

(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 1
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 N 1/21	(2006.01) C 12 N 1/21
C 12 P 21/00	(2006.01) C 12 P 21/00 C
C 12 R 1/19	(2006.01) C 12 N 1/21 C 12 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	プラットナー, 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產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、5'SrRNA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し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ら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ばならない。

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g1yT (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 t RNA 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ク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ら、Mol Biochem. Parasitol. 第 83 卷：93～106 頁 (1996 年)

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

【非特許文献 3】Bacaら、Int'l. J. Parasit. 第 30 卷：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、希少コドンを有するタンパク質を產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、t RNA 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 r RNA オペロンを有する宿主細胞に関する。t RNA 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】

t RNA 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。t RNA 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。t RNA 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。t RNA 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。t RNA 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) 30 でもよい。t RNA をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞の r RNA 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。t RNA をコードするポリヌクレオチドは、5S r RNA エレメントの 3' および転写終結エレメントの 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 t RNA に伴う 1 つまたは複数のコドンを含んでよい。

【0010】

本発明は、組換え型異種タンパク質細胞を產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 r RNA オペロンが、t RNA 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。

(項目 2)

前記 t RNA 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 r RNA 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。

10

30

40

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。

10

(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、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、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。

20

(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シングに干渉することなく、rRNAオペロンに付加できる。

30

**【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。

40

**【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使用される場合、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

50

数の位置に導入できる。

【0015】

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

【0016】

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。 20

【0017】

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。 20

【0018】

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、欠失可能なこれらの位置(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)を機能で示した、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

【0019】

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

【0020】

【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

## 2. r RNAオペロン

各r RNAオペロンは、一連のポリシストロン性遺伝子である。r RNAオペロンは、リボソームRNA(16S rRNA、23S rRNA、および5S rRNA)、スペーサー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r RNAオペロンの概略を表2に示す。

【0021】

【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> ) リボソームtRNAs: 16S rRNA ( <i>rrs</i> ), 23S rRNA ( <i>rrl</i> ), 5S rRNA ( <i>rrf</i> ) スペーサー tRNAs: tRNA <sup>Leu</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> ) 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
rrnA	P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub> - <i>rrsA-ileT-alaT-rrlA-rrfA-T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub></i>	8
rrnB	P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub> - <i>rrsB-gltT-rrlB-rrfB-T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub></i>	9
rrnC	P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub> - <i>rrsC-gltU-rrlC-rrfC-aspT-trpT-T</i>	10
rrnD	P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub> - <i>rrsD-ileU-alaU-rrlD-rrfD-thrV-rrfF-T</i>	11
rrnE	P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub> - <i>rrsE-gltV-rrlE-rrfE-T</i>	12
rrnG	P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub> - <i>rrsG-gltW-rrlG-rrfG-T</i>	13
rrnH	P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub> - <i>rrsH-ileV-alaV-rrlH-rrfH-aspU-T</i>	14

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、r RNA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、r RNAオペロンの構成要素間(遺伝子間)に、またはr RNAオペロンの構成要素内(遺伝子内)に導入できる。

【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。r RNAオペロン間の高度な類似性のため、tRNAの導入部位は、r RNAオペロン間の相同組換えをもたらし得る。幾つかの実験では、rrnオペロン配列の均質化に関与する遺伝子変換事象が、スペーサー領域でなされた付加の喪失に繋がり得ることが示されている(HarveyおよびHill 1990年; Hashimotoら、2003年)。

【0023】

10

20

30

40

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 t RNA を r RNA オペロンの 5 S 遠位領域に挿入できる。大腸菌の r r n H オペロンは、各オペロンの 3' 末端に位置する 5 S 遠位領域にかなりの差異を示す。r r n H 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 r r f H の代替として導入することに成功している (Ammons ら、1998 年)。r r n A、r r n B、r r n E、および r r n G オペロンも、遠位 t RNA を既に含んではいないので、希少 t RNA 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 r RNA オペロンに 1 つまたは複数の希少 t RNA 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 t RNA の量は、親細胞内の希少 t RNA のレベルに比べて増加している。宿主細胞内の希少 t RNA 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*)、例えは、*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 t RNA 遺伝子を、親細胞の 1 つまたは複数の r RNA オペロンに導入することにより作製できる。t RNA 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、r RNA 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、プロモーター要素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 に組み込んでもよい。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、例えは、インスリン、hGH、tPA、サイトカイン、例えは IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-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、目的タンパク質の产生方法にも関する。タンパク質発現を至適化する方法は、Hannigら、Trends Biotechnol.、第16巻(第2号)：54～60頁(1998年)で考察され、その内容は参考によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

