

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7011599号  
(P7011599)

(45)発行日 令和4年2月10日(2022.2.10)

(24)登録日 令和4年1月18日(2022.1.18)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 P	19/34	(2006.01)	C 1 2 P	19/34	A Z N A
C 1 2 N	15/10	(2006.01)	C 1 2 N	15/10	Z
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	

請求項の数 18 (全75頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-553092(P2018-553092)  
 (86)(22)出願日 平成29年4月6日(2017.4.6)  
 (65)公表番号 特表2019-510504(P2019-510504 A)  
 (43)公表日 平成31年4月18日(2019.4.18)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/026285  
 (87)国際公開番号 WO2017/176963  
 (87)国際公開日 平成29年10月12日(2017.10.12)  
 審査請求日 令和2年4月6日(2020.4.6)  
 (31)優先権主張番号 62/452,550  
 (32)優先日 平成29年1月31日(2017.1.31)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 62/319,220  
 (32)優先日 平成28年4月6日(2016.4.6)

最終頁に続く

(73)特許権者 511152991  
 グリーンライト バイオサイエンス  
 インコーポレーテッド  
 GREENLIGHT BIOSCIEN  
 NCES, INC.  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0  
 2155、メドフォード、ボストン ア  
 ヴェニュー 200、スイート 1000  
 200 Boston Avenue,  
 Suite 1000, Medford  
 , MA 02155, U.S.A.  
 (74)代理人 100102842  
 弁理士 葛和 清司  
 (74)代理人 100189924  
 弁理士 小田切 美紗

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リボ核酸の無細胞的生産

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

リボ核酸(RNA)を生合成する無細胞的方法であって、該方法が：

(a) RNA、リボヌクレアーゼ、耐熱性キナーゼ、および耐熱性RNAポリメラーゼを含む細胞ライセート混合物をインキュベートして、解重合したヌクレオシドリン酸を含む細胞ライセート混合物を生産すること、ここでリボヌクレアーゼは、RNAse RおよびヌクレアーゼP1からなる群から選択され、耐熱性キナーゼは、耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼ、耐熱性ヌクレオシドニリン酸キナーゼ、および耐熱性ポリリン酸キナーゼからなる群から選択され、耐熱性RNAポリメラーゼは、耐熱性T7 RNAポリメラーゼ、耐熱性SP6 RNAポリメラーゼ、および耐熱性T3 RNAポリメラーゼからなる群から選択される；

(b) ステップ(a)において生産された細胞ライセート混合物を、耐熱性キナーゼおよび耐熱性RNAポリメラーゼを不活性化することなしに内在性ヌクレアーゼおよびホスファターゼを不活性化または部分的に不活性化する温度に加熱して、熱不活性化されたヌクレアーゼおよびホスファターゼを含む細胞ライセート混合物を生産すること；および

(c) ステップ(b)において生産された細胞ライセート混合物を、エネルギー供給源と関心のRNAをコードするデオキシリボ核酸(DNA)鋳型との存在下においてインキュベートして、関心のRNAを含む細胞ライセート混合物を生産すること、ここで、エネルギー供給源は、アデノシン三リン酸(ATP)またはATP再生系である、を含む、

前記方法。

【請求項 2】

ステップ ( a ) の細胞ライセート混合物が、単一の細胞ライセートまたは少なくとも 2 つの細胞ライセートを含み、少なくとも 2 つの細胞ライセートのうちの少なくとも 1 つの細胞ライセートが、RNA を含む細胞から得られ、少なくとも 2 つの細胞ライセートのうちの少なくとも 1 つの細胞ライセートが、リボヌクレアーゼ、耐熱性キナーゼ、および/または耐熱性 RNA ポリメラーゼを発現する細胞から得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼが、耐熱性ウリジル酸キナーゼ、耐熱性シチジル酸キナーゼ、耐熱性グアニル酸キナーゼ、および耐熱性アデニル酸キナーゼからなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼが、耐熱性 *Pyrococcus furiosus* ウリジル酸キナーゼ ( P f P y r H )、耐熱性 *Thermus thermophilus* アデニル酸キナーゼ ( T t h A d k )、耐熱性 *Thermus thermophilus* シチジル酸キナーゼ ( T t h C m k )、および耐熱性 *Thermotoga maritima* グアニル酸キナーゼ ( T m G m k ) からなる群から選択され、および/または、耐熱性ヌクレオシドニリン酸キナーゼが、耐熱性 *Aquifex aeolicus* ヌクレオシドニリン酸キナーゼからなる群から選択され、および/または、耐熱性ポリリン酸キナーゼが、耐熱性ポリリン酸キナーゼ 1 ( P P K 1 ) 酵素および耐熱性ポリリン酸キナーゼ 2 ( P P K 2 ) 酵素からなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

耐熱性 P P K 1 酵素が、耐熱性 *Thermosynechococcus elongatus* P P K 1 酵素からなる群から選択され、および/または、耐熱性 P P K 2 酵素が、耐熱性クラス I I I P P K 2 酵素からなる群から選択され、任意に、耐熱性クラス I I I P P K 2 酵素が、*Meiothermus ruber*、*Meiothermus silvanus*、*Deinococcus geothermalis*、*Thermosynechococcus elongates*、*Anaerolinea thermophile*、*Caldilinea aerophila*、*Chlorobaculum tepidum*、*Oceanithermus profundus*、*Roseiflexus castenholzii*、*Roseiflexus sp.*、および *Truepera radiovctrix* P P K 2 酵素からなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

耐熱性クラス I I I P P K 2 酵素が、配列番号 8 ~ 18 のいずれか 1 つによって同定されるアミノ酸配列と少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む耐熱性クラス I I I P P K 2 酵素からなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 7】

ステップ ( a ) の細胞ライセート混合物が、少なくとも 1 つの耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼ、少なくとも 1 つの耐熱性ヌクレオシドニリン酸キナーゼ、および少なくとも 1 つの耐熱性ポリリン酸キナーゼを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

ATP 再生系が、ポリリン酸を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 9】

ATP 再生系が、ヘキサメタリン酸、ヌクレオシドリン酸、および/またはポリリン酸キナーゼを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

エネルギー供給源、またはエネルギー供給源の少なくとも 1 つのコンポーネントがステップ ( c ) の細胞ライセート混合物に追加される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

少なくとも 1 つの精製された酵素または融合酵素がステップ ( a ) および/またはステップ ( c ) の細胞ライセート混合物に追加され、該少なくとも 1 つの精製された酵素または

50

融合酵素は、リボヌクレアーゼ、耐熱性キナーゼ、および/または耐熱性RNAポリメラーゼであり、ここでリボヌクレアーゼは、RNase RおよびヌクレアーゼP1からなる群から選択され、耐熱性キナーゼは、耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼ、耐熱性ヌクレオシドニリン酸キナーゼ、および耐熱性ポリリン酸キナーゼからなる群から選択され、耐熱性RNAポリメラーゼは、耐熱性T7 RNAポリメラーゼ、耐熱性SP6 RNAポリメラーゼ、および耐熱性T3 RNAポリメラーゼからなる群から選択される、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

(i) ステップ(a)の細胞ライセート混合物が、関心のRNAをコードするDNA鋳型を含む、および/または、

(ii) ステップ(a)の細胞ライセート混合物が、さらに $Mg^{2+}$ キレート剤を含み、任意に、 $Mg^{2+}$ キレート剤が、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)であるか、または、ステップ(a)の細胞ライセート混合物が、さらに塩化マンガン( $MnCl_2$ )および/または硫酸マグネシウム( $MgSO_4$ )を含む、および/または、

(iii) ステップ(b)の温度が、50～80である、および/または、

(iv) 関心のRNAをコードするDNA鋳型がステップ(c)の細胞ライセート混合物に追加される、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

関心のRNAが、一本鎖RNAまたは二本鎖RNAであり、任意に、一本鎖RNAが、メッセンジャーRNA(mRNA)、アンチセンスRNA、または、ヒンジドメインによって互いに連結された相補的なドメインを含有する一本鎖RNAであり、任意に、二本鎖RNAが、低分子干渉RNA(siRNA)またはショートヘアピンRNA(shRNA)である、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

関心のRNAが、少なくとも1g/L、任意に少なくとも5g/L、またはさらに任意に少なくとも10g/Lの濃度で生産される、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

任意に、ステップ(c)において生産された熱不活性化された細胞ライセート混合物と蛋白質沈殿剤とを組み合わせること、および沈殿した蛋白質、脂質、およびDNAを除去することによって、関心のRNAを精製することをさらに含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

細胞が、細菌細胞または酵母細胞であり、任意に、細菌細胞が、Escherichia coli細胞である、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

細胞培養培地中で、(a) RNAを含む細胞と、(b) 少なくとも1つのリボヌクレアーゼ、少なくとも1つの耐熱性キナーゼ、および少なくとも1つの耐熱性RNAポリメラーゼを含む細胞とを培養することを含む、リボ核酸(RNA)を生合成する方法であって、ここでリボヌクレアーゼは、RNase RおよびヌクレアーゼP1からなる群から選択され、耐熱性キナーゼは、耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼ、耐熱性ヌクレオシドニリン酸キナーゼ、および耐熱性ポリリン酸キナーゼからなる群から選択され、耐熱性RNAポリメラーゼは、耐熱性T7 RNAポリメラーゼ、耐熱性SP6 RNAポリメラーゼ、および耐熱性T3 RNAポリメラーゼからなる群から選択され、以下：

(i) (a)および(b)の細胞を溶解して細胞ライセートを生産することおよび該細胞ライセートを組み合わせて複数の酵素を含有する細胞ライセート混合物を生産すること；あるいは

(ii) (a)および(b)の細胞を組み合わせること、および組み合わせられた細胞を溶解して複数の酵素を含有する細胞ライセート混合物を生産すること；および

(iii) ステップ(i)または(ii)において生産された細胞ライセート混合物をインキュベートして、解重合したヌクレオシドリン酸を含む細胞ライセート混合物を生

10

20

30

40

50

産すること

をさらに含み、

ステップ ( i i i ) において生産された細胞ライセート混合物を、耐熱性キナーゼおよび耐熱性 RNA ポリメラーゼを完全に不活性化することなしに内在性ヌクレアーゼおよびホスファターゼを不活性化または部分的に不活性化する温度に加熱して、熱不活性化されたヌクレアーゼおよびホスファターゼを含む熱不活性化された細胞ライセート混合物を生産することをさらに含み、および

熱不活性化された細胞ライセート混合物を、エネルギー供給源および関心の RNA をコードするデオキシリボ核酸 ( DNA ) 鋳型の存在下、ヌクレオシド三リン酸の生産およびヌクレオシド三リン酸の重合をもたらす条件下でインキュベートして、関心の RNA を含む細胞ライセート混合物を生産することをさらに含み、ここで、エネルギー供給源は、アデノシン三リン酸 ( ATP ) または ATP 再生系である、前記方法。

10

【請求項 18】

請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法における使用のための細胞ライセートであって、少なくとも 1 つのリボヌクレアーゼ、少なくとも 1 つの耐熱性キナーゼ、および少なくとも 1 つの耐熱性 RNA ポリメラーゼを含み、ここでリボヌクレアーゼは、RNAse R およびヌクレアーゼ P1 からなる群から選択され、耐熱性キナーゼは、耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼ、耐熱性ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、および耐熱性ポリリン酸キナーゼからなる群から選択され、耐熱性 RNA ポリメラーゼは、耐熱性 T7 RNA ポリメラーゼ、耐熱性 SP6 RNA ポリメラーゼ、および耐熱性 T3 RNA ポリメラーゼからなる群から選択され、任意に、エネルギー供給源、ヌクレオシドリン酸、および 5' - ヌクレオシドリン酸から 5' - ヌクレオシド三リン酸への変換を直接的または間接的に触媒するキナーゼをさらに含み、ここで、エネルギー供給源は、アデノシン三リン酸 ( ATP ) または ATP 再生系であり、および / または、任意に、該細胞ライセートおよび / または該細胞ライセートの少なくとも 1 つのコンポーネントは改変細胞および / または細菌細胞から得られ、任意に細菌細胞が、Escherichia coli 細胞である、前記細胞ライセート。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

関連出願

本願は、米国特許法第 119 条 ( e ) の下において、2016 年 4 月 6 日出願の U.S. 仮出願番号 62/319,220 および 2017 年 1 月 31 日出願の U.S. 仮出願番号 62/452,550 の利益を主張し、これらのそれぞれはその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

リボ核酸 ( RNA ) は生命に遍在する。RNA は、蛋白質の制御および合成のための DNA から命令を運搬する、細胞内における情報の重要なメッセンジャーとして働く。細胞内における mRNA レベルの合成的な調節 ( mRNA の導入によって正に、または siRNA もしくは dsRNA の導入によって負に ) は、農作物保護、抗癌治療、およびワクチンなどの分野への適用を有するため、RNA はバイオテクノロジーにおいて関心がある。例えば、RNA 干渉 ( RNAi ) は、遺伝子の DNA 配列を用いて遺伝子を「オフ」にする細胞機序 - 「サイレンシング」と言われるプロセスを言う。動物、植物、および真菌を含む多種多様な生物において、RNAi は二本鎖 RNA ( dsRNA ) によって誘発される。機能的な一本鎖 (例えば mRNA) および二本鎖 RNA 分子は、生細胞内で、および精製された組換え体酵素と精製されたヌクレオチド三リン酸とを用いて in vitro で生産されてきた (例えば、欧州特許 No. 1631675 および U.S. 特許出願公開 No. 2014/0271559 A1 を参照。これらのそれぞれは参照によって本明細書に組み込まれる)。とはいえ、広範な商業的適用を可能にするスケールでの RNA の生産は、現在は法外なコストがかかる。

40

50

## 【発明の概要】

## 【0003】

本明細書においてはRNAの生産（生合成）のための方法、組成物、細胞、構築物、およびシステムが提供される。一般的には、バイオマス材料からの多量体RNAがその成分モノマーへと酵素的に解重合され、それから、それらのモノマーは（一連のキナーゼによって）それらの同族の三リン酸化されたバリエーションへとリン酸化され、これらはその後対応する核酸（例えばDNA）鋳型を用いて多量体RNAへと重合される。

## 【0004】

いくつかの態様において、本開示の方法、組成物、細胞、構築物、およびシステムは、例えば、少なくとも1つの細胞ライセート、精製蛋白質の組み合わせ、または細胞ライセート（単数または複数）と精製蛋白質（単数または複数）との組み合わせを用いた無細胞的条件下におけるRNAの生産のために用いられる。いくつかの態様において、本開示は、細胞ライセートを用いたバイオマスからのRNA（例えば、細胞の内在性RNA）からの所望の合成RNA（例えば、合成の一本鎖または二本鎖RNA）への変換に基づく。第1に、例えばメッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、および/またはリボソームRNA（rRNA）（例えば、細胞ライセート中に存在する）などのバイオマスからのRNA（例えば内在性RNA）は、1つ以上のヌクレアーゼによってそのモノマー形態、5'-ヌクレオシドリン酸（NMP）へと解重合される（図1、反応1）。次に、それらのヌクレアーゼ、ならびに天然のヌクレアーゼおよびホスファターゼは（例えば熱不活性化によって）不活性化または部分的に不活性化され、NMPは一連の耐熱性キナーゼ活性によってリボヌクレオチド三リン酸（NTP）へとリン酸化される（図1、反応2）。最後に、NTPは核酸（例えばDNA）鋳型を用いてRNAポリメラーゼ（例えば、耐熱性RNAポリメラーゼ）によって重合されて所望のRNAを形成する（図1、反応3）。所望の合成RNAは任意に細胞ライセートから精製され得る。

## 【0005】

それゆえに、本開示のいくつかの側面はリボ核酸（RNA）を生産する（生合成する）無細胞的方法を提供し、該方法は：（a）（i）RNAと（ii）RNAを解重合する酵素活性、耐熱性キナーゼ活性、および耐熱性RNAポリメラーゼ活性からなる群から選択される少なくとも1つの酵素活性とを含む、少なくとも1つの細胞ライセート混合物を、RNAの解重合をもたらす条件下においてインキュベートして、ヌクレオシドリン酸を含む細胞ライセート混合物を生産すること；（b）ステップ（a）において生産された細胞ライセート混合物を、耐熱性キナーゼ活性および耐熱性RNAポリメラーゼ活性を完全に不活性化することなしに内在性のヌクレアーゼおよびホスファターゼを不活性化または部分的に不活性化する温度（例えば50～80）に加熱して、熱不活性化されたヌクレアーゼおよびホスファターゼを含む細胞ライセート混合物を生産すること；および（c）ステップ（b）において生産された細胞ライセート混合物を、エネルギー供給源（例えばATP再生系）およびデオキシリボ核酸（DNA）鋳型（例えば、関心のRNAをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含有する）の存在下において、ヌクレオチド三リン酸の生産およびヌクレオチド三リン酸の重合をもたらす条件下においてインキュベートして、関心のRNAを含む細胞ライセート混合物を生産することを含む。

## 【0006】

細胞ライセート混合物は、RNAを含み、かつリボヌクレアーゼとして働く、キナーゼとして働く、および/またはRNAポリメラーゼとして働く少なくとも1つの酵素（少なくとも1つの融合酵素を包む）を発現する細胞から得られる、単一の細胞ライセートを含み得る。代替的には、細胞ライセート混合物は少なくとも2つの（例えば、少なくとも3、4、5、または6つの）細胞ライセートを含み得、少なくとも1つの細胞ライセートはRNAを含む細胞から得られ、少なくとも1つの細胞ライセート（例えば、少なくとも2、3、4、または5つ）は、ヌクレアーゼとして働く、キナーゼとして働く、および/またはRNAポリメラーゼとして働く少なくとも1つの酵素を発現する細胞から得られる。

## 【 0 0 0 7 】

酵素または融合酵素は、融合酵素の酵素がヌクレアーゼ活性を発揮する（核酸を切断または解重合する；例えばRNase R）場合に「ヌクレアーゼとして働く」と見なされる。酵素または融合酵素は、融合酵素の酵素がキナーゼ活性を発揮する（1つの分子から別の分子へのリン酸基の転移を触媒する；例えばポリリン酸キナーゼ）場合に「キナーゼとして働く」と見なされる。酵素または融合酵素は、融合酵素の酵素がポリメラーゼ活性を発揮する（ヌクレオチドをアセンブリして核酸を生産する；例えばRNAポリメラーゼ）場合に「ポリメラーゼとして働く」と見なされる。

## 【 0 0 0 8 】

いくつかの態様において、ステップ（a）のRNAはメッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、またはリボソームRNA（rRNA）である。

10

## 【 0 0 0 9 】

いくつかの態様において、細胞ライセート混合物は、少なくとも1つのリボヌクレアーゼ、少なくとも1つの耐熱性キナーゼ、および/または少なくとも1つのRNAポリメラーゼ（例えば、耐熱性RNAポリメラーゼ）を含む。融合酵素の使用もまた本開示に含まれる。例えば、細胞ライセート混合物はリボヌクレアーゼとキナーゼとの融合体または複数のキナーゼの融合体を含み得る。他の融合酵素は本開示に含まれる。

## 【 0 0 1 0 】

本開示の他の側面は、少なくとも1つのヌクレオシドリン酸キナーゼ（例えば、耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼ）、少なくとも1つのヌクレオシドニリン酸キナーゼ（例えば、耐熱性ヌクレオシドニリン酸キナーゼ）、および少なくとも1つのポリリン酸キナーゼ（例えば、耐熱性ポリリン酸キナーゼ）を含む、改変細胞、細胞ライセート、および細胞ライセート混合物を提供する。いくつかの態様において、細胞は少なくとも1つのリボヌクレアーゼおよび/または少なくとも1つのRNAポリメラーゼ（例えば、耐熱性RNAポリメラーゼ）をもまた含み得る。

20

## 【 0 0 1 1 】

いくつかの態様において、RNAを生産する（生合成する）方法は、（a）RNA（例えば、mRNA、tRNA、および/またはrRNA）、RNase R、耐熱性キナーゼ（例えば、PfpYrH、TthAdk、TthCmk、Pfgmk、AaNdK、TepPk、および/またはPPK2（例えば表6参照）、および耐熱性T7 RNAポリメラーゼを含む培養細胞（例えば改変細胞）を溶解し、それによって細胞ライセートを生産すること、（b）ステップ（a）において生産された細胞ライセートを、RNAから5'-NMPへの解重合をもたらす条件下においてインキュベートし、それによって5'-NMPを含む細胞ライセートを生産すること、（c）ステップ（b）において生産された細胞ライセートを60～80℃に加熱して、耐熱性キナーゼおよび耐熱性RNAポリメラーゼを完全に不活性化することなしに内在性のヌクレアーゼおよびホスファターゼを不活性化し、それによって熱不活性化されたヌクレアーゼおよびホスファターゼを含む細胞ライセートを生産すること、（d）ステップ（c）において生産された細胞ライセートを、エネルギー供給源（例えば、ポリリン酸を含むATP再生系）および改変核酸（例えばDNA）鑄型（例えば、関心のRNAをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含有する）の存在下において、ヌクレオシド三リン酸の生産およびヌクレオシド三リン酸の重合をもたらす条件下においてインキュベートして、関心のRNAを生産することを含む。

30

40

## 【 0 0 1 2 】

いくつかの態様において、RNA、RNase R、耐熱性キナーゼ、および耐熱性T7 RNAポリメラーゼは培養細胞（例えば改変細胞）の単一の株内に含有される。他の態様においては、上記活性/コンポーネントのサブセットを含有する培養細胞（例えば改変細胞）が溶解され、ライセートが組み合わせられて、上記ステップ（a）に記載されている全ての酵素活性を含む細胞ライセート混合物を生成する。いくつかの態様において、酵素活性は、精製酵素の形態で、上記ステップ（a）に記載されているライセートに追加され

50

る。いくつかの態様において、ライセートおよび/または精製蛋白質は上記ステップ(c)に記載されている熱不活性化ステップ前に組み合わせられる。他の態様において、ライセートおよび/または精製蛋白質は上記ステップ(c)に記載されている熱不活性化ステップ後に組み合わせられる。

【0013】

関心のRNAはRNAのいずれかの形態であり得、一本鎖RNAおよび二本鎖RNAを包含する。例えば、関心のRNAはメッセンジャーRNA(mRNA)、アンチセンスRNA、マイクロRNA、短鎖干渉RNA(sRNA)、またはショートヘアピンRNA(shRNA)であり得る。他のRNA干渉(RNAi)分子は本明細書に包含される。

【0014】

本発明のいくつかの態様の詳細は付随する図および発明を実施するための形態に提示されている。本発明の他の特徴、目的、および利点は明細書および請求項から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、本明細書に記載される無細胞的RNA生産の概略図を示している。バイオマスからのRNA(例えば内在性RNA)、ヌクレアーゼ、耐熱性キナーゼ、および/または耐熱性RNAポリメラーゼを含有する細胞を溶解し(または組み合わせて溶解し)、もたらされた細胞ライセート(単数または複数)を、RNAの解重合をもたらす条件下においてインキュベートする。それから、細胞ライセートを加熱して、ヌクレアーゼおよびいずれかの内在性ホスファターゼを不活性化する(耐熱性キナーゼおよび耐熱性RNAポリメラーゼを不活性化することなしに)。それから、細胞ライセートを、関心のRNAをコードする改変DNA鋳型の存在下において、ヌクレオシド三リン酸の生産およびヌクレオシド三リン酸の重合をもたらす条件下でインキュベートし、それによって関心のRNA(例えば、ssRNAまたはdsRNA)を生産する。代替的には、個々の精製された経路酵素(例えば、耐熱性RNAポリメラーゼなどのRNAポリメラーゼ)を熱不活性化ステップ後の細胞ライセートに追加し得る。それゆえに、いくつかの場合には、細胞ライセートを生産するために用いられる改変細胞は、上に記載されている酵素活性の1つ以上、例えばヌクレアーゼ、耐熱性キナーゼ、および/または耐熱性RNAポリメラーゼを発現しない。

【0016】

【図2】図2Aは、エネルギー生成のためのポリリン酸依存性キナーゼ経路の概略図を示している。図2Bは、本開示の方法およびシステムへの使用のための追加の例示的なエネルギー変換経路の概略図を示している。UMPキナーゼ(例えばPyrococcus furiosusから得られる)およびポリリン酸キナーゼ(例えば、Thermosynechococcus elongatus、Caldilinea aerophila、Deinococcus geothermalis、Meiothermus ruber、Meiothermus silvanus、Deinococcus geothermalis、Anaerolinea thermophila、Chlorobaculum tepidum、Oceanithermus profundus、Roseiflexus castenholzii、Roseiflexus sp.、またはTruepera radiovctrixから得られる)がUMPをUDPに変換するために用いられ得、NDPキナーゼ(例えばAquifex aeolicus ndk遺伝子によってコードされる)およびポリリン酸キナーゼがUDPをUTPに変換するために用いられ得る。CMPキナーゼ(例えばThermus thermophilusから得られる)およびポリリン酸キナーゼがCMPをCDPに変換するために用いられ得、NDPキナーゼおよびポリリン酸キナーゼがCDPをCTPに変換するために用いられ得る。GMPキナーゼ(例えばThermotoga maritimaから得られる)およびポリリン酸キナーゼがGMPをGDPに変換するために用いられ得、NDPキナーゼおよびポリリン酸キナーゼがGDPをGTPに変換するために用いられ得る。AMPキナーゼ(例えばThermus thermophilusから得られる)およびポリリン酸キナーゼがAMPをADPに変換するために用いられ得、NDPキナーゼ(例えばAquifex aeolicus ndk遺伝子によってコードされる)およびポリリン酸キナーゼがADPをATPに変換するために用いられ得る。代替的には、クラスII IIPPK2酵素(例えば表6参照)がAMPをATPに変換するために用いられ得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 7 】

【図3】図3Aは、二本鎖RNAの生合成のために用いられるDNA鋳型の例の概略図を示している。プラスミドの一部としてコードされたDNA鋳型は単一のコード領域を含有し、関心のコード領域に作動可能に連結されたプロモーターと1つ以上のターミネーターとを包含する。転写後に、RNAは分子内ヌクレオチド塩基対形成によってヘアピン構造へとフォールディングする。単独かまたはプラスミドの一部としてコードされたかどちらかのDNA鋳型は、ドメイン2によって離間された2つの相補的なドメイン(1および3)を含有する。図3Bは、二本鎖RNAの生合成のために用いられるDNA鋳型の別の例の概略図を示している。DNA鋳型はコンバージェントなプロモーター配列を相補鎖上に含有する。各鋳型鎖から転写されたRNA配列は、転写後にアニーリングする。図3Cは、二本鎖RNAの生合成のために用いられるDNA鋳型の別の例の概略図を示している。プラスミドの一部としてコードされたDNA鋳型は、相補鎖上の関心のコード領域に作動可能に連結されたコンバージェントなプロモーター配列と、リードスルー転写を防ぐための1つ以上のターミネーター配列とを含有する。図3Dは、二本鎖RNAの生合成のために用いられるDNA鋳型の別の例の概略図を示している。プラスミドの一部としてコードされたDNA鋳型は独立したカセットを含有し、そのそれぞれは関心のコード領域に作動可能に連結されたプロモーターと1つ以上のターミネーターとを包含し、相補的な配列の転写を駆動し、これらは転写後にアニーリングする。図3Eは、二本鎖RNAの生合成のために用いられるDNA鋳型の別の例の概略図を示している。DNA依存性RNAポリメラーゼを用いてssRNA鋳型を生産し、RNA依存性RNAポリメラーゼを用いて二本鎖RNAを生産する。

10

20

## 【 0 0 1 8 】

【図4】図4は、本開示の無細胞的RNA生産方法の別の例の概略図を示している。プロセスは、改変細胞が生産される単一の発酵ベッセルから、標準的な発酵技術を用いて始まる。発酵により生成したバイオマスは例えば任意に精密濾過(MF)によって濃縮された後、機械的ホモジナイゼーションにより溶解される。それから、ライセートは第2の発酵ベッセルに圧送され、発現されたヌクレアーゼ酵素がRNAをそのモノマー成分に変換する。反応全体を加熱して、任意の内在性ホスファターゼまたはヌクレアーゼ(例えばRNase)活性、ならびにRNA産物安定性および/または忠実性にとって不利であろう任意の他の外来性の/導入された細胞(例えばヌクレアーゼ)活性を不活性化する。熱不活性化後に、ポリリン酸を一連の耐熱性キナーゼによるNMPからNTPへのリン酸化のための高エネルギーリン酸供給源として反応に供給し、続けてdsRNAへの重合が起こる。99重量%(例えば、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、または99%)dsRNAほどまで純度を増大させるための下流処理が用いられ得る。例えば、純度を50~60%、50~70%、50~80%、50~90%、50~95%、70~80%、70~90%、または70~95%に増大させるための処理が用いられ得る。例示的な下流プロセスは、蛋白質沈殿剤(例えば酢酸アンモニウム)の追加によって始まり、ディスク型遠心(DSC)またはタンジェンシャルフロー濾過(TFF)による製品流からの蛋白質、脂質、および何らかのDNAの除去に続く。それから、塩を除去し体積を低減させるために限外濾過を実行する。製品流への塩化リチウムの追加はdsRNA産物の沈殿をもたらし、その後ディスク型遠心を用いてバルク液体から分離され、80%純度のdsRNA製品流を得る。さらなるクロマトグラフィーポリッシングで99%純粋な産物を得る(Nilsen, TW. Cold Spring Harb Protoc. 2012 Dec 1;2012(12))。

30

40

## 【 0 0 1 9 】

【図5】図5A~5Bは、精製E. coli RNAの消化によるリボヌクレアーゼ活性の比較を示している。(図5A)ヌクレアーゼ処置による酸可溶性のヌクレオチド(モノヌクレオチドおよび短いオリゴヌクレオチド)の遊離はベンゾナーゼ、RNase A、RNase R、およびヌクレアーゼP1で最も急速であった。(図5B)反応産物のLC-MS分析は、RNase RおよびヌクレアーゼP1処置によるRNAからのNMP遊離を実証した。

50

## 【 0 0 2 0 】

【図6】図6は、外来性RNase Rを用いたライセートRNAの解重合を示すグラフであり、5'-NMPを特異的に同定するために、産物はUPLCによって分析されている。RNase Rの非存在下では、ライセートは内在性のRNase R活性を發揮し、これは5'-NMPのゆっくりした蓄積をもたらした（濃灰色の実線）。外来性RNase Rの追加は、2'または3' NMP蓄積の速度に影響することなしに（薄灰色の線）、急速な5'-NMP遊離（濃灰色の点線）をもたらした。それゆえに、RNase Rの過剰発現は多量体RNAから5'-NMPへの変換の速度を加速させ、抽出液中に存在するホスファターゼ/ヌクレアーゼ活性の有害な効果を低減させる。実験は50%ライセートの終濃度で実施した。

10

## 【 0 0 2 1 】

【図7】図7A~7Cは、バッチ段階で増殖した1Lバイオリアクター培養物中のRNase R過剰発現の結果を示している。（図7A）二つの培養物における蛋白質発現のSDS-PAGE分析。空ベクター培養物は空の蛋白質発現ベクターを含有した（pETDuet-1）。RNase R培養物はpETDuet-1にクローニングされたE. coli rnrを含有した。誘導した培養物からのサンプル（+）は、右の矢印によって示されるRNase R（MW 92.9 kDa。C末端ヘキサヒスチジンタグを有する）の強い発現を示した。（図7B）空ベクター（濃灰色）およびRNase R発現株（薄灰色）の増殖キネティクス（誘導前および後の増殖を包含する）は、RNase R過剰発現が細胞増殖にとって有害ではないということを実証した。点線は指数曲線フィットを表す。（図7C）過剰発現されたRNase Rはバッチ増殖したバイオマスのライセート中において活性であり、酸可溶性のヌクレオチドを遊離させた。空ベクター株（濃灰色実線）では、外来性RNase Rを追加することはヌクレオチド遊離の速度を増大させた（濃灰色点線）。対照的に、RNase Rを発現する株は溶解によって急速なヌクレオチド遊離を示した（薄灰色実線）。外来性RNase Rを追加することはヌクレオチド遊離の速度または最終的なヌクレオチド収量を増大させなかった（薄灰色点線）。実験は50%ライセートの終濃度で実施した。

20

## 【 0 0 2 2 】

【図8】図8は、Mg<sup>2+</sup>をキレートすることが高密度ライセート中の解重合速度に及ぼす効果を描写するグラフである。空ベクターを含有するバイオマスから調製されたライセート（濃灰色）はEDTAに不感であった。過剰発現されたRNase Rを有するライセート（薄灰色）はMg<sup>2+</sup>除去に伴って急速なRNA解重合を示し、8mM EDTAが最大の解重合速度を提供した。実験は90%ライセートの終濃度で実施した。

30

## 【 0 0 2 3 】

【図9】図9A~9Dは、ライセート中における外来性の同位体標識された「重い」NMP（hNMP）の安定性を実証するグラフを示している：（図9A）hAMPはライセート中において比較的安定であり、37℃での1時間インキュベーション後に90%が残った。（図9B）hCMPはライセート中において分解され、およそ30分後に70%が残った。10mMオルトバナジン酸ナトリウム（点線）（いくつかのホスファターゼおよびキナーゼの阻害剤）の追加は安定性を有意に改善した。（図9C）hUMPはライセート中において分解され、およそ20分後に70%が残った。リン酸ナトリウム（150mM）（点線）およびオルトバナジン酸ナトリウム（点線）は安定性を有意に改善した。（図9D）hGMPはライセート中において分解され、およそ10分後に70%が残った。オルトバナジン酸ナトリウムは安定性を有意に改善し、70% hGMPが30分後に残った。

40

## 【 0 0 2 4 】

【図10】図10は、ライセート中の外来性NTPの安定性に及ぼす熱不活性化の効果を実証するグラフである。ライセートを70℃でブレインキュベートした後に、温度を37℃に下げ、NTP（ATP、CTP、UTP、およびGTP）の等モル混合物を追加した。ブレインキュベーション時間は右のレジェンドに列記されている。コントロールライセート（熱不活性化に付されない）はNTPを急速に消費した（T = 0 min）。ブレイン

50

キュベーション時間を増大させることはNTPを安定化し、70 °Cでの15分はNTPase活性を消去した(T = 15 min)。

【0025】

【図11】図11A~11Bは、ライセート中のNMPおよびdsRNAの安定性に及ぼす熱不活性化の効果を実証するグラフである。(図11A)熱不活性化はライセート中のNMPを安定化した。ライセートを37 °Cで外来性RNase R (ライセート+RNase R)によって処置して(t = 0 min - 5 min)、NMPを遊離させ、それから70 °Cで熱不活性化した(t = 5 minから25 min)。それから温度を37 °Cに下げ、反応物をさらに60 minインキュベートした。NMPは熱不活性化後のライセート中において概ね安定であった。(図11B)熱不活性化はライセート中における転写反応の反応物および産物を安定化した。ライセートを示されている温度で15分間プレインキュベートし、それから温度を37 °Cに下げ、転写反応物を追加した。70 °Cおよび80 °Cでの熱不活性化は、正のコントロール(ライセートなし)と同様の検出可能な転写産物を生産するのに十分に基質および産物を安定化した。60 °Cではしなかった。

10

【0026】

【図12】図12は、*P. furiosus*からのUMPキナーゼ(PfPyrH)の温度依存的な活性を実証するグラフであり、ATP消費についてルシフェラーゼアッセイによって定量した。精製PfPyrHの比活性はインキュベーション温度に概ね不感であった。

