

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5232138号  
(P5232138)

(45) 発行日 平成25年7月10日 (2013. 7. 10)

(24) 登録日 平成25年3月29日 (2013. 3. 29)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 21/00 (2006. 01)

C 1 2 P 21/00 C

C 1 2 R 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19

請求項の数 9 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2009-506813 (P2009-506813)  
 (86) (22) 出願日 平成19年4月23日 (2007. 4. 23)  
 (65) 公表番号 特表2009-534043 (P2009-534043A)  
 (43) 公表日 平成21年9月24日 (2009. 9. 24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/067232  
 (87) 国際公開番号 W02007/124493  
 (87) 国際公開日 平成19年11月1日 (2007. 11. 1)  
 審査請求日 平成22年3月23日 (2010. 3. 23)  
 (31) 優先権主張番号 60/793, 755  
 (32) 優先日 平成18年4月22日 (2006. 4. 22)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 508314607  
 スカラブ ゲノミクス, エルエルシー  
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537  
 13, マディソン, アン ストリート  
 1202  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (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 537  
 11, マディソン, ジェファークソン  
 ストリート 1547

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 tRNA遺伝子をしようする、組み換えタンパク質産生のための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

大腸菌宿主細胞であって、前記宿主細胞の1つまたは複数のrRNAオペロンが、tRNAをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含み、該1つまたは複数のポリヌクレオチドは、配列番号1～7からなる群より選択される配列を含む、宿主細胞。

【請求項 2】

前記rRNAオペロンが、配列番号1および7を含む、請求項1に記載の宿主細胞。

【請求項 3】

前記rRNAオペロンが、配列番号1、5および6を含む、請求項1に記載の宿主細胞。

【請求項 4】

前記rRNAオペロンが、配列番号1、5、6および7を含む、請求項1に記載の宿主細胞。

【請求項 5】

前記rRNAオペロンが、配列番号1～7を含む、請求項1に記載の宿主細胞。

【請求項 6】

前記rRNAオペロンが、rrnA、rrnB、rrnC、rrnD、rrnE、rrnGおよびrrnHからなる群から選択される、請求項1に記載の宿主細胞。

【請求項 7】

前記ポリヌクレオチドが、5SrRNAエレメントの3'および転写終結エレメントの

5'である、請求項1に記載の宿主細胞。

【請求項8】

前記宿主細胞が、異種タンパク質をコードする遺伝子をさらに含む、請求項1に記載の宿主細胞。

【請求項9】

組換え型異種タンパク質細胞を調製する方法であって、

(a) 請求項8に記載の宿主細胞を準備することと、

(b) 前記異種タンパク質をコードする遺伝子を発現させることとを含む方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

本願は、2006年4月22日に出願された米国仮特許出願第60/793,755号の利益を請求する。米国仮特許出願第60/793,755号の内容は、本明細書中に参考として援用される。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、tRNAの発現の改善による、タンパク質発現用の改変された宿主細胞およびそれに関する方法に関する。

20

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

現代バイオテクノロジーの進歩の1つは、目的タンパク質またはタンパク質を含有する目的遺伝子産物の大量生産である。細菌宿主細胞は、容易に大量発酵することができるため、目的タンパク質の産生に使用されることが多い。数多くの細菌系の1つの重大な欠点は、細菌系が、発現される遺伝子のコドン選択と大きく異なり得る希少コドンを使用することである。細菌の希少コドンは、典型的には、相補的なアンチコドンを有するtRNAの低レベル発現を伴う。その結果、発現される遺伝子に希少コドンが存在すると、希少tRNAの貯留が枯渇するために、細菌宿主細胞内での所望の産物の発現が顕著に減少する可能性がある。

30

【0004】

細菌系での発現を増加させるための1つの手法は、発現される遺伝子の希少コドンを、同一アミノ酸をコードする、宿主細胞でより頻繁に出現するシコドンに変化させることである。特許文献1を参照されたい。希少コドンをより望ましいコドンに置換するための目的遺伝子の改変の他の例は、非特許文献1および非特許文献2に見い出すことができる。しかしながら、この手法は、目的遺伝子に対しておそくは複数ステップの変異誘発を行う必要性によって制限を受ける。加えて、この工程は、1つの遺伝子の発現を増加させるに過ぎない。希少コドンを豊富なコドンに置換する全工程は、目的遺伝子毎に繰り返さね

