝子を欠失させ、ゲノム縮小化細菌を作製することができる。大腸菌および他の細菌では、欠失させることが可能なDNA配列の種類としては、一般的に、その生物の安定性またはその生物の遺伝子産物の安定性に悪影響を及ぼさないものが含まれる。不安定にするような要素としては、限定されるものではないが、転移因子、挿入配列、およびゲノムの不安定性に関与し得る他の「利己的DNA」要素が挙げられる。例えば、挿入配列（IS）要素および関連の転移は細菌ゲノムにしばしば見出されるため、それらは欠失の標的である。IS配列は大腸菌において一般的であり、それらの全てを欠失させることができる。本明細書では明確にするために、一般に、本発明者らはIS要素および転移要素という用語を使用して、完全であれ不完全であれ、ゲノム内のある点から別の点へと移動することができるDNA要素を指す。科学技術におけるIS要素の有害な影響の例は、配列決定のための増殖中に、それらが宿主である大腸菌のゲノムからBACプラスミド内へ飛び移り得るという事実である。この人工産物は全てのIS要素を宿主細胞から欠失させることによって防ぐことができる。特定の適用では、ゲノムの不安定性に関連する他の特定の遺伝子、例えば、活性および不活性プロファージも欠失させることができる。

【0025】

また、本発明のゲノム縮小化細菌は、例えば、限定されるものではないが、該細菌の増殖および代謝に不要な特定の遺伝子、偽遺伝子、プロファージ、望ましくない内因性制限修飾遺伝子、病原性遺伝子、毒素遺伝子、線毛遺伝子、周辺細胞質タンパク質遺伝子、インベシシン遺伝子、リポ多糖遺伝子、クラスIII分泌系、ファージ病原性決定因子、ファージ受容体、病原性島、RHS要素、機能未知の配列、ならびに同じ天然親細菌種の2株間で共通に見られない配列を持たないように操作してもよい。細胞の生存に必要なではない他のDNA配列も欠失または除去してもよい。

【0026】

本発明のゲノム縮小化細菌は、ポリペプチドをコードする異種核酸を含んでもよい。該ポリペプチドは、治療用タンパク質、例えば、インスリン、インターロイキン、サイトカイン、成長ホルモン、増殖因子、エリスロポエチン、コロニー刺激因子、インターフェロンまたは抗体であり得る。異種核酸は、プラスミドなどのベクター内に収容され、プロモーターと、また所望により付加的な調節配列とも、機能し得る形で連結させることができる。

【0027】

1以上の機能しない遺伝子polB、dinBおよびumuDCを有し、好ましくは、少なくとも機能しない遺伝子polBおよびdinBを有し、さらに、全ての挿入配列を

10

20

30

40

50

欠いているゲノム縮小化細菌は、全ての挿入配列を欠いているゲノム縮小化細菌でも単離または維持が困難であるかまたは不可能である毒性核酸のクローニングを可能にする驚くべき遺伝的安定性を示す。「毒性」核酸とは、宿主株での増殖の際に突然変異率を上昇させる核酸であり得る。毒性核酸はまた、IS要素の転移率も上昇させ得る。毒性核酸の突然変異率の上昇は、宿主株が増殖させる対照核酸との比較により決定することができる。

【0028】

1以上の機能しない遺伝子 *polB*、*dinB* および *umuDC* を含むゲノム縮小化細菌を使用して、ポリペプチドを生産することができる。簡単に述べると、上記のように、発現制御配列と機能し得る形で連結された、ポリペプチドをコードする異種核酸を含む本発明の細菌を、ポリペプチド産物の発現を可能にするのに十分な条件下でインキュベートすればよい。

【0029】

十分に許容される対象タンパク質であっても過剰発現はIS転移率を上昇させ、突然変異率を大幅に増大させる細胞のストレス応答を活性化する可能性がある。対象タンパク質をコードするプラスミドはこれらの条件下で機能喪失突然変異を急速に獲得し、このような変異したプラスミドを保有する細菌は、少なくとも部分的に、過剰発現されるタンパク質をコードする無傷のプラスミドの増殖阻害作用によって、培養物中ですぐに優勢なものとなる。驚くべきゲノムの安定性および忠実度を示す本発明の細菌は、そのような突然変異プラスミドの出現を遅らせ、それらの細胞は機能する毒性タンパク質を長期間生産することができる。

【0030】

組換えタンパク質は、周辺細胞質または細胞質で発現させることができる。周辺細胞質でのタンパク質の発現は工業用途に常用され、*Hanahan, J. Mol. Biol.*, 166:557-580 (1983); *Hockney, Trends Biotechnol.*, 12:456-632 (1994); および *Hannig* らの、*Trends Biotechnol.*, 16:54-60 (1998) において総説されており、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる。組換えタンパク質は、それらが周辺細胞質間隙への分泌を引き起こすシグナルペプチドに結合している融合タンパク質を発現させることによって、周辺細胞質において生産することができる。そこでは、シグナルペプチドが特異的シグナルペプチダーゼによって切断され得る。周辺細胞質間隙に輸送されたタンパク質は生物学的に活性であり得る。

