(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2017-506080
(P2017-506080A)
(43)公表日　平成29年3月2日(2017.3.2)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B065
C07K 14/00	(2006.01)	C07K	14/00		4H045
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 27 頁）

(21)出願番号　特願2016-553605 (P2016-553605)
(86)(22)出願日　平成27年2月20日 (2015.2.20)
(85)翻訳文提出日　平成28年10月20日 (2016.10.20)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/016868
(87)国際公開番号　WO2015/127242
(87)国際公開日　平成27年8月27日 (2015.8.27)
(31)優先権主張番号　61/942,755
(32)優先日　平成26年2月21日 (2014.2.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　507044516
プレジデント　アンド　フェローズ　オブ　ハーバード　カレッジ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３８，　ケンブリッジ，　クインシー　ストリート　１７
(74)代理人　100079049
弁理士　中島　淳
(74)代理人　100084995
弁理士　加藤　和詳
(72)発明者　チャーチ、　ジョージ　エム.
アメリカ合衆国　０２４４６　マサチューセッツ州　ブルックリン　ケント　ストリート　２１８

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アロステリックタンパク質の新規設計

(57)【要約】
１種類または複数種類のアロステリックエフェクターに結合してタンパク質の立体構造変化を誘導するアロステリックＤＮＡ結合タンパク質を作製および単離するための方法および組成物が提供される。

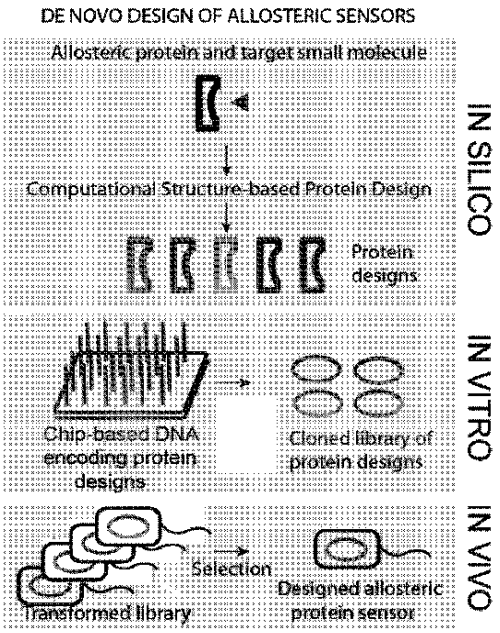


Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
立体構造変化を誘導するコンパニオンアロステリックエフェクターに結合する、アロステリックＤＮＡ結合タンパク質を作製および単離する方法であって、
コンパニオンアロステリックエフェクターに対する結合ポケットを有する候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をインシリコで計算的に設計すること；
前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸配列を提供すること；
前記核酸配列を細菌宿主細胞に導入し、前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質を発現させること；
前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して遺伝子の発現を阻害するかどうかをネガティブセレクションを用いて決定して、前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して前記遺伝子の発現を阻害している第１の複数の細菌宿主細胞を同定すること；および
前記第１の複数の細菌宿主細胞中の前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質が前記コンパニオンアロステリックエフェクターに結合するかどうかをポジティブセレクションを用いて決定して、前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質が前記コンパニオンアロステリックエフェクターに結合した第２の複数の細菌宿主細胞を同定すること
を含む方法。
【請求項２】
前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸配列が、基体に結合した核酸部分配列から作成される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記基体に由来する複数の部分配列が、連結されて前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする前記核酸配列を形成する、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記ネガティブセレクションが、前記遺伝子を発現する細胞にとって有害である毒素に前記細菌宿主細胞を接触させることを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記ネガティブセレクションが、前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して前記遺伝子の発現を阻害することがなかった細胞にとって有害である毒素に前記細菌宿主細胞を接触させることを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記ポジティブセレクションが、毒素および前記コンパニオンアロステリックエフェクターに前記第１の複数の細菌宿主細胞を接触させることを含み、前記毒素は、前記遺伝子が発現されない細胞にとって有害である、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記ポジティブセレクションが、前記第１の複数の細菌宿主細胞を毒素およびアロステリックエフェクター標的に接触させることを含み、前記コンパニオンアロステリックエフェクターが前記ＤＮＡから前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質を遊離させるような様式で前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質に結合しなかった細胞にとって、前記毒素が有害である、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記ポジティブセレクションが、検出可能なマーカーを検出することを含み、該検出可能なマーカーは、前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質が前記ＤＮＡに結合して前記遺伝子が発現している場合に前記第１の複数の細菌細胞中で発現される、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記検出可能なマーカーが蛍光タンパク質である、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】

前記蛍光タンパク質が、蛍光活性化細胞選別によって検出される、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記ポジティブセレクションが、前記コンパニオンアロステリックエフェクターが前記ＤＮＡから前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質を遊離させる様式で前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質に結合しなかった場合に前記第１の複数の細菌細胞中で発現される、検出可能なマーカーを検出することをさらに含む、請求項７に記載の方法。
【請求項１２】
前記ＤＮＡ結合タンパク質が化学センサーである、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
前記細菌宿主細胞が大腸菌または枯草菌である、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
立体構造変化を誘導するコンパニオンアロステリックエフェクターに結合するアロステリックＤＮＡ結合タンパク質を作製および単離する方法であって、
コンパニオンアロステリックエフェクターに対する結合ポケットを有する候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をインシリコで計算的に設計すること、
前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸配列を提供すること、
前記核酸配列を出芽酵母（Saccharomyces cerevisiae）宿主細胞に導入し、前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質を発現させること、
前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して遺伝子の発現を阻害するかどうかをネガティブセレクションを用いて決定して、前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して前記遺伝子の発現を阻害している第１の複数の出芽酵母宿主細胞を同定すること、および
前記第１の複数の出芽酵母宿主細胞中の前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質が前記コンパニオンアロステリックエフェクターに結合するかどうかをポジティブセレクションを用いて決定して、前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質が前記コンパニオンアロステリックエフェクターに結合した第２の複数の出芽酵母宿主細胞を同定すること
を含む方法。
【請求項１５】
前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸配列が、基体に結合した核酸部分配列から作成され、且つ、連結されて前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする前記核酸配列を形成する、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記ネガティブセレクションが、前記遺伝子を発現する細胞にとって有害である毒素に前記細菌宿主細胞を接触させることを含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
前記ポジティブセレクションが、毒素および前記コンパニオンアロステリックエフェクターに前記第１の複数の細菌宿主細胞を接触させることを含み、前記毒素は、前記遺伝子が発現されない細胞にとって有害である、請求項１４に記載の方法。
【請求項１８】
立体構造変化を誘導するコンパニオンアロステリックエフェクターに結合するアロステリックＤＮＡ結合タンパク質を作製および単離する方法であって、
コンパニオンアロステリックエフェクターに対する結合ポケットを有する候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をインシリコで計算的に設計すること、
基体に結合した核酸部分配列から作成された、前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸配列を提供すること、
前記核酸配列を微生物に導入して前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質を発

現させること、
前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して遺伝子の発現を阻害するかどうかをネガティブセレクションを用いて決定して、前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して前記遺伝子の発現を阻害している第１の複数の微生物を同定すること、および
前記第１の複数の微生物中の前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質が前記コンパニオンアロステリックエフェクターに結合するかどうかをポジティブセレクションを用いて決定して、前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質が前記コンパニオンアロステリックエフェクターに結合した第２の複数の微生物を同定すること
を含む方法。
【請求項１９】
前記基体がマイクロアレイである、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記基体に由来する複数の部分配列が、前記マイクロアレイ上の配列から増幅され、且つ、連結されて前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする前記核酸配列を形成する、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする前記核酸配列がランダムに作製される、請求項１８に記載の方法。
【請求項２２】
前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がエラープローンＰＣＲまたはコンビナトリアルＰＣＲによって作製される、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質が、その機能のためにはタンパク質読み枠がインタクトなままである必要がある抗毒素遺伝子に融合している、請求項１８に記載の方法。
【請求項２４】
フレームのずれたまたは短縮された（truncated）候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質が、毒素に対して特異的な抗毒素タンパク質を発現させない、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
フレームのずれたまたは短縮された候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質を発現する宿主細胞が、前記宿主細胞を前記毒素に晒すことにより排除される、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
エフェクター分子に対する結合ポケットを有する計算的にインシリコで設計されたアロステリックＤＮＡ結合タンパク質。
【請求項２７】
エフェクター分子に対する結合ポケットを有する計算的にインシリコで設計されたアロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸配列。
【請求項２８】
計算的にインシリコで設計されたアロステリックＤＮＡ結合タンパク質の結合ポケットに選択的に結合する構造を有するエフェクター分子。
【請求項２９】
計算的にインシリコで設計されたアロステリックＤＮＡ結合タンパク質の結合ポケットに選択的に結合する構造を有するエフェクター分子をコードする核酸配列。
【請求項３０】
エフェクター分子に対する結合ポケットを有する計算的にインシリコで設計されたアロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸配列を含む細胞。
【請求項３１】

前記アロステリックＤＮＡ結合タンパク質によって制御される外来性遺伝子をさらに含む、請求項３０に記載の細胞。
【請求項３２】
計算的にインシリコで設計されたアロステリックＤＮＡ結合タンパク質の結合ポケットに選択的に結合する構造を有するエフェクター分子をコードする核酸配列を含む細胞。
【請求項３３】
エフェクター分子に対する結合ポケットを有する計算的にインシリコで設計されたアロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸配列、および
前記計算的にインシリコで設計されたアロステリックＤＮＡ結合タンパク質の前記結合ポケットに選択的に結合する構造を有する前記エフェクター分子をコードする核酸配列
を含む細胞。
【請求項３４】
前記アロステリックＤＮＡ結合タンパク質によって制御される外来性遺伝子をさらに含む、請求項３３に記載の細胞。
【請求項３５】
前記アロステリックＤＮＡ結合タンパク質と前記エフェクター分子とによって制御される外来性遺伝子をさらに含む、請求項３３に記載の細胞。
【請求項３６】
前記外来性遺伝子が、毒素に対する解毒剤をコードする、請求項３３に記載の細胞。
【請求項３７】
前記外来性遺伝子が、検出可能なタンパク質または検出可能なタンパク質タグをコードする、請求項３３に記載の細胞。
【請求項３８】
前記アロステリックＤＮＡ結合タンパク質が、解毒剤遺伝子に融合しており、インタクトなタンパク質読み枠を有する、請求項３３に記載の細胞。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願データ
本願は、２０１４年２月２１日に提出された米国仮特許出願第６１／９４２，７５５号に基づく優先権を主張するものであり、あらゆる目的のために、その全体が参照により本明細書に取り込まれる。
【０００２】
政府利益の記載
本発明は、米国エネルギー省の助成番号第ＤＥ－ＦＧ０２－０２ＥＲ６３４４５号の政府助成を受けてなされた。米国政府は、本発明における一定の権利を有する。
【０００３】
分野
本発明は、新規なアロステリックタンパク質を設計するための方法および組成物に関する。
【背景技術】
【０００４】
合理的なタンパク質設計においては、目的のタンパク質の構造および機能の詳細な知見を用いて変異型のタンパク質を合成（engineer）する。しかし、タンパク質の構造および機能は、しばしば複雑で非直観的な相互作用に支配されているため、合理的な突然変異誘発方法は一般的に成功しない。したがって、タンパク質工学のための新規な方法および組成物の開発が望ましい。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００５】