40

【0005】

細菌系で発現を増加させる別の手法は、希少コドンの同種tRNAをコードする遺伝子を含有するプラスミドを、宿主細胞に導入することである。例えば、幾つかのプラスミドは、希少tRNAの発現を増加させるために構築されてきた。特許文献2には、アルギニンに対応するAGGおよびAGAコドン用の希少tRNA分子の遺伝子を含有するプラスミドが記載されている。非特許文献3には、アルギニン、イソロイシン、およびグリシンに対応するtRNA: argU(AG(A/G))、ileX(AUA)、およびglyT(GG(A/G))をコードするpACYC184に由来するプラスミドが記載されている。希少tRNAの追加コピーを提供するプラスミドを含有する細胞も、商業的に入手

50

可能である。希少 tRNA 発現用のプラスミドの使用は、產生の費用を増加させる選択可能なマーカーの必要性によって制限を受ける。さらに、典型的に使用される高コピー数のプラスミドは、宿主細胞内で遺伝的不安定性を招き得る。

【特許文献 1】米国特許第 6,821,755 号明細書

【特許文献 2】米国特許第 6,270,988 号明細書

【非特許文献 1】Prapunwattana, Mol Biochem. Parasitol. 第 83 巻: 93 ~ 106 頁 (1996 年)

【非特許文献 2】Pan, Nucleic Acids Res. 第 27 巻: 1094 ~ 1103 頁 (1999 年)

【非特許文献 3】Bac, Int'l. J. Parasit. 第 30 巻: 113 ~ 118 頁 (2000 年) 10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、当技術分野は、希少コドンをもつタンパク質を産生するための効率的な系を必要とし続けている。本発明は、この必要性およびその他の必要性を満たす。

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要旨)

本発明は、tRNA をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを含む 1 つまたは複数の rRNA オペロンを有する宿主細胞に関する。tRNA をコードするポリヌクレオチドは、ヒト、酵母に由来してもよく、または宿主細胞のゲノムに由来してもよい。 20

【0008】

tRNA をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 1 ~ 7 のいずれかの配列を含んでよい。tRNA をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 1 および 7 を含んでよい。tRNA をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 1、5 および 6 を含んでよい。tRNA をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 1、5、6 および 7 を含んでよい。tRNA をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 1 ~ 7 を含んでよい。

【0009】

宿主細胞は、細菌、酵母または昆虫細胞でよい。宿主細胞は、大腸菌 (E. coli) でもよい。tRNA をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞の rRNA オペロンは、1 つまたは複数の rrnA、rrnB、rrnC、rrnD、rrnE、rrnG および rrnH でよい。tRNA をコードするポリヌクレオチドは、5S rRNA エLEMENT の 3' および転写終結 ELEMENT の 5' でよい。宿主細胞は、異種タンパク質をコードする遺伝子を含んでもよい。異種遺伝子は、宿主細胞の前駆体での希少 tRNA に伴う 1 つまたは複数のコドンを含んでよい。 30

【0010】

本発明は、組換え型異種タンパク質細胞を産生する方法にも関する。異種タンパク質をコードする遺伝子は、本明細書中に記載した宿主細胞内で発現される。

(項目 1)

宿主細胞であって、前記宿主細胞の 1 つまたは複数の rRNA オペロンが、tRNA をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。 40

(項目 2)

前記 tRNA をコードするポリヌクレオチドが、ヒト、酵母、およびその他からなる群から選択される供給体に由来する、項目 1 に記載の宿主細胞。

(項目 3)

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 ~ 7 からなる群から選択される配列を含む、項目 1 に記載の宿主細胞。

(項目 4)

前記 rRNA オペロンが、配列番号 1 および 7 を含む、項目 3 に記載の宿主細胞。 50

(項目5)

前記 rRNA オペロンが、配列番号 1、5 および 6 を含む、項目 3 に記載の宿主細胞。

(項目6)

前記 rRNA オペロンが、配列番号 1、5、6 および 7 を含む、項目 3 に記載の宿主細胞。

(項目7)

前記 rRNA オペロンが、配列番号 1 ~ 7 を含む、項目 3 に記載の宿主細胞。

(項目8)

前記宿主細胞が、細菌、酵母または昆虫細胞である、項目 1 に記載の宿主細胞。

(項目9)

前記宿主細胞が大腸菌である、項目 8 に記載の宿主細胞。

(項目10)