【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。

20

【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产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產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。

30

【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増量化大腸菌での、熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)ジヒドロプロテロイン酸シンテーゼ(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MDS42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ロテロイン酸シンテーゼ(DHPS)を含む発現ベクターで形質転換する。非変異MDS42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。

40

【0036】

形質転換したtRNA増量化宿主細胞の單一コロニーを採取し、アンピシリン(100μg/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、100μlの終夜培養物を使用して、アンピシリン(100μg/ml)を補充した2mlのLBを含有するフラス

50

コに播く。細胞密度OD<sub>600</sub>が0.5~0.7に達するまで、これらの培養物を37度3~4時間インキュベートする。0.5mM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つ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。

【 0 0 3 7 】

非増量化对照細胞と比較した、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。

10

## 【図面の簡単な説明】

〔 0 0 3 8 〕

【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】

### 【図 1 - 2】

**FIGURE 1**

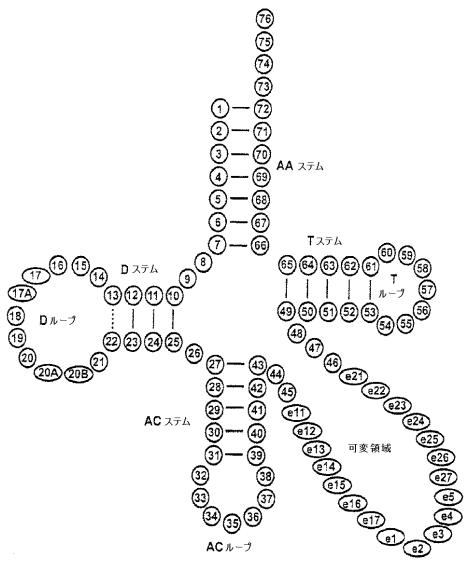
コドン使用頻度	tRNA			コドン使用頻度		tRNA			
	累積頻度	遺伝子コドン数	【含有量】	累積頻度	遺伝子コドン数	【含有量】			
コドン	大脳菌	T4	アンチコドン	大脳菌	T4	枯核菌	D29	枯核菌	D29
Arg	CGU	20.9	19.0	ACG	4 [0.9]	8.4	6.5	1	
	CGC	22.0	5.8			25.4	20.6		
	CGA	3.6	5.5			7.2	9.6	1	
	CGG	5.4	1.2	CCG	1 [微量]	24.6	21.2		
	AGA	2.1	10.2	UCU	2 [微量]	1	1.3	0.9	1
	AGG	1.2	1.9	CCU	1 [微量]		3.2	5.3	1
		55.2	43.6			73.0	64.2		
Leu	UUA	13.9	27.6	UAA	1 [0.25]	1	1.6	0.0	1
	UUG	13.7	10.8	CAA	1 [0.2]		17.9	5.6	1
	CUU	11.0	18.3				5.4	4.6	
	CUC	11.1	4.1	GAG	1 [0.3]		17.3	26.4	1
	CUA	3.9	5.9	UAG	1 [微量]		4.8	1.6	1
	<u>CUG</u>	52.6	5.7	CAG	4 [1.0]		50.4	44.1	
		106.2	73.5				97.4	82.3	
Ser	UCU	8.5	24.8				2.2	3.4	
	UCC	8.8	3.8	GGA	2 [0.25]		11.5	11.8	1
	UCA	7.2	18.1	UGA	1 [0.25]	1	3.5	3.0	1
	UCG	8.9	3.7	CGA	1 [0.05]		19.3	17.9	1
	AGU	8.8	10.7				3.5	2.4	
	AGC	16.1	5.8	GCU	1 [0.25]		14.5	12.1	1
		59.1	66.3				54.5	50.4	
Ala	GGU	15.3	31.2				10.9	17.5	
	GCC	25.6	5.3	GCC	2 [0.3]		59.9	36.6	1
	GCA	20.1	19.6	UGC	3 [1.0]		12.8	12.1	1
	<u>GCG</u>	33.6	6.3				48.5	33.9	1
		94.6	62.4				132.7	100.4	
Gly	GGU	24.7	27.5				18.9	15.4	
	GGC	29.6	8.1	GCC	4 [1.1]		51.4	42.6	1
	GGA	8.0	19.5	UGC	1 [0.15]	1	9.9	8.5	1
	GGG	11.1	3.9	CCC	1 [0.1]		19.3	15.8	1
		73.5	59.1				99.5	82.3	
Pro	CCU	7.0	14.4				3.4	5.5	
	CCC	5.5	1.2	GGG	1 [微量]		17	15.0	1
	CCA	8.4	13.7	UGG	1 [0.3]	1	6.1	4.5	1
	CCG	23.2	5.0	CGG	1 [0.3]		31.3	28.9	1
		44.1	34.2				57.8	53.9	
Thr	ACU	9.0	27.8				3.7	4.3	
	ACC	23.4	6.3	GGU	2 [0.8]		35.3	31.0	1
	ACA	7.1	17.1	UGU	1 [0.1]	1	4.5	3.9	1
	ACG	14.4	5.3	CGU	1 [0.1]		15.6	19.3	1
		53.9	56.4				59.1	58.5	
Val	<u>GUU</u>	19.3	31.5				8.0	6.5	
	GUC	15.3	5.5	GAC	2 [0.4]		32.7	39.6	1
	<u>GUA</u>	10.9	20.0	UAC	5 [1.05]		4.7	3.7	1
	<u>GUG</u>	25.4	6.1				40.0	23.7	1
		70.6	63.2				85.4	73.5	
He	AUU	30.3	50.9				6.4	2.8	
	AUC	25.1	11.5	GAU	3 [1.0]		33.9	46.7	1
	AUA	4.4	12.2	CAU	2 [0.05]	1	2.2	0.6	
		50.9	74.5				42.5	50.1	