【0031】

組換えタンパク質は、組換えタンパク質の適切な折り畳みを引き起こし得るシャペロン/ジスルフィド結合形成酵素と共発現させることができる。組換えタンパク質の周辺細胞質発現に有用なこのようなタンパク質の核酸配列としては、限定されるものではないが、米国特許第5,747,662号; 同第5,578,464号および同第6,022,952号に記載されているものが挙げられ、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【0032】

実施例 1

ゲノム縮小化大腸菌の作製

ゲノム縮小株 MDS39 を国際公開第 2003/070880 号 (参照により本明細書に組み入れられる) に記載のとおり作製した。簡単に述べると、親株大腸菌 MG1655 から核酸配列の一連の 39 の累積的欠失 (ゲノムの約 14.1%) を得誘発することにより、一連のゲノム縮小株 (MDS01 ~ MDS39) を作製した。

【0033】

K-12 配列および IS データベース中の全配列を含むゲノムスキャンチップ (*NimbleGen Systems, Madison, WI*) とのハイブリダイゼーションにより、全ての IS 要素を欠失するように設計された第一の株である MDS39 が

10

20

30

40

50

、予期しないことに、その作製中に新たな位置へ飛び移ったIS要素のさらなるコピーを含むことが明らかになった。これらのIS要素を欠失させてMDS40を作製した。MDS40からfhuACDB (tonA遺伝子座)を欠失させてMDS41を作製した。MDS01～MDS41を作製するために行った各累積的欠失の位置および機能は米国特許出願公開第2007/0054358号の表2に記載されており、その全内容を参照により本明細書に組み入れられる。次に、MDS41からendA遺伝子を欠失させてMDS42を作製した。

【0034】

MDS42のゲノムから、米国特許第6,989,265号およびプラスミドpST76-AおよびpSTKSTを用いたFeherらの、Methods Mol. Biol., 416:251-259 (2008)に記載されているように、自殺プラスミドに基づく方法を用いた傷跡のない方法で、DNAポリメラーゼIIをコードする遺伝子(polB)、DNAポリメラーゼIVをコードする遺伝子(dinB)およびDNAポリメラーゼVをコードする遺伝子(umuDC)を欠失させた。遺伝子欠失は個々に行うほか、考えられる全ての組合せでも行い、MDS42 polB、MDS42 dinB、MDS42 umuDC、MDS42 polB dinB、MDS42 polB umuDC、MDS42 dinB umuDCおよびMDS42 polB dinB umuDCの株を作製した。個々の欠失の組合せは、欠失構築物のマーキングされた(自殺プラスミドが組み込まれている)中間体のP1ファージ形質導入と、その後のエンドヌクレアーゼ切断刺激アウトリコンビネーション(endonuclease cleavage-stimulated out-recombination)およびプラスミドの消滅によって行った。全ての欠失を、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)およびフランキングプライマーを用いた配列決定により確認した。研究に用いたプライマー配列を表2に列挙する。