【0027】

【図13】図13は、*E. coli*からのAdk(EcAdk)と比較した*T. thermophilus*からのAMPキナーゼ(TthAdk)の温度依存的な活性を実証するグラフであり、ルシフェラーゼによって測定した。精製EcAdkは60 °Cよりも下の温度で活性であった。TthAdkはより高い比活性を有し、70 °Cに最大を有した。

20

【0028】

【図14】図14は、*T. thermophilus*からのCMPキナーゼ(TthCmk)の温度依存的な活性を実証するグラフであり、ルシフェラーゼによって測定した。精製TthCmkは温度に比較的の不感であり、37~80 °Cで高い活性を有した。

【0029】

【図15】図15は、*E. coli*(EcGmk)、*T. thermophilus*(TthGmk)、および*T. maritima*(TmGmk)からのGMPキナーゼの温度依存的な活性を実証するグラフであり、ルシフェラーゼによって測定した。精製EcGmk(濃灰色)はより低温でより活性であり、一方、TthGmk(薄灰色)およびTmGmk(中間の灰色)は70 °Cで最も活性であった。

30

【0030】

【図16】図16は、*A. aeolicus*からの精製NDPキナーゼ(AaNdk)の活性を実証するデータのグラフであり、ルシフェラーゼによって測定した。精製AaNdkはATPおよびGDPを基質として用いると37~80 °Cで高度に活性であり、50 °Cで最適活性であった。

【0031】

【図17】図17は、*E. coli*(EcPpk)、*Thermosynechococcus elongatus*(TePpk)、および*Thermus thermophilus*(TthPpk)からの精製ポリリン酸キナーゼ1(PPK1)酵素の活性を実証するグラフであり、ルシフェラーゼによって測定した。EcPpkは温度60 °Cで最も活性であり、一方、TePpkは70 °Cで最適活性であった。TthPpkは比較的低い活性を示した。

40

【0032】

【図18】図18は、緩衝液中における市販のT7 RNAポリメラーゼの活性を実証するグラフであり、37 °Cでそれらのそれぞれの製造者によって推奨される条件を用いた。ThermoT7およびMegaScriptポリメラーゼは、(例えば、図3Bの)二重鎖DNA鋳型による試験された条件下において、NEBポリメラーゼよりも高い比活性を示した。

50

## 【 0 0 3 3 】

【図 1 9】図 1 9 は、二重鎖 DNA 鋳型による標準化された反応条件下において、37 および 50 °C での希釈ライセート中における T7 RNA ポリメラーゼ活性を比較するグラフである。37 °C では、Thermo T7 が最も高い比活性を示した。50 °C では Thermo T7 のみが検出可能な活性を有し、10 g / L / hr を超える dsRNA を生じさせた。

## 【 0 0 3 4 】

【図 2 0】図 2 0 は、緩衝液および高密度の熱不活性化されたライセート中の Thermo T7 活性の活性を実証するグラフである。Thermo T7 活性は熱不活性化後の遠心によって清澄化されたライセートにおいて最も高かった。清澄化されていないマトリックス中のポリメラーゼ活性は緩衝液単独を超えたが、清澄化ステップを省くことは活性の 60 % 減少をもたらした。

10

## 【 0 0 3 5 】

【図 2 1】図 2 1 は、上昇した温度に対する Thermo T7 の耐容性を実証するグラフである。Thermo T7 を 50 °C でプレインキュベートすることは、37 °C でアッセイしたその後のポリメラーゼ活性に効果を有さなかった。60 °C および 70 °C でのプレインキュベーションは酵素機能の急速な不可逆的阻害をもたらした。

## 【 0 0 3 6 】

【図 2 2】図 2 2 A は、E. coli 株 G L 1 6 - 1 7 0 中の A. thermophila P P K 2 について発現および可溶性データを示す SDS - PAGE ゲルの画像である。MW : 未染色蛋白質標準ブロードレンジ (New England Biolabs Cat#P7704)。- : 誘導前培養物。+ : 収穫時の誘導した培養物。L : 清澄化されたライセート中の可溶性蛋白質。A. thermophila P P K 2 : 33 kDa。図 2 2 B は、熱不活性化されたライセート中における A. thermophila P P K 2 の ATP 生産を示すグラフである。黒丸は ADP からの ATP 生産を表す。白丸は AMP からの ATP 生産を表す。両方の基質について、A. thermophila P P K 2 は 400 mM / hr を超過する速度で ATP を生産する。

20

## 【 0 0 3 7 】

【図 2 3】図 2 3 は、無細胞的 dsRNA 生産におけるエネルギー生成のための耐熱性クラス III P P K 2 の適用を実証するアガロースゲルの画像である。左のレーンには正のコントロールを含有しており、NTP からの dsRNA 合成を実証している。真ん中のレーンには正のコントロールを含有しており、外来性 ATP をエネルギー供給源として用いて、ヌクレオチドキナーゼ発現ライセート中における NMP からの dsRNA 合成を実証している。右のレーンは、ヌクレオチドキナーゼおよび C. aerophila P p k 発現ライセートを用いた NMP および HMP からの dsRNA 合成を実証する反応を含有する。各ケースにおいて、無細胞的 RNA 合成反応は  $Mn^{2+}$  非依存的である。ポリメラーゼなしの反応が負のコントロールとして包含されており、各ライセート含有反応のバックグラウンド核酸含量を例解している。

30

## 【 0 0 3 8 】

【図 2 4】図 2 4 は、無細胞的 dsRNA 生産におけるエネルギー生成のための耐熱性クラス III P P K 2 の適用を実証するアガロースゲルの画像である。左のレーンには正のコントロールを含有しており、NTP からの dsRNA 合成を実証している。真ん中のレーンには正のコントロールを含有しており、外来性 ATP をエネルギー供給源として用いて、ヌクレオチドキナーゼ発現ライセート中における NMP からの dsRNA 合成を実証している。右のレーンは、ヌクレオチドキナーゼおよび C. aerophila P p k 発現ライセートを用いた NMP および HMP からの dsRNA 合成を実証する反応を含有している。C. aerophila P P K 2 では、dsRNA 合成は AMP キナーゼおよび外来性 ADP の非存在下において進む。

40

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 3 9 】

本明細書は、いくつかの側面において、核酸（例えば、RNA または DNA）の無細胞的

50

生産（生合成）のための方法、組成物、細胞、構築物、およびシステムが提供される。いくつかの態様においては、生物の単一の型（例えば、細菌細胞の集団）が、少なくとも1つのヌクレアーゼ、少なくとも1つの耐熱性キナーゼ、および少なくとも1つの耐熱性ポリメラーゼ（例えば、RNAまたはDNAポリメラーゼ）を発現するように改変され得る。改変細胞は酵素発現をもたらす条件下において増殖させられる（培養される）。いくつかの態様において、改変細胞は所望の細胞密度まで増殖させられ得、それから、ある種の酵素の発現が誘導（活性化）され得る。それゆえに、ある種の酵素の転写は誘導型プロモーターのコントロール下にあり得る。それから、細胞（例えば、改変および/または未改変細胞）は溶解（例えば、機械的に、化学的に、または酵素的に破壊）されて、RNA（例えば、ssRNAまたはdsRNA）の無細胞的生産のために要求される酵素活性を含む細胞ライセートを生産する。いくつかの態様においては、多量体RNA（例えば、mRNA、tRNA、および/またはrRNA）を含有する細胞が、細胞溶解ステップに先立って、経路酵素を含有する改変細胞と混合される。他の態様においては、多量体RNAを含有する細胞から得られた細胞ライセート（単数または複数）が、経路酵素を含有する改変細胞から得られた細胞ライセート（単数または複数）と組み合わせられる（混合される）。また他の態様においては、1つ以上の精製された経路酵素が、改変細胞から得られた細胞ライセート（単数または複数）と組み合わせられる（混合される）。「経路酵素」は、関心のRNAを（例えば、多量体RNAから出発して）生合成するために要求される酵素である。

10

#### 【0040】

20

RNAを合成するためには、細胞ライセート（または細胞ライセート混合物）は、宿主由来の（内在性の）RNAの、所望の収量の5'-ヌクレオシドリン酸（NMPまたはヌクレオシドリン酸）への、ヌクレアーゼ媒介性（例えば、RNase媒介性）解重合をもたらす条件下でインキュベートされる。いくつかの態様において、細胞ライセート（または細胞ライセート混合物）はそれから加熱されて、ホスファターゼおよびヌクレアーゼ（例えばRNase）を包含する宿主由来の酵素と、宿主由来のRNAの解重合を促すために細胞ライセートに先に追加されたいずれかの外来性ヌクレアーゼ（単数または複数）との大部分を不活性化する。熱不活性化ステップ後に、細胞ライセートは、例えば耐熱性ポリリン酸キナーゼとエネルギー供給源としてのポリリン酸の追加とを用いて、耐熱性キナーゼ（例えば、耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼおよびヌクレオシドリン酸キナーゼ）によるNMPからNTP（ヌクレオシド三リン酸）へのリン酸化をもたらす条件下でインキュベートされる。その後、もたらされたNTPは、ライセート中に存在する（例えば、改変細胞によって発現され、細胞ライセートの細胞内コンポーネントとして包含されるか、または後で細胞ライセートに追加されるかどうかの）改変鋳型（例えばDNA鋳型）を用いて、RNAポリメラーゼ（例えば耐熱性RNAポリメラーゼ）によってRNAへと重合される。

30

#### 無細胞的生産

#### 【0041】

「無細胞的生産」は、生細胞を用いることのない生体分子または化学物質の合成のための生物学的プロセスの使用である。細胞は溶解され、両方が酵素を含有する未精製（クールド）部分または部分精製部分が、所望の産物の生産のために用いられる。いくつかの態様においては、精製された酵素が細胞ライセートに追加され得る。例として、細胞は培養され、収穫され、および高圧ホモジナイゼーションまたは他の細胞溶解方法（例えば化学的な細胞溶解）によって溶解される。無細胞的反応はバッチまたはフェドバッチモードで行われ得る。いくつかの場合には、酵素経路は反応器の有効体積を満たし、細胞内環境よりも希釈され得る。それでもやはり、膜結合している触媒を含む細胞内触媒の実質的に全てが提供される。内膜は細胞溶解の間に断片化され、それらの膜の断片は膜小胞を形成し得る。例えば、参照によって本明細書に組み込まれるSwartz, *AIChE Journal*, 2012, 58(1), 5-13参照。

40

#### 【0042】

50

本開示の無細胞的方法、組成物、およびシステムは、本明細書においてより詳細に論じられる細胞ライセート（例えば、クルードなまたは部分精製された細胞ライセート）を利用する。例えば機械的手段（例えば、剪断または粉碎）によって調製された細胞ライセートは、化学的に透過処理された細胞とは別物である。上で論じられているように、いくつかの態様においては、細胞溶解（例えば、機械的な細胞溶解）の間に、細胞内膜は断片化され、その結果、細胞ライセート中に反転膜小胞が形成される。かかる反転膜小胞は化学的な細胞透過処理方法によっては生産されない。溶解される細胞（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%）はもはや原形ではない。それゆえに、パーフォレーション（小さい穴）を含有する原形の細胞である透過処理された細胞は、溶解された細胞とは見なされない。

10

#### 【0043】

本明細書において提供される方法は一般的に無細胞的であり、細胞ライセートを用いるが、いくつかの態様において、少なくとも本方法のいくつかのステップについては透過処理された細胞を用いることが有利であり得る。それゆえに、本開示は、本RNA生産方法の少なくとも1つのステップへの透過処理された細胞の使用を除外しない。

#### 【0044】

本明細書に記載される態様の多くは特定の酵素を含む「培養細胞を溶解すること」に言及するが、この語句は、単一の培養物（例えば、RNAを合成するために必要とされる全ての酵素を含有する）から得られた細胞のクローン集団を溶解すること、ならびにそれぞれ異なる細胞培養物（例えば、それぞれが、RNAおよび/または多量体RNA基質を合成するために必要とされる1つ以上の酵素を含有する）から得られた、1よりも多くの細胞のクローン集団を溶解することを包含することが意図されているということが理解されるべきである。例えば、いくつかの態様においては、1つの耐熱性キナーゼを発現する細胞（例えば、改変細胞）の集団と一緒に培養され、1つの細胞ライセートを生産するために用いられ得、異なる耐熱性キナーゼを発現する細胞（例えば、改変細胞）の別の集団と一緒に培養され、別の細胞ライセートを生産するために用いられ得る。それから、それぞれ異なる耐熱性キナーゼを含むこれらの2つの細胞ライセートは、本開示のRNA生合成方法への使用のために組み合わせられ得る。

20

#### リボ核酸からヌクレオシドリン酸への解重合

#### 【0045】

本開示は、一連の酵素反応が関わる無細胞のプロセスによる、細胞ライセートを用いるバイオマスからのRNA（例えば、細胞の内在性RNA）から所望の合成RNAへの変換に基づく。第1に、宿主細胞に由来する細胞ライセート中に存在するRNA（例えば内在性RNA）がヌクレアーゼによってその成分モノマーに変換される。バイオマスからのRNA（例えば内在性RNA）は、典型的にはリボソームRNA（rRNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、他のRNA、またはその組み合わせを包含する。RNAの解重合または分解は、単純に「モノマー」ともまた言われる5'-ヌクレオシドリン酸（5'-NMP）のプールをもたらす。それらのモノマーは関心のRNAの下流の重合/合成のための出発材料として用いられ、それらはヌクレオシドニリン酸に変換され、これらはヌクレオシド三リン酸に変換される。いくつかの態様において、関心のRNAはssRNA（例えばmRNA）である。いくつかの態様において、関心のRNAはdsRNAである。

30

40

#### 【0046】

関心のRNAを合成するために要求されるRNA（例えば内在性RNA）の量は変わり得、例えば、関心のRNAの所望の長さおよび収量と、細胞（例えばE. coli細胞）のRNA（例えば内在性RNA）のヌクレオチド組成に対して相対的なRNAのヌクレオチド組成とに依存する。典型的には、細菌細胞では、例えばRNA（例えば内在性RNA）含量はトータルの細胞質量の5~50%の範囲である。出発材料の質量は例えば次の等式を用いて計算され得る： $(\text{RNAのキログラム(kg)} / \text{乾燥細胞重量のキログラム}) \times 100\%$ 。

50

## 【0047】

内在性RNAは化学的または酵素的手段によってその成分モノマーへと解重合または分解され得る。しかしながら、RNAの化学的加水分解は典型的には2'-および3'-NMPを生産し、これらはRNAへと重合され得ない。それゆえに、本明細書において提供される方法、組成物、およびシステムは、主として内在性RNAの解重合のために酵素を用いる。「RNAを解重合する酵素」は、RNA中の2つのヌクレオチド間のホスホジエステル結合の加水分解を触媒する。それゆえに、「RNAを解重合する酵素」は、RNA（多量体RNA）をそのモノマー状態のヌクレオシドリン酸（NMP）に変換する。酵素に依存して、RNAの酵素的解重合は3'-NMP、5'-NMP、または3'-NMPおよび5'-NMPの組み合わせを生み得る。3'-NTP（3'-NMPから変換される3'-NDPから変換される）を重合することは可能ではないので、5'-NMP（これらは、それから5'-NDPに、それから5'-NTPに変換される）を生む酵素（例えばRNase R）が好ましい。いくつかの態様において、3'-NMPを生む酵素は、RNA生産の効率を増大させるために改変細胞のゲノムDNAから除去される。いくつかの態様において、RNA解重合に用いられる酵素はRNase Rである。いくつかの態様において、用いられるRNase Rの濃度は0.1~1.0 mg/mL（例えば、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、または1.0 mg/mL）である。いくつかの態様において、用いられるRNase Rの濃度は0.4~0.6 mg/mLである。いくつかの態様において、用いられるRNase Rの濃度は0.5 mg/mLである。いくつかの態様において、用いられるRNase Rの濃度は1.0 mg/mLを超える。

## 【0048】

RNAを解重合する酵素の例は、限定なしに、リボヌクレアーゼ（RNase、例えばRNase R）を包含するヌクレアーゼ、およびホスホジエステラーゼを包含する。ヌクレアーゼは核酸からより小さいコンポーネント（例えば、ヌクレオシドリン酸ともまた言われるモノマー、またはオリゴヌクレオチド）への分解を触媒する。ホスホジエステラーゼはホスホジエステル結合の分解を触媒する。RNAを解重合するこれらの酵素は全長遺伝子または遺伝子融合体（例えば、2つの異なる酵素活性をコードする少なくとも2つの異なる遺伝子（または遺伝子の断片）を包含するDNA）によってコードされ得る。

## 【0049】

RNaseは細胞内においてRNA成熟およびターンオーバーを制御するために機能する。各RNaseは特異的な基質選好性を有するdsRNAまたはssRNA。それゆえに、いくつかの態様においては、一般的に、異なるRNaseの組み合わせまたは異なるヌクレアーゼの組み合わせがバイオマス由来の多量体RNA（例えば内在性RNA）を解重合するために用いられ得る。例えば、1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、または1~10個の異なるヌクレアーゼがRNAを解重合するために組み合わせで用いられ得る。いくつかの態様においては、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、または少なくとも10個の異なるヌクレアーゼがRNAを解重合するために組み合わせで用いられ得る。本明細書において提供される使用のためのヌクレアーゼの限定しない例が表1に包含されている。いくつかの態様において、用いられるヌクレアーゼはRNase Rである。

30

40

50

【表 1】

表1. リボ核酸を解重合する酵素

ヌクレアーゼ	宿主生物(単数または複数)	EC #	UniProt	参考文献
ヌクレアーゼ P1 (P1 ヌクレアーゼ)	<i>Penicillium citrum</i>	3.1.30.1	P24289	1, 2, 3
RNase II	<i>Escherichia coli</i>	3.1.13.1	P30850	4, 5
RNase III	<i>Escherichia coli</i>	3.1.26.3	P0A7Y0	6, 7, 8
RNase R	<i>Pseudomonas putida</i> or <i>Escherichia coli</i>	3.1.13.-	R9V9M9 P21499	9
RNase JI	<i>Bacillus subtilis</i>	3.1.4.1	Q45493	10, 11
NucA	<i>Serratia marcescens</i>	3.1.30.2	P13717	12, 13, 14
RNase T	<i>Escherichia coli</i>	3.1.27.3	P30014	15, 16, 17
RNase E	<i>Escherichia coli</i>	3.1.26.12	P21513	18, 19

10

## 【0050】

RNAを解重合する酵素(例えばRNase)は宿主細胞にとって内在性(宿主由来)であり得、またはそれらは宿主細胞内に外来的に導入された(例えば、エピソードベクター上の、または宿主細胞のゲノム中にインテグレーションされた)改変核酸によってコードされ得る。

20

## 【0051】

いくつかの態様において、RNAを解重合する酵素をコードする改変核酸は誘導型プロモーターに作動可能に連結される。それゆえに、いくつかの態様において、RNAを解重合する酵素をコードする改変核酸の発現は時間的または空間的に制御される。例えば、核酸は宿主細胞のペリプラズムに転置または隔離される酵素(例えばRNase)をコードするように改変され得、その結果、酵素の活性が細胞増殖または他の代謝プロセスに干渉しない。細胞溶解によって、転置された酵素はペリプラズムから遊離し、内在性RNAとの接触をし、RNAをモノマー形態に解重合する。例えば、参照によって本明細書に組み込まれる2011年11月10日公開の国際公開No. WO2011/140516参照。

## 【0052】

「RNAの解重合をもたらす条件」は当分野において公知である。または、当業者によって決定され得、例えば、pH、温度、時間の長さ、および細胞ライセートの塩濃度、ならびにいずれかの外来性補因子を包含するヌクレアーゼ(例えばRNase)活性の最適条件を考慮に入れる。例は、先に記載されているものを包含する(例えばWong, C.H. et al. J. Am. Chem. Soc., 105: 115-117, 1983)、EP1587947B1、Cheng ZF, Deutscher MP. J Biol Chem. 277:21624-21629, 2002参照)。

30

## 【0053】

いくつかの態様においては、金属イオン(例えばMg<sup>2+</sup>)が解重合反応から枯渇させられる。いくつかの態様において、金属イオン(例えばMg<sup>2+</sup>)の濃度は8mM以下(例えば、8mM未満、7mM未満、6mM未満、5mM未満、4mM未満、3mM未満、2mM未満、1mM未満、0.5mM未満)である。いくつかの態様において、金属イオン(例えばMg<sup>2+</sup>)の濃度は0.1mM - 8mM、0.1mM - 7mM、または0.1mM - 5mMである。

40

## 【0054】

RNA解重合反応の間の細胞ライセートのpHは3.0から8.0の値を有し得る。いくつかの態様において、細胞ライセートのpH値は3.0~8.0、4.0~8.0、5.0~8.0、6.0~8.0、7.0~8.0、3.0~7.0、4.0~7.0、5.0~7.0、6.0~7.0、3.0~6.0、4.0~6.0、5.0~6.0、3.0~5.0、3.0~4.0、または4.0~5.0である。いくつかの態様において、細胞ライセートのpH値は3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、

50

6.5、7.0、7.5、または8.0である。いくつかの態様において、細胞ライセートのpH値は7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、または7.5である。細胞ライセートのpH値は必要とされるように調整され得る。

【0055】

RNA解重合反応の間の細胞ライセートの温度は15 から70 であり得る。いくつかの態様において、RNA解重合反応の間の細胞ライセートの温度は15 ~ 60 、15 ~ 50 、15 ~ 40 、15 ~ 30 、25 ~ 70 、25 ~ 60 、25 ~ 50 、25 ~ 40 、30 ~ 70 、30 ~ 60 、または30 ~ 50 である。いくつかの態様において、RNA解重合反応の間の細胞ライセートの温度は37 である。いくつかの態様において、RNA解重合反応の間の細胞ライセートの温度は15 、25 、32 、37 、40 、42 、45 、50 、55 、56 、57 、58 、59 、60 、61 、62 、63 、64 、65 、66 、67 、68 、69 、または70 である。

10

【0056】

RNA解重合反応の間の細胞ライセートは5分(min)から72時間(hr)インキュベートされ得る。いくつかの態様において、RNA解重合反応の間の細胞ライセートは5 ~ 10 min、5 ~ 15 min、5 ~ 20 min、5 ~ 30 min、または5 min - 48 hrインキュベートされる。例えば、RNA解重合反応の間の細胞ライセートは5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、45 min、1 hr、2 hr、3 hr、4 hr、5 hr、6 hr、7 hr、8 hr、9 hr、10 hr、11 hr、12 hr、18 hr、24 hr、30 hr、36 hr、42時間、または48時間インキュベートされ得る。いくつかの態様において、RNA解重合反応の間の細胞ライセートは37 の温度で24時間インキュベートされる。いくつかの態様において、RNA解重合反応の間の細胞ライセートは37 の温度で5 ~ 10 minインキュベートされる。いくつかの態様において、RNA解重合反応の間の細胞ライセートは7.0のpHを有し、37 の温度で15分間インキュベートされる。いくつかの態様において、RNA解重合反応の間の細胞ライセートは、RNAから5' - NMPへの65%超の変換をもたらす条件下においてインキュベートされ得る。いくつかの態様において、RNAは(または少なくとも)50 mM/hr、100 mM/hr、または200 mM/hrの速度で5' - NMPに変換される。

20

30

【0057】

いくつかの態様においては、例えば酵素凝集を防ぐために、塩が細胞ライセートに追加される。例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、またはその組み合わせが細胞ライセートに追加され得る。RNA解重合反応の間の細胞ライセート中の塩の濃度は5 mMから1 Mであり得る。いくつかの態様において、RNA解重合反応の間の細胞ライセート中の塩の濃度は5 mM、10 mM、15 mM、20 mM、25 mM、50 mM、100 mM、150 mM、200 mM、250 mM、500 mM、750 mM、または1 Mである。いくつかの態様において、細胞ライセートは、40 ~ 60 mMリン酸カリウム、1 ~ 5 mM  $MnCl_2$ 、および/または10 ~ 50 mM  $MgCl_2$  (例えば、20 mM  $MgCl_2$ ) を包含する混合物を含む。

40

【0058】

いくつかの態様においては、例えば特定のpH値および/または塩濃度を達成するために、緩衝液が細胞ライセートに追加される。緩衝液の例は、限定なしに、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、MOPS緩衝液、HEPES緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、リンゴ酸緩衝液、MES緩衝液、ヒスチジン緩衝液、PIPES緩衝液、bis-tris緩衝液、およびエタノールアミン緩衝液を包含する。

【0059】

RNAの解重合は、5' - AMP、5' - UMP、5' - CMP、および5' - GMPを包含する5' - NMPの生産をもたらす。NMPは細胞ライセート中において比較的等モル量で存在し得、一方、RNAの解重合はNMPのいずれかの所定の比をもたらさない。

50

## 【 0 0 6 0 】

いくつかの態様においては、溶解によって、細胞内の内在性RNAの50～98%が5'-NMPに変換される(解重合される)。例えば、50～95%、50～90%、50～85%、50～80%、75～98%、75～95%、75～90%、75～85%、または75～80%RNAが5'-NMPに変換される(解重合される)。いくつかの態様においては、溶解によって、細胞内の内在性RNAの65～70%が5'-NMPに変換される(解重合される)。より低い収量もまた許容可能である。

無益回路の消去

## 【 0 0 6 1 】

内在性および/または外来性ヌクレアーゼによるバイオマス(例えば内在性RNA)からそのモノマー成分へのRNAの変換後に、典型的には、細胞ライセート中にはヌクレアーゼおよびホスファターゼを包含するいくつかの酵素が残っており、それらはRNA生合成に有害な効果を有し得る。例えば、*Escherichia coli*は数々のホスファターゼを有し、それらの多くはNTP、NDP、およびNMPを脱リン酸化する。RNA解重合後のNMPの脱リン酸化は、リン酸化されていないヌクレオシドの蓄積と使用可能なNMP基質の喪失とをもたらす、それゆえに合成RNA収量を低減する。RNA解重合後のNMP、NDP、またはNTPの脱リン酸化は無益エネルギー回路(合成RNAの低い収量を生じさせるエネルギー回路)をもたらす、その間にNMPはNDPおよびNTPへとリン酸化され、これらは翻ってそれらのNMPまたはヌクレオシド出発点へと再び脱リン酸化される。無益回路は単位エネルギー入力(例えば、ポリリン酸、ATP、または他の高エネルギーリン酸供給源)あたりのRNA産物の収量を低減する。いくつかの態様において、酵素活性はホストゲノムからの除去によって消去される。いくつかの態様において、酵素活性は熱不活性化によって消去される。いくつかの態様において、酵素活性はプロテアーゼ標的化によって消去される。いくつかの態様において、酵素活性は化学的阻害剤の使用によって消去される。前述のアプローチのいずれかの組み合わせもまた用いられ得る。

## 【 0 0 6 2 】

本明細書において提供されるRNAの生合成にとって有害な酵素は、宿主細胞を改変するプロセスの間に宿主細胞ゲノムから欠失させられ得る。ただし、酵素は宿主細胞(例えば、細菌細胞)生存および/または増殖にとって必須ではないものとする。酵素または酵素活性の欠失は、例えば宿主細胞ゲノム中の必須酵素をコードする遺伝子を欠失させるかまたは修飾することによって達成され得る。酵素は、酵素が宿主細胞の生存にとって必要である場合には「宿主細胞生存にとって必須」である。すなわち、宿主細胞が特定の酵素の発現および/または活性なしには生存し得ない場合には、その酵素は宿主細胞生存にとって必須と見なされる。類似に、酵素は、酵素が宿主細胞の増殖に必要な場合には「宿主細胞増殖にとって必須」である。すなわち、宿主細胞が特定の酵素の発現および/または活性なしには分裂および/または増殖し得ない場合には、その酵素は宿主細胞増殖にとって必須と見なされる。

## 【 0 0 6 3 】

RNAの生合成にとって有害な酵素が宿主細胞生存および/または増殖にとって必須である場合には、酵素をコードする遺伝子を欠失させるかまたは修飾することが可能ではなくあり得る。かかる場合に、酵素は熱不活性化され得る。「熱不活性化」は、細胞ライセートを、内在性のヌクレアーゼおよびホスファターゼを不活性化する(または少なくとも部分的に不活性化する)ために十分な温度に加熱するプロセスを言う。一般的に、熱不活性化のプロセスには有害な酵素の変性(アンフォールディング)が関わる。細胞の内在性蛋白質が変性する温度は生物間で変わる。*E. coli*においては、例えば、細胞の内在性酵素は一般的に41よりも上の温度で変性する。変性温度は他の生物では41よりも高くまたは低くあり得る。ここで提供される細胞ライセートの酵素は40～95の、またはより高い温度で熱不活性化され得る。いくつかの態様において、細胞ライセートの酵素は40～90、40～80、40～70、40～60、40～50、50～80、50～70、50～60、60～80、60～70、または70～80

10

20

30

40

50

の温度で熱不活性化され得る。例えば、細胞ライセートの酵素は40、42、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または95の温度で熱不活性化され得る。いくつかの態様において、細胞ライセートの酵素は50~80の温度で熱不活性化され得る。いくつかの態様において、細胞ライセートの酵素は70の温度で熱不活性化され得る。いくつかの態様において、細胞ライセートの酵素は60の温度で熱不活性化され得る。有害な酵素の化学的阻害剤を導入することもまた可能であり得る。かかる阻害剤はオルトパナジン酸ナトリウム（蛋白質ホスホチロシンホスファターゼの阻害剤）、フッ化ナトリウム（ホスホセリンおよびホスホトレオニンホスファターゼの阻害剤）、ピロリン酸ナトリウム（ホスファターゼ阻害剤）、リン酸ナトリウム、および/またはリン酸カリウムを包含し得るが、これに限定されない。

10

## 【0064】

細胞ライセートが内在性酵素の熱不活性化を達成するために上昇した温度でインキュベートされる時期は、例えば細胞ライセートの体積および細胞ライセートが調製された生物に依存して変わり得る。いくつかの態様において、細胞ライセートは35~80の温度で2分間（min）から48時間（hr）インキュベートされる。例えば、細胞ライセートは35~80の温度で2min、4min、5min、10min、15min、30min、45min、または1hrインキュベートされ得る。いくつかの態様において、細胞ライセートは35~80の温度で2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、24、36、42、または48hrインキュベートされる。

20

## 【0065】

いくつかの態様において、酵素は60~80の温度で10~20min熱不活性化される。いくつかの態様において、酵素は70の温度で15min熱不活性化される。

## 【0066】

いくつかの態様において、内在性RNAを解重合する酵素は、酵素を熱に対してより感受性にする1つ以上の修飾（例えば変異）を含む。それらの酵素は「熱感受性酵素」と言われる。熱感受性酵素はそれらの野生型カウンターパートのものよりも低い温度で変性し不活性化されるようになり、および/または熱感受性酵素の活性を低減するために要求される時期はそれらの野生型カウンターパートのものよりも短い。

## 【0067】

熱不活性化される酵素はいくつかの場合には何らかの程度の活性を保持し得るということが理解されるべきである。例えば、熱不活性化された酵素の活性レベルは熱不活性化されていない同じ酵素の活性レベルの50%未満であり得る。いくつかの態様において、熱不活性化された酵素の活性レベルは熱不活性化されていない同じ酵素の活性レベルの40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、1%未満、または0.1%未満である。

30

## 【0068】

それゆえに、酵素の活性は完全に消去または低減され得る。酵素は、酵素の変性した（熱不活性化された）形態がその自然状態の形態の酵素によって触媒される反応をほぼ触媒しない場合に、完全に不活性と見なされる。熱不活性化された変性した酵素は、熱不活性化された酵素の活性が（例えば、その自然状態の環境において）加熱されない酵素の活性に対して相対的に少なくとも50%低減されるときに、「不活性化された」と見なされる。いくつかの態様において、熱不活性化された酵素の活性は、加熱されない酵素の活性に対して相対的に50~100%低減される。例えば、熱不活性化された酵素の活性は、加熱されない酵素の活性に対して相対的に50~90%、50~85%、50~80%、50~75%、50~70%、50~65%、50~60%、または50~55%低減される。いくつかの態様において、熱不活性化された酵素の活性は、加熱されない酵素の活性に対して相対的に25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%低減される。

40

50

【 0 0 6 9 】

熱不活性化されるかまたは宿主細胞のゲノムから欠失させられ得る酵素の例は、限定なしに、ヌクレアーゼ（例えば、RNase III、RNase I、RNase R、PNPase、RNase II、およびRNase T）、ホスファターゼ（例えば、ヌクレオシドモノホスファターゼ、ヌクレオシドジホスファターゼ、ヌクレオシドトリホスファターゼ）、ならびにRNAを解重合またはヌクレオチドを脱リン酸化する他の酵素を包含する。RNAを解重合する酵素は、RNA分子を切断、部分的に加水分解、または完全に加水分解することができるいずれかの酵素を包含する。表2は、熱不活性化されるかまたはいくつかの場合には改変宿主細胞から欠失させられ得る、ヌクレアーゼの限定しない例のリストを提供している。表3は、熱不活性化されるかまたはいくつかの場合には改変宿主細胞から欠失させられ得る、ホスファターゼの限定しない例のリストを提供している。これらおよび他のヌクレアーゼおよびホスファターゼの熱不活性化は本開示によって包含される。

【表2】

表2. ヌクレアーゼの例

ヌクレアーゼ	遺伝子	機能	EC #	Uniprot	参考文献
RNase III	<i>rnc</i>	dsRNA、rRNA、およびいくつかのmRNAを切断する	3.1.26.3	P0A7Y0	6, 7, 8
RNase I	<i>rna</i>	一般的なリボヌクレアーゼ。幅広い基質特異性。ペリプラズムに局在する。	3.1.27.6	P21338	20
RNase R	<i>rnr</i>	いくつかのdsRNA、ポリA mRNA、mRNA、およびrRNAを切断する。	3.1.13.-	P21499	4, 21
PNPase	<i>pnp</i>	一般的なmRNA分解、tRNA成熟化および分解。	3.1.13.1	P05055	22, 23, 24
RNase II	<i>rnb</i>	エキソヌクレアーゼ。tRNAプロセッシングにおいて役割を果たす。	3.1.13.1	P30850	4, 5
RNase T	<i>rnt</i>	tRNA、rRNA、および他の安定なRNAのプロセッシング。ssDNAおよびssRNAを分解する能力がある。	3.1.13.-	P30014	15, 16, 17
RNase E	<i>rne</i>	rRNA、tRNA、および他のRNAをプロセッシングする。「デグラドソーム」と結合する。	3.1.26.12	P21513	18, 19

【表3】

表3. ホスファターゼの例.

