

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年5月10日(10.05.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/096123 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/52 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/039717

(22) 国際出願日: 2023年11月2日(02.11.2023)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2022-177703 2022年11月4日(04.11.2022) JP

(71) 出願人: 株式会社バイオパレット (BIO PALETTE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町六丁目3番7 Hyogo (JP).

(72) 発明者: 西田 南部 由美子 (NISHIDA NAMBU, Yumiko); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町六丁目3番7 株式会社バイオパレット内 Hyogo (JP). 田宮 大雅 (TAMIYA, Taiga); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町六丁目3番7 株式会社バイオパレット内 Hyogo (JP). 奥村 亮 (OKUMURA, Ryo); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町六丁目3番7 株式会社バイオパレット内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 鎌田 光宜, 外 (KAMADA, Mitsunori et al.); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル 高島国際特許事務所 Osaka (JP).

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

KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: GENETICALLY MODIFIED MICROORGANISM AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: 遺伝子が改変された微生物およびその生産方法

(57) Abstract: The present disclosure relates to the prevention of transmission and/or spread within the environment and to humans when using a bacterial preparation. More specifically, the present disclosure relates to a microorganism in which at least one gene in the microorganism has been modified and the modification does not substantially recover the function normally possessed by a protein encoded by the gene.

(57) 要約: 本開示は、細菌製剤の利用において環境中やヒトへの伝播および/または拡散を防止することに関する。より詳細には、本開示は、微生物であって、該微生物における少なくとも1つの遺伝子が改変されており、該改変は、該遺伝子によってコードされるタンパク質が通常有する機能が実質的に回復しないものである、微生物、に関する。



WO 2024/096123 A1

明 細 書

発明の名称： 遺伝子が改変された微生物およびその生産方法

技術分野

[0001] 本開示は、遺伝子および／または核酸によってコードされるタンパク質が通常有する機能が実質的に回復しない改変を有する微生物、およびその微生物を生産する方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、種々の感染症や潰瘍性大腸炎、癌等の幅広い疾患を対象として、その治療や予防のために、単数または複数の細菌からなる製剤を医薬品として開発する試みが行われており、数多くの細菌種が試験されている。このような細菌製剤では、もともとの細菌がもつ遺伝子を改変して目的の形質を付与する場合もあり、このような利用の場合には、臨床利用においては細菌製剤の品質および安全性を担保し、環境中やヒトへの伝播および／または拡散を防止する必要がある。

発明の概要

課題を解決するための手段

[0003] したがって、本開示は以下を提供する。

(項目 X 1)

微生物であって、該微生物における少なくとも 1 つの遺伝子が改変されており、該改変は、該遺伝子によってコードされるタンパク質が通常有する機能が実質的に回復しないものである、微生物。

(項目 X 2)

前記遺伝子が、必須遺伝子、薬効関連遺伝子、形態関連遺伝子、および定着性関連遺伝子からなる群から選択される、上記項目に記載の微生物。

(項目 X 3)

前記遺伝子が必須遺伝子であり、前記改変は、該必須遺伝子によってコードされるタンパク質が通常有する活性が低減または欠損した場合に、前記微

生物が、環境または対象において実質的に伝播しない改変である、上記項目のいずれか一項に記載の微生物。

(項目X4)

前記必須遺伝子が、アミノ酸合成酵素、核酸合成酵素、およびビタミン合成酵素をコードする遺伝子からなる群から選択される、上記項目のいずれか一項に記載の微生物。

(項目X5)

前記アミノ酸合成酵素が、リジン生合成酵素をコードする遺伝子 (dapA)、cysK、cysM、pabA、pabB、pabC、glyA、proB、proA、leuB、alr、dadX、serC、argH、hisD、ilvA、leuB、lysA、metB、pheA、proC、thrC、trpC、およびtyrAからなる群から選択される、上記項目のいずれか一項に記載の微生物。

(項目X6)

前記核酸合成酵素が、チミジル酸合成酵素をコードする遺伝子 (thyA)、purK、purN、purT、pyrB、pyrC、pyrD、およびpyrEからなる群から選択される、上記項目のいずれか一項に記載の微生物。

(項目X7)

前記ビタミン合成酵素が、thiC、thiE、thiF、thiS、thiG、thiH、ribB、ribC、ribD、nadA、nadB、panC、pdxB、bioH、およびmetEからなる群から選択される、上記項目のいずれか一項に記載の微生物。

(項目X8)

前記改変が、前記遺伝子における点変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載の微生物。

(項目X9)

前記改変が、終止コドンを生じさせる変異を含む、上記項目のいずれか一

項に記載の微生物。

(項目 X 1 0)

前記改変が、前記少なくとも 1 つの遺伝子における少なくとも 2 ヶ所の変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載の微生物。

(項目 X 1 1)

前記改変が、少なくとも 2 種の遺伝子におけるそれぞれ少なくとも 1 ヶ所の変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載の微生物。

(項目 X 1 2)

前記改変が、少なくとも 2 種の遺伝子におけるそれぞれ少なくとも 2 ヶ所の変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載の微生物。

(項目 X 1 3)

前記少なくとも 2 種の遺伝子が、必須遺伝子、薬効関連遺伝子、形態関連遺伝子、および定着性関連遺伝子からなる群からそれぞれ独立して選択される、上記項目のいずれか一項に記載の微生物。

(項目 1)

少なくとも 1 つの遺伝子が改変された微生物を生産する方法であって、
該少なくとも 1 つの遺伝子を改変する工程であって、該微生物内において、該遺伝子の標的核酸配列の 1 またはそれ以上のヌクレオチドを他のヌクレオチドに変換し、もしくは欠失させ、または該遺伝子の標的核酸配列に 1 またはそれ以上のヌクレオチドを挿入する、改変する工程、
を含み、該改変は、該遺伝子によってコードされるタンパク質が通常有する機能が実質的に回復しないものである、方法。

(項目 2)

前記遺伝子が、必須遺伝子、薬効関連遺伝子、形態関連遺伝子、および定着性関連遺伝子からなる群から選択される、上記項目に記載の方法。

(項目 3)

前記遺伝子が必須遺伝子であり、前記改変は、該必須遺伝子によってコードされるタンパク質が通常有する活性が低減または欠損した場合に、前記微

生物が、環境または対象において実質的に伝播しない改変である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目4)

前記必須遺伝子が、アミノ酸合成酵素、核酸合成酵素、およびビタミン合成酵素からなる群から選択される、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目5)

前記アミノ酸合成酵素が、リジン生合成酵素をコードする遺伝子 (dapA)、cysK、cysM、pabA、pabB、pabC、glyA、proB、proA、leuB、alr、dadX、serC、argH、hisD、ilvA、leuB、lysA、metB、pheA、proC、thrC、trpC、およびtyrAからなる群から選択される、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目6)

前記核酸合成酵素が、チミジル酸合成酵素をコードする遺伝子 (thyA)、purK、purN、purT、pyrB、pyrC、pyrD、およびpyrEからなる群から選択される、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目7)

前記ビタミン合成酵素が、thiC、thiE、thiF、thiS、thiG、thiH、ribB、ribC、ribD、nadA、nadB、panC、pdxB、bioH、およびmetEからなる群から選択される、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目8)

前記改変が、前記遺伝子における点変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目9)

前記改変が、終止コドンを生じさせる変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0)

前記改変が、前記少なくとも 1 つの遺伝子における少なくとも 2 ヶ所の変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1)

前記改変が、少なくとも 2 種の遺伝子におけるそれぞれ少なくとも 1 ヶ所の変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2)

前記改変が、少なくとも 2 種の遺伝子におけるそれぞれ少なくとも 2 ヶ所の変異を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 3)

前記少なくとも 2 種の遺伝子が、必須遺伝子、薬効関連遺伝子、形態関連遺伝子、および定着性関連遺伝子からなる群からそれぞれ独立して選択される、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

[0004] 本開示において、上記の 1 つまたは複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせて提供され得ることが意図される。なお、本開示のさらなる実施形態および利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解すれば、当業者に認識される。

[0005] なお、上記した以外の本開示の特徴及び顕著な作用・効果は、以下の発明の実施形態の項及び図面を参照することで、当業者にとって明確となる。

発明の効果

[0006] 本開示により、微生物に対して、通常有する機能が実質的に回復しない改変を施すことができ、またこれにより、改変微生物はその通常有する機能が回復する外的要因（例えば、栄養（必須栄養素）、ある種の薬剤であり得る）が提供されない限り、増殖できないため、その外的要因の有無で微生物の生存や増殖を制御・管理することができる。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]図 1 は、本開示の一実施形態における、*t h y A* 遺伝子ノックアウト株、*d a p A* 遺伝子ノックアウト株、*t h y A* および *d a p A* 遺伝子の二重

ノックアウト株の非増殖性試験結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

- [0008] 以下、本開示を最良の形態を示しながら説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本開示の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。
- [0009] 以下に本明細書において特に使用される用語の定義および／または基本的技術内容を適宜説明する。
- [0010] 本明細書において、「約」とは、後に続く数値の±10%を意味する。
- [0011] 本明細書において、「微生物」とは、微小な生物を指し、例えば、細菌や放線菌などの原核生物、酵母やカビなどの真核生物、下等藻類、真菌、ウイルス等の他、動物や植物などの多細胞生物であっても個々に別々に存在する細胞も含まれる。また微生物には、天然の微生物のほか、それらを培養して人為的に増殖させたもの、それらが突然変異したもの、または形質転換その他の手法によって、人為的に改変した微生物等も含まれる。
- [0012] 本明細書において、遺伝子の「改変」とは、DNA鎖上のあるヌクレオチド（例えば、dC）が、他のヌクレオチド（例えば、dT、dA又はdG）に変換されるか、欠失すること、あるいはDNA鎖上のあるヌクレオチド間にヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列が挿入もしくは付加されることを意味する。本明細書における「改変」には、二本鎖DNAの標的化した部位の1以上のヌクレオチドの置換、欠失、または二本鎖DNAの標的化した部位への1以上のヌクレオチドの挿入もしくは付加を含む。ここで、改変され

る二本鎖DNAは特に制限されないが、好ましくはゲノムDNAである。また、二本鎖DNAの「標的化した部位」とは、核酸配列認識モジュールが特異的に認識して結合する「標的ヌクレオチド配列」の全部もしくは一部、又はそれと該標的ヌクレオチド配列の近傍（5'上流及び3'下流のいずれか一方又は両方）を意味し、その範囲は目的に応じて、1塩基～数百塩基長の間で適宜調節することができる。

[0013] 本明細書において「遺伝子」とは最広義に解釈され、核酸の文字列またはそれを担う物質（例えば、DNA、RNAなどのヌクレオチド）の配列をいい、好ましくは、なんらかの機能を発揮する配列または配列を含む物質であって、例えば、タンパク質をコードするもののほか、転写因子結合部位として、転写産物の転写時期と生産量を制御するプロモーターやエンハンサーなどの隣接した転写調節領域、転写因子結合部位として、転写産物の転写時期と生産量を制御するプロモーターやエンハンサーなどの隣接した転写調節領域なども包含される。