【0035】

表2

10

20

【表 2】

プライマー名称	配列 (5'-3')	用途
polB-A	ccgaattcagtatccaggcgagt	polB の欠失
polB-BR	caggcaggtgtggcggagggaatact	polB の欠失
polB-BF	tccgccacacctgectgcgccacgct	polB の欠失
polB-C	ccggatccattggcggcattgt	polB の欠失
polB-D	tgctgaacaccagtttgct	polB の欠失
polB-E	aaccgggtgaagtgggtga	polB の欠失
dinB-A	ccggtagccgggcataaccgatgcga	dinB の欠失
dinB-BR	cagaatatacattgctcacctctcaacact	dinB の欠失
dinB-BF	gaggtgagcaatgtatattctgtgtgca	dinB の欠失
dinB-C	ccggatccgccgttaacgcatcaa	dinB の欠失
dinB-D	gtgttcgactcgcctgat	dinB の欠失
dinB-E	gagtcgtcgttagagtgcatt	dinB の欠失
umuDC-A	ggaattcggatgagcgtcgtcgcca	umuDC の欠失
umuDC-BR	ttgagcgcacaacagcagcgatgacaa	umuDC の欠失
umuDC-BF	gctgctgttgttgccgtcaatgaacctt	umuDC の欠失
umuDC-C	gctgcagatcgcttacctgattgtc	umuDC の欠失
umuDC-D	aatgctccatctgcgggtt	umuDC の欠失
umuDC-E	gctctatccttcgccgtt	umuDC の欠失
lexA-A	gttatggctgcattttggata	lexA の修飾
lexA-BR	gatatctttcatcgCcatcccgtgacgcga	lexA の修飾
lexA-BF	ggatgGcgatgaaagatatcgcca	lexA の修飾
lexA-C	ccggatcccagcaacggaacggt	lexA の修飾
lexA-D	cggtagctgattgccatta	lexA の修飾
lexA-E	gggctatcaagatgacca	lexA の修飾
recA-D	cggctagcgcagggatgttgattc	recA の欠失
recA-E	gtgctgattatgccgtgt	recA の欠失
BMD30-A	ccgaattcagtcgcgcacgcaactt	mcrBC の欠失
BMD30-BR	ctcgcccttaattacatacttttggtgc	mcrBC の欠失
BMD30-BF	tatgtaaattaaggcgagattattaaa	mcrBC の欠失
BMD30-C	ccggatccacatggcgcggttacaa	mcrBC の欠失
BMD30-D	tgataccgccgcacaca	mcrBC の欠失
BMD30-E	actgggtgtgtctcgcaag	mcrBC の欠失
cycA-D	ctgatgccgtaggttct	cycA 突然変異の解析
cycA-E	gcgccatccagcatgata	cycA 突然変異の解析
AK54-D	atgataatgaatgacatca	sinI の配列決定
AK55-E	ctcgagtttagaccaactctccaaa	sinI の配列決定
Sce2	attaccctgttatcccta	pST76 配列決定プライマー
T7	taatacgactcactataggg	pST76 配列決定プライマー

A、C、BFおよびBRを付けたプライマーは、自殺プラスミドのゲノム組込みのために組換えPCRにより相同性領域を作製するために用いた。DまたはEを付したプライマーは、フランキングゲノム領域と相同であり、PCRおよび配列決定による欠失/対立遺伝子置換の確認のために用いた。lexAプライマー中の大文字は遺伝子に導入された点突然変異を示す。

【0036】

実施例 2

ゲノム縮小化大腸菌における自然突然変異率

10

20

30

40

次に、各株の自然突然変異率を、Feher らの、Mutat. Res. 595 (1-2): 184-190 (2006)に記載されているように、cycA遺伝子における全ての種類の突然変異を検出するD-サイクロセリン耐性アッセイを用いて決定した。簡単に述べると、揺動アッセイにおいて、0.2%グルコースを添加したMS培地(Hall, Mol. Biol. Evol., 15(1): 1-5 (1998))に記載のとおり) 1mlの試験管20本のそれぞれに約 10^4 細胞を播種し、培養物を定常期初期まで増殖させた。その後、各試験管の50 μ lアリコートにD-サイクロセリン(0.04mM)が入っているMSプレート上に拡げた。試験管当たりの推定突然変異数(m)は、Ma-Sandri-Sarkar最尤法(Sarkar らの、Genetica, 85(2): 173-179 (1992))を用いることによりコロニー数から算出した。50 μ lで求めた有効m値から、Stewart らの、Genetics, 124(1): 175-185 (1990)の式41を用いて1mlの値を推定した。m値の統計比較は、総細胞数の差がごくわずかである場合のみ行った(<3%、P 0.6、対応のない両側t検定による)。試験管中の細胞総数は、3本の無作為抽出の試験管の希釈物を非選択的プレート上に拡げることにより算出した。試験管当たりの突然変異数を試験管中の平均細胞総数で割ることにより突然変異率(突然変異/細胞/世代)を得た。

【0037】

各遺伝子単独での欠失では、この方法により測定した突然変異率を少なくとも20%低下させる(全ての値が有意、 $P < 0.05$ 、対応のない両側t検定)。結果は図1においてグラフで示す。異なる欠失を組み合わせることによって、減少した突然変異率はさらに低下し、突然変異率が最も低いのはMDS42polBdinBおよび三重欠失株MDS42polBdinBumuDCであった。polBとdinBの欠失を組み合わせさせた効果は倍数的に増加し、このことはこれらのポリメラーゼの独立した作用様式を示している。umuDCの欠失では、他の2つの変異しやすいポリメラーゼのいずれもが欠失している場合には、突然変異率のさらなる減少は起こらなかったが、このことはおそらく遺伝子またはそれらの産物の間での相互作用を示している。親MDS42株と比較して、MDS42polBdinB株およびMDS42polBdinBumuDC株は自然突然変異率のほぼ50%の減少を示した(8.2×10^{-8} 突然変異/細胞/世代がそれぞれ、 4.34×10^{-8} および 4.45×10^{-8} に減少)。