ホスファターゼの分類	宿主	EC #	例	Uniprot	参考文献
NMP/NDP ホスファターゼ	<i>E. coli</i>	3.1.3.5 3.6.1.6	AphA	P0AE22	25, 26
			PhoA	P00634	27, 28
			UmpG	P0A840	29
			YrfG	P64636	30
			UshA	P07024	31, 32
			UmpH	P0AF24	33
NTP ホスファターゼ	<i>E. coli</i>	3.6.1.15	AppA RavA	P07102 P31473	34, 35 36
NTP ホスホヒドロラーゼ	<i>E. coli</i>	3.6.1.19	YhdE MazG	P25536 P0AEY3	37 38

【 0 0 7 0 】

*E. coli* RNase IIIはdsRNAおよびいくつかの一本鎖mRNA分子を選好的に切断する。細胞ライセート中のRNase IIIの存在は、高濃度の合成RNA（例えばdsRNA）の蓄積を限定し得る。なぜなら合成RNAが難なく切断されるからである。RNase IIIもRNase IIをコードする遺伝子*rnc*も細胞生存能にと

って必須ではない。それゆえに、いくつかの態様においては、*rnc* が改変宿主細胞において欠失または変異させられる。他の態様においては、*RNase III* が内在性RNAの解重合後に熱不活性化される。

【0071】

*E. coli RNase I* は、原形の細胞内のペリプラズム空間に局在し、*rRNA*、*mRNA*、および*tRNA*を包含する広範囲のRNA分子の解重合を触媒する。生理条件下においては、この酵素のペリプラズム局在は、酵素が細胞内のRNA安定性にはほとんど影響を有さないということを意味する；しかしながら、細胞ライセート中のペリプラズムおよび細胞質の混合は、細胞内RNAへの*RNase I*のアクセスを許可する。細胞ライセート中の*RNase I*の存在はRNA分解によって合成RNAの収量を低減し得る。  
*RNase I*も*RNase I*をコードする遺伝子*rna*も細胞生存能にとって必須ではない。それゆえに、いくつかの態様においては、*rna*が改変宿主細胞において欠失または変異させられる。他の態様においては、*RNase I*が内在性RNAの解重合後に熱不活性化される。

10

【0072】

*E. coli RNase R*および*RNase T*は*dsRNA*、*rRNA*、*tRNA*、および*mRNA*、ならびに小さい無構造RNA分子の解重合を触媒する。酵素もそれぞれ酵素をコードする遺伝子*rnr*および*rnt*も細胞生存能にとって必須ではない。それゆえに、いくつかの態様においては、*rnr*および/または*rnt*が改変宿主細胞（例えば*E. coli*宿主細胞）において欠失または変異させられる。他の態様においては、*RNase R*および/または*RNase T*が内在性RNAの解重合後に熱不活性化される。

20

【0073】

*E. coli RNase E*および*PNPase*はデグラドソームのコンポーネントであり、これは細胞内の*mRNA*ターンオーバーを担う。*RNase E*は、*PNPase*および*RNase III*と一緒に機能して細胞内*mRNA*プールをターンオーバーさせると考えられている。*RNase E*をコードする遺伝子*rne*の破壊は*E. coli*においては致死性である。それゆえに、いくつかの態様においては、*RNase E*が内在性RNAの解重合後に熱不活性化される。*PNPase*も*PNPase*をコードする遺伝子*pnp*も細胞生存能にとって必須ではない。それゆえに、いくつかの態様においては、*pnp*が改変宿主細胞（例えば*E. coli*宿主細胞）において欠失または変異させられる。他の態様においては、*PNPase*が内在性RNAの解重合後に熱不活性化される。

30

【0074】

*E. coli RNase II*は*mRNA*および*tRNA*両方を3' -> 5'方向に解重合する。*RNase II*も*RNase II*をコードする遺伝子*rnb*も細胞生存能にとって必須ではない。それゆえに、いくつかの態様においては、*rnb*が改変宿主細胞において欠失または変異させられる。他の態様においては、*RNase II*が内在性RNAの解重合後に熱不活性化される。

【0075】

*pnp*も*rnb*も宿主細胞生存にとって必須ではなく、一方で、同時に両方の破壊は致死性であり得る。それゆえに、いくつかの態様においては、*PNPase*および*RNase II*両方が熱不活性化される。

40

ヌクレオシドリン酸からヌクレオシド三リン酸へのリン酸化

【0076】

内在性RNAからそのモノマー状態への変換後に、および内在性ヌクレアーゼおよびホスファターゼの熱不活性化後に、細胞ライセート中のもたらされたヌクレオシドリン酸（*NMP*）はリン酸化された後に、重合させられて、所望の合成RNA、例えば二本鎖RNAまたは一本鎖RNA（例えば、*mRNA*またはアンチセンスRNA）を形成する。このプロセスは高度にエネルギー依存的であり、それゆえにこのプロセスはエネルギー供給源を要求する。典型的には、リン酸は、例えばホスホエノールピルビン酸、*ATP*、またはポリリン酸などの高エネルギーリン酸供給源から供与される。

50

## 【 0 0 7 7 】

いくつかの態様において、エネルギー供給源は細胞ライセートに直接的に追加される A T P である。他の態様において、エネルギー供給源は A T P 再生系を用いて提供される。例えば、ポリリン酸およびポリリン酸キナーゼが A T P を生産するために用いられ得る。他の例は、A T P を生産するためのアセチルリン酸および酢酸キナーゼ；A T P を生産するためのクレアチンリン酸およびクレアチンキナーゼ；ならびに A T P を生産するためのホスホエノールピルビン酸およびピルビン酸キナーゼの使用を包含した。他の A T P (または他のエネルギー) 再生系が用いられ得る。いくつかの態様においては、エネルギー供給源の少なくとも 1 つのコンポーネントが細胞ライセートまたは細胞ライセート混合物に追加される。エネルギー供給源の「コンポーネント」は、エネルギー (例えば A T P) を生産するために要求される基質 (単数または複数) および酵素 (単数または複数) を包含する。それらのコンポーネントの限定しない例は、ポリリン酸、ポリリン酸キナーゼ、アセチルリン酸、酢酸キナーゼ、クレアチンリン酸、クレアチンキナーゼ、ホスホエノールピルビン酸、およびピルビン酸キナーゼを包含する。

10

## 【 0 0 7 8 】

キナーゼは、A T P などの高エネルギーリン酸供与分子から特異的な基質 / 分子へのリン酸基の転移を触媒する酵素である。このプロセスはリン酸化と言われ、ここでは基質はリン酸基を獲得し、高エネルギー A T P 分子はリン酸基を供与する。このエステル交換はリン酸化された基質と A D P とを生産する。いくつかの態様において、本開示のキナーゼは、N M P を N D P に、N D P を N T P に変換する。

20

## 【 0 0 7 9 】

いくつかの態様において、キナーゼはヌクレオシドリン酸キナーゼであり、これが A T P から N M P への高エネルギーリン酸の転移を触媒し、A D P および N D P をもたらす。ヌクレオシドリン酸キナーゼの限定しない例が表 4 および 5 に提供されている。下で論じられているように、表 4 および 5 に列記されている酵素の耐熱性バリエーションは本開示に包含される。いくつかの態様において、細胞ライセートは次の 4 つのヌクレオシドリン酸キナーゼの 1 つ以上 (または全て) を含む：耐熱性ウリジル酸キナーゼ、耐熱性シチジル酸キナーゼ、耐熱性グアニル酸キナーゼ、および耐熱性アデニル酸キナーゼ。いくつかの態様において、U M P キナーゼは *Pyrococcus furiosus* から得られる (例えば、配列番号 3、または配列番号 3 によって同定されるアミノ酸配列と少なくとも 70 % 同一であるアミノ酸配列を含むバリエーション)。いくつかの態様において、C M P キナーゼは *Thermus thermophilus* から得られる (例えば、配列番号 4、または配列番号 4 によって同定されるアミノ酸配列と少なくとも 70 % 同一であるアミノ酸配列を含むバリエーション)。いくつかの態様において、G M P キナーゼは *Thermotoga maritima* から得られる (例えば、配列番号 5、または配列番号 5 によって同定されるアミノ酸配列と少なくとも 70 % 同一であるアミノ酸配列を含むバリエーション)。いくつかの態様において、A M P キナーゼは *Thermus thermophilus* から得られる (例えば、配列番号 6、または配列番号 6 によって同定されるアミノ酸配列と少なくとも 70 % 同一であるアミノ酸配列を含むバリエーション)。

30

## 【 0 0 8 0 】

それゆえに、いくつかの態様において、N M P キナーゼは、配列番号 3 ~ 6 のいずれか 1 つのアミノ酸配列によって同定されるアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、N M P キナーゼは、配列番号 3 ~ 6 のいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 70 % 同一であるアミノ酸配列を有する。例えば、N M P キナーゼは、配列番号 3 ~ 6 のいずれか 1 つによって同定されるアミノ酸配列と少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を有し得る。

40

## 【 0 0 8 1 】

本開示は、本明細書に記載される酵素および酵素のバリエーション (例えば「P P K 2 バリエーション」) のいずれか 1 つ以上の使用を包含するということが理解されるべきである。バリエーション酵素は参照酵素に対してある種の程度の配列同一性を共有し得る。用語「同一性」

50

は、2つ以上のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの配列間の関係性を言い、配列同士を比較することによって決定される。同一性は、2つ以上の配列のより小さいもの間における同一のマッチのパーセントを測定し、ギャップアラインメント（いずれかがある場合）が特定の数理モデルまたはコンピュータプログラム（例えば「アルゴリズム」）によって取り扱われる。近縁分子同士の同一性は公知の方法によって難なく計算され得る。アミノ酸または核酸配列に適用される「パーセント（%）同一性」は、最大のパーセント同一性を達成するように配列同士をアラインメントし、必要な場合にはギャップを導入した後に、第2の配列のアミノ酸配列または核酸配列中の残基と同一である候補アミノ酸または核酸配列中の残基（アミノ酸残基または核酸残基）のパーセンテージとして定められる。同一性はパーセント同一性の計算に依存するが、計算時に導入されるギャップおよびペナルティーが原因で値が異なり得る。特定の配列のバリエーションはその特定の参照配列に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、しかし100%未満の配列同一性を有し得、本明細書に記載され当業者に公知の配列アラインメントプログラムおよびパラメータによって決定される。

#### 【0082】

2つの配列間における配列の比較およびパーセント同一性の決定は、数理アルゴリズムを用いて成し遂げられ得る。同一性を決定するための技術は公に利用可能なコンピュータプログラムにコード化されている。2つの配列間の相同性を決定するための例示的なコンピュータソフトウェアは、GCGプログラムパッケージ（Devereux, J. et al. Nucleic Acids Research, 12(1): 387, 1984）、BLASTスイート（Altschul, S. F. et al. Nucleic Acids Res. 25: 3389, 1997）、およびFASTA（Altschul, S. F. et al. J. Mol. Biol. 215: 403, 1990）を包含するが、これに限定されない。他の技術は：Smith-Watermanアルゴリズム（Smith, T.F. et al. J. Mol. Biol. 147: 195, 1981；Needleman-Wunschアルゴリズム（Needleman, S.B. et al. J. Mol. Biol. 48: 443, 1970；およびFast Optimal Global Sequence Alignmentアルゴリズム（FOGSA）（Chakraborty, A. et al. Sci Rep.3 : 1746, 2013）を包含する。

#### 【表4】

表4. ヌクレオシド二リン酸キナーゼの例

酵素名	宿主生物	EC #	反応	Uniprot	参考文献
PyrH	<i>E. coli</i>	2.7.4.22	UMP + ATP → UDP + ADP	P0A7E9	39, 40
	<i>T. thermophilus</i>			P43891	41
	<i>P. furiosus</i>			Q8U122	42, 43
Cmk	<i>E. coli</i>	2.7.4.25	CMP + ATP → CDP + ADP	P0A6I0	44, 45
	<i>T. thermophilus</i>			Q5SL35	41
	<i>P. furiosus</i>			Q8U2L4	46
Gmk	<i>E. coli</i>	2.7.4.8	GMP + ATP → GDP + ADP	P60546	47, 48
	<i>T. thermophilus</i>			Q5SI18	41
	<i>T. maritima</i>			Q9X215	49
Adk	<i>E. coli</i>	2.7.4.3	AMP + ATP → 2 ADP	P69441	50, 51
	<i>T. thermophilus</i>			Q72I25	52, 53
	<i>P. furiosus</i>			Q8U207	46

#### 【0083】

いくつかの態様において、キナーゼはヌクレオシド二リン酸キナーゼであり、これはホスホリル基をNDPに転移させ、NTPをもたらす。ホスホリル基のドナーは、限定なしに、ATP、ポリリン酸ポリマー、またはホスホエノールピルビン酸であり得る。NDPをNTPに変換するキナーゼの限定しない例は、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、ポリリン酸キナーゼ、およびピルビン酸キナーゼを包含する。下で論じられているように、前述の酵素の耐熱性バリエーションは本開示に包含される。いくつかの態様において、NDPキナー

ゼ（単数または複数）はAquifex aeolicusから得られる（例えば、配列番号9、または配列番号9によって同定されるアミノ酸配列と少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を含むバリエーション）。いくつかの態様において、NDPキナーゼは配列番号9によって同定されるアミノ酸配列と少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を有する。例えば、NDPキナーゼは、配列番号9によって同定されるアミノ酸配列と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有し得る。

#### 【0084】

いくつかの態様において、NMPからNTPへのリン酸化はポリリン酸依存性キナーゼ経路によって生じ（図2Aおよび2B）、ここでは、高エネルギーリン酸がポリリン酸キナーゼ（PPK）によってポリリン酸からADPに転移させられる。いくつかの態様において、ポリリン酸キナーゼはポリリン酸キナーゼ1（PPK1）ファミリーに属し、これは高エネルギーリン酸をポリリン酸からADPに転移させてATPを形成する。このATPはその後NMPキナーゼ（例えば、AMPキナーゼ、UMPキナーゼ、GMPキナーゼ、およびCMPキナーゼ）によって用いられて、NMPをそれらの対応するリボヌクレオチド二リン酸（NDP）に変換する。さらにその上、その後、ATPはNDPをNTPに変換するためにヌクレオチド二リン酸キナーゼによって用いられる。例えば、例示的な酵素については表5および6参照。

#### 【0085】

いくつかの態様において、ポリリン酸キナーゼはポリリン酸キナーゼ2（PPK2）ファミリーに属する。いくつかの態様において、ポリリン酸キナーゼはクラスI PPK2ファミリーに属し、これは高エネルギーリン酸をポリリン酸からNDPに転移させてNTPを形成する。システムによって生産されたATPはNMPをNDPに変換するための高エネルギーリン酸ドナーとして用いられる。いくつかの態様において、ポリリン酸キナーゼはクラスII PPK2ファミリーに属し、これは高エネルギーリン酸をポリリン酸からNMPおよびNDPに転移させてNTPを形成する。いくつかの態様において、クラスII PPK2はNMPからNTPを生産するために単独で用いられる。他の態様において、クラスII PPK2は他のキナーゼとの組み合わせで用いられる。クラスII PPK2はADP、AMP、およびポリリン酸からATPを生産し、これはその後NMPをNTPに変換するためにNMPおよびNDPキナーゼによって用いられる。

#### 【0086】

本明細書において提供される使用のためのPPK2酵素の限定しない例が、表6に列記されている（配列番号8～18）。それゆえに、いくつかの態様において、PPK2酵素は耐熱性である。例えば、PPK2酵素は耐熱性クラスII PPK2酵素であり得、これらはポリリン酸重合よりもATP合成を好む、ADPおよびAMP両方をATPに変換する。いくつかの態様において、PPK2酵素は、例えば時間あたり10から800mMの範囲である速度（例えば、時間あたり10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、または800mM）で、ヘキサメタリン酸などのポリリン酸をATPに変換するために用いられる。

#### 【0087】

いくつかの態様において、本開示のRNA生合成方法は、配列番号8～18のいずれか1つによって同定されるアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含むPPK2酵素を利用する。いくつかの態様において、PPK2酵素は配列番号8～18のいずれか1つによって同定されるアミノ酸配列と少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を含む。例えば、PPK2酵素は、配列番号8～18のいずれか1つによって同定されるアミノ酸配列と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含み得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 8 】

本開示は融合酵素をもまた包含する。融合酵素は複数の活性を発揮し得、それぞれが異なる酵素の活性に対応する。例えば、独立のヌクレオシドリン酸キナーゼおよび独立のヌクレオシドニリン酸キナーゼを用いるよりもむしろ、ヌクレオシドリン酸キナーゼ活性およびヌクレオシドニリン酸キナーゼ活性両方を有する融合酵素（またはいずれかの他の酵素）が用いられ得る。

## 【表 5】

表5. 経路酵素の例

酵素 #	酵素名	EC #	生物	Uniprot #	配列番号
1	RNase R	3.1.13.-	<i>Escherichia coli</i>	P21499	配列番号 1
2	PPK1	2.7.4.1	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	Q8DMA8	配列番号 2
3	UMP キナーゼ	2.7.4.22	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Q8U122	配列番号 3
4	CMP キナーゼ	2.7.4.25	<i>Thermus thermophilus</i>	Q5SL35	配列番号 4
5	GMPキナーゼ	2.7.4.8	<i>Thermatoga maritima</i>	Q9X215	配列番号 5
6	AMP キナーゼ	2.7.4.3	<i>Thermus thermophilus</i>	Q72I25	配列番号 6
7	NDP キナーゼ	2.7.4.6	<i>Aquifex aeolicus</i>	O67528	配列番号 7
8	RNA ポリメラーゼ				

10

20

## 【表 6】

表6. PPK2 酵素の例

生物	アクセッション#	配列番号
<i>Meiothermus ruber</i> DSM 1279	ADD29239.1	配列番号 8
<i>Meiothermus silvanus</i> DSM 9946	WP_013159015.1	配列番号 9
<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300	WP_011531362.1	配列番号 10
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	NP_682498.1	配列番号 11
<i>Anaerolinea thermophila</i> UNI-1	WP_013558940	配列番号 12
<i>Caldilinea aerophila</i> DSM 14535	WP_014433181	配列番号 13
<i>Chlorobaculum tepidum</i> TLS	NP_661973.1	配列番号 14
<i>Oceanithermus profundus</i> DSM 14977	WP_013458618	配列番号 15
<i>Roseiflexus castenholzii</i> DSM 13941	WP_012120763	配列番号 16
<i>Roseiflexus</i> sp. RS-1	WP_011956376	配列番号 17
<i>Truepera radiovictrix</i> DSM 17093	WP_013178933	配列番号 18

30

ヌクレオシド三リン酸からリボ核酸への重合

40

## 【 0 0 8 9 】

関心の RNA の生合成の最後のステップは NTP から RNA（例えば、dsRNA または ssRNA）最終産物への重合であり、例えば DNA 依存性 RNA ポリメラーゼを用いる。プロセスのこのステップにおいては、関心の RNA をコードするように設計された DNA が関心の RNA の合成のための鋳型としての用をなす。いくつかの場合には、DNA 鋳型は関心の RNA の転写を選択的に駆動する転写プロモーターを有するように改変され得る。例の DNA 鋳型が図 3 A に示されている。DNA 鋳型は 3 つの RNA ドメインをコードする：センスドメイン（ドメイン 1）、柔軟なヒンジドメイン（ドメイン 2）、およびセンスドメインに対して相補的なドメイン（アンチセンスドメイン 3）。DNA 鋳型の転写後に、アンチセンスドメインはセンスドメインに結合して（ハイブリダイゼーションし

50

て)、二本鎖RNAヘアピンステムドメインおよび隣接するヘアピンループドメインを形成する。DNA鋳型の他の例が図3B~3Eに示されている。図3BのDNA鋳型は相補鎖同士の上にコンバージェントなプロモーター配列同士を含有する。各鋳型鎖から転写されたRNA配列同士は転写後にアニーリングする。プラスミドの一部としてコードされた図3CのDNA鋳型は、相補鎖同士の上のコンバージェントなプロモーター配列同士と、リードスルー転写を最小化するための1つ以上のターミネーター配列とを含有する。プラスミドの一部としてコードされた図3DのDNA鋳型は、相補配列同士の転写を駆動する独立のプロモーター-ターミネーターカセットを含有し、これらは転写後にアニーリングする。図3EのDNA鋳型は単一のRNAドメインをコードする。DNA依存性RNAポリメラーゼおよびRNA依存性RNAポリメラーゼ両方の使用が二本鎖RNA最終産物を生産する。

10

#### 【0090】

RNAの重合は、NTP、転写プロモーターを含むDNA鋳型、および転写プロモーターに特異的なポリメラーゼ(RNAポリメラーゼ)を要求する。典型的には、本明細書において提供される使用のためのポリメラーゼは単一サブユニットポリメラーゼであり、その対応する転写プロモーターに対して高度に選択的であり、高い正確性を有し、高度に効率的である。ポリメラーゼの例は、限定なしに、T7 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、およびSP6 RNAポリメラーゼを包含する。バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼはDNA依存性RNAポリメラーゼであり、これは高度にT7ファージプロモーターに特異的である。99KD酵素はT7プロモーターのコントロール下のクローニングされたDNA配列からのインビトロRNA合成を触媒する。バクテリオファージT3 RNAポリメラーゼはDNA依存性RNAポリメラーゼであり、これは高度にT3ファージプロモーターに特異的である。99KD酵素はT3プロモーター下のクローニングされたDNA配列からのインビトロRNA合成を触媒する。バクテリオファージSP6 RNAポリメラーゼはDNA依存性RNAポリメラーゼであり、これは高度にSP6ファージプロモーターに特異的である。98.5KDポリメラーゼはSP6プロモーター下のクローニングされたDNA鋳型からのインビトロRNA合成を触媒する。T7、T3、およびSP6ポリメラーゼのそれぞれは37~40で最適活性である。いくつかの態様においては、T7、T3、およびSP6ポリメラーゼの耐熱性バリエーションが用いられる。耐熱性バリエーションポリメラーゼは典型的には40よりも上の温度(または約50~60)で最適活性である。

20

30

#### 【0091】

「ヌクレオシド三リン酸の生産およびヌクレオシド三リン酸の重合をもたらす条件」は、「RNAの生合成のための条件」ともまた言われる。これは当業者によって決定され得、例えば、pH、温度、時間の長さ、および細胞ライセートの塩濃度、ならびにいずれかの外来性の補因子を包含するポリメラーゼ活性の最適条件を考慮に入れる。

#### 【0092】

RNAの生合成の間の細胞ライセートのpHは3.0から8.0の値を有し得る。いくつかの態様において、細胞ライセートのpH値は3.0~8.0、4.0~8.0、5.0~8.0、6.0~8.0、7.0~8.0、3.0~7.0、4.0~7.0、5.0~7.0、6.0~7.0、3.0~6.0、4.0~6.0、5.0~6.0、3.0~5.0、3.0~4.0、または4.0~5.0である。いくつかの態様において、細胞ライセートのpH値は3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、または8.0である。いくつかの態様において、RNAの生合成の間の細胞ライセートのpH値は7.0である。

40

#### 【0093】

RNAの生合成の間の細胞ライセートの温度は15から70であり得る。いくつかの態様において、RNAの生合成の間の細胞ライセートの温度は15~60、15~50、15~40、15~30、25~70、25~60、25~50、25~40、30~70、30~60、30~50、40~70、40~60、4

50

0 ~ 50、50 ~ 70、または50 ~ 60 である。いくつかの態様において、RNAの生合成の間の細胞ライセートの温度は15、25、32、37、42、45、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、または70 である。いくつかの態様において、RNAの生合成の間の細胞ライセートの温度は50 である。

【0094】

RNAの生合成の間の細胞ライセートは15分(min)から72時間(hr)インキュベートされ得る。いくつかの態様において、RNAの生合成の間の細胞ライセートは30min ~ 48hrインキュベートされる。例えば、RNAの生合成の間の細胞ライセートは30min、45min、1hr、2hr、3hr、4hr、5hr、6hr、7hr、8hr、9hr、10hr、11hr、12hr、18hr、24hr、30hr、36hr、42時間、または48時間インキュベートされ得る。いくつかの態様において、RNAの生合成の間の細胞ライセートは3時間インキュベートされる。いくつかの態様において、RNAの生合成の間の細胞ライセートは37 の温度で24時間インキュベートされる。

10

【0095】

いくつかの態様において、RNAの生合成の間の細胞ライセートは7.0のpHにおいて50 の温度で2 ~ 4時間インキュベートされる。

【0096】

いくつかのポリメラーゼ活性は金属イオンの存在を要求し得る。それゆえに、いくつかの態様においては、金属イオンが細胞ライセートに追加される。金属イオンの限定しない例はMg<sup>2+</sup>、Li<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、およびMn<sup>2+</sup>を包含する。他の金属イオンが用いられてもよい。いくつかの態様においては、1つよりも多くの金属イオンが用いられ得る。細胞ライセート中の金属イオンの濃度は0.1mMから100mM、または10mMから50mMであり得る。いくつかの態様において、細胞ライセート中の金属イオンの濃度は0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、45.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、または100.0mMである。

20

30

【0097】

いくつかの態様においては、例えば酵素凝集を防ぐために、塩が細胞ライセートに追加される。例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、またはその組み合わせが細胞ライセートに追加され得る。RNA解重合反応の間の細胞ライセート中の塩の濃度は5mMから1Mであり得る。いくつかの態様において、RNA解重合反応の間の細胞ライセート中の塩の濃度は5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、50mM、100mM、150mM、200mM、250mM、500mM、750mM、または1Mである。

耐熱性酵素

【0098】

本開示の無細胞的RNA生合成方法の1つの利点は、内在性RNAを合成二本鎖RNAに変換するために必要とされる酵素の全てが例えば単一の改変細胞内で発現され得る(ただし、そうである必要はない)ということである。例えば、改変細胞のクローン系集団が所望の細胞密度まで培養され、細胞は溶解され、内在性RNAからそのモノマー形態への解重合をもたらす条件下において(例えば、30 ~ 37 の温度で)インキュベートされ、内在性のヌクレアーゼおよびホスファターゼを不活性化するために十分な温度(例えば40 ~ 90 )に付され、RNA(例えば、dsRNAまたはssRNA)の重合をもたらす条件下においてインキュベートされる(例えば30 ~ 50 )。最終産物の合成RNAまで進むためには、NMPからNDP(例えば、ヌクレオシドリン酸キナーゼおよび/またはポリリン酸キナーゼ)、NDPからNTP(例えば、ヌクレオシド二リン酸キナー

40

50

ゼおよび/またはポリリン酸キナーゼ)、およびNTPからRNA(例えばポリメラーゼ)への変換に要求される酵素は、内在性ヌクレアーゼ(および/または外来性ヌクレアーゼ)およびホスファターゼの熱不活性化の間の変性を避けるために耐熱性であるべきである。耐熱性は、酵素が比較的高温での変性に堪える品質を言う。例えば、酵素が42の温度で変性(不活性化)される場合には、類似の活性(例えばキナーゼ活性)を有する酵素は、それが42で変性しない場合には「耐熱性」と見なされる。

【0099】

酵素(例えば、キナーゼまたはポリメラーゼ)は、酵素が(a)他の自然状態の酵素を変性させる高温への一時的暴露後に活性を保持するか、または(b)自然状態の酵素が低い速度で機能する中間温度から高温への一時的暴露後に高い速度で機能する場合に、耐熱性と見なされる。

10

【0100】

いくつかの態様において、耐熱性酵素は、さもなければ類似の(非耐熱性の)自然状態の酵素を変性させるであろう比較的高温(例えば、E. coliから得られるキナーゼの41よりも高く、多くのRNAポリメラーゼの37よりも高い)への一時的暴露後に、50%超の活性を保持する。いくつかの態様において、耐熱性酵素は、さもなければ類似の(非耐熱性の)自然状態の酵素を変性させるであろう比較的高温への一時的暴露後に、50~100%の活性を保持する。例えば、耐熱性酵素は、さもなければ類似の(非耐熱性の)自然状態の酵素を変性させるであろう比較的高温への一時的暴露後に、50~90%、50~85%、50~80%、50~75%、50~70%、50~65%、50~60%、または50~55%の活性を保持し得る。いくつかの態様において、耐熱性酵素は、さもなければ類似の(非耐熱性の)自然状態の酵素を変性させるであろう比較的高温への一時的暴露後に、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%の活性を保持する。

20

【0101】

いくつかの態様において、中間温度から高温(例えば42~80)への一時的暴露後の耐熱性酵素の活性は、類似の(非耐熱性の)自然状態の酵素の活性を超える(例えば、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%を超える)。

30

【0102】

例えば、耐熱性キナーゼの活性は、キナーゼがリン酸化することができるNMPまたはNDPの量によって測定され得る。それゆえに、いくつかの態様において、耐熱性キナーゼは、37で類似の変換を完了するために要求される同じ量の時間で、比較的高温(例えば42)でNMPの50%超をNDPに、またはNDPの50%超をNTPに変換する。いくつかの態様において、耐熱性キナーゼは、37で類似の変換を完了するために要求される同じ量の時間で、比較的高温(例えば42)でNMPの60%超をNDPに、またはNDPの60%超をNTPに変換する。いくつかの態様において、耐熱性キナーゼは、37で類似の変換を完了するために要求される同じ量の時間で、比較的高温(例えば42)でNMPの70%超をNDPに、またはNDPの70%超をNTPに変換する。いくつかの態様において、耐熱性キナーゼは、37で類似の変換を完了するために要求される同じ量の時間で、比較的高温(例えば42)でNMPの80%超をNDPに、またはNDPの80%超をNTPに変換する。いくつかの態様において、耐熱性キナーゼは、37で類似の変換を完了するために要求される同じ量の時間で、比較的高温(例えば42)でNMPの90%超をNDPに、またはNDPの90%超をNTPに変換する。

40

【0103】

例えば、耐熱性ポリメラーゼの活性は正確性および重合キネティクス(例えば、重合の速度)に基づいて算定される。それゆえに、例えば、耐熱性T7ポリメラーゼの1単位は、37よりも上の温度で(例えば50で)30分間に10nモルのNTPを酸不溶性の材料に組み込み得る。

50

## 【 0 1 0 4 】

耐熱性酵素（例えば、キナーゼまたはポリメラーゼ）は42 から80 の、またはより高い温度で活性なままであり得る（反応を触媒することができる）。いくつかの態様において、耐熱性酵素は、42～80、42～70、42～60、42～50、50～80、50～70、50～60、60～80、60～70、または70～80の温度で活性なままである。例えば、耐熱性酵素は、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、または80の温度で活性なままであり得る。耐熱性酵素は比較的高温で15分間から48時間、またはより長く活性なままであり得る。例えば、耐熱性酵素は比較的高温で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、24、36、42、または48時間活性なままであり得る。

10

## 【 0 1 0 5 】

耐熱性NMPキナーゼの限定しない例が表5および7に列記されている。他の耐熱性キナーゼは、耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼ、耐熱性ピルビン酸キナーゼ、および耐熱性ポリリン酸キナーゼを包含する（例えば表6参照）。他の耐熱性キナーゼが本開示に包含される。

## 【表7】

20

表7. 耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼの例.