前記 rRNA オペロンが、rrnA、rrnB、rrnC、rrnD、rrnE、rrnG および rrnH からなる群から選択される、項目 9 に記載の宿主細胞。

(項目11)

前記ポリヌクレオチドが、5S rRNA エLEMENT の 3' および転写終結ELEMENT の 5' である、項目 10 に記載の宿主細胞。

(項目12)

前記宿主細胞が、異種タンパク質をコードする遺伝子をさらに含む、項目 12 に記載の宿主細胞。

(項目13)

組換え型異種タンパク質細胞を調製する方法であって、

(a) 項目 12 に記載の宿主細胞を準備することと、

(b) 前記異種タンパク質をコードする遺伝子を発現させることとを含む方法。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

(詳細な説明)

本発明は、宿主細胞の rRNA オペロン内に tRNA 遺伝子を含む宿主細胞により特徴付けられる、宿主細胞でのタンパク質発現を増加させるための方法および組成物を提供する。rRNA オペロンは強力プロモーターを有するため、rRNA オペロンは、tRNA 遺伝子を導入するための望ましい目的地である。これは、rRNA が細胞 RNA の主要な構成要素であることにより証明される。さらに、ポリヌクレオチドは、rRNA の発現およびプロセッシングに干渉することなく、rRNA オペロンに付加できる。

【0012】

本発明による方法および組成物を使用すると、従来技術から公知である工程と比較して、向上した効率性でタンパク質発現の増加を達成することが可能である。本発明のこれらの方法および組成物は、X線結晶解析およびNMRなど、生物物理学的研究用のタンパク質だけでなく、医薬品の大量生産にも有用であり得る。他の考えうる使用は、当業者であれば自明であろう。

【0013】

本化合物、産物および組成物ならびに方法を開示し説明する前に、本明細書中で使用する用語は、特定の実施形態を説明するためだけの目的であり、限定することを意図しないことが、理解されるべきである。本明細書および添付の特許請求の範囲で 사용되는場合、文脈が明確にそうではないと指示しない限り、単数形の「a」、「an」、「the」は、複数の参照対象を含むことに留意しなければならない。

【0014】

1. tRNA 遺伝子

本発明は、1つまたは複数の tRNA 遺伝子を宿主細胞の染色体に導入することに関する。各 tRNA 遺伝子は、宿主細胞の 1つまたは複数の rRNA オペロンの 1つまたは複

10

20

30

40

50

数の位置に導入できる。

【 0 0 1 5 】

宿主細胞の rRNA オペロンに導入する tRNA 遺伝子は、宿主細胞で発現されるコドン頻度または同種 tRNA の頻度と比較した、目的タンパク質をコードする遺伝子に存在するコドン頻度に基づいて選択できる。希少 tRNA をコードする、または希少コドンの同種 tRNA をコードする希少 tRNA 遺伝子は、宿主細胞の rRNA オペロンに導入できる。目的タンパク質の遺伝子が複数の希少コドンを含む場合、1 つまたは複数のそのような同種 tRNA の遺伝子は、宿主細胞の rRNA オペロンに挿入することができる。全ての tRNA またはその任意の部分を、それらの出現率にかかわらず、rRNA オペロンに導入することもでき、それにより、全ての tRNA の tRNA レベルを増加させることができる。

10

【 0 0 1 6 】

希少コドンは、1000 当たり、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 または 1 より少ない頻度で宿主細胞内に存在する、宿主細胞内の任意のコドンでよい。希少 tRNA は、Leu-tRNA に対して、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.04、0.03、0.02 または 0.01 より少ない細胞含量の、任意の tRNA でよい。図 1 には、大腸菌の tRNA 頻度と共に、大腸菌および結核菌 (*M. tuberculosis*) のコドン頻度を列挙している。

【 0 0 1 7 】

20

希少 tRNA 遺伝子は、宿主細胞の tRNA 遺伝子に由来し得る。天然性の希少 tRNA は、当技術分野で公知の方法を使用して、クローニングまたは合成し、宿主細胞の rRNA オペロンに挿入できる。希少 tRNA 遺伝子は、目的タンパク質をコードする遺伝子の供給体など、別の生物にも由来し得る。希少 tRNA はまた、合成 tRNA、変異性 tRNA、改変された tRNA、サプレッサー tRNA、ウイルス tRNA またはバクテリオファージ tRNA でよい。