【0038】

DNAポリメラーゼII、DNAポリメラーゼIVおよびDNAポリメラーゼVをコードする遺伝子の欠失が適応度に悪影響を及ぼさないことを確認するために、異なる株の増殖速度をMOPS最少培地で測定した。各株の10の個々のコロニーから生じた10の並行培養物を採取し、Bioscreen C機器内で増殖させた。増殖曲線は、各培養物の540nmでの光学密度(O.D.)を追跡することにより求めた。三重欠失株MDS42polBdinBumuDCとして組み合わせさせた場合でも、MOPS最少培地での適応度に有意な影響を及ぼした欠失はなかった。

【0039】

レギュレーター変異体による完全なSOS応答の上流不活性化が、自然突然変異率に対して、DNAポリメラーゼII、DNAポリメラーゼIVおよびDNAポリメラーゼVをコードする遺伝子の欠失と同じ影響を及ぼすかどうかを判定するために、MDS42recAおよびMDS42lexAを作出した。MDS42recAはrecAの傷跡のない欠失(MG1655の座標2820783-2821861)を含み、この産物はLexAの自己タンパク質分解の誘導に必要である。MDS42lexAは、119番のセリンがアラニンで置換されている(S119A)機能しない対立遺伝子でのlexA遺伝子の置換を含む。これらの遺伝子(recAおよびlexA)はそれぞれSOSレギュロン遺伝子の脱抑制に必要である。従って、MDS42recAもMDS42lexAもSOS経路を誘導することができない。これらの改変はいずれも、上記のようにMOPS最少培地における株の増殖速度により測定した場合には、株の全体的な適応度に悪影響を及ぼさ

10

20

30

40

50

なかった。驚くべきことに、MDS 42と比較した場合、いずれの株も自然突然変異率の有意な減少を示さなかった。MDS 42lexAの場合では、実際には、わずかな増加が認められた(MDS 42の 8.2×10^{-8} に対して 2.07×10^{-7})。結果を図2に示す(白色のバー(ストレス無し))。

【0040】

実施例3

ゲノム縮小化大腸菌におけるストレス誘発突然変異率

次に、ストレス条件下でのMDS 42recA、MDS 42lexAおよびMDS 42polBdinBumuDCの突然変異率を測定し、比較した。

【0041】

DNA架橋剤マイトマイシン-Cは、二本鎖DNAの損傷を引き起こし、SOS応答を直接活性化し、DNAポリメラーゼII、DNAポリメラーゼIVおよびDNAポリメラーゼVのアップレギュレーションを引き起こす。阻害濃度に満たない($0.1 \mu\text{g/ml}$)マイトマイシン-Cを用いて、細胞にストレスを与え、突然変異率への影響を解析した。結果を図2に示す(斜線のバー(マイトマイシン))。

【0042】

タンパク質過剰生産は宿主細胞にストレスを与える。良性タンパク質である緑色蛍光タンパク質(GFP)の過剰生産の、突然変異率に対する影響を試験した。GFPをコードする遺伝子を、T7プロモーターによって制御される誘導構築物としてのプラスミドにクローニングした。GFPを発現させるために、MDS 42polBdinBumuDC株のT7 RNAポリメラーゼコード化変異体(MDS 42polBdinBumuDC-T7)、MDS 42recAのT7 RNAポリメラーゼコード化変異体(MDS 42recA-T7)、およびMDS 42lexAのT7 RNAポリメラーゼコード化変異体(MDS 42lexA-T7)を、yaha-yailゲノム領域をIPTG誘導性のlacオペレーター/T7ポリメラーゼカセットで置換することにより構築した。また、MDS 42のT7 RNAポリメラーゼコード化変異体(MDS 42-T7)、MG1655のT7 RNAポリメラーゼコード化変異体(MG1655-T7)、および広く使用されているタンパク質生産株BL21のT7 RNAポリメラーゼコード化変異体(DE3)も構築し、各株における突然変異率に対するGFP過剰発現の影響を測定し、比較した。結果を図2に示す(黒いバー(pET-GFP))。

【0043】

次に、細菌における突然変異率に対する毒性タンパク質(ORF238、低分子、ロイシンリッチ疎水性タンパク質)過剰生産の影響を、これらの株を、ORF238タンパク質を過剰発現することが可能な、IPTG誘導性の、pSG1144に基づく構築物であるプラスミドpSG-ORF238で形質転換させることにより試験した。結果を図2に示す(灰色のバー(pSG-ORF238))。ORF238の過剰生産はMDS 42の突然変異率を有意に増加させた。MDS 42polBdinBumuDCの値は同じ条件下で安定していた。

