

(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
2021年12月2日(02.12.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/241593 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/62 (2006.01) C12N 15/76 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C40B 40/06 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/019849

(22) 国際出願日: 2021年5月25日(25.05.2021)

(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 2020-091799 2020年5月26日(26.05.2020) JP

(71) 出願人: S p i b e r 株式会社(SPIBER INC.)
[JP/JP]; 〒9970052 山形県鶴岡市覚岸寺字水
上234番地1 Yamagata (JP).

(72) 発明者: リップス デイビッド(LIPS David);
〒9970052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上234
番地1 S p i b e r 株式会社内 Yamagata
(JP). ベルクレイ ハイシュ(VERKLEIJ Gijs);
〒9970052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上234番
地1 S p i b e r 株式会社内 Yamagata (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiaki
et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二
丁目1番1号丸の内 M Y P L A Z A
(明治安田生命ビル) 9階 創英国際特
許法律事務所 Tokyo (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,

MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
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, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, 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, 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: METHOD FOR PREPARING COMBINATORIAL LIBRARY OF MULTI-MODULAR BIOSYNTHETIC ENZYME GENE

(54) 発明の名称: マルチモジュール型生合成酵素遺伝子のコンビナトリアルライブラリーの調製方法

(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing a gene cluster construct containing a plurality of genes encoding a multi-modular biosynthetic enzyme, the method comprising: (A) a step for preparing a plurality of DNA fragments which can reconstitute a gene cluster construct and have structures capable of linking to each other; and (B) a step for mixing the plurality of DNA fragments prepared in step (A) together in a solution to link the plurality of DNA fragments to each other, thereby producing a gene cluster construct.

(57) 要約: 本発明は、マルチモジュール型生合成酵素をコードする複数の遺伝子を含む遺伝子クラスターコンストラクトを調製する方法であって、(A) 遺伝子クラスターコンストラクトを再構成可能であり、かつ、交互に連結し得る構造を有する複数のDNAフラグメントを調製する工程、(B) 工程(A)で調製された複数のDNAフラグメントを溶液中で混合することで複数のDNAフラグメントを交互に連結して遺伝子クラスターコンストラクトを得る工程、を含む、方法に関する。



WO 2021/241593 A1

明 細 書

発明の名称：

マルチモジュール型生合成酵素遺伝子のコンビナトリアルライブラリーの調製方法

技術分野

[0001] 本発明は、マルチモジュール型生合成酵素をコードする複数の遺伝子を含む遺伝子クラスターコンストラクトを調製する方法、及び当該遺伝子クラスターコンストラクトから、マルチモジュール型生合成酵素遺伝子のコンビナトリアルライブラリーを調製する方法に関する。

背景技術

[0002] 放線菌や糸状菌などの微生物が生産する天然化合物は、多種多様な構造と生物活性を有する、有用物質として知られている。現在ではゲノムを解読することにより、有用物質を生合成する遺伝子クラスターの特定は容易となっている。また、人類が未利用の有用物質を生合成する遺伝子クラスターが多数存在することも明らかになってきている。微生物の二次代謝産物のうち、産業上重要なポリケチド系化合物およびペプチド系化合物を重点的、これらを生合成する遺伝子クラスターの研究が行われた。例えば、放線菌の生産する二次代謝産物の中で臨床応用されている *erythromycin*、FK-506 (*tacrolimus*)、*rapamycin* および *avermectin* などのマクロライド系化合物の生合成に用いられる I 型ポリケチド合成酵素 (*Polyketide Synthase*; PKS) を挙げる事ができる。

[0003] 伝統的な化学的方法によるポリケチド化合物等の生産の困難さ、および野生型細胞におけるポリケチドの通常の低生産を考えると、ポリケチド化合物を生産するための改良または代替手段を見つけることによりかなりの関心が集まっている。これらの理由により、元の菌株から生合成に必要な遺伝子クラスターをその他の細胞に導入し、化合物の異種生産が試されている。実際、異

種発現の従来の方法は小さな遺伝子クラスター (<40 kb) に限定されているものが多く、多くのPKS遺伝子クラスターはこれよりもかなり大きく、数キロベースから100キロベース以上のDNAである。

[0004] DNAをアセンブリする方法として、ゴールドゲート (Golden Gate) 法、ギブソン (Gibson) 法など、複数のDNAフラグメントを連結する方法が知られている (非特許文献1)。

[0005] Golden Gate法は、一方又は両方の末端にIIs型制限酵素により認識される塩基配列を含む複数のDNAフラグメントを用意し、IIs型制限酵素とDNAリガーゼで処理する方法である。IIs型制限酵素による切断で生じる粘着末端 (スティッキー・エンド) により複数のDNAフラグメントがハイブリダイズし、次いでDNAリガーゼによりニックが繋ぎ合わされて、所望の塩基配列を有するDNAフラグメントを製造することができる。IIs型制限酵素により認識される塩基配列の種類及び配置を設計することで、IIs型制限酵素で切断された複数のDNAフラグメントが、制限酵素の認識部位がなくなるように連結され、所望の塩基配列を有するDNAフラグメントを製造することができる。Golden Gate法を利用し、所望の塩基配列を有するDNAフラグメントをクローニングベクターへ導入する方法等が報告されている (特許文献1及び非特許文献1)。

[0006] Gibson法は、隣接して連結するDNAフラグメントのそれぞれの末端部の連結領域が15~80塩基対 (bp) 程度重複するように (同一の塩基配列となるように) 設計した複数のDNAフラグメントを用意し、5' エキソヌクレアーゼ、DNAポリメラーゼ及びDNAリガーゼで処理する方法である。5' エキソヌクレアーゼによりDNAフラグメントの末端から部分的に一本鎖DNAが生じる。生じた一本鎖DNAは、重複した塩基配列部分でハイブリダイズする。その後、DNAポリメラーゼによりギャップが埋められ、DNAリガーゼによりニックが繋ぎ合わされて、所望の塩基配列を有するDNAフラグメントを製造することができる。

[0007] Gibson法では、制限酵素により認識される塩基配列などを含ませる

必要がないことから、塩基配列の制約がなく、長いDNAフラグメントの構築にも適している（非特許文献2、特許文献2及び特許文献3）。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：米国特許出願公開第2010/0291633号明細書
特許文献2：米国特許第7723077号明細書
特許文献3：特表2011-512140号公報

非特許文献

- [0009] 非特許文献1：P L o S O n e , 2009年, 4 (5) , e 5 5 5 3
非特許文献2：化学と生物, 2016年, V o l . 5 4 , N o . 1 0 , p p . 7 4 0 ~ 7 4 6

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] ハイブリッドPKSモジュールにより、新規物質が生産されたとしても、収量が大きく減少するケースが多く、効率的な改変手法は確立されていないのが現状であった。原因が複雑であり、考えられる説明の1つは、ポリケチド骨格の大部分を構築するのは伸長基質であり、伸長反応を人為的に改変することは困難であり、上流モジュールから提供されたケチドを拡張できないことが発生していると推測される。
- [0011] もう一つ考えられる説明は、異種生産に際してはいずれの宿主も放線菌や糸状菌とは転写制御システムが異なることから、十分な発現量を得るためには生合成に必要な全遺伝子のプロモーターを置換する必要がある。例えば、異種宿主で機能することが知られている強力なプロモーターを追加するまたは置き換えることによって、異種宿主でのポリケチドの生産性向上ができた（非特許文献2、非特許文献3）。ただ、二次代謝産物の生合成反応は、多段階に渡ることが多いため、複数遺伝子の共発現をさせる必要がある。その際に、各遺伝子が可能な限り強く発現されると最適な生産レベルが達成でき

るわけではなく（非特許文献4）、協調的な発現が求められている。遺伝子発現の理想的なバランスを予測することの難しさを考えると、異種宿主で生産性の高い生合成遺伝子クラスターを作成する最も効果的な方法は、合成調節と係る転写と翻訳を制御するさまざまなプロモーター強度とリボソーム結合部位（RBS）を備えた遺伝子クラスターライブラリーを作成することである。広範囲にわたる転写レベルと翻訳レベルの両方で個々の酵素の相対量を制御するようにして、タンパク質発現の理想的なバランスにつながる組み合わせを見つけることができると考えられる。

[0012] したがって、多数のPKSモジュールの組み合わせ及び発現パラメーターを同時に検討するためには、各モジュール及び／または発現パラメーターについて複数の選択肢が存在する中から一つを選択し、それぞれを連結して多種のPKS遺伝子クラスターを構築するコンビナトリアルライブラリー技術が、効率性の観点から望ましい。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明は、以下の〔1〕～〔11〕の発明を提供するものである。

〔1〕マルチモジュール型生合成酵素をコードする複数の遺伝子を含む遺伝子クラスターコンストラクトを調製する方法であって、

（A）前記遺伝子クラスターコンストラクトを再構成可能であり、かつ、交互に連結し得る構造を有する複数のDNAフラグメントを調製する工程

（B）工程（A）で調製された複数のDNAフラグメントを溶液中で混合することで複数のDNAフラグメントを交互に連結して遺伝子クラスターコンストラクトを得る工程、

を含む、方法。

〔2〕前記DNAフラグメントのそれぞれがプラスミドに含まれており、前記プラスミドから前記工程（A）のDNAフラグメントを調製する工程をさらに含む、〔1〕に記載の方法。

〔3〕マルチモジュール型生合成酵素をコードする複数の遺伝子を含む遺伝子クラスターコンストラクトを調製する方法であって、以下の工程：

(P) 交互に連結し得る構造を有する複数のDNAフラグメントを含む複数種類のプラスミドを調製する工程、

(A1) 複数種類の前記プラスミドを、それぞれに適した制限酵素で処理して、複数種類のDNAフラグメントの混合液を調製する工程、及び

(B1) 工程(A1)で得られたDNAフラグメントの混合液を用いて、DNAフラグメントを再集積させて前記遺伝子クラスターコンストラクトを得る工程、

を含む、方法。

[4] 前記工程(P)において、枯草菌を用いることにより交互に連結し得る構造を有する複数のDNAフラグメントを含む複数種類のプラスミドを調製する、[3]に記載の方法。