FIGURE 1											
コジン使用頻度			tRNA			コジン使用頻度			tRNA		
累積頻度 (1000回当たり)			遺伝子 <sup>コジン</sup> 数 [含有量]			累積頻度			遺伝子 <sup>コジン</sup> 数		
コジン	大腸菌	T4	アバコジン	大腸菌	T4	結核菌	D29	結核菌	D29		
Asn	AAU	17.7	42.8	GUU	4 [0.6]	5.3	1.9	30.6	1	1	
	AAC	21.7	15.0			20.0	25.3				
Asp	39.4	57.8				15.7	32.5				
	GAU	32.1	47.2	GUC	3 [0.8]	42.1	53.4	64.1	1	1	
	GAC	19.1	14.4			57.8					
Cys	51.2	61.6				2.2	1.3				
	UGU	5.2	7.3	GCA	1 [数量]	8.6	8.6	7.4	1	1	
	UGC	6.5	3.7			8.6	8.7				
Gln	11.7	11.0				8.1	3.8	31.4	1	1	
	CAA	15.3	21.7	UUG	2 [0.3]	22.7	31.4				
	CAG	28.8	11.1			30.8	35.2				
Glu	44.2	32.8				16.1	14.7	51.8	1	1	
	GAA	39.4	60.0	UUC	4 [0.9]	30.5	46.6				
	GAG	17.8	10.8			30.5	66.5				
His	57.3	70.8				6.4	2.6	41.9	1	1	
	CAU	12.9	13.5	GUG	1 [0.4]	15.8	19				
	CAC	9.7	3.7			22.0	21.6				
Lys	22.7	17.3				5.3	3.4	45.3	1	1	
	AAA	33.6	64.1	UUU	6 [1.0]	15.0	20.3				
	AAG	10.3	17.5			29.5	33.9				
Phe	43.9	81.6				6.2	1.2	35.1	1	1	
	UUU	22.3	33.3	GAA	2 [0.35]	23.3	29.5				
	UUC	16.8	11.1			6.1	1.5				
Tyr	38.9	44.4				14.7	27.5	29.0	1	1	
	UAU	18.2	33.8	GUU	3 [0.5]	20.8	21.2				
	UAC	12.2	9.7			18.4	21.2				
Met	28.4	43.5				5.0	8.1	3	1	1	
	AUG	22.9	26.7	CAU	5 [0.8]	18.4	21.2				

この統計は、大腸菌については13634946個(4290種のタクソイドをコードする遺伝子), T4Eについては53183個(271種の遺伝子), 乳酸菌については13336567個(3924種のタクソイド), プロクレーティナ14280個(774種の遺伝子)。同様にして今計は斜

## 【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, ウエスト 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)

C 12 N 15 / 00 - 09

C 12 N 1 / 21

C 12 R 1 / 19

W P I

P u b M e d