【0044】

これらの結果は、MDS 42recAおよびMDS 42polBdinBumuDCを除いて、様々なストレスがMDS 42を含む全ての株の突然変異率を増加させたことを示している。毒性ORF238タンパク質の過剰生産が最大の影響を持ち、突然変異率に5倍を超える増加が測定された。阻害濃度に満たないマイトマイシン-Cは突然変異率を2~3倍増大させ、BL21(DE3)およびMDS 42recAはこれらの条件下では増殖できなかった。GFPの過剰生産の影響は比較的小さく、突然変異率を1.5~2倍増大させた。

【0045】

これに対して、ストレスの存在下では、MDS 42recAでもMDS 42polBdinBumuDCでも突然変異率の有意な増加は見られなかった。興味深いことに、MDS 42lexAはこの挙動に従わず、該株は全てのストレスに応答して突然変異率の

10

20

30

40

50

増加を示した。MDS 42 pol B din B umu DC は、最も低い自然突然変異率を示し、ストレス条件に対して示す応答はごくわずかである、遺伝的に最も安定な株と特徴付けることができる。

【0046】

最も一般的に使用されるタンパク質生産株である BL 21 (DE 3) は、毒性 ORF 238 タンパク質を過剰発現する場合、MDS 42 pol B din B umu DC よりもほぼ2桁高い突然変異率を示した。この差を解析するために、BL 21 (DE 3)、MG 1655、MDS 42 および MDS 42 pol B din B umu DC の突然変異スペクトルを、サイクロセリン耐性変異体における cyc A の PCR 解析により研究した。簡単に述べると、遺伝子全体を包含する 1,87 bp のゲノムセグメントを、プライマー対 cyc A 1 - D / cyc A 2 - E を用いて、変異細胞から増幅した。代表的なサンプルは、各並行プレートから5コロニーを解析することにより得、1実験につき合計96サンプルを得た。増幅した断片をアガロースゲル上で分離し、野生型鋳型から作製した断片と比較した。サ同一のサイズは1個または数個のヌクレオチドにだけ影響を与える突然変異を示し、サイズ縮小または増幅の失敗は欠失を示し、検出可能なサイズ拡大はIS挿入を示した。結果を図3に示す。MG 1655では、突然変異の74%は点突然変異であることが判明し、24%はIS挿入であり、2%は欠失であった。これに対して、BL 21 (DE 3)では、cyc A 突然変異の77%がIS挿入であった。BL 21 (DE 3)での点突然変異の割合ははるかに低かったが(MG 1655では74%に対してBL 21 (DE 3)では23%)、BL 21 (DE 3)での実際の点突然変異率は有意に高かった(MG 1655での 9.2×10^{-8} に対して 2.28×10^{-7})。BL 21 (DE 3)では cyc A 対立遺伝子の間で欠失は認められなかった。

【0047】

cyc A 揺動アッセイを用いて得られたデータを確認するために、それぞれ異なるストレス条件下でのMDS 42 および MDS 42 pol B din B umu DC の突然変異率も、リファンピシン耐性アッセイを用いて測定した。このアッセイでは、Jin and Gross, J. Mol. Biol., 202(1):45-58 (1988) に記載のとおり、必須 rpo B 遺伝子における点突然変異を検出する。簡単に述べると、LB 1 ml の試験管20本に各 10^4 細胞を播種し、培養物を定常期初期まで増殖させた。適当な希釈物を非選択的LB寒天プレートおよびリファンピシン ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) 含有LB寒天プレートに拡げた。24時間後または48時間後にそれぞれコロニー計数を行った。突然変異頻度は、総生菌数に対するリファンピシン耐性コロニー数の割合として報告した。この結果は、各株および条件について3回の独立した実験で得た平均値に相当する。必要に応じて、cyc A アッセイの場合と同様に、異なるストレス条件を与えた。リファンピシン耐性アッセイを用いて得たデータは、図4に示すように、cyc A 揺動データと一致した。MDS 42 pol B din B umu DC は、MDS 42 と比べて有意に低い自然突然変異頻度を示した。毒性ORF 238 タンパク質の過剰生産にตอบสนองして、ならびにマイトマイシン - C の存在下でも、MDS 42 の突然変異率は著しく上昇したが、MDS 42 pol B din B umu DC の応答はかなり低かった。

【0048】

実施例 4

MDS 42 pol B din B umu DC は毒性タンパク質発現プラスミドに安定性の向上を提供する

機能しない遺伝子 pol B、din B および / または umu DC を含むゲノム縮小化細菌の驚くべき利点を示すために、プラスミドに基づく突然変異スクリーニングを設計した。プラスミド pSin 32 は、pET 3 - His プラスミドの Xho I 部位にクローニングされた、サルモネラ・エンテリカ血清型インファンティス (Salmonella enterica serovar infantis) の Sin I メチルトランスフェラーゼをコードする、sin I の誘導性コピーを保有する。Sin I は DNA の内部のシトシンを GG (A/T) CC 部位でメチル化して、5 - メチルシトシンを生成し、それによ