[5] 前記マルチモジュール型生合成酵素はモジュラーポリケチドシンターゼ(PKS)である、[1]～[4]のいずれか1項に記載の方法。

[6] 前記制限酵素が、Type II制限酵素である、[3]に記載の方法。

[7] [1]～[6]のいずれか1項に記載の方法で調製された前記遺伝子クラスターコンストラクトを枯草菌に形質転換し、枯草菌からプラスミドDNAを回収する、プラスミドのコンビナトリアルライブラリーの調製方法。

[8] [7]に記載の調製方法により得られたプラスミドを複数種類選択し、前記工程(A1)におけるプラスミドとして再利用し、前記工程(A1)及び前記工程(B1)を実施する、[3]に記載の方法。

[9] [7]に記載の調製方法により得られたプラスミドのコンビナトリアルライブラリー。

[10] [9]に記載のプラスミドを宿主細胞に形質転換し、マルチモジュール型生合成酵素を製造する方法。

[11] 前記宿主細胞がStreptomyces属の微生物である、[10]に記載の方法。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、1ポット反応で合成された遺伝子クラスターコンストラクトからマルチモジュール型生合成酵素のコンビナトリアルライブラリー、例えばPKS遺伝子クラスターライブラリー全体を組み立てることができる。これにより、遺伝子クラスターの発現収量の最適化と生理的活性の向上のための化学的多様性の生成を期待できる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]実施例1及び2の手順を模式的に示す図である。

[図2]実施例1及び2で得たプラスミドの制限消化パターンの一例を示す写真である。

[図3]OGABベクター1. 0のベクターマップである。

[図4]OGABベクター2. 0のベクターマップである。

[図5]OGABベクター2. 1のベクターマップである。

[図6]OGABベクター2. 2のベクターマップである。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。ただし、本発明は、以下の実施形態に限定されるものではない。

[0017] 一実施形態に係るマルチモジュール型生合成酵素をコードする複数の遺伝子を含む遺伝子クラスターコンストラクトを調製する方法は、(A) 遺伝子クラスターコンストラクトを再構成可能であり、かつ、交互に連結し得る構造を有する複数のDNAフラグメントを調製する工程、及び(B) 工程(A)で調製された複数のDNAフラグメントを溶液中で混合することで複数のDNAフラグメントを交互に連結して遺伝子クラスターコンストラクトを得る工程、を含む。

[0018] 他の実施形態に係るマルチモジュール型生合成酵素をコードする複数の遺伝子を含む遺伝子クラスターコンストラクトを調製する方法は、以下の工程：(P) 交互に連結し得る構造を有する複数のDNAフラグメントを含む複数種類のプラスミドを調製する工程、(A1) 複数種類の前記プラスミドを、それぞれに適した制限酵素で処理して、複数種類のDNAフラグメントの

混合液を調製する工程、及び（B1）工程（A1）で得られたDNAフラグメントの混合液を用いて、DNAフラグメントを再集積させて前記遺伝子クラスターコンストラクトを得る工程、を含む。

[0019] 本明細書において、マルチモジュール型生合成酵素としては、I型ポリケチドシンターゼ（単に「PKS」又は「I型PKS」と記載することがある。）と非リボソームペプチド合成酵素が挙げられる。

[0020] 本発明で得られる遺伝子クラスターコンストラクト又はプラスミドは、特定の宿主と組み合わせることで、マルチモジュール型生合成酵素により生合成される有用物質（例えば、ポリケチド又は非リボソームペプチド）を高効率で産生することができる。1つの好ましい実施形態において、本発明は、天然に生じるマルチモジュール型生合成酵素をコードする遺伝子（例えば、I型PKS遺伝子又は非リボソームペプチド合成酵素）が実質的に欠失した、遺伝子操作した宿主細胞を利用することができる。これらの宿主細胞は、マルチモジュール型生合成酵素により生合成される有用物質（例えば、活性ポリケチド又は非リボソームペプチド）の産生のために、種々のマルチモジュール型生合成酵素をコードする遺伝子（例えば、I型PKS遺伝子又は非リボソームペプチド合成酵素遺伝子）を含むプラスミドで形質転換され得る。本発明は、成長周期の適切な段階で大量の産生物の産生を提供する。このように産生されたマルチモジュール型生合成酵素により生合成される有用物質（例えば、ポリケチド又は非リボソームペプチド）は、マルチモジュール型生合成酵素により生合成される有用物質（例えば、ポリケチド又は非リボソームペプチド）のタイプに依存して、治療剤として多くの疾患を治療するために使用され得る。例えば、本発明のプラスミドによって形質転換された宿主により産生されたいくつかのポリケチド又は非リボソームペプチドは、免疫抑制剤、抗腫瘍剤として、ならびにウイルス、細菌および寄生虫感染の治療のための使用が見出される。

[0021] より好ましくは、対象のマルチモジュール型生合成酵素により生合成される有用物質（例えば、ポリケチド又は非リボソームペプチド）の組換え産生

のための宿主細胞は、本発明のプラスミドで形質転換され得るいずれの生物にも由来し得る。それゆえ、本発明の宿主細胞は、原核生物または真核生物のいずれにも由来し得る。しかし、好ましい宿主細胞は、放線菌から構築されるものであり、さらに好ましくは *Streptomyces* 属の宿主である。*Streptomyces* 属の宿主に用いる最大のメリットは、大腸菌を用いた異種発現生産と比較して、生産力価が高いこと、さらに I 型 PKS の活性発現に必須な翻訳後修飾系が存在することが挙げられる。具体的には、*S. albus*、*S. ambofaciens*、*S. avermitilis*、*S. azureus*、*S. cinnamonensis*、*S. coelicolor*、*S. curacoii*、*S. erythraeus*、*S. fradiae*、*S. galilaeus*、*S. glaucescens*、*S. hygrosopicus*、*S. lividans*、*S. parvulus*、*S. peucetius*、*S. rimosus*、*S. roseofulvus*、*S. thermotolerans*、*S. violaceoruber* などが挙げられ、*S. albus* が好ましい。

[0022] 上記の宿主細胞は、標準の技術（例えば、相同組換え）を用いて、この宿主細胞由来の天然に生じるマルチモジュール型生合成酵素をコードする遺伝子（例えば、PKS 遺伝子又は非リボソームペプチド合成酵素遺伝子）を欠失させることにより、遺伝子操作され得る。

[0023] 本発明のプラスミドに含まれるマルチモジュール型生合成酵素をコードする DNA（例えば、PKS 又は非リボソームペプチド合成酵素をコードする DNA）は、天然型であってもよく、コドンユーセージを改変したものであってもよく、1 個又は 2 個以上のアミノ酸を改変したものであってもよい。1 つの好ましい実施形態において、*Streptomyces* PKS では、3 つのオープンリーディングフレーム（ORF 1、ORF 2、ORF 3）の生成物を含む。PKS はケト合成酵素（KS）ドメイン、アシル転移酵素（AT）ドメイン、アシルキャリアープロテイン（ACP）の 3 種のドメインを含み、これら 3 つのドメインによりポリケチド鎖を伸長することができる。

る。PKSはさらに、ケト還元酵素（KR）ドメイン、脱水酵素（DH）ドメイン、エノイル還元酵素（ER）ドメインなどの主鎖の修飾に関わるドメインを有していてもよい。PKSによって調製される化合物としては、6-デオキシエリスロノリドB（6-dEB）、フレノリシン、グラナチシン、テトラセノマイシン、6-メチルサリチル酸、オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、エリスロマイシン、グリセウシン、ナオマイシン、メデルマイシン、ダウノルピシン、チロシン、カルボマイシン、スピラマイシン、アベルメクチン、モネンシン、ノナクチン、クラマイシン、リポマイシン、リファマイシン、カンジシジンが挙げられる。

[0024] 「非リボソームペプチド」は、単純アミノ酸モノマーから構成される複雑な天然産物のファミリーに属するペプチドのクラスを意味する。これは非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）と呼ばれる大型多機能タンパク質によって、多くの細菌または真菌において合成される。NRPS系の特徴は、タンパク新生および非タンパク新生アミノ酸を含むペプチドを合成できることである。

[0025] 「非リボソームペプチド合成酵素」（NRPS）は、モジュールと呼ばれる活性部位の協調的なグループに組織される、大型多機能タンパク質を意味し、ここで各モジュールは、ペプチド伸長および官能基の修飾の1サイクルを触媒するために必要である。モジュールの数および順序、並びに各NRPS上のモジュール内に存在するドメインのタイプは、取り込まれるアミノ酸の数、順序、選択、そして特定のタイプの伸長に関連した修飾を指示することによって、得られるペプチド産物の構造バリエーションを決定する。

[0026] プラスミドは、所望のマルチモジュール型生合成酵素をコードするDNA（例えば、PKSをコードするDNA）に作動可能に連結された制御配列を含む。本発明に使用するための適切な発現系は、真核生物宿主細胞および原核生物宿主細胞において機能する系を含む。しかし、上記で説明したように、原核生物系が好適であり、そして特に、*Streptomyces* 属細菌と適合する系が特に重要である。そのような系で使用するための制御配列は

、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、エンハンサーなどを含む。有用なプロモーターは、*Streptomyces* 属の宿主細胞で機能するものであり、例えば pGapdh、pErmE、pKasO などが挙げられるが、これらに限定されることはない。

[0027] 選択マーカーもまた、プラスミド中に含まれ得る。形質転換細胞株の選択において有用であり、そして一般に、細胞が適切な選択培地中で成長するとき、その発現が形質転換細胞上の選択可能な表現型を与える遺伝子を含む種々のマーカーが公知である。そのようなマーカーは、例えば、プラスミドに抗生物質の耐性または感受性を付与する遺伝子を含む。あるいは、いくつかのポリケチドは、本来着色されており、この特徴は、本発明の構築物により首尾良く形質転換された細胞を選択するための生来の (built-in) マーカーを提供する。