酵素名	宿主生物	EC #	反応	Uniprot	参考文献
ウリジル酸キナーゼ	<i>T. thermophilus, P. furiosus</i>	2.7.4.22	UMP → UDP + ADP	P43891 Q8U122	41 42, 43
シチジル酸キナーゼ	<i>T. thermophilus, P. furiosus</i>	2.7.4.25	CMP → CDP + ADP	Q5SL35 Q8U2L4	41 46
グアニル酸キナーゼ	<i>T. thermophilus, T. maritima</i>	2.7.4.8	GMP → GDP + ADP	Q5SI18 Q9X215	41 49
アデニル酸キナーゼ	<i>T. thermophilus, P. furiosus</i>	2.7.4.3	AMP → 2ADP	Q72I25 Q8U207	52, 53 46

30

## 【 0 1 0 6 】

RNAポリメラーゼの限定しない例が表8に列記されている。耐熱性RNAポリメラーゼを包含する他のRNAポリメラーゼが本開示に包含される。

## 【表8】

表8. RNAポリメラーゼの例

酵素名	宿主生物	機能	Uniprot	参考文献
T7 RNAポリメラーゼ	T7 ファージ	DNA依存性RNAポリメラーゼ	P00573	54, 55
Φ6 RdRP	ファージΦ6	RNA依存性RNAポリメラーゼ	P11124	56
T3 RNAポリメラーゼ	T3 ファージ	DNA依存性RNAポリメラーゼ	P07659	57
SP6 ポリメラーゼ	SP6 ファージ	DNA依存性RNAポリメラーゼ	P06221	58

40

## 【 0 1 0 7 】

耐熱性RNAポリメラーゼは野生型酵素を修飾することによって調製され得る。かかる修飾（例えば変異）は公知である。例えば、バリエーション耐熱性T7 RNAポリメラーゼは次の点変異の1つ以上を包含し得る：V426L、A702V、V795I、S430P、F849I、S633I、F880Y、C510R、およびS767G（EP2377

50

928およびEP1261696A1。そのそれぞれは参照によって本明細書に組み込まれる)。いくつかの態様において、バリエーション耐熱性T7 RNAポリメラーゼはV426L、A702V、およびV795I変異を包含する。いくつかの態様において、バリエーション耐熱性T7 RNAポリメラーゼはS430P、F849I、S633I、およびF880Y変異を包含する。いくつかの態様において、バリエーション耐熱性T7 RNAポリメラーゼはF880Y、S430P、F849I、S633I、C510R、およびS767G変異を包含する。いくつかの態様において、バリエーション耐熱性T7 RNAポリメラーゼはY639V、H784G、E593G、およびV685A変異を包含する。いくつかの態様において、バリエーション耐熱性T7 RNAポリメラーゼはS430P、N433T、S633P、F849I、およびF880Y変異を包含する。他のバリエーションおよび組換え体耐熱性ポリメラーゼが本開示に包含される。

10

#### 【0108】

いくつかの態様においては、耐熱性T7ポリメラーゼが関心のRNAを生産するために用いられる。例えば、1~2%総蛋白質の濃度を有する耐熱性T7ポリメラーゼ(例えば、40~60の温度でインキュベートされる)が、関心のRNAを2g/L/hr超(または例えば2g/L/hr~10g/L/hr)の速度で合成するために用いられ得る。別の例として、3~5%総蛋白質の濃度を有する耐熱性T7ポリメラーゼ(例えば、40~60の温度でインキュベートされる)が、関心のRNAを10g/L/hr超(または例えば10g/L/hr~20g/L/hr)の速度で合成するために用いられ得る。

#### 【0109】

本開示の多くの態様は耐熱性ポリメラーゼ/酵素の使用を記載するが、他の酵素/ポリメラーゼが用いられ得るということが理解されるべきである。いくつかの態様において、ポリメラーゼは、例えば耐熱性酵素(単数または複数)の活性のいずれかの低減または喪失を補うために、熱不活性化された細胞ライセートに外来的に追加され得る。

20

#### 関心のRNA

#### 【0110】

本開示の方法は関心のRNAを生合成するために用いられる。RNAは一本鎖または二本鎖であり得る。いくつかの態様において、RNAは二本鎖RNA干渉分子である。例えば、関心のRNAはsiRNAまたはヘアピンRNA干渉分子であり得る。上で論じられているように、関心のRNAはDNA鋳型によってコードされ、その例は図3A~3Eに示されている。図3Aの鋳型を用いて生産されるRNAは、センスドメイン(ドメイン1)、柔軟なヒンジドメイン(ドメイン2)、およびセンスドメインに対して相補的なドメイン(アンチセンスドメイン3)を包含する。DNA鋳型の転写後に、アンチセンスドメインはセンスドメインに結合して(ハイブリダイゼーションして)、二本鎖RNAヘアピンステムドメインおよび隣接するヘアピンループ(ヒンジ)ドメインを形成する。

30

#### 【0111】

二本鎖ヘアピンステムドメインは、2つの相補的な核酸ドメイン同士(例えば、別々のヌクレオチド配列同士)の互いへの結合によって形成される。核酸ドメイン同士は、それらが互いに結合(Watson-Crick相互作用によって塩基対形成、ハイブリダイゼーション)して二本鎖核酸を形成する場合に「相補的」である。関心のRNAをコードするDNA鋳型の相補的なドメイン同士は、所望の最終産物に依存して変わり得る。相補的なドメイン同士は、例えば4から1000ヌクレオチドの、またはより長い長さを有し得る。例えば、相補的なドメイン同士は4から10、4から20、4から30、4から50、4から60、4から70、4から80、4から90、4から100、4から200、4から300、4から400、または4から500、または4から1000ヌクレオチドの長さを有し得る。いくつかの態様において、相補的なドメイン同士は15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの態様において、相補的なドメイン同士は4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100ヌクレオチドの長さを有する。

40

50

## 【0112】

ヘアピンループドメインもまた2つの相補的な核酸ドメイン同士の結合によって形成される。ヘアピンループドメインは2つの相補的なドメイン同士の間の介在配列である。典型的には、ヘアピンループドメインは非特異的であり、それが分子内でまたは別の核酸に結合するように設計されてはいないということの意味する。ヘアピンループドメインは相補的なドメイン同士の結合によってループ様構造を形成して、二本鎖ヘアピンステムドメインを形成する。いくつかの態様において、ヘアピンループドメインは、4から500ヌクレオチドの長さ、またはより多くを有する。例えば、ヘアピンループドメインは4から10、4から20、4から30、4から50、4から60、4から70、4から80、4から90、4から100、4から200、4から300、4から400、または4から500ヌクレオチドの長さを有し得る。いくつかの態様において、ヘアピンループドメインは4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100ヌクレオチドの長さを有する。

10

## 【0113】

本開示の「二本鎖RNA」は、一本鎖領域（例えば、ループまたはオーバーハング）を含有しない全くの二本鎖分子、ならびに二本鎖領域および一本鎖領域（例えば、ループまたはオーバーハング）を含有する部分的二本鎖分子を包含する。図3Aの一番下に図示されているdsRNA産物は部分的二本鎖分子と見なされ、一方、図3Bの一番下に図示されているdsRNA産物は全くの二本鎖分子と見なされる。

20

## 【0114】

関心の「一本鎖RNA」の例は、メッセンジャーRNA（mRNA）およびアンチセンスRNAを包含する。それゆえに、本明細書においてはmRNAおよび他の一本鎖RNA分子を合成する方法が提供される。

## 【0115】

それらの方法は、(a) RNA、RNAを解重合する酵素、耐熱性キナーゼ、耐熱性RNAポリメラーゼを含む培養改変細胞を溶解し、それによって細胞ライセートを生産すること、(b) ステップ(a)において生産された細胞ライセートを、RNAの解重合をもたらす条件下においてインキュベートし、それによってヌクレオシドリン酸を含む細胞ライセートを生産すること、(c) ステップ(b)において生産された細胞ライセートを、耐熱性キナーゼおよび耐熱性RNAポリメラーゼを不活性化することなしに内在性ヌクレアーゼおよびホスファターゼを不活性化する温度に加熱し、それによって熱不活性化されたヌクレアーゼおよびホスファターゼを含む細胞ライセートを生産すること、(d) (c)において生産された細胞ライセートを、エネルギー供給源と関心のRNAをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含有する改変DNA鋳型との存在下において、ヌクレオシド三リン酸の生産およびヌクレオシド三リン酸の重合をもたらす条件下においてインキュベートし、それによって関心のmRNAを含む細胞ライセートを生産することを含み得る。

30

## 【0116】

代替的には、かかる方法は、(a) 内在性の多量体RNA、RNAを解重合する酵素、耐熱性ヌクレオシドリン酸（NMP）キナーゼ、耐熱性ヌクレオシドニリン酸（NDP）キナーゼ、耐熱性PPK2キナーゼ、および/またはポリリン酸を含む改変細胞から得られた細胞ライセート同士を組み合わせて、細胞ライセート混合物を生産すること、(b) ステップ(a)において生産された細胞ライセート混合物を、RNAの解重合をもたらす条件下においてインキュベートし、それによってヌクレオシドリン酸を含む細胞ライセートを生産すること、(c) ステップ(b)において生産された細胞ライセートを、耐熱性キナーゼおよび耐熱性RNAポリメラーゼを不活性化することなしにホスファターゼおよびRNase（ならびにRNA安定性または重合正確性にとって不利であり得るいずれかの他の活性、例えば自然状態のRNAポリメラーゼ、NMPレダクターゼ、および/またはヌクレオシダーゼ）を不活性化する温度に加熱し、それによって、熱不活性化さ

40

50

れたホスファターゼおよびRNase（ならびに他の有害な細胞活性）を含む細胞ライセートを生産することと、(d)ステップ(c)において生産された細胞ライセートを、エネルギー供給源と関心のRNAをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含有する改変DNA鋳型との存在下において、ヌクレオシド三リン酸の生産およびヌクレオシド三リン酸の重合をもたらす条件下においてインキュベートし、それによってmRNAを含む細胞ライセートを生産することを含み得る。

【0117】

いくつかの態様において、単一の標的ドメインを含有するRNAをコードするDNA鋳型は例えばT7 RNAポリメラーゼなどのDNA依存性RNAポリメラーゼを用いて転写され、もたらされたRNA転写物は例えばファージ 6 RdRPなどのRNA依存性RNAポリメラーゼの鋳型としての用をなして、相補的なRNA分子を合成し、dsRNAを生む。例えば図3B参照。ファージ 6は二本鎖RNAウイルスであり、これはPseudomonas属のメンバーに感染する。このファージはRNA鋳型を用いてRNAを合成する能力があるRdRPをコードし、dsRNA分子を生む。6 RdRPはプライマー分子なしでRNAを重合する能力があり、それゆえにポリメラーゼは鋳型RNAのみを要求する(Wright, S. et al, 2012. Journal of Virology. Mar;86(5):2837-49; Van Dijk, AA., et al, 2004. J Gen Virol. May;85(Pt 5)。参照によって本明細書に組み込まれる)。他のRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRP)が本開示に包含される。

10

【0118】

いくつかの態様において、改変細胞は関心のRNAをコードするDNA鋳型を含む。RNAをコードするDNA鋳型は改変細胞のゲノムDNA中にインテグレーションされ得、またはDNA鋳型はプラスミド上で改変細胞内に導入され得る。他の態様においては、DNA鋳型は関心のRNAの生合成の間に（例えば熱不活性化ステップ後に）細胞ライセートに追加される。いくつかの態様において、細胞ライセート中のDNA鋳型の濃度は0.05~1 μg/μlである。いくつかの態様において、細胞ライセート中のDNA鋳型の濃度は0.05 μg/μl、0.1 μg/μl、0.5 μg/μl、1.0 μg/μlである。

20

【0119】

上で論じられているように、関心のRNA最終産物の他の例はメッセンジャーRNA(mRNA)およびショート/短鎖干渉RNA(siRNA)(分解に向けて特定のmRNAを特異的に標的化するように設計された合成RNA二重鎖)を包含する。

30

【0120】

いくつかの態様において、RNA最終産物(生合成された関心のRNA)の濃度は、少なくとも1 g/Lから50 g/L細胞ライセートである。例えば、RNA最終産物の濃度は1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、もしくは50 g/L、またはより多くであり得る。

【0121】

いくつかの態様において、関心のRNAは関心の標的核酸に結合するように設計され、例えば治療、予防、または診断薬として用いられる。

プロテアーゼ標的化

40

【0122】

本開示の改変細胞は、RNAなどの核酸の生産に負の影響を有し得る細胞の健康に必要な酵素を発現(例えば内在的に発現)し得る。かかる酵素は本明細書においては「標的酵素」と言われる。例えば、改変細胞によって発現される標的酵素は、基質または補因子について、RNA生合成経路に供給される前駆体の速度を増大させる酵素と競合し得る。別の例として、改変細胞によって発現された標的酵素は、基質または補因子について、RNA生合成経路の鍵となる経路入り口酵素である酵素と競合し得る。また別の例として、改変細胞によって発現された標的酵素は、基質または補因子について、RNA生合成経路の基質または補因子を供給する酵素と競合し得る。

【0123】

50

この負の影響を無効化または低減するために、標的酵素はそれらの蛋白質配列中に部位特異的プロテアーゼ認識配列を包含するように修飾され得、その結果、標的酵素はRNA生産の間の不活性化に向けて「標的化」および切断され得る（例えば、そのそれぞれが参照によって本明細書に組み込まれる2012年3月1日公開のU.S.公開No. 2012/0052547A1；および2015年2月12日公開の国際公開No. WO2015/021058A2参照）。

#### 【0124】

部位特異的プロテアーゼ認識配列を含有する標的酵素の切断は、対応する部位特異的プロテアーゼとの接触からもたらされる。これは細胞増殖段階の間には（例えば改変細胞が培養されているときには）細胞のペリプラズムに（標的酵素から離れて）隔離されており、RNA生産段階の間に（例えば、細胞ライセートを生産するための細胞溶解後に）標的酵素との接触をさせられる。それゆえに、いくつかの態様において、本開示の改変細胞は、(i) RNA生産の速度に負に影響しかつ標的酵素の蛋白質配列中に部位特異的プロテアーゼ認識配列を包含する標的酵素をコードする改変核酸と(ii) 標的酵素の部位特異的プロテアーゼ認識配列を切断しかつペリプラズム標的化配列を包含する部位特異的プロテアーゼをコードする改変核酸とを含む。このペリプラズム標的化配列は、細胞が溶解されるまで部位特異的プロテアーゼを細胞のペリプラズム空間に隔離することを担う。ペリプラズム標的化配列の例は下で提供されている。

#### 【0125】

本開示に従って用いられ得るプロテアーゼの例は、限定なしに、アラニンカルボキシペプチダーゼ、*Armillaria mellea*から得られるプロテアーゼ、アスタシン、細菌ロイシルアミノペプチダーゼ、癌由来凝固促進因子、カテプシンB、クロストリパイン、細胞質アラニルアミノペプチダーゼ、エラスターゼ、エンドプロテイナーゼBr g - C、エンテロキナーゼ、ガストリシン、ゼラチナーゼ、Gly - Xカルボキシペプチダーゼ、グリシルエンドペプチダーゼ、ヒトライノウイルス3Cプロテアーゼ、ヒポデルミンC、Iga特異的セリンエンドペプチダーゼ、ロイシルアミノペプチダーゼ、ロイシルエンドペプチダーゼ、lys C、リソソームpro - Xカルボキシペプチダーゼ、リシルアミノペプチダーゼ、メチオニルアミノペプチダーゼ、ミクソバクター（myxobacter）、ナルディライジン、隣エンドペプチダーゼE、ピコルナイン（picornain）2B、ピコルナイン（picornain）3C、プロエンドペプチダーゼ、プロリルアミノペプチダーゼ、プロ蛋白質転換酵素I、プロ蛋白質転換酵素II、ラッセルライジン（russellysin）、サッカロペプシン（saccharopepsin）、セメノゲラーゼ、T - プラスミノゲン活性化因子、トロンピン、組織カリクレイン、タバコエッチウイルス（TEV）から得られるプロテアーゼ、トガピリン、トリプトファンアミノペプチダーゼ、U - プラスミノゲン活性化因子、V8、ベノムピンB、ベノムピンBB、およびXaa - Proアミノペプチダーゼを包含する。

#### ペリプラズム標的化

#### 【0126】

核酸（例えばRNA）生合成経路の酵素は、細胞の健康（例えば生存能）に負の影響を有する少なくとも1つの酵素を包含し得る。この負の影響を無効化または低減するために、酵素は転置配列を包含するように修飾され得、その結果、酵素は、それが天然には位置せずかつ酵素が細胞の健康に負に影響しない細胞内または細胞外区画に転置される（例えば、参照によって本明細書に組み込まれる2011年11月10日公開の公開No. US - 2011 - 0275116 - A1参照）。例えば、生合成経路の酵素は細胞のペリプラズム空間に転置され得る。

#### 【0127】

それゆえに、いくつかの態様において、本開示の改変細胞はペリプラズム標的化配列に連結された核酸（例えばRNA）生合成経路の少なくとも1つの酵素を含む。「ペリプラズム標的化配列」は、それが連結されている蛋白質を細胞のペリプラズムに標的化するアミノ酸配列である。ペリプラズム標的化配列に連結されている蛋白質は、蛋白質が発現される細胞のペリプラズムに隔離されるであろう。

10

20

30

40

50

## 【0128】

例えば、ペリプラズム標的化配列は細菌分泌蛋白質のN末端に由来し得る。配列は長さが約15から約70アミノ酸まで変わる。ペリプラズム標的化配列の一次アミノ酸配列は変わるが、一般的には次のコンポーネントを包含する共通の構造を有する：(i) N末端部は可変的な長さを有し、一般的に正味の正電荷を持ち；(ii) 約6から約15アミノ酸の疎水性の中心コアが後続し；(iii) 最後のコンポーネントはシグナルペプチダーゼの切断部位を定める4から6アミノ酸を包含する。

## 【0129】

いくつかの態様において、本開示のペリプラズム標的化配列はグラム陰性細菌によって分泌される蛋白質に由来し得る。分泌蛋白質は、細菌によってまたは細菌に感染するバクテリオファージによってコードされ得る。分泌蛋白質のグラム陰性細菌供給源の例は、限定なしに、Escherichia、Pseudomonas、Klebsiella、Salmonella、Caulobacter、Methylobacterium、Acetobacter、Achromobacter、Acinetobacter、Aeromonas、Agrobacterium、Alcaligenes、Azotobacter、Burkholderia、Citrobacter、Comamonas、Enterobacter、Erwinia、Rhizobium、Vibrio、およびXanthomonas属のメンバーを包含する。

10

## 【0130】

本開示に従う使用のためのペリプラズム標的化配列の例は、限定なしに：

MKIKTGARILALSA LTTMMFSASALA (配列番号19)；

MKQSTIALALLPLLPVTKA (配列番号20)；

MMITLRKLP LAVAVAAGVMSAQAMA (配列番号21)；

MNKKVLTLSAVMASMLFGAAHA (配列番号22)；

MKYLLPTAAAGLLLAQPAMA (配列番号23)；

MKKIWLALAGLVLA FSASA (配列番号24)；

MMTKIKLMLIIFYLIISASAHA (配列番号25)；

MKQALRVAFGLILWASVLHA (配列番号26)；

MRVLLFLLSLFLP AFS (配列番号27)；および

MANNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRATA (配列番号28)、

からなる群から選択される配列を包含する。

20

30

改変細胞

## 【0131】

典型的には、本開示の改変細胞は、RNAを生合成するために要求される酵素活性の少なくとも1つ、大多数、または全てを含む。「改変細胞」は、少なくとも1つの改変(例えば、組換え体または合成)核酸を含むか、またはそれらの天然に生ずるカウンターパートとは構造的および/もしくは機能的に別物であるように別様に修飾されている細胞である。それゆえに、改変核酸を含有する細胞は「改変細胞」と見なされる。

## 【0132】

いくつかの態様において、本開示の改変細胞は、RNA、RNAを解重合する酵素、耐熱性キナーゼ、および/または耐熱性ポリメラーゼを含む。いくつかの態様において、改変細胞は、関心のRNAをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含有するDNA鋳型をさらに含む。

40

## 【0133】

いくつかの態様において、改変細胞は選択マーカーを発現する。選択マーカーは、細胞のトランスフェクション後に(または外来性の核酸を細胞内に導入するために用いられる他の手続き後に)、改変核酸を取り込み発現した改変細胞を選択するために典型的に用いられる。それゆえに、産物をコードする核酸は選択マーカーをもまたコードし得る。選択マーカーの例は、限定なしに、抗生物質(例えば、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、およびクロラムフェニコール耐性遺伝子)または他の化合物に対する耐性または感受性どちらかを増大また

50

は減少させる蛋白質をコードする遺伝子を包含する。選択マーカーの追加の例は、限定なしに、細胞がさもなくば必須の栄養素が欠乏した培地で増殖することを可能にする蛋白質をコードする遺伝子（栄養要求性マーカー）を包含する。他の選択マーカーが本開示に従って用いられ得る。

【0134】

改変細胞は、核酸（例えば改変核酸）によってコードされる産物が細胞内で生産される場合に、産物を「発現する」。遺伝子発現が、核酸の形態の遺伝子命令が用いられて蛋白質（例えば酵素）などの産物を合成するプロセスを言う、ということは当分野において公知である。

【0135】

改変細胞は原核細胞または真核細胞であり得る。いくつかの態様において、改変細胞は細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞、または細胞の他の型である。

【0136】

本開示の改変細菌細胞は、限定なしに、改変*Escherichia* spp.、*Streptomyces* spp.、*Zymomonas* spp.、*Acetobacter* spp.、*Citrobacter* spp.、*Synechocystis* spp.、*Rhizobium* spp.、*Clostridium* spp.、*Corynebacterium* spp.、*Streptococcus* spp.、*Xanthomonas* spp.、*Lactobacillus* spp.、*Lactococcus* spp.、*Bacillus* spp.、*Alcaligenes* spp.、*Pseudomonas* spp.、*Aeromonas* spp.、*Azotobacter* spp.、*Comamonas* spp.、*Mycobacterium* spp.、*Rhodococcus* spp.、*Gluconobacter* spp.、*Ralstonia* spp.、*Acidithiobacillus* spp.、*Microlunatus* spp.、*Geobacter* spp.、*Geobacillus* spp.、*Arthrobacter* spp.、*Flavobacterium* spp.、*Serratia* spp.、*Saccharopolyspora* spp.、*Thermus* spp.、*Stenotrophomonas* spp.、*Chromobacterium* spp.、*Sinorhizobium* spp.、*Saccharopolyspora* spp.、*Agrobacterium* spp.、および*Pantoea* spp.を包含する。

【0137】

本開示の改変酵母細胞は、限定なしに、改変*Saccharomyces* spp.、*Schizosaccharomyces*、*Hansenula*、*Candida*、*Kluyveromyces*、*Yarrowia*、および*Pichia*を包含する。

【0138】

いくつかの態様において、本開示の改変細胞は、改変*Escherichia coli*細胞、*Bacillus subtilis*細胞、*Pseudomonas putida*細胞、*Saccharomyces cerevisiae*細胞、または*Lactobacillus brevis*細胞である。いくつかの態様において、本開示の改変細胞は改変*Escherichia coli*細胞である。

改変核酸

【0139】

「核酸」は、共有結合的に一緒に連結された少なくとも2つのヌクレオチドであり、いくつかの場合にはホスホジエステル結合（例えばホスホジエステル「バックボーン」）を含有し得る。核酸（例えば、核酸のコンポーネントまたは部分）は天然に生ずるかまたは改変され得る。「天然に生ずる」核酸は、ヒトの介入の非存在下において天然に存在する細胞内に存在する。「改変核酸」は組換え体核酸および合成核酸を包含する。「組換え体核酸」は、（例えば同じ種からのまたは異なる種からの）核酸分子同士を繋ぎ合わせることで構築される分子を言い、典型的には生細胞内で複製し得る。「合成核酸」は、生物学的に合成、化学的に合成、または他の手段によって合成もしくは増幅される分子を言う。合成核酸は、化学的に修飾または別様に修飾されているが、天然に生ずる核酸分子と塩基対形成し得る核酸を包含する。組換え体および合成核酸は、前述のどちらかの複製からもたらされる分子をもまた包含する。改変核酸は天然に生ずる核酸の部分を含み得るが、全体としては、改変核酸は天然には生じず、ヒトの介入を要求する。いくつかの態様において、本開示の産物をコードする核酸は組換え体核酸または合成核酸である。他の態様において、産物をコードする核酸は天然に生ずる。

【0140】

本明細書において提供されるRNAをコードする改変核酸は、核酸のコントロール領域で

10

20

30

40

50

ある「プロモーター」に作動可能に連結され得、そこでは核酸の残りの転写の開始および速度がコントロールされる。プロモーターは、それが制御する核酸の発現を駆動しまたは転写を駆動する。

【0141】

プロモーターは、遺伝子または配列に天然に結び付けられているものであり得、所与の遺伝子または配列のコードセグメントの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって得られ得る。かかるプロモーターは「内在性」と言われ得る。

【0142】

いくつかの態様において、コード核酸配列は組換え体または異種プロモーターのコントロール下に配置され得、これは、通常ではその天然環境においてはコードされている配列に結びつけられていないプロモーターを言う。かかるプロモーターは、他の遺伝子のプロモーター；いずれかの他の細胞から単離されたプロモーター；および例えば、異なる転写制御領域の異なるエレメント同士および/または当分野において公知である遺伝子工学の方法によって発現を変改する変異を含有するものなどの、「天然に生じ」ない合成プロモーターまたはエンハンサーを包含し得る。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を合成的に生産することに加えて、配列は、組換えクローニングおよび/またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を包含する核酸増幅テクノロジーを用いて生産され得る。

10

【0143】

プロモーターは、それが制御する核酸に対して正しい機能的な位置および向きにあって、その核酸の転写開始および/または発現をコントロールする(「駆動する」)ときに、「作動可能に連結」されていると見なされる。

20

【0144】

本開示の改変核酸は恒常的プロモーターまたは誘導型プロモーターを含有し得る。「恒常的プロモーター」は細胞内において常に活性であるプロモーターを言う。「誘導型プロモーター」は、誘導因子もしくは誘導剤の存在下にあるか、それによって影響されるか、もしくはそれと接触するか、または抑圧を引き起こす因子の非存在下において活性化されるときに、転写活性を開始または増強するプロモーターを言う。本開示に従う使用のための誘導型プロモーターは、本明細書に記載されるかまたは当業者に公知のいずれかの誘導型プロモーターを包含する。誘導型プロモーターの例は、限定なしに、化学的/生化学的に制御および物理的に制御されるプロモーター、例えばアルコールによって制御されるプロモーター、テトラサイクリンによって制御されるプロモーター、ステロイドによって制御されるプロモーター、金属によって制御されるプロモーター、発病機構によって制御されるプロモーター、温度/熱誘導型、リン酸によって制御される(例えばPhoA)、および光によって制御されるプロモーターを包含する。

30

【0145】

誘導因子または誘導剤は、内在的もしくは通常では外来的な条件(例えば光)、化合物(例えば、化学もしくは非化学化合物)、または誘導型プロモーターからの転写活性を制御する点で活性であるようなやり方で誘導型プロモーターに接触する蛋白質であり得る。それゆえに、核酸の「転写を制御するシグナル」は誘導型プロモーターに作用する誘導因子シグナルを言う。転写を制御するシグナルは、用いられる制御システムに依存して転写を活性化または不活性化し得る。転写の活性化には、プロモーターに直接的に作用して転写を駆動すること、またはプロモーターが転写を駆動することを防ぐリプレッサーを不活性化することによってプロモーターに間接的に作用することが関わり得る。反対に、転写の脱活性化には、プロモーターに直接的に作用して転写を防ぐこと、またはリプレッサーを活性化し、これがそれからプロモーターに作用することによってプロモーターに間接的に作用することが関わり得る。

40

【0146】

改変核酸は当分野において公知のいずれかの手段を用いて宿主細胞内に導入され得、限定なしに、形質転換、トランスフェクション(例えば、化学的(例えば、リン酸カルシウム、カチオン性ポリマー、もしくはリポソーム)または非化学的(例えば、エレクトロポ

50

レーション、ソノポレーション、インペイルフェクション (impalefection)、光学的トランスフェクション、流体力学的トランスフェクション)、および形質導入 (例えば、ウイルス系形質導入) を包含する。

【0147】

天然に生ずる細胞内核酸によってコードされる酵素または他の蛋白質は「内在性酵素」または「内在性蛋白質」と言われ得る。

細胞培養物および細胞ライセート

【0148】

典型的には、改変細胞は培養される。「培養する」は、細胞がコントロールされた条件下において、典型的にはそれらの天然環境の外において増殖させられるプロセスを言う。例えば、改変細菌細胞などの改変細胞は、液体「培養培地」ともまた言われる液体栄養素プロセス中において細胞懸濁液として増殖させられ得る。

10

【0149】

普通に用いられる細菌 *Escherichia coli* 増殖培地の例は、限定なしに、LB (溶原ブロス) Miller ブロス (1% NaCl) : 1% ペプトン、0.5% 酵母エキス、および 1% NaCl ; LB (溶原ブロス) Lennox ブロス (0.5% NaCl) : 1% ペプトン、0.5% 酵母エキス、および 0.5% NaCl ; SOB 培地 (スーパーオブティマルブロス) : 2% ペプトン、0.5% 酵母エキス、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM MgSO<sub>4</sub> ; SOC 培地 (異化抑制因子を有するスーパーオブティマルブロス) : SOB + 20 mM グルコース ; 2xYT ブロス (2x 酵母エキスおよびトリプトン) : 1.6% ペプトン、1% 酵母エキス、および 0.5% NaCl ; TB (テリフィックブロス) 培地 : 1.2% ペプトン、2.4% 酵母エキス、72 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、および 0.4% グリセロール ; ならびに SB (スーパーブロス) 培地 : 3.2% ペプトン、2% 酵母エキス、および 0.5% NaCl、ならびに / または Korz 培地 (Korz, DJ et al. 1995) を包含する。

20

【0150】

高密度の細菌 *Escherichia coli* 増殖培地の例は、DNA Gro (商標) 培地、Pro Gro (商標) 培地、Auto X (商標) 培地、Deto X (商標) 培地、Indu X (商標) 培地、および Sec Pro (商標) 培地を包含するが、これに限定されない。

【0151】

いくつかの態様において、改変細胞は酵素または核酸の発現をもたらす条件下において培養される。かかる培養条件は発現されようとする特定の産物と産物の所望の量とに依存し得る。

30

【0152】

いくつかの態様において、改変細胞は 30 から 40 の温度で培養される。例えば、改変細胞は 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または 40 の温度で培養され得る。典型的には、改変細胞、例えば改変 *E. coli* 細胞は 37 の温度で培養される。

【0153】

いくつかの態様において、改変細胞は、12 時間から 72 時間の、またはより多くの時期培養される。例えば、改変細胞は、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、または 72 時間の時期培養され得る。典型的には、改変細菌細胞などの改変細胞は 12 から 24 時間の時期培養される。いくつかの態様において、改変細胞は 37 の温度で 12 から 24 時間培養される。

40

【0154】

いくつかの態様において、改変細胞は (例えば、液体細胞培養培地中において) 5 から 200 の 600 nm の波長で測定される光学密度 (OD<sub>600</sub>) まで培養される。いくつかの態様において、改変細胞は 5、10、15、20、25、50、75、100、150、または 200 の OD<sub>600</sub> まで培養される。

【0155】

50

いくつかの態様において、改変細胞は、 $1 \times 10^8$  ( $OD < 1$ ) から  $2 \times 10^{11}$  ( $OD \sim 200$ ) 生存可能細胞 / ml 細胞培養培地の密度で培養される。いくつかの態様において、改変細胞は  $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $4 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $6 \times 10^8$ 、 $7 \times 10^8$ 、 $8 \times 10^8$ 、 $9 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $4 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $2 \times 10^{10}$ 、 $3 \times 10^{10}$ 、 $4 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、または  $2 \times 10^{11}$  生存可能細胞 / ml の密度まで培養される (変換係数:  $OD 1 = 8 \times 10^8$  細胞 / ml)。

#### 【0156】

いくつかの態様において、改変細胞はバイオリアクター内で培養される。バイオリアクターは単純に細胞が培養される容器、例えば培養フラスコ、ディッシュ、またはバッグを言い、これらは単回使用 (使い捨て)、オートクレーブ可能、または滅菌可能であり得る。バイオリアクターはガラスから作られ得、またはこれはポリマーに基づき得、またはこれは他の材料から作られ得る。

10

#### 【0157】

バイオリアクターの例は、限定なしに、攪拌槽 (例えば完全混合) バイオリアクターおよび管型 (例えば押し出し流れ) バイオリアクター、エアリフトバイオリアクター、膜攪拌槽、スピンフィルター攪拌槽、バイプロミキサー、流動床反応器、ならびに膜バイオリアクターを包含する。バイオリアクターを作動させるモードはバッチまたは連続プロセスであり得、培養されようとする改変細胞に依存するであろう。バイオリアクターは、フィードおよび製品流が連続的にフィードされ、システムから取り出されるときに、連続的である。バッチ式バイオリアクターは連続的な再循環流れを有し得るが、栄養素の連続的なフィードまたは産物収穫はない。断続的収穫およびフェドバッチ (fed-batch) (またはバッチフェド (batch fed)) 培養では、細胞は、組成がバッチ培地に類似である培地に、より低い生存可能細胞密度で接種される。細胞は、栄養素がやや枯渇し細胞が定常増殖段階に近づくまで、本質的に外的操作なしに指数増殖することを許される。この時点において、断続的収穫バッチフェド (batch fed) プロセスでは、細胞および産物の部分が収穫され得、除去された培養培地が新しい培地によって補充される。このプロセスは数回繰り返され得る。組換え体蛋白質および抗体の生産のためには、フェドバッチプロセスが用いられ得る。細胞が指数増殖していくが栄養素が枯渇してくる一方で、濃縮されたフィード培地 (例えば、 $10 \sim 15$  倍濃縮された基礎培地) が連続的または断続的にどちらかで追加されて、追加の栄養素を供給し、細胞濃度と生産段階の長さとのさらなる増大を許す。新しい培地が、培養培地 (ブラス) の除去なしに細胞濃度に比例して追加され得る。培地の追加を収容するように、フェドバッチ培養はバイオリアクターの満容量よりも大分低い体積 (例えば、最大の体積のおよそ  $40\%$  から  $50\%$ ) で始められる。

20

30

#### 【0158】

本開示のいくつかの方法は、RNA (例えば、ssRNA または dsRNA) の大スケール生産を対象とする。大スケール生産方法では、改変細胞は、5 リットル (L) から  $250,000$  L の、またはより多くの体積の液体培養培地中で増殖させられ得る。いくつかの態様において、改変細胞は、 $10$  L、 $100$  L、 $1000$  L、 $10000$  L、または  $100000$  L 超の (またはそれに等しい) 体積の液体培養培地中で増殖させられ得る。いくつかの態様において、改変細胞は、 $5$  L、 $10$  L、 $15$  L、 $20$  L、 $25$  L、 $30$  L、 $35$  L、 $40$  L、 $45$  L、 $50$  L、 $100$  L、 $500$  L、 $1000$  L、 $5000$  L、 $10000$  L、 $100000$  L、 $150000$  L、 $200000$  L、 $250000$  L、またはより多くの体積の液体培養培地中で増殖させられる。いくつかの態様において、改変細胞は、 $5$  L から  $10$  L、 $5$  L から  $15$  L、 $5$  L から  $20$  L、 $5$  L から  $25$  L、 $5$  L から  $30$  L、 $5$  L から  $35$  L、 $5$  L から  $40$  L、 $5$  L から  $45$  L、 $10$  L から  $15$  L、 $10$  L から  $20$  L、 $10$  L から  $25$  L、 $20$  L から  $30$  L、 $10$  L から  $35$  L、 $10$  L から  $40$  L、 $10$  L から  $45$  L、 $10$  L から  $50$  L、 $15$  L から  $20$  L、 $15$  L から  $25$  L、 $15$  L から  $30$  L、 $15$  L から  $35$  L、 $15$  L から  $40$  L、 $15$  L から  $45$  L、または  $15$  から  $5$

40

50

0 Lの体積の液体培養培地中で増殖させられ得る。いくつかの態様において、改変細胞は、100 Lから300000 L、100 Lから200000 L、または100 Lから100000 Lの体積の液体培養培地中で増殖させられ得る。

【0159】

典型的には、改変細胞を培養することには、細胞を溶解することが後続する。「溶解する」は、細胞が例えばウイルス的、酵素的、機械的、または浸透圧的機序によって破片化されるプロセスを言う。「細胞ライセート」は、溶解された細胞（例えば、溶解された改変細胞）の内容物を含有する液を言い、例えばオルガネラ、膜脂質、蛋白質、核酸、および反転膜小胞を包含する。本開示の細胞ライセートは、本明細書において提供される改変細胞いずれかの集団を溶解することによって生産され得る。

10

【0160】

「溶解する」と言われる細胞溶解の方法は当分野において公知であり、それらのいずれかが本開示に従って用いられ得る。かかる細胞溶解方法は、限定なしに、ホモジナイゼーションなどの物理的溶解を包含する。

【0161】

細胞溶解は綿密にコントロールされた細胞内環境を攪乱し得、無制御な内在性プロテアーゼおよびホスファターゼによる蛋白質分解および修飾をもたらす。それゆえに、いくつかの態様においては、プロテアーゼ阻害剤および/またはホスファターゼ阻害剤が細胞ライセートまたは溶解前の細胞に追加され得、またはそれらの活性は熱不活性化、遺伝子不活性化、またはプロテアーゼ標的化によって除去され得る。

20

【0162】

いくつかの態様において、細胞ライセートは少なくとも1つの栄養素と組み合わせられ得る。例えば、細胞ライセートは $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ と組み合わせられ得る。他の栄養素の例は、限定なしに、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、オロト酸マグネシウム、クエン酸マグネシウム、一塩基性リン酸カリウム、二塩基性リン酸カリウム、三塩基性リン酸カリウム、一塩基性リン酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム、三塩基性リン酸ナトリウム、一塩基性リン酸アンモニウム、二塩基性リン酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、および水酸化アンモニウムを包含する。

【0163】

いくつかの態様において、細胞ライセートは少なくとも1つの補因子と組み合わせられ得る。例えば、細胞ライセートは、アデノシン二リン酸（ADP）、アデノシン三リン酸（ATP）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD<sup>+</sup>）、または酵素の活性のために要求される他の非蛋白質化学化合物（例えば、無機イオンおよび補酵素）と組み合わせられ得る。

30

【0164】

いくつかの態様において、細胞ライセートはRNA解重合をもたらす条件下においてインキュベートされる。いくつかの態様において、細胞ライセートはssRNAまたはdsRNAの生産をもたらす条件下においてインキュベートされる。

【0165】

単一の反応に用いられる細胞ライセートの体積は変わり得る。いくつかの態様において、細胞ライセートの体積は0.001から250 m<sup>3</sup>である。例えば、細胞ライセートの体積は0.001 m<sup>3</sup>、0.01 m<sup>3</sup>、0.1 m<sup>3</sup>、1 m<sup>3</sup>、5 m<sup>3</sup>、10 m<sup>3</sup>、15 m<sup>3</sup>、20 m<sup>3</sup>、25 m<sup>3</sup>、30 m<sup>3</sup>、35 m<sup>3</sup>、40 m<sup>3</sup>、45 m<sup>3</sup>、50 m<sup>3</sup>、55 m<sup>3</sup>、60 m<sup>3</sup>、65 m<sup>3</sup>、70 m<sup>3</sup>、75 m<sup>3</sup>、80 m<sup>3</sup>、85 m<sup>3</sup>、90 m<sup>3</sup>、95 m<sup>3</sup>、100 m<sup>3</sup>、105 m<sup>3</sup>、110 m<sup>3</sup>、115 m<sup>3</sup>、120 m<sup>3</sup>、125 m<sup>3</sup>、130 m<sup>3</sup>、135 m<sup>3</sup>、140 m<sup>3</sup>、145 m<sup>3</sup>、150 m<sup>3</sup>、155 m<sup>3</sup>、160 m<sup>3</sup>、165 m<sup>3</sup>、170 m<sup>3</sup>、175 m<sup>3</sup>、180 m<sup>3</sup>、185 m<sup>3</sup>、190 m<sup>3</sup>、195 m<sup>3</sup>、200 m<sup>3</sup>、205 m<sup>3</sup>、210 m<sup>3</sup>、215 m<sup>3</sup>、220 m<sup>3</sup>、225 m<sup>3</sup>、230 m<sup>3</sup>、235 m<sup>3</sup>、240 m<sup>3</sup>、245 m<sup>3</sup>、または250 m<sup>3</sup>であり得る。いくつかの