り、メチルシトシンを含有するDNAを切断するMcrBCエンドヌクレアーゼの標的を作り出す。そのため、メチル化SinI部位を保有するプラスミド（例えば、pSin32、その8つのSinI部位で自己メチル化される）は、mcrBC⁺宿主内でそれ自体安定化できない。mcrBC⁻宿主に導入された場合には、該プラスミドは、sinIの発現が誘導された際にメチル化されるが、維持することができる。

【0049】

MDS42の作製中にmcrBC遺伝子は欠失されたので、全てのMDS42株はmcrBC⁻である。BL21(DE3)からmcrBC遺伝子を欠失させ、株BL21(DE3)mcrBCを作出した。プラスミドpSin32を、MDS42-T7、MDS42 polBdinBumuDC-T7およびBL21(DE3)mcrBCにエレクトロポレーションにより導入した。1mlのLB中37℃で1時間の回復インキュベーション後、100μlの形質転換培養物を、アンピシリン(Ap)を添加したLB 100mlに入れ、37℃でインキュベートした。残りの900μlから、プラスミドDNAを標準的なプロトコールに従って単離した。7時間のインキュベーション後に、培養物はOD₅₄₀ = 約0.2に達し、この時点で、サンプルをIPTG（終濃度1mM）で誘導した。また、この時点でプラスミド調製物のサンプルも採取し（8時間のサンプル）、その後、2時間おきに18時間まで追加サンプルを採取し、次いで、形質転換後の増殖24時間および36時間の時点で追加サンプルを採取した。次に、精製したpSin32プラスミドサンプル（各株から9サンプル）をMDS42(McrBC⁻)およびMG1655(McrBC⁺)に形質転換した。各プラスミドサンプルの形質転換MG1655およびMDS42コロニーを計数することにより、突然変異したプラスミドの相対数を計算することができる。突然変異したプラスミドの数の絶対値を得るために、エレクトロコンピテントMDS42およびMG1655指標株の各バッチを、Ap耐性カセットを保有する対照(pST76-A)プラスミドで形質転換した。次に、MG1655およびMDS42形質転換体の割合を補正係数として用いて、各サンプルの突然変異pSin32プラスミド数の絶対値を算出した。

【0050】

pSin32でのBL21(DE3)mcrBC、MDS42-T7およびMDS42 polBdinBumuDC-T7の形質転換に続き、IPTGによる誘導によって、SinI酵素の過剰生産はMcrBC⁻株でさえも中程度の増殖阻害作用を示すことが分かった（図5）。この中程度の毒性はMDS42-T7の突然変異率を上昇させるが、MDS42 polBdinBumuDC-T7ではその作用ははるかに弱く（図6）、上述の知見が裏付けられる。

【0051】

IPTG誘導に続いて、プラスミドサンプルを一定の間隔で採取した。該プラスミドサンプルを再びMG1655(mcrBC⁺)に形質転換することにより、sinI無効化突然変異を保有するプラスミドサンプル（非メチル化プラスミド）の画分が検出された。サンプル当たりの総プラスミド数は、サンプルをMDS42に同時に形質転換することにより決定した。エレクトロコンピテント細胞の各セットについて対照プラスミドから得られた形質転換体数で各値を補正した後、機能する/機能しないsinIをコードするプラスミドの割合を算出した。結果を図7に示す。

【0052】

驚くべきことに、MDS42由来の開始（0時間）プラスミドサンプルの96.7%は、MG1655において安定させることができなかった。これは、T7ポリメラーゼを欠失する宿主でも、sinIの偽転写によってSinI発現が起こり、その結果として、sinI部位のメチル化が起こったことを示した。最初のプラスミドサンプルにおけるsinI部位のメチル化状態は、SinIによるそれらの非切断性により確認した。

【0053】

異なる株におけるクローン安定性に関する違いは、SinI発現のIPTG誘導後に明らかになった。形質転換から36時間後（IPTG誘導から28時間後）に、BL21（

10

20

30

40

50

DE3) mcrBC細胞に保持されたpSin32の51.7%が、活性SinIの生産を阻害する突然変異を保有していた。この値はMDS42-T7では有意に低かった(25.8%)。MDS42 polB dinB umuDC-T7では、突然変異したpSin32プラスミドの画分がさらに低かった(8.2%)。突然変異したsinI遺伝子を保有するプラスミドにおけるSinI部位の非メチル化状態は、SinIによるそれらの切断性により確認した。