本発明の実施形態は、標的小分子またはアロステリックエフェクターへの結合およびその後の立体構造変化（conformational change）によって標的小分子またはアロステリックエフェクターに応答するアロステリックタンパク質を設計するための新規な方法および組成物に基づく。本発明のある態様では、本明細書に記載の方法および組成物を用いて、例えば発酵に基づく分子産生に有用な、生合成経路を合成するために有用なセンサータンパク質を設計することができる。本発明の別の態様では、本明細書に記載の方法および組成物を用いて、現在当業者に用いられているＴｅｔ－Ｏｎシステムなどの方法に対して大幅に進歩した、哺乳動物細胞培養において使用するための、直交性の誘導型遺伝子発現系を設計することができる。本発明のさらに別の態様では、本明細書に記載の方法および組成物を用いて、現在当業者に用いられているＩＰＴＧに基づくシステムなどの方法に対して大幅に進歩した、例えば大規模発酵に有用な、誘導型遺伝子発現系を設計することもできる。

【０００６】

ある例示的な実施形態では、アロステリックＤＮＡ結合タンパク質の立体構造変化を誘導するコンパニオンアロステリックエフェクター（companion allosteric effector）に結合するアロステリックＤＮＡ結合タンパク質を作製および単離する方法が提供される。

【０００７】

本明細書において、「アロステリックタンパク質」という用語は、エフェクター分子に結合し、立体構造変化を受け、タンパク質の１または複数の活性の上昇または低下を生じるタンパク質を指す。本発明のアロステリックタンパク質は、誘導型遺伝子発現系（例えば、直交性遺伝子発現系）の一部および／またはセンサーであり得る。（概説については Liang et al. (2013) Biotech. and Bioeng. 110:1419参照）。アロステリックタンパク質は当業者に周知であり、転写因子、リボスイッチ、二成分シグナル伝達タンパク質、および核内ホルモン受容体などを含む。

【０００８】

本明細書において、「エフェクター分子」とは、アロステリックタンパク質に選択的に結合してその生物学的活性を制御する分子、例えば小分子、を指す。このように、エフェクター分子はリガンドとして働いて活性の１または複数を上昇または低下させ、そのような活性としては、酵素活性、遺伝子発現、および細胞シグナル伝達などが挙げられるが、これに限定されない。ある態様では、エフェクター分子はアロステリックタンパク質の活性を上昇させる、すなわちエフェクター分子は「アロステリック活性化因子（allosteric activator）」として機能する。別の態様では、エフェクター分子はアロステリックタンパク質の活性を低下させる、すなわちエフェクター分子は「アロステリック阻害剤（allosteric inhibitor）」として機能する。

【０００９】

ある例示的な実施形態では、所望のコンパニオンアロステリックエフェクターに対する結合ポケットを有する候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がインシリコで計算的に設計される。候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸配列が提供され、続いて、細菌宿主細胞に導入されて候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質を発現する。

【００１０】

ある例示的な実施形態では、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して遺伝子の発現を阻害するかどうかがネガティブセレクションを用いて決定され、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して遺伝子の発現を阻害している第１の複数の微生物（例えば、細菌宿主細胞（例えば、大腸菌または枯草菌））が同定される。ＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して遺伝子の発現を阻害している場合、微生物（例えば、細菌宿主細胞）は生存することになる。ＤＮＡに結合していない候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質は遺伝子の発現を活性化し、そのアロステリックＤＮＡ結合タンパク質を有する細菌宿主細胞は死滅することになる。

【００１１】

ある例示的な実施形態では、第１の複数の細菌宿主細胞中の候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質が所望のコンパニオンアロステリックエフェクターに結合するかどうかがポジティブセレクションを用いて決定され、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がコンパニオンアロステリックエフェクターに結合した第２の複数の細菌宿主細胞が同定される。第１の複数の細菌宿主細胞に由来するプールされた候補ＤＮＡ結合タンパク質を、ポジティブセレクションにより所望のアロステリックエフェクター分子による活性化についてアッセイすることになる。ポジティブセレクションでは、所望のアロステリックエフェクター分子に応答する候補ＤＮＡ結合タンパク質を有する細菌宿主細胞のみが生存することになる。

【００１２】

微生物のゲノムを、必要に応じて、毒素に対する解毒剤をコードするＤＮＡを含むように遺伝子改変する。アロステリックタンパク質は、発現された場合、微生物内での解毒剤の産生を制御する。アロステリックタンパク質はその性質に応じて、アロステリックエフェクター非存在下での抑制、アロステリックエフェクター存在下での活性化、アロステリックエフェクター非存在下でのリボソーム結合部位の閉鎖（occlude）などにより解毒剤産生を制御することができる。微生物が毒素環境中に置かれ、解毒剤の産生がないまたは不十分である場合、微生物は死滅することになる。所望のアロステリックエフェクターは外部から（exogenously）供給されてもよい。

【００１３】

微生物は、必要に応じて、解毒剤に対応する毒素の環境中に置かれる。このように、存在するアロステリックエフェクターのレベルに応答して、且つ細胞が死滅するのを防ぐのに十分である量で、細胞によって解毒剤が産生される限りは、解毒剤は本明細書で「セレクター」と呼ばれる。アロステリックエフェクターのレベルに比例している解毒剤のレベルにより、さらなる改変および最適化のための候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質を含む株が選択される。

【００１４】

本発明のある態様では、ネガティブセレクションには、遺伝子を発現する細胞にとって有害である毒素に細菌宿主細胞を接触させることが含まれる。

【００１５】

本発明の別の態様では、ネガティブセレクションには、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して遺伝子の発現を阻害することがなかった細胞にとって有害である毒素に、細菌宿主細胞を接触させることが含まれる。

【００１６】

本発明のある態様では、ポジティブセレクションには、第１の複数の細菌宿主細胞を毒素およびコンパニオンアロステリックエフェクターに接触させることが含まれ、毒素は、遺伝子が発現されない細胞にとって有害である。

【００１７】

本発明のある態様では、ポジティブセレクションには、第１の複数の細菌宿主細胞を毒素およびアロステリックエフェクター標的に接触させることが含まれ、コンパニオンアロステリックエフェクターがＤＮＡから候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質を遊離させるような様式で候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質に結合することがなかった細胞にとって、毒素が有害である。

【００１８】

本発明のある態様では、ポジティブセレクションには、検出可能なマーカーを検出することが含まれ、この検出可能なマーカーは、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して遺伝子が発現している場合に第１の複数の細菌細胞中で発現される。

【００１９】

本発明のある態様では、検出可能なマーカーは、例えば蛍光活性化細胞選別（fluorescence activated cell sorting）によって検出可能な、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ））である。

【００２０】
本発明のある態様では、アロステリックＤＮＡ結合タンパク質は、蛍光レポーター（例えば、ＧＦＰ）の発現を制御し、その結果、アロステリックエフェクター分子によってアロステリックＤＮＡ結合タンパク質が活性化された場合に、蛍光レポーターが発現される。
【００２１】
本発明のある態様では、ネガティブセレクション後の第１の複数の細胞は、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）によってさらにスクリーニングされる。本発明のある態様では、ポジティブスクリーニングには、所望のアロステリックエフェクターに対する候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質の活性化を評価することが含まれ、蛍光レポーターの発現により活性化を示す候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質のみが、ＦＡＣＳによりソートおよび回収される。
【００２２】
本発明のある態様では、ポジティブセレクションには、コンパニオンアロステリックエフェクターがＤＮＡから候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質を遊離させるような様式で候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質に結合しなかった場合に第１の複数の細菌細胞中で発現される、検出可能なマーカーを検出することがさらに含まれる。
【００２３】
ある例示的な実施形態では、アロステリックＤＮＡ結合タンパク質の立体構造変化を誘導するコンパニオンアロステリックエフェクターに結合するアロステリックＤＮＡ結合タンパク質を作製および単離する方法が提供される。方法には、コンパニオンアロステリックエフェクターに対する結合ポケットを有する候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をインシリコで計算的に設計すること、およびこの候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸配列を提供することが含まれる。方法にはさらに、核酸配列を大腸菌宿主細胞に導入すること、および候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質を発現させることが含まれる。
【００２４】
方法には、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して遺伝子の発現を阻害するかどうかをネガティブセレクションを用いて決定して、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して遺伝子の発現を阻害している第１の複数の大腸菌宿主細胞を同定することが含まれる。
【００２５】
方法にはまた、第１の複数の大腸菌宿主細胞中の候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がコンパニオンアロステリックエフェクターに結合するかどうかをポジティブセレクションを用いて決定して、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がコンパニオンアロステリックエフェクターに結合した第２の複数の大腸菌宿主細胞を同定することが含まれる。
【００２６】
本発明のある態様では、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸配列が、基体（substrate）に結合した核酸部分配列（subsequence）から作成され、且つ、連結されて候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸配列を形成する。
【００２７】
本発明の別の態様では、ネガティブセレクションには、その遺伝子を発現する細胞にとって有害である毒素に細菌宿主細胞を接触させることが含まれ、および／またはポジティブセレクションには、その遺伝子が発現されない細胞にとって有害である毒素およびコンパニオンアロステリックエフェクターに第１の複数の細菌宿主細胞を接触させることが含まれる。
【００２８】
ある例示的な実施形態では、アロステリックＤＮＡ結合タンパク質の立体構造変化を誘導するコンパニオンアロステリックエフェクターに結合するアロステリックＤＮＡ結合タ

ンパク質を作製および単離する方法が提供される。方法には、コンパニオンアロステリックエフェクターに対する結合ポケットを有する候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をインシリコで計算的に設計すること、基体に結合した核酸部分配列から作成された、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸配列を提供すること、および核酸配列を微生物に導入して候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質を発現させることが含まれる。