【 0 0 1 8 】

希少 tRNA は、tRNA の非定常部分で改変することができる。tRNA をコードする遺伝子の「定常」位置は以下の通りであり得る：Y = C または T、および R = G または A として、8 (T)、11 (Y)、14 (A)、15 (R)、18 (G)、19 (G)、21 (A)、24 (R)、26 (R)、32 (Y)、33 (T)、37 (R)、48 (Y)、52 (R)、53 (G)、54 (T)、55 (T)、56 (C)、57 (R)、58 (A)、60 (Y)、61 (C)、62 (Y)、74 (C)、75 (C) および 76 (A)。非定常部分は、置換または欠失により改変することができる。図 1 は、欠失可能なそれらの位置 (D ループ内の 17、17A、20A および 20B ならびに可変領域内の 45 と 46 との間の塩基) を楕円で示した、tRNA の二次構造を図示する。希少 tRNA はまた、米国特許出願第 20040265952 号に記載のように、非天然アミノ酸を導入するための tRNA でよい。

30

【 0 0 1 9 】

使用できる tRNA 遺伝子の代表的な例は、表 1 に列挙した大腸菌遺伝子を含む。

40

【 0 0 2 0 】

【表 1】

表1

| 遺伝子         | 認識されるコドン | アンチコドン | 配列番号 |
|-------------|----------|--------|------|
| <i>argU</i> | AGA, AGG | UCU    | 1    |
| <i>argW</i> | AGG      | CCU    | 2    |
| <i>argX</i> | CGG      | CCG    | 3    |
| <i>glyT</i> | GGA, GGG | UCC    | 4    |
| <i>ilex</i> | AUA      | CAU    | 5    |
| <i>leuW</i> | CUA, CUG | UAG    | 6    |
| <i>proL</i> | CCC, CCU | GGG    | 7    |

10

## 2. rRNA オペロン

各 rRNA オペロンは、一連のポリシストロン性遺伝子である。rRNA オペロンは、リボソーム RNA (16S rRNA、23S rRNA、および 5S rRNA)、スパーサー tRNA、遠位 tRNA、および制御エレメントをコードする DNA の組合せを含んでよい。大腸菌の 7 つのポリシストロン性 rRNA オペロンの概略を表 2 に示す。

【0021】

20

【表 2】

表2

|             | 凡例：制御エレメント：プロモーター (P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub> ), 転写終結区 (T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> )<br>リボソーム rRNAs: 16S rRNA ( <i>rrs</i> ), 23S rRNA ( <i>rrl</i> ), 5S rRNA ( <i>rrf</i> )<br>スパーサー tRNAs: tRNA <sup>Ile</sup> <sub>1</sub> ( <i>ile</i> ), tRNA <sup>Ala</sup> <sub>1B</sub> ( <i>ala</i> ), tRNA <sup>Glu</sup> <sub>2</sub> ( <i>glt</i> )<br>遠位 tRNAs: tRNA <sup>Asp</sup> <sub>1</sub> ( <i>asp</i> ), tRNA <sup>Thr</sup> <sub>1</sub> ( <i>thr</i> ), tRNA <sup>Trp</sup> ( <i>trp</i> ) | 配列番号 |
|-------------|--|------|
| <i>rrnA</i> | P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub> - <i>rrsA-ileT-alaT-rrlA-rrfA-T</i> <sub>1</sub> -T <sub>2</sub>  | 8    |
| <i>rrnB</i> | P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub> - <i>rrsB-gltT-rrlB-rrfB-T</i> <sub>1</sub> -T <sub>2</sub>   | 9    |
| <i>rrnC</i> | P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub> - <i>rrsC-gltU-rrlC-rrfC-aspT-trpT-T</i>  | 10   |
| <i>rrnD</i> | P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub> - <i>rrsD-ileU-alaU-rrlD-rrfD-thrV-rrfF-T</i>   | 11   |
| <i>rrnE</i> | P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub> - <i>rrsE-gltV-rrlE-rrfE-T</i>  | 12   |
| <i>rrnG</i> | P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub> - <i>rrsG-gltW-rrlG-rrfG-T</i>  | 13   |
| <i>rrnH</i> | P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub> - <i>rrsH-ileV-alaV-rrlH-rrfH-aspU-T</i>  | 14   |