【0054】

BL21(DE3) mcrBCおよびMDS42-T7における変異プラスミドの蓄積は、ストレス誘発突然変異誘発とSinI発現プラスミドによる増殖阻害との複合効果によるものであった。該酵素の過剰生産により突然変異率は上昇し、増殖は減少した。これらの増殖の遅い培養物では、経時的にSinI不活性化突然変異が起こり、次に、それらの正常な増殖速度を取り戻し、残りの培養物よりも速く増殖した。低突然変異率のMDS42 polB dinB umuDC-T7では、SinI不活性化突然変異は、平均して、より長時間発現した。MDS42-T7およびMDS42 polB dinB umuDC-T7の50の独立したコロニー(全てpSin32プラスミドを保有する)の増殖曲線の評価はこの見解を裏付けている(図8)。培養物が誘導プラスミドの増殖阻害作用を克服したことを示すカットオフとしてOD₅₄₀値0.7を用いた。MDS42 polB dinB umuDC-T7がこの密度レベルに達するのに要した平均時間はMDS42-T7の場合よりも有意に長かった(それぞれ727.8分と571.8分; P<0.005、対応のない両側t検定)。

【0055】

McrBC⁺細胞での増殖を可能にするプラスミドにおいて実際に突然変異が起こったことを確認するために、8つの異なるプラスミドサンプル(実現性のあるpSin32形質転換MG1655コロニーから採取した)のsinI領域を配列決定した(図9)。8サンプルのうちの7サンプルで、sinIにおいてフレームシフト突然変異が起こり、その結果、遺伝子内に新たな停止コドンが形成された。8番目のサンプルはAからCへの転換を示し、その結果、タンパク質のN880T突然変異が引き起こされた。フレームシフトによって生じた7つの新たな停止コドンのうちの6つは遺伝子の最初の125bp内にあった。

【0056】

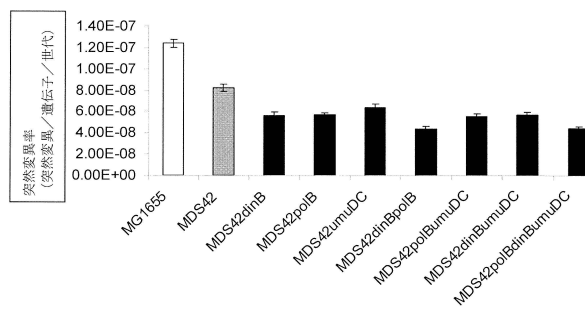
これらの結果は、特に、IS要素のない遺伝的背景において、DNAポリメラーゼII、IVおよび/またはVをコードする機能しない遺伝子を有するゲノム縮小化細菌の明確かつ予想外の実用的利点を示している。SinIが過剰生産されると、プラスミドにおいて保有されるsinI遺伝子は、MDS42 polB dinB umuDCでは、MDS42の場合の約3分の1の頻度で、また、BL21(DE3) mcrBCの場合の5分の1を下回る頻度で機能喪失突然変異を獲得した。注目すべきことに、BL21(DE3) mcrBCでの過剰生産からわずか16時間後に、プラスミドにコードされる全てのsinI遺伝子の半数近くが無効化突然変異を受けていた。

【0057】

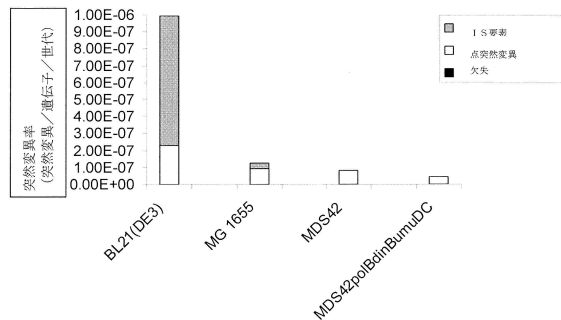
SinIを過剰発現する培養物において突然変異クローンの割合が予想外に高いことは、ストレス誘発突然変異誘発だけでは説明できず、この全体的突然変異率は絶対値が低すぎ(10⁻⁶突然変異/遺伝子/世代程度)、そのような劇的な効果を引き起こすことができない。むしろ、その現象は毒性遺伝子を保有するプラスミドの増殖阻害作用による場所が大きい。一連の事象は以下のとおりである: 毒性遺伝子が発現すると、細胞の増殖速度が減少する。同時に、突然変異率はストレスによって増加する。毒性機能をもはや発現しない突然変異体がプラスミド集団内でひと度発生すると、それを保有する細胞は正常な増殖を取り戻すことができ、その培養物中で優勢となる。MDS42 polB dinB umuDCにより例示されるような、1以上の機能しない遺伝子polB、dinBおよび/またはumuDCを有するゲノム縮小化細菌では、このような突然変異体の出現は遅延され、細胞は機能する毒性産物を長期間生産することができる。親株MDS42や一