【００２９】

方法にはまた、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して遺伝子の発現を阻害するかどうかをネガティブセレクションを用いて決定して、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がＤＮＡに結合して遺伝子の発現を阻害している第１の複数の微生物を同定することが含まれる。

【００３０】

方法にはさらに、第１の複数の微生物中の候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がコンパニオンアロステリックエフェクターに結合するかどうかをポジティブセレクションを用いて決定して、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質がコンパニオンアロステリックエフェクターに結合した第２の複数の微生物を同定することが含まれる。

【００３１】

本発明のある態様では、基体はマイクロアレイである。本発明の別の態様では、基体に由来する複数の部分配列をマイクロアレイ上の配列から増幅し、組み合わせて、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸配列を形成する。

【００３２】

本発明のある態様では、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質をコードする核酸配列は、（例えば、エラープローンＰＣＲまたはコンビナトリアルＰＣＲにより）ランダムに作製される。

【００３３】

本発明のある態様では、候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質は抗毒素遺伝子に融合しており、この遺伝子が機能するためには、タンパク質読み枠がインタクトなままである必要がある。読み枠がインタクトでない候補アロステリックＤＮＡ結合タンパク質では抗毒素タンパク質が発現されず、細胞を毒素に晒すことによってそれらを有する宿主細胞は排除され得る。

【００３４】

本特許または出願ファイルは、カラーで作製された図面を含む。カラー図面を含む本特許または特許出願公開のコピーは、特許状へ申請し、必要な料金の支払うことで提供される。本発明の、前述した特徴およびその他の特徴、ならびに利点は、添付の図面と共に、具体的実施形態についての以下の詳細な説明からより十分に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００３５】

【図１】アロステリックタンパク質のデノボ設計（de novo design）のための本発明の例示的な実施形態に係る方法を模式的に示す図である。この方法は、インシリコ、インビトロ、およびインビボのステップを組み合わせて、高い結合親和性およびアロステリック性を示す新規なアロステリックタンパク質を合成する。

【図２】本発明のある実施形態に係るセンサー再設計ライブラリーの構築方法を模式的に示す図である。

【発明を実施するための形態】

【００３６】

本発明の実施形態は、タンパク質工学のための新規な方法および組成物を提供する。ある例示的な実施形態において、本発明のある方法では、候補タンパク質配列を計算的に設計するステップと、候補タンパク質配列をコードする核酸配列を合成するステップと、ネガティブセレクションステップおよびポジティブセレクションステップの各々を行うためのセレクションシステムを用いて候補タンパク質を同定するステップとが組み合わされる

。

【００３７】

本発明のある態様では、アロステリックタンパク質をコードする１種類または複数種類の外来性（exogenous）核酸を含むように微生物を遺伝子改変する。アロステリックタンパク質配列は公開文献の検索に基づいて同定することができる。例えば、エフェクターおよびアロステリックタンパク質の生合成経路は、以下の参照文献に十分に記載されている。ｃｄａＲ（Monterrubio et al. 2000 J. Bacteriol. 182(9):2672-4）、ｔｅｔＲ（Lutz and Bujard Nucleic Acids Res. 1997 25(6):1203-10）、ａｌｋＳ（Canosa et al. Mol. Micriobiol. 2000 35(4):791-9）、ｔｔｇＲ（Teran, et al. Antimicrob. Agents Chemother. 47(10):3067-72 (2003)）、ｂｔｕＢリボスイッチ（Nahvi, et al. Nucleic Acids Res. 32:143-150 (2004)）；グルカル酸（Moon, et al. Appl. Env. Microbiol. 75:589-595 (2009)）、ナリンゲニン（Santos, et al. Metabolic Engineering. 13:392-400 (2011)）、アルカン（Steen, et al. 463:559-562 (2009)）、コバラミン（Raux, et al. Cell Mol. Life Sci. 57:1880-1893. (2000)）、ムコン酸（Niu, et al. Biotechnol Prog. 18:201-211. (2002)）。本発明のある態様に係る使用に適したセンサー遺伝子の非網羅的リストを表１に示す。本明細書に記載の方法は、アロステリックタンパク質の産生を担う微生物のゲノム中に核酸を挿入するために用いることができる。

【００３８】

【表１】

センサー遺伝子	分子	センサーの種類
ｃｄａＲ	グルカル酸	転写活性化因子
ｔｔｇＲ	ナリンゲニン（フラボノイド）	転写抑制因子
ｂｔｕＢリボスイッチ	コバラミン	リボスイッチ
ｍｐｈＲ	マクロライド	転写抑制因子
ｔｅｔＲ	テトラサイクリン誘導体	転写抑制因子
ｂｅｎＭ	ムコン酸	転写活性化因子
ａｌｋＳ	中鎖ｎ－アルカン	転写活性化因子
ｘｙｌＲ	キシロース	転写活性化因子
ａｒａＣ	アラビノース	転写活性化因子
ｇｎｔＲ	グルコン酸	転写抑制因子
ｇａｌＳ	ガラクトース	転写抑制因子
ｔｒｐＲ	トリプトファン	転写抑制因子
ｑａｃＲ	ベルベリン	転写抑制因子
ｒｍｒＲ	フィトアレキシン	転写抑制因子
ｃｙｍＲ	クミン酸	転写抑制因子
ｍｅｌＲ	メリビオース	転写活性化因子
ｒａｆＲ	ラフィノース	転写活性化因子
ｎａｈＲ	サリチル酸	転写活性化因子
ｎｏｃＲ	ノパリン	転写活性化因子
ｃｌｃＲ	クロロ安息香酸	転写活性化因子
ｖａｒＲ	ヴァージニアマイシン	転写抑制因子
ｒｈａＲ	ラムノース	転写抑制因子
ＰｈｏＲ	リン酸	二成分系
ＭａｌＫ	リンゴ酸	二成分系
ＧｌｎＫ	グルタミン	二成分系
レチノイン酸受容体	レチノイン酸	核内ホルモン受容体
エストロゲン受容体	エストロゲン	核内ホルモン受容体
エクジソン受容体	エクジソン	核内ホルモン受容体

【００３９】

ある例示的な実施形態では、エフェクターの結合によりアロステリックな立体構造変化を受けないおよび／または不完全なアロステリック立体構造変化を受ける変異アロステリックタンパク質を発現する微生物を、ネガティブに選択する方法が提供される。別の例示的な実施形態では、アロステリックな立体構造変化を受けるおよび／またはエフェクター分子に結合する変異アロステリックタンパク質を発現する微生物を、ポジティブに選択する方法が提供される。

【００４０】

本発明のある態様では、毒素に対する解毒剤をコードする１種類または複数種類の外来性核酸を含むように微生物を遺伝子改変する。解毒剤と毒素のペアは当業者に公知であり、ＳＤＳ：ｔｏｌＣ、コリシン：ｔｏｌＣ（ネガティブセレクション）、カナマイシン：カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ、クロラムフェニコール：クロラムフェ

ニコールアシルトランスフェラーゼ、アンピシリン：ベータラクタマーゼ、テトラサイクリン：テトラサイクリン排出ポンプｔｅｔＡ、塩化ニッケル：テトラサイクリン排出ポンプｔｅｔＡ（ネガティブセレクション）、５－フルオロオロチン酸：ＵＲＡ３（ネガティブセレクション）が挙げられるが、これらに限定されない。形質転換された微生物は、適切な条件下で解毒剤を発現することが意図される。

【００４１】

任意の具体的な解毒剤の産生のための遺伝子は、当業者に公知である。例えば、上記解毒剤の遺伝子はｔｅｔＡ（Postle et al. Nucleic Acid Research 1984 12(12)4849-4863）ｔｏｌＣ（Fralick J. Bacteriol. 1996 178(19)5803-5805）クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（Shaw et al. J. Bacteriol. 1970 104(3):1095-1105）について、十分に記載されている。本明細書に記載の方法は、ＤＮＡ結合タンパク質の産生を担う微生物のゲノム中に、核酸を挿入するために用いることができる。

【００４２】

ある態様では、形質転換された組換え微生物は、解毒剤の産生を制御するアロステリックタンパク質を発現する。アロステリックタンパク質が発現された場合、アロステリックタンパク質の機能を変化させることによって解毒剤の発現を引き起こす標的アロステリックエフェクターがアロステリックタンパク質に結合しない限りは、解毒剤の発現を阻止（すなわち、抑制因子）することか、または発現を活性化（すなわち、活性化因子）できないかことかのいずれかにより、細胞による解毒剤遺伝子の発現を妨げる。いくつかの制御機構が有り得る。抑制因子であるアロステリック転写因子では、抑制因子タンパク質は、所望のアロステリックエフェクターが抑制因子に結合しない限り、解毒剤遺伝子の５′側のＤＮＡ領域に結合することによって解毒剤遺伝子の転写を阻止する。活性化因子であるアロステリック転写因子では、活性化因子は、所望のアロステリックエフェクターが活性化因子に結合する場合にのみ、解毒剤遺伝子の５′側のＤＮＡ領域にＲＮＡポリメラーゼを動員する。減弱（attenuating）アロステリックタンパク質では、アロステリックタンパク質は、解毒剤遺伝子の転写を制御する抑制因子の５′非翻訳領域中にコードされ、標的アロステリックエフェクターに結合した場合に、この抑制因子の翻訳を弱める（あらゆる目的のために、その全体が参照により援用される２０１３年３月１４日付で出願された米国特許出願第６１／７８１，３７３号参照）。

【００４３】

別の態様では、アロステリックタンパク質としては、エフェクター結合ドメインおよびＤＮＡ結合ドメインが同じポリペプチド鎖中に存在しない場合が挙げられ、例えば二成分系または核内ホルモン受容体が挙げられる。エフェクターが結合すると、エフェクター結合ドメインが１種類または複数種類の中間タンパク質を通じて信号を中継し、所定の座位の転写を制御する。

【００４４】

別の態様では、外部から提供された形質転換されたアロステリックエフェクターは、解毒剤の産生を促進するような様式でアロステリックタンパク質に結合する。ある態様では、解毒剤の産生は、アロステリックタンパク質に結合したアロステリックエフェクターの量に比例する。アロステリックエフェクターの非存在下では、アロステリックタンパク質は解毒剤の産生を妨げる。