[0014] 本明細書において、「必須遺伝子」とは、目的の条件下で生存能を維持するために機能発現が必要な遺伝子または核酸配列、またはその一部をいい、例えば必須遺伝子には、アミノ酸合成酵素、核酸合成酵素、およびビタミン合成酵素などをコードする遺伝子を挙げることができる。例示的な必須遺伝子としては、チミジル酸合成酵素をコードする遺伝子 (thyA)、5-(カルボキシアミノ)イミダゾールリボヌクレオチド合成酵素(5-(carboxyamino)imidazole ribonucleotide synthase: purK)、ホスホリボシルグリシンアミドホルミルトランスフェラーゼ 1 (phosphoribosylglycinamide formyltransferase 1: purN)、ホスホリボシルグリシンアミドホルミルトランスフェラーゼ 2 (phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2: purT)、アスパラギン酸カルバモイルトランスフェラーゼ触媒サブユニット(aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit: pyrB)、ジヒドロオロターゼ (dihydroorotase: pyrC)、ジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ、タイプ 2 (dihydroorotate dehydrogenase, type 2: pyrD)、オロチン酸ホ

スホリボシル基転移酵素(ototate phosphoribosyltransferase: pyrE)などの核酸合成酵素をコードする遺伝子、チアミン生合成酵素の構造遺伝子 (phosphomethylpyrimidine synthase: thiC, thiamine phosphate synthase: thiE, sulfur carrier protein: thiS, adenylyltransferase: thiF, sulfur carrier protein thiS: thiS, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate: thiol sulfurtransferase: thiG, 2-iminoacetate synthase: thiH)、3, 4-ジヒドロキシー-2-ブタノン-4-リン酸シンターゼ (3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphatesynthase: ribB)、リボフラビン合成酵素 (riboflavin synthase: ribC)、ジアミノヒドロキシホスホリボシルアミノピリミジンデアミナーゼ/5-アミノ-6-(5-ホスホリボシルアミノ)ウラシルレダクターゼ (fused diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase/5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase: ribD)、キノリン酸シンターゼ (quinolinate synthase: nadA)、アスパラギン酸オキシダーゼ (L-aspartate oxidase: nadB)、パントテン酸合成酵素 (pantothenate synthetase: panC)、エリスロン酸-4-リン酸デヒドロゲナーゼ (erythronate-4-phosphate dehydrogenase: pdxB)、ピメロイルアシルキャリアタンパク質メチルエステルエステラーゼ (pimeloyl-acyl carrier protein methyl ester esterase: bioH)、およびコバラミン非依存性ホモシステイントランスメチラーゼ (cobalamin-independent homocysteine transmethylation: metE) などのビタミン合成酵素をコードする遺伝子、およびアラニン、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、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンから選択される1または複数のアミノ酸の合成に関するアミノ酸合成酵素 (例えばリジン生合成酵素をコードする遺伝子 (dapA)、システイン合成酵素 (cysteine synthase A: cysK, cysteine synthase B: cysM)、アミノデオキシコリスミ酸合成酵素 (aminodeoxychorismate synthase subunit 2: pabA, aminodeoxychorismate synthase

subunit 1: pabB) アミノデオキシコリスミ酸リアーゼ (aminodeoxychorismate lyase:pabC)、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (serine hydroxymethyltransferase : glyA)、グルタミン酸5-キナーゼ (glutamate 5-kinase: proB) グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase: proA)、3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (3-isopropylmalatedehydrogenase: leuB)、アラニンラセマーゼ (alanine racemase 1 : alr、alanine racemase 2 :dadX)、ホスホセリン/ホスホヒドロキシスレオニンアミノトランスフェラーゼ (phosphoserine/phosphohydroxythreonineaminotransferase : serC)、アルギニノコハク酸リアーゼ (argininosuccinate lyase : argH)、ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ (histidinol dehydrogenase:hisD)、スレオニンデアミナーゼ (threonine deaminase: ilvA)、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ (diaminopimelate decarboxylase: lysA)、o-サクシニルホモセリン (チオール) -リアーゼ (0-succinylhomoserine(thiol)-lyase / 0-succinylhomoserine lyase: metB)、コリスミ酸ムターゼ/プレフェン酸デヒドラターゼ (fused chorismate mutase/prephenate dehydratase: pheA)、ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ (pyrroline-5-carboxylate reductase: proC)、スレオニン合成酵素 (threonine synthase: thrC)、インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ (fused indole-3-glycerol phosphate synthase/phosphoribosylanthranilate isomerase: trpC)、およびコリスミ酸ムターゼ/プレフェン酸デヒドロゲナーゼ (fused chorismate mutase/prephenate dehydrogenase: tyrA))などを挙げるができる。

[0015] 本明細書において、「薬効関連遺伝子」とは、提供された生物（例えばヒト）に対して、何らかの医学的または生物学的な利益を提供することができる遺伝子または核酸配列、またはその一部をいい、例えば、I型線毛D-マンノース特異的アドヘシン (Type 1 fimbrin D-mannose specific adhesin: fimH)、カーリー線毛主要サブユニット (Major curlin subunit ge

ne A : csgA)などを挙げることができる。薬効関連遺伝子には、ノックアウトすることで何らかの薬効が発揮される遺伝子、および発現を向上されることで薬効が発揮される遺伝子の双方が含まれる。また薬効関連遺伝子には、プロバイオティクスなどの、生物学的成分（例えば、微生物全体またはその一部）を含む組成物であって、対象内において有害微生物に作用する、有用微生物フローラを形成する、健康状態を維持または向上する、および/または免疫力を賦活する等の機能を有する微生物またはその生物学的成分自体、あるいはこれらを含む組成物を提供することができる遺伝子または核酸配列、またはその一部も含まれる。

[0016] 本明細書において、「形態関連遺伝子」とは、微生物が有する形態を直接または間接的に決定づける要素（例えば、タンパク質、代謝物など）を提供し得る遺伝子または核酸配列、またはその一部をいい、例えば、細菌のアクチン様細胞骨格タンパク質 (Cell shape-determining protein : mreB)などを挙げることができる。

[0017] 本明細書において、「定着性関連遺伝子」とは、宿主（例えばヒト）の器官や細胞において微生物が接着し、粘着し、および/または付着などするための機構を構成するタンパク質をコードする遺伝子または核酸配列、またはその一部、またはそのような遺伝子の発現を制御する因子をコードする遺伝子または核酸配列、またはその一部をいい、例えば、DNA結合型転写活性化因子 (DNA-binding transcriptional activator : flhD)、DNA結合型鉄獲得調節因子 (Ferric uptake regulator : fur)、DNA結合型グルシトールオペロン転写抑制因子 (glucitol operon transcriptional repressor : srlR)、ミリストイル化アシルキャリアプロテイン依存的アシル基転移酵素 (Myristoyl-acyl carrier protein (acp)-dependent acyl transferase : lpxM)、DNA結合型転写活性化因子 (DNA-binding transcriptional activator : ntrC)、DNA結合型転写抑制因子 (DNA-binding transcriptional repressor : cytR)、DNA結合型マルトースレギュロン転写抑制因子 (DNA-binding mal regulon transcriptional r

epressor : m a l l) 、 D N A 結合型転写デュアル調節因子 (DNA-binding transcriptional dual regulator : n a g C) 、 D N A 結合型転写活性化因子 (DNA-binding transcriptional activator : f l h C) 、 高親和型グルコン酸輸送体 (High-affinity gluconate transporter : g n t T) 、 D N A 結合型フルクトースリシンオペロン転写抑制因子 (DNA-binding fructo selysine utilization operon transcriptional repressor : f r l R) 、 D N A 結合型転写抑制因子 (DNA-binding transcriptional repressor : k d g R) 、 D N A 結合型転写調節因子 (DNA-binding transcriptional r egulator : o x y R) 、 センサーキナーゼ (osmolarity sensor protein : e n v Z) 、 鞭毛構成因子 (flagellar filament structural protein : f l i C) 、 タガトース6リン酸キナーゼ (Tagatose 6-phosphate kinase : g a t Z) 、 D N A 結合型転写調節因子 (DNA-binding transcriptional regulator : o m p R) 、 およびロイシン応答調節タンパク質 (Leucine-re sponsive regulatory protein : l r p) などを挙げることができる。

[0018] 本明細書において、「タンパク質が通常有する機能」または「タンパク質が通常有する活性」とは、あるタンパク質が通常存在する環境において発揮し得る機能または活性をいう。また「タンパク質が通常有する機能が実質的に回復しない」とは、遺伝子が改変された結果、当該遺伝子がコードするタンパク質の機能および／または活性が低減または欠損し、その後当該機能および／または活性が、当該改変がされていない遺伝子によってコードされるタンパク質と比較して、元の機能および／または活性に戻らないことをいう。

[0019] 本明細書において、タンパク質の機能または活性が「低減する」または「欠損する」とは、遺伝子が改変された結果、当該遺伝子がコードするタンパク質の機能および／または活性が、元のタンパク質の機能および／または活性と比較した場合に、少なくとも実質的に低下していることをいう。タンパク質の機能または活性が「低減する」または「欠損する」とは、元のタンパク質の機能および／または活性よりも、少なくとも約10%低い、少なくと

も約25%低い、少なくとも約50%低い、少なくとも約75%低い、および／または少なくとも約90%低い場合を含む。

[0020] 本明細書において、微生物が「伝播」するとは、直接的な接触を介して、または空気や水、飲食物、物体などを介して間接的に、微生物が第一の個体および／または細胞から、第二の個体および／または細胞へ移ることをいう。伝播には、プラスミド、トランスポゾン、バクテリオファージ等の可動性遺伝因子が関与する場合も含まれる。

[0021] (好ましい実施形態)

以下に本開示の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本開示のよりよい理解のために提供されるものであり、本開示の範囲は以下の記載に限定されるべきでない。したがって、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本開示の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。また、本開示の以下の実施形態は単独でも使用されあるいはそれらを組み合わせて使用することができる。

[0022] 本開示の一局面において、微生物であって、該微生物における少なくとも1つの遺伝子が改変されており、該改変は、該遺伝子によってコードされるタンパク質が通常有する機能が実質的に回復しないものである、微生物が提供される。本開示の微生物は、細菌治療剤の環境中への拡散防止技術として有用である。

[0023] 通常有する機能が実質的に回復しない改変が微生物に施されることにより、その改変微生物は、その通常有する機能を回復される外的要因（例えば、栄養（必須栄養素）、ある種の薬剤であり得る）が提供されない限り通常有する機能を有せないことになるため、通常有する機能（例えば、生存、特殊状態での維持等であり得る）をその外的要因の有無で制御・管理することができ、例えば、環境におけるコントロールに応用することができる。

[0024] 改変微生物の細菌剤としての利用については、2020年にゲノム編集技術の利用により得られた医薬品関連生物の取り扱いが通知されており、この通知では、カルタヘナ法の規制対象外と判断された場合であっても（すな

わち、最終的に得られた生物に細胞外で加工した核酸が含まれない場合でも)、生物多様性への影響が生ずる恐れがあると判断された場合、生物多様性に対する影響を防止するために必要な措置を執ることが求められている。生物多様性に対する影響とは、対象生物が体外排出される際、競合する生物との優位性の有無、または、影響を受ける可能性のある野生動植物等の有無を評価することである。こうしたリスクを特定し予め届け出ることが、臨床試験開始の要件に課される可能性がある。このため、ゲノム編集技術を利用した微生物製剤を臨床試験の開始のみならず、実臨床で活用されるためには、体外排出後の非増殖性に関する情報(生残条件、生残時間等)を明示できるようにすることが最も現実的と考えられる。

[0025] 一つの例として、限定を意図しないが、本開示では、微生物の増殖に必要なアミノ酸を産生する能力を除去すると、栄養要求株として知られる微生物を生じる。その栄養要求性の微生物を生存させ、または増殖させる場合には、増殖に必要なアミノ酸を外部から与える必要がある。栄養要求性微生物の作製は、特に大腸菌についてよく知られている。

[0026] 一つの例として、限定を意図しないが、本開示では、微生物を目的の環境に導入する場合、標的環境への導入後に、導入された微生物を制御できることが望ましく、例えば、導入された微生物が標的環境以外の環境に伝播や拡散しないことが望ましい。このような制御は、例えば、標的環境に導入する微生物に栄養要求性を付与することによって達成することができる。その一方で、微生物に栄養要求性を付与した場合であっても、その微生物が増殖を繰り返す過程において、その栄養要求性が消失することも知られており、これは栄養要求性を付与するために改変した遺伝子やタンパク質において、その遺伝子やタンパク質の機能を回復する改変が生じてしまうことに起因すると考えられる。

[0027] 本開示の一実施形態において、少なくとも1つの遺伝子が改変された微生物において、当該改変された遺伝子によってコードされるタンパク質が通常有する機能が実質的に回復しない微生物を提供することができ、このような

遺伝子としては、必須遺伝子、薬効関連遺伝子、形態関連遺伝子、および定着性関連遺伝子を挙げることができるが、これらの遺伝子に限られない。

[0028] 一実施形態において、必須遺伝子としては、必須遺伝子によってコードされるタンパク質が通常有する活性が低減または欠損した場合に、当該微生物が環境または対象において実質的に伝播しないような遺伝子または核酸配列、またはその一部を挙げることができ、例えば、アミノ酸合成酵素、核酸合成酵素、およびビタミン合成酵素などをコードする遺伝子を挙げることができるが、これらに限られるものではない。

[0029] 一実施形態において、薬効関連遺伝子としては、提供された生物（例えばヒト）に対して、何らかの医学的または生物学的な利益を提供することができる遺伝子または核酸配列、またはその一部を挙げることができ、例えば、I型線毛D-マンノース特異的アドヘシン（Type 1 fimbriae D-mannose specific adhesin : fimH）、カーリー線毛主要サブユニット（Major curli subunit gene A : csgA）などを挙げることができるが、これらに限られるものではない。薬効関連遺伝子には、プロバイオティクスなどの、生物学的成分（例えば、微生物全体またはその一部）を含む組成物であって、対象内において有害微生物に作用する、有用微生物フローラを形成する、健康状態を維持または向上する、および/または免疫力を賦活する等の機能を有する微生物またはその生物学的成分自体、あるいはこれらを含む組成物を提供することができる遺伝子または核酸配列、またはその一部も含まれる。

[0030] 一実施形態において、形態関連遺伝子としては、微生物が有する形態を直接または間接的に決定づける要素（例えば、タンパク質、代謝物など）を提供し得る遺伝子または核酸配列、またはその一部を挙げることができ、例えば、細菌のアクチン様細胞骨格タンパク質（Cell shape-determining protein : mreB）などを挙げることができるが、これらに限られるものではない。

[0031] 一実施形態において、定着性関連遺伝子としては、宿主（例えばヒト）の器官や細胞において微生物が接着し、粘着し、および/または付着などするための機構を構成するタンパク質をコードする遺伝子または核酸配列、また

はその一部、またはそのような遺伝子の発現を制御する因子をコードする遺伝子または核酸配列、またはその一部を挙げることができ、例えば、DNA結合型転写活性化因子 (DNA-binding transcriptional activator: flhD)、DNA結合型鉄獲得調節因子 (Ferric uptake regulator: fur)、DNA結合型グルシトールオペロン転写抑制因子 (glucitol operon transcriptional repressor: srlR)、ミリストイル化アシルキャリアプロテイン依存的アシル基転移酵素 (Myristoyl-acyl carrier protein (acp)-dependent acyltransferase: lpxM)、DNA結合型転写活性化因子 (DNA-binding transcriptional activator: ntrC)、DNA結合型転写抑制因子 (DNA-binding transcriptional repressor: cytR)、DNA結合型マルトースレギュロン転写抑制因子 (DNA-binding mal regulon transcriptional repressor: malI)、DNA結合型転写デュアル調節因子 (DNA-binding transcriptional dual regulator: nagC)、DNA結合型転写活性化因子 (DNA-binding transcriptional activator: flhC)、高親和型グルコン酸輸送体 (High-affinity gluconate transporter: gntT)、DNA結合型フルクトースリシンオペロン転写抑制因子 (DNA-binding fructoselysine utilization operon transcriptional repressor: frlR)、DNA結合型転写抑制因子 (DNA-binding transcriptional repressor: kdgR)、DNA結合型転写調節因子 (DNA-binding transcriptional regulator: oxyR)、センサーキナーゼ (osmolarity sensor protein: envZ)、鞭毛構成因子 (flagellar filament structural protein: flhC)、タガトース6リン酸キナーゼ (Tagatose 6-phosphate kinase: gatZ)、DNA結合型転写調節因子 (DNA-binding transcriptional regulator: ompR)、およびロイシン応答調節タンパク質 (Leucine-responsive regulatory protein: lrp)などを挙げることができるが、これらに限られるものではない。

[0032] 一実施形態において、アミノ酸合成酵素としては、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、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンから選択される1または複数のアミノ酸の合成に関与する酵素を挙げることができる。例示的なアミノ酸合成酵素としては、リジン生合成酵素をコードする遺伝子 (dapA)、システイン合成酵素 (cysteine synthase A: cysK、cysteine synthase B: cysM)、アミノデオキシコリスミ酸合成酵素 (aminodeoxychorismate synthase subunit 2: pabA、aminodeoxychorismate synthase subunit 1: pabB) アミノデオキシコリスミ酸リアーゼ (aminodeoxychorismate lyase: pabC)、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (serine hydroxymethyltransferase : glyA)、グルタミン酸5-キナーゼ (glutamate 5-kinase: proB) グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase : proA)、3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (3-isopropylmalate dehydrogenase: leuB)、アラニンラセマーゼ (alanine racemase 1 : alr、alanine racemase 2 : dadX)、ホスホセリン/ホスホヒドロキシスレオニンアミノトランスフェラーゼ (phosphoserine/phosphohydroxythreonine aminotransferase: serC)、アルギニノコハク酸リアーゼ (argininosuccinate lyase : argH)、ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ (histidinol dehydrogenase: hisD)、スレオニンデアミナーゼ (threonine deaminase: ilvA)、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ (diaminopimelate decarboxylase: lysA)、0-サクシニルホモセリン (チオール) -リアーゼ (0-succinylhomoserine(thiol)-lyase /0-succinylhomoserine lyase: metB)、コリスミ酸ムターゼ/プレフェン酸デヒドラターゼ (fused chorismate mutase /prephenate dehydratase: pheA)、ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ (pyrroline-5-carboxylate reductase: proC)、スレオニン合成酵素 (threonine synthase: thrC)、インドール-3-グリセロールリン酸シクターゼ (fused indole-3-glycerol phosphate synthase/phosphoribosylanthranilate isomerase: trpC)、およびコリスミ酸ムターゼ/プレフェン酸デヒド

ロゲナーゼ (fused chorismate mutase/prephenate dehydrogenase: tyrA) を挙げることができる。本開示の一実施形態において、このようなアミノ酸合成酵素に改変を行うことで、当該アミノ酸合成酵素が合成に関与するアミノ酸に対して栄養要求性が生じるような微生物を生産することができる。

[0033] 一実施形態において、核酸合成酵素としては、任意の核酸の合成に関与する酵素を挙げることができる。本開示の一実施形態において、このような核酸合成酵素に改変を行うことで、当該核酸合成酵素が合成に関与する核酸に対して栄養要求性が生じるような微生物を生産することができる。一実施形態において、核酸合成酵素としては、例えば、チミジル酸合成酵素をコードする遺伝子 (thyA)、5-(カルボキシアミノ)イミダゾールリボヌクレオチド合成酵素(5-(carboxyamino)imidazole ribonucleotide synthase: purK)、ホスホリボシルグリシンアミドホルミルトランスフェラーゼ 1 (phosphoribosylglycinamide formyltransferase 1: purN)、ホスホリボシルグリシンアミドホルミルトランスフェラーゼ 2 (phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2: purT)、アスパラギン酸カルバモイルトランスフェラーゼ触媒サブユニット(aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit: pyrB)、ジヒドロオロターゼ (dihydroorotase: pyrC)、ジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ、タイプ 2 (dihydroorotate dehydrogenase, type 2: pyrD)、オロチン酸ホスホリボシル基転移酵素(ototate phosphoribosyltransferase: pyrE)を挙げることができる。

[0034] 一実施形態において、ビタミン合成酵素としては、例えばビタミンA群、ビタミンB群、ビタミンC群、ビタミンD群、ビタミンE群、およびビタミンK群などから選択される1または複数のビタミンの合成に関与する酵素を挙げることができる。本開示の一実施形態において、このようなビタミン合成酵素に改変を行うことで、当該ビタミン合成酵素が合成に関与するビタミンに対して栄養要求性が生じるような微生物を生産することができる。一実施形態において、ビタミン合成酵素としては、例えば、チアミン生合成酵素の構造遺伝子 (phosphomethylpyrimidine synthase: thiC, thiamine phos

phate synthase: thiE, sulfur carrier protein: thiS, adenylyltransferase: thiF, sulfur carrier protein: thiS, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate: thiol sulfurtransferase: thiG, 2-iminoacetate synthase: thiH)、3,4-ジヒドロキシ-2-ブタノン-4-リン酸シンターゼ (3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase: ribB)、リボフラビン合成酵素 (riboflavin synthase: ribC)、ジアミノヒドロキシホスホリボシルアミノピリミジンデアミナーゼ/5-アミノ-6-(5-ホスホリボシルアミノ)ウラシルレダクターゼ (fused diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase/5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase: ribD)、キノリン酸シンターゼ (quinolinate synthase: nadA)、アスパラギン酸オキシダーゼ (L-aspartate oxidase: nadB)、パントテン酸合成酵素 (pantothenate synthetase: panC)、エリスロン酸-4-リン酸デヒドロゲナーゼ (erythronate-4-phosphate dehydrogenase: pdxB)、ピメロイルアシルキャリアタンパク質メチルエステルエステラーゼ (pimeloyl-acyl carrier protein methyl ester esterase: bioH)、およびコバラミン非依存性ホモシステイントランスメチラーゼ (cobalamin-independent homocysteine transmethylase: metE) を挙げることができる。

[0035] 一実施形態において、本開示の微生物における少なくとも1つの遺伝子の改変は、標準的な分子生物学の手法を利用することができる。一実施形態において、改変は遺伝子における点変異を含むことができ、標的二本鎖ポリヌクレオチドを部位特異的にかつ正確に修飾するための方法として、例えば標的二本鎖ポリヌクレオチドと、Casタンパク質と、ガイドRNAとを接触させる方法、または標的二本鎖ポリヌクレオチドと、Casタンパク質と核酸塩基変換酵素との複合体と、ガイドRNAとを接触させる方法などを用いることができる。このような方法では、Cas9タンパク質とガイドRNAとが複合体を形成し、標的二本鎖ポリヌクレオチドに結合する。ここで、Cas9タンパク質は、前記標的二本鎖ポリヌクレオチドを切断しないか又は一方の鎖のみを切断して、すなわち、二本鎖切断を起こすことなく、標的ポ

リヌクレオチド内の塩基配列を修飾する。一実施形態において、修飾は好ましくは一塩基単位で行われる。

[0036] 一実施形態において、上記の一塩基単位の特異的かつ正確な修飾（一塩基編集）は、好ましくは、複合体中の核酸塩基変換酵素を用いて行われる。核酸塩基変換酵素としては、デアミナーゼ（脱アミノ化酵素）が挙げられる。デアミナーゼとしては、例えば、シトシンデアミナーゼ、シチジンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ等を使用することができる。一実施形態における複合体は、係る核酸塩基変換酵素に加えて、Indel形成を阻害するため、uracil DNA glycosylase inhibitor (UGI) といったIndel形成阻害因子を含んでいてもよい。

[0037] 一実施形態において、上記の一塩基単位の特異的かつ正確な修飾（一塩基編集）は、核酸配列認識モジュールとDNAグリコシラーゼとの複合体を用いた手法を利用することもでき、細胞内に導入された発現ベクター又はRNA分子から、核酸配列認識モジュールとDNAグリコシラーゼとの複合体が発現すると、該核酸配列認識モジュールが目的の二本鎖DNA（例、ゲノムDNA）内の標的ヌクレオチド配列を特異的に認識して結合し、該核酸配列認識モジュールに連結されたDNAグリコシラーゼの作用により、標的化された部位（標的ヌクレオチド配列の全部もしくは一部又はそれらの近傍を含む数百塩基の範囲内で適宜調節できる）のセンス鎖もしくはアンチセンス鎖で脱塩基反応が起こり、二本鎖DNAの一方の鎖に無塩基部位（AP部位）が生じる。すると、細胞内の塩基除去修復（BER）系が作動し、まずAPエンドヌクレアーゼがAP部位を認識してDNA片鎖のリン酸結合を切断し、エキソヌクレアーゼが脱塩基されたヌクレオチドを除去する。次にDNAポリメラーゼが反対鎖DNAを鋳型として新たにヌクレオチドを挿入し、最後にDNAリガーゼが繋ぎ目を修復する。このBERのいずれかの段階で修復ミスが起こることにより、種々の変異が導入される。上述のように、酵素活性を失っているがAP部位への結合能を保持する変異APエンドヌクレアーゼを併用することにより、細胞内のBER機構が阻害され、修復ミスの頻

度、したがって変異導入効率を向上させることができる。

[0038] CRISPR-Casシステムは、標的ヌクレオチド配列に対して相補的なガイドRNAにより目的の二本鎖DNAの配列を認識するので、標的ヌクレオチド配列と特異的にハイブリッド形成し得るオリゴRNAおよび／またはオリゴDNAを合成するだけで、任意の配列を標的化することができ、しかも標的化された部位において、二本鎖DNAをほどいて一本鎖構造の領域と、それに隣接する緩んだ二本鎖DNA構造をとる領域とを生成するため、二本鎖DNAの構造を変化させる因子を組み合わせることなく、標的化された部位特異的に核酸塩基変換酵素やDNAグリコシラーゼを効率よく作用させることができる。したがって、本開示のより好ましい実施態様においては、核酸配列認識モジュールとして、Casの少なくとも1つのDNA切断能を持たないCRISPR-Casシステム（CRISPR-変異Cas）、またはCasの両方のDNA切断能を持たないCRISPR-Casシステム（CRISPR-変異Cas）を好ましく用いることができる。

[0039] CRISPR-変異Casを用いた本開示の核酸配列認識モジュールは、標的ヌクレオチド配列と相補的なガイドRNAと、変異Casタンパク質のリクルートに必要なtracrRNAとからなるRNA分子と変異Casタンパク質との複合体として提供される。

[0040] 一実施形態において、改変はin vivo又はin vitroの任意の環境で行うことができる。一実施形態において、改変は、生体外、すなわちex vivo又はin vitroで行うこともできる。

[0041] 本開示の一実施形態において、本開示の微生物における少なくとも1つの遺伝子の改変は、上記のような手法により、終止コドンを生じさせる変異を含むことができる。これにより、当該遺伝子がコードするタンパク質が通常有する機能または活性を低減または欠損させることができる。

[0042] 本開示の一実施形態において、本開示の微生物における少なくとも1つの遺伝子の改変は、ある1つの遺伝子において少なくとも2ヶ所、3ヶ所、4ヶ所、5ヶ所、6ヶ所、7ヶ所、または8ヶ所の変異を含むことができる。

ある1つの遺伝子において少なくとも2ヶ所の変異を生じさせることで、当該遺伝子によってコードされるタンパク質が通常有する機能が実質的に回復しないものとすることができる。

[0043] 本開示の一実施形態において、微生物における少なくとも1つの遺伝子の改変は、塩基編集、好ましくは一塩基編集によって行うことが好ましい。遺伝子組換え技術を利用して作出した必須遺伝子欠損大腸菌株を対象に、生育必須物質（核酸またはアミノ酸）を添加しない液体培地中の濁度を指標にした生育曲線を描くと、培養開始から一定時間は生育が見られない。例えば、Sci Transl Med. 2019 Jan 16;11(475):eaau7975およびNat Biotechnol. 2018 Oct;36(9):857-864において、少なくとも16時間まで生育しないことが示されている。しかし、遺伝子組換え技術を利用して作出した単一の必須遺伝子を欠損させた大腸菌株を100時間以上培養すると、生育が見られることを本発明者らは本開示の過程を通じて見出している。

[0044] 本開示の一実施形態において、本開示の微生物における少なくとも1つの遺伝子の改変は、少なくとも2種の遺伝子におけるそれぞれ少なくとも1ヶ所の変異を含むことができ、例えば少なくとも2種の遺伝子は、必須遺伝子、薬効関連遺伝子、形態関連遺伝子、および定着性関連遺伝子からなる群からそれぞれ独立して選択されることができる。他の実施形態において、本開示の微生物における少なくとも1つの遺伝子の改変は、少なくとも2種の遺伝子におけるそれぞれ少なくとも2ヶ所の変異を含むことができる。少なくとも2種の遺伝子においてそれぞれ少なくとも1ヶ所または少なくとも2ヶ所の変異を生じさせることで、1種の遺伝子を改変させた場合と比較して、当該遺伝子によってコードされるタンパク質が通常有する機能が復帰するような変異が生じる割合を減少させることができる。理論に縛られるものではないが、これは1種の遺伝子にのみ変異を加えた場合は、他の経路によって相補されて機能が復帰する可能性があるものの、2種の遺伝子に変異を導入することにより、他の経路による相補的な機能の復帰を回避することができると考えられる。

- [0045] 一実施形態において、本開示は、例えば、これに限られないが、生理的に補完関係にない独立した2つの生育必須物質の生合成遺伝子を対象に、各遺伝子配列内に終止コドンを導入し、デュアル生合成遺伝子ノックアウト編集株を塩基編集技術により作出することができる。
- [0046] 一実施形態において、本開示によれば、生体内では良好に増殖するが、体外排出後では生育できないという2つの条件を同時に満たすことを実現する改変微生物を提供することができる。理論に縛られるものではないが、2遺伝子をデュアルに機能欠損させることの意義は、1遺伝子内に2つの終止コドンを導入するダブル変異株を作出しても、1つのバイパス経路が補完もしくは代替すれば、非増殖性の付与効果が一度に消失してしまう可能性があり、この可能性を限りなく阻止することにある。微生物の突然変異発生頻度は、 10^6 から 10^7 コロニー形成単位（CFU）につき1回程度であるため、2遺伝子にデュアルに復帰変異や代替遺伝子に変異が入る確率は、理論上、 10^{12} から 10^{14} CFUにつき1回程度である。1回の臨床想定投与菌数が最大 10^9 から 10^{10} CFUであることを踏まえると、2遺伝子にデュアル変異が同時に入ることはあり得ない、もしくは、可能性は限りなく低くできる。
- [0047] 一実施形態において、改変の対象となる必須遺伝子は、対象微生物がその生合成遺伝子もしくはその関連遺伝子を有し、2遺伝子が機能的に補完関係にないことが好ましい。これにより、2遺伝子のデュアル機能欠損株が、通常的环境下では生育できず死滅する状況を作為的に作り出すことが可能であり、対象微生物の生育のためには周辺環境から2つの生育必須物質の同時補給に完全に依存する条件を課すことができる。例えば、生体の腸内環境を志向する場合、生体由来の核酸関連物質、食事由来の必須アミノ酸関連物質や必須ビタミン関連物質が存在する環境下においてのみ、当該微生物が生存できるように生存の場を限定できる。他の実施形態において、体外排出後の環境中には存在しないか、仮に存在したとしても対象微生物が長期間生育できないことが成立する生育必須物質およびその生合成遺伝子を選択することも

好ましい。

[0048] 復帰変異の出現率は任意の手法で測定することができるが、例えば、一実施形態において、復帰変異の出現率は以下の計算式によって算出することができる。

(復帰変異株出現率) = (培地に出現したコロニー数) / (培地に塗抹した菌液の総菌数)

[0049] 一実施形態において、本開示の微生物は、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*)、ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*)、バクテロイデス門 (*Bacteroidetes*)、ファーミキューテス門 (*Firmicute*)、アクチノ細菌 (*Actinobacteria*)、プロテオ細菌 (*Proteobacteria*)、フソバクテリア門 (*Fusobacteria*) 又はウェルコミクロビウム門 (*Verrucomicrobia*) の門のメンバー及びバクテロイデス (*Bacteroides*)、アリスティペス (*Alistipes*)、フィーカリバクテリウム (*Faecalibacterium*)、パラバクテロイデス (*Parabacteroides*)、プレボテラ (*Prevotella*)、ロセブリア (*Roseburia*)、ルミノコッカス (*Ruminococcus*)、クロストリジウム (*Clostridium*)、オシリバクター (*Oscillibacter*)、ジェミガー (*Gemmiger*)、バルネシエラ (*Barnesiella*)、ディアリスター (*Dialister*)、パラステレラ (*Parasutterella*)、ファスコラクトバクテリウム (*Phascolarctobacterium*)、プロピオニバクテリウム (*Propionibacterium*)、サテレラ (*Sutterella*)、ブラウティア (*Blautia*)、パラプレボテラ (*Paraprevotella*)、コプロコッカス (*Coprococcus*)、オドリバクター (*Odoribacter*)、スピロプラズマ (*Spiroplasma*)、アナエロスティペス (*Anaerostipes*)、アッケルマンシア (*Akkermansia*)、ラクトバ

チラス (*Lactobacillus*)、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*)、アッカーマンシア (*Akkermansia*)、メガスファエラ (*Megasphaera*)、ユーバクテリウム (*Eubacterium*)、バリアトリクス (*Bariatricus*)、エリユシペラトクロストリジウム (*Erysipelatoclostridium*)、ペディオコッカス (*Pediococcus*) エンテロコッカス (*Enterococcus*)、シュードフラボニフラクター (*Pseudoflavonifractor*)、ラクノスピラ科細菌 (*Lachnospiraceae*)、エリシペロトリクス科細菌 (*Erysipelotrichaceae*) オシロスピラ科細菌 (*Oscillospiraceae*)、フィーカリカタナ (*Faecalicatena*) 属の細菌、*Enterococcus casseliflavus*、*Enterococcus gallinarum*、*Enterococcus faecalis*、*Enterococcus hirae*、*Enterococcus mundtii*、*Lactiplantibacillus plantarum*、*Lactobacillus gasseri*、*Akkermansia muciniphila*、*Faecalibacterium prausnitzii*、*Bifidobacterium* spp.、*Bifidobacterium animalis*、*Bifidobacterium breve*、*Streptococcus cristatus*、*Streptococcus gordonii*、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus salivarius*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Porphyromonas gingivalis*、*Clostridium acetobutylicum*、*Clostridium butyricum*、*Clostridium sporogenes*、*Clostridium cocleatum*、*Clostridium*

saccharogumia, Clostridium spiroforme, Clostridium innocuum, Clostridium ramosum, Clostridium hathewayi, Clostridium saccharolyticum, Clostridium scindens, Clostridium sp., Clostridium bolteae, Clostridium indolis, Clostridium lavalense, Clostridium asparagiforme, Clostridium symbiosum, Clostridiales bacterium, Fusobacterium nucleatum, Blautia hydrognotrophica, Blautia stercoris, Blautia wexlerae, Blautia producta, Blautia coccoides, Blautia hansenii, Blautia faecis, Blautia glucerasea, Blautia luti, Blautia schinkii, Megasphaera massiliensis, Megasphaera elsdenii, Megasphaera cerevisiae, Megasphaera indica, Megasphaera paucivorans, Megasphaera sueciensis, Megasphaera micronuciformis, Megasphaera hexanoica, Eubacterium contortum, Eubacterium fissicatena, Eubacterium limosum, Eubacterium rectale, Eubacterium aerofaciens, Eubacterium callanderi, Eubacterium eligens, Eubacterium hallii, Bariatricus massiliensis, Anaerostipes hadrus, Anaerostipes butyraticus, Anaerostipes rhamnosivora

ns, *Anaerostipes caccae*, *Anaerotruncus colihominis*, *Faecalicatena fissicatena*, *Faecalicatena contorta*, *Erysipelatoclostridium ramosum*, *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides merdae*, *Parabacteroides goldsteinii*, *Parabacteroides johnsonii*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus cellicola*, *Pediococcus clausenii*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus ethanolidurans*, *Pediococcus inopinatus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus stilesii*, *Roseburia hominis*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia faecis*, *Roseburia massiliensis*, *Roseburia cecicola*, *Roseburia inulinivorans*, *Bacteroides coprocola*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides sp.*, *Pseudoflavonifractor capillosus*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Lachnospiraceae sp.*, *Erysipelotrichaceae bacterium*, *Ruminococcus sp.*, *Oscillospiraceae bacterium*, *Oscillibacter valericigenes*, および *Lactobacillus reuteri* などが挙げられる。

[0050] 一実施形態において、本開示の微生物は、対象の腸内、口腔、および／ま

たは皮膚などに生息することができ、例えば、対象の糞便中の全培養可能微生物の少なくとも約0.1%、少なくとも約0.5%、少なくとも約1%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、又は少なくとも約40%超を構成する属のものである。対象の腸又は糞便中の微生物は、16Sリボソーム配列決定を含む当技術分野で公知の任意の技術によって分析することができる。例えばバクテロイデス (*Bacteroides*) は、ヒト腸内で最も天然に豊富な属であり、例示的なバクテロイデス (*Bacteroides*) 種としては、*B. アシジファシエンス* (*B. acidifaciens*)、*B. アミロフィルス* (*B. amylophilus*)、*B. アサッカロリチクス* (*B. asaccharolyticus*)、*B. バルネシアエス* (*B. barnesi*)、*B. ビビウス* (*B. bivius*)、*B. ブッカエ* (*B. buccae*)、*B. ブッカリス* (*B. buccalis*)、*B. カッカエ* (*B. caccae*)、*B. カエシコラ* (*B. caecicola*)、*B. カエシガリナルム* (*B. caecigallinarum*)、*B. カピロサス* (*B. capillosus*)、*B. カピルス* (*B. capillus*)、*B. セルロシリチクス* (*B. cellulolyticus*)、*B. セルロソルベンス* (*B. cellulosolvans*)、*B. チンチラ* (*B. chinchilla*)、*B. クラルス* (*B. clarus*)、*B. コアギュランス* (*B. coagulans*)、*B. コプロコラ* (*B. coprocola*)、*B. コプロフィルス* (*B. coprophilus*)、*B. コプロスイス* (*B. coprosuis*)、*B. コルポリス* (*B. corporis*)、*B. デンチコラ* (*B. denticola*)、*B. ジシエンス* (*B. disiens*)、*B. ジスタソニス* (*B. distasonis*)、*B. ドレイ* (*B. dorei*)、*B. エゲルチイ* (*B. eggerthii*)、*B. エンドドンタリス* (*B. endodontalis*)、*B. ファエシチンチラエ* (*B. faecichinchillae*)、*B. ファエシス* (*B. faecis*)、*B. フィネゴルジイ* (*B. finegoldii*)、*B. フルクスス*

(*B. fluxus*)、*B. フォルシス* (*B. forsythus*)、*B. フラギリス* (*B. fragilis*)、*B. フルコス* (*B. furcosus*)、*B. ガラクツロニクス* (*B. galacturonicus*)、*B. ガリナセウム* (*B. gallinaceum*)、*B. ガリナルム* (*B. gallinarum*)、*B. ギンギバリス* (*B. gingivalis*)、*B. ゴルドステイニイ* (*B. goldsteinii*)、*B. グラシリス* (*B. gracilis*)、*B. グラミニソルベンス* (*B. graminisolvens*)、*B. ヘルコゲネス* (*B. helcogenes*)、*B. ヘパリノリチクス* (*B. heparinolyticus*)、*B. ヒペルメガス* (*B. hypermegas*)、*B. インテルメジウス* (*B. intermedius*)、*B. インテスチナリス* (*B. intestinalis*)、*B. ジョンソニイ* (*B. johnsonii*)、*B. レビイ* (*B. levvi*)、*B. ロエシェイイ* (*B. loescheii*)、*B. ルチ* (*B. lutii*)、*B. マカカエ* (*B. macacae*)、*B. マシリエンシス* (*B. massiliensis*)、*B. メラニノゲニクス* (*B. melaninogenicus*)、*B. メルダエ* (*B. merdae*)、*B. ミクロフス* (*B. microfus*)、*B. ムルアチアシツス* (*B. multiacidus*)、*B. ノドス* (*B. nodosus*)、*B. ノルジイ* (*B. nordii*)、*B. オクラセウス* (*B. ochraceus*)、*B. オレイシプレヌス* (*B. oleiciplenus*)、*B. オラリス* (*B. oralis*)、*B. オリス* (*B. oris*)、*B. オウロルム* (*B. oulorum*)、*B. オバタス* (*B. ovatus*)、*B. パウロサッカオリチクス* (*B. paurosaccharolyticus*)、*B. ペクチノフィルス* (*B. pectinophilus*)、*B. ペントサセウス* (*B. pentosaceus*)、*B. プレベイウス* (*B. plebeius*)、*B. ニューモシンテス* (*B. pneumosintes*)、*B. ポリプラグマツス* (*B. polypragmatus*)、*B. プラエアクツス* (*B. praeacutus*)、*B. プロピオニシファシエンス* (*B. propi*

onicifaciens)、B. プトレジニス (B. putredinis)、B. ピオゲネス (B. pyogenes)、B. レチキュロテルミチス (B. reticulotermitis)、B. ロデンチウム (B. rodentium)、B. ルミニコラ (B. ruminicola)、B. サラニトロニス (B. salanitronis)、B. サリボスス (B. salivosus)、B. サリエルシアエ (B. salyersiae)、B. サルトリイ (B. sartorii)、B. セジメント (B. sediment)、B. スプランクニクス (B. splanchnicus)、B. ステルコリロソリス (B. stercorisoris)、B. ステルコリス (B. stercoris)、B. スシノゲネス (B. succinogenes)、B. スイス (B. suis)、B. テクツス (B. tectus)、B. テルミチジス (B. termitidis)、B. テタイオタオミクロン (B. thetaiotaomicron)、B. ウレフォルミス (B. uniformis)、B. ウレオリチクス (B. ureolyticus)、B. ベロラリス (B. veroralis)、B. ブルガツス (B. vulgatus)、B. キシラニソルベンス (B. xylanisolvens)、B. キシラノリチクス (B. xylanolyticus) 又は B. ズーグレオフォンナンス (B. zooglyphofonnans) を挙げることができる。また口腔細菌としては *Streptococcus gordonii*、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus salivarius* などを、皮膚常在菌としては *Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis* などをそれぞれ挙げることができる。

[0051] 一実施形態において、本開示の微生物は、ヒト腸内、口腔、および／または皮膚で安定にコロニー形成することができる。本開示の微生物は、例えば、改変されていない同一のまたは類似の微生物と比較して、腸内において増加した存在量、安定性、または初期コロニー形成の容易さで対象の腸内にコロニー形成することができる。

[0052] 一実施形態において、本開示の微生物は、治療用の関連遺伝子をさらに含むことができる。このような治療用の関連遺伝子は微生物がもともっているものでもよく、または所望の効果を発揮する遺伝子をそのまま、または一部改変して導入することもできる。一実施形態において、治療用の関連遺伝子は、I型線毛D-マンノース特異的アドヘシン (Type 1 fimbriae D-mannose specific adhesin: fimH)などを挙げることができる。一実施形態において、本開示の微生物は、診断用の関連遺伝子をさらに含むことができる。このような診断用の関連遺伝子は微生物がもともっているものでもよく、または所望の効果を発揮する遺伝子をそのまま、または一部改変して導入することもできる。一実施形態において、診断用の関連遺伝子は、細菌のアクチン様細胞骨格タンパク質 (Cell shape-determining protein: mreB)などを挙げることができる。一実施形態において、本開示の微生物は、定着性に関連する遺伝子をさらに含むことができる。このような定着性に関連する遺伝子は微生物がもともっているものでもよく、または所望の効果を発揮する遺伝子をそのまま、または一部改変して導入することもできる。一実施形態において、定着性に関連する遺伝子は、DNA結合型転写活性化因子 (DNA-binding transcriptional activator) flhDなどを挙げることができる。

[0053] 一実施形態において、塩基編集の結果として導入される終止コドンの影響によって、標的タンパク質の機能的発現を阻害することができる。微生物が複数のタンパク質をコードする遺伝子又は核酸を含む場合、タンパク質の2つ以上をコードするオープンリーディングフレームは、例えば、単一のオペロンに存在し得ることが意図される。

[0054] 本開示の一実施形態において、本開示の微生物は、治療用製剤として利用することもでき、そのような治療用製剤は、例えば治療上有効の量の本開示の微生物を、例えば微生物の重量比で、少なくとも約0.01%、約0.05%、約0.1%、約0.2%、約0.3%、約0.4%、約0.5%、約0.6%、約0.7%、約0.8%、約0.9%、約1.0%、約1.5%

、約2.0%、約3.0%、約4.0%、約5.0%、約6.0%、約7.0%、約8.0%、約9.0%、約10.0%、約11.0%、約12.0%、約13.0%、約14.0%、約15.0%、約16.0%、約17.0%、約18.0%、約19.0%、約20.0%、約25.0%、約30.0%、約35.0%、約40.0%、約45.0%、約50.0%またはそれ以上含むことが可能である。

[0055] 本開示の他の局面において、少なくとも1つの遺伝子が改変された微生物を生産する方法であって、該少なくとも1つの遺伝子を改変する工程であって、該微生物内において、該遺伝子の標的核酸配列の1またはそれ以上のヌクレオチドを他のヌクレオチドに変換し、もしくは欠失させ、または該遺伝子の標的核酸配列に1またはそれ以上のヌクレオチドを挿入する、改変する工程、を含み、該改変は、該遺伝子によってコードされるタンパク質が通常有する機能が実質的に回復しないものである、方法が提供される。本開示の一実施形態において、本開示の方法は、本明細書の他の箇所の説明した任意の特徴を備えることができる。

[0056] (一般技術)

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

eene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Innis, M. A. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995). PCR Strategies, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, and annual updates; Sninsky, J. J. et al. (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分（全部であり得る）が参考として援用される。

[0057] 人工的に合成した遺伝子を作製するためのDNA合成技術および核酸化学については、例えばGeneArt、GenScript、Integrated DNA Technologies (IDT)などの遺伝子合成や

フラグメント合成サービスを用いることもでき、その他、例えば、Gait, M. J. (1985). *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Gait, M. J. (1990). *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein, F. (1991). *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992). *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). *Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids*, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). *Bioconjugate Techniques*, Academic Pressなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

[0058] 本明細書において「または」は、文章中に列挙されている事項の「少なくとも1つ以上」を採用できるときに使用される。「もしくは」も同様である。本明細書において「2つの値」の「範囲内」と明記した場合、その範囲には2つの値自体も含む。

本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

[0059] 以上、本開示を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本開示を説明するが、上述の説明および以

下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本開示を限定する目的で提供したのではない。従って、本開示の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

[0060] (実施例 1 : 非増殖性試験)

培地および培養条件

本実施例は、LB Broth, Miller (LB液体培地) (ナカライテスク株式会社) を用いて実施した。ノックアウト株の液体培養は、最終濃度 10 mM チミジン (東京化成工業株式会社) または 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2, 6-ジアミノピメリン酸 (東京化成工業株式会社) を添加した LB 液体培地を使用し、37°C、200 rpm 振盪条件下にて培養した。静置培養は、最終濃度 3 mM チミジン または 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2, 6-ジアミノピメリン酸を添加した LB 寒天培地を用いて実施した。

[0061] 供試菌株

野生株として、American type culture collection (ATCC) より入手した *Escherichia coli* ATCC 47076 株を使用した。ゲノム編集株として、核酸合成に関与する thymidylate synthase (thyA)、必須アミノ酸合成に関与する 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase (dapA) をコードする各遺伝子をゲノム編集によりノックアウトした株を作出した (表 1)。

[0062]

[表1]

表1. 使用した菌株

菌株	<i>thyA</i> 遺伝子配列上の アミノ酸変異箇所	<i>dapA</i> 遺伝子配列上の アミノ酸置換箇所	備考
ATCC 47076	-	-	野生株
BP2037	Q9*	-	
BP2040	Q39*	-	
BP2043	Q9*, Q39*	-	
BP2067	-	T89M, Q90*, R91C	
BP2088	-	Q196*	
BP2239	-	T89M, Q90*, R91C, Q198*	
BP2230	Q9*	T89M, Q90*, R91C	
BP2233	Q39*	T89M, Q90*, R91C	

*はストップコドンを示す。

[0063] 非増殖性試験

各添加物を含有したLB液体培地にて一晩培養した菌株0.5 mLを新しく調製した培地20 mLに植菌した。一晩培養した菌量が十分でない場合は、一晩培養した菌液1 mLを新しく調製した培地40 mLに植菌した。37°C、200 rpm 巡回培養にて菌液の濁度OD₆₀₀が1.5以上になるまで培養した。

[0064] 菌体を遠心分離（20°C，3,000 rpm，15分間）により集菌後、10 mLのリン酸緩衝生理食塩水（PBS溶液）を用いて洗浄した。さらに、2 mLのPBS溶液にて菌体を洗浄後、1.5 mLのPBS溶液に菌体を再懸濁し、菌液の濁度OD₆₀₀を測定した。

[0065] 回収した菌液のうち1 mLを100 μLずつ10枚のLB寒天培地へ塗抹し、37°Cにて培養した。dapAノックアウト株のみ回収した菌液のうち1 mLをPBS溶液にて2倍希釈後、100 μLずつ20枚のLB寒天培地へ塗抹し、37°Cにて培養した。

[0066] 塗抹した菌液の総菌数を確認するため、塗抹した菌液の残液をPBS溶液にて10⁷倍に希釈後、各100 μLを各添加物含有LB寒天培地へ塗抹した。37°Cにて一晩培養後、出現したコロニー数より塗抹菌液の総菌数を算出した。

[0067] 復帰変異出現率は、下記の計算式により算出した。

(復帰変異株出現率) = (LB寒天培地に出現したコロニー数) / (塗抹した菌液の総菌数)

この試験に供する菌液の総菌数は、 10^{10} cfu以上となるものを使用した。

[0068] 結果

回収菌液の総菌数

非増殖性試験へ供したゲノム編集菌の総菌数を表2に示した。各菌株とも 1×10^{10} cfu以上であった。

[0069] [表2]

表2. 非増殖性試験へ供した回収菌液の総菌数

評価株	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*
	BP2037	BP2040	BP2043	BP2067	BP2088	BP2239	BP2230	BP2233
総菌数 (cfu)	2.1×10^{10}	2.2×10^{10}	1.5×10^{10}	1.7×10^{10}	3.1×10^{10}	1.5×10^{10}	1.1×10^{10}	1.1×10^{10}

[0070] 非増殖性試験結果

thyA遺伝子ノックアウト株 (BP2037, BP2040, BP2043)、dapA遺伝子ノックアウト株 (BP2067, BP2088, BP2239)、thyAおよびdapA遺伝子の二重ノックアウト株 (BP2230, BP2233) の非増殖性を確認した結果を図1に示した。またLB寒天培地上に出現したコロニー数 (表3) より、復帰変異株出現率を算出した (図1)。

[0071] [表3]

表3. 出現コロニー数の計数結果

評価株	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*
	BP2037	BP2040	BP2043	BP2067	BP2088	BP2239	BP2230	BP2233
菌数 (cfu)	4318	1395	5	3293	2851	13056	1	0

[0072] 培養72時間後に出現したコロニー数より復帰変異株出現率を算出した結果、1アミノ酸を終止コドンに置換したthyAまたはdapAノックアウト株 (BP2037, BP2040, BP2067, BP2088) に比べ、生理的機能の異なる2つの各遺伝子内に終止コドン各1ヶ所ずつ

置換した t h y A - d a p A 二重ノックアウト株 (B P 2 2 3 0 , B P 2 2 3 3) 株の方が復帰変異株出現率の減少が証明された。

[0073] (注記)

以上のように、本開示の好ましい実施形態を用いて本開示を例示してきたが、本開示は、請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願及び他の文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。本出願は、日本国特許庁に2022年11月4日に出願された特願2022-177703に対して優先権主張を伴うものであり、その内容は、本願においてすべての内容が参考として援用される。

産業上の利用可能性

[0074] 本開示の微生物によって、細菌製剤の品質および安全性を担保し、環境中やヒトへの伝播および／または拡散を防止することが可能になるため、医療分野において幅広い応用が期待できる。

配列表フリーテキスト

[0075] 配列番号1 : t h y A の核酸配列

配列番号2 : t h y A のアミノ酸配列

配列番号3 : d a p A の核酸配列

配列番号4 : d a p A のアミノ酸配列

請求の範囲

- [請求項1] 微生物であって、該微生物における少なくとも1つの遺伝子が改変されており、該改変は、該遺伝子によってコードされるタンパク質が通常有する機能が実質的に回復しないものである、微生物。
- [請求項2] 前記遺伝子が、必須遺伝子、薬効関連遺伝子、形態関連遺伝子、および定着性関連遺伝子からなる群から選択される、請求項1に記載の微生物。
- [請求項3] 前記遺伝子が必須遺伝子であり、前記改変は、該必須遺伝子によってコードされるタンパク質が通常有する活性が低減または欠損した場合に、前記微生物が、環境または対象において実質的に伝播しない改変である、請求項1または2に記載の微生物。
- [請求項4] 前記必須遺伝子が、アミノ酸合成酵素、核酸合成酵素、およびビタミン合成酵素をコードする遺伝子からなる群から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の微生物。
- [請求項5] 前記アミノ酸合成酵素が、リジン合成酵素をコードする遺伝子 (`dapA`)、`cysK`、`cysM`、`pabA`、`pabB`、`pabC`、`glyA`、`proB`、`proA`、`leuB`、`alr`、`dadX`、`serC`、`argH`、`hisD`、`ilvA`、`leuB`、`lysA`、`metB`、`pheA`、`proC`、`thrC`、`trpC`、および`tyrA`からなる群から選択される、請求項4に記載の微生物。
- [請求項6] 前記核酸合成酵素が、チミジル酸合成酵素をコードする遺伝子 (`thyA`)、`purK`、`purN`、`purT`、`pyrB`、`pyrC`、`pyrD`、および`pyrE`からなる群から選択される、請求項4に記載の微生物。
- [請求項7] 前記ビタミン合成酵素が、`thiC`、`thiE`、`thiF`、`thiS`、`thiG`、`thiH`、`ribB`、`ribC`、`ribD`、`nadA`、`nadB`、`panC`、`pdxB`、`bioH`、および`metE`からなる群から選択される、請求項4に記載の微生物。

- [請求項8] 前記改変が、前記遺伝子における点変異を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の微生物。
- [請求項9] 前記改変が、終止コドンを生じさせる変異を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の微生物。
- [請求項10] 前記改変が、前記少なくとも1つの遺伝子における少なくとも2ヶ所の変異を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の微生物。
- [請求項11] 前記改変が、少なくとも2種の遺伝子におけるそれぞれ少なくとも1ヶ所の変異を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の微生物。
- [請求項12] 前記改変が、少なくとも2種の遺伝子におけるそれぞれ少なくとも2ヶ所の変異を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の微生物。
- [請求項13] 前記少なくとも2種の遺伝子が、必須遺伝子、薬効関連遺伝子、形態関連遺伝子、および定着性関連遺伝子からなる群からそれぞれ独立して選択される、請求項11または請求項12に記載の微生物。
- [請求項14] 少なくとも1つの遺伝子が改変された微生物を生産する方法であって、
該少なくとも1つの遺伝子を改変する工程であって、該微生物内において、該遺伝子の標的核酸配列の1またはそれ以上のヌクレオチドを他のヌクレオチドに変換し、もしくは欠失させ、または該遺伝子の標的核酸配列に1またはそれ以上のヌクレオチドを挿入する、改変する工程、
を含み、該改変は、該遺伝子によってコードされるタンパク質が通常有する機能が実質的に回復しないものである、方法。
- [請求項15] 前記遺伝子が、必須遺伝子、薬効関連遺伝子、形態関連遺伝子、および定着性関連遺伝子からなる群から選択される、請求項14に記載の方法。
- [請求項16] 前記遺伝子が必須遺伝子であり、前記改変は、該必須遺伝子によってコードされるタンパク質が通常有する活性が低減または欠損した場合に、前記微生物が、環境または対象において実質的に伝播しない改

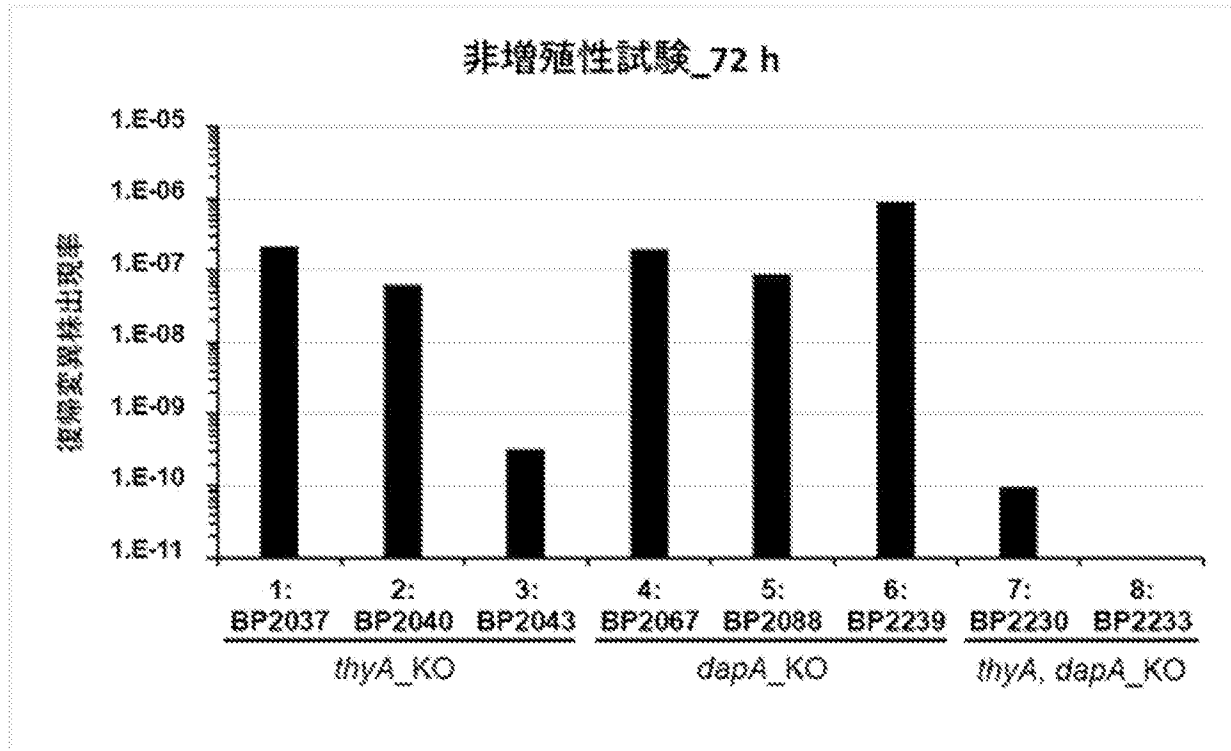
変である、請求項14または15に記載の方法。

- [請求項17] 前記必須遺伝子が、アミノ酸合成酵素、核酸合成酵素、およびビタミン合成酵素からなる群から選択される、請求項14～16のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項18] 前記アミノ酸合成酵素が、リジン生合成酵素をコードする遺伝子（dapA）、cysK、cysM、pabA、pabB、pabC、glyA、proB、proA、leuB、alr、dadX、serC、argH、hisD、ilvA、leuB、lysA、metB、pheA、proC、thrC、trpC、およびtyrAからなる群から選択される、請求項17に記載の方法。
- [請求項19] 前記核酸合成酵素が、チミジル酸合成酵素をコードする遺伝子（thyA）、purK、purN、purT、pyrB、pyrC、pyrD、およびpyrEからなる群から選択される、請求項17に記載の方法。
- [請求項20] 前記ビタミン合成酵素が、thiC、thiE、thiF、thiS、thiG、thiH、ribB、ribC、ribD、nadA、nadB、panC、pdxB、bioH、およびmetEからなる群から選択される、請求項17に記載の方法。
- [請求項21] 前記改変が、前記遺伝子における点変異を含む、請求項14～20のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項22] 前記改変が、終止コドンを生じさせる変異を含む、請求項14～21のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項23] 前記改変が、前記少なくとも1つの遺伝子における少なくとも2ヶ所の変異を含む、請求項14～22のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項24] 前記改変が、少なくとも2種の遺伝子におけるそれぞれ少なくとも1ヶ所の変異を含む、請求項14～22のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項25] 前記改変が、少なくとも2種の遺伝子におけるそれぞれ少なくとも

2ヶ所の変異を含む、請求項14～22のいずれか一項に記載の方法
。

[請求項26] 前記少なくとも2種の遺伝子が、必須遺伝子、薬効関連遺伝子、形態関連遺伝子、および定着性関連遺伝子からなる群からそれぞれ独立して選択される、請求項24または請求項25に記載の方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/039717

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 15/52</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/15</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/19</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/21</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/00</i> (2006.01)i FI: C12N15/52 Z; C12N1/19; C12N1/21; C12N9/00; C12N1/15 ZNA		
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) C12N15/52; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N9/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	WO 2022/036159 A2 (ACTYM THERAPEUTICS, INC.) 17 February 2022 (2022-02-17) claims, examples	1-4, 6, 8-17, 19, 21-26 13, 26 5, 7, 18, 20
X Y A	JP 2020-527025 A (SYNLOGIC OPERATING COMPANY, INC.) 03 September 2020 (2020-09-03) claims, examples 65, 66, table 63	1-6, 8-12, 14-19, 21-25 13, 26 7, 20
X Y A	JP 2002-537771 A (FORSCHUNGSZENTRUM JULICH GMBH) 12 November 2002 (2002-11-12) claims, examples, table 4	1-5, 7-12, 14-18, 20-25 13, 26 6, 19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 15 January 2024		Date of mailing of the international search report 23 January 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/039717

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	WO 2021/215717 A1 (LIVEOME INC.) 28 October 2021 (2021-10-28) claims, examples	1-4, 6-12, 14-17, 19-25 13, 26 5, 18
X Y A	JP 2012-527249 A (MERIAL LTD.) 08 November 2012 (2012-11-08) claims, examples	1-4, 6, 8-12, 14-17, 19, 21-25 13, 26 5, 7, 18, 20
X Y A	JP 2009-511006 A (DOMPE PHA.R.MA S.P.A.) 19 March 2009 (2009-03-19) claims, examples	1-4, 6, 8-12, 14-17, 19, 21-25 13, 26 5, 7, 18, 20
X Y A	JP 2020-54266 A (NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH ORG.) 09 April 2020 (2020-04-09) claims, examples	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	JP 2013-516162 A (METABOLIC EXPLORER) 13 May 2013 (2013-05-13) claims, examples	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	US 2021/0115429 A1 (JIANGNAN UNIVERSITY) 22 April 2021 (2021-04-22) claims, examples	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	WO 2018/037098 A1 (DANMARKS TEKNISKE UNIVERSITET) 01 March 2018 (2018-03-01) claims	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	JP 2011-510611 A (THE REG. OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 07 April 2011 (2011-04-07) claims	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	JP 2020-74748 A (KIKKOMAN CORP.) 21 May 2020 (2020-05-21) claims, examples	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	JP 2018-516587 A (BASF SE) 28 June 2018 (2018-06-28) claims, paragraph [0031]	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	JP 2000-139471 A (AJINOMOTO CO., INC.) 23 May 2000 (2000-05-23) claims, examples	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/039717

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	JP 2022-130128 A (MICRO BIO FACTORY CO., LTD.) 06 September 2022 (2022-09-06) claims, examples	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	WO 2022/018260 A1 (BASF SE) 27 January 2022 (2022-01-27) claims, examples	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	JP 2016-533731 A (CJ CHEILJEDANG CORP.) 04 November 2016 (2016-11-04) claims, examples	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	JP 11-504662 A (BRD. OF TRUSTEES MICHIGAN STATE UNIVERSITY) 27 April 1999 (1999-04-27) claims, pages 18-57	1-4, 7-12, 14-17, 20-25 13, 26 5, 6, 18, 19
X Y A	JP 2018-515121 A (TIANJIN UNIV. OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 14 June 2018 (2018-06-14) claims, examples, fig. 16-18	1-4, 7-12, 14-17, 20-25 13, 26 5, 6, 18, 19
X Y A	JP 2014-121325 A (EVONIK INDUSTRIES AG) 03 July 2014 (2014-07-03) claims, example 2	1-4, 7-12, 14-17, 20-25 13, 26 5, 6, 18, 19
X Y A	JP 2015-519917 A (METABOLIC EXPLORER) 16 July 2015 (2015-07-16) claims, examples, table 1, paragraphs [0123], [0124]	1-4, 7-12, 14-17, 20-25 13, 26 5, 6, 18, 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/039717

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/039717

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2022/036159 A2	17 February 2022	US 2022/0380720 A1 claims, examples EP 4196139 A2 KR 10-2023-0066000 A CN 116249779 A JP 2023-501539 A	
JP 2020-527025 A	03 September 2020	WO 2019/014391 A1 claims, examples 65, 66, table 63 US 2016/0333326 A1 EP 3565566 A1 CN 110913875 A KR 10-2020-0064980 A	
JP 2002-537771 A	12 November 2002	WO 2000/050624 A1 claims, examples, table 4 US 7632663 B1 EP 1155139 B1 KR 10-0614029 B1	
WO 2021/215717 A1	28 October 2021	EP 4144847 A1 claims, examples KR 10-2021-0129516 A CN 115916982 A JP 2023-523214 A	
JP 2012-527249 A	08 November 2012	US 2010/0298419 A1 claims, examples WO 2010/135742 A1 EP 2432884 B1 KR 10-2012-0016661 A CN 102482679 A	
JP 2009-511006 A	19 March 2009	US 2010/0216190 A1 claims, examples WO 2007/039632 A1 EP 1945772 A1 KR 10-2008-0068042 A CN 101305096 A	
JP 2020-54266 A	09 April 2020	(Family: none)	
JP 2013-516162 A	13 May 2013	US 2012/0288904 A1 claims, examples WO 2011/080301 A2 EP 2519637 A2 CN 102782137 A KR 10-2012-0114325 A	
US 2021/0115429 A1	22 April 2021	WO 2021/027175 A1 CN 110452865 A	
WO 2018/037098 A1	01 March 2018	US 2019/0194601 A1 claims EP 3504318 A1	
JP 2011-510611 A	07 April 2011	US 2009/0081746 A1 claims WO 2008/098227 A2 EP 2118266 A2	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/039717

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				CN 101688175	A
				KR 10-2009-0117739	A
JP	2020-74748	A	21 May 2020	US 2021/0403929	A1
				claims, examples	
				WO 2020/095864	A1
				EP 3878944	A1
				CN 113056553	A
JP	2018-516587	A	28 June 2018	US 2020/0032304	A1
				claims, paragraph [0036]	
				WO 2016/198529	A1
				EP 3307902	A1
				KR 10-2018-0011324	A
				CN 107690478	A
JP	2000-139471	A	23 May 2000	US 7611873	B1
				claims, examples	
JP	2022-130128	A	06 September 2022	(Family: none)	
WO	2022/018260	A1	27 January 2022	US 2023/0272358	A1
				claims, examples	
				JP 2023-534742	A
				EP 4185689	A1
				KR 10-2023-0042088	A
				CN 116249777	A
JP	2016-533731	A	04 November 2016	US 2016/0304919	A1
				claims, examples	
				WO 2015/060647	A1
				EP 3061812	A1
				KR 10-2015-0046964	A
				CN 105705636	A
JP	11-504662	A	27 April 1999	US 6410021	B1
				claims, columns 7-29	
				WO 1998/018917	A2
				EP 948616	A2
JP	2018-515121	A	14 June 2018	US 2018/0073045	A1
				claims, examples, fig. 16-18	
				WO 2016/184044	A1
				EP 3299449	A1
				CN 105705630	A
JP	2014-121325	A	03 July 2014	US 2014/0178948	A1
				claims, example 2	
				EP 2746399	A1
				CN 103881933	A
				KR 10-2014-0090935	A
JP	2015-519917	A	16 July 2015	WO 2013/190343	A1
				claims, examples, table 1, page 27	
				US 2015/0247175	A1
				EP 2861726	B1
				CN 104411821	A
				KR 10-2015-0033649	A

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/52(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 9/00(2006.01)i FI: C12N15/52 Z; C12N1/19; C12N1/21; C12N9/00; C12N1/15 ZNA		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/52; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N9/00 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2024年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2024年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	WO 2022/036159 A2 (ACTYM THERAPEUTICS, INC.) 17.02.2022 (2022 - 02 - 17) 特許請求の範囲、実施例	1-4, 6, 8- 17, 19, 21-26 13, 26 5, 7, 18, 20
X Y A	JP 2020-527025 A (シンロジック オペレーティング カンパニー インコーポレイ テッド) 03.09.2020 (2020 - 09 - 03) 特許請求の範囲、実施例 6 5、6 6、表 6 3	1-6, 8-12, 14-19, 21-25 13, 26 7, 20
X Y A	JP 2002-537771 A (フォルシュングスツェントルム・ユーリッヒ・ゲゼルシャフト・ ミット・ベシュレンクテル・ハフツング) 12.11.2002 (2002 - 11 - 12) 特許請求の範囲、実施例、表 4	1-5, 7-12, 14-18, 20-25 13, 26 6, 19
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に 公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を 付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の 後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵 触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引 用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性 又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献 との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな いと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	15.01.2024	国際調査報告の発送日 23.01.2024
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 山本 匡子 4B 3038 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	WO 2021/215717 A1 (LIVEOME INC) 28.10.2021 (2021 - 10 - 28) 特許請求の範囲、実施例	1-4, 6-12, 14-17, 19-25 13, 26 5, 18
X Y A	JP 2012-527249 A (メリアル リミテッド) 08.11.2012 (2012 - 11 - 08) 特許請求の範囲、実施例	1-4, 6, 8-12, 14-17, 19, 21-25 13, 26 5, 7, 18, 20
X Y A	JP 2009-511006 A (ドンペ ファルマ ソシエタ ペル アチオニ) 19.03.2009 (2009 - 03 - 19) 特許請求の範囲、実施例	1-4, 6, 8-12, 14-17, 19, 21-25 13, 26 5, 7, 18, 20
X Y A	JP 2020-54266 A (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構) 09.04.2020 (2020 - 04 - 09) 特許請求の範囲、実施例	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	JP 2013-516162 A (メタボリック エクスプローラー) 13.05.2013 (2013 - 05 - 13) 特許請求の範囲、実施例	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	US 2021/0115429 A1 (JIANGNAN UNIVERSITY) 22.04.2021 (2021 - 04 - 22) CLAIMS, EXAMPLES	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	WO 2018/037098 A1 (DANMARKS TEKNISKE UNIVERSITET) 01.03.2018 (2018 - 03 - 01) 特許請求の範囲	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	JP 2011-510611 A (ザ レジェンツ オブ ザ ユニヴァースティ オブ カリフォルニア) 07.04.2011 (2011 - 04 - 07) 特許請求の範囲	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	JP 2020-74748 A (キッコーマン株式会社) 21.05.2020 (2020 - 05 - 21) 特許請求の範囲、実施例	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	JP 2018-516587 A (ビーエーエスエフ ソシエタス・ヨーロッパ) 28.06.2018 (2018 - 06 - 28) 特許請求の範囲、[0031]	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	JP 2000-139471 A (味の素株式会社) 23.05.2000 (2000 - 05 - 23) 特許請求の範囲、実施例	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	JP 2022-130128 A (マイクロバイオファクトリー株式会社) 06.09.2022 (2022 - 09 - 06) 特許請求の範囲、実施例	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	WO 2022/018260 A1 (BASF SE) 27.01.2022 (2022 - 01 - 27) 特許請求の範囲、実施例	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	JP 2016-533731 A (シージェイ チェイルジェダン コーポレイション) 04.11.2016 (2016 - 11 - 04) 特許請求の範囲、実施例	1-5, 8-12, 14-18, 21-25 13, 26 6, 7, 19, 20
X Y A	JP 11-504662 A (ボード オブ トラスティーズ ミシガン ステイト ユニヴァース ティ) 27.04.1999 (1999 - 04 - 27) 特許請求の範囲、第 1 8 - 5 7 頁	1-4, 7-12, 14-17, 20-25 13, 26 5, 6, 18, 19
X Y A	JP 2018-515121 A (天津科技大学) 14.06.2018 (2018 - 06 - 14) 特許請求の範囲、実施例、図 1 6 - 1 8	1-4, 7-12, 14-17, 20-25 13, 26 5, 6, 18, 19
X Y A	JP 2014-121325 A (エボニック インダストリーズ アクチエンゲゼルシャフト) 03.07.2014 (2014 - 07 - 03) 特許請求の範囲、例 2	1-4, 7-12, 14-17, 20-25 13, 26 5, 6, 18, 19
X Y A	JP 2015-519917 A (メタボリック エクスプローラー) 16.07.2015 (2015 - 07 - 16) 特許請求の範囲、実施例、表 1、 [0 1 2 3]、 [0 1 2 4]	1-4, 7-12, 14-17, 20-25 13, 26 5, 6, 18, 19

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
 - a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 - b. 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a）
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/039717

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2022/036159 A2	17.02.2022	US 2022/0380720 A1 CLAIMS, EXAMPLES EP 4196139 A2 KR 10-2023-0066000 A CN 116249779 A JP 2023-501539 A	
JP 2020-527025 A	03.09.2020	WO 2019/014391 A1 CLAIMS, EXAMPLE65, EXAMPLE66, Table 63 US 2016/0333326 A1 EP 3565566 A1 CN 110913875 A KR 10-2020-0064980 A	
JP 2002-537771 A	12.11.2002	WO 2000/050624 A1 CLAIMS, EXAMPLES, Table4 US 7632663 B1 EP 1155139 B1 KR 10-0614029 B1	
WO 2021/215717 A1	28.10.2021	EP 4144847 A1 CLAIMS, EXAMPLES KR 10-2021-0129516 A CN 115916982 A JP 2023-523214 A	
JP 2012-527249 A	08.11.2012	US 2010/0298419 A1 CLAIMS, EXAMPLES WO 2010/135742 A1 EP 2432884 B1 KR 10-2012-0016661 A CN 102482679 A	
JP 2009-511006 A	19.03.2009	US 2010/0216190 A1 CLAIMS, EXAMPLES WO 2007/039632 A1 EP 1945772 A1 KR 10-2008-0068042 A CN 101305096 A	
JP 2020-54266 A	09.04.2020	(ファミリーなし)	
JP 2013-516162 A	13.05.2013	US 2012/0288904 A1 CLAIMS, EXAMPLES WO 2011/080301 A2 EP 2519637 A2 CN 102782137 A KR 10-2012-0114325 A	
US 2021/0115429 A1	22.04.2021	WO 2021/027175 A1 CN 110452865 A	
WO 2018/037098 A1	01.03.2018	US 2019/0194601 A1 CLAIMS EP 3504318 A1	
JP 2011-510611 A	07.04.2011	US 2009/0081746 A1 CLAIMS WO 2008/098227 A2 EP 2118266 A2	

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/039717

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
		CN 101688175 A	
		KR 10-2009-0117739 A	
JP 2020-74748 A	21.05.2020	US 2021/0403929 A1	
		CLAIMS, EXAMPLES	
		WO 2020/095864 A1	
		EP 3878944 A1	
		CN 113056553 A	
JP 2018-516587 A	28.06.2018	US 2020/0032304 A1	
		CLAIMS, [0036]	
		WO 2016/198529 A1	
		EP 3307902 A1	
		KR 10-2018-0011324 A	
		CN 107690478 A	
JP 2000-139471 A	23.05.2000	US 7611873 B1	
		CLAIMS, EXAMPLES	
JP 2022-130128 A	06.09.2022	(ファミリーなし)	
WO 2022/018260 A1	27.01.2022	US 2023/0272358 A1	
		CLAIMS, EXAMPLES	
		JP 2023-534742 A	
		EP 4185689 A1	
		KR 10-2023-0042088 A	
		CN 116249777 A	
JP 2016-533731 A	04.11.2016	US 2016/0304919 A1	
		CLAIMS, EXAMPLES	
		WO 2015/060647 A1	
		EP 3061812 A1	
		KR 10-2015-0046964 A	
		CN 105705636 A	
JP 11-504662 A	27.04.1999	US 6410021 B1	
		CLAIMS, columns 7-29	
		WO 1998/018917 A2	
		EP 948616 A2	
JP 2018-515121 A	14.06.2018	US 2018/0073045 A1	
		CLAIMS, EXAMPLES, Figs. 16-18	
		WO 2016/184044 A1	
		EP 3299449 A1	
		CN 105705630 A	
JP 2014-121325 A	03.07.2014	US 2014/0178948 A1	
		CLAIMS, EXAMPLE2	
		EP 2746399 A1	
		CN 103881933 A	
		KR 10-2014-0090935 A	
JP 2015-519917 A	16.07.2015	WO 2013/190343 A1	
		CLAIMS, EXAMPLES, Table 1, p.27	
		US 2015/0247175 A1	
		EP 2861726 B1	
		CN 104411821 A	
		KR 10-2015-0033649 A	