般的に使用される生産株 B L 2 1 (D E 3) に優る M D S 4 2 p o l B d i n B u m u D C などの株の利点は著しく、産物過剰生産のストレスの重度が増すにつれて増大する。本明細書に記載の高いゲノム安定性を有する細菌株は治療適用において特に有益であり、その場合、核酸および/またはタンパク質産物の忠実度が基本的に重要である。また、本発明の細菌は、長期連続培養条件が必要とされる場合も驚くべきことに有用である。

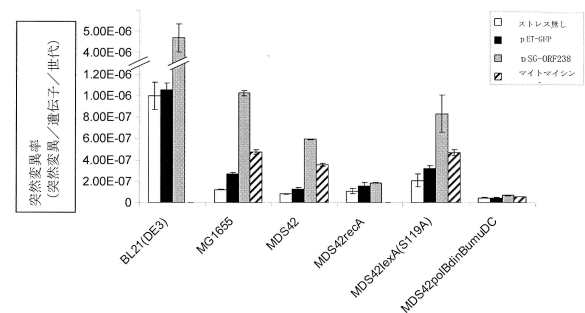
【図 1】



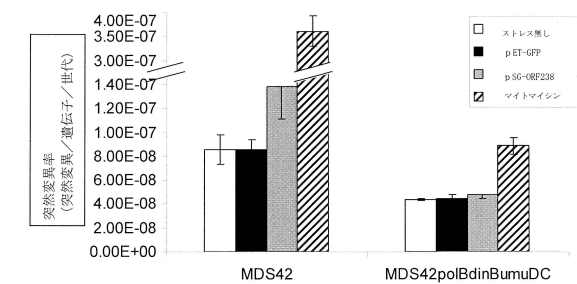
【図 3】



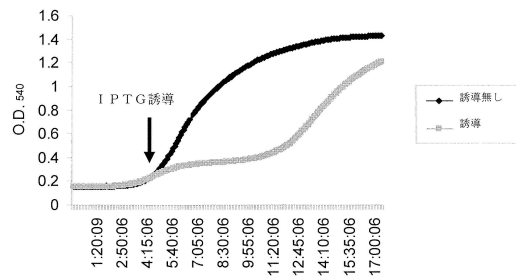
【図 2】



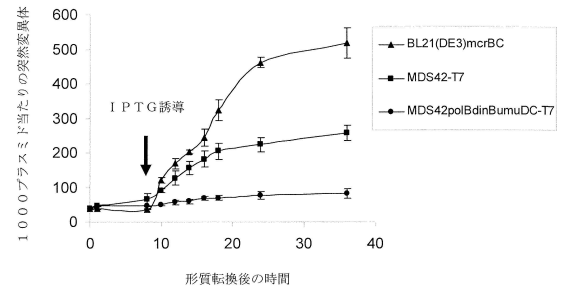
【図 4】



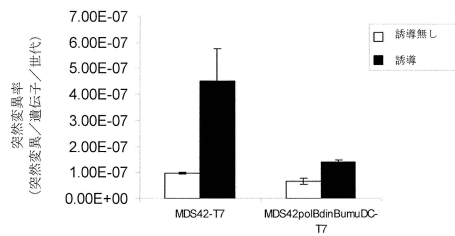
【図 5】



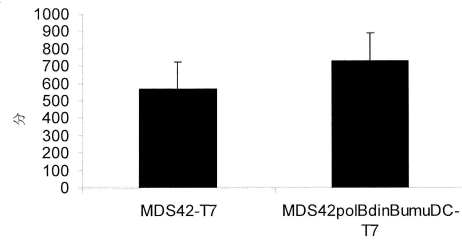
【図 7】



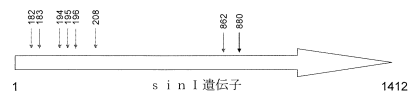
【図 6】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

0006151704000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ブラットナー, フレデリック アール.
アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711, マディソン, ジェファーソン ストリート
1547
- (72)発明者 ツオルゴ, バリント
ハンガリー国 ハー - 6726 セゲド, ソーヴォ ウ. 18
- (72)発明者 ポスファイ, ジョルジュ
ハンガリー国 ハー - 6727 セゲド, マユス 1 ウ. 74

審査官 宮岡 真衣

- (56)参考文献 特表2009-533027(JP,A)
特表2005-517429(JP,A)
Posfai G. et al., SCIENCE, 2006年, 312, p.1044-1046, Figs. S1-S5, Tables S1-S4
Umenhoffer K. et al., Microbial Cell Factories, 2010年, 9:38, p.1-12
Napolitano R. et al., EMBO J., 2000年, 19(22), p.6259-6265
JEONG H. et al., J. Mol. Biol., 394(2009), p.644-652

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/21
C12P 21/02
C12N 15/09
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
PubMed
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)