【００４５】

本発明のある態様では、１種類または複数種類のアロステリックタンパク質を用いて微生物中の１種類または複数種類の検出可能なマーカーの発現が調節される。ある態様では、１種類または複数種類の検出可能なマーカーを毒素選択と組み合わせて用いる。別の態様では、１種類または複数種類の検出可能なマーカーを独立した（stand-alone）検出技術として用いる。ある態様では、アロステリックタンパク質および／またはアロステリックエフェクターは、検出可能に標識可能な部分（例えば、アミノ酸配列または核酸配列）またはマーカー（例えば、検出可能なマーカー）の発現を調節する。

【００４６】

検出可能なマーカーの例としては、種々の放射性部分、酵素、補欠分子族、蛍光マーカー、発光マーカー、生物発光マーカー、金属粒子、タンパク質－タンパク質結合対、およびタンパク質－抗体結合対などが挙げられる。検出可能なマーカーは種々の製造業者から市販されている。

【００４７】

本発明のある態様では、検出可能なタンパク質および／またはタンパク質タグが提供される。検出可能な蛍光タンパク質の例としては、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、およびフィコエリトリンなどが挙げられるが、これらに限定されない。検出可能な生物発光タンパク質の例としては、ルシフェラーゼ（例えば、細菌、ホタル、コメツキムシなど）、ルシフェリン、およびエクオリンなどが挙げられるが、これらに限定されない。検出可能な酵素システムの例としては、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、およびコリンエステラーゼなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【００４８】

ビオチンまたはその誘導体を検出可能な標識として用いてもよく、続いて、検出可能に標識されたアビジン／ストレプトアビジン誘導体（例えば、フィコエリトリン結合ストレプトアビジン）または検出可能に標識された抗ビオチン抗体を結合させてもよい。ジゴキシゲニンを発現させ、続いて、検出可能に標識された抗ジゴキシゲニン抗体（例えば、フルオレセイン化抗ジゴキシゲニン）を結合させてもよい。一般的に、検出可能に標識されたコンジュゲートパートナーを結合させて検出できる場合は、コンジュゲート対の任意のメンバーを検出オリゴヌクレオチド中に組み込み可能である。本明細書において、抗体という用語は、任意のクラスの抗体分子、またはＦａｂなどのその任意の部分断片を指す。

【００４９】

検出のためのその他の適切な標識としては、１種類または複数種類のタンパク質タグが挙げられる。本明細書において、「タンパク質タグ」という用語は、本発明のポリメラーゼに連結された異種ポリペプチド配列を指す。タンパク質タグとしては、Ａｖｉタグ（ＧＬＮＤＩＦＥＡＱＫＩＥＷＨＥ）（配列番号１）、カルモジュリンタグ（ＫＲＲＷＫＫＮＦＩＡＶＳＡＡＮＲＦＫＫＩＳＳＳＧＡＬ）（配列番号２）、ＦＬＡＧタグ（ＤＹＫＤＤＤＤＫ）（配列番号３）、ＨＡタグ（ＹＰＹＤＶＰＤＹＡ）（配列番号４）、Ｈｉｓタグ（ＨＨＨＨＨＨ）（配列番号５）、Ｍｙｃタグ（ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ）（配列番号６）、Ｓタグ（ＫＥＴＡＡＡＫＦＥＲＱＨＭＤＳ）（配列番号７）、ＳＢＰタグ（ＭＤＥＫＴＴＧＷＲＧＧＨＶＶＥＧＬＡＧＥＬＥＱＬＲＡＲＬＥＨＨＰＱＧＱＲＥＰ）（配列番号８）、Ｓｏｆｔａｇ１（ＳＬＡＥＬＬＮＡＧＬＧＧＳ）（配列番号９）、Ｓｏｆｔａｇ３（ＴＱＤＰＳＲＶＧ）（配列番号１７）、Ｖ５タグ（ＧＫＰＩＰＮＰＬＬＧＬＤＳＴ）（配列番号１０）、Ｘｐｒｅｓｓタグ（ＤＬＹＤＤＤＤＫ）（配列番号１１）、Ｉｓｏｐｅｔａｇ（ＴＤＫＤＭＴＩＴＦＴＮＫＫＤＡＥ）（配列番号１２）、ＳｐｙＴａｇ（ＡＨＩＶＭＶＤＡＹＫＰＴＫ）（配列番号１３）、およびｓｔｒｅｐｔａｃｔｉｎタグ（Ｓｔｒｅｐ－ｔａｇＩＩ：ＷＳＨＰＱＦＥＫ）（配列番号１４）などが挙げられるが、これらに限定されない。

【００５０】

使用される検出方法は、微生物中で使用される具体的な検出可能な標識によって決まり得る。ある例示的な実施形態では、微生物は、顕微鏡、分光光度計、チューブルミノメーターもしくはプレートルミノメーター、Ｘ線フィルム、磁場、シンチレーター、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）装置、マイクロフルイディクス装置、またはビーズベースの装置などを用いて、選択および／またはスクリーニングされ得る。

【００５１】

ある例示的な実施形態では、分子生物学の標準的な技術を用いて、宿主細胞中で候補タンパク質配列をコードする１種類または複数種類の核酸配列を発現させる。本明細書で使

用される標準的な組換えＤＮＡおよび分子クローニング技術は当該技術分野で周知であり、それぞれその全体が参照により本明細書に援用される、Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y., (1989) およびSilhavy, T.J., Bennan, M.L. and Enquist, L.W., Experiments with Gene Fusions; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y., (1984); およびAusubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience (1987) に記載されている。別の有用な方法は、それぞれその全体が参照により本明細書に援用される、Advanced Bacterial Genetics (Davis, Roth and Botstein, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980)、Experiments with Gene Fusions (Silhavy, Berman and Enquist, Cold Spring Harbor Laboratory, 1984)、Experiments in Molecular Genetics (Miller, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972)、Experimental Techniques in Bacterial Genetics (Maloy, in Jones and Bartlett, 1990)、およびA Short Course in Bacterial Genetics (Miller, Cold Spring Harbor Laboratory 1992) を含むマニュアルに記載されている。

【００５２】

本明細書において、「核酸」という用語は、ＤＮＡ分子（例えば、ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ）およびＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ）、ならびにヌクレオチド類似体（analog）を用いて作製されたＤＮＡまたはＲＮＡの類似体を含むことが意図される。核酸分子は、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。

【００５３】

本明細書において、「アミノ酸」という用語には、塩基性アミノ基および酸性カルボキシル基の両方を含む有機化合物が含まれる。この用語には、天然アミノ酸（例えば、Ｌ－アミノ酸）、修飾および異常アミノ酸（例えば、Ｄ－アミノ酸および　－アミノ酸）、ならびに生物学的には遊離または結合した形態で存在することが知られているが通常タンパク質中には存在しないアミノ酸が含まれる。天然タンパク質に存在するアミノ酸としては、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、およびバリンが挙げられる。天然非タンパク質アミノ酸としては、アルギノコハク酸、シトルリン、システインスルフィン酸、３，４－ジヒドロキシフェニルアラニン、ホモシステイン、ホモセリン、オルニチン、３－モノヨードチロシン、３，５－ジヨードチロシン、３，５，５，－トリヨードサイロニン、および３，３’，５，５’－テトラヨードサイロニンが挙げられる。修飾または異常アミノ酸としては、Ｄ－アミノ酸、ヒドロキシリジン、４－ヒドロキシプロリン、Ｎ－Ｃｂｚ－保護アミノ酸、２，４－ジアミノ酪酸、ホモアルギニン、ノルロイシン、Ｎ－メチルアミノ酪酸、ナフチルアラニン、フェニルグリシン、α－フェニルプロリン、ｔｅｒｔ－ロイシン、４－アミノシクロヘキシルアラニン、Ｎメチル－ノルロイシン、３，４－デヒドロプロリン、Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノグリシン、Ｎ－メチルアミノグリシン、４－アミノピペリジン－４－カルボン酸、６－アミノカプロン酸、トランス－４－（アミノメチル）－シクロヘキサンカルボン酸、２－、３－、および４－（アミノメチル）－安息香酸、１－アミノシクロペンタンカルボン酸、１－アミノシクロプロパンカルボン酸、および２－ベンジル－５－アミノペンタン酸が挙げられる。

【００５４】

本明細書において、「ペプチド」という用語には、ペプチド結合によって連結された２個以上のアミノ酸からなる化合物が含まれる。ペプチドの分子量は１０，０００ダルトン未満、５，０００ダルトン未満、または２，５００ダルトン未満であってもよい。「ペプチド」という用語にはまた、偽ペプチドもしくはペプチド模倣残基または他の非アミノ酸成分などの非ペプチド成分とペプチド成分の両方を含む化合物も含まれる。ペプチド成分と非ペプチド成分の両方を含むそのような化合物は、「ペプチド類似体」と呼ばれることもある。

【００５５】

本明細書において、「タンパク質」という用語には、線状鎖（linear chain）状に配列され、隣接アミノ酸残基のカルボキシル基とアミノ基との間のペプチド結合によって互いに連結されたアミノ酸からなる化合物が含まれる。

【００５６】

微生物は、当業者に公知の方法により、遺伝子が欠失するか、または遺伝子が組み込まれるよう、遺伝子改変されてもよい。種々の宿主細胞の形質転換に有用なベクターおよびプラスミドは公知であり、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社（カリフォルニア州、カールズバッド）、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社（カリフォルニア州、ラ・ホーヤ）、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社（マサチューセッツ州、ベバリー）、およびＡｄｄｇｅｎｅ社（マサチューセッツ州、ケンブリッジ）などの会社から市販されている。

【００５７】

本発明のある態様は、例えば発現ベクターなどのベクターに関する。本明細書において、「ベクター」という用語は、それに連結された別の核酸を輸送可能な核酸配列を指す。ベクターの一種が「プラスミド」であり、これは、付加的なＤＮＡ断片を連結可能な環状二本鎖ＤＮＡループを指す。別の種類のベクターが、ウイルスゲノム中に付加的なＤＮＡ断片を連結可能なウイルスベクターである。例えば、限定されるものではないが、本発明のベクターは、例えば、これらに限定されないが、ＢＡＣ（バクテリア人工染色体）、フォスミド、コスミド、プラスミド、自殺プラスミド（suicide plasmid）、シャトルベクター、Ｐ１ベクター、エピソーム、ＹＡＣ（酵母人工染色体）、バクテリオファージもしくはウイルスゲノム、または任意の他の適切なベクターを含む、シングルコピーまたはマルチコピーのベクターであってもよい。宿主細胞は、ベクターが複製可能な原核細胞および真核細胞を含む、任意の細胞であってもよい。