40

50

態様において、細胞ライセートの体積は  $25\text{ m}^3$  から  $250\text{ m}^3$ 、 $50\text{ m}^3$  から  $250\text{ m}^3$ 、または  $100\text{ m}^3$  から  $250\text{ m}^3$  である。

#### 下流処理

##### 【0166】

本明細書において提供される方法およびシステムは、いくつかの態様において、RNA（例えば、dsRNA、ssRNA）産物を  $1\sim 50\text{ g/L}$ （例えば、30、35、40、45、または  $50\text{ g/L}$ ）の濃度で生む。下流処理は99重量%（例えば、75、80、85、90、95、96、97、98、または99%）dsRNAほどまで純度を増大させる。下流処理の例が図4に示されており、蛋白質沈殿剤（例えば酢酸アンモニウム）の追加によって出発し、蛋白質、脂質、および何らかのDNAを製品流から除去するためのディスク型遠心（DSC）が後続する。それから、塩および体積を除去するために限外濾過が実行される。製品流への塩化リチウムの追加はRNA産物の沈殿に至り、これはその後ディスク型遠心を用いてバルク液体から分離され、例えば~80%純度のRNA製品流を生む。さらなるクロマトグラフィーポリッシングは~99%純粋な産物を生む。

10

#### 追加の態様

##### 【0167】

本開示の追加の態様は次の番号付きのパラグラフ1~46に包含される：

1. リボ核酸（RNA）を生合成する無細胞的方法であって、方法が：

(a) RNA、RNAを解重合する酵素、耐熱性キナーゼ、耐熱性RNAポリメラーゼを含む培養改変細胞を溶解し、それによって細胞ライセートを生産することと；

20

(b) ステップ(a)において生産された細胞ライセートを、RNAの解重合をもたらす条件下においてインキュベートし、それによってヌクレオシドリン酸を含む細胞ライセートを生産することと；

(c) ステップ(b)において生産された細胞ライセートを、耐熱性キナーゼおよび耐熱性RNAポリメラーゼを不活性化することなしに内在性ヌクレアーゼおよびホスファターゼを不活性化する温度に加熱し、それによって、熱不活性化されたヌクレアーゼおよびホスファターゼを含む細胞ライセートを生産することと；

(d) (c)において生産された細胞ライセートを、エネルギー供給源と関心のRNAをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含有する改変DNA鋳型との存在下において、ヌクレオシド三リン酸の生産およびヌクレオシド三リン酸の重合をもたらす条件下においてインキュベートし、それによって関心のRNAを含む細胞ライセートを生産することと、を含む。

30

2. パラグラフ1の方法であって、エネルギー供給源がポリリン酸、ポリリン酸キナーゼ、またはポリリン酸およびポリリン酸キナーゼ両方である。

3. パラグラフ1または2の方法であって、培養改変細胞が改変DNA鋳型を含む。

4. パラグラフ1または2の方法であって、改変DNA鋳型がステップ(d)の細胞ライセートに追加される。

5. パラグラフ1~4のいずれか1つの方法であって、ATP再生系がステップ(d)の細胞ライセートに追加される。

40

6. パラグラフ1の方法であって、培養改変細胞がさらに耐熱性ポリリン酸キナーゼを含む。

7. パラグラフ1~6のいずれか1つの方法であって、ステップ(a)の改変細胞のRNAが内在性RNAである。

8. パラグラフ1~7のいずれか1つの方法であって、RNAがリボソームRNA、メッセンジャーRNA、トランスファーRNA、またはその組み合わせを含む。

9. パラグラフ1~8のいずれか1つの方法であって、培養改変細胞がRNAを解重合する少なくとも2つの酵素を含む。

10. パラグラフ1~9のいずれか1つの方法であって、RNAを解重合する酵素が：S1ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼP1、RNase II、RNase III、RNase

50

e R、RNase J I、NucA、PNPase、RNase T、RNase E、RNase G、およびその組み合わせからなる群から選択される。

11. パラグラフ10の方法であって、RNAを解重合する酵素がヌクレアーゼP1である。

12. パラグラフ1~11のいずれか1つの方法であって、ステップ(b)の細胞ライセートがMg<sup>2+</sup>キレート剤を含む。

13. パラグラフ12の方法であって、Mg<sup>2+</sup>キレート剤がエチレンジアミン四酢酸(EDTA)である。

14. パラグラフ13の方法であって、EDTAの濃度が0.1mMから25mMである。

15. パラグラフ14の方法であって、EDTAの濃度が8mMである。

16. パラグラフ1~15のいずれか1つの方法であって、耐熱性キナーゼが耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼを含む。

17. パラグラフ16の方法であって、耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼが、耐熱性ウリジル酸キナーゼ、耐熱性シチジル酸キナーゼ、耐熱性グアニル酸キナーゼ、および耐熱性アデニル酸キナーゼからなる群から選択される。

18. パラグラフ17の方法であって、安定なヌクレオシドリン酸キナーゼが、pyrH遺伝子によってコードされる耐熱性*Pyrococcus furiosus*ウリジル酸キナーゼ(PfPyrH)、adk遺伝子によってコードされる耐熱性*Thermus thermophilus*アデニル酸キナーゼ(TthAdk)、cmk遺伝子によってコードされる耐熱性*Thermus thermophilus*シチジル酸キナーゼ(TthCmk)、およびgmk遺伝子によってコードされる耐熱性*Pyrococcus furiosus*グアニル酸キナーゼ(PfGmk)からなる群から選択される。

19. パラグラフ1~18のいずれか1つの方法であって、耐熱性キナーゼが耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼを含む。

20. パラグラフ19の方法であって、耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼが、耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼ、耐熱性ピルビン酸キナーゼ、および耐熱性ポリリン酸キナーゼからなる群から選択される。

21. パラグラフ20の方法であって、耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼの少なくとも1つがndk遺伝子によってコードされる耐熱性*Aquifex aeolicus*酵素である。

22. パラグラフ1~21のいずれか1つの方法であって、細胞が耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼおよび耐熱性ヌクレオシドリン酸キナーゼを含む。

23. パラグラフ1~22のいずれか1つの方法であって、培養改変細胞が耐熱性ウリジル酸キナーゼ、耐熱性シチジル酸キナーゼ、耐熱性グアニル酸キナーゼ、耐熱性アデニル酸キナーゼ、および耐熱性ポリリン酸キナーゼを含む。

24. パラグラフ1~23のいずれか1つの方法であって、耐熱性RNAポリメラーゼが耐熱性DNA依存性RNAポリメラーゼである。

25. パラグラフ24の方法であって、DNA依存性RNAポリメラーゼが、耐熱性T7RNAポリメラーゼ、耐熱性SP6RNAポリメラーゼ、および耐熱性T3RNAポリメラーゼからなる群から選択される。

26. パラグラフ25の方法であって、DNA依存性RNAポリメラーゼが耐熱性T7RNAポリメラーゼである。

27. パラグラフ1~26のいずれか1つの方法であって、ステップ(c)の温度が少なくとも50である。

28. パラグラフ27の方法であって、ステップ(c)の温度が50~80である。

29. パラグラフ1~28のいずれか1つの方法であって、ステップ(c)が、細胞ライセートを少なくとも15分間加熱することを含む。

30. パラグラフ1~29のいずれか1つの方法であって、ステップ(c)が、細胞ライセートを少なくとも65の温度で15分間加熱することを含む。

31. パラグラフ1~30のいずれか1つの方法であって、ステップ(d)のヌクレオ

10

20

30

40

50

シド三リン酸が 15 ~ 30 mM / 時間の速度で生産される。

32. パラグラフ 1 ~ 31 のいずれか 1 つの方法であって、ステップ (d) において生産される関心の RNA が二本鎖 RNA である。

33. パラグラフ 1 ~ 32 のいずれか 1 つの方法であって、ステップ (d) において生産される関心の RNA が RNA 干渉分子である。

34. パラグラフ 1 ~ 33 のいずれか 1 つの方法であって、ステップ (d) において生産される関心の RNA が、ヒンジドメインによって連結された相補的なドメイン同士を含有する mRNA である。

35. パラグラフ 1 ~ 34 のいずれか 1 つの方法であって、ステップ (d) において生産される関心の RNA が、少なくとも 4 g / L、少なくとも 6 g / L、少なくとも 6 g / L、または少なくとも 10 g / L の濃度で生産される。

10

36. パラグラフ 35 の方法であって、さらに、二本鎖 RNA を精製することを含む。

37. パラグラフ 36 の方法であって、精製ステップが、ステップ (d) の細胞ライセートを蛋白質沈殿剤と組み合わせることと、沈殿した蛋白質、脂質、および DNA を除去することを含む。

38. パラグラフ 1 ~ 37 のいずれか 1 つの方法によって生産される細胞ライセート。

39. RNA、RNA を解重合する酵素、耐熱性キナーゼ、および耐熱性 RNA ポリメラーゼを含む、改変細胞。

40. パラグラフ 39 の改変細胞であって、さらに、関心の RNA をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含有する改変 DNA 鋳型を含む。

20

41. パラグラフ 39 または 40 の改変細胞の集団。

42. 方法であって：細胞培養培地中においてパラグラフ 39 の改変細胞を維持することを含む。

43. パラグラフ 42 の方法であって、さらに、培養改変細胞を溶解して細胞ライセートを生産することを含む。

44. パラグラフ 43 の方法であって、さらに、RNA の解重合をもたらす条件下において細胞ライセートをインキュベートして、ヌクレオシドリン酸を含む細胞ライセートを生産することを含む。

45. パラグラフ 44 の方法であって、さらに、細胞ライセートを、耐熱性キナーゼおよび耐熱性 RNA ポリメラーゼを不活性化することなしに内在性ヌクレアーゼおよびホスファターゼを不活性化する温度に加熱して、熱不活性化されたヌクレアーゼおよびホスファターゼを含む細胞ライセートを生産することを含む。

30

46. パラグラフ 45 の方法であって、さらに、熱不活性化されたヌクレアーゼおよびホスファターゼを含む細胞ライセートを、エネルギー供給源と関心の RNA をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含有する改変 DNA 鋳型との存在下において、ヌクレオシド三リン酸の生産およびヌクレオシド三リン酸の重合をもたらす条件下においてインキュベートして、関心の RNA を含む細胞ライセートを生産することを含む。

#### 【実施例】

#### 【0168】

40

#### 例 1

#### ヌクレアーゼの絞り込み

ライセート RNA を消化するための最適なヌクレアーゼ (単数または複数) を同定するために、一連のスクリーニング実験を、5' - NMP またはオリゴヌクレオチドを生成するそれらの能力に基づいて選ばれた市販の酵素を用いて実施した。第 1 に、それらの酵素の活性を精製 E. coli RNA と製造者が推奨する反応条件とを用いて決定した。ここでは、RNA 解重合を酸可溶性のヌクレオチドの遊離によってモニターした。これらの条件下においては、4 つのヌクレアーゼはバックグラウンドを上回る解重合活性を実証した。正のコントロールとしての用をなすエンドヌクレアーゼのベンゾナーゼおよび RNase A は、RNA から酸可溶性のヌクレオチドへの迅速な変換を生んだ (図 5 A)。エキソヌクレ

50

アーゼ P 1 および RNase R による RNA の処置は RNA から酸可溶性のヌクレオチドへの時間依存的な変換を生み、RNase R は 2 時間で 100% 近くの解重合に達した。残りのヌクレアーゼ (ターミネーターエキソヌクレアーゼ、RNase III、および RNase T) はこのアッセイでは検出可能な解重合を生じさせなかった。LC-MS によるその後の分析は、ベンゾナーゼまたは RNase A ではなく RNase R およびヌクレアーゼ P 1 によって処置されたサンプルにおいて、NMP 遊離を明らかにした (図 5 B)。これらの結果は、RNase R およびヌクレアーゼ P 1 がライセート RNA を 5' - NMP へと解重合することによって好適であろうということを示唆している。その DNase 活性の欠如、その dsRNA および有構造 RNA を分解する能力、ならびにそのプロセシブな 3' -> 5' エキソヌクレアーゼ活性を含むいくつかの理由から、RNase R をさらなる研究のために選んだ。

10

#### ライセート中における RNA 解重合

##### 【0169】

それから、RNase R を、細菌ライセート中の内在性 RNA を解重合するその能力について試験した。これらの実験においては、精製 RNase R (0.5 mg/mL 終濃度) をライセート (50% 終濃度) に追加し、遊離のヌクレオチドを UPLC によって定量した。代表的な実験が図 6 に示されている。精製 RNase R をライセートに追加することは、ライセート RNA からの 5' - NMP の急速な遊離をもたらし、最大の NMP 遊離は 5 ~ 10 分後であった。急速な解重合のこの初期期間後に、NMP 濃度は安定化し、それからゆっくり低下しはじめた。大分より低い速度ではあるが、内在性 RNase 活性もまた 5' - NMP 遊離をもたらした。重要なことに、その公知の作用機序と整合して、RNase R 追加は RNA からの 2' または 3' NMP 遊離の速度を増大させなかった。複数の独立の実験において、ライセートへの RNase R の追加は、200 mM/hr を超過する速度で 5 ~ 10 分でライセート RNA の 68% から 5' - NMP への変換をもたらした。

20

##### 【0170】

RNase R 発現の毒性を算定するために、2 つの細菌株を構築した。1 つの株は空の蛋白質発現ベクターによって形質転換された元株 (GL16-170) を包含し、別のものは RNase R をコードする同じ蛋白質発現ベクターによって形質転換された GL16-170 を包含した。両方の株をバッチ条件下において 1 L バイオリアクター内で増殖させ、OD<sub>600</sub> = 2.0 で誘導し、グルコース消費前に収穫した。誘導は、増殖速度の検出可能な変化なしに (図 7 B) RNase R の強い発現を生んだ (図 7 A)。溶解および 50% 希釈によって、RNase R を発現する株は RNA から酸可溶性のヌクレオチドへの急速な解重合を発揮し (図 7 C)、過剰発現された RNase R が機能的であるということを示した。特に、精製酵素を反応に追加することによって供給された追加の RNase R 活性は、解重合の速度または酸可溶性のヌクレオチドの収量を増大させず、過剰発現された RNase R が溶解および希釈によって十分に活性であるということを示唆した。

30

##### 【0171】

次に、過剰発現された RNase R の活性を高密度ライセート中で算定した。リボソーム構造を安定化し rRNA をヌクレアーゼから保護することが公知である Mg<sup>2+</sup> は、RNase R 活性のためにもまた (低い量で) 要求される。よって、解重合速度を様々な濃度の EDTA の存在下において測定した (図 8)。空ベクター株からのライセートは比較的ゆっくりした解重合速度を発揮し、それらは EDTA に不感であり、一方、過剰発現された RNase R を有するライセートは増大していく EDTA 濃度によって解重合のより高い速度を発揮し、8 mM EDTA において最大の速度であった。おそらくは Mg<sup>2+</sup> 依存性 RNase R の不活性化が原因で、8 mM よりも上では解重合速度は減少した。一緒にすると、これらの結果は、過剰発現された RNase R が非毒性であり、溶解によって活性化され得るということを示唆している。

40

#### ライセート中における NMP 安定性

50

## 【0172】

RNA解重合の後に、もたらされたNMPプールはdsRNAへの重合前にNTPへと漸次リン酸化される。有害な酵素活性、例えばヌクレオシドへのNMP分解と糖および塩基へのその後の加水分解とは、dsRNA収量に負に影響する。よって、個々のNMPの安定性をライセート中で算定した。安定性算定は、同位体標識した「重い」NMP(hAMP、hCMP、hUMP、およびhGMP)をライセートに追加することと、LC-MSを用いて経時的に存在量を定量することとによって実施した(図9A~9D、実線)。比較的安定であるhAMPとは対照的に、hCMP、hUMP、およびhGMPはライセートによって盛んに分解され、それぞれ1時間、30分、および20分というおよその半減期( $t_{1/2}$ )を有する。

10

## 【0173】

NMPの代謝の1つの経路はヌクレオシドへの脱リン酸化である。脱リン酸化がNMP分解に寄与しているかどうかを算定するために、安価なホスファターゼ阻害剤の追加によって安定性算定を繰り返した。リン酸( $PO_4$ 、150mM)および構造的模倣物オルトバナジン酸( $VO_4$ 、10mM)の増大した濃度をhNMP追加前のライセートとブレインキュベートした。リン酸濃度を増大させることはhUMPを安定化し( $t_{1/2}$  60分)、一方、hCMPおよびhGMPには最小に影響した(図9A~9D、点線)。対照的に、オルトバナジン酸はhCMP( $t_{1/2} >> 60$ 分)、hUMP( $t_{1/2}$  60分)、およびhGMP( $t_{1/2}$  45分)を安定化した(図9A~9D、点線)。一緒にすると、これらの安定性算定はライセート中における13mM/hrという総体的なNMP分解速度を定め、外来的に追加されたNMPの70%が15分後に存在する。ホスファターゼ阻害剤の非存在下においてであっても、RNase R依存的な解重合の速度( $> 200$ mM/hr)と比較してhNMP消費の比較的低い速度(13mM/hr)は、RNAから遊離したNMPがdsRNAへの重合に利用可能であるはずであるということを示唆した。

20

熱不活性化の開発

## 【0174】

NMP、ならびにNDP、NTP、およびdsRNAを安定化するために、熱不活性化プロトコルを開発した。目的は、ライセート中のヌクレオチドおよびRNA分解活性を消去するであろう最も低い温度および最も短いインキュベーション時間を同定することであった。熱不活性化の効力を算定するために、(37 での)NTP消費速度を熱不活性化されたライセートの間でLC-MSによって比較し、熱不活性化の時間および温度を変えた。熱不活性化前には、ライセートはNTPをおよそ120mM/hrで消費した(図10)。70 よりも下の温度はNTPase活性に影響せず、一方、70 でのインキュベーションはNTPase活性の時間依存的な減少を生じさせた。NTPase活性の完全な阻害は70 での15分インキュベーション後に生じた(図10)。

30

## 【0175】

次に、これらの条件を、ライセート中のNMPおよびdsRNAを安定化するそれらの能力について評価した。NMP分解に及ぼす熱不活性化の効果を評価するために、ライセートを外来性RNase Rによって処置してRNAを遊離させ、それから70 での熱不活性化に付した。不活性化後に、温度を37 に下げ、反応を追加の60分間インキュベートした。図11Aに示されているように、5分間のRNase Rによる処置はRNAを急速に解重合した。熱不活性化および37 でのインキュベーション後に、NMP濃度は不変であり、選んだ熱不活性化条件がNMPを安定にしたということを示唆した。

40

## 【0176】

最後に、これらの条件を、ライセート中のインビトロ転写反応の反応物および産物(NTPおよびdsRNAを包含する)を安定化するそれらの能力について評価した。第1に、ライセートを上昇した温度で15分間ブレインキュベートした。それから温度を37 に下げ、転写反応物(外来性のNTP、DNA鋳型、および精製T7 RNAポリメラーゼを包含する)を追加した。図11Bに示されているように、70 で熱不活性化された

50

ライセート中における転写反応は、正のコントロール反応（緩衝液中で実施した）に定性的に類似のRNA産物を生んだ。60 で実施した反応ではRNA産物は明らかではなかった。

【0177】

一緒にすると、これらの結果は、15分間の70 インキュベーションが無細胞的反応においてNMP、NTP、およびdsRNAを安定化するために十分であることを示唆している。

#### 耐熱性キナーゼの選択および評価

【0178】

熱不活性化後には、RNAから遊離した5' - NMPを、dsRNAを形成するために重合され得るNTPへと逐次的にリン酸化するために、一連のキナーゼ活性が要求される。ATPからの高エネルギーリン酸基を用いてNMPおよびNDPをリン酸化するそれらのキナーゼは、高温インキュベーション後に活性なままであるために十分に耐熱性であり、かつ高い速度でNTP（1g dsRNA / L / hrで21mM / hr NTP）を生産するために十分に活性でなければならない。E. coliによる上首尾な発現および組換え体酵素の生化学的キャラクタリゼーションの文献報告に基づいて、好熱生物からの酵素を評価のために選んだ（表9）。

【表9】

表9. 活性の各分類について試験された耐熱性キナーゼの起源。

酵素分類	生物	接頭辞
NMPキナーゼ	<i>Escherichia coli</i>	<i>Ec</i>
	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Tth</i>
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	<i>Pf</i>
	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Te</i>
	<i>Thermotoga maritima</i>	<i>Tm</i>
NDP キナーゼ	<i>Escherichia coli</i>	<i>Ec</i>
	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Tth</i>
	<i>Aquifex aeolicus</i>	<i>Aa</i>
ポリリン酸 キナーゼ	<i>Escherichia coli</i>	<i>Ec</i>
	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Tth</i>
	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	<i>Te</i>

【0179】

dsRNAの無細胞的生産にとってのこれらの酵素の好適性を評価するために、酵素をN末端へキサヒスチジンタグと共にE. coli蛋白質発現ベクターにクローニングし、過剰発現し、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）を用いて精製した。精製酵素の活性を第1にルシフェラーゼアッセイを用いて定量した。そこでは、ATPの消費がNMPおよびNDPリン酸化のプロキシとしての用をなした。アッセイをいろいろなインキュベーション温度で実施して、各酵素の最適反応温度を決定した。

【0180】

T thermophilusおよびE. coliからのUMPキナーゼ（pyrH遺伝子によってコードされる）の発現は、試験された誘導および精製条件下において不溶性の蛋白質を生んだ。P. furiosusからの精製PyrHはおよそ2 μmol / min / mg蛋白質の比活性を発揮し

、これは概ね温度非依存的であった（図12）。この比活性に基づいて、P f P y r Hを1%総蛋白質で発現する高密度細胞ライセート（90 g d c w / L）は、過剰なA T Pの存在下においては、50 m M / h rを超過する速度でU M Pをリン酸化するであろう（表10）。1 g / L / h rでのd s R N A生産はおよそ5 . 2 5 m M / h rのU M Pキナーゼ活性を要求するので、P f P y r Hをさらなる評価のために選んだ。表10は高密度（90 g d c w / L）ライセート中における予測されるP y r H速度を示しており、P f P y r Hが総ライセート蛋白質の1%を構成していると想定している。

【表10】

表10. 予測されるPyrH反応速度

温度 (°C)	予測される速度 (mM/hr)
50	51.0
60	52.4
70	51.8
80	59.7

10

## 【0181】

E. coliおよびT. thermophilusからのA M Pキナーゼ（a d k遺伝子によってコードされる）の発現は可溶性の組換え体蛋白質を生んだが、一方、Thermosynechococcus酵素は試験された発現および精製条件下において不溶性であった。精製E. coli酵素は37 および50 では活性であったが、より高温では検出可能な活性を発揮しなかった（図13）。T. thermophilus酵素は、全ての試験された温度でE. coli酵素よりも高い比活性を発揮し、70 でm g酵素あたり1 m M / m i n近くの最適活性を有した。この活性は、酵素が高密度ライセート中において総蛋白質の0 . 0 1 %で発現されているときには、ライセート中におけるA M Pリン酸化の250 m M / h rを超過する予想される速度に帰着する（表11）。およそ5 . 2 5 m M / h rのA M Pキナーゼ活性が、1 g / L / h rでd s R N Aを合成するためには要求されるので、T t h A d kをさらなる研究のために選んだ。表11は高密度（90 g d c w / L）ライセート中における予測されるA d k反応速度を示しており、T t h A d kが総ライセート蛋白質の0 . 0 1 %を構成していると想定している。

20

30

【表11】

表11. 予測されるAdk反応速度

温度 (°C)	予測される速度 (mM/hr)
37	<i>n.d.</i>
50	86.4
60	199.5
70	253.8
80	106.1

40

## 【0182】

E. coliおよびP. furiosusからのC M Pキナーゼ（c m k遺伝子によってコードされる）の発現は不溶性の蛋白質を生み、一方、T. thermophilus酵素の発現は試験された条件下においては可溶性蛋白質を生んだ。T. thermophilus C M Pキナーゼは概ね温度に非依存的な活性を示したが、酵素活性は60 よりも上の温度では僅かに減少した（図14）。これらの結果に基づくと、総蛋白質の0 . 0 2 %での高密度ライセート中におけるT t h C m kの発現は、5 . 2 5 m M / h rの目標をかなり超過する30 ~ 45 m M / h rというC M Pキナーゼ活性を生むであろう（温度に依存する。表12）。よって、T t h C m kをさらなる評価のために選んだ。表12は、高密度（90 g d c w / L）ライセート中における予測されるC m k反応速度を示しており、T t h C m kが総ライセート蛋白

50

質の 0.02% を構成していると想定している。

【表 1 2】

表12. 予測されるCmk反応速度

温度 (°C)	予測される速度 (mM/hr)
37	44.8
50	44.0
60	40.8
70	30.2
80	32.2

10

【0183】

試験されたCMPキナーゼとは対照的に、E. coli、T. thermophilus、およびT. maritimaからのGMPキナーゼの発現は可溶性の組換え体蛋白質を生んだ。E. coli酵素は試験された最も高い比活性を37 で有したが、より高温ではより活性でなかった(図14)。T. thermophilusおよびT. maritima酵素両方は最適活性をより高温で発揮し、一方、T. maritima酵素は全ての試験された温度でより活性であった。TmGmkの測定された比活性に基づくと、総蛋白質の0.1%での高密度細胞ライセート中における発現は、5.25 mM/hrという目標速度と比較して、過剰なATPの存在下において70 では60 mM/hrを超過する予想される速度を生むであろう(表13)。よって、TmGmkをさらなる評価のために選んだ。表13は高密度(90 g dcw/L)ライセート中における予測されるGmk反応速度を示しており、TmGmkが総ライセート蛋白質の0.1%を構成していると想定している。

20

【表 1 3 - 1】

表13. 予測されるGmk反応速度

温度 (°C)	予測される速度(mM/hr)
37	41.8
50	42.8
60	55.2

30

【表 1 3 - 2】

70	62.0
80	52.4

【0184】

概ね単一の基質に特異的であるNMPキナーゼとは違って、NDPキナーゼはADP、CDP、UDP、およびGDPをリン酸化する。NDPキナーゼ同士を比較するために、好熱菌T. thermophilusおよびA. aeolicusからの酵素をクローニングし、E. coliによって発現した。T. thermophilus酵素は試験された条件下において不溶性であったが、一方、A. aeolicus酵素の発現は可溶性蛋白質を生んだ。ATPおよびGDPを基質として用いたルシフェラーゼアッセイでの活性測定は、AaNd kが広い範囲の温度に渡って高度に活性であり、50 の至適温度を有するというを明らかにした(図16)。基質間の比較は、各ヌクレオチドについて50 では100 μmol/min/mgを超過する比活性を明らかにし、AaNd kが複数のNDP基質をリン酸化し得るということを確認した(表14)。これらの測定に基づくと、0.01%総蛋白質での高密度ライセート中におけるAaNd kの発現は、60 mM/hrをかなり超過するUDPキナーゼ速度に帰着する。21 mM/hrのNDPキナーゼ活性が1 g/L/hrのdsRNA合成をサポートするために要求されるということに鑑みて、AaNd kをさらなる評価のために選んだ

40

50

。表14は、50℃ではAaNdkがCDP、UDP、およびGDP基質について高度に活性であるということを示している。

【表14】

表14. 基質毎のAaNdk比活性.

基質	比活性 (μmol/min/mg)
CDP	259.6
UDP	110.4
GDP	217

10

【0185】

ポリリン酸キナーゼ (Ppk) は高エネルギーリン酸基を多量体リン酸鎖とアデノシンヌクレオチドとの間で可逆的に転移させる。E. coliならびに好熱生物T. thermophilusおよびThermosynechococcus elongatusからの酵素を包含する、ポリリン酸キナーゼのI型ファミリーに属する複数のPpk酵素を活性について評価した。これらの酵素は、これらが良くキャラクター化されたI型ファミリーに属するか、または活性であることが先に示されていたので、試験のために選択した。Ppk酵素の発現および精製は可溶性蛋白質を生んだ。それから、これを、基質としてADPおよびヘキサメタリン酸ナトリウムを用いて、ルシフェラーゼアッセイシステムによって活性について試験した。図17に示されているように、全ての試験されたPpk酵素の比活性は他のキナーゼ活性に対して相対的に低かった。E. coli Ppkはより低温（最高で60℃）で最も高い比活性を有し、一方、Thermosynechococcus酵素は70℃で最も高い活性を有した。加えて、熱不活性化条件（70℃、15分間）下におけるE. coli酵素のインキュベーションは不可逆的な不活性化をもたらした（示されていない）。Thermosynechococcus酵素の比活性に基づくと、総蛋白質の2%での高密度ライセート中における発現は、70℃では、1g/L/hr dsRNA合成をサポートするための要求されるATP生産速度にマッチする4.2mM/hrという予想される速度をもたらすであろう（表15）。しかしながら、より低温（例えば50℃）での無細胞的dsRNA合成はTePpkのより高い発現（4%総蛋白質を超過する）を要求するであろう。表15は高密度（90g dcw/L）ライセート中における予測されるPpk反応速度を示しており、TePpkが総ライセート蛋白質の2%を構成していると想定している。

20

30

【表15】

表15. 予測されるPPK1反応速度

温度 (°C)	予測される速度 (mM/hr)
37	6.5
50	18.9
60	38.9
70	42.1
80	0

40

【0186】

精製されたシステムにおける各酵素活性を評価した後に、酵素を熱不活性化されたライセート中における活性について試験した。個々のキナーゼを発現するライセートを70℃で15分間プレインキュベートした後に、基質を追加した。精製された反応のように、ATP消費（NMPおよびNDPキナーゼについて）またはATP生産（ポリリン酸キナーゼについて）を、ルシフェラーゼアッセイキットを用いて定量した。下の表16に示されているように、NMPおよびNDPリン酸化の速度は目標をかなり超過する。

50

## 【表 16】

表16. 熱不活性化されたライセート中のキナーゼ活性

酵素	反応	速度 (mM/hr)	目標 (mM/hr)
PfPyrH	$UMP + ATP \rightleftharpoons UDP + ADP + P_i$	151	5.25
TthAdk	$AMP + ATP \rightleftharpoons 2 ADP + 2 P_i$	199	5.25
TthCmk	$CMP + ATP \rightleftharpoons CDP + ADP + P_i$	183	5.25
PfGmk	$GMP + ATP \rightleftharpoons GDP + ADP + P_i$	168	5.25
AaNdk	$NDP + ATP \rightleftharpoons NTP + ADP + P_i$	163	21
TePpk	$ADP + \text{ポリ } P_n \rightleftharpoons ATP + \text{ポリ } P_{n-1}$	2.7	42

10

## 【0187】

個々のキナーゼがライセート中において十分に活性である（Ppkを例外とする）ということを確認した後に、NMPをNTPに変換するそれらの能力について、キナーゼをマルチ酵素システムによって評価した。これらの研究においては、個々のキナーゼ（5）を発現する同体積のライセートを組み合わせ、熱不活性化し、それから、LC-MSによってNMPの等モルミックスからのNTPのATP依存的生産についてアッセイした。表17に示されているように、総体的なNTP生産速度はUTP、CTP、およびGTPについては24 mM/hrを超過し、ライセートの単純混合物が、反応条件のいずれかの最適化なしに、十分なATPの存在下において1 g/L/hr dsRNAの合成をサポートするために十分な速度でNTPを提供し得るということを示唆した。

20

## 【表 17】

表17. NMPの等モル混合物を基質とし、ATPを高エネルギーリン酸ドナーとして用いた、個々のキナーゼ活性を発現するライセートの熱不活性化1:1混合物中におけるNTPの生産

経路	速度 (mM/hr)
UMP → UTP	3.24
CMP → CTP	9.24
GMP → GTP	11.8
AMP → ATP	<i>n.d.</i>
NMPs → NTPs	>24.3

30

40

## RNAポリメラーゼの絞り込み

## 【0188】

RNAからNMPへの解重合とNMPからそれらの対応するNTPへのリン酸化との後には、NTPをdsRNA産物に変換するためにRNAポリメラーゼが要求される。バクテリオファージT7からのRNAポリメラーゼは、いくつかの理由から組換え体システムへの使用にとって魅力的な酵素である。T7 RNAポリメラーゼは（細菌および真核生物からの多くのRNAポリメラーゼとは違って）単一のサブユニットを包含し、生化学的および分子生物学研究によって鋭意にキャラクタリゼーションされてきた。加えて、改善された耐熱性を付与する複数のT7 RNAポリメラーゼ変異が記載されている（表18参

50

照)。

【表 18】

表18. 活性および耐熱性について評価したT7 RNAポリメラーゼのリスト

酵素名	供給源	根拠
MegaScript T7	Invitrogen	高収量転写キットのコンポーネント
T7 RNA ポリメラーゼ	New England Biolabs	コントロール
ThermoT7 RNA ポリメラーゼ «TT7»	Toyobo Life Sciences JP4399684 (Toyobo)	公称50°Cにおける活性
T7 RNA ポリメラーゼ (LVI)	EP2377928 (Roche)	公称50°Cにおける活性
T7 RNA ポリメラーゼ (PPIY)	EP1261696 (bioMérieux)	公称50°Cにおける活性
T7 RNA ポリメラーゼ (LPPVIIY)	LVI & PPIYの組み合わせ	潜在的に相乗的な変異

10

【0189】

第1に、市販のT7 RNAポリメラーゼの活性を二重鎖DNA鋳型(例えば図3B)および37の反応温度を用いて評価した。RNAの生産をQuant-iT RNAキット(ブロードレンジ)(Thermo Fisher Scientific)を用いて経時的に定量した。各製造者が推奨する条件下において、ThermoT7およびMegaScript酵素は高度に活性であり、一方、NEB酵素は有意により低い活性を見せた(図18)。

20

【0190】

次に、T7 RNAポリメラーゼのLVI変異をN末端ヘキサヒスチジンタグと共にクローニングし、E. coliで発現し、IMACを用いて精製した。

【0191】

次に、MegaScriptおよびThermoT7ポリメラーゼの活性を、LVI変異ポリメラーゼと並べて、希釈された熱不活性化されたライセート(35%ライセート終濃度)中において、標準化された反応条件下において試験した(図19)。精製されたシステムのように、ThermoT7は37ではMegaScript酵素よりも高い比活性を示した(3.1nmol RNA/min/mg蛋白質)。LVI変異は試験された3つの酵素のうち最も低い比活性(0.33nmol/min/mg)を有した。さもなければ同一の条件下において50で試験したときには、MegaScript酵素もLVI変異もいずれかの検出可能な活性を発揮しなかった。対照的に、ThermoT7の活性は37でより高かった。アッセイの総蛋白質のおよそ4%をThermoT7ポリメラーゼとして、RNA合成速度は二重鎖DNA鋳型およびThermoT7ポリメラーゼでは50で1g/L/hrを超過した(図19)。そこで、ThermoT7をさらなるキャラクタリゼーションのために選択した。