30

1 つまたは複数の希少 tRNA 遺伝子は、それらの発現をもたらすオペロン内の任意の位置に、個々にまたは一緒に導入できる。希少 tRNA 遺伝子は、rRNA オペロンの P<sub>1</sub> または P<sub>2</sub> の 3' に導入できる。希少 tRNA 遺伝子は、rRNA オペロンの構成要素間 (遺伝子間) に、または rRNA オペロンの構成要素内 (遺伝子内) に導入できる。

40

【0022】

希少 tRNA 遺伝子を挿入するオペロンおよびオペロン上の位置を決定する際に、当業者であれば、相同組換え事象の可能性を考慮できる。rRNA オペロン間の高度な類似性のため、tRNA の導入部位は、rRNA オペロン間の相同組換えをもたらす得る。幾つかの実験では、rrn オペロン配列の均質化に關与する遺伝子変換事象が、スパーサー領域でなされた付加の喪失に繋がりが得ることが示されている (Harvey および Hill 1990 年; Hashimoto ら、2003 年)。

【0023】

50

大腸菌での相同組換えを最小限に抑えることが望ましい場合は、例えば、希少 tRNA を rRNA オペロンの 5' 遠位領域に挿入できる。大腸菌の rrrn オペロンは、各オペロンの 3' 末端に位置する 5' 遠位領域にかなりの差異を示す。rrnH オペロン上の発現に悪影響を及ぼさずに、遺伝子マーカーを rrfH の代替として導入することに成功している (Ammons ら、1998 年)。rrnA、rrnB、rrnE、および rrrnG オペロンも、遠位 tRNA を既に含んではいないので、希少 tRNA 遺伝子の付加の候補である。

#### 【0024】

##### 3. 宿主細胞

本発明は、宿主細胞の 1 つまたは複数の rRNA オペロンに 1 つまたは複数の希少 tRNA 遺伝子を含む宿主細胞にも関する。宿主細胞に存在する希少 tRNA の量は、親細胞内の希少 tRNA のレベルに比べて増加している。宿主細胞内の希少 tRNA の量は、1.5 倍、2.0 倍、2.5 倍、3.0 倍、3.5 倍、4.0 倍、4.5 倍または 5.0 倍を超えて増加し得る。

#### 【0025】

宿主細胞は、目的タンパク質の発現に好適な任意の親細胞に由来し得る。親細胞は、真核性または原核性のいずれかであってよく、グラム陽性またはグラム陰性でよい。親細胞の代表的な例は、酵母、大腸菌、枯草菌 (*B. subtilis*)、ストレプトマイセス (*Streptomyces*)、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*)、例えば、*S. カルノサス* (*S. carnosus*) などのブドウ球菌 (*Staphylococcus*)、および公開コレクションから入手可能な他の細胞を含むが、それらに限定されない。親細胞は、細菌であってもよく、米国特許出願第 10/057582 号および Blattner (2004 年) に記載されている縮小ゲノム細菌であってもよく、両文献は両方とも参考として本明細書中に援用される。

#### 【0026】

##### 4. 宿主細胞の作製方法

本発明は、宿主細胞の作製方法にも関する。宿主細胞は、1 つまたは複数の希少 tRNA 遺伝子を、親細胞の 1 つまたは複数の rRNA オペロンに導入することにより作製できる。tRNA 遺伝子は、Sambrook ら、「Molecular Cloning Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory (2001 年) に見い出すことができるような当技術分野で周知の方法により、rRNA オペロンに導入できる。

#### 【0027】

##### 5. 発現可能な宿主細胞

本発明は、目的タンパク質をコードする異種遺伝子を含む本発明の宿主細胞を含む発現可能な宿主細胞にも関する。異種遺伝子は、プロモーターエレメントに作用可能に連結できる。

#### 【0028】

異種遺伝子は、発現可能な宿主細胞の染色体内に配置できる。異種遺伝子は、Sambrook ら、(2001 年) に記載のそれらの方法など、当技術分野で周知の方法を使用して、発現可能な宿主細胞の染色体内に挿入できる。異種遺伝子は、発現可能な宿主細胞がそのベクターを含む、ベクター上に配置することもできる。ベクターは、自律複製が可能であってもよく、または微生物の DNA に組み込んでよい。ベクターは、プラスミド、コスミド、ファージ、ファージミド、YAC またはウイルスベクターなどを含むがそれらに限定されない、異種遺伝子を輸送可能な任意のポリヌクレオチドでよい。ベクターは、発現可能な宿主細胞内の異種遺伝子の発現のために好適な形態でよい。発現ベクターは、宿主細胞内の目的タンパク質の発現用に設計できる。