【００５８】

特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞中で自律的に複製可能である（例えば、細菌複製開始点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。その他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中に導入されると宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それにより、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターは、それらが作働可能なように連結された（operatively linked）遺伝子の発現を誘導することが可能である。そのようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。一般的に、組換えＤＮＡ技術において有用な発現ベクターは、多くの場合プラスミドの形態である。本明細書中、「プラスミド」および「ベクター」は、交換可能に使用され得る。しかし、本発明には、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）などの同等の機能を果たす他の形態の発現ベクターが含まれることが意図される。

【００５９】

ある例示的な実施形態では、例えばフォスミドなどの細菌発現ベクターを用いて細菌細胞中で本明細書に記載の外来性核酸を発現させる。フォスミドとは、細菌のＦ－プラスミドに基づくクローニングベクターである。宿主細菌は通常、１個のフォスミド分子だけを含むが、より多くのコピー数を得ることができるよう、誘導可能な高コピーｏｒｉが含まれていてもよい（例えば、ｐＣＣ１ＦＯＳ（商標）、ｐＣＣ２ＦＯＳ（商標））。フォスミドライブラリーは、複雑なゲノムから安定なライブラリーを構築するために特に有用である。フォスミドおよびフォスミドライブラリー作成キットが市販されている（ＥＰＩＣＥＮＴＲＥ（登録商標）　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社、ウィスコンシン州、マディソン）。原核細胞および真核細胞の両方のためのその他の適切な発現系については、Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989の第１６章および第１７章を参照されたい。

【００６０】

ある例示的な実施形態では、組換え発現ベクターは、宿主細胞中での核酸配列の発現に適した形態の核酸配列を含む。このことは、組換え発現ベクターが、発現に使用される宿

主細胞に基づいて選択される、発現される核酸配列に作働可能なように連結された１種類または複数種類の制御配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内で「作働可能なように連結された」とは、本明細書に記載の複数のリボ核酸配列をコードする外来核酸配列が、核酸配列の発現が可能となるような様式で制御配列に連結されていることを意味することが意図される。「制御配列」という用語には、プロモーター、エンハンサー、およびその他の発現調節エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）が含まれることが意図される。そのような制御配列は、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) に記載されている。当業者には、発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、および所望のタンパク質の発現レベルなどの要因に依存し得ることが理解されよう。

【００６１】

本発明の別の態様は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書中で交換可能に使用される。このような用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫も指すと理解される。変異または環境的影響のため、後の世代において一定の改変が生じ得るので、そのような子孫は事実上、親細胞と同一でないこともあるが、本明細書で使用される用語の範囲内に含まれる。

【００６２】

本開示に係る細胞としては、本明細書に記載されているように外来核酸（foreign nucleic acid）を導入および発現することが可能な、任意の細胞が挙げられる。本明細書に記載されている本開示の基本的概念は、細胞の種類によって限定されないと理解されるべきである。本開示に係る細胞としては、真核細胞、原核細胞、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、真菌細胞、古細菌細胞、真正細菌細胞、ビリオン、ビロソーム、ウイルス様粒子、寄生微生物、および感染性タンパク質などが挙げられる。細胞には、真核細胞、例えば、酵母細胞、植物細胞、および動物細胞が挙げられる。具体的な細胞としては、細菌細胞が挙げられる。その他の適切な細胞は当業者に公知である。

【００６３】

外来核酸（すなわち、細胞の天然核酸組成物の一部でないもの）は、当業者に公知の任意の導入方法を用いて細胞に導入されてもよい。そのような方法としては、遺伝子導入法、形質導入法、感染（例えば、ウイルス形質導入法）、インジェクション法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法、ヌクレオフェクション法、ナノ粒子銃法（nanoparticle bombardment）、形質転換法、接合法（conjugation）、核酸を含むゲル、オイル、もしくはクリームの適用、エレクトロポレーション法、脂質系トランスフェクション試薬の使用、または任意の他の適切なトランスフェクション法が挙げられる。当業者は、容易に特定可能な文献資料を用いてそのような方法を容易に理解し、適用するであろう。

【００６４】

本明細書において、「形質転換」および「トランスフェクション」という用語は、宿主細胞に外来核酸を導入するための、当該技術分野で知られている種々の技術、例えばリン酸カルシウムもしくは塩化カルシウムとの共沈、ＤＥＡＥ－デキストランによるトランスフェクション、リポフェクション（例えば、市販の試薬、例えばＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮ（登録商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社、カリフォルニア州、サンディエゴ）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（登録商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）、ＦＵＧＥＮＥ（登録商標）（Ｒｏｃｈｅ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｓｃｉｅｎｃｅ社、スイス、バーゼル）、ＪＥＴＰＥＩ（商標）（Ｐｏｌｙｐｌｕｓ－ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ社、ニューヨーク州、ニューヨーク）、ＥＦＦＥＣＴＥＮＥ（登録商標）（Ｑｉａｇｅｎ社、カリフォルニア州、バレンシア）、ＤＲＥＡＭＦＥＣＴ（商標）（ＯＺ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社、フランス）などを使用）、またはエレクトロポレーション（例えば、インビボ エレクトロポレーション）を指すことが意図される。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションするための適切な方法は、Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spr

ing Harbor, N.Y., 1989)、および他の実験マニュアルに見出すことができる。

【００６５】

通常は、ベクターまたはプラスミドには、関連する１種類または複数種類の遺伝子と、選択マーカーと、自律的複製または染色体組込みを可能にする配列との転写および翻訳を誘導する配列が含まれる。適切なベクターには、転写開始調節領域を有する遺伝子である５′側の領域、および転写終結を調節するＤＮＡ断片である３′側の領域が含まれる。これらの調節領域はいずれも、形質転換された宿主細胞に相同な遺伝子に由来し得るが、そのような調節領域は産生宿主として選択された種には自然に存在しない遺伝子に由来していてもよいと理解されるべきである。

【００６６】

所望の宿主細胞において関連経路コード領域の発現をドライブするのに有用な開始調節領域またはプロモーターは多数存在し、当業者によく知られている。これらの遺伝要素をドライブすることが可能な実質的に全てのプロモーターが本発明に適している。そのようなプロモーターとしては、ｌａｃ、ａｒａ、ｔｅｔ、ｔｒｐ、IP_L、IP_R、Ｔ７、ｔａｃ、およびｔｒｃ（大腸菌および緑膿菌における発現に有用）；枯草菌（Bacillus subtilis）およびバチルス・リケニフォルミス（Bacillus licheniformis）における発現に有用なａｍｙ、ａｐｒ、ｎｐｒプロモーターおよび種々のファージプロモーター；ｎｉｓＡ（グラム陽性細菌における発現に有用、Eichenbaum et al. Appl. Environ. Microbiol. 64(8):2763-2769 (1998)）；および合成Ｐ１１プロモーター（ラクトバチルス・プランタルム（Lactobacillus plantarum）における発現に有用、Rud et al., Microbiology 152:1011-1019 (2006)）が挙げられるが、これらに限定されない。終結調節領域も、好ましい宿主に天然に存在する種々の遺伝子に由来し得る。

【００６７】

特定のベクターは、幅広い宿主細菌中で複製することが可能であり、接合により導入され得る。ｐＲＫ４０４および３つの関連ベクターであるｐＲＫ４３７、ｐＲＫ４４２、およびｐＲＫ４４２（Ｈ）の注釈付き（annotated）の全配列が利用可能である。これらの誘導体は、グラム陰性細菌における遺伝子操作のための有用なツールであることが証明されている（Scott et al., Plasmid 50(1):74-79 (2003)）。広宿主域Ｉｎｃ　Ｐ４プラスミドＲＳＦ１０１０の複数のプラスミド誘導体も、幅広いグラム陰性細菌において機能し得るプロモーターと共に使用可能である。プラスミドであるｐＡＹＣ３６およびｐＡＹＣ３７は、マルチクローニングサイトと共に活性プロモーターを有し、グラム陰性細菌における異種遺伝子発現を可能にする。

【００６８】

染色体遺伝子置換ツールも広く利用可能である。例えば、広宿主域レプリコンｐＷＶ１０１の熱感受変異体を改変して、幅広いグラム陽性細菌において遺伝子置換を行うために用いることができる、プラスミドｐＶＥ６００２が構築されている（Maguin et al., J. Bacteriol. 174(17):5633-5638 (1992)）。さらに、ＥＰＩＣＥＮＴＲＥ（登録商標）社（マディソン、ウィスコンシン州）などの商業的製造業者由来の、種々のゲノムにおいてランダム変異を作成するためのインビトロトランスポソームが利用可能である。

【００６９】

大腸菌の形質転換に有用なベクターは一般的であり、市販されている。例えば、所望の遺伝子が、種々のソースから単離され、改変ｐＵＣ１９ベクターにクローニングされ、大腸菌宿主細胞に形質転換され得る。あるいは、所望の生合成経路をコードする遺伝子が、複数のオペロンに分割され、発現ベクターにクローニングされ、種々の大腸菌株に形質転換され得る。

【００７０】

ラクトバチルス（Lactobacillus）属はラクトバチルス目（Lactobacillales）の科に属し、枯草菌およびストレプトコッカス（Streptococcus）の形質転換に使用される多くのプラスミドおよびベクターがラクトバチルス属に用いられ得る。適切なベクターの非限定的な例としては、ｐＡＭ　１およびその誘導体（Renault et al., Gene 183:175-182 (19

96)；およびO'Sullivan et al., Gene 137:227-231 (1993))；ｐＭＢＢ１、およびｐＭＢＢ１の誘導体であるｐＨＷ８００（Wyckoff et al. Appl. Environ. Microbiol. 62:1481-1486 (1996))；接合性プラスミドｐＭＧ１（Tanimoto et al., J. Bacteriol. 184:5800-5804 (2002))；ｐＮＺ９５２０（Kleerebezem et al., Appl. Environ. Microbiol. 63:4581-4584 (1997))；ｐＡＭ４０１（Fujimoto et al., Appl. Environ. Microbiol. 67:1262-1267 (2001))；およびｐＡＴ３９２（Arthur et al., Antimicrob. Agents Chemother. 38:1899-1903 (1994))が挙げられる。ラクトバチルス・プランタルムに由来する複数のプラスミドも報告されており（van Kranenburg R, Golic N, Bongers R, Leer R J, de Vos W M, Siezen R J, Kleerebezem M. Appl. Environ. Microbiol. 2005 March; 71(3): 1223-1230）、これらは形質転換に使用され得る。

【００７１】

開始調節領域またはプロモーターは、所望のラクトバチルス宿主細胞における関連経路コード領域の発現をドライブするのに有用であり、ラクトバチルスまたは他の乳酸菌、あるいは他のグラム陽性生物から得ることができる。非限定的な例としては、ラクトコッカス（Lactococcus）に由来するｎｉｓＡプロモーターが挙げられる。終結調節領域もまた、好ましい宿主または関連する細菌に天然に存在する種々の遺伝子に由来し得る。

【００７２】

所望の生合成または他の所望の経路のための種々の遺伝子は、上記のような任意の適切なベクター中にアセンブルされてもよい。ラクトバチルス・プランタルムまたはラクトバチルス・アリゾネンシス（Lactobacillus arizonensis）などの宿主株のゲノム配列から推定されるコドンインデックスに基づいて、コドンを発現に最適化することができる。プラスミドは、以下の参照文献のCruz-Rodz et al. (Molecular Genetics and Genomics 224:1252-154 (1990)), Bringel and Hubert (Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 664-670 (1990))、およびTeresa Alegre, Rodriguez and Mesas (FEMS Microbiology Letters 241:73-77 (2004)) のいずれかに記載されているように、エレクトロポレーションなどの当該技術分野で公知の方法を用いて、宿主細胞に導入してもよい。接合によりプラスミドをラクトバチルス・プランタルムに導入することもできる（Shrago, Chassy and Dobrogosz Appl. Environ. Micro. 52: 574-576 (1986)）。組込みベクターを用いて、所望の生合成経路遺伝子をラクトバチルスの染色体中に組み込むこともできる（Hols et al. Appl. Environ. Micro. 60:1401-1403 (1990); Jang et al. Micro. Lett. 24:191-195 (2003)）。

【００７３】

宿主細胞となり得、本明細書に記載されているように組換え微生物を産生するよう遺伝子改変され得る微生物としては、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、および抗酸菌などが挙げられるが、これらに限定されない。

【００７４】

本明細書において、グラム陽性細菌としては、アクチノマヅラ（Actinomedurae）、アクチノマイセス・イスラエリ（Actinomyces israelii）、バチルス・アンシラシス（Bacillus anthracis）、バチルス・セレウス（Bacillus cereus）、クロストリジウム・ボツリヌム（Clostridium botulinum）、クロストリジウム・ディフィシル（Clostridium difficile）、クロストリジウム・パーフリンゲンス（Clostridium perfringens）、クロストリジウム・テタニ（Clostridium tetani）、コリネバクテリウム（Corynebacterium）、エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）、リステリア・モノサイトゲネス（Listeria monocytogenes）、ノカルディア（Nocardia）、プロピオニバクテリウム・アクネス（Propionibacterium acnes）、スタフィロコッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus）、スタフィロコッカス・エピデルミディス（Staphylococcus epiderm）、ストレプトコッカス・ミュータンス（Streptococcus mutans）、及びストレプトコッカス・ニューモニアエ（Streptococcus pneumoniae）などが挙げられるが、これらに限定されない。

【００７５】

本明細書において、グラム陰性細菌としては、アフピア・フェリス（Afipia felis）、バクテロイデス（Bacteriodes）、バルトネラ・バシリホルミス（Bartonella bacilliformis）、ボルデテラ・パーツシス（Bortadella pertussis）、ボレリア・ブルグドルフェリ（Borrelia burgdorferi）、ボレリア‐レカレンチス（Borrelia recurrentis）、ブルセラ（Brucella）、肉芽腫カリマトバクテリウム（Calymmatobacterium granulomatis）、カンピロバクター（Campylobacter）、大腸菌（Escherichia coli）、フランシセラ・ツラレンシス（Francisella tularensis）、ガードネレラ・バギナリス（Gardnerella vaginalis）、ヘモフィラス・エジプティウス（Haemophilius aegyptius）、ヘモフィラス・デュクレイー（Haemophilius ducreyi）、ヘモフィラス・インフルエンザエ（Haemophilius influenziae）、ヘリコバクター・ピロリ（Heliobacter pylori）、レジオネラ・ニューモフィラ（Legionella pneumophila）、レプトスピラ・インターロガンス（Leptospira interrogans）、ナイセリア・メニンジティディス（Neisseria meningitidia）、ポルフィロモナス・ジンジバリス（Porphyromonas gingivalis）、プロビデンシア・スチューアーティイ（Providencia sturti）、シュードモナス・エルジノーサ（Pseudomonas aeruginosa）、サルモネラ・エンテリティディス（Salmonella enteridis）、サルモネラ・ティフィ（Salmonella typhi）、セラチア・マルセッセンス（Serratia marcescens）、シゲラ・ボイディイ（Shigella boydii）、ストレプトバチルス・モニリフォルミス（Streptobacillus moniliformis）、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）、トレポネーマ・パリダム（Treponema pallidum）、ビブリオ・コレラエ（Vibrio cholerae）、エルシニア・エンテロコリティカ（Yersinia enterocolitica）、およびエルシニア・ペスティス（Yersinia pestis）などが挙げられるが、これらに限定されない。

【００７６】

本明細書において、抗酸菌としては、マイコバクテリウム・アビウム（Myobacterium avium）、マイコバクテリウム・レプラエ（Myobacterium leprae）、およびマイコバクテリウム・ツベルクローシス（Myobacterium tuberculosis）などが挙げられるが、これらに限定されない。

【００７７】

本明細書において、他の３つのカテゴリーに入らないその他の細菌としては、バルトネラ・ヘンセラエ（Bartonella henseiae）、クラミジア・シタッシ（Chlamydia psittaci）、クラミジア・トラコマチス（Chlamydia trachomatis）、コクシエラ・バーネッティイ（Coxiella burnetii）、マイコプラズマ・ニューモニアエ（Mycoplasma pneumoniae）、リケッチア・アカリ（Rickettsia akari）、リケッチア・ロワゼキイ（Rickettsia prowazekii）、リケッチア・リケッチイ（Rickettsia rickettsii）、リケッチア・ツツガムシ（Rickettsia tsutsugamushi）、リケッチア・ティフィー（Rickettsia typhi）、ウレアプラズマ・ウレアリティカム（Ureaplasma urealyticum）、ディプロコッカス・ニューモニエ（Diplococcus pneumoniae）、エールリキア・シャフィンシス（Ehrlichia chafensis）、エンテロコッカス・フェシウム（Enterococcus faecium）、および髄膜炎菌（Meningococci）などが挙げられるが、これらに限定されない。

【００７８】

ある態様では、宿主細胞となり得、本明細書に記載されているように組換え微生物を産生するよう遺伝子改変され得る微生物としては、クロストリジウム属（Clostridium）、エシェリキア属（Escherichia）、ロドコッカス属（Rhodococcus）、シュードモナス属（Pseudomonas）、バチルス属（Bacillus）、ラクトバチルス属（Lactobacillus）、サッカロミセス属（Saccharomyces）、およびエンテロコッカス属（Enterococcus）が挙げられるが、これらに限定されない。特に適した微生物としては、大腸菌（Escherichia coli）、枯草菌（Bacillus subtilis）、および出芽酵母（Saccharomyces cerevisiae）が挙げられる。

【００７９】

本発明のある態様では、ファージおよびその遺伝子材料が提供される。本明細書において、「ファージ」および「バクテリオファージ」という用語は、交換可能に使用される。

ファージは、それらの遺伝子構成および／またはそれらのビリオン形態に基づいて互いに区別することができる。コルチコウイルス科、リポスリクスウイルス科、プラズマウイルス科、ミロウイルス科、シホウイルス科、スルホロブス・シバタエ（sulfolobus shibate）、ポドウイルス科、テクティウイルス科、およびフセロウイルス科のファージを含む一部のファージは、二本鎖ＤＮＡゲノムを有する。ミクロウイルス科およびイノウイルス科のファージを含む他のファージは、一本鎖ＤＮＡゲノムを有する。レビウイルス科およびシストウイルス科のファージを含む他のファージはＲＮＡゲノムを有する。例示的なバクテリオファージとしては、Ｗｐｈｉ、Ｍｕ、Ｔ１、Ｔ２、Ｔ３、Ｔ４、Ｔ５、Ｔ６、Ｔ７、Ｐ１、Ｐ２、Ｐ４、Ｐ２２、ｆｄ、ｐｈｉ６、ｐｈｉ２９、ｐｈｉＣ３１、ｐｈｉ８０、ｐｈｉＸ１７４、ＳＰ０１、Ｍ１３、ＭＳ２、ＰＭ２、ＳＳＶ－１、Ｌ５、ＰＲＤ１、Ｑベータ、ラムダ、ＵＣ－１、ＨＫ９７、およびＨＫ０２２などが挙げられるが、これらに限定されない。

【００８０】

ある例示的な実施形態では、本明細書に記載の１種類または複数種類のアロステリックタンパク質をコードする核酸が結合したマイクロアレイが提供される。本明細書において、「マイクロアレイ」とは、ある実施形態では、固定されたハイブリダイゼーションプローブを各々が含む空間的に規定された一連の非重複の領域または部位が存在する実質的に平面状の表面を有する、固相支持体を含む多重アッセイ製品の一種を指す。「実質的に平面状」とは、表面上のプローブ部位などの目的の特徴または物体が、表面の上または下に広がる体積を占有してもよく、且つ、その寸法が表面の寸法に比べて小さいことを意味する。例えば、光ファイバー束の面上に配置されたビーズは、プローブ部位の実質的に平面状の表面を形成する。あるいは、多孔性の平面状基体上に配置されたか、または多孔性の平面状基体上で合成されたオリゴヌクレオチドは、実質的に平面状の表面を形成する。空間的に規定された部位はさらに、その位置、およびその位置での固定化プローブのアイデンティティーが既知であるかまたは決定可能である点で、「アドレス可能（addressable）」であり得る。マイクロアレイ上に固定化されたプローブとしては、アッセイ反応中でまたはアッセイ反応により産生されるオリゴヌクレオチドバーコードなどの核酸が挙げられる。一般的には、マイクロアレイ上のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは一本鎖であり、通常は５′末端または３′末端により、固相支持体に共有結合している。マイクロアレイ中の核酸を含む非重複領域の密度は通常、１ｃｍ^{2}あたり１００毎超、より好ましくは１ｃｍ^{2}あたり１０００超である。核酸プローブに関連するマイクロアレイ技術は、以下の例示的な参照文献：Schena, Editor, Microarrays: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 2000); Southern, Current Opin. Chem. Biol., 2: 404-410 (1998); Nature Genetics Supplement, 21:1-60 (1999)；およびFodor et al.、米国特許第５，４２４，１８６号；同第５，４４５，９３４号；および同第５，７４４，３０５号に概説されている。マイクロアレイには、平面状表面上もしくはウェル中、またはビーズを隔てるのに用いられ得るその他の物理的立体構造中に配置されているかまたは単独の、マイクロビーズまたはその他の微粒子のアレイが含まれ得る。そのようなマイクロアレイは、以下の例示的な参照文献：Brenner et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18:630；Tulley et al.、米国特許第６，１３３，０４３；Stuelpnagel et al.、米国特許第６，３９６，９９５；Chee et al.、および米国特許第６，５４４，７３２号などに開示されているように、種々の方法で形成され得る。あるフォーマットでは、表面にオリゴヌクレオチドが結合したマイクロビーズをランダムに配置することによりマイクロアレイが形成され、続いて、例えばGunderson et al.、米国特許出願公開第２００３／００９６２３９号に開示されているように、解読手順（decoding procedure）により、どのマイクロビーズがどのオリゴヌクレオチドを有しているかが決定される。

【００８１】

「マイクロアレイ」または「アレイ」はまた、支持体マトリックス上に分布する核酸分子の異種プールを指すことがある。核酸は、支持体に共有結合的または非共有結合的に結合し得る。好ましくは、核酸分子は、アレイの個別の特徴の同定を可能とするような十分

な距離を互いに置いて配置される。アレイ上の核酸は非重複であってもよく、部分的に重複していてもよい。核酸プールを支持媒体に転写する（transfer）方法は、米国特許第６，４３２，３６０号に記載されている。本明細書に記載の方法に有用なビーズに基づく方法は、国際出願ＰＣＴ／ＵＳ０５／０４３７３号に開示されている。

【００８２】

「増幅」には、プライムド酵素合成（primed enzymatic synthesis）の反復によるアレイの核酸分子またはビーズに結合した核酸分子のコピーの産生が含まれる。「ｉｎ　ｓｉｔｕ」増幅は、増幅が、溶液中ではなく支持体またはビーズ上に配置された鋳型核酸分子を用いて起こることを意味した。ｉｎ　ｓｉｔｕ増幅方法は、米国特許第６，４３２，３６０号に記載されている。

【００８３】

「支持体」とは、その上に核酸アレイの核酸分子が配置されるマトリックスを指し得る。支持体は固体、半固体、またはゲルであってもよい。「半固体」とは、固体成分および液体の両方を含む圧縮性マトリックスを指し、液体が、固体マトリックス要素間の細孔、空間、またはその他の隙間を占有している。半固体支持体は、ポリアクリルアミド、セルロース、ポリアミド（ナイロン）、ならびに架橋されたアガロース、デキストラン、およびポリエチレングリコールから選択することができる。

【００８４】

「ランダムにパターン化された」または「ランダムな」とは、支持体上での核酸分子の不規則な非デカルト分布（言い換えると、格子のｘ軸またはｙ軸に沿った所定の点、または放射状パターンの中心からの明確な「クロックポジション」、角度、もしくは半径では配置されていない）を指し、これは、意図的な設計（またはそのような設計を実現し得るプログラム）または個別の核酸特徴の配置によっても達成されない。そのような「ランダムにパターン化された」または「ランダムな」核酸のアレイは、核酸分子のプールを含む溶液、エマルション、エアロゾル、蒸気、または乾燥調製物を、支持体上に滴下、噴霧、プレーティング、または塗布して、支持体上の特定の位置へと核酸分子を導くような介入をせずに、支持体上に核酸分子を定着させることにより達成され得る。本発明のアレイはランダムにパターン化されてもよいか、またはランダムであってよい。

【００８５】

本明細書において、「結合する」という用語は、共有結合性相互作用および非共有結合性相互作用の両方を指す。共有結合性相互作用には、一対の電子の共有（すなわち、単結合）、２対の電子の共有（すなわち、二重結合）、または３対の電子の共有（すなわち、三重結合）によって形成される２個の原子またはラジカル間の化学結合（chemical linkage）である。共有結合性相互作用は、当該技術分野で電子対相互作用または電子対結合としても知られる。非共有結合性相互作用としては、限定されるものではないが、ファンデルワールス相互作用、水素結合、弱い化学結合（すなわち、短距離非共有力による）、疎水性相互作用、およびイオン結合などが挙げられる。非共有結合性相互作用の概説は、Alberts et al., in Molecular Biology of the Cell, 3d edition, Garland Publishing, 1994に見出すことができる。

【００８６】

本発明のある態様では、アロステリックタンパク質をコードするために、１種類または複数種類の核酸配列を「ステッチ（stitching）」するための方法および組成物が提供される。本明細書において「ステッチ」という用語は、例えばバーコードクロスオーバーＰＣＲなどの増幅反応または伸長反応による、複数の核酸配列の連結を指す。

【００８７】

ある態様では、核酸配列を増幅する方法が提供される。核酸を増幅する一般的な方法としては、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）（例えば、Mullis et al. (1986) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51 Pt 1:263およびCleary et al. (2004) Nature Methods 1:241；および米国特許第４，６８３，１９５号および同第４，６８３，２０２号参照）、アンカーＰＣＲ、ＲＡＣＥ　ＰＣＲ、ライゲーション連鎖反応（ＬＣＲ）（例えば、Land

egran et al. (1988) Science 241:1077-1080；および Nakazawa et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:360-364参照）、自家持続配列複製法（Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1874）、転写増幅システム（Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:1173）、Ｑ－Ｂｅｔａ　Ｒｅｐｌｉｃａｓｅ（Lizardi et al. (1988) BioTechnology 6:1197）、反復ＰＣＲ（recursive PCR）（Jaffe et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:2619; およびWilliams et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:7790）、米国特許第６，３９１，５４４号、同第６，３６５，３７５号、同第６，２９４，３２３号、同第６，２６１，７９７号、同第６，１２４，０９０号、および同第５，６１２，１９９号に記載の増幅方法、等温増幅法（例えば、ローリングサークル増幅法（ＲＣＡ）、超分岐ローリングサークル増幅法（ＨＲＣＡ）、鎖置換増幅法（ＳＤＡ）、ヘリカーゼ依存性増幅法（ＨＤＡ）、ＰＷＧＡ）、または当業者に周知の技術を用いた任意の他の核酸増幅方法が挙げられる。ポリメラーゼおよび／またはリガーゼ連鎖反応。サーマルサイクリング（ＰＣＲ）または等温（例えば、ＲＣＡ、ｈＲＣＡ、ＳＤＡ、ＨＤＡ、ＰＷＧＡ（ワールドワイドウェブサイト：biohelix.com/technology.asp））。

【００８８】

ＰＣＲとは、ＤＮＡの相補鎖の同時プライマー伸長による特異的ＤＮＡ配列のインビトロ増幅のための反応を指す。言い換えると、ＰＣＲには、プライマー結合部位に挟まれた標的核酸の複数のコピーまたは複製物を作成するための反応である。このような反応には、（ｉ）標的核酸を変性するステップ、（ｉｉ）プライマー結合部位へプライマーをアニーリングするステップ、および（ｉｉｉ）ヌクレオシド三リン酸の存在下で核酸ポリメラーゼによりプライマーを伸長するステップを、１回または複数回、反復することが含まれる。通常、反応は、サーマルサイクラー装置を用いて、各ステップについて最適化された異なる温度でサイクルされる。特定の温度、各ステップの継続時間、およびステップ間の変化速度は、例えば、参照文献McPherson et al., editors, PCR: A Practical Approach およびPCR2: A Practical Approach（IRL Press、Oxford、それぞれ１９９１年および１９９５年）に例示されている、当業者に周知の多くの要因に依存する。例えば、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼを用いた通常のＰＣＲでは、二本鎖標的核酸を９０℃を超える温度で変性させ、５０℃～７５℃の温度でプライマーをアニーリングさせ、７２℃～７８℃の温度でプライマーを伸長させてもよい。

【００８９】

「ＰＣＲ」という用語には、ＲＴ－ＰＣＲ、リアルタイムＰＣＲ、ネステッドＰＣＲ、定量的ＰＣＲ、およびマルチプレックスＰＣＲなどを含む、反応の派生的形態が含まれるが、これらに限定されない。反応体積は、数百ナノリットル、例えば２００ｎＬ、から数百マイクロリットル、例えば２００マイクロリットル、である。「逆転写ＰＣＲ」または「ＲＴ－ＰＣＲ」とは、例えばＴｅｃｏｔｔ　ｅｔ　ａｌ．、米国特許第５，１６８，０３８号のように、標的ＲＮＡを相補的一本鎖ＤＮＡに変換する逆転写反応が先に行われ、続いてこれが増幅されるＰＣＲを意味する。「リアルタイムＰＣＲ」とは、反応を進行させながら反応産物、すなわち増幅産物の量をモニタリングするＰＣＲを意味する。反応産物のモニタリングに使用される検出化学が主に異なる多くの形態のリアルタイムＰＣＲがある。例えば、Gelfand et al.、米国特許第５，２１０，０１５号（「Ｔａｑｍａｎ」）；Wittwer et al.、米国特許第６，１７４，６７０号および同第６，５６９，６２７号（インターカレーティング色素）；Tyagi et al.、米国特許第５，９２５，５１７号（分子ビーコン）。リアルタイムＰＣＲのための検出化学は、Mackay et al., Nucleic Acids Research, 30:1292-1305 (2002)に概説されている。「ネステッドＰＣＲ」とは、第１のＰＣＲの増幅産物が新たなプライマーのセットを用いる第２のＰＣＲのための試料になる、２段階ＰＣＲを意味し、このプライマーの少なくとも１つは、第１の増幅産物の内側の位置に結合する。本明細書において、ネステッド増幅反応に関する「初期プライマー（initial primer）」とは、第１の増幅産物を生成するために使用されるプライマーを意味し、「二次プライマー（secondary primer）」とは、第２の増幅産物、すなわちネステッド増幅産物を生成するために使用される１種類または複数種類のプライマーを意味する。「マ

ルチプレックスＰＣＲ」とは、例えば、Bernard et al. (1999) Anal. Biochem., 273:221-228（二色リアルタイムＰＣＲ）のように、同じ反応混合物中で複数の標的配列（または、単一の標的配列と１もしくは複数の参照配列）で同時に行われるＰＣＲを意味する。通常、増幅される配列ごとに別個のプライマーセットが使用される。「定量的ＰＣＲ」とは、試料または検体中の１種類または複数種類の特定の標的配列の存在量を測定するために設計されたＰＣＲを意味する。定量的ＰＣＲには、そのような標的配列の絶対的定量化および相対的定量化の両方が含まれる。定量的ＰＣＲのための技術は、以下の参照文献：Freeman et al., Biotechniques, 26:112-126 (1999); Becker-Andre et al., Nucleic Acids Research, 17:9437-9447 (1989); Zimmerman et al., Biotechniques, 21:268-279 (1996); Diviacco et al., Gene, 122:3013-3020 (1992)、およびBecker-Andre et al., Nucleic Acids Research, 17:9437-9446 (1989) などに例示されているように、当業者に周知である。

【００９０】

記載した本発明の実施形態は、単に本発明の原理の応用例の一例の説明であると理解されるべきである。本明細書に記載の教示に基づいて、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、当業者によって多くの変更が可能である。本願中で参照される全ての参照文献、特許、および公開特許出願の内容の全体は、あらゆる目的のために、参照により本明細書に取り込まれる。

【００９１】

以下の実施例は、本発明の代表例として記載するものである。本開示、図面、および添付の特許請求の範囲を考慮して、これらの実施形態および他の同等の実施形態が明らかとなるので、これらの実施例は本開示の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【００９２】

実施例Ｉ

計算的タンパク質設計

本発明のある実施形態では、構造に基づくタンパク質設計を最先端のソフトウェア（例えば、Ｒｏｓｅｔｔａソフトウェア）と組み合わせて、小分子－タンパク質間相互作用を設計する。小分子が標的となるようにアロステリックタンパク質の結合ポケットを設計する。小分子に結合でき得る、インシリコでフィルタリングされた数千のタンパク質設計が作製される。

【００９３】

実施例ＩＩ

チップに基づくＤＮＡ合成および設計のアセンブリー

ある実施形態では、基体上（例えば、ＤＮＡチップ上）に固定されたＤＮＡにより、実施例Ｉで設計されたアロステリックタンパク質がコードされる。ある態様では、複数の小分子標的（例えば、小分子結合タンパク質、例えば、アロステリックタンパク質）が単一チップ上でコードされる。所与のアロステリックタンパク質について、そのタンパク質をコードする対応するＤＮＡ配列が選択的に増幅および精製される。ある態様では、チップ上の各ＤＮＡ配列は約１００塩基長である。増幅されたＤＮＡ配列をステッチして、アロステリックタンパク質をコードする配列へとアセンブルする。複数のアロステリックタンパク質をコードする全長設計ライブラリーを構築するために、階層的アセンブリー（hierarchical assembly）技術が開発された。あらゆる目的のために全体を参照により本明細書に援用する、２００９年７月３１日に提出された米国特許出願第１２／５３３，１４１号に、階層的アセンブリーの方法が記載されている。

【００９４】

アセンブリー

多重アセンブリー戦略（multiplexed assembly strategy）を用いて、計算的結合予測またはその他の方法から生じた設計をアセンブルする。マイクロチップ上へのプリント、標準的キャピラリー合成などにより作製されたオリゴから、野生型配列から、または以前

のライブラリーバージョンから、ライブラリー断片を増幅する。増幅配列は、例えばＩＩｓ型制限エンドヌクレアーゼにより、除去される。リガーゼまたは他の手段を用いた多重反応中で、断片を部分遺伝子断片または全長遺伝子へとアセンブルする。例えばオーバーラップＰＣＲ、ライゲーション、または当業者に公知のその他の適切な方法を用いて、部分遺伝子断片を全長設計およびその組合せへと多重的にアセンブルする。例えば多重反応中でのライゲーション、ギブソンアセンブリー、または当業者に公知のその他の適切な方法により、全長遺伝子を発現プラスミドに挿入する。発現プラスミドライブラリーを、高クローニング効率を可能とする株に形質転換するか、センサータンパク質の結合部位および／または活性化部位に対してコンピテントな株に直接的に形質転換する。セレクション、スクリーニング、またはその組合せを用いて、機能的センサータンパク質を同定する。

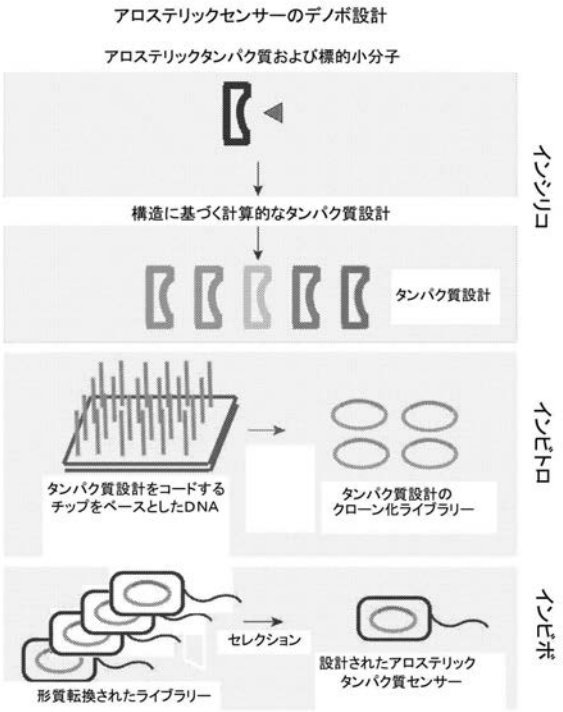
【００９５】

実施例ＩＩＩ

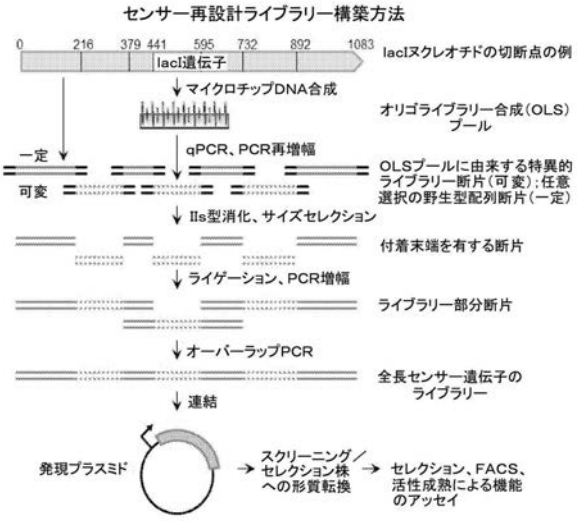
遺伝子セレクションシステム

最良のアロステリックタンパク質設計を同定するための新規な遺伝子セレクションシステムを開発した。出願時において他の当業者に公知の一般的なセレクションシステムは、単一の所望の機能を最適化するものである。対照的に、本発明の実施形態は、１）アロステリックタンパク質に対する標的小分子の結合親和性、および２）アロステリックタンパク質のアロステリック性の保存、の２つの機能を最適化する。ある態様では、本発明のセレクションシステムには二重選択マーカーが使用され、これは場合により２段階に活性化される。最初のセレクションステップでは、アロステリックでない設計タンパク質がネガティブセレクションによって排除される。第２のセレクションステップでは、第１のセレクション段階で排除されなかった設計タンパク質が、ポジティブセレクションによって標的小分子への結合について評価される。本発明のセレクションシステムにより、ほぼ１０億個のタンパク質設計の評価が可能になる。両方のセレクション段階を通過したタンパク質設計は、活性について個別にアッセイされる。

【図１】



【図２】



【配列表】
2017506080000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US15/16868

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12P 21/08; C12N 15/10; C40B 50/06 (2015.01)
CPC - C12N 15/1089, 15/1058; C40B 50/06
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8): C12P 21/08; C12N 15/10; C40B 50/06 (2015.01)
CPC: C12P 21/02; C12N 15/1089, 15/1034, 15/1093, 15/1058; C40B 30/02, USPC: 530/388.21, 350, 388.2, 388.1, 387.1, 386, 380

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Patseer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC); EBSCO; PubMed; Google; Google Scholar: computationally, rational, design, allosteric, protein, site, regulate, 'negative selection,' 'positive selection,' 'DNA binding,' endonuclease, effector, molecule, binds

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STRICKLAND, D et al. Light-Activated DNA Binding In A Designed Allosteric Protein. Proc Natl Acad Sci USA. 05 August 2008, Vol. 105, No. 31; pages 10709-10714; abstract; page 10709, second column, fifth paragraph to page 10711, second column, fourth paragraph; page 10713, second column, third paragraph; figure 1; DOI: 10.1073/pnas.0709610105.	26-32
A		1-25, 33-38
Y	US 2009/0263851 A1 (LIU, DR et al.) October 22, 2009; paragraphs [0070]-[0081], [0120]-[0134]	26, 27, 30, 31
A		1-25
Y	GLASS, CK et al. The Coregulator Exchange In Transcriptional Functions Of Nuclear Receptors. Genes Dev. 15 January 2000, Vol. 14, No. 2; pages 121-141; page 131, second column, first paragraph to page 131, second column, second paragraph; page 132, first column, second paragraph to page 132, second column, second paragraph; DOI: 10.1101/gad.14.2.121.	28, 29, 32
A		33-38
A	LASKOWSKI, RA et al. The Structural Basis Of Allosteric Regulation In Proteins. FEBS Lett. 05 June 2009, Vol. 583, No. 11; pages 1692-1698; page 1694, second column, first paragraph; DOI: 10.1016/j.febslet.2009.03.019.	1-25, 33-38
A	US 7476500 B1 (LIU, DR et al.) January 13, 2009; abstract	1-38
A	US 2011/0287485 A1 (BOWERS, PM et al.) November 24, 2011; abstract	1-38
A	WO 2002/074978 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) September 26, 2002; abstract	1-38
A	WO 2008/103475 A1 (ANAPTYSBIO, INC.) August 28, 2008; abstract	1-38

☐ 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	Date of mailing of the international search report
29 May 2015 (29.05.2015)	08 JUL 2015
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

フロントページの続き

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

(72)発明者 ラマン、 スリバッサン
アメリカ合衆国 ０２４７４ マサチューセッツ州 アーリントン アパート １ ウィンザー ストリート ４３
(72)発明者 テイラー、 ノア ディー.
アメリカ合衆国 ０２１１５ マサチューセッツ州 ボストン マルボロー ストリート ４０７

Ｆターム(参考) 4B065 AA01X AB01 BA02 BD50 CA60
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 FA72 FA74