30

【0192】

希釈された熱不活性化されたライセート中における50でのThermoT7の活性を確認した後に、ThermoT7の活性を大規模な無細胞的dsRNA生産の代表的な条件下において検討した。ライセートの増大した濃度に加えて、大規模な反応は、熱不活性化プロセスに起因する沈殿したライセートコンポーネント(例えば蛋白質)を包含し得る。これらの条件下におけるThermoT7の性能を算定するために、RNA重合を、熱不活性化後の沈殿した蛋白質を除去するための清澄化ありまたはなしで、熱不活性化された高密度ライセート(68%ライセート終濃度)中で定量した(図20)。RNA合成速度は緩衝液中よりもマトリックス中において有意に高く、最も高い速度は遠心によって清澄化された熱不活性化されたマトリックスにおいて生じた。清澄化されていない反応では、総体的なRNA合成速度(2時間反応による)は、アッセイの総蛋白質の1.4%をT

40

50

Thermo T7ポリメラーゼとして2 g / L / hrを超過した。

#### 【0193】

最後に、Thermo T7の耐熱性をより高温で試験して、このプログラムにおいて以前に確立された熱不活性化条件との適合性を評価した。これらの研究では、Thermo T7酵素を上昇した温度(50~70)で様々な長さの時間(0~15分)プレインキュベートし、残っている活性を37で定量した。図21に示されているように、50でのインキュベーションは酵素によって良く耐容性を示すが、より高温はポリメラーゼ活性の急速な不可逆的不活性化をもたらす。よって、これらの実験では、この特定のThermo T7は50~70での熱不活性化とは適合性ではなかった。それゆえに、いくつかの場合には、精製Thermo T7酵素が熱不活性化後の無細胞的反応に追加され得、

10

#### 材料および方法

##### ヌクレオチド分析

#### 【0194】

ヌクレオチドリン酸(AMP、CMP、UMP、およびGMP)の分析を液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)によって実施した。サンプルは、ZIC-cHILICカラム(2.1 x 20 mm, 3 μm i.d.) (Merck)を備えたAgilent 1100シリーズHPLCを用いて、室温で、0.5 mL/minの流量および2 μL注入体積によって分離した。移動相は20 mM酢酸アンモニウム(A)と90%アセトニトリル中の20 mM酢酸アンモニウム(B)とからなった。分離方法は3.5分間の15~50%(B)の勾配からなり、1.5分間の50%(B)、それから3分間の15%Bが後続した。定量は、ABSciex API 3200質量分析計によって、エレクトロスプレーイオン化(キャピラリー電圧:-3000V、温度:600、脱溶媒ガス:20 psi)を用いて複数反応モニター(MRM)モードで実施した。ヌクレオチドリン酸、二リン酸、および三リン酸種(NMP、NDP、およびNTP)の分析は、上に記載されている方法を次の分離勾配で用いた: 3.5分間の15%Bから50%Bに、続いて2.5 minの50%B、それから4分間の15%Bが後続する。ピーク面積を、精製化合物(Sigma-Aldrich)からなる標準曲線と比較した。ライセート中のサンプルの分析では、標準曲線を、下に記載されているサンプル調製ステップのように酸クエンチ、清澄化、pH中和、および濾過したライセートバックグラウンドで作成した。

20

30

#### 【0195】

2'、3'、および5'-NMPの分析は、ACQUITY CSHフルオロフェニルカラム(2.1 x 150 mm, 1.7 μm i.d.) (Waters)を備えたACQUITY HクラスUPLC(Waters)を用いる液体クロマトグラフィーによって、40で、0.5 mL/minの流量および0.5 μL注入体積によって実施した。移動相は、0.2%ギ酸中の10 mM酢酸アンモニウム(A)および95%アセトニトリル、0.2%ギ酸中の10 mM酢酸アンモニウム(B)からなった。分離方法は2.8分間の1%Bからなり、2.2分間の1~30%Bの勾配が後続し、7分間の100%B、それから3分間の1%Bが後続した。定量を、ACQUITY UPLC PDA(Waters)を用いて260、254、および210 nmで実施した。ピーク面積を、精製化合物(Biolog Life Science Instituteから購入した2'および3' CMP、UMP、およびGMPを例外として、Sigma-Aldrichから購入)からなる標準曲線と比較した。ライセート中のサンプルの分析では、標準曲線を、下に記載されているサンプル調製ステップのように酸クエンチ、清澄化、pH中和、および濾過したライセートバックグラウンドで作成した。

40

##### E. coli RNAの抽出および精製

#### 【0196】

RNAを確立されたプロトコールに従って高密度E. coliライセート(蛋白質濃度: 40~50 mg/mL)から抽出および精製した(Mohanty, B. K., Giladi, H., Maples, V. F., & Kushner, S. R. (2008). Analysis of RNA decay, processing, and polyadenylat

50

ion in *Escherichia coli* and other prokaryotes. *Methods in enzymology*, 447, 3-29)。凍結 *E. coli* ライセートの  $400 \mu\text{L}$  毎に、 $67 \mu\text{L}$  の  $20 \text{ mM}$  酢酸を追加して *RNase* 活性を低減した。サンプルをビーズバス中において  $37^\circ\text{C}$  で融解した。融解直後に、トリメチル(テトラデシル)アンモニウムブロミド (Sigma-Aldrich) の  $10\%$  ( $w/v$ ) 溶液の  $400 \mu\text{L}$  を追加した。それから、もたらされた懸濁液を  $4^\circ\text{C}$  におけるマイクロ遠心機による  $10,000 \times g$  での遠心によって清澄化し、上清を除去した。ペレットを  $35\%$  エタノール中の塩化リチウム (Sigma-Aldrich) の  $2 \text{ M}$  溶液の  $1 \text{ mL}$  中に再懸濁した。懸濁液を室温で  $5$  分間インキュベートし、それから  $4^\circ\text{C}$  における  $6$  分間の  $15,000 \times g$  での遠心によって清澄化し、上清を除去した。それから、ペレットを水中の塩化リチウムの  $2 \text{ M}$  溶液の  $1 \text{ mL}$  中に再懸濁し、 $6$  分間の  $15,000 \times g$  での清澄化前に室温で  $2$  分間インキュベートした。それから上清を除去し、残っているペレットを、 $70\%$  エタノール中への再懸濁と  $4^\circ\text{C}$  における  $5$  分間の最大スピード ( $21,000 \times g$ ) での遠心とによって洗浄した。それから上清を除去し、ペレットを室温で  $15$  分間風乾した。それから、ペレットを  $200 \mu\text{L}$  ヌクレアーゼ不含水中に再懸濁し、 $4^\circ\text{C}$  で一晩インキュベートして *RNA* を可溶化した。*RNA* 溶液を遠心 ( $4^\circ\text{C}$  での  $5$  分間の最大スピード) によって清澄化し、可溶性 *RNA* を含有する上清を無菌の *RNase* 不含チューブに移し、 $-20^\circ\text{C}$  で保存した。

#### ヌクレアーゼの絞り込み

【0197】

ヌクレアーゼは次の商業的供給源から得た：ベンゾナーゼおよびヌクレアーゼ P1 は Sigma-Aldrich から得、*RNase R*、ターミネーターエキソヌクレアーゼ、および *RNase III* は Epicentre から得、*RNase A* は Thermo Fisher から得、エキソヌクレアーゼ T は New England BioLabs から得た。スクリーニングアッセイのためには、各酵素溶液の  $1 \mu\text{L}$  を  $2 \times$  アッセイ緩衝液 ( $100 \text{ mM}$  リン酸カリウム  $\text{pH} 7.4$ 、 $10 \text{ mM}$  塩化マグネシウム、 $1 \text{ mM}$  塩化亜鉛) の  $100 \mu\text{L}$  に追加し、それから時間  $t = 0$  において等体積の  $1 \text{ mM}$  *RNA* 溶液 ( $\sim 340 \text{ ng} / \mu\text{L}$ ) と組み合わせ、良く混合した。反応を  $37^\circ\text{C}$  でインキュベートし、 $20 \mu\text{L}$  を氷上の酸クエンチ溶液 ( $180 \mu\text{L}$  の  $0.2 \text{ M}$  硫酸) に移すことによって定期的にサンプリングした。時系列の完了後に、クエンチされたサンプルを  $4^\circ\text{C}$  における  $5$  分間の  $3,000 \times g$  での遠心によって清澄化した。それから、各サンプルからの上清の  $170 \mu\text{L}$  を UV 透明  $96$  ウェルハーフエリアプレート (Corning) に移し、酸可溶性のヌクレオチドを、マイクロプレートリーダーと各モノヌクレオチドの個々の減衰係数を平均することによって概算された  $10665 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  の減衰係数とを用いて、 $260 \text{ nm}$  の吸光度によって定量した。LC-MS によるその後の分析のために、 $45 \mu\text{L}$  の清澄化された上清を  $5 \mu\text{L}$  の  $2.5 \text{ M}$  水酸化カリウムによって  $\text{pH}$  中和した。トータルヌクレオチドプール (すなわち  $100\%$  解重合) を *RNA* のアルカリ加水分解によって決定した：*RNA* を等体積の  $0.2 \text{ M}$  水酸化カリウムと組み合わせ、それから  $99^\circ\text{C}$  に  $20$  分間加熱した。それから、アルカリ加水分解されたサンプルをクエンチし、上に記載されているように分析した。

#### 蛋白質発現および精製

【0198】

組換え体蛋白質を、ヘキサヒスチジンタグと併せて当該遺伝子をコードする合成 *DNA* から *pETDuet-1* (Novagen) にクローニングした。プラスミドを *E. coli* T7 Express (New England Biolabs) に形質転換し、それから、 $1 \text{ L}$  培養によって、 $50 \mu\text{g} / \text{mL}$  カルベニシリンを添加した *ZYM-505* 培地 (Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein expression and purification*, 41(1), 207-234) を用いて増殖させた。発現を  $A_{600} = 0.6$  において誘導した。*RNase R* およびキナーゼについては、 $0.1 \text{ mM}$  IPTG によって発現を誘導し、温度を  $16^\circ\text{C}$  に下げ、培養物は  $16^\circ\text{C}$  で  $24$  時間増殖させた。T7 *RNA* ポリメラーゼについては、 $0.8 \text{ mM}$  IPTG によって発現を誘導し、培養物は  $37^\circ\text{C}$  で  $3$  時間増殖させた。バイオマスを遠心によって収穫し、上清を傾瀉した

後に、細胞ペレットを  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。細胞ペレットを融解し、ベンゾナーゼ ( $0.04 \mu\text{L}/\text{mL}$ ) を添加した4体積の B - P E R C o m p l e t e (Thermo Fisher Scientific) 中への再懸濁と、穏やかな振盪をしながらの室温における15分間のインキュベーションとによって溶解した。それから、ライセートを4における1時間の  $16,000 \times g$  での遠心によって清澄化した。A K T A Prime Plus FPLCシステム (GE Healthcare) に接続された H i s G r a v i T r a p カラム (GE Healthcare) または H i s T r a p H P カラムを用いる固定化金属アフィニティークロマトグラフィーによって、蛋白質を精製した。両方の精製方法について、カラムを平衡化/洗浄緩衝液 ( $50 \text{mM}$  リン酸緩衝液  $\text{pH} 7.4$ 、 $500 \text{mM}$   $\text{NaCl}$ 、 $20 \text{mM}$  イミダゾール) によって平衡化し、ライセートをローディングし、それから30カラム体積の平衡化/洗浄緩衝液によって洗浄した。溶出緩衝液 ( $50 \text{mM}$  リン酸緩衝液  $\text{pH} 7.4$ 、 $500 \text{mM}$   $\text{NaCl}$ 、 $500 \text{mM}$  イミダゾール) によって蛋白質を溶出した。キナーゼの精製のためには、平衡化/洗浄および溶出緩衝液はリン酸緩衝液の代わりに  $50 \text{mM}$   $\text{Tris-HCl}$   $\text{pH} 7.5$  を用いた。溶出画分を SDS - P A G E によって分析し、蛋白質含量を B C A (Thermo Fisher Scientific) によって定量した。それから、画分を組み合わせ、緩衝液を1000体積の2×保存緩衝液による透析によって交換した。R N a s e R については、2×保存緩衝液は追加の  $500 \text{mM}$   $\text{NaCl}$  を添加した2×PBSからなった。T 7 R N A ポリメラーゼについては、2×保存緩衝液は2×PBSからなった。キナーゼについては、2×保存緩衝液は  $100 \text{mM}$   $\text{NaCl}$  を有する  $100 \text{mM}$   $\text{Tris-HCl}$   $\text{pH} 7.0$  からなった。透析後に、蛋白質を等体積の  $100\%$  グリセロールと混合し ( $50\%$  終濃度)、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

10

20

#### 細胞ライセート調製

【0199】

E. coli株 G L 1 6 - 1 7 0 ( B L 2 1 ( D E 3 ) . t 5 2 6 p g i . e d d . t k t B . t o l C \_ w t - 7 - E 1 . m g s A \* - F 3 . a p p A \* . a m n \* - F 1 . n a g D ( k e i o ) : : z e o R - 1 . p h o A \* . t 3 5 2 B A A 1 6 4 4 . u s h A \* - C 4 . r n a : : t o l C - B 0 4 ) および G L 1 4 - 3 2 2 ( B L 2 1 ( D E 3 ) . t 5 2 6 p g i . e d d . t k t B . t o l C \_ w t - 7 - E 1 . m g s A \* - F 3 . a p p A \* . a m n \* - F 1 . n a g D ( k e i o ) : : z e o R - 1 . p h o A \* . t 3 5 2 B A A 1 6 4 4 . u s h A : : t o l C - A 0 1 ) を、K o r z 培地によって10Lバイオリクター内でバッチ段階の終わりまで増殖させ、それから遠心によって収穫し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結した。ペレットを  $10\%$  乾燥細胞重量になるよう  $58.8 \text{mM}$  二塩基性リン酸カリウム中に再懸濁し、 $15,000 \text{psi}$  で4に冷却された PandaPLUS ホモジナイザー (GEA Niro Soavi) による2パスを用いて溶解した。ライセートを4における1時間の  $16,000 \times g$  での遠心によって清澄化し、蛋白質含量を  $-80^{\circ}\text{C}$  での保存前に B C A アッセイ (Thermo Fisher) によって分析した。

30

#### 外来性 R N a s e R によるライセートRNAの解重合

【0200】

G L 1 6 - 1 7 0 ライセート (蛋白質含量  $34.5 \text{mg}/\text{mL}$ ) および R N a s e R 溶液 ( $300 \text{mM}$  リン酸カリウム緩衝液  $\text{pH} 7.4$ 、 $200 \text{mM}$   $\text{KCl}$ 、 $2 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  中に  $1 \text{mg}/\text{mL}$ ) を2で予め平衡化した後に、反応を開始した。時間  $t = 0$  において、 $50 \mu\text{L}$  の E. coli ライセートおよび  $50 \mu\text{L}$  R N a s e R 溶液を混合し、予熱された  $37^{\circ}\text{C}$  ブロックに移すことによって反応を開始した。ライセートを水中の  $5 \times$  デオキシコール酸ナトリウム溶液の  $0.2$  体積と予め混合し、開始前に2で15分間インキュベートしたことを例外として、デオキシコール酸を包含する反応を上に記載されているようにアSEMBリした。開始後に、反応を  $37^{\circ}\text{C}$  でインキュベートし、 $10 \mu\text{L}$  を氷上の酸クエンチ溶液 ( $90 \mu\text{L}$  の  $0.2 \text{M}$  硫酸) に移すことによって定期的にサンプリングした。時系列の完了後に、クエンチされたサンプルを2における10分間の  $3,200 \times g$  での遠心によって清澄化した。解重合を第1に酸可溶性のヌクレオチドの吸光度によって定量した：クエンチおよび清澄化された反応の  $10 \mu\text{L}$  を UV 透明 96 ウェルハーフエリ

40

50

アプレート (Corning) 上で 160  $\mu$ L の 0.2 M 硫酸に追加した。酸可溶性のヌクレオチドを、マイクロプレートリーダーを用いて 260 nm の吸光度によって定量した (上参照)。解重合は 5'、2'、および 3' NMP の UPLC 分析によってもまた定量した: 各酸クエンチされたサンプルの 30  $\mu$ L を、10  $\mu$ L の 1 M KOH を追加することによって pH 中和し、それから、UPLC 分析前に 0.2  $\mu$ m フィルターに通した。トータルヌクレオチドプール (すなわち 100% 解重合) をライセート RNA のアルカリ加水分解によって決定した: 50  $\mu$ L ライセートを 150  $\mu$ L の 0.2 M 水酸化カリウムと組み合わせ、それから 99 °C で 20 分間加熱した。それから、アルカリ加水分解されたサンプルを上に記載されているようにクエンチし、分析した。

過剰発現された RNase R によるライセート中の RNA の解重合

10

【0201】

E. coli 株 GL16-170 を、C 末端ヘキサヒスチジンタグを有する E. coli rnr 遺伝子をコードする pETDuet-1 によって形質転換した。この株を、空の pETDuet-1 によって形質転換された GL16-170 と並べて、50 mg/L カルベニシリンを添加した Kory 培地によってバッチ段階で増殖させた。培養物を A600 = 2.0 において 0.8 mM IPTG によって誘導し、誘導時に追加の 10 g/L グルコースを添加した。誘導の 1 時間後に、バイオマスを遠心によって収穫し、凍結した。ライセートを上に記載されているように凍結されたバイオマスから調製した (蛋白質濃度: 空の pETDuet-1 を有する GL16-170 バイオマスでは 36.6 mg/mL; クローニングされた RNase R を持つ pETDuet-1 を有する GL16-170 では 53.2 mg/mL)。希釈ライセート中における解重合を、反応中の 50% ライセート終濃度について上に記載されているように算定した。濃縮されたライセート中における解重合を、9 体積のライセートを 1 体積の 10  $\times$  EDTA 溶液と 2 °C で 5 分間プレインキュベートすることによって算定した。それから、上に記載されているように予熱された 37 °C ブロックに移すこととサンプリングすることによって、反応を開始した。

20

NMP 安定性算定

【0202】

4 体積の GL14-322 ライセート (蛋白質濃度: 50.5 mg/mL) を 1 体積のホスファターゼ阻害剤溶液 (50 mM リン酸カリウム pH 7.4, 150 mM リン酸カリウム pH 7.4、または 10 mM オルトバナジン酸ナトリウムという終濃度) と氷上で組み合わせた。同位体標識した NMP (アデノシン-13C<sub>10</sub>, 15N<sub>5</sub> 5'- $\gamma$ -リン酸、シチジン-15N<sub>3</sub>-5'- $\gamma$ -リン酸、ウリジン-15N<sub>2</sub>-5'- $\gamma$ -リン酸、およびグアノシン-15N<sub>5</sub>-5'- $\gamma$ -リン酸 [Sigma-Aldrich]、各 25 mM) の等モル溶液を水中に調製した。ライセートおよび NMP を 37 °C に 10 分間平衡化した後に、反応を開始した。反応を開始するためには、90  $\mu$ L ライセート溶液を 10  $\mu$ L NMP 溶液に追加し、反応を良く混合した。反応は指定されているタイムポイントにおけるサンプリングによってモニターした。サンプリングの間には、反応混合物の 12  $\mu$ L を氷上の 108  $\mu$ L の 0.2 M 硫酸に移した。それから、クエンチされた反応を、上に記載されているように LC-MS 分析のために遠心によって清澄化、pH 中和、および濾過した。

30

熱不活性化の開発

40

【0203】

GL14-322 ライセートを氷上の 5 つのマイクロ遠心チューブに分注し、それから、所望の熱不活性化温度で平衡化されたヒートブロックに移した。指定されている時間において、チューブを氷上で冷却し、それから遠心 (5 分間の 21,000  $\times$  g) によって清澄化し、上清を収穫した。熱不活性化されたライセートからの上清を、NTP の等モル混合物 (Sigma-Aldrich、各 25 mM) と共に 37 °C で 10 分間平衡化した。時間 t = 0 において、9 体積の熱不活性化されたライセート上清を 1 体積の NTP 溶液と組み合わせ、反応を上に記載されているように酸クエンチ溶液中へのサンプリングによってモニターし、pH 中和し、濾過し、LC-MS によって分析した。ライセート中における転写反応では、酵素ミックスの低減された量 (最終反応体積の 5%) と熱不活性化されたライセート

50

上清（最終反応体積の40%）を包含することを例外として、10  $\mu$ L 反応をキット取扱説明にならって Mega Script T7 転写キット（Thermo Fisher）を用いて実施した。正のコントロール反応は Mega Script 反応緩衝液単独の中で実施し、一方、負のコントロール反応はライセートを包含したが、酵素ミックスを省いた。反応を 1 kb DNA ラダー（New England Biolabs）と並べて、SYBR Safe（Invitrogen）によって染色したアガロースゲル電気泳動によって分析した。

#### ヌクレオチドキナーゼ活性アッセイ

##### 【0204】

ヌクレオチドキナーゼを、50 mM Tris-HCl pH 7.0、4 mM MgSO<sub>4</sub>、4 mM ATP、および 4 mM の対応する NMP または NDP からなる緩衝液中において、様々な温度（37、50、60、70、および 80）でアッセイした。反応緩衝液（1.2  $\times$  濃縮液）および酵素溶液（0.5 mg/mL）を反応温度で 1 分間予め平衡化した後に、反応を開始した。時間  $t = 0$  において、80  $\mu$ L 反応緩衝液を 20  $\mu$ L 酵素と混合することによって反応を開始した。反応は指定されているタイムポイントにおけるサンプリングによってモニターした。サンプリングの間には、反応混合物の 15  $\mu$ L を氷上の 135  $\mu$ L の 0.2 M 硫酸に移した。反応の完了後に、サンプルを上に記載されているように 1 M KOH によって pH 中和し、それから氷冷水によって 1:10 希釈した。キット取扱説明にならって ATP 生物発光アッセイキット（Sigma-Aldrich）を用いて各サンプル中の ATP を定量した。ライセート中における反応のために、上のプロトコールを次のように修飾した：ライセートを個々の反応チューブに分注し、それから 15 分間の 70 でのインキュベーションによって熱不活性化した。反応緩衝液（2  $\times$  濃縮液）および熱不活性化されたライセートを反応温度で予め平衡化し、ライセートおよび反応緩衝液の等体積同士を組み合わせることによって反応を開始した。反応は個々の反応チューブを 9 体積の酸クエンチ溶液によってクエンチすることによってサンプリングし、それから上に記載されているように分析した。

##### 【0205】

ライセート中のキナーゼの組み合わせられた（すなわち、NMP から NTP への）活性をアッセイするために、各キナーゼを個々に発現するライセート同士を 1:1 比で混合し、10  $\mu$ L アリコートに分割し、それから上に記載されているように熱不活性化した。キナーゼ活性は、50 mM Tris-HCl pH 7.0、16 mM MgSO<sub>4</sub>、2 mM 各ヌクレオチドリン酸（AMP、CMP、UMP、および GMP）、および 16 mM ATP からなる緩衝液中において分析した。反応温度で予め平衡化した反応緩衝液（2  $\times$  濃縮液）を等体積のライセートと組み合わせて、反応を開始した。反応は 70 で実施し、個々の反応チューブを 9 体積の酸クエンチ溶液によってクエンチすることによってサンプリングし、それから上に記載されているように分析した。

#### ポリリン酸キナーゼ活性アッセイ

##### 【0206】

ポリリン酸キナーゼを、50 mM Tris-HCl pH 7.0、4 mM MgSO<sub>4</sub>、25 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1 mM ADP、および 1 mM ヘキサメタリン酸ナトリウムからなる緩衝液中において、様々な温度（37、50、60、70、および 80）でアッセイした。反応緩衝液（1.2  $\times$  濃縮液）および酵素溶液（0.25 mg/mL）を反応温度で 1 分間予め平衡化した後に、反応を開始した。時間  $t = 0$  において、80  $\mu$ L 反応緩衝液を 20  $\mu$ L 酵素と混合することによって反応を開始した。反応は指定されているタイムポイントにおけるサンプリングによってモニターした。サンプリングの間には、反応混合物の 15  $\mu$ L を氷上の 135  $\mu$ L の 0.2 M 硫酸に移した。反応の完了後に、サンプルを上に記載されているように 1 M KOH によって pH 中和し、それから氷冷水によって 1:10 希釈した。キット取扱説明にならって ATP 生物発光アッセイキット（Sigma-Aldrich）を用いて、各サンプル中の ATP を定量した。ライセート中における反応のために、上のプロトコールを次のように修飾した：ライセートを個々の反応チューブに分注し、それから 15 分間の 70 でのインキュベーションによって熱不活性

化した。反応緩衝液（2 × 濃縮液）および熱不活性化されたライセートを反応温度で予め平衡化し、等体積のライセートおよび反応緩衝液を組み合わせることによって反応を開始した。反応は個々の反応チューブを9体積の酸クエンチ溶液によってクエンチすることによってサンプリングし、それから上に記載されているように分析した。ライセート中における反応速度を、同じ反応条件下のコントロールライセート（過剰発現されたポリリン酸キナーゼなし）からのシグナルを差し引くことによって計算した。

#### 転写鑄型の生成

##### 【0207】

二重鎖DNA鑄型を合成gBlock DNA (Integrated DNA Technologies) のPCR増幅によって調製した。反応をイソプロパノール沈殿によって精製および濃縮した。

10

#### RNAポリメラーゼの絞り込み

##### 【0208】

市販のRNAポリメラーゼ同士を、各製造者が推奨する条件を用いて比較した。各50 μL反応は10 × 反応緩衝液（製造者によって供給）、NTP、DNA鑄型（0.5 μg）、および酵素からなった。NEB T7 RNAポリメラーゼについては、反応は0.5 mM各NTP、5 mM DTT、および100 U酵素を包含した。Thermo T7ポリメラーゼによる反応は、DTTを省いたことを例外として同一であった。MegaScript T7による反応は7.5 mMの各NTPおよび5 μL酵素ミックスを包含した。酵素濃度はBCAアッセイ (Thermo Fisher) によって決定した。反応は指定されているタイムポイントにおけるサンプリングによってモニターした。サンプリングの間には、反応混合物の10 μLをRNAクエンチ溶液（10 mM Tris-HCl pH 8.0、5 mM EDTA）の90 μLに移し、氷上で保存した。クエンチ溶液中のRNAサンプルを、キット取扱説明にならってQuant-iT RNAブロードレンジアッセイキット (Thermo Fisher) を用いて定量した。キット取扱説明にならってMegaScriptキットを用いて調製および精製された精製dsRNAの段階希釈物を用いて、定量化のための標準曲線を構築した。反応をアガロースゲル電気泳動によって定性的に分析した。

20

#### ライセート中におけるRNAポリメラーゼ評価

##### 【0209】

GL14-322ライセートを先に記載されているように熱不活性化し、遠心によって清澄化した。各20 μL反応は、清澄化されたライセート（7 μL）、10 × 補因子溶液（300 mM MgCl<sub>2</sub>、20 mM スペルミジン）、NTP（各7.5 mM、pH中和されたストック溶液から調製）、DNA鑄型（0.6 μg）、および酵素（1 μL）からなった。反応を37 または50 で1時間インキュベートし、それから9体積のRNAクエンチ溶液を追加することによってクエンチした。クエンチされた反応をさらにクエンチ溶液によって10倍希釈した（最終希釈：100倍）。それから、希釈した反応をQuant-iTキットを用いて定量した（上参照）。反応によって生産されたRNAを、コントロール反応（RNAポリメラーゼを省いた）において定量されたRNAを差し引くことによって計算した。

30

##### 【0210】

高密度ライセート中におけるRNAポリメラーゼアッセイを、次の修飾と共に、上に記載されているように実施した。各100 μL反応はライセート（67.5 μL）、10 × 補因子溶液（300 mM MgCl<sub>2</sub>、20 mM スペルミジン）、NTP（各7.5 mM、pH中和されたストック溶液から調製）、DNA鑄型（3 μg）、および酵素（10 μL）からなった。清澄化されていない反応マトリックス中において実施される反応では、GL14-322ライセート（67.5 μL）を個々の反応チューブに分注し、それから先に記載されているように熱不活性化した。追加の反応物を熱不活性化されたマトリックスに追加し、それから均質までボルテックスすることによって良く混合した。緩衝液中において実施される反応では、10 × 補因子溶液は300 mM MgCl<sub>2</sub>、20 mM スペルミジン、および400 mM DTTからなった。加えて、緩衝液のみの反応には50 mM リン酸カリウム pH 7.4 が包含された。全ての反応は50 で2時間インキュベートし

40

50

た。各反応からのサンプルは9体積のRNAクエンチ溶液を追加することによってクエンチし、それから最大スピード(21,000×g)での1分の遠心によって清澄化した。これらの反応からの上清をクエンチ溶液によってさらに40倍希釈し(最終希釈:400倍)、それからQuant-iTキットを用いて定量した(上参照)。

## 例2

### 【0211】

耐熱性PPK2酵素をE. coliでの発現のためにコドン最適化し、合成し、pETDuet-1(Novagen)にクローニングした。それから、プラスミドをGL16-170に形質転換した。コントロール株を生成するためには、空のpETDuet-1プラスミドをGL16-170に形質転換した。5mL溶原ブロス(LB)中における一晩の前培養後に、細胞密度がおおよそ0.5のOD<sub>600</sub>に達するまで、株を1LのLB中において37℃で培養した。それから培養物を氷上で手短に冷やし、イソプロピルチオガラクトピラノシド(IPTG)を0.25mMの終濃度で追加することによって、PPK2発現を誘導した。誘導後に、培養物を20℃でおおよそ16時間増殖させた。培養物を遠心によって収穫し、細胞ペレットを-80℃に保存した。凍結ペレットを融解することと、2ペレット体積の150mM MOPS-NaOH pH7中への再懸濁と、15,000psiでEmulsiFlex C3ホモジナイザー(Avestin)による4パスを用いるホモジナイゼーションとによって、ライセートを生産した。それから、ライセートを4℃における1時間の15,000×gでの遠心によって清澄化した。ライセートのアリコートを使用前に-80℃で凍結した。

### 【0212】

それから、熱不活性化されたライセート中の耐熱性PPK2活性を測定した。PPK2酵素を発現する融解したライセートを、第1に、1:10希釈されたD. geothermalis PPK2ライセートを例外として、コントロール株から調製されたライセートによって1:100希釈した。塩化マンガン(MnCl<sub>2</sub>)およびヘキサメタリン酸ナトリウム(HMP)の予冷溶液をそれぞれ10mMおよび1mMの終濃度で追加した。それから、予熱された70℃サーモサイクラーによる15分間のインキュベーションによってライセートを熱不活性化した。それから、熱不活性化されたライセートを10mM MnCl<sub>2</sub>、2mM アデノシン二リン酸(ADP)またはアデノシン一リン酸(AMP)、および9mM HMPからなる2×反応緩衝液の等体積と混合することによって、反応を開始した。反応を70℃でインキュベートし、反応混合物のアリコートを除去することと氷上の9部のクエンチ溶液(200mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)による希釈とによって、タイムポイントを取った。初期タイムポイント(t<sub>0</sub>)は、ライセートをクエンチ溶液と直接的に混合すること、クエンチされたライセートを氷上に15分間保存すること、それから2×反応緩衝液を追加することによって取った。アッセイの締め括りに、クエンチされたタイムポイント溶液を10分間の3,200×gでの遠心によって清澄化した。それから、3部のクエンチされた反応溶液を1部の中和溶液(1M KOH)と混合することによって、クエンチされた反応からの上清をpH中和した。それから、キット取扱説明にならってアデノシン5'-三リン酸(ATP)生物発光アッセイキット(Sigma-Aldrich cat#:FLAA)を用いる定量化前に、クエンチおよび中和されたサンプルを水によって1:10希釈した。PPK2含有反応中のATPの蓄積に基づき、コントロールライセートからのATP濃度を差し引いて、初期反応速度を計算した。

### 【0213】

5つのクラスIII PPK2酵素は、ライセート中において70℃で可溶性の発現、耐熱性、および高い反応速度を示した。代表的な発現および活性データが図22A~22Bに示されている。

### 【0214】

試験された各酵素の発現およびキネティクスデータの概要が表17に示されている。C. aerophila、Roseiflexus、A. thermophila、およびR. castenholzii酵素は、基質としてHMPを用いてAMPおよびADPを急速にATPに変換した。D. geothermalis酵素は

、AMPおよびADP基質両方について他の試験されたPPK2よりも大体20×低い変換速度を示した。

【表19-1】

表17. ライセート中の耐熱性クラスIII PPK2酵素の発現および速度データの概要

供給源の生物	可溶性の発現	V <sub>max</sub> (ADP) (mM ATP/hr)	V <sub>max</sub> (AMP) (mM ATP/hr)
<i>C. aerophila</i> DSM 14535	+	600	350

10

【表19-2】

<i>Roseiflexus sp.</i> RS-1	++	680	470
<i>A. thermophila</i> UNI-1	++	530	480
<i>D. geothermalis</i> DSM 11300	+++	21	17
<i>R. castenholzii</i> DSM 13941	+	530	370

20

### 例3

【0215】

それから、耐熱性*C. aerophila* PPK2を用いて、NMP、ADP、およびHMPからのdsRNAの無細胞的生産のためのATPを供給した。無細胞的なdsRNA合成反応を、表18に挙げられているキナーゼを個々に過剰発現する6つの*E. coli*ライセートの混合物によって実施した。

【表20】

表18. NMPおよびHMPからdsRNAを生産するために用いたキナーゼ。

基質(単数または複数)	供給源の生物	遺伝子
AMP	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>adk</i>
CMP	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>cmk</i>
GMP	<i>Thermotoga maritima</i>	<i>gmk</i>
UMP	<i>Pyrococcus furiosus</i>	<i>pyrH</i>
ADP, CDP, GDP, UDP	<i>Aquifex aeolicus</i>	<i>ndk</i>
AMP, ADP, HMP	<i>Caldilinea aerophila</i> DSM 14535	<i>ppk2</i>

30

40

【0216】

第1に、表18に挙げられているライセート同士を氷上において等体積で組み合わせた。塩化マンガン(MnCl<sub>2</sub>)、硫酸マグネシウム(MgSO<sub>4</sub>)、およびヘキサメタリン酸ナトリウム(HMP)の予冷溶液を、それぞれ0~2.5mM、30mM、および1mMの終濃度まで追加した。それから、予熱された70℃サーモサイクラーによる15分間のインキュベーションによってライセート混合物を熱不活性化した。反応を開始するためには、熱不活性化されたライセートを次のコンポーネントと組み合わせた: 20μLの総体積中に、ヌクレオチドリン酸(アデノシン5'-リン酸、シチジン5'-リン酸、ウリジン5'-リン酸、およびグアノシン5'-リン酸。各2mM)の等モル混合物、