[0028] プラスミドは、宿主細胞中で機能する機能配列を含んでいてもよい。機能配列としては、例えば、プラスミド複製開始点配列、宿主ゲノム中にプラスミドを組み込むための酵素をコードする配列、接合 (conjugation) 開始点配列等が挙げられる。

[0029] 制御配列、選択マーカーおよび機能配列等は、遺伝子クラスターコンストラクト中のマルチモジュール型生合成酵素をコードする複数の遺伝子に対して適切な位置に組み入れておくことで、プラスミドに含ませることができる。

[0030] 本発明のプラスミドを適切な宿主細胞中に導入する方法は、当業者に公知であり、そして代表的には、CaCl₂ または 2 価のカチオンおよび DMSO のようなその他の薬剤の使用を包含する。プラスミドはまた、エレクトロポレーションにより宿主細胞中に導入され得る。一旦マルチモジュール型生合成酵素 (例えば、PKS) が発現されると、有用物質 (例えば、ポリケチド) 産生コロニーが同定され得、そして公知の技術を用いて単離され得る。

[0031] 本発明の好ましい 1 つの実施形態において、本発明のプラスミドからマルチモジュール型生合成酵素をコードする DNA を含む領域を大腸菌のプラス

ミドに移してプラスミド骨格を変更し（サブクローニング）、次いで接合（*conjugation*）により大腸菌から*Streptomyces*属微生物に転送することで宿主細胞への導入を実施する。マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNAは、これにより*Streptomyces*属微生物のような宿主細胞のゲノムに組み込まれる。

[0032] 一実施形態において、本発明のプラスミドは、枯草菌、大腸菌及び*Streptomyces*属微生物における複製開始点配列、大腸菌から*Streptomyces*属微生物への接合による移送のための接合開始点配列（*OriT*）、*Streptomyces*属微生物のゲノムへの組み込みに必要なインテグラーゼをコードする配列を含むものであってもよい。このようなプラスミドは、枯草菌から回収した後、プラスミド骨格を変更するためのサブクローニングを行うことなく、大腸菌を形質転換し、次いで接合により大腸菌から*Streptomyces*属微生物に転送することができる。

[0033] 本発明のさらに好ましい実施形態の1つは、大きなマルチモジュール型生合成酵素をコードするDNAを含むプラスミドである。例えば、*Streptomyces aureofaciens*株Tu117由来のリポマイシン生合成遺伝子クラスターは、7つのモジュールに対応するオープンリーディングフレーム（*LipPKS1*、*LipPKS2*、*LipPKS3*、*LipPKS4*、*LipNRPS*、*LipMT*、*LipTE*）を有する。

[0034] 遺伝子クラスターコンストラクトは、マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNA（例えば、マルチモジュール型生合成酵素に含まれるドメインをコードするDNA）を含むものであればよく、マルチモジュール型生合成酵素の種類は特に限定されない。好ましくは、PKS又はNRPSを構成する遺伝子クラスターが挙げられる。また遺伝子クラスターコンストラクトの大きさも特に限定されない。マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNA（例えば、マルチモジュール型生合成酵素に含まれるドメインをコードするDNA）の種類は、微生物などの天然由来配列を有するもののみならず、人工設計配列を有するものなどいずれでもよく、特に制限されない。天然

由来配列は、対応するアミノ酸を発現するために生物種によって主に一つのコドンが使用されるが、異種発現させる場合は、宿主のコドン使用頻度に合わせた人工設計配列を使用するのが好ましい。異種発現の結果に影響を与える可能性のあるその他の要因は、GC含有量（塩基配列内のグアニンおよびシトシンの合計含有量）、繰り返し配列等を挙げることができる。繰り返し配列は遺伝的安定性を低下させ、誤ったハイブリダイゼーションのリスクが生じ、反復セグメントの合成を阻害する。したがって、異種発現させる場合は、マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNAはコドン使用量とGC含量に関連して最適化するのが好ましい。ただし、これらの要件は通常、同時に最適に満たすことは困難である。例えば、コドンを最適化した結果、非常に反復的なDNA配列、又は高いGC含量につながる可能性がある。

[0035] 本発明において、マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNAのGC含量は30～70%である。マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNAのGC含量は、好ましくは70%以下、68%以下、65%以下、60%以下である。本発明に係る方法を用いることによって、マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNAのGC含量が50%以上、52%以上、55%以上、58%以上、60%以上であっても、高い効率で目的プラスミドを合成することができる。本発明において、マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNAは、好ましくは20bp以上の塩基配列の繰り返しが現れないように、コドンを最適化する。マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNA内のGC含量の極端な違いを避けることが好ましい。例えば、最高と最低の50bpストレッチ間のGC含量の差は52%以下であることが好ましい。ホモポリマーをできるだけ少なくすることが好ましい。マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNA内に散らばっている小さな繰り返し配列の数/長さを可能な限り最小化することが好ましい。配列の反復性は表1で示されるように、繰り返し配列の長さで重み付けされた繰り返しの数の合計 ($\sum (n_count \times n_length) \text{ for } n = 5 \text{ to } n = 24$) として計算されるスコアで評価することができる。マ

マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNAの反復スコアは、好ましくは1000以下、900以下である。本発明を用いることによって、マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNAの反復スコアが600以上であってもよい。繰り返し配列の長さが小さくて、5~10bpである繰り返しの数の合計は、好ましくは150以下、120以下、100以下、80以下、60以下である。本発明を用いることによって、マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNAに含まれる5~10bp長の繰り返しの数は、50以上であってもよい。

[0036] pps遺伝子は、NRPS遺伝子クラスターからのプリパスタチン遺伝子クラスターから取得したものである。LipPKS__original遺伝子は、リポマイシンPKS遺伝子クラスターから取得したの未修飾PKS遺伝子である。LipPKS__optimized遺伝子は、本発明で使用されるコドン最適化リポマイシン遺伝子である（表1、表2）。

[0037]

[表1]

5C	5bp repeat	6bp repeat	7bp repeat	8bp repeat	9bp repeat	10bp repeat	11bp repeat	12bp repeat	13bp repeat	14bp repeat
ppmA	32	14	7	4	3	2	2	2	1	1
ppxB	33	14	6	4	3	3	3	3	2	2
ppxC	29	14	7	5	3	2	2	2	2	1
ppxD	42	16	9	5	4	3	3	3	2	2
ppxE	21	11	5	4	2	2	2	2	1	1
LipPKS1_original	95	31	17	10	5	4	4	4	3	2
LipPKS2_original	91	33	16	10	6	5	4	4	3	2
LipPKS3_original	94	31	18	10	8	4	4	4	3	2
LipPKS4_original	86	34	16	9	6	4	4	4	3	2
LipPKS1_optimized	36	14	8	5	4	3	2	2	2	1
LipPKS2_optimized	48	21	11	6	4	3	3	3	2	2
LipPKS3_optimized	40	22	9	6	4	3	2	2	2	2
LipPKS4_optimized	46	19	10	5	4	3	3	2	2	2

[表2]

	15bp repeat	16bp repeat	17bp repeat	18bp repeat	19bp repeat	20bp repeat	21 bp repeat	22bp repeat	23bp repeat	24bp repeat	score	length
gpaA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	560
gpaB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	585
gpaC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	558
gpaD	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	788
gpaE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	464
LipPK01_original	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1245
LipPK02_original	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1307
LipPK03_original	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1335
LipPK04_original	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1363
LipPK01_optimized	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	617
LipPK02_optimized	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	818
LipPK03_optimized	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	802
LipPK04_optimized	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	794

gpa genes are from plipertain gene cluster from 2007 CGAG operon in which large operon made NRP5 gene cluster.

The LipPK01_optimized genes are the unmodified PK01 genes from the Bacillus PaC gene cluster

The LipPK02_optimized genes are the codon optimized lipomycin genes as used in this study.

Score is calculated as the sum of the repeat counts weighted by the repeat length.

[0038] マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNA（例えば、マルチモジュール型生合成酵素に含まれるドメインをコードするDNA）の大きさは、好ましくは100kDa以上、200kDa以上、300kDa以上、400kDa以上、500kDa以上、600kDa以上、700kDa以上、800kDa以上、900kDa以上、1000kDa以上である。

[0039] 遺伝子クラスターコンストラクトは、交互に連結し得る構造を有する複数のDNAフラグメントより構成される。連結し得るとは、遺伝子クラスターコンストラクト上で隣り合う配列を有するDNAフラグメントが一定の順序および向きを保って結合することができることをいう。前記DNAフラグメントとして、具体的には、例えば、断片の粘着末端の塩基配列の相補性を利用して、お互いに順序を保ったまま繰り返し連結し得るような末端を有するものが挙げられる。この粘着末端の構造は、回分構造（パリンドローム）以外であれば、5'末端突出、3'末端突出の形状の違いも含めて、特に制限はない。ただし、DNAフラグメントの作製の際に突出末端を制限酵素の消化により作製できることが好ましい。制限酵素としては、特定の配列を認識してその近傍に任意の配列の突出末端を作成可能な酵素を用いると、DNAフラグメントの粘着末端が各連結部位で異なるものにできるため、その連結する順序が保たれる。各DNAフラグメントの粘着末端の配列を適切に設計することで、所定の順序で各DNAフラグメントが並んだマルチモジュール型生合成酵素をコードする複数のDNA（例えば、PKS又はNRPSをコードするDNA）を含む遺伝子クラスターコンストラクトを得ることができる。これらの制限酵素の例としては、通常分子生物学に用いられる制限酵素の他に、人工制限酵素のTALENやZNF、あるいはCRISPR-Cpf1などの粘着末端を生成可能なCRISPR技術関連酵素などが挙げられ、好ましくはAarI、A1wNI、BbsI、BbvI、BcoDI、BfuAI、BglI、BsaI、BsaXI、BsmAI、BsmBI、BsmFI、BspMI、BspQI、BtgZI、DraIII、FokI、PflMI、SfaNI、SfiIなどのようなTypeII制限酵素

を用いることが良い。NEB *eta*TM *Tools*を使用して、最適な粘着末端を決めることができる。粘着末端の塩基数は好ましくは3～6、より好ましくは3～4である。1つのDNAフラグメントに含まれる塩基数は、好ましくは1～5 kbである。2 kb以上、3 kb以上、4 kb以上であってもよい。粘着末端生成に用いられる制限酵素の種類数は1つのDNAフラグメントの切り出しには、1種類の制限酵素による切断が好ましい。必ずしも全てのDNAフラグメントを同一種類の制限酵素の消化により得る必要はないが、使用する制限酵素の種類数は少ない方がよく、3種類以下であることが好ましく、2種類以下であることがより好ましく、1種類であることがさらに好ましい。

[0040] 前記遺伝子クラスターコンストラクトは、マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNA（例えば、マルチモジュール型生合成酵素に含まれるドメインをコードするDNA）以外に、他の遺伝子を含んでもよい。例えば、遺伝子クラスターコンストラクトがPKS遺伝子を含む場合、PKS遺伝子以外に、最終的なポリケチド生成物の修飾、ポリケチドの細胞外への輸送、または抗生物質ポリケチドに対する耐性の付与のため、他の非PKS遺伝子も含むことが重要である。

[0041] DNAフラグメントの種類としては、3～60（種類）であり、好ましくは、5～50（種類）、より好ましくは、8～40（種類）、さらに好ましくは、10～30（種類）である。

[0042] 本発明の遺伝子クラスターコンストラクトの調製方法における工程（A）において、遺伝子クラスターコンストラクトを再構成可能であり、かつ、交互に連結し得る構造を有する複数のDNAフラグメントを調製する。各DNAフラグメントは、制限酵素で切断することにより、交互に連結し得る構造の粘着末端が形成されてもよい。又は、各DNAフラグメントを含むプラスミドを合成し、制限酵素で切断することにより、交互に連結し得る構造の粘着末端を有する各DNAフラグメントを調製してもよい。各DNAフラグメントのGC含量は65%以下であってよい。各DNAフラグメントは、好ま

しくは20bp以上の塩基配列の繰り返しが現れないようにする。各DNAフラグメントの長さは揃っていなくてもよい。同一の粘着配列を有するDNAフラグメントの長さは揃っていることが好ましい。

[0043] 本発明の遺伝子クラスターコンストラクトの調製方法における工程（B）において、工程（A）で調製された複数のDNAフラグメントを溶液中で混合する。混合は、全てのDNAフラグメントのモル濃度の比率が0.8～1.2、好ましくは0.9～1.1、より好ましくは0.95～1.05、さらに好ましくは、約1.0になるように行うことが好ましい。DNAフラグメントの混合は、必要に応じて集積用プラスミドの存在下に行うことでDNAフラグメントを集積させて、マルチモジュール型生合成酵素をコードする複数の遺伝子のクラスターのタンデムリピートを含むコンストラクトが得られる。得られた遺伝子クラスターコンストラクトを枯草菌に導入することで、マルチモジュール型生合成酵素をコードする遺伝子クラスターを含むプラスミドライブラリーが得られ、このプラスミドライブラリーのマルチモジュール型生合成酵素の遺伝子クラスターをシャトルプラスミドに移し、大腸菌とのconjugationによりStreptomyces属細菌のような適切な宿主細胞に転送することでマルチモジュール型生合成酵素を宿主細胞で発現させることができる。例えば上記コンビナトリアルライブラリーが、異なる強さ又は発現量のプロモータを各遺伝子について有しているプラスミドから構成される場合、マルチモジュール型生合成酵素を適当な宿主細胞で発現させることで、高発現のための好ましいプロモータの組み合わせを見出すことができる。

[0044] 本発明の遺伝子クラスターコンストラクトの調製方法における工程（P）においては、複数のプラスミド（種プラスミド）が調製される。種プラスミドは、工程（A1）、および工程（B1）を考慮して、集積体構築後にDNAフラグメントに分割可能なように、それぞれの設計に合わせて、適切な制限酵素認識配列をDNAフラグメントの境界、もしくは近傍に導入されている構造であってもよい。制限酵素としては、AarI、AlwNI、Bbs

I、BbvI、BcoDI、BfuAI、BglI、BsaI、BsaXI、BsmAI、BsmBI、BsmFI、BspMI、BspQI、BtgZI、DraIII、FokI、PflMI、SfaNI、SfiIなどのように、任意の配列の粘着末端を作製可能な酵素を用いることが好ましい。これらの制限酵素処理により得られる複数の粘着配列は、単一種プラスミド内で唯一の配列となってもよい。また、種プラスミド群は、コンビナトリアルライブラリーの組換え単位（多くの場合一つのDNAフラグメントがその単位に一致するが、場合により組換え単位が一部の種プラスミドにおいては、複数のDNAフラグメントからなる場合がある。）において同一の粘着配列を、同一の鎖に、同一の順番で有してもよい。

[0045] 本発明の遺伝子クラスターコンストラクトの調製方法における工程（A1）においては、複数種類の種プラスミドを、それぞれに適した制限酵素で処理して、複数種類のDNAフラグメントの混合液を調製する。制限酵素としては、上記に例示されたものが挙げられる。得られた制限酵素消化物には、所望のDNAフラグメントとプラスミド由来の断片が含まれる。本発明の好ましい1つの実施形態において、本発明で使用するDNAフラグメントと種プラスミド由来の断片はサイズが異なるので、これらを電気泳動でサイズ分画することにより、所望のDNAフラグメントの略等モル混合物が得られる。略等モル混合物とは、全てのDNAフラグメントのモル濃度の比率が0.8～1.2の範囲であること、好ましくは0.9～1.1の範囲であること、より好ましくは0.95～1.05の範囲であること、さらに好ましくは、約1.0であることをいう。

[0046] 本発明の遺伝子クラスターコンストラクトの調製方法における工程（B1）においては、工程（A1）で得られた所望のDNAフラグメントの略等モル混合物を、必要に応じて集積用プラスミドの存在下に再集積させて、マルチモジュール型生合成酵素をコードする複数の遺伝子のクラスターのタンデムリピートを含む遺伝子クラスターコンストラクトが得られる。得られた遺伝子クラスターコンストラクトを用い、上記（B）の記載と同様にしてプラ

スミドライブラリーが得られる。プラスミドライブラリーはクラスターを構成する遺伝子配列や、宿主細胞におけるプロモーターの強度などの制御配列の少なくとも1種を様々に変更したものを使用して宿主細胞で発現させることで、高発現マルチモジュール型生合成酵素遺伝子クラスターを選別することができる。

[0047] DNAフラグメント混合液にDNAリガーゼなどを用いて連結（ライゲーション）することにより遺伝子クラスターコンストラクトを作製することも可能であるが、上記工程（P）より得られた各DNAフラグメントのみが遺伝子集積の出発材料に限定されるわけではなく、最終的に上述のように各DNAフラグメントに分割可能な構造となっていれば、いかなる集積方法で準備された集積体を利用してもよい。ここで、DNAフラグメント混合液における、全てのDNAフラグメントのモル濃度の比率が0.8～1.2の範囲であること、好ましくは0.9～1.1の範囲であること、より好ましくは0.95～1.05の範囲であること、さらに好ましくは、約1.0であることをいう。

[0048] DNAフラグメントの連結方法は特に制限されないが、ポリエチレングリコールと塩の存在下で行うことが好ましい。塩としては、1価のアルカリ金属の塩が好ましい。好ましくは、T4DNAポリメラーゼで37℃、30分以上である。

[0049] 例えばPKSをコードするDNAがP、Q、R、Sの順に4つのドメインが連結されたP-Q-R-Sで表される場合、遺伝子クラスターコンストラクトは $(P-Q-R-S)_n$ で表されるタンデムリピート（nは2以上の整数）を含む。遺伝子クラスターコンストラクトの各ORF（P-Q-R-S）の5'エンドまたは3'エンドには宿主細胞で機能するプロモーター、リボソーム結合配列（RBS配列）、エンハンサーなどの制御配列が付加されていることが好ましい。また、遺伝子クラスターコンストラクトの各ORF（P-Q-R-S）の5'エンドまたは3'エンドには、宿主細胞中で機能する機能配列、及び選択マーカー等の配列が付加されていてもよい。また

、遺伝子クラスターコンストラクトには、枯草菌で有効な複製開始点が含まれていることが好ましい。例えば枯草菌の場合は θ 型の複製機構を有するもので、具体的には、pTB19 (Imanaka, T., et al., J. Gen. Microbiol., 130, 1399-1408. (1984)) や pLS32 (Tanaka, T and Ogra, M., FEMS Lett., 422, 243-246. (1998))、pAM β 1 (Swinfield, T. J., et al., Gene, 87, 79-90. (1990)) 等のプラスミドに含まれる複製開始点等の配列が挙げられる。

[0050] 枯草菌コンピテント細胞を遺伝子クラスターコンストラクトとともに培養することで、遺伝子クラスターコンストラクトは枯草菌内に取り込まれ、マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNA (例えば、PKS又はNRPSをコードするDNA) を含むプラスミドが形成される。枯草菌をコンピテントとする方法としては、Anagnostopoulou, C. and Spizizen, J., J. Bacteriol., 81, 741-746 (1961) に記載の方法を用いることが好ましい。枯草菌コンピテント細胞に加える遺伝子クラスターコンストラクト溶液の液量は特に制限はない。遺伝子クラスターコンストラクト溶液の液量は、好ましくは、枯草菌コンピテント細胞の培養液の液量に対し、1/20から等量であり、より好ましくは、半量である。

[0051] マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNA (例えば、PKS又はNRPSをコードするDNA) のタンデムリピートはプラスミドが形成される際にタンデムリピートの少なくとも1つ、好ましくは1つのマルチモジュール型生合成酵素をコードするDNA (例えば、PKS又はNRPSをコードするDNA) がプラスミドに組み込まれる。枯草菌からプラスミドを精製する方法としても公知の方法を用いることができる。