#### 【0029】

目的タンパク質は、例えば、インスリン、hGH、tPA、サイトカイン、例えば IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL

10

20

30

40

50

- 9、IL - 10、IL - 11、IL - 12、IL - 13、IL - 14、IL - 15、IL - 16、IL - 17、IL - 18などのインターロイキン (IL、interleukin)、インターフェロン (IFN、interferon) アルファ、IFNベータ、IFNガンマ、IFNオメガまたはIFNタウなど、腫瘍壊死因子 (TNF、tumour necrosis factor)、TNFアルファおよびTNFベータ、TRAIL、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、MCP-1、VEGFならびに抗体など、当技術分野で公知の任意のタンパク質でよい。

#### 【0030】

##### 6. タンパク質発現

本発明は、目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現可能な宿主細胞に由来する目的タンパク質を単離することを含む、目的タンパク質の産生方法にも関する。タンパク質発現を最適化する方法は、Hannigら、Trends Biotechnol.、第16巻 (第2号) : 54~60頁 (1998年) で考察され、その内容は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0031】

発現可能な宿主細胞は、目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを恒常的に発現してもよい。ポリヌクレオチドの発現は、それらに限定はされないが、プロモーター、エンハンサーおよび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) を含む、1つまたは複数の作用可能に連結された制御配列により制御することもできる。誘導可能な制御配列は、発現可能な宿主細胞の局所的環境に基づき、活性化または抑制ができる。

#### 【0032】

##### 7. キット

本発明は、本発明の宿主細胞を含む容器を含むキットにも関する。宿主細胞は、コンピテント細胞でよい。キットは、1つもしくは複数のプラスミド、形質転換に使用するための1つもしくは複数の試薬、または発現可能な宿主細胞もしくは目的タンパク質を産生する際の宿主細胞の使用説明書を必要に応じて含んでよい。

#### 【0033】

本発明は、本発明の発現可能な宿主細胞を含む容器を含むキットにも関する。発現可能な宿主細胞は、目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含んでよい。キットは、細胞を増殖させるための、または目的タンパク質産生用の細胞を使用するための説明書を必要に応じて含んでよい。

#### 【0034】

本発明は複数の態様を有し、以下の非限定的な実施例により例証される。

#### 【実施例】

#### 【0035】

##### (実施例1)

tRNA増量化大腸菌内での、熱帯熱マラリア原虫 (P. falciparum) ジヒドロプテロイン酸シンターゼ (DHPS、dihydropteroate synthetase) の発現

argUおよびileX遺伝子を、rrnGオペロンの3'末端で染色体に挿入することにより、大腸菌宿主細胞MD S 4 2株を形質転換する。この結果生じたtRNA増量化宿主細胞もまた、アンピシリンに対する抗生物質耐性マーカーと共にプロモーターの下流に配置された熱帯熱マラリア原虫ジヒドロプテロイン酸シンターゼ (DHPS) を含む発現ベクターで形質転換する。非改変MD S 4 2大腸菌細胞の第2の試料を、対照として同一の発現ベクターで形質転換する。

#### 【0036】

形質転換したtRNA増量化宿主細胞の単一コロニーを採取し、アンピシリン (100 μg/ml) を補充した3mlのルリア-ベルターニ (Luria-Bertani) (LB) 培地に播くことにより、終夜培養物を調製する。翌朝、100 μlの終夜培養物を使用して、アンピシリン (100 μg/ml) を補充した2mlのLBを含有するフラス

10

20

30

40

50



コに播く。細胞密度  $OD_{600}$  が  $0.5 \sim 0.7$  に達するまで、これらの培養物を 37 で 3 ~ 4 時間インキュベートする。0.5 mM の終濃度で IPTG を添加することにより、培養物を誘導し、次いで、誘導 3 時間後に回収する。タンパク質の発現は、tRNA 増量化がなされた細胞およびなされなかった細胞の誘導前および回収した全細胞溶菌液の SDS-PAGE により観察する。熱帯熱マラリア原虫 DHP5 に対してウエスタン解析を実施し、タンパク質の同一性を確認する。

#### 【0037】

非増量化対照細胞と比較した、tRNA 増量化細胞に対する酵素アッセイから、熱帯熱マラリア原虫 DHP5 の発現が、tRNA 増量化細胞内で著しく亢進されることが示される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0038】