50

50 mM Tris pH 7.0, 30 mM MgSO<sub>4</sub>, 0 ~ 2.5 mM MnCl<sub>2</sub>; 1 mM アデノシン 5' - ニリン酸、2 mM スペルミジン、1.5 μg プラスミド DNA 鋳型、および 3 μg 耐熱性 T7 RNA ポリメラーゼ (S430P, F849I, F880Y)。コントロールとして、dsRNA を 2 mM NTP の等モル混合物から合成した (ライセート、ADP、および HMP は省いた)。追加のコントロールとして、dsRNA を 2 mM NMP の等モル混合物から合成した (PPK2 発現ライセート、ADP、および HMP は省いたが、エネルギー供給源として 8 mM ATP を包含した)。負のコントロールとして、ポリメラーゼを省いた二重の反応を実施した。全ての反応は 50 °C で 2 時間 インキュベートし、それから 9 体積の TE + 緩衝液 (10 mM Tris - HCl pH 8.0, 5 mM EDTA) の追加によって停止させた。サンプルを等体積の 2 × RNA ローディング色素 (New England Biolabs) と混合し、70 °C に 10 分間加熱し、アガロース / TAE ゲル電気泳動が後続した。

10

## 【0217】

図 23 に示されているように、所望の dsRNA 産物を、緩衝液中において NTP を用いて (左のレーン)、ヌクレオチドキナーゼ発現ライセート中において NMP および ATP から (真ん中のレーン)、ヌクレオチドキナーゼおよびポリリン酸キナーゼ発現ライセート中において NMP および HMP から (右のレーン) 生産した。塩化マンガンはいずれかの反応に要求されず、*C. aerophila* 酵素が補因子として Mn<sup>2+</sup> および Mg<sup>2+</sup> を利用し得るということを実証した。よって、Mn<sup>2+</sup> は *C. aerophila* PPK2 を含有する無細胞的反応のためにアプリアリには要求されない。

20

## 【0218】

図 24 に示されているように、所望の dsRNA 産物を、緩衝液中において NTP を用いて (左のレーン)、ヌクレオチドキナーゼ発現ライセート中において NMP および ATP から (真ん中のレーン)、ヌクレオチドキナーゼおよびポリリン酸キナーゼ発現ライセート中において NMP および HMP から (右のレーン) 生産した。NMP および HMP からの dsRNA 生産は外来性 ADP または *T. thermophilus* AMP キナーゼを要求しなかった。よって、*C. aerophila* PPK2 は、無細胞的反応によって NMP および HMP から dsRNA を生産するために 5 - キナーゼシステムの一部として用いられ得る。

## 他の態様

## 【0219】

請求項において、「a」、「an」、および「the」などの冠詞は、それと反対に示されないかまたは文脈から別様に明白でない限り、1 つまたは 1 つよりも多くを意味し得る。群の 1 つ以上のメンバーの間に「または」を包含する請求項または記載は、それと反対に示されないかまたは文脈から別様に明白でない限り、群のメンバーの 1 つ、1 つよりも多く、または全てが所与の産物またはプロセスに存在するか、使用されるか、または別様に関係する場合には、満足されると見なされる。本発明は、群の厳密に 1 つのメンバーが所与の産物またはプロセスに存在するか、使用されるか、または別様に関係する態様を包含する。本発明は、群のメンバーの 1 つよりも多くまたは全てが所与の産物またはプロセスに存在するか、使用されるか、または別様に関係する態様を包含する。

30

## 【0220】

さらにその上、本発明は、列記されている請求項の 1 つ以上から 1 つ以上の限定、要素、節、および記述用語が別の請求項に導入される全ての変形、組み合わせ、および順序を包含する。例えば、別の請求項に従属するいずれかの請求項は、同じ元の請求項に従属するいずれかの他の請求項に見出される 1 つ以上の限定を包含するように修飾され得る。要素がリストとして、例えばマーカッシュ群フォーマットで提出されているところでは、要素の各下位群もまた開示され、いずれかの要素 (単数または複数) は群から除去され得る。一般的に、本発明または本発明の側面が特定の要素および / または特徴を含むと言われるところでは、ある種の本発明の態様または本発明の側面がかかる要素および / または特徴からなるかまたは本質的になるということが理解されるべきである。単純の目的のために、それらの態様は本明細書において一々具体的には提示しなかった。用語「含む」および

40

50

「含有する」は開放的であることが意図されており、追加の要素またはステップの包含を許可するという事ともまた注意される。範囲が与えられているところでは、エンドポイントが包含される。さらにその上、別様に示されていないかまたは文脈および当業者の理解から別様に明白でない限り、範囲として表現されている値は、文脈が明らかに別様に指示しない限り、本発明の異なる態様において、述べられている範囲内のいずれかの具体的な値または部分範囲を、範囲の下限の単位の 1 / 10 までとり得る。

#### 【0221】

本明細書は種々の発行済み特許、公開特許出願、雑誌記事、および他の刊行物を参照し、その全ては参照によって本明細書に組み込まれる。組み込まれる参照のいずれかと本明細書との間に矛盾がある場合には、本明細書がコントロールするものとする。加えて、従来技術のうちである本発明のいずれかの特定の態様は請求項のいずれか 1 つ以上から明示的に除外され得る。かかる態様は当業者に公知であると判断されるので、それらは、除外が本明細書において明示的に提示されていない場合であっても除外され得る。本発明のいずれかの特定の態様は、従来技術の存在に関するか否かにかかわらず、いずれかの請求項からいずれかの理由で除外され得る。

10

#### 【0222】

当業者は、本明細書に記載される具体的な態様の多くの均等物を認識するか、またはせいぜい慣例の実験作業を用いて確かめることができるであろう。本明細書に記載される本態様の範囲は上の明細書に限定されることを意図されず、むしろ添付の請求項に提示されている通りである。当業者は、次の請求項に定められている本発明の趣旨または範囲から外れることなしに、本明細書の種々の変化および修飾がなされ得るということを理解するであろう。

20

#### 参考文献

1. Maekewa K., Tsunasawa S., Dibo G., Sakiyama F. 1991. "Primary structure of nuclease P1 from *Penicillium citrinum*." *Eur. J. Biochem.* 200:651-661.
2. Volbeda A., Lahm A., Sakiyama F., Suck D. 1991. Crystal structure of *Penicillium citrinum* P1 nuclease at 2.8-Å resolution. *EMBO J.* 10:1607-1618(1991)
3. Romier C., Dominguez R., Lahm A., Dahl O., Suck D. 1998. Recognition of single-stranded DNA by nuclease P1: high resolution crystal structures of complexes with substrate analogs. *Proteins* 32:414-424
4. Cheng Z.F., Deutscher M.P. 2002. Purification and characterization of the *Escherichia coli* exoribonuclease RNase R. Comparison with RNase II. *J. Biol. Chem.* 277:21624-21629.
5. Zilhao R., Camelo L., Arraiano C.M. 1993. DNA sequencing and expression of the gene *rnb* encoding *Escherichia coli* ribonuclease II. *Mol. Microbiol.* 8:43-51
6. March P.E., Ahnn J., Inouye M. 1985. The DNA sequence of the gene (*rnc*) encoding ribonuclease III of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 13:4677-4685
7. Chen S.M., Takiff H.E., Barber A.M., Dubois G.C., Bardwell J.C., Court D.L. 1990. Expression and characterization of RNase III and Era proteins. Products of the *rnc* operon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265:2888-2895
8. Robertson H.D., Webster R.E., Zinder N.D. 1968. Purification and properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 243:82-91.
9. Molina L., Bernal P., Udaondo Z., Segura A., Ramos J.L. 2013. Complete Genome Sequence of a *Pseudomonas putida* Clinical Isolate, Strain H8234. *Genome Announc.* 1:E00496-13 ; および Cheng, Z.F. and M.P. Deutscher. 2002. Purification and characterization of the *Escherichia coli* exoribonuclease RNase R. Comparison with RNase II. *J Biol Chem.* 277(24).
10. Even S., Pellegrini O., Zig L., Labas V., Vinh J., Brechemmier-Baey D., Putzer H. 2005. Ribonucleases J1 and J2: two novel endoribonucleases in *B. subtilis* with functional homology to *E. coli* RNase E. *Nucleic Acids Res.* 33:2141-2152.

30

40

50

11. Li de la Sierra-Gallay I., Zig L., Jamalli A., Putzer H. 2008. Structural insights into the dual activity of RNase J. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:206-212.
12. Ball T.K., Saurugger P.N., Benedick M.J. 1987. The extracellular nuclease gene of *Serratia marcescens* and its secretion from *Escherichia coli*. *Gene* 57: 183-192.
13. Biedermann K., Jepsen P.K., Riise E., Svendsen I. 1989. Purification and characterization of a *Serratia marcescens* nuclease produced by *Escherichia coli*. *Carlsberg Res. Commun.* 54:17-27.
14. Shlyapnikov S.V., Lunin V.V., Perbandt M., Polyakov K.M., Lunin V.Y., Levikov V.M., Betzel C., Mikhailov A.M. 2000. Atomic structure of the *Serratia marcescens* endonuclease at 1.1 Å resolution and the enzyme reaction mechanism. *Acta Crystallogr. D* 56:567-572. 10
15. Zuo Y., Deutscher M.P. 2002. Mechanism of action of RNase T. I. Identification of residues required for catalysis, substrate binding, and dimerization. *J. Biol. Chem.* 277:50155-50159.
16. Zuo Y., Zheng H., Wang Y., Chruszcz M., Cymborowski M., Skarina T., Savchenko A., Malhotra A., Minor W. 2007. Crystal structure of RNase T, an exonuclease involved in tRNA maturation and end turnover. *Structure* 15:417-428.
17. Huang S., Deutscher M.P. 1992. Sequence and transcriptional analysis of the *Escherichia coli* *rnt* gene encoding RNase T. *J. Biol. Chem.* 267:25609-25613. 20
18. Chauhan A.K., Miczak A., Taraseviciene L., Apirion D. 1991. Sequencing and expression of the *rne* gene of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 19:125-129.
19. Cormack R.S., Genereaux J.L., Mackie G.A. 1993. RNase E activity is conferred by a single polypeptide: overexpression, purification, and properties of the *ams/rne/hmpl* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:9006-9010.
20. Meador J. III, Kennell D. 1990. Cloning and sequencing the gene encoding *Escherichia coli* ribonuclease I: exact physical mapping using the genome library. *Gene* 95:1-7.
21. Awano N., Rajagopal V., Arbing M., Patel S., Hunt J., Inouye M., Phadtare S. 2010. *Escherichia coli* RNase R has dual activities, helicase and RNase. *J. Bacteriol.* 192:1344-1352. 30
22. Regnier P., Grunberg-Manago M., Portier C. 1987. Nucleotide sequence of the *pnp* gene of *Escherichia coli* encoding polynucleotide phosphorylase. Homology of the primary structure of the protein with the RNA-binding domain of ribosomal protein S1. *J. Biol. Chem.* 262:63-68.
23. Kimhi Y., Littauer U.Z. 1968. Purification and properties of polynucleotide phosphorylase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 243:231-240.
24. Shi Z., Yang W.Z., Lin-Chao S., Chak K.F., Yuan H.S. 2008. Crystal structure of *Escherichia coli* PNPase: central channel residues are involved in processive RNA degradation. *RNA* 14:2361-2371. 40
25. Thaller M.C., Schippa S., Bonci A., Cresti S., Rossolini G.M. 1997. Identification of the gene (*aphA*) encoding the class B acid phosphatase/phosphotransferase of *Escherichia coli* MG1655 and characterization of its product. *FEMS Microbiol. Lett.* 146:191-198.
26. Forleo C, Benvenuti M., Calderone V., Schippa S., Docquier J.D., Thaller M.C., Rossolini G.M., Mangani S. 2003. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray characterization of the class B acid phosphatase (AphA) from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr. D* 59:1058-1060.
27. Shuttleworth H., Taylor J., Minton N. 1986. Sequence of the gene for alka 50

- line phosphatase from *Escherichia coli* JM83. *Nucleic Acids Res.* 14:8689-8689.
28. Bradshaw R.A., Cancedda F., Ericsson L.H., Neumann P.A., Piccoli S.P., Schlesinger M.J., Shriefer K., Walsh K.A. 1981. Amino acid sequence of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3473-3477.
29. Li C., Ichikawa J.K., Ravetto J.J., Kuo H.-C., Fu J.C., Clarke S. 1994. A new gene involved in stationary-phase survival located at 59 minutes on the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* 176:6015-6022.
30. Kuznetsova E., Proudfoot M., Gonzalez C.F., Brown G., Omelchenko M.V., Borozan I., Carmel L., Wolf Y.I., Mori H., Savchenko A.V., Arrowsmith C.H., Koonin E.V., Edwards A.M., Yakunin A.F. 2006. Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family. *J. Biol. Chem.* 281:36149-36161. 10
31. Burns D.M., Beacham I.R. 1986. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *E. coli* *ushA* gene, encoding periplasmic UDP-sugar hydrolase (5'-nucleotidase): regulation of the *ushA* gene, and the signal sequence of its encoded protein product. *Nucleic Acids Res.* 14:4325-4342.
32. Knoefel T., Straeter N. 1999. X-ray structure of the *Escherichia coli* periplasmic 5'-nucleotidase containing a dimetal catalytic site. *Nat. Struct. Biol.* 6:448-453.
33. Tremblay L.W., Dunaway-Mariano D., Allen K.N. 2006. Structure and activity analyses of *Escherichia coli* K-12 *NagD* provide insight into the evolution of biochemical function in the haloalkanoic acid dehalogenase superfamily. *Biochemistry* 45:1183-1193. 20
34. Golovan S., Wang G., Zhang J., Forsberg C.W. 2000. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* *appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Can. J. Microbiol.* 46:59-71.
35. Greiner R., Jany K.-D. 1991. Characterization of a phytase from *Escherichia coli*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 372:664-665.
36. El Bakkouri M, Gutsche I, Kanjee U, Zhao B, Yu M, Goret G, Schoehn G, Burmeister WP, Houry WA. 2010. Structure of RavA MoxR AAA+ protein reveals the design principles of a molecular cage modulating the inducible lysine decarboxylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(52);22499-504. PMID: 21148420 30
37. Tchigvintsev A, Tchigvintsev D, Flick R, Popovic A, Dong A, Xu X, Brown G, Lu W, Wu H, Cui H, Dombrowski L, Joo JC, Beloglazova N, Min J, Savchenko A, Caudy AA, Rabinowitz JD, Murzin AG, Yakunin AF. 2013. Biochemical and structural studies of conserved maf proteins revealed nucleotide pyrophosphatases with a preference for modified nucleotides. *Chem Biol* 20(11);1386-98. PMID: 24210219 40
38. Zhang J., Inouye M. 2002. *MazG*, a nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase, interacts with *Era*, an essential GTPase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184:5323-5329.
39. Smallshaw J.E., Kelln R.A. 1992. Cloning, nucleotide sequence and expression of the *Escherichia coli* K-12 *pyrH* gene encoding UMP kinase. *Life Sci. Adv. (Genet.)* 11:59-65.
40. Briozzo P., Evrin C., Meyer P., Assairi L., Joly N., Barzu O., Gilles A.-M. 2005. Structure of *Escherichia coli* UMP kinase differs from that of other nucleoside monophosphate kinases and sheds new light on enzyme regulation. *J. Biol. Chem.* 280:25533-25540. 50

41. Masui R., Kurokawa K., Nakagawa N., Tokunaga F., Koyama Y., Shibata T., Oshima T., Yokoyama S., Yasunaga T., Kuramitsu S. Complete genome sequence of *Thermus thermophilus* HB8. Submitted (NOV-2004) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
42. Marco-Marin C., Escamilla-Honrubia J.M., Rubio V. 2005. First-time crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a bacterial-archaeal type UMP kinase, a key enzyme in microbial pyrimidine biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1747:271-275.
43. Marco-Marin C., Escamilla-Honrubia J.M., Rubio V. 2005. First-time crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a bacterial-archaeal type UMP kinase, a key enzyme in microbial pyrimidine biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1747:271-275. 10
44. Fricke J., Neuhard J., Kelln R.A., Pedersen S. 1995. The *cmk* gene encoding cytidine monophosphate kinase is located in the *rpsA* operon and is required for normal replication rate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:517-523.
45. Briozzo P., Golinelli-Pimpaneau B., Gilles A.M., Gaucher J.F., Burlacu-Miron S., Sakamoto H., Janin J., Barzu O. 1998. Structures of *Escherichia coli* CMP kinase alone and in complex with CDP: a new fold of the nucleoside monophosphate binding domain and insights into cytosine nucleotide specificity. *Structure* 6:1517-1527. 20
46. Maeder D.L., Weiss R.B., Dunn D.M., Cherry J.L., Gonzalez J.M., DiRuggiero J., Robb F.T. 1999. Divergence of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *P. horikoshii* inferred from complete genomic sequences. *Genetics* 152:1299-1305.
47. Gentry D, Bengra C, Ikehara K, Cashel M. 1993. Guanylate kinase of *Escherichia coli* K-12." *J Biol Chem* 1993;268(19); 14316-21. PMID: 8390989.
48. Hible G, Daalova P, Gilles AM, Cherfils J. 2006. Crystal structures of GMP kinase in complex with ganciclovir monophosphate and Ap5G." *Biochimie* 88(9); 1157-64. PMID: 16690197
49. Nelson K.E., Clayton R. A., Gill S.R., Gwinn M.L., Dodson R.J., Haft D.H., Hickey E.K., Peterson J.D., Nelson W.C., Ketchum K.A., McDonald L.A., Utterback T.R., Malek J.A., Linher K.D., Garrett M.M., Stewart A.M., Cotton M.D., Pratt M.S. Fraser C.M. 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399:323-329. 30
50. Brune M., Schumann R., Wittinghofer F. 1985. Cloning and sequencing of the adenylate kinase gene (*adk*) of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 13:7139-7151.
51. Berry M.B., Bae E., Bilderback T.R., Glaser M., Phillips G.N. Jr. 2006. Crystal structure of ADP/AMP complex of *Escherichia coli* adenylate kinase. *Proteins* 62:555-556. 40
52. Henne A., Brueggemann H., Raasch C, Wiezer A., Hartsch T., Liesegang H., Johann A., Lienard T., Gohl O., Martinez-Arias R., Jacobi C., Starkuviene V., Schlenczeck S., Dencker S., Huber R., Klenk H.-P., Kramer W., Merkl R., Gottschalk G., Fritz H.-J. 2004. The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* 22:547-553.
53. Tan ZW, Liu J, Zhang XF, Meng FG, Zhang YZ. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2010. Expression, purification and enzymatic characterization of adenylate kinase of *Thermus thermophilus* HB27 in *Escherichia coli*. *Jan*;30(1):1-6
54. Moffatt B.A., Dunn J.J., Studier F.W. 1984. Nucleotide sequence of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 173:265-269. 50

55. Sousa R., Chung Y.J., Rose J.P., Wang B.-C. 1993. Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3-Å resolution. *Nature* 364:593-599.
56. Mindich L., Nemhauser I., Gottlieb P., Romantschuk M., Carton J., Frucht S., Strassman J., Bamford D.H., Kalkkinen N. 1988. Nucleotide sequence of the large double-stranded RNA segment of bacteriophage phi 6: genes specifying the viral replicase and transcriptase. *J. Virol.* 62:1180-1185.
57. McGraw N.J., Bailey J.N., Cleaves G.R., Dembinski D.R., Gocke C.R., Joliffe L.K., Macwright R.S., McAllister W.T. 1985. Sequence and analysis of the gene for bacteriophage T3 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 13:6753-6766.
58. Kotani H, Ishizaki Y., Hiraoka N., Obayashi A. 1987. Nucleotide sequence and expression of the cloned gene of bacteriophage SP6 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 15:2653-2664.

10

配列

E. coli RNase R

MSQDPFQEREAEKYANPIPSREFILEHLTKREKSPASRDELAVELHIEGEEQLEGLRRRLR  
 AMERDGQLVFTRRQCYALPERLDLVKGTVIGHRDGYGFLRVEGRKDDLYLSSEQMKTCIH  
 GDQVLAQPLGADRKGRREARIVRVLPKTSQIVGRYFTEAGVGFVVPDDSRLSFDILIPP  
 DQIMGARMGFVVVELTQRPTRRTKAVGKIVEVLGDNMGTGMAVDIALRTHIPIYWPQ  
 A

VEQQVAGLKEEVPEEAKAGRVDLRDLPLVTIDGEDARDFDDAVYCEKRRGGGWRLWVAI  
 A

20

DVSYVVRPSTPLDREARNRGTSVYFSPQVIPMLPEVLSNGLCSLNPQVDRLCMVCEMTVS  
 SKGRLTGYKFYEAVMSSHARLTYTKVWHILQGDQDLREQYAPLVKHLEELHNLYKVLDK  
 A

REERGGISFESEEAKFIFNAERRIERIEQTQRNDAHKLIEECMILANISAARFVEKAKEP  
 ALFRIHDKPSTEAITSFERSVLAELGLELPGGNKPEPRDYAELLESVADRPDAEMLQTMILL  
 RSMKQAIYDPENRGHFGLALQSYAHFTSPIRRYPDLTLHRAIKYLLAKEQGHQGNTTETG  
 GYHYSMEEMQLQGHCMAERRADEATRVDWLVKCDFMLDQVGNVFKGVISSVTGFG  
 FF

VRLDDLFDGLVHVSSLDNDYYRFDQVGQRLMGESSGQTYRLGDRVEVRVEAVNMDERKI  
 DFSLISSERAPRNVGKTAREKAKKGDAGKKGKRRQVGKKNVFEPSAFRGEKKTCPKAA  
 KKDARKAKKPSAKTQKIAAATKAKRAAKKVAE (配列番号 1)

30

T. elongatus Ppk (PPK1)

MPSAKSPRRKAPEPIDLDNPQYYFNRSLSWLEFNKRVLHEAYDPRTPLLERLKFMAIFSS  
 NLDEFFMVRVAGLQKQVESGILQVGADGMPPAEQLQAVRQYLLPIVTEQHRYFDQELRAL  
 LAKESIFLTRFNELTPEQQAYLNDYFQAQVFPVLTPLAVDPAHPFPYISSLSLNLAVLIR  
 DPESGQERLARVKVPNQFPFVALPQHLHSPQGVHWLGVPLEEIIAHNLSALFPGMEIEA  
 YFAFRITRSADLELETDKADDLLIAIEQEIRKRRFGSVVRLEVQRGIPLLRQTLMEEMD  
 LEEIDVYELEGLLCLNDLFAFMGLPLPQFKDPEWQPQVPPSFQRVEERESMFDTSSEITT  
 LGTDYWEAVANELFSLIREGDIIVHHPYHSFAATVQRFITLAAHDPQVLAIKITLYRTSG  
 DSPIVSALIKAAENGKQVAVLVELKARFDEENNILWARKLEKGVHVYVYVGPGLKTHTKT  
 VLVVRQEAGQIRRYVHIGTGNYNPKTASLYEDLGLFSCREELGADLSELFNVLTGYARQR  
 DYRKLLVAPVTMRDRTLQLIYREIEHARNGQPARIIAKMNAITDTQVIRALYEASQAGVD  
 IDLIIRGMCLRPVPGVSDRIRVISIIGRFLEHSRIFYFGNNGDPEYYIGSADWRSRNL  
 DRRVEAITPIEDPAIQLELKERLEIMLADNRQAWELQPDGTYRQRQPAPGEAERGTHSVL  
 MARTLKDVQGS (配列番号 2)

40

P. furiosus Umk

MRIVFDIGGSVLVPENPDIDFIKEIAYQLTKVSEDHEVAVVVGGGKLARKYIEVAEKFNSS  
 TFKDFIGIQITRANAMLLIAALREKAYPVVVEDFWAWKAVQLKKIPVMGGTHPGHTTD  
 AVA

50

ALLAEFLKADLLVVITNVDGVYTADPKKDPTAKKIKKMKPEELLEIVGKGIEKAGSSSIDP  
LAAKIIARSGIKTIVIGKEDAKDLFRVIKGDHNGTTIEP (配列番号 3)

*T. thermophilus* Cmk

MRGIVTIDGPSASGKSSVARRVAAAALGVVYLLSSGLLYRAAAFLALRAGVDPGDEEGLLAL  
LEGLGVRLLAQAEGNRVLADGEDLTSFLHTPEVDRVVSARLPGVRAWVNRRLKEVPPP  
FVAEGRDMGTAVFPEAAHKFYLTASPEVRAWRRARERPQAYEEVLRDLLRRDERDKAQS  
A

PAPDALVLDTGGMTLDEVVAWVLAHIRR (配列番号 4)

*T. maritima* Gmk

MKGQLFVICGPGSAGKTSIIKEVLKRLDNVVFVSVCTTRPKRPHEEDGKDYFFITEEEFL  
KRVERGEFLEWARVHGHLYGTLRSFVESHINEGKDVLDIDVQGALSVMKKYSNTVFIYV  
APPSYADLRERILKRGTEKEADVLRLENAKWELMFMDEFDYIVNENLEDAVEMVVSIV  
RSERAKVTRNQDKIERFKMEVKGWKKL (配列番号 5)

10

*T. thermophilus* Adk

MDVGQAVIFLGGPGAGKGTQASRLAQELGFKKLSTGDILRDHVARGTPLGERVRPIMERG  
DLVPPDLLILELIREELAERVIFDGFPRTLAQAEALDRLLSETGTRLLGVVLEVPPEEELV  
RRILRRAELEGRSDDNEETVRRRLEVYREKTEPLVGYEARGLKRVLDGLGTPDEVYARI  
RAALGI (配列番号 6)

*A. aeolicus* Ndk

MAVERTLIIVKPDAMEKALGKILDRFIQEGFQIKALKMFRFTPEKAGEFYVHRERPPF  
QELVEFMSSGPVVAALVEGEDAIKRVREIIGPTDSEARKVAPNSIRAQFGTDKGNAIH  
ASDSPESAQYEICFIFSGLEIV (配列番号 7)

20

*Meiothermus ruber* DM 1279 PPK2

MGFCSIEFLMGAQMKKYRVQPDGRFELKRFDPDDTSAFEGGKQAALAVLNRRLEKL  
QEL

LYAEGQHKVVLVQLAMDAGGKDGTVRVVFDGVNPSGVRVASFGVPTAQELARDYLWRV  
HQQV

PRKGELVIFNRSHYEDVLVVRVKNLVPQQVWQKRYRHIREFERMLADEGTTILKFFLHIS  
KD

EQRQRLQERLDNPEKRWKFRMGDLEDRRLWDRYQEAYEAAIRETSTEYAPWYVIPANK  
NWYR

30

NWLVSILVETLEGLAMQYPQPETASEKIVIE (配列番号 8)

*Meiothermus silvanus* DSM 9946 PPK2

MAKTIGATLNLQDIDPRSTPGFNGDKEKALALLEKLTARLDELQEQLYAEHQHRVLVILQ  
GM

DTSGKDGTVRHVFNVDPLGVRVVAFAKAPTPPELERDYLWRVHGHVPANGELVIFNRSH  
YED

VLVARVHNLVPPAIWSRRYDHINAFKMLVDEGTTVLKFFLHISKEEQKKRLLERLVEAD  
KH

WKFDPPQDLVERGYWEDYMEAYQDVLDKTHYQYAPWHVIPADRKWRNLQVSRLLEVA  
LEGLR

40

MKYPRPKLNIPRLKSELEKM (配列番号 9)

*Deinococcus geothermalis* DSM 11300 PPK2

MQLDRYRVPPGQRVRLSNWPTDDDGGLSKAEGEALLPDLQQRANLQERLYAESQAL  
LIVL

QARDAGGKDGTVKHVIGAFNPSGVQVSNFKVPTEEERAHDFLWRIHRQTPRLGMIGVFN  
RSQ

YEDVLVTRVHHLIDDQTAQRRLKHICAFESLLTDSGTRIVKFYLVHISPEEQKKRLEARLADP  
SKHWKFNPGDLQERAHWDAYTAVYEDVLTSTPAAPWYVVPADRKWRNLLVSQILVQ

TLEE

50

MNPQFPAPAFNAADLRIV ( 配列番号 1 0 )

*Thermosynechococcus elongatus* BP-1 PPK2

MIPQDFLDEINPDRYIVPAGGNFHWKDYDPGDTAGLKSKEVAQELLAAGIKKLAAYQDV  
LYA

QNIYGLLIIFQAMDAAGKDSTIKHVMSGLNPQACRVYSFKAPSAEELDHDFLWRANRALP  
ER

GCIGIFNRSYYEEVLVVRVHPDLLNRQQLPPETKTKHIWKERFEDINHYERYLTRNGILILK  
FFLHISKAQKRFLEIRSRPEKNWKFSIEDVRDRAHWDDYQQAYADVFRHTSTKWAPW  
HII

PANHKWFARLMVAHFYQKLASLNLHYPMLSEAHREQLLEAKALLENEPDED ( 配列番  
号 1 1 )

*Anaerolinea thermophila* UNI-1 PPK2

MGEAMERYFIKPGKVRKDWSPDPKDFEGDKESTRAAVAELNRKLEVLQERLYAERK  
HKV

LVILQGMDSGKDGVIKRVFEGVNPQGVKVANFKVPTQEELDHDYLWRVHKVVPKGEI  
VIF

NRSHYEDVLVVRVHNLVPPEVWKKRYEQINQFERLLHETGTTILKFFLFISREEQKQRLL  
ER

LADPAKHWFNPGDLKERALWEEYEKAYEDVLSRTSTEYAPWILVPADKKWYRDWVIS  
RVLV

ETLEGLEIQLPPPLADAETYRRQLLEEDAPESR ( 配列番号 1 2 )

*Caldilinea aerophila* OSM 14535 PPK2

MDVDRYRVPPGSTIHLSQWPPDDRSLYEGDKKQKQDLSALNRRLETQELLYAEGKHK  
VLI

ILQGMDSGKDGVIKRVFNGVNPQGVKVASFKVPTAVELAHDFLWRIHRQTPGSGEIVIF  
NR

SHYEDVLVVRVHGLVPPEVWARRYEHINAFKLLVDEGTTILKFFLHISKEEQRQRLLER  
LE

MPEKRWKFSVGDLAERKRWDEYMAAYEAVLSKTSTEYAPWYIVPSDRKWYRNLVISHV  
IINA

LEGLNMRYQPEDIAFDTIVIE ( 配列番号 1 3 )

*Chlorobaculum tepidum* TLS PPK2

MKLDLDAFRIQPGKKNLAKRPRTRIDPVYRSKGEYHELLANHVAELSKLQNVLYADNRY  
AIL

LIFQAMDAAGKDSAIAKHVMSGVNPQGCQVYSFKHPSATELEHDFLWRTNCVLPERGRIGI  
FN

RSYYEEVLVVRVHPEILEMQNIPHNLAHNGKVDHRYRSIVSHEQHLHCNGTRIVKFYL  
HLS

KEEQRKRFLERIDDPNKNWKFSTADLEERKFDQYMEAYESCLQETSTKDSPWFVAVPAD  
DKK

NARLIVSRIVLDTLESLNLKYPEPSPERRKELDIRKRELPENGGK ( 配列番号 1 4 )

*Oceanithermus profundus* DSM 14977 PPK2

MDVSRYRVPPGSGFDPEAWPTREDDDFAGGKKEAKKELARLAVRLGELQARLYAEGRQA  
LLI

VLQGMDSGKDGVIKRVFRAVNPQGVVTSFKKPTALELAHDYLWRVHRHAPARGEIGI  
FNR

SHYEDVLVVRVHELVPPEVWGRRYDHINAFERLLADEGTRIVKFFLHISKDEQKRRLEAR  
LE

NPRKHWKFNPADLSERARWGDYAAAYAEALSRTSSDRAPWYAVPADRWQRNRIVAQ  
VLVDA

10

20

30

40

50

LEAMDPRFPRVDFDPASVRVE ( 配列番号 1 5 )

*Roseiflexus castenholzii* DSM 13941 PPK2

MYAQRVVPGMRVRLHDIDPDANGGLNKDEGRARFAELNAELDVMQEELYAAGIHALLI  
LQG

MDTAGKDGAIKRVMLNLPQGCRVESFKVPTEEELAHDFLWRVHRVPRKGMVGVFNR  
SHYE

DVLVVRVHSLVPESVWRARYDQINAFERLLADTGTIIVKCFLHISKEEQEQRLARERDVS  
K

AWKLSAGDWRERAFWDDYMAAYEEALTRCSTDYAPWYIIPANRKWYRDLAISEALVET  
LRPY

10

RDDWRRALDAMSRARRAELEAFRAEQHAMEGRPQGAGGVSRR ( 配列番号 1 6 )

*Roseiflexus* sp. RS-1 PPK2

MHYAHTVIPGTQVRLRDIDPDASGGLTKDEGRERFASFNATLDAMQEELYAAGVHALLI  
LQ

GMDTAGKDGAIKRVMLNLPQGCRVESFKVPTEEELAHDFLWRVHKVPRKGMVGVF  
NRSHY

EDVLVVRVHSLVPEHVWRARYDQINAFERLLTDTGTIIVKCFLHISKDEQEKRLAREQD  
VT

KAWKLSAGDWRERERWDEYMAAYEEALTRCSTEYAPWYIIPANRKWYRDLAISEVLVET  
LRP

20

YRDDWQRALDAMSQARLAELKAFRHQQTAGATRL ( 配列番号 1 7 )

*Truepera radiovictrix* DSM 17093 PPK2

MSQGSAGKGLGKLDKKVYARELALLQLELVKLQGWIKAQGLKVVVLFEGRDAAGKGSTIT  
RIT

QPLNPRVCRVVALGAPTERERTQWYFQRYVHHLPAAGEMVLFDRSWYNRAGVERVMG  
FCTEA

EYREFLHACPTFERLLLDAGIILIKYWFSVSAEQERRMRRRNENPAKRWKLSPMDLEAR  
AR

WVAYSKAKDAMFYHTDTKASPWYVVNAEDKRRRAHLSCIAHLLSLIPYEDLTPPPLEMP  
RDL

30

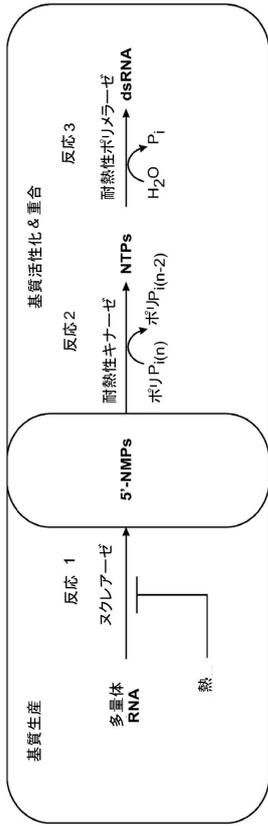
AGADEGYERPDKAHQTWVPDYVPPTR ( 配列番号 1 8 )