[0052] 上述の方法により得られたプラスミドが目的とするマルチモジュール型生合成酵素をコードするDNA (例えば、PKS又はNRPSをコードするD

NA) を有していることは、制限酵素切断により発生する断片のサイズパターンや、PCR法、塩基配列決定法により確認することができる。

[0053] ターミネーターは、前記宿主細胞で機能するものであれば特に限定されないが、例えば、fdファージ由来のターミネーター (fd-ter)、T4ファージ由来のターミネーター (T4-ter) 及びT7ファージ由来のターミネーター (T7-ter) 等が好ましく挙げられる。中でも、fdファージ由来のターミネーターが、上述した安定化効果がより大きい点で特に好ましい。

[0054] リボソーム結合配列 (RBS) は、公知のものが使用できる。

[0055] 本発明の1つの実施形態において、マルチモジュール型生合成酵素をコードするDNA (例えば、PKS又はNRPSをコードするDNA) を含むプラスミドを宿主細胞に導入した形質転換体を培養し、その培養物から有用物質 (例えば、ポリケチドまたは非リボソームペプチド) を得ることができる。「培養物」としては、培養上清、培養細胞、培養菌体、又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれかを意味するものである。本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

[0056] 本発明の形質転換体を培養する培地は、宿主が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、グルコース、ガラクトース、フラクトース、スクロース、ラフィノース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が挙げられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物が挙げられる。その他、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、各種アミノ酸等を用いてもよい。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫

酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が挙げられる。

[0057] 培養は、通常、振とう培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、28～38℃で行う。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。

[0058] 上記培養条件で培養すると、高収率で有用物質（例えば、ポリケチド）を生産することができる。

[0059] 培養後、有用物質（例えば、ポリケチド）が菌体内又は細胞内に生産される場合には、ホモジナイザー処理などを施して菌体又は細胞を破砕することにより、当該有用物質を採取することができる。一方、有用物質（例えば、ポリケチド）が菌体外又は細胞外に分泌される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、硫酸沈澱による抽出等により前記培養物中から当該有用物質を採取し、必要に応じてさらに各種クロマトグラフィー等を用いて単離精製する。

[0060] モジューラーPKSは、モジュール内で順番に複数の化学反応を触媒し、各ドメインの空間配置が重要である。いくつかの研究では、過去数年でPKSモジュールとドメインスワッピングの最適な融合境界候補を特定したが、タンパク質の配列が異なるため、この空間配置はモジュールごとに変わる可能性が生じる。これは、コンビナトリアル生合成の最適な境界位置が内容物に依存する可能性があることを意味する。したがって、本発明を使用することにより、ATドメインスワッピングなどのターゲットを絞った変更をさまざまなドメイン境界を使用して実行でき、得られた酵素の活性を*in vitro*で評価できる。

実施例

[0061] 以下、本発明を実施例に基づいて説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

[0062] 図1は、実施例1及び2の手順を模式的に示す図である。図1中、矢印の下にある模式図それぞれが、マルチモジュール型生合成酵素をコードする複数の遺伝子を含む遺伝子クラスターコンストラクトを示す。各遺伝子クラス

ターコンストラクトには、プロモーター、RBS、マルチモジュール型生合成酵素をコードする遺伝子（CDS）及びターミネーターの組み合わせがスペーサー配列を介して複数並んでいる。実施例1及び2では、この遺伝子クラスターコンストラクトを、交互に連結し得る構造を有する複数のDNAフラグメント（図1中、矢印の上にある模式図）を連結して得た。なお、実施例1では、全てのDNAフラグメントを一度に連結して遺伝子クラスターコンストラクトを得た。実施例2では、DNAフラグメントを3つの群に分け、それぞれの群で一旦遺伝子クラスターコンストラクトをプラスミドとして得た後、3つの群で得られたプラスミドを一緒にした後、再度DNAフラグメントに分解し、次いで連結して遺伝子クラスターコンストラクトを得た。なお、DNAフラグメントの連結の際には、ベクター骨格となるDNAフラグメントも含ませている。

[0063] 実施例1及び2

<DNAデザイン>

マルチモジュール型生合成酵素をコードする複数の遺伝子として、以下の遺伝子配列を利用した。以下の遺伝子配列は、*Streptomyces aureofaciens*株Tu117からのリポマイシン生合成遺伝子クラスターから選択した。

LipPKS1

LipPKS2

LipPKS3

LipPKS4

LipNRPS

LipMT

LipTE

[0064] すべてのCDSは、カスタム設計され、70%未満のGC含量となるように、及び20bp以上の繰り返しがないように、コドン最適化された。対象の生産宿主（ストレプトマイセスアルバス）での効率的な発現の要件のバラ

ンスもとっている。

コドン最適化前のGC含量 (%) :

L i p P K S 1 : 7 4 . 2 %

L i p P K S 2 : 7 2 . 3 %

L i p P K S 3 : 7 1 . 3 %

L i p P K S 4 : 7 1 . 3 %

L i p N R P S : 7 5 . 2 %

L i p M T : 7 1 . 1 %

L i p T E : 7 4 . 5 %

コドン最適化後のGC含量 (%) :

L i p P K S 1 : 6 3 . 7 %

L i p P K S 2 : 6 3 . 7 %

L i p P K S 3 : 6 3 . 9 %

L i p P K S 4 : 6 3 . 9 %

L i p N R P S : 6 5 . 3 %

L i p M T : 5 9 . 6 %

L i p T E : 6 5 . 7 %

[0065] コンビナトリアルライブラリとベクター転送のアセンブリで使用されるすべてのネイティブ制限酵素認識サイトをCDS (B s m b l、B s a l、A a r l) から削除した。

得られたシーケンス最適化CDSは、ストレプトミセスアルバスのプロモーターとRBSシーケンスを使用し、新しい遺伝子クラスターを設計するために使用した。

具体的には :

プロモーターとRBSは各PKS CDSの前に配置され、ターミネーターとスペーサー配列は各CDSの最後に配置した。実施例で使用したプロモーターの配列を配列番号14~23に示す。

[0066] L i p N R P S、L i p M T、およびL i p T E 遺伝子は、1つのプロモ

ーターの制御下で単一のオペロンにまとめた。3つのCDSにはそれぞれ独自のRBSを残した。ターミネーターはこのオペロンの最後に配置した。

[0067] したがって、デザインした遺伝子クラスターコンストラクトは、ベクター骨格の配列、並びにCDSの前にプロモーター及びRBSを含み、かつCDSの後にターミネーター及びスペーサー配列を含むLipPKS1遺伝子（遺伝子1）、LipPKS2遺伝子（遺伝子2）、LipPKS3遺伝子（遺伝子3）、LipPKS4（遺伝子4）、及び上記オペロン（遺伝子5）をこの順に含む配列が繰り返されたものである。

[0068] <アセンブリ>

実施例1（ダイレクトOGAB法）

プロモーターバリエーションを含むすべてのDNAフラグメント（配列番号1～13及び28～37）の濃度をUV分光光度計（ThermoFisher Nanodrop）で測定し、等モルのフラグメント混合物を作成するように調整した。DNase（Lucigen Corporation）による処理を行って、混入している線状DNAを除去した。濃度は各DNAフラグメントに対して100ng/μlに標準化した。500ngの各DNAフラグメントをチューブにまとめ、BsaI-HFv2制限酵素（NEB）で処理した。制限酵素で消化したDNAを精製するために、フェノールクロロホルム処理、ブタノール処理、エタノール沈殿を行った。透析チューブを用いたゲル抽出を行って、消化されたプラスミド混合物から標的断片を除去し、得られた消化された標的断片をエタノール沈殿で精製した。消化した断片を、消化したベクター（OGABベクター1.0）、1μlのT4 DNA Ligase（TAKARA BIO）、ライゲーションバッファーと混合し、37℃で3時間インキュベートしてライゲーションを完了させ、設計した遺伝子クラスターコンストラクトを得た。遺伝子クラスターコンストラクトを含むDNAライゲーション溶液を枯草菌コンピテント細胞と混合し、細胞を37℃での短時間のインキュベーション期間後にテトラサイクリン選択プレート上に広げた。コロニー増殖の時間の後、形質転換体をプレー

トから拾い、2 ml LB中で37℃で一晩増殖させた。プラスミド抽出は、従来プロトコルのように行い、得られたプラスミドは、予想通りにアセンブリされたかを制限消化パターン（制限酵素：Not Iによる切断パターン）により確認した。なお、OGABベクター1.0の塩基配列は、配列番号24に示したとおりである。図3は、OGABベクター1.0のベクターマップである。

[0069] 図2は、得られたプラスミドの制限消化パターンの一例を示す写真である。解析したコロニー24個のうち、予想通りにアセンブリされたコロニーは20個であった（ $20/24=83\%$ ）。

[0070] 実施例2（スタンダードOGAB法）

群1：DNAフラグメント（配列番号1～13）

群2：DNAフラグメント（配列番号1～3、5～9及び28～32）

群3：DNAフラグメント（配列番号1～3、5～9及び33～37）

まず、上記群1～群3それぞれに対して、実施例1と同様の手順でプラスミドを得た。次いで、DNAフラグメントの代わりに群1～群3のプラスミドを使用して、実施例1と同様の手順で再編成したプラスミドを得た。得られたプラスミドは、予想通りにアセンブリされたかを実施例1と同様に制限消化パターンにより確認した。その結果、解析したコロニー24個のうち、予想通りにアセンブリされたコロニーは23個であった（ $23/24=96\%$ ）。

[0071] 実施例1及び実施例2共に、5箇所のプロモーター位置（図1参照）に組み込まれたプロモーターの種類はランダムであり、有意な偏りは認められなかった。すなわち、偏りのないコンビナトリアルライブラリーが構築できていた。また、制限消化パターンにより予想通りにアセンブリされたプラスミドの塩基配列をFlongle（Oxford Nanopore Technologies社製）を使用して解読した結果、デザインした塩基配列とよく一致していた（約60kbpのうち、99.96%マッチ）。

[0072] 実施例3

実施例2の群1のDNAフラグメントのみを使用して得たプラスミドから LipPKS 遺伝子クラスターを制限酵素 AarI で切り出し、E. coli -Streptomyces シャトルベクター (pSYN0002, 配列番号38) の制限酵素 AarI サイトにライゲーションし、E. coli (ET12567 (pUZ8002)) でクローニングした。このE. coli を使用して、Streptomyces に接合伝達し、LipPKS 遺伝子クラスターの発現を確認した。

[0073] 実施例4

実施例1のOGABベクター1.0に代えて、ダイレクトシャトルベクター (OGABベクター2.0, 配列番号25) を使用したこと、DNAフラグメントとして配列番号1~13に示す塩基配列を有するDNAフラグメントを使用したこと以外は、実施例1と同様にしてプラスミドを得た。図4は、OGABベクター2.0のベクターマップである。OGABベクター2.0は、枯草菌、大腸菌及びStreptomyces 属微生物における複製開始点配列、大腸菌からStreptomyces 属微生物への接合による移送のための接合開始点配列 (OriT)、Streptomyces 属微生物のゲノムへの組み込みに必要な部位特異的組換えシステム (phiC31 インテグラーゼをコードする配列及び phiC31 attP 配列) を含む。得られたプラスミドを、E. coli に形質転換し、このE. coli を使用して、Streptomyces に接合伝達し、LipPKS 遺伝子クラスターの発現を確認した。

[0074] 実施例5

実施例4のOGABベクター2.0に代えて、ダイレクトシャトルベクター (OGABベクター2.1, 配列番号26) を使用したこと以外は、実施例4と同様の手順でStreptomyces に接合伝達し、LipPKS 遺伝子クラスターの発現を確認した。図5は、OGABベクター2.1のベクターマップである。OGABベクター2.1は、OGABベクター2.0にあるStreptomyces 属微生物のゲノムへの組み込みに必要な部

位特異的組換えシステムを `phiBT1` インテグラーゼをコードする配列及び `phiBT1 attP` 配列に変更したものである。

[0075] 実施例 6

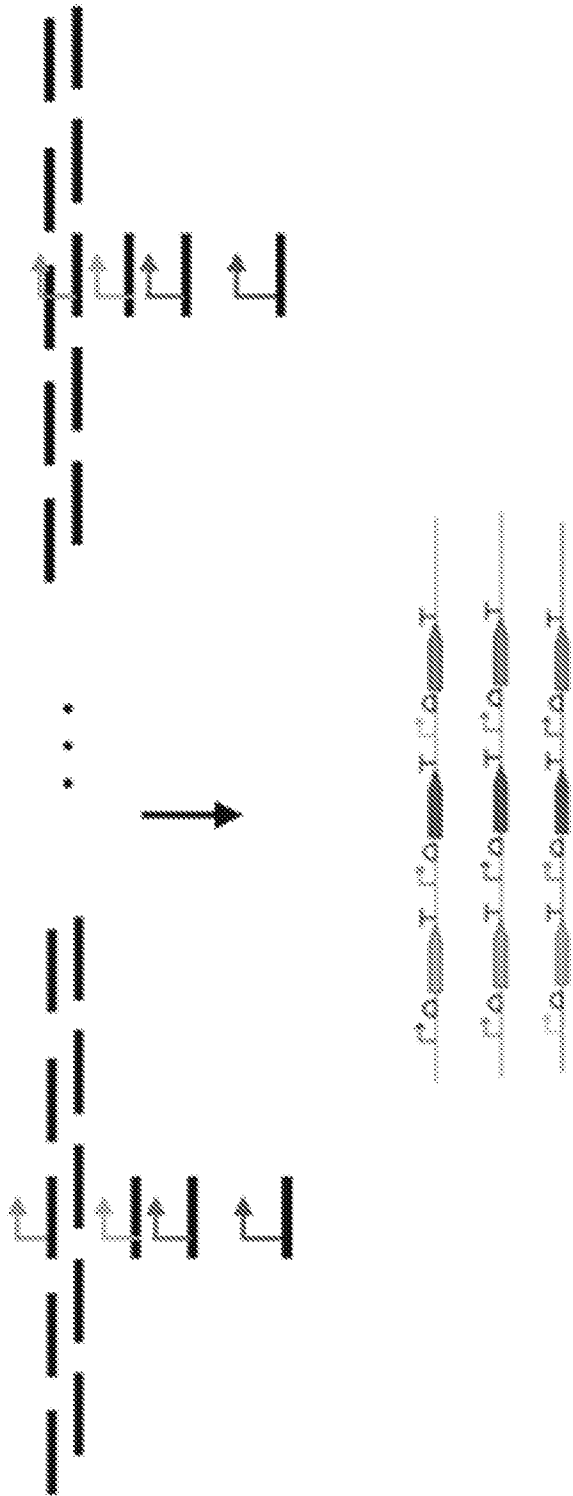
実施例 4 の `OGAB` ベクター 2. 0 に代えて、ダイレクトシャトルベクター（`OGAB` ベクター 2. 2, 配列番号 27）を使用したこと以外は、実施例 4 と同様の手順で `Streptomyces` に接合伝達し、`LipPKS` 遺伝子クラスターの発現を確認した。図 6 は、`OGAB` ベクター 2. 2 のベクターマップである。`OGAB` ベクター 2. 2 は、`OGAB` ベクター 2. 1 にインテグラーゼ（`Tyrosine-type recombinase`）及びクロラムフェニコール耐性遺伝子をコードする配列を追加したものである。

請求の範囲

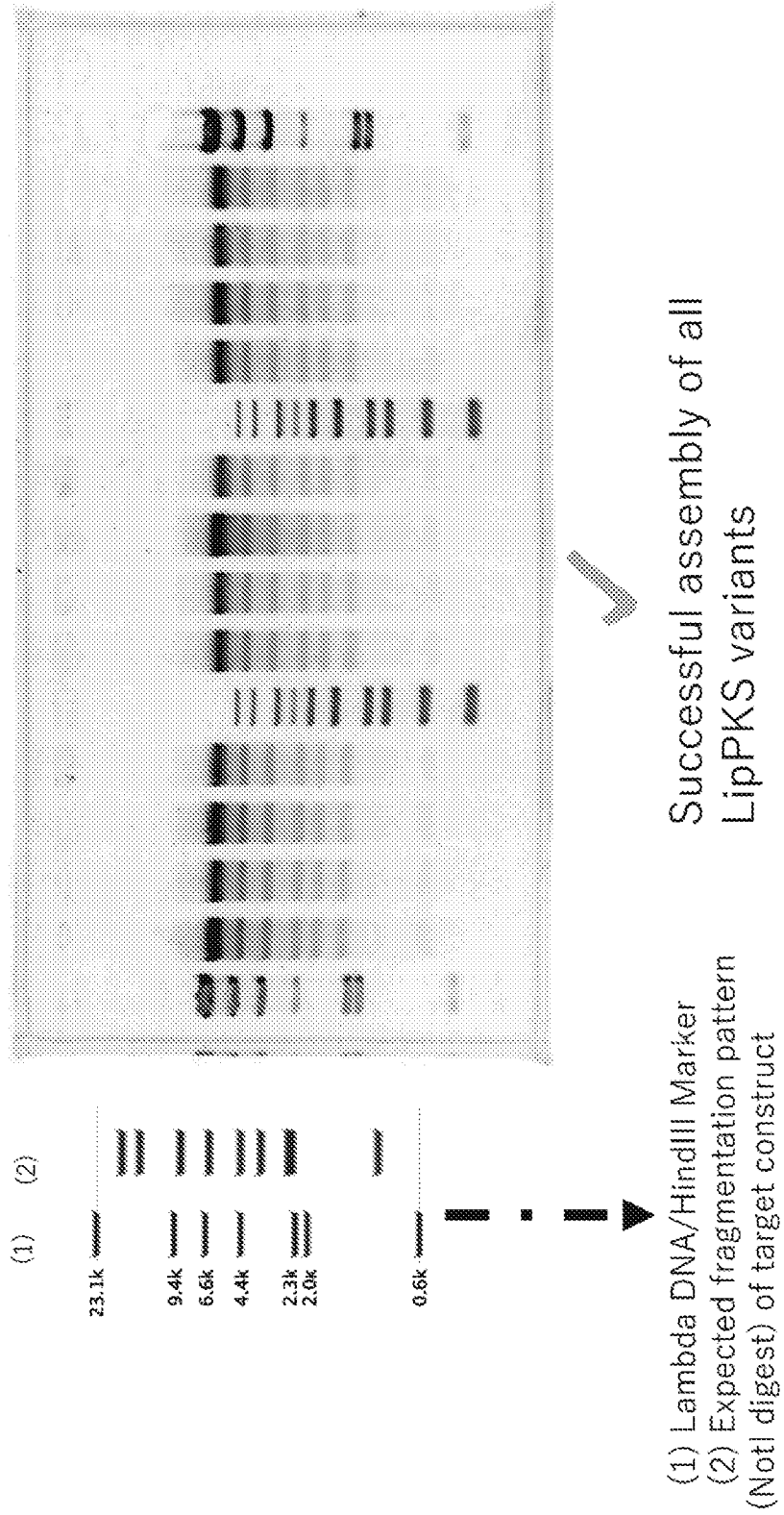
- [請求項1] マルチモジュール型生合成酵素をコードする複数の遺伝子を含む遺伝子クラスターコンストラクトを調製する方法であって、
- (A) 前記遺伝子クラスターコンストラクトを再構成可能であり、かつ、交互に連結し得る構造を有する複数のDNAフラグメントを調製する工程
- (B) 工程(A)で調製された複数のDNAフラグメントを溶液中で混合することで複数のDNAフラグメントを交互に連結して遺伝子クラスターコンストラクトを得る工程、を含む、方法。
- [請求項2] 前記DNAフラグメントのそれぞれがプラスミドに含まれており、前記プラスミドから前記工程(A)のDNAフラグメントを調製する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] マルチモジュール型生合成酵素をコードする複数の遺伝子を含む遺伝子クラスターコンストラクトを調製する方法であって、以下の工程：
- (P) 交互に連結し得る構造を有する複数のDNAフラグメントを含む複数種類のプラスミドを調製する工程、
- (A1) 複数種類の前記プラスミドを、それぞれに適した制限酵素で処理して、複数種類のDNAフラグメントの混合液を調製する工程、及び
- (B1) 工程(A1)で得られたDNAフラグメントの混合液を用いて、DNAフラグメントを再集積させて前記遺伝子クラスターコンストラクトを得る工程、を含む、方法。
- [請求項4] 前記工程(P)において、枯草菌を用いることにより交互に連結し得る構造を有する複数のDNAフラグメントを含む複数種類のプラスミドを調製する、請求項3に記載の方法。

- [請求項5] 前記マルチモジュール型生合成酵素はモジュラーポリケチドシンターゼ（PKS）である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] 前記制限酵素が、Type II制限酵素である、請求項3に記載の方法。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか1項に記載の方法で調製された前記遺伝子クラスターコンストラクトを枯草菌に形質転換し、枯草菌からプラスミドDNAを回収する、プラスミドのコンビナトリアルライブラリーの調製方法。
- [請求項8] 請求項7に記載の調製方法により得られたプラスミドを複数種類選択し、前記工程（A1）におけるプラスミドとして再利用し、前記工程（A1）及び前記工程（B1）を実施する、請求項3に記載の方法。
- [請求項9] 請求項7に記載の調製方法により得られたプラスミドのコンビナトリアルライブラリー。
- [請求項10] 請求項9に記載のプラスミドを宿主細胞に形質転換し、マルチモジュール型生合成酵素を製造する方法。
- [請求項11] 前記宿主細胞がStreptomyces属の微生物である、請求項10に記載の方法。

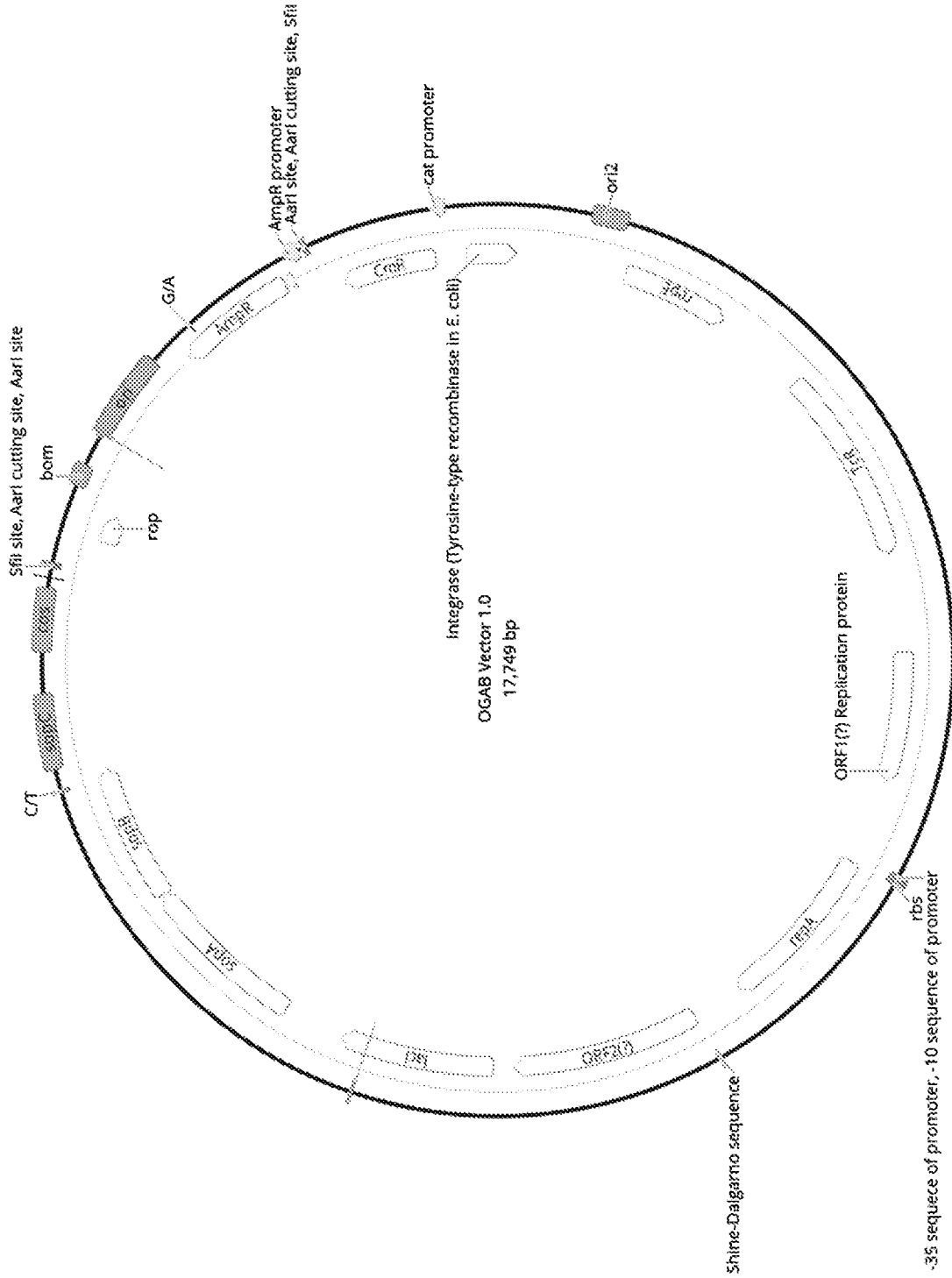
[図1]



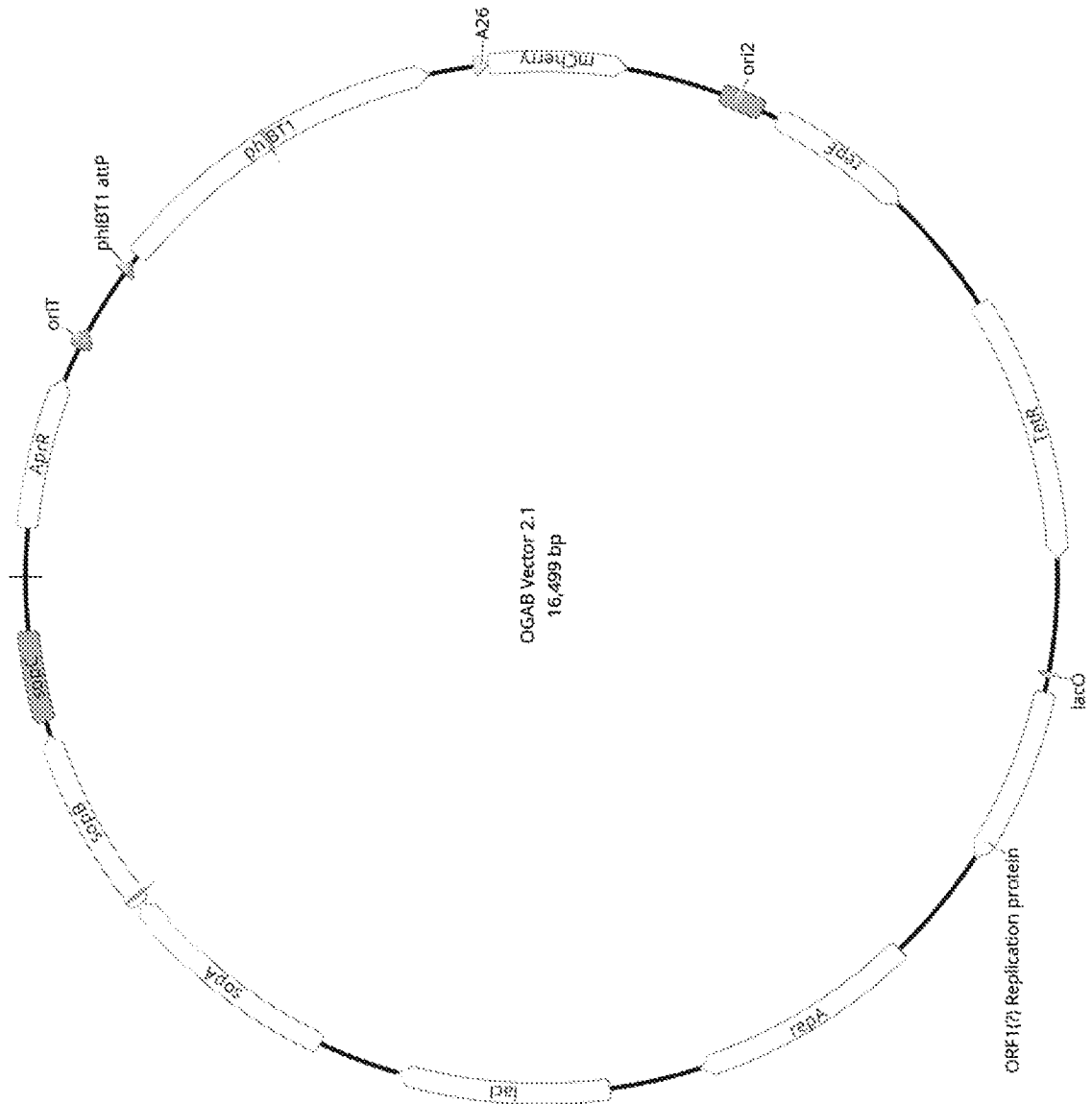
[図2]



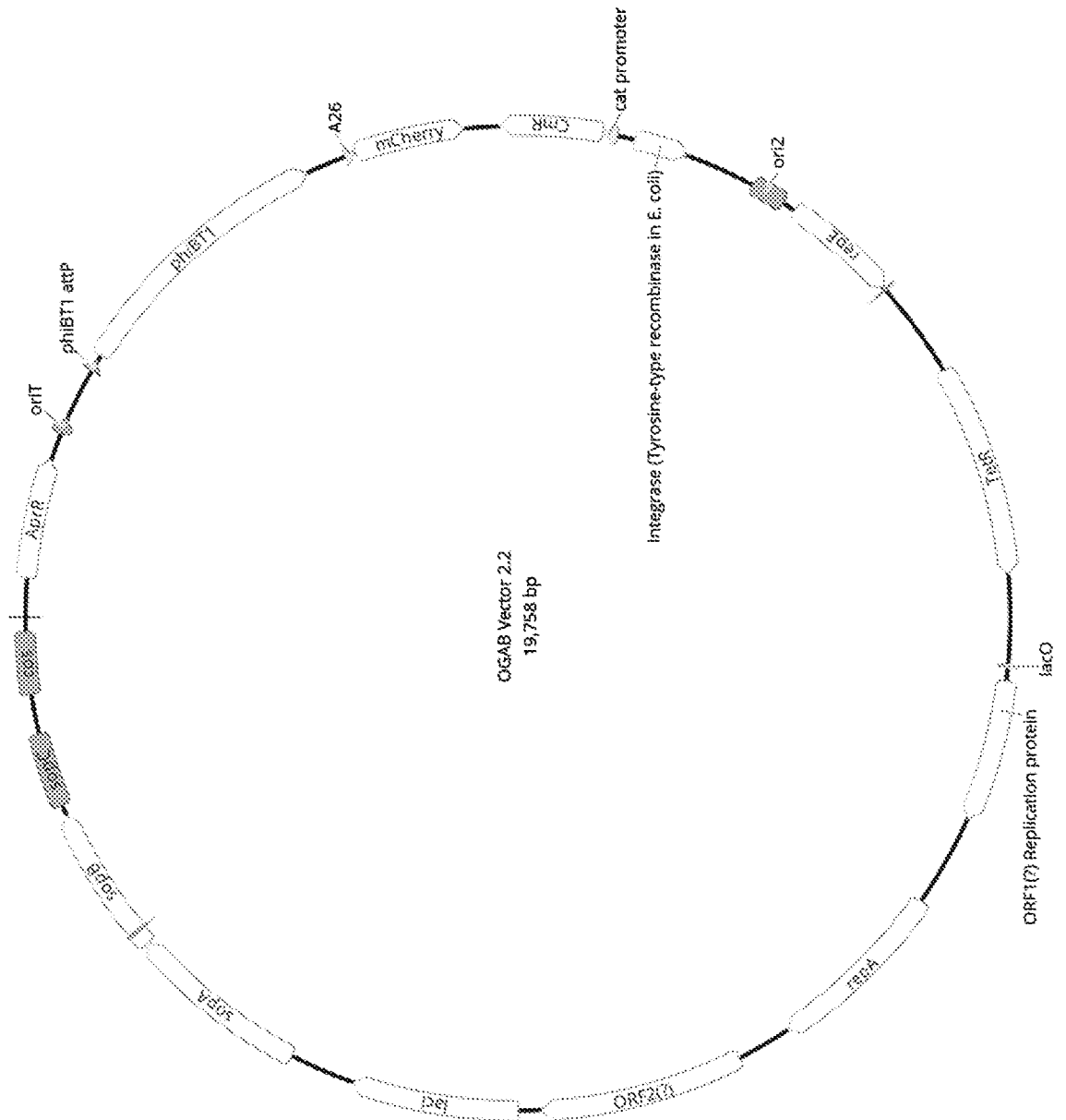
[3]



[圖5]



[圖6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/019849

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. C12N15/62 (2006.01) i, C12N5/10 (2006.01) i, C12N15/76 (2006.01) i, C40B40/06 (2006.01) i FI: C12N15/62Z, C12N15/76Z, C40B40/06, C12N5/10ZNA According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																				
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. C12N15/62, C12N5/10, C12N15/76, C40B40/06</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Published examined utility model applications of Japan</td> <td style="text-align: right;">1922-1996</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Published unexamined utility model applications of Japan</td> <td style="text-align: right;">1971-2021</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Registered utility model specifications of Japan</td> <td style="text-align: right;">1996-2021</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Published registered utility model applications of Japan</td> <td style="text-align: right;">1994-2021</td> </tr> </table> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			Published examined utility model applications of Japan	1922-1996	Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021	Registered utility model specifications of Japan	1996-2021	Published registered utility model applications of Japan	1994-2021										
Published examined utility model applications of Japan	1922-1996																			
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021																			
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021																			
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021																			
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">Category*</th> <th style="width:70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width:20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X Y</td> <td>JP 2004-129654 A (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) 30 April 2004 (2004-04-30), claims, paragraphs [0011]-[0036], examples</td> <td>1-4, 6-10 5, 7-11</td> </tr> <tr> <td>X Y</td> <td>WO 2015/111248 A1 (KEIO UNIVERSITY) 30 July 2015 (2015-07-30), claims, examples</td> <td>1-4, 6, 10 5, 7-11</td> </tr> <tr> <td>Y A</td> <td>JP 2019-533470 A (GINKGO BIOWORKS, INC.) 21 November 2019 (2019-11-21), paragraphs [0052]-[0060], examples 2-6, fig. 4A-H, 5A, 5B</td> <td>5, 7-11 1-4, 6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2007-508012 A (PROMEGA CORPORATION) 05 April 2007 (2007-04-05), paragraph [0017]</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2006-517090 A (KOSAN BIOSCIENCES, INC.) 20 July 2006 (2006-07-20), entire text</td> <td>1-11</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X Y	JP 2004-129654 A (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) 30 April 2004 (2004-04-30), claims, paragraphs [0011]-[0036], examples	1-4, 6-10 5, 7-11	X Y	WO 2015/111248 A1 (KEIO UNIVERSITY) 30 July 2015 (2015-07-30), claims, examples	1-4, 6, 10 5, 7-11	Y A	JP 2019-533470 A (GINKGO BIOWORKS, INC.) 21 November 2019 (2019-11-21), paragraphs [0052]-[0060], examples 2-6, fig. 4A-H, 5A, 5B	5, 7-11 1-4, 6	A	JP 2007-508012 A (PROMEGA CORPORATION) 05 April 2007 (2007-04-05), paragraph [0017]	6	A	JP 2006-517090 A (KOSAN BIOSCIENCES, INC.) 20 July 2006 (2006-07-20), entire text	1-11
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X Y	JP 2004-129654 A (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) 30 April 2004 (2004-04-30), claims, paragraphs [0011]-[0036], examples	1-4, 6-10 5, 7-11																		
X Y	WO 2015/111248 A1 (KEIO UNIVERSITY) 30 July 2015 (2015-07-30), claims, examples	1-4, 6, 10 5, 7-11																		
Y A	JP 2019-533470 A (GINKGO BIOWORKS, INC.) 21 November 2019 (2019-11-21), paragraphs [0052]-[0060], examples 2-6, fig. 4A-H, 5A, 5B	5, 7-11 1-4, 6																		
A	JP 2007-508012 A (PROMEGA CORPORATION) 05 April 2007 (2007-04-05), paragraph [0017]	6																		
A	JP 2006-517090 A (KOSAN BIOSCIENCES, INC.) 20 July 2006 (2006-07-20), entire text	1-11																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</p>																				
<table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> "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 </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																			
Date of the actual completion of the international search 10 August 2021		Date of mailing of the international search report 17 August 2021																		
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/019849

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-533308 A (KOSAN BIOSCIENCES, INC.) 22 November 2007 (2007-11-22), entire text	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/019849

JP 2004-129654 A	30 April 2004	(Family: none)
WO 2015/111248 A1	30 July 2015	US 2017/0009243 A1 claims, examples EP 3098310 A1 CN 106170547 A
JP 2019-533470 A	21 November 2019	US 2019/0264184 A1 paragraphs [0083]-[0086], examples, fig. 4A-H, 5A, 5B WO 2018/081590 A1 EP 3532055 A1
JP 2007-508012 A	05 April 2007	US 2005/0074883 A1 paragraph [0015] WO 2005/087932 A2 EP 1847611 A2
JP 2006-517090 A	20 July 2006	US 2004/0166567 A1 whole document WO 2004/029220 A2 EP 1576140 A2
JP 2007-533308 A	22 November 2007	US 2005/0227316 A1 whole document WO 2005/103279 A2 EP 1740713 A2

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/62(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/76(2006.01)i; C40B 40/06(2006.01)i FI: C12N15/62 Z; C12N15/76 Z; C40B40/06; C12N5/10 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）） C12N15/62; C12N5/10; C12N15/76; C40B40/06 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 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021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	JP 2004-129654 A (三菱化学株式会社) 30.04.2004 (2004-04-30)	1-4, 6-10
Y	特許請求の範囲、[0011]-[0036]、実施例	5, 7-11
X	WO 2015/111248 A1 (学校法人慶應義塾) 30.07.2015 (2015-07-30)	1-4, 6, 10
Y	特許請求の範囲、実施例	5, 7-11
Y	JP 2019-533470 A (ギンゴウ バイオワークス, インコーポレイテッド) 21.11.2019 (2019-11-21)	5, 7-11
A	[0052]-[0060]、実施例2-6、図4A-H、図5A、B	1-4, 6
A	JP 2007-508012 A (プロメガ コーポレイション) 05.04.2007 (2007-04-05)	6
	[0017]	
A	JP 2006-517090 A (コーサン バイオサイエンスズ, インコーポレイテッド)	1-11
	20.07.2006 (2006-07-20)	
	全文	
<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	“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	
“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		
“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		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
10.08.2021	17.08.2021	
名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）	
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	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
A	JP 2007-533308 A (コーサン バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド) 22.11.2007 (2007 - 11 - 22) 全文	1-11
.....		

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
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
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/JP2021/019849

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2004-129654 A	30.04.2004	(ファミリーなし)	
WO 2015/111248 A1	30.07.2015	US 2017/0009243 A1 CLAIMS, EXAMPLES EP 3098310 A1 CN 106170547 A	
JP 2019-533470 A	21.11.2019	US 2019/0264184 A1 [0083]-[0086], EXAMPLES, FIG. 4A-H, FIG. 5A, B WO 2018/081590 A1 EP 3532055 A1	
JP 2007-508012 A	05.04.2007	US 2005/0074883 A1 [0015] WO 2005/087932 A2 EP 1847611 A2	
JP 2006-517090 A	20.07.2006	US 2004/0166567 A1 whole document WO 2004/029220 A2 EP 1576140 A2	
JP 2007-533308 A	22.11.2007	US 2005/0227316 A1 whole document WO 2005/103279 A2 EP 1740713 A2	