【図 1 - 1】大腸菌の tRNA 頻度と、大腸菌および結核菌のコドン頻度を示す図である。

【図 1 - 2】大腸菌の tRNA 頻度と、大腸菌および結核菌のコドン頻度を示す図である。

【図 2】塩基位置を標準的な付番体系で表記した tRNA のクローバーリーフ型二次構造を描いた図である。楕円により表された塩基は、存在してもしなくてもよいという点で可変性がある。

#### 【図 1 - 1】

FIGURE 1

| コドン | 大腸菌  | T4  | アンチコドン                                       | tRNA              |                  | コドン | 大腸菌 | T4 | 結核菌 | D29 | 結核菌 | D29 |
|-----|--|---|--|-------------------|------------------|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|
|     |  |   |  | 累積頻度<br>(1000当たり) | 遺伝子コドン数<br>[含有量] |     |     |    |     |     |     |     |
| Arg | CGU 20.9<br>CGC 22.0<br>CGA 3.6<br>CGG 5.4<br>AGA 2.1<br>AGG 1.2<br>55.2     | 19.0<br>5.8<br>5.5<br>1.2<br>10.2<br>1.9<br>43.6  | ACG 4 [0.9]                                  |                   |                  |     |     |    |     |     |     |     |
| Leu | UUA 13.9<br>UUG 13.7<br>CUU 11.0<br>CUC 11.1<br>CUA 3.9<br>CUG 52.6<br>105.2 | 27.6<br>10.8<br>18.3<br>4.1<br>9.9<br>5.7<br>73.5 | AAA 1 [0.25]<br>CAA 1 [0.2]                  |                   |                  | 1   |     |    |     |     |     |     |
| Ser | UCU 8.5<br>UCC 8.6<br>UCA 7.2<br>UCG 8.9<br>AGU 8.8<br>AGC 16.1<br>59.1      | 24.6<br>3.8<br>18.1<br>3.7<br>10.7<br>5.9<br>66.3 | GGA 2 [0.25]<br>UGA 1 [0.25]<br>CGA 1 [0.05] |                   |                  | 1   |     |    |     |     |     |     |
| Ala | GCU 15.3<br>GCC 25.5<br>GCA 20.1<br>GCG 33.6<br>94.6                         | 31.2<br>5.3<br>19.6<br>6.3<br>62.4                | GGC 2 [0.3]<br>UGC 3 [1.0]                   |                   |                  |     |     |    |     |     |     |     |
| Gly | GGU 24.7<br>GGC 29.6<br>GGA 8.0<br>GGG 11.1<br>73.5                          | 27.5<br>8.1<br>19.5<br>3.9<br>59.1                | GCC 4 [1.1]<br>UCC 1 [0.15]<br>CCC 1 [0.1]   |                   |                  | 1   |     |    |     |     |     |     |
| Pro | CCU 7.0<br>CCC 5.5<br>CCA 8.4<br>CCG 23.2<br>44.1                            | 14.4<br>1.2<br>13.7<br>5.0<br>34.2                | GGG 1 [0.3]<br>UGG 1 [0.3]<br>CGG 1 [0.3]    |                   |                  | 1   |     |    |     |     |     |     |
| Thr | ACU 9.0<br>ACC 23.4<br>ACA 7.1<br>ACG 14.4<br>53.9                           | 27.8<br>6.3<br>17.1<br>5.3<br>56.4                | GUU 2 [0.8]<br>UGU 1 [0.1]<br>CGU 1 [0.1]    |                   |                  | 1   |     |    |     |     |     |     |
| Val | GUU 18.3<br>GUC 15.3<br>GUA 10.9<br>GUG 26.4<br>70.8                         | 31.5<br>5.5<br>20.0<br>6.1<br>63.2                | GAC 2 [0.4]<br>UAC 5 [1.05]                  |                   |                  |     |     |    |     |     |     |     |
| He  | AUU 30.3<br>AUC 25.1<br>AUA 4.4<br>59.9                                      | 50.9<br>11.5<br>12.2<br>74.6                      | GAU 3 [1.0]<br>CAU 2 [0.05]                  |                   |                  | 1   |     |    |     |     |     |     |

#### 【図 1 - 2】

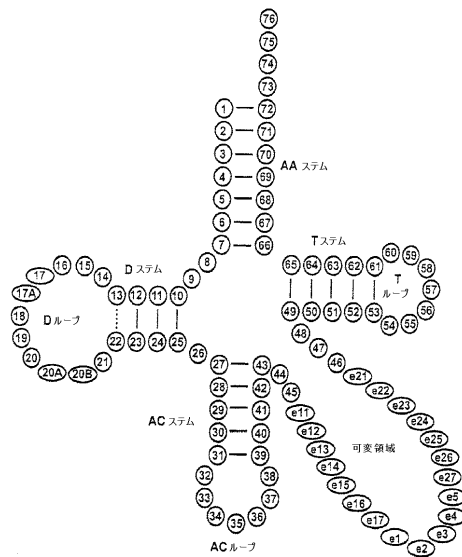
FIGURE 1

| コドン | 大腸菌                          | T4                   | アンチコドン                     | tRNA              |                  | コドン | 大腸菌 | T4 | 結核菌 | D29 | 結核菌 | D29 |
|-----|------------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------|------------------|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|
|     |                              |                      |                            | 累積頻度<br>(1000当たり) | 遺伝子コドン数<br>[含有量] |     |     |    |     |     |     |     |
| Asn | AAU 17.7<br>AAC 21.7<br>39.4 | 42.8<br>15.0<br>57.8 | GUU 4 [0.6]                |                   |                  |     |     |    |     |     |     |     |
| Asp | GAU 32.1<br>GAC 19.1<br>51.2 | 47.2<br>14.4<br>61.6 | GUC 3 [0.8]                |                   |                  |     |     |    |     |     |     |     |
| Cys | UGU 5.2<br>UGC 6.5<br>11.7   | 7.3<br>3.7<br>11.0   | GCA 1 [0.25]               |                   |                  |     |     |    |     |     |     |     |
| Gln | CAA 15.3<br>CAG 28.8<br>44.2 | 21.7<br>11.1<br>32.8 | UUG 2 [0.3]<br>CUG 2 [0.4] |                   |                  | 1   |     |    |     |     |     |     |
| Glu | GAA 39.4<br>GAG 17.8<br>57.3 | 50.0<br>10.8<br>70.8 | UUC 4 [0.9]                |                   |                  |     |     |    |     |     |     |     |
| His | CAU 12.9<br>CAC 9.7<br>22.7  | 13.5<br>3.7<br>17.3  | GUG 1 [0.4]                |                   |                  |     |     |    |     |     |     |     |
| Lys | AAA 33.6<br>AAG 10.3<br>43.9 | 64.1<br>17.5<br>81.6 | UUU 6 [1.0]                |                   |                  |     |     |    |     |     |     |     |
| Phe | UUU 22.3<br>UUC 16.6<br>38.9 | 33.3<br>11.1<br>44.4 | GAA 2 [0.35]               |                   |                  |     |     |    |     |     |     |     |
| Tyr | UAU 16.2<br>UAC 12.2<br>28.4 | 33.8<br>9.7<br>43.5  | GUA 3 [0.5]                |                   |                  |     |     |    |     |     |     |     |
| Met | AUG 27.9<br>UGG 15.2         | 26.7<br>14.1         | CAU 5 [0.8]<br>CCA 1 [0.3] |                   |                  |     |     |    |     |     |     |     |

コドンの総数は、大腸菌については1963490個(4290種のタンパク質をコードする遺伝子)、T4については531183個(271種の遺伝子)、結核菌については1359687個(3924種の遺伝子)、D29については147899個(77種の遺伝子)、同様にコドンの合計は斜字で示されている。大腸菌の主要コドンは下線が引かれている。

【図 2】

FIGURE 2



【配列表】

0005232138000001.app

---

フロントページの続き

- (72)発明者 キャンベル, ジョン ウォルター  
アメリカ合衆国 イリノイ 60302, オーク パーク, ウェスト ワシントン ブールバ  
ード 601
- (72)発明者 プランケット, ガイ  
アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711, マディソン, ギルバート ロード 1613

審査官 鈴木 崇之

- (56)参考文献 特開平02-265490(JP,A)  
EMBO J., 1993年, Vol.12, No.11, P.4305-4315  
PLASMID, 1981年, Vol.6, No.1, P.112-118  
inNovations, Novagen, 2001年, No.12, P.1-3  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985年, Vol.82, P.1069-1073

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-09  
C12N 1/21  
C12R 1/19  
WPI  
PubMed