40

50

【 図 面 】  
【 図 1 】

図 1



【 図 2 】

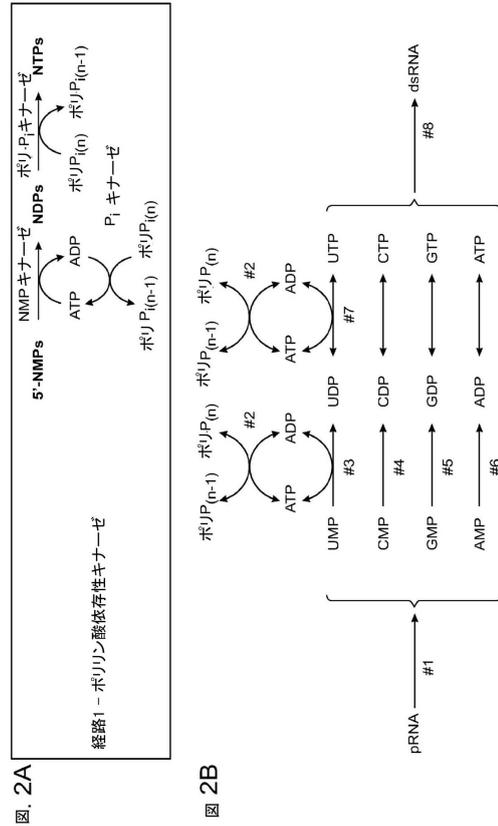


図. 2A

図 2B

【 図 3 A - B 】

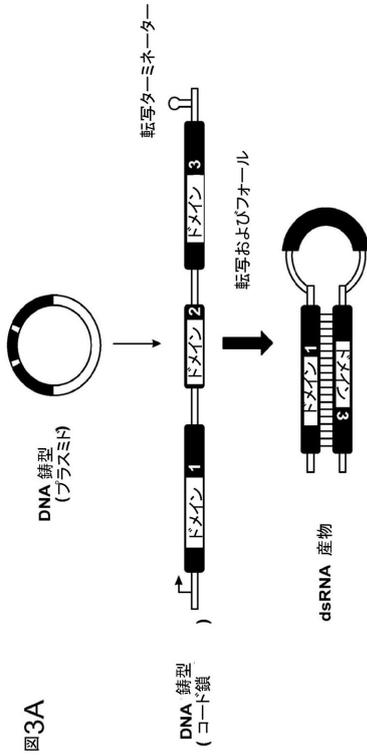


図3A

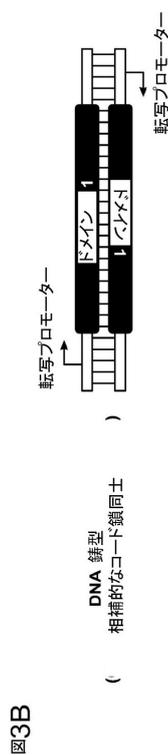


図3B

【 図 3 C 】

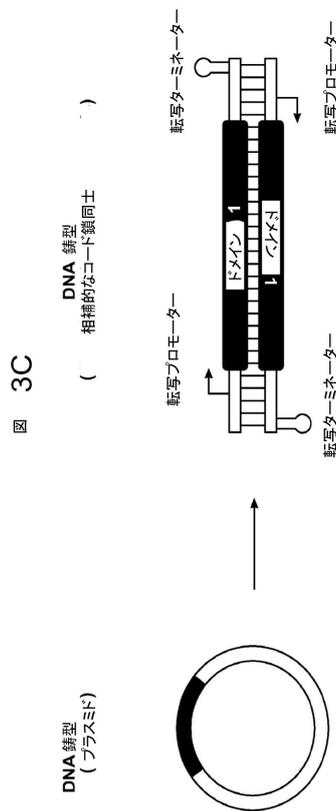
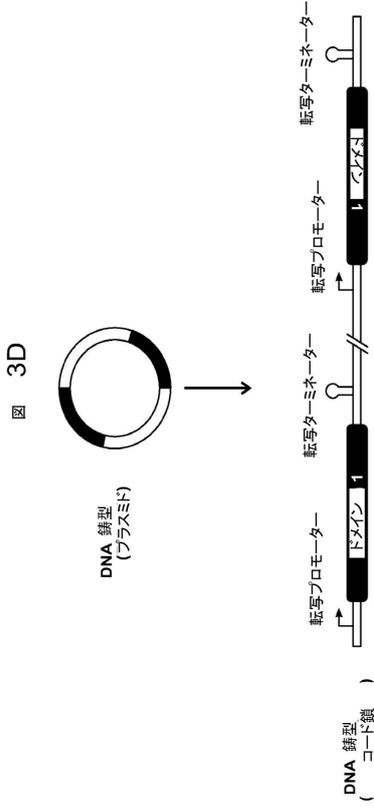
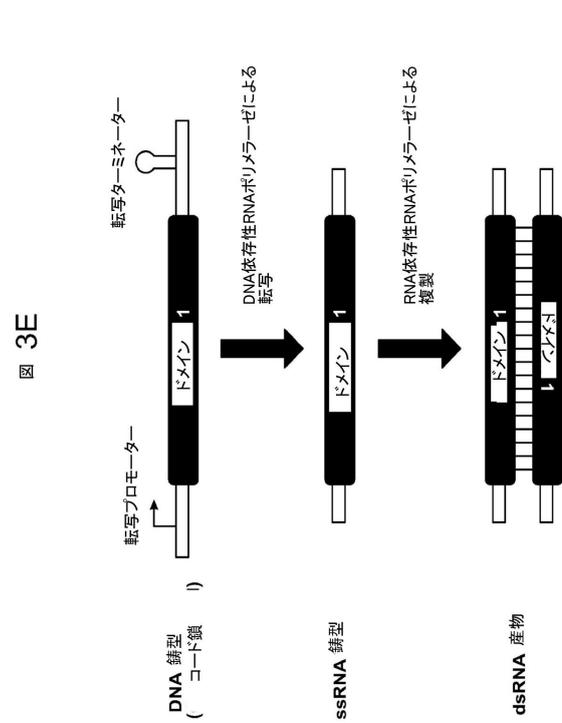


図 3C

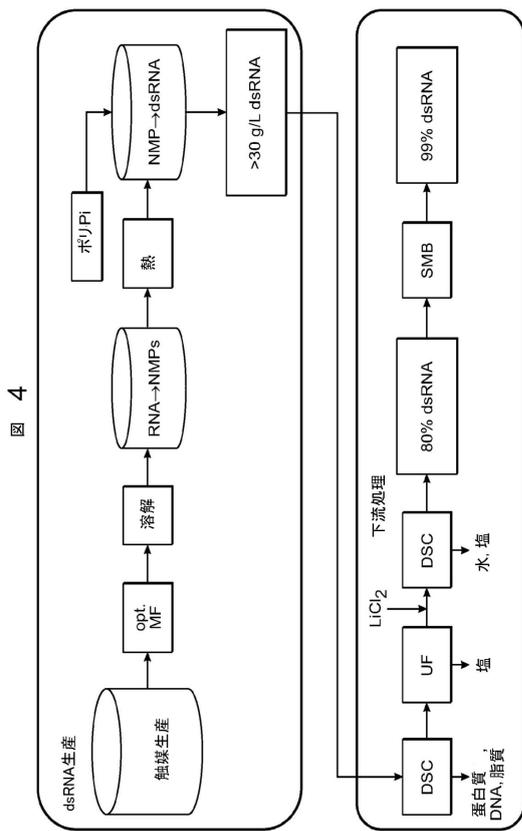
【 図 3 D 】



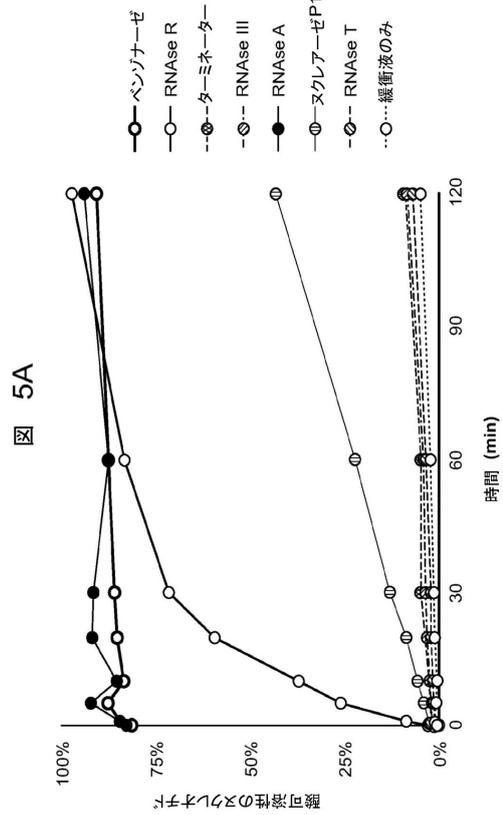
【 図 3 E 】



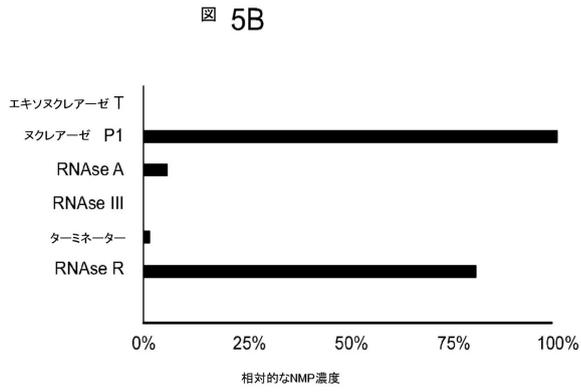
【 図 4 】



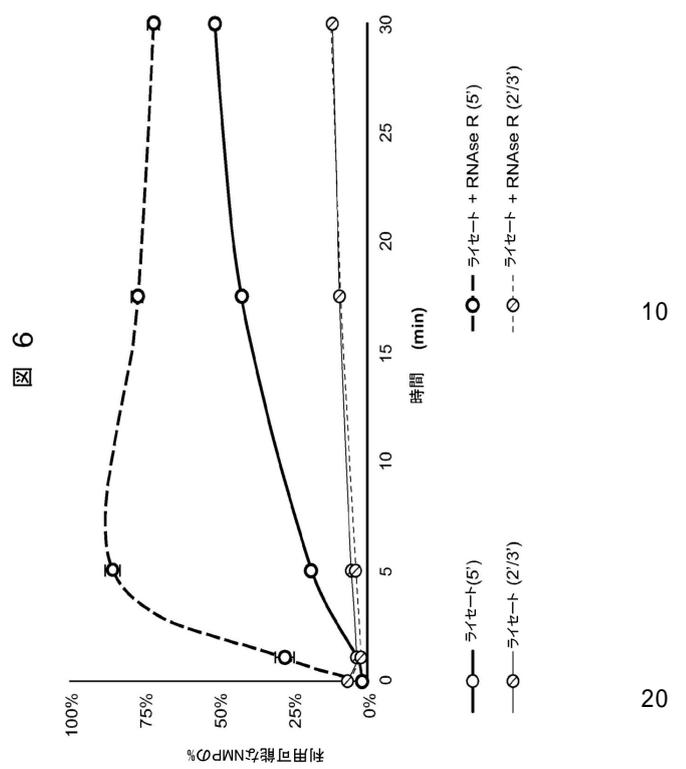
【 図 5 A 】



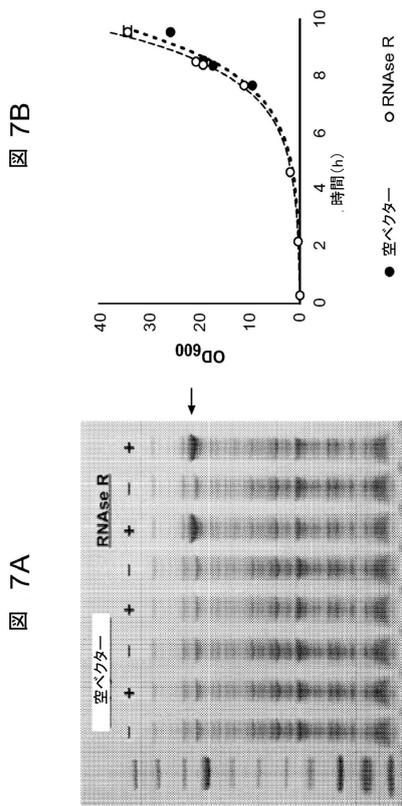
【 図 5 B 】



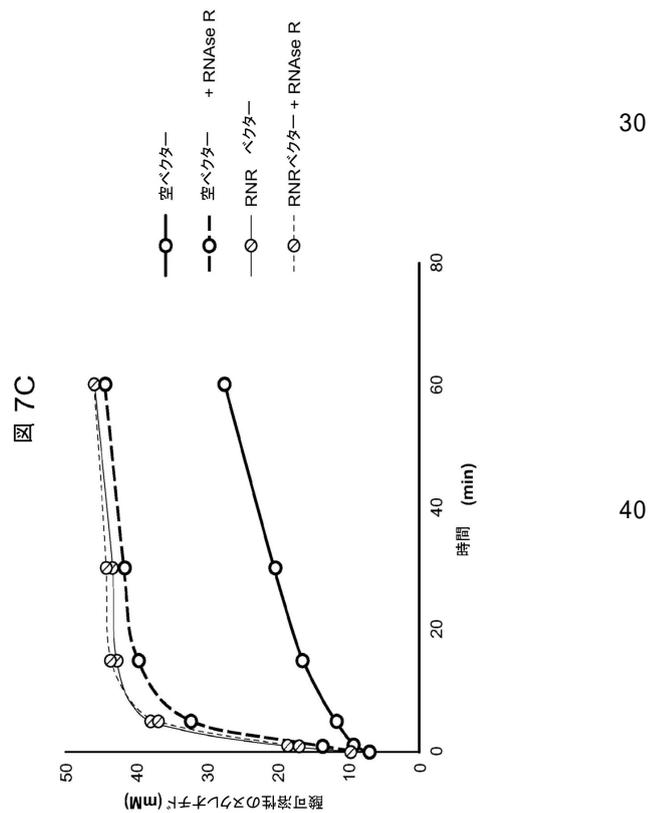
【 図 6 】



【 図 7 A - B 】



【 図 7 C 】



10

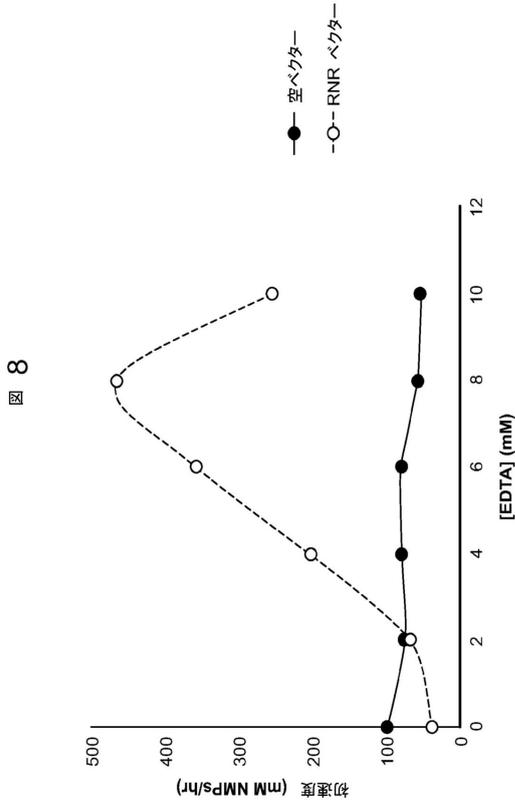
20

30

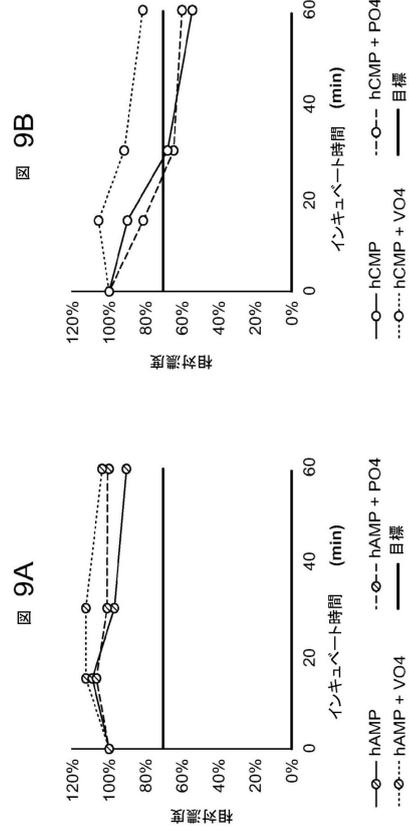
40

50

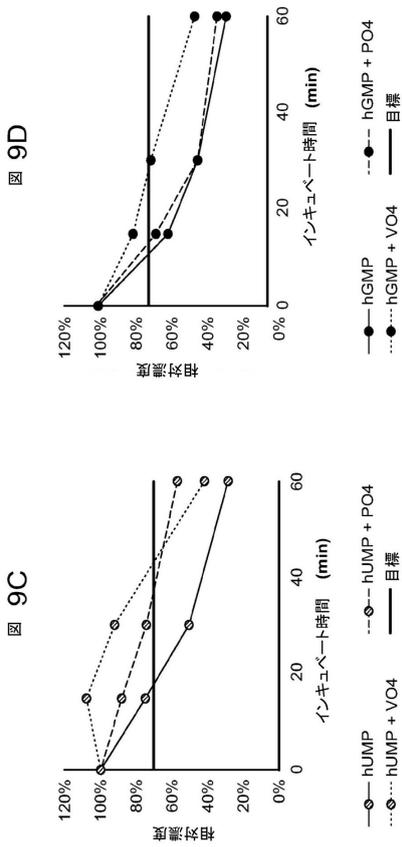
【図 8】



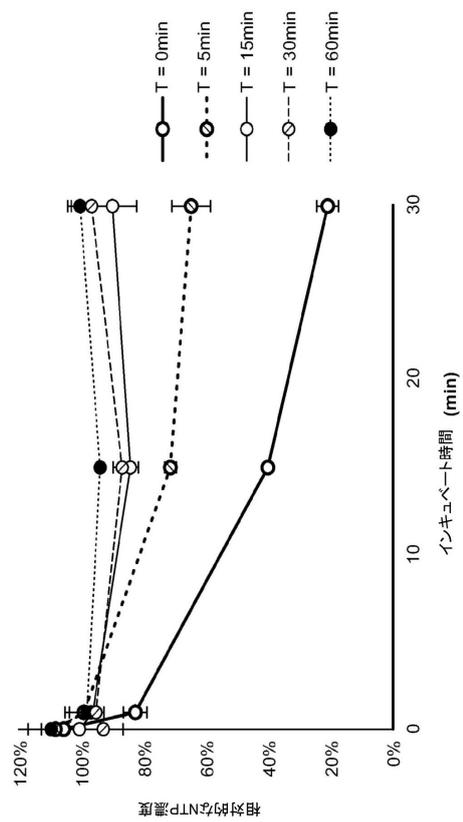
【図 9 A - B】



【図 9 C - D】



【図 10】



10

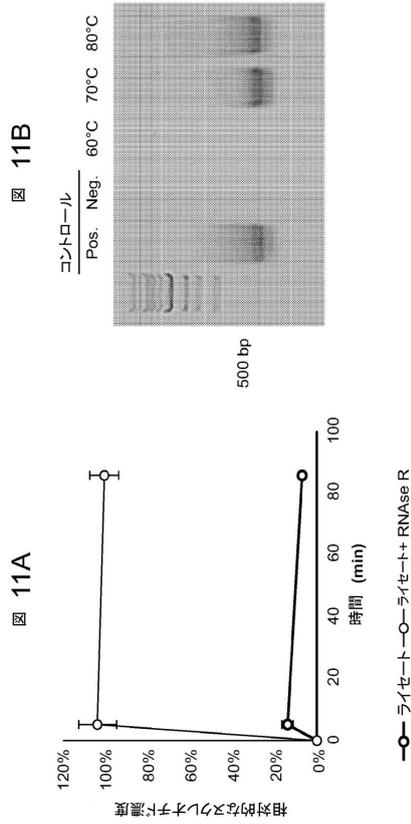
20

30

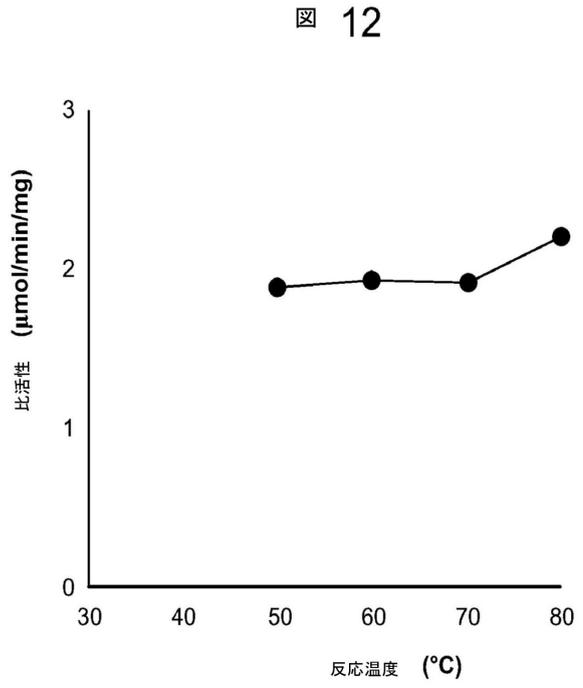
40

50

【 図 1 1 】



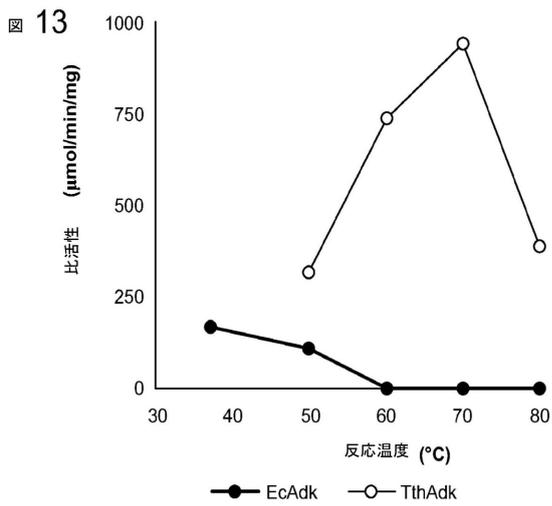
【 図 1 2 】



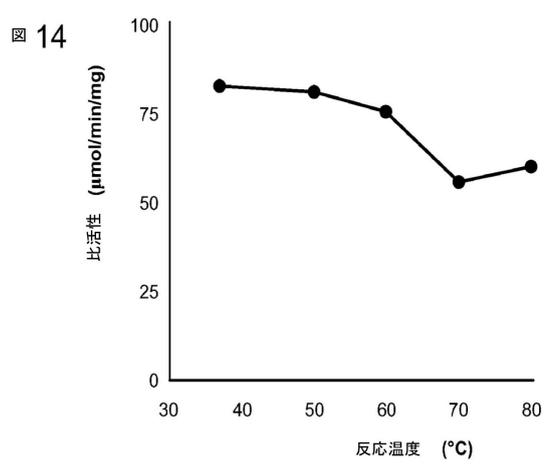
10

20

【 図 1 3 】



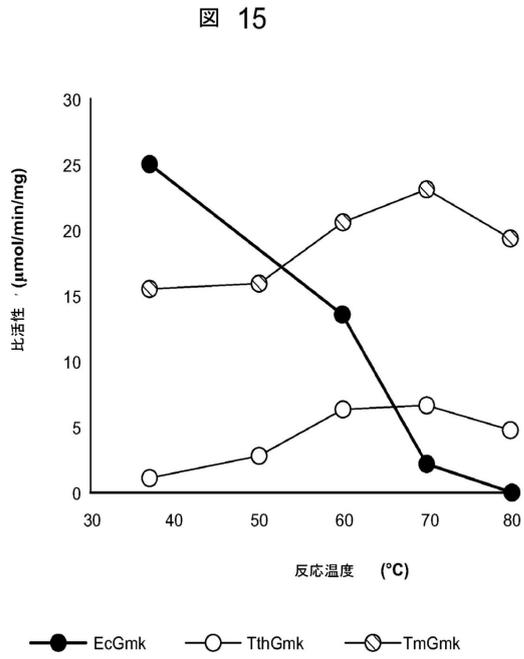
【 図 1 4 】



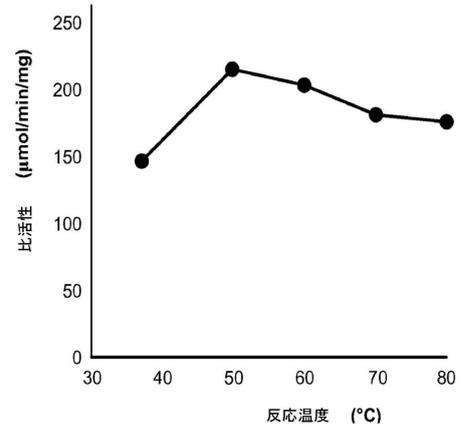
30

40

【 図 15 】



【 図 16 】

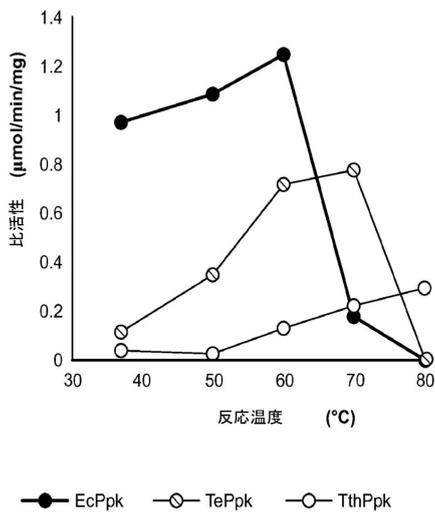


10

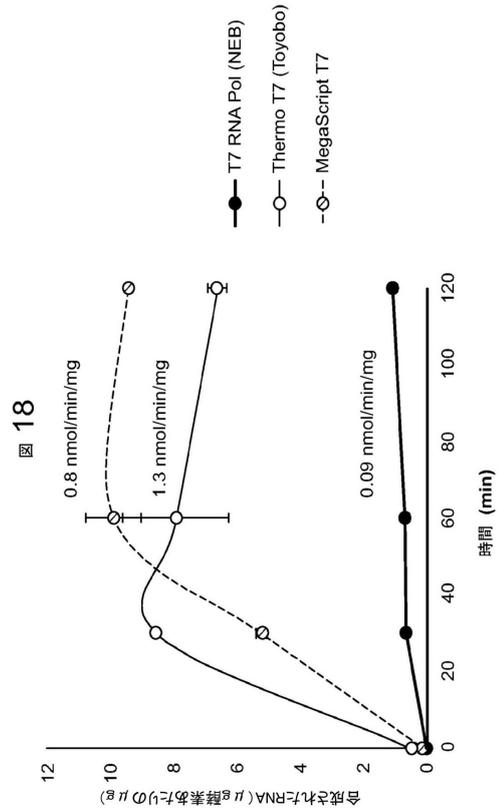
20

【 図 17 】

図 17



【 図 18 】



30

40

50

【 図 19 】

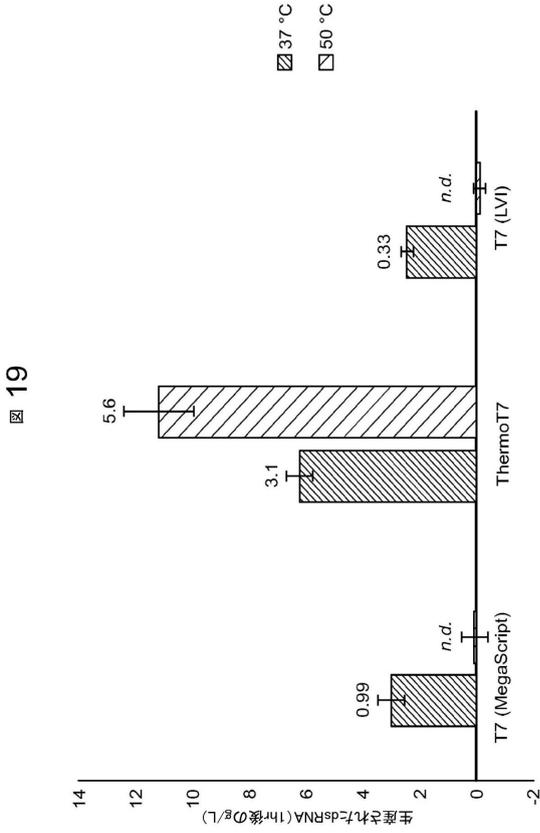


図 19

【 図 20 】

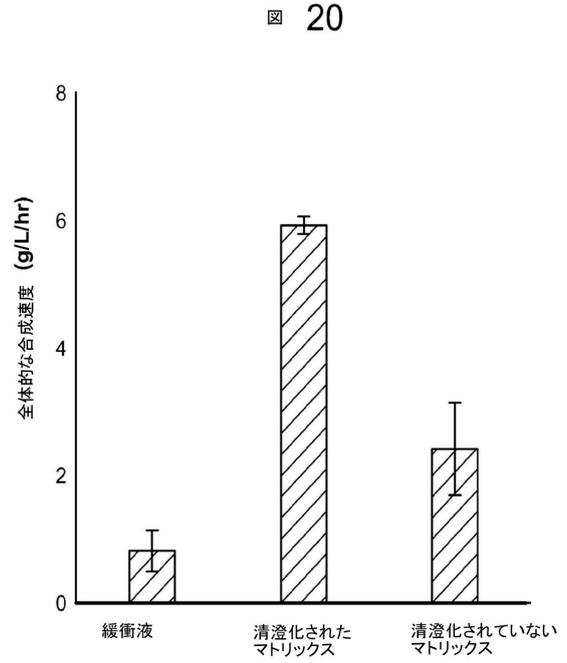


図 20

【 図 21 】

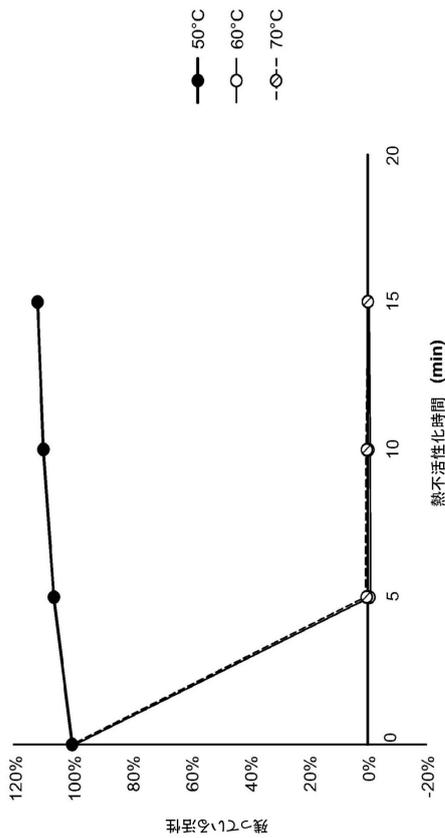


図 21

【 図 22 】

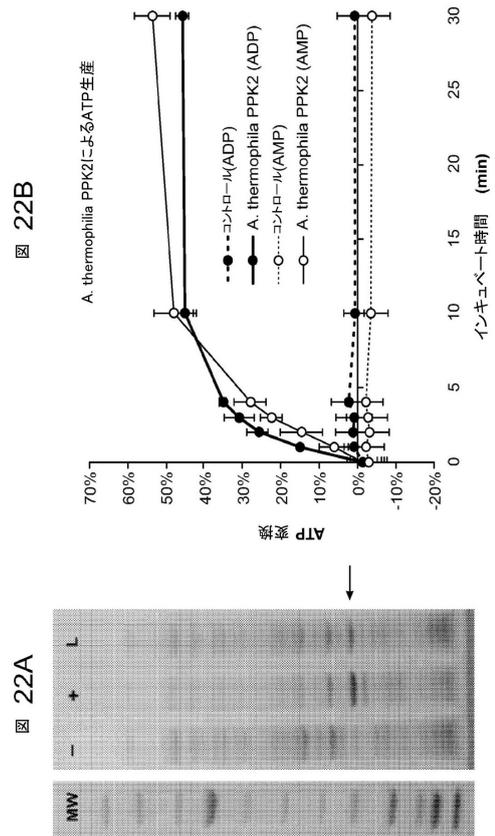


図 22B

図 22A

10

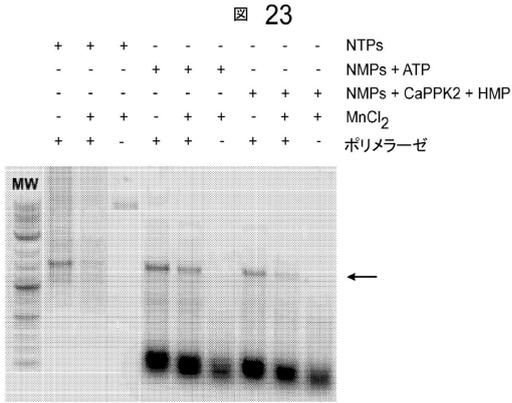
20

30

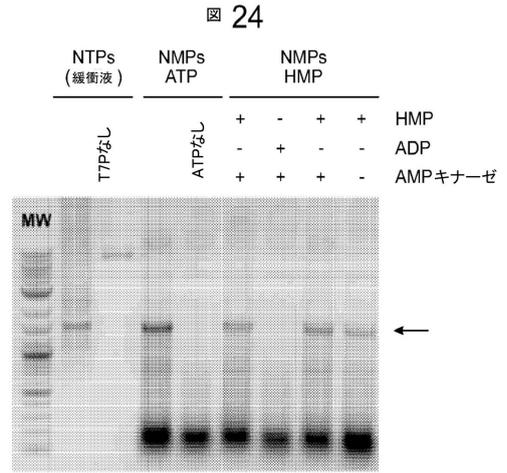
40

50

【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



【 配列表 】

[0007011599000001.app](#)

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z
C 1 2 N	9/12 (2006.01)	C 1 2 N	9/12	
C 1 2 N	9/22 (2006.01)	C 1 2 N	9/22	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 ブレイク, ウィリアム, ジェレミー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 8 9 0、ウィンチェスター、メイフラワー ロード 3 0

(72)発明者 カニンガム, ドリュー, エス.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 0、ケンブリッジ、クリフトン ストリート 8 2

(72)発明者 マキーヒラン, ダニエル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 5 5、メドフォード、ピゴット ロード 6 8

(72)発明者 アプシャー, ジェームズ, ロピンス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9、ケンブリッジ、シドニー ストリート 2 6 5  
、 1

(72)発明者 グプタ, メヘイク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 5 5、メドフォード、ウィリアム ストリート 4 4

審査官 大久保 智之

## (56)参考文献

米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 3 3 7 3 0 6 ( U S , A 1 )

特表 2 0 0 7 - 5 0 6 4 3 0 ( J P , A )

国際公開第 2 0 0 6 / 1 0 9 7 5 1 ( W O , A 1 )

特開 2 0 0 5 - 1 6 0 4 4 6 ( J P , A )

欧州特許出願公開第 0 1 2 7 9 7 3 6 ( E P , A 1 )

特表 2 0 0 3 - 5 1 7 8 3 7 ( J P , A )

特表 2 0 0 7 - 5 2 1 0 2 3 ( J P , A )

米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 1 1 3 7 7 8 ( U S , A 1 )

特開 2 0 1 3 - 0 2 1 9 6 7 ( J P , A )

特開 2 0 0 7 - 1 4 3 4 6 3 ( J P , A )

特開昭 5 8 - 1 2 9 9 9 2 ( J P , A )

特開平 0 5 - 1 7 6 7 5 7 ( J P , A )

European Journal of Biochemistry, 1996, Vol.236, No.1, pp.234-239

Journal of Biotechnology, 2006, Vol.126, No.2, pp.186-195

Process Biochemistry, 2011, Vol.46, No.9, pp.1747-1752

Bioprocess and Biosystems Engineering, 2010, Vol. 33, No.1, pp.71-78

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 P

C 1 2 N

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / W P I D S / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )