(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2013-519376
(P2013-519376A)
(43)公表日　平成25年5月30日(2013.5.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	ZNA	4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B064
C12P 7/56	(2006.01)	C12P	7/56		4B065
C12P 7/52	(2006.01)	C12P	7/52		
C12P 7/16	(2006.01)	C12P	7/16		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 202 頁）

(21)出願番号　特願2012-553020 (P2012-553020)
(86)(22)出願日　平成23年2月11日 (2011.2.11)
(85)翻訳文提出日　平成24年10月15日 (2012.10.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2011/024482
(87)国際公開番号　WO2011/142865
(87)国際公開日　平成23年11月17日 (2011.11.17)
(31)優先権主張番号　61/430,801
(32)優先日　平成23年1月7日 (2011.1.7)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/411,885
(32)優先日　平成22年11月9日 (2010.11.9)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/352,133
(32)優先日　平成22年6月7日 (2010.6.7)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　510153973
ジーヴォ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国，コロラド州　８０１１２，エングルウッド，スイート　３１０，ビルディング　シー，インバネス　ドライブ　サウス　３４５
(71)出願人　506321458
カリフォルニア　インスティテュート　オブ　テクノロジー
アメリカ合衆国、カリフォルニア州　９１１２５、パサデナ、エム／エス　２０１－８５、イースト　カリフォルニア　ブールバード　１２００、オフィス　オブ　テクノロジー　トランスファー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】燃料、化学物質、およびアミノ酸の改善された産生のための、低減された副産物蓄積を有する酵母微生物

(57)【要約】
本発明は、生合成経路を含む組み換え微生物、および前記組み換え微生物を使用して、種々の有益な代謝物を産生する方法に関する。本発明の種々の態様では、本組み換え微生物は、３ケト－酸（例えば、アセト乳酸および２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩）および／またはアルデヒド由来副産物の低減または排除をもたらす１つ以上の改変を更に含んでもよい。本明細書に記載される種々の実施形態では、本組み換え微生物は、サッカロミセスクレード、クラブトリー陰性酵母微生物、クラブトリー陽性酵母微生物、ＷＧＤ（全ゲノム重複）後酵母微生物、ＷＧＤ（全ゲノム重複）前酵母微生物、および非発酵酵母微生物の微生物であってもよい。
【選択図】図５

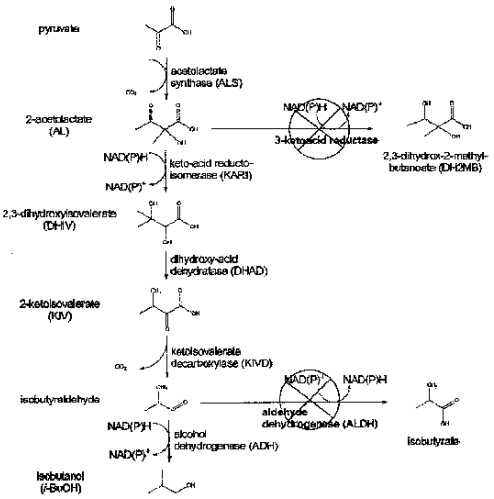


FIGURE 5

【特許請求の範囲】
【請求項１】
中間体として３－ケト酸を使用する生合成経路を含み、前記３－ケト酸の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される、組み換え微生物。
【請求項２】
前記３－ケト酸中間体は、アセト乳酸であり、前記３－ヒドロキシ酸副産物は、２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）である、請求項１に記載の組み換え微生物。
【請求項３】
アセト乳酸からの前記ＤＨ２ＭＢの炭素収率は、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約５０％低減される、請求項２に記載の組み換え微生物。
【請求項４】
アセト乳酸からの前記ＤＨ２ＭＢの炭素収率は、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約７５％低減される、請求項２に記載の組み換え微生物。
【請求項５】
アセト乳酸からの前記ＤＨ２ＭＢの炭素収率は、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約９５％低減される、請求項２に記載の組み換え微生物。
【請求項６】
前記組み換え微生物は、アセト乳酸由来産物を産生する、請求項２に記載の組み換え微生物。
【請求項７】
前記アセト乳酸由来産物は、イソブタノール、２－ブタノール、１－ブタノール、２－ブタノン、２，３－ブタンジオール、アセトイン、ジアセチル、バリン、ロイシン、パントテン酸、イソブチレン、３－メチル－１－ブタノール、４－メチル－１－ペンタノール、および補酵素Ａから選択される、請求項６に記載の組み換え微生物。
【請求項８】
前記３－ケト酸中間体は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩であり、前記３－ヒドロキシ酸副産物は、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）である、請求項１に記載の組み換え微生物。
【請求項９】
２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩からの前記２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）の炭素収率は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約５０％低減される、請求項８に記載の組み換え微生物。
【請求項１０】
２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩からの前記２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）の炭素収率は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約７５％低減される、請求項８に記載の組み換え微生物。
【請求項１１】
２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩からの前記２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）の炭素収率は、２－アセト－２－ヒ

ドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約９５％低減される、請求項８に記載の組み換え微生物。

【請求項１２】

前記組み換え微生物は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩由来産物を産生する、請求項８に記載の組み換え微生物。

【請求項１３】

前記２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩由来産物は、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールから選択される、請求項１２に記載の組み換え微生物。

【請求項１４】

３－ケト酸の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒する前記酵素は、３－ケト酸レダクターゼである、前述の請求項のいずれかに記載の組み換え微生物。

【請求項１５】

前記３－ケト酸レダクターゼは、Ｓ．セレビシエＹＭＲ２２６（配列番号１）またはその相同体もしくは変異体である、請求項１４に記載の組み換え微生物。

【請求項１６】

前記３－ケト酸レダクターゼは、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、および配列番号２３、またはその相同体もしくは変異体から選択される、請求項１４に記載の組み換え微生物。

【請求項１７】

中間体としてアルデヒドを使用する生合成経路を含み、前記アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される、組み換え微生物。

【請求項１８】

前記アルデヒド中間体からの前記酸副産物炭素の収率は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも３５％低減される、請求項１７に記載の組み換え微生物。

【請求項１９】

前記アルデヒド中間体からの前記酸副産物炭素の収率は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも７５％低減される、請求項１７に記載の組み換え微生物。

【請求項２０】

前記アルデヒド中間体からの前記酸副産物炭素の収率は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも９５％低減される、請求項１７に記載の組み換え微生物。

【請求項２１】

中間体としてアルデヒドを使用する前記生合成経路は、イソブタノール、１－ブタノール、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ブタノール、１－プロパノール、１－ペンタノール、１－ヘキサノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールの生合成のための経路から選択される、請求項１７に記載の組み換え微生物。

【請求項２２】

アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する前記酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼである、請求項１７～２１のいずれかに記載の組み換え微生物。
【請求項２３】
前記アルデヒドデヒドロゲナーゼは、Ｓ．セレビシエＡＬＤ６（配列番号２５）またはその相同体もしくは変異体である、請求項２２に記載の組み換え微生物。
【請求項２４】
前記アルデヒドデヒドロゲナーゼは、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、および配列番号４１、またはその相同体もしくは変異体から選択される、請求項２２に記載の組み換え微生物。
【請求項２５】
中間体として３－ケト酸およびアルデヒドを使用する生合成経路を含み、
（ｉ）前記３－ケト酸の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ
（ｉｉ）前記アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される、組み換え微生物。
【請求項２６】
前記３－ケト酸中間体は、アセト乳酸であり、前記３－ヒドロキシ酸副産物は、２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）である、請求項２５に記載の組み換え微生物。
【請求項２７】
アセト乳酸からの前記ＤＨ２ＭＢ炭素の収率は、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約５０％低減される、請求項２６に記載の組み換え微生物。
【請求項２８】
アセト乳酸からの前記ＤＨ２ＭＢ炭素の収率は、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約７５％低減される、請求項２６に記載の組み換え微生物。
【請求項２９】
アセト乳酸からの前記ＤＨ２ＭＢ炭素の収率は、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約９５％低減される、請求項２６に記載の組み換え微生物。
【請求項３０】
前記組み換え微生物は、アセト乳酸由来産物を産生する、請求項２６に記載の組み換え微生物。
【請求項３１】
前記アセト乳酸由来産物は、イソブタノール、１－ブタノール、および３－メチル－１－ブタノールから選択される、請求項３０に記載の組み換え微生物。
【請求項３２】
前記３－ケト酸中間体は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩であり、前記３－ヒドロキシ酸副産物は、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）である、請求項２５に記載の組み換え微生物。
【請求項３３】
２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩からの前記２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）炭素の収率は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約５０％低減される、請求項３２に記載の組み換え微生物。

【請求項３４】
２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩からの前記２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）炭素の収率は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約７５％低減される、請求項３２に記載の組み換え微生物。
【請求項３５】
２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩からの前記２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）炭素の収率は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約９５％低減される、請求項３２に記載の組み換え微生物。
【請求項３６】
前記組み換え微生物は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩由来産物を産生する、請求項３２に記載の組み換え微生物。
【請求項３７】
前記２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩由来産物は、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールから選択される、請求項３６に記載の組み換え微生物。
【請求項３８】
３－ケト酸の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒する前記酵素は、３－ケト酸レダクターゼである、請求項２５～３７のいずれかに記載の組み換え微生物。
【請求項３９】
前記３－ケト酸レダクターゼは、Ｓ．セレビシエＹＭＲ２２６（配列番号１）またはその相同体もしくは変異体である、請求項３８に記載の組み換え微生物。
【請求項４０】
前記３－ケト酸レダクターゼは、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、および配列番号２３、またはその相同体もしくは変異体から選択される、請求項３８に記載の組み換え微生物。
【請求項４１】
前記アルデヒド中間体からの前記酸副産物炭素の収率は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも３５％低減される、請求項２５～４０のいずれかに記載の組み換え微生物。
【請求項４２】
前記アルデヒド中間体からの前記酸副産物炭素の収率は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも７５％低減される、請求項２５～４０のいずれかに記載の組み換え微生物。
【請求項４３】
前記アルデヒド中間体からの前記酸副産物炭素の収率は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも９５％低減される、請求項２５～４０のいずれかに記載の組み換え微生物。
【請求項４４】

アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する前記酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼである、請求項２５～４３のいずれかに記載の組み換え微生物。
【請求項４５】
前記アルデヒドデヒドロゲナーゼは、Ｓ．セレビシエＡＬＤ６（配列番号２５）またはその相同体もしくは変異体である、請求項４４に記載の組み換え微生物。
【請求項４６】
前記アルデヒドデヒドロゲナーゼは、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、および配列番号４１、またはその相同体もしくは変異体から選択される、請求項４４に記載の組み換え微生物。
【請求項４７】
前記組み換え微生物は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ＰＤＣ）活性を低減または排除するように操作される、前述の請求項のいずれかに記載の組み換え微生物。
【請求項４８】
前記組み換え微生物は、グリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）活性を低減または排除するように操作される、前述の請求項のいずれかに記載の組み換え微生物。
【請求項４９】
前記組み換え微生物は、酵母微生物である、前述の請求項のいずれかに記載の組み換え微生物。
【請求項５０】
前記組み換え微生物は、サッカロミセスクレードの酵母微生物である、請求項４９に記載の組み換え微生物。
【請求項５１】
前記組み換え微生物は、サッカロミセス・センス・ストリクト微生物である、請求項４９に記載の組み換え微生物。
【請求項５２】
前記サッカロミセス・センス・ストリクト微生物は、Ｓ．セレビシエ、Ｓ．クドリアブゼビイ、Ｓ．ミカタエ、Ｓ．バヤヌス、Ｓ．ウバルム、Ｓ．カロカニス、およびそれらのハイブリッドからなる群から選択される、請求項５１に記載の組み換え微生物。
【請求項５３】
前記組み換え微生物は、クラブトリー陰性酵母微生物である、請求項４９に記載の組み換え微生物。
【請求項５４】
前記クラブトリー陰性酵母微生物は、サッカロミセス、クルイベロミセス、ピキア、ハンゼヌラ、イッサチェンキア、およびカンジダからなる群から選択される属に分類される、請求項５３に記載の組み換え微生物。
【請求項５５】
前記クラブトリー陰性酵母微生物は、サッカロミセス・クルイベリ、クルイベロミセス・ラクチス、クルイベロミセス・マルシアヌス、ピキア・アノマラ、ピキア・スチピチス、ピキア・クドリアブゼビイ、イッサチェンキア・オリエンタリス、ハンゼヌラ・アノマラ、カンジダ・ウチリス、およびクルイベロミセス・ワルチイからなる群から選択される、請求項５４に記載の組み換え微生物。
【請求項５６】
前記組み換え微生物は、クラブトリー陽性酵母微生物である、請求項４９に記載の組み換え微生物。
【請求項５７】
前記クラブトリー陽性酵母微生物は、サッカロミセス、クルイベロミセス、ジゴサッカロミセス、デバリオミセス、ピキア、カンジダ、およびシゾサッカロミセスからなる群か

ら選択される属に分類される、請求項５６に記載の組み換え微生物。
【請求項５８】
前記クラブトリー陽性酵母微生物は、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・ウバルム、サッカロミセス・バヤヌス、サッカロミセス・パラドキサス、サッカロミセス・カステリイ、クルイベロミセス・サーモトレランス、カンジダ・グラブラタ、ジゴサッカロミセス・バイリ、ジゴサッカロミセス・ロウキシイ、デバリオミセス・ハンセニイ、ピキア・パストリウス、シゾサッカロミセス・ポンベ、およびサッカロミセス・ウバルムからなる群から選択される、請求項５７に記載の組み換え微生物。
【請求項５９】
前記組み換え微生物は、ＷＧＤ（全ゲノム重複）後酵母微生物である、請求項４９に記載の組み換え微生物。
【請求項６０】
前記ＷＧＤ後酵母微生物は、サッカロミセスまたはカンジダからなる群から選択される属に分類される、請求項５９に記載の組み換え微生物。
【請求項６１】
前記ＷＧＤ後酵母微生物は、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・ウバルム、サッカロミセス・バヤヌス、サッカロミセス・パラドキサス、サッカロミセス・カステリイ、およびカンジダ・グラブラタからなる群から選択される、請求項６０に記載の組み換え微生物。
【請求項６２】
前記組み換え微生物は、ＷＧＤ（全ゲノム重複）前酵母微生物である、請求項４９に記載の組み換え微生物。
【請求項６３】
前記ＷＧＤ前酵母微生物は、サッカロミセス、クルイベロミセス、カンジダ、ピキア、デバリオミセス、ハンゼヌラ、イッサトケンキア、パキソレン、ヤロウィア、およびシゾサッカロミセスからなる群から選択される属に分類される、請求項６２に記載の組み換え微生物。
【請求項６４】
前記ＷＧＤ前酵母微生物は、サッカロミセス・クルイベリ、クルイベロミセス・サーモトレランス、クルイベロミセス・マルシアヌス、クルイベロミセス・ワルチイ、クルイベロミセス・ラクチス、カンジダ・トロピカリス、ピキア・パストリス、ピキア・アノマラ、ピキア・スチピチス、ピキア・クドリアブゼビイ、イッサチェンキア・オリエンタリス、デバリオミセス・ハンセニイ、ハンゼヌラ・アノマラ、パキソレン・タンノフィリス（ｔａｎｎｏｐｈｉｌｉｓ）、ヤロウィア・リポリチカ、およびシゾサッカロミセス・ポンベからなる群から選択される、請求項６３に記載の組み換え微生物。
【請求項６５】
３－ケト酸中間体に由来する有益な代謝物を産生する方法であって、
（ａ）請求項１～１６および２５～６４のいずれかに記載の組み換え微生物を提供することと、
（ｂ）回収可能な量の前記有益な代謝物が産生されるまで、前記組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養することと、
（ｃ）前記有益な代謝物を回収することと、を含む、方法。
【請求項６６】
前記３－ケト酸中間体は、アセト乳酸であり、前記有益な代謝物は、イソブタノール、２－ブタノール、１－ブタノール、２－ブタノン、２，３－ブタンジオール、アセトイン、ジアセチル、バリン、ロイシン、パントテン酸、イソブチレン、３－メチル－１－ブタノール、４－メチル－１－ペンタノール、および補酵素Ａから選択される、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
前記３－ケト酸中間体は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩であり、前記有益な代謝

物は、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールから選択される、請求項６５に記載の方法。

【請求項６８】

アルデヒド中間体に由来する有益な代謝物を産生する方法であって、

（ａ）請求項１７～６４のいずれかに記載の組み換え微生物を提供することと、

（ｂ）回収可能な量の前記有益な代謝物が産生されるまで、前記組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養することと、

（ｃ）前記有益な代謝物を回収することと、を含む、方法。

【請求項６９】

前記アルデヒド中間体は、イソブチルアルデヒド、１－ブタナール、２－メチル－１－ブタナール、３－メチル－１－ブタナール、１－プロパナール、１－ペンタナール、１－ヘキサナール、３－メチル－１－ペンタナール、４－メチル－１－ペンタナール、４－メチル－１－ヘキサナール、および５－メチル－１－ヘプタナールから選択される、請求項６８に記載の方法。

【請求項７０】

前記有益な代謝物は、イソブタノール、１－ブタノール、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ブタノール、１－プロパノール、１－ペンタノール、１－ヘキサノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールから選択される、請求項６９に記載の方法。

【請求項７１】

３－ケト酸およびアルデヒド中間体に由来する有益な代謝物を産生する方法であって、

（ａ）請求項２５～６４のいずれかに記載の組み換え微生物を提供することと、

（ｂ）回収可能な量の前記有益な代謝物が産生されるまで、前記組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養することと、

（ｃ）前記有益な代謝物を回収することと、を含む、方法。

【請求項７２】

前記３－ケト酸中間体は、アセト乳酸であり、前記有益な代謝物は、イソブタノール、１－ブタノール、および３－メチル－１－ブタノールから選択される、請求項７１に記載の方法。

【請求項７３】

前記３－ケト酸中間体は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩であり、前記有益な代謝物は、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールから選択される、請求項７１に記載の方法。

【請求項７４】

イソブタノール産生代謝経路を含み、アセト乳酸の２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される、組み換え微生物。

【請求項７５】

アセト乳酸からの前記ＤＨ２ＭＢ炭素収率は、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約５０％低減される、請求項７４に記載の組み換え微生物。

【請求項７６】

アセト乳酸からの前記ＤＨ２ＭＢ炭素の収率は、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約７５％低減される、請求項７４に記載の組み換え微生物。

【請求項７７】

アセト乳酸からの前記ＤＨ２ＭＢ炭素の収率は、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約９５％低減される、請求項７４に記載の組み換え微生物。

【請求項７８】

アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する前記酵素は、３－ケト酸レダクターゼである、請求項７４～７７のいずれかに記載の組み換え微生物。

【請求項７９】

前記３－ケト酸レダクターゼは、Ｓ．セレビシエＹＭＲ２２６（配列番号１）またはその相同体もしくは変異体である、請求項７８に記載の組み換え微生物。

【請求項８０】

前記３－ケト酸レダクターゼは、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、および配列番号２３、またはその相同体もしくは変異体から選択される、請求項７８に記載の組み換え微生物。

【請求項８１】

イソブタノール産生代謝経路を含み、イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される、組み換え微生物。

【請求項８２】

イソブチルアルデヒドからの前記イソ酪酸塩炭素の収率は、イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも３５％低減される、請求項８１に記載の組み換え微生物。

【請求項８３】

イソブチルアルデヒドからの前記イソ酪酸塩炭素の収率は、イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも７５％低減される、請求項８１に記載の組み換え微生物。

【請求項８４】

イソブチルアルデヒドからの前記イソ酪酸塩炭素の収率は、イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも９５％低減される、請求項８１に記載の組み換え微生物。

【請求項８５】

イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する前記酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼである、請求項８１～８４のいずれかに記載の組み換え微生物。

【請求項８６】

前記アルデヒドデヒドロゲナーゼは、Ｓ．セレビシエＡＬＤ６（配列番号２５）またはその相同体もしくは変異体である、請求項８５に記載の組み換え微生物。

【請求項８７】

前記アルデヒドデヒドロゲナーゼは、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、および配列番号４１、またはその相同体もしくは変異体から選択される、請求項８６に記載の組み換え微生物。

【請求項８８】

イソブタノール産生代謝経路を含み、

（ｉ）アセト乳酸の２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）への変換

を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ（ｉｉ）イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作されることと、である、組み換え微生物。

【請求項８９】

アセト乳酸からの前記ＤＨ２ＭＢ炭素の収率は、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約５０％低減される、請求項８８に記載の組み換え微生物。

【請求項９０】

アセト乳酸からの前記ＤＨ２ＭＢ炭素の収率は、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約７５％低減される、請求項８８に記載の組み換え微生物。

【請求項９１】

アセト乳酸からの前記ＤＨ２ＭＢ炭素の収率は、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約９５％低減される、請求項８８に記載の組み換え微生物。

【請求項９２】

アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する前記酵素は、３－ケト酸レダクターゼである、請求項８８～９１のいずれかに記載の組み換え微生物。

【請求項９３】

前記３－ケト酸レダクターゼは、Ｓ．セレビシエＹＭＲ２２６（配列番号１）またはその相同体もしくは変異体である、請求項９２に記載の組み換え微生物。

【請求項９４】

前記３－ケト酸レダクターゼは、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、および配列番号２３、またはその相同体もしくは変異体から選択される、請求項９２に記載の組み換え微生物。

【請求項９５】

イソブチルアルデヒドからの前記イソ酪酸塩炭素の収率は、イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも３５％低減される、請求項８８に記載の組み換え微生物。

【請求項９６】

イソブチルアルデヒドからの前記イソ酪酸塩炭素の収率は、イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも７５％低減される、請求項８８に記載の組み換え微生物。

【請求項９７】

イソブチルアルデヒドからの前記イソ酪酸塩炭素の収率は、イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒することに関与する１つ以上の酵素の発現または活性の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも９５％低減される、請求項８８に記載の組み換え微生物。

【請求項９８】

イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する前記酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼである、請求項８８～９７のいずれかに記載の組み換え微生物。

【請求項９９】

前記アルデヒドデヒドロゲナーゼは、Ｓ．セレビシエＡＬＤ６（配列番号２５）またはその相同体もしくは変異体である、請求項９８に記載の組み換え微生物。

【請求項１００】

前記アルデヒドデヒドロゲナーゼは、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、および配列番号４１、またはその相同体もしくは変異体から選択される、請求項９８に記載の組み換え微生物。

【請求項１０１】

前記組み換え微生物は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ＰＤＣ）活性を低減または排除するように操作される、請求項８８～１００のいずれかに記載の組み換え微生物。

【請求項１０２】

前記組み換え微生物は、グリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）活性を低減または排除するように操作される、請求項８８～１０１のいずれかに記載の組み換え微生物。

【請求項１０３】

前記組み換え微生物は、酵母微生物である、請求項８８～１０２のいずれかに記載の組み換え微生物。

【請求項１０４】

前記組み換え微生物は、サッカロミセスクレードの酵母微生物である、請求項１０３に記載の組み換え微生物。

【請求項１０５】

前記組み換え微生物は、サッカロミセス・センス・ストリクト微生物である、請求項１０３に記載の組み換え微生物。

【請求項１０６】

前記サッカロミセス・センス・ストリクト微生物は、Ｓ．セレビシエ、Ｓ．クドリアブゼビイ、Ｓ．ミカタエ、Ｓ．バヤヌス、Ｓ．ウバルム、Ｓ．カロカニス、およびそれらのハイブリッドからなる群から選択される、請求項１０５に記載の組み換え微生物。

【請求項１０７】

前記組み換え微生物は、クラブトリー陰性酵母微生物である、請求項１０３に記載の組み換え微生物。

【請求項１０８】

前記クラブトリー陰性酵母微生物は、サッカロミセス、クルイベロミセス、ピキア、ハンゼヌラ、イッサチェンキア、およびカンジダからなる群から選択される属に分類される、請求項１０７に記載の組み換え微生物。

【請求項１０９】

前記クラブトリー陰性酵母微生物は、サッカロミセス・クルイベリ、クルイベロミセス・ラクチス、クルイベロミセス・マルシアヌス、ピキア・アノマラ、ピキア・スチピチス、ピキア・クドリアブゼビイ、イッサチェンキア・オリエンタリス、ハンゼヌラ・アノマラ、カンジダ・ウチリス、およびクルイベロミセス・ワルチイからなる群から選択される、請求項１０８に記載の組み換え微生物。

【請求項１１０】

前記組み換え微生物は、クラブトリー陽性酵母微生物である、請求項１０３に記載の組み換え微生物。

【請求項１１１】

前記クラブトリー陽性酵母微生物は、サッカロミセス、クルイベロミセス、ジゴサッカロミセス、デバリオミセス、ピキア、カンジダ、およびシゾサッカロミセスからなる群から選択される属に分類される、請求項１１０に記載の組み換え微生物。

【請求項１１２】

前記クラブトリー陽性酵母微生物は、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・ウバルム、サッカロミセス・バヤヌス、サッカロミセス・パラドキサス、サッカロミセス・カステリイ、クルイベロミセス・サーモトレランス、カンジダ・グラブラタ、ジゴサッカロミセス・バイリ、ジゴサッカロミセス・ロウキシイ、デバリオミセス・ハンセニイ、

ピキア・パストリウス、シゾサッカロミセス・ポンベ、およびサッカロミセス・ウバルムからなる群から選択される、請求項１１１に記載の組み換え微生物。
【請求項１１３】
前記組み換え微生物は、ＷＧＤ（全ゲノム重複）後酵母微生物である、請求項１０３に記載の組み換え微生物。
【請求項１１４】
前記ＷＧＤ後酵母微生物は、サッカロミセスまたはカンジダからなる群から選択される属に分類される、請求項１１３に記載の組み換え微生物。
【請求項１１５】
前記ＷＧＤ後酵母微生物は、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・ウバルム、サッカロミセス・バヤヌス、サッカロミセス・パラドキサス、サッカロミセス・カステリイ、およびカンジダ・グラブラタからなる群から選択される、請求項１１４に記載の組み換え微生物。
【請求項１１６】
前記組み換え微生物は、ＷＧＤ（全ゲノム重複）前酵母微生物である、請求項１０３に記載の組み換え微生物。
【請求項１１７】
前記ＷＧＤ前酵母微生物は、サッカロミセス、クルイベロミセス、カンジダ、ピキア、デバリオミセス、ハンゼヌラ、イッサトケンキア、パキソレン、ヤロウィア、およびシゾサッカロミセスからなる群から選択される属に分類される、請求項１１６に記載の組み換え微生物。
【請求項１１８】
前記ＷＧＤ前酵母微生物は、サッカロミセス・クルイベリ、クルイベロミセス・サーモトレランス、クルイベロミセス・マルシアヌス、クルイベロミセス・ワルチイ、クルイベロミセス・ラクチス、カンジダ・トロピカリス、ピキア・パストリス、ピキア・アノマラ、ピキア・スチピチス、ピキア・クドリアブゼビイ、イッサチェンキア・オリエンタリス、デバリオミセス・ハンセニイ、ハンゼヌラ・アノマラ、パキソレン・タンノフィリス（ｔａｎｎｏｐｈｉｌｉｓ）、ヤロウィア・リポリチカ、およびシゾサッカロミセス・ポンベからなる群から選択される、請求項１１７に記載の組み換え微生物。
【請求項１１９】
イソブタノールを産生する方法であって、
（ａ）請求項７４～１１８のいずれかに記載の組み換え微生物を提供することと、
（ｂ）回収可能な量のイソブタノールが産生されるまで、前記組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養することと、
（ｃ）前記イソブタノールを回収することと、を含む、方法。
【請求項１２０】
中間体として３－ケト酸を使用する生合成経路を含み、
（ａ）前記３－ケト酸の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ／あるいは
（ｂ）３－ケト酸の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒する酵素が実質的にない、組み換え微生物。
【請求項１２１】
中間体としてアルデヒドを使用する生合成経路を含み、
（ａ）前記アルデヒド中間体の酸副産物への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ／あるいは
（ｂ）アルデヒド中間体の酸副産物への変換を触媒する酵素が実質的にない、組み換え微生物。
【請求項１２２】
中間体として３－ケト酸およびアルデヒドを使用する生合成経路を含み、

（ａ）前記３－ケト酸の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ／あるいは
（ｂ）３－ケト酸の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒する酵素が実質的になく、かつ
（ｃ）前記アルデヒド中間体の酸副産物への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ／あるいは
（ｄ）アルデヒド中間体の酸副産物への変換を触媒する酵素が実質的にない、組み換え微生物。

【請求項１２３】
イソブタノール産生代謝経路を含み、
（ａ）アセト乳酸の２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ／あるいは
（ｂ）アセト乳酸の２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）への変換を触媒する酵素が実質的にない、組み換え微生物。

【請求項１２４】
イソブタノール産生代謝経路を含み、
（ａ）イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ／あるいは
（ｂ）イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する酵素が実質的にない、組み換え微生物。

【請求項１２５】
イソブタノール産生代謝経路を含み、
（ａ）アセト乳酸の２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ／あるいは
（ｂ）アセト乳酸の２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）への変換を触媒する酵素が実質的になく、かつ
（ｃ）イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ／あるいは
（ｄ）イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する酵素が実質的にない、組み換え微生物。

【請求項１２６】
（ａ）ピルビン酸塩をアセト乳酸に変換する、アセト乳酸シンターゼ活性を有するサイトゾル局在化ポリペプチドをコードする遺伝子と、
（ｂ）過剰発現されたケトール酸レダクトイソメラーゼであって、野生型または親ＫＡＲＩと比較して、アセト乳酸に対する低減されたK_Mおよび／またはアセト乳酸に対する増加されたk_{cat}を示すように操作されている、ケトール酸レダクトイソメラーゼと、を含む、組み換え微生物。

【請求項１２７】
（ａ）ピルビン酸塩をアセト乳酸に変換する、少なくとも０．５Ｕ／ｍｇライセートのアセト乳酸シンターゼ活性を有するサイトゾル局在化ポリペプチドをコードする遺伝子と、
（ｂ）過剰発現されたケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）であって、少なくとも０．０３Ｕ／ｍｇライセートのＫＡＲＩ活性を有する、ＫＡＲＩと、を含む、組み換え微生物。

【請求項１２８】
（ａ）ピルビン酸塩をアセト乳酸に変換する、少なくとも０．５Ｕ／ｍｇライセートのアセト乳酸シンターゼ活性を有するサイトゾル局在化ポリペプチドをコードする遺伝子と、

（ｂ）過剰発現されたヒジドロキシ酸デヒドラターゼ（ＤＨＡＤ）であって、少なくとも０．０３Ｕ／ｍｇライセートのＤＨＡＤ活性を有する、ＤＨＡＤと、を含む、組み換え微生物。

【請求項１２９】

（ａ）ピルビン酸塩をアセト乳酸に変換する、アセト乳酸シンターゼ活性を有するサイトゾル局在化ポリペプチドをコードする遺伝子と、

（ｂ）アセト乳酸の２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現の低減または欠失と、

（ｃ）過剰発現されたケトール酸レダクトイソメラーゼと、を含む、組み換え微生物。

【請求項１３０】

イソブタノール産生代謝経路を含み、２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）をアセト乳酸に変換することができる内在性または異種タンパク質を過剰発現する、組み換え微生物。

【請求項１３１】

イソブタノール産生代謝経路を含み、２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）を２，３－ジヒドロキシイソ吉草酸塩（ＤＨＩＶ）に変換することができる内在性または異種タンパク質を過剰発現する、組み換え微生物。

【請求項１３２】

アセト乳酸を、２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）に変換することができる１つ以上の酵素を過剰発現する、２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）の産生のための組み換え微生物。

【請求項１３３】

アセト乳酸を２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）に変換することができる前記酵素は、３－ケト酸レダクターゼである、請求項１３２に記載の組み換え微生物。

【請求項１３４】

前記３－ケト酸レダクターゼは、Ｓ．セレビシエＹＭＲ２２６（配列番号１）またはその相同体もしくは変異体である、請求項１３３に記載の組み換え微生物。

【請求項１３５】

前記３－ケト酸レダクターゼは、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、および配列番号２３、またはその相同体もしくは変異体から選択される、請求項１３３に記載の組み換え微生物。

【請求項１３６】

２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）の産生ための方法であって、

（ａ）請求項１３２～１３５のいずれかに記載の組み換え微生物を提供することと、

（ｂ）回収可能な量のＤＨ２ＭＢが産生されるまで、前記組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養することと、

（ｃ）前記ＤＨ２ＭＢを回収することと、を含む、方法。

【請求項１３７】

２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩を２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）に変換することができる１つ以上の酵素を過剰発現する、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）の産生のための組み換え微生物。

【請求項１３８】
２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩を２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）に変換することができる前記酵素は、３－ケト酸レダクターゼである、請求項１３７に記載の組み換え微生物。
【請求項１３９】
前記３－ケト酸レダクターゼは、Ｓ．セレビシエＹＭＲ２２６（配列番号１）またはその相同体もしくは変異体である、請求項１３８に記載の組み換え微生物。
【請求項１４０】
前記３－ケト酸レダクターゼは、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、および配列番号２３、またはその相同体もしくは変異体から選択される、請求項１３８に記載の組み換え微生物。
【請求項１４１】
２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）の産生ための方法であって、
（ａ）請求項１３７～１４０のいずれかに記載の組み換え微生物を提供することと、
（ｂ）回収可能な量の２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）が産生されるまで、前記組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養することと、
（ｃ）前記２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート（ｄｉｈｙｄｒｏｙｘｂｕｔａｎｏａｔｅ）を回収することと、を含む、方法。
【請求項１４２】
アルデヒドを酸副産物に変換することができる１つ以上の酵素を過剰発現する、酸産物の産生のための組み換え微生物。
【請求項１４３】
アルデヒドの酸産物への変換を触媒する前記酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼである、請求項１４２に記載の組み換え微生物。
【請求項１４４】
前記アルデヒドデヒドロゲナーゼは、Ｓ．セレビシエＡＬＤ６（配列番号２５）またはその相同体もしくは変異体である、請求項１４３に記載の組み換え微生物。
【請求項１４５】
前記アルデヒドデヒドロゲナーゼは、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、および配列番号４１、またはその相同体もしくは変異体から選択される、請求項１４３に記載の組み換え微生物。
【請求項１４６】
酸産物の産生のための方法であって、
（ａ）請求項１４２～１４５のいずれかに記載の組み換え微生物を提供することと、
（ｂ）回収可能な量の前記酸産物が産生されるまで、前記組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養することと、
（ｃ）前記酸産物を回収することと、を含む、方法。
【請求項１４７】
前記酸副産物は、イソ酪酸塩、酪酸塩、２－メチル－１－酪酸塩、３－メチル－１－酪酸塩、プロピオン酸塩、ペンタノエート、ヘキサノエート、３－メチル－１－ペンタノエート、４－メチル－１－ペンタノエート、４－メチル－１－ヘキサノエート、および５－

メチル－１－ヘプタノエートから選択される、請求項１４６に記載の方法。
【請求項１４８】
（ａ）野生型Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号２）のチロシン５０、（ｂ）野生型Ｌ．ラクチスＡｄｈＡのグルタミン７７、（ｃ）野生型Ｌ．ラクチスＡｄｈＡのバリン１０８、（ｄ）野生型Ｌ．ラクチスＡｄｈＡのチロシン１１３、（ｅ）野生型Ｌ．ラクチスＡｄｈＡのイソロイシン２１２、および（ｆ）野生型Ｌ．ラクチスＡｄｈＡのロイシン２６４、からなる群から選択されるアミノ酸に対応する位置において１つ以上の改変を含む、改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）。
【請求項１４９】
前記チロシン５０残基は、フェニルアラニンまたはトリプトファン残基と置換される、請求項１４８に記載の改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）。
【請求項１５０】
前記グルタミン７７残基は、アルギニンまたはセリン残基と置換される、請求項１４８に記載の改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）。
【請求項１５１】
前記バリン１０８残基は、セリンまたはアラニン残基と置換される、請求項１４８に記載の改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）。
【請求項１５２】
前記チロシン１１３残基は、フェニルアラニンまたはグリシン残基と置換される、請求項１４８に記載の改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）。
【請求項１５３】
前記イソロイシン２１２残基は、スレオニン、アラニン、またはバリン残基と置換される、請求項１４８に記載の改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）。
【請求項１５４】
前記ロイシン２６４残基は、バリン残基と置換される、請求項１４８に記載の改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）。
【請求項１５５】
イソブチルアルデヒドのイソブタノールへの変換に対する、前記改変されたＡＤＨの前記触媒効率は、前記野生型ＡＤＨと比較して、少なくとも約５０％増強される、請求項１４８に記載の改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）。
【請求項１５６】
イソブチルアルデヒドのイソブタノールへの変換に対する、前記改変されたＡＤＨの前記触媒効率は、前記野生型ＡＤＨと比較して、少なくとも約１００％増強される、請求項１４８に記載の改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）。
【請求項１５７】
イソブチルアルデヒドのイソブタノールへの変換に対する、前記改変されたＡＤＨの前記触媒効率は、前記野生型ＡＤＨと比較して、少なくとも約２００％増強される、請求項１４８に記載の改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）。
【請求項１５８】
前記ＡＤＨは、ラクトコッカス、ラクトバチルス、ペディオコッカス、バチルス、レプトトリキア、アクチノバチルス、ストレプトコッカス、ストレプトバチルス、スタフィロコッカス、エイケネラ、ワイセラ、キンゲラ、ロチア、およびエキシグオバクテリウムから選択される属に由来する、請求項１４８に記載の改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）。
【請求項１５９】
前記ＡＤＨは、宿主細胞中での発現のためにコドン最適化される、請求項１５８に記載の改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）。
【請求項１６０】
前記宿主細胞は、酵母である、請求項１５９に記載の改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）。

【請求項１６１】
前記宿主細胞は、大腸菌である、請求項１５９に記載の改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）。
【請求項１６２】
請求項１４８～１６１のいずれかに記載の改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）をコードする核酸構築物により形質転換された、組み換え微生物。
【請求項１６３】
前記組み換え微生物は、アセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）、ケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（ＤＨＡＤ）、および２－ケト－酸デカルボキシラーゼ（ＫＩＶＤ）から選択される１つ以上のイソブタノール代謝経路酵素を含む、イソブタノール産生代謝経路を含む、請求項１５に記載の組み換え微生物。
【請求項１６４】
前記組み換え微生物は、酵母微生物である、請求項１６３に記載の組み換え微生物。
【請求項１６５】
イソブタノールを産生する方法であって、
（ａ）請求項１４８～１６４のいずれか１項に記載の組み換え微生物を提供することと、
（ｂ）回収可能な量の前記イソブタノールが産生されるまで、前記組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養することと、を含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願への相互参照
本出願は、２０１０年２月１２日に出願された米国仮出願第６１／３０４，０６９号、２０１０年２月２６日に出願された米国仮出願第６１／３０８，５６８号、２０１０年３月１０日に出願された米国仮出願第６１／２８２，６４１号、２０１０年６月７日に出願された米国仮出願第６１／３５２，１３３号、２０１０年１１月９日に出願された米国仮出願第６１／４１１，８８５号、および２０１１年１月７日に出願された米国仮出願第６１／４３０，８０１号に対する優先権を主張し、これらの各々は、参照によりその全体が全目的で本明細書に組み込まれる。
【０００２】
政府支援の承認
本発明は、米国農務省によって授与された契約第２００９－１０００６－０５９１９号の下、および米国陸軍省研究所によって授与された契約第Ｗ９１１ＮＦ－０９－２－００２２号の下で、政府支援により行われた。政府は本発明において一定の権利を有する。
【０００３】
組み換え微生物、およびかかる生物を産生する方法が提供される。好適な基質を、組み換え微生物およびそれに由来する酵素調製物と接触させることによって、燃料、化学物質、およびアミノ酸を含む有益な代謝物を産生する方法もまた、提供される。
【０００４】
電子的に提出されたテキストファイルの説明
本明細書と共に電子的に提出された次のテキストファイルの内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる：コンピュータ可読形式の配列表のコピー（ファイル名：ＧＥＶＯ＿０４５＿０３ＷＯ＿ＳｅｑＬｉｓｔ＿ＳＴ２５．ｔｘｔ、記録日：２０１１年２月９日、ファイルサイズ：３０６キロバイト）。
【背景技術】
【０００５】
ピルビン酸塩を、燃料、化学物質、およびアミノ酸を含む有益な代謝物に変換する微生物の能力は、近年、文献において幅広く記載されている。例えば、Ａｌｐｅｒ　ｅｔ　ａ

ｌ．，２００９，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．７：７１５－７２３を参照されたい。組み換え工学技術は、バリン、イソロイシン、ロイシン、およびパントテン酸（ビタミンＢ５）等の多数の有用な産物を産生することができる生合成経路を発現する、微生物の作成を可能にしている。加えて、イソブタノール等の燃料は、異種代謝経路を発現する微生物中で組み換えにより産生されている（例えば、Ｄｏｎａｌｄｓｏｎらに対する国際公開第／２００７／０５０６７１号、およびＬｉａｏらに対する国際公開第／２００８／０９８２２７号を参照されたい）。操作された微生物は、燃料、化学物質、およびアミノ酸の再生可能な産物のために潜在的に有用なツールを代表するが、これらの微生物の多くは、それらの低生産性、低力価、および低収率を含む低性能特性に起因して、商業的妥当性を満たしていない。

【０００６】

多くの既存の微生物中で観察される最適未満の性能に対する主な理由の１つは、経路中間体の所望されない副産物への望ましくない変換である。本発明者らは、２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）（ＣＡＳ番号１４８６８－２４－７）、２－エチル－２，３－ジヒドロキシ酪酸塩、２，３－ジヒドロキシ－２－メチル－ブタノエート、イソ酪酸塩、３－メチル－１－酪酸塩、２－メチル－１－酪酸塩、およびプロピオン酸塩を含む、種々の副産物を特定しており、それらは、燃料、化学物質、およびアミノ酸を産生するために使用される生合成経路の種々の中間体に由来する。これらの副産物の蓄積は、多様な発酵反応における望ましい代謝物の合成および収率に悪影響を及ぼす。現在まで、これらの所望されない副産物の産生に関与する酵素活性は、特徴付けられていない。より具体的には、本出願は、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）の活性が、これらの副産物の、重要な生合成経路中間体からの形成を許容することを示す。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

本発明は、これらの酵素活性の研究からもたらされ、３－ＫＡＲおよび／またはＡＬＤＨ酵素の抑制が、所望されない副産物の形成を大幅に低減または排除し、かつ同時に有益な代謝物の収率および力価を改善することを示す。本出願は、３－ＫＡＲおよび／またはＡＬＤＨ酵素活性の増強を使用して、２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）、２－エチル－２，３－ジヒドロキシ酪酸塩、２，３－ジヒドロキシ－２－メチル－ブタノエート、イソ酪酸塩、３－メチル－１－酪酸塩、２－メチル－１－酪酸塩、およびプロピオン酸塩等の、種々の副産物の産生を増加させることができることを更に示す。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

発明の概要

本発明者らは、生物燃料候補である、イソブタノールの発酵を含む、種々の発酵プロセス中に、所望されない副産物が蓄積し得ることを発見した。これらの所望されない副産物の蓄積は、３－ケト酸であるアセト乳酸および２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩、ならびに／またはイソブチルアルデヒド、１－ブタナール、１－プロパナール、２－メチル－１－ブタナール、および３－メチル－１－ブタナール等のアルデヒドを含む、経路中間体の望ましくない変換からもたらされる。これらの中間体の、所望されない副産物への変換は、３－ケト酸－および／またはアルデヒド由来産物の最適な生産性および収率を妨げ得る。したがって、本発明者らは、３－ケト酸および／またはアルデヒドが経路中間体として作用するプロセス中に、３－ケト酸および／またはアルデヒド中間体の、種々の発酵副産物への変換を低減するための方法を開発した。

【０００９】

第１の態様では、本発明は、３－ケト酸および／またはアルデヒドが中間体である生合成経路を含む組み換え微生物に関し、該組み換え微生物は、（ａ）３－ケト酸の３－ヒド

ロキシ酸副産物への変換を触媒する酵素が実質的になく、（ｂ）アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する酵素が実質的になく、（ｃ）３－ケト酸の、３－ヒドロキシ酸への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ／あるいは（ｄ）アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。一実施形態では、３－ケト酸は、アセト乳酸である。別の実施形態では、３－ケト酸は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩である。

【００１０】

一実施形態では、本発明は、中間体として３－ケト酸であるアセト乳酸を使用する生合成経路を含む組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、アセト乳酸の、対応する３－ヒドロキシ酸、ＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。幾つかの実施形態では、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素は、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）である。

【００１１】

一実施形態では、本発明は、中間体として３－ケト酸である２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩を使用する生合成経路を含む組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、アセト乳酸の対応する３－ヒドロキシ酸、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートへの変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。幾つかの実施形態では、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートへの変換を触媒する酵素は、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）である。

【００１２】

一実施形態では、本発明は、中間体としてアルデヒドを使用する生合成経路を含む組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。幾つかの実施形態では、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）である。

【００１３】

一実施形態では、本発明は、中間体として３－ケト酸およびアルデヒドの両方を使用する生合成経路を含む組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、（ａ）３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ（ｂ）アルデヒド中間体の酸副産物への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。一実施形態では、３－ケト酸は、アセト乳酸であり、３－ヒドロキシ酸副産物は、ＤＨ２ＭＢである。別の実施形態では、３－ケト酸は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩であり、３－ヒドロキシ酸副産物は、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートである。幾つかの実施形態では、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素は、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）である。幾つかの他の実施形態では、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートへの変換を触媒する酵素は、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）である。幾つかの他の実施形態では、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）である。なおも幾つかの他の実施形態では、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素は、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）であり、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）である。なおも幾つかの他の実施形態では、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートへの変換を触媒する酵素は、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）であり、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）である。

【００１４】

本明細書に記載される種々の実施形態では、本発明の組み換え微生物は、３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現の低減または欠失を含んでもよい。一実施形態では、３－ケト酸

中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現は、少なくとも約５０％低減される。別の実施形態では、３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現は、３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現の低減または欠失を含まない組み換え微生物と比較して、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または少なくとも約９９％低減される。一実施形態では、３－ケト酸中間体は、アセト乳酸であり、３－ヒドロキシ酸副産物は、ＤＨ２ＭＢである。別の実施形態では、３－ケト酸中間体は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩であり、３－ヒドロキシ酸副産物は、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートである。

【００１５】

本明細書に記載される種々の実施形態では、３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒することに関与するタンパク質は、ケトレダクターゼである。例示的な実施形態では、ケトレダクターゼは、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）である。別の実施形態では、タンパク質は、短鎖アルコールデヒドロゲナーゼである。なおも別の実施形態では、タンパク質は、中鎖アルコールデヒドロゲナーゼである。なおも別の実施形態では、タンパク質は、アルドースレダクターゼである。なおも別の実施形態では、タンパク質は、Ｄ－ヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼである。なおも別の実施形態では、タンパク質は、乳酸デヒドロゲナーゼである。なおも別の実施形態では、タンパク質は、Ｓ．セレビシエのＹＡＬ０６０Ｗ、ＹＪＲ１５９Ｗ、ＹＧＬ１５７Ｗ、ＹＢＬ１１４Ｗ、ＹＯＲ１２０Ｗ、ＹＫＬ０５５Ｃ、ＹＢＲ１５９Ｗ、ＹＢＲ１４９Ｗ、ＹＤＬ１６８Ｗ、ＹＤＲ３６８Ｗ、ＹＬＲ４２６Ｗ、ＹＣＲ１０７Ｗ、ＹＩＬ１２４Ｗ、ＹＭＬ０５４Ｃ、ＹＯＬ１５１Ｗ、ＹＭＲ３１８Ｃ、ＹＭＲ２２６Ｃ、ＹＢＲ０４６Ｃ、ＹＨＲ１０４Ｗ、ＹＩＲ０３６Ｃ、ＹＤＬ１７４Ｃ、ＹＤＲ５４１Ｃ、ＹＢＲ１４５Ｗ、ＹＧＬ０３９Ｗ、ＹＣＲ１０５Ｗ、ＹＤＬ１２４Ｗ、ＹＩＲ０３５Ｃ、ＹＦＬ０５６Ｃ、ＹＮＬ２７４Ｃ、ＹＬＲ２５５Ｃ、ＹＧＬ１８５Ｃ、ＹＧＬ２５６Ｗ、ＹＪＲ０９６Ｗ、ＹＭＲ２２６Ｃ、ＹＪＲ１５５Ｗ、ＹＰＬ２７５Ｗ、ＹＯＲ３８８Ｃ、ＹＬＲ０７０Ｃ、ＹＭＲ０８３Ｗ、ＹＥＲ０８１Ｗ、ＹＪＲ１３９Ｃ、ＹＤＬ２４３Ｃ、ＹＰＬ１１３Ｃ、ＹＯＬ１６５Ｃ、ＹＭＬ０８６Ｃ、ＹＭＲ３０３Ｃ、ＹＤＬ２４６Ｃ、ＹＬＲ０７０Ｃ、ＹＨＲ０６３Ｃ、ＹＮＬ３３１Ｃ、ＹＦＬ０５７Ｃ、ＹＩＬ１５５Ｃ、ＹＯＬ０８６Ｃ、ＹＡＬ０６１Ｗ、ＹＤＲ１２７Ｗ、ＹＰＲ１２７Ｗ、ＹＣｌ０１８Ｗ、ＹＩＬ０７４Ｃ、ＹＩＬ１２４Ｗ、およびＹＥＬ０７１Ｗ遺伝子、ならびにそれらの相同体からなる群から選択される。

【００１６】

一実施形態では、内在性タンパク質は、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）である。例示的な実施形態では、３－ケト酸レダクターゼは、Ｓ．セレビシエＹＭＲ２２６Ｃ（配列番号１）タンパク質であり、本明細書で「ＴＭＡ２９」と交換可能に使用される。幾つかの実施形態では、内在性タンパク質は、Ｓ．セレビシエＹＭＲ２２６Ｃ（配列番号１）タンパク質またはその相同体もしくは変異体であってもよい。一実施形態では、相同体は、バンデルワルトムジマ（Ｖａｎｄｅｒｗａｌｔｏｍｚｙｍａ）・ポリスポラ（配列番号２）、サッカロミセス・カステリイ（配列番号３）、カンジダ・グラブラタ（配列番号４）、サッカロミセス・バヤヌス（配列番号５）、ジゴサッカロミセス・ロウキシイ（配列番号６）、クルイベロミセス・ラクチス（配列番号７）、アシビア・ゴシピイ（配列番号８）、サッカロミセス・クルイベリ（配列番号９）、クルイベロミセス・サーモトレランス（配列番号１０）、クルイベロミセス・ワルチイ（配列番号１１）、ピキア・スチピチス（配列番号１２）、デバロミセス・ハンセニイ（配列番号１３）、ピキア・パストリス（配列番号１４）、カンジダ・デュブリニエンシス（配列番号１５）、カンジダ・アルビカンス（配列番号１６）、ヤロウィア・リポリチカ（配列番号１７）、イッサチェンキア・オリエンタリス（配列番号１８）、アスペルギルス・ニデュランス（配列番号１９）

、アスペルギルス・ニガー（配列番号２０）、ニューロスポラ・クラッサ（配列番号２１）、シゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号２２）、およびクルイベロミセス・マルシアヌス（配列番号２３）からなる群から選択されてもよい。

【００１７】

一実施形態では、組み換え微生物は、３－ケト酸レダクターゼをコードする少なくとも１つの遺伝子における突然変異を含み、該遺伝子によってコードされるポリペプチドの３－ケト酸レダクターゼ活性の低減をもたらす。別の実施形態では、組み換え微生物は、３－ケト酸レダクターゼをコードする遺伝子の部分的欠失を含み、この遺伝子によってコードされるポリペプチドの３－ケト酸レダクターゼ活性の低減をもたらす。別の実施形態では、組み換え微生物は、３－ケト酸レダクターゼをコードする遺伝子の完全な欠失を含み、この遺伝子によってコードされるポリペプチドの３－ケト酸レダクターゼ活性の低減をもたらす。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、３－ケト酸レダクターゼをコードする遺伝子に関連する調節領域の改変を含み、該遺伝子によってコードされるポリペプチドの発現の低減をもたらす。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、転写調節因子の改変を含み、３－ケト酸レダクターゼをコードする遺伝子の転写の低減をもたらす。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、３－ケト酸レダクターゼをコードする全ての遺伝子において突然変異を含み、この遺伝子によってコードされるポリペプチドの活性の低減をもたらす。一実施形態では、３－ケト酸レダクターゼ活性または発現は、少なくとも約５０％低減される。別の実施形態では、３－ケト酸レダクターゼ活性または発現は、３－ケト酸レダクターゼ活性または発現の低減を含まない組み換え微生物と比較して、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または少なくとも約９９％低減される。一実施形態では、該３－ケト酸レダクターゼは、Ｓ．セレビシエＴＭＡ２９（ＹＭＲ２２６Ｃ）遺伝子またはその相同体によってコードされる。

【００１８】

本明細書に記載される種々の実施形態では、本発明の組み換え微生物は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現の低減または欠失を含んでもよい。一実施形態では、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現は、少なくとも約５０％低減される。別の実施形態では、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現の低減または欠失を含まない組み換え微生物と比較して、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または少なくとも約９９％低減される。

【００１９】

本明細書に記載される種々の実施形態では、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する内在性タンパク質は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）である。一実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、ＡＬＤ６、およびＨＦＤ１からなる群から選択される遺伝子、ならびにそれらの相同体および変異体によってコードされる。例示的な実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、Ｓ．セレビシエＡＬＤ６（配列番号２５）タンパク質である。幾つかの実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、Ｓ．セレビシエＡＬＤ６（配列番号２５）タンパク質またはその相同体もしくは変異体である。一実施形態では、相同体は、サッカロミセス・カステリイ（配列番号２６）、カンジダ・グラブラタ（配列番号２７）、サッカロミセス・バヤヌス（配列番号２８）、クルイベロミセス・ラクチス（配列番号２９）、クルイベロミセス・サーモトレランス（配列番号３０）、クルイベロミセス・ワルチイ（配列番号３１）、サッカロミセス・セレビシエＹＪ７８９（配列番号３２）、サッカロミセス・セレビシエＪＡＹ２９１（配列番号３３）、サッカロミセス・セレビシエＥＣ１１１

８（配列番号３４）、サッカロミセス・セレビシエＤＢＹ９３９（配列番号３５）、サッカロミセス・セレビシエＡＷＲＩ１６３１（配列番号３６）、サッカロミセス・セレビシエＲＭ１１－１ａ（配列番号３７）、ピキア・パストリス（配列番号３８）、クルイベロミセス・マルシアヌス（配列番号３９）、シゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号４０）、およびシゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号４１）からなる群から選択される。

【００２０】

一実施形態では、組み換え微生物は、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子における突然変異を含み、該遺伝子によってコードされるポリペプチドのアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の低減をもたらす。別の実施形態では、組み換え微生物は、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の部分的欠失を含み、この遺伝子によってコードされるポリペプチドアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の低減をもたらす。別の実施形態では、組み換え微生物は、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の完全な欠失を含み、この遺伝子によってコードされるポリペプチドアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の低減をもたらす。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子に関連する調節領域の改変を含み、該遺伝子によってコードされるポリペプチドの発現の低減をもたらす。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、転写調節因子の改変を含み、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の転写の低減をもたらす。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする全ての遺伝子において突然変異を含み、この遺伝子によってコードされるポリペプチドの活性の低減をもたらす。一実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性または発現は、少なくとも約５０％低減される。別の実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性または発現は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性または発現の低減を含まない組み換え微生物と比較して、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または少なくとも約９９％低減される。一実施形態では、該アルデヒドデヒドロゲナーゼは、Ｓ．セレビシエＡＬＤ６遺伝子またはその相同体によってコードされる。

【００２１】

本明細書に記載される種々の実施形態では、組み換え微生物は、中間体として３－ケト酸を使用する生合成経路を含んでもよい。一実施形態では、３－ケト酸中間体は、アセト乳酸である。中間体としてアセト乳酸を使用する生合成経路は、イソブタノール、２－ブタノール、１－ブタノール、２－ブタノン、２，３－ブタンジオール、アセトイン、ジアセチル、バリン、ロイシン、パントテン酸、イソブチレン、３－メチル－１－ブタノール、４－メチル－１－ペンタノール、および補酵素Ａの生合成のための経路から選択されてもよい。別の実施形態では、３－ケト酸中間体は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩である。中間体として２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩を使用する生合成経路は、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールの生合成のための経路から選択されてもよい。

【００２２】

本明細書に記載される種々の実施形態では、組み換え微生物は、中間体としてアルデヒドを使用する生合成経路を含んでもよい。中間体としてアルデヒドを使用する生合成経路は、イソブタノール、１－ブタノール、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ブタノール、１－プロパノール、１－ペンタノール、１－ヘキサノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールの生合成のための経路から選択されてもよい。本明細書に記載される種々の実施形態では、アルデヒド中間体は、イソブチルアルデヒド、１－ブタナール、２－メチル－１－ブタナール、３－メチル－１－ブタナール、１－プロパナール、１－ペンタナール、１－ヘキサナール、３－メチル－１－ペンタナール、４－メチル－１－ペンタナール、４－メチル－１－ヘキサナール、および５－メチル－１－ヘプタナ

ールから選択されてもよい。

【００２３】

本明細書に記載される種々の実施形態では、組み換え微生物は、中間体として３－ケト酸およびアルデヒドを使用する生合成経路を含んでもよい。一実施形態では、３－ケト酸中間体は、アセト乳酸である。中間体としてアセト乳酸およびアルデヒドを使用する生合成経路は、イソブタノール、１－ブタノール、および３－メチル－１－ブタノールの生合成のための経路から選択されてもよい。別の実施形態では、３－ケト酸中間体は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩である。中間体として２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩およびアルデヒドを使用する生合成経路は、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールの生合成のための経路から選択されてもよい。

【００２４】

一実施形態では、本発明は、イソブタノールを産生するための組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、イソブタノール産生代謝経路を含み、該微生物は、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。幾つかの実施形態では、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素は、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）である。特定の実施形態では、３－ケト酸レダクターゼは、Ｓ．セレビシエＴＭＡ２９（ＹＭＲ２２６Ｃ）遺伝子またはその相同体によってコードされる。

【００２５】

別の実施形態では、本発明は、イソブタノールを産生するための組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、イソブタノール産生代謝経路を含み、該微生物は、イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。幾つかの実施形態では、イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼである。特定の実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、Ｓ．セレビシエＡＬＤ６遺伝子またはその相同体によってコードされる。

【００２６】

なおも別の実施形態では、本発明は、イソブタノールを産生するための組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、イソブタノール産生代謝経路を含み、該微生物は、（ｉ）アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ（ｉｉ）イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。幾つかの実施形態では、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素は、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）である。特定の実施形態では、３－ケト酸レダクターゼは、Ｓ．セレビシエＴＭＡ２９（ＹＭＲ２２６Ｃ）遺伝子またはその相同体によってコードされる。幾つかの実施形態では、イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼである。特定の実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、Ｓ．セレビシエＡＬＤ６遺伝子またはその相同体によってコードされる。

【００２７】

一実施形態では、イソブタノール産生代謝経路は、ピルビン酸塩のイソブタノールへの変換におけるステップを触媒する少なくとも１つの外来性遺伝子を含む。別の実施形態では、イソブタノール産生代謝経路は、ピルビン酸塩のイソブタノールへの変換におけるステップを触媒する少なくとも２つの外来性遺伝子を含む。なおも別の実施形態では、イソブタノール産生代謝経路は、ピルビン酸塩のイソブタノールへの変換におけるステップを触媒する少なくとも３つの外来性遺伝子を含む。なおも別の実施形態では、イソブタノール産生代謝経路は、ピルビン酸塩のイソブタノールへの変換におけるステップを触媒する少なくとも４つの外来性遺伝子を含む。なおも別の実施形態では、イソブタノール産生代謝経路は、ピルビン酸塩のイソブタノールへの変換におけるステップを触媒する５つの外来性遺伝子を含む。

【００２８】
一実施形態では、イソブタノール経路遺伝子のうちの１つ以上が、サイトゾルに局在化される酵素をコードする。一実施形態では、組み換え微生物は、少なくとも１つのイソブタノール経路酵素がサイトゾルに局在化される、イソブタノール産生代謝経路を含む。別の実施形態では、組み換え微生物は、少なくとも２つのイソブタノール経路酵素がサイトゾルに局在化される、イソブタノール産生代謝経路を含む。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、少なくとも３つのイソブタノール経路酵素がサイトゾルに局在化される、イソブタノール産生代謝経路を含む。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、少なくとも４つのイソブタノール経路酵素がサイトゾルに局在化される、イソブタノール産生代謝経路を含む。例示的な実施形態では、組み換え微生物は、５つのイソブタノール経路酵素がサイトゾルに局在化される、イソブタノール産生代謝経路を含む。

【００２９】
本明細書に記載される種々の実施形態では、イソブタノール経路遺伝子は、アセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）、ケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）、ヒジドロキシ酸デヒドラターゼ（ＤＨＡＤ）、２－ケト－酸デカルボキシラーゼ（ＫＩＶＤ）、およびアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）からなる群から選択される酵素をコードする。

【００３０】
別の態様では、組み換え微生物は、１つ以上のアルコールデヒドロゲナーゼの発現を低減および／または排除することによって、イソブタノールのイソブチルアルデヒドへの変換を低減するように操作されてもよい。特定の実施形態では、アルコールデヒドロゲナーゼは、ＡＤＨ１、ＡＤＨ２、ＡＤＨ３、ＡＤＨ４、ＡＤＨ５、ＡＤＨ６、およびＡＤＨ７、ならびにそれらの相同体および変異体からなる群から選択される遺伝子によってコードされる。

【００３１】
別の態様では、本発明は、イソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する増強された能力を示す、改変されたアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）酵素に関する。一般に、これらの改善されたＡＤＨ酵素を発現する細胞は、発酵反応中に増加されたレベルのイソブタノールを産生するであろう。本発明の改変されたＡＤＨ酵素が、イソブタノール産生発酵反応における実用性を有する一方で、改変されたＡＤＨ酵素がまた、１－プロパノール、２－プロパノール、１－ブタノール、２－ブタノール、１－ペンタノール、２－メチル－１－ブタノール、および３－メチル－１－ブタノール等の他のアルコールを産生する発酵反応において有用性を有することは、本開示を提供される当業者によって理解されるであろう。

【００３２】
ある態様では、本発明は、イソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する酵素の能力を増強するように改変されている、アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）を対象とする。かかるＡＤＨの例としては、（ａ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のチロシン５０、（ｂ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のグルタミン７７、（ｃ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のバリン１０８、（ｄ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のチロシン１１３、（ｅ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のイソロイシン２１２、および（ｆ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のロイシン２６４から選択されるアミノ酸に対応する位置において１つ以上の突然変異を有する酵素が挙げられ、ここでＡｄｈＡ（配列番号１８５）は、Ｌ．ラクチスアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）遺伝子ａｄｈＡ（配列番号１８４）またはそのコドン最適化バージョン（配列番号２０６）によってコードされる。

【００３３】
一実施形態では、改変されたＡＤＨ酵素は、Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）の５０位に対応するアミノ酸において突然変異を含有する。別の実施形態では、改変されたＡＤＨ酵素は、Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）の７７位に対応するアミノ酸において突然変異を含有する。なおも別の実施形態では、改変されたＡＤＨ酵素は、Ｌ．

ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）の１０８位に対応するアミノ酸において突然変異を含有する。なおも別の実施形態では、改変されたＡＤＨ酵素は、Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）の１１３位に対応するアミノ酸において突然変異を含有する。なおも別の実施形態では、改変されたＡＤＨ酵素は、Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）の２１２位に対応するアミノ酸において突然変異を含有する。なおも別の実施形態では、改変されたＡＤＨ酵素は、Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）の２６４位に対応するアミノ酸において突然変異を含有する。

【００３４】

一実施形態では、ＡＤＨ酵素は、上述の位置に対応するアミノ酸において２つ以上の突然変異を含有する。別の実施形態では、ＡＤＨ酵素は、上述の位置に対応するアミノ酸において３つ以上の突然変異を含有する。なおも別の実施形態では、ＡＤＨ酵素は、上述の位置に対応するアミノ酸において４つ以上の突然変異を含有する。なおも別の実施形態では、ＡＤＨ酵素は、上述の位置に対応するアミノ酸において５つ以上の突然変異を含有する。なおも別の実施形態では、ＡＤＨ酵素は、上述の位置に対応するアミノ酸において６つの突然変異を含有する。

【００３５】

１つの特定の実施形態では、本発明は、５０位のチロシンがフェニルアラニンまたはトリプトファン残基と置換される、ＡＤＨ酵素を対象とする。別の特定の実施形態では、本発明は、７７位のグルタミンがアルギニンまたはセリン残基と置換される、ＡＤＨ酵素を対象とする。別の特定の実施形態では、本発明は、１０８位のバリンがセリンまたはアラニン残基と置換される、ＡＤＨ酵素を対象とする。別の特定の実施形態では、本発明は、１１３位のチロシンがフェニルアラニンまたはグリシン残基と置換される、ＡＤＨ酵素を対象とする。別の特定の実施形態では、本発明は、２１２位のイソロイシンがスレオニンまたはバリン残基と置換される、ＡＤＨ酵素を対象とする。なおも別の特定の実施形態では、本発明は、２６４位のロイシンがバリン残基と置換される、ＡＤＨ酵素を対象とする。一実施形態では、ＡＤＨ酵素は、これらの特定の実施形態に記載される位置に対応するアミノ酸において２つ以上の突然変異を含有する。別の実施形態では、ＡＤＨ酵素は、これらの特定の実施形態に記載される位置に対応するアミノ酸において３つ以上の突然変異を含有する。なおも別の実施形態では、ＡＤＨ酵素は、これらの特定の実施形態に記載される位置に対応するアミノ酸において４つ以上の突然変異を含有する。なおも別の実施形態では、ＡＤＨ酵素は、これらの特定の実施形態に記載される位置に対応するアミノ酸において５つ以上の突然変異を含有する。なおも別の実施形態では、ＡＤＨ酵素は、これらの特定の実施形態に記載される位置に対応するアミノ酸において６つの突然変異を含有する。

【００３６】

ある例示的な実施形態では、ＡＤＨ酵素は、配列番号１８９、配列番号１９１、配列番号１９３、配列番号１９５、配列番号１９７、配列番号１９９、配列番号２０１、配列番号２０３、配列番号２０５、配列番号２０８、配列番号２１０、配列番号２１２、配列番号２１４、配列番号２１６、配列番号２１８、配列番号２２０、配列番号２２２、配列番号２２４選択される配列、および野生型または親酵素と比較した対応する突然変異を含むその相同体もしくは変異体を含む。

【００３７】

前の段落で言及されたように、上に提示されるものに対応する変化を含有する、Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）以外のＡＤＨ酵素が、本発明の範囲内に更に含まれる。かかるＡＤＨ酵素には、表９７に列挙されるＡＤＨ酵素が含まれてもよいが、これらに限定されない。

【００３８】

幾つかの実施形態では、改変対象のＡＤＨ酵素は、ＮＡＤＨ依存性ＡＤＨ酵素である。かかるＮＡＤＨ依存性ＡＤＨ酵素の例は、譲受人共通および同時係属中の米国特許公開第２０１０／０１４３９９７号に記載され、それは参照によりその全体が全目的で本明細書

に組み込まれる。幾つかの実施形態では、元々、ＮＡＤＰＨ利用ＡＤＨ酵素をコードする遺伝子は、酵素のＮＡＤＨに対する補因子優先度を切り替えるように改変される。

【００３９】

本明細書に記載されるように、改変されたＡＤＨは一般的に、野生型または親ＡＤＨと比較して、イソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する増強された能力を示す。好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率（$k_{cat}／K_M$）は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約５％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約１５％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約２５％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約５０％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約７５％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約１００％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約２００％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約５００％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約１０００％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約２０００％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約３０００％増強される。最も好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約３５００％増強される。

【００４０】

さらなる態様では、本発明は、酵母および大腸菌等の、ある種の望ましい宿主生物における発現のためにコドン最適化された、改変されたＡＤＨ酵素を対象とする。他の態様では、本発明は、本発明の改変されたＡＤＨ酵素を含む組み換え宿主細胞を対象とする。この態様によれば、本発明はまた、イソブチルアルデヒドのイソブタノールへの変換が所望される、任意の発酵プロセスにおいて改変されたＡＤＨ酵素を使用する方法も対象とする。この態様による一実施形態では、改変されたＡＤＨ酵素は、イソブタノールを産生する宿主細胞の能力を増強するのに好適である可能性がある。この態様による別の実施形態では、改変されたＡＤＨ酵素は、１－プロパノール、２－プロパノール、１－ブタノール、２－ブタノール、１－ペンタノール、２－メチル－１－ブタノール、および３－メチル－１－ブタノールを産生する宿主細胞の能力を増強するのに好適である可能性がある。

【００４１】

本明細書に記載される種々の実施形態では、組み換え微生物を含む改変されたＡＤＨは、イソブタノール産生代謝経路を発現するように更に操作されてもよい。一実施形態では、組み換え微生物は、少なくとも１つの外来性遺伝子を含むイソブタノール産生代謝経路を発現するように操作されてもよい。一実施形態では、組み換え微生物は、少なくとも２つの外来性遺伝子を含むイソブタノール産生代謝経路を発現するように操作されてもよい。別の実施形態では、組み換え微生物は、少なくとも３つの外来性遺伝子を含むイソブタノール産生代謝経路を発現するように操作されてもよい。別の実施形態では、組み換え微生物は、少なくとも４つの外来性遺伝子を含むイソブタノール産生代謝経路を発現するように操作されてもよい。別の実施形態では、組み換え微生物は、５つの外来性遺伝子を含むイソブタノール産生代謝経路を発現するように操作されてもよい。故に、本発明は更に、イソブタノール産生代謝経路を含む組み換え微生物、および該組み換え微生物を使用してイソブタノールを産生する方法を提供する。

【００４２】

本明細書に記載される種々の実施形態では、イソブタノール経路酵素は、アセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）、ケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）、ヒジドロキシ酸デ

ヒドラターゼ（ＤＨＡＤ）、２－ケト－酸デカルボキシラーゼ（ＫＩＶＤ）、およびアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）から選択される。

【００４３】

本明細書に記載される種々の実施形態では、イソブタノール経路酵素は、原核生物に由来してもよい。本明細書に記載される代替的な実施形態では、イソブタノール経路酵素は、真核生物に由来してもよい。ピルビン酸塩をイソブタノールに変換する例示的な代謝経路は、例えば、Ｂ．スブチリスからのａｌｓＳによってコードされるアセトヒドロキシ酸シンターゼ（ＡＬＳ）酵素、例えば、大腸菌からのｉｌｖＣによってコードされるケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）、例えば、Ｌ．ラクチスからのｉｌｖＤによってコードされるジヒドロオキシ（ｄｉｈｙｒｏｘｙ）－酸デヒドラターゼ（ＤＨＡＤ）、例えば、Ｌ．ラクチスからのｋｉｖＤによってコードされる２－ケト－酸デカルボキシラーゼ（ＫＩＶＤ）、および例えば、Ｌ．ラクチスからのａｄｈＡによってコードされるアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）（例えば、本明細書に記載される改変されたＡＤＨ）からなってもよく、本明細書に記載されるＹ５０、Ｑ７７、Ｖ１０８、Ｙ１１３、Ｉ２１２、およびＬ２６４位における１つ以上の突然変異を有する。

【００４４】

本明細書に記載される種々の実施形態では、組み換え微生物は、サッカロミセスクレード、サッカロミセス・センス・ストリクト微生物、クラブトリー陰性酵母微生物、クラブトリー陽性酵母微生物、ＷＧＤ（全ゲノム重複）後酵母微生物、ＷＧＤ（全ゲノム重複）前酵母微生物、および非発酵酵母微生物の微生物であってもよい。

【００４５】

幾つかの実施形態では、組み換え微生物は、サッカロミセスクレードの酵母組み換え微生物であってもよい。

【００４６】

幾つかの実施形態では、組み換え微生物は、サッカロミセス・センス・ストリクト微生物であってもよい。一実施形態では、サッカロミセス・センス・ストリクトは、Ｓ．セレビシエ、Ｓ．クドリアブゼビイ、Ｓ．ミカタエ、Ｓ．バヤヌス、Ｓ．ウバルム．Ｓ．カロカニス、およびそれらのハイブリッドからなる群から選択される。

【００４７】

幾つかの実施形態では、組み換え微生物は、クラブトリー陰性組み換え酵母微生物であってもよい。一実施形態では、クラブトリー陰性酵母微生物は、サッカロミセス、クルイベロミセス、ピキア、イッサトケンキア、ハンゼヌラ、またはカンジダからなる群から選択される属に分類される。さらなる実施形態では、クラブトリー陰性酵母微生物は、サッカロミセス・クルイベリ、クルイベロミセス・ラクチス、クルイベロミセス・マルシアヌス、ピキア・アノマラ、ピキア・スチピチス、ハンゼヌラ・アノマラ、カンジダ・ウチリス、およびクルイベロミセス・ワルチイから選択される。

【００４８】

幾つかの実施形態では、組み換え微生物は、クラブトリー陽性組み換え酵母微生物であってもよい。一実施形態では、クラブトリー陽性酵母微生物は、サッカロミセス、クルイベロミセス、ジゴサッカロミセス、デバリオミセス、カンジダ、ピキア、およびシゾサッカロミセスからなる群から選択される属に分類される。さらなる実施形態では、クラブトリー陽性酵母微生物は、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・ウバルム、サッカロミセス・バヤヌス、サッカロミセス・パラドキサス、サッカロミセス・カステリイ、クルイベロミセス・サーモトレランス、カンジダ・グラブラタ、Ｚ．・バイリ、Ｚ．・ロウキシイ、デバリオミセス・ハンセニイ、ピキア・パストリウス、シゾサッカロミセス・ポンベ、およびサッカロミセス・ウバルムからなる群から選択される。

【００４９】

幾つかの実施形態では、組み換え微生物は、ＷＧＤ（全ゲノム重複）後酵母組み換え微生物であってもよい。一実施形態では、ＷＧＤ後酵母組み換え微生物は、サッカロミセスまたはカンジダからなる群から選択される属に分類される。さらなる実施形態では、ＷＧ

Ｄ後酵母は、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・ウバルム、サッカロミセス・バヤヌス、サッカロミセス・パラドキサス、サッカロミセス・カステリイ、およびカンジダ・グラブラタからなる群から選択される。

【００５０】

幾つかの実施形態では、組み換え微生物は、ＷＧＤ（全ゲノム重複）前酵母組み換え微生物であってもよい。一実施形態では、ＷＧＤ前酵母組み換え微生物は、サッカロミセス、クルイベロミセス、カンジダ、ピキア、イッサトケンキア、デバリオミセス、ハンゼヌラ、パキソレン、ヤロウィア、およびシゾサッカロミセスからなる群から選択される属に分類される。さらなる実施形態では、ＷＧＤ前酵母は、サッカロミセス・クルイベリ、クルイベロミセス・サーモトレランス、クルイベロミセス・マルシアヌス、クルイベロミセス・ワルチイ、クルイベロミセス・ラクチス、カンジダ・トロピカリス、ピキア・パストリス、ピキア・アノマラ、ピキア・スチピチス、イッサチェンキア・オリエンタリス、イッサチェンキア・オシデンタリス、デバリオミセス・ハンセニイ、ハンゼヌラ・アノマラ、パキソレン・タンノフィリス（ｔａｎｎｏｐｈｉｌｉｓ）、ヤロウィア・リポリチカ、およびシゾサッカロミセス・ポンベからなる群から選択される。

【００５１】

幾つかの実施形態では、組み換え微生物は、トリコスポロン、ロドトルラ、ミキソチマ、またはカンジダからなる群から選択される属に分類されるものを含むが、これらに限定されない、非発酵酵母微生物である微生物であってもよい。特定の実施形態では、非発酵酵母は、Ｃ．ゼストビイ（ｘｅｓｔｏｂｉｉ）である。

【００５２】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される組み換え微生物を使用する燃料、化学物質、およびアミノ酸を含む、有益な代謝物を産生する方法を提供する。一実施形態では、本方法は、回収可能な量の代謝物が産生されるまで、組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養すること、および任意に、代謝物を回収することを含む。一実施形態では、微生物は、少なくとも約５パーセント理論収率の収率で、炭素源から代謝物を産生する。別の実施形態では、微生物は、少なくとも約１０パーセント、少なくとも約１５パーセント、約少なくとも約２０パーセント、少なくとも約２５パーセント、少なくとも約３０パーセント、少なくとも約３５パーセント、少なくとも約４０パーセント、少なくとも約４５パーセント、少なくとも約５０パーセント、少なくとも約５５パーセント、少なくとも約６０パーセント、少なくとも約６５パーセント、少なくとも約７０パーセント、少なくとも約７５パーセント、少なくとも約８０パーセント、少なくとも約８５パーセント、少なくとも約９０パーセント、少なくとも約９５パーセント、または少なくとも約９７．５パーセント理論収率の収率で、代謝物を産生する。一実施形態では、代謝物は、中間体として３－ケト酸を使用する生合成経路に由来してもよい。一実施形態では、３－ケト酸中間体は、アセト乳酸である。したがって、代謝物は、イソブタノール、２－ブタノール、１－ブタノール、２－ブタノン、２，３－ブタンジオール、アセトイン、ジアセチル、バリン、ロイシン、パントテン酸、イソブチレン、３－メチル－１－ブタノール、４－メチル－１－ペンタノール、および補酵素Ａを含むが、これらに限定されない、中間体としてアセト乳酸を使用する生合成経路に由来してもよい。別の実施形態では、３－ケト酸中間体は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩である。したがって、代謝物は、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールを含むが、これらに限定されない、中間体として２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩を使用する生合成経路に由来してもよい。別の実施形態では、代謝物は、イソブタノール、１－ブタノール、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ブタノール、１－プロパノール、１－ペンタノール、１－ヘキサノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールを含むが、これらに限定されない、中間体としてアルデヒドを使用する生合成経路に由来してもよい。なおも別の実施形態では、代謝物は、イソブタノール、１－ブタノール、およ

び３－メチル－１－ブタノール生合成経路を含むが、これらに限定されない、中間体としてアセト乳酸およびアルデヒドを使用する生合成経路に由来してもよい。なおも別の実施形態では、代謝物は、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノール生合成経路を含むが、これらに限定されない、中間体として２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩およびアルデヒドを使用する生合成経路に由来してもよい。

【００５３】

一実施形態では、組み換え微生物は、好気性条件下で増殖させられる。別の実施形態では、組み換え微生物は、微好気性条件下で増殖させられる。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、嫌気性条件下で増殖させられる。

【図面の簡単な説明】

【００５４】

本発明の例証的な実施形態は、次のように、図面で例証される。

【図１】イソブタノール経路の例示的な実施形態を例証する。

【図２】３－ケト酸レダクターゼによって触媒可能な例示的な反応を例証する。

【図３－１】例示的な３－ケト酸レダクターゼの非限定的な一覧、およびそれらの対応する酵素分類番号を例証する。

【図３－２】図３－１の続き。

【図４】アルデヒドデヒドロゲナーゼによって触媒可能な例示的な反応を例証する。

【図５】イソブタノール産生組み換え微生物中の、ＤＨ２ＭＢおよびイソ酪酸塩の産生を低減するための戦略を例証する。

【図６】３－メチル－１－ブタノール産生組み換え微生物中の、ＤＨ２ＭＢおよび３－メチル－１－酪酸塩の産生を低減するための戦略を例証する。

【図７】２－メチル－１－ブタノールを産生する組み換え微生物中の、２－エチル－２，３－ジヒドロキシ酪酸塩および２－メチル－１－酪酸塩の産生を低減するための戦略を例証する。

【図８】ＤＨ２ＭＢおよび酢酸塩を含有する試料（上部）、ならびに酢酸塩およびＤＨＩＶ（下部）を含有する試料を示すＬＣ４クロマトグラムの積み重ねオーバーレイを例証する。溶出順序：ＤＨ２ＭＢ、続いて酢酸塩（上部）；乳酸塩、酢酸塩、ＤＨＩＶ、イソ酪酸塩、ピルビン酸塩（下部）。

【図９】ＬＣ１上で収集されたＤＨＩＶに対応する保持時間で収集され、電導度検出を用いるＡＳ－１１カラム上でＬＣ４によって分析された、試料画分に対するクロマトグラムを例証する。

【図１０】ＬＣ１から単離されたピークの１Ｈ－ＣＯＳＹスペクトルを例証する。スペクトルは、０．９５ｐｐｍのＤＨ２ＭＢメチルプロトン（二重項）が、３．７ｐｐｍのメチンプロトン（四重項）に結合されることを示す。

【図１１】ＬＣ１から単離されたピークの１Ｈ－ＮＭＲスペクトルを例証する。スペクトルは、次のＤＨ２ＭＢの存在を示す：１．２ｐｐｍで整数値３のメチルプロトン（ａ）の一重項、０．９５ｐｐｍで整数値３のメチルプロトン（ｂ）の二重項、および３．７ｐｐｍで１．８４の整数値のメチンプロトン（ｃ）の四重項。メチンプロトン（ｃ）の整数値は、同じ領域におけるグルコース共鳴との重複に起因して１を超える。

【図１２】ＬＣ１から単離されたピークのＬＣ－ＭＳ分析を例証する。図の上部分で示されるように、試料中に複数の分子イオンが特定された。１３４分子イオンの更なる断片化（ＭＳ２）は、単離されたＬＣ１画分が、CO_2（＊）およびH_2O+CO_2（＊＊）の特徴的な損失によって、ヒドロキシカルボン酸を含有することを示した。

【図１３】２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（２Ｒ，３Ｓ）－１ａ、（２Ｓ，３Ｒ）－１ｂ、（２Ｒ，３Ｒ）－２ａ、（２Ｓ，３Ｓ）－２ｂのジアステレオマーおよび鏡像異性構造を例証する。

【図１４】D_2O中の結晶化ＤＨ２ＭＢの１Ｈスペクトルを例証する。１Ｈ　ＮＭＲ（ＴＳＰ）１．１（ｄ、６．５Ｈｚ、３Ｈ）、１．３（ｓ、３Ｈ）、３．９（ｑ、６．５Ｈｚ

、３Ｈ）
【図１５】D_2O中の結晶化ＤＨ２ＭＢの１３Ｃスペクトルを例証する。スペクトルは、５つの異なる炭素共鳴を示し、これらのうちの１つは、１８１ｐｐｍでの特徴的なカルボン酸共鳴である。
【図１６】ＧＥＶＯ３１６０での単一の発酵からのイソブタノールおよび副産物の発酵プロフィールを例証する。産生曝気は、植菌の９３時間後に、０．８ｍＭ／時間から０．３ｍＭ／時間のＯＴＲまで低減された。白ひし形＝ｉＢｕＯＨ、正方形＝未知、ＤＨ２ＭＢとして定量化、アスタリスク＝細胞乾燥重量（ｃｄｗ）、および黒三角形＝総副産物。
【図１７－１】Ｇ．ステアロサーモフィラス（Ｐｙｍｏｌ）の構造を有するＬ．ラクチスＡｄｈＡアミノ酸配列の構造的整列を例証する。活性部位突然変異が示される（Ｙ５０ＦおよびＬ２６４Ｖ）。補因子結合ドメインにおける突然変異もまた示される（Ｉ２１２ＴおよびＮ２１９Ｙ）。
【図１７－２】図１７－１の続き。
【図１８】中間体としてアセト乳酸を利用する生合成経路を例証する。１－ブタノール、イソブタノール、３－メチル－１－ブタノール、および４－メチル－１－ペンタノールの産生のための生合成経路は、中間体としてアセト乳酸およびアルデヒドの両方を使用する。
【図１９】中間体として２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩を利用する生合成経路を例証する。２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールの産生のための生合成経路は、中間体として２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩およびアルデヒドの両方を使用する。
【図２０】中間体としてアルデヒドを利用するさらなる生合成経路を例証する。
【発明を実施するための形態】
【００５５】
本明細書および添付の特許請求に使用されるとき、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈上、そうでないとする明確な指示がない限り、対応する複数形の指示対象を含む。故に、例えば、「ポリヌクレオチド（ａ ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ）」への言及は、複数のかかるポリヌクレオチドを含み、「微生物（ｔｈｅ ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍ）」への言及は、１つ以上の微生物への言及を含む、等である。
【００５６】
別途規定されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の専門家とって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様のまたは同等の方法および物質を、開示される方法および組成物の実践において使用することができるが、例示的な方法、デバイス、および物質が本明細書に記載される。
【００５７】
上記および本文全体にわたって論じられる任意の刊行物は、本出願の出願日前に単にそれらを開示するために提供される。本明細書のいかなる部分も、本発明者らが、先行開示に基づいて、かかる開示に先行する権利を有さないという承認として解釈されるべきではない。
【００５８】
「微生物」という用語には、古細菌ドメイン、細菌ドメイン、および真核生物ドメインからの原核微生物種および真核微生物種が含まれ、後者には、酵母および糸状菌、原虫、藻類、またはより高度な原生生物が含まれる。「微生物細胞」および「微生物（ｍｉｃｒｏｂｅ）」という用語は、微生物（ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍ）という用語と交換可能に使用される。
【００５９】
「属」という用語は、Ｔａｘｏｎｏｍｉｃ Ｏｕｔｌｉｎｅ ｏｆ Ｂａｃｔｅｒｉａ ａｎｄ Ａｒｃｈａｅａ（Ｇａｒｒｉｔｙ，Ｇ．Ｍ．，Ｌｉｌｂｕｒｎ，Ｔ．Ｇ．，Ｃｏｌｅ，Ｊ．Ｒ．，Ｈａｒｒｉｓｏｎ，Ｓ．Ｈ．，Ｅｕｚｅｂｙ，Ｊ．，ａｎｄ Ｔｉｎ

dall, B. J. (2007) The Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea. TOBA Release 7.7, March 2007. Michigan State University Board of Trustees. [http://www.taxonomicoutline.org/])による関連種の分類群として定義される。

【００６０】

「種」という用語は、９７％を超える１６ＳリボソームＲＮＡ配列相同性、および７０％を超えるゲノムハイブリダイゼーションを有する密接に関連した生物のコレクションとして定義され、全ての他の生物と十分に異なるため、異なる単位として認識される。

【００６１】

「組み換え微生物」および「組み換え宿主細胞」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、内在性ポリヌクレオチドを発現もしくは過剰発現し、ベクター中、組み込み構築物中に含められるもの等の異種ポリヌクレオチドを発現するように遺伝的に改変された微生物、または内在性遺伝子の発現の変化を有する微生物を指す。「変化」とは、遺伝子の発現、または１つ以上のポリペプチドもしくはポリペプチドサブユニットをコードするＲＮＡ分子もしくは同等のＲＮＡ分子のレベル、または１つ以上のポリペプチドもしくはポリペプチドサブユニットの活性が上方調節または下方調節され、その結果、発現、レベル、または活性が、変化の不在下で観察されるものより大きい、または小さいことを意味する。例えば、「変化させる」という用語は、「阻害する」を意味し得るが、「変化させる」という単語の使用は、この定義に限定されない。

【００６２】

遺伝子配列に関して、「発現」という用語は、遺伝子の転写、および適切な場合、結果として生じるｍＲＮＡ転写物のタンパク質への翻訳を指す。故に、文脈から明らかとなるであろうが、タンパク質の発現は、オープンリーディングフレーム配列の転写および翻訳からもたらされる。宿主細胞における所望の産物の発現レベルは、細胞中に存在する対応するｍＲＮＡの量、または選択された配列によってコードされる所望の産物の量のいずれかに基づいて決定され得る。例えば、選択された配列から転写されたｍＲＮＡは、ｑＲＴ－ＰＣＲまたはノーザンハイブリダイゼーションによって定量化することができる（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）を参照されたい）。選択された配列によってコードされるタンパク質は、種々の方法によって、例えば、ＥＬＩＳＡによって、タンパク質の生物活性をアッセイすることによって、またはウエスタンブロッティングもしくはラジオイムノアッセイ等の、かかる活性から独立したアッセイを用いることによって、タンパク質を認識しそれに結合する抗体を使用して、定量化することができる。上記のＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，１９８９を参照されたい。ポリヌクレオチドは、一般的に、所望の代謝物を産生するための代謝経路に関与する標的酵素をコードする。「組み換え微生物」および「組み換え宿主細胞」という用語は、特定の組み換え微生物を指すだけでなく、かかる微生物の子孫または可能性のある子孫も指すことが理解される。突然変異または環境的な影響のいずれかに起因して、後続の生成においてある種の改変が起こり得るため、かかる子孫は、実際には親細胞と同一でない可能性があるが、本明細書で使用されるとき、この用語の範囲内に依然として含まれる。

【００６３】

「過剰発現」という用語は、基底レベルのｍＲＮＡ（例えば、Ａｆｔタンパク質をコードするもの）を発現するか、または基底レベルのタンパク質を有する、同様の対応する非改変細胞と比較したときの、タンパク質（例えば、ＴＭＡ２９タンパク質またはその相同体）をコードするｍＲＮＡの亢進されたレベル（例えば、異常なレベル）、および／または細胞中のタンパク質（例えば、ＴＭＡ２９）の亢進されたレベルを指す。特定の実施形態では、ＴＭＡ２９、またはその相同体は、増加されたＴＭＡ２９ ｍＲＮＡ、タンパク質、および／または活性を示すように操作された微生物中で、少なくとも２倍、３倍、４

倍、５倍、６倍、８倍、１０倍、１２倍、１５倍、またはそれを超えて過剰発現され得る。

【００６４】

本明細書で使用されるとき、および当業者によって理解されるように、酵素等のタンパク質の「低減された活性および／または発現」は、細胞中のタンパク質の低減された特異的な触媒活性（例えば、低減された活性）、および／またはタンパク質の減少された濃度（例えば、低減された発現）のいずれかを意味し得る一方で、酵素等のタンパク質の「欠失された活性および／または発現」または「排除された活性および／または発現」は、細胞中の酵素のゼロのもしくはごく少量の特異的な触媒活性（例えば、欠失された活性）、および／または酵素のゼロのもしくはごく少量の濃度（例えば、欠失された発現）のいずれかを意味し得る。

【００６５】

「野生型微生物」という用語は、天然に生じる細胞、すなわち、遺伝子改変されていない細胞を説明する。野生型微生物は、第１の標的酵素を発現または過剰発現するように遺伝子改変することができる。この微生物は、第２の標的酵素を発現または過剰発現するように改変された微生物の生成において親微生物として作用することができる。次に、第１および第２の標的酵素を発現または過剰発現するように改変された微生物は、第３の標的酵素を発現または過剰発現するように改変することができる。

【００６６】

したがって、「親微生物」は、後続の遺伝子改変事象のための参照細胞として機能する。各改変事象は、核酸分子を参照細胞に導入することによって達成することができる。この導入は、標的酵素の発現または過剰発現を促進する。「促進する」という用語は、例えば、親微生物中のプロモーター配列の遺伝子改変による、標的酵素をコードする内在性ポリヌクレオチドの活性化を包含することが理解される。「促進する」という用語は、標的酵素をコードする異種ポリヌクレオチドの、親微生物への導入を包含することが更に理解される。

【００６７】

「操作（ｅｎｇｉｎｅｅｒ）」という用語は、微生物中の検出可能な変更をもたらす微生物の任意の操作（ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ）を指し、ここで操作（ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ）には、ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチド異種を微生物に挿入すること、および微生物に対して自然のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドを突然変異させることが含まれるが、これらに限定されない。

【００６８】

本明細書で使用される「突然変異」という用語は、変化した核酸またはポリペプチドをもたらす、核酸および／またはポリペプチドの任意の改変を指す。突然変異には、例えば、ポリヌクレオチド中の単一または複数の残基の点突然変異、欠失、または挿入が含まれ、これには、遺伝子のタンパク質コード領域内で生じる変化、ならびに調節配列またはプロモーター配列等であるがこれらに限定されない、タンパク質コード配列の外側の領域における変化が含まれる。遺伝子変化は、任意の型の突然変異であってもよい。例えば、突然変異は、遺伝子の一部または全ての点突然変異、フレームシフト突然変異、ナンセンス突然変異、挿入、または欠失を構成してもよい。加えて、改変された微生物の幾つかの実施形態では、微生物ゲノムの一部分が異種ポリヌクレオチドと置換されている。幾つかの実施形態では、突然変異は天然に生じる。他の実施形態では、突然変異は、人為淘汰圧力を通じて特定および／または強化される。更に他の実施形態では、微生物ゲノムにおける突然変異は、遺伝子操作の結果である。

【００６９】

「生合成経路」という用語は、「代謝経路」とも称され、１つの化学種を別の化学種に変換するための一組の同化または異化の生化学的反応を指す。遺伝子産物が、並行してまたは順次で、同じ基質に作用し、同じ産物を産生するか、または同じ基質と代謝最終産物との間の代謝中間体（すなわち、代謝物）に作用するか、もしくはそれを産生する場合、

この遺伝子産物は同じ「代謝経路」に属する。

【００７０】

本明細書で使用されるとき、「イソブタノール産生代謝経路」という用語は、ピルビン酸塩からイソブタノールを産生する酵素経路を指す。

【００７１】

「異種」という用語は、分子、特に、酵素およびポリヌクレオチドを参照して本明細書で使用されとき、天然の微生物における分子の発現レベルより低く、等しく、または高くなり得る発現レベルから独立して、分子が由来した生物、または自然界で見出される生物以外の生物において発現される分子を示す。

【００７２】

一方、「天然の」または「内在性の」という用語は、分子、特に、酵素およびポリヌクレオチドを参照して本明細書で使用されるとき、天然の微生物における分子の発現レベルより低く、等しく、または高くなり得る発現レベルから独立して、分子が由来した生物、または自然界で見出される生物において発現される分子を示す。天然の酵素またはポリヌクレオチドの発現は、組み換え微生物中で改変されてもよいことが理解される。

【００７３】

「供給原料」という用語は、微生物または発酵プロセスに供給される原料、または原料の混合物として定義され、これから他の産物を作製することができる。例えば、バイオマスまたはバイオマスに由来する炭素化合物等の炭素源は、発酵プロセスにおいて生物燃料を産生する微生物のための供給原料である。しかしながら、供給原料は、炭素源以外の栄養分を含有し得る。

【００７４】

「基質」または「好適な基質」という用語は、酵素の作用によって別の化合物に変換されるか、または変換されることが意図される任意の材料または化合物を指す。この用語には、単一の化合物だけではなく、少なくとも１つの基質、またはその誘導体を含有する溶液、混合物、および他の物質等の化合物の組み合わせもまた含まれる。更に、「基質」という用語は、任意のバイオマス由来の糖等の出発物質として使用するのに好適な炭素源を提供する化合物だけでなく、本明細書に記載される組み換え微生物に関連する経路において使用される中間体および最終産物代謝物もまた包含する。

【００７５】

「Ｃ２化合物」という用語は、全てのピルビン酸デカルボキシラーゼ（ＰＤＣ）遺伝子における突然変異が該遺伝子のピルビン酸デカルボキシラーゼ活性の低減をもたらす、操作された酵母微生物のための炭素源として使用されるとき、エタノールおよび酢酸塩を含むが、これらに限定されない２個の炭素原子からなる有機化合物を指す。

【００７６】

「発酵」または「発酵プロセス」という用語は、微生物が、供給原料および栄養分等の原料を含有する培地中で培養される過程として定義され、ここで微生物は、供給原料等の原料を産物に変換する。

【００７７】

「容積生産性」または「生産率」という用語は、１容積の培地当たり、単位時間当たりに形成される産物の量として定義される。容積生産性は、１リットル当たり、１時間当たりのグラム（ｇ／Ｌ／時間）として報告される。

【００７８】

「比生産性」または「比生産率」という用語は、培地１容積当たり、単位時間当たり、細胞のある量の当たりに形成される産物の量として定義される。比生産性は、１リットル当たり、１時間当たりＯＤ（ｇ／Ｌ／時間／ＯＤ）のグラムまたはミリグラムとして報告される。

【００７９】

「収率」という用語は、原料の１単位重量当たりに得られる産物の量として定義され、基質１ｇ当たりの産物のｇ（ｇ／ｇ）として表され得る。収率は、理論収率の百分率とし

て表されて得る。「理論収率」は、産物を作製するために使用される代謝経路の化学量論によって指示される、基質の所与の量当たり生成することができる産物の最大量として定義される。例えば、グルコースのイソブタノールへの１つの典型的な変換に対する理論収率は、０．４１ｇ／ｇである。したがって、０．３９ｇ／ｇのグルコースからのイソブタノールの収率は、９５％の理論収率（ｔｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ）、または９５理論収率％（ｔｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ　ｙｉｅｌｄ）として表されるであろう。

【００８０】

「力価」という用語は、溶液の強度、または溶液中の材料の濃度として定義される。例えば、発酵ブロス中の生物燃料の力価は、発酵ブロス１リットル当たりの溶液中の生物燃料のｇ（ｇ／Ｌ）として記載される。

【００８１】

「好気性条件」は、発酵培地中の酸素濃度が、末端電子受容体として使用するのに、好気性微生物または通性嫌気性微生物にとって十分に高い条件として定義される。

【００８２】

対照的に、「嫌気性条件」は、発酵培地中の酸素濃度が、末端電子受容体として使用するのに、微生物にとって低すぎる条件として定義される。嫌気性条件は、端末電子受容体として、微生物にとって酸素がもはや利用可能でなくなるまで、窒素等の不活性ガスを用いて発酵培地をスパージすることによって達成され得る。代替的には、嫌気性条件は、端末電子受容体として、微生物にとって酸素が利用不可能になるまで、微生物が発酵の利用可能な酸素を消費することによって達成され得る。嫌気性条件下でのイソブタノールの産生のための方法は、譲受人共通および同時係属中の刊行物、米国特許第２０１０／０１４３９９７号に記載され、この開示は、参照によりその全体が全目的で本明細書に組み込まれる。

【００８３】

「好気性代謝」は、酸素が端末電子受容体として使用されることによって、炭水化物から典型的にはＡＴＰの形態で、エネルギーを生成する生化学的プロセスを指す。好気性代謝は、例えば、解糖およびＴＣＡサイクルを介して生じ、ここで単一のグルコース分子が、酸素の存在下で完全に代謝されて二酸化炭素になる。

【００８４】

対照的に、「嫌気性代謝」は、酸素が、ＮＡＤＨに含有される電子の最終的な受容体でない生化学的プロセスを指す。嫌気性代謝は、酸素以外の化合物が、端末電子受容体として役割を果たす嫌気性呼吸、およびＮＡＤＨからの電子を利用することにより、「発酵経路」を介して還元産物を生成する、基質レベルのリン酸化に分類することができる。

【００８５】

「発酵経路」において、ＮＡＤ（Ｐ）Ｈは、ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ中に担持される電子を生成した同じ代謝経路によって産生される分子にその電子を供与する。例えば、ある種の酵母株の発酵経路の１つにおいて、解糖を介して生成されるＮＡＤ（Ｐ）Ｈは、ピルビン酸にその電子を移し、エタノールを産出する。発酵経路は、嫌気性条件下で通常活性であるが、好気性条件下、ＮＡＤＨが、呼吸鎖を介して完全に酸化されない条件下でも生じ得る。例えば、ある種のグルコース濃度の上で、クラブトリー陽性酵母は、好気性条件下で大量のエタノールを産生する。

【００８６】

「副産物（ｂｙｐｒｏｄｕｃｔ）」または「副産物（ｂｙ－ｐｒｏｄｕｃｔ）」という用語は、アミノ酸、アミノ酸前駆体、化学物質、化学物質前駆体、生物燃料、または生物燃料前駆体の産生に関連する所望されない産物を意味する。

【００８７】

「実質的にない」という用語は、所望の代謝経路（例えば、イソブタノール産生代謝経路）と競合する炭素経路における、酵素活性（３－ＫＡＲ、ＡＬＤＨ、ＰＤＣ、ＧＰＤ等）の存在または不在を参照して使用されるとき、酵素のレベルが、野生型宿主における同じ酵素のレベルよりも相当低いことを意味し、ここで約５０％未満の野生型レベルが好ま

しく、約３０％未満がより好ましい。活性は、約２０％未満、約１０％未満、約５％未満、または約１％未満の野生型活性であり得る。特定の酵素活性（３－ＫＡＲ、ＡＬＤＨ、ＰＤＣ、ＧＰＤ等）が「実質的にない」微生物は、組み換え手段を通じて作製されるか、自然界で特定され得る。

【００８８】

「非発酵酵母」という用語は、ＮＡＤＨからの電子を利用することにより、グルコースからのエタノールおよびCO_2の産生等の発酵経路を介して還元産物を生成する、嫌気性代謝を示すことができない酵母種である。非発酵酵母は、「Ｄｕｒｈａｍ管試験」（Ｊ．Ａ．Ｂａｒｎｅｔｔ，Ｒ．Ｗ．Ｐａｙｎｅ，ａｎｄ Ｄ．Ｙａｒｒｏｗ．２０００．Ｙｅａｓｔｓ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃｓ ａｎｄ Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ．３ｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ．ｐ．２８－２９．Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＵＫ）によって、またはエタノールおよびCO_2等の発酵産生の産生をモニタリングすることによって特定することができる。

【００８９】

「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書で「核酸」という用語と交換可能に使用され、ヌクレオチド、ヌクレオシド、またはそれらの類似体を含む２つ以上の単量体からなる有機ポリマーを指し、それらは任意の長さの１本鎖または２本鎖の、センスまたはアンチセンスデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、および適切な場合、ｓｉＲＮＡを含む、任意の長さの１本鎖または２本鎖の、センスまたはアンチセンスリボ核酸（ＲＮＡ）を含むが、これらに限定されない。「ヌクレオチド」という用語は、プリン塩基またはピリミジン塩基に、およびリン酸基に結合した、リボースまたはデオキシリボース糖からなり、核酸の塩基構造単位である、任意の複数の化合物を指す。「ヌクレオシド」という用語は、デオキシリボースまたはリボースと組み合わされたプリン塩基またはピリミジン塩基からなり、とりわけ核酸中に見出される化合物（グアノシンまたはアデノシン）を指す。「ヌクレオチド類似体」または「ヌクレオシド類似体」という用語はそれぞれ、１個以上の個々の原子が、異なる原子でまたは異なる官能基で置換されているヌクレオチドまたはヌクレオシドを指す。したがって、ポリヌクレオチドという用語には、任意の長さの核酸、ＤＮＡ、ＲＮＡ、それらの類似体および断片が含まれる。３つ以上のヌクレオチドのポリヌクレオチドはまた、ヌクレオチドオリゴマーまたはオリゴヌクレオチドとも呼ばれる。

【００９０】

本明細書に記載されるポリヌクレオチドには、「遺伝子」が含まれ、本明細書に記載される核酸分子には、「ベクター」または「プラスミド」が含まれることが理解される。したがって、「遺伝子」という用語は、「構造遺伝子」とも呼ばれ、１つ以上のタンパク質または酵素の全てまたは一部を含む、アミノ酸の特定の配列をコードするポリヌクレオチドを指し、プロモーター配列等の調節（非転写の）ＤＮＡ配列を含み得、それは、例えば、遺伝子が発現される条件を決定する。遺伝子の転写領域は、イントロン、５’－非翻訳領域（ＵＴＲ）、および３’－ＵＴＲを含む非翻訳領域、ならびにコード配列を含み得る。

【００９１】

「オペロン」という用語は、共通のプロモーターから単一の転写単位として転写される２つ以上の遺伝子を指す。幾つかの実施形態では、オペロンを含む遺伝子は、隣接遺伝子である。オペロン全体の転写は、共通のプロモーターを改変することによって、改変する（すなわち、増加させる、減少させる、または排除する）ことができることが理解される。代替的には、オペロン中の任意の遺伝子または遺伝子の組み合わせを、コードされるポリペプチドの機能または活性を変化させるように改変することができる。改変は、コードされるポリペプチドの活性の増加をもたらすことができる。更に、改変は、コードされるポリペプチドに新たな活性を付与することができる。例示的な新たな活性には、代替の基質の使用および／または代替の環境条件下で機能する能力が含まれる。

【００９２】

「ベクター」は、核酸を、生物、細胞、または細胞構成成分間で伝播および／または移

行させることができる任意の手段である。ベクターには、ウイルス、バクテリオファージ、プローウイルス、プラスミド、ファージミド、トランスポゾン、ならびにＹＡＣ（酵母人工染色体）、ＢＡＣ（細菌性人工染色体）、およびＰＬＡＣ（植物人工染色体）等の人工の染色体等が含まれ、それらは「エピソーム」であり、すなわち、それらは自律的に複製するか、宿主細胞の染色体に組み込むことができる。ベクターはまた、ネイキッドＲＮＡポリヌクレオチド、ネイキッドＤＮＡポリヌクレオチド、同じ鎖内のＤＮＡおよびＲＮＡの両方からなるポリヌクレオチド、ポリリジン共役ＤＮＡもしくはＲＮＡ、ペプチド共役ＤＮＡもしくはＲＮＡ、リポソーム共役ＤＮＡ等であり得、それらは本質的にエピソームではないか、またはそれはアグロバクテリウムまたは細菌等の上記のポリヌクレオチド構築物のうちの１つ以上を含む生物であり得る。

【００９３】

「形質転換」は、ベクターが宿主細胞中に導入されるプロセスを指す。形質転換（またはトランスダクション、またはトランスフェクション）は、化学物質形質転換（例えば、酢酸リチウム形質転換）、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、微粒子銃（または粒子ボンバードメント媒介型送達）、またはアグロバクテリウム媒介型形質転換を含む幾つかの手段のうちの任意の１つによって達成することができる。

【００９４】

本明細書で使用される「酵素」という用語は、１つ以上の化学的または生化学的反応を触媒または促進する任意の物質を指し、それは通常、完全にまたは部分的にポリペプチドからなる酵素を含むが、ポリヌクレオチドを含む異なる分子からなる酵素を含み得る。

【００９５】

本明細書で使用される「タンパク質」、「ペプチド」、または「ポリペプチド」という用語は、２つ以上のアミノ酸単量体および／またはその類似体からなる有機ポリマーを示す。本明細書で使用されるとき、「アミノ酸」または「アミノ酸単量体」という用語は、グリシンおよびＤまたはＬ両方の光学異性体を含む任意の天然および／または合成アミノ酸を指す。「アミノ酸類似体」という用語は、１個以上の個々の原子が、異なる原子または異なる官能基のいずれかで置換されているアミノ酸を指す。したがって、ポリペプチドという用語には、完全長タンパク質、およびペプチド、ならびにそれらの類似体および断片を含む、任意の長さのアミノ酸ポリマーが含まれる。３つ以上のアミノ酸のポリペプチドはまた、タンパク質オリゴマーまたはオリゴペプチドとも呼ばれる。

【００９６】

「相同体」という用語は、第１のファミリーまたは種の元の酵素または遺伝子に関して使用され、機能的、構造的、またはゲノム分析によって、第１のファミリーまたは種の元の酵素または遺伝子に対応する、第２のファミリーまたは種の酵素または遺伝子であると決定される、第２のファミリーまたは種の異なる酵素または遺伝子を指す。ほとんどの場合、相同体は、機能的、構造的、またはゲノム類似性を有することになる。酵素または遺伝子の相同体を、遺伝子プローブおよびＰＣＲを使用して、容易にクローン化することができる技術が知られている。相同体としてのクローン化配列の素性は、機能的アッセイを使用して、および／または遺伝子のゲノムマッピングによって確認することができる。

【００９７】

遺伝子によってコードされるアミノ酸配列が、第２の遺伝子の配列と同様のアミノ酸配列を有する場合、タンパク質は、第２のタンパク質に対して「相同性」を有するか、または「相同性」である。代替的には、２つのタンパク質が、「同様の」アミノ酸配列を有する場合、タンパク質は、第２のタンパク質に対して相同性を有する。（故に、「相同タンパク質」という用語は、２つのタンパク質が、同様のアミノ酸配列を有することを意味するように定義される）。

【００９８】

「類似体」または「類似した」という用語は、互いに機能においてのみ関係し、共通の系統に由来しないか、または共通の祖先配列を共有しない核酸配列もしくはタンパク質配列、またはタンパク質構造を指す。類似体は、配列において異なる可能性があるが、収束

進化に起因して、同様の構造を共有する可能性がある。例えば、酵素が、基質を産物に変換する同じ反応を触媒し、配列において無関係であり、２つの酵素が構造において関連しているかどうかに関係ない場合、２つの酵素は類似体であるか、または類似している。

低減された副産物蓄積を有する組み換え微生物

【００９９】

酵母細胞は、糖類を変換してピルビン酸塩を産生し、それは次いで、細胞代謝の幾つかの経路において利用される。近年、酵母細胞は、ピルビン酸塩駆動型生合成経路を介して、幾つかの望ましい産物を産生するように操作されている。これらの生合成経路のうちの多くにおいて、初期経路ステップは、内在性ピルビン酸塩の３－ケト酸への変換である。

【０１００】

本明細書で使用されるとき、「３－ケト酸」は、Ｃ１炭素上にカルボン酸部分およびＣ３炭素上にケトン部分を含有する、有機化合物を指す。例えば、アセト乳酸および２－ヒドロキシ－２－メチル－３－オキソブタン酸は、Ｃ３炭素においてケトン基を有する３－ケト酸である（例えば、図２を参照されたい）。

【０１０１】

多くの生合成経路に共通の３－ケト酸の例としては、アセト乳酸があり、それは酵素アセト乳酸シンターゼ（アセトヒドロキシ酸シンターゼとしても知られる）の作用によって、ピルビン酸塩から形成される。中間体としてアセト乳酸を使用する生合成経路の中には、イソブタノール、２－ブタノール、１－ブタノール、２－ブタノン、２，３－ブタンジオール、アセトイン、ジアセチル、バリン、ロイシン、パントテン酸、イソブチレン、３－メチル－１－ブタノール、４－メチル－１－ペンタノール、および補酵素Ａの産生のための経路が含まれる。これらの有益なアセト乳酸由来代謝物の合成のために操作された生合成経路は、表１および図１８に見出される。

【表１】
中間体としてアセト乳酸を利用する生合成経路

生合成経路	***参考文献[a]***
イソブタノール	米国特許第 2009/0226991 号（Feldman ら）、米国特許第 2011/0020889 号（Feldman ら）、および米国特許第 2010/0143997 号（Buelter ら）
1-ブタノール	国際公開第/2010/017230 号（Lynch）、国際公開第/2010/031772 号（Wu ら）、および KR2011002130 号（Lee ら）
2-ブタノール	国際公開第/2007/130518 号（Donaldson ら）、国際公開第/2007/130521 号（Donaldson ら）、および国際公開第/2009/134276 号（Donaldson ら）
2-ブタノン	国際公開第/2007/130518 号（Donaldson ら）、国際公開第/2007/130521 号（Donaldson ら）、および国際公開第/2009/134276 号（Donaldson ら）
2-3-ブタンジオール	国際公開第/2007/130518 号（Donaldson ら）、国際公開第/2007/130521 号（Donaldson ら）、および国際公開第/2009/134276 号（Donaldson ら）
アセトイン	国際公開第/2007/130518 号（Donaldson ら）、国際公開第/2007/130521 号（Donaldson ら）、および国際公開第/2009/134276 号（Donaldson ら）
ジアセチル	Gonzalez *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem* 275: 35876-85 および Ehsani *et al.*, 2009, *App. Environ. Micro.* 75: 3196-205
バリン	国際公開第/2001/021772 号（Yocum ら）および McCourt *et al.*, 2006, *Amino Acids* 31: 173-210
ロイシン	国際公開第/2001/021772 号（Yocum ら）および McCourt *et al.*, 2006, *Amino Acids* 31: 173-210
パントテン酸	国際公開第/2001/021772 号（Yocum ら）
3-メチル-1-ブタノール	国際公開第/2008/098227 号（Liao ら）、Atsumi *et al.*, 2008, *Nature* 451: 86-89、および Connor *et al.*, 2008, *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 5769-5775
4-メチル-1-ペンタノール	国際公開第/2010/045629 号（Liao ら）、Zhang *et al.*, 2008, 105:20653-20658
補酵素 A	国際公開第/2001/021772 号（Yocum ら）

[a]－この表における参考文献の各々の内容は、参照によりその全体が全目的で本明細書に組み込まれる。

【０１０２】
表１に列挙される生合成経路の各々は、共通の３－ケト酸中間体である、アセト乳酸を共有する。したがって、これらの生合成経路からの産物収率は、一部には、該生合成経路の下流酵素にとって利用可能なアセト乳酸の量に依存することになる。

【０１０３】
多くの生合成経路に共通の３－ケト酸の別の例としては、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩があり、それは酵素アセト乳酸シンターゼ（アセトヒドロキシ酸シンターゼとしても知られる）の作用によって、ピルビン酸塩および２－ケト酪酸塩から形成される。中間体として２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩を使用する生合成経路の中には、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールの産生のための経路が含まれる。これらの有益な２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩由来代謝物の合成のために操作された生合成経路は、表２および図１９に見出される。

【表２】
中間体として２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩を利用する生合成経路

生合成経路	***参考文献[a]***
2-メチル-1-ブタノール	国際公開第/2008/098227 号（Liao ら）、国際公開第/2009/076480 号（Picataggio ら）、および Atsumi *et al.*, 2008, *Nature* 451: 86-89
イソロイシン	McCourt *et al.*, 2006, *Amino Acids* 31: 173-210
3-メチル-1-ペンタノール	国際公開第/2010/045629 号（Liao ら）、Zhang *et al.*, 2008, 105:20653-20658
4-メチル-1-ヘキサノール	W 国際公開第/2010/045629 号（Liao ら）、Zhang *et al.*, 2008, 105:20653-20658
5-メチル-1-ヘプタノール	国際公開第/2010/045629 号（Liao ら）、Zhang *et al.*, 2008, 105:20653-20658

[a]－この表における参考文献の各々の内容は、参照によりその全体が全目的で本明細書に組み込まれる。

【０１０４】
表２に列挙される生合成経路の各々は、共通の３－ケト酸中間体である、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩を共有する。したがって、これらの生合成経路からの産物収率は、一部には、該生合成経路の下流酵素にとって利用可能なアセト乳酸の量に依存することになる。

【０１０５】
同様に、酵母細胞は、経路中間体としてアルデヒドを利用する生合成経路を介して、幾つかの望ましい産物を産生するように操作することができる。アルデヒド中間体を含む操作された生合成経路には、イソブタノール、１－ブタノール、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ブタノール、１－プロパノール、１－ペンタノール、１－ヘキサノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールの産生のための生合成経路が含まれる（表３ならびに図１８、１９、および２０を参照されたい）。

【表３】
中間体としてアルデヒドを利用する生合成経路

生合成経路	***アルデヒド中間体***	***参考文献[a]***
イソブタノール	イソブチルアルデヒド	米国特許第 2009/0226991 号（Feldman ら）、米国特許第 2011/0020889 号（Feldman ら）、および米国特許第 2010/0143997 号（Buelter ら）
1-ブタノール	1-ブタナール	国際公開第/2010/017230 号（Lynch）、国際公開第/2010/031772 号（Wu ら）、国際公開第/2010/045629 号（Liao ら）、国際公開第/2007/041269 号（Donaldson ら）、国際公開第/2008/052991 号（Raamsdonk ら）、国際公開第/2008/143704 号（Buelter ら）、および国際公開第/2008/080124 号（Gunawardena ら）
2-メチル-1-ブタノール	2-メチル-1-ブタナール	国際公開第/2008/098227 号（Liao ら）、国際公開第/2009/076480 号（Picataggio ら）、および Atsumi *et al.*, 2008, *Nature* 451: 86-89
3-メチル-1-ブタノール	3-メチル-1-ブタナール	国際公開第/2008/098227 号（Liao ら）、Atsumi *et al.*, 2008, *Nature* 451: 86-89、および Connor *et al.*, 2008, *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 5769-5775
1-プロパノール	1-プロパナール	国際公開第/2008/098227 号（Liao ら）
1-ペンタノール	1-ペンタナール	国際公開第/2010/045629 号（Liao ら）、Zhang *et al.*, 2008, 105:20653-20658
1-ヘキサノール	1-ヘキサナール	国際公開第/2010/045629 号（Liao ら）、Zhang *et al.*, 2008, 105:20653-20658
3-メチル-1-ペンタノール	3-メチル-1-ペンタナール	国際公開第/2010/045629 号（Liao ら）、Zhang *et al.*, 2008, 105:20653-20658
4-メチル-1-ペンタノール	4-メチル-1-ペンタナール	国際公開第/2010/045629 号（Liao ら）、Zhang *et al.*, 2008, 105:20653-20658
4-メチル-1-ヘキサノール	4-メチル-1-ヘキサナール	国際公開第/2010/045629 号（Liao ら）、Zhang *et al.*, 2008, 105:20653-20658
5-メチル-1-ヘプタノール	5-メチル-1-ヘプタナール	国際公開第/2010/045629 号（Liao ら）、Zhang *et al.*, 2008, 105:20653-20658

[a]－この表における参考文献の各々の内容は、参照によりその全体が全目的で本明細書に組み込まれる。

【０１０６】
表３に列挙される生合成経路の各々は、アルデヒド中間体を有する。例えば、イソブタノール産生代謝経路におけるアルデヒド中間体は、イソブチルアルデヒド（図１を参照されたい）である一方で、１－ブタノール、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ブタノール、１－プロパノール、１－ペンタノール、１－ヘキサノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールの産生のための経路は、それぞれ、中間体としてアルデヒド、１－ブタナール、２－メチル－１－ブタナール、３－メチル－１－ブタナール、１－プロパナール、１－ペンタナール、１－ヘキサナール、３－メチル－１－ペンタナール、４－メチル－１－ペンタナール、４－メチル－１－ヘキサナール、および５－メチル－１－ヘプタノールを利用する。したがって、これらのアルデヒド中間体を利用する生合成経路における産物収率は、一部には、該生合成経路の下流酵素にとって利用可能なアルデヒド中間体の量に依存することになる。

【０１０７】
本明細書に記載されるように、本発明者らは、３－ケト酸および／またはアルデヒド中間体に由来する、所望されない副産物の蓄積に関与する酵素活性を発見した。具体的には、彼らは、３－ケト酸レダクターゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼが、３－ケト酸およびアルデヒドの、それぞれ、所望されない副産物への変換に関与することを突き止めた

。これらの酵素の活性は、表１～３に列挙されるものを含むが、これらに限定されない、３－ケト酸由来および／またはアルデヒド由来産物の最適な生産性および収率を妨げることが示される。本発明者らは、これらの新たに特徴付けられた酵素活性を抑制することが、所望されない副産物の形成を大幅に低減または排除し、および同時に有益な代謝物の収率および力価を改善することを見出した。

３－ケト酸からの３－ヒドロキシ酸の低減された蓄積

【０１０８】

本明細書に記載されるように、本発明者らは、所望されない副産物である３－ヒドロキシ酸が、３－ケト酸中間体を伴う経路を含む微生物との発酵反応中に蓄積し得ることを発見している。

【０１０９】

本明細書で使用されるとき、「３－ヒドロキシ酸」は、Ｃ１炭素上にカルボン酸部分およびＣ３炭素上にアルコール部分を含有する、有機化合物である。３－ヒドロキシ酸は、３－ケト酸ケトン部分の、アルコール部分への化学的還元によって、３－ケト酸から得ることができる。例えば、アセト乳酸または２－ヒドロキシ－２－メチル－３－オキソブタン酸におけるケトン部分の還元は、３－ヒドロキシ酸２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）の形成をもたらす（例えば、図２を参照されたい）。

【０１１０】

本発明者らは、３－ヒドロキシ酸副産物である２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＣＡＳ番号１４８６８－２４－７）（ＤＨ２ＭＢ）が、３－ケト酸中間体、アセト乳酸を伴う生合成経路を含む微生物との発酵反応中に蓄積することを発見した。この副産物の蓄積は、生合成経路の標的代謝物の最適な生産性および収率を妨げることが見出された。本発明者らは、ＤＨ２ＭＢの産生が、アセト乳酸の還元によって引き起こされることを見出した。ＤＨ２ＭＢの産生に関与する活性を低減または排除するために、この反応を触媒する対応する酵素活性が特定され、低減または排除される必要があった。発明者らは、Ｓ．セレビシエにおいて、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する１つのかかる酵素が、ＹＭＲ２２６Ｃ（ＴＭＡ２９としても知られる）であることを見出した。これは、アセト乳酸をＤＨ２ＭＢに変換する酵母中のタンパク質の最初の報告である。

【０１１１】

本発明者らはまた、３－ヒドロキシ酸副産物である２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートが、３－ケト酸中間体である２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩を伴う生合成経路を含む微生物との発酵反応中に蓄積することを発見した。この副産物の蓄積は、生合成経路の標的代謝物の最適な生産性および収率を妨げることが見出された。本発明者らは、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートの産生が、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の還元によって引き起こされることを見出した。２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートの産生に関与する活性を低減または排除するために、この反応を触媒する対応する酵素活性が特定され、低減または排除される必要があった。発明者らは、Ｓ．セレビシエにおいて、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素ＹＭＲ２２６Ｃ（ＴＭＡ２９としても知られる）がまた、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートへの変換も触媒することを見出した。これは、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩を２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートに変換する酵母中のタンパク質の最初の報告である。

【０１１２】

本発明者らは、本明細書で、３－ケト酸中間体の、対応する３－ヒドロキシ酸副産物への変換を低減するための複数の戦略を説明し、それは望ましい代謝物の収率の増加を伴うプロセスである。一実施形態では、３－ケト酸中間体は、アセト乳酸であり、対応する３－ヒドロキシ酸は、ＤＨ２ＭＢである。本明細書に記載されるように、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を低減することは、中間体としてアセト乳酸を使用する生合成経路に由来する、イソブタノール、２－ブタノール、１－ブタノール、２－ブタノン、２，３－ブタ

ンジオール、アセトイン、ジアセチル、バリン、ロイシン、パントテン酸、イソブチレン、３－メチル－１－ブタノール、４－メチル－１－ペンタノール、および補酵素Ａ等の有益な代謝物の増加された産生を可能にする。別の実施形態では、３－ケト酸中間体は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩であり、対応する３－ヒドロキシ酸は、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートである。本明細書に記載されるように、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートへの変換を低減することは、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノール等の有益な代謝物の増加された産生を可能にする。

【０１１３】

したがって、本発明の一態様は、中間体として３－ケト酸を使用する生合成経路を含む組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒する酵素が実質的にない。一実施形態では、３－ケト酸中間体は、アセト乳酸であり、３－ヒドロキシ酸副産物は、ＤＨ２ＭＢである。別の実施形態では、３－ケト酸中間体は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩であり、３－ヒドロキシ酸副産物は、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートである。

【０１１４】

別の態様では、本発明は、中間体として３－ケト酸を使用する生合成経路を含む組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。一実施形態では、３－ケト酸中間体は、アセト乳酸であり、３－ヒドロキシ酸副産物は、ＤＨ２ＭＢである。別の実施形態では、３－ケト酸中間体は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩であり、３－ヒドロキシ酸副産物は、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートである。

【０１１５】

本明細書に記載される種々の実施形態では、３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒することに関与するタンパク質は、ケトレダクターゼである。例示的な実施形態では、ケトレダクターゼは、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）である。本明細書で使用されるとき、「３－ケト酸レダクターゼ」という用語は、３－ケト酸の３－オキソ基に向けて活性なケトレダクターゼ（すなわち、ケトンレダクターゼ）を指す。３－ケト酸レダクターゼによって触媒可能な例示的な反応の例証は、図２に示される。好適な３－ケト酸レダクターゼは、一般的に酵素分類亜群１．１．１．Ｘにおいて見出され、このうち最終桁Ｘは、基質に依存する。例示的な３－ケト酸レダクターゼおよびそれらの対応する酵素分類番号の非限定的な一覧は、図３に示される。

【０１１６】

例示的な実施形態では、３－ケト酸レダクターゼは、本明細書で「ＴＭＡ２９」と交換可能に使用される、Ｓ．セレビシエＹＭＲ２２６Ｃ（配列番号１）タンパク質である。幾つかの実施形態では、３－ケト酸レダクターゼは、Ｓ．セレビシエＹＭＲ２２６Ｃ（配列番号１）タンパク質またはその相同体もしくは変異体である。一実施形態では、相同体は、バンデルワルトムジマ（Ｖａｎｄｅｒｗａｌｔｏｍｚｙｍａ）・ポリスポラ（配列番号２）、サッカロミセス・カステリイ（配列番号３）、カンジダ・グラブラタ（配列番号４）、サッカロミセス・バヤヌス（配列番号５）、ジゴサッカロミセス・ロウキシイ（配列番号６）、Ｋ．ラクチス（配列番号７）、アシビア・ゴシピイ（配列番号８）、サッカロミセス・クルイベリ（配列番号９）、クルイベロミセス・サーモトレランス（配列番号１０）、クルイベロミセス・ワルチイ（配列番号１１）、ピキア・スチピチス（配列番号１２）、デバロミセス・ハンセニイ（配列番号１３）、ピキア・パストリス（配列番号１４）、カンジダ・デュブリニエンシス（配列番号１５）、カンジダ・アルビカンス（配列番号１６）、ヤロウィア・リポリチカ（配列番号１７）、イッサチェンキア・オリエンタリス（配列番号１８）、アスペルギルス・ニデュランス（配列番号１９）、アスペルギルス・ニガー（配列番号２０）、ニューロスポラ・クラッサ（配列番号２１）、シゾサッカロ

ミセス・ポンベ（配列番号２２）、およびクルイベロミセス・マルシアヌス（配列番号２３）からなる群から選択されてもよい。

【０１１７】

一実施形態では、本発明の組み換え微生物は、３－ケト酸レダクターゼをコードする少なくとも１つの遺伝子における突然変異を含み、該遺伝子によってコードされるポリペプチドの３－ケト酸レダクターゼ活性の低減をもたらす。別の実施形態では、組み換え微生物は、３－ケト酸レダクターゼをコードする遺伝子の部分的欠失を含み、この遺伝子によってコードされるポリペプチドの３－ケト酸レダクターゼ活性の低減をもたらす。別の実施形態では、組み換え微生物は、３－ケト酸レダクターゼをコードする遺伝子の完全な欠失を含み、この遺伝子によってコードされるポリペプチドの３－ケト酸レダクターゼ活性の低減をもたらす。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、３－ケト酸レダクターゼをコードする遺伝子に関連する調節領域の改変を含み、該遺伝子によってコードされるポリペプチドの発現の低減をもたらす。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、転写調節因子の改変を含み、３－ケト酸レダクターゼをコードする遺伝子の転写の低減をもたらす。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、３－ケト酸レダクターゼをコードする全ての遺伝子における突然変異を含み、この遺伝子によってコードされるポリペプチドの活性の低減をもたらす。一実施形態では、該３－ケト酸レダクターゼ遺伝子は、Ｓ．セレビシエＴＭＡ２９（ＹＭＲ２２６Ｃ）遺伝子またはその相同体である。当該技術分野において理解されるであろうが、Ｓ．セレビシエ以外の酵母中のＴＭＡ２９の天然産の相同体を、本発明の方法を使用して同様に不活性化することができる。ＴＭＡ２９相同体およびかかるＴＭＡ２９相同体を特定する方法が本明細書に記載される。

【０１１８】

当業者によって理解されるように、３－ケト酸レダクターゼ等のタンパク質の活性を低減または撹乱するために利用可能な複数のさらなる機構が存在し、調節型プロモーターの使用、弱い構成的プロモーターの使用、二倍体酵母中の遺伝子の２コピーのうちの１つの撹乱、二倍体酵母中の遺伝子の両コピーの撹乱、アンチセンス核酸の発現、ｓｉＲＮＡの発現、内在性プロモーターの陰性調節因子の過剰発現、内在性または異種遺伝子の活性の変更、より低い比活性を有する異種遺伝子の使用、それらと同様のものまたはそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【０１１９】

本明細書に記載されるように、本発明の組み換え微生物は、非改変親微生物よりも、少ない３－ヒドロキシ酸副産物を産生するように操作される。一実施形態では、組み換え微生物は、約２０パーセント未満の炭素収率で、炭素源から３－ヒドロキシ酸副産物を産生する。別の実施形態では、微生物は、約１０パーセント未満、約５パーセント未満、約２パーセント未満、約１パーセント未満、約０．５パーセント未満、約０．１パーセント未満、または約０．０１パーセント未満の炭素収率で、炭素源から３－ヒドロキシ酸副産物を産生する。一実施形態では、３－ヒドロキシ酸副産物は、３－ケト酸であるアセト乳酸に由来するＤＨ２ＭＢである。別の実施形態では、３－ヒドロキシ酸副産物は、３－ケト酸である２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩に由来する２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートである。

【０１２０】

一実施形態では、３－ケト酸に由来する３－ヒドロキシ酸副産物炭素収率は、３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現の低減または欠失を含まない親微生物と比較して、組み換え微生物中で少なくとも約５０％低減される。別の実施形態では、３－ケト酸に由来する３－ヒドロキシ酸副産物は、３－ケト酸の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現の低減または欠失を含まない親微生物と比較して、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％、少なくとも約９９．９％、または少なくとも約

１００％低減される。一実施形態では、３－ヒドロキシ酸副産物は、３－ケト酸であるアセト乳酸に由来するＤＨ２ＭＢである。別の実施形態では、３－ヒドロキシ酸副産物は、３－ケト酸である２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩に由来する２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートである。

【０１２１】

さらなる実施形態では、望ましい発酵産物の収率は、３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現の低減または排除を含む組み換え微生物中で増加される。一実施形態では、望ましい発酵産物の収率は、３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約１％増加される。別の実施形態では、望ましい発酵産物の収率は、３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２５％、または少なくとも約５０％増加される。一実施形態では、３－ヒドロキシ酸副産物は、３－ケト酸であるアセト乳酸に由来するＤＨ２ＭＢである。したがって、一実施形態では、望ましい発酵産物は、イソブタノール、２－ブタノール、１－ブタノール、２－ブタノン、２，３－ブタンジオール、アセトイン、ジアセチル、バリン、ロイシン、パントテン酸、イソブチレン、３－メチル－１－ブタノール、４－メチル－１－ペンタノール、および補酵素Ａを含むが、これらに限定されない、アセト乳酸が中間体として作用する任意の生合成経路に由来する。別の実施形態では、３－ヒドロキシ酸副産物は、３－ケト酸である２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩に由来する２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートである。したがって、別の実施形態では、望ましい発酵産物は、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールを含むが、これらに限定されない、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩が中間体として作用する任意の生合成経路に由来する。

【０１２２】

更なる実施形態では、３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒する可能性のあるさらなる酵素が、中間体として３－ケト酸を使用する生合成経路を含む組み換え微生物のゲノムから欠失される。３－ケト酸中間体を３－ヒドロキシ酸副産物に変換する可能性を有する内在性酵母遺伝子には、ケトレダクターゼ、短鎖アルコールデヒドロゲナーゼ、中鎖アルコールデヒドロゲナーゼ、アルドースレダクターゼファミリーのメンバー、Ｄ－ヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼファミリーのメンバー、アルコールデヒドロゲナーゼ、および乳酸デヒドロゲナーゼが含まれる。一実施形態では、３－ヒドロキシ酸副産物は、３－ケト酸であるアセト乳酸に由来するＤＨ２ＭＢである。別の実施形態では、３－ヒドロキシ酸副産物は、３－ケト酸である２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩に由来する２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートである。

【０１２３】

３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒するさらなる酵素を特定する方法は、次のように概説される：ケトレダクターゼ、短鎖アルコールデヒドロゲナーゼ、中鎖アルコールデヒドロゲナーゼ、アルドースレダクターゼファミリーのメンバー、Ｄ－ヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼファミリーのメンバー、アルコールデヒドロゲナーゼ、および乳酸デヒドロゲナーゼをコードする内在性酵母遺伝子を、３－ケト酸（例えば、アセト乳酸または２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩）が中間体である、生合成経路を含む酵母株のゲノムから欠失させる。これらの欠失株を、発酵ブロスの発酵および分析によって、対応する３－ヒドロキシ酸副産物（例えば、それぞれアセト乳酸および２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩に由来する、ＤＨ２ＭＢまたは２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート）の存在および濃度について、親株と比較する。Ｓ．セレビシエにおいて、３－ヒドロキシ酸副産物の産生を低減する欠失は、複数の欠失を担持する株の構築によって組み合わせられる。候補遺伝子には、ＹＡＬ０６０Ｗ、ＹＪＲ１５９Ｗ、ＹＧＬ１５７

Ｗ、ＹＢＬ１１４Ｗ、ＹＯＲ１２０Ｗ、ＹＫＬ０５５Ｃ、ＹＢＲ１５９Ｗ、ＹＢＲ１４９Ｗ、ＹＤＬ１６８Ｗ、ＹＤＲ３６８Ｗ、ＹＬＲ４２６Ｗ、ＹＣＲ１０７Ｗ、ＹＩＬＬ２４Ｗ、ＹＭＬ０５４Ｃ、ＹＯＬ１５１Ｗ、ＹＭＲ３１８ｃ、ＹＢＲ０４６Ｃ、ＹＨＲ１０４Ｗ、ＹＩＲ０３６Ｃ、ＹＤＬ１７４Ｃ、ＹＤＲ５４１Ｃ、ＹＢＲ１４５Ｗ、ＹＧＬ０３９Ｗ、ＹＣＲ１０５Ｗ、ＹＤＬ１２４Ｗ、ＹＩＲ０３５Ｃ、ＹＦＬ０５６Ｃ、ＹＮＬ２７４ｃ、ＹＬＲ２５５Ｃ、ＹＧＬ１８５Ｃ、ＹＧＬ２５６Ｗ、ＹＪＲ０９６Ｗ、ＹＪＲ１５５Ｗ、ＹＰＬ２７５Ｗ、ＹＯＲ３８８Ｃ、ＹＬＲ０７０Ｃ、ＹＭＲ０８３Ｗ、ＹＥＲ０８１Ｗ、ＹＪＲ１３９Ｃ、ＹＤＬ２４３Ｃ、ＹＰＬ１１３Ｃ、ＹＯＬ１６５Ｃ、ＹＭＬ０８６Ｃ、ＹＭＲ３０３Ｃ、ＹＤＬ２４６Ｃ、ＹＬＲ０７０Ｃ、ＹＨＲ０６３Ｃ、ＹＮＬ３３１Ｃ、ＹＦＬ０５７Ｃ、ＹＩＬ１５５Ｃ、ＹＯＬ０８６Ｃ、ＹＡＬ０６１Ｗ、ＹＤＲ１２７Ｗ、ＹＰＲ１２７Ｗ、ＹＣＬ０１８Ｗ、ＹＩＬ０７４Ｃ、ＹＩＬ１２４Ｗ、およびＹＥＬ０７１Ｗが含まれ得るが、これらに限定されない。これらの欠失株の多くは、市販されている（例えば、Ｏｐｅｎ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　ＹＳＣ１０５４）。これらの欠失株をプラスミドｐＧＶ２４３５で形質転換し、そこからＡＬＳ遺伝子（例えば、Ｂ．スブチリスａｌｓＳ）を、ＣＵＰ１プロモーターの制御下で発現させる。形質転換体を、振盪フラスコ中に１５０ｇ／Ｌグルコースを含有するＹＰＤ培地中、振盪インキュベーター中で、３０℃、７５ｒｐｍで４８時間培養する。４８時間後、振盪フラスコからの試料を、ＨＰＬＣによって、３－ヒドロキシ酸副産物（例えば、それぞれアセト乳酸および２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩に由来する、ＤＨ２ＭＢおよび２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート）の濃度について分析する。当該技術分野において理解されるように、Ｓ．セレビシエ以外の酵母中の３－ケト酸のレダクターゼ遺伝子（例えば、ＴＭＡ２９）の天然産の相同体を、同様に不活性化することができる。３－ケト酸レダクターゼ遺伝子（例えば、ＴＭＡ２９）相同体、およびかかる３－ケト酸レダクターゼ遺伝子相同体を特定する方法は、本明細書に記載される。

【０１２４】

欠失ライブラリをスクリーニングする別の方法は、酵母細胞を３－ケト酸中間体（例えば、アセト乳酸または２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩）でインキュベートし、対応する３－ヒドロキシ酸副産物（例えば、それぞれアセト乳酸および２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩に由来する、ＤＨ２ＭＢまたは２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート）の産生について、ブロスを分析することである。

【０１２５】

列挙された遺伝子の幾つかは、縦列重複または全ゲノム重複事象の結果であり、同様の基質特異性を有することが予想される。例としては、ＹＡＬ０６１Ｗ（ＢＤＨ１）およびＹＡＬ０６０Ｗ（ＢＤＨ２）、ＹＤＲ３６８Ｗ（ＹＰＲ１）、ならびにＹＯＲ１２０Ｗ（ＧＣＹ１）がある。重複遺伝子のうちの１つのみの欠失が表現型をもたらす可能性は低い。これらの遺伝子対は、両方の遺伝子中に欠失を担持する株において分析される必要がある。

【０１２６】

３－ヒドロキシ酸副産物（例えば、それぞれアセト乳酸および２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩に由来する、ＤＨ２ＭＢまたは２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート）の産生に関与する、さらなる内在性活性を見出すための代替的な手法は、３－ヒドロキシ酸副産物の産生に関与する酵素をコードすることが疑われる遺伝子を過剰発現する酵母株を分析することである。かかる株は、上記に列挙された候補遺伝子の多くのために、市販されている（例えば、Ｏｐｅｎ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　ＹＳＣ３８７０）。ＯＲＦ過剰発現株は、欠失株と同じ方法でプロセスされる。それらは、ＡＬＳ発現のためにプラスミドで形質転換され、３－ヒドロキシ酸副産物（例えば、ＤＨ２ＭＢまたは２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート）産生レベルについてスクリーニングされる。３－ヒドロキシ酸副産物（例えば、ＤＨ２ＭＢまたは２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート）の産生を引き起こす可能性のある遺伝子の一覧を狭めるために、それらの発現を、発酵試料中で分析することができる。３－ヒドロキシ酸副産物（例えば、ＤＨ２ＭＢ

または２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート）を産生した発酵中に発現されない遺伝子は、可能性のある標的の一覧から除外することができる。この分析は、発酵槽試料からＲＮＡを抽出し、これらの試料を、例えば、Ｒｏｃｈｅ　ＮｉｍｂｌｅＧｅｎによる、全ゲノム発現分析に供することによって行うことができる。

【０１２７】

本明細書に記載されるように、低レベルの１つ以上の３－ヒドロキシ酸副産物を天然に産生する株もまた、３－ケト酸中間体を含む生合成経路に由来する、増加されたレベルの望ましい発酵産物を産生するために適用できる可能性がある。本開示を提供される当業者によって理解されるように、低レベルの１つ以上の３－ヒドロキシ酸副産物を天然に産生する株は、本質的に、低レベルまたは検出不可能なレベルの内在性酵素活性を示す可能性があり、３－ケト酸の、３－ヒドロキシ酸への低減された変換をもたらし、それはイソブタノール等の望ましい発酵産物の産生に好ましい形質である。３－ケト酸レダクターゼ活性が実質的にない、天然の宿主微生物を特定するための複数の手法が本明細書に記載される。例えば、３－ヒドロキシ酸副産物（例えば、ＤＨ２ＭＢまたは２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート）の産生に関与する、本質的に低いまたは検出不可能な内在性酵素活性を示す宿主微生物を見出すための１つの手法は、酵母株を３－ケト酸（例えば、アセト乳酸または２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩）でインキュベートすることによって、酵母株を分析すること、および対応する３－ヒドロキシ酸副産物（例えば、それぞれアセト乳酸および２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩に由来する、ＤＨ２ＭＢまたは２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエート）の産生について、ブロスを分析することである。

【０１２８】

中間体として３－ケト酸を使用する生合成経路に由来する有益な代謝物を産生する、本明細書に記載される組み換え微生物は、ピルビン酸塩の、３－ケト酸（例えば、アセト乳酸および／または２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩）以外の産物への変換に対する酵素活性を低減または排除するように更に操作されてもよい。一実施形態では、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ＰＤＣ）、乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）、ピルビン酸塩オキシダーゼ、ピルビン酸塩デヒドロゲナーゼ、および／またはグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）の酵素活性が、低減または排除される。

【０１２９】

特定の実施形態では、有益な代謝物は、アセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）遺伝子を過剰発現する、組み換えＰＤＣ－マイナスＧＰＤ－マイナス酵母微生物中で産生される。別の特定の実施形態では、ＡＬＳは、Ｂ．スブチリスａｌｓＳによってコードされる。

アルデヒド中間体からの酸副産物の低減された蓄積

【０１３０】

実施例に更に記載されるように、本発明者らはまた、所望されない酸副産物（例えば、イソブタノールの場合におけるイソ酪酸塩）が、アルデヒド中間体（例えば、イソブタノールの場合におけるイソブチルアルデヒド）を伴う経路を含む微生物との発酵反応中に蓄積し得ることも発見した。

【０１３１】

本明細書で使用されるとき、「酸副産物」は、カルボン酸部分を含有する有機化合物を指す。酸副産物は、アルデヒドの酸化によって得ることができる。例えば、イソブチルアルデヒドの酸化は、イソ酪酸の形成をもたらす（例えば、図４を参照されたい）。

【０１３２】

本発明者らは、これらの酸副産物の蓄積が、アルデヒド中間体を利用する生合成経路の最適な生産性および収率を妨げることを見出した。本発明者らは、これらの酸副産物の産生が、対応するアルデヒドの脱水素化によって引き起こされることを見出した。酸副産物の産生に関与する活性を低減または排除するために、この反応を触媒する対応する酵素活性が特定され、低減または排除される必要があった。発明者らは、Ｓ．セレビシエにおい

て、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する１つのかかる酵素が、アルデヒドデヒドロゲナーゼであることを見出した。

【０１３３】

本発明者らは、本明細書で、酸副産物形成を低減するための複数の戦略を説明し、それはイソブタノール、１－ブタノール、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ブタノール、１－プロパノール、１－ペンタノール、１－ヘキサノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノール等の望ましい代謝物の収率の増加を伴うプロセスである。

【０１３４】

したがって、本発明の一態様は、中間体としてアルデヒドを使用する生合成経路を含む組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する酵素が実質的にない。

【０１３５】

別の態様では、本発明は、中間体としてアルデヒドを使用する生合成経路を含む組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。

【０１３６】

一実施形態では、アルデヒド中間体は、イソブチルアルデヒドであり、酸副産物は、イソ酪酸塩である。別の実施形態では、アルデヒド中間体は、１－ブタナールであり、酸副産物は、酪酸塩である。なおも別の実施形態では、アルデヒド中間体は、２－メチル－１－ブタナールであり、酸副産物は、２－メチル－１－酪酸塩である。なおも別の実施形態では、アルデヒド中間体は、３－メチル－１－ブタナールであり、酸副産物は、３－メチル－１－酪酸塩である。なおも別の実施形態では、アルデヒド中間体は、１－プロパナールであり、酸副産物は、プロピオン酸塩である。なおも別の実施形態では、アルデヒド中間体は、１－ペンタナールであり、酸副産物は、ペンタノエートである。なおも別の実施形態では、アルデヒド中間体は、１－ヘキサナールであり、酸副産物は、ヘキサノエートである。なおも別の実施形態では、アルデヒド中間体は、３－メチル－１－ペンタナールであり、酸副産物は、３－メチル－１－ペンタノエートである。なおも別の実施形態では、アルデヒド中間体は、４－メチル－１－ペンタナールであり、酸副産物は、４－メチル－１－ペンタノエートである。なおも別の実施形態では、アルデヒド中間体は、４－メチル－１－ヘキサナールであり、酸副産物は、４－メチル－１－ヘキサノエートである。なおも別の実施形態では、アルデヒド中間体は、５－メチル－１－ヘプタナールであり、酸副産物は、５－メチル－１－ヘプタノエートである。

【０１３７】

本明細書に記載される種々の実施形態では、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与するタンパク質は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）である。

【０１３８】

本明細書で使用されるとき、「アルデヒドデヒドロゲナーゼ」という用語は、次の反応を触媒する酵素を指す。

$$\text{アルデヒド}+\text{酸化補因子}+H_2O=\text{酸}+\text{還元補因子}+H^+$$

【０１３９】

アルデヒドデヒドロゲナーゼによって触媒可能な例示的な反応の例証は、図４に示される。好適なアルデヒドデヒドロゲナーゼは、一般的に酵素分類亜群ＥＣ　１．２．１．Ｘにおいて見出され、ここで最終桁Ｘは、基質または補因子に依存する。例えば、ＥＣ　１．２．１．３は、次の反応を触媒する：アルデヒド＋NAD^+＋H_2O＝酸＋ＮＡＤＨ＋H^+）。ＥＣ　１．２．１．４は、次の反応を触媒する：アルデヒド＋$NADP^+$＋H_2O＝酸＋ＮＡＤＰＨ＋H^+）。ＥＣ１．２．１．５は、次の反応を触媒する：アルデヒド＋$NAD(P)^+$＋H_2O＝酸＋ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ＋H^+。

【０１４０】

本明細書に記載されるように、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与するタンパク質は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）である。一実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、ＡＬＤ６、およびＨＦＤ１からなる群から選択される遺伝子、ならびにそれらの相同体および変異体によってコードされる。例示的な実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、Ｓ．セレビシエアルデヒドデヒドロゲナーゼＡＬＤ６（配列番号２５）またはその相同体もしくは変異体である。一実施形態では、相同体は、サッカロミセス・カステリイ（配列番号２６）、カンジダ・グラブラタ（配列番号２７）、サッカロミセス・バヤヌス（配列番号２８）、クルイベロミセス・ラクチス（配列番号２９）、クルイベロミセス・サーモトレランス（配列番号３０）、クルイベロミセス・ワルチイ（配列番号３１）、サッカロミセス・セレビシエＹＪ７８９（配列番号３２）、サッカロミセス・セレビシエＪＡＹ２９１（配列番号３３）、サッカロミセス・セレビシエＥＣ１１１８（配列番号３４）、サッカロミセス・セレビシエＤＢＹ９３９（配列番号３５）、サッカロミセス・セレビシエＡＷＲＩ１６３１（配列番号３６）、サッカロミセス・セレビシエＲＭ１１－１ａ（配列番号３７）、ピキア・パストリス（配列番号３８）、クルイベロミセス・マルシアヌス（配列番号３９）、シゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号４０）、およびシゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号４１）からなる群から選択されてもよい。

【０１４１】

一実施形態では、組み換え微生物は、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子における突然変異を含み、該遺伝子によってコードされるポリペプチドのアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の低減をもたらす。別の実施形態では、組み換え微生物は、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の部分的欠失を含み、この遺伝子によってコードされるポリペプチドアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の低減をもたらす。別の実施形態では、組み換え微生物は、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の完全な欠失を含み、この遺伝子によってコードされるポリペプチドアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の低減をもたらす。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子に関連する調節領域の改変を含み、該遺伝子によってコードされるポリペプチドの発現の低減をもたらす。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、転写調節因子の改変を含み、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の転写の低減をもたらす。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする全ての遺伝子における突然変異を含み、この遺伝子によってコードされるポリペプチドの活性の低減をもたらす。一実施形態では、該アルデヒドデヒドロゲナーゼは、ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、ＡＬＤ６、およびＨＦＤ１からなる群から選択される遺伝子、ならびにそれらの相同体および変異体によってコードされる。当該技術分野において理解されるであろうが、Ｓ．セレビシエ以外の酵母中のアルデヒドデヒドロゲナーゼの天然産の相同体を、本発明の方法を使用して同様に不活性化することができる。アルデヒドデヒドロゲナーゼ相同体およびかかるアルデヒドデヒドロゲナーゼ相同体を特定する方法が本明細書に記載される。

【０１４２】

当業者によって理解されるように、アルデヒドデヒドロゲナーゼ等のタンパク質の活性を低減または撹乱するために利用可能な複数の追加的な機構が存在し、調節型プロモーターの使用、弱い構成的プロモーターの使用、二倍体酵母中の遺伝子の２コピーのうちの１つの撹乱、二倍体酵母中の遺伝子の両コピーの撹乱、アンチセンス核酸の発現、ｓｉＲＮＡの発現、内在性プロモーターの陰性調節因子の過剰発現、内在性または異種遺伝子の活性の変更、より低い比活性を有する異種遺伝子の使用、それらと同様のものまたはそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【０１４３】

当業者によって理解されるであろうが、１つより多いアルデヒドデヒドロゲナーゼの活性または発現を、低減または排除することができる。１つの特定の実施形態では、ＡＬＤ４およびＡＬＤ６またはそれらの相同体もしくは変異体の活性または発現が、低減または

排除される。別の特定の実施形態では、ＡＬＤ５およびＡＬＤ６またはそれらの相同体もしくは変異体の活性または発現が、低減または排除される。なおも別の特定の実施形態では、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、およびＡＬＤ６またはそれらの相同体もしくは変異体の活性または発現が、低減または排除される。なおも別の特定の実施形態では、サイトゾル局在化アルデヒドデヒドロゲナーゼＡＬＤ２、ＡＬＤ３、およびＡＬＤ６またはそれらの相同体もしくは変異体の活性または発現が、低減または排除される。なおも別の特定の実施形態では、ミトコンドリア局在性アルデヒドデヒドロゲナーゼ、ＡＬＤ４およびＡＬＤ５またはそれらの相同体もしくは変異体の活性または発現が、低減または排除される。

【０１４４】

本明細書に記載されるように、本発明の組み換え微生物は、非改変親微生物よりも、少ない酸副産物を産生するように操作される。一実施形態では、組み換え微生物は、親微生物と比較して、約５０パーセント未満の炭素収率で、炭素源から酸副産物を産生する。別の実施形態では、微生物は、約２５パーセント未満、約１０パーセント未満、約５パーセント未満、約１パーセント未満、約０．５パーセント未満、約０．１パーセント未満、または約０．０１パーセント未満の炭素収率で、炭素源から酸副産物を産生する。一実施形態では、酸副産物は、イソブタノール生合成経路の中間体であるイソブチルアルデヒドに由来する、イソ酪酸塩である。別の実施形態では、酸副産物は、１－ブタノール生合成経路の中間体である１－ブタナールに由来する、酪酸塩である。なおも別の実施形態では、酸副産物は、２－メチル－１－ブタノール生合成経路の中間体である２－メチル－１－ブタナールに由来する、２－メチル－１－酪酸塩である。なおも別の実施形態では、酸副産物は、３－メチル－１－ブタノール生合成経路の中間体である３－メチル－１－ブタナールに由来する、３－メチル－１－酪酸塩である。なおも別の実施形態では、酸副産物は、１－プロパノール生合成経路の中間体である１－プロパナールに由来する、プロピオン酸塩である。なおも別の実施形態では、酸副産物は、１－ペンタノール生合成経路の中間体である１－ペンタナールに由来する、ペンタノエートである。なおも別の実施形態では、酸副産物は、１－ヘキサノール生合成経路の中間体である１－ヘキサナールに由来する、ヘキサノエートである。なおも別の実施形態では、酸副産物は、３－メチル－１－ペンタノール生合成経路の中間体である３－メチル－１－ペンタナールに由来する、３－メチル－１－ペンタノエートである。なおも別の実施形態では、酸副産物は、４－メチル－１－ペンタノール生合成経路の中間体である４－メチル－１－ペンタナールに由来する、４－メチル－１－ペンタノエートである。なおも別の実施形態では、酸副産物は、４－メチル－１－ヘキサノール生合成経路の中間体である４－メチル－１－ヘキサナールに由来する、４－メチル－１－ヘキサノエートである。なおも別の実施形態では、酸副産物は、５－メチル－１－ヘプタノール生合成経路の中間体である５－メチル－１－ヘプタナール、に由来する、５－メチル－１－ヘプタノエートである。

【０１４５】

一実施形態では、対応するアルデヒドからの酸副産物炭素収率は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上のタンパク質の活性または発現の低減または欠失を含まない親微生物と比較して、組み換え微生物中で少なくとも約５０％低減される。別の実施形態では、アセト乳酸からの酸副産物炭素収率は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上のタンパク質の活性または発現の低減または欠失を含まない親微生物と比較して、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％、少なくとも約９９．９％、または少なくとも約１００％低減される。一実施形態では、酸副産物は、イソブタノール生合成経路の中間体であるイソブチルアルデヒドに由来する、イソ酪酸塩である。別の実施形態では、酸副産物は、１－ブタノール生合成経路の中間体である１－ブタナールに由来する、酪酸塩である。なおも別の実施形態では、酸副産物は、２－メチル－１－ブタノール生合成経路の中間体である２－メチル－１－ブタナールに由来する、２－メチル－１－酪酸塩である。なおも別の実施形態では、酸副産物は、３－メチル－１－ブタノール生合成

経路の中間体である３－メチル－１－ブタナールに由来する、３－メチル－１－酪酸塩である。なおも別の実施形態では、酸副産物は、１－プロパノール生合成経路の中間体である１－プロパナールに由来する、プロピオン酸塩である。なおも別の実施形態では、酸副産物は、１－ペンタノール生合成経路の中間体である１－ペンタナールに由来する、ペンタノエートである。なおも別の実施形態では、酸副産物は、１－ヘキサノール生合成経路の中間体である１－ヘキサナールに由来する、ヘキサノエートである。なおも別の実施形態では、酸副産物は、３－メチル－１－ペンタノール生合成経路の中間体である３－メチル－１－ペンタナールに由来する、３－メチル－１－ペンタノエートである。なおも別の実施形態では、酸副産物は、４－メチル－１－ペンタノール生合成経路の中間体である４－メチル－１－ペンタナールに由来する、４－メチル－１－ペンタノエートである。なおも別の実施形態では、酸副産物は、４－メチル－１－ヘキサノール生合成経路の中間体である４－メチル－１－ヘキサナールに由来する、４－メチル－１－ヘキサノエートである。なおも別の実施形態では、酸副産物は、５－メチル－１－ヘプタノール生合成経路の中間体である５－メチル－１－ヘプタナール、に由来する、５－メチル－１－ヘプタノエートである。

【０１４６】

さらなる実施形態では、望ましい発酵産物の収率は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上のタンパク質の活性または発現の低減または排除を含む組み換え微生物中で増加される。一実施形態では、望ましい発酵産物の収率は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約１％増加される。別の実施形態では、望ましい発酵産物の収率は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与する１つ以上の内在性タンパク質の活性または発現の低減または排除を含まない親微生物と比較して、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２５％、または少なくとも約５０％増加される。本明細書に記載されるように、望ましい発酵産物は、イソブタノール、１－ブタノール、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ブタノール、１－プロパノール、１－ペンタノール、１－ヘキサノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノール生合成経路を含むが、これらに限定されない、アルデヒドが中間体として作用する任意の生合成経路に由来してもよい。

【０１４７】

アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する追加的な酵素を特定する方法は、次のように概説される：推定アルデヒドおよびアルコールデヒドロゲナーゼをコードする内在性酵母遺伝子を、酵母株のゲノムから欠失させる。これらの欠失株を、酵素アッセイによって、親株と比較する。これらの欠失株の多くは、市販されている（例えば、Ｏｐｅｎ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　ＹＳＣ１０５４）。

【０１４８】

欠失ライブラリをスクリーニングするための別の方法は、酵母細胞を、アルデヒド（例えば、イソブチルアルデヒドまたは１－ブタナール）でインキュベートし、対応する酸副産物（例えば、それぞれイソブチルアルデヒドまたは１－ブタナールに由来する、イソ酪酸塩または酪酸塩）の産生について、ブロスを分析することである。

【０１４９】

酸副産物（例えば、それぞれイソブチルアルデヒドまたは１－ブタナールに由来する、イソ酪酸塩または酪酸塩）の産生に関与するさらなる内在性活性を見出すための代替の手法は、酸副産物の産生に関与する酵素をコードすることが疑われる遺伝子を過剰発現する酵母株を分析することである。かかる株は、上記に列挙された候補遺伝子の多くのために、市販されている（例えば、Ｏｐｅｎ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　ＹＳＣ３８７０）。ＯＲＦ過剰発現株は、増加された酸副産物産生レベルについてスクリーニングされる。代替的には、ＯＲＦ過剰発現株の細胞ライセートが、増加されたアルデヒド酸化活性についてアッセイされる。酸副産物の産生を引き起こす可能性のある遺伝子の一覧を狭めるために、

それらの発現を、発酵試料中で分析することができる。酸副産物を産生する発酵中に発現されない遺伝子は、可能性のある標的の一覧から除外することができる。この分析は、発酵槽試料からＲＮＡを抽出し、これらの試料を、例えば、Ｒｏｃｈｅ　ＮｉｍｂｌｅＧｅｎによる、全ゲノム発現分析に供することによって行うことができる。

【０１５０】

本明細書に記載されるように、低レベルの１つ以上の酸副産物を天然に産生する株もまた、アルデヒド中間体を含む生合成経路に由来する、増加されたレベルの望ましい発酵産物を産生するために適用できる可能性がある。本開示を提供される当業者によって理解されるであろうが、低レベルの１つ以上の酸副産物を天然に産生する株は、本質的に、低レベルまたは検出不可能なレベルの内在性酵素活性を示す可能性があり、アルデヒドの、酸副産物への低減された変換をもたらし、それはイソブタノール等の望ましい発酵産物の産生に好ましい形質である。アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性が実質的にない、天然の宿主微生物を特定するための複数の手法が本明細書に記載される。例えば、酸副産物（例えば、イソ酪酸塩または酪酸塩）の産生に関与する、本質的に低いまたは検出不可能な内在性酵素活性を示す宿主微生物を見出すための１つの手法は、酵母細胞を、アルデヒド（例えば、イソブチルアルデヒドまたは１－ブタナール）でインキュベートし、対応する酸副産物（例えば、それぞれイソブチルアルデヒドまたは１－ブタナールに由来する、イソ酪酸塩または酪酸塩）の産生について、ブロスを分析することである。

【０１５１】

上述のように、酸副産物であるイソ酪酸塩の産生を低減する１つの戦略は、イソブチルアルデヒドをイソ酪酸塩に変換している可能性がある、酵母中に存在する１つ以上の内在性アルデヒドデヒドロゲナーゼタンパク質の活性または発現を低減または排除することである。

【０１５２】

イソ酪酸塩の産生を低減するための別の戦略は、更に１つの内在性酵母アルコールデヒドロゲナーゼの活性または発現の低減または排除である。Ｓ．セレビシエＡＤＨ１、ＡＤＨ２、ＡＤＨ３、ＡＤＨ４、ＡＤＨ５、ＡＤＨ６、ＡＤＨ７、およびＳＦＡ１、ならびにその相同体もしくは変異体を含むが、これらに限定されない、１つ以上のアルコールデヒドロゲナーゼの発現を低減すること、またはそれらを欠失させることにより、一般的に、イソ酪酸塩の低減された産生およびイソブタノール収率の随伴的増加がもたらされるであろう。さらなるデヒドロゲナーゼの低減および／または欠失が本明細書に想定され、本発明の範囲内にあるとみなされる。これらのデヒドロゲナーゼには、Ｓ．セレビシエＢＤＨ１、ＢＤＨ２、ＳＯＲ１、ＳＯＲ２、およびＸＹＬ１、ならびにその相同体もしくは変異体等のさらなるアルコールデヒドロゲナーゼ、ならびにＡＡＤ３、ＡＡＤ４、ＡＡＤ６、ＡＡＤ１０、ＡＡＤ１４、ＡＡＤ１５、ＡＡＤ１６、およびＹＰＬ０８８Ｗ、ならびにその相同体もしくは変異体等のアリールアルコールデヒドロゲナーゼが含まれる。

【０１５３】

別の実施形態では、本発明は、カルボニル／アルデヒドレダクターゼをコードする１つ以上の追加的な遺伝子を低減および／または欠失するように操作された、組み換え微生物を提供する。これらのカルボニル／アルデヒドレダクターゼには、Ｓ．セレビシエＡＲＩ１、ＹＰＲ１、ＴＭＡ２９、ＹＧＬ０３９Ｗ、およびＵＧＡ２、ならびにその相同体もしくは変異体が含まれる。

【０１５４】

副産物イソ酪酸塩の産生を低減するための、本明細書に記載されるさらなる戦略は、イソブタノール経路中間体である２－ケトイソ吉草酸塩から、イソ酪酸塩を産生している可能性がある、酵母中に存在する内在性タンパク質の活性または発現を低減または排除することである。かかる酵素は、一般的にケト酸デヒドロゲナーゼ（ＫＤＨ）と称される。これらの内在性タンパク質の活性または発現の排除または低減は、所望されない副産物、イソ酪酸塩の産生を低減または排除することができる。ＫＤＨ酵素活性は、Ｓ．セレビシエにおいて特定されている（Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｊ．Ｒ．，ａｎｄ　Ｉ．Ｗ．Ｄａｗｅｓ

，１９９２。分岐鎖アミノ酸の異化は、Ｓ．セレビシエにおいて２－オキソ酸デヒドロゲナーゼを介して生じる。Ｊ．Ｇｅｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１３８：２０２９－２０３３）。１つ以上のケト酸デヒドロゲナーゼおよびその相同体もしくは変異体の発現を低減すること、またはそれらを欠失させることにより、一般的に、イソ酪酸塩の低減された産生およびイソブタノール収率の随伴的増加がもたらされるであろう。

【０１５５】

Ｓ．セレビシエおよび他の酵母中の遺伝子の発現の低減またはその欠失は、対立遺伝子置換または交換、ならびに別の遺伝子またはマーカーカセットの挿入による遺伝子破壊等の、当業者に既知の方法によって達成することができる。

【０１５６】

副産物イソ酪酸塩の産生を低減するための本明細書に記載される別の戦略は、イソブチルアルデヒドのイソブタノールへの変換に関与するアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）の活性および／または発現を増加させることである。この戦略は、イソブタノール経路中間体であるイソブチルアルデヒドに対する、内在性酵素による競合を防止する。アルコールデヒドロゲナーゼの活性および／または発現における増加は、種々の手段によって達成され得る。例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ活性は、増加されたプロモーター強度を有するプロモーターを利用することによって、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子のコピー数を増加させることによって、または増加された比活性を有する代替の、もしくは改変されたアルコールデヒドロゲナーゼを利用することによって、増加させることができる。

【０１５７】

副産物イソ酪酸塩の産生を低減するための、本明細書に記載される代替的な戦略は、ミカエリス‐メンテン定数（K_M）の減少を示す、イソブチルアルデヒドのイソブタノールへの変換に関与するイソブタノール経路において、アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）を利用することである。この戦略はまた、イソブタノール経路中間体であるイソブチルアルデヒドに対する、内在性酵素による競合を防止する。

【０１５８】

副産物イソ酪酸塩の産生を低減するための、本明細書に記載される別の戦略は、増加された活性、およびミカエリス‐メンテン定数（K_M）の減少を示す、イソブチルアルデヒドのイソブタノールへの変換に関与するイソブタノール経路において、アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）を利用することである。この戦略はまた、イソブタノール経路中間体、イソブチルアルデヒドに対する、内在性酵素による競合を防止する。

【０１５９】

更に、改変されたＡＤＨ酵素を利用することによって、本発明者らは、順反応（すなわち、イソブタノールへのイソブチルアルデヒド変換）が、逆反応（すなわち、イソブタノールのイソブチルアルデヒドへの変換）よりも好ましい反応である状況を確立し得る。

【０１６０】

上述の戦略は、一般的に、イソ酪酸塩収率の減少をもたらし、それは、イソブタノール収率の増加を伴う。したがって、上記の戦略は、イソ酪酸塩収率および／または力価を減少させるため、およびイソブタノール収率の、イソ酪酸塩収率に対する比率を増加させるために有用である。

【０１６１】

一実施形態では、イソ酪酸塩収率（グルコース１ｍｏｌ当たりのイソ酪酸塩ｍｏｌ）は、約５％未満である。別の実施形態では、イソ酪酸塩収率（グルコース１ｍｏｌ当たりのイソ酪酸塩ｍｏｌ）は、約１％未満である。なおも別の実施形態では、イソ酪酸塩収率（グルコース１ｍｏｌ当たりのイソ酪酸塩ｍｏｌ）は、約０．５％未満、約０．１％未満、約０．０５％未満、または約０．０１％未満である。

【０１６２】

一実施形態では、イソブタノール対イソ酪酸塩収率比率は、少なくとも約２である。別の実施形態では、イソブタノール対イソ酪酸塩収率は、少なくとも約５である。なおも別

の実施形態では、イソブタノール対イソ酪酸塩収率比率は、少なくとも約２０、少なくとも約１００、少なくとも約５００、または少なくとも約１０００である。

【０１６３】

中間体としてアルデヒドを使用する生合成経路に由来する有益な代謝物を産生する、本明細書に記載される組み換え微生物は、ピルビン酸塩の、３－ケト酸（例えば、アセト乳酸および／または２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩）以外の産物への変換に対する酵素活性を低減または排除するように更に操作されてもよい。一実施形態では、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ＰＤＣ）、乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）、ピルビン酸塩オキシダーゼ、ピルビン酸塩デヒドロゲナーゼ、および／またはグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）の酵素活性が、低減または排除される。

【０１６４】

特定の実施形態では、有益な代謝物は、アセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）遺伝子を過剰発現する、組み換えＰＤＣ－マイナスＧＰＤ－マイナス酵母微生物中で産生される。別の特定の実施形態では、ＡＬＳは、Ｂ．スブチリスａｌｓＳによってコードされる。

３－ヒドロキシ酸副産物および酸副産物の低減された蓄積

【０１６５】

本発明者らは、本明細書で、３－ケト酸中間体の、対応する３－ヒドロキシ酸副産物への変換を低減するための複数の戦略を説明し、それは望ましい代謝物の収率の増加を伴うプロセスである。本発明者らはまた、本明細書で、アルデヒド中間体の、対応する酸副産物への変換を低減するための複数の戦略を説明し、それは望ましい代謝物の収率の更なる増加を伴うプロセスである。

【０１６６】

したがって、一態様では、本発明は、中間体として３－ケト酸、および中間体としてアルデヒドを使用する生合成経路を含む組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、（ｉ）３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒する酵素が実質的になく、かつ（ｉｉ）アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する酵素が実質的にない。一実施形態では、３－ケト酸中間体は、アセト乳酸である。中間体としてアセト乳酸およびアルデヒドを使用する生合成経路は、イソブタノール、１－ブタノール、および３－メチル－１－ブタノールの生合成のための経路から選択され得る。別の実施形態では、３－ケト酸中間体は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩である。中間体として２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩およびアルデヒドを使用する生合成経路は、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールの生合成のための経路から選択されてもよい。

【０１６７】

別の態様では、本発明は、中間体として３－ケト酸、および中間体としてアルデヒドを使用する生合成経路を含む組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、（ｉ）３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ（ｉｉ）アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。一実施形態では、３－ケト酸中間体は、アセト乳酸である。中間体としてアセト乳酸およびアルデヒドを使用する生合成経路は、イソブタノール、１－ブタノール、および３－メチル－１－ブタノールの生合成のための経路から選択され得る。別の実施形態では、３－ケト酸中間体は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩である。中間体として２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩およびアルデヒドを使用する生合成経路は、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールの生合成のための経路から選択されてもよい。

【０１６８】

本明細書に記載される種々の実施形態では、３－ケト酸中間体の３－ヒドロキシ酸副産物への変換を触媒することに関与するタンパク質は、ケトレダクターゼである。例示的な

実施形態では、ケトレダクターゼは、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）である。更なる例示的な実施形態では、３－ケト酸レダクターゼは、Ｓ．セレビシエＹＭＲ２２６Ｃ（配列番号１）タンパク質またはその相同体もしくは変異体である。一実施形態では、相同体は、バンデルワルトムジマ（Ｖａｎｄｅｒｗａｌｔｏｍｚｙｍａ）・ポリスポラ（配列番号２）、サッカロミセス・カステリイ（配列番号３）、カンジダ・グラブラタ（配列番号４）、サッカロミセス・バヤヌス（配列番号５）、ジゴサッカロミセス・ロウキシイ（配列番号６）、Ｋ．ラクチス（配列番号７）、アシビア・ゴシピイ（配列番号８）、サッカロミセス・クルイベリ（配列番号９）、クルイベロミセス・サーモトレランス（配列番号１０）、クルイベロミセス・ワルチイ（配列番号１１）、ピキア・スチピチス（配列番号１２）、デバロミセス・ハンセニイ（配列番号１３）、ピキア・パストリス（配列番号１４）、カンジダ・デュブリニエンシス（配列番号１５）、カンジダ・アルビカンス（配列番号１６）、ヤロウィア・リポリチカ（配列番号１７）、イッサチェンキア・オリエンタリス（配列番号１８）、アスペルギルス・ニデュランス（配列番号１９）、アスペルギルス・ニガー（配列番号２０）、ニューロスポラ・クラッサ（配列番号２１）、シゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号２２）、およびクルイベロミセス・マルシアヌス（配列番号２３）からなる群から選択されてもよい。

【０１６９】

本明細書に記載される種々の実施形態では、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒することに関与するタンパク質は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）である。一実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、ＡＬＤ６、およびＨＦＤ１からなる群から選択される遺伝子、ならびにそれらの相同体および変異体によってコードされる。例示的な実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、Ｓ．セレビシエアルデヒドデヒドロゲナーゼＡＬＤ６（配列番号２５）またはその相同体もしくは変異体である。一実施形態では、相同体は、サッカロミセス・カステリイ（配列番号２６）、カンジダ・グラブラタ（配列番号２７）、サッカロミセス・バヤヌス（配列番号２８）、クルイベロミセス・ラクチス（配列番号２９）、クルイベロミセス・サーモトレランス（配列番号３０）、クルイベロミセス・ワルチイ（配列番号３１）、サッカロミセス・セレビシエＹＪ７８９（配列番号３２）、サッカロミセス・セレビシエＪＡＹ２９１（配列番号３３）、サッカロミセス・セレビシエＥＣ１１１８（配列番号３４）、サッカロミセス・セレビシエＤＢＹ９３９（配列番号３５）、サッカロミセス・セレビシエＡＷＲＩ１６３１（配列番号３６）、サッカロミセス・セレビシエＲＭ１１－１ａ（配列番号３７）、ピキア・パストリス（配列番号３８）、クルイベロミセス・マルシアヌス（配列番号３９）、シゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号４０）、およびシゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号４１）からなる群から選択されてもよい。

【０１７０】

中間体として３－ケト酸およびアルデヒドを使用する生合成経路に由来する有益な代謝物を産生する、本明細書に記載される組み換え微生物は、ピルビン酸塩の、３－ケト酸（例えば、アセト乳酸および／または２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩）以外の産物への変換に対する酵素活性を低減または排除するように更に操作されてもよい。一実施形態では、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ＰＤＣ）、乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）、ピルビン酸塩オキシダーゼ、ピルビン酸塩デヒドロゲナーゼ、および／またはグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）の酵素活性が、低減または排除される。

【０１７１】

特定の実施形態では、有益な代謝物は、アセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）遺伝子を過剰発現する、組み換えＰＤＣ－マイナスＧＰＤ－マイナス酵母微生物中で産生される。別の特定の実施形態では、ＡＬＳは、Ｂ．スブチリスａｌｓＳによってコードされる。

３－ヒドロキシ酸副産物および／または酸副産物の蓄積を低減するための戦略の例証的な実施形態

【０１７２】

特定の例証的実施形態では、組み換え微生物は、アセト乳酸およびイソブチルアルデヒドが代謝経路の中間体である、イソブタノール産生代謝経路を含み、該組み換え微生物は、アセト乳酸中間体のＤＨ２ＭＢへの変換、およびイソブチルアルデヒド中間体のイソ酪酸塩への変換を触媒する酵素が実質的にない。別の特定の実施形態では、組み換え微生物は、アセト乳酸およびイソブチルアルデヒドが代謝経路の中間体である、イソブタノール産生代謝経路を含み、該組み換え微生物は、（ｉ）アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ（ｉｉ）イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。一実施形態では、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素は、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）である。別の実施形態では、イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）である。３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）が排除されるような経路の非限定的例は、図５に示される。

【０１７３】

更なる特定の例証的実施形態では、組み換え微生物は、アセト乳酸および３－メチル－１－ブタナールが代謝経路の中間体である、３－メチル－１－ブタノール産生代謝経路を含み、該組み換え微生物は、アセト乳酸中間体のＤＨ２ＭＢへの変換、および３－メチル－１－ブタナール中間体の３－メチル－１－酪酸塩への変換を触媒する酵素が実質的にない。別の特定の実施形態では、組み換え微生物は、アセト乳酸および３－メチル－１－ブタナールが代謝経路の中間体である、３－メチル－１－ブタノール産生代謝経路を含み、該組み換え微生物は、（ｉ）アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ（ｉｉ）３－メチル－１－ブタナールの３－メチル－１－酪酸塩への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。一実施形態では、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素は、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）である。別の実施形態では、３－メチル－１－ブタナールの３－メチル－１－酪酸塩への変換を触媒する酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）である。３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）が排除されるような経路の非限定的例は、図６に示される。

【０１７４】

更なる特定の例証的実施形態では、組み換え微生物は、アセト乳酸および２－メチル－１－ブタナールが代謝経路の中間体である、２－メチル－１－ブタノール産生代謝経路を含み、該組み換え微生物は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩中間体の２－エチル－２，３－ジヒドロキシ酪酸塩への変換、および２－メチル－１－ブタナール中間体の２－メチル－１－酪酸塩への変換を触媒する酵素が実質的にない。別の特定の実施形態では、組み換え微生物は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩および２－メチル－１－ブタナールが代謝経路の中間体である、２－メチル－１－ブタノール産生代謝経路を含み、該組み換え微生物は、（ｉ）２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシ酪酸塩への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ（ｉｉ）２－メチル－１－ブタナールの２－メチル－１－酪酸塩への変換を触媒する１つ以上の酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。一実施形態では、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシ酪酸塩への変換を触媒する酵素は、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）である。別の実施形態では、２－メチル－１－ブタナールの２－メチル－１－酪酸塩への変換を触媒する酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）である。３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）が排除されるような経路の非限定的例は、図７に示される。

ＤＨ２ＭＢをイソブタノール経路中間体に変換する酵素の過剰発現

【０１７５】
イソブタノール産生酵母中の、２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＣＡＳ番号１４８６８－２４－７）の産生を低減または排除するための異なる手法は、ＤＨ２ＭＢをイソブタノール経路中間体に変換する酵素を過剰発現させることである。これを達成するための１つの方法は、ＤＨ２ＭＢおよびアセト乳酸の相互変換を触媒するが、ＤＨ２ＭＢの酸化を選好する、酵素の使用を通じるものである。したがって、一実施形態では、本発明は、イソブタノールを産生するための組み換え微生物を提供し、該組み換え微生物は、ＤＨ２ＭＢをアセト乳酸に変換することができる内在性または異種タンパク質を過剰発現する。

【０１７６】
一実施形態では、内在性または異種タンパク質は、動態的に酸化的反応を選好する。別の実施形態では、内在性または異種タンパク質は、ＤＨ２ＭＢに対して低K_M、かつアセト乳酸に対して高K_Mを有する。なおも別の実施形態では、内在性または異種タンパク質は、その補因子の酸化型に対して低K_M、かつその補因子の対応する還元型に対して高K_Mを有する。なおも別の実施形態では、内在性または異種タンパク質は、還元的方向に対してよりも、酸化的反応に対してより高いk_{cat}を有する。この内在性または異種タンパク質は、好ましくは、酸化還元補因子を、その還元型と比較して高濃度のその酸化型で使用する能力を有するべきである。

【０１７７】
一実施形態では、内在性または異種タンパク質は、ＹＡＬ０６０Ｗ、ＹＪＲ１５９Ｗ、ＹＧＬ１５７Ｗ、ＹＢＬ１１４Ｗ、ＹＯＲ１２０Ｗ、ＹＫＬ０５５Ｃ、ＹＢＲ１５９Ｗ、ＹＢＲ１４９Ｗ、ＹＤＬ１６８Ｗ、ＹＤＲ３６８Ｗ、ＹＬＲ４２６Ｗ、ＹＣＲ１０７Ｗ、ＹＩＬＬ２４Ｗ、ＹＭＬ０５４Ｃ、ＹＯＬ１５１Ｗ、ＹＭＲ３１８ｃ、ＹＢＲ０４６Ｃ、ＹＨＲ１０４Ｗ、ＹＩＲ０３６Ｃ、ＹＤＬ１７４Ｃ、ＹＤＲ５４１Ｃ、ＹＢＲ１４５Ｗ、ＹＧＬ０３９Ｗ、ＹＣＲ１０５Ｗ、ＹＤＬ１２４Ｗ、ＹＩＲ０３５Ｃ、ＹＦＬ０５６Ｃ、ＹＮＬ２７４ｃ、ＹＬＲ２５５Ｃ、ＹＧＬ１８５Ｃ、ＹＧＬ２５６Ｗ、ＹＪＲ０９６Ｗ、ＹＪＲ１５５Ｗ、ＹＰＬ２７５Ｗ、ＹＯＲ３８８Ｃ、ＹＬＲ０７０Ｃ、ＹＭＲ０８３Ｗ、ＹＥＲ０８１Ｗ、ＹＪＲ１３９Ｃ、ＹＤＬ２４３Ｃ、ＹＰＬ１１３Ｃ、ＹＯＬ１６５Ｃ、ＹＭＬ０８６Ｃ、ＹＭＲ３０３Ｃ、ＹＤＬ２４６Ｃ、ＹＬＲ０７０Ｃ、ＹＨＲ０６３Ｃ、ＹＮＬ３３１Ｃ、ＹＦＬ０５７Ｃ、ＹＩＬ１５５Ｃ、ＹＯＬ０８６Ｃ、ＹＡＬ０６１Ｗ、ＹＤＲ１２７Ｗ、ＹＰＲ１２７Ｗ、ＹＣＬ０１８Ｗ、ＹＩＬ０７４Ｃ、ＹＩＬ１２４Ｗ、およびＹＥＬ０７１Ｗからなる群から選択される遺伝子によってコードされる。加えて、異種遺伝子は、イソブタノール産生酵母中で過剰発現させることができる。例えば、ベーターヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼ（ＥＣ１．１．１．４５およびＥＣ１．１．１．６０）は、過剰発現に対する候補であろう。

【０１７８】
別の実施形態では、動態的に、還元的反応を選好する内在性または異種タンパク質が、酸化的反応を選好するように操作される。別の実施形態では、タンパク質は、ＤＨ２ＭＢに対して低K_M、かつアセト乳酸に対して高K_Mを有するように操作される。なおも別の実施形態では、タンパク質は、その補因子の酸化型に対して低K_M、かつその補因子の対応する還元型に対して高K_Mを有するように操作される。なおも別の実施形態では、タンパク質は、還元的方向に対してよりも、酸化的反応に対してより高いk_{cat}を有するように操作される。この操作されたタンパク質は、好ましくは、酸化還元補因子を、その還元型と比較して高濃度のその酸化型で使用する能力を有するべきである。

【０１７９】
代替的には、ＤＨ２ＭＢをＤＨＩＶに異性化する酵素が、過剰発現され得る。この手法は、ピルビン酸塩からイソブタノールを産生するための新規経路を表す。故に、一実施形態では、本発明は、イソブタノールを産生するための組み換え微生物を提供すし、該組み換え微生物は、ＤＨ２ＭＢを２，３－ジヒドロキシイソ吉草酸塩に変換することができる内在性または異種タンパク質を過剰発現する。

２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートを生合成経路中間体に変換する酵素の過剰発現

【０１８０】

酵母中の２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートの産生を低減または排除するための異なる手法は、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートを生合成経路中間体に変換する酵素を過剰発現させることである。この手法は、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールを含むが、これらに限定されない、中間体として２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩を使用する任意の生合成経路に有用である。これを達成するための１つの方法は、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートおよび２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の相互変換を触媒するが、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートの酸化を選好する、酵素の使用を通じるものである。したがって、一実施形態では、本発明は、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールから選択される産物を産生するための組み換え微生物を提供し、該組み換え微生物は、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートを２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩に変換することができる内在性または異種タンパク質を過剰発現する。

【０１８１】

一実施形態では、内在性または異種タンパク質は、動態的に酸化的反応を選好する。別の実施形態では、内在性または異種タンパク質は、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートに対して低K_M、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩に対して高K_Mを有する。なおも別の実施形態では、内在性または異種タンパク質は、その補因子の酸化型に対して低K_M、その補因子の対応する還元型に対して高K_Mを有する。なおも別の実施形態では、内在性または異種タンパク質は、還元的方向に対してよりも、酸化的反応に対してより高いk_{cat}を有する。この内在性または異種タンパク質は、好ましくは、酸化還元補因子を、その還元型と比較して高濃度のその酸化型で使用する能力を有するべきである。

【０１８２】

一実施形態では、内在性または異種タンパク質は、ＹＡＬ０６０Ｗ、ＹＪＲ１５９Ｗ、ＹＧＬ１５７Ｗ、ＹＢＬ１１４Ｗ、ＹＯＲ１２０Ｗ、ＹＫＬ０５５Ｃ、ＹＢＲ１５９Ｗ、ＹＢＲ１４９Ｗ、ＹＤＬ１６８Ｗ、ＹＤＲ３６８Ｗ、ＹＬＲ４２６Ｗ、ＹＣＲ１０７Ｗ、ＹＩＬＬ２４Ｗ、ＹＭＬ０５４Ｃ、ＹＯＬ１５１Ｗ、ＹＭＲ３１８ｃ、ＹＢＲ０４６Ｃ、ＹＨＲ１０４Ｗ、ＹＩＲ０３６Ｃ、ＹＤＬ１７４Ｃ、ＹＤＲ５４１Ｃ、ＹＢＲ１４５Ｗ、ＹＧＬ０３９Ｗ、ＹＣＲ１０５Ｗ、ＹＤＬ１２４Ｗ、ＹＩＲ０３５Ｃ、ＹＦＬ０５６Ｃ、ＹＮＬ２７４ｃ、ＹＬＲ２５５Ｃ、ＹＧＬ１８５Ｃ、ＹＧＬ２５６Ｗ、ＹＪＲ０９６Ｗ、ＹＪＲ１５５Ｗ、ＹＰＬ２７５Ｗ、ＹＯＲ３８８Ｃ、ＹＬＲ０７０Ｃ、ＹＭＲ０８３Ｗ、ＹＥＲ０８１Ｗ、ＹＪＲ１３９Ｃ、ＹＤＬ２４３Ｃ、ＹＰＬ１１３Ｃ、ＹＯＬ１６５Ｃ、ＹＭＬ０８６Ｃ、ＹＭＲ３０３Ｃ、ＹＤＬ２４６Ｃ、ＹＬＲ０７０Ｃ、ＹＨＲ０６３Ｃ、ＹＮＬ３３１Ｃ、ＹＦＬ０５７Ｃ、ＹＩＬ１５５Ｃ、ＹＯＬ０８６Ｃ、ＹＡＬ０６１Ｗ、ＹＤＲ１２７Ｗ、ＹＰＲ１２７Ｗ、ＹＣＬ０１８Ｗ、ＹＩＬ０７４Ｃ、ＹＩＬ１２４Ｗ、およびＹＥＬ０７１Ｗからなる群から選択される遺伝子によってコードされる。加えて、異種遺伝子は、イソロイシン産生酵母中で過剰発現させることができる。例えば、ベータ－ヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼ（ＥＣ１．１．１．４５およびＥＣ１．１．１．６０）は、過剰発現に対する候補であろう。

【０１８３】

代替的には、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートを２，３－ジヒドロキシ－３－吉草酸メチルに異性化する酵素が、過剰発現され得る。この手法は、ピルビン酸塩から、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールを産生するための新規経路を表す。故に、一実施形態では、本発明は、２－メチル－１－ブタノール、イソロ

イシン、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールから選択される産物を産生するための組み換え微生物を提供し、該組み換え微生物は、２－エチル－２，３－ジヒドロキシブタノエートをβ－ジヒドロキシ－β－吉草酸メチルに変換することができる内在性または異種タンパク質を過剰発現する。

ＤＨ２ＭＢの産生低減するための、過剰発現されたケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）および／または改変されたケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）の使用

【０１８４】

本明細書に記載されるように、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換は、中間体アセト乳酸に対して、イソブタノール経路と競合する。本酵母イソブタノール産生株において、ケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）は、アセト乳酸のＤＨＩＶへの変換を触媒する。

【０１８５】

一実施形態では、本発明は、アセト乳酸の２，３－ジヒドロキシイソ吉草酸塩（ＤＨＩＶ）への変換を触媒する、過剰発現されたケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）を有する組み換え微生物を提供する。ＫＡＲＩの過剰発現は、ＤＨ２ＭＢ産生を低減する効果を有する。一実施形態では、ＫＡＲＩは、ライセートにおいて、少なくとも０．０１Ｕ／ｍｇの活性を有する。別の実施形態では、ＫＡＲＩは、ライセートにおいて、少なくとも０．０３Ｕ／ｍｇの活性を有する。なおも別の実施形態では、ＫＡＲＩは、ライセートにおいて、少なくとも０．０５、０．１、０．５、１、２、５、または１０Ｕ／ｍｇの活性を有する。

【０１８６】

好ましい実施形態では、過剰発現されたＫＡＲＩは、野生型または親ＫＡＲＩと比較して、アセト乳酸に対して低減されたK_Mを示すように操作される。アセト乳酸に対してより低いK_Mを有する改変されたＫＡＲＩの使用は、副産物ＤＨ２ＭＢの産生を低減することが予想される。より低い基質K_Mを有するＫＡＲＩは、スクリーニング相同体によって特定される。代替手段においては、ＫＡＲＩは、当該技術分野で既知の技術を使用する指向性進化によって、低減されたK_Mを示すように操作することができる。

【０１８７】

これらの実施形態の各々において、ＫＡＲＩは、補因子として（ＮＡＤＰＨよりもむしろ）ＮＡＤＨを利用する変異体酵素であってもよい。かかる酵素は、譲受人共通および同時係属中の刊行物、米国特許第２０１０／０１４３９９７号に記載され、それは参照によりその全体が全目的で本明細書に組み込まれる。

ＤＨ２ＭＢの産生を低減するための、過剰発現されたジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（ＤＨＡＤ）の使用

【０１８８】

本明細書に記載されるように、本発明者らは、イソブタノール経路酵素であるヒジドロキシ酸デヒドラターゼ（ＤＨＡＤ）の過剰発現が、副産物、ＤＨ２ＭＢの産生を低減することを見出した。

【０１８９】

したがって、一実施形態では、本発明は、２，３－ジヒドロキシイソ吉草酸塩（ＤＨＩＶ）の２－ケトイソ吉草酸塩（ＫＩＶ）への変換を触媒する、ヒジドロキシ酸デヒドラターゼ（ＤＨＡＤ）を有する組み換え微生物を提供する。ＤＨＡＤの過剰発現は、ＤＨ２ＭＢ産生を低減する効果を有する。一実施形態では、ＤＨＡＤは、ライセートにおいて、少なくとも０．０１Ｕ／ｍｇの活性を有する。別の実施形態では、ＤＨＡＤは、ライセートにおいて、少なくとも０．０３Ｕ／ｍｇの活性を有する。なおも別の実施形態では、ＤＨＡＤは、ライセートにおいて、少なくとも０．０５、０．１、０．５、１、２、５、または１０Ｕ／ｍｇの活性を有する。

３－ヒドロキシ酸の産生のための組み換え微生物

【０１９０】

本発明は、さらなる態様で、産物または代謝中間体としての３－ヒドロキシ酸の産生のための組み換え微生物を提供する。一実施形態では、これらの３－ヒドロキシ酸産生組み換え微生物は、アセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）、および２－アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの還元を触媒する３－ケト酸レダクターゼを発現する。別の実施形態では、これらの３－ヒドロキシ酸産生組み換え微生物は、アセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）、および２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシ酪酸塩への還元を触媒する３－ケト酸レダクターゼを発現する。

【０１９１】

これらの３－ヒドロキシ酸産生組み換え微生物は、ピルビン酸塩の、アセト乳酸以外の産物への変換に対する酵素活性を低減または排除するように更に操作されてもよい。一実施形態では、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ＰＤＣ）、乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）、ピルビン酸塩オキシダーゼ、ピルビン酸塩デヒドロゲナーゼ、および／またはグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）の酵素活性が、低減または排除される。

【０１９２】

特定の実施形態では、ＤＨ２ＭＢは、ＡＬＳ遺伝子を過剰発現し、３－ケト酸レダクターゼを発現する、組み換えＰＤＣ－マイナスＧＰＤ－マイナス酵母微生物中で産生される。一実施形態では、３－ケト酸レダクターゼは、天然に発現される。別の実施形態では、３－ケト酸レダクターゼは、異種性で発現される。なおも別の実施形態では、３－ケト酸レダクターゼは、過剰発現される。特定の実施形態では、３－ケト酸レダクターゼは、Ｓ．セレビシエＴＭＡ２９遺伝子またはその相同体によってコードされる。別の特定の実施形態では、ＡＬＳは、Ｂ．スブチリスＡｌｓＳによってコードされる。

【０１９３】

別の特定の実施形態では、２－エチル－２，３－ジヒドロキシ酪酸塩は、ＡＬＳ遺伝子を過剰発現し、３－ケト酸レダクターゼを発現する、組み換えＰＤＣ－マイナスＧＰＤ－マイナス酵母微生物中で産生される。一実施形態では、３－ケト酸レダクターゼは、天然に発現される。別の実施形態では、３－ケト酸レダクターゼは、異種性で発現される。なおも別の実施形態では、３－ケト酸レダクターゼは、過剰発現される。特定の実施形態では、３－ケト酸レダクターゼは、Ｓ．セレビシエＴＭＡ２９遺伝子またはその相同体によってコードされる。別の特定の実施形態では、ＡＬＳは、Ｂ．スブチリスＡｌｓＳによってコードされる。

【０１９４】

これらのさらなる態様に従って、本発明はまた、２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）を産生する方法を提供し、（ａ）アセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）、および２－アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの還元を触媒する３－ケト酸レダクターゼを発現するＤＨ２ＭＢ産生組み換え微生物を提供することと、（ｂ）回収可能な量のＤＨ２ＭＢが産生されるまで、該組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養することと、を含む。

【０１９５】

これらの追加的な態様に従って、本発明はまた、２－エチル－２，３－ジヒドロキシ酪酸塩を産生する方法を提供し、（ａ）アセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）、および２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシ酪酸塩への還元を触媒する３－ケト酸レダクターゼを発現する２－エチル－２，３－ジヒドロキシ酪酸塩産生組み換え微生物を提供することと、（ｂ）回収可能な量の２－エチル－２，３－ジヒドロキシ酪酸塩が産生されるまで、該組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養することと、を含む。

酸産物の産生のための組み換え微生物

【０１９６】
本発明は、さらなる態様で、アルデヒドに由来する酸産物の産生のための組み換え微生物を提供する。一実施形態では、これらの酸産物産生組み換え微生物は、アルデヒドの、対応する酸産物への変換を触媒するアルデヒドデヒドロゲナーゼを発現する。これらの酸産物産生組み換え微生物は、所望の酸産物の上流にある代謝物の望ましくない変換に対する、競合酵素活性を低減または排除するように更に操作され得る。
【０１９７】
特定の実施形態では、酸産物は、アルデヒドデヒドロゲナーゼを過剰発現する組み換え酵母微生物中で産生される。一実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、天然に発現される。別の実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、異種性で発現される。なおも別の実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、過剰発現される。特定の実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、Ｓ．セレビシエＡＬＤ６遺伝子またはその相同体によってコードされる。
【０１９８】
このさらなる態様に従って、本発明はまた、酸産物を産生する方法を提供し、（ａ）アルデヒドの、酸産物への変換を触媒するアルデヒドデヒドロゲナーゼを発現する酸産物産生組み換え微生物を提供することと、および（ｂ）回収可能な量の所望の酸産物が産生されるまで、該組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養することと、を含む。

微生物の概要
【０１９９】
本明細書に提供される組み換え微生物は、好適な炭素源からの、イソブタノール、２－ブタノール、１－ブタノール、２－ブタノン、２，３－ブタンジオール、アセトイン、ジアセチル、バリン、ロイシン、パントテン酸、イソブチレン、３－メチル－１－ブタノール、補酵素Ａ、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、１－ペンタノール、１－ヘキサノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、５－メチル－１－ヘプタノール、および１－プロパノール等の有益な代謝物の産生のための経路に関与する、複数の異種および／または天然の酵素を発現することができる。操作された生合成経路において産生される有益な代謝物の非限定的な一覧は、本明細書の表１～３に見出される。
【０２００】
本明細書に記載されるように、「操作された」または「改変された」微生物は、選択の宿主または親微生物への遺伝物質の導入を介して、および／または天然の遺伝子の発現の改変によって産生され、それによって微生物の細胞生理学および生化学を改変または変化させる。遺伝物質の導入および／または天然の遺伝子の発現の改変を通じて、親微生物は、新たな特性、例えば、新たな、またはより大量の、細胞内および／または細胞外代謝物を産生する能力を獲得する。本明細書に記載されるように、親微生物中への遺伝物質の導入および／または親微生物中での天然の遺伝子の発現の改変は、好適な炭素源からの、イソブタノール、２－ブタノール、１－ブタノール、２－ブタノン、２，３－ブタンジオール、アセトイン、ジアセチル、バリン、ロイシン、パントテン酸、イソブチレン、３－メチル－１－ブタノール、補酵素Ａ、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、１－ペンタノール、１－ヘキサノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、５－メチル－１－ヘプタノール、および１－プロパノール等の有益な代謝物を産生する新たなまたは改変された能力をもたらす。親微生物中に導入された遺伝物質および／または親微生物中での発現のために改変された遺伝子は、イソブタノール、２－ブタノール、１－ブタノール、２－ブタノン、２，３－ブタンジオール、アセトイン、ジアセチル、バリン、ロイシン、パントテン酸、イソブチレン、３－メチル－１－ブタノール、補酵素Ａ、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、１－ペンタノール、１－ヘキサノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－

１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、５－メチル－１－ヘプタノール、および１－プロパノールから選択される１つ以上の代謝物の産生のための生合成経路に関与する酵素のうちの１つ以上をコードする遺伝子、または遺伝子の一部を含有し、またこれらの遺伝子発現および／またはその発現の調節のための、追加的な要素、例えばプロモーター配列、を含んでもよい。

【０２０１】

宿主または親微生物中への遺伝物質の導入に加えて、操作または改変された微生物はまた、微生物の細胞生理学および生化学を変化させるための、遺伝子またはポリヌクレオチドの変化、撹乱、欠失、またはノックアウトを含み得る。遺伝子またはポリヌクレオチドの変化、撹乱、欠失、またはノックアウトを通じて、微生物は、新たなまたは改善された特性（例えば、新たな代謝物、またはより大量の細胞内代謝物を産生する、所望の経路を下る代謝物の流動を改善する、および／または副産物の産生を低減する能力）を獲得する。

【０２０２】

本明細書に提供される組み換え微生物はまた、親微生物中で利用不可能な量の代謝物を産生し得る。「代謝物」は、代謝によって産生される任意の物質、または特定の代謝プロセスに必要なもしくはそれに関与する物質を指す。代謝物は、代謝の出発物質（例えば、グルコースまたはピルビン酸塩）、中間体（例えば、２－ケトイソ吉草酸塩）、または最終産物（例えば、イソブタノール）である有機化合物であり得る。代謝物を使用して、より複合の分子を構築することができ、またはそれらを、より単純な分子に分解することができる。中間体代謝物は、他の代謝物から合成されても、場合によるとより複合の物質を作製するために使用されも、またはしばしば化学エネルギーの放出を伴って、より単純な化合物に分解されもよい。

【０２０３】

本開示は、本開示の方法、組成物、および生物において有用な特異的遺伝子を特定するが、かかる遺伝子との絶対的な同一性は必要でないことが認識されるであろう。例えば、ポリペプチドまたは酵素をコードする配列を含む特定の遺伝子またはポリヌクレオチドにおける変更が行われ、活性についてスクリーニングされ得る。典型的には、かかる変更は、保存的突然変異およびサイレント突然変異を含む。かかる改変または突然変異されたポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、機能酵素の発現について、当該技術分野で既知の方法を使用してスクリーニングすることができる。

【０２０４】

遺伝子コードの固有の縮重に起因して、実質的に同じまたは機能的に同等のポリペプチドをコードする他のポリヌクレオチドを使用して、かかる酵素をコードするポリヌクレオチドをクローン化し、発現させることもできる。

【０２０５】

当業者によって理解されるように、特定の宿主におけるその発現を増強するために、コード配列を改変することが有利であり得る。遺伝子コードは、６４の可能性のあるコドンと重複しているが、ほとんどの生物は、典型的にはこれらのコドンのサブセットを使用する。種において最も頻繁に利用されるコドンは、最適なコドンと呼ばれ、低頻度でしか利用されないものは、稀少コドンまたは低使用頻度コドンとして分類される。コドンは、「コドン最適化」または「種のコドンバイアスの制御」と呼ばれるプロセス時に、宿主の好ましいコドン使用頻度を反映するように置換することができる。

【０２０６】

特定の原核宿主または真核宿主によって好まれるコドンを含有する最適化コード配列（Ｍｕｒｒａｙ ｅｔ ａｌ．，１９８９，Ｎｕｃｌ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１７：４７７－５０８）は、例えば、翻訳率を増加させるために、または非最適化配列から産生される転写物と比較して、より長い半減期等の望ましい特性を有する組み換えＲＮＡ転写物を産生するために、調製することができる。翻訳終止コドンもまた、宿主選好を反映するように改変することができる。例えば、Ｓ．セレビシエおよび哺乳動物に対する典型的な終止

コドンは、それぞれＵＡＡおよびＵＧＡである。単子葉植物に対する典型的な終止コドンはＵＧＡである一方で、昆虫および大腸菌は、終止コドンとして、一般にＵＡＡを使用する（Ｄａｌｐｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｎｕｃｌ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２４：２１６－８）。植物中の発現のためにヌクレオチド配列を最適化するための手法は、例えば、米国特許第６，０１５，８９１号、およびその中で引用される参考文献に提供される。

【０２０７】

当業者であれば、遺伝子コードの縮重性質に起因して、それらのヌクレオチド配列において異なる多様なＤＮＡ化合物を使用して、本開示の所与の酵素をコードすることができることを認識するであろう。上述の生合成酵素をコードする天然のＤＮＡ配列は、本開示の実施形態を例証するために本明細書で参照されるにすぎず、本開示は、本開示の方法に利用される酵素のポリペプチドおよびタンパク質のアミノ酸配列をコードする、任意の配列のＤＮＡ化合物を含む。同様の様式で、ポリペプチドは、典型的には、所望の活性の損失または有意な損失なしに、そのアミノ酸配列における１つ以上のアミノ酸置換、欠失、および挿入を許容することができる。本開示は、改変されたポリペプチドまたは変異体ポリペプチドが、参照ポリペプチドの酵素同化または異化活性を有する限り、本明細書に記載される特異的タンパク質とは異なるアミノ酸配列を有するかかるポリペプチドを含む。更に、本明細書に示されるＤＮＡ配列によってコードされるアミノ酸配列は、本開示の実施形態を例証するにすぎない。

【０２０８】

加えて、代謝物を生成するのに有用な酵素の相同体が、本明細書に提供される微生物および方法によって包含される。

【０２０９】

本明細書で使用されるとき、２つのタンパク質（またはタンパク質の領域）は、アミノ酸配列が少なくとも約３０％、４０％、５０％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一性を有するとき、実質的に相同である。２つのアミノ酸配列の、または２つの核酸配列の、同一性パーセントを決定するために、配列は、最適な比較目的（例えば、最適な整列のために、第１および第２のアミノ酸配列または核酸配列の１つまたは両方に、ギャップを導入することができ、非相同配列は、比較目的のために無視することができる）のために整列される。一実施形態では、比較目的のために整列される参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも３０％、典型的には少なくとも４０％、より典型的には少なくとも５０％、更により典型的には少なくとも６０％、および更により典型的には少なくとも７０％、８０％、９０％、１００％である。次いで対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第１の配列における位置が、第２の配列における対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占有されるとき、分子は、その位置で同一である（本明細書で使用されるときアミノ酸または核酸「同一性」は、アミノ酸または核酸「相同性」と同等である）。２つの配列の間の同一性パーセントは、２つの配列の最適な整列のために導入される必要がある、ギャップの数、および各ギャップの長さを考慮した、その配列によって共有される同一位置の数の関数である。

【０２１０】

タンパク質またはペプチドを参照して「相同」が使用されるとき、同一でない残基位置がしばしば保存的アミノ酸置換によって異なることが認識される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、同様の化学特性（例えば、電荷または疎水性）を有する側鎖（Ｒ基）を有する、別のアミノ酸残基によって置換される置換である。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変更しない。２つ以上のアミノ酸配列が保存的置換によって互いに異なる場合には、配列同一性パーセントまたは相同性の度合いは、置換の保存的性質を補正するために、上方に調整されてもよい。この調整を行うための手段は、当業者に周知である（例えば、Ｐｅａｒｓｏｎ Ｗ．Ｒ．，１９９４，Ｍｅｔｈ

ｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　２５：３６５－８９を参照されたい）。

【０２１１】

次の６個の群は各々、互いに対して保存的置換であるアミノ酸を含有する：１）セリン（Ｓ）、スレオニン（Ｔ）、２）アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）、３）アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）、４）アルギニン（Ｒ）、リジン（Ｋ）、５）イソロイシン（Ｉ）、ロイシン（Ｌ）、アラニン（Ａ）、バリン（Ｖ）、および６）フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）。

【０２１２】

配列同一性パーセントとも称される、ポリペプチドに対する配列相同性は、典型的には配列分析ソフトウェアを使用して測定される。譲受人共通および同時係属中の出願米国特許第２００９／０２２６９９１号を参照されたい。分子配列を、異なる生物からの多数の配列を含有するデータベースと比較する、使用される典型的なアルゴリズムは、コンピュータプログラムＢＬＡＳＴである。多数の異なる生物からの配列を含有するデータベースを検索するとき、アミノ酸配列を比較することが典型的である。データベースを検索するを使用するアミノ酸配列は、譲受人共通および同時係属中の出願米国特許第２００９／０２２６９９１号に記載されるアルゴリズムによって測定することができる。

【０２１３】

様々な微生物が、アセト乳酸を要求するおよび／またはアルデヒド中間体を要求する生合成経路からの有益な代謝物の産生に好適な、組み換え代謝経路を含むように改変することができることが理解される。種々の実施形態では、微生物は、酵母微生物から選択されてもよい。イソブタノール、２－ブタノール、１－ブタノール、２－ブタノン、２，３－ブタンジオール、アセトイン、ジアセチル、バリン、ロイシン、パントテン酸、イソブチレン、３－メチル－１－ブタノール、補酵素Ａ、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、１－ペンタノール、１－ヘキサノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、５－メチル－１－ヘプタノール、および１－プロパノール等の代謝物の産生のための酵母微生物は、ある種の特徴に基づいて選択され得る。

【０２１４】

１つの特徴には、種々の炭素源を、イソブタノール、２－ブタノール、１－ブタノール、２－ブタノン、２，３－ブタンジオール、アセトイン、ジアセチル、バリン、ロイシン、パントテン酸、イソブチレン、３－メチル－１－ブタノール、補酵素Ａ、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、１－ペンタノール、１－ヘキサノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、５－メチル－１－ヘプタノール、および１－プロパノール等の有益な代謝物に変換するために、微生物が選択されるという特性が含まれてもよい。「炭素源」という用語は、一般的には、原核または真核細胞増殖のための炭素の源として使用されるために好適な物質を指す。好適な炭素源の例は、譲受人共通および同時係属中の出願米国特許第２００９／０２２６９９１号に記載される。したがって、一実施形態では、本明細書に開示される組み換え微生物は、グルコース、ガラクトース、マンノース、キシロース、アラビノース、ラクトース、スクロース、およびそれらの混合物を含むが、これらに限定されない多様な炭素源を、産物に変換することができる。

【０２１５】

組み換え微生物は故に、キシロースを含む五炭（ペントース）糖からの、イソブタノール、２－ブタノール、１－ブタノール、２－ブタノン、２，３－ブタンジオール、アセトイン、ジアセチル、バリン、ロイシン、パントテン酸、イソブチレン、３－メチル－１－ブタノール、補酵素Ａ、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、１－ペンタノール、１－ヘキサノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、５－メチル－１－ヘプタノール、および１－プロパノールの産生のための経路を更に含む。ほとんどの酵母種は、複雑な経路を介して、キシロースを代謝し、そこでは、まずキシロースがキシロースレダクターゼ（ＸＲ）酵素を介して

キシリトールに還元される。キシリトールは次いで、キシリトールデヒドロゲナーゼ（ＸＤＨ）酵素を介してキシルロースに酸化される。キシルロースは次いで、キシルロキナーゼ（ＸＫ）酵素を介してリン酸化される。この経路は、それが細胞中の酸化還元不均衡を導入するため、酵母種において非効率的に作動する。キシロースからキシリトールへのステップは、補因子としてＮＡＤＨを使用する一方で、キシリトールからキシルロースへのステップは、補因子としてＮＡＤＰＨを使用する。他のプロセスが、細胞内の酸化還元不均衡を回復させるように作動する必要がある。これはしばしば、生物が、キシロースまたは他のペントース糖上で嫌気的に成長することができないことを意味する。それ故に、キシロースおよび他のペントース糖を所望の発酵産物に効率的に発酵させることができる酵母種が、したがって、非常に望ましい。

【０２１６】

故に、一態様では、組み換え微生物は、機能する外来性キシロースイソメラーゼを発現するように操作される。酵母中で機能する外来性キシロースイソメラーゼは、当該技術分野で既知である。例えば、Ｒａｊｇａｒｈｉａら、米国特許第２００６／０２３４３６４号を参照されたく、それは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。この態様による実施形態では、外来性キシロースイソメラーゼ遺伝子は、酵母細胞中で機能するプロモーターおよび終結配列に作動的に連結される。好ましい実施形態では、組み換え微生物は更に、キシロースからキシリトールへの変換を触媒する酵素（例えば、ＸＲおよび／またはＸＤＨ）をコードする天然の遺伝子の欠失または撹乱を有する。更なる好ましい実施形態では、組み換え微生物はまた、酵母細胞中で機能的なプロモーターおよび終結配列に作動的に連結される、機能する外来性キシルロキナーゼ（ＸＫ）遺伝子も含有する。一実施形態では、キシルロキナーゼ（ＸＫ）遺伝子は、過剰発現される。

【０２１７】

一実施形態では、微生物は、低減されたまたはゼロのピルビン酸デカルボキシラーゼ（ＰＤＣ）活性を有する。ＰＤＣは、ピルビン酸塩のアセトアルデヒドへの脱炭酸を触媒し、アセトアルデヒドは次いで、ＡＤＨによって、ＮＡＤＨのＮＡＤ＋への酸化を介してエタノールに還元される。エタノール産物は、解糖からＮＡＤＨを酸化させるための主要な経路である。この経路の欠失は、生合成経路のために利用可能なピルビン酸塩および還元等価物（ＮＡＤＨ）を増加させる。したがって、ＰＤＣ遺伝子の欠失により、更に所望の代謝物の収率を増加させることができる。

【０２１８】

別の実施形態では、微生物は、低減されたまたはゼロのグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）活性を有する。ＧＰＤは、ＮＡＤＨのＮＡＤ＋への酸化を介して、ジヒドロキシアセトンリン酸（ＤＨＡＰ）の、グリセロール－３－リン酸（Ｇ３Ｐ）への還元を触媒する。グリセロールが次いで、グリセロール－３－ホスファターゼ（ＧＰＰ）によってＧ３Ｐから産生される。グリセロール産生は、解糖からの過剰のＮＡＤＨを酸化させるための二次経路である。この経路の低減または排除は、生合成経路のために利用可能なピルビン酸塩および還元等価物（ＮＡＤＨ）を増加させるであろう。故に、ＧＰＤ遺伝子の欠失により、更に所望の代謝物の収率を増加させることができる。

【０２１９】

なおも別の実施形態では、微生物は、低減されたまたはゼロのＰＤＣ活性、および低減されたまたはゼロのＧＰＤ活性を有する。ＰＤＣ－マイナス／ＧＰＤ－マイナス酵母産物株は、譲受人共通および同時係属中の刊行物、米国特許第２００９／０２２６９９１号および米国特許第２０１１／００２０８８９号に記載され、それらの両方は参照によりそれらの全体が全目的で本明細書に組み込まれる。

【０２２０】

一実施形態では、酵母微生物は、譲受人共通および同時係属中の出願米国特許第２００９／０２２６９９１号に記載される、「サッカロミセス酵母クレード」から選択されてもよい。

【０２２１】

「サッカロミセス・センス・ストリクト」分類群という用語は、Ｓ．セレビシエに高度に関連する酵母種のクラスターである（Ｒａｉｎｉｅｒｉ ｅｔ ａｌ．，２００３，Ｊ．Ｂｉｏｓｃｉ Ｂｉｏｅｎｇｉｎ ９６：１－９）。サッカロミセス・センス・ストリクト酵母種には、Ｓ．セレビシエ、Ｓ．クドリアブゼビイ、Ｓ．ミカタエ、Ｓ．バヤヌス、Ｓ．ウバルム、Ｓ．カロカニス、およびこれらの種に由来するハイブリッドが含まれるが、これらに限定されない（Ｍａｓｎｅｕｆ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｙｅａｓｔ ７：６１－７２）。

【０２２２】

古代の全ゲノム重複（ＷＧＤ）事象は、半子嚢菌類酵母の進化中に生じ、比較ゲノムツールを使用して発見された（Ｋｅｌｌｉｓ ｅｔ ａｌ．，２００４，Ｎａｔｕｒｅ ４２８：６１７－２４、Ｄｕｊｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００４，Ｎａｔｕｒｅ ４３０：３５－４４、Ｌａｎｇｋｊａｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００３，Ｎａｔｕｒｅ ４２８：８４８－５２、Ｗｏｌｆｅ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｎａｔｕｒｅ ３８７：７０８－１３）。この主要な進化事象を使用して、酵母は、ＷＧＤ事象後に共通の祖先から分岐した種（本明細書で「ＷＧＤ後酵母」と称される）、およびＷＧＤ事象前に酵母系統から分岐した種（本明細書で「ＷＧＤ前酵母」と称される）に分割することができる。

【０２２３】

したがって、一実施形態では、酵母微生物は、サッカロミセスおよびカンジダを含むが、これらに限定されないＷＧＤ後酵母属から選択されてもよい。好ましいＷＧＤ後酵母種には、次のものが含まれる：Ｓ．セレビシエ、Ｓ．ウバルム、Ｓ．バヤヌス、Ｓ．パラドキサス、Ｓ．カステリイ、およびＣ．グラブラタ。

【０２２４】

別の実施形態では、酵母微生物は、サッカロミセス、クルイベロミセス、カンジダ、ピキア、イッサトケンキア、デバリオミセス、ハンゼヌラ、ヤロウィア、およびシゾサッカロミセスを含むが、これらに限定されない全ゲノム重複前（ＷＧＤ前）酵母属から選択されてもよい。代表的なＷＧＤ前酵母種には、次のものが含まれる：Ｓ．クルイベリ、Ｋ．サーモトレランス、Ｋ．マルシアヌス、Ｋ．ワルチイ、Ｋ．ラクチス、Ｃ．トロピカリス、Ｐ．パストリス、Ｐ．アノマラ、Ｐ．スチピチス、Ｉ．オリエンタリス、Ｉ．オシデンタリス、Ｉ．スクツラタ、Ｄ．ハンセニイ、Ｈ．アノマラ、Ｙ．リポリチカ、およびＳ．ポンベ。

【０２２５】

酵母微生物は、譲受人共通および同時係属中の出願米国特許第２００９／０２２６９９１号に記載される中に記載される、クラブトリー陰性またはクラブトリー陽性のいずれであってもよい。一実施形態では、酵母微生物は、次の属を含むが、これらに限定されない、クラブトリー陰性表現型を有する酵母から選択されてもよい：サッカロミセス、クルイベロミセス、ピキア、イッサトケンキア、ハンゼヌラ、およびカンジダ。クラブトリー陰性種には、次のものが含まれるが、これらに限定されない：Ｓ．クルイベリ、Ｋ．ラクチス、Ｋ．マルシアヌス、Ｐ．アノマラ、Ｐ．スチピチス、Ｉ．オリエンタリス、Ｉ．オシデンタリス、Ｉ．スクツラタ、Ｈ．アノマラ、およびＣ．ウチリス。別の実施形態では、酵母微生物は、サッカロミセス、クルイベロミセス、ジゴサッカロミセス、デバリオミセス、ピキア、およびシゾサッカロミセスを含むが、これらに限定されない、クラブトリー陽性表現型を有する酵母から選択されてもよい。クラブトリー陽性酵母種には、次のものが含まれるが、これらに限定されない：Ｓ．セレビシエ、Ｓ．ウバルム、Ｓ．バヤヌス、Ｓ．パラドキサス、Ｓ．カステリイ、Ｋ．サーモトレランス、Ｃ．グラブラタ、Ｚ．バイリ、Ｚ．ロウキシイ、Ｄ．ハンセニイ、Ｐ．パストリウス、およびＳ．ポンベ。

【０２２６】

別の特徴には、微生物が非発酵であるものであるという特性が含まれてもよい。換言すると、それは炭素源を嫌気的に代謝することができないが、酵母は酸素の存在下で炭素源を代謝することができる。非発酵酵母は、天然産の酵母ならびに遺伝子改変酵母の両方を指す。発酵性酵母との嫌気性発酵中に、解糖からのＮＡＤＨを酸化させるための主要な経

路は、エタノールの産生を通じるものである。エタノールは、アセトアルデヒドの還元を介して、アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）によって産生され、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ＰＤＣ）によってピルビン酸塩から生成される。一実施形態では、発酵性酵母は、天然のＰＤＣ活性の低減または排除によって、非発酵性となるように操作することができる。故に、解糖によって産生されるピルビン酸塩のほとんどは、ＰＤＣによって消費されず、イソブタノール経路のために利用可能である。この経路の欠失は、生合成経路のために利用可能なピルビン酸塩および還元等価物を増加させる。発酵性経路は、イソブタノール等の所望の代謝物の低収率および低生産性に寄与する。したがって、ＰＤＣ遺伝子の欠失は、イソブタノール等の所望の代謝物の収率および生産性を増加させ得る。

【０２２７】

幾つかの実施形態では、組み換え微生物は、トリコスポロン、ロドトルラ、ミキソチマ、またはカンジダからなる群から選択される属に分類されるものを含むが、これらに限定されない、非発酵酵母微生物である微生物であってもよい。特定の実施形態では、非発酵酵母は、Ｃ．ゼストビイ（ｘｅｓｔｏｂｉｉ）である。

イソブタノール産生酵母微生物

【０２２８】

本明細書に記載されるように、一実施形態では、酵母微生物は、解糖によって、グルコース等の炭素源をピルビン酸塩に変換するように操作され、ピルビン酸塩は、イソブタノール産生代謝経路を介してイソブタノールに変換される（例えば、国際公開第／２００７／０５０６７１号、国際公開第／２００８／０９８２２７号、およびＡｔｓｕｍｉ ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｎａｔｕｒｅ ４５：８６－９を参照されたい）。イソブタノールの産生のための代替的な経路は、国際公開第／２００７／０５０６７１号、およびＤｉｃｋｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７３：２５７５１－６に記載されている。

【０２２９】

したがって、一実施形態では、ピルビン酸塩をイソブタノールに変換するためのイソブタノール産生代謝経路は、次の反応からなることができる：

１．２ピルビン酸塩→アセト乳酸＋CO_2

２．アセト乳酸＋ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ→２，３－ジヒドロキシイソ吉草酸塩＋ＮＡＤ（Ｐ）$^+$

３．２，３－ジヒドロキシイソ吉草酸塩→アルファ－ケトイソ吉草酸塩

４．アルファ－ケトイソ吉草酸塩→イソブチルアルデヒド＋CO_2

５．イソブチルアルデヒド＋ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ→イソブタノール＋ＮＡＤ（Ｐ）$^+$

【０２３０】

これらの反応は、酵素１）アセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）、２）ケトール酸レダクトーイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）、３）ジヒドロキシ－酸デヒドラターゼ（ＤＨＡＤ）、４）ケト－イソ吉草酸塩デカルボキシラーゼ（ＫＩＶＤ）、および５）アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）によって行われる（図１）。別の実施形態では、酵母微生物は、これらの酵素を過剰発現するように操作される。例えば、これらの酵素は、天然の遺伝子によってコードされ得る。代替的には、これらの酵素は、異種遺伝子によってコードされ得る。例えば、ＡＬＳは、Ｂ．スブチリスのａｌｓＳ遺伝子、Ｌ．ラクチスのａｌｓＳ、またはＫ．ニューモニエ（ｐｎｅｕｍｏｎｉａ）のｉｌｖＫ遺伝子によってコードすることができる。例えば、ＫＡＲＩは、大腸菌のｉｌｖＣ遺伝子、Ｃ．グルタミクム、Ｍ．マリパルディス、またはピロミセス菌種Ｅ２によってコードすることができる。例えば、ＤＨＡＤは、大腸菌のｉｌｖＤ遺伝子、Ｃ．グルタミクム、またはＬ．ラクチスによってコードすることができる。例えば、ＫＩＶＤは、Ｌ．ラクチスのｋｉｖＤ遺伝子によってコードすることができる。ＡＤＨは、Ｓ．セレビシエのＡＤＨ２、ＡＤＨ６、もしくはＡＤＨ７、またはＬ．ラクチスのａｄｈＡによってコードすることができる。

【０２３１】

一実施形態では、経路ステップ２および５は、補因子として（ＮＡＤＰＨよりもむしろ）ＮＡＤＨを利用するＫＡＲＩおよびＡＤＨ酵素によって行われてもよい。かかる酵素は、譲受人共通および同時係属中の刊行物、米国特許第２０１０／０１４３９９７号に記載され、それは参照によりその全体が全目的で本明細書に組み込まれる。本発明者らは、それぞれ経路ステップ２および５を触媒するための、ＮＡＤＨ依存性ＫＡＲＩおよびＡＤＨ酵素の利用が、嫌気性条件下でのイソブタノールの産生を驚くほどに可能にすることを見出した。故に、一実施形態では、本発明の組み換え微生物は、アセト乳酸（＋ＮＡＤＨ）の変換を触媒して２，３－ジヒドロキシイソ吉草酸塩を産生するために、ＮＡＤＨ依存性ＫＡＲＩを使用し得る。別の実施形態では、本発明の組み換え微生物は、イソブチルアルデヒド（＋ＮＡＤＨ）の変換を触媒してイソブタノールを産生するために、ＮＡＤＨ依存性ＡＤＨを使用し得る。なおも別の実施形態では、本発明の組み換え微生物は、アセト乳酸（＋ＮＡＤＨ）の変換を触媒して２，３－ジヒドロキシイソ吉草酸塩を産生するためのＮＡＤＨ依存性ＫＡＲＩ、およびイソブチルアルデヒド（＋ＮＡＤＨ）の変換を触媒してイソブタノールを産生するためのＮＡＤＨ依存性ＡＤＨの両方を使用し得る。

【０２３２】

別の実施形態では、酵母微生物は、ピルビン酸塩をイソブタノールに変換する増加された能力を有するように操作されてもよい。一実施形態では、酵母微生物は、ピルビン酸塩をイソブチルアルデヒドに変換する増加された能力を有するように操作されてもよい。別の実施形態では、酵母微生物は、ピルビン酸塩をケト－イソ吉草酸塩に変換する増加された能力を有するように操作されてもよい。別の実施形態では、酵母微生物は、ピルビン酸塩を２，３－ジヒドロキシイソ吉草酸塩に変換する増加された能力を有するように操作されてもよい。別の実施形態では、酵母微生物は、ピルビン酸塩をアセト乳酸に変換する増加された能力を有するように操作されてもよい。

【０２３３】

更に、前述の酵素をコードする遺伝子のいずれも（または本明細書で言及される任意のその他のもの（またはその発現を制御または調節する調節要素のいずれか））、指向性進化または合理的突然変異誘発等の遺伝子／タンパク質工学技術によって最適化され得、それらは当業者に既知である。かかる作用は、当業者が、酵素を酵母中の発現および活性に対して最適化することを可能にする。

【０２３４】

加えて、これらの酵素をコードする遺伝子は、他の真菌および細菌種から特定することができ、この経路の調節のために発現させることができる。Ｓ．セレビシエおよびＳ．ウバルムを含むサッカロミセス菌種、Ｋ．サーモトレランス、Ｋ．ラクチス、およびＫ．マルシアヌスを含むクルイベロミセス菌種、ピキア菌種、Ｈ．ポリモルファを含むハンゼヌラ菌種、カンジダ菌種、トリコスポロン菌種、Ｙ．菌種スチピチスを含むヤマダザイマ菌種、トルラスポラ・プレトリエンシス、イッサチェンキア・オリエンタリス、Ｓ．ポンベを含むシゾサッカロミセス菌種、クリプトコッカス菌種、アスペルギルス菌種、ニューロスポラ菌種、またはウスチラゴ菌種を含むが、これらに限定されない多様な生物が、これらの酵素のための源としての機能を果たし得る。嫌気性真菌からの遺伝子の源には、ピロミセス菌種、オルピノミセス菌種、またはネオカリマスティクス菌種が含まれるが、これらに限定されない。有用である原核酵素の源には、大腸菌、ザイモモナス・モビリス、黄色ブドウ球菌、バチルス・菌種、クロストリジウム菌種、コリネバクテリウム菌種、シュードモナス菌種、ラクトコッカス菌種、エンテロバクター菌種、およびサルモネラ菌種が含まれるが、これらに限定されない。

【０２３５】

一実施形態では、本発明は、イソブタノールを産生するための組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、イソブタノール産生代謝経路を含み、該微生物は、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。幾つかの実施形態では、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素は、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）である。特定の実施形態では、３－ケト酸レダクタ

ーゼは、Ｓ．セレビシエＴＭＡ２９（ＹＭＲ２２６Ｃ）遺伝子またはその相同体によってコードされる。一実施形態では、相同体は、バンデルワルトムジマ（Ｖａｎｄｅｒｗａｌｔｏｍｚｙｍａ）・ポリスポラ（配列番号２）、サッカロミセス・カステリイ（配列番号３）、カンジダ・グラブラタ（配列番号４）、サッカロミセス・バヤヌス（配列番号５）、ジゴサッカロミセス・ロウキシイ（配列番号６）、クルイベロミセス・ラクチス（配列番号７）、アシビア・ゴシピイ（配列番号８）、サッカロミセス・クルイベリ（配列番号９）、クルイベロミセス・サーモトレランス（配列番号１０）、クルイベロミセス・ワルチイ（配列番号１１）、ピキア・スチピチス（配列番号１２）、デバロミセス・ハンセニイ（配列番号１３）、ピキア・パストリス（配列番号１４）、カンジダ・デュブリニエンシス（配列番号１５）、カンジダ・アルビカンス（配列番号１６）、ヤロウィア・リポリチカ（配列番号１７）、イッサチェンキア・オリエンタリス（配列番号１８）、アスペルギルス・ニデュランス（配列番号１９）、アスペルギルス・ニガー（配列番号２０）、ニューロスポラ・クラッサ（配列番号２１）、シゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号２２）、およびクルイベロミセス・マルシアヌス（配列番号２３）からなる群から選択されてもよい。

【０２３６】

別の実施形態では、本発明は、イソブタノールを産生するための組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、イソブタノール産生代謝経路を含み、該微生物は、イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。幾つかの実施形態では、イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼである。例示的な実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、Ｓ．セレビシエアルデヒドデヒドロゲナーゼＡＬＤ６（配列番号２５）またはその相同体もしくは変異体である。一実施形態では、相同体は、サッカロミセス・カステリイ（配列番号２６）、カンジダ・グラブラタ（配列番号２７）、サッカロミセス・バヤヌス（配列番号２８）、クルイベロミセス・ラクチス（配列番号２９）、クルイベロミセス・サーモトレランス（配列番号３０）、クルイベロミセス・ワルチイ（配列番号３１）、サッカロミセス・セレビシエＹＪ７８９（配列番号３２）、サッカロミセス・セレビシエＪＡＹ２９１（配列番号３３）、サッカロミセス・セレビシエＥＣ１１１８（配列番号３４）、サッカロミセス・セレビシエＤＢＹ９３９（配列番号３５）、サッカロミセス・セレビシエＡＷＲＩ１６３１（配列番号３６）、サッカロミセス・セレビシエＲＭ１１－１ａ（配列番号３７）、ピキア・パストリス（配列番号３８）、クルイベロミセス・マルシアヌス（配列番号３９）、シゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号４０）、およびシゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号４１）からなる群から選択される。

【０２３７】

なおも別の実施形態では、本発明は、イソブタノールを産生するための組み換え微生物を対象とし、該組み換え微生物は、イソブタノール産生代謝経路を含み、該微生物は、（ｉ）アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作され、かつ（ｉｉ）イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。幾つかの実施形態では、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素は、３－ケト酸レダクターゼ（３－ＫＡＲ）である。特定の実施形態では、３－ケト酸レダクターゼは、Ｓ．セレビシエＴＭＡ２９（ＹＭＲ２２６Ｃ）遺伝子またはその相同体もしくは変異体によってコードされる。一実施形態では、相同体は、バンデルワルトムジマ（Ｖａｎｄｅｒｗａｌｔｏｍｚｙｍａ）・ポリスポラ（配列番号２）、サッカロミセス・カステリイ（配列番号３）、カンジダ・グラブラタ（配列番号４）、サッカロミセス・バヤヌス（配列番号５）、ジゴサッカロミセス・ロウキシイ（配列番号６）、クルイベロミセス・ラクチス（配列番号７）、アシビア・ゴシピイ（配列番号８）、サッカロミセス・クルイベリ（配列番号９）、クルイベロミセス・サーモトレランス（配列番号１０）、クルイベロミセス・ワルチイ（配列番号１１）、ピキア・スチピチス（配列番号１２）、デバロミセス・ハンセニイ（配列番号１３）、ピキア・パストリス（配列番号１４）、カンジダ・デュブリニエンシス（配列番号

１５）、カンジダ・アルビカンス（配列番号１６）、ヤロウィア・リポリチカ（配列番号１７）、イッサチェンキア・オリエンタリス（配列番号１８）、アスペルギルス・ニデュランス（配列番号１９）、アスペルギルス・ニガー（配列番号２０）、ニューロスポラ・クラッサ（配列番号２１）、シゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号２２）、およびクルイベロミセス・マルシアヌス（配列番号２３）からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼである。特定の実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、Ｓ．セレビシエアルデヒドデヒドロゲナーゼＡＬＤ６（配列番号２５）またはその相同体もしくは変異体である。一実施形態では、相同体は、サッカロミセス・カステリイ（配列番号２６）、カンジダ・グラブラタ（配列番号２７）、サッカロミセス・バヤヌス（配列番号２８）、クルイベロミセス・ラクチス（配列番号２９）、クルイベロミセス・サーモトレランス（配列番号３０）、クルイベロミセス・ワルチイ（配列番号３１）、サッカロミセス・セレビシエＹＪ７８９（配列番号３２）、サッカロミセス・セレビシエＪＡＹ２９１（配列番号３３）、サッカロミセス・セレビシエＥＣ１１１８（配列番号３４）、サッカロミセス・セレビシエＤＢＹ９３９（配列番号３５）、サッカロミセス・セレビシエＡＷＲＩ１６３１（配列番号３６）、サッカロミセス・セレビシエＲＭ１１－１ａ（配列番号３７）、ピキア・パストリス（配列番号３８）、クルイベロミセス・マルシアヌス（配列番号３９）、シゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号４０）、およびシゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号４１）からなる群から選択される。

【０２３８】

一実施形態では、イソブタノール産生代謝経路は、ピルビン酸塩のイソブタノールへの変換におけるステップを触媒する少なくとも１つの外来性遺伝子を含む。別の実施形態では、イソブタノール産生代謝経路は、ピルビン酸塩のイソブタノールへの変換におけるステップを触媒する少なくとも２つの外来性遺伝子を含む。なおも別の実施形態では、イソブタノール産生代謝経路は、ピルビン酸塩のイソブタノールへの変換におけるステップを触媒する少なくとも３つの外来性遺伝子を含む。なおも別の実施形態では、イソブタノール産生代謝経路は、ピルビン酸塩のイソブタノールへの変換におけるステップを触媒する少なくとも４つの外来性遺伝子を含む。なおも別の実施形態では、イソブタノール産生代謝経路は、ピルビン酸塩のイソブタノールへの変換におけるステップを触媒する５つの外来性遺伝子を含む。

【０２３９】

一実施形態では、イソブタノール経路遺伝子のうちの１つ以上が、サイトゾルに局在化される酵素をコードする。一実施形態では、組み換え微生物は、少なくとも１つのイソブタノール経路酵素がサイトゾルに局在化される、イソブタノール産生代謝経路を含む。別の実施形態では、組み換え微生物は、少なくとも２つのイソブタノール経路酵素がサイトゾルに局在化される、イソブタノール産生代謝経路を含む。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、少なくとも３つのイソブタノール経路酵素がサイトゾルに局在化される、イソブタノール産生代謝経路を含む。なおも別の実施形態では、組み換え微生物は、少なくとも４つのイソブタノール経路酵素がサイトゾルに局在化される、イソブタノール産生代謝経路を含む。例示的な実施形態では、組み換え微生物は、５つのイソブタノール経路酵素がサイトゾルに局在化される、イソブタノール産生代謝経路を含む。１つ以上の遺伝子がサイトゾルに局在化される、イソブタノール産生代謝経路は、譲受人共通および同時係属中の米国出願第１２／８５５，２７６号に記載され、それは参照によりその全体が全目的で本明細書に組み込まれる。

イソブタノールの産生における改変されたアルコールデヒドロゲナーゼの発現

【０２４０】

副産物イソ酪酸塩の産生を低減するための本明細書に記載される別の戦略は、イソブチルアルデヒドのイソブタノールへの変換に関与するアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）の活性および／または発現を増加させることである。この戦略は、イソブタノール経路

中間体、イソブチルアルデヒドに対する、内在性酵素による競合を防止する。ＡＤＨの活性および／または発現における増加は、種々の手段によって達成され得る。例えば、ＡＤＨ活性は、増加されたプロモーター強度を有するプロモーターを利用することによって、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子のコピー数を増加させることによって、増加させることができる。

【０２４１】

代替的な実施形態では、副産物イソ酪酸塩の産生は、イソブチルアルデヒドに対して増加された比活性を有するＡＤＨを利用することによって低減され得る。イソブチルアルデヒドに対して増加された比活性を有するかかるＡＤＨ酵素は、自然界で特定されてもよく、または本明細書に記載される改変等の、ＡＤＨ酵素に対する改変からもたらされてもよい。幾つかの実施形態では、これらの改変は、イソブチルアルデヒドに対するミカエリス‐メンテン定数（K_M）の減少をもたらすであろう。かかる改変されたＡＤＨ酵素の使用を通じて、イソブチルアルデヒドに対する、内在性酵素による競合は更に限定される。一実施形態では、本明細書に記載される改変されたＡＤＨを含む組み換え微生物におけるイソ酪酸塩収率（１ｍｏｌ当たりのイソ酪酸塩ｍｏｌグルコース）は、約５％未満である。別の実施形態では、本明細書に記載される改変されたＡＤＨを含む組み換え微生物におけるイソ酪酸塩収率（１ｍｏｌ当たりのイソ酪酸塩ｍｏｌグルコース）は、約１％未満である。なおも別の実施形態では、本明細書に記載される改変されたＡＤＨを含む組み換え微生物におけるイソ酪酸塩収率（１ｍｏｌ当たりのイソ酪酸塩ｍｏｌグルコース）は、約０．５％未満、約０．１％未満、約０．０５％未満、または約０．０１％未満である。

【０２４２】

更に、改変されたＡＤＨ酵素を利用することによって、本発明者らは、順反応（すなわち、イソブタノールへのイソブチルアルデヒド変換）が、逆反応（すなわち、イソブタノールのイソブチルアルデヒドへの変換）よりも好ましい反応である状況を確立し得る。

【０２４３】

上述の戦略は、一般的に、イソ酪酸塩収率の減少をもたらし、それはイソブタノール収率の増加を伴う。したがって、上記の戦略は、イソ酪酸塩収率および／または力価を減少させるため、およびイソブタノール収率の、イソ酪酸塩収率に対する比率を増加させるために有用である。

【０２４４】

したがって、一態様では、本出願は、残りの４つのイソブタノール経路酵素と共発現されるとき、改善されたイソブタノール産生を促進することができる、増強された活性を有する改変されたＡＤＨの生成を記載する。この態様による一実施形態では、本出願は、１つ以上の改変されたＡＤＨを含む組み換え微生物を対象とする。一実施形態では、組み換え微生物は更に、本明細書に記載されるように、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。別の実施形態では、組み換え微生物は更に、本明細書に記載されるように、イソブチルアルデヒドのイソ酪酸塩への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。

【０２４５】

イソブタノール生合成経路に加えて、他の生合成経路が、アルデヒドのアルコールへの変換のためにＡＤＨ酵素を利用する。例えば、ＡＤＨ酵素は、１－プロパノール、２－プロパノール、１－ブタノール、２－ブタノール、１－ペンタノール、２－メチル－１－ブタノール、および３－メチル－１－ブタノールの産生のための生合成経路の一部として、種々のアルデヒドをアルコールに変換する。

【０２４６】

本明細書で使用されるとき、「ＡＤＨ」または「ＡＤＨ酵素」または「アルコールデヒドロゲナーゼ」という用語は、イソブチルアルデヒドのイソブタノールへの変換を触媒する酵素を指すために本明細書で交換可能に使用される。ＡＤＨ配列は、Ｌ．ラクチス（配列番号１７５）、ストレプトコッカス・ニューモニエ、黄色ブドウ球菌、およびバチルス・セレウスを含むが、これらに限定されない無数の微生物から入手可能である。本発明の

方法によって改変可能なＡＤＨ酵素には、譲受人共通および同時係属中の米国特許公開第２０１０／０１４３９９７号に開示されるものが含まれるが、これらに限定されない。本明細書に記載される方法によって改変可能なＡＤＨ酵素の代表的な一覧は、表９７において見出される。

改変されたＡＤＨ酵素

【０２４７】

本発明に従って、ＡＤＨ酵素に対して任意の数の突然変異を行うことができ、一実施形態では、複数の突然変異を行って、イソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する増加された能力をもたらすことができる。かかる突然変異は、点突然変異、フレームシフト突然変異、欠失、および挿入を含み、このうち１つ以上の（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つ等）点突然変異が好ましい。例示的な実施形態では、改変されたＡＤＨ酵素は、（ａ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のチロシン５０（ｂ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のグルタミン７７、（ｃ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のバリン１０８、（ｄ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のチロシン１１３、（ｅ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のイソロイシン２１２、および（ｆ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のロイシン２６４から選択されるアミノ酸に対応する位置における１つ以上の突然変異を含み、ここでＡｄｈＡ（配列番号１８５）は、Ｌ．ラクチスアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）遺伝子ａｄｈＡ（配列番号１８４）またはそのコドン最適化バージョン（配列番号２０６）によってコードされる。

【０２４８】

突然変異は、当業者に既知の任意の手法を使用して、本発明のＡＤＨ酵素中に導入されてもよい。突然変異は、例えば、２価金属イオン補因子としてのマンガンの存在下でＰＣＲ反応を行うことによって、無作為に導入されてもよい。代替的には、オリゴヌクレオチド指向性突然変異誘発を使用して、コードするＤＮＡ分子に沿った任意の決定部位における、全ての可能性のあるクラスの塩基対変更を可能にする、改変されたＡＤＨ酵素を作り出してもよい。一般に、この技術は、目的のＡＤＨ酵素をコードする１本鎖ヌクレオチド配列に相補的（１つ以上のミスマッチを除く）なオリゴヌクレオチドをアニーリングすることを伴う。ミスマッチオリゴヌクレオチドは次いで、ＤＮＡポリメラーゼによって伸張されて、１つの鎖の配列において所望の変更を含有する２本鎖ＤＮＡ分子を生成する。配列における変更は、例えば、アミノ酸の欠失、置換、または挿入をもたらし得る。２本鎖ポリヌクレオチドを次いで、適切な発現ベクター中に挿入することができ、このようにして突然変異体または改変されたポリペプチドを産生することができる。上述のオリゴヌクレオチド指向性突然変異誘発は、例えば、ＰＣＲを介して行うことができる。

【０２４９】

本発明の組成物および方法において使用するための酵素には、イソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する能力を有する任意の酵素が含まれる。かかる酵素には、とりわけ、Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ、Ｓ．ニューモニエＡｄｈＡ、黄色ブドウ球菌ＡｄｈＡ、およびバチルス・セレウスＡｄｈＡが含まれるが、これらに限定されない。本発明の方法によって改変可能なさらなるＡＤＨ酵素には、譲受人共通および同時係属中の米国特許公開第２０１０／０１４３９９７号に開示されるものが含まれるが、これらに限定されない。本明細書に記載される方法によって改変可能なＡＤＨ酵素の代表的な一覧は、表１６に見出すことができる。当業者によって理解されるように、改変されたＡＤＨ酵素は、当該技術分野で日常的かつ周知である組み換えまたは遺伝子工学技術によって得られてもよい。改変されたＡＤＨ酵素は、例えば、部位指向性または無作為突然変異誘発によって目的のＡＤＨ酵素をコードする遺伝子（複数可）を突然変異させることによって、得ることができる。かかる突然変異は、点突然変異、欠失突然変異、および挿入突然変異を含んでもよい。例えば、１つ以上の点突然変異（例えば、１つ以上のアミノ酸の、１つ以上の異なるアミノ酸との置換）を使用して、本発明の改変されたＡＤＨ酵素を構築してもよい。

【０２５０】
本発明は更に、野生型ＡＤＨ酵素（例えば、Ｌ．ラクチスＡｄｈＡまたは大腸菌ＡｄｈＡ）に対して、アミノ酸レベルで５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であり、イソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する増加された能力を示す相同ＡＤＨ酵素を含む。また、配列番号１８５に提示されるアミノ酸配列を含むＡＤＨ酵素に対して、アミノ酸レベルで５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であり、非改変野生型酵素と比較して、イソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する増加された能力を示す、ＡＤＨ酵素も本明細書に含まれる。本発明はまた、上述のＡＤＨ酵素をコードする核酸分子を含む。

【０２５１】
本発明はまた、少なくとも５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、または６００アミノ酸残基を含み、ＡＤＨ酵素に関連する１つ以上の活性を保持する、ＡＤＨ酵素の断片を含む。かかる断片は、欠失突然変異によって、当該技術分野で日常的かつ周知である組み換え技術によって、または幾つかの周知のタンパク質分解酵素のいずれかを使用する、目的のＡＤＨ酵素の酵素消化によって、得られてもよい。本発明は更に、上述の改変されたＡＤＨ酵素およびＡＤＨ酵素断片をコードする核酸分子を含む。

【０２５２】
少なくとも、例えば、参照アミノ酸配列と５０％「同一」のアミノ酸配列を有するタンパク質またはタンパク質断片とは、タンパク質のタンパク質配列が、参照タンパク質のアミノ酸配列の各々１００個のアミノ酸当たり最大５０個のアミノ酸変化を含み得ることを除いて、アミノ酸配列が参照配列と同一であることが意図される。換言すると、参照アミノ酸配列に対して、少なくとも５０％同一のアミノ酸配列を有するタンパク質を得るために、参照配列における最大５０％のアミノ酸残基が欠失もしくは別のアミノ酸で置換され得るか、または参照配列における総アミノ酸残基の最大５０％である幾つかのアミノ酸が参照配列中に挿入され得る。参照配列のこれらの変化は、参照アミノ酸配列のアミノ（Ｎ－）および／もしくはカルボキシ（Ｃ－）末端位置において、ならびに／または参照配列中の残基の間で個々におよび／もしくは参照配列内の１つ以上の隣接基のいずれかにおいて散在した、これらの末端位置の間のいずれの位置においても生じ得る。実際に、所与のアミノ酸配列が、例えば、参照タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも５０％同一であるかどうかは、核酸配列同一性決定に関して上述のもの等の既知のコンピュータプログラムを使用して、またはＣＬＵＳＴＡＬ　Ｗプログラムを使用して、従来通りに決定することができる（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，Ｊ．Ｄ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２２：４６７３　４６８０（１９９４））。

【０２５３】
一態様では、アミノ酸置換は、上記の特定位置（すなわち、Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のＹ５０、Ｑ７７、Ｖ１０８、Ｙ１１３、Ｉ２１２、またはＬ２６４と同等のまたはそれらに対応するアミノ酸位置）のうちの１つ以上において行われる。故に、これらの位置におけるアミノ酸は、Ａｌａ、Ａｓｎ、Ａｒｇ、Ａｓｐ、Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｐｒｏ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、およびＶａｌを含む任意の他のアミノ酸で置換されてもよい。イソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する増加された能力を示すＡＤＨ酵素の特定の例は、（１）５０位のチロシンがフェニルアラニンまたはトリプトファン残基と置換されており、（２）７７位のグルタミンアルギニンまたはセリン残基と置換されており、（３）１０８位のバリンがセリンまたはアラニン残基と置換されており、（４）１１３位のチロシンがフェニルアラニンまたはグリシン残基と置換されており、（５）２１２位のイソロイシンがスレオニンまたはバリン残基と置換されており、および／または（６）２６４位のロイシンがバリン残基と置換される、ＡＤＨである。

【０２５４】
本発明において使用するための、イソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する能力を有するポリペプチドは、当業者に周知である、天然タンパク質を単離および精製するための標準的手順によって、それらの天然の原核性または真核性の源から単離されてもよい（例えば、Ｈｏｕｔｓ，Ｇ．Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．２９：５１７（１９７９）を参照されたい）。加えて、イソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する能力を有するポリペプチドは、当業者が精通している組み換えＤＮＡ技術によって調製されてもよい（例えば、Ｋｏｔｅｗｉｃｚ，Ｍ．Ｌ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１６：２６５（１９８８）、Ｓｏｌｔｉｓ，Ｄ．Ａ．，ａｎｄ Ｓｋａｌｋａ，Ａ．Ｍ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：３３７２ ３３７６（１９８８）を参照されたい）。

【０２５５】
本発明の一態様では、改変されたＡＤＨ酵素は、組み換え技術によって作製される。本発明に従って改変されることになるＡＤＨ酵素をコードする遺伝子または他の核酸分子をクローン化するために、ＡＤＨ酵素遺伝子またはオープンリーディングフレームを含有する単離されたＤＮＡを使用して、組み換えＤＮＡライブラリを構築してもよい。当該技術分野で周知の任意のベクターを使用して、目的のＡＤＨ酵素をクローン化することができる。しかしながら、使用されるベクターは、組み換えベクターが形質転換されることになる宿主と適合しなければならない。

【０２５６】
プラスミドライブラリを構築するための原核性ベクターには、例えば、ｐＢＲ３２２、ＣｏｌＥ１、ｐＳＣ１０１、ｐＵＣ－ベクター等の大腸菌において複製可能なもの等のプラスミドが含まれる（ｐＵＣ１８、ｐＵＣ１９等：Ｉｎ：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８２）、およびＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎ：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｄ ｅｄ．）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８９））。バチルス・プラスミドには、ｐＣ１９４、ｐＵＢ１１０、ｐＥ１９４、ｐＣ２２１、ｐＣ２１７等が含まれる。かかるプラスミドは、Ｇｌｙｃｚａｎ，Ｔ．Ｉｎ：Ｔｈｅ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｂａｃｉｌｌｉ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｙｏｒｋ（１９８２），３０７ ３２９によって開示される。好適なストレプトミセスプラスミドには、ｐＩＪ１０１が含まれる（Ｋｅｎｄａｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１６９：４１７７ ４１８３（１９８７））。シュードモナスプラスミドは、Ｊｏｈｎ ｅｔ ａｌ．，（Ｒａｄ．Ｉｎｓｅｃ．Ｄｉｓ．８：６９３ ７０４（１９８６））、およびＩｇａｋｉ，（Ｊｐｎ．Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．３３：７２９ ７４２（１９７８））によって概説される。ｐＣＰ１３等の、広宿主域プラスミドまたはコスミド（Ｄａｒｚｉｎｓ ａｎｄ Ｃｈａｋｒａｂａｒｔｙ，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１５９：９ １８（１９８４））もまた、本発明のために使用することができる。

【０２５７】
目的のＡＤＨ核酸分子をクローン化するために好適な宿主は、原核宿主である。原核宿主の一例は、大腸菌である。しかしながら、本発明の所望のＡＤＨ核酸分子は、エシェリキア属、バチルス・属、ストレプトミセス属、シュードモナス属、サルモネラ属、セラチア属、およびプロテウス属における宿主を含むが、これらに限定されない他の原核宿主中でクローン化されてもよい。

【０２５８】
目的のＡＤＨ酵素のクローニングおよび発現のための真核宿主には、酵母および真菌細胞が含まれる。特に好ましい真核宿主は、酵母である。かかる真核細胞中での所望のＡＤＨ酵素の発現は、真核プロモーターを含む真核調節領域の使用を要求する可能性がある。

真核細胞中でＡＤＨ核酸分子をクローン化し、発現させることは、周知の真核ベクター系を使用する周知の技術によって達成し得る。

【０２５９】

本発明に従って、イソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する酵素の能力を増加させる、または本明細書に記載される他の特性を酵素上に付与するために、本発明に従って、任意の目的のＡＤＨ酵素において１つ以上の突然変異が行われてもよい。かかる突然変異には、点突然変異、フレームシフト突然変異、欠失、および挿入が含まれる。好ましくは、１つ以上のアミノ酸置換をもたらす１つ以上の点突然変異は、イソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する増強された能力を有するＡＤＨ酵素を産生するために使用される。本発明の好ましい態様では、Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）酵素のＹ５０（例えば、Ｙ５０ＷまたはＹ５０Ｆ）、Ｑ７７（例えば、Ｑ７７ＳまたはＱ７７Ｒ）、Ｖ１０８（例えば、Ｖ１０８ＳまたはＶ１０８Ａ）、Ｙ１１３（例えば、Ｙ１１３ＦまたはＹ１１３Ｇ）、Ｉ２１２（例えば、Ｉ２１２ＴまたはＩ２１２Ｖ）、および／またはＬ２６４位（例えば、Ｌ２６４Ｖ）と同等の位置またはそれらに対応する位置における１つ以上の突然変異を行って、目的の他のＡＤＨ酵素において所望の結果をもたらしてもよい。

【０２６０】

本明細書で特定されるＡＤＨ酵素の対応する位置（例えば、配列番号１８５のＬ．ラクチスＡｄｈＡ）は、当業者によって他のＡＤＨ酵素に対して容易に特定され得る。故に、本出願に記載される規定の領域およびアッセイを提供されると、当業者は、任意の目的のＡＤＨ酵素においてイソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する増加された能力をもたらすであろう、１つまたは幾つかの改変を行うことができる。

【０２６１】

好ましい実施形態では、改変されたＡＤＨ酵素は、野生型ＡＤＨ酵素と比較して、Ｙ５０、Ｑ７７、Ｖ１０８、Ｙ１１３、Ｉ２１２、またはＬ２６４に対応する位置から選択される１～６つのアミノ酸置換を有する。他の実施形態では、改変されたＡＤＨ酵素は、それぞれの野生型ＡＤＨ酵素と比較して、他の位置において追加的なアミノ酸置換を有する。故に、改変されたＡＤＨ酵素は、それぞれの野生型ＡＤＨ酵素と比較して、他の位置において少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０個の異なる残基を有し得る。当業者によって理解されるように、アミノ酸置換を有し得るさらなる位置の数は、変異体を生成するために使用される野生型ＡＤＨ酵素に依存するであろう。故に、場合によっては、最大５０個の異なる位置がアミノ酸置換を有し得る。

【０２６２】

種々の微生物は、本明細書に提供される組み換え微生物中での使用に好適なＡＤＨ酵素をコードする遺伝物質に対する「源」として作用することができることが理解される。例えば、加えて、これらの酵素をコードする遺伝子は、他の真菌および細菌種から特定することができ、この経路の調節のために発現させることができる。Ｌ．ラクチスを含むラクトコッカス菌種、Ｌ．ブレビス、Ｌ．ブチェネリ、Ｌ．ヒルガルディイ、Ｌ．ファーメンタム、Ｌ．ロイテリ、Ｌ．バジナリス、Ｌ．アントリ、Ｌ．オリス、およびＬ．コレオホミニスを含むラクトバチルス・菌種、Ｐ．アシディラクティシを含むペディオコッカス菌種、Ｂ．セレウス、Ｂ．チューリンゲンシス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．アンスラシス、Ｂ．ウェイヘンステファネンシス、Ｂ．ミコイデス、およびＢ．アミロリケファシエンスを含むバチルス・菌種、Ｌ．グッドフェロウィイ（ｇｏｏｄｆｅｌｌｏｗｉｉ）、Ｌ．ブッカリス、およびＬ．ホフスタディイ（ｈｏｆｓｔａｄｉｉ）を含むレプトトリキア菌種、Ａ．プルロニューモニアを含むアクチノバチルス・菌種、Ｓ．サングイニス、Ｓ．パラサングイニス、Ｓ．ゴルドニイ、Ｓ．ニューモニエ、およびＳ・ミティスを含むストレプトコッカス菌種、Ｓ．モニリフォルミスを含むストレプトバチルス・菌種、黄色ブドウ球菌を含むスタフィロコッカス菌種、Ｅ．コルロデンスを含むエイケネラ菌種、Ｗ．パラメゼ

ンテロイデスを含むワイセラ菌種、Ｋ．オラリスを含むキンゲラ菌種、およびＲ．デントカリオーサを含むロチア菌種、ならびにエキシグオバクテリウム菌種を含むが、これらに限定されない多様な生物が、これらの酵素に対する源としての機能を果たし得る。

【０２６３】

複数のＡＤＨ酵素に対するヌクレオチド配列が知られている。例えば、ＡＤＨ酵素の配列は、Ｌ．ラクチス（配列番号１８５）、Ｓ．ニューモニエ、黄色ブドウ球菌、およびバチルス・セレウスを含むが、これらに限定されない広範囲の微生物から入手可能である。本発明の方法によって改変可能なＡＤＨ酵素には、譲受人共通および同時係属中の米国特許公開第２０１０／０１４３９９７号に開示されるものが含まれるが、これらに限定されない。本明細書に記載される方法によって改変可能なＡＤＨ酵素の代表的な一覧は、表９７において見出される。

【０２６４】

加えて、任意の方法を使用して、比活性を有するＡＤＨ酵素をコードする遺伝子を特定することができる。一般的に、同様の活性を有する相同のまたは類似した遺伝子は、機能分析、構造分析、および／または遺伝子分析によって特定することができる。ほとんどの場合、同様の活性を有する相同のまたは類似した遺伝子は、機能的、構造的、または遺伝子類似性を有するであろう。当業者に既知の技術が、相同遺伝子および相同酵素を特定するために好適であり得る。一般的に、類似した遺伝子および／または類似した酵素は、機能分析によって特定することができ、機能的類似性を有するであろう。当業者に既知の技術が、類似した遺伝子および類似した酵素を特定するために好適であり得る。例えば、相同のまたは類似した遺伝子、タンパク質、または酵素を特定するために、技術には、遺伝子／酵素の公開された配列に基づくプライマーを使用するＰＣＲによって、または遺伝子の間の保存された領域を増幅するように設計された縮重プライマーを使用する縮重ＰＣＲによって、遺伝子をクローン化することが含まれてもよいが、これらに限定されない。更に、当業者は、機能的相同性または類似性を有する、相同のまたは類似した遺伝子、タンパク質、または酵素を特定する技術を使用することができる。技術には、細胞または細胞培養物を、該活性についての体外酵素アッセイを通じて、酵素の触媒効率または比活性について試験すること、次いで該活性を有する酵素を、精製を通じて単離すること、酵素のタンパク質配列を、エドマン分解、有力な核酸配列に合わせたＰＣＲプライマーの設計、ＰＣＲを通じた該ＤＮＡ配列の増幅、および該核酸配列のクローン化等の技術を通じて決定することが含まれる。同様の活性を有する相同のまたは類似した遺伝子を特定するために、技術にはまた、候補遺伝子または酵素に関するデータの、ＢＲＥＮＤＡ、ＫＥＧＧ、またはＭｅｔａＣＹＣ等のデータベースとの比較が含まれる。候補遺伝子または酵素は、本明細書の教示に従って、上述のデータベース内で特定されてもよい。更に、酵素活性は、表現型的に決定することができる。

増強された触媒効率を有するＡＤＨ酵素を作製する方法

【０２６５】

本発明は更に、それらの触媒効率を増強するために、ＡＤＨ酵素を操作する方法を提供する。

【０２６６】

ＡＤＨ酵素の触媒効率を増加させるための１つの手法は、ＮＮＫライブラリを用いた飽和突然変異誘発による。これらのライブラリは、どの単一の突然変異がイソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する増加された能力に寄与するのかを特定するために、触媒効率の増加についてスクリーニングされてもよい。前述の残基における突然変異の組み合わせは、任意の方法によって調査されてもよい。例えば、突然変異体のコンビナトリアルライブラリは、飽和突然変異誘発研究の結果に基づいて設計されてもよい。

【０２６７】

別の手法は、合成オリゴヌクレオチド上でコードされる無作為突然変異を酵素中に組み込むことによって、無作為オリゴヌクレオチド突然変異誘発を使用して多様性を生成する

ことである。集団内の個々の酵素中の突然変異の数は、オリゴヌクレオチドの合成中に標的配列の長さおよび無作為化の度合いを多様にすることによって、制御され得る。このより規定された手法の利点は、全ての可能性のあるアミノ酸突然変異、および結合された突然変異もまた見出され得るということである。

【０２６８】

上述の実験からの最良の変異体が十分な活性を示さない場合、誤りがちなＰＣＲを介した指向性進化を使用して、更なる改善を得てもよい。ＡＤＨ酵素の誤りがちなＰＣＲ突然変異誘発、続いてＡＤＨ活性についてのスクリーニングが行われてもよい。

増強されたＡＤＨ触媒効率

【０２６９】

一態様では、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、増強される。本明細書で使用されるとき、「触媒効率」という語句は、ＡＤＨ酵素がイソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換することを可能にするＡＤＨ酵素の特性を指す。

【０２７０】

一実施形態では、改変されたＡＤＨの触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して増強される。好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約５％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約１５％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約２５％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約５０％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約７５％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約１００％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約２００％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約５００％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約１０００％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約２０００％増強される。より好ましくは、改変されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約３０００％増強される。最も好ましくは、修飾されたＡＤＨ酵素の触媒効率は、野生型または親ＡＤＨと比較して、少なくとも約３５００％増強される。

改変されたＡＤＨ酵素の遺伝子発現

【０２７１】

有益な代謝物の産生に関与する１つ以上の改変されたＡＤＨ酵素遺伝子の発現ための方法、および本方法において有用な、組み換えＤＮＡ発現ベクターが本明細書に提供される。故に、かかる核酸を含む組み換え発現ベクターが本開示の範囲内に含まれる。発現ベクターという用語は、宿主微生物または無細胞の転写および翻訳系の中に組み込まれ得る核酸を指す。発現ベクターは、細胞質中の複製ベクター等の、微生物中または任意の細胞コンパートメント中で、染色体または他のＤＮＡの一部としてに関わらず、微生物中に永続的にまたは一過性で維持することができる。発現ベクターはまた、典型的には微生物または細胞抽出物中のポリペプチドに翻訳される、ＲＮＡの発現を駆動するプロモーターを含む。ＲＮＡのタンパク質への効率的な翻訳のために、発現ベクターはまた、典型的には、発現対象の遺伝子のコード配列の出発コドンの上流に位置付けられる、リボソーム結合部位配列を含有する。エンハンサー、分泌シグナル配列、転写終結配列、およびベクターを含有する宿主微生物を特定および／または選択することができる１つ以上のマーカー遺伝子等の他の要素もまた、発現ベクター中に存在し得る。選択可能マーカー、すなわち、抗

体抵抗性または感受性を付与する遺伝子が使用され、それは細胞が適切な選択培地中で増殖されるとき、形質転換細胞に、選択可能な表現型を付与する。

【０２７２】

発現ベクターの種々の構成成分は、ベクターの意図される使用、およびベクターが発現を複製または駆動することが意図される宿主細胞に依存して幅広く異なり得る。大腸菌、酵母、ストレプトミセス、および他の一般に使用される細胞中での遺伝子の発現およびベクターの維持に好適な発現ベクター構成成分は、幅広く知られており、市販されている。例えば、本開示の発現ベクター中への組み込みに好適なプロモーターには、真核または原核宿主微生物中で機能するものが含まれる。プロモーターは、宿主微生物の増殖に関して発現の調節を可能にする、または化学的または物理的刺激に反応してオンもしくはオフにされる遺伝子の発現を引き起こす、調節配列を含み得る。大腸菌およびある種の他の細菌宿主細胞については、生合成酵素、抗生物質抵抗性付与酵素、およびファージタンパク質のための遺伝子に由来するプロモーターを使用することができ、例えば、ガラクトース、ラクトース（ｌａｃ）、マルトース、トリプトファン（ｔｒｐ）、ベーターラクタマーゼ（ｂｌａ）、バクテリオファージラムダＰＬ、およびＴ５プロモーターが含まれる。加えて、ｔａｃプロモーター（米国特許第４，５５１，４３３号）等の合成プロモーターもまた使用することができる。大腸菌発現ベクターについては、ｐＵＣ、ｐ１Ｐ、ｐ１、およびｐＢＲからのもの等の大腸菌複製起点を含むことが有用である。

【０２７３】

故に、組み換え発現ベクターは、少なくとも１つの発現系を含有し、次にこの発現系は、プロモーターに作動可能に連結された生合成遺伝子コード配列の少なくとも一部分、および任意に、適合性の宿主細胞中でコード配列の発現を達成するように作動する終結配列から構成される。宿主細胞は、染色体外要素としての発現系配列、または染色体中に組み込まれた発現系配列のいずれかを含有するために、本開示の組み換えＤＮＡ発現ベクターでの形質転換によって改変される。

【０２７４】

更に、特定の微生物（すなわち、酵母微生物）に特異的な核酸分子からポリペプチドを発現させるための方法が周知である。例えば、クルイベロミセスおよびサッカロミセス内での異種ポリペプチドの発現のために使用される核酸構築物が周知である（クルイベロミセスについては、例えば、米国特許第４，８５９，５９６号および第４，９４３，５２９号を参照されたく、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれ、サッカロミセスについては、例えば、Ｇｅｌｌｉｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ １９０（１）：８７－９７（１９９７）を参照されたい。酵母プラスミドは、自律複製配列（ＡＲＳ）としても知られる選択可能マーカーおよび複製起点を有する。加えてある種のプラスミドはまた、セントロメア配列も含有し得る。これらのセントロメアプラスミドは、一般的に単一または低コピープラスミドである。セントロメア配列を有さず、２ミクロン（Ｓ．セレビシエ）または１．６ミクロン（Ｋ．ラクチス）のいずれかの複製起点を利用するプラスミドは、高コピープラスミドである。選択可能マーカーは、ＨＩＳ３、ＴＲＰ１、ＬＥＵ２、ＵＲＡ３、もしくはＡＤＥ２等の原栄養性、またはｂａｒ、ｂｌｅ、ｈｐｈ、もしくはｋａｎ等の抗体抵抗性のいずれかであり得る。

【０２７５】

本開示の核酸は、テンプレートとして、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ合成ＤＮＡ、または代替としてゲノムＤＮＡ、ならびに標準的なＰＣＲ増幅技術および下記の実施例の節に記載される手順による適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、増幅することができる。そのようにして増幅された核酸を、適切なベクター中にクローン化し、ＤＮＡ配列分析によって特徴付けることができる。更に、ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、例えば、自動ＤＮＡ合成装置を使用する、標準的な合成技術によって調製することができる。

【０２７６】

本明細書に記載される酵素と相同なポリペプチドをコードする単離された核酸分子は、

１つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失をコードされたタンパク質中に導入するように、１つ以上のヌクレオチド置換、付加、または欠失を、特定のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に導入することによって作り出すことができることもまた理解される。突然変異は、部位指向性突然変異誘発およびＰＣＲ媒介型突然変異誘発等の標準的な技術によって、ポリヌクレオチド中に導入することができる。非保存的アミノ酸置換（上記を参照されたい）を行うことが望ましい可能性がある位置とは対照的に、幾つかの位置においては、保存的アミノ酸置換を行うことが好ましい。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基と置換される置換である。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野で規定されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベーター分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。

【０２７７】

アミノ酸変更の効果は、リン酸化、グリコシル化、鎖内結合、三次構造、および活性部位または可能性のあるアロステリック部位におけるアミノ酸の役割等の要因に依存して異なるが、一般的に、置換されたアミノ酸が、置換されているアミノ酸と同じ基からのものであることが好ましい。ある程度、次の基は、互換性のあるアミノ酸を含有する：塩基性アミノ酸リジン、アルギニン、およびヒスチジン、酸性アミノ酸アスパラギン酸およびグルタミン酸、中性極性アミノ酸セリン、スレオニン、システイン、グルタミン、アスパラギン、およびより少ない程度にメチオニン、非極性脂肪族アミノ酸グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、およびロイシン（しかしながら、サイズのため、グリシンおよびアラニンがより密接に関連し、バリン、イソロイシン、およびロイシンがより密接に関連する）、ならびに芳香族アミノ酸フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシン。加えて、異なるカテゴリーに分類されるが、アラニン、グリシン、およびセリンは、ある程度互換性があると考えられ、システインは、追加的にこの基に適合するか、または極性中性アミノ酸により分類され得る。

方法の概要

３－ケト酸レダクターゼ相同体の特定

【０２７８】

任意の方法を使用して、Ｓ．セレビシエＴＭＡ２９を含むが、これらに限定されない、３－ケト酸レダクターゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子を特定することができる。一般的に、ＴＭＡ２９等の３－ケト酸レダクターゼと相同または同様の遺伝子は、機能分析、構造分析、および／または遺伝子分析によって特定することができる。ほとんどの場合、相同もしくは同様の遺伝子および／または相同もしくは同様の酵素は、機能的、構造的、または遺伝子類似性を有するであろう。

【０２７９】

Ｓ．セレビシエ遺伝子ＴＭＡ２９はまた、ＹＭＲ２２６Ｃとしても知られている。オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）ＹＭＲ２２６Ｃは、Ｓ．セレビシエ染色体ＸＩＩＩ上の７２２３９５…７２１５９２位において見出される。ＹＭＲ２２６Ｃの染色体の場所は、多くの関連する酵母中の染色体に対して高度にシンテニックな領域である［Ｂｙｒｎｅ，Ｋ．Ｐ．ａｎｄ Ｋ．Ｈ．Ｗｏｌｆｅ（２００５）“Ｔｈｅ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅ Ｏｒｄｅｒ Ｂｒｏｗｓｅｒ：ｃｏｍｂｉｎｉｎｇ ｃｕｒａｔｅｄ ｈｏｍｏｌｏｇｙ ａｎｄ ｓｙｎｔｅｎｉｃ ｃｏｎｔｅｘｔ ｒｅｖｅａｌｓ ｇｅｎｅ ｆａｔｅ ｉｎ ｐｏｌｙｐｌｏｉｄ ｓｐｅｃｉｅｓ．”Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．１５（１０）：１４５６－６１。Ｓｃａｎｎｅｌｌ，Ｄ．Ｒ．，Ｋ．Ｐ．Ｂｙｒｎｅ，Ｊ．Ｌ．Ｇｏｒ

don, S. Wong, and K. H. Wolfe（2006）“Multiple rounds of speciation associated with reciprocal gene loss in polyploidy yeasts.”Nature 440：341－5。Scannell, D. R., A. C. Frank, G. C. Conant, K. P. Byrne, M. Woolfit, and K. H. Wolfe（2007）”Independent sorting－out of thousands of duplicated gene pairs in two yeast species descended from a whole－genome duplication.”Proc Natl Acad Sci U S A 104：8397－402］。

【0280】

例えば、他の酵母種からのＹＭＲ２２６Ｃのシンテニックバージョンの場所は、カンジダ・グラブラタにおける染色体１３、ジゴサッカロミセス・ロウキシイにおける染色体１、Ｋ．ラクチスにおける染色体２、アシビア・ゴシピイにおける染色体６、Ｓ．クルイベリにおける染色体８、Ｋ．サーモトレランス（ｔｈｅｒｍｏｔｏｌｅｒａｎｃｅ）における染色体４、および推定祖先酵母種からの染色体８上で見出すことができる［Ｇｏｒｄｏｎ，Ｊ．Ｌ．，Ｋ．Ｐ．Ｂｙｒｎｅ，ａｎｄ Ｋ．Ｈ．Ｗｏｌｆｅ（２００９）“Ａｄｄｉｔｉｏｎｓ，ｌｏｓｓｅｓ，ａｎｄ ｒｅａｒｒａｎｇｅｍｅｎｔｓ ｏｎ ｔｈｅ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎａｒｙ ｒｏｕｔｅ ｆｒｏｍ ａ ｒｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔｅｄ ａｎｃｅｓｔｏｒ ｔｏ ｔｈｅ ｍｏｄｅｒｎ Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ ｇｅｎｏｍｅ．”ＰＬｏＳ Ｇｅｎｅｔ．５：ｅ１０００４８５］。

【0281】

このシンテニック関係を使用して、この遺伝子の種に特有のバージョンが容易に特定され、例は表４に見出すことができる。

【表４】

ＹＭＲ２２６Ｃおよびその相同体。

種	遺伝子名	配列番号
S.セレビシエ	YMR226C	1
K.ポリスポラ	Kpol_1043p53	2
S.カステリイ	Scas_594.12d	3
C.グラブラタ	CAGL0M11242g	4
S.バヤヌス	Sbay_651.2	5
Z.ロウキシイ	ZYRO0A05742p	6
K.ラクチス	KLLA0B08371g	7
A.ゴシピイ	AFR561Wp	8
S.クルイベリ	SAKL0H04730g	9
K.サーモトレランス	KLTH0D13002p	10
K.ワルチイ	Kwal_26.9160	11

【0282】

シンテニーに加えて、Ｓ．セレビシエＴＭＡ２９遺伝子に対する真菌相同体が、ＢＬＡＳＴおよび配列アライメント等のツールを通じて、当業者によって特定され得る。これら

の他の相同体は、３－ヒドロキシ酸副産物の蓄積を排除するために、同様の様態でそれぞれの酵母種から欠失されてもよい。相同タンパク質の例は、バンデルワルトムジマ（Ｖａｎｄｅｒｗａｌｔｏｍｚｙｍａ）・ポリスポラ（配列番号２）、サッカロミセス・カステリイ（配列番号３）、カンジダ・グラブラタ（配列番号４）、サッカロミセス・バヤヌス（配列番号５）、ジゴサッカロミセス・ロウキシイ（配列番号６）、Ｋ．ラクチス（配列番号７）、アシビア・ゴシピイ（配列番号８）、サッカロミセス・クルイベリ（配列番号９）、クルイベロミセス・サーモトレランス（配列番号１０）、クルイベロミセス・ワルチイ（配列番号１１）、ピキア・スチピチス（配列番号１２）、デバロミセス・ハンセニイ（配列番号１３）、ピキア・パストリス（配列番号１４）、カンジダ・デュブリニエンシス（配列番号１５）、カンジダ・アルビカンス（配列番号１６）、ヤロウィア・リポリチカ（配列番号１７）、イッサチェンキア・オリエンタリス（配列番号１８）、アスペルギルス・ニデュランス（配列番号１９）、アスペルギルス・ニガー（配列番号２０）、ニューロスポラ・クラッサ（配列番号２１）、シゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号２２）、およびクルイベロミセス・マルシアヌス（配列番号２３）に見出すことができる。

【０２８３】

当業者に既知の技術が、追加的な相同遺伝子および相同酵素を特定するために好適であり得る。一般的に、類似した遺伝子および／または類似した酵素は、機能分析によって特定することができ、機能的類似性を有するであろう。当業者に既知の技術は、類似した遺伝子および類似した酵素を特定するために好適であり得る。例えば、相同のまたは類似した遺伝子、タンパク質、または酵素を特定するために、技術には、遺伝子／酵素の公開された配列に基づくプライマーを使用するＰＣＲによって、またはデヒドラターゼ遺伝子の間の保存された領域を増幅するように設計された縮重プライマーを使用する縮重ＰＣＲによって、デヒドラターゼ遺伝子をクローン化することが含まれてもよいが、これらに限定されない。更に、当業者は、機能的相同性または類似性を有する、相同のまたは類似した遺伝子、タンパク質、または酵素を特定するために、技術を使用することができる。技術には、細胞または細胞培養物を、該活性についての体外酵素アッセイを通じて、酵素の触媒活性について試験すること（例えば、本明細書に、またはＫｉｒｉｔａｎｉ，Ｋ．Ｂｒａｎｃｈｅｄ－Ｃｈａｉｎ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１９７０に記載されるように）、次いで該活性を有する酵素を、精製を通じて単離すること、酵素のタンパク質配列を、エドマン分解、有力な核酸配列に合わせたＰＣＲプライマーの設計、ＰＣＲを通じた該ＤＮＡ配列の増幅、および該核酸配列のクローン化等の技術を通じて決定することが含まれる。相同もしくは同様の遺伝子および／または相同もしくは同様の酵素、類似した遺伝子および／または類似した酵素もしくはタンパク質を特定するために、技術にはまた、候補遺伝子または酵素に関するデータの、ＢＲＥＮＤＡ、ＫＥＧＧ、またはＭｅｔａＣＹＣ等のデータベースとの比較が含まれる。補遺伝子または酵素は、本明細書の教示に従って、上述のデータベース内で特定されてもよい。

アルデヒドデヒドロゲナーゼ相同体の特定

【０２８４】

任意の方法を使用して、Ｓ．セレビシエＡＬＤ６を含むが、これらに限定されない、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子を特定することができる。一般的に、ＡＬＤ６等のアルデヒドデヒドロゲナーゼと相同または同様の遺伝子は、機能分析、構造分析、および／または遺伝子分析によって特定することができる。ほとんどの場合、相同もしくは同様の遺伝子および／または相同もしくは同様の酵素は、機能的、構造的、または遺伝子類似性を有するであろう。

【０２８５】

Ｓ．セレビシエ遺伝子ＡＬＤ６はまた、その系統名ＹＰＬ０６１Ｗによっても知られている。オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）ＹＰＬ０６１Ｗは、Ｓ．セレビシエ染色体ＸＶＩ上の４３２５８５…４３４０８７位において見出される。ＹＰＬ０６１Ｗの染色体の場所は、多くの関連する酵母中の染色体に対して高度にシンテニックな領域である［

Byrne, K. P. and K. H. Wolfe（２００５）“The Yeast Gene Order Browser：combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species.”Genome Res. １５：１４５６－６１。Scannell, D. R., K. P. Byrne, J. L. Gordon, S. Wong, and K. H. Wolfe（２００６）“Multiple rounds of speciation associated with reciprocal gene loss in polyploidy yeasts.”Nature ４４０：３４１－５。Scannell, D. R., A. C. Frank, G. C. Conant, K. P. Byrne, M. Woolfit, and K. H. Wolfe（２００７）”Independent sorting－out of thousands of duplicated gene pairs in two yeast species descended from a whole－genome duplication.”Proc Natl Acad Sci U S A １０４：８３９７－４０２］。

【０２８６】

例えば、他の酵母種からのＹＰＬ０６１Ｗのシンテニックバージョンの場所は、カンジダ・グラブラタにおける染色体８、Ｋ．ラクチスにおける染色体５、Ｋ．サーモトレランスにおける染色体５、および推定祖先酵母種からの染色体８上で見出すことができる［Gordon, J. L., K. P. Byrne, and K. H. Wolfe（２００９）“Additions, losses, and rearrangements on the evolutionary route from a reconstructed ancestor to the modern Saccharomyces cerevisiae genome.”PLoS Genet. ５：e１０００４８５］。

【０２８７】

このシンテニック関係を使用して、この遺伝子の種に特有のバージョンが容易に特定され、例は表５に見出すことができる。

【表５】

ＡＬＤ６およびその相同体。

種	遺伝子名	配列番号
S.セレビシエ	YPL061W	25
S.カステリイ	Scas_664.24	26
C.グラブラタ	CAGL0H05137g	27
S.バヤヌス	Sbay_623.4	28
K.ラクチス	KLLA0E23057	29
K.サーモトレランス	KLTH0E12210g	30
K.ワルチイ	Kwal_27.119760	31

【０２８８】

シンテニーに加えて、Ｓ．セレビシエＡＬＤ６遺伝子に対する真菌相同体が、ＢＬＡＳＴおよび配列アライメント等のツールを通じて、当業者によって特定され得る。これらの他の相同体は、アルデヒド副産物の蓄積を排除するために、同様の様態でそれぞれの酵母種から欠失されてもよい。相同タンパク質の例は、サッカロミセス・カステリイ（配列番号２６）、カンジダ・グラブラタ（配列番号２７）、サッカロミセス・バヤヌス（配列番

号２８）、クルイベロミセス・ラクチス（配列番号２９）、クルイベロミセス・サーモトレランス（配列番号３０）、クルイベロミセス・ワルチイ（配列番号３１）、サッカロミセス・セレビシエＹＪ７８９（配列番号３２）、サッカロミセス・セレビシエＪＡＹ２９１（配列番号３３）、サッカロミセス・セレビシエＥＣ１１１８（配列番号３４）、サッカロミセス・セレビシエＤＢＹ９３９（配列番号３５）、サッカロミセス・セレビシエＡＷＲＩ１６３１（配列番号３６）、サッカロミセス・セレビシエＲＭ１１－１ａ（配列番号３７）、ピキア・パストリス（配列番号３８）、クルイベロミセス・マルシアヌス（配列番号３９）、シゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号４０）、およびシゾサッカロミセス・ポンベ（配列番号４１）に見出すことができる。

微生物中のＡＤＨまたはＫＤＨの特定

【０２８９】

任意の方法を使用して、アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）またはケト酸デヒドロゲナーゼ（ＫＤＨ）活性を有する酵素をコードする遺伝子を特定することができる。アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）は、イソブタノールの、イソブチルアルデヒドへの可逆変換を触媒することができる。ケト酸デヒドロゲナーゼ（ＫＤＨ）は、２－ケトイソ吉草酸塩の、イソブチリル－ＣｏＡの変換を触媒することができ、それはトランスアセチラーゼおよびカルボン酸キナーゼ酵素の作用によって更にイソ酪酸塩に変換することができる。一般的に、既知のアルコールデヒドロゲナーゼおよびケト酸デヒドロゲナーゼと相同または同様である遺伝子は、機能分析、構造分析、および／または遺伝子分析によって特定することができる。ほとんどの場合、相同もしくは同様のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子および／または相同もしくは同様のアルコールデヒドロゲナーゼ酵素は、機能的、構造的、または遺伝子類似性を有するであろう。同様に、相同もしくは同様のケト酸デヒドロゲナーゼ遺伝子および／または相同もしくは同様のケト酸デヒドロゲナーゼ酵素は、機能的、構造的、または遺伝子類似性を有するであろう。

酵母微生物中のＰＤＣおよびＧＰＤの特定

【０２９０】

任意の方法を使用して、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ＰＤＣ）活性またはグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）活性を有する酵素をコードする遺伝子を特定することができる。ＰＤＣおよびＧＰＤの特定に好適な方法は、譲受人共通および同時係属中の刊行物、米国特許第２００９／０２２６９９１号および米国特許第２０１１／００２０８８９号に記載され、それらの両方は参照によりそれらの全体が全目的で本明細書に組み込まれる。

遺伝子挿入および欠失

【０２９１】

任意の方法を使用して、核酸分子を、酵母中に導入することができ、多くのかかる方法が周知である。例えば、形質転換およびエレクトロポレーションは、核酸を酵母細胞中に導入するための一般的な方法である。例えば、Ｇｉｅｔｚ ｅｔ ａｌ．，１９９２，Ｎｕｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２７：６９－７４、Ｉｔｏ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１５３：１６３－８、およびＢｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １９４：１８２－７を参照されたい。

【０２９２】

一実施形態では、目的の遺伝子、酵母微生物のＤＮＡ断片または標的遺伝子中への組み込みは、相同組み換えの原則によって生じる。この実施形態によると、少なくとも１つの酵母マーカー遺伝子および／または組み込み対象の遺伝子（内部モジュール）を含むモジュールを含有する組み込みカセットの両側上には、標的化組み込み部位（組み換え誘導配列）の末端のそれらと相同なＤＮＡ断片が隣接する。適切な方法によってカセットで酵母

を形質転換した後、組み換え誘導配列の間の相同組み換えは、組み込みカセットの組み換え誘導配列に対応するゲノムの２つの部位の間における染色体領域を置き換える、内部モジュールをもたらし得る。（Ｏｒｒ－Ｗｅａｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９８１，ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　７８：６３５４－５８）。

【０２９３】

一実施形態では、目的の遺伝子の、酵母微生物中への組み込みのための組み込みカセットには、異種遺伝子の、酵母染色体中への組み込みのための組み換え誘導配列が隣接する選択可能マーカーと一緒に、適切なプロモーターおよびターミネーターの制御下での異種遺伝子が含まれる。一実施形態では、異種遺伝子には、天然の遺伝子のコピー数を増加させることが所望される適切な天然の遺伝子が含まれる。選択可能マーカー遺伝子は、ＨＩＳ３、ＴＲＰ１、ＬＥＵ２、ＵＲＡ３、ｂａｒ、ｂｌｅ、ｈｐｈ、およびｋａｎを含むが、これらに限定されない、酵母中で使用される任意のマーカー遺伝子であり得る。組み換え誘導配列は、所望の適用に好適な所望の組み込み部位に依存して、随意に選択することができる。

【０２９４】

別の実施形態では、遺伝子の、酵母微生物の染色体中への組み込みは、無作為組み込みを介して生じ得る（Ｋｏｏｉｓｔｒａ　ｅｔ　ａｌ．，２００４，Ｙｅａｓｔ　２１：７８１－７９２）。

【０２９５】

さらに、一実施形態では、ある種の導入されたマーカー遺伝子は、当業者に周知の技術を使用してゲノムから除去される。例えば、ＵＲＡ３　マーカー損失は、ＦＯＡ（５－フルオロ－オロチン酸）含有培地中にＵＲＡ３含有細胞をプレートし、ＦＯＡ抵抗性コロニーについて選択することによって得ることができる（Ｂｏｅｋｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９８４，Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ　１９７：３４５－４７）。

【０２９６】

本開示の酵母細胞内に含有される外来性核酸分子は、任意の形態で細胞内で維持することができる。例えば、外来性核酸分子は、細胞のゲノム中に組み込むか、または娘細胞に安定に伝えられ得る（「受け継がれる」）エピソーム状態で維持することができる。かかる染色体外遺伝子要素（プラスミド、ミトコンドリアゲノム等）は、追加的に、娘細胞中のかかる遺伝子要素の存在を確実にする選択マーカーを含有することができる。更に、酵母細胞は、安定にまたは一過性で形質転換することができる。加えて、本明細書に記載される酵母細胞は、上述の特定の外来性核酸分子の単一のコピー、または複数のコピーを含有することができる。

酵素活性の低減

【０２９７】

本発明の範囲内の酵母微生物は、低減された３－ケト酸レダクターゼ、ＰＤＣ、ＡＬＤＨ、またはグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）活性等の、低減された酵素活性を有し得る。「低減された」という用語は、本明細書で特定の酵素活性に関して使用されるとき、同じ種の同等の酵母細胞において測定されるものより、より低いレベルの酵素活性を指す。低減されたという用語はまた、同じ種の同等の酵母細胞と比較した、酵素活性の排除を指す。故に、３－ケト酸レダクターゼ、ＰＤＣ、ＡＬＤＨ、またはグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）活性を欠く酵母細胞は、全てではないにしても、もほとんどの同等の酵母株が、少なくとも幾らかの３－ケト酸レダクターゼ、ＰＤＣ、ＡＬＤＨ、またはグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）活性を有するため、低減された３－ケト酸レダクターゼ、ＰＤＣ、ＡＬＤＨ、またはグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）活性を有すると考えられる。かかる低減された酵素活性は、より低い酵素濃度、酵素のより低い比活性度、またはそれらの組み合わせの結果であり得る。多くの異なる方法を使用して、低減された酵素活性を有する酵母を作製することができる。例えば、酵母細胞は、一般的な突然変異誘発またはノックアウト技

術を使用して、撹乱された酵素をコードする遺伝子座を有するように操作することができる。例えば、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（１９９７ ｅｄｉｔｉｏｎ），Ａｄａｍｓ，Ｇｏｔｔｓｃｈｌｉｎｇ，Ｋａｉｓｅｒ，ａｎｄ Ｓｔｅｍｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ（１９９８）を参照されたい。加えて、低減された活性を有する酵素をもたらす、ある種の点突然変異を導入することができる。また、自然界で見出されるとき、３－ケト酸レダクターゼ、ＰＤＣ、ＡＬＤＨ、またはグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）活性から選択される１つ以上の活性が実質的にない酵母株も本発明の範囲内に含まれる。

【０２９８】

代替的には、アンチセンス技術を使用して、酵素活性を低減することができる。例えば、酵母は、酵素が生成されるのを防止するアンチセンス分子をコードするｃＤＮＡを含有するように操作することができる。本明細書で使用される「アンチセンス分子」という用語は、内在性ポリペプチドのコード鎖に対応する配列を含有する、任意の核酸分子を包含する。アンチセンス分子はまた、隣接配列（例えば、調節配列）を有することができる。故に、アンチセンス分子は、リボザイムまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。リボザイムは、分子がＲＮＡを開裂することを条件として、制限なしに、ヘアピン、ハンマーヘッド、またはアクスヘッド（ａｘｈｅａｄ）構造を含む任意の一般構造を有することができる。

【０２９９】

低減された酵素活性を有する酵母は、多くの方法を使用して特定することができる。例えば、低減された３－ケト酸レダクターゼ、ＰＤＣ、ＡＬＤＨ、またはグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）活性を有する酵母は、一般的な方法を使用して簡便に特定することができ、それには例えば、液体クロマトグラフィーを介してグリセロール形成を測定することが含まれ得る。

異種遺伝子の過剰発現

【０３００】

天然または異種核酸分子からポリペプチドを過剰発現させるための方法が周知である。かかる方法には、制限なしに、調節要素が、所望のポリペプチドをコードする核酸配列の発現を促進するように、核酸配列を構築することが含まれる。典型的には、調節要素は、ＤＮＡ配列の発現を転写のレベルで調節するＤＮＡ配列である。故に、調節要素には、制限なしに、プロモーター、エンハンサー等が含まれる。例えば、外来性遺伝子は、誘導可能なプロモーターまたは構成的プロモーターの制御下にあり得る。更に、酵母中の外来性核酸分子からポリペプチド発現させるための方法が周知である。例えば、クルイベロミセスおよびサッカロミセス内での外来性ポリペプチドの発現のために使用される核酸構築物が周知である（クルイベロミセスについては、例えば、米国特許第４，８５９，５９６号および第４，９４３，５２９号を参照されたく、サッカロミセスについては、例えば、Ｇｅｌｌｉｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ １９０（１）：８７－９７（１９９７）を参照されたい）。酵母プラスミドは、選択可能マーカーおよび複製起点を有する。加えてある種のプラスミドはまた、セントロメア配列も含有し得る。これらのセントロメアプラスミドは、一般的に単一または低コピープラスミドである。セントロメア配列を有さず、２ミクロン（Ｓ．セレビシエ）または１．６ミクロン（Ｋ．ラクチス）のいずれかの複製起点を利用するプラスミドは、高コピープラスミドである。選択可能マーカーは、ＨＩＳ３、ＴＲＰ１、ＬＥＵ２、ＵＲＡ３、もしくはＡＤＥ２等の原栄養性、またはｂａｒ、ｂｌｅ、ｈｐｈ、もしくはｋａｎ等の抗体抵抗性のいずれかであり得る。

【０３０１】

別の実施形態では、異種制御要素を使用して、内在性遺伝子の発現を活性化または抑制することができる。加えて、発現が抑制または排除されるべきであるとき、関連する酵素、タンパク質、またはＲＮＡに対する遺伝子は、既知の欠失技術によって排除することができる。

【０３０２】
本明細書に記載されるように、本開示の範囲内の任意の酵母が、発現されている、過剰発現されている、または抑制されている特定の酵素に特異的な選択技術によって、特定することができる。所望の表現型を有する株を特定する方法は、当業者に周知である。かかる方法には、制限なしに、ＰＣＲ、ＲＴ－ＰＣＲ、ならびにノーザンおよびサザン分析等の核酸ハイブリダイゼーション技術、特定の基質上でもしくは特定の基質、化学化合物、選択剤等の存在下で変化させられた増殖能力が含まれる。場合によっては、免疫組織化学および生化学技術を使用して、コードされたポリペプチドの発現を検出することによって、細胞が特定の核酸を含有するかどうかを決定することができる。例えば、コードされた酵素に対する特異性を有する抗体を使用して、特定の酵母細胞がそのコードされた酵素を含有するか否かを決定することができる。更に、生化学的技術を使用して、酵素ポリペプチドの発現の結果として産生される産物を検出することによって、細胞が酵素ポリペプチドをコードする特定の核酸分子を含有するかどうかを決定することができる。例えば、アセト乳酸シンターゼをコードするベクターで細胞を形質転換し、ベクターを有さない細胞と比較して増加されたアセト乳酸濃度を検出することは、ベクターが存在し、かつ遺伝子産物が活性であることを示す。特異的酵素活性または特定の産物の存在を検出するための方法は、当業者に周知である。例えば、アセト乳酸の存在は、Ｈｕｇｅｎｈｏｌｔｚ ａｎｄ Ｓｔａｒｒｅｎｂｕｒｇ，１９９２，Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏ．Ｂｉｏｔ．３８：１７－２２に記載されるように決定することができる。

酵素活性の増加

【０３０３】
本発明の酵母微生物は、酵素の増加された活性を有するように更に操作されてもよい（例えば、イソブタノール産生代謝経路に関与する酵素の増加された活性）。「増加された」という用語は、特定の酵素活性に関して本明細書で使用されるとき、同じ種の同等の酵母細胞において測定されるものよりも、より高い酵素活性レベルを指す。例えば、特異的酵素の過剰発現は、その酵素に対する細胞中の増加された活性レベルをもたらし得る。解糖またはイソブタノール経路に関与する酵素に対する増加された活性は、増加されたイソブタノールの生産性および収率をもたらすであろう。

【０３０４】
酵素活性を増加させる方法は、当業者に既知である。かかる技術には、増加されたコピー数および／もしくは強力なプロモーターの使用によって酵素の発現を増加させること、酵素の負の調節を軽減するための突然変異の導入、特定の活性を増加させるかつ／もしくは基質に対するＫｍを減少させるための特定の突然変異の導入、または指向性進化によるものが含まれてもよい。例えば、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（ｖｏｌ．２３１），ｅｄ．Ａｒｎｏｌｄ ａｎｄ Ｇｅｏｒｇｉｏｕ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２００３）を参照されたい。

高収率発酵のために組み換え微生物を使用する方法

【０３０５】
生体触媒が有益な代謝物を最も経済的に産生するために、該代謝物を高収率で産生することが望ましい。余分の産物（すなわち、副産物）は、特に余分な産物がほとんどまたは全く価値を有さない場合、所望の代謝物の収率の低減、ならびに資本費用および稼働費用の増加をもたらすため、好ましくは、産生される唯一の産物が所望の代謝物である。これらの余分な産物はまた、これらの産物を所望の代謝物から分離するために、追加的な資本費用および稼働費用も要する。

【０３０６】
一態様では、本発明は、生合成経路を含む組み換え微生物に由来する有益な代謝物を産生する方法を提供する。

【０３０７】

一実施形態では、本方法は、回収可能な量の有益な代謝物が産生されるまで、中間体として３－ケト酸を使用する生合成経路を含む組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養すること、および任意に、代謝物を回収することを含む。一実施形態では、３－ケト酸中間体は、アセト乳酸である。例示的な実施形態では、該組み換え微生物は、アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。有益な代謝物は、、イソブタノール、２－ブタノール、１－ブタノール、２－ブタノン、２，３－ブタンジオール、アセトイン、ジアセチル、バリン、ロイシン、パントテン酸、イソブチレン、３－メチル－１－ブタノール、４－メチル－１－ペンタノール、および補酵素Ａの産生のための生合成経路を含むが、これらに限定されない、中間体としてアセト乳酸を使用する任意の生合成経路に由来してもよい。特定の実施形態では、有益な代謝物は、イソブタノールである。別の実施形態では、３－ケト酸中間体は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩である。例示的な実施形態では、該組み換え微生物は、２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシ酪酸塩への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。有益な代謝物は、２－メチル－１－ブタノール、イソロイシン、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールの産生のための生合成経路を含むが、これらに限定されない、中間体として２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩を使用する任意の生合成経路に由来してもよい。

【０３０８】

別の実施形態では、本方法は、回収可能な量の有益な代謝物が産生されるまで、中間体としてアルデヒドを使用する生合成経路を含む組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養すること、および任意に、代謝物を回収することを含む。例示的な実施形態では、該組み換え微生物は、アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。有益な代謝物は、イソブタノール、１－ブタノール、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ブタノール、１－プロパノール、１－ペンタノール、１－ヘキサノール、３－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ペンタノール、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールの産生のための生合成経路を含むが、これらに限定されない、中間体としてアルデヒドを使用する任意の生合成経路に由来してもよい。特定の実施形態では、有益な代謝物は、イソブタノールである。

【０３０９】

別の実施形態では、本方法は、回収可能な量の有益な代謝物が産生されるまで、中間体としてアセト乳酸およびアルデヒドを使用する生合成経路を含む組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養すること、および任意に、代謝物を回収することを含む。例示的な実施形態では、該組み換え微生物は、（ｉ）アセト乳酸のＤＨ２ＭＢへの変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除する、かつ（ｉｉ）アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。有益な代謝物は、イソブタノール、１－ブタノール、および３－メチル－１－ブタノールの産生のための生合成経路を含むが、これらに限定されない、中間体としてアセト乳酸およびアルデヒドを使用する任意の生合成経路に由来してもよい。特定の実施形態では、有益な代謝物は、イソブタノールである。

【０３１０】

別の実施形態では、本方法は、回収可能な量の有益な代謝物が産生されるまで、中間体として２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩およびアルデヒドを使用する生合成経路を含む組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養すること、および任意に、代謝物を回収することを含む。例示的な実施形態では、該組み換え微生物は、（ｉ）２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩の２－エチル－２，３－ジヒドロキシ酪酸塩への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除する、かつ（ｉｉ）アルデヒドの酸副産物への変換を触媒する酵素の発現または活性を低減または排除するように操作される。有益な代謝物は、２－メチル－１－ブタノール、３－メチル－１－ペンタノール

、４－メチル－１－ヘキサノール、および５－メチル－１－ヘプタノールの産生のための生合成経路を含むが、これらに限定されない、中間体として２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩およびアルデヒドを使用する任意の生合成経路に由来してもよい。

【０３１１】

別の実施形態では、本発明は、アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）を必要とする生合成経路に由来する有益な代謝物を産生する方法を提供する。一実施形態では、本方法は、回収可能な量の有益な代謝物が産生されるまで、本明細書に記載される改変されたＡＤＨを含む組み換え微生物を、炭素源を提供する供給原料を含有する培養培地中で培養すること、および任意に、代謝物を回収することを含む。有益な代謝物は、１－プロパノール、２－プロパノール、１－ブタノール、２－ブタノール、１－ペンタノール、２－メチル－１－ブタノール、および３－メチル－１－ブタノールの産生のための生合成経路を含むが、これらに限定されない、ＡＤＨを必要とする任意の生合成経路に由来してもよい。特定の実施形態では、有益な代謝物は、イソブタノールである。

【０３１２】

炭素源から有益な代謝物を産生するための方法において、酵母微生物は、炭素源を含有する適切な培養培地中で培養される。ある実施形態では、本方法は更に、培養培地から有益な代謝物を単離することを含む。例えば、イソブタノールは、蒸留、浸透気化、または液液抽出等の、当業者に既知の任意の方法によって培養培地から単離されてもよい。

【０３１３】

一実施形態では、組み換え微生物は、少なくとも５パーセント理論収率の収率で、炭素源から有益な代謝物を産生し得る。別の実施形態では、微生物は、少なくとも約１０パーセント、少なくとも約１５パーセント、約少なくとも約２０パーセント、少なくとも約２５パーセント、少なくとも約３０パーセント、少なくとも約３５パーセント、少なくとも約４０パーセント、少なくとも約４５パーセント、少なくとも約５０パーセント、少なくとも約５５パーセント、少なくとも約６０パーセント、少なくとも約６５パーセント、少なくとも約７０パーセント、少なくとも約７５パーセント、少なくとも約８０パーセント、少なくとも約８５パーセント、少なくとも約９０パーセント、少なくとも約９５パーセント、または少なくとも約９７．５理論収率％の収率で、炭素源から有益な代謝物を産生する可能性がある。特定の実施形態では、有益な代謝物は、イソブタノールである。

【０３１４】

本発明は更に、次の実施例によって例証されるが、それは限定するものとして解釈されるべきではない。本出願全体にわたって引用される全ての参考文献、特許、および公開された特許出願の内容、ならびに図および配列表は、参照により全目的で本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【０３１５】

実施例１～２６についての一般的方法

配列：本明細書に開示されるアミノ酸およびヌクレオチド配列を表６に示す。

【表６】
種々の実施例に開示される酵素および遺伝子のアミノ酸およびヌクレオチド配列

酵素	源	遺伝子（配列番号）	対応するタンパク質（配列番号）
ALS	B.スブチリス	*Bs_alsS1_coSc*（配列番号42）	Bs_AlsS1（配列番号43）
KARI	大腸菌	*Ec_ilvC*_coSc^{Q110V}（配列番号44）	Ec_IlvC^{Q110V}（配列番号45）
	大腸菌	*Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1-A1}$（配列番号46）	Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1}$（配列番号47）
KIVD	L.ラクチス	*Ll_kivD2_coEc*（配列番号48）	Ll_Kivd2（配列番号49）
DHAD	L.ラクチス	*Ll_ilvD_coSc*（配列番号50）	Ll_IlvD（配列番号51）
	S.セレビシエ	*Sc_ILV3ΔN*（配列番号52）	Sc_Ilv3ΔN（配列番号53）
ADH	D.メラノガスター	*Dm_ADH*（配列番号54）	Dm_Adh（配列番号55）
	L.ラクチス	*Ll_adhA*（配列番号56）	Ll_AdhA（配列番号57）
	L.ラクチス	*Ll_adhA_coSc*^{his6}（配列番号58）	Ll_AdhA^{his6}（配列番号59）
	L.ラクチス	*Ll_adhA*^{RE1}*_coSc*^{his6}（配列番号60）	Ll_AdhA$^{RE1-his6}$（配列番号61）

【０３１６】
培地：使用した培地は、標準的な酵母培地であった（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｒｕｓｓｅｌ，Ｄ．Ｗ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．３ｒｄ ｅｄ．２００１，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ ａｎｄ Ｇｕｔｈｒｉｅ，Ｃ．ａｎｄ Ｆｉｎｋ，Ｇ．Ｒ．ｅｄｓ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ Ｐａｒｔ Ｂ：Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ３５０：３－６２３（２００２）を参照されたい）。ＹＰ培地は、１％（ｗ／ｖ）酵母抽出物、２％（ｗ／ｖ）ペプトンを含有する。ＹＰＤは、別途明記されない限り、２％グルコースを含有するＹＰである。ＹＰＥは、２５ｍＬ／／Ｌエタノールを含有するＹＰである。ＳＣ培地は、６．７ｇ／Ｌ Ｄｉｆｃｏ（商標）酵母窒素原礎培地、１４ｇ／Ｌ Ｓｉｇｍａ（商標）合成ドロップアウト培地用添加物（ヒスチジン、トリプトファン、ウラシル、およびロイシンを除くアミノ酸および栄養分を含む）、０．０７６ｇ／Ｌヒスチジン、０．０７６ｇ／Ｌトリプトファン、０．３８０ｇ／Ｌロイシン、および０．０７６ｇ／Ｌウラシルである。ＳＣＤは、別途注記のない限り、２％（ｗ／ｖ）グルコースを含有するＳＣである。ＳＣおよびＳＣＤ培地のドロップアウトバージョンは、ヒスチジン（－Ｈ）、トリプトファン（－Ｗ）、ロイシン（－Ｌ）、またはウラシル（－Ｕ）のうちの１つ以上を省略することによって作製する。上述の培地の固体バージョンは、２％（ｗ／ｖ）寒天を含有する。

【０３１７】
クローン化技術：別途注記のない限り、クローン化およびプラスミド構築のための標準的な分子生物学的方法を一般的に使用した（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｒｕｓｓｅｌ，Ｄ．Ｗ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．３ ｅｄ．２００１，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ）。クローン化技術には、制限酵素での消化、ＤＮＡ断片を生成するためのＰＣＲ（ＫＯＤ Ｈｏｔ Ｓｔａｒｔ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ、カタログ番号７１０８６、Ｍｅｒｃｋ，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、ＤＮＡライゲーションキットを使用した２つのＤＮＡ断片のライゲーション（Ｍｉｇｈｔｙ Ｍｉｘカタログ番号ＴＡＫ ６０２３、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）、およびコンピテント大腸菌細胞中への細菌形質転換（Ｘｔｒｅｍｅ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ＤＨ５ａ Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ Ｃｅｌｌｓ、カタログ番号ＡＢＰ－ＣＥ－ＣＣ０２０９６Ｐ、Ａｌｌｅｌｅ

Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）が含まれた。プラスミドＤＮＡは、Ｑｉａｇｅｎ ＱＩＡｐｒｅｐ Ｓｐｉｎ Ｍｉｎｉｐｒｅｐ Ｋｉｔ（カタログ番号２７１０６，Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）を使用して、大腸菌細胞から精製した。ＤＮＡは、製造業者のプロトコルに従って、Ｚｙｍｏｃｌｅａｎ Ｇｅｌ ＤＮＡ Ｒｅｃｏｖｅｒｙ Ｋｉｔ（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｏｒａｎｇｅ，ＣＡ、カタログ番号Ｄ４００２）を使用して、アガロースゲルから精製した。

【０３１８】

コロニーＰＣＲ：酵母コロニーＰＣＲは、製造業者のプロトコルに従って、ＦａｉｌＳａｆｅ（商標）ＰＣＲ系（ＥＰＩＣＥＮＴＲＥ（登録商標）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ、カタログ番号ＦＳ９９２５０）を使用した。１５μＬのマスターミックスＥ緩衝液、１０．５μＬ水、１０μＭ濃度での２μＬの各プライマー、キットからの０．５μＬポリメラーゼ酵素ミックスを含有するＰＣＲカクテルを、各試料（各々３０μＬ）につき０．２ｍＬ ＰＣＲ管に添加した。各候補につき、少量の細胞を、滅菌ピペットチップを使用して反応管に添加した。陽性ＰＣＲ産物の存在を、アガロースゲル電気泳動を使用して査定した。

【０３１９】

ＳＯＥ ＰＣＲ：ＰＣＲ反応物を、次のＰＣＲ条件を使用して、サーモサイクラー中でインキュベートした：９４℃×２分間を１サイクル、９４℃×３０秒間、５３℃×３０秒間、７２℃×２分間を３５サイクル、および７２℃×１０分間を１サイクル。マスターミックスを、各反応物が次のものを含有するように作製した：３μＬ $MgSO_4$（２５ｍＭ）、５μＬ １０Ｘ ＫＯＤ緩衝液、５μＬ ５０％ＤＭＳＯ、５μＬ ｄＮＴＰミックス（各々２ｍＭ）、１μＬ ＫＯＤ、２８μＬ dH_2O、１．５μＬ順方向プライマー（１０μＭ）、１．５μＬ逆方向プライマー（１０μＭ）、０．５μＬテンプレート（プラスミドまたはゲノムＤＮＡ）。

【０３２０】

ゲノムＤＮＡ単離：Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ＺＲ真菌／細菌ＤＮＡキット（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｏｒａｎｇｅ，ＣＡ、カタログ番号Ｄ６００５）を、製造業者のプロトコルに従って、次の改変を用いて、ゲノムＤＮＡ単離のために使用した。ペレットの再懸濁に続いて、２００μＬを、２つの別個のＺＲ ＢａｓｈｉｎｇＢｅａｄ（商標）溶解管（収率を最大化するために）に移した。ビーズ式破砕による溶解に続いて、ＺＲ ＢａｓｈｉｎｇＢｅａｄ（商標）溶解管の各々からの４００μＬの上清を、２別個のＺｙｍｏ－Ｓｐｉｎ（商標）ＩＶスピンフィルターに移し、７，０００ｒｐｍで１分間遠心分離した。スピンに続いて、１．２ｍＬの真菌／細菌ＤＮＡ結合緩衝液を、各濾液に添加した。８００μＬアリコート中、両方のフィルターからの濾液を、収集管中の単一のＺｙｍｏ－Ｓｐｉｎ（商標）ＩＩＣカラムに移し、１０，０００×ｇで１分間遠心分離した。溶出ステップについては、１００μＬのＥＢ（溶出緩衝液、Ｑｉａｇｅｎ）中で溶出する代わりに、５０μＬのＥＢを添加し、１分間インキュベートし、次いでカラムを１分間遠心分離した。この溶出ステップを反復して、１００μＬの最終溶出容量を得た。

【０３２１】

Ｓ．セレビシエ形質転換。Ｓ．セレビシエ株を、１％エタノールを含有するＹＰＤ中で増殖させた。形質転換コンピテント細胞を、１００ｍＭ酢酸リチウム中でのＳ．セレビシエ細胞の再懸濁によって調製した。一旦、細胞を調製すると、ＤＮＡ（滅菌水を用いた１５μＬの最終容量）、７２μＬ ５０％ＰＥＧ、１０μＬ １Ｍ酢酸リチウム、および３μＬの変性サケ精子ＤＮＡ（１０ｍｇ／ｍＬ）の混合物を、各形質転換のために調製した。１．５ｍＬ管中、１５μＬの細胞懸濁液を、ＤＮＡ混合物（１００μＬ）に添加し、形質転換懸濁液を、５回の短いパルスにわたってボルテックスした。形質転換を、３０℃で３０分間インキュベートし、続いて４２℃で２２分間のインキュベートを行った。細胞を遠心分離（１８，０００×ｇ、１０秒間、２５℃）によって収集した。細胞を、３５０μＬ ＹＰＤ中に再懸濁させ、３０℃および２５０ｒｐｍで振盪しながら一晩の回収後、細胞を、０．２ｇ／Ｌ Ｇ４１８選択プレートを含有するＹＰＤプレート上に広げた。形質

転換体を次いで、Ｇ４１８選択プレート上に単一のコロニーで精製した。

【０３２２】

Ｋ．マルシアヌス形質転換：Ｋ．マルシアヌス株を、３ｍＬの適切な培養培地中、２５０ｒｐｍおよび３０℃で一晩増殖させた。翌日、培養物を５０ｍＬの同じ培地中に希釈し、１～４のOD_{600}まで増殖させた。細胞を、滅菌５０ｍＬ円錐管中、遠心分離（１６００×ｇ、室温で５分間）によって収集した。細胞を、１０ｍＬのエレクトロポレーション緩衝液（１０ｍＭトリス－Ｃｌ、２７０ｍＭスクロース、１ｍＭ $MgCl_2$、ｐＨ７．５）中に再懸濁させ、１６００×ｇで、室温で５分間収集した。細胞を、１０ｍＬ ＩＢ中に再懸濁させた（ＹＰＥ、２５ｍＭ ＤＴＴ、２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、ｐＨ８．０；１００μＬの２．５Ｍ ＤＴＴおよび２００μＬの１Ｍ ＨＥＰＥＳ、ｐＨ８．０を、１０ｍＬのＹＰＤ中に希釈することによって新たに調製）。細胞を、２５０ｒｐｍ、３０℃で３０分間（管を直立させて）インキュベートした。細胞を、１６００×ｇで、室温で５分間収集し、１０ｍＬの冷却したエレクトロポレーション緩衝液中に再懸濁させた。細胞を、１６００×ｇで、４℃で５分間ペレット化した。細胞を、１ｍＬの冷却したエレクトロポレーション緩衝液中に再懸濁させ、微量遠心管に移した。細胞を、１０，０００×ｇ超で２０秒間、４℃での遠心分離によって収集した。細胞を、適切な量の冷却したエレクトロポレーション緩衝液中に再懸濁させて、３０～３８OD_{600}／ｍＬの最終バイオマス濃度を得た。４００μＬの細胞を、冷却したエレクトロポレーションキュベット（０．４ｃｍギャップ）に添加し、５０μＬのＳＯＥ ＰＣＲ産物（または水の対照）を添加し、上下にピペット操作することによって混合し、キュベットを、氷上で３０分間インキュベートした。試料を、１．８ｋＶ、１０００Ｏｈｍ、２５μＦで電気穿孔処理した。試料を次いで、１ｍＬの適切な培養培地と共に５０ｍＬ管に移し、試料を、２５０ｒｐｍで、３０℃で一晩インキュベートした。インキュベーション後、細胞を、適切な寒天プレート上にプレートした。

【０３２３】

Ｋ．ラクチス形質転換：Ｋ．ラクチス株を、３ｍＬ ＹＰＤ中、２５０ｒｐｍおよび３０℃で一晩増殖させた。翌日、培養物を５０ｍＬ ＹＰＤ中に希釈し、それらが約０．８のOD_{600}に到達するまで増殖させた。５０ｍＬ ＹＰＤ培養物からの細胞を、遠心分離（２７００ｒｃｆ、２分間、２５℃）によって収集した。細胞を、５０ｍＬ滅菌水で洗浄し、２７００ｒｃｆで２分間、室温での遠心分離によって収集した。細胞を、２５ｍＬ滅菌水で再び洗浄し、２７００ｒｃｆで２分間、室温での遠心分離によって収集した。細胞を、１ｍＬ １００ｍＭ酢酸リチウム中に再懸濁させ、１．５ｍＬエッペンドルフ管に移した。細胞を、１８，０００ｒｃｆで１０秒間、室温での遠心分離によって収集した。細胞を、細胞ペレットの容量のおよそ４倍である、１００ｍＭ酢酸リチウムの容量中に再懸濁させた。１０～１５μＬのＤＮＡ、７２μＬ ５０％ＰＥＧ（３３５０）、１０μＬ １Ｍ酢酸リチウム、３μＬ変性サケ精子ＤＮＡ、および滅菌水の容量を組み合わせて、各形質転換について１００μＬの最終容量にした。１．５ｍＬ管中、１５μＬの細胞懸濁液を、ＤＮＡ混合物に添加し、形質転換懸濁液を５回の短いパルスでボルテックスした。形質転換を、３０℃で３０分間インキュベートし、続いて４２℃で２２分間のインキュベートを行った。細胞を、１８，０００ｒｃｆで１０秒間、室温での遠心分離によって収集した。細胞を、４００μＬの適切な培地中に再懸濁させ、適切な培地を含有する寒天プレート上に広げて、形質転換細胞について選択した。

分析化学：

【０３２４】

ガスクロマトグラフィー（ＧＣ１法）。エタノールおよびイソブタノールを含む、揮発性の有機化合物の分析を、Ａｇｉｌｅｎｔ ７６７３オートサンプラ、ＺＢ－ＦＦＡＰカラム（Ｊ＆Ｗ、３０ｍ長、０．３２ｍｍ ＩＤ、０．２５μＭ膜厚）または同等物を装着し、水素炎イオン化検出器（ＦＩＤ）に接続したＡｇｉｌｅｎｔ ５８９０／６８９０／７８９０ガスクロマトグラフ上で行った。温度プログラムは、次の通りであった：注入器

については２００℃、検出器については３００℃、１００℃の炉で１分間、７０℃／分勾配で２３０℃まで、次いで２．５分間保有。分析は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから得た、純正基準（９９％超、および内部基準として１－ペンタノールを用いた５点較正曲線を使用して行った。

【０３２５】

高性能液体クロマトグラフィー（ＬＣ１法）：２，３－ジヒドロキシイソ吉草酸塩（ＤＨＩＶ）、２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＤＨ２ＭＢ）、イソ酪酸塩およびグルコースを含む有機酸代謝物の分析を、Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｍｉｃｒｏ－ｇｕａｒｄ Ｃａｔｉｏｎ Ｈ Ｃａｒｔｒｉｄｇｅおよび２つのＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ Ｒｅｚｅｘ ＲＦＱ－Ｆａｓｔ Ｆｒｕｉｔ Ｈ＋（８％）、１００×７．８ｍｍ直列カラム、または同等物を装着した、Ａｇｉｌｅｎｔ １２００または同等の高性能液体クロマトグラフィー系上で行った。有機酸代謝物を、Ａｇｉｌｅｎｔ １１００または同等のＵＶ検出器（２１０ｎｍ）、および屈折率検出器を使用して検出した。カラム温度は６０℃であった。この方法は、移動相としてＭｉｌｌｉ－Ｑ水中の０．０１８０ Ｎ H_2SO_4を用いる均一濃度法であった。流量を、１．１ｍＬ／分に設定した。注入容量は、２０μＬであり、実行時間は、１６分であった。有機酸代謝物の定量化は、純正基準（９９％超または利用可能な最も高い純度）を用いた５点較正曲線を使用して行ったが、例外として、ＤＨＩＶ（２，３－ジヒドロキシ－３－メチル－ブタノエート、ＣＡＳ １７５６－１８－９）は、Ｃｉｏｆｆｉ ｅｔ ａｌ．（Ｃｉｏｆｆｉ，Ｅ．ｅｔ ａｌ．Ａｎａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ １９８０，１０４，ｐｐ．４８５）に従って合成し、またＤＨ２ＭＢは、ＤＨＩＶおよびＤＨ２ＭＢが同じ反応因子を示すという仮定に基づいて定量化した。この方法において、ＤＨＩＶおよびＤＨ２ＭＢは共溶出し、したがってそれらの濃度は、２つの濃度の合計として報告する。

【０３２６】

高性能液体クロマトグラフィー（ＬＣ４法）：２，３－ジヒドロキシイソ吉草酸塩（ＤＨＩＶ、ＣＡＳ １７５６－１８－９）、２，３－ジヒドロキシ－２－メチル酪酸塩酸（ＤＨ２ＭＢ）、乳酸塩、酢酸塩、アセト乳酸、イソ酪酸塩、およびピルビン酸塩）を含む、オキソ酸の分析を、ＩｏｎＰａｃ ＡＳ１１－ＨＣ分析カラム（Ｄｉｏｎｅｘ：９μＭ、４．６×２５０ｍｍ）を、ＩｏｎＰａｃ ＡＧ１１－ＨＣガードカラム（Ｄｉｏｎｅｘ：１３μＭ、４．６×５０ｍｍ）およびＩｏｎＰａｃ ＡＴＣ－３アニオントラップカラム（Ｄｉｏｎｅｘ：９×２４ｍｍ）と連結して装着した、Ａｇｉｌｅｎｔ－１１００高性能液体クロマトグラフィー系上で行った。アセト乳酸を、ＵＶ検出器を使用して２２５ｎｍで検出した一方で、全ての他の分析物を、電導度検出器（ＡｕｔｏＳｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎリサイクルモードで ＡＳＲＳ ４ｍｍ、２００ｍＡサプレッサー電流を用いたＥＤ５０抑制電導度）を使用して検出した。カラム温度は３５℃であった。注入サイズは１０μＬであった。この方法は、次の溶出プロフィールを使用した：０．２５ｍＭ ＮａＯＨで３分間、続いて０．２５～５ｍＭ ＮａＯＨで２２分間の直線勾配、および５ｍＭ～３８．２５ｍＭで０．１分間、続いて３８．２５ｍＭ ＮａＯＨで４．９分間にわたる第２の直線勾配、および３８．２５ｍＭ～０．２５ｍＭで０．１分間にわたる最終直線勾配の後、０．２５ｍＭ ＮａＯＨで７分間にわたる再平衡化。流量は２ｍＬ／分に設定した。分析は、純正基準（９９％超、または利用可能な最も高い純度）を用いた４点較正曲線を使用して行ったが、次のものは例外であった：ＤＨＩＶは、Ｃｉｏｆｆｉら（Ｃｉｏｆｆｉ，Ｅ．ｅｔ ａｌ．Ａｎａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ １９８０，１０４，ｐｐ．４８５）に従って合成した。ＤＨ２ＭＢは、実施例８に記載するように合成し、ＤＨＩＶおよびＤＨ２ＭＢが同じ反応因子を示すという仮定に基づいて定量化した。ラセミ体アセト乳酸を、エチル－２－アセトキシ－２－メチルアセト酢酸塩（ＥＡＭＭＡ）のＮａＯＨとの加水分解によって作製した（Ｋｒａｍｐｉｔｚ，Ｌ．Ｏ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １９５７，３，２７７－２８３．）。この方法において、ＤＨＩＶおよびＤＨ２ＭＢは分離される（図８）。

酵素アッセイ

【０３２７】

タンパク質濃度の決定：（酵母ライセートのまたは精製したタンパク質の）タンパク質濃度を、ＢｉｏＲａｄ Ｂｒａｄｆｏｒｄタンパク質アッセイ試薬キット（カタログ番号５００－０００６、ＢｉｏＲａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）を使用して、また検量線についてはＢＳＡを使用して、決定した。このアッセイについての検量線を、５００μｇ／ｍＬ ＢＳＡの標準タンパク質原液の希釈系列を使用して作製した。細胞ライセートの適切な希釈液を水中で作製して、ＢｉｏＲａｄタンパク質検量線の直線範囲内に入る各ライセートのOD_{595}測定値を得た。１０μＬのライセート希釈液を、５００μＬの希釈したＢｉｏＲａｄタンパク質アッセイ染料に添加し、試料をボルテックスすることによって混合し、室温で６分間インキュベートした。試料をキュベットに移し、分光光度計において５９５ｎｍで読み取った。基準の線形回帰を使用して、各試料のタンパク質濃度を算出した。

【０３２８】

アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）アッセイ．細胞を、氷上で解凍し、溶解緩衝液（１００ｍＭトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．５）中に再懸濁させた。１０００μＬのガラスビーズ（直径０．５ｍｍ）を、１．５ｍＬエッペンドルフ管に添加し、８７５μＬの細胞懸濁液を添加した。酵母細胞を、Ｒｅｔｓｃｈ ＭＭ３０１ミキサーミル（Ｒｅｔｓｃｈ Ｉｎｃ．Ｎｅｗｔｏｗｎ，ＰＡ）を使用して、各ビーズ式破砕ステップの間に氷上で１分間インキュベーションしながら、各々最高速度で６×１分間混合し、溶解させた。管を、２３，５００×ｇで１０分間、４℃で遠心分離し、上清を、使用のために除去した。これらのライセートを、アッセイするまで氷上で保有した。酵母ライセートタンパク質濃度を、記載されるように決定した。

【０３２９】

試料の希釈液を、活性の読取りが得られるように作製した。一般的に、低いＡＤＨ活性を有することが予想される株からの試料を、溶解緩衝液（１００ｍＭトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．５）中、１：５に希釈し、ＡＤＨ遺伝子が高コピー数プラスミドから発現される株等の、高いＡＤＨ活性が予想される株からの試料を、１：４０～１：１００に希釈した。反応を、１０μＬの適切に希釈した細胞抽出物を使用して、９０μＬの反応緩衝液（１００ｍＭトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．５、１５０μＭ ＮＡＤＨ、１１ｍＭイソブチルアルデヒド）と共に、９６ウェルプレート中、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）３４０ＰＣマルチプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）において、３系列で行った。反応を、吸光度読取りを１０秒毎に行いながら、３４０ｎｍで５分間追跡した。反応を、３０℃で行った。反応を、完全緩衝液中で、および基質を含まない緩衝液中でも行った。

【０３３０】

イソブチルアルデヒド酸化アッセイ（ＡＬＤ６アッセイ）：細胞ペレットを氷上で解凍し、溶解緩衝液（１０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７．０、１ｍＭジチオスレイトール、５％ｗ／ｖグリセロール）中に再懸濁させた。１ｍＬのガラスビーズ（直径０．５ｍｍ）を、各試料につき、１．５ｍＬエッペンドルフ管に添加し、８５０μＬの細胞懸濁液を添加した。酵母細胞を、Ｒｅｔｓｃｈ ＭＭ３０１ミキサーミル（Ｒｅｔｓｃｈ Ｉｎｃ．Ｎｅｗｔｏｗｎ，ＰＡ）を使用して、間に氷上で１分間インキュベーションしながら、各々最高速度で６×１分間混合し、溶解させた。管を、２１，５００×ｇで１０分間、４℃で遠心分離し、上清を、新たな管に移した。抽出物を、アッセイするまで氷上で保有した。酵母ライセートタンパク質濃度を、記載されるように決定した。

【０３３１】

細胞ライセート中で、イソブチルアルデヒドの、イソ酪酸塩への酸化を触媒する酵素の酵素活性を測定するために使用した方法は、Ｍｅａｄｅｎ ｅｔ ａｌ．１９９７、Ｙｅａｓｔ １３：１３１９－１３２７およびＰｏｓｔｍａ ｅｔ ａｌ．１９８８，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．５５：４６８－４７７から改変した。手短に

述べると、各試料につき、１０μＬの無希釈の細胞ライセートを、６ウェルのＵＶマイクロタイタープレートに添加した。３つのウェルは、ｐＨ７．５の５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ－ＮａＯＨ、０．４ｍＭ $NADP^+$、３．７５ｍＭ $MgCl_2$、および０．１ｍＭ、１ｍＭ、または１０ｍＭイソブチルアルデヒドを含有する、９０μＬアッセイ緩衝液を入れた。残りの３ウェルは、９０μＬの基質を含まない緩衝液（アッセイ緩衝液と同じであるが、イソブチルアルデヒドを含まない）を入れた。緩衝液を、上下にピペット操作することによって、ウェル中のライセートと混合した。反応を次いで、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）３４０ＰＣプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）において吸光度読取りを１０秒毎に取りながら、３４０ｎｍで５分間モニターした。反応を、３０℃で行った。各試料についての V_{max} を、基質を含まない対照のバックグラウンド読取り値を差し引くことによって決定した。ライセートを含まない対照もまた、各基質濃度につき、３系列で行った。

【０３３２】

ＡＬＳアッセイ：実施例１～１８に記載されるＡＬＳアッセイのために、細胞を、氷上で解凍し、溶解緩衝液（５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液ｐＨ６．０、および１ｍＭ $MgSO_4$）中に再懸濁させた。１０００μＬのガラスビーズ（直径０．５ｍｍ）を、１．５ｍＬエッペンドルフ管に添加し、８７５μＬの細胞懸濁液を添加した。酵母細胞を、Ｒｅｔｓｃｈ ＭＭ３０１ミキサーミル（Ｒｅｔｓｃｈ Ｉｎｃ．Ｎｅｗｔｏｗｎ，ＰＡ）を使用して、各ビーズ式破砕ステップの間に氷上で１分間インキュベーションしながら、各々最高速度で６×１分間混合し、溶解させた。管を、２３，５００×ｇで１０分間、４℃で遠心分離し、上清を、使用のために除去した。これらのライセートを、アッセイするまで氷上で保有した。ライセートのタンパク質含量を、記載されるように測定した。全てのＡＬＳアッセイを、基質を含めておよび含まずに両通りで、各ライセートにつき、３系列で行った。各ライセートをアッセイするために、１５μＬのライセートを、１３５μＬの緩衝液（５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液ｐＨ６．０、１ｍＭ $MgSO_4$、１ｍＭチアミンピロリン酸塩、１１０ｍＭピルビン酸塩）と混合し、３０℃で１５分間インキュベートした。緩衝液を室温で調製した。基質を含まない対照（ピルビン酸塩を含まない緩衝液）およびライセートを含まない対照（ライセートの代わりに溶解緩衝液）もまた含めた。インキュベーション後、２１．５μＬの３５％ H_2SO_4 を、各反応物に添加し、３７℃で１時間インキュベートした。

【０３３３】

実施例１９～２５に記載されるＡＬＳアッセイのために、細胞を、氷上で解凍し、溶解緩衝液（１００ｍＭ $NaPO_4$ ｐＨ７．０、５ｍＭ $MgCl_2$、および１ｍＭ ＤＴＴ）中に再懸濁させた。１ｍＬのガラスビーズ（直径０．５ｍｍ）を、１．５ｍＬエッペンドルフ管に添加し、８００μＬの細胞懸濁液を、ガラスビーズを含有する管に添加した。酵母細胞を、Ｒｅｔｓｃｈ ＭＭ３０１ミキサーミル（Ｒｅｔｓｃｈ Ｉｎｃ．Ｎｅｗｔｏｗｎ，ＰＡ）および冷却ブロックを使用して、混合の間に１分間氷冷しながら、各々３０サイクル／秒で６回、１分間にわたって混合し、溶解させた。管を、２１，５００×ｇで１０分間、４℃で遠心分離し、上清を除去した。抽出物を、アッセイするまで氷上で保有した。酵母ライセートタンパク質濃度を、ＢｉｏＲａｄ Ｂｒａｄｆｏｒｄタンパク質アッセイ試薬キット（カタログ番号５００－０００６、ＢｉｏＲａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）を使用して、また検量線についてはＢＳＡを記載されるように使用して、決定した。全てのＡＬＳアッセイを各ライセートにつき、３系列で行った。全ての緩衝液、ライセート、および反応管を氷上で事前冷却した。各ライセートをアッセイするために、１５μＬのライセート（必要に応じて溶解緩衝液で希釈）を、１３５μＬのアッセイ緩衝液（５０ｍＭ ＫＰｉ、ｐＨ７．０、１ｍＭ $MgSO_4$、１ｍＭチアミンピロリン酸塩、１１０ｍＭピルビン酸塩）と混合し、３０℃で１５分間インキュベートした。基質を含まない対照（緩衝液ピルビン酸塩を含まない）およびライセートを含まない対照（溶解緩衝液ライセートの代わりに）もまた含めた。インキュベーション後、各反応物を、２１．５μＬの３５％ H_2SO_4 と混合し、３７℃で１時間インキ

ュベートし、５，０００×ｇで５分間遠心分離して、いかなる不溶性沈殿剤も除去した。

【０３３４】

全てのアッセイ試料を、アッセイ基質（ピルビン酸塩）および産物（アセトイン）について、高性能液体クロマトグラフィー、２つのＲｅｓｔｅｋ　ＲＦＱ　１５０×４．６ｍｍ直列カラムを装着したＨＰ－１２００高性能液体クロマトグラフィー系を介して分析した。有機酸代謝物を、ＨＰ－１１００　ＵＶ検出器（２１０ｎｍ）および屈折率を使用して検出した。カラム温度は６０℃であった。この方法は、移動相として、０．０１８０Ｎ　H_2SO_4（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水中）を用いる均一濃度法であった。流量は１．１ｍＬ／分に設定した。注入容量は２０μＬであり、実行時間は８分間であった。分析は、純正基準（９９％超、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから得た）および５点較正曲線を使用して行った。

【０３３５】

ＴＭＡ２９酵素アッセイ：細胞ペレットを氷上で解凍し、溶解緩衝液（１０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７．０、１ｍＭジチオスレイトール、５％ｗ／ｖグリセロール）中に再懸濁させた。１ｍＬのガラスビーズ（直径０．５ｍｍ）を、各試料につき、１．５ｍＬエッペンドルフ管に添加し、８５０μＬの細胞懸濁液を添加した。酵母細胞を、Ｒｅｔｓｃｈ　ＭＭ３０１ミキサーミル（Ｒｅｔｓｃｈ　Ｉｎｃ．Ｎｅｗｔｏｗｎ，ＰＡ）を使用して、間に氷上で１分間インキュベーションしながら、各々最高速度で６×１分間混合し、溶解させた。管を、２１，５００×ｇで１０分間、４℃で遠心分離し、上清を、新たな管に移した。抽出物を、アッセイするまで氷上で保有した。酵母ライセートタンパク質濃度を、ＢｉｏＲａｄ　Ｂｒａｄｆｏｒｄタンパク質アッセイ試薬キット（カタログ番号５００－０００６、ＢｉｏＲａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）を使用して、また検量線についてはＢＳＡを記載されるように使用して、決定した。

【０３３６】

（Ｓ）－２－アセト乳酸（（Ｓ）－ＡＬ）の酵素合成を、嫌気性フラスコ中で行った。反応は、２０ｍＭリン酸カリウムｐＨ７．０、１ｍＭ　$MgCl_2$、０．０５ｍＭチアミンピロリン酸塩（ＴＰＰ）、および２００ｍＭピルビン酸ナトリウムを含有する５５ｍＬの総容量で行った。合成を、６５単位の精製したＢ．スブチリスＡｌｓＳの添加によって開始し、反応物を、静的インキュベーター中で、３０℃で７．５時間インキュベートした。

【０３３７】

ラセミ体２－アセト乳酸（（Ｒ／Ｓ）－２－ＡＬ）の化学合成を、５０μＬのエチル－２－アセトキシ－２－メチルアμセト酢酸塩（ＥＡＭＭＡ）を９９０μＬの水と混合することによって行った。２６０μＬの２Ｎ　ＮａＯＨを次いで、各添加の後に１５秒間のボルテックスを行いながら、１０μＬ増分で添加した。溶液を次いで、オービタルシェーカー上で２０分間混合した。

【０３３８】

ラセミ体ＡＨＢ（（Ｒ／Ｓ）－ＡＨＢ）の化学合成を、５０μＬのエチル－２－アセトキシ－２－エチル－３－オキソブタノエートを９９０μＬの水と混合することによって行った。２Ｎ　ＮａＯＨを次いで、各添加の後に１５秒間のボルテックスを行いながら、１０μＬ増分で添加した。ＮａＯＨを、溶液のｐＨが１２になるまで添加した（約１８０μＬの２Ｎ　ＮａＯＨ）。溶液を次いで、オービタルシェーカー上で２０分間混合した。

【０３３９】

（Ｓ）－ＡＬ、（Ｒ／Ｓ）－ＡＬ、または（Ｒ／Ｓ）－ＡＨＢ還元活性の決定のために、１０μＬの無希釈の細胞ライセートを、６ウェルのＵＶマイクロタイタープレートに添加した。３つのウェルは、ｐＨ７．０の１００ｍＭ　KPO_4、１５０μＭ　ＮＡＤＰＨ、および基質として５ｍＭ（Ｓ）－ＡＬ、または１０ｍＭ（Ｒ／Ｓ）－ＡＬ、または１０ｍＭ（Ｒ／Ｓ）－ＡＨＢを含有する９０μＬアッセイ緩衝液を入れた。残りの３つのウェルは、９０μＬのアッセイ緩衝液を入れたが、基質を含まなかった。緩衝液を、上下にピペット操作することによって、ウェル中のライセートと混合した。反応を次いで、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）３４０ＰＣプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉ

ｃｅｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）において吸光度読取りを１０秒毎に取りながら、３４０ｎｍでモニターした。反応を、３０℃で行った。各試料についての（Ｓ）－ＡＬ、（Ｒ／Ｓ）－ＡＬ、または（Ｒ／Ｓ）－ＡＨＢ還元活性を、基質を含まない対照のバックグラウンド読取り値を差し引くことによって決定した。ライセートを含まない対照もまた、３系列で行った。

【０３４０】

ＤＨＡＤ酵素アッセイ：細胞ペレットを氷上で解凍し、溶解緩衝液（５０ｍＭトリスｐＨ８．０、５ｍＭ ＭｇＳＯ４、およびＧ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｙｅａｓｔ／Ｆｕｎｇａｌ ＰｒｏｔｅａｓｅＡｒｒｅｓｔ（商標）（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ、カタログ番号７８８－３３３））中に再懸濁させた。１ｍＬのガラスビーズ（直径０．５ｍｍ）を、各試料につき、１．５ｍＬエッペンドルフ管に添加し、８５０μＬの細胞懸濁液を添加した。酵母細胞を、Ｒｅｔｓｃｈ ＭＭ３０１ミキサーミル（Ｒｅｔｓｃｈ Ｉｎｃ．Ｎｅｗｔｏｗｎ，ＰＡ）を使用して、間に氷上で１分間インキュベーションしながら、各々最高速度で６×１分間混合し、溶解させた。管を、２１，５００×ｇで１０分間、４℃で遠心分離し、上清を、新たな管に移した。抽出物を、アッセイするまで氷上で保有した。酵母ライセートタンパク質濃度を、記載されるように決定した。各試料からのタンパク質を、ＤＨＡＤアッセイ緩衝液（５０ｍＭトリスｐＨ８、５ｍＭ ＭｇＳＯ４）中に、０．５μｇ／μＬの最終濃度になるまで希釈した。各ライセートの３つの試料を、ライセートを含まない対照と共にアッセイした。１０μＬの各試料（またはＤＨＡＤアッセイ緩衝液）を、０．２ｍＬ ＰＣＲ管に添加した。マルチチャネルピペットを使用して、９０μＬの基質を各管（基質混合物は、４ｍＬ ＤＨＡＤアッセイ緩衝液を０．５ｍＬ １００ｍＭ ＤＨＩＶに添加することによって調製した）に添加した。試料をサーモサイクラー（エッペンドルフマスターサイクラー）中に３５℃で３０分間置き、続いて９５℃で５分間のインキュベーションを行った。試料をサーモサイクラー上で４℃まで冷却し、次いで３０００×ｇで５分間遠心分離した。最後に、７５μＬの上清を、新たなＰＣＲ管に移し、ＨＰＬＣによって次のように分析し、１００μＬ ＤＮＰＨ試薬（１２ｍＭ ２，４－ジニトロフェニルヒドラジン、１０ｍＭクエン酸ｐＨ３．０、８０％アセトニトリル、２０％ＭｉｌｌｉＱ Ｈ２Ｏ）を、１００μＬの各試料に添加した。試料を、サーモサイクラー（エッペンドルフ、マスターサイクラー）中、７０℃で３０分間インキュベートした。ケト－イソ吉草酸塩およびイソブチルアルデヒドの分析を、Ｅｃｌｉｐｓｅ ＸＤＢ Ｃ－１８逆相カラム（Ａｇｉｌｅｎｔ）およびＣ－１８逆相カラムガード（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ）を装着したＨＰ－１２００高性能液体クロマトグラフィー系上で行った。ケトイソ吉草酸塩およびイソブチルアルデヒドを、ＨＰ－１１００ ＵＶ検出器（２１０ｎｍ）を使用して検出した。カラム温度は５０℃であった。この方法は、２．５％希釈リン酸（４％）を用いる移動相として、７０％アセトニトリル対水を用いる均一濃度法であった。流量は３ｍＬ／分に設定した。注入サイズは１０μＬであり、実行時間は２分間であった。

実施例１：Ｓ．セレビシエにおいてＡＤＨ活性を増加させることによって、増加されたイソブタノール／イソ酪酸塩比

【０３４１】

この実施例の目的は、増加されたアルコールデヒドロゲナーゼ活性が、増加されたイソブタノール収率、減少されたイソ酪酸塩収率、およびイソブタノール収率のイソ酪酸塩収率に対する比率の増加をもたらすことを実証することである。

【０３４２】

この実施例に開示される株およびプラスミドを、それぞれ表７および８に示す。

【表７】
実施例１に開示される株の遺伝子型。

GEVO 番号	遺伝子型
GEVO2843	S.セレビシエ、*MATa ura3 leu2 his3 trp1* *pdc1Δ::P_{CUP1}:[Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD2:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6Δ::[URA3:bla:P_{TEF1}:Ll_kivD2:P_{TDH3}:Dm_ADH]* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}

【表８】
実施例１に開示されるプラスミド。

プラスミド名	関連する遺伝子/使用頻度	遺伝子型
pGV2011	2μ プラスミド発現 KARI および DHAD	*P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}*, *P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc*, *2μ ori*, *bla*, G418R
pGV2485	2μ プラスミド発現 KARI、DHAD、および ADH	*P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}*, *P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc*, *P_{ENO2}:Ll_adhA*, *2μ ori*, *bla*, G418R

【０３４３】
染色体ＤＮＡから単一のアルコールデヒドロゲナーゼ（Ｄ．メラノガスターＡＤＨ、Ｄｍ＿ＡＤＨ）を発現する、Ｓ．セレビシエ株ＧＥＶＯ２８４３を、記載されるように、ＫＡＲＩおよびＤＨＡＤ（それぞれＥｃ＿ｉｌｖＣ＿Ｑ１１０ＶおよびＬｌ＿ｉｌｖＤ＿ｃｏＳｃ）のみを担持する２μプラスミドｐＧＶ２０１１、またはＫＡＲＩ、ＤＨＡＤ、およびＡＤＨ（それぞれＥｃ＿ｉｌｖＣ＿Ｑ１１０Ｖ、Ｌｌ＿ｉｌｖＤ＿ｃｏＳｃ、およびＬｌ＿ａｄｈＡ）を担持するｐＧＶ２４８５で形質転換した。

【０３４４】
発酵培養物を出発させるために、形質転換された株の一晩の小培養物を、１％エタノールおよび０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有するＹＰＤ培地中で出発させ、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。各株の３つの生物学的複製を試験した。翌朝、これらの培養物のＯＤ$_{６００}$を決定し、適切な量を使用して、５０ｍＬバッフル付フラスコ中の５０ｍＬの同じ培地に、およそ０．１のＯＤ$_{６００}$になるまで植菌した。これらの前培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。培養物がおよそ５～６のＯＤ$_{６００}$に到達したとき、それらを５０ｍＬファルコン管中で、２７００ｒｐｍで５分間、２５℃で遠心分離した。１つの５０ｍＬ培養物（１クローン）からの細胞を、８％グルコース、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８、１％（ｖ／ｖ）エタノール（３ｇ／Ｌエルゴステロールおよび１３２ｇ／Ｌ　Ｔｗｅｅｎ－８０を含有）を含有するＹＰＤ中に再懸濁させ、２００ｍＭ　ＭＥＳを用いてｐＨ６．５で緩衝した。培養物を次いで、２５０ｍＬバッフルなしフラスコ中に移し、３０℃および７５ｒｐｍでインキュベートした。

【０３４５】
７２時間時点で、各発酵フラスコからの試料を、ＯＤ$_{６００}$、ＡＤＨ活性を決定するため、およびＧＣ１およびＬＣ１によって分析するために採取した。ＧＣ１およびＬＣ１分析用の試料を調製するために、適切な容量の細胞培養物を、微量遠心機中で、最大速度で１０分間スピンし、上清をＧＣ１およびＬＣ１分析のために除去した。細胞ペレットを、ＡＤＨアッセイのために、１４ｍＬの培養培地を３０００×ｇで５分間、４℃で遠心分離することによって調製した。上清を除去し、細胞を３ｍＬ冷滅菌水中で洗浄した。管を次いで、上記の通り２分間遠心分離し、上清を除去し、管を再計量して、総細胞重量を決定した。ファルコン管を－８０℃で保管した。ＡＤＨアッセイを記載されるように行った。

【０３４６】
表９は、発酵の経過中の各株についてのＯＤ$_{６００}$を示す。７２時間のこの発酵中、株のＯＤ$_{６００}$は同様であった：それらは約７のＯＤ$_{６００}$で出発し、約９のＯＤ$_{６００}$で

終了した。２つのプラスミドで形質転換したＧＥＶＯ２８４３からのライセートの体外ＡＤＨ酵素活性を、７２時間時点について測定した。表９は、体外で測定したライセートにおけるＡＤＨ活性を示す。ＡＤＨを含まないプラスミド（ｐＧＶ２０１１）を担持する株は、約０．０４Ｕ／ｍｇの活性を示した。Ｌｌ＿ａｄｈＡ遺伝子を含むプラスミド（ｐＧＶ２４８５）を担持する株は、およそ７倍高いＡＤＨ活性を有した。

【表９】

発酵の７２時間後にプラスミドｐＧＶ２０１１またはｐＧＶ２４８５で形質転換した株ＧＥＶＯ２８４３の、OD_{600}およびアルコールデヒドロゲナーゼ活性。

次のもので形質転換したGEVO2843	**OD_{600}**	**ADH 活性 [U/mg]**
pGV2011	8.5	0.04
pGV2485	9.1	0.29

【０３４７】

発酵の７２時間後のイソブタノールおよびイソ酪酸塩力価を表１０に示す。０．０４Ｕ／ｍｇの低いＡＤＨ活性を有する株中のイソブタノール力価は、０．２９Ｕ／ｍｇの高いＡＤＨ活性を有する株と比較して有意に低かった。０．０４Ｕ／ｍｇの低いＡＤＨ活性を有する株中のイソ酪酸塩力価は、０．２９Ｕ／ｍｇの高いＡＤＨ活性を有する株と比較して有意に高かった。表６はまた、発酵の７２時間後のイソ酪酸塩およびイソブタノールについての収率を示す。０．０４Ｕ／ｍｇの低いＡＤＨ活性を有する株中のイソブタノール収率は、０．２９Ｕ／ｍｇの高いＡＤＨ活性を有する株と比較して有意に低かった。０．０４Ｕ／ｍｇの低いＡＤＨ活性を有する株中のイソ酪酸塩収率は、０．２９Ｕ／ｍｇの高いＡＤＨ活性を有する株と比較して有意に高かった。

【表１０】

発酵の７２時間後にプラスミドｐＧＶ２０１１またはｐＧＶ２４８５で形質転換した株ＧＥＶＯ２８４３中の、イソブタノールおよびイソ酪酸塩についての力価および収率。

	イソブタノール力価 [g/L]	**イソ酪酸塩力価 [g/L]**	**イソブタノール収率 [mol/mol グルコース]**	**イソ酪酸塩（Isobutryate）収率 [mol/mol グルコース]**	**収率比率（イソブタノール / イソ酪酸塩）**
pGV2011	3.2	3.8	0.22	0.22	1.0
pGV2485	4.7	1.9	0.33	0.11	3.0

実施例２：Ｓ．セレビシエにおける変異体ＡＤＨ　Ｌｌ＿ＡｄｈＡＲＥ１の使用によって更に増加されたイソブタノール／イソ酪酸塩比

【０３４８】

この実施例の目的は、増加されたk_{cat}および減少されたK_Mを有するアルコールデヒドロゲナーゼの発現が、イソブタノール収率の更なる増加、イソ酪酸塩収率の減少、およびイソブタノール収率のイソ酪酸塩収率に対する比率の増加をもたらすことを実証することである。

【表１１】

実施例２に開示される株の遺伝子型。

GEVO 番号	**遺伝子型**
GEVO2843	S.セレビシエ、*MATa ura3 leu2 his3 trp1* *pdc1Δ::P_{CUP1}:[Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD2:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6Δ::[URA3:bla:P_{TEF1}:Ll_kivD2:P_{TDH3}:Dm_ADH]* {C2 *添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した*}

【表１２】
実施例２に開示されるプラスミド。

プラスミド名	関連する遺伝子/使用頻度	遺伝子型
pGV2543	2μ プラスミド発現 KARI、DHAD、KIVD、および ADH（Ll_AdhA^{his6}）	P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}, P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*, P_{PGK1}:*Ll_kivD_coEc*, P_{ENO2}: *Ll_AdhA*^{his6}, *2μ ori*, *bla*, G418R
pGV2545	2μ プラスミド発現 KARI、DHAD、KIVD、および ADH（Ll_AdhA$^{RE1\text{-}his6}$）	P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}, P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*, P_{PGK1}:*Ll_kivD_coEc*, P_{ENO2}: *Ll_AdhA*$^{RE1\text{-}his6}$, *2μ ori*, *bla*, G418R

【０３４９】
染色体ＤＮＡから単一のアルコールデヒドロゲナーゼ（Ｄ．メラノガスターＡＤＨ、Ｄｍ＿ＡＤＨ）を発現する、Ｓ．セレビシエ株ＧＥＶＯ２８４３を、ＫＡＲＩ、ＤＨＡＤ、ＫＩＶＤ、およびヒスータグ、コドン最適化野生型ＡＤＨ（それぞれＥｃ＿ｉｌｖＣ^{Ｑ１１０Ｖ}、Ｌｌ＿ｉｌｖＤ＿ｃｏＳｃ、およびＬｌ＿ａｄｈＡ＿ｃｏＳｃ^{ｈｉｓ６}）を担持する２μプラスミドｐＧＶ２５４３、またはＫＡＲＩ、ＤＨＡＤ、ＫＩＶＤ、およびヒスータグ、コドン最適化突然変異体ＡＤＨ（それぞれＥｃ＿ｉｌｖＣ^{Ｑ１１０Ｖ}、Ｌｌ＿ｉｌｖＤ＿ｃｏＳｃ、およびＬｌ＿ａｄｈＡ^{ＲＥ１}＿ｃｏＳｃ^{ｈｉｓ６}）を担持するｐＧＶ２５４５で形質転換した。これらの株を培養し、記載されるように、ＡＤＨ酵素活性、ならびにＧＣ１およびＬＣ１による細胞外代謝物の産生について評価した。

【０３５０】
Ｌｌ＿ａｄｈＡ＿ｃｏＳｃ^{ｈｉｓ６}、Ｌｌ＿ａｄｈＡ^{ＲＥ１}＿ｃｏＳｃ^{ｈｉｓ６}（それぞれＬｌ＿ａｄｈＡ^{ｈｉｓ６}およびＬｌ＿ａｄｈＡ$^{ＲＥ１－ｈｉｓ６}$）の遺伝子産物の動力学的パラメータを表１３に示す。

【表１３】
補因子としてＮＡＤＨを有するイソブチルアルデヒドについて測定した、野生型Ｌｌ＿ａｄｈＡ^{ｈｉｓ６}の動力学的パラメータの、改変されたＬｌ＿ａｄｈＡ^{ＲＥ１}との比較

変異体	K_M [mMイソブチルアルデヒド]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$M^{-1}*s^{-1}$]
Ll_adhA^{his6}	11.7	51	4400
Ll_adhA$^{RE1\text{-}his6}$	1.6	84	49700

【０３５１】
表１４は、発酵の経過中の各株についてのＯＤ$_{６００}$を示す。７２時間のこの発酵中、株のＯＤ$_{６００}$は同様であった：それらは約６のＯＤ$_{６００}$で出発し、約９のＯＤ$_{６００}$で終了した。２つのプラスミドで形質転換したＧＥＶＯ２８４３からのライセートの体外ＡＤＨ酵素活性を、７２時間時点について測定した。表１４は、上述のように体外で測定したライセートにおけるＡＤＨ活性を示す。Ｌｌ＿ａｄｈＡ＿ｃｏＳｃ^{ｈｉｓ６}を含むプラスミド（ｐＧＶ２５４３）を担持する株は、約０．３８Ｕ／ｍｇの活性を示した。Ｌｌ＿ａｄｈＡ^{ＲＥ１}＿ｃｏＳｃ^{ｈｉｓ６}遺伝子、を含むプラスミド（ｐＧＶ２５４５）を担持する株は、およそ７倍高いＡＤＨ活性を有した。

【表１４】

発酵の７２時間後にプラスミドｐＧＶ２５４３またはｐＧＶ２５４５で形質転換した株ＧＥＶＯ２８４３の、OD_{600}およびアルコールデヒドロゲナーゼ活性。

次のもので形質転換したGEVO2843	**OD_{600}**	**ADH活性 [U/mg]**
pGV2543	8.5	0.38
pGV2545	8.8	2.46

【０３５２】

発酵の７２時間後のイソブタノールおよびイソ酪酸塩力価および収率を表１５に示す。ｐＧＶ２５４３を担持する株中のイソブタノール力価および収率は、ｐＧＶ２５４５を担持する株と比較してより低かった。ｐＧＶ２５４３を担持する株中のイソ酪酸塩力価および収率は、ｐＧＶ２５４５を担持する株と比較して有意に高かった。

【表１５】

発酵の７２時間後にプラスミドｐＧＶ２４５３またはｐＧＶ２４８５で形質転換した株ＧＥＶＯ２８４３中の、イソブタノールおよびイソ酪酸塩についての力価および収率。

次のもので形質転換したGEVO2843	**イソブタノール [g/L]**	**イソ酪酸塩 [g/L]**	**イソブタノール収率 [mol/mol グルコース]**	**イソ酪酸塩（Isobutryate）収率 [mol/mol グルコース]**	**収率比率（イソブタノール/イソ酪酸塩）**
pGV2543	4.6	1.3	0.28	0.06	4
pGV2545	4.9	0.3	0.29	0.01	20

実施例３：ＲＥ１の発現によってＳ．セレビシエにおいて更に増加されたイソブタノール／イソ酪酸塩比

【０３５３】

この実施例の目的は、増加されたk_{cat}および減少されたK_Mを有するアルコールデヒドロゲナーゼの発現が、発酵槽中で行った発酵において、イソブタノール収率の増加およびイソ酪酸塩収率の減少をもたらすことを実証することである。

【０３５４】

Ｓ．セレビシエ株ＧＥＶＯ３５１９およびＧＥＶＯ３５２３の性能を比較するために、発酵を行った。イソブタノールおよびイソ酪酸塩力価および収率を発酵中に測定した。ＧＥＶＯ３５１９は、次の酵素をコードする遺伝子を含有する２μプラスミドｐＧＶ２５２４を担持する：ＫＡＲＩ、ＤＨＡＤ、ＫＩＶＤ、およびヒスータグ、コドン最適化野生型ラクトコッカ・スラクチスＡＤＨ。ＧＥＶＯ３５２３は、次の酵素をコードする遺伝子を含有する２μプラスミドｐＧＶ２５２４を担持する：ＫＡＲＩ、ＤＨＡＤ、ＫＩＶＤ、ならびに減少されたK_Mおよび増加されたk_{cat}を有する、ヒスータグ、コドン最適化ラクトコッカ・スラクチスＡＤＨの改善された変異体。これらの株を、ＬＣ１およびＧＣ１により、イソブタノール、イソブチルアルデヒド、グルコース消費について、ならびにＤａｓＧｉｐ発酵槽中での発酵中のOD_{600}について評価した。

【表１６】
実施例３に開示される株の遺伝子型。

GEVO 番号	遺伝子型
GEVO3128	*S.*セレビシエ、*MATa ura3 leu2 his3 trp1* *gpd2Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}]* *gpd1Δ::P_{ccw12}:hph* *pdc1Δ ::[P_{CUP1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivDkivD2:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1};ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6Δ::[P_{TEF1}:Ll_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1\text{-}AT}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]* *{C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}*
GEVO3519	プラスミド pGV2524 で形質転換した GEVO3128
GEVO3523	プラスミド pGV2546 で形質転換した GEVO3128

【表１７】
実施例３に開示されるプラスミド。

プラスミド名	関連する遺伝子/使用頻度	遺伝子型
pGV2524	2μ プラスミド	*P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1\text{-}A1}$, P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc,* *P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc P_{ENO2}:Ll_adhA_coSc^{his6},* *2μ ori, bla,* G418R
pGV2546	2μ プラスミド	*P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1\text{-}A1}$, P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc,* *P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc P_{ENO2}:Ll_adhA_coSc$^{RE1\text{-}his6}$,* *2μ ori, bla,* G418R

【０３５５】
Ｓ．セレビシエ株ＧＥＶＯ３１２８を、記載されるように、２μプラスミドｐＧＶ２５２４またはｐＧＶ２５４６のいずれかで形質転換して、それぞれ株ＧＥＶＯ３５１９およびＧＥＶＯ３５２３を生成した。ＧＥＶＯ３５１９およびＧＥＶＯ３５２３の種菌培養物を、８０ｍＬのＹＰＤ培地０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８抗生物質、１％ｖ／ｖエタノール、および０．０１９ｇ／Ｌトリプトファンを含有する５００ｍＬバッフル付フラスコに植菌することによって出発させた。培養物をおよそ３４時間インキュベートした。オービタルシェーカーを、両実施例において２５０ｒｐｍおよび３０℃に設定した。同様の細胞質量を、ＧＥＶＯ３５１９およびＧＥＶＯ３５２３株のために達成した。インキュベーション後に達成された細胞密度は、８．０　OD_{600}であった。バッチの発酵を、８０ｇ／Ｌグルコース、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８、１％ｖ／ｖエタノール、および０．０１９ｇ／Ｌトリプトファンを含有するＹＰＤ培地中で、２ＬトップドライブモーターｄａｓＧｉｐ槽を使用して、１槽当たり０．９Ｌの作業容量で行った。適切な溶解酸素およびｐＨプローブと共に、槽を１２１℃で６０分間滅菌した。極性化を可能にするために、溶解酸素プローブは、滅菌後に較正したが、ｐＨプローブは、滅菌前に較正した。ｐＨを、６Ｎ　ＫＯＨおよび２Ｎ　H_2SO_4を使用してｐＨ６．０に制御した。培養物の増殖期中に、酸素移動速度（ＯＴＲ）は、１０ｍＭ／時間であり、培養物の産生期中に、培養物ＯＴＲは、０．２ｍＭ／時間であった。

【０３５６】
表１８は、培養物の産生期について算出した、イソブタノール力価および収率（理論収率％として）を示す。イソブタノール力価および収率の両方は、減少されたK_Mおよび増加されたk_{cat}を有するアルコールデヒドロゲナーゼを担持する株ＧＥＶＯ３５２３中で増加される。表１８はまた、到達した最大力価として報告するイソ酪酸塩力価、および％単位の炭素収率としての収率を示す。イソ酪酸塩力価および収率の両方は、減少されたK_Mおよび増加されたk_{cat}を有するアルコールデヒドロゲナーゼを担持する株ＧＥＶＯ３５２３中で減少された。

【表１８】
イソブタノールおよびイソ酪酸塩力価および収率。

株	**イソブタノール力価 [g/L]**	**イソブタノール収率 [理論収率%]**	**イソ酪酸塩力価[g/L]**	**イソ酪酸塩収率 [C-収率%]**
GEVO3519	3.9 ± 0.4	50.5 ± 2.1	0.82 ± 0.04	4.0 ± 0.0
GEVO3523	5.0 ± 0.3	59.5 ± 2.1	0.40 ± 0.01	2.0 ± 0.0

実施例４：Ｓ．セレビシエにおけるＡＬＤ６遺伝子の欠失を伴う発酵において減少されたイソ酪酸塩および酢酸塩産生

【０３５７】
次の実施例は、ＡＬＤ６遺伝子の欠失が、発酵においてイソ酪酸塩および酢酸塩産生の減少をもたらすことを例証する。

【０３５８】
ＡＬＤ６欠失株の構築：ＰＣＲを使用して、Ｓ．セレビシエからのＡＬＤ６の欠失のためのＡＬＤ６の欠失対立遺伝子を含有するＤＮＡ断片を生成した。１つのＰＣＲ反応は、プライマーｏＧＶ２８３４およびｏＧＶ２８３５を使用して、ＡＬＤ６の上流隣接領域、およびｖｐＧＶ１９５４からのP_{Sc_CCW12}プロモーター領域の５’末端を有するＤＮＡ断片の３’末端における重複の領域を含む、ＤＮＡ断片（Ａ）を増幅した。別のＰＣＲ反応は、プライマーｏＧＶ２８３６およびｏＧＶ２８３７を使用して、ＡＬＤ６の下流隣接領域、およびｐＧＶ２０７４からのｈｐｈハイグロマイシン抵抗性ＯＲＦの３’末端を有するＤＮＡ断片の５’末端における重複の領域を含む、ＤＮＡ断片（Ｄ）を増幅した。別のＰＣＲ反応は、プライマーｏＧＶ２６３１およびｏＧＶ２６３２を使用して、ＡＬＤ６の上流隣接領域の３’末端を有するＤＮＡ断片（断片Ａ）の５’末端における重複の領域、およびｐＧＶ２０７４からのｈｐｈハイグロマイシン抵抗性ＯＲＦの５’末端を有するＤＮＡ断片の３’末端における領域を有する、ｐＧＶ１９５４からのP_{Sc_CCW12}プロモーター領域を含む、ＤＮＡ断片（Ｂ）を増幅した。別のＰＣＲ反応は、プライマーｏＧＶ２６３３およびｏＧＶ２６３４を使用して、ｐＧＶ１９５４からのP_{Sc_CCW12}プロモーター領域の３’末端を有するＤＮＡ断片（断片Ｂ）の５’末端における重複の領域、およびＡＬＤ６の下流隣接領域の５’末端を有するＤＮＡ断片（断片Ｄ）の３’末端における重複の領域を有する、ｐＧＶ２０７４からのｈｐｈハイグロマイシン抵抗性ＯＲＦを含む、ＤＮＡ断片（Ｃ）を増幅した。ＤＮＡ断片ＡおよびＢを、プライマーｏＧＶ２８３４およびｏＧＶ２６３２を使用するＰＣＲによって組み合わせて、ＤＮＡ断片ＡＢを生成し、ＤＮＡ断片ＣおよびＤを、プライマーｏＧＶ２６３３およびｏＧＶ２８３７を使用するＰＣＲによって組み合わせて、ＤＮＡ断片ＣＤを生成した。ＤＮＡ断片ＡＢおよびＣＤを、プライマーｏＧＶ２８３４およびｏＧＶ２８３７を使用するＰＣＲによって組み合わせて、ＡＬＤ６の欠失対立遺伝子を含有する最終ＤＮＡ断片ＡＢＣＤを生成した。

【表１９－１】
実施例４に開示されるプライマー配列。

oGV番号	配列
oGV968	ACTCGCCGATAGTGGAAACCGACG（配列番号62）
oGV1965	CAAACTGTGATGGACGACACC（配列番号63）
oGV2631	CAATACGTTATGCCGTAATGAAG（配列番号64）
oGV2632	GCTTTTTACCCATTATTGATATAGTGTTTAAGCGAATG（配列番号65）
oGV2633	CACTATATCAATAATGGGTAAAAAGCCTGAACTCAC（配列番号66）
oGV2634	TTATTCCTTTGCCCTCGGACG（配列番号67）
oGV2680	TGCACTGCTGTCTTCACTTC（配列番号68）
oGV2796	TGTCAGCGCTTCAGACTC（配列番号69）
oGV2797	AAGTATTTTTAAGGATTCGCTC（配列番号70）
oGV2798	CTTCATTACGGCATAACGTATTGAAGTATTTTTAAGGATTCGCTC（配列番号71）
oGV2800	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAAGATAGTTATCATTATGTAAGTGCG（配列番号72）
oGV2801	GGGAGTTTAGCAATCAGC（配列番号73）
oGV2802	TGGTTGACCCGCAAACTTC（配列番号74）
oGV2803	ACAATCTCCCTGTCTCCTCCC（配列番号75）
oGV2804	AAGGTGATTTGGCACAAATTTTAC（配列番号76）
oGV2805	GGTACAATTCTGTCCTGAATTGTAG（配列番号77）
oGV2806	AGGTCCTAGAAATCCCTTAAG（配列番号78）
oGV2808	CTTCATTACGGCATAACGTATTGCGATATCAGTATACAAGGTAGGC（配列番号79）
oGV2810	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAAGGATTTAAGATGAGTGGTATTGG（配列番号80）
oGV2811	TGTTCGTAACTTTTGTCATCAC（配列番号81）
oGV2812	TCAGCATGCGGAACAATTG（配列番号82）
oGV2813	TCCACACGGTATCATACGATC（配列番号83）
oGV2814	GCGGTCGACAAGTTCAATATG（配列番号84）
oGV2815	TACTGAGCCGCCAACCTTAGTA（配列番号85）
oGV2816	CATAACTATACCCGTACGCAG（配列番号86）
oGV2818	CTTCATTACGGCATAACGTATTGAGCGTAGATCTACTGAACATGC（配列番号87）
oGV2820	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAACATGAGATTGTCAAAGAGG（配列番号88）
oGV2821	CACCAGGCTTATTGATGACC（配列番号89）
oGV2822	CATTACCGGCAGTTGCTC（配列番号90）
oGV2824	TATGACAGTGCCTATCAAGC（配列番号91）
oGV2825	AATGGGTTCTACCAGTATC（配列番号92）

【表１９－２】

oGV2826	AAGCCGGGAACGTGCGTAAC（配列番号93）
oGV2827	CTTCATTACGGCATAACGTATTGGGAACGCGTAATGGTGCTTG（配列番号94）
oGV2828	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAACCCGAGTTGACTGCTCATTG（配列番号95）
oGV2829	AATACTCGCCGAGGCGTAGG（配列番号96）
oGV2830	TTGGAGCTGGGAGGTAAATC（配列番号97）
oGV2831	TGCGGCTAACCCATATTGAG（配列番号98）
oGV2832	TACGCTGAGCGTAGTACAAC（配列番号99）
oGV2833	TAAAGCGCTGGGTGGACAACCG（配列番号100）
oGV2834	GCACCGAGACGTCATTGTTG（配列番号101）
oGV2835	CTTCATTACGGCATAACGTATTGTAAACACGCCAGGCTTGACC（配列番号102）
oGV2836	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAATCCATTCGGTGGTGTTAAGC（配列番号103）
oGV2837	ATGGCGAAATGGCAGTACTC（配列番号104）
oGV2838	ACCAACGACCCAAGAATC（配列番号105）
oGV2839	CTTTGCGACAGTGACAAC（配列番号106）
oGV2840	CCTCACGTAAGGGCATGATAG（配列番号107）
oGV2841	GCATTGCAGCGGTATTGTCAGG（配列番号108）
oGV2842	CAGCAGCCACATAGTATACC（配列番号109）
oGV2843	CTTCATTACGGCATAACGTATTGAGCCGTCGTTTGACATGTTG（配列番号110）
oGV2844	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAACGCTCCATTTGGAGGGATCG（配列番号111）
oGV2845	GAATGCGCTTGCTGCTAGGG（配列番号112）
oGV2846	CAGCTCTTGCTGCAGGTAACAC（配列番号113）
oGV2847	GGCACAATCTTGGAGCCGTTAG（配列番号114）
oGV2848	ACCAAGCCATCAAGGTTGTC（配列番号115）
oGV2849	TGGGTGATGGTTTGGCGAATGC（配列番号116）
oGV2896	GAAATGATGACATGTGGAAATATAACAG（配列番号117）

【０３５９】

ＡＬＤ６の欠失によって減少されたイソ酪酸塩および酢酸塩産生を実証するための株を、ＡＬＤ６の欠失対立遺伝子を含有するＡＢＣＤ　ＤＮＡ断片での、ＧＥＶＯ３１９８の形質転換によって構築した。形質転換体を、０．１ｇ／Ｌハイグロマイシンに対する抵抗性について選択し、形質転換体コロニーを、コロニーＰＣＲによって、ＡＢＣＤ　ＤＮＡ断片の正しい組み込みについて、プライマー対ｏＧＶ２８４０／ｏＧＶ２６８０、ｏＧＶ９６８／ｏＧＶ２８４１、およびｏＧＶ２８３８／ｏＧＶ２８３９を使用してスクリーニングした。株ＧＥＶＯ３７１１、ＧＥＶＯ３７１２、およびＧＥＶＯ３７１３を、このコロニーＰＣＲによって、ＡＢＣＤ　ＤＮＡ断片の正しい組み込みによって欠失されたＡＬＤ６を有するとして特定した。

【０３６０】

ＡＬＤ６の欠失によって減少されたイソ酪酸塩および酢酸塩産生を実証するためのイソブタノール産生経路を含有する株を、遺伝子発現ＫＡＲＩ、ＤＨＡＤ、ＫＩＶＤ、およびＡＤＨ（それぞれＥｃ＿ｉｌｖＣ＿ｃｏＳｃ$^{Ｐ２Ｄ１－Ａ１}$、Ｌｌ＿ｉｌｖＤ＿ｃｏＳｃ、Ｌｌ＿ｋｉｖＤ２＿ｃｏＥｃ、およびＬｌ＿ａｄｈＡ）を担持する２μ複製起点プラスミド、ｐＧＶ２２４７での、ＧＥＶＯ３７１１、ＧＥＶＯ３７１２、およびＧＥＶＯ３７１３の形質転換によって構築した。形質転換体を、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８および０．１ｇ／Ｌハイグロマイシンに対する抵抗性について選択し、０．１ｇ／Ｌハイグロマイシンおよび０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有する培地上に再度画線することによって精製して、株ＧＥＶＯ３７１４、ＧＥＶＯ３７１５、およびＧＥＶＯ３７１６を生成した。イソブタノール産生経路を含有するＡＬＤ６対照株、ＧＥＶＯ３４６６を、プラスミドｐＧＶ２２

４７での、ＧＥＶＯ３１９８の形質転換によって生成した。形質転換体を、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８に対する抵抗性について選択し、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有する培地上に再度画線することによって精製した。

【０３６１】

ａｌｄ２Δ、ａｌｄ３Δ、ａｌｄ４Δ、ａｌｄ５Δ、およびｈｆｄ１Δ欠失株の構築：ＰＣＲを使用して、ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、およびＨＦＤ１の欠失に対する、ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、およびＨＦＤ１の個々の欠失対立遺伝子を含有する別個のＤＮＡ断片を、別個の株中のＳ．セレビシエから個々に生成した。さらに、ＰＣＲを使用して、ＡＬＤ２およびＡＬＤ３（ａｌｄ２Δ　ａｌｄ３Δ）の一緒の欠失に対する、Ｓ．セレビシエゲノムにおける隣接遺伝子であるＡＬＤ２およびＡＬＤ３の両方を含む欠失対立遺伝子を含有するＤＮＡ断片を、個々の株中のＳ．セレビシエから生成した。上流隣接領域、ｐＧＶ１９５４からのＰ$_{Ｓｃ＿ＣＣＷ１２}$プロモーター領域、ｐＧＶ２０７４からのｈｐｈハイグロマイシン抵抗性ＯＲＦ、および各々個々の遺伝子に対する下流隣接領域を含有する、４構成成分断片を、表２０に列挙されるプライマー対を使用したこと以外は、ＡＬＤ６の欠失に対するＡＢＣＤ断片の生成と同様にＰＣＲによって生成した。ＡＬＤ２およびＡＬＤ３の一緒の欠失に対する４構成成分断片は、ＡＬＤ２からの上流隣接領域およびＡＬＤ３からの下流隣接領域を含有し、それを表２０に列挙されるプライマー対を使用するＰＣＲによって、同様に構築した。ｐＧＶ１９５４からのＰ$_{Ｓｃ＿ＣＣＷ１２}$プロモーター領域は、常にプライマー対ｏＧＶ２６３１／ｏＧＶ２６３２で増幅し、ｐＧＶ２０７４からのｈｐｈハイグロマイシン抵抗性ＯＲＦは、常にプライマー対ｏＧＶ２６３３／ｏＧＶ２６３４で増幅した。

【表２０】

遺伝子欠失に対する上流および下流領域を増幅するために使用したプライマー。

遺伝子欠失	上流領域に対するプライマー対	下流領域に対するプライマー対
ald2Δ	oGV2796/oGV2797、 oGV2796/oGV2798	oGV2800/oGV2801
ald3Δ	oGV2806/oGV2808	oGV2810/oGV2811
ald2Δ ald3Δ	oGV2796/oGV2798	oGV2810/oGV2811
ald4Δ	oGV2816/oGV2818	oGV2820/oGV2821
ald5Δ	oGV2826/oGV2827	oGV2828/oGV2829
ald6Δ	oGV2834/oGV2835	oGV2836/oGV2837
hfd1Δ	oGV2842/oGV2843	oGV2844/oGV2845

【０３６２】

ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、およびＨＦＤ１の個々の欠失を伴う株、ならびにＡＬＤ２およびＡＬＤ３の一緒の欠失を伴う株を、ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、もしくはＨＦＤ１の個々の欠失対立遺伝子を含有する個々の４構成成分ＤＮＡ断片での、またはＡＬＤ２およびＡＬＤ３の一緒の欠失対立遺伝子を含有する４構成成分ＤＮＡ断片での、ＧＥＶＯ３１９８またはＧＥＶＯ３４６６の形質転換によって構築した。形質転換体を、０．１ｇ／Ｌハイグロマイシンに対する抵抗性について選択し、形質転換体コロニーを、コロニーＰＣＲによって、４構成成分ＤＮＡ断片の正しい組み込みについて、表２１に列挙されるプライマー対を使用してスクリーニングした。株ＧＥＶＯ３５６７を、このコロニーＰＣＲによって、正しく欠失されたＡＬＤ２を有するとして特定し、株ＧＥＶＯ３５６８を、このコロニーＰＣＲによって、正しく欠失されたＡＬＤ３を有するとして特定し、株ＧＥＶＯ３５６９を、このコロニーＰＣＲによって、正しく欠失されたＡＬＤ２およびＡＬＤ３を一緒に有するとして特定し、株ＧＥＶＯ３５７９を、このコロニーＰＣＲによって、正しく欠失されたＡＬＤ４を有するとして特定し、株ＧＥＶＯ３７０５、ＧＥＶＯ３７０６、およびＧＥＶＯ３７０７を、このコロニーＰＣＲによって、正しく欠失されたＡＬＤ５を有するとして特定し、株ＧＥＶＯ３７２０、ＧＥＶＯ３７２１、およびＧＥＶＯ３７２２を、このコロニーＰＣＲによって、正しく欠失されたＨ

ＦＤ１を有するとして特定した。

【０３６３】

イソブタノール産生経路を含有し、ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、およびＡＬＤ５の個々の欠失を伴う、またはＡＬＤ２およびＡＬＤ３の一緒の欠失を伴う株を、プラスミドｐＧＶ２２４７での、株ＧＥＶＯ３５６７、ＧＥＶＯ３５６８、ＧＥＶＯ３５６９、ＧＥＶＯ３７０５、ＧＥＶＯ３７０６、およびＧＥＶＯ３７０７の形質転換によって構築した。形質転換体を、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８および０．１ｇ／Ｌハイグロマイシンに対する抵抗性について選択し、０．１ｇ／Ｌハイグロマイシンおよび０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有する培地上に再度画線することによって精製して、株ＧＥＶＯ３５８６、ＧＥＶＯ３５８７、ＧＥＶＯ３５８８、ＧＥＶＯ３５９０、ＧＥＶＯ３５９１、ＧＥＶＯ３５９２、ＧＥＶＯ３５９３、ＧＥＶＯ３５９４、ＧＥＶＯ３５９５、ＧＥＶＯ３７０８、ＧＥＶＯ３７０９、およびＧＥＶＯ３７１０を生成した。株ＧＥＶＯ３５７９、ＧＥＶＯ３７２０、ＧＥＶＯ３７２１、およびＧＥＶＯ３７２２は、ＧＥＶＯ３４６６から生成し、したがって、プラスミドｐＧＶ２２４７を含有した。

【表２１】

遺伝子欠失の検証のためのコロニーをスクリーニングするために使用したプライマー。

遺伝子欠失	**プライマー対**
ald2Δ	oGV2802/oGV2632, oGV968/oGV2803, oGV2804/oGV2805
ald3Δ	oGV2812/oGV2632, oGV968/oGV2813, oGV2814/oGV2815
ald2Δ ald3Δ	oGV2802/oGV2632, oGV968/oGV2813, oGV2804/oGV2805, oGV2814/oGV2815
ald4Δ	oGV2822/oGV2632, oGV968/oGV2896, oGV2824/oGV2825
ald5Δ	oGV2832/oGV2680, oGV1965/oGV2833, oGV2830/oGV2831
ald6Δ	oGV2840/oGV2680, oGV968/oGV2841, oGV2838/oGV2839
hfd1Δ	oGV2848/oGV2680, oGV968/oGV2849, oGV2846/oGV2847

【表２２－１】
実施例４に開示される株の遺伝子型。

GEVO 番号	遺伝子型
GEVO3198	*MATa ura3 leu2 his3 trp1* *gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}]* *pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6Δ*::[P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2DT-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1] {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}
GEVO3466	*MATa ura3 leu2 his3 trp1* *gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}]* *pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6Δ*::[P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2DT-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1] {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}:pGV2247 で形質転換した
GEVO3567	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}]* *pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6Δ*::[P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2DT-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1] *ald2Δ::P_{Sc_CCW12}:hph* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}
GEVO3568	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}]* *pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6Δ*::[P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2DT-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1] *ald3Δ::P_{Sc_CCW12}-hph* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}

【表２２－２】

GEVO3569	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] pdc1Δ::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{PGK1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] pdc5Δ::[*LEU2*:*bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3ΔN*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}] pdc6Δ::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P2DT\text{-}A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] ald2Δ :ald3Δ::P_{Sc_CCW12}:*hph* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}
GEVO3579	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] pdc1Δ::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{PGK1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] pdc5Δ::[*LEU2*:*bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3ΔN*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}] pdc6Δ::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P2DT\text{-}A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] ald4Δ::P_{Sc_CCW12}:*hph* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した};pGV2247 で形質転換した
GEVO3586、GEVO3587、および GEVO3588	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] pdc1Δ::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{PGK1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] pdc5Δ::[*LEU2*:*bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3ΔN*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}] pdc6Δ::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P2DT\text{-}A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] ald2Δ:ald3Δ::P_{Sc_CCW12}:*hph* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した};pGV2247 で形質転換した
GEVO3590、GEVO3591、および GEVO3592	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] pdc1Δ::[P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{PGK1}:*Ll_kivD2_coEc*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] pdc5Δ::[*LEU2*:*bla*:P_{TEF1}:*Sc_ILV3ΔN*:P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}] pdc6Δ::[P_{TEF1}:*Ll_ilvD_coSc*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P2DT\text{-}A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*] ald2Δ::P_{Sc_CCW12}:*hph* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した};pGV2247 で形質転換した
GEVO3593、GEVO3594、および GEVO3595	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1::T_{Kl_URA3} gpd2::$T_{Kl_URA3_short}$-P_{FBA1}-*Kl_URA3*-T_{Kl_URA3} pdc1::P_{CUP1}-*Bs_alsS_coSc*-T_{CYC1}-P_{PGK1}-*Ll_kivD2_coEc*-P_{ENO2}-*Sp_HIS5* pdc5*::LEU2-*bla*-P_{TEF1}-*Sc_ILV3ΔN*-P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V} pdc6*::P_{TEF1}-*Ll_ilvD_coSc*-P_{TDH3}-*Ec_ilvC_coSc*$^{P2DT\text{-}A1}$-P_{ENO2}-*Ll_adhA*-P_{FBA1}-*Sc_TRP1 ald3Δ*::P_{Sc_CCW12}-*hph* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した};pGV2247 で形質転換した

【表２２－３】

GEVO3705、GEVO3706、およびGEVO3707	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}] pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5] pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}] pdc6Δ::[P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2DT-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1] ald5Δ::P_{Sc_CCW12}-hph* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}
GEVO3708、GEVO3709、およびGEVO3710	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}] pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5] pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}] pdc6Δ::[P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2DT-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1] ald5Δ::P_{Sc_CCW12}:hph* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した};pGV2247 で形質転換した
GEVO3711、GEVO3712、およびGEVO3713	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}] pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5] pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}] pdc6Δ::[P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2DT-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1] ald6Δ::P_{Sc_CCW12}:hph* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}
GEVO3714、GEVO3715、およびGEVO3716	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}] pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5] pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}] pdc6Δ::[P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2DT-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1] ald6Δ::P_{Sc_CCW12}:hph* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した};pGV2247 で形質転換した
GEVO3720、GEVO3721、およびGEVO3722	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}] pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5] pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}] pdc6Δ::[P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2DT-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1] hfd1Δ::P_{Sc_CCW12}:hph* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した};pGV2247 で形質転換した

【表２３】

実施例４に開示されるプラスミド。

プラスミド名	遺伝子型
pGV2247	P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2DT-A1}$ P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc P_{ENO2}: Ll_adhA *2μ-ori*, pUC-ori, *bla, G418R.*

【０３６４】

振盪フラスコ発酵：ＧＥＶＯ３４６６の性能を、ａｌｄ２Δ、ａｌｄ３Δ、ａｌｄ２Δａｌｄ３Δ、ａｌｄ４Δ、ａｌｄ５Δ、ｈｆｄ１Δ、およびａｌｄ６Δ欠失突然変異を含有する株と比較するために、発酵を行った。酵母株を、細胞パッチから、または０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有するＹＰＤ寒天プレートから精製した単一のコロニーから、１４ｍＬ丸底スナップキャップ管中、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８および１％ｖ／ｖエタノール培地を含有する３ｍＬのＹＰＤ中に植菌した。培養物を、一晩から最大２４時間、２５０ｒ

ｐｍで、傾斜させて振盪しながら３０℃でインキュベートした。各株について別個に、これらの一晩の培養物を使用して、スリーブを閉鎖した２５０ｍＬバッフル付フラスコ中の、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８および１％ｖ／ｖエタノール培地を含有する５０ｍＬのＹＰＤに、０．１のOD_{600}になるまで植菌した。これらのフラスコ培養物を、一晩から最大２４時間、２５０ｒｐｍで振盪しながら３０℃でインキュベートした。これらのフラスコ培養物からの細胞を、３０００×ｇで５分間の遠心分離によって、各株について別個に採取し、各細胞ペレットを、８０ｇ／Ｌグルコース、エタノール中に溶解させた３ｇ／Ｌエルゴステロールおよび１３２ｇ／Ｌ　Ｔｗｅｅｎ　８０の１％ｖ／ｖ保存液、２００ｍＭ　ＭＥＳ緩衝液、ｐＨ６．５、および０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８培地を含有する５ｍＬのＹＰＤ中に別個に再懸濁させた。各細胞懸濁液を使用して、通気したねじ蓋を有する２５０ｍＬのバッフルなしフラスコ中、８０ｇ／Ｌグルコース、エタノール中に溶解させた３ｇ／Ｌエルゴステロールおよび１３２ｇ／Ｌ　Ｔｗｅｅｎ　８０の１％ｖ／ｖ保存液、２００ｍＭ　ＭＥＳ緩衝液、ｐＨ６．５、および０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８培地を含有する５０ｍＬのＹＰＤに、およそ５のOD_{600}になるまで植菌した。これらの発酵物を、２５０ｒｐｍで振盪しながら３０℃でインキュベートした。一定期間ごとに、各振盪フラスコ発酵からの試料を除去して、OD_{600}を測定し、かつイソブタノールおよび他の代謝物についてのガスクロマトグラフィー（ＧＣ１）分析のため、ならびに有機酸およびグルコースについての高性能液体クロマトグラフィー（ＬＣ１）分析のために調製した。２ｍＬの試料を微量遠心管中に除去し、微量遠心機中、最大ｒｐｍで１０分間遠心分離した。１ｍＬの上清は、記載されるようにＧＣ１およびＬＣ１によって細胞外代謝物の分析を行った。

【０３６５】

ＡＬＤ６の欠失は、振盪フラスコ発酵におけるイソ酪酸塩および酢酸塩産生を減少させた：ＧＥＶＯ３４６６、ならびにａｌｄ６Δ株ＧＥＶＯ３７１４、ＧＥＶＯ３７１５、およびＧＥＶＯ３７１６についての５２時間の振盪フラスコ発酵の結果を、表２４に要約する。ａｌｄ６Δ株ＧＥＶＯ３７１４、ＧＥＶＯ３７１５、およびＧＥＶＯ３７１６は、ＡＬＤ６株ＧＥＶＯ３４６６よりも７１％少ないイソ酪酸塩を産生した。ａｌｄ６Δ株ＧＥＶＯ３７１４、ＧＥＶＯ３７１５、およびＧＥＶＯ３７１６はまた、ＡＬＤ６株ＧＥＶＯ３４６６よりも８６％少ない酢酸塩を産生した。ａｌｄ６Δ株ＧＥＶＯ３７１４、ＧＥＶＯ３７１５、およびＧＥＶＯ３７１６におけるイソブタノール収率は、ＡＬＤ６株ＧＥＶＯ３４６６から、特記すべきほどには異ならなかった。ａｌｄ６Δ株ＧＥＶＯ３７１４、ＧＥＶＯ３７１５、およびＧＥＶＯ３７１６におけるイソブタノール力価は、ＡＬＤ６株ＧＥＶＯ３４６６よりも２３％高かった。

【表２４】

*ＡＬＤ６*の欠失によって減少されたイソ酪酸塩および酢酸塩産生を実証する振盪フラスコ発酵の結果

株	イソブタノール力価 [g/L]	イソブタノール収率 [理論収率%]	産生されたイソ酪酸塩 [g/L]	産生された酢酸塩 [g/L]
GEVO3466 (*ALD6*)	2.6 ± 0.1	44 ± 2	0.48 ± 0.06	0.59 ± 0.04
GEVO3714、GEVO3715、および GEVO3716 (*ald6Δ*)	3.2 ± 0.2	42 ± 2	0.14 ± 0.06	0.08 ± 0.01

【０３６６】

ＧＥＶＯ３４６６およびｔｈｅ　ａｌｄ２Δ、ａｌｄ３Δ、ａｌｄ２Δ、ａｌｄ３Δ、ａｌｄ４Δ、ａｌｄ５Δ、およびＨＦＤ１Δ株についての７２時間の振盪フラスコ発酵の結果を、表２５および表２６に要約する。ＡＬＤ３、ＡＬＤ２およびＡＬＤ３の一緒の、またはＡＬＤ４における欠失を伴う株は、野生型ＡＬＤＨ株ＧＥＶＯ３４６６と比較して

、イソ酪酸塩産生の減少を有さなかった。ＡＬＤ２、ＡＬＤ５、またはＨＦＤ１における欠失を伴う株は、野生型ＡＬＤＨ株ＧＥＶＯ３４６６と比較して、イソ酪酸塩産生の特記すべき減少を有さなかった。ＡＬＤ２、およびＡＬＤ３の両方の一緒の欠失を伴う株は、野生型ＡＬＤＨ株ＧＥＶＯ３４６６よりも１９％少ない酢酸塩を産生したが、ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、またはＨＦＤ１の個々の欠失を伴う株は、野生型ＡＬＤ株ＧＥＶＯ３４６６と比較して酢酸塩産生の特記すべき減少を有さなかった。

【表２５】

ＡＬＤ２、*ＡＬＤ３*、*ＡＬＤ４*、または*ＡＬＤ２*、および*ＡＬＤ３*の一緒の欠失によるイソ酪酸塩および酢酸塩産生の減少の不在を実証する振盪フラスコ発酵の結果。

株	イソブタノール力価 [g/L]	イソブタノール収率 [理論収率%]	産生されたイソ酪酸塩 [g/L]	産生された酢酸塩 [g/L]
GEVO3466 (野生型)	5.1 ± 0.1	42 ± 2	1.24 ± 0.15	0.95 ± 0.07
GEVO3590、GEVO3591、および GEVO3592 (*ald2Δ*)	5.2 ± 0.2	45 ± 2	1.21 ± 0.06	0.85 ± 0.07
GEVO3593、GEVO3594、および GEVO3595 (*ald3Δ*)	5.5 ± 0.6	45 ± 6	1.34 ± 0.16	0.91 ± 0.07
GEVO3596、GEVO3597、および GEVO3598 (*ald2Δ ald3Δ*)	6.8 ± 0.1	51 ± 1	1.41 ± 0.09	0.77 ± 0.08
GEVO3579 (*ald4Δ*)	5.6 ± 0.7	46 ± 6	1.34 ± 0.13	0.89 ± 0.15

【表２６】

*ＡＬＤ５*または*ＨＦＤ１*の欠失によるイソ酪酸塩および酢酸塩産生の減少の不在を実証する振盪フラスコ発酵の結果。

株	イソブタノール力価 [g/L]	イソブタノール収率 [理論収率%]	産生されたイソ酪酸塩 [g/L]	産生された酢酸塩 [g/L]
GEVO3466 (野生型)	4.0 ± 0.4	44 ± 7	0.47 ± 0.04	0.75 ± 0.05
GEVO3708、GEVO3709、および GEVO3710 (*ald5Δ*)	3.8 ± 0.8	46 ± 15	0.41 ± 0.04	0.64 ± 0.08
GEVO3720、GEVO3721、および GEVO3722 (*hfd1Δ*)	4.4 ± 1.0	54 ± 14	0.40 ± 0.07	0.56 ± 0.18

【０３６７】

ベンチトップ発酵槽中での発酵：ベンチトップ発酵槽中での発酵を、ＧＥＶＯ３４６６（ＡＬＤ６）の性能を、ＧＥＶＯ３７１４およびＧＥＶＯ３７１５（ａｌｄ６Δ）と比較するために行った。グルコース消費、イソブタノール産生、イソ酪酸塩産生、およびＯＤ$_{６００}$を発酵中に測定した。これらの発酵について、画線プレートから精製した株を、１％ｖ／ｖエタノール、１００μＭＣｕＳＯ$_{4}$．５Ｈ$_{2}$Ｏ、および０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８

を含有する８０ｍＬのＹＰＤ培地を含有する５００ｍＬバッフル付フラスコに移し、２５０ｒｐｍでのオービタルシェーカー中、３０℃で３２時間インキュベートした。フラスコ培養物を、個々の２Ｌトップドライブモーター発酵槽に、１槽当たり、８０ｇ／Ｌグルコース、１％ｖ／ｖエタノール、１００μＭ$CuSO_4 \cdot 5H_2O$、および０．２ｇ／ＬＧ４１８を含有する、０．９ＬのＹＰＤ培地の作業容量で移して、０．５の出発OD_{600}を得た。発酵槽を、酸素移動速度（ＯＴＲ）に基づく２相好気性条件下で、６Ｎ ＫＯＨおよび２Ｎ H_2SO_4で制御して、３０℃およびｐＨ６．０で作動させた。最初に、発酵槽を、１０ｍＭ／時間の増殖期ＯＴＲで、７００ｒｐｍの固定撹拌および５ｓＬ／時間の空気のオーバーレイによって作動させた。培養物を、およそ９～１０のOD_{600}になるまで２４時間増殖させ、次いで即座に、撹拌を７００ｒｐｍから４５０ｒｐｍに２４時間～８６．５時間の期間にわたって低減することによって、ＯＴＲ＝２．０ｍＭ／時間の産生曝気に切り替えた。一定期間ごとに、各発酵槽からの試料を除去して、OD_{600}を測定し、イソブタノールおよび他の代謝物についてのガスクロマトグラフィー（ＧＣ１）分析のため、ならびに有機酸およびグルコースについての高性能液体クロマトグラフィー（ＬＣ１）分析のために調製した。２ｍＬの試料を微量遠心管中に除去し、微量遠心機中、最大ｒｐｍで１０分間遠心分離した。１ｍＬの上清を、記載されるようにＧＣ１およびＬＣ１分析に供した。

【０３６８】

ＡＬＤ６の欠失は、ベンチトップ発酵槽発酵において、イソ酪酸塩および酢酸塩産生を減少させ、イソブタノール収率を増加させた：８６．５時間のベンチトップ発酵槽発酵の結果を、表２７に要約する。ａｌｄ６Δ株ＧＥＶＯ３７１４およびＧＥＶＯ３７１５は、ＡＬＤ６株ＧＥＶＯ３４６６よりも３８％少ないイソ酪酸塩を産生した。ａｌｄ６Δ株ＧＥＶＯ３７１４およびＧＥＶＯ３７１５はまた、ＡＬＤ６株ＧＥＶＯ３４６６よりも６１％少ない酢酸塩を産生した。ａｌｄ６Δ株ＧＥＶＯ３７１４およびＧＥＶＯ３７１５におけるイソブタノール収率は、ＡＬＤ６株ＧＥＶＯ３４６６よりも２５％高かった。ａｌｄ６Δ株ＧＥＶＯ３７１４およびＧＥＶＯ３７１５におけるイソブタノール力価は、ＡＬＤ６株ＧＥＶＯ３４６６よりも３５％高かった。

【表２７】

*ＡＬＤ６*の欠失によって減少されたイソ酪酸塩および酢酸塩産生ならびに増加されたイソブタノール収率を実証するベンチトップ発酵槽発酵の結果。

株	イソブタノール力価 [g/L]	イソブタノール収率 [理論収率%]	産生されたイソ酪酸塩 [g/L]	産生された酢酸塩 [g/L]
GEVO3466 (*ALD6*)	8.2 ± 0.1	32 ± 1	2.1 ± 0.1	2.3 ± 0.3
GEVO3714 および GEVO3715 (*ald6Δ*)	11.1 ± 0.1	40 ± 0	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1

実施例５：Ｓ．セレビシエにおけるＡＬＤ６活性の決定

【０３６９】

次の実施例は、イソブチルアルデヒド酸化活性が、ａｌｄ６Δ株中で有意に減少されることを例証する。

【表２８】

実施例５に開示される株の遺伝子型。

GEVO 番号	遺伝子型	源
GEVO3527	*MATα his3Δ-1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ*	ATCC 番号 201389（BY4742）
GEVO3940	*MATα his3Δ-1 leu2Δlys2Δ ura3Δ* ***ald6Δ****::kan*^{R}	OpenBiosystems カタログ番号 YSC1054（Yeast MATalpha コレクション）

【０３７０】

ＡＬＤ６（ＹＰＬ０６１Ｗ）遺伝子が欠失された酵母株ＧＥＶＯ３９４０およびその親ＧＥＶＯ３５２７を、各株について３系列で、１４ｍＬ培養物管中、３ｍＬのＹＰＤ培地に植菌することによって、各々３系列で培養した。培養物を、ＧＥＶＯ３５２７についてはＹＰＤ寒天プレート上の、およびＧＥＶＯ３９４０については０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８プレートを含有するＹＰＤ寒天プレート上のパッチから出発させた。培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。翌日、一晩の培養物のOD_{600}を測定し、０．１のOD_{600}になるまで５０ｍＬ培養物に植菌するための各培養物の容量を算出した。算出した各培養物の容量を使用して、２５０ｍＬバッフル付フラスコ中の５０ｍＬのＹＰＤに植菌し、培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍでインキュベートした。細胞を、７時間の増殖後に、１．６～２．１のＯＤの対数期中期の間に採取した。培養物を事前計量した５０ｍＬファルコン管に移し、細胞を、３０００×ｇで５分間の遠心分離によって収集した。培地の除去後、細胞を、１０ｍＬ　ＭｉｌｌｉＱ　H_2Oで洗浄した。水の除去後、細胞を、３０００×ｇで５分間、再び遠心分離し、残った水を、１ｍＬピペットチップを用いて注意深く除去した。細胞ペレットを計量し、次いで－８０℃で保管した。その後、それらを溶解させ、記載されるようにイソブチルアルデヒド酸化活性についてアッセイした。

【０３７１】

表２９に示されるように、１０ｍＭイソブチルアルデヒドの酸化に対する、ＧＥＶＯ３５２７ライセートにおけるＳ．セレビシエＡＬＤ６の比活性は、１３．９ｍＵ／ｍｇであった。ＡＬＤ６欠失を伴う同じ株は、２２倍低い０．６ｍＵ／ｍｇの比活性を有した。１．０ｍＭイソブチルアルデヒドの酸化に対する、ＧＥＶＯ３５２７ライセートにおけるＳ．セレビシエＡＬＤ６の比活性は、１７．６ｍＵ／ｍｇであった。ＡＬＤ６欠失を伴う同じ株は、８倍低い２．１ｍＵ／ｍｇの比活性を有した。０．１ｍＭイソブチルアルデヒドの酸化に対する、ＧＥＶＯ３５２７ライセートにおけるＳ．セレビシエＡＬＤ６の比活性は、６．７ｍＵ／ｍｇであった。ＡＬＤ６欠失を伴う同じ株は、５倍低い１．３ｍＵ／ｍｇの比活性を有した。これらのデータは、内在性ＡＬＤ６酵素が、Ｓ．セレビシエにおけるイソブタノール経路のイソ酪酸塩副産物に関与することを実証する。

【表２９】

種々のイソブチルアルデヒド濃度を使用した、株ＧＥＶＯ３５２７およびＧＥＶＯ３９４０の特異的イソブチルアルデヒド酸化活性。比活性を、ＧＥＶＯ３５２７およびＧＥＶＯ３９４０の３つの並列培養物からのライセートにおいて測定した。生物学的複製培養物中で測定した活性の平均および標準偏差を示す。

株	イソブチルアルデヒドを用いて測定した活性[mU/mg総タンパク質]		
	0.1mMイソブチルアルデヒド	1.0mMイソブチルアルデヒド	10mMイソブチルアルデヒド
GEVO3527	6.7 ± 0.4	17.6 ± 1.2	13.9 ± 0.4
GEVO3940	1.3 ± 0.2	2.1 ± 0.2	0.6 ± 0.1

実施例６：Ｓ．セレビシエにおけるＡＬＤ６遺伝子の欠失および改善されたアルコールデヒドロゲナーゼの過剰発現を伴う、更に減少されたイソ酪酸塩産生

【０３７２】

次の実施例は、ＡＬＤ６欠失および改善された動力学的特性を有するＡＤＨの過剰発現の組み合わせが、イソ酪酸塩産生の更なる減少、およびイソブタノール産生の更なる増加をもたらすことを例証する。

【０３７３】

イソ酪酸塩は、酵母中のイソブチルアルデヒド代謝の副産物であり、炭素収率の有意な割合を含む可能性がある。次の酵母株を構築した：ＧＥＶＯ３４６６は、株ＧＥＶＯ３１９８を、次の酵素をコードする遺伝子を担持する２μプラスミド、ｐＧＶ２２４７で形質転換することによって構築した：ＫＡＲＩ、ＤＨＡＤ、ＫＩＶＤ、および野生型ＡＤＨ（それぞれＥｃ＿ｉｌｖＣ＿ｃｏＳｃ$^{Ｐ２Ｄ１－Ａ１}$、Ｌｌ＿ｉｌｖＤ＿ｃｏＳｃ、Ｌｌ＿ｋｉｖＤ２＿ｃｏＥｃ、およびＬｌ＿ａｄｈＡ）。ＧＥＶＯ３１９８は、その染色体ＤＮＡからアルコールデヒドロゲナーゼ（Ｌ．ラクチスＡＤＨ、Ｌｌ＿ａｄｈＡ）の単一のコピーを発現する。株の生物学的複製物がＧＥＶＯ３７１４およびＧＥＶＯ３７１５と称される第２の株は、２つの独立した株、ＧＥＶＯ３７１１およびＧＥＶＯ３７１２を、次の酵素をコードする遺伝子を担持する２μプラスミドｐＧＶ２２４７で形質転換することによって構築した：ＫＡＲＩ、ＤＨＡＤ、ＫＩＶＤ、および野生型ＡＤＨ（それぞれＥｃ＿ｉｌｖＣ＿ｃｏＳｃ$^{Ｐ２Ｄ１－Ａ１，}$、Ｌｌ＿ｉｌｖＤ＿ｃｏＳｃ、Ｌｌ＿ｋｉｖＤ２＿ｃｏＥｃ、およびＬｌ＿ａｄｈＡ）。ＧＥＶＯ３７１１および３７１２は、単一のアルコールデヒドロゲナーゼ（Ｌ．ラクチスＡＤＨ、ＬＩ＿ａｄｈＡ）を発現し、ＡＬＤ６遺伝子が染色体ＤＮＡから欠失されている。株の生物学的複製物がＧＥＶＯ３８５５およびＧＥＶＯ３８５６と称される第３の株は、株ＧＥＶＯ３７１１を、次の酵素をコードする遺伝子を担持する２μプラスミドｐＧＶ２６０２で形質転換することによって構築した：ＫＡＲＩ、ＤＨＡＤ、ＫＩＶＤ、および突然変異体ＡＤＨ（それぞれＥｃ＿ｉｌｖＣ＿ｃｏＳｃ$^{Ｐ２Ｄ１－Ａ１－ｈｉｓ６，}$、Ｌｌ＿ｉｌｖＤ＿ｃｏＳｃ、Ｌｌ＿ｋｉｖＤ２＿ｃｏＥｃ、およびＬｌ＿ａｄｈＡ^{ＲＥ１}）。

【表３０】
実施例６に開示される株の遺伝子型。

GEVO 番号	遺伝子型
GEVO3198	*MATa ura3 leu2 his3 trp1* *gpd1Δ::T_{Kl_URA3}* *gpd2Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}]* *pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivDkivD:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6Δ::[P_{TEF}:Ll_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1\text{-}A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}
GEVO3466	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::T_{Kl_URA3}* *gpd2Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}]* *pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivDkivD:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6Δ::[P_{TEF}:Ll_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1\text{-}A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]* pGV2247 で形質転換した{C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}
GEVO3711, GEVO3712	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::T_{Kl_URA3}* *gpd2Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}]* *pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6Δ::[P_{TEF}:Ll_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1\text{-}A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]* *ald6Δ::P_{CCW12}:hph* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}
GEVO3714、 GEVO3715	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::T_{Kl_URA3}* *gpd2Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}]* *pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6Δ::[P_{TEF}:Ll_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1\text{-}A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]* *ald6Δ::P_{CCW12}:hph* pGV2247 で形質転換した{C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}
GEVO3855、 GEVO3856	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::T_{Kl_URA3}* *gpd2Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}]* *pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]* *pdc6Δ::[P_{TEF}:Ll_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1\text{-}A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]* *ald6Δ::P_{CCW12}:hph* pGV2602 で形質転換した{C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}

【表３１】
実施例６に開示されるプラスミド。

プラスミド名	遺伝子型
pGV2247	*P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc, P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1\text{-}A1}$,* *P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc, P_{ENO2}: Ll_adhA. 2μ-ori,* pUC-ori, *bla, G418R.*
pGV2602	*P_{TEF1}:Ll_ilvD_coSc, P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1\text{-}A1\text{-}his6}$,* *$P_{PGK1}$:Ll_kivD2_coEc, P_{ENO2}: Ll_adhA^{RE1}. 2μ-ori,* pUC-ori, *bla, G418R.*

【０３７４】
２つの異なる組の発酵を行った。発酵Ａ組を、ＧＥＶＯ３４６６（ＬＩ＿ａｄｈＡ）の性能をＧＥＶＯ３７１４－ＧＥＶＯ３７１５（ＬＩ－ａｄｈＡ、ａｌｄ６Δ）と比較するために行った。発酵Ｂ組を、ＧＥＶＯ３７１４（ＬＩ＿ａｄｈＡ、ａｌｄ６Δ）の性能をそれぞれＧＥＶＯ３８５５－ＧＥＶＯ３８５６（ＬＩ＿ａｄｈＡ^{ＲＥ１}、ａｌｄ６Δ）と比較するために行った。グルコース消費、イソブタノール産生、イソ酪酸塩産生、およびＯＤ$_{６００}$を発酵中に測定した。これらの発酵について、ＹＰＤ寒天プレート上で増殖さ

せた単一の単離細胞コロニーを、１％ｖ／ｖエタノール、１００μＭＣｕＳＯ$_4$．５Ｈ$_2$Ｏ、および０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有する８０ｍＬのＹＰＤ培地を含有する５００ｍＬバッフル付フラスコに移し、２５０ｒｐｍでのオービタルシェーカー中、３０℃で３２時間インキュベートした。フラスコ培養物を、個々の２Ｌトップドライブモーター発酵槽に、１槽当たり、８０ｇ／Ｌグルコース、１％ｖ／ｖエタノール、１００μＭＣｕＳＯ$_4$．５Ｈ$_2$Ｏ、および０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有する、０．９ＬのＹＰＤ培地の作業容量で移して、０．５の出発ＯＤ$_{600}$を得た。発酵槽を、酸素移動速度（ＯＴＲ）に基づく２相好気性条件下で、６Ｎ　ＫＯＨにより制御して、３０℃およびｐＨ６．０で作動させた。両実験において、最初に、発酵槽を、７００ｒｐｍの固定撹拌および５ｓＬ／時間の空気のオーバーレイによって、１０ｍＭ／時間の増殖期ＯＴＲで作動させた。培養物を、およそ９～１０のＯＤ$_{600}$になるまで２４時間増殖させ、次いで即座に、４８．５時間の産生曝気条件に切り替えた。第１の実験では、２．５～３．０ｍＭ／時間のＯＴＲを、撹拌を７００ｒｐｍから４２５ｒｐｍに低減することによって持続させた一方で、第２の実験では、２．０～２．５ｍＭ／時間のＯＴＲを、撹拌を７００ｒｐｍから４００ｒｐｍに低減することによって持続させた。一定期間ごとに、各発酵槽からの試料を除去して、ＯＤ$_{600}$を測定し、ガスクロマトグラフィー（ＧＣ１）分析および液体クロマトグラフィー（ＬＣ１）分析のために調製した。ＧＣ１およびＬＣ１のために、２ｍＬ試料をエッペンドルフ管中に除去し、微量遠心機中で１０分間、最大で遠心分離した。１ｍＬの上清を、ＧＣ１（イソブタノール、他の代謝物）によって分析し、１ｍＬを、有機酸およびグルコースについて、高性能液体クロマトグラフィー（ＬＣ１）によって分析した。

【０３７５】

２つの別個の発酵Ａ組およびＢ組からの７２．５時間のデータを、表３２および３３に要約する。発酵Ａ組は、ＧＥＶＯ３４６６（ＷＴ　ＡＤＨ）を、ＧＥＶＯ３７１４および３７１５（ＷＴ　ＡＤＨ、ａｌｄ６Δ）と比較した一方で、発酵Ｂ組は、ＧＥＶＯ３７１４（ＷＴ　ＡＤＨ、ａｌｄ６Δ）を、ＧＥＶＯ３８５５および３８５６（Ｌｌ＿ａｄｈＡ^{ＲＥ１}、ａｌｄ６Δ）と比較した。

【０３７６】

発酵Ａ組（表３２）を指すデータは、ＡＬＤ６遺伝子欠失を伴うＬｌ＿ａｄｈＡを担持する株中のイソブタノール力価および理論収率が、ＡＬＤ６遺伝子欠失を伴わないＬＩ＿ａｄｈＡを担持する株と比較して、それぞれ１．４倍および１．３倍高かったことを示す。ＡＬＤ６遺伝子欠失を伴わないＬＩ＿ａｄｈＡを担持する株（ＧＥＶＯ３４６６）は、０．０４０ｇ／ｇのイソ酪酸塩収率（産生されたイソ酪酸塩グラム／消費されたグルコースグラム）を有した一方で、ＡＬＤ６遺伝子欠失を伴うＬＩ＿ａｄｈＡを担持する株（ＧＥＶＯ３７１４、ＧＥＶＯ３７１５）は、０．０１７ｇ／ｇのより低いイソ酪酸塩収率を有した。ＡＬＤ６遺伝子欠失を伴わないＬ．ラクチスａｄｈＡを担持する株は、２．３ｇ／Ｌ酢酸塩を産生した一方で、ＡＬＤ６遺伝子欠失を伴うＬ．ラクチスａｄｈＡを担持する株は、０．６ｇ／Ｌ酢酸塩を産生した。

【表３２】
発酵Ａ組からのデータ。

株	OD_{600}	産生されたイソブタノール [g/L]	産生されたイソ酪酸塩 [g/L]	イソブタノール収率 [理論収率%]	イソ酪酸塩収率 [g/g]	産生された酢酸塩 [g/L]
GEVO3466（WT ADH）	9.7 ± 0.1	7.4 ± 0.6	1.7 ± 0.0	48.1 ± 2.6	0.040 ± 0.004	2.3 ± 0.1
GEVO3714、GEVO3715（WT ADH, *ALD6Δ*）	10.0 ± 0.7	10.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1	55.3 ± 0.6	0.017 ± 0.003	0.6 ± 0.1

【０３７７】
発酵Ｂ組（表３３）を指すデータは、ＡＬＤ６遺伝子欠失を伴うＬ．ラクチスａｄｈＡ^{ＲＥ１}を担持する株中のイソブタノール力価および理論収率が、ＡＬＤ６遺伝子欠失を伴うＬ．ラクチスａｄｈＡを担持する株と比較して、それぞれ１．２倍および１．１倍高かったことを示す。ＬＤ６遺伝子欠失を伴うＬ．ラクチスａｄｈＡ^{ＲＥ１}を担持する株（ＧＥＶＯ３８５５、ＧＥＶＯ３８５６）は、０．０１４ｇ／ｇのより高いイソ酪酸塩収率、および０．０ｇ／Ｌの同様の酢酸塩力価を有したＡＬＤ６遺伝子欠失を伴うＬ．ラクチスａｄｈＡを担持する株（ＧＥＶＯ３７１４）と比較して、最も低いイソ酪酸塩収率（産生されたイソ酪酸塩グラム／消費されたグルコースグラム）である０．００５ｇ／ｇを有し、０．０ｇ／Ｌ酢酸塩を産生した（表３３）。

【表３３】
発酵Ｂ組からのデータ。

株	OD_{600}	産生されたイソブタノール [g/L]	産生されたイソ酪酸塩 [g/L]	イソブタノール収率 [理論収率%]	イソ酪酸塩収率 [g/g]	産生された酢酸塩 [g/L]
GEVO3714、（WT ADH, *ALD6Δ*）	9.7 ± 0.2	10.3 ± 0.1	0.8 ± 0.0	46.5 ± 1.6	0.014 ± 0.000	0.0 ± 0.0
GEVO3855、GEVO3856（*Ll_adhA*$_{RE1}$, *ALD6Δ*）	9.9 ± 0.3	12.0 ± 0.0	0.3 ± 0.0	51.5 ± 0.8	0.005 ± 0.000	0.0 ± 0.0

実施例７：イソブタノール発酵の副産物としてのＤＨ２ＭＢの特定

【０３７８】
イソブタノール産生酵母株の発酵中に、ＬＣ１法において、２，３－ジヒドロキシイソ吉草酸塩（ＤＨＩＶ）と共溶出しており、これに基づいて定量化された未知のピークが、利用されている炭素の実質的な部分に対する吸収源として作用していることが見出された。

【０３７９】
最初は、このピークは専ら２，３－ジヒドロキシイソ吉草酸塩（ＤＨＩＶ）であると考えられたが、その後の研究により、これらのレベルのＤＨＩＶでは、ＫＡＲＩ産物阻害が

生じていたであろうため、かかる濃度はあり得ないことが示された。追加的な実験により、この回収されたピークが、酵素アッセイにおいてＤＨＡＤと反応性でないことが示され、故に、有意な量のＤＨＩＶが存在する可能性は排除された。

【０３８０】

高性能液体クロマトグラフィーＬＣ１：有機酸代謝物の分析を、２つのＲｅｚｅｘ ＲＦＱ－Ｆａｓｔ Ｆｒｕｉｔ Ｈ＋（８％）１５０×４．６ｍｍ直列カラム（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ）を装着したＡｇｉｌｅｎｔ－１２００高性能液体クロマトグラフィー系上で行った。有機酸代謝物を、Ａｇｉｌｅｎｔ－１１００ ＵＶ検出器（２１０ｎｍ）および屈折率（ＲＩ）検出器使用して検出した。カラム温度は６０℃であった。この方法は、移動相として、０．０１２８ Ｎ H_2SO_4（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水中、２５％０．０５１２ Ｎ H_2SO_4）を用いる均一濃度法であった。流量は１．１ｍＬ／分に設定した。注入容量は２０μＬであり、実行時間は１６分間であった。

【０３８１】

高性能液体クロマトグラフィーＬＣ３：最大１０ｍＭアルデヒド、ケトン、およびケト酸中間体（組み合わせ）を含有する試料について、ＤＮＰＨ試薬を、１：１比で各試料に添加した。１００μＬ ＤＮＰＨ試薬（１２ｍＭ ２，４－ジニトロフェニルヒドラジン２０ｍＭクエン酸ｐＨ３．０ ８０％アセトニトリル２０％ＭｉｌｌｉＱ H_2O）を、１００μＬの各試料に添加した。試料を、サーモサイクラー（エッペンドルフ、マスターサイクラー）中、７０℃で３０分間インキュベートした。アセトイン、ジアセチル、ケトイソ吉草酸塩、およびイソブチルアルデヒドの分析を、Ｅｃｌｉｐｓｅ ＸＤＢ Ｃ－１８ １５０×４ｍｍ、５μｍ粒径逆相カラム（Ａｇｉｌｅｎｔ）およびＣ－１８逆相ガードカラム（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ）を装着したＨＰ－１２００高性能液体クロマトグラフィー系上で行った。全ての分析物を、Ａｇｉｌｅｎｔ－１１００ ＵＶ検出器（３６０ｎｍ）使用して検出した。カラム温度は５０℃であった。この方法は、移動相として、６０％アセトニトリル２．５％リン酸（０．４％）、３７．５％水を用いる均一濃度法であった。流量は２ｍＬ／分に設定した。注入サイズは１０μＬであり、実行時間は１０分間であった。

【０３８２】

高性能液体クロマトグラフィーＬＣ４：オキソ酸の分析を、ＩｏｎＰａｃ ＡＳ１１－ＨＣ Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ、ＩｏｎＰａｃ ＡＧ１１－ＨＣガードカラム（ＩｏｎＰａｃ ＡＴＣ ｃｏｌｕｍｎ，Ｄｉｏｎｅｘ については３～４ｍｍ）または同等物、およびＩｏｎＰａｃ ＡＴＣ－１アニオントラップカラムまたは同等物を装着した、Ａｇｉｌｅｎｔ－１１００高性能液体クロマトグラフィー系上で行った。オキソ酸を、電導度検出器（ＥＤ５０抑制電導度、サプレッサー型：ＡｕｔｏＳｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎリサイクルモードでＡＳＲＳ ４ｍｍ、サプレッサー電流：３００ｍＡ）を使用して検出した。カラム温度は３５℃であった。この方法は、次の溶出プロフィールを使用した：０．２５ｍＭで３分間保有、２５分時点で５ｍＭまでの直線勾配、２５．１分時点で３８．５ｍＭまでの直線勾配、３８．５ｍＭで４．９分間保有、３０．１分時点で０．２５ｍＭまでの直線勾配、平衡化するまで７分間保有。流量は２ｍＬ／分に設定した。注入サイズは５μＬであり、実行時間は３７．１分間であった。

【０３８３】

ＧＣ－ＭＳ：Ｖａｒｉａｎ ３８００ＣＰ ＧＣ系を装着した単一の四重極３２０ＭＳ、ＤＢ－５ｍｓカラム、２５０℃の１０７９注入ポート、１００分割量（ｓｐｌｉｔ ｒａｔｉｏｎ）で一定流量１．０ｍＬ／分、炉プロフィール：初期温度４０℃、５分間保持、２０℃／分のランプで最大２３５℃、および２分間保持、０．５μＬの試料を送達するｃｏｍｂｉＰＡＬオートサンプラ、３５～１００の収集された質量。ＢＳＴＦＡ誘導化：（１）試料を、ＧＣバイアル中、窒素下で乾燥するまで蒸発させる、（２）０．５ｍＬのアセトニトリルおよび０．５ｍＬのＢＳＴＦＡ試薬を添加する、（３）５０℃で３０分間インキュベートする、（４）ＧＣ－ＭＳ上に注入する。

【０３８４】

ＬＣ－ＭＳ：ＬＣ１ピーク画分のＬＣ－ＭＳ分析について、試料を、複数の波長検出器、およびＬＣ／ＭＳＤトラップ質量分析計（イオントラップ）を装着した、Ａｇｉｌｅｎｔ　１１００シリーズ高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）系上に注入した。分離物を、質量分析によってモニタリングして、試料中の構成成分に対する同定を得た。質量分析計を、試料注入のために大気圧化学イオン化（ＡＰＣＩ）モードで作動させた。陽および陰ＡＰＣＩモードを使用して分析を行った。「未知」の検出は、陰イオン化モードのみで観察された。ＭＳｎを使用して分析を行って、試料分析物上での断片化データを得た。５μｍ粒子による４．６×１５０ｍｍ　Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｚｏｒｂａｘ　ＳＢ　Ｃ－１８カラムを使用して分離を達成した。９０％ＨＰＬＣ水および１０％メタノールの溶出液を使用した均一濃度法を使用して、試料を分析した。１０μＬの注入を使用して、試料溶液の分析を行った。試料はまた、クロマトグラフカラムに通すことによって分析した。

【０３８５】

ＤＨＩＶおよびその異性体、ＤＨ２ＭＢは、ＬＣ１上で、同じ保持時間で溶出する。これらの化合物に関連したピークを、発酵試料中の他の化合物から分離した。ピークを、ＨＰＬＣから収集し、更なる分析に使用した。

【０３８６】

ＤＨＩＶ（およびＤＨ２ＭＢ）についてのＬＣ１で見られた、ＲＩ検出シグナル対ＵＶ検出シグナルのシグナル比は、一般的な有機酸（例えば、乳酸塩、酢酸塩等）の特徴を示し、共役酸（例えば、ピルビン酸塩）は、非常に異なるＲＩ／ＵＶシグナル比を有する。回収した「ピークＤＨＩＶ」は、次の非共役酸の特性を有した：

【０３８７】

比率（ＲＩ／ＵＶ）：回収したＤＨＩＶ／ＤＨ２ＭＢピーク（１３０）、ＤＨＩＶ　Ｓｔｄ（１５０）、ピルビン酸塩（１４）。

【０３８８】

「ミステリーピーク」におけるカルボニル部分の欠如を、ＬＣ１およびＤＮＰＨから回収したピーク画分の間の反応の完全欠如によって確認した。付加ピークは、ＬＣ３クロマトグラフ系において明白でなかった。

【０３８９】

ＬＣ１から回収したピーク画分を次いで、アルカリ条件で作動し、ＤＨＩＶおよびアセト乳酸を分離することができる、ＬＣ４法によって分析した。その結果を、標準的な混合物と重ね合わせながら一緒に、図９に示す。これは明確に、ＤＨ２ＭＢ（後に特定された）と、ＤＨＩＶとの間の分離を示す。一部のピルビン酸塩もまた、ＤＨ２ＭＢピークの収集と共にもたらされた。

【０３９０】

ＮＭＲ分析：ＬＣ１法から回収した試料ピークを、中和し、凍結乾燥させ、ＮＭＲ分析に供した。１Ｈ－ＣＯＳＹ　ＮＭＲ（図１０）およびプロトンＮＭＲスペクトル（図１１）による２－Ｄ結合分析は、良好な結果をもたらした。

【０３９１】

ＤＨＩＶで溶出する「ミステリーピーク」の２－Ｄ分析（図１０）：１個のメチル基は、低磁場にシフトし、いかなる隣接プロトンによっても分割されず、ここで０．９５ｐｐｍでのメチル基は、ヒドロキシルに隣接した１個のプロトンによって二重項に分割される。そのプロトンは、次に、隣接メチル基によって四重項に分割される。３．１ｐｐｍと３．７ｐｐｍとの間の複合パターンは、「ＤＨＩＶ」のピーク収集中にわたって担持されるグルコースの異なるアノマーを示す。

【０３９２】

ＮＭＲピークの割り当てを下記のスペクトルにおいて示し（図１１）、これは「ミステリーピーク」の素性が、２，３－ジヒドロキシ－２－酪酸塩（ＤＨ２ＭＢ）であることを明確に示す。

【０３９３】

１Ｈ　ＮＭＲおよびＣＯＳＹスペクトラムは、ヒドロキシイソ吉草酸の構造的異性体で

ある、２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸の存在を支持する。これらのスペクトラムにおける他のシグナルは、アノマータンパク質の存在を支持し、したがって、糖構成成分である。更に、３．１～３．８ｐｐｍの間のシグナルの複合群形成が、オリゴ糖によりしばしば観察される。１３Ｃ　ＮＭＲスペクトルは、非常に弱く、ベースラインを下回る４５ｐｐｍのシグナルに基づく付属プロトン試験（ＡＰＴ）実験であると思われる。

【０３９４】

ＬＣ－ＭＳもまた、ＬＣ１ピーク画分上で行った。ＬＣ－ＭＳは、化合物が１３４の質量を有したことを十分に実証した（ＤＨＩＶおよびＤＨ２ＭＢの両方）（図１２）。

【０３９５】

この分析は、未知の副産物を、２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸（ＣＡＳ番号１４８６８－２４－７）として決定的に特定した。この化合物は、４つの異なる立体異性体型において存在する。２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸は、一組のシスおよびトランスジアステレオマーとして存在し、これらの各々は、一組の鏡像異性体として存在する。この４つの化合物を図１３に示す。

【０３９６】

本明細書に記載されるように、ＤＨ２ＭＢは、（２Ｓ）－２－ヒドロキシ－２－メチル－３－オキソ酪酸塩（アセト乳酸）に由来する。この反応の産物は、この変換を触媒する内在性酵素の立体選択性に依存して、（２Ｓ，３Ｒ）－２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸、（２Ｓ，３Ｓ）－２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブタン酸、または２つのジアステレオマーの混合物のいずれかであろう。

実施例８：ＤＨ２ＭＢの産生および精製

【０３９７】

この実施例の目的は、ＤＨ２ＭＢを産生および精製する方法を例証することである。

【０３９８】

ＡＬＳ活性を含む、操作されたＳ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２株（ＧＥＶＯ３１６０、Ｓ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２：ＭＡＴａ　ｕｒａ３　ｌｅｕ２　ｈｉｓ３　ｔｒｐ１　ｇｐｄ１Δ：：P_{CCW12}：Ｈｐｈ　ｇｐｄ２Δ：：$T_{Kl_URA3—short}$：P_{FBA1}：Ｋｌ＿ＵＲＡ３：T_{Kl_URA3}　ｐｄｃ１Δ：：P_{CUP1}：Ｂｓ＿ａｌｓＳ＿ｃｏＳｃ：T_{CYC1}：P_{PGK1}：Ｌｌ＿ｋｉｖＤ：$P_{ENO2—Sp—HIS5}$　ｐｄｃ５Δ：：ＬＥＵ２：ｂｌａ：P_{TEF1}：ＩＬＶ３ΔＮ：P_{TDH3}：ｉｌｖＣ＿ｃｏＳｃ＿Ｑ１１０Ｖ　ｐｄｃ６Δ：：P_{TEF1}：Ｌｌ＿ｉｌｖＤ＿P_{TDH3}：Ｅｃ＿ｉｌｖＣ＿ｃｏＳｃ＿Ｐ２Ｄ１－Ａ１：P_{ENO2}：Ｌｌ＿ａｄｈＡ：P_{FBA1}：Ｓｃ＿ＴＲＰ１｛Ｃ２添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した｝発現プラスミドｐＧＶ２２４７（Ｅｃ＿ｉｌｖＣ＿Ｐ２Ｄ１－Ａ１、Ｌｌ＿ｉｌｖＤ、Ｌｌ＿ｋｉｖＤ２、およびＬｌ＿ａｄｈＡの発現のための２－ミクロン、Ｇ４１８抵抗性プラスミド）を使用して、３０℃、ｐＨ６．０での１Ｌ培養培地培地（１０ｇ／Ｌ酵母抽出物、２０ｇ／Ｌペプトン、８０ｇ／Ｌグルコース、１％ｖ／ｖエタノール、１００μＭ$CuSO_4 \cdot 5H_2O$、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８）で満たした２Ｌトップドライブモーター$DasGip$槽、およびおよそ１０ｍｍｏｌ／時間のＯＴＲを使用するバッチ発酵において、およそ１０ｇ／Ｌ　ＤＨ２ＭＢを産生した。

【０３９９】

無細胞発酵ブロスを、濃縮H_2SO_4を使用してｐＨ２に酸性化した。酸性化したブロスを、Ｂ■ｃｈｉ　Ｒｏｔｏｖａｐｏｒ　Ｒ－２１５を使用して、減圧下で（０～１００ｍｂａｒ）３５０ｍＬまで濃縮した。蒸発中に、ブロスを含有するフラスコを水浴中で２０～３０℃まで加熱した。７０ｍＬ容量のＭｅＯＨを濃縮ブロスに添加し、混合物を、エチル酢酸塩（ＥｔＯＡｃ）での連続的抽出のために製造業者の仕様書に従って設定した、５００ｍＬ液－液エクストラクターに移した（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈカタログ　番号Ｚ５６２４３２）。連続的抽出を、ＥｔＯＡｃ抽出物を新たなＥｔＯＡｃと毎日置き換えながら、３日間行った。

【０４００】
抽出に続いて、ＥｔＯＡｃ中のＤＨ２ＭＢ抽出物の最初の２つのバッチを組み合わせ、無水$MgSO_4$で乾燥させ、続いて濾過を行った。乾燥した抽出物を、真空下で５００ｍＬまで濃縮し、３ｇの活性炭で、室温で撹拌することによって３０分間処理した（Ｆｌｕｋａカタログ番号０５１０５）。漂白された溶液を濾過し、真空下でおよそ５０ｍＬまで濃縮した（０～１００ｍｂａｒ、Ｂ■ｃｈｉ　Ｒｏｔｏｖａｐｏｒ　Ｒ－２１５を使用）。溶液を、４℃で２日間インキュベートした。得られた結晶を濾過し、氷冷ジエチルエーテルおよびアセトンで洗浄した。結晶を、凍結乾燥を使用して減圧下で１日間（０．０５ｍｂａｒ）乾燥させた。

【０４０１】
単離されたＤＨ２ＭＢを、１Ｈ（図１４）および１３Ｃ（図１５）ＮＭＲによって分析した。１Ｈ　ＮＭＲ（ＴＳＰ）１．１（ｄ、６．５Ｈｚ、３Ｈ）、１．３（ｓ、３Ｈ）、３．９（ｑ、６．５Ｈｚ、３Ｈ）。１３Ｃスペクトルは、試料中に存在する５つの異なる炭素原子を示した。１８１ｐｐｍの共鳴は、試料中に存在するカルボン酸炭素を示した。結論として、ＮＭＲスペクトラムに基づいて、単離されたＤＨ２ＭＢの９９％純度を推定することができた。

実施例９：発酵における、ＤＨ２ＭＢ産生のイソブタノール収率に及ぼす影響

【０４０２】
この実施例の目的は、ＤＨ２ＭＢが、ＡＬＳおよびＴＭＡ２９活性を含む酵母株中で実質的なレベルまで蓄積することを実証することである。

【０４０３】
この実施例に開示される株およびプラスミドを、それぞれ表３４および３５に示す。

【表３４】
Ｓ．セレビシエ株ＧＥＶＯ３１６０の遺伝子型。

株	遺伝子型
GEVO3160	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[P_{CCW12}:hph] gpd2Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:*Kl_URA3*:T_{Kl_URA3}] pdc1Δ:: [P_{CUP1}:*Bs_alsS_coSc*:T_{CYC1}:P_{PGK1}:*Ll_kivD*:P_{ENO2}:*Sp_HIS5*] pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF}:-*ILV3ΔN*:P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}] pdc6Δ:: [P_{TEF1}:*Ll_ilvD*_P_{TDH3}:*Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1\text{-}A1}$:P_{ENO2}:*Ll_adhA*:P_{FBA1}:*Sc_TRP1*]*{C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した} pGV2247

【表３５】
プラスミドｐＧＶ２２４７の遺伝子型。

プラスミド	遺伝子型
pGV2247	P_{Sc_TEF1}*: Ll_ilvD_coSc*, P_{Sc_TDH3}*: Ec_ilvC_coSc*^{P2D1A1}, P_{Sc_TPI1}*: G418R*, P_{Sc_PGK1}*: Ll_kivD_coEc*, P_{Sc_ENO2}*: Ll_adhA*, 2μ, AP^r, PMB1

【０４０４】
Ｓ．セレビシエ株ＧＥＶＯ３１６０を、記載されるようにｐＧＶ２２４７で形質転換した。形質転換した株を特徴付けるために、発酵を行った。０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有するＹＰＤ寒天プレート上で増殖させた単一の単離細胞コロニーを、８０ｇ／Ｌグルコース、１％ｖ／ｖエタノール、１００μＭ$CuSO_4 . 5H_2O$、および０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有する５ｍＬのＹＰＤ培地に移し、３０℃、２５０ｒｐｍで、２４時間インキュベートした。次に、この培養物を、８０ｍＬの同じ培地を含有する５００ｍＬバッフル付フラスコに移し、３０℃で２４時間、２５０ｒｐｍでのオービタルシェーカー中でインキュベートした。フラスコ培養物を、２Ｌトップドライブモーター発酵槽に、０．９Ｌの同じ培地の作業容量で移して、０．５の出発OD_{600}を得た。発酵槽を、酸素移動速度（ＯＴＲ）に基づく２相好気性条件下で、６Ｎ　ＫＯＨにより制御して、３０℃およびｐＨ６．０で作動させた。両実験において、最初に、発酵槽を、７００ｒｐｍの固定撹拌お

よび５ｓＬ／時間の空気のオーバーレイによって、１０ｍＭ／時間の増殖期ＯＴＲで作動させた。培養物を、およそ８のOD_{600}になるまで約２０時間増殖させ、次いで即座に産生曝気に切り替えた。１ｍＭ／時間のＯＴＲを、撹拌を７００ｒｐｍから３５０ｒｐｍに低減させることによって持続させた。植菌の９３時間後、各株からの１つの複製槽を、撹拌を３５０ｒｐｍから１８０ｒｐｍに減少させることによって、０．３ｍＭ／時間のＯＴＲまで更に低減した。一定期間ごとに、各発酵槽からの試料を除去して、OD_{600}を測定し、ガスクロマトグラフィー（ＧＣ１）分析および液体クロマトグラフィー（ＬＣ１）分析のために調製した。ＧＣ１およびＬＣ１のために、２ｍＬ試料をエッペンドルフ管中に除去し、微量遠心機中で１０分間、最大で遠心分離した。１ｍＬの上清を、ＧＣ１（イソブタノール、他の代謝物）によって分析し、１ｍＬを、有機酸およびグルコースについて、高性能液体クロマトグラフィー（ＬＣ１）によって分析した。

【０４０５】

図１６は、ｐＧＶ２２４７で形質転換したＳ．セレビシエＧＥＶＯ３１６０の産物および副産物プロフィールを示す。これらのプロフィールは、イソブタノール産生Ｐｄｃ－マイナス、Ｇｐｄ－マイナス酵母株に対して代表的である。Ｐｄｃ－マイナス／Ｇｐｄ－マイナス酵母産生株は、譲受人共通および同時係属中の刊行物、米国特許第２００９／０２６９９１号および米国特許第２０１１／００２０８８９号に記載され、それらの両方は参照によりそれらの全体が全目的で本明細書に組み込まれる。図１６は、イソブタノール（１３．９ｇ／Ｌ）、および「ＤＨＩＶ」として定量化し、ＤＨ２ＭＢ（８．４ｇ／Ｌ）として既に特定した未知の化合物が、微好気性産生ＯＴＲ中に産生される一次産物であることを示す。ＤＨＩＶの反応因子を使用する定量化が、ＤＨ２ＭＢの正確な定量化をもたらすと想定すると、消費されたおよそ１２～１３％の炭素がＤＨ２ＭＢの産生に転用される。ＤＨ２ＭＢに変換されるアセト乳酸が、代わりにイソブタノールに変換されるとすれば、図１６に示される発酵時間全体にわたるイソブタノール収率は、有意に高くなるであろう。

実施例１０：ＡＬＳ発現は、ＤＨ２ＭＢ産生に必要である。

【０４０６】

この実施例の目的は、外来性で発現したＡＬＳ活性が、Ｓ．セレビシエにおけるＤＨ２ＭＢ蓄積のために必要であることを実証することである。

【０４０７】

この実験は、ＡＬＳがＤＨ２ＭＢの産生のために必要であるかどうかを決定するために行った。この実験に使用した株は、ＧＥＶＯ１１８７（Ｓ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２、ＭＡＴａ　ｕｒａ３－５２　ｌｅｕ２－３＿１１２　ｈｉｓ３Δ１　ｔｒｐ１－２８９　ＡＤＥ２）およびＧＥＶＯ２２８０（Ｓ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２、ＭＡＴａ　ｕｒａ３　ｌｅｕ２　ｈｉｓ３　ｔｒｐ１　ＡＤＥ２　ｐｄｃ１Δ：：P_{CUP1-1}：Ｂｓ＿ａｌｓＳ２：ＴＲＰ１）であった。発酵前に、両方の株を、記載されるように、２ミクロンプラスミドｐＧＶ２０８２（P_{TDH3}：Ｅｃ＿ｉｌｖＣ＿ｃｏＳｃ^{Q110V}、P_{TEF1}：Ｌｌ＿ｉｌｖＤ＿ｃｏＳｃ、P_{PGK1}：Ｌｌ＿ｋｉｖＤ＿ｃｏＥｃ、およびP_{ENO2}：Ｄｍ＿ＡＤＨ、２μ　ｏｒｉ、ｂｌａ、Ｇ４１８Ｒ）で形質転換した。

【０４０８】

ＡＬＳ活性を測定するために、ＧＥＶＯ１１８７およびＧＥＶＯ２２８０からの酵母細胞抽出物を調製した。細胞を、約１のOD_{600}まで増殖させ、１ｍＭ　$CuSO_4$で２時間誘導し、次いで採取した。細胞をアッセイ用に調製するために、５０ｍＬの細胞を、２７００×ｇでの遠心分離によって収集した。培地の除去後、細胞を、滅菌dH_2O中に再懸濁させ、２７００×ｇで遠心分離し、残った培地を、１ｍＬピペットチップを用いて注意深く除去した。細胞ペレットを計量し（空の管を事前計量した）、次いで使用するまで－８０℃で凍結させた。細胞ライセートを、後述するように、次のＳＯＰを使用して作製した。細胞を、氷上で解凍し、溶解緩衝液（２５０ｍＭ　KPO_4　ｐＨ７．５、１０ｍＭ　$MgCl_2$、および１ｍＭ　ＤＴＴ）中に再懸濁させて、結果として２０質量％細

胞懸濁液を得た。１０００μＬの容量のガラスビーズ（直径０．５ｍｍ）を、１．５ｍＬエッペンドルフ管に添加し、８７５μＬの細胞懸濁液を添加した。酵母細胞を、Ｒｅｔｓｃｈ　ＭＭ３０１ミキサーミル（Ｒｅｔｓｃｈ　Ｉｎｃ．Ｎｅｗｔｏｗｎ，ＰＡ）使用して、間に１分間氷冷ステップを行いながら、各々６×１分間、最高速度で混合することによって溶解させた。管を、２３，５００×ｇで１０分間、４℃で遠心分離し、上清を除去した。抽出物を、アッセイするまで氷上で保持した。ライセートタンパク質濃度を、ＢｉｏＲａｄ　Ｂｒａｄｆｏｒｄタンパク質アッセイ試薬キット（カタログ番号５００－０００６、ＢｉｏＲａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）を使用して、また検量線についてはＢＳＡを記載されるように使用して、決定した。手短に述べると、全てのＡＬＳアッセイを、基質を含めておよび含まずに両通りで、各ライセートにつき、３系列で行った。各ライセートをアッセイするために、溶解緩衝液で１：２に希釈した１００μＬのライセートを、９００μＬの緩衝液（５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液ｐＨ６．０、１ｍＭ　$MgSO_4$、１ｍＭチアミンピロリン酸塩、１１０ｍＭピルビン酸塩）と混合し、３０℃で１５分間インキュベートした。緩衝液を室温で調製した。基質を含まない対照（ピルビン酸塩を含まない緩衝液）およびライセートを含まない対照（ライセートの代わりに溶解緩衝液）もまた含めた。インキュベーション後、各反応からの１７５μＬを、２５μＬ　３５％H_2SO_4と混合し、３７℃で３０分間インキュベートした。試料を、ＬＣ１による分析のために解析に供した。この方法を使用して、野生型株ＧＥＶＯ１１８７が検出可能なＡＬＳを有さない一方で、ＡＬＳ発現株ＧＥＶＯ２２８０が０．６５単位／ｍｇライセートのＡＬＳ活性を有することを決定した。

【０４０９】

２つの株（異種ＡＬＳ組み込み発現構築物を含むまたは含まない）の性能を、次の振盪フラスコ発酵条件を使用して比較した。株を、０．２ｍｇ／ｍＬ　Ｇ４１８を含有するＹＰＤプレート上に貼り付けた。一晩の増殖後、細胞を、滅菌楊枝を用いてプレートから除去し、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を有する４ｍＬのＹＰＤ中に再懸濁させた。OD_{600}を、各培養物につき決定した。細胞を、５０ｇ／Ｌデキストロースおよび０．２ｍｇ／ｍＬ　Ｇ４１８を有する５０ｍＬ　ＹＰに添加して、その結果、０．１の最終OD_{600}を得た。ＡＬＳ発現を駆動するＣＵＰ１プロモーターを誘導するために、１ｍＭ硫酸銅を、２４時間時点で添加した。未使用の培地を、ＧＣおよびＬＣのためのブランク培地として作用するように、ならびに発酵のためのｔ＝０試料として作用するように、４℃で保管した。ｔ＝２４、４８、および７２時間で、試料をＧＣ１による分析のために調製し、７２時間で、試料をＬＣ１によって追加的に分析した。２４時間および４８時間時点で、各培養物の上清の１：１０希釈を、ＹＳＩによって分析した。必要な場合、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有する５０％グルコースを、１００ｇ／Ｌグルコースの最終濃度に添加した。発酵を、３０℃で、２５０ｒｐｍで振盪しながら行った。

【０４１０】

７２時間の振盪フラスコ発酵時点で到達したＤＨ２ＭＢ力価を、ＡＬＳを含まないＷＴ株（ＢＵＤ１１８７）、およびＰＤＣ１においてＰ$_{CUP1}$：Ｂｓ＿ａｌｓＳ２を発現する株（ＢＵＤ２２８０）の両方について、ＬＣ１法を使用して決定した。各株を、４構成成分プラスミドｐＧＶ２０８２で形質転換した。発酵を記載されるように行った。外来性ＡＬＳ発現を含まずには、株は、ＤＨ２ＭＢを産生しなかった一方で、ＡＬＳ発現を含む株は、最大１．４ｇ／Ｌ　ＤＨ２ＭＢに加えてＤＨＩＶを産生した。

実施例１１：ＡＬＳ発現のみが、ＤＨ２ＭＢ産生に必要である

【０４１１】

この実施例の目的は、ＡＬＳ活性のみが、Ｓ．セレビシエにおけるＤＨ２ＭＢ蓄積に関与することを実証することである。

【０４１２】

この実験を、ＡＬＳが単独で、またはＫＡＲＩ、ＤＨＡＤ、ＫＩＶＤ、ＡＤＨ発現プラスミドと組み合わせて、ＤＨ２ＭＢの産生に関与するのかを決定するために行った。この

実験に使用した株は、ＧＥＶＯ２６１８（ＭＡＴａ ｕｒａ３ ｌｅｕ２ ｈｉｓ３ ｔｒｐ１ ｐｄｃ１Δ：：［P_{CUP1}：Ｂｓ＿ａｌｓＳ１＿ｃｏＳｃ：ＴＲＰ１）であった。この実験で試験したプラスミドは、残りの４つの経路遺伝子を含有するｐＧＶ２２２７（－P_{TEF1}：Ｌｌ＿ｉｌｖＤ＿ｃｏＳｃ：P_{TDH3}：Ｅｃ＿ｉｌｖＣ＿ｃｏＳｃ^{Q110V}：P_{Sc_TPI1}：Ｇ４１８：P_{PGK1}：Ｌｌ＿ｋｉｖＤ２＿ｃｏＥｃ：ＰＤＣ１－３’領域：P_{ENO2}：Ｌｌ＿ａｄｈＡ ２μ ｂｌａ、ｐＵＣ－ｏｒｉ）、およびｐＧＶ２０２０、空ベクター対照（P_{Sc_TEF1}、P_{Sc_TPI1}、Ｇ４１８Ｒ、ＡＰｒ、２μ）であった。

【０４１３】

ｐＧＶ２０２０で形質転換したＧＥＶＯ２６１８およびｐＧＶ２２２７で形質転換したＧＥＶＯ２６１８の振盪フラスコ培養物を、２００ｍＭ ＭＥＳ ｐＨ６．５、および約０．１のＯＤ６００での０．４ｇ／Ｌ Ｇ４１８を含有するＹＰＤ（１５％グルコース）中で出発させ、振盪インキュベーター中で、３０℃および７５ｒｐｍでインキュベートした。試料を２４時間および４８時間時点で採取し、試料を、ＨＰＬＣ（ＬＣ１）およびＧＣ（ＧＣ１）によって、代謝物レベルについて分析した。４８時間後、全てのグルコースは、両株によって培地から消費された。空ベクターを含有する株（ＧＥＶＯ２６１８＋ｐＧＶ２０２０）は、収率３．８％を表す、４．６ｇ／ＬのＤＨＩＶ＋ＤＨ２ＭＢを産生した。追加の４つの経路遺伝子を発現するベクター（ＧＥＶＯ２６１８＋ｐＧＶ２２２７）を含有する株は、収率３．１％を表す、５．６ｇ／Ｌ ＤＨＩＶ＋ＤＨ２ＭＢの同様の力価を産生した。

実施例１２：増加されたＫＡＲＩ活性の、ＤＨ２ＭＢ産生に及ぼす効果

【０４１４】

この実施例の目的は、増加されたＫＡＲＩ活性が、ＡＬＳ活性を含む酵母中の、ＤＨ２ＭＢ産生の減少をもたらすことを実証することである。

【０４１５】

この実施例に開示される株およびプラスミドを、それぞれ表３６および３７に示す。

【表３６】

実施例１２に開示される株の遺伝子型。

株	遺伝子型
GEVO2843	S.セレビシエ、*MATa ura3 leu2 his3 trp1 pdc1Δ::P_{CUP1}:[Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD2:P_{ENO2}:Sp_HIS5] pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}] pdc6Δ::[URA3:bla:P_{TEF1}:Ll_kivD2:P_{TDH3}:Dm_ADH]* {C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}

【表３７】

実施例１２に開示されるプラスミド。

プラスミド	遺伝子型
pGV2196	*CEN, ARS, hph, bla, pUC-ori.*
pGV2377	*P_{TEF1}: Ll_ilvD_coSc, P_{ScPGK1}: Ll_kivD_coEc, P_{ScENO2}: Ll_adhA, 2μ ori, pUC ori, bla, G418R*
pGV2466	*P_{TEF1}: Ll_ilvD_coSc, P_{SCTDH3}: Ec_ilvC_coSc^{his6}, P_{ScPGK1}: Ll_kivD_coEc, P_{ScENO2}: Ll_adhA, 2μ ori, pUC ori, bla, G418R*
pGV2398	*P_{TEF1}: Ll_ilvD_coSc, P_{SCTDH3}: Ec_ilvC_coSc$^{Q110V\text{-}his6}$, P_{ScPGK1}: Ll_kivD_coEc, P_{ScENO2}:Ll_adhA, 2μ ori, pUC ori, bla, G418R*
pGV2400	*P_{TEF1}: Ll_ilvD_coSc, P_{SCTDH3}: Ec_ilvC_coSc$^{P2D1\text{-}A1\text{-}his6}$, P_{ScPGK1}: Ll_kivD_coEc, P_{ScENO2}: Ll_adhA, 2μ ori, pUC ori, bla, G418R*
pGV2406	*$P_{Sc\ TEF1}$: Ec_ilvC_coSc$^{Q110V\text{-}his6}$, CEN, ARS, hph, bla, pUC ori.*

【０４１６】

野生型または操作されＫＡＲＩの発現が、ＤＨ２ＭＢのより高い蓄積をもたらすかどう

かを決定するために、Ｓ．セレビシエ株ＧＥＶＯ２８４３を、記載されるように、２μプラスミドｐＧＶ２３７７、ｐＧＶ２４６６、ｐＧＶ２３９８、およびｐＧＶ２４００で形質転換した。

【０４１７】

２μプラスミド（ｐＧＶ２３７７、２４６６、２３９８、２４００）で形質転換したＧＥＶＯ２８４３の前培養物を、１％エタノールおよび０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有するＹＰＤ中で出発させ、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。これらの前培養物を使用して、バッフル付フラスコ中の５０ｍＬの同じ培地に植菌し、約５のOD_{600}に到達するまで、３０℃および２５０ｒｐｍでインキュベートした。それらを、５０ｍＬファルコン管中で、２７００ｒｃｆで５分間、２５℃でペレット化した。次に、各５０ｍＬ培養物からの細胞を、８％グルコース、１％（ｖ／ｖ）エタノール、エルゴステロール、Ｔｗｅｅｎ－８０、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８、および２００ｍＭ　ＭＥＳ、ｐＨ６．５を含有する、５０ｍＬ　ＹＰＤ中に再懸濁させた。培養物を２５０ｍＬバッフルなしフラスコに添加し、インキュベーター中に３０℃および７５ｒｐｍで配置した。７２時間後、試料を採取して、OD_{600}を決定し、細胞外代謝物について、ＧＣ１およびＬＣ１分析を介して発酵ブロスを分析した。

【０４１８】

表３８は、ｐＧＶ２３７７で形質転換した株（プラスミドからいかなるＫＡＲＩ遺伝子も過剰発現しない）が、組み合わせＤＨ２ＭＢ＋ＤＨＩＶに対して、１５％の最も高い炭素収率を産生した一方で、ｐＧＶ２４６６（$Ec_ilvC_coSc^{his6}$を含有する）、ｐＧＶ２３９８（$Ec_ilvC_coSc^{Q110V-his6}$を含有する）、およびｐＧＶ２４００（$Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1-his6}$を含有する）を有する株は、８～１０％の同様のＤＨ２ＭＢ＋ＤＨＩＶ総合炭素収率を有したことを示す。同様に、ｐＧＶ２３７７で形質転換した株は、６％の最も低い炭素収率でイソブタノールを産生した。プラスミド上にＫＡＲＩ遺伝子を含む残った株は、より高い炭素収率でイソブタノールを産生した。減少されたＤＨ２ＭＢ産生が、増加されたイソブタノール産生と相関するという観察は、ＤＨ２ＭＢが、アセト乳酸から、ＫＡＲＩを伴わない反応を介して産生されるという知見と一致する。

【表３８】

イソブタノールおよび総合ＤＨ２ＭＢ＋ＤＨＩＶ炭素収率

株	プラスミド	KARI	イソブタノール炭素収率[%]	DH2MB+DHIV 炭素収率[%]
GEVO2843	pGV2377	n/a	6	15
GEVO2843	pGV2466	$Ec_ilvC_coSc^{his6}$	18	8
GEVO2843	pGV2398	$Ec_ilvC_coSc^{Q110V-his6}$	15	8
GEVO2843	pGV2400	$Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1-his6}$	18	10

【０４１９】

株がプラスミドからＫＡＲＩを発現しないか、低レベルのＫＡＲＩを発現するか、または高レベルのＫＡＲＩを発現するかのいずれかである、第２の実験を行った。この実験において、細胞ライセートのＫＡＲＩ活性を測定した。

【０４２０】

Ｓ．セレビシエ株ＧＥＶＯ２８４３を、記載されるように、表３７に記載されるプラスミドの組み合わせで形質転換した。ＫＡＲＩなし株はｐＧＶ２３７７＋ｐＧＶ２１９６を含有し、プラスミドが担持するＫＡＲＩを有さず、低ＫＡＲＩ株はｐＧＶ２３７７＋ｐＧＶ２４０６を含有し、低コピープラスミドからＫＡＲＩを発現し、高いＫＡＲＩ株はｐＧＶ２３９８＋ｐＧＶ２１９６を含有し、高コピープラスミドからＫＡＲＩを発現した。発酵および試料採取を記載されるように行った。ＧＣ１法およびＬＣ１法を、記載されるように行った。ＫＡＲＩアッセイのための細胞を、記載されるように溶解させたが、溶解緩衝液は、２５０ｍＭ　KPO_4　ｐＨ７．５、１０ｍＭ　$MgCl_2$、および１ｍＭ　Ｄ

ＴＴであったことが異なっていた。ライセートのタンパク質濃度を、記載されるように決定した。

【０４２１】

体外ＫＡＲＩ活性を測定するために、アセト乳酸基質を、５０μＬのエチル－２アセトキシ－２－メチル－アセト酢酸塩を９９０μＬの水と混合することによって作製した。次に、１０μＬの２Ｎ　ＮａＯＨを、添加の間に１５秒間ボルテックス混合を行いながら、２６０μＬのＮａＯＨが添加されるまで順次添加した。アセト乳酸を室温で２０分間撹拌し、氷上で保有した。ＮＡＤＰＨを、０．０１Ｎ　ＮａＯＨ中で５０ｍＭの濃度になるまで調製した。濃度を、希釈した試料のＯＤを分光光度計において３４０ｎｍで読み取ることによって、また正確な濃度を算出するために６．２２$M^{-1}cm^{-1}$のモル吸光係数を使用することによって決定した。３つの緩衝液を調製し、氷上で保有した。反応緩衝液は、２５０ｍＭ　KPO_4　ｐＨ７．５、１０ｍＭ　$MgCl_2$、１ｍＭ　ＤＴＴ、１０ｍＭアセト乳酸、および０．２ｍＭ　ＮＡＤＰＨを含有した。基質を含まない緩衝液は、アセト乳酸を含まなかった。ＮＡＤＰＨを含まない緩衝液は、ＮＡＤＰＨを欠損していた。反応を、１０μＬの細胞抽出物を使用して、９０μＬの反応緩衝液と共に、９６ウェルプレート中、３４０ＰＣマルチプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）において、３系列で行った。反応を、動力学的曲線を５分間測定することによって、ＯＤ読取りを１０秒毎に３０℃で行いながら、３４０ｎｍで追跡した。各抽出物についてのＶｍａｘを、基質を含まない対照のバックグラウンド読取りを完全緩衝液中の読取りから差し引いた後に決定した。

【０４２２】

表３９は、ＫＡＲＩ活性について、ならびにイソブタノールおよび組み合わせＤＨ２ＭＢ＋ＤＨＩＶについての％単位の炭素収率についてのデータを示す。ＫＡＲＩ活性が増加するにつれて、イソブタノール炭素収率は増加し、ＤＨ２ＭＢ＋ＤＨＩＶの総合炭素収率は減少した。

【表３９】

ＫＡＲＩ活性、イソブタノールおよびＤＨ２ＭＢ＋ＤＨＩＶ総合炭素収率。

株	プラスミド	KARI活性μmol/分/mg	イソブタノール炭素収率[%]	DH2MB+DHIV炭素収率[%]
GEVO2843	pGV2377+pGV2196	0.011 ± .002	5	19
GEVO2843	pGV2377+pGV2406	0.030*	11*	16*
GEVO2843	pGV2398+pGV2196	0.151 ± .005	19	11

＊このデータは、１つの試料のみを含む

実施例１３：増加されたＤＨＡＤ活性の効果

【０４２３】

この実施例の目的は、増加されたＤＨＡＤ活性が、ＡＬＳ活性を含む酵母中の、ＤＨ２ＭＢ産生の減少をもたらすことを実証することである。

【０４２４】

この実施例に開示される株およびプラスミドを、それぞれ表４０および４１に示す。

【０４２５】

ＧＥＶＯ２８４３を、異なる対のプラスミドで形質転換した。株Ａは、ｐＧＶ２２２７に加えてｐＧＶ２１９６を含有する。株Ｂは、ｐＧＶ２２８４に加えてｐＧＶ２１９６含有する。株Ｃは、ｐＧＶ２２８４に加えてｐＧＶ２３３６を含有する。３つの２プラスミド組み合わせのうちの１つを含む、ＢＵＤ２８４３の単一の形質転換体を、ハイグロマイシンを含有するＹＰＤプレート上で、単一のコロニーで精製し、貼り付けられた細胞を使用して、１％エタノール（ｖ／ｖ）、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８、および０．１ｇ／Ｌハイ

グロマイシンを含有する、３ｍＬ　ＹＰＤに植菌した。培養物を、３０℃、２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした後、それらを使用して、１％エタノール（ｖ／ｖ）、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８、および０．１ｇ／Ｌハイグロマイシンを含有する３ｍＬ　ＹＰＤに植菌した。これらの培養物を、３０℃、２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。翌日、培養物を使用して、８％グルコース、２００ｍＭ　ＭＥＳ　ｐＨ６．５、エルゴステロール、およびＴｗｅｅｎ８０を含有する、５０ｍＬ　ＹＰＤに、およそ０．１のOD_{600}になるまで植菌した。これらの培養物を、３０℃、２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。翌日、培養物を、５０ｍＬの同じ培地中に、約０．１のOD_{600}になるまで希釈した。培養物を、３０℃、２５０ｒｐｍでインキュベートし、０、２４、４７、７０、および９２時間のインキュベーション後に、１．５ｍＬ試料を除去した。試料を、記載されるようにＧＣおよびＬＣ分析のために調製した。９２時間後、全ての試料の残りを、遠心分離し、ペレットを計量し、－８０℃で保管した。ＤＨＡＤアッセイを、記載されるように凍結ペレットから調製したライセートを用いて行った。ＬＣ１およびＧＣ１分析を、記載されるように行った。

【表４０】

実施例１３に開示される株の遺伝子型。

株	遺伝子型
GEVO2843	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD:P_{ENO2}:Sp_HIS5] pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}] pdc6Δ::[URA3:bla:P_{TEF1}:Ll_kivD:P_{TDH3}:DmADH]* {C2添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}

【表４１】

実施例１３に開示されるプラスミド。

プラスミド	遺伝子型
pGV2227	P_{Sc_TEF1}: *Ll_ilvD_coSc*, P_{Sc_TDH3}: *Ec_ilvC_coSc*^{Q110V}, P_{Sc_TPI1}: *G418*, P_{Sc_PGK1}: *Ll_kivD_coEc*, P_{Sc_ENO2}: *Ll_adhA*, 2μ, AP^r, PMB1
pGV2284	P_{Sc_TEF1}, P_{Sc_TDH3}: *Ec_ilvC_coSc*$^{P2D1\text{-}A1}$, P_{Sc_TPI1}: *G418*, P_{Sc_PGK1}: *Ll_kivD_coEc*, P_{Sc_ENO2}: *Ll_adhA*, 2μ, AP^r, PMB1
pGV2196	P_{Sc_PGK1} P_{Sc_TEF1}, P_{Sc_TPI1}: *hph*, CEN, AP^r, pUC ORI
pGV2336	P_{Sc_ENO}, T_{ScPDC6} P_{Sc_PGK}, P_{Sc_TEF1}: *Ll_ilvD_coSc* P_{Sc_TDH3}, P_{Sc_TPI1}: *hph*, CEN, AP^r, pUC ORI

【０４２６】

表４２は、ＤＨＡＤ活性、イソブタノール収率およびＤＨＩＶ＋ＤＨ２ＭＢ総合収率を示す。ｐＧＶ２２８４＋ｐＧＶ２１９６で形質転換した株（ＤＨＡＤはプラスミドから発現されない）は、ＤＨ２ＭＢ＋ＤＨＩＶ総合について１９％の最も高い炭素収率、および９％でイソブタノールの最も低い炭素収率を産生した。ｐＧＶ２２２７＋ｐＧＶ２１９６で形質転換した株（プラスミドからの最も高いＤＨＡＤ発現）は、ＤＨ２ＭＢ＋ＤＨＩＶ総合について９％の最も低い炭素収率、および１８％でイソブタノールについて最も高い炭素収率を有した。ｐＧＶ２２８４＋ｐＧＶ２３３６で形質転換した株（プラスミドからの低コピーＤＨＡＤ発現）は、ＤＨ２ＭＢ＋ＤＨＩＶ総合について１６％の、およびイソブタノールについて１２％の中程度の炭素収率を有した。

【表４２】
９２時間発酵時点での、ＤＨＡＤ活性、イソブタノールおよびＤＨ２ＭＢ＋ＤＨＩＶ総合炭素収率。

株	プラスミド	DHAD活性	イソブタノール炭素収率[%]	DH2MB+DHIV炭素収率[%]
A	pGV2227+pGV2196	0.29 ± 0.05	18	9
B	pGV2284+pGV2196	0.05 ± 0.00	9	19
C	pGV2284+pGV2336	0.08 ± 0.01	12	16

【０４２７】
第２の実験において、ＧＥＶＯ２８４３を、異なる対のプラスミドで形質転換し（表４３）、上記のように振盪フラスコ発酵において査定した。株Ｄは、ｐＧＶ２１９６に加えてｐＧＶ２５８９を含有する。株Ｅは、ｐＧＶ２５２９に加えてｐＧＶ２５８９を含有する。株Ｆは、ｐＧＶ２１９６に加えてｐＧＶ２４８５を含有する。ｐＧＶ２１９６＋ｐＧＶ２５８９で形質転換した株（プラスミド由来ＤＨＡＤなし）は、１．２５ｇ／Ｌイソブタノールおよび５．６７ｇ／Ｌ　ＤＨ２ＭＢ＋ＤＨＩＶを産生した。高コピープラスミド（ｐＧＶ２１９６＋ｐＧＶ２４８５）から発現されたＤＨＡＤを有する株は、２．７４ｇ／Ｌイソブタノールおよび３．７１ｇ／Ｌ　ＤＨ２ＭＢ＋ＤＨＩＶを産生し、ＤＨＡＤ発現の増加がＤＨ２ＭＢ＋ＤＨＩＶ蓄積の減少をもたらしたことを示す。低コピープラスミド（ｐＧＶ２５２９＋ｐＧＶ２４８５）から発現されたＤＨＡＤを有する株は、中程度レベルのＤＨＡＤ活性と一致して、中程度レベルの両代謝物を産生した。

【表４３】
実施例１３に開示される追加プラスミド。

プラスミド	遺伝子型
2196	*$P_{Sc\ PGK1}$, $P_{Sc\ TEF1}$, $P_{Sc\ TPI1}$hph, CEN, AP^r, pUC ORI*
2529	*$P_{Sc\ PGK1}$, $P_{Sc\ TEF1}$Ll_ilvD_coSc4, $P_{Sc\ TPI1}$hph, CEN, AP^r, pUC ORI*
2589	*$P_{Sc\ TDH3}$Ec_ilvC_coSc_Q110V, $P_{Sc\ TPI1}$G418R, $P_{Sc\ ENO2}$Ll_adhA, 2μ, AP^r, PMB1*

【表４４】
７２時間発酵時点での、ＤＨＡＤ活性、イソブタノール力価および収率、ならびにＤＨ２ＭＢ＋ＤＨＩＶ総合力価。

株	プラスミド（複数可）	プラスミド由来DHAD	イソブタノール力価（g/L）	イソブタノール収率（%）	DH2MB+DHIV（g/L）
D	pGV2196+pGV2589	なし	1.25 ± 0.27	16.1	5.67 ± 0.29
E	pGV2529+pGV2589	低コピー	2.15 ± 0.05	24.8	5.00 ± 0.20
F	pGV2196+pGV2485	高コピー	2.74 ± 0.22	31.0	3.71 ± 0.11

実施例１４：標的化欠失によるＳ．セレビシエにおけるＴＭＡ２９の欠失

【０４２８】
次の実施例は、アセト乳酸シンターゼが過剰発現されるとき、Ｓ．セレビシエゲノムからのＴＭＡ２９遺伝子の欠失が、ＤＨ２ＭＢの産生を排除することを例証する。

【０４２９】
ＤＨ２ＭＢの産生を触媒し得る複数のレダクターゼ酵素候補を、ＴＭＡ２９遺伝子産物を含むＳ．セレビシエゲノムにおいて特定した。これらのレダクターゼをコードする遺伝子を、ＵＲＡ３マーカーの組み込みを使用して、ｇ／Ｌ量のＤＨ２ＭＢを産生することが知られる株である、Ｓ．セレビシエ株ＧＥＶＯ２６１８において欠失させた。ＴＭＡ２９を含む、候補遺伝子のうちのいずれかを欠失させることが、ＤＨ２ＭＢの産生を低減また

は排除するかどうかを決定するために、これらの株を用いて発酵を行った。

【０４３０】

株、プラスミド、およびプライマー配列を、それぞれ表４５、４６、および４７に列挙する。

【表４５】

実施例１４に開示される株の遺伝子型。

GEVO番号	遺伝子型
GEVO1187	S.セレビシエCEN.PK2 *MAT*a *ura3-52 leu2-3_112 his3Δ1 trp1-289 ADE2*
GEVO2618	*S.*セレビシエ、*MAT*a *ura3 leu2 his3 trp1 pdc1Δ::[$P_{CUP1\text{-}1}$:Bs_alsS1_coSc:TRP1].*
GEVO3638	*S.*セレビシエ、*MAT*a *ura3 leu2 his3 trp1 pdc1Δ::[$P_{CUP1\text{-}1}$:Bs_alsS1_coSc:TRP1] tma29Δ::[$T_{Kl\ URA3\ short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:$T_{Kl\ URA3}$]*
GEVO3639	*S.*セレビシエ、*MAT*a *ura3 leu2 his3 trp1 pdc1Δ::[$P_{CUP1\text{-}1}$:Bs_alsS1_coSc:TRP1] tma29Δ::[$T_{Kl\ URA3\ short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:$T_{Kl\ URA3}$]*
GEVO3640	*S.*セレビシエ、*MAT*a *ura3 leu2 his3 trp1 pdc1Δ::[$P_{CUP1\text{-}1}$:Bs_alsS1_coSc:TRP1] tma29Δ::[$T_{Kl\ URA3\ short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:$T_{Kl\ URA3}$]*

【表４６】

実施例１４に開示されるプラスミド。

プラスミド名	遺伝子型
pGV1299	*Kl_URA3, bla, pUC-ori*
pGV2129	*Kl_URA3-5', bla.*

【表４７】

実施例１４に開示されるオリゴヌクレオチド配列。

oGV番号	配列
893	GGATGTGAAGTCGTTGACACAG（配列番号118）
2231	TTGAAACGTTGGGTCCATAC（配列番号119）
2232	TTCACCGTGTGCTAGAGAAC（配列番号120）
2862	TTATACAGGAAACTTAATAGAACAAATC（配列番号121）
2867	TGAAACAGCATGGCGCATAG（配列番号122）
2869	CTGTGTCAACGACTTCACATCCGAGGTAACGAGGAACAAGCC（配列番号123）
2870	TTTCGCCGGTATATTCCGTAG（配列番号124）
2891	GTTCTATTAAGTTTCCTGTATAACGGCATTGTTCACCAGAATGTC（配列番号125）
2902	TCCCGACGGCTGCTAGAATG（配列番号126）
2904	CGCTCCCCATTAATTATACA（配列番号127）
2913	GAAAGGCTCTTGGCAGTGAC（配列番号128）
2914	GCCCTGGTGCAATTAGAATG（配列番号129）
2915	TGCAGAGGGTGATGAGTAAG（配列番号130）
2916	GGCCAAAGGTAAGGAGAACG（配列番号131）

【０４３１】

株構築：Ｓ．セレビシエ株ＧＥＶＯ３６３８、ＧＥＶＯ３６３９、およびＧＥＶＯ３６４０を、ＧＥＶＯ２６１８を二連組み込みＳＯＥ　ＰＣＲ産物で形質転換して、ＴＭＡ２９をＵＲＡ３マーカーと置き換えることによって構築した。レダクターゼ遺伝子に対する５’および３’標的配列を増幅するためのプライマーを、ＵＲＡ３断片と相同な２０ｂｐ配列を用いて設計した。これは、ＳＯＥ　ＰＣＲを使用して、ＵＲＡ３マーカーを含有する断片および目的のレダクターゼ遺伝子に隣接した相同領域を作り出すことができるように行った。ＰＣＲを、エッペンドルフマスターサイクラー（登録商標）（カタログ番号７１０８６、Ｎｏｖａｇｅｎ，Ｍａｄｉｓｏｎ　ＷＩ）上で行った。ＳＯＥ　ＰＣＲ断片を

生成するために使用したプライマー組について、次のＰＣＲプログラムに従った：９４℃で２分間、次いで（９４℃　３０秒間、５３℃　３０秒間、７２℃　１．５分間）を３０サイクル、次いで７２℃で１０分間。次のプライマー対およびテンプレートを、ＳＯＥ反応の第１のステップに使用した。

【０４３２】

５’ＵＲＡ３断片を生成するために、ｏＧＶ２２３２およびｏＧＶ２８６２を使用して、テンプレートとしてｐＧＶ２１２９を使用して５’ＵＲＡ３断片を増幅した。１３６４ｂｐの断片を、ゲル電気泳動によって精製した。３’ＵＲＡ３　断片を生成するために、ｏＧＶ２２３１およびｏＧＶ８９３を使用して、テンプレートとしてｐＧＶ１２９９を使用して３’ＵＲＡ３断片を増幅した。１１１５ｂｐの断片を、ゲル電気泳動によって精製した。

【０４３３】

５’ＴＭＡ２９断片を生成するために、ｏＧＶ２８６７およびｏＧＶ２８９１を使用して、テンプレートとしてＳ．セレビシエＳ２８８ｃゲノムＤＮＡを使用して５’ＴＭＡ２９断片を増幅した。Ｓ．セレビシエＳ２８８ｃ株を、ＡＴＣＣ（ＡＴＣＣ番号２０４５０８）から購入した。４１２ｂｐの断片を、ゲル電気泳動によって精製した。３’ＴＭＡ２９断片を生成するために、ｏＧＶ２８６９およびｏＧＶ２８７０を使用して、テンプレートとしてＳ．セレビシエＳ２８８ｃゲノムＤＮＡを使用して３’ＴＭＡ２９断片を増幅した。３０５ｂｐの断片を、ゲル電気泳動によって精製した。

【０４３４】

次のプライマー対およびテンプレートを使用して、ＳＯＥ　ＰＣＲ産物を生成した。５’ＴＭＡ２９　ＳＯＥ　ＰＣＲ産物を生成するために、ｏＧＶ２２３２およびｏＧＶ２８６７を使用した。５’ＵＲＡ３断片および５’ＴＭＡ２９断片を、テンプレートとして使用した。３’ＴＭＡ２９　ＳＯＥ　ＰＣＲ産物を生成するために、ｏＧＶ２２３１およびｏＧＶ２８７０を使用した。３’ＵＲＡ３断片および３’ＴＭＡ２９断片を、テンプレートとして使用した。

【０４３５】

Ｓ．セレビシエ株ＧＥＶＯ２６１８の、二連組み込みＳＯＥ　ＰＣＲ産物での形質転換を、記載されるように行った。形質転換に続いて、細胞を、遠心分離によって収集し（１８，０００×ｇ、１０秒間、２５℃）、４００μＬ　ＳＣＤ－ＨＬＷＵ培地中に再懸濁させた。組み込み形質転換体を、形質転換された細胞をＳＣＤ－Ｕｒａ寒天培地上にプレートすることによって選択した。一旦、形質転換体を単一のコロニーで精製すると、それらをＳＣＤ－Ｕｒａプレート上で維持した。

【０４３６】

コロニーＰＣＲを使用して、正しい組み込みを検証した。正しい５’末端についてスクリーニングするために、ＵＲＡ３：ＴＭＡ２９　５’ジャンクションプライマーｏＧＶ２９１５およびｏＧＶ２９０２を使用して、９９１ｂｐでの予想バンドを得た。正しい３’末端についてスクリーニングするために、ＵＲＡ３：ＴＭＡ２９　３’ジャンクションプライマーｏＧＶ２９０４およびｏＧＶ２９１６を使用して、９３３ｂｐでの予想バンドを得た。ＣＤＳが欠失される場合、２８８ｂｐの欠如を予想して、ＴＭＡ２９遺伝子の欠失をスクリーニングするために、プライマーｏＧＶ２９１３およびｏＧＶ２９１４を使用した。

【０４３７】

発酵：ｔｍａ２９Δ株ＧＥＶＯ３６３８、ＧＥＶＯ３６３９、およびＧＥＶＯ３６４０、ならびに親ＴＭＡ２９株ＧＥＶＯ２６１８を用いて発酵を行った。培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで振盪しながら、ＹＰＤ中で出発させた。４回の倍加後、OD_{600}を、各培養物につき決定した。細胞を、０．０５の最終OD_{600}が得られるように、１５％グルコースを含む５０ｍＬ　ＹＰＤに添加した。ｔ＝２４時間で、２ｍＬの培地を除去し、OD_{600}を決定するために、２５μＬを１：４０希釈で使用した。残りの培養物を、微量遠心機中で、最大速度で１０分間遠心分離し、１ｍＬの上清を除去し、ＬＣ１およ

びＬＣ４分析に供した。ｔ＝４８時間で、２ｍＬの培地を除去し、OD_{600}を決定するために、２５μＬを１：４０希釈で使用した。１ｍＬの上清を、ＬＣ１分析に供した。加えて、１４ｍＬを、２７００×ｇでの遠心分離によって収集した。培地の除去後、細胞を、滅菌dH_2O中に再懸濁させ、２７００×ｇで遠心分離し、残りの培地を、１ｍＬピペットチップを用いて注意深く除去した。細胞ペレットを計量し（空の管を事前計量した）、記載されるＡＬＳアッセイのために解凍するまで－８０℃で凍結させた。

【０４３８】

ＤＨ２ＭＢの産生は、異種ＡＬＳ発現、例えば、Ｂｓ＿ａｌｓＳ１＿ｃｏＳｃ遺伝子に依存する。細胞ライセートのＡＬＳ活性を記載されるように測定して、ＴＭＡ２９欠失が、ＡＬＳ発現および／または活性に対する影響を有さなかったことを実証した。ＴＭＡ２９欠失を担持する株からの抽出物のＡＬＳ活性は、親株からの抽出物の活性以上であり、それよりも若干高い。２４時間（ＡＬＳ活性については４８時間）時点での結果を表４８に要約し、それはＴＭＡ２９欠失を伴う株中のＤＨ２ＭＢ産生の欠如を明確に実証する。ＬＣ４分析により、ＧＥＶＯ３５２７がＤＨＩＶを産生しなかったことが確認された。

【表４８】

ＴＭＡ２９欠失を伴う株中でのＤＨ２ＭＢの産生。

株	OD_{600}	LC1によって消費されたグルコース[g/L]	LC1によるDH2MB [g/L]	ALS活性 [U/mg]
GEVO2618	9.2 ± 0.9	61.56 ± 12.0	1.51 ± 0.1	0.44 ± 0.06
GEVO3638、GEVO3639、GEVO3640（*tma29Δ*）	12.5 ± 5.0	68.44 ± 12.5	0.00 ± 0.0	0.57 ± 0.04

実施例１５：欠失ライブラリによるＳ．セレビシエにおけるＴＭＡ２９の欠失

【０４３９】

次の実施例は、アセト乳酸シンターゼが過剰発現されるとき、Ｓ．セレビシエゲノムからのＴＭＡ２９遺伝子の欠失が、ＤＨ２ＭＢの産生を排除することを例証する。

【０４４０】

株、ＯＲＦ欠失、およびプラスミドを、表４９、５０、および５１に列挙する。

【表４９】

実施例１５に開示される株の遺伝子型。

GEVO 番号	遺伝子型/源
GEVO3527	S.セレビシエ *BY4742:MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0* /ATCC 番号 201389、ATCC 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110-2209 から購入

【表５０】

実施例１５に開示されるＯＲＦ欠失。

ORF欠失	遺伝子名	源
YMR226C	*TMA29*	欠失ライブラリは、Open Biosystems, カタログ番号YSC 1054から得た

【表５１】

実施例１５に開示されるプラスミド。

プラスミド	関連する遺伝子
pGV2435	P_{ScCUP1}: *Bs_alsS1_coSc*:P_{ScTPI1}:*hph*:T_{ScCYC1}, *CEN/ARS, bla, pUC-ori*

【０４４１】

１株当たり１つの遺伝子／ＯＲＦ欠失を有する、Ｓ．セレビシエ株の商業用ライブラリ

を使用して、ＤＨ２ＭＢの産生を触媒する可能性がある欠失についてスクリーニングした。ＴＭＡ２９（すなわち、ＹＭＲ２２６Ｃ）ＯＲＦの欠失を含有する候補株を選択した。外来性ＡＬＳ発現がＤＨ２ＭＢの産生に必要であるため、ＣＵＰ１プロモーターによって駆動されるＢｓ＿ａｌｓＳ１＿ｃｏＳｃ遺伝子を含有するＣＥＮプラスミド（ｐＧＶ２４３５）を、記載されるように株中に形質転換した。形質転換体を３０℃、２５０ｒｐｍで一晩回収した後、０．２ｇ／Ｌハイグロマイシンを含有するＹＰＤプレート上にプレートした。形質転換体を次いで、０．２ｇ／Ｌハイグロマイシンを含有するＹＰＤプレート上に貼り付け、３０℃でインキュベートした。

【０４４２】

ＴＭＡ２９（ＹＭＲ２２６Ｃ）を欠失させることが、ＤＨ２ＭＢの産生を低減または排除するをかどうかを決定するために、これらの株を用いて発酵を行った。各株の３つの独立した形質転換体を使用して、飽和するまで一晩増殖させた発酵前培養物を、０．２ｇ／ＬハイグロマイシンをＹＰＤ中で、３０℃および２５０ｒｐｍで植菌した。翌日、前培養物のOD_{600}を測定し、５０ｍＬ培養物を０．１のOD_{600}になるまで植菌するために必要とされる一晩の培養物の容量を、各培養物につき算出した。２５０ｍＬバッフルなしフラスコ中、１５０ｇ／Ｌグルコース、２００ｍＭ ＭＥＳ、ｐＨ６．５、および０．２ｇ／ＬハイグロマイシンをＹＰＤに、算出した量の一晩の培養物を植菌した。細胞を、オービタルシェーカー中、３０℃および７５ｒｐｍでインキュベートした。２４時間時点で、全ての培養物に、追加的な７５ｇ／Ｌのグルコースを、８．８ｍＬの５０％グルコース溶液の各フラスコへの添加によって供給し、次いで３０℃および７５ｒｐｍでのインキュベーションに戻った。７２時間時点で、１．５ｍＬを、各フラスコ（７５０μＬを２つのエッペンドルフ管に分割）から試料採取した。OD_{600}を、各培養物（H_2O中、１：４０希釈）につき測定した。細胞を、１４０００×ｇ以上で１０分間の遠心分離によって、試料から除去した。試料からの上清を収集し、ＬＣ１によって分析するまで４℃で保管し、細胞ペレットを、記載されるＡＬＳアッセイのために解凍するまで－８０℃で保管した。

【０４４３】

２つの株の間の増殖には幾らかの変形が存在し、７２時間時点で、OD_{600}値はＧＥＶＯ３５２７について１３．７、およびＴＭＡ２９欠失株について１５．７であった（表５２）。株は、７２時間までに約２２３ｇ／Ｌの同じ量のグルコースを消費した（表５２）。ＧＥＶＯ３５２７は、７２時間までに２．８ｇ／ＬのＤＨ２ＭＢを産生した。ＹＭＲ２２６Ｃ欠失株（ｔｍａ２９Δ）は、検出可能なレベルのＤＨ２ＭＢを産生しなかった。ＧＥＶＯ３５２７に対して比ＤＨ２ＭＢ力価は、０．２ｇ／Ｌ／ＯＤであり、ＹＭＲ２２６Ｃ欠失株（ｔｍａ２９Δ）は、検出可能なレベルのＤＨ２ＭＢを産生しなかった。ＬＣ４分析により、ＧＥＶＯ３５２７がＤＨＩＶを産生しなかったことが確認された。

【表５２】

７２時間時点での細胞増殖、グルコース消費、およびＤＨ２ＭＢ産生。

株	OD_{600}	LC1によって消費されたグルコース[g/L]	LC1 による DH2MB 力価 [g/L]	比 DH2MB 力価 [g/L/OD]
GEVO3527	13.7 ± 0.3	223.3 ± 0.6	2.8 ± 0.1	0.2 ± 0.01
***TMA29*Δ**	15.7 ± 5.5	223.9 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

実施例１６：Ｓ．セレビシエにおけるＴＭＡ２９遺伝子の欠失により改善されたイソブタノール率、収率、および力価

【０４４４】

次の実施例は、Ｓ．セレビシエゲノムからのＴＭＡ２９遺伝子の欠失が、所望の産物、イソブタノールの生産性、収率、および力価の増加をもたらすことを例証する。加えて、それは、ＤＨ２ＭＢ生産性、収率、および力価の減少をもたらす。

【０４４５】

ＤＨ２ＭＢは、酵母中のアセト乳酸代謝の副産物である。イソブタノール発酵において、ＤＨ２ＭＢは、炭素収率の１０％以上を構成する可能性がある。野生型ＴＭＡ２９を有する株は、Ｂｓ＿ａｌｓＳ１＿ｃｏＳｃ（配列番号２３）によってコードされる、発現されたアセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）の存在下でＤＨ２ＭＢを産生する。ＴＭＡ２９が欠失された株は、発現されたＢｓ＿ａｌｓＳ１＿ｃｏＳｃの存在下でＤＨ２ＭＢを産生しない。染色体からＡＬＳ（Ｂｓ＿ａｌｓＳ１＿ｃｏＳｃ）を発現する全てのＰＤＣおよびＧＰＤ遺伝子が欠失された酵母株を、ＴＭＡ２９について欠失させ、高コピー４構成成分イソブタノール経路プラスミド、ＤＨＡＤ（Ｌｌ＿ｉｌｖＤ＿ｃｏＳｃ）、ＫＡＲＩ（Ｅｃ＿ｉｌｖＣ＿ｃｏＳｃ$^{Ｐ２Ｄ１－Ａ１－ｈｉｓ６}$）、ＫＩＶＤ（Ｌｌ＿ｋｉｖＤ２＿ｃｏＥｃ）、およびＡＤＨ（Ｌｌ＿ａｄｈＡ＿ｃｏＳｃ$^{ＲＥ１－ｈｉｓ６}$）に対する遺伝子を有するｐＧＶ２５５０で形質転換した。この株のイソブタノール力価、収率、および生産性を、ＴＭＡ２９遺伝子が欠失されていない親株のそれらと、振盪フラスコ発酵において、および発酵槽においの両方で比較した。株およびプラスミドを、それぞれ表５３および５４に列挙する。

【表５３】

実施例１６に開示される株の遺伝子型。

GEVO番号	遺伝子型
GEVO1187	S.セレビシエCEN.PK2 *MAT*a *ura3 leu2 his3 trp1 ADE2*
GEVO3351	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[TKl_URA3] gpd2 Δ::TKl_URA3 pdc1 Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD-P_{ENO2}:Sp_HIS5] pdc5 Δ::[LEU2;bla;P_{TEF1}:ILV3ΔN;P_{TDH3};ilvC_coSc^{Q110V}] pdc6 Δ::[P_{TEF}-Ll_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]* {C2添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}
GEVO3663	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1::T_{Kl_URA3} gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::T_{Kl_URA3} pdc1 Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD-P_{ENO2}:Sp_HIS5] pdc5 Δ::[LEU2;bla;P_{TEF1}:ILV3ΔN;P_{TDH3};ilvC_coSc^{Q110V}] pdc6 Δ::[P_{TEF}-Ll_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1] tma29Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}]* {C2添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}
GEVO3690, GEVO3691, GEVO 3692	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::T_{Kl_URA3} pdc1 Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD-P_{ENO2}:Sp_HIS5] pdc5 Δ::[LEU2;bla;P_{TEF1}:ILV3ΔN;P_{TDH3};ilvC_coSc^{Q110V}] pdc6 Δ::[P_{TEF}-Ll_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]* pGV2550で形質転換した{C2添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}
GEVO3694, GEVO3695, GEVO3696 GEVO3697	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{Kl_URA3}] gpd2 Δ::T_{Kl_URA3} pdc1 Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD-P_{ENO2}:Sp_HIS5] pdc5 Δ::[LEU2;bla;P_{TEF1}:ILV3ΔN;P_{TDH3};ilvC_coSc^{Q110V}] pdc6 Δ::[P_{TEF}-Ll_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1}$:P_{ENO2}:Ll_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1] tma29Δ::[$T_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}]* pGV2550で形質転換した{C2添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}

【表５４】

実施例１６に開示されるプラスミド。

プラスミド名	遺伝子型
pGV1299	*Kl_URA3, bla,* pUC-ori.
pGV2129	*Kl_URA3-5', bla,* pUC ori
pGV2550	P_{ScTEF1}:Ll_ilvD_coS, P_{ScTDH3}:Ec_ilvC_coSc$^{P2D1-A1-his6}$:P_{ScPGK1}:Ll_kivD2_coEc: P_{ScENO2}:Ll_adhA_coSc$^{RE1-his6}$, *2μ-ori,* pUC-ori, *bla, G418R.*

【０４４６】

酵母株構築：ＧＥＶＯ３６６３を、ＧＥＶＯ３３５１を実施例１４に記載される二連組み込みＳＯＥ　ＰＣＲ産物で形質転換して、記載されるようにＴＭＡ２９をＵＲＡ３マーカーと置き換えることによって構築したが、形質転換後に、細胞を、３５０μＬ　ＳＣＤ

－Ｕｒａ培地中に再懸濁させた後、ＳＣＤ－Ｕｒａプレートに広げたことが異なっていた。

【０４４７】

Ｓ．セレビシエ株ＧＥＶＯ３６９０、ＧＥＶＯ３６９１、およびＧＥＶＯ３６９２を、ＧＥＶＯ３３５１をプラスミドｐＧＶ２５５０で形質転換することによって構築した。Ｓ．セレビシエ株ＧＥＶＯ３６９４、ＧＥＶＯ３６９５、およびＧＥＶＯ３６９７を、ＧＥＶＯ３６６３をプラスミドｐＧＶ２２５０で形質転換することによって構築した。手短に述べると、コンピテント細胞を、細胞を新たなプレートから１００μＬ　１００ｍＭ酢酸リチウム中に除去することによって調製した。細胞懸濁液を室温で３０分間インキュベートした。プラスミドＤＮＡを、記載されるように形質転換した。形質転換後、細胞を、１％エタノールを含有する４００μＬ　ＹＰＤ中に再懸濁させ、３０℃で６時間、２５０ｒｐｍで振盪しながらインキュベートした。細胞を次いで、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有するＹＰＤプレート上に広げた。形質転換体を、０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８プレートを含有するＹＰＤプレート上で、単一のコロニーで精製した。一旦、形質転換体を単一のコロニーで精製すると、それらを０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有するＹＰＤプレート上で維持した。

【０４４８】

発酵：振盪フラスコ発酵を行って、ＧＥＶＯ３６９０～ＧＥＶＯ３６９２（ＴＭＡ２９）の性能をＧＥＶＯ３６９４～ＧＥＶＯ３６９５およびＧＥＶＯ３６９７（ｔｍａ２９Δ）と比較した。培養物（３ｍＬ）を、１％エタノールおよび０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有するＹＰＤ中で出発させ、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。これらの培養物のOD_{600}を、約２０時間後に測定した。適切な量の各培養物を使用して、２５０ｍＬバッフル付フラスコ中の、１％エタノールおよび０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有する５０ｍＬのＹＰＤに、およそ０．１のOD_{600}になるまで植菌した。これらの前培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。培養物がおよそ５のOD_{600}に到達したとき、それらを５０ｍＬファルコン管中で、２７００ｒｐｍで５分間、２５℃で遠心分離した。各５０ｍＬ培養物からの細胞を、記載されるように５０ｍＬの発酵培地中に再懸濁させた。培養物を次いで、小さい通気孔を有する２５０ｍＬバッフルなしのねじ蓋フラスコ中に移し、３０℃および７５ｒｐｍでインキュベートした。２４および４８時間時点で、各フラスコからの試料を除去して、OD_{600}を測定し、ＧＣ１分析のために調製した。ＧＣ１のために、２ｍＬ試料をエッペンドルフ管中に除去し、微量遠心機中で１０分間、最大で遠心分離した。１ｍＬの上清をＧＣ１によって分析した。７２時間時点で、同じ手順を使用して、OD_{600}およびＧＣ分析のための細胞を収集し、加えて試料を、高性能液体クロマトグラフィー（ＬＣ１）によって、ＤＨ２ＭＢおよびＤＨＩＶ、ならびにグルコースを含む、有機酸について分析した。

【０４４９】

７２時間時点での結果を表５５に要約する。イソブタノール力価、収率、および率は、ＴＭＡ２９遺伝子の欠失により増加する一方で、ＤＨ２ＭＢ産生は、減少する。

【表５５】

７２時間時点でのイソブタノール力価、収率、および率の増加。

株	OD_{600}	消費されたグルコース[g/L]	産生されたイソブタノール[g/L]	イソブタノール収率[理論収率%]	イソブタノール率[g/L/時間]	産生されたDH2MB[g/L]
GEVO3690, GEVO3691, GEVO3692	8.3 ± 0.3	29.8 ± 1.3	5.5 ± 0.4	45.1 ± 4	0.08	3.1
GEVO3694, GEVO3695, GEVO3697 (*TMA29Δ*)	8.3 ± 0.7	33.4 ± 1.0	7.6 ± 0.2	55.1 ± 2	0.11	0.03

【０４５０】

加えて、ＧＥＶＯ３６９０～ＧＥＶＯ３６９１（ＴＭＡ２９）対ＧＥＶＯ３６９４～ＧＥＶＯ３６９６（ｔｍａ２９Δ）の性能もまた、発酵槽中で行った発酵において比較した。プレートした培養物を、２０ｇ／Ｌグルコース、１％ｖ／ｖエタノール、１００μＭＣｕＳＯ$_4$．５Ｈ$_2$Ｏ、および０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含む、８０ｍＬのＹＰ培地を含有する５００ｍＬバッフル付フラスコに移し、２５０ｒｐｍでのオービタルシェーカー中、３０℃で３４．５時間インキュベートした。フラスコ培養物を、個々の２Ｌトップドライブモーター発酵槽に、２０ｇ／Ｌグルコース、１％ｖ／ｖエタノール、１００μＭＣｕＳＯ$_4$．５Ｈ$_2$Ｏ、および０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有する、８０ｍＬのＹＰＤ培地の１．２Ｌの作業容量で移して、０．２の出発ＯＤ$_{600}$を得た。発酵槽を、２つの相好気性発酵において、６Ｎ　ＫＯＨで制御して、３０℃およびｐＨ６で作動させた。最初に、発酵槽を、１０ｍＭ／時間の増殖期酸素移動速度（ＯＴＲ）で、８５０ｒｐｍの固定撹拌および５ｓＬ／時間の空気のオーバーレイによって作動させた。培養物を、およそ６～７のＯＤ$_{600}$になるまで３１時間増殖させ、次いで即座に、撹拌を８５０ｒｐｍから３００ｒｐｍに、１１１時間の発酵の残り期間にわたって低減することによって、０．５ｍＭ／時間の産生曝気ＯＴＲに切り替えた。一定期間ごとに、各発酵槽からの試料を除去して、ＯＤ$_{600}$を測定し、ガスクロマトグラフィー（ＧＣ１）分析のために調製した。ＧＣのために、２ｍＬ試料をエッペンドルフ管中に除去し、微量遠心機中で１０分間、最大で遠心分離した。１ｍＬの上清を、ＧＣ１によって分析した（イソブタノール、他の代謝物）。７２時間時点で、同じ手順を使用して、ＯＤ$_{600}$およびＧＣ分析のための細胞を収集し、加えて試料を、高性能液体クロマトグラフィー（ＬＣ１）によって、有機酸およびグルコースについて分析した。

【０４５１】

１１１時間時点での結果を表５６に要約する。イソブタノール力価、収率、および率は、ＴＭＡ２９遺伝子の欠失により増加する。ＤＨ２ＭＢ産生は、検出不可能なレベルまで減少した。

【表５６】

１１１時間時点でのイソブタノール力価、収率、および率の増加。

株	OD_{600}	消費されたグルコース[a] [g/L]	産生されたイソブタノール[a] [g/L]	産生されたDH2MB[a] [g/L]	イソブタノール収率[b] [理論収率%]	イソブタノール率[b] [g/L/時間]
GEVO3690, GEVO3691 (*TMA29+*)	7.2 ± 0.7	29.7 ± 1.1	8.6 ± 0.1	2.9	62.4 ± 3	0.09
GEVO3694, GEVO3695, GEVO3696 (*TMA29Δ*)	7.4 ± 1.3	35.7 ± 3.9	12.3 ± 1.2	0	75.0 ± 0.01	0.14

[a]グルコース、イソブタノール、およびＤＨ２ＭＢ力価は、最終、すなわち、１１１時間の発酵時点の力価である。

[b]イソブタノール収率および率は、産生期のみ、すなわち、３１～１１１時間の発酵に基づいて算出する。

実施例１７：Ｓ．セレビシエにおけるＴＭＡ２９活性の決定

【０４５２】

次の実施例は、（Ｓ）－２－アセト乳酸還元活性が、ｔｍａ２９Δ株中で有意に減少されることを例証する。

【表５７】
実施例１７に開示される株の遺伝子型。

GEVO番号	遺伝子型	源
GEVO3527	*MATα his3Δ-1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ*	ATCC番号201389（BY4742）
GEVO3939	*MATα his3Δ-1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ tma29::kan*^{R}	OpenBiosystemsカタログ番号YSC1054（Yeast MATalphaコレクション）

【０４５３】
ＴＭＡ２９（ＹＭＲ２２６Ｃ）遺伝子が欠失された酵母株ＧＥＶＯ３９３９およびその親ＧＥＶＯ３５２７を、各株について３系列で、１４ｍＬ培養物管中、３ｍＬのＹＰＤに植菌することによって、各々３系列で培養した。培養物を、ＧＥＶＯ３５２７についてはＹＰＤ寒天プレート上の、ならびにＧＥＶＯ３９３９およびＧＥＶＯ３９４０については０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有するＹＰＤプレート上のパッチから出発させた。培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。翌日、一晩の培養物のOD_{600}を測定し、０．１のOD_{600}になるまで５０ｍＬ培養物に植菌するための各培養物の容量を算出した。算出した各培養物の容量を使用して、２５０ｍＬバッフル付フラスコ中の５０ｍＬのＹＰＤに植菌し、培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍでインキュベートした。

【０４５４】
細胞を、７時間の増殖後に、１．６～２．１のＯＤの対数期中期の間に採取した。培養物を事前計量した５０ｍＬファルコン管に移し、細胞を、３０００×ｇで５分間の遠心分離によって収集した。培地の除去後、細胞を、１０ｍＬ　ＭｉｌｌｉＱ　H_2Oで洗浄した。水の除去後、細胞を、３０００×ｇで５分間、再び遠心分離し、残った水を、１ｍＬピペットチップを使用して注意深く除去した。細胞ペレットを計量し、次いで、更に使用するまで－８０℃で保管した。

【０４５５】
細胞ペレットを氷上で解凍し、溶解緩衝液（１０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７．０、１ｍＭジチオスレイトール、５％ｗ／ｖグリセロール）中に再懸濁させて、結果として２０質量％細胞懸濁液を得た。１ｍＬのガラスビーズ（直径０．５ｍｍ）を、各試料につき、１．５ｍＬエッペンドルフ管に添加し、８５０μＬの細胞懸濁液を添加した。酵母細胞を、Ｒｅｔｓｃｈ　ＭＭ３０１ミキサーミル（Ｒｅｔｓｃｈ　Ｉｎｃ．Ｎｅｗｔｏｗｎ，ＰＡ）を使用して、間に氷上で１分間インキュベーションしながら、各々最高速度で６×１分間混合し、溶解させた。管を、２１，５００×ｇで１０分間、４℃で遠心分離し、上清を、新たな管に移した。抽出物を、記載されるようにＴＭＡ２９アッセイを使用してアッセイするまで、それらを氷上で保有した。

【０４５６】
野生型ＭＡＴαＳ．セレビシエ株である、ＧＥＶＯ３５２７ライセートにおけるＳ．セレビシエＴＭＡ２９の、（Ｓ）－２－アセト乳酸の還元についての比活性は、６．９　±　０．２ｍＵ／ｍｇであった。ｔｍａ２９Δ株ＧＥＶＯ３９３９は、０．７　±　０．３ｍＵ／ｍｇの比活性を有した。野生型ＧＥＶＯ３５２７株は、欠失株よりも約１０倍高い比ＴＭＡ２９活性を有した。

実施例１８．クルイベロミセス・ラクチスにおけるＴＭＡ２９活性の決定

【０４５７】
次の実施例は、（Ｓ）－２－アセト乳酸還元活性が、ｔｍａ２９Δ株中で有意に減少されることを例証する。

【表５８】

実施例１８に開示される株の遺伝子型。

GEVO番号	遺伝子型
GEVO1287	クルイベロミセス・ラクチス、*MATα uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8* [pKD1]
GEVO1742	クルイベロミセス・ラクチス、*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1Δ::kan*
GEVO4458	クルイベロミセス・ラクチス、*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1Δ::kan tma29Δ::hph*

【表５９】

実施例１８に開示されるオリゴヌクレオチド配列。

oGV番号	配列
821	CGGGTAATTAACGACACCCTAGAGG（配列番号132）
2320	GGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG（配列番号133）
3065	AAAAAGGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGCGTTGATAAGGGCAACAACG TTAGTATC（配列番号134）
3066	ATACTAACGTTGTTGCCCTTATCAACGCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCC TTTTTTAC（配列番号135）
3067	TCAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGTTACCCAAGCTGTTTTGCCTATTTTC AAAGC（配列番号136）
3068	GCTTTGAAAATAGGCAAAACAGCTTGGGTAACTGTACAGAAAAAAAAAGAA AAATTTG（配列番号137）
3069	AGTTCAAATCAGTTCGAGGATAATTTAAG（配列番号138）
3070	TTAATAAATGCTCAAAAGAAAAAAGGCTGGCG（配列番号139）
3103	ACCGGTGCTTCTGCAGGTATTG（配列番号140）
3106	ATGCTTGGTTGGAAGCAAATAC（配列番号141）

【０４５８】

Ｋ．ラクチス株ＧＥＶＯ４４５８を、次のようにＧＥＶＯ１７４２から構築した。ＳＯＥ　ＰＣＲを使用して、ＴＭＡ２９遺伝子座を欠失させるために、ＤＮＡ構築物を作製した。５’標的配列を、ＰＣＲによって、ＧＥＶＯ１２８７ゲノムＤＮＡをテンプレートとして使用して、プライマーｏＧＶ３１０３およびｏＧＶ３０６５を用いて増幅した。３７６ｂｐの断片を、ゲル電気泳動によって精製した。３’標的配列を、ＰＣＲによって、ＧＥＶＯ１２８７ゲノムＤＮＡをテンプレートとして使用して、プライマーｏＧＶ３１０６およびｏＧＶ３０６７を用いて増幅した。４０５ｂｐの断片をゲル精製した。Ｈｐｈマーカーを、ＰＣＲによって、テンプレートとしてｐＧＶ２７０１（P_{TEF1}－Ｈｐｈ、ＣＥＮ／ＡＲＳ、ｐＵＣ－ｏｒｉ、ｂｌａ）を使用して、プライマーｏＧＶ３０６６およびｏＧＶ３０６８を用いて増幅した。１，１６５ｂｐの断片をゲル精製した。次に、５’標的配列およびｈｐｈマーカーを、テンプレートとして説明したＰＣＲ産物を使用して結合した。反応物を、プライマーｏＧＶ３０６８およびｏＧＶ３１０３を使用して増幅した。１，９８４ｂｐの断片をゲル精製した。次に、５’標的配列とＨｐｈマーカーＰＣＲ断片に、プライマーｏＧＶ３１０３およびｏＧＶ３１０６を用いたＰＣＲを使用して、３’標的配列を結合した。２，３３１ｂｐを、ゲル精製し、形質転換のために使用した。酵母ＤＮＡを、Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ＺＲ　真菌／細菌ＤＮＡキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｏｒａｎｇｅ，ＣＡ、カタログ番号Ｄ６００５）を使用して単離した。ＧＥＶＯ１２８７を、バッフル付１２５ｍＬフラスコ中の１２．５ｍＬのＹＰＤ中で、飽和するまで増殖させた。培養物全体を１５ｍＬファルコン管中に収集し、細胞を２７００ｒｃｆで５分間収集した。ゲノムＤＮＡを、製造業者の指示に従って単離した。ＤＮＡ濃度を測定し、全てのゲノムＤＮＡ調製物を、２５ｎｇ／μＬの最終濃度になるまで希釈した。

【０４５９】

ＧＥＶＯ１７４２を、次のように形質転換した。２５０ｍＬバッフル付フラスコ中の５０ｍＬ　ＹＰＤ培地に、新たなプレートからのＧＥＶＯ１７４２細胞を植菌した。培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。翌朝、培養物を、ＹＰＤ培地中で１：５０に希釈し、６時間増殖させた。細胞を、２７００ｒｃｆで２分間、３０℃での遠心分離によって収集した。細胞を５０ｍＬ滅菌ＭｉｌｌｉＱ水で完全に再懸濁させることによって、細胞を洗浄した。細胞を、２７００ｒｃｆで２分間、３０℃での遠心分離によって収集した。細胞を、２５ｍＬ滅菌ＭｉｌｌｉＱ水で再懸濁させることによって洗浄した。細胞を、２７００ｒｃｆで２分間、３０℃での遠心分離によって収集した。細胞を、１ｍＬ　１００ｍＭ酢酸リチウム中に再懸濁させ、エッペンドルフ管に移し、１４，０００ｒｃｆで１０秒間遠心分離することによって収集した。上清を除去し、細胞を、１００ｍＭ　ＬｉＯＡｃ中、ペレット容量の４倍で再懸濁させた。ＤＮＡ（１５μＬのＰＣＲ産物）、７２μＬ　５０％ＰＥＧ、１０μＬ　１Ｍ酢酸リチウム、および３μＬの変性サケ精子ＤＮＡ（１０ｍｇ／ｍＬ）の混合物を、各形質転換のために調製した。１．５ｍＬ管中、１５μＬの細胞懸濁液を、ＤＮＡ混合物（１７０μＬ）に添加し、形質転換懸濁液を、５回の短いパルスにわたってボルテックスした。形質転換体を、３０℃で３０分間インキュベートし、続いて４２℃で２２分間のインキュベートを行った。細胞を遠心分離（１８，０００×ｇ、１０秒間、２５℃）によって収集した。細胞を、４００μＬ　ＹＰＤ培地中に再懸濁させ、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩回収させた。翌朝、細胞を、０．１ｇ／Ｌハイグロマイシンを補充したＹＰＥプレート１％（ｗ／ｖ）酵母抽出物、２％（ｗ／ｖ）ペプトン、２５ｍＬ／Ｌエタノール）上に広げた。形質転換体を、０．１ｇ／Ｌハイグロマイシンを補充したＹＰＤプレート上で、単一のコロニーで精製した。

【０４６０】

単一のコロニー単離株を、０．１ｇ／Ｌハイグロマイシンプレートを補充したＹＰＥ上に貼り付け、パッチを、正しい組み込みについて、コロニーＰＣＲによってスクリーニングした。正しいＰＣＲ産物の存在を、アガロースゲル電気泳動を使用して確認した。内部ＴＭＡ２９コード領域についてスクリーニングするために、プライマーｏＧＶ３１０３およびｏＧＶ３１０６を使用した。５’組み込みジャンクションをスクリーニングするために、プライマーｏＧＶ３０６９およびｏＧＶ８２１を使用した。３’組み込みジャンクションをスクリーニングするために、プライマーｏＧＶ２３２０およびｏＧＶ３０７０を使用した。

【０４６１】

酵母細胞を、１４ｍＬ培養物管中、３ｍＬのＹＰＤ培地（１％（ｗ／ｖ）酵母抽出物、２％（ｗ／ｖ）ペプトン、２％（ｗ／ｖ）グルコース）に植菌することによって、各株について３系列で培養した。培養物を、ＹＰＤプレート１％（ｗ／ｖ）酵母抽出物、２％（ｗ／ｖ）ペプトン、２％（ｗ／ｖ）グルコース、２％寒天）上のパッチから出発させた。培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。翌日、一晩の培養物のOD_{600}を測定し、０．１のOD_{600}になるまで５０ｍＬ培養物に植菌するための各培養物の容量を算出した。算出した各培養物の容量を使用して、２５０ｍＬバッフル付フラスコ中の５０ｍＬのＹＰＤに植菌し、培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。細胞を、１．８～２．２のＯＤの対数期中期の間に採取した。培養物を事前計量した５０ｍＬファルコン管に移し、細胞を、３０００×ｇで５分間の遠心分離によって収集した。培地の除去後、細胞を、１０ｍＬ　ＭｉｌｌｉＱ　H_2Oで洗浄した。水の除去後、細胞を、３０００×ｇで５分間、再び遠心分離し、残りの水を、１ｍＬピペットチップで注意深く除去した。細胞ペレットを計量し、次いで－８０℃で保管した。

【０４６２】

細胞ペレットを氷上で解凍し、溶解緩衝液（１０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７．０、１ｍＭジチオスレイトール、５％ｗ／ｖグリセロール）中に再懸濁させて、結果として２０質量％細胞懸濁液を得た。１ｍＬのガラスビーズ（直径０．５ｍｍ）を、各試料につき、１．５ｍＬエッペンドルフ管に添加し、８５０μＬの細胞懸濁液を添加した。酵母細胞を、Ｒｅｔｓｃｈ　ＭＭ３０１ミキサーミル（Ｒｅｔｓｃｈ　Ｉｎｃ．Ｎｅｗｔｏｗｎ，Ｐ

Ａ）を使用して、間に氷上で１分間インキュベーションしながら、各々最高速度で６×１分間混合し、溶解させた。管を、２１，５００×ｇで１０分間、４℃で遠心分離し、上清を、新たな管に移した。抽出物を、記載されるようにＴＭＡ２９アッセイを使用してアッセイするまで、それらを氷上で保有した。

【０４６３】

（Ｓ）－２－アセト乳酸の還元についての、ＴＭＡ２９遺伝子を有するＧｅｖｏ１７４２の比活性は、０．００４３±０．０００５μｍｏｌ／分／ｍｇライセートであった。ＴＭＡ２９遺伝子が欠失されたＧｅｖｏ４４５９の比活性は、０．００１９±０．０００３μｍｏｌ／分／ｍｇライセートであった。

実施例１９：ＡＬＤ６欠失、ＴＭＡ２９欠失、ならびにＳ．セレビシエにおいて増加されたｋ$_{cat}$および減少されたＫ$_{M}$を有するアルコールデヒドロゲナーゼを含む株中の、増加されたイソブタノール収率

【０４６４】

次の実施例は、ＡＬＤ６欠失、ＴＭＡ２９欠失、および改善された動力学的特性を有するＡＤＨをコードする遺伝子の過剰発現の組み合わせが、増加されたイソブタノール産生および理論収率をもたらすことを例証する。

【０４６５】

Ｓ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２株、ＧＥＶＯ３９９１は、染色体ＤＮＡから、改善されたアルコールデヒドロゲナーゼ（Ｌ．ラクチスＡＤＨ＊、ＬＩ＿ＡＤＨ＊）およびデカルボキシラーゼ（Ｌ．ラクチスＫＩＶＤ、ＬＩ＿ｋｉｖＤ２）を発現する、Ｓ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２株、ＧＥＶＯ３９５６を、次の酵素をコードする遺伝子を発現する２μプラスミド、ｐＧＶ２６０３（Ｐ$_{TDH3}$：Ｅｃ＿ｉｌｖＣ＿ｃｏＳｃ$^{P2D1-A1-his6}$、Ｐ$_{TEF1}$：Ｌｌ＿ｉｌｖＤ＿ｃｏＳｃ、Ｐ$_{ENO2}$：Ｌｌ＿ａｄｈＡ^{RE1}、２μ－ｏｒｉ、ｐＵＣ－ｏｒｉ、ｂｌａ、Ｇ４１８Ｒ）で形質転換することによって構築した：ＫＡＲＩ、ＤＨＡＤ、および改善されたＡＤＨ（それぞれＥｃ＿ｉｌｖＣ＿ｃｏＳｃ$^{P2D1-A1-his6}$、Ｌｌ＿ｉｌｖＤ＿ｃｏＳｃ、およびＬｌ＿ａｄｈＡ^{RE1}）。

【表６０】

実施例１９に開示される株の遺伝子型。

GEVO番号	遺伝子型
GEVO3991	*MATa ura3 leu2 his3 trp1* *ald6Δ::[P_{ENO2}:Ll_adhA^{RE1}:P_{FBA1}:Sc_TRP1* *gpd1Δ::T_{Kl_URA3}* *gpd2Δ::T_{Kl_URA3}* *tma29Δ::T_{Kl_URA3}* *pdc1Δ::[P_{PDC1}:Ll_kivD2_coSc5:P_{FBA1}:LEU2:T_{LEU2}:P_{ADH1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5Δ::T_{Kl_URA3}* *pdc6Δ::P_{TDH3}:Sc_AFT1:P_{ENO2}:Ll_adhA^{RE1}:T-$_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}]{C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した},* [pGV2603]
GEVO3956	*MATa ura3 leu2 his3 trp1 ald6Δ::[P_{ENO2}:Ll_adhA^{RE1}:P_{FBA1}:Sc_TRP1* *gpd1Δ::T_{Kl_URA3}* *gpd2Δ::T_{Kl_URA3}* *tma29Δ::T_{Kl_URA3}* *pdc1Δ::[P_{PDC1}:Ll_kivD2_coSc5:P_{FBA1}:LEU2:T_{LEU2}:P_{ADH1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:Ll_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]* *pdc5Δ::T_{Kl_URA3}* *pdc6Δ::P_{TDH3}:Sc_AFT1:P_{ENO2}:Ll_adhA^{RE1}:T-$_{Kl_URA3_short}$:P_{FBA1}:Kl_URA3:T_{Kl_URA3}]{C2 添加物非依存性、グルコース耐性、およびより速い増殖のために進化した}*

【０４６６】

４つの複製発酵槽中で、ＧＥＶＯ３９９１（ＬＩ＿ａｄｈＡ^{ＲＥＩ}、ＡＬＤ６Δ、ＴＭＡ２９Δ）の性能を決定するために、発酵を行った。グルコース消費、イソブタノール産生、イソ酪酸塩産生、酢酸塩産生、およびＯＤ$_{６００}$を発酵中に測定した。これらの発酵について、ＹＰＤ寒天プレート上で増殖させた単一の単離細胞コロニーを、８０ｇ／Ｌグルコース、５ｇ／Ｌエタノール、０．５ｇ／Ｌ　ＭｇＳＯ$_{4}$、および０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有する８０ｍＬのＹＰＤを含有する５００ｍＬバッフル付フラスコに移し、２５０ｒｐｍでのオービタルシェーカー中、３０℃で３０時間インキュベートした。フラスコ培養物を、４つの個々の２Ｌトップドライブモーター発酵槽に、１槽当たり、８０ｇ／Ｌグルコース、５ｇ／Ｌエタノール、０．５ｇ／Ｌ　ＭｇＳＯ$_{4}$、および０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有する、０．９ＬのＹＰＤの作業容量で移して、０．３の出発ＯＤ$_{６００}$を得た。発酵槽を、酸素移動速度（ＯＴＲ）に基づく２相好気性条件下で、６Ｎ　ＫＯＨにより制御して、３０℃およびｐＨ６．０で作動させた。最初に、発酵槽を、７００ｒｐｍの固定撹拌および５ｓＬ／時間の空気のオーバーレイによって、１０ｍＭ／時間の増殖期ＯＴＲで作動させた。培養物を、およそ１０～１１　ＯＤ$_{６００}$になるまで２２．５時間増殖させ、次いで即座に、４０．７時間の産生曝気条件に切り替えた。産生期中の細胞密度は、１３～１４　ＯＤ$_{６００}$に近づいた。産生相を、３００ｒｐｍの固定撹拌によって、０．５ｍＭ／時間のＯＴＲで作動させた。一定期間ごとに、各発酵槽からの試料を除去して、ＯＤ$_{６００}$を測定し、ガスクロマトグラフィー（ＧＣ）分析および液体クロマトグラフィー（ＬＣ）分析のために調製した。ＧＣおよびＬＣのために、２ｍＬ試料をエッペンドルフ管中に除去し、微量遠心機中で１０分間、最大で遠心分離した。１ｍＬの上清を、ＧＣ１（イソブタノール、他の代謝物）によって分析し、１ｍＬを、有機酸およびグルコースについて、高性能液体クロマトグラフィー（ＬＣ１）によって、記載されるように分析した。

【０４６７】

ＧＥＶＯ３９９１は、２２．５時間の増殖期中に１３．８の細胞密度を達成した。実験の持続期間全体（６３．２時間）中に産生されたイソブタノールは、１８．６±０．９ｇ／Ｌであり、それとともに０．８４±０．１０ｇ／Ｌイソ酪酸塩および０．１５±０．０２ｇ／Ｌ酢酸塩が産生された。実験（２２．５～６３．５時間）の産生期中に達成したイソブタノール理論収率は、８０．３±１．１％であった一方で、イソ酪酸塩収率は、わずか０．０１３±０．００１ｇ／ｇグルコースであった。ＤＨ２ＭＢの産生は、検出されなかった。

【０４６８】

加えて、ＧＥＶＯ３９９１の３つの独立した形質転換体もまた、振盪フラスコ中で特徴付けた。株を、１％エタノールを含有する３ｍＬのＹＰＤ中、３０℃で、２５０ｒｐｍで一晩増殖させた。これらの培養物を、バッフル付２５０ｍＬフラスコ中の５０ｍＬの同じ培地中、０．１のＯＤ$_{６００}$まで希釈し、一晩増殖させた。ＯＤ$_{６００}$を、測定し、２５０ＯＤ$_{６００}$におよそ等しい細胞の容量を、２７００ｒｃで２分間の遠心分離によって、各培養物につき収集し、細胞を、５０ｍＬの発酵培地（８０ｇ／Ｌグルコース、０．０３ｇ／Ｌエルゴステロール、１．３２ｇ／Ｌ　Ｔｗｅｅｎ８０、１％ｖ／ｖエタノール、２００ｍＭ　ＭＥＳ、ｐＨ６．５を含有するＹＰＤ）中に再懸濁させ、バッフルなしの通気したねじ蓋２５０ｍＬフラスコに移した。ＯＤ$_{６００}$を確認し、培養物を３０℃で、７５ｒｐｍで配置して、微好気性発酵を開始させた。液体クロマトグラフィー（ＬＣ）、ガスクロマトグラフィー（ＧＣ）分析、およびＯＤ$_{６００}$のための試料を、概ね２４時間間隔で採取した。試料（２ｍＬ）を、１８，０００×ｇで１０分間遠心分離し、１．５ｍＬの清澄化した上清を、ＧＣ１およびＬＣ１による分析のために使用した。

【０４６９】

発酵を、約４のＯＤ$_{６００}$で開始させた。細胞は、７２時間の微好気性発酵までに、約８のＯＤ$_{６００}$まで増殖した。７２時間後、イソブタノール力価は１２．３ｇ／Ｌであり、およびイソブタノール収率は６７．２％の理論収率であった。イソ酪酸塩力価および収率は低かった：０．６ｇ／Ｌイソ酪酸塩は、０．０１３ｇ／ｇグルコースの収率で産生さ

れた。ＤＨ２ＭＢの産生は、検出されなかった。

実施例２０：Ｋ．マルシアヌスにおけるＴＭＡ２９欠失の効果

【０４７０】

この実施例の目的は、ＡＬＳ活性を含むクルイベロミセス・マルシアヌス株中のＴＭＡ２９の欠失が、低減されたＤＨ２ＭＢ産生をもたらすことを実証することである。

【０４７１】

この実施例に開示される株、プラスミド、およびオリゴヌクレオチド配列を、それぞれ表６１、６２、および６３に列挙する。

【表６１】

実施例２０に開示される株の遺伝子型。

GEVO番号	遺伝子型
1947	*ura3-delta2*、株NRRL-Y-7571 クルイベロミセス・マルシアヌス(E.C. Hansen)van der Walt (1971)に由来する
2348	*ura3-delta2 pdc1Δ::G418R, P_{Sc_PDC1}:31COX4 MTS:Bs_alsS:P_{Sc_FBA1}:URA3 ura3-delta2*
6403, 6404	*ura3-delta2 pdc1Δ::G418R, P_{Sc_PDC1}:31COX4 MTS:alsS: P_{Sc_FBA1}:URA3 ura3-delta2 tma29Δ::P_{Sc_TEF1}-hph*

【表６２】

実施例２０に開示されるプラスミド。

プラスミド名	関連する遺伝子/使用頻度	遺伝子型
pGV2701	*hph*断片を得るためのSOE PCRについて	*P_{TEF1}:hph, CEN, pUC ori, bla*

【表６３】

実施例２０に開示されるオリゴヌクレオチド配列。

プライマー	配列
3498	ATGTCTCAAGGTAGAAGAGCTG（配列番号142）
3137	GGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGTATATCTTCTGAATCAATTGCACCGAC（配列番号143）
3140	CAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGAGAGGTATGATTAATACCAATGTCTTGGG（配列番号144）
3499	TCATTCACCACGGTAAATGTGG（配列番号145）
3138	GTCGGTGCAATTGATTCAGAAGATATACATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCC（配列番号146）
3139	GTATTAATCATACCTCTCTGTACAGAAAAAAAAGAAAAATTTGAAATATAAATAACG（配列番号147）
3501	GAAGGAAATTCCAGTCTCCTAGTTCCTTTGAACAC（配列番号148）
2320	GGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG（配列番号149）
3500	CAGAACAATCAATCAACGAACGAACGACCCACCC（配列番号150）
821	CGGGTAATTAACGACACCCTAGAGG（配列番号151）
3141	AAGGAGATGCTTGGTTTGTAGCAAACACC（配列番号152）

【０４７２】

株構築：Ｋ．マルシアヌスＴＭＡ２９タンパク質（配列番号２３）をコードするＫ．マルシアヌスＴＭＡ２９遺伝子相同体を、次のように、親Ｋ．マルシアヌス株ＧＥＶＯ２３４８から欠失させて、株ＧＥＶＯ６４０３およびＧＥＶＯ６４０４をもたらした。

【０４７３】

ゲノムＤＮＡを、記載されるようにＧＥＶＯ１９４７から単離した。構築物を作製して

、大腸菌ｈｐｈ（ハイグロマイシン抵抗性）カセットを、記載されるように、ＧＥＶＯ２３４８のＴＭＡ２９遺伝子座に、ＳＯＥ　ＰＣＲによって組み込んだ。ＰＣＲステップ番号１は、５’ＴＭＡ２９標的配列、３’ＴＭＡ２９標的配列、およびｈｐｈマーカーをもたらす３つの反応からなっていた。５’標的配列を、調製したＧＥＶＯ１９４７ゲノムＤＮＡから、プライマーｏＧＶ３４９８およびｏＧＶ３１３７を用いて増幅した。３８５ｂｐの断片を、ゲル電気泳動によって精製した。３’標的配列を、調製したＧＥＶＯ１９４７ゲノムＤＮＡから、プライマーｏＧＶ３１４０およびｏＧＶ３４９９を用いて増幅した。４７３ｂｐの断片をゲル精製した。P_{TEF1}：ｈｐｈ：$T_{CYC1(partia1)}$カセットを、ｐＧＶ２７０１から、プライマーｏＧＶ３１３８およびｏＧＶ３１３９を用いて増幅した。１，６５１ｂｐの断片をゲル精製した。最終ＳＯＥ　ＰＣＲステップでは、ステップ番号１（５’標的配列／ｈｐｈマーカー／３’標的配列）からの３つの産物を結合した。反応物を、プライマーｏＧＶ３４９８およびｏＧＶ３４９９を使用して増幅した。２，４１４ｂｐの断片を、記載されるようにゲル精製し、記載されるようにＧＥＶＯ２３４８の形質転換のために使用した。形質転換のための細胞を増殖させるために使用した培地は、ＹＰＥであった。形質転換に続いて、１５０μＬの形質転換培養物を、０．１ｇ／Ｌハイグロマイシンを含有するＹＰＥプレート上に広げた。プレートを３０℃でインキュベートし、形質転換されたコロニーを、単一のコロニーで単離し、次いでコロニーＰＣＲのために、０．１ｇ／Ｌハイグロマイシンを含有するＹＰＥプレート上に貼り付けた。

【０４７４】

酵母コロニーＰＣＲを、記載されるように、適切な３’組み込みジャンクション、５’組み込みジャンクション、ならびにＴＭＡ２９コード領域の欠如についてスクリーニングするために使用した。妥当な３’組み込みジャンクションを、プライマーｏＧＶ３５０１および２３２０を使用して確認した。妥当な５’組み込みジャンクションを、プライマーｏＧＶ３５００およびｏＧＶ０８２１を使用して確認した。最後に、ＴＭＡ２９内部コード領域の欠失についてスクリーニングするために、プライマーｏＧＶ３５００およびｏＧＶ３１４１を使用した。

【０４７５】

発酵：振盪フラスコ発酵を、Ｂｓ＿ａｌｓＳを発現する株中のＴＭＡ２９の欠失が、ＤＨ２ＭＢの減少された産生をもたらすかどうかを決定するために、記載されるように、ＧＥＶＯ２３４８（ＴＭＡ２９）、ＧＥＶＯ６４０３（ｔｍａ２９Δ）、およびＧＥＶＯ６４０４（ｔｍａ２９Δ）の各々につき、３系列で行った。単一のコロニーで単離したｔｍａ２９Δ株の形質転換体を、０．１ｇ／Ｌハイグロマイシンを含有するＹＰＥプレートに貼り付けた一方で、親株を、ＹＰＥプレートに貼り付けた。パッチからの細胞を使用して、ＹＰＥ　の３ｍＬ培養物を植菌した。培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。一晩のインキュベーション後、これらの培養物のOD_{600}を、水中で１：４０に希釈することによって決定した。適切な量の培養物を、２５０ｍＬバッフル付フラスコ中の５０ｍＬのＹＰＥに添加して、０．１のOD_{600}を得、３０℃および２５０ｒｐｍでインキュベートした。２４時間のインキュベーション後、これらの培養物のOD_{600}を、水中で１：４０に希釈することによって決定した。適切な量の培養物を、８％グルコースおよび２００ｍＭ　ＭＥＳ、ｐＨ６．５を含有する５０ｍＬのＹＰＤに添加して、５のOD_{600}を得た。発酵培養物を、バッフルなし２５０ｍＬフラスコ中で、３０℃および７５ｒｐｍでインキュベートした。培地の１つの１５ｍＬアリコートをまた、ＬＣ４分析のためのブランクとして使用するために収集し、試料を供するまで４℃で保った。７２時間後、１．５ｍＬの培養物を除去し、および試料を、OD_{600}およびＬＣ４分析のために、上記のように調製した。加えて、７２時間時点で、酵素アッセイのための試料を、適切な試料の８０個のＯＤを、３０００×ｇで５分間、４℃で遠心分離しした２つの１５ｍＬファルコン管に移すことによって採取した。ペレットを３ｍＬ冷滅菌水中に再懸濁させ、卓上遠心分離機中のスイング型バケットローター中で、５０００×ｇで２分間、４℃で遠心分離した。水を真空吸引器によって除去した。円錐管を－８０℃で保管し

た。

【０４７６】

ライセートの体外ＡＬＳ酵素活性を、記載されるように測定した。表６４は、７２時間後の株からのライセートの平均体外ＡＬＳ酵素活性を示す。ＡＬＳ活性は、ＧＥＶＯ２３４８（３．１４単位／ｍｇライセートの平均）において、ならびにｔｍａ２９Δ株ＧＥＶＯ６４０３およびＧＥＶＯ６４０４（それぞれ１．６３および１．５８単位／ｍｇライセートの平均）の両方において、測定可能である。

【０４７７】

表６４はまた、これらの株についてのＬＣ４による、ＤＨ２ＭＢおよびＤＨＩＶ力価を示す。ＧＥＶＯ２３４８（ＴＭＡ２９）株は、０．８９ｇ／Ｌの平均ＤＨ２ＭＢ力価を産生した一方で、ＤＨＩＶは、検出されなかった。ＤＨ２ＭＢ力価は、ｔｍａ２９Δ株ＧＥＶＯ６４０３およびＧＥＶＯ６４０４において有意に減少され、それぞれ０．１６および０．１５ｇ／Ｌと測定された。ＡＬＳ活性は、ｔｍａ２９Δ株中で減少されるが、これは、欠失株中のＤＨ２ＭＢ力価における８０％超の減少を説明していない。例えば、ＧＥＶＯ２３４８の１つの技術的複製物は、２．５単位／ｍｇライセートのＡＬＳ活性示し、０．８３ｇ／Ｌ　ＤＨ２ＭＢを産生した一方で、ｔｍａ２９Δ株ＧＥＶＯ６４０４の技術的複製物のうちの１つは、１．９単位／ｍｇライセートの同様の活性を有し、わずか０．１６ｇ／Ｌ　ＤＨ２ＭＢを産生した。

【表６４】

７２時間発酵後の、*ｔｍａ２９Δ*株中のＡＬＳ活性、ＤＨ２ＭＢおよびＤＨＩＶ力価、ならびにＤＨ２ＭＢ減少パーセント。

株	*TMA29*	ALS活性（U/mgライセート）	LC4によるDH2MB（g/L）	LC4によるDHIV（g/L）	DH2MB減少（%）
GEVO2348	+	3.1±0.5	0.89±0.07	n.d.	
GEVO6403	Δ	1.6±0.2	0.16±0.02	n.d.	82%
GEVO6404	Δ	1.6±0.3	0.15±0.01	n.d.	83%

ｎ．ｄ．＝検出されず

実施例２１：クルイベロミセス・ラクチスにおけるＴＭＡ２９欠失の効果

【０４７８】

この実施例の目的は、ＡＬＳ活性を含むクルイベロミセス・ラクチス株中のＴＭＡ２９の欠失が、低減されたＤＨ２ＭＢ産生をもたらすことを実証することである。

【０４７９】

この実施例に開示される株、プラスミド、およびオリゴヌクレオチドプライマーを、それぞれ表６５、６６、および６７に列挙する。

【表６５】
実施例２１に開示される株の遺伝子型。

GEVO番号	遺伝子型
1742	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan*、K.ラクチス株ATCC 200826（クルイベロミセス・ラクチス(Dombrowski)van der Walt, teleomorph）に由来する
4458	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan tma29::hph*
6310, 6311, 6312	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan* [pGV1429]
6313, 6314, 6315	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan* [pGV1645]
6316, 6317	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan+ Bs_alsS:TRP1*の無作為組み込み
6318, 6319, 6320	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan tma29::hph* [pGV1429]
6321, 6322,6323	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan tma29::hph* [pGV1645]
6324, 6325	*MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan tma29::hph+* Bs_alsS:TRP1の無作為組み込み

【表６６】
実施例２１に開示されるプラスミド。

プラスミド名	関連する遺伝子/使用頻度	遺伝子型
pGV1429	*TRP1*を含有する、高コピー1.6μ空ベクター	*1.6 μ-ori, PMB1 ori, bla, TRP1*
pGV1645	*TRP1*および*Bs_alsS*を含有する高コピー1.6μベクター	*1.6 μ-ori, PMB1 ori, bla, TRP1, Bs_alsS*
pGV1726（*Ahd*Iで直線化した）	*TRP1*および*Bs_alsS*を含有するベクター	*PMB1 ori, bla, TRP1, Bs_alsS*

【表６７】
実施例２１に開示されるオリゴヌクレオチド配列。

プライマー	配列
oGV3065	AAAAAGGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGCGTTGATAAGGGCAACAACGTTAGTATC（配列番号153）
oGV3066	ATACTAACGTTGTTGCCCTTATCAACGCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTTTTTTAC（配列番号154）
oGV3067	TCAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGTTACCCAAGCTGTTTTGCCTATTTTCAAAGC（配列番号155）
oGV3068	GCTTTGAAAATAGGCAAAACAGCTTGGGTAACTGTACAGAAAAAAAAGAAAAATTTG（配列番号156）
oGV3103	ACCGGTGCTTCTGCAGGTATTG（配列番号157）
oGV3106	ATGCTTGGTTGGAAGCAAATAC（配列番号158）
oGV1321	AATCATATCGAACACGATGC（配列番号159）
oGV1324	AGCTGGTCTGGTGATTCTAC（配列番号160）

【０４８０】
株構築：Ｋ．ラクチスＴＭＡ２９タンパク質（配列番号７）をコードするＫ．ラクチスＴＭＡ２９遺伝子相同体を、次のように、親Ｋ．ラクチス株ＧＥＶＯ１７４２から欠失させて、実施例１８に記載される株ＧＥＶＯ４４５８をもたらした。
【０４８１】
Ｋ．ラクチス株ＧＥＶＯ１７４２（親、ＴＭＡ２９）およびＧＥＶＯ４４５８（ｔｍａ

２９Δ）を、プラスミドｐＧＶ１４２９（空の対照ベクター）、ｐＧＶ１６４５（発現Ｂｓ＿ａｌｓＳ）で、または記載されるＡｈｄＩ直線化プラスミドｐＧＶ１７２６（Ｂｓ＿ａｌｓＳの無作為組み込みをもたらす）で形質転換し、４００μＬの１．２５倍ＳＣ－ＨＷＬＵ中に再懸濁させ、ＳＣＤ－Ｗプレート上に広げて、形質転換細胞について選択した。ＧＥＶＯ１７４２およびｔｍａ２９Δ株ＧＥＶＯ４４５８の両方における、ＡｈｄＩ直線化ｐＧＶ１７２６の無作為組み込みを、コロニーＰＣＲによって、記載される内部Ｂｓ＿ａｌｓＳコード領域に特異的なプライマーｏＧＶ１３２１およびｏＧＶ１３２４を用いて確認した。株ＧＥＶＯ６３１６、ＧＥＶＯ６３１７、ＧＥＶＯ６３２４、およびＧＥＶＯ６３２５は、遺伝子組み込みに対して陽性であった。

【０４８２】

発酵：振盪フラスコ発酵を、Ｂｓ＿ａｌｓＳを発現する株中のＴＭＡ２９の欠失が、ＤＨ２ＭＢの減少された産生をもたらすかどうかを決定するために、記載されるように、種々のＧＥＶＯ株（表６５）上で行った。単一のコロニーで単離した形質転換体を、ＳＣＤ－Ｗプレートに貼り付け、形質転換されていない親を、ＹＰＤ上に貼り付けた。パッチからの細胞を使用して、３ｍＬ培養物を、ＹＰＤ（親株および組み込まれた株）または３ｍＬ　ＳＣＤ－Ｗのいずれかの中に植菌した。培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。一晩のインキュベーション後、これらの培養物のOD_{600}を、水中で１：４０に希釈することによって決定した。適切な量の培養物を、２５０ｍＬバッフル付フラスコ中の、５％グルコースを含有する５０ｍＬのＹＰＤ、または５％グルコースを含有するＳＣＤ－Ｗに添加して、０．１のOD_{600}を得、３０℃および２５０ｒｐｍでインキュベートした。２４時間のインキュベーション後、これらの培養物のOD_{600}を、水中で１：４０に希釈することによって決定した。適切な量の培養物を、８％グルコース、２００ｍＭ　ＭＥＳ　ｐＨ６．５を含有する５０ｍＬのＹＰＤ、または８％グルコースを含有するＳＣＤ－Ｗに添加して、５のOD_{600}を得た。２５０個のＯＤが発酵を開始するのに利用可能でない場合は、５０ｍＬ培養物全体を使用した。発酵培養物を、バッフルなし２５０ｍＬフラスコ中、３０℃および７５ｒｐｍでインキュベートした。１５ｍＬ円錐管をまた、記載されるように、ＬＣ１およびＬＣ４分析のためのブランク培地のために収集し、試料を供するまで４℃で保った。７２時間時点で、１．５ｍＬの培養物を収集した。OD_{600}値を決定し、試料を、ＬＣ１およびＬＣ４分析のために、１４，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、分析対象の１ｍＬの上清を除去することによって調製した。加えて、酵素アッセイのための試料を７２時間時点で採取した。適切な試料の６０個のＯＤを、１５ｍＬファルコン管中に移し、３０００×ｇで５分間、４℃で遠心分離した。ペレットを３ｍＬ冷滅菌水中に再懸濁させ、３つの１．５ｍＬエッペンドルフ管に移して（各々１ｍＬ）、３×２０個のＯＤ複製物を作製した。管を、卓上遠心分離機中のスイング型バケットローター中で、５０００×ｇで２分間、４℃で遠心分離した。水を真空吸引器によって除去した。エッペンドルフ管を－８０℃で保管した。

【０４８３】

ライセートの体外ＡＬＳ酵素活性を、記載されるように測定した。表６８は、７２時間後の株からのライセートの平均体外ＡＬＳ酵素活性を示す。ＡＬＳ活性は、無作為に組み込まれた（ＧＥＶＯ６３１６、ＧＥＶＯ６３１７、ＧＥＶＯ６３２４、６３２５）、またはプラスミドから発現された（ＧＥＶＯ６３１３～６３１５、ＧＥＶＯ６３２１～６３２３）Ｂｓ＿ａｌｓＳを有する株中でのみ測定可能であった。組み込まれたＢｓ＿ａｌｓＳを有する株中のＡＬＳ活性は、プラスミドからＢｓ＿ａｌｓＳを発現する株中のそれよりも低い。しかしながら、組み込みＢｓ＿ａｌｓＳ（ＧＥＶＯ６３１６、ＧＥＶＯ６３１７）を有するＴＭＡ２９株中の０．２５単位／ｍｇライセートの活性は依然として、ＤＨＩＶ＋ＤＨ２ＭＢの総合力価１．０６ｇ／Ｌを産生するために十分である。

【０４８４】

表６８は、ＬＣ１分析に基づく、発酵の７２時間後の、種々の株についてのＤＨＩＶ＋ＤＨ２ＭＢ総合力価を示す。株ＧＥＶＯ１７４２（親、ＴＭＡ２９）株は、Ｂｓ＿ａｌｓＳが、無作為に組み込まれたか（１．０６ｇ／Ｌ）、またはプラスミドｐＧＶ１６４５（

０．４５ｇ／Ｌ）から発現されたときのみ、測定可能なＤＨＩＶ＋ＤＨ２ＭＢ総合力価を産生した。これらのＤＨＩＶ＋ＤＨ２ＭＢ力価は、無作為組み込み（ＧＥＶＯ６３２４、ＧＥＶＯ６３２５）またはプラスミド（ＧＥＶＯ６３２１～６３２３）を介して、Ｂｓ＿ａｌｓＳを発現させたとき、ｔｍａ２９Δ株ＧＥＶＯ４４５８において消失させられた。ＬＣ４分析は、ＤＨＩＶ＋ＤＨ２ＭＢ総合力価の大部分が、実際にはＤＨ２ＭＢであることを示した。

【表６８】

ＡＬＳ活性、ＤＨＩＶ＋ＤＨ２ＭＢ総合力価、およびＤＨＩＶ＋ＤＨ２ＭＢ総合力価のうちのＤＨ２ＭＢの百分率。

株	親株	組み込まれたプラスミド（I）、プラスミド（P）、または対照（C）	TMA29	ALS	ALS活性（U/mgライセート）	LC1によるDHIV+DH2MB（g/L）	LC4によるDH2MB+DHIV中のDH2MB%
GEVO1742		なし	+	-	0.00±0.00	0.00±0.00	n/a
GEVO6316、6317	GEVO1742	pGV1726（I）	+	+	0.25±0.06	1.06±0.23	80.0±3.7
GEVO4458	GEVO1742	なし	Δ	-	0.00±0.00	0.00±0.00	n/a
GEVO6324、6325	GEVO4458	pGV1726（I）	Δ	+	0.86±0.28	0.00±0.00	n/a
GEVO6310-6312	GEVO1742	pGV1429（C）	+	-	0.00±0.00	0.00±0.00	n/a
GEVO6313-6315	GEVO1742	pGV1645（P）	+	+	6.12±1.09	0.45±0.02	87.2±2.3
GEVO6318-6320	GEVO4458	pGV1429（C）	Δ	-	0.00±0.00	0.00±0.00	n/a
GEVO6321-6323	GEVO4458	pGV1645（P）	Δ	+	1.23±0.45	0.00±0.00	n/a

ｎ／ａ＝該当なし、試料は、ＬＣ１によって検出可能なピークを有さなかったため、ＬＣ４によって分析されなかった。

実施例２２：Ｉ．オリエンタリスにおけるＴＭＡ２９欠失の効果

【０４８５】

次の実施例は、Ｉ．オリエンタリスＴＭＡ２９遺伝子の欠失が、減少されたＴＭＡ２９活性をもたらし、またＡＬＳ活性を含む株中のＤＨ２ＭＢ産生の減少をもたらすことを例証する。

【表６９】
実施例２２に開示される株の遺伝子型。

GEVO 番号	関連する遺伝子型
GEVO4450	*ura3Δ/ura3Δ* *pdc1-1Δ::Ll_kivD:T_{ScCYC1}:loxP:P_{ENO1}:Bs_alsS /* *pdc1-2Δ::Ll_kivD:T_{ScCYC1}:loxP:P_{ENO1}:Bs_alsS* *TMA29/TMA29*
GEVO12425	*ura3Δ/ura3Δ* *pdc1-1Δ::Ll_kivD:T_{ScCYC1}:loxP:P_{ENO1}:Bs_alsS pdc1-2Δ::Ll_kivD:loxP* *TMA29/ TMA29*
GEVO6155	*ura3Δ/ura3Δ* *pdc1-1Δ::Ll_kivD:T_{ScCYC1}:loxP:P_{ENO1}:Bs_alsS* *pdc1-2Δ::Ll_kivD:loxP* *TMA29/* *tma29Δ::P_{PDC}:Ll_adhA^{RE1}:P_{TDH3}:Ec_ilvC$^{P2D1-A1}$:loxP:URA3:loxP:P_{ENO1}:Ll_ilvD*
GEVO6158	*ura3Δ/ ura3Δ* *pdc1-1Δ::Ll_kivD:T_{ScCYC1}:loxP:P_{ENO1}:Bs_alsS* *pdc1-2Δ::Ll_kivD:loxP* *tma29Δ::P_{PDC}:Ll_adhA^{RE1}:P_{TDH3}:Ec_ilvC$^{P2D1-A1}$_coCB:loxP:URA3:loxP:P_{ENO1}:Ll_ilvD /* *tma29Δ::P_{PDC}:Ll_adhA^{RE1}:P_{TDH3}:Ec_ilvC$^{P2D1-A1}$:loxP:URA3:loxP:P_{ENO1}:Ll_ilvD*
GEVO12473	*ura3Δ/ ura3Δ* *pdc1-1Δ::Ll_kivD:T_{ScCYC1}:loxP:P_{ENO1}:Bs_alsS* *pdc1-2Δ::Ll_kivD:loxP* *tma29Δ::loxP:URA3:loxP/* *tma29Δ::loxP:MEL5:loxP*
GEVO12474	*ura3Δ/ura3Δ* *pdc1-1Δ::Ll_kivD:T_{ScCYC1}:loxP:P_{ENO1}:Bs_alsS* *pdc1-2Δ::Ll_kivD:loxP* *tma29Δ::loxP:URA3:loxP/* *tma29Δ::loxP:MEL5:loxP*

【０４８６】
株構築：ＴＭＡ２９遺伝子（ＧＥＶＯ４４５０、ＧＥＶＯ１２４２５）に対する野生型である、ＴＭＡ２９遺伝子（ＧＥＶＯ６１５５）の１コピーの欠失に対する異型接合である、またはＴＭＡ２９遺伝子（ＧＥＶＯ６１５８、ＧＥＶＯ１２４７３、ＧＥＶＯ１２４７４）が完全に欠失されている、ＰＴＡ－６６５８に由来するイッサチェンキア・オリエンタリス株を、標準的な酵母遺伝学的および分子生物学的方法を使用して構築した。これらの株はまた、バチルス・スブチリスａｌｓＳ遺伝子のコピーを担持する。
【０４８７】
ＴＭＡ２９酵素アッセイ：ＴＭＡ２９体外アッセイのために、Ｉ．オリエンタリス株ＧＥＶＯ４４５０（ＴＭＡ２９／ＴＭＡ２９）、ＧＥＶＯ６１５５（ｔｍａ２９Δ／ＴＭＡ２９）、およびＧＥＶＯ６１５８（完全　ｔｍａ２９Δ／ｔｍａ２９Δ）を、新たなＹＰＤプレートからの細胞を用いて、１２５ｍＬバッフル付フラスコ中の２５ｍＬ　ＹＰＤに植菌することによって増殖させた。培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩増殖させた。これらの培養物を使用して、２５０ｍＬバッフル付フラスコ中の５０ｍＬのＹＰＤに、０．０５のOD_{600}になるまで植菌した。培養物を、それらがおよそ５～８のOD_{600}（対数期後期）に到達するまで、３０℃および２５０ｒｐｍで増殖させた。細胞を、細胞の８０個のＯＤを５０ｍＬファルコン管中に収集し、２，７００×ｇで３分間遠心分離することによって採取した。上清の除去後、細胞を氷上に配置し、５ｍＬ冷水で洗浄した。細胞を、２，７００×ｇで３分間遠心分離し、水を除去した。細胞ペレットを、使用するまで－８０℃で保管した。さらに、同じ株を、新たなプレートから３ｍＬのＹＰＤに植菌し、３０℃および２５０ｒｐｍで８時間増殖させることによって、増殖させた。これ

らの培養物を使用して、２５０ｍＬバッフル付フラスコ中の５０ｍＬのＹＰＤに、０．０１のＯＤ$_{600}$になるまで植菌し、培養物を、それらがおよそ４～８のＯＤ$_{600}$に到達するまで、３０℃および２５０ｒｐｍで増殖させた。この培養物を使用して、８％グルコース、２００ｍＭ　ＭＥＳ　ｐＨ６．５を含有する５０ｍＬのＹＰＤに、４～５の最終ＯＤ$_{600}$になるまで、適切な量の培養物を５０ｍＬファルコン管中、２，７００×ｇで３分間遠心分離し、次いで細胞ペレットを５０ｍＬの所定の培地中に再懸濁することによって植菌した。細胞を、２５０ｍＬバッフルなしフラスコ中、３０℃および７５ｒｐｍで４８時間インキュベートした。（発酵期）。８０個のＯＤ細胞ペレットを、記載されるように採取した。細胞を再懸濁させ、溶解させ、記載されるようにＴＭＡ２９活性についてアッセイした。

【０４８８】

表７０は、総タンパク質Ｕ／ｍｇ単位の、Ｉ．オリエンタリス株ＧＥＶＯ４４５０、６１５５、および６１５８のライセートの比ＴＭＡ２９活性を示す。比ＴＭＡ２９活性は、ＧＥＶＯ４４５０（ＴＭＡ２９／ＴＭＡ２９）と比較して、ＧＥＶＯ６１５５（ｔｍａ２９／ＴＭＡ２９）およびＧＥＶＯ６１５８（完全ｔｍａ２９欠失）において低減された。

【表７０】

Ｉ．オリエンタリス株中のＴＭＡ２９活性。

株	TMA29 活性 対数期後期 [U/mg 総タンパク質]	TMA29 活性 48 時間発酵期 [U/mg 総タンパク質]
GEVO4450	0.0048±.0010	.0027±.0003
GEVO6155	0.0025±.0008	.0010±.0001
GEVO6158	0.0023±.0003	.0010±.0003

【０４８９】

発酵：発酵のために、Ｉ．オリエンタリス株ＧＥＶＯ１２４２５（ＴＭＡ２９／ＴＭＡ２９）、ＧＥＶＯ１２４７３（ｔｍａ２９／ｔｍａ２９）、およびＧＥＶＯ１２４７４（ｔｍａ２９／ｔｍａ２９）を、新たなＹＰＤプレートからの細胞を用いて、１２５ｍＬバッフル付フラスコ中の１２ｍＬ　ＹＰＤに植菌することによって増殖させた。培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩増殖させた。１２ｍＬの一晩の培養物のＯＤ$_{600}$を決定し、適切な量を使用して、２５０ｍＬバッフル付フラスコ中の、５％グルコースを含有する５０ｍＬのＹＰＤに、０．１のＯＤ$_{600}$になるまで植菌した。フラスコを、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。５０ｍＬ培養物のＯＤ$_{600}$を決定した。適切な量の培養物を、５０ｍＬファルコン管中、２７００ｒｃｆで５分間、２５℃で遠心分離し、上清を除去した。各５０ｍＬ培養物からの細胞を、８％グルコース、２００ｍＭ　ＭＥＳ、ｐＨ６．５を含有する５０ｍＬＹＰＤ中に再懸濁させた。培養物を次いで、２５０ｍＬバッフルなしねじ蓋フラスコに移し、３０℃および７５ｒｐｍでインキュベートした。７２時間時点で、各フラスコからの試料を除去し、ＯＤ$_{600}$を測定し、ＬＣ４分析のために、１ｍＬ試料をエッペンドルフ管に移し、１８，０００×ｇで１０秒間、２５℃で遠心分離することによって、試料を調製した。遠心分離後、０．７５ｍＬの上清を、マイクロタイタープレートに移し、ＬＣ４によって分析した。また、７２時間時点で酵素アッセイのための細胞を、記載されるように、８０個のＯＤを１５ｍＬファルコン管に移すことによって収集した。ＡＬＳアッセイのための細胞を再懸濁させ、溶解させ、記載されるようにアッセイした。

【０４９０】

表７１は、７２時間時点での、ＧＥＶＯ１２４２５、１２４７３、および１２４７４に対する、ＤＨ２ＭＢ産生およびＡＬＳ活性を示す。ＤＨ２ＭＢ力価を、ＬＣ４によって決定した。ＡＬＳ活性は、全ての株において同様であった。

【表７１】
７２時間発酵時点での、Ｉ．オリエンタリス株中のＤＨ２ＭＢ産生およびＡＬＳ活性。

株	LC4 による DH2MB [g/L]	ALS 活性 [U/mg]
GEVO12425	1.87±0.60	4.6±1.1
GEVO12473	0.08±0.01	4.0±0.1
GEVO12474	0.07±0.00	3.1±1.1

実施例２３：Ｓ．ポンベにおけるＴＭＡ２９欠失の効果

【０４９１】
次の実施例は、（Ｓ）－２－アセト乳酸還元活性が、Ｓ．ポンベｔｍａ２９Δ株中で、Ｓ．ポンベＴＭＡ２９株と比較して有意に減少されることを例証する。

【表７２】
実施例２３に開示される株の遺伝子型。

GEVO番号	遺伝子型	源
GEVO6444	h^+ *ade6-M216, ura4-D18, leu1-32*	Bioneer株BG_0000H8
GEVO6445	*h+ SPAC521.03Δ::kanMX4, ade6-M216, ura4-D18, leu1-32* *TMA29*相同体（配列番号22）欠失	Bioneer株BG_1772H

【０４９２】
無傷のＴＭＡ２９遺伝子（配列番号１６１）を有する酵母株ＧＥＶＯ６４４４、およびＴＭＡ２９遺伝子の欠失を有するＧＥＶＯ６４４５を、１２５ｍＬバッフル付フラスコ中の１２ｍＬ　ＹＰＤ中で、２５０ｒｐｍおよび３０℃で一晩増殖させた。翌日、OD_{600}値を決定し、技術的な３系列培養物を、５％グルコースを含む５０ｍＬ　ＹＰＤ中、およそ０．３のOD_{600}で出発させた。一日全体にわたって、培養物を２５０ｒｐｍおよび３０℃で増殖させた。一日の終わりに、培養物を、５％グルコースを含むＹＰＤ中に、およそ０．１５のOD_{600}になるまで希釈し、２５０ｒｐｍおよび３０℃で一晩インキュベートした。４～６のOD_{600}に到達すると、細胞を採取した。酵素アッセイのためのペレットを採取するために、適切な試料の８０個のＯＤを、２つの１５ｍＬファルコン管中に移し（複製試料用）、３０００×ｇで５分間、４℃で遠心分離した。ペレットを３ｍＬ冷滅菌水中に再懸濁させ、卓上遠心分離機中のスイング型バケットローター中で、５０００×ｇで２分間、４℃で遠心分離した。水を真空吸引器によって除去した。ペレットを－８０℃で保管した。ライセートを調製し、ＴＭＡ２９酵素アッセイを記載されるように行った。

【０４９３】
（Ｓ）－２－アセト乳酸の還元に対する、Ｓ．ポンベＧＥＶＯ６４４４ライセートの比活性は、０．０１８±０．００２Ｕ／ｍｇ総タンパク質であった。ｔｍａ２９Δ株ＧＥＶＯ６４４５のライセートは、０．００１±０．００２Ｕ／ｍｇ総タンパク質の比活性を有した。

実施例２４：Ｋ．マルシアヌスにおけるＡＬＤ６欠失の効果

【０４９４】
この実施例の目的は、クルイベロミセス・マルシアヌス株中のＡＬＤ６の欠失が、低減されたイソブチルアルデヒド酸化活性およびイソ酪酸塩産生をもたらすことを実証することである。

【０４９５】
この実施例に開示される株、プラスミド、およびオリゴヌクレオチドプライマーを、それぞれ表７３、７４、および７５に列挙する。

【表７３】
実施例２４に開示されるＫ．マルシアヌス株の遺伝子型。

GEVO番号	遺伝子型
GEVO1947	*ura3-delta2*
GEVO6264, GEVO6265	*ura3-delta2 ald6Δ::P_{TEF1}-hph*
GEVO2087	*ura3-delta2, PDC1, P_{Sc_PDC1}:31COX4 MTS:alsS:P_{Sc_TDH3}:kivD co HMI1 MTS:P_{Sc_ADH1}:ADH7:P_{Sc_FBA1}:URA3*
GEVO6270 GEVO6271	*ura3-delta2, PDC1, P_{Sc_PDC1}:31COX4 MTS:alsS:P_{Sc_TDH3}:kivD co HMI1 MTS:P_{Sc_ADH1}:ADH7:P_{Sc_FBA1}:URA3 ald6Δ::P_{TEF1}-hph*

【表７４】
実施例２４に開示されるプラスミド。

プラスミド名	関連する遺伝子/使用頻度	遺伝子型
pGV2701	*hph*断片を得るためのSOE PCRについて	*P_{TEF1}:hph, CEN, pUC ori, bla*

【表７５】
実施例２４に開示されるオリゴヌクレオチド配列。

プライマー	配列
oGV3490	GTCAAGATTGTTGAACAAAAGCC（配列番号162）
oGV3492	GAGTAAAAAAGGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGGTTTAGTGGGGTTGGGGAAGCTGGC（配列番号163）
oGV3493	CAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGGCCAACATCAAGAAGACTATTCCAAACTTGGTC（配列番号164）
oGV3495	TGTATGATTCGAAAGCTTCTTCACC（配列番号165）
oGV3491	GCCAGCTTCCCCAACCCCACTAAACCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTTTTTTACTC（配列番号166）
oGV3494	GACCAAGTTTGGAATAGTCTTCTTGATGTTGGCCTGTACAGAAAAAAAAGAAAAATTTG（配列番号167）
oGV3497	TTACTCGAGCTTGATTCTGAC（配列番号168）
oGV2320	GGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG（配列番号169）
oGV3496	ATGTCTTCATCACTAGCAGAG（配列番号170）
oGV0821	CGGGTAATTAACGACACCCTAGAGG（配列番号171）
oGV0706	GGTTGGTATTCCAGCTGGTGTCG（配列番号172）

【０４９６】
株構築：Ｋ．マルシアヌスＡＬＤ６タンパク質（配列番号３９）をコードするＫ．マルシアヌスＡＬＤ６遺伝子相同体を、次のように、親Ｋ．マルシアヌス株ＧＥＶＯ１９４７およびＧＥＶＯ２０８７から欠失させて、それぞれ、ＧＥＶＯ６２６４／ＧＥＶＯ６２６５、およびＧＥＶＯ６２７０／ＧＥＶＯ６２７１をもたらした。
【０４９７】
ゲノムＤＮＡを、記載されるようにＧＥＶＯ１９４７から単離した。構築物を作製して、大腸菌ｈｐｈ（ハイグロマイシン抵抗性）カセットを、記載されるように、ＧＥＶＯ１９４７およびＧＥＶＯ２０８７のＡＬＤ６遺伝子座に、ＳＯＥ　ＰＣＲによって組み込んだ。ＰＣＲステップ番号１は、次の３つの反応からなっていた：５’ＡＬＤ６標的配列、３’ＡＬＤ６標的配列、およびｈｐｈマーカー。５’標的配列を、調製したＧＥＶＯ１９４７ゲノムＤＮＡから、プライマーｏＧＶ３４９０およびｏＧＶ３４９２を用いて増幅した。６３５ｂｐの断片を、ゲル電気泳動によって精製した。３’標的配列を、調製したＧＥＶＯ１９４７ゲノムＤＮＡから、プライマーｏＧＶ３４９３およびｏＧＶ３４９５を用いて増幅した。６４５ｂｐの断片をゲル精製した。P_{TEF1}：ｈｐｈ：T_{CYC1}（ｐａｒｔｉａｌ）カセットを、ｐＧＶ２７０１から、プライマーｏＧＶ３４９１およびｏＧＶ３４９４を用いて増幅した。１，６６５ｂｐの断片をゲル精製した。最終ＳＯＥ　ＰＣ

Ｒステップでは、ステップ番号１（５’ＡＬＤ６標的配列／ｈｐｈ／マーカー／３’ＡＬＤ６標的配列）からの３つの産物を結合した。反応物を、プライマーｏＧＶ３４９０およびｏＧＶ３４９５を使用して増幅した。２，８２６ｂｐの断片をゲル精製し、記載されるようにＧＥＶＯ１９４７およびＧＥＶＯ２０８７の形質転換のために使用した。形質転換のための細胞を増殖させるために使用した培地は、ＹＰＤであった。形質転換に続いて、１５０μＬの各形質転換培養物を、０．２ｇ／Ｌハイグロマイシンを補充したＹＰＤプレート上に広げた。プレートを３０℃でインキュベートした。形質転換されたコロニーを初期コロニーＰＣＲスクリーニングのために貼り付け、次いで単一のコロニーで単離し、０．２ｇ／Ｌハイグロマイシンを補充したＹＰＤプレート上に再度貼り付けた。

【０４９８】

酵母コロニーＰＣＲを、記載されるように、適切な３’組み込みジャンクション、５’組み込みジャンクション、ならびにＡＬＤ６コード領域の欠如についてスクリーニングするために使用した。妥当な３’組み込みジャンクションを、プライマーｏＧＶ３４９７およびｏＧＶ２３２０を使用して確認した。妥当な５’組み込みジャンクションを、プライマーｏＧＶ３４９６およびｏＧＶ０８２１を使用して確認した。最後に、ＡＬＤ６内部コード領域の欠失を、プライマーｏＧＶ３４９５およびｏＧＶ０７０６を使用して確認した。

【０４９９】

発酵：２ｇ／Ｌイソブチルアルデヒドを用いた振盪フラスコ発酵を、記載されるように、ａｌｄ６Δ株ＧＥＶＯ６２６４／ＧＥＶＯ６２６５、およびＧＥＶＯ６２７０／ＧＥＶＯ６２７１、ならびにそれらの対応するＡＬＤ６親株ＧＥＶＯ１９４７およびＧＥＶＯ２０８７の技術的３系列を使用して行った。

【０５００】

確認したａｌｄ６Δ株の、単一のコロニーで単離した形質転換体を、０．２ｇ／Ｌハイグロマイシンプレートを補充したＹＰＤプレートに貼り付け、親を、ＹＰＤプレートに貼り付けた。パッチからの細胞を使用して、ＹＰＤの技術的３系列３ｍＬ培養物に植菌した。培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。一晩のインキュベーション後、これらの培養物のOD_{600}を、水中で１：４０に希釈することによって決定した。適切な量の培養物を、２５０ｍＬバッフル付フラスコ中、５％グルコースを含む５０ｍＬのＹＰＤに添加して、０．１のOD_{600}を得、培養物を３０℃および２５０ｒｐｍでインキュベートした。２４時間のインキュベーション後、これらの培養物のOD_{600}を、水中で１：４０に希釈することによって決定した。適切な量の培養物を、８％グルコース、２００ｍＭ　ＭＥＳ　ｐＨ６．５、および２ｇ／Ｌイソブチルアルデヒドを含有する５０ｍＬのＹＰＤに添加して、５のOD_{600}を得た。発酵培養物を、バッフルなし２５０ｍＬフラスコ中で、３０℃および７５ｒｐｍでインキュベートした。未使用の培地を、ＬＣ分析のためのブランク培地として収集し、試料を供するまで４℃で保った。４８時間時点で、フラスコの各々からの試料を次のように採取した。１．５ｍＬの培養物を、１．５ｍＬエッペンドルフ管中に除去した。OD_{600}値を決定し、試料をＬＣ１分析のために調製した。各管を１４，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、上清を、ＬＣ１によって分析した。加えて、４８時間後に、酵素アッセイのための試料を採取した。適切な試料の８０個のＯＤを、２つの１５ｍＬファルコン管中に移し（複製試料用）、３０００×ｇで５分間、４℃で遠心分離した。ペレットを３ｍＬ冷滅菌水中に再懸濁させ、スイング型バケットローター中で、５０００×ｇで２分間、４℃で遠心分離した。水を真空吸引器によって除去した。円錐管を－８０℃で保管した。

【０５０１】

表７６は、４８時間の発酵後のイソ酪酸塩力価を示す。ＡＬＤ６親株ＧＥＶＯ１９４７は、それぞれ０．１９ｇ／Ｌおよび０．０１３ｇ／Ｌ／ＯＤの、平均総計および比イソ酪酸塩力価を産生した。これらの総計および比イソ酪酸塩力価は、ａｌｄ６Δ株ＧＥＶＯ６２６４において（それぞれ０．０６ｇ／Ｌおよび０．００４ｇ／Ｌ／ＯＤ）、またａｌｄ６Δ株ＧＥＶＯ６２６５においても（それぞれ０．０５ｇ／Ｌおよび０．００３ｇ／Ｌ／

ＯＤ）有意に減少された。ＡＬＤ６親株ＧＥＶＯ２０８７は、それぞれ０．１５ｇ／Ｌおよび０．００８ｇ／Ｌ／ＯＤの、平均総計および比イソ酪酸塩力価を産生した。総計および比イソ酪酸塩力価は、ａｌｄ６Δ株ＧＥＶＯ６２７０において（０．０５ｇ／Ｌおよび０．００３ｇ／Ｌ／ＯＤ）、またａｌｄ６Δ株ＧＥＶＯ６２７１においても（それぞれ０．０８ｇ／Ｌおよび０．００５ｇ／Ｌ／ＯＤ）有意に減少された。

【表７６】

*ＡＬＤ６*親株および該*ＡＬＤ６*親株に由来する*ａｌｄ６Δ*株のイソ酪酸塩産生。

株	親株	ALD6	イソブチルアルデヒド供給発酵（48時間）	
			イソ酪酸塩力価（g/L）	イソ酪酸塩減少（%）
GEVO1947		+	0.19±0.05	
GEVO6264	GEVO1947	-	0.06±0.02	68%
GEVO6265	GEVO1947	-	0.05±0.02	74%
GEVO2087		+	0.15±0.03	
GEVO6270	GEVO2087	-	0.05±0.03	67%
GEVO6271	GEVO2087	-	0.08±0.02	47%

この実施例に開示される株、プラスミド、およびオリゴヌクレオチドプライマーを、それぞれ表７７、７８、および７９に列挙する。

【表７７】

実施例２５に開示されるＫ．ラクチス株の遺伝子型。

GEVO番号	遺伝子型
GEVO1287	*MATα uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8* [pKD1]、クルイベロミセス・ラクチス(Dombrowski)van der Walt, teleomorph, ATCC 200826
GEVO6242	*MATα uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8* [pKD1] *ald6Δ::P_{TEF1}-hph*
GEVO1830	*MATα uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8* [pKD1] *pdc1::kan:Ec_ilvC_ΔN:Ec_ilvDΔN_coKl::Sc_LEU2 組み込み} {Ll_kivD;Sc_Adh7:Km_URA3 無作為組み込み} {$P_{Sc_CUP1\text{-}1}$:Bs_alsS:TRP1 無作為組み込み}*
GEVO6244, GEVO6245	*MATα uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8* [pKD1] pdc1::kan:Ec_ilvC_ΔN:Ec_ilvDΔN_coKl::Sc_LEU2 組み込み} {Ll_kivD;Sc_Adh7:Km_URA3組み込み} {$P_{Sc_CUP1\text{-}1}$:Bs_alsS:TRP1 無作為組み込み} *ald6Δ::P_{TEF1}-hph*

【表７８】

実施例２５に開示されるプラスミド。

プラスミド名	遺伝子型
pGV2701	*P_{TEF1}:hph, CEN, pUC ori, bla*

【表７９】
実施例２５に開示されるオリゴヌクレオチド配列。

プライマー	配列
oGV3502	GAAACACAGTGGATTAGTGCTGTC（配列番号173）
oGV3504	GAAGAGTAAAAAAGGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGCTCTTTGTAATTGTTGTTGGTG（配列番号174）
oGV3505	CAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAAACAGAGTCCATCCGTTTGAAACTGATTGCATGTC（配列番号175）
oGV3507	TCAAATTCTATTATCGCGCGGG（配列番号176）
oGV3503	CACCAACAACAATTACAAAGAGCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTTTTTTACTCTTC（配列番号177）
oGV3506	GACATGCAATCAGTTTCAAACGGATGGACTCTGTTTGTACAGAAAAAAAAGAAAAATTTG（配列番号178）
oGV3509	CTCCTCCGTTGCAGAACAAGGCTTTG（配列番号179）
oGV2320	GGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG（配列番号180）
oGV3508	CGGTGTTAAGTGCCAGAAATTGGTTG（配列番号181）
oGV0821	CGGGTAATTAACGACACCCTAGAGG（配列番号182）
oGV3510	CGGCGTACTCGACGTCTTGAGAAGTAG（配列番号183）

【０５０２】
株構築：Ｋ．ラクチスＡＬＤ６タンパク質（配列番号２９）をコードするＫ．ラクチスＡＬＤ６遺伝子相同体を、次のように、親Ｋ．ラクチス株ＧＥＶＯ１２８７およびＧＥＶＯ１８３０から欠失させて、それぞれ、株ＧＥＶＯ６２４２、およびＧＥＶＯ６２４４／ＧＥＶＯ６２４５をもたらした。

【０５０３】
ゲノムＤＮＡを、記載されるようにＧＥＶＯ１２８７から単離した。構築物を作製して、大腸菌ｈｐｈ（ハイグロマイシン抵抗性）カセットを、記載されるように、ＧＥＶＯ１２８７およびＧＥＶＯ１８３０のＡＬＤ６遺伝子座に、ＳＯＥ　ＰＣＲによって組み込んだ。ＰＣＲステップ番号１は、次の３つの反応からなっていた：５’ＡＬＤ６標的配列、３’ＡＬＤ６標的配列、およびｈｐｈマーカー。５’標的配列を、調製したＧＥＶＯ１２８７ゲノムＤＮＡから、プライマーｏＧＶ３５０２およびｏＧＶ３５０４を用いて増幅した。６３９ｂｐの断片を、ゲル電気泳動によって精製した。３’標的配列を、調製したＧＥＶＯ１２８７ゲノムＤＮＡから、プライマーｏＧＶ３５０５およびｏＧＶ３５０７を用いて増幅した。６２８ｂｐの断片をゲル精製した。P_{TEF1}：ｈｐｈ：$T_{CYC1(partial)}$カセットを、ｐＧＶ２７０１から、プライマーｏＧＶ３５０３およびｏＧＶ３５０６を用いて増幅した。１，６６３ｂｐの断片をゲル精製した。最終ＳＯＥ　ＰＣＲステップでは、ステップ番号１（５’標的配列／ｈｐｈマーカー／３’標的配列）からの３つの産物を結合した。反応物を、プライマーｏＧＶ３５０２およびｏＧＶ３５０７を使用して増幅した。２，８１０ｂｐの断片をゲル精製し、記載されるようにＧＥＶＯ１２８７およびＧＥＶＯ１８３０の形質転換のために使用した。コロニーを、ハイグロマイシン抵抗性について、０．１ｇ／Ｌハイグロマイシンを補充したＹＰＤプレート上で選択した。酵母コロニーＰＣＲを、記載されるように、適切な３’組み込みジャンクション、５’組み込みジャンクション、ならびにＡＬＤ６コード領域の欠如についてスクリーニングするために使用した。妥当な３’組み込みジャンクションを、プライマーｏＧＶ３５０９およびｏＧＶ２３２０を使用して確認した。妥当な５’組み込みジャンクションを、プライマーｏＧＶ３５０８およびｏＧＶ０８２１を使用して確認した。最後に、ＡＬＤ６内部コード領域の欠失を、プライマーｏＧＶ３５０８およびｏＧＶ３５１０を使用して確認した。

【０５０４】
発酵：培地中の２ｇ／Ｌイソブチルアルデヒドを用いた第１の振盪フラスコ発酵を、ａｌｄ６Δ株ＧＥＶＯ６２４２、およびＡＬＤ６野生型親株ＧＥＶＯ１２８７の技術的３系列を使用して行った。確認したａｌｄ６Δ欠失株の、単一のコロニーで単離した形質転換

体を、０．１ｇ／Ｌハイグロマイシンプレートを補充したＹＰＤプレートに貼り付け、親株を、ＹＰＤ上に貼り付けた。パッチからの細胞を使用して、ＹＰＤの技術的３系列３ｍＬ培養物に植菌した。培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。一晩のインキュベーション後、これらの培養物のOD_{600}を、水中で１：４０に希釈することによって決定した。適切な量の培養物を、２５０ｍＬバッフル付フラスコ中、５％グルコースを含む５０ｍＬのＹＰＤに添加して、０．１のOD_{600}を得、培養物を３０℃および２５０ｒｐｍでインキュベートした。２４時間のインキュベーション後、これらの培養物のOD_{600}を、水中で１：４０に希釈することによって決定した。適切な量の培養物を、８％グルコース、２００ｍＭ　ＭＥＳ　ｐＨ６．５、および２ｇ／Ｌイソブチルアルデヒドを含有する５０ｍＬのＹＰＤに添加して、５のOD_{600}を得た。発酵培養物を、バッフルなし２５０ｍＬフラスコ中で、３０℃および７５ｒｐｍでインキュベートした。未使用の培地を、ＬＣ１分析のためのブランク培地として収集し、試料を供するまで４℃で保った。２４時間時点で、フラスコの各々からの試料を次のように採取した。１．５ｍＬの培養物を、１．５ｍＬエッペンドルフ管中に除去した。OD_{600}値を決定し、試料を、記載されるようにＬＣ１分析のために調製した。各管を１４，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、上清を、記載されるようにＬＣ１による分析のために収集した。

【０５０５】

２ｇ／Ｌイソブチルアルデヒドを用いた第２の振盪フラスコ発酵を、記載されるように、ａｌｄ６Δ欠失株ＧＥＶＯ６２４４／ＧＥＶＯ６２４５、およびそれらの対応するＡＬＤ６親株ＧＥＶＯ１８３０を使用して行った。この発酵を、記載されるように、２４および４８時間時点で試料採取した。表８０は、これらの発酵の両方についてのイソ酪酸塩力価を示す。イソ酪酸塩力価は、ａｌｄ６Δ株中で、ＡＬＤ６親株と比較して有意に減少される。

【表８０】

*ＡＬＤ６*親株および該*ＡＬＤ６*親株に由来する*ａｌｄ６Δ*株のイソ酪酸塩産生。

株	イソブチルアルデヒド供給発酵（24時間）		イソブチルアルデヒド供給発酵（48時間）	
	イソ酪酸塩力価（g/L）	イソ酪酸塩減少（%）	イソ酪酸塩力価（g/L）	イソ酪酸塩減少（%）
GEVO1287	0.19±0.03		n.d.	n.d.
GEVO6242	0.12±0.02	36.8%	n.d.	n.d.
GEVO1830	0.16±0.00		0.12±0.01	
GEVO6244	0.06±0.02	62.5%	0.04±0.01	66.7
GEVO6245	0.07±0.00	56.3%	0.00±0.00	≥79.2*

ｎ．ｄ．＝この実験において決定されず

＊０．０２５ｇ／Ｌのイソ酪酸塩に対するＬＯＱに基づく

実施例２６：２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩に向けたＴＭＡ２９活性

【０５０６】

次の実施例は、Ｓ．セレビシエＴＭＡ２９タンパク質が、（Ｓ）－２－アセト乳酸（（Ｓ）－ＡＬ）および２－アセト－２－ヒドロキシ酪酸塩（ＡＨＢ）に向けて活性であることを例証する。

【表８１】

実施例２６に開示される株の遺伝子型。

GEVO番号	遺伝子型	源
GEVO3527	*MATα his3Δ-1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ*	ATCC番号201389（BY4742）
GEVO3939	*MATα his3Δ-1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ tma29::kan^R*	OpenBiosystems カタログ番号 YSC1054 （Yeast MATalphaコレクション）

【０５０７】

ＴＭＡ２９（ＹＭＲ２２６Ｃ）遺伝子が欠失された酵母株ＧＥＶＯ３９３９およびその親ＧＥＶＯ３５２７を、各株について３系列で、１４ｍＬ培養物管中、３ｍＬのＹＰＤに植菌することによって、各々３系列で培養した。培養物を、ＧＥＶＯ３５２７についてはＹＰＤ寒天プレート上の、およびＧＥＶＯ３９３９については０．２ｇ／Ｌ　Ｇ４１８を含有するＹＰＤプレート上のパッチから出発させた。培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。翌日、一晩の培養物のOD_{600}を測定し、０．１のOD_{600}になるまで５０ｍＬ培養物に植菌するための各培養物の容量を算出した。算出した各培養物の容量を使用して、２５０ｍＬバッフル付フラスコ中の５０ｍＬのＹＰＤに植菌し、培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍでインキュベートした。

【０５０８】

細胞を、８時間の増殖後に、２．２～２．７のＯＤの対数期中期の間に採取した。培養物を事前計量した５０ｍＬファルコン管に移し、細胞を、３０００×ｇで５分間の遠心分離によって収集した。培地の除去後、細胞を、１０ｍＬ　ＭｉｌｌｉＱ　H_2Oで洗浄した。水の除去後、細胞を、３０００×ｇで５分間、再び遠心分離し、残った水を、１ｍＬピペットチップを使用して注意深く除去した。細胞ペレットを計量し、次いで、更に使用するまで－８０℃で保管した。

【０５０９】

細胞ペレットを氷上で解凍し、溶解緩衝液（１０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７．０、１ｍＭジチオスレイトール、５％ｗ／ｖグリセロール）中に再懸濁させて、結果として２０質量％細胞懸濁液を得た。１ｍＬのガラスビーズ（直径０．５ｍｍ）を、各試料につき、１．５ｍＬエッペンドルフ管に添加し、８５０μＬの細胞懸濁液を添加した。酵母細胞を、Ｒｅｔｓｃｈ　ＭＭ３０１ミキサーミル（Ｒｅｔｓｃｈ　Ｉｎｃ．Ｎｅｗｔｏｗｎ，ＰＡ）を使用して、間に氷上で１分間インキュベーションしながら、各々最高速度で６×１分間混合し、溶解させた。管を、２１，５００×ｇで１０分間、４℃で遠心分離し、上清を、新たな管に移した。抽出物を、（Ｒ／Ｓ）－ＡＨＢおよび（Ｒ／Ｓ）－ＡＬに向けたＴＭＡ２９活性を決定するために、記載されるようにＴＭＡ２９アッセイを使用してアッセイするまで、それらを氷上で保有した。

【０５１０】

野生型ＭＡＴαＳ．セレビシエ株である、ＧＥＶＯ３５２７ライセートにおけるＳ．セレビシエＴＭＡ２９の、（Ｒ／Ｓ）－ＡＨＢの還元についての比活性は、１０．５±０．６ｍＵ／ｍｇであった。ｔｍａ２９Δ株ＧＥＶＯ３９３９は、４．８±０．１ｍＵ／ｍｇの比活性を有した。野生型ＧＥＶＯ３５２７株は、欠失株よりも約２倍高い比ＴＭＡ２９活性を有した。

【０５１１】

野生型ＭＡＴαＳ．セレビシエ株である、ＧＥＶＯ３５２７ライセートにおけるＳ．セレビシエＴＭＡ２９の、（Ｒ／Ｓ）－ＡＬの還元についての比活性は、１２．３±０．２ｍＵ／ｍｇであった。ｔｍａ２９Δ株ＧＥＶＯ３９３９は、２．９±０．３ｍＵ／ｍｇの比活性を有した。野生型ＧＥＶＯ３５２７株は、欠失株よりも約４倍高い比ＴＭＡ２９活性を有した。

実施例２７～３０のための一般的方法

【０５１２】

実施例２７～３０に記載される株、プラスミド、遺伝子／アミノ酸配列、およびプライマー配列を、それぞれ表８２、８３、８４、および８５に列挙する。

【表８２】

実施例２７～３０に開示される株の遺伝子型。

遺伝子型または参照
大腸菌 BL21（DE3）（Lucigen Corporation, Middleton, WI）
大腸菌 DH5α（Novagen, Gibbstown, NJ）
S.セレビシエ CEN.PK2（Euroscarf, Frankfurt, Germany）

【表８３】

実施例２７～３０に開示されるプラスミド。

Gevo 番号	遺伝子型または参照
pET22（b）+	Novagen, Gibbstown, NJ
pGV1102	$P_{Sc\ TEF1}$-*HA-tag-MCS-*T_{CYC1}*,URA3, 2-micron, bla, pUC-ori*
pGV1662	P_{Sc_TEF1}-L.ラクチス *kivD-*$T_{Sc_CYC1,}$ *bla*, ColE1 ori, *URA3*, 2μ ori.
pGV1947	$P_{Sc\ TEF1}$-*Ll_adhA-*$T_{Sc\ CYC1}$ *bla URA3 pMB1 ori 2μ ori*
pGV1947his	P_{Sc_TEF1}-*Ll_adhA*^{his6}-T_{Sc_CYC1} *bla URA3 pMB1 ori 2μ ori*
pET1947	P_{T7}*::Ll_adhA*^{his6}, *bla*, *ori*pBR322, *lac*I
pGV2274	*Ll_adhA_coSc* 配列を含有するクローン化ベクター（DNA2.0 によって合成、Menlo Park, CA）
pGV2475	$P_{Sc\ TEF1}$-*Ll_adhA_coSc*$^{28E7\text{-}his6}$-$T_{Sc\ CYC1}$, *bla*, *URA3*, *pMB1 ori*, *2μ ori*
pGV2476	$P_{Sc\ TEF1}$-*Ll_adhA_coSc*^{his6}-$T_{Sc\ CYC1}$, *bla*, *URA3*, *pMB1 ori*, *2μ ori*
pGV2477	$P_{Sc\ TEF1}$-*Ll_adhA_coSc*$^{RE1\text{-}his6}$-$T_{Sc\ CYC1}$, *bla*, *URA3*, *pMB1 ori*, *2μ ori*
pGV30C11	$P_{Sc\ TEF1}$-*Ll_adhA_coSc*$^{30C11\text{-}his6}$-$T_{Sc\ CYC1}$, *bla*, *URA3*, *pMB1 ori*, *2μ ori*

【表８４】

実施例２７～３０に開示される核酸およびタンパク質配列。

源	遺伝子（配列番号）	タンパク質（配列番号）
L.ラクチス	*Ll_adhA*（配列番号184）	Ll_AdhA（配列番号185）
L.ラクチス	*Ll_adhA_coSc*^{his6}（配列番号186）	Ll_AdhA^{his6}（配列番号187）
L.ラクチス	*Ll_adhA_coSc*$^{28E7\text{-}his6}$（配列番号188）	Ll_AdhA$^{28E7\text{-}his6}$（配列番号189）
L.ラクチス	*Ll_adhA_coSc*$^{30C11\text{-}his6}$（配列番号190）	Ll_AdhA$^{30C11\text{-}his6}$（配列番号191）
L.ラクチス	*Ll_adhA_coSc*$^{RE1\text{-}his6}$（配列番号192）	Ll_AdhA$^{RE1\text{-}his6}$（配列番号193）
L.ラクチス	*Ll_adhA_coSc*$^{7A4\text{-}his6}$（配列番号194）	Ll_AdhA$^{7A4\text{-}his6}$（配列番号195）
L.ラクチス	*Ll_adhA_coSc*$^{4A3\text{-}his6}$（配列番号196）	Ll_AdhA$^{4A3\text{-}his6}$（配列番号197）
L.ラクチス	*Ll_adhA*$^{1H7\text{-}his6}$（配列番号198）	Ll_AdhA$^{1H7\text{-}his6}$（配列番号199）
L.ラクチス	*Ll_adhA*$^{10F10\text{-}his6}$（配列番号200）	Ll_AdhA$^{10F10\text{-}his6}$（配列番号201）
L.ラクチス	*Ll_adhA*$^{8F11\text{-}his6}$（配列番号202）	Ll_AdhA$^{8F11\text{-}his6}$（配列番号203）
L.ラクチス	*Ll_adhA*$^{8D10\text{-}his6}$（配列番号204）	Ll_AdhA$^{8D10\text{-}his6}$（配列番号205）
L.ラクチス	*Ll_adhA_coSc*（配列番号206）	Ll_AdhA（配列番号185）
L.ラクチス	*Ll_adhA_coSc*^{28E7}（配列番号207）	Ll_AdhA^{28E7}（配列番号208）
L.ラクチス	*Ll_adhA_coSc*^{30C11}（配列番号209）	Ll_AdhA^{30C11}（配列番号210）
L.ラクチス	*Ll_adhA_coSc*^{RE1}（配列番号211）	Ll_AdhA^{RE1}（配列番号212）
L.ラクチス	*Ll_adhA_coSc*^{7A4}（配列番号213）	Ll_AdhA^{7A4}（配列番号214）
L.ラクチス	*Ll_adhA_coSc*^{4A3}（配列番号215）	Ll_AdhA^{4A3}（配列番号216）
L.ラクチス	*Ll_adhA*^{1H7}（配列番号217）	Ll_AdhA^{1H7}（配列番号218）
L.ラクチス	*Ll_adhA*^{10F10}（配列番号219）	Ll_AdhA^{10F10}（配列番号220）
L.ラクチス	*Ll_adhA*^{8F11}（配列番号221）	Ll_AdhA^{8F11}（配列番号222）
L.ラクチス	*Ll_adhA*^{8D10}（配列番号223）	Ll_AdhA^{8D10}（配列番号224）

【表８５－１】
実施例２７～３０に開示されるプライマー配列（５’から３’で示される）。

プライマー名	配列*
XX7	GGAGAAAACCCATATGTCGTTTAC（配列番号 225）
XX9	GCAGCCGAACGCTCGAGGGCGGCCG（配列番号 226）
His_Not1_1947_rev	CTCGAGCGGCCGCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTTTAGTAAAATCAA（配列番号 227）
Sal1_for	GAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTT（配列番号 228）
adhAcoSc_SalIin_for	GTTTGTCGACATGAAGGCTGCAGTTGTCCGT(配列番号 229）
adhAcoSC_NotIin_his_rev	TCGAGCGGCCGCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTTCGTGAAGTCTATAACCATTCTACC（配列番号 230）
pGV1994ep_for	CGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTTGTTCTATTACAAC（配列番号 231）
pGV1994ep_rev	CTAACTCCTTCCTTTTCGGTTAGAGCGGATGTGGG（配列番号 232）
RecombADHY50_for	TGCTGCCGGAGATTWCGGCAACAAGGCAGG（配列番号 233）
RecombADHY50_rev	CCTGCCTTGTTGCCGWAATCTCCGGCAGCA（配列番号 234）
RecombADHL264_for	ATGGTAGCCGTTGCTKTACCAAACACAGAA（配列番号 235）
RecombADHL264_rev	TTCTGTGTTTGGTAMAGCAACGGCTACCAT（配列番号 236）
RecombADHI212_Y219_for	GCTGATGTCAYAATTAACTCTGGTGACGTTWACCCTGTAG（配列番号 237）
RecombADHI212_Y219_rev	CTACAGGGTWAACGTCACCAGAGTTAATTRTGACATCAGC（配列番号 238）
NNKADHF50_for	TGCTGCCGGAGATNNKGGCAACAAG（配列番号 239）
NNKADHF50_rev	GCCTTGTTGCCMNNATCTCCGGCAG（配列番号 240）
NNKADHR77_for	GTTAGTTCTCTCNNKGTAGGTGATAG（配列番号 241）
NNKADHR77_rev	CACTCTATCACCTACMNNGAGAGAAC（配列番号 242）
NNKADHA108_for	ACATTTTGCCGAGAANNKAAAAACGC（配列番号 243）
NNKADHA108_rev	ACCAGCGTTTTTMNNTTCTCGGCAAA（配列番号 244）
NNKADHF113_for	GTCAAAAACGCTGGTNNKAGCGTTGA（配列番号 245）
NNKADHF113_rev	ACCATCAACGCTMNNACCAGCGTTTT（配列番号 246）
NNKADHT212_for	AGATAGGTGCTGATGTCNNKATTAAC（配列番号 247）
NNKADHT212_rev	CAGAGTTAATMNNGACATCAGCACCT（配列番号 248）
NNKADHV264_for	GGTAGCCGTTGCTNNKCCAAACACAG（配列番号 249）
NNKADHV264_rev	ATTTCTGTGTTTGGMNNAGCAACGGC（配列番号 250）

【表８５－２】

Recomb2F50Minilib_for	GTTGCAGCAGGTGATTDKGGCAACAAAGCA（配列番号251）
Recomb2F50Minilib_rev	TGCTTTGTTGCCMHAATCACCTGCTGCAAC（配列番号252）
Recomb2Q77Gen5_for3	TGATGTAAGCTCGCTTCAAGTTGGTGATCG（配列番号253）
Recomb2Q77Gen5_rev4	CGATCACCAACTTGAAGCGAGCTTACATCA（配列番号254）
Recomb2R77Gen5_for5	TGATGTAAGCTCGCTTCGAGTTGGTGATCG（配列番号255）
Recomb2R77Gen5_rev6	CGATCACCAACTCGAAGCGAGCTTACATCA（配列番号256）
Recomb2S77Gen5_for7	TGATGTAAGCTCGCTTTCTGTTGGTGATCG（配列番号257）
Recomb2S77Gen5_rev8	CGATCACCAACAGAAAGCGAGCTTACATCA（配列番号258）
Recomb2Y113 Gen5_for9	TTAAAAATGCAGGATATTCAGTTGATGGCG（配列番号259）
Recomb2Y113 Gen5_rev10	CGCCATCAACTGAATATCCTGCATTTTTAA（配列番号260）
Recomb2F113 Gen5_for11	TTAAAAATGCAGGATTTTCAGTTGATGGCG（配列番号261）
Recomb2F113 Gen5_rev12	CGCCATCAACTGAAAATCCTGCATTTTTAA（配列番号262）
Recomb2G113 Gen5_for13	TTAAAAATGCAGGAGGGTCAGTTGATGGCG（配列番号263）
Recomb2G113 Gen5_rev14	CGCCATCAACTGACCCTCCTGCATTTTTAA（配列番号264）
Recomb2T212 Mini_for15	GAGCTGATGTGRYAATCAATTCTGGTGATG（配列番号265）
Recomb2T212 Mini_rev16	CATCACCAGAATTGATTRYCACATCAGCTC（配列番号266）
Recomb2V264 Mini_for17	TGGTTGCTGTGGCAKTACCCAATACTGAGA（配列番号267）
Recomb2V264 Mini_rev18	TCTCAGTATTGGGTAMTGCCACAGCAACCA（配列番号268）

＊　Ａ（アデニン）、Ｇ（グアニン）、Ｃ（シトシン）、Ｔ（チミン）、Ｕ（ウラシル）、Ｒ（プリン－ＡまたはＧ）、Ｙ（ピリミジン－ＣまたはＴ）、Ｎ（任意のヌクレオチド）、Ｗ（弱－ＡまたはＴ）、Ｓ（強－ＧまたはＣ）、Ｍ（アミノ－ＡまたはＣ）、Ｋ（ケト－Ｇ、またはＴ）、Ｂ（Ａでない（Ｎｏｔ　Ａ）－ＧまたはＣまたはＴ）、Ｈ（Ｇでない（Ｎｏｔ　Ｇ）－ＡまたはＣまたはＴ）、Ｄ（Ｃでない（Ｎｏｔ　Ｃ）－ＡまたはＧまたはＴ）、およびＶ（Ｔでない（Ｎｏｔ　Ｔ）－ＡまたはＧまたはＣ）

培地および緩衝液：

【０５１３】

ＳＣ－ＵＲＡ：６．７ｇ／Ｌ　Ｄｉｆｃｏ（商標）酵母窒素原礎培地、１４ｇ／Ｌ　Ｓｉｇｍａ（商標）合成ドロップアウト培地用添加物（ヒスチジン、トリプトファン、ウラシル、およびロイシンを除くアミノ酸および栄養分を含む）、１０ｇ／Ｌカザミノ酸、２０ｇ／Ｌグルコース、０．０１８ｇ／Ｌアデニンヘミ硫酸塩、および０．０７６ｇ／Ｌトリプトファン。

【０５１４】

ＳＤ－ＵＲＡ：ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ（Ｉｒｖｉｎｅ，ＣＡ）にて市販されている。組成：カザミノ酸を含み、ウラシルＣＳＭ－ＵＲＡを含まない、１．７ｇ／Ｌ酵母窒素原礎培地（ＹＮＢ）、５ｇ／Ｌ硫酸アンモニウム、２０ｇ／Ｌグルコース。

【０５１５】

ＹＰＤ（酵母ペプトンデキストロース）培地：１０ｇ／Ｌ酵母抽出物、２０ｇ／Ｌペプトン、２０ｇ／Ｌグルコース。

【０５１６】

トリス－ＤＴＴ：ｐＨ８．０の、濾過滅菌した、１ｍＬの１ＭトリスＨＣｌ当たり、０．３９ｇ　１，４－ジチオスレイトール。

【０５１７】

緩衝液Ａ：ｐＨ７．４に調整し、濾過滅菌した、２０ｍＭトリス、２０ｍＭイミダゾール、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　$MgCl_2$。

【０５１８】

緩衝液Ｂ：ｐＨ７．４に調整し、濾過滅菌した、２０ｍＭトリス、３００ｍＭイミダゾール、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　$MgCl_2$。

【０５１９】

緩衝液Ｅ：ｐＨ７．５に調整し、濾過滅菌した、１Ｌの脱イオン水当たり、１．２ｇトリス塩基、９２．４ｇグルコース、および０．２ｇ　$MgCl_2$。

【０５２０】

ｐＥＴ１９４７の構築：Ｌ．ラクチスａｄｈＡ（Ｌｌ＿ａｄｈＡ）遺伝子を、ｐＧＶ１９４７から、プライマーＨｉｓ＿Ｎｏｔ１＿１９４７＿ｆｗｄおよびＳａｌ１＿ｒｅｖを使用してクローン化し、ｐＥＴ２２ｂ（＋）中にライゲートして、プラスミドｐＥＴ１９４７を得た。

【０５２１】

ｐＧＶ２４７６の構築：プラスミドｐＧＶ２２７４は、順方向プライマーａｄｈＡｃｏＳｃ＿Ｓａｌｌｉｎ＿ｆｏｒ、および逆方向プライマーａｄｈＡｃｏＳＣ＿Ｎｏｔｌｉｎ＿ｈｉｓ＿ｒｅｖを使用して、ＰＣＲのためのテンプレートとしての機能を果たした。ＰＣＲ産物を精製し、ＮｏｔＩおよびＳａｌＩで制限消化し、ｐＧＶ１６６２中にライゲートし、それをＮｏｔＩおよびＳａｌＩで切断し、精製した。

【０５２２】

Ｓ．セレビシエの形質転換：計画した形質転換の前夜に、ＹＰＤ培養物に、単一のＳ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２コロニーを植菌し、３０℃および２５０ｒｐｍで一晩インキュベートした。翌朝、２０ｍＬ　ＹＰＤ培養物を、バッフルを有さない２５０ｍＬエルレンマイヤーフラスコ中で、０．１のOD_{600}である一晩の培養物を用いて出発させた。この培養物を、それが１．３～１．５のOD_{600}に到達するまで、３０℃および２５０ｒｐｍでインキュベートした。培養物が所望のOD_{600}に到達したとき、２００μＬのトリス－ＤＴＴを添加し、培養物を３０℃および２５０ｒｐｍで更に１５分間インキュベートさせた。細胞を次いで、４℃および２，５００×ｇで３分間ペレット化した。上清を除去した後、ペレットを、１０ｍＬの氷冷緩衝液Ｅ中に再懸濁させ、上述のように再び遠沈させた。次いで、細胞ペレットを、１ｍＬの氷冷緩衝液Ｅ中に再懸濁させ、前のように更に１回遠沈させた。ピペットでの上清の除去後、２００μＬの氷冷緩衝液Ｅを添加し、ペレットを、穏やかに再懸濁させた。６μＬの挿入／主鎖混合物を半分に分割し、５０μＬの細胞懸濁液に添加した。ＤＮＡ／細胞混合物を０．２ｃｍエレクトロポレーションキュベット（ＢＩＯＲＡＤ）中に移し、パルスコントローラを用いずに０．５４ｋＶおよび２５μＦで電気穿孔処理した。即座に、１ｍＬの事前加温したＹＰＤを添加し、形質転換した細胞を、１５ｍＬ丸底培養物管（Ｆａｌｃｏｎ）中、３０℃および２５０ｒｐｍで再生させた。１時間後、細胞を４℃および２，５００×ｇで３分間遠沈させ、ペレットを１ｍＬ事前加温したＳＤ－ＵＲＡ培地中に再懸濁させた。異なる量の形質転換された細胞を、ＳＤ－ＵＲＡプレート上にプレートし、３０℃で１．５日間、またはコロニーが滅菌楊枝で取り上げるのに十分なほど大きくなるまで、インキュベートした。

【０５２３】

酵母細胞のプラスミド少量調製：Ｚｙｍｏｐｒｅｐ（商標）ＩＩ－酵母プラスミドミニプレップキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｏｒａｎｇｅ，ＣＡ）を使用して、若干変更した、液培養物についての製造業者のプロトコルに従って、Ｓ．セレビシエ細胞からプラスミドＤＮＡを調製した。２００μＬの酵母細胞のアリコートを、６００×ｇで２分間遠沈させた。上清をデカントした後、２００μＬの溶液１を添加して、ペレットを再懸濁させた。試料に、３μＬのＺｙｍｏｌｙａｓｅ（商標）を添加し、細胞／酵素懸濁液を、指ではじくことによって穏やかに混合した。試料を３７℃で１時間インキュベートした後、溶液２および３を添加し、各添加後によく混合した。試料を次いで、最大速度および４℃で１０分間遠沈させた。次のＺｙｍｏカラム上での浄化を、製造業者の指示に従って行った。プラスミドＤＮＡを、１０μＬのＰＣＲグレード水で溶出した。この容量の半分を使用して、大腸菌ＤＨ５αを形質転換した。

【０５２４】

大腸菌における異種ＡＤＨ発現：アンピシリン（最終濃度０．１ｍｇ／ｍＬ）を含む５０ｍＬのＬｕｒｉａ－Ｂｅｒｔａｎｉ（ＬＢ）培地（１リットル当たり１０ｇトリプトン、１０ｇ　ＮａＣｌ、５ｇ酵母抽出物）を含有するフラスコ（５００ｍＬエルレンマイヤ

ー）に、０．１の初期ＯＤ$_{600}$になるまで、単一のコロニーを担持するプラスミドｐＥＴ１９４７の、０．５ｍＬの一晩のＬＢ$_{amp}$培養物を使用して植菌した。５０ｍＬ　ＬＢ発現培養物を、２５０ｒｐｍおよび３７℃で３～４時間増殖させた。タンパク質発現を、０．５ｍＭの最終濃度になるまでＩＰＴＧを添加しながら、約１のＯＤ$_{600}$で誘導した。タンパク質発現を２２５ｒｐｍおよび２５℃で２４時間継続させた。細胞を、５３００×ｇおよび４℃で１０分間採取し、次いで細胞ペレットを、更に使用するまで－２０℃で凍結させた。

【０５２５】

Ｓ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２における異種発現：１００ｍＬのＳＣ－ＵＲＡで満たしたフラスコ（１０００ｍＬエルレンマイヤー）に、１ｍＬの一晩の培養物（３０℃および２５０ｒｐｍで増殖させた、単一のＣＥＮ．ＰＫ２コロニーを植菌した５ｍＬ　ＳＣ－ＵＲＡ）を植菌した。発現培養物を、３０℃および２５０ｒｐｍで２４時間増殖させた。細胞を、５３００×ｇで５分間ペレット化した。上清を破棄し、ペレットを再びスピンした。残渣の上清を次いで、ピペットで取り除いた。ペレットを、更に使用するまで－２０℃で凍結した。

【０５２６】

高処理アッセイのための９６ウェルプレート中でのＣＥＮ．ＰＫ２における異種発現：３００μＬのＳＣ－ＵＲＡで満たした、１ウェル当たり１ｍＬ容積の浅底９６ウェルプレートに、Ｌｌ＿ａｄｈＡ^{his6}またはその変異体をコードするプラスミドを担持する、単一ＣＥＮ．ＰＫ２コロニーを植菌した。１ウェル当たり６００μＬのＳＣ－ＵＲＡで満たした、１ウェル当たり２ｍＬ容積の深底９６ウェルプレートに、５０μＬのこれらの一晩の培養物を植菌した。プレートを、３０℃および２５０ｒｐｍで２４時間増殖させ、次いで、５３００×ｇおよび４℃で５分間採取し、－２０℃で保管した。

【０５２７】

大腸菌からのＡＤＨ含有抽出物の調製：発現されたＡＤＨを含有する大腸菌細胞ペレットを解凍し、緩衝液Ａ中に再懸濁させた（０．２５ｇ湿重量／ｍＬ緩衝液）。再懸濁させた細胞を、超音波処理によって、５０％デューティサイクルで１分間溶解させ、１１０００×ｇおよび４℃で１０分間ペレット化した。抽出物を４℃で保管した。

【０５２８】

Ｓ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２からのＡＤＨ含有抽出物の調製：発現されたＡＤＨを含有するＳ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２細胞ペレットを解凍し、計量して、ペレットの湿重量を得た。細胞を次いで、緩衝液Ａ中に再懸濁させ、結果として２０質量％細胞懸濁液を得た。直径０．５ｍｍのガラスビーズを、１．５ｍＬエッペンドルフ管の１０００μＬマークの（直径０．５ｍｍ）に添加した後、８７５μＬの細胞懸濁液を添加した。酵母細胞を、ビーズ式破砕によって、Ｒｅｔｓｃｈ　ＭＭ３０１ミキサーミル（Ｒｅｔｓｃｈ　Ｉｎｃ．Ｎｅｗｔｏｗｎ，ＰＡ）使用して、間に１分間の氷冷ステップを行いながら、各々６×１分間、最高速度で混合して溶解させた。管を、２３，５００ｘｇおよび４℃で１０分間遠心分離機にかけ、上清を除去した。抽出物を４℃で保管した。

【０５２９】

ＡＤＨの精製：ＡＤＨを、ＩＭＡＣ（固定化金属親和性クロマトグラフィー）によって、Ｎｉｃｋｅｌ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を事前充填した、１ｍＬ　Ｈｉｓｔｒａｐ高性能（ｈｉｓｔｒａｐ　ＨＰ）カラム上で、Ａｋｔａ精製器ＦＰＬＣ系（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して精製した。カラムを、緩衝液Ａの４カラム容量（ｃｖ）で平衡化した。粗抽出物をカラム上に注入した後、カラムを、緩衝液Ａの２ｃｖで洗浄し、続いて１００％溶出緩衝液Ｂの１５ｃｖで直線勾配をかけ、９６ウェルプレート中に収集した。タンパク質を含有する画分をプールし、４℃で保管した。

【０５３０】

ＡＤＨキュベットアッセイ：ＡＤＨ活性を、３４０ｎｍでの吸光度測定することによってＮＡＤＨ濃度の減少をモニタリングすることによって、動態的にアッセイした。１００ｍＭトリス／ＨＣｌ、ｐＨ７．０、１ｍＭ　ＤＴＴ、１１ｍＭイソブチルアルデヒド、お

よび２００μＭ　ＮＡＤＨを含有する反応緩衝液を調製した。反応を、９００μＬの反応緩衝液に対する適切な希釈液中、１００μＬの粗抽出物または精製したタンパク質の添加によって開始させた。

【０５３１】

ＡＤＨマイクロタイタープレート活性アッセイ：マイクロタイタープレート中での活性測定は、縮小規模のキュベットアッセイである。総容量は１００μＬであった。適切に希釈した１０μＬの粗ライセートまたは精製した酵素を、アッセイプレート中に配置した。反応緩衝液を、上述のように調製し（イソブチルアルデヒド基質のみ）、その９０μＬをプレート中の酵素溶液に添加した。ＮＡＤＨの消費を、インフィニットＭ２００プレートリーダー（ＴＥＣＡＮ　Ｔｒａｄｉｎｇ　ＡＧ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）において３４０ｎｍで記録した。

【０５３２】

ＡＤＨ高処理活性アッセイ：９６ウェルプレート中の凍結した酵母細胞ペレットを室温で２０分間解凍し、次いで１００μＬのＹ－Ｐｅｒ（Ｐｉｅｒｃｅ、カタログ番号７８９９０）を添加した。プレートを手短にボルテックスして、細胞ペレットを再懸濁させた。室温および１３０ｒｐｍで６０分間のインキュベーション期間後、３００μＬの１００ｍＭトリス－ＨＣｌ（ｐＨ７．０）をプレートに添加して、粗抽出物を希釈した。５，３００×ｇおよび４℃で１０分間の遠心分離ステップに続いて、４０μＬの結果として得られた粗抽出物を、アッセイプレート（平底、Ｒａｉｎｉｎ）中に、液搬送ロボットを使用して移した。アッセイプレートを４，０００ｒｐｍおよび室温で手短に遠沈させた。１プレート当たり１２ｍＬアッセイ緩衝液を調製し（１００ｍＭトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．０、１ｍＭ、０．５ｍＭ、０．２５ｍＭ、または０．１２５ｍＭイソブチルアルデヒド、１ｍＭ　ＤＴＴ、２００μＭ　ＮＡＤＨ）、その１００μＬを各ウェルに添加して、反応を開始させた。ＮＡＤＨの枯渇を、インフィニットＭ２００プレートリーダー（ＴＥＣＡＮ　Ｔｒａｄｉｎｇ　ＡＧ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）において３４０ｎｍで２分間にわたって記録した。

【０５３３】

活性アッセイから得たデータに基づく比活性の決定：粗抽出物および精製したタンパク質等の、異種性で発現されるＬ．ラクチスＡｄｈＡを含有する試料のタンパク質濃度を、Ｑｕｉｃｋ　Ｓｔａｒｔ（商標）Ｂｒａｄｆｏｒｄキット（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）を使用して、製造業者の指示に従って測定した。１単位酵素の活性（１Ｕ）は、アッセイ方法の指定条件下で、１分間当たり１マイクロモルの基質の変換を触媒する酵素の量として定義される。

【０５３４】

熱安定性測定：親Ｌｌ＿ａｄｈＡおよびその変異体のT_{50}値（１５分間のインキュベーション時間後に、酵素活性の５０％が保持される温度）を測定して、熱安定性データを得た。３０μＬアリコートの精製した酵素を、ＰＣＲ管中に移した。各管に、２０℃温度範囲に及ぶ勾配でプログラムされたマスターサイクラー（登録商標）ｅｐ　ＰＣＲ機（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ，Ｈａｍｂｕｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）のスロットまたはブロックに対応する、特定のインキュベーション温度を割り当てた。管をそれらのスロット内で１５分間インキュベートした。次いで、反応を氷上で反応停止処理した。残渣の活性を、上述のようにＡＤＨマイクロタイタープレート活性アッセイを用いて決定した。

【０５３５】

精製のためのＨｉｓ－Ｔａｇの使用：後述の実施例の各々において、ｈｉｓ－ｔａｇを含むＡＤＨ酵素に言及する。当該技術分野において理解されるように、かかるｈｉｓ－ｔａｇは、タンパク質精製を促進する。本開示を提供される当業者によって理解されるように、該ｈｉｓ－ｔａｇを欠くＡＤＨ酵素は、イソブチルアルデヒドのイソブタノールへの変換のために同等にまたはよりよく適している。精製有効化ｈｉｓ－ｔａｇｓを欠く、本明細書に記載される改変されたＡＤＨ酵素の例は、配列番号　２０６～２２４に見出される。

実施例２７：無作為突然変異誘発を介した指向性進化

【０５３６】

次の実施例は、ＡＤＨの動力学的特性を改善するための方法を例証し、また、かかる改善されたＡＤＨ酵素の動力学的特性も説明する。

【０５３７】

Ｌｌ＿ａｄｈＡ＿ｃｏＳｃ^{ｈｉｓ６}遺伝子を担持する、プラスミドｐＧＶ１６６２の誘導体であるプラスミドｐＧＶ２４７６は、順方向プライマーｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｆｏｒ、および逆方向プライマーｐＧＶ１９９４＿ｒｅｖを使用して、誤りがちなＰＣＲのためのテンプレートとしての機能を果たした。これらのプライマーは、主鎖ｐＧＶ１６６２に特異的であり、およびＡＤＨ挿入の５０ｂｐ上流および下流に結合して、酵母中の相同組み換えに対する重複を作り出す。３つの誤りがちなＰＣＲ反応物の組成を、表８６に要約する。温度プロフィールは次の通りであった：９５℃　３分間の初期変性、９５℃　３０秒間の変性、５５℃　３０秒間のアニーリング、７２℃　２分間の伸長、２５サイクル、７２℃で５分間の最終伸長。

【表８６】

誤りがちなライブラリのためのＰＣＲ条件。

最終 $MnCl_2$ 濃度[μM]	**100**	**200**	**300**
テンプレート[ng]	2	2	2
プライマー順方向[μM]	0.2	0.2	0.2
プライマー逆方向[μM]	0.2	0.2	0.2
dNTP[μM]	400	400	400
Taq 緩衝液（10 倍原液）[μL]	10	10	10
$MgCl_2$ [μM]	7	7	7
Taq ポリメラーゼ[U]	8	8	8
$MnCl_2$（1mM 原液）[μM]	100	200	300
PCR グレード水[μL]	41.4	31.4	21.4

【０５３８】

ＰＣＲ産物を、１％分析用ＴＡＥアガロースゲル上で確認し、３７℃で１時間ＤｐｎＩ消化させて、微量のテンプレートＤＮＡを除去し、次いで１％分取ＴＡＥアガロースゲルを使用して浄化した。ＰＣＲ産物を含有するアガロース片を、Ｆｒｅｅｚｅ‘ｎ’Ｓｑｕｅｅｚｅ管（ＢＩＯＲＡＤ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ、カタログ番号７３２－６１６６）を使用して浄化し、続いて製造業者のプロトコルに従って、ペレット着色手順（Ｎｏｖａｇｅｎ、カタログ番号６９０４９－３）を行った。その一方で、アガロースゲルおよびペレット着色上の消化混合物を使い果たす前に、プラスミドｐＧＶ１６６２を、ＮｏｔＩおよびＳａｌＩで制限消化した。各々５００ｎｇのプラスミドおよび挿入物を、一緒に混合し、ペレット着色で沈殿させ、６μＬのＰＣＲグレード水中に再懸濁させ、それを使用して、一般的方法に記載されるようにエレクトロコンピテントなセレビシエ細胞を形質転換した。

【０５３９】

１００、２００、および３００μＭ　$MnCl_2$ ライブラリの各々からの総計８８個のクローンを、親プラスミドｐＧＶ２４７６を含有する４個のクローン、およびＡＤＨなし対照としてｐＧＶ１１０２を含有する３個のクローンと共に、９６ウェルプレート中に摘み取った。１つのウェルは空のまま残し、無菌対照としての機能を果たすようにした。これらのライブラリを、一般的方法（高処理アッセイのための９６ウェルプレート中でのＣＥＮ．ＰＫ２における異種発現、ＡＤＨ高処理活性アッセイ）下に記載されるようにスクリーニングした後、３００μＭライブラリを選択し、追加的な４，０００個のクローンを同じ方法でスクリーニングした。総計２４個の変異体は、野生型と比較して１．５倍超の改善を有し、それを３系列での再スクリーニングのために選択した。その上位１０個の変

異体を増殖させ、一般的方法（Ｓ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２における異種発現）下に記載されるように１００ｍＬ培養物中で発現させ、粗酵母抽出物中でのそれらの特異的な活性を、一般的方法（ＡＤＨマイクロタイタープレートアッセイ）下に記載されるように決定した。２つの変異体、Ｌｌ＿ＡｄｈＡ$^{２８Ｅ７－ｈｉｓ６}$およびＬｌ＿ＡｄｈＡ$^{３０Ｃ１１－ｈｉｓ６}$は、活性（それぞれ０．３および０．２５Ｕ／ｍｇ総ライセートタンパク質）において、野生型酵素Ｌｌ＿ＡｄｈＡ^{ｈｉｓ６}（０．１Ｕ／ｍｇ総ライセートタンパク質）と比較して、２倍超の改善を示し、それをより詳細に特徴付けた。

【０５４０】

これらの２つの変異体からのプラスミドＤＮＡを、一般的方法（酵母細胞のプラスミド少量調製）下に記載されるように抽出し、ＤＮＡ配列決定（Ｌａｒａｇｅｎ，Ｌｏｓ Ａｎｇｅｌｅｓ，ＣＡ）に供し、それによって、表８７に列挙されるように１変異体当たり２つの突然変異が明らかとなった。これらの突然変異（Ｙ５０ＦおよびＬ２６４Ｖ）のうちの２つは、基質結合ドメイン（ｃｙａｎ）と補因子結合ドメイン（ｇｒｅｅｎ）との間のギャップである、活性部位に近接して局在化される。突然変異Ｉ２１２ＴおよびＮ２１９Ｙは、（図１７に示されるように）補因子結合ドメインの表面上に位置する。補因子結合部位突然変異の場所を強調するために、図１７は、構造整列についての２つの図を伴う。

【表８７】

第１の誤りがちなライブラリの２つの改善された変異体において見出される突然変異の一覧（世代１）。

変異体	突然変異
Ll_adhA$^{28E7\text{-}his6}$	N219Y、L264V
Ll_adhA$^{30C11\text{-}his6}$	Y50F、I212T

【０５４１】

２つの酵素変異体、Ｌｌ＿ＡｄｈＡ$^{２８Ｅ７－ｈｉｓ６}$およびＬｌ＿ＡｄｈＡ$^{３０Ｃ１１－ｈｉｓ６}$を、それぞれプラスミドｐＧＶ２４７５およびｐＧＶ３０Ｃ１１から、より大規模に（各々１００ｍＬ培養物）発現させ、精製し、一般的方法（Ｓ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２における異種発現、Ｓ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２からのＡＤＨ含有抽出物の調製、ＡＤＨの精製）下に記載されるように、より詳細に特徴付けた。野生型Ｌｌ＿ＡｄｈＡ^{ｈｉｓ６}酵素をプラスミドｐＧＶ２４７６から発現させ、同じ方法で精製した。酵素を、一般的方法（ＡＤＨキュベットアッセイ）下に記載されるように、動力学的特性について特徴付けた。表８８は、イソブチルアルデヒドおよびＮＡＤＨを用いて測定した動力学的パラメータを示す。減少されたK_M値が、両変異体について観察された一方で、k_{cat}は、Ｌｌ＿ＡｄｈＡ^{２８Ｅ７}についてのみ改善された。

【表８８】

親酵素と比較した、イソブチルアルデヒドに対する２つの変異体（世代１）の動力学的パラメータ。

変異体	粗ライセート	精製したタンパク質			
	U/mg	K_M [mM]	U/mg	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$M^{-1}*s^{-1}$]
Ll_AdhA^{his6}	0.28±0.08	11.7±0.6	25±0.2	30	2,800
Ll_AdhA$^{28E7\text{-}his6}$	0.74±0.15	2.7±0.2	43±2	60	21,000
Ll_AdhA$^{30C11\text{-}his6}$	0.46±0.2	3.9±0.1	60±0.2	80	20,000

【０５４２】

野生型酵素および２つの変異体の熱安定性を、一般的方法（熱安定性測定）下に記載されるように決定した。見出された突然変異は、変異体の安定性にプラスの影響を与えたことに加えて、それらの触媒効率に有益な効果を及ぼした。表８９は、親および変異体について測定したT_{50}を要約する。

【表８９】
親酵素および変異体のＴ$_{50}$の概要。

変異体	T_{50} [℃]、15分間
Ll_AdhA^{his6}	54.4±0.5
Ll_AdhA$^{28E7\text{-}his6}$	62.3±0.3
Ll_AdhA$^{30C11\text{-}his6}$	57.6±0.6

実施例２８：組み換えを介した指向性進化

【０５４３】
次の実施例は、ＡＤＨの動力学的特性を改善するための方法を例証し、また、かかる改善されたＡＤＨ酵素の動力学的特性も例証する。

【０５４４】
第２の遺伝子ライブラリ（世代２）を構築して、第１の誤りがちなライブラリおよびこれらの部位の各々における野生型残基において見出される、有益な突然変異を組み換えた（表９０）。

【表９０】
組み換えライブラリに含まれるアミノ酸突然変異。

アミノ酸位置	野生型	突然変異	総数（野生型を含む）
50	Y	F	2
212	I	T	2
219	Y	N	2
264	L	V	2

【０５４５】
４つのＰＣＲ断片を、プライマーＲｅｃｏｍｂＡＤＨＹ５０＿ｒｅｖおよびｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｆｏｒ（断片１）、ＲｅｃｏｍｂＡＤＨＹ５０＿ｆｏｒおよびＲｅｃｏｍｂＡＤＨＩ２１２＿Ｙ２１９＿ｒｅｖ（断片２）、ＲｅｃｏｍｂＡＤＨＩ２１２＿Ｙ２１９＿ｆｏｒおよびＲｅｃｏｍｂＡＤＨＬ２６４＿ｒｅｖ（断片３）、ならびにＲｅｃｏｍｂＡＤＨＬ２６４＿ｒｅｖおよびｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｒｅｖ（断片４）を使用して生成した。断片を、分析用１％ＴＡＥゲル上で分析し、ＤｐｎＩ消化させ、１％分取ＴＡＥアガロースゲル上で分離し、Ｆｒｅｅｚｅ’ｎ’Ｓｑｕｅｅｚｅ（ＢＩＯＲＡＤ）処理し、最後にペレット着色した（Ｎｏｖａｇｅｎ）。クリーンな断片は、アセンブリＰＣＲのためのテンプレートとしての機能を果たした。アセンブリＰＣＲの成功後、ＰＣＲ産物を実施例２７に記載されるように処理し、実施例２７に記載されるｐＧＶ１６６２主鎖と混合し、この混合物を使用してセレビシエを、実施例２７～３０のための一般的方法に記載されるように形質転換した。組み換えライブラリの８０個の単一クローンを摘み取り、高処理スクリーニングにおいて、誤りがちなライブラリにおいて見出される野生型および２つの変異体と比較した。

【０５４６】
総計８０個の単一クローンを、元の親および２つの改善された変異体と共に９６ウェルプレート中に摘み取った。組み換えプレートを、一般的方法（高処理アッセイのための９６ウェルプレート中でのＣＥＮ．ＰＫ２における異種発現、ＡＤＨ高処理活性アッセイ）下に記載されるようにスクリーニングした後、親Ｌｌ＿ＡｄｈＡ$^{28E7-his6}$またはＬｌ＿ＡｄｈＡ$^{30C11-his6}$のいずれかと比較して全てが少なくとも２倍高い活性を示す、１２個の変異体を増殖させ、一般的方法（Ｓ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２における異種発現）下に記載されるように、１００ｍＬ培養物中で発現させ、粗酵母抽出物中でのそれらの活性を、一般的方法（ＡＤＨマイクロタイタープレートアッセイ）下に記載されるように決定した。２つの変異体は、粗抽出物中で非常に類似した比活性を有した。Ｌｌ＿ＡｄｈＡ^{RE1}の活性は、Ｌｌ＿ＡｄｈＡ$^{28E7-his6}$よりも４０％良好であり、かつＬｌ＿ＡｄｈＡ$^{30C11-his6}$よりも６４％良好であったため、それ

を更なる改変のために選択した。

【０５４７】

この変異体からのプラスミドＤＮＡを、一般的方法（酵母細胞のプラスミド少量調製）下に記載されるように抽出し、ＤＮＡ配列決定（Ｌａｒａｇｅｎ，Ｌｏｓ Ａｎｇｅｌｅｓ，ＣＡ）に供し、それによって、突然変異Ｙ５０Ｆ、Ｉ２１２Ｔ、およびＬ２６４Ｖ（Ｌｌ＿ＡｄｈＡ^{ＲＥ１}において見出される）が、観察された改善に寄与する一方で、２１９位における突然変異が変異体の活性に有害であり、組み換えライブラリの改善された変異体のいずれにおいても見出されないことが明らかとなった。

【０５４８】

変異体Ｌｌ＿ＡｄｈＡ$^{ＲＥ１－ｈｉｓ６}$を、プラスミドｐＧＶ２４７７から、より大規模に（各々１００ｍＬ培養物）発現させ、精製し、一般的方法（Ｓ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２における異種発現、Ｓ．セレビシエＣＥＮ．ＰＫ２からのＡＤＨ含有抽出物の調製、ＡＤＨの精製）下に記載されるように、より詳細に特徴付けた。野生型Ｌｌ＿ＡｄｈＡ^{ｈｉｓ６}酵素をプラスミドｐＧＶ２４７６から発現させ、同じ方法で精製した。酵素を、一般的方法（ＡＤＨキュベットアッセイ）下に記載されるように、動力学的特性について特徴付けた。表９１は、イソブチルアルデヒドおよびＮＡＤＨを用いて測定した動力学的パラメータを示す。Ｌｌ＿ＡｄｈＡ^{ｈｉｓ６}、Ｌｌ＿ＡｄｈＡ$^{２８Ｅ７－ｈｉｓ６}$、Ｌｌ＿ＡｄｈＡ$^{３０Ｃ１１－ｈｉｓ６}$と比較して、減少されたK_Mおよび増加されたk_{cat}が、Ｌｌ＿ＡｄｈＡ$^{ＲＥ１－ｈｉｓ６}$について観察された。

【表９１】

イソブチルアルデヒド上で測定したＬｌ＿ＡｄｈＡ^{ＲＥ１}の生化学的特性。

変異体	粗ライセート	精製したタンパク質			
	U/mg	K_M [mM]	U/mg	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$M^{-1}*s^{-1}$]
Ll_AdhA^{his6}	0.28±0.08	11.7±0.6	25±0.2	30	2,800
Ll_AdhA$^{28E7\text{-}his6}$	0.74±0.15	2.7±0.2	43±2	60	21,000
Ll_AdhA$^{30C11\text{-}his6}$	0.46±0.2	3.9±0.1	60±0.2	80	20,000
Ll_AdhA$^{RE1\text{-}his6}$	1.15±0.2	1.7± 0.0	105±1	140	82,000

【０５４９】

変異体Ｌｌ＿ａｄｈＡ$^{ＲＥ１－ｈｉｓ６}$は、野生型のＴ$_{５０}$よりも５度高く、かつ組み換えラウンドの最も安定な親、Ｌｌ＿ＡｄｈＡ$^{２８Ｅ７－ｈｉｓ６}$よりも概ね１度低い、６１．６±０．１℃のＴ$_{５０}$値を示した。

実施例２９：無作為突然変異誘発、部位飽和突然変異誘発、および組み換えを介したＬ．ラクチスＡｄｈＡの指向性進化

【０５５０】

次の実施例は、ＡＤＨの動力学的特性を改善するための方法を例証し、また、かかる改善されたＡＤＨ酵素の動力学的特性も説明する。

【０５５１】

Ｌｌ＿ａｄｈＡ$^{ＲＥ１－ｈｉｓ６}$遺伝子は、誤りがちなＰＣＲおよびスクリーニングの第２ラウンドのためのテンプレートとしての機能を果たした（世代３）。スクリーニングアッセイは、０．１２５ｍＭイソブチルアルデヒドを利用した。上記の実施例１に従って、誤りがちなＰＣＲを使用して、２００μＭ ＭｎＣｌ$_２$を用いて生成したライブラリの約３，０００クローンを発現させ、高処理様式でスクリーニングした。複数のヒットを、３系列での再スクリーニングのために選択し、２つの変異体、Ｌｌ＿ＡｄｈＡ$^{７Ａ４－ｈｉｓ６}$およびＬｌ＿ＡｄｈＡ$^{４Ａ３－ｈｉｓ６}$を、改善された活性を有するとして特定した。これらの変異体の突然変異を表９２に示す。

【表９２】

世代３変異体Ｌｌ＿ＡｄｈＡ$^{7A4-his6}$およびＬｌ＿ＡｄｈＡ$^{4A3-his6}$において蓄積した突然変異の一覧。

変異体	突然変異
Ll_AdhA$^{7A4-his6}$	Y50F、I212T、L264V、Q77R、V108A
Ll_AdhA$^{4A3-his6}$	Y50F、I212T、L264V、Y113F

【０５５２】

Ｌｌ＿ＡｄｈＡ$^{7A4-his6}$およびＬｌ＿ＡｄｈＡ$^{4A3-his6}$、ならびに親のライセートにおける比活性（Ｕ／ｍｇ）を、生物学的３系列で、ｐＨ７．０で測定した（表９３）。

【表９３】

ｐＨ７．０でのＬｌ＿ＡｄｈＡ$^{7A4-his6}$およびＬｌ＿ＡｄｈＡ$^{4A3-his6}$の生化学的特性。

変異体	粗ライセート	精製したタンパク質			
	[U/mg]	K_M [mM]	U/mg	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$M^{-1}*s^{-1}$]
Ll_AdhA$^{7A4-his6}$	1.14±0.1	1.2±0.2	88.8±2.9	117	94,000
Ll_AdhA$^{4A3-his6}$	1.36±0.1	0.9±0.1	70±2.9	95	100,000

【０５５３】

Ｌｌ＿ＡｄｈＡ$^{7A4-his6}$（５９．４℃）およびＬｌ＿ＡｄｈＡ$^{4A3-his6}$（５７．６℃）T_{50}値は双方とも、Ｌｌ＿ＡｄｈＡ^{his6}よりも高く、かつＬｌ＿ＡｄｈＡ$^{RE1-his6}$よりも低かった。

【０５５４】

２ラウンドの誤りがちなＰＣＲおよび１ラウンドの組み換え後、部位飽和突然変異誘発を、６つの部位の各々において行って、６つのライブラリ（ライブラリ５０、７７、１０８、１１３、２１２、および２６４）を生成した。元の親、Ｌｌ＿ＡｄｈＡ^{his6}を、各ＮＮＫ断片のためのテンプレートとして使用した。各ライブラリに対する２つの断片を、表４に列挙されるプライマー（ライブラリ５０の断片１に対するｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｆｏｒおよびＮＮＫＡＤＨＦ５０＿ｒｅｖ、ライブラリ５０の断片２に対するＮＮＫＡＤＨＦ５０＿ｆｏｒおよびｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｒｅｖ；ライブラリ７７の断片１に対するｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｆｏｒおよびＮＮＫＡＤＨＲ７７＿ｒｅｖ、ライブラリ７７の断片２に対するＮＮＫＡＤＨＲ７７＿ｆｏｒおよびｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｒｅｖ；ライブラリ１０８の断片１に対するｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｆｏｒおよびＮＮＫＡＤＨＡ１０８＿ｒｅｖ、ライブラリ１０８の断片２に対するＮＮＫＡＤＨＡ１０８＿ｆｏｒおよびｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｒｅｖ；ライブラリ１１３の断片１に対するｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｆｏｒおよびＮＮＫＡＤＨＦ１１３＿ｒｅｖ、ライブラリ１１３の断片２に対するＮＮＫＡＤＨＦ１１３＿ｆｏｒおよびｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｒｅｖ；ライブラリ２１２の断片１に対するｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｆｏｒおよびＮＮＫＡＤＨＴ２１２＿ｒｅｖ、ライブラリ２１２の断片２に対するＮＮＫＡＤＨＴ２１２＿ｆｏｒおよびｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｒｅｖ；ライブラリ２６４の断片１に対するｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｆｏｒおよびＮＮＫＡＤＨＶ２６４＿ｒｅｖ、ライブラリ２６４の断片２に対するＮＮＫＡＤＨＶ２６４＿ｆｏｒおよびｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｒｅｖ）を使用して増幅し、次いで、アセンブリＰＣＲのためのテンプレートとして使用した。アセンブリＰＣＲ産物を前述のように処理して、酵母中のＮＮＫライブラリを生成した。９０個のクローンを、各ＮＮＫライブラリにつき摘み取り、別個にスクリーニングした。再スクリーニング後、６つのライブラリからの９個のクローンを、酵母から小規模調整し、プラスミドを使用して、大腸菌を形質転換し、結果として得られたプラスミドを配列決定した。それらのライセート活性および配列決定の結果を、表９４

に要約する。

【表９４】

部位飽和突然変異誘発の概要（世代４）。

NNK ライブラリの位置	変異体	ライセートにおける U/mg	NNK ライブラリにおいて見出される突然変異	NNK ライブラリにおいて見出される例示的な突然変異	組み換えに対する突然変異
-	Ll_adhA^{his6}	0.28±0.08			
-	Ll_AdhA^{RE1}	1.15±0.20			
50	1G4	0.78±0.02	Y50W	F、W	C、L、F、W、Y、X
77	2G3	0.42 ±0.00	Q77S	R、S	Q、R、S
77	2H2	0.43±0.00	-	-	-
108	3D10	0.61±0.01	V108A	-	-
108	3D12	0.53±0.07	V108S	-	-
113	4A3b	0.38±0.05	Y113G	F、G	Y、F、G
113	4E6	0.30±0.04	Y113G	-	-
212	5D2	0.92±0.02	I212V	T、V	A、I、T、V
264	6E12	0.38±0.07	L264V	V	I、V

【０５５５】

部位飽和突然変異誘発ライブラリにおいて見出される多様な突然変異を、コンビナトリアル様式で、ＳＯＥ　ＰＣＲを使用して組み換え、ライブラリを、非コドン最適化された親、ｐＧＶ１９４７ｈｉｓを使用して構築した。表８５に記載されるプライマーは、６つの標的化部位における野生型配列も許容した。６つの断片を、Ｒｅｃｏｍｂ２Ｆ５０Ｍｉｎｉｌｉｂ＿ｒｅｖおよびｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｆｏｒ（断片１）、Ｒｅｃｏｍｂ２Ｆ５０Ｍｉｎｉｌｉｂ＿ｆｏｒ、およびＲｅｃｏｍｂ２Ｑ７７Ｇｅｎ５＿ｒｅｖ４と、Ｒｅｃｏｍｂ２Ｒ７７Ｇｅｎ５＿ｒｅｖ６と、Ｒｅｃｏｍｂ２Ｓ７７Ｇｅｎ５＿ｒｅｖ８とのミックス（断片２）、Ｒｅｃｏｍｂ２Ｑ７７Ｇｅｎ５＿ｆｏｒ３と、Ｒｅｃｏｍｂ２Ｒ７７Ｇｅｎ５＿ｆｏｒ５と、Ｒｅｃｏｍｂ２Ｓ７７Ｇｅｎ５＿ｆｏｒ７とのミックス、およびＲｅｃｏｍｂ２Ｙ１１３　Ｇｅｎ５＿ｒｅｖ１０と、Ｒｅｃｏｍｂ２Ｆ１１３　Ｇｅｎ５＿ｒｅｖ１２と、Ｒｅｃｏｍｂ２Ｇ１１３　Ｇｅｎ５＿ｒｅｖ１４とのミックス（断片３）、Ｒｅｃｏｍｂ２Ｙ１１３　Ｇｅｎ５＿ｆｏｒ９と、Ｒｅｃｏｍｂ２Ｆ１１３　Ｇｅｎ５＿ｆｏｒ１１と、Ｒｅｃｏｍｂ２Ｇ１１３　Ｇｅｎ５＿ｆｏｒ１３とのミックス、およびＲｅｃｏｍｂ２Ｔ２１２　Ｍｉｎｉ＿ｒｅｖ１６（断片４）、Ｒｅｃｏｍｂ２Ｔ２１２　Ｍｉｎｉ＿ｆｏｒ１５およびＲｅｃｏｍｂ２Ｖ２６４　Ｍｉｎｉ＿ｒｅｖ１８（断片５）、ならびにＲｅｃｏｍｂ２Ｖ２６４　Ｍｉｎｉ＿ｆｏｒ１７およびｐＧＶ１９９４ｅｐ＿ｒｅｖ（断片６）を使用して生成した。断片ＰＣＲを、分析用１％ＴＡＥゲル上で分析し、次いで、産物を３７℃で１時間ＤｐｎＩ消化させ、１％分取ＴＡＥアガロースゲル上で分離し、Ｆｒｅｅｚｅ’ｎ’Ｓｑｕｅｅｚｅ（ＢＩＯＲＡＤ）処理し、最後にペレット着色した（Ｎｏｖａｇｅｎ）。クリーンな断片は、アセンブリＰＣＲのためのテンプレートとしての機能を果たした。アセンブリＰＣＲの成功後、相同組み換え（上述のように）を使用して、ライブラリを作り出した。１０００個を超える個々のクローンを、０．１２５ｍＭのイソブチルアルデヒド濃度を使用してスクリーニングした。再スクリーニングプレートを、上位６０個の変異体からなるようにまとめ、０．１２５ｍＭイソブチルアルデヒドを用いてアッセイした。

【０５５６】

１０個の変異体を、ライセートにおけるそれらの比活性を決定するために、１００ｍＬＳＣ－ＵＲＡ培地中での発現について選択した。それらのうちの４個を配列決定し（突然変異については表９５を参照されたい）、精製し、より詳細に特徴付けた（表９６）。新たな変異体は、ライセートにおいて、Ｌｌ＿ＡｄｈＡ^{ＲＥ１}と同様の比活性を示した。

とりわけ、変異体４Ａ３は、高い比活性を有する酵素として際立っていた。

【表９５】

世代５からの変異体における突然変異の一覧。

変異体	突然変異
Ll_AdhA$^{1H7\text{-}his6}$	Y50F、I212A、L264V、Y113F
Ll_AdhA$^{10F10\text{-}his6}$	Y50F、I212T、L264V、Q77S、Y113F
Ll_AdhA$^{8F11\text{-}his6}$	Y50F、I212A、L264V、Q77R、Y113F
Ll_AdhA$^{8D10\text{-}his6}$	Y50F、I212V、L264V、Q77S、Y113F

【表９６】

世代５からの変異体の生化学的特性。

	粗ライセート	精製したタンパク質			
変異体	U/mg	K_M [mM]	U/mg	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$M^{-1}*s^{-1}$]
Ll_AdhA$^{1H7\text{-}his6}$	1.12±0.11		39.9±1.7		
Ll_AdhA$^{10F10\text{-}his6}$	1.15±0.17		75.4±12.3		
Ll_AdhA$^{8F11\text{-}his6}$	1.09±0.13	0.8±0.2	41.7±0.2	55	68233
Ll_AdhA$^{8D10\text{-}his6}$	1.05±0.08		58.8±4.5		

実施例３０：相同ＡＤＨ酵素の操作

【０５５７】

次の実施例は、どのように追加のＡＤＨ酵素が特定され、追加のＡＤＨ酵素の動力学的特性を改善するために操作されるかを例証する。

【０５５８】

Ｌ．ラクチスＡｄｈＡと相同な酵素を、一般に入手可能なデータベースであるＢｌａｓｔＰ検索を通じて、Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のアミノ酸配列を使用して、次の検索パラメータを用いて特定した：予想閾値＝１０、ワードサイズ＝３、行列＝Ｂｌｏｓｕｍ６２、ギャップ開始＝１１、ギャップ伸張＝１。約６０％を超える配列同一性を有する相同体を表す上位１００個のヒットを選択したが、それを表９７に列挙する。配列を、Ｖｅｃｔｏｒ ＮＴＩ Ａｄｖａｎｃｅ １０．３．１の構成要素である、多重配列アライメントツールＡｌｉｇｎＸを使用して、次のパラメータを用いて整列させた：ギャップ開始ペナルティ（ｐｅｎｔａｌｔｙ）＝１０、ギャップ伸張ペナルティ＝０．０５、ギャップ分離ペナルティ範囲＝８。多重配列アライメントは、（ａ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のチロシン５０（ｂ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のグルタミン７７、（ｃ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のバリン１０８、（ｄ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のチロシン１１３、（ｅ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のイソロイシン２１２、および（ｆ）Ｌ．ラクチスＡｄｈＡ（配列番号１８５）のロイシン２６４に対応する残基の中の間で非常に高レベルの保存を示した。、ここでＡｄｈＡ（配列番号１８５）は、Ｌ．ラクチスアルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）遺伝子ａｄｈＡ（配列番号１８４）またはそのコドン最適化バージョン（配列番号２０６）によってコードされる。

【表９７－１】
Ｌ．ラクチスＡｄｈＡとの６０％超の配列同一性を有する相同酵素

アクセッション	説明	配列同一性%	E値	総スコア
YP_003354381.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [ラクトコッカ・スラクチス亜種ラクチスKF147]	100	0	684
NP_267964.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトコッカ・スラクチス亜種ラクチスIl1403]	99	0	681
YP_001033251.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトコッカ・スラクチス亜種クレモリスMG1363]	95	0	659
YP_811585.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトコッカ・スラクチス亜種クレモリスSK11]	95	0	658
ZP_07367864.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ペディオコッカスアシディラクティシDSM 20284]	69	2.00E-129	466
YP_794451.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトバチルス・ブレビスATCC 367]	66	1.00E-127	460
ZP_06197454.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ペディオコッカスアシディラクティシ7_4]	69	8.00E-124	447
YP_001374103.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[バチルス・セレウス亜種サイトトキシスNVH 391-98]	65	1.00E-123	447
ZP_00741101.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・イスラエレンシスATCC 35646]	64	9.00E-123	444
ZP_04431756.1	アルコールデヒドロゲナーゼGroESドメインタンパク質[バチルス・コアグランス36D1]	63	1.00E-122	444
ZP_04101989.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ベルリナー ATCC 10792]	64	1.00E-122	443
ZP_03943574.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトバチルス・ブチェネリATCC 11577]	62	2.00E-122	443

【表９７－２】

ZP_03943574.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトバチルス・ブチェネリATCC 11577]	62	2.00E-122	443
YP_002338331.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[バチルス・セレウスAH187]	64	2.00E-122	443
ZP_04145518.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・トチギエンシスBGSC 4Y1]	64	2.00E-122	443
ZP_00236660.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、プロパノール選好[バチルス・セレウスG9241]	64	2.00E-122	443
ZP_03954717.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトバチルス・ヒルガルディイATCC 8290]	62	2.00E-122	443
ZP_06011170.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [レプトトリキア・グッドフェロウィイ（goodfellowii）F0264]	65	2.00E-122	442
ZP_07537679.1	アルコールデヒドロゲナーゼ亜鉛結合ドメインタンパク質[アクチノバチルス・プルロニューモニア・セロバー9株CVJ13261]	63	2.00E-122	442
NP_844655.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[バチルス・アンスラシス株Ames]	64	3.00E-122	442
ZP_04071880.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・チューリンゲンシスIBL 200]	64	3.00E-122	442
YP_001844344.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトバチルス・ファーメンタムIFO 3956]	64	3.00E-122	442
ZP_04227732.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・セレウスRock3-29]	64	4.00E-122	442
YP_002529920.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[バチルス・セレウスQ1]	64	4.00E-122	442
ZP_03107320.1	推定アルコールデヒドロゲナーゼ、亜鉛含有[バチルス・セレウスNVH0597-99]	64	5.00E-122	441
YP_001644942.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[バチルス・ウェイヘンステファネンシスKBAB4]	64	5.00E-122	441

【表９７－３】

ZP_03940565.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトバチルス・ブレビス亜種グラベセンシスATCC 27305]	62	5.00E-122	441
ZP_05863633.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトバチルス・ファーメンタム28-3-CHN]	64	5.00E-122	441
ZP_04174477.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・セレウスAH1273]	64	5.00E-122	441
ZP_04168725.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・ミコイデスDSM 2048]	64	5.00E-122	441
ZP_03945523.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトバチルス・ファーメンタムATCC 14931]	64	5.00E-122	441
YP_894846.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[バチルス・チューリンゲンシス株Al Hakam]	64	6.00E-122	441
ZP_04273257.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・セレウスBDRD-ST24]	64	6.00E-122	441
ZP_07337905.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[アクチノバチルス・プルロニューモニア・セロバー2株4226]	63	6.00E-122	441
YP_795183.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトバチルス・ブレビスATCC 367]	64	6.00E-122	441
ZP_03234447.1	推定アルコールデヒドロゲナーゼ、亜鉛含有[バチルス・セレウスH3081.97]	64	7.00E-122	441
ZP_00134308.2	COG1064:Zn依存性アルコールデヒドロゲナーゼ[アクチノバチルス・プルロニューモニア・セロバー1株4074]	63	7.00E-122	441
NP_831985.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[バチルス・セレウスATCC 14579]	64	7.00E-122	441
NP_978607.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[バチルス・セレウスATCC 10987]	65	7.00E-122	441
YP_002366965.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[バチルス・セレウスB4264]	64	8.00E-122	441

【表９７－４】

ZP_04283955.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・セレウスATCC 4342]	64	8.00E-122	441
ZP_04218185.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・セレウスRock3-44]	64	1.00E-121	441
ZP_04186048.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・セレウスAH1271]	64	1.00E-121	441
ZP_07542038.1	アルコールデヒドロゲナーゼ亜鉛結合ドメインタンパク質[アクチノバチルス・プルロニューモニア・セロバー11株56153]	63	1.00E-121	440
YP_003664530.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[バチルス・チューリンゲンシスBMB171]	64	1.00E-121	440
ZP_04222478.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・セレウスRock3-42]	64	1.00E-121	440
ZP_04305999.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・セレウス172560W]	64	1.00E-121	440
ZP_04317351.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・セレウスATCC 10876]	64	2.00E-121	440
YP_001035842.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ストレプトコッカスサングイニスSK36]	66	2.00E-121	439
ZP_07336540.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[アクチノバチルス・プルロニューモニア・セロバー6株Femo]	63	2.00E-121	439
ZP_03232573.1	推定アルコールデヒドロゲナーゼ、亜鉛含有[バチルス・セレウスAH1134]	64	2.00E-121	439
ZP_04084316.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ヒュアゾンゲンシス(huazhongensis)BGSC 4BD1]	64	2.00E-121	439
YP_036379.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・コンクキアン（konkukian）株97-27]	64	2.00E-121	439

【表９７－５】

ZP_03713785.1	仮説タンパク質EIKCOROL_01470 [エイケネラコルロデンスATCC 23834]	64	3.00E-121	439
ZP_04300512.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・セレウスMM3]	64	3.00E-121	439
ZP_04261933.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・セレウスBDRD-ST196]	64	3.00E-121	439
ZP_04197309.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・セレウスAH603】	64	3.00E-121	439
ZP_04289229.1	アルコールデヒドロゲナーゼ1 [バチルス・セレウスR309803]	64	6.00E-121	438
YP_001449881.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ストレプトコッカスゴルドニイ株チャリス（Challis）亜株CH1]	64	1.00E-120	437
YP_002886170.1	アルコールデヒドロゲナーゼ亜鉛結合ドメインタンパク質[エキシグオバクテリウム菌種AT1b]	64	1.00E-120	437
ZP_03072955.1	アルコールデヒドロゲナーゼGroESドメインタンパク質[ラクトバチルス・ロイテリ100-23]	63	3.00E-120	435
ZP_01817011.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、亜鉛含有[ストレプトコッカス・ニューモニエSP3-BS71]	65	5.00E-120	435
ZP_03974464.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトバチルス・ロイテリCF48-3A]	63	6.00E-120	434
ZP_01824429.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、亜鉛含有[ストレプトコッカス・ニューモニエSP11-BS70]	65	8.00E-120	434
YP_002735395.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ストレプトコッカス・ニューモニエJJA]	65	8.00E-120	434
CAQ49114.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、プロパノール選好[黄色ブドウ球菌亜種アウレウスST398]	63	1.00E-119	434
ZP_01819490.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、亜鉛含有[ストレプトコッカス・ニューモニエSP6-BS73]	65	1.00E-119	434

【表９７－６】

ZP_01832462.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、亜鉛含有[ストレプトコッカス・ニューモニエSP19-BS75]	65	1.00E-119	434
ZP_01834441.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、亜鉛含有[ストレプトコッカス・ニューモニエSP23-BS72]	65	1.00E-119	433
ZP_07644167.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、プロパノール選好[ストレプトコッカス・ミティスNCTC 12261]	65	1.00E-119	433
NP_344823.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ストレプトコッカス・ニューモニエTIGR4]	65	1.00E-119	433
YP_003878532.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、プロパノール選好[ストレプトコッカス・ニューモニエ670-6B]	65	1.00E-119	433
YP_001272079.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトバチルス・ロイテリDSM 20016]	63	1.00E-119	433
ZP_03960239.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトバチルス・バジナリスATCC 49540]	62	1.00E-119	433
ZP_07646288.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ストレプトコッカス・ミティスSK564]	65	2.00E-119	433
YP_002739644.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ストレプトコッカス・ニューモニエ70585]	65	2.00E-119	433
YP_002737553.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ストレプトコッカス・ニューモニエP1031]	65	2.00E-119	433
YP_002741829.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ストレプトコッカス・ニューモニエ台湾19F-14]	65	2.00E-119	433
ZP_05689169.1	アルコールデヒドロゲナーゼGroESドメイン含有タンパク質[黄色ブドウ球菌A9299]	63	2.00E-119	432
ZP_07642509.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ストレプトコッカス・ミティスSK597]	65	2.00E-119	432

【表９７－７】

ZP_02718124.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、プロパノール選好[ストレプトコッカス・ニューモニエCDC3059-06]	65	2.00E-119	432
ZP_07647302.1	アルコールデヒドロゲナーゼファミリータンパク質[ストレプトコッカス・ミティスSK321]	65	2.00E-119	432
NP_371129.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[黄色ブドウ球菌亜種アウレウスMu50]	62	3.00E-119	432
NP_645385.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[黄色ブドウ球菌亜種アウレウスMW2]	62	3.00E-119	432
ZP_01826570.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、亜鉛含有[ストレプトコッカス・ニューモニエSP14-BS69]	65	4.00E-119	432
CBW35926.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ストレプトコッカス・ニューモニエINV104]	65	4.00E-119	432
YP_003305918.1	アルコールデヒドロゲナーゼ亜鉛結合ドメインタンパク質[ストレプトバチルス・モニリフォルミスDSM 12112]	63	4.00E-119	432
YP_003445415.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、プロパノール選好、COG1064 [ストレプトコッカス・ミティスB6]	64	4.00E-119	432
ZP_05900148.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、プロパノール選好[レプトトリキア ホフスタディイ（hofstadii)F0254]	64	6.00E-119	431
ZP_06901123.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ストレプトコッカスパラサングイニスATCC 15912]	64	1.00E-118	430
ZP_05685696.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[黄色ブドウ球菌A9635]	62	1.00E-118	430
ZP_07728047.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、プロパノール選好[ストレプトコッカスパラサングイニスF0405]	63	2.00E-118	430
ZP_04783075.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ワイセラパラメゼンテロイデスATCC 33313]	62	4.00E-118	429

【表９７－８】

YP_003163500.1	アルコールデヒドロゲナーゼGroESドメインタンパク質[レプトトリキア・ブッカリスDSM 1135]	63	7.00E-118	427
ZP_05745418.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトバチルス・アントリDSM 16041]	63	3.00E-117	426
ZP_07729093.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、プロパノール選好[ラクトバチルス・オリスPB013-T2-3]	63	4.00E-117	425
ZP_03960690.1	アルコールデヒドロゲナーゼ[ラクトバチルス・バジナリスATCC 49540]	61	1.00E-116	424
YP_003920444.1	RBAM017440 [バチルス・アミロリケファシエンスDSM7]	60	2.00E-116	422
ZP_04603652.1	仮説タンパク質GCWU000324_03153 [キンゲラ・オラリスATCC 51147]	62	3.00E-116	422
ZP_05553195.1	マイコチオール依存性型アルデヒドデヒドロゲナーゼ[ラクトバチルス・コレオホミニス101-4-CHN]	63	4.00E-116	422
ZP_07073134.1	アルコールデヒドロゲナーゼ、プロパノール選好[ロチア・デントカリオーサM567]	63	1.00E-115	421

【０５５９】

前述の詳細な説明は、理解を明確にするために提供されているにすぎず、当業者にとって修正が明白であるので、そこから不必要な限定が何らなされるべきではない。

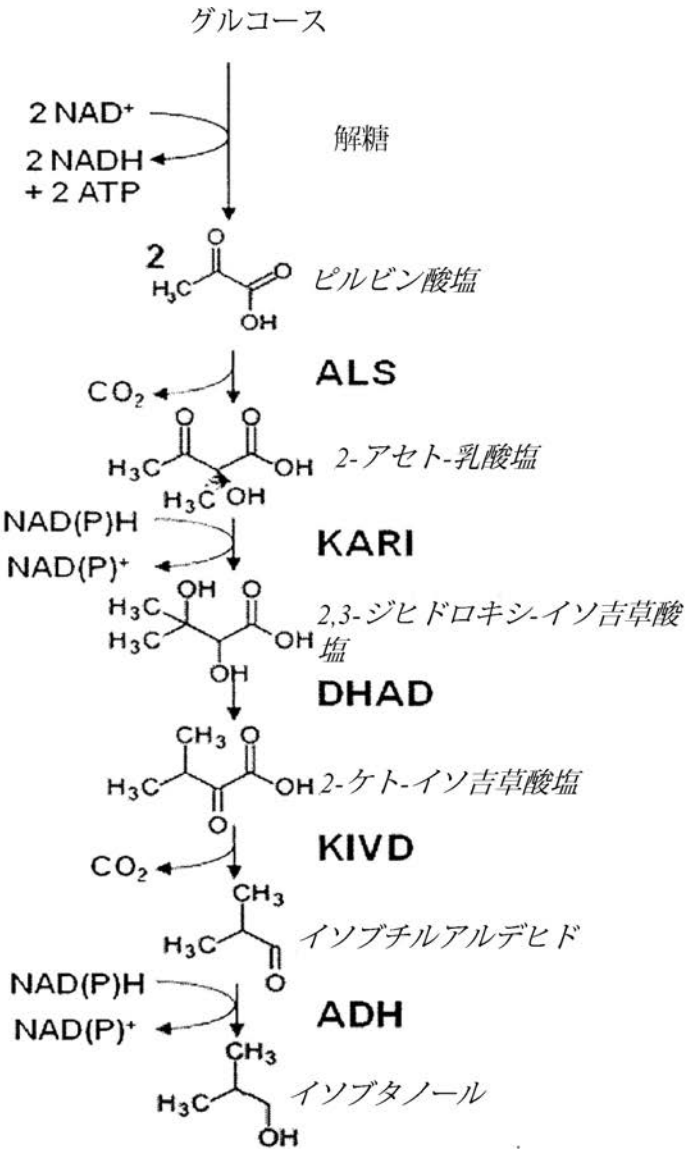
【０５６０】

本発明は、それらの特定の実施形態に関連して説明されているが、それは更なる修正が可能であり、本出願は、一般に、本発明の原則に従って、本発明の属する技術分野内での既知の実践または慣行の範囲内であるような、またこれより先に述べた、および次の添付の特許請求の範囲における本質的特徴に適用され得るような本開示からのかかる逸脱を含む、本発明のいかなる変形、使用、または適合をも包含することが意図されることが理解されよう。

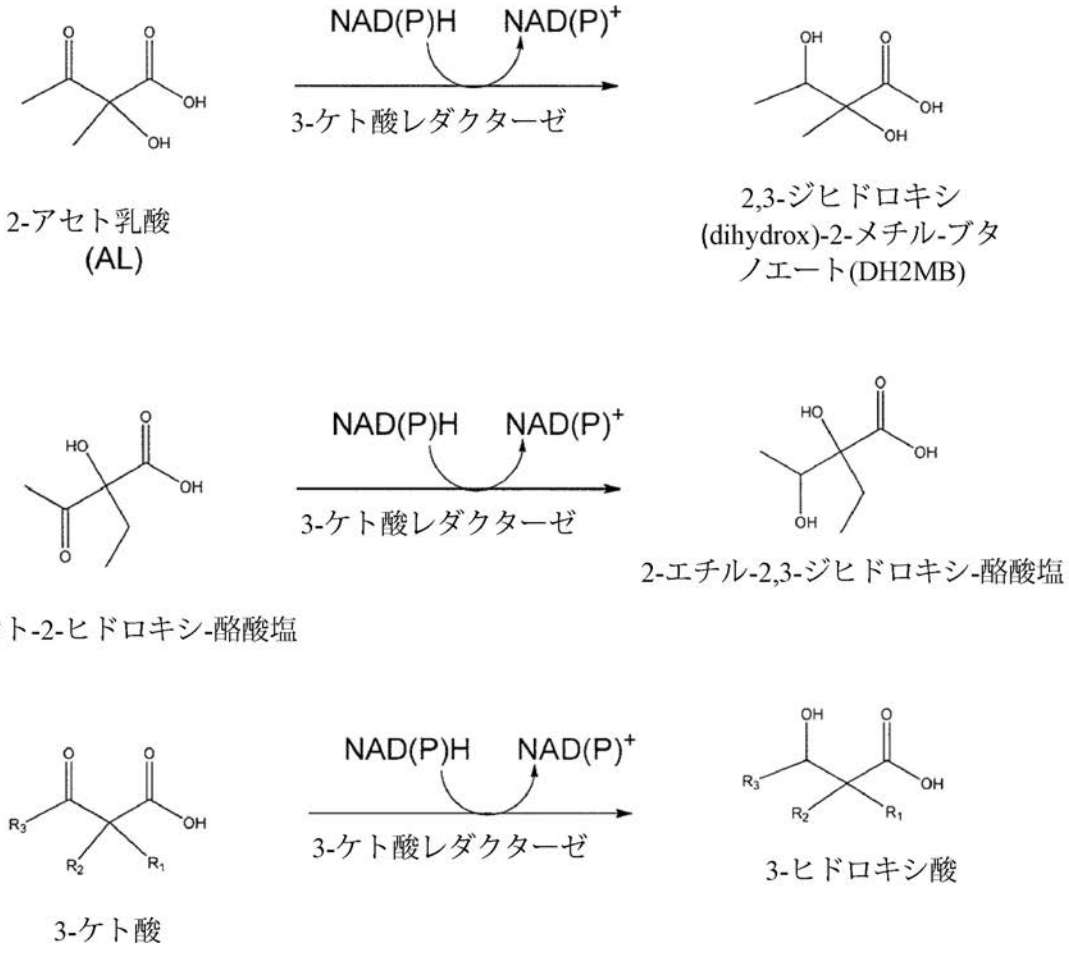
【０５６１】

本明細書で引用される各々あらゆる特許、特許出願、および刊行物の、特許請求の範囲、図および／または図面を含む開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【図１】

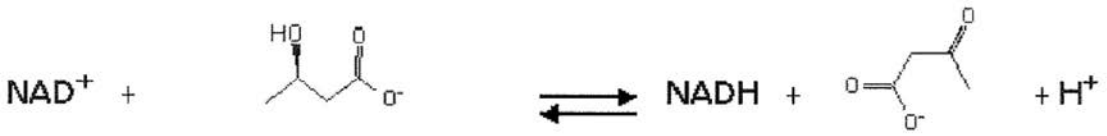

グルコース
2 NAD+
2 NADH
+ 2 ATP
解糖
2
ピルビン酸塩
ALS
CO2
2-アセト-乳酸塩
NAD(P)H
NAD(P)+
KARI
2,3-ジヒドロキシ-イソ吉草酸塩
DHAD
2-ケト-イソ吉草酸塩
KIVD
CO2
イソブチルアルデヒド
NAD(P)H
NAD(P)+
ADH
イソブタノール

【図２】


NAD(P)H
NAD(P)+
3-ケト酸レダクターゼ
2-アセト乳酸
(AL)
2,3-ジヒドロキシ
(dihydrox)-2-メチル-ブタ
ノエート(DH2MB)
NAD(P)H
NAD(P)+
3-ケト酸レダクターゼ
2-エチル-2,3-ジヒドロキシ-酪酸塩
2-アセト-2-ヒドロキシ-酪酸塩
NAD(P)H
NAD(P)+
3-ケト酸レダクターゼ
3-ケト酸
3-ヒドロキシ酸

【図３－１】

EC 1.1.1.30



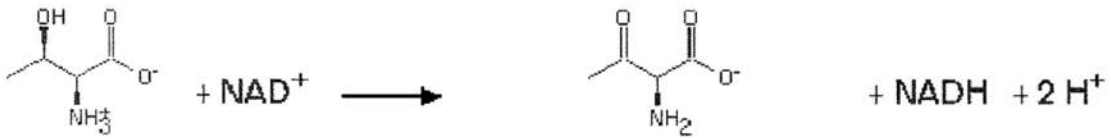
(R)-3-ヒドロキシブタノエート　　アセト酢酸塩

EC 1.1.1.31



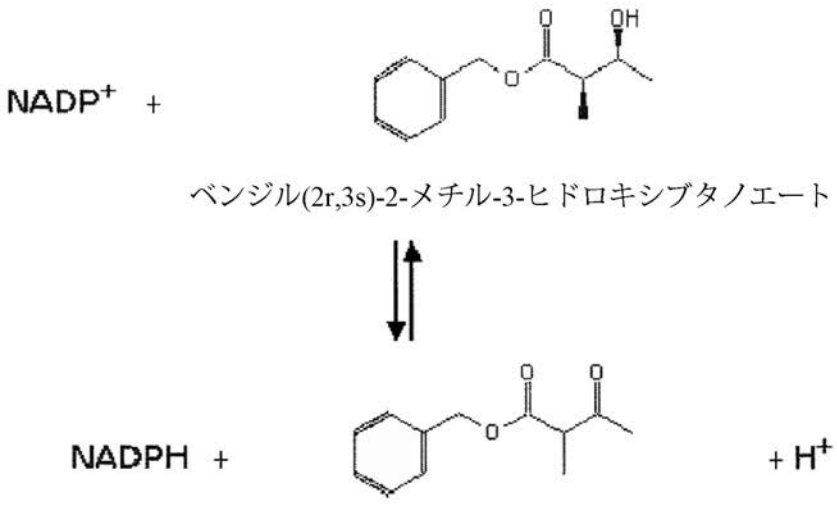
(S)-3-ヒドロキシ-イソ酪酸塩　　(S)-メチルマロン酸-セミアルデヒド

EC 1.1.1.103



L-スレオニン　　2-アミノ-3-オキソブタノエート

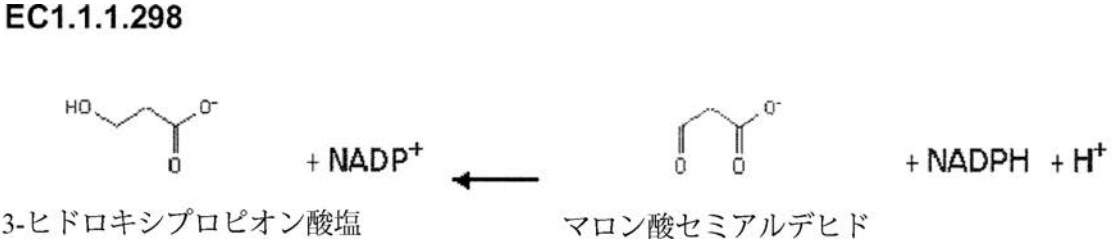
EC 1.1.1.217



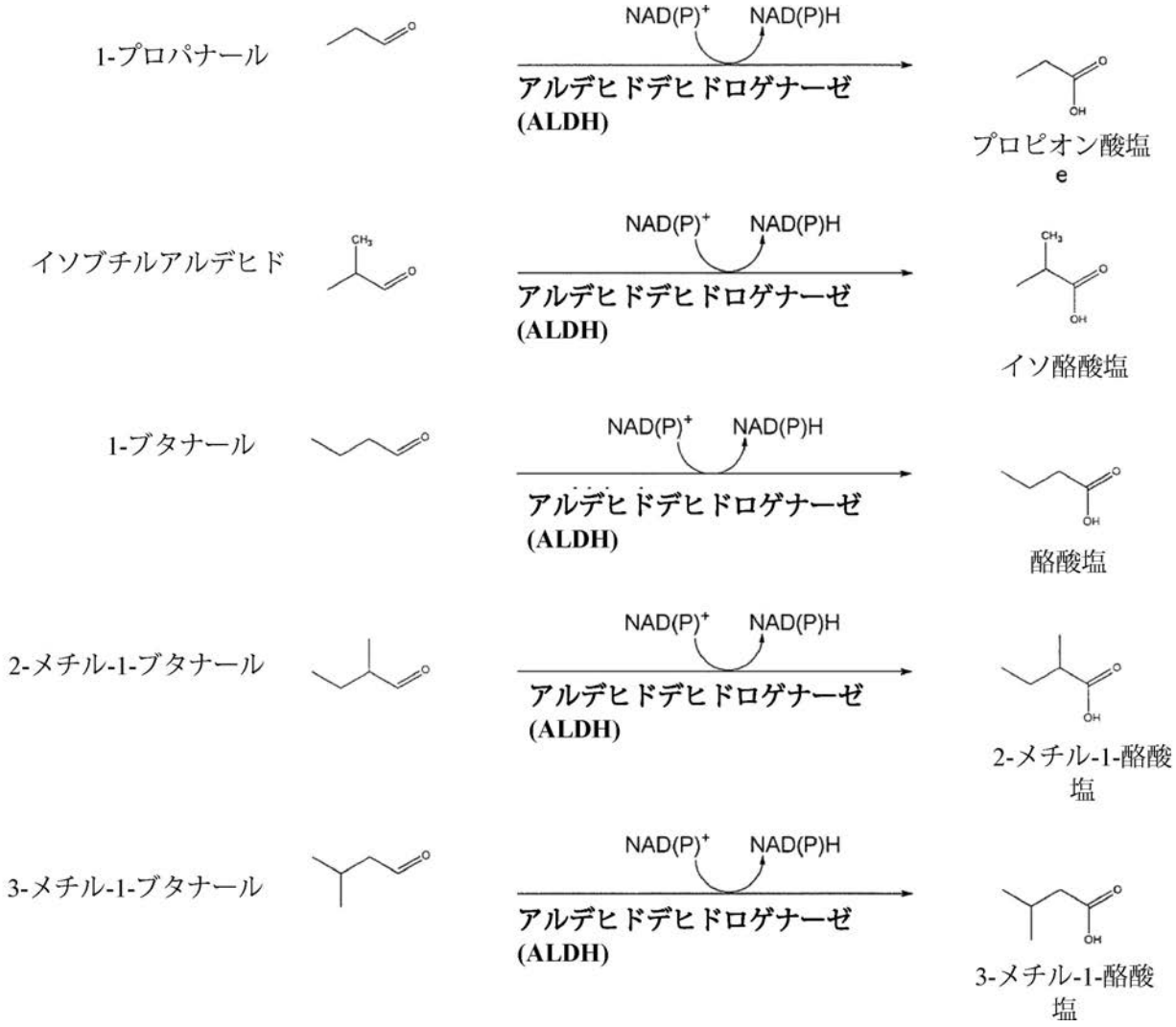
ベンジル(2r,3s)-2-メチル-3-ヒドロキシブタノエート

ベンジル-2-メチル-3-オキソブタノエート

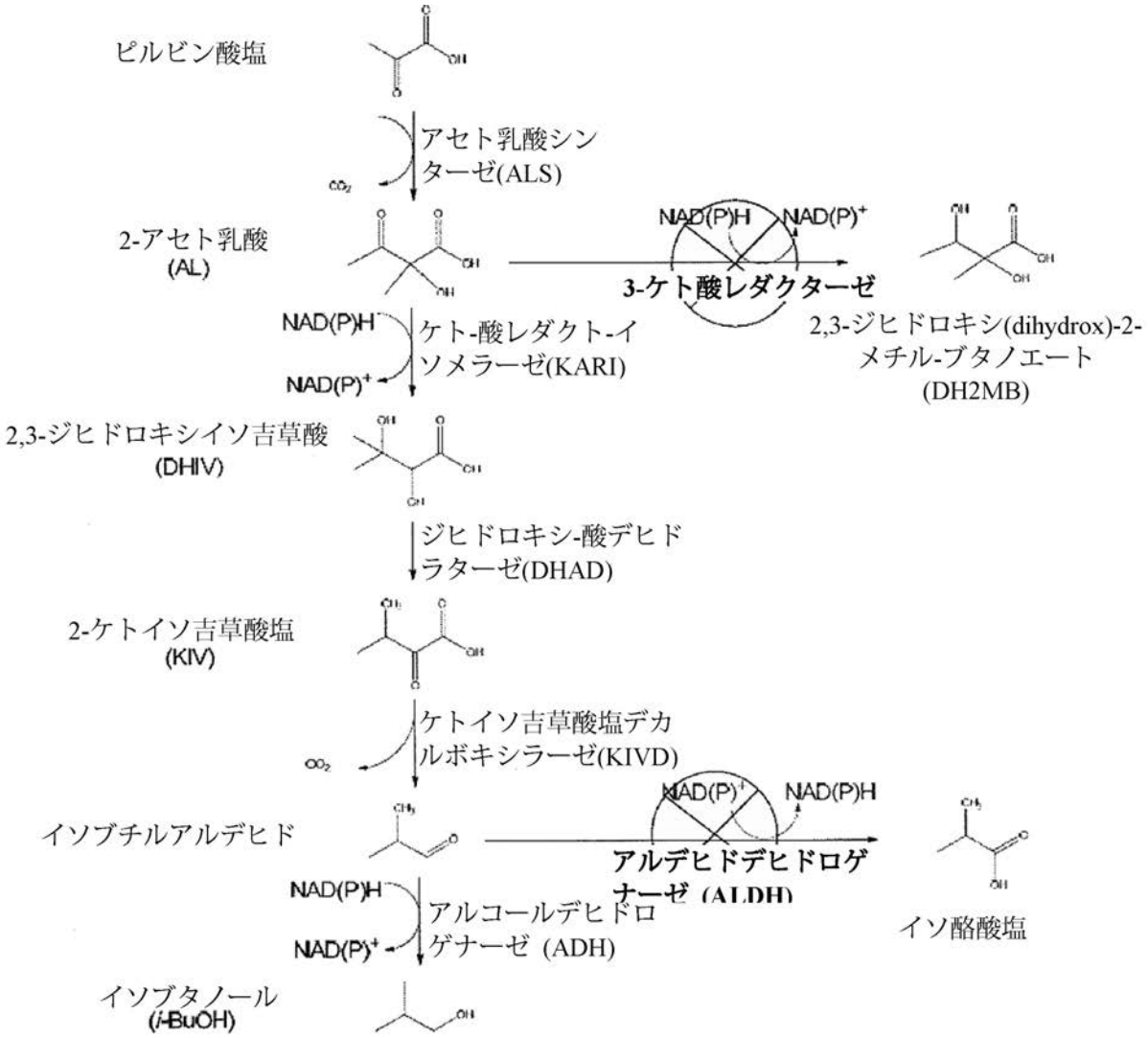
【図３－２】


EC1.1.1.298
+ NADP+
+ NADPH + H+
3-ヒドロキシプロピオン酸塩
マロン酸セミアルデヒド

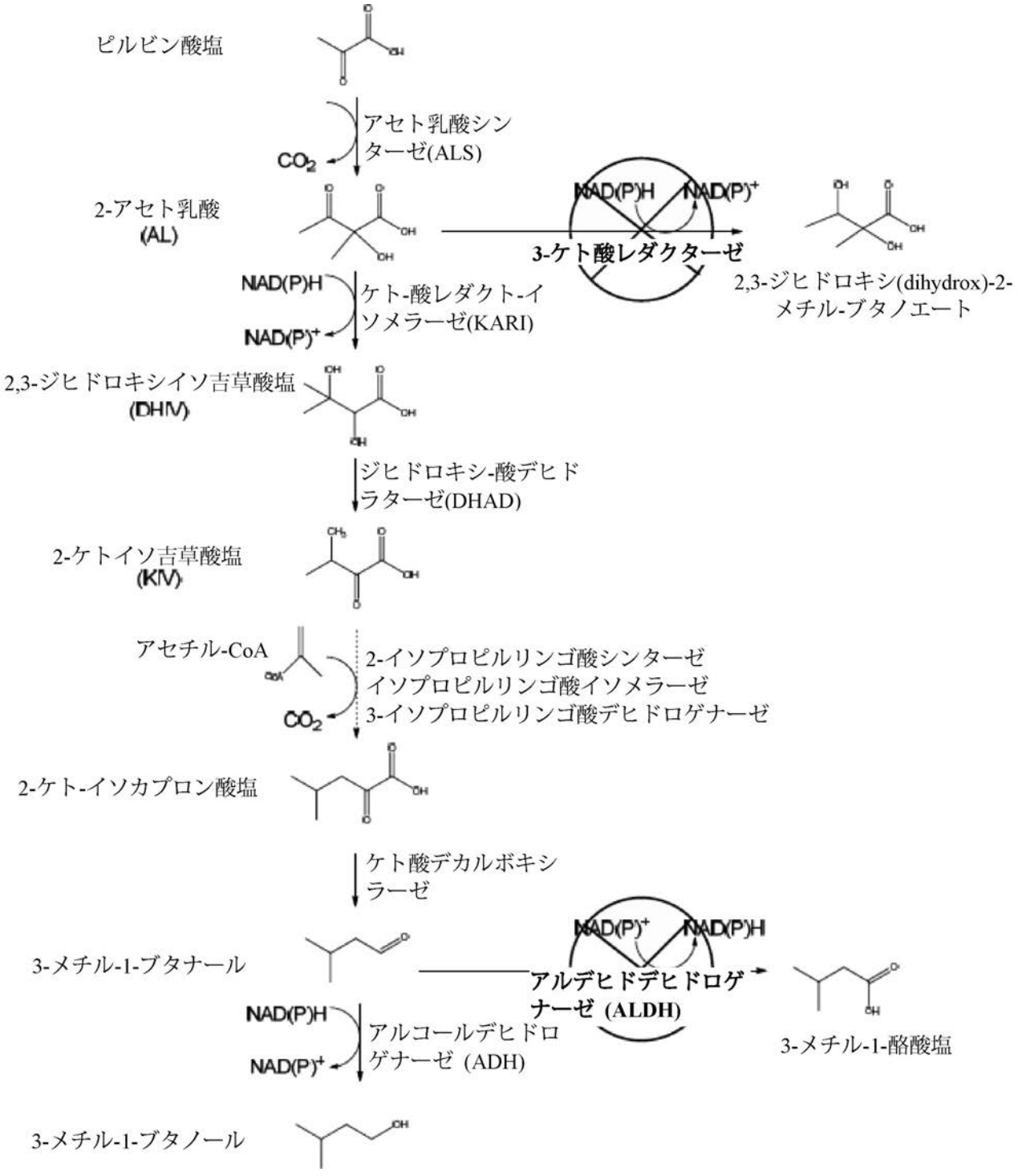
【図４】


1-プロパナール
NAD(P)+ NAD(P)H
アルデヒドデヒドロゲナーゼ
(ALDH)
プロピオン酸塩
e
イソブチルアルデヒド
NAD(P)+ NAD(P)H
アルデヒドデヒドロゲナーゼ
(ALDH)
イソ酪酸塩
1-ブタナール
NAD(P)+ NAD(P)H
アルデヒドデヒドロゲナーゼ
(ALDH)
酪酸塩
2-メチル-1-ブタナール
NAD(P)+ NAD(P)H
アルデヒドデヒドロゲナーゼ
(ALDH)
2-メチル-1-酪酸塩
3-メチル-1-ブタナール
NAD(P)+ NAD(P)H
アルデヒドデヒドロゲナーゼ
(ALDH)
3-メチル-1-酪酸塩

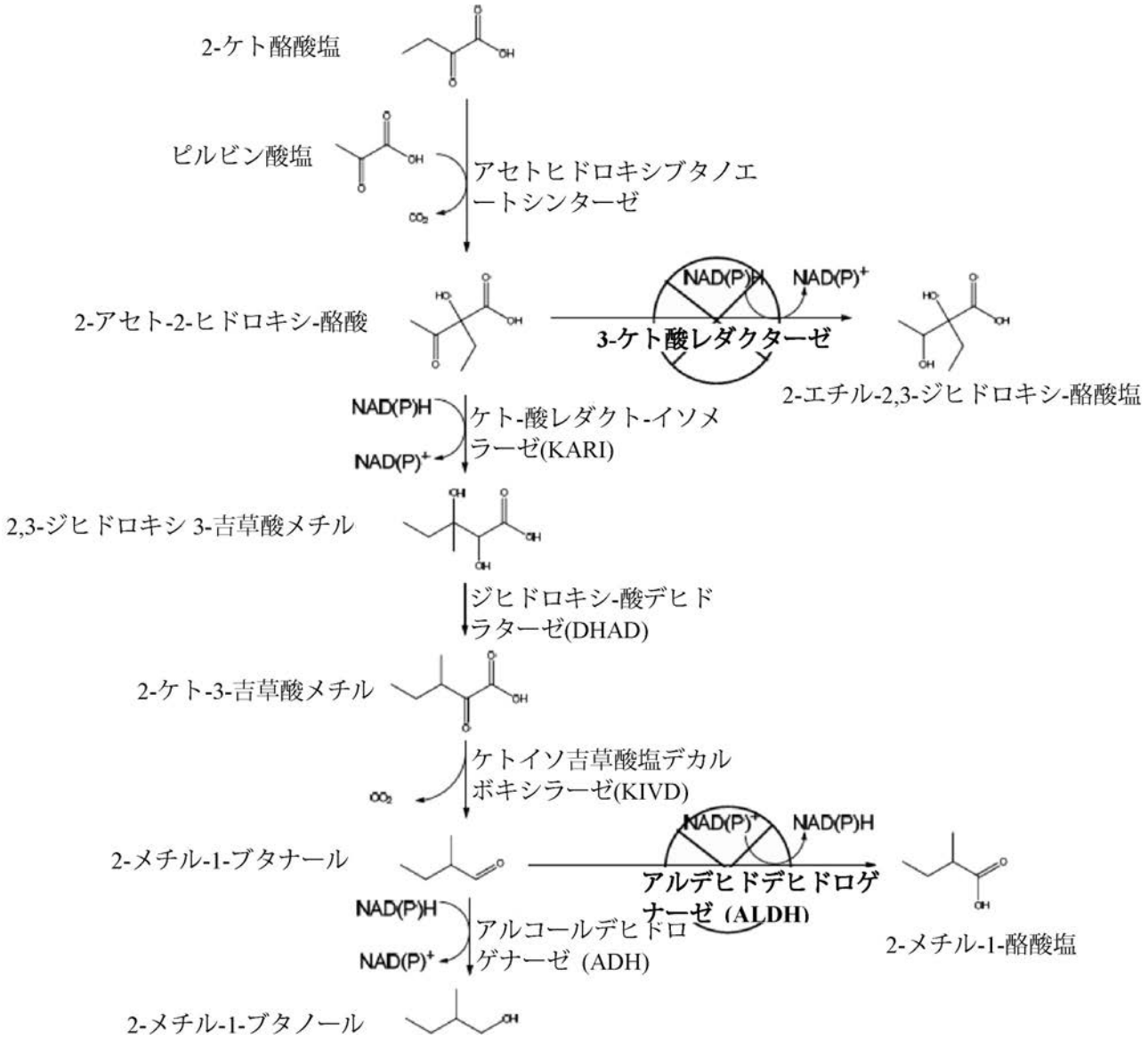
【図５】


ピルビン酸塩
アセト乳酸シンターゼ(ALS)
2-アセト乳酸
(AL)
NAD(P)H
NAD(P)+
3-ケト酸レダクターゼ
2,3-ジヒドロキシ(dihydrox)-2-メチル-ブタノエート
(DH2MB)
NAD(P)H
NAD(P)+
ケト-酸レダクト-イソメラーゼ(KARI)
2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸
(DHIV)
ジヒドロキシ-酸デヒドラターゼ(DHAD)
2-ケトイソ吉草酸塩
(KIV)
ケトイソ吉草酸塩デカルボキシラーゼ(KIVD)
イソブチルアルデヒド
NAD(P)+
NAD(P)H
アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)
イソ酪酸塩
NAD(P)H
NAD(P)+
アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)
イソブタノール
(i-BuOH)

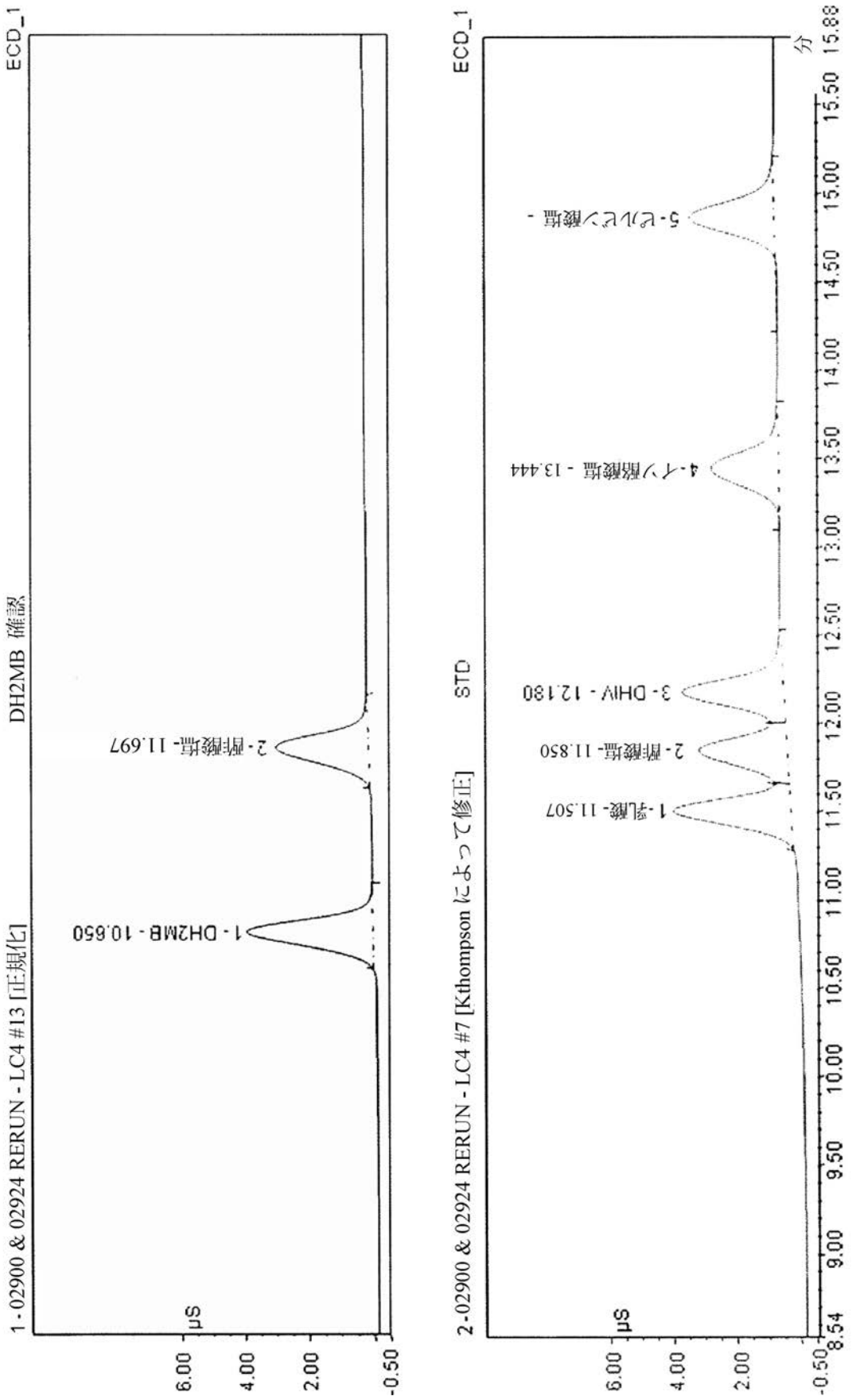
【図６】


ピルビン酸塩
アセト乳酸シンターゼ(ALS)
CO2
2-アセト乳酸
(AL)
NAD(P)H
NAD(P)+
3-ケト酸レダクターゼ
2,3-ジヒドロキシ(dihydrox)-2-メチル-ブタノエート
NAD(P)H
NAD(P)+
ケト-酸レダクト-イソメラーゼ(KARI)
2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸塩
(DHIV)
ジヒドロキシ-酸デヒドラターゼ(DHAD)
2-ケトイソ吉草酸塩
(KIV)
アセチル-CoA
CoA
CO2
2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ
イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ
3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ
2-ケト-イソカプロン酸塩
ケト酸デカルボキシラーゼ
3-メチル-1-ブタナール
NAD(P)+
NAD(P)H
アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)
3-メチル-1-酪酸塩
NAD(P)H
NAD(P)+
アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)
3-メチル-1-ブタノール

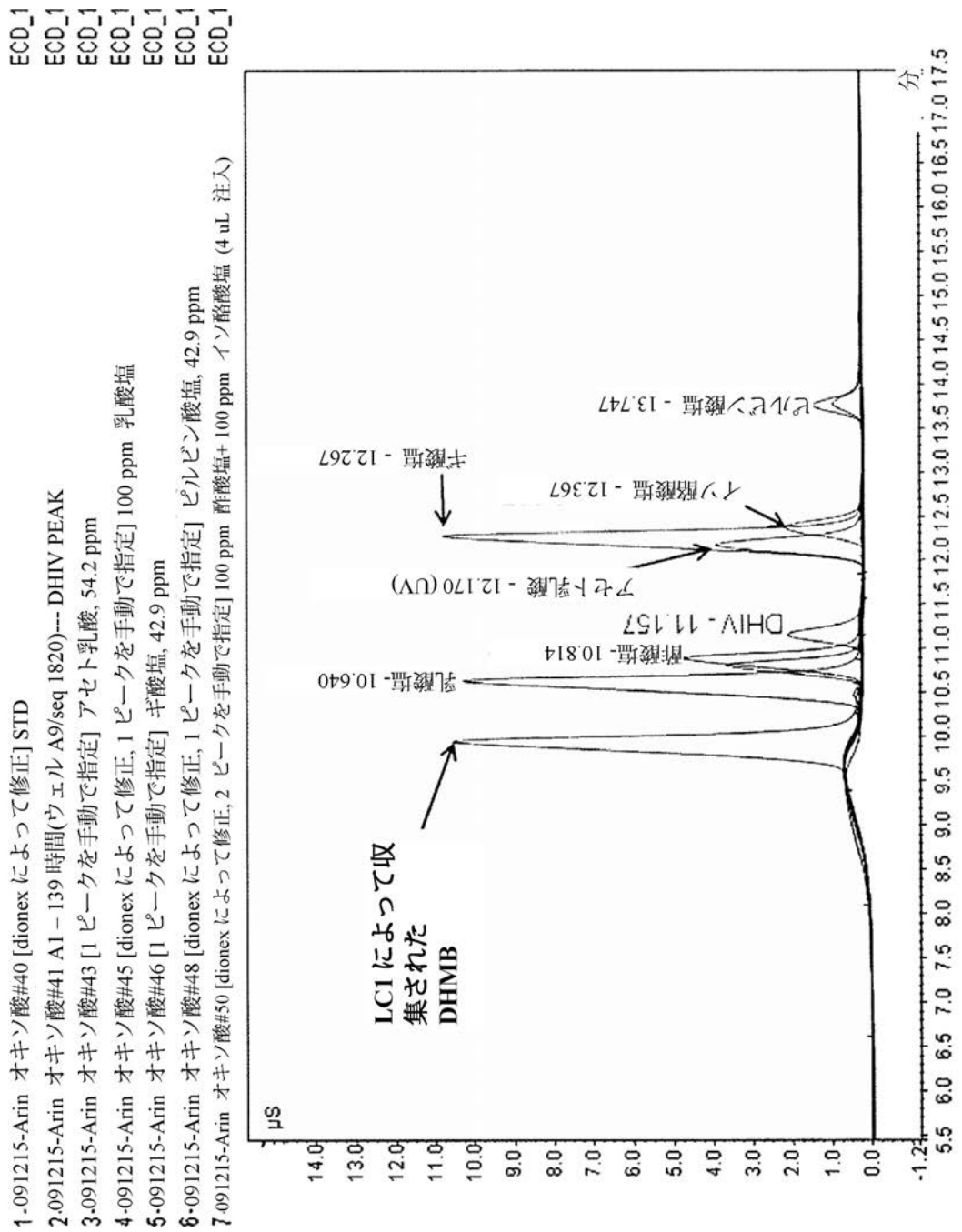
【図７】


2-ケト酪酸塩
ピルビン酸塩
アセトヒドロキシブタノエートシンターゼ
2-アセト-2-ヒドロキシ-酪酸
NAD(P)H
NAD(P)+
3-ケト酸レダクターゼ
2-エチル-2,3-ジヒドロキシ-酪酸塩
NAD(P)H
NAD(P)+
ケト-酸レダクト-イソメラーゼ(KARI)
2,3-ジヒドロキシ 3-吉草酸メチル
ジヒドロキシ-酸デヒドラターゼ(DHAD)
2-ケト-3-吉草酸メチル
ケトイソ吉草酸塩デカルボキシラーゼ(KIVD)
2-メチル-1-ブタナール
NAD(P)+
NAD(P)H
アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)
2-メチル-1-酪酸塩
NAD(P)H
NAD(P)+
アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)
2-メチル-1-ブタノール

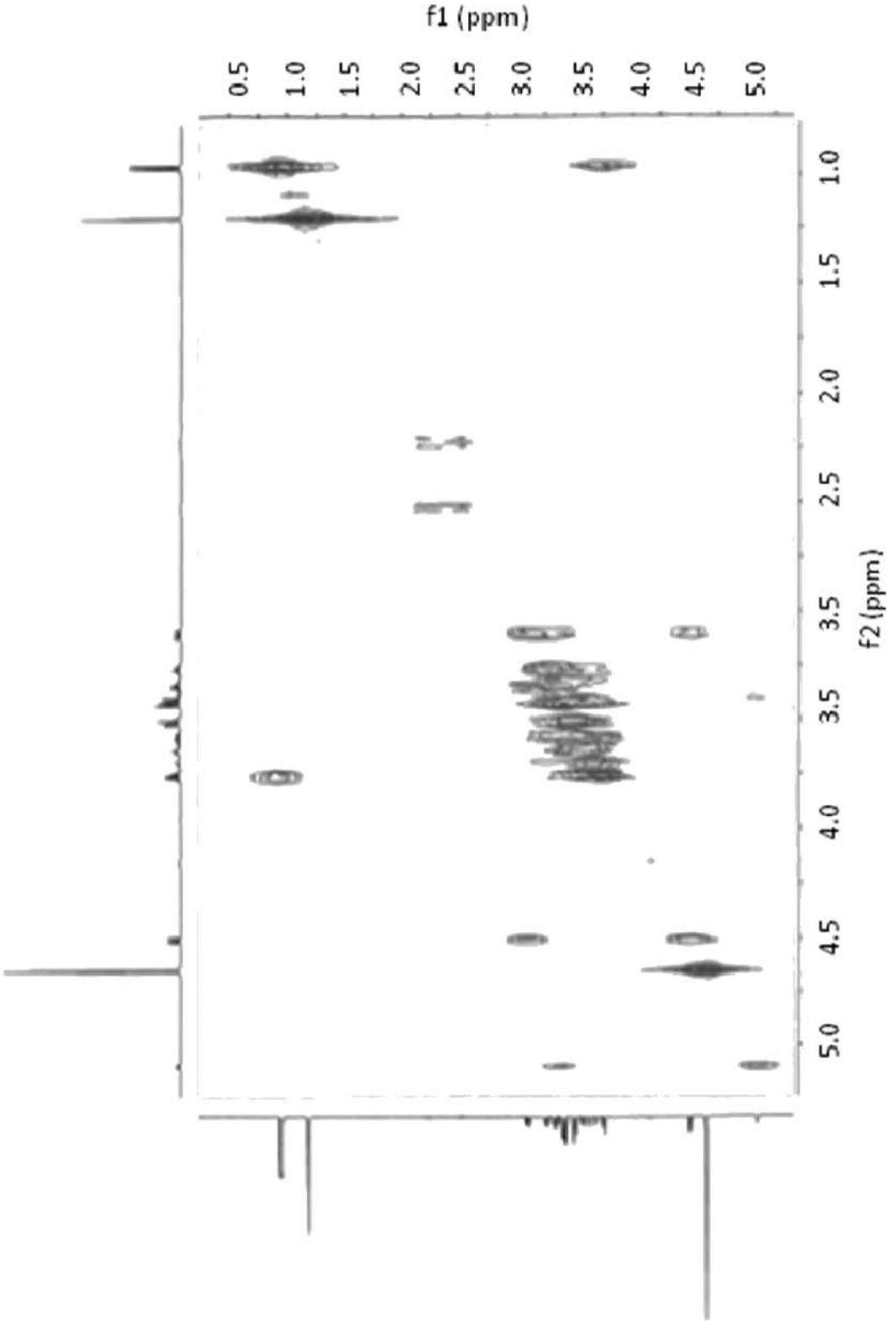
【図８】


ECD_1
1 - 02900 & 02924 RERUN - LC4 #13 [正規化]
DH2MB 確認
1 - DH2MB - 10.650
2 - 酢酸塩 - 11.697
nS
6.00
4.00
2.00
-0.50
ECD_1
2 - 02900 & 02924 RERUN - LC4 #7 [Kthompson によって修正]
STD
1 - 乳酸 - 11.507
2 - 酢酸塩 - 11.850
3 - DHIV - 12.180
4 - イソ酪酸塩 - 13.444
5 - ヒバレビン酸塩 -
nS
6.00
4.00
2.00
-0.50
8.54
9.00
9.50
10.00
10.50
11.00
11.50
12.00
12.50
13.00
13.50
14.00
14.50
15.00
15.50
15.88
分

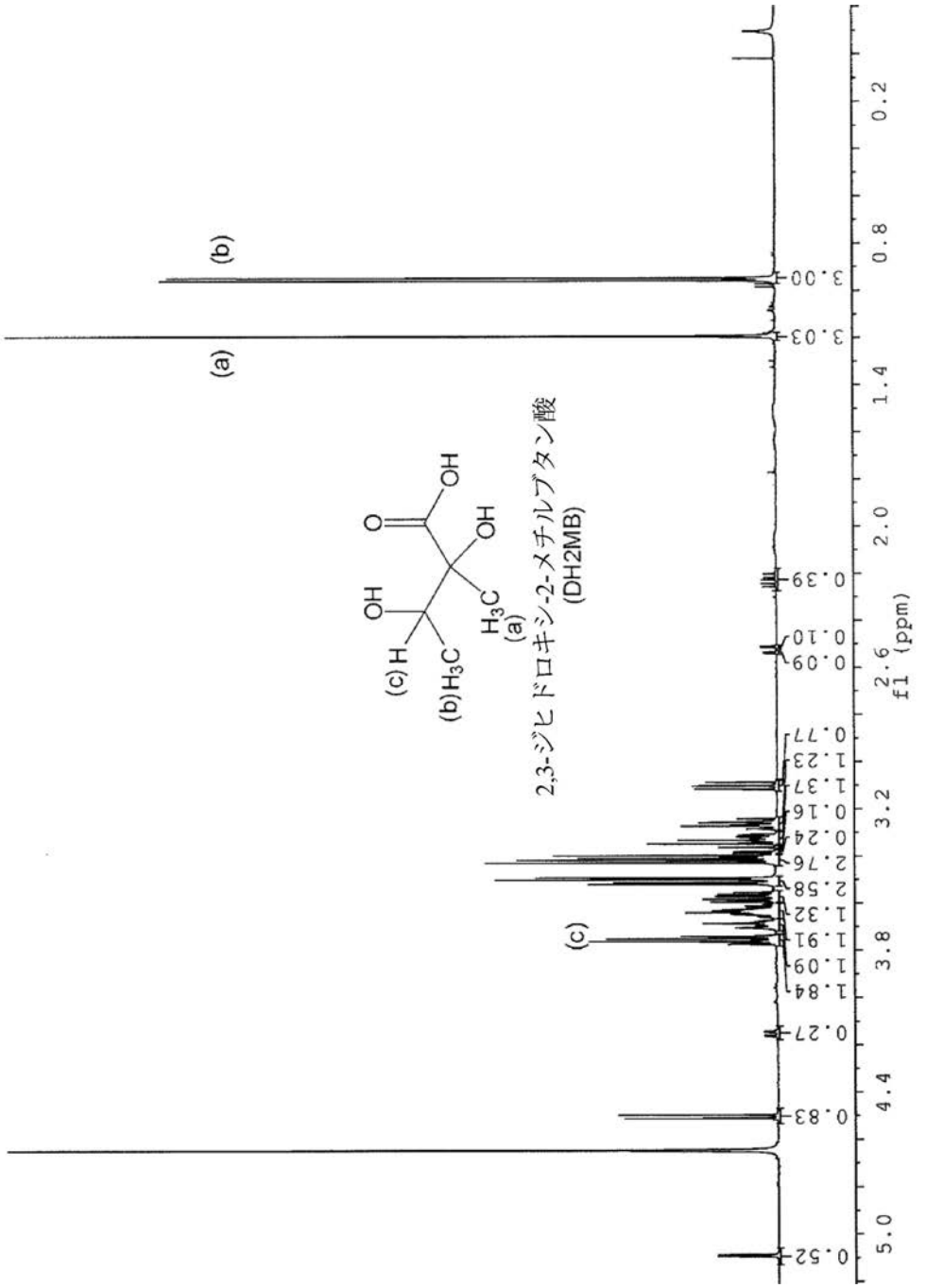
【図９】


1-091215-Arin オキソ酸#40 [dionex によって修正] STD ECD_1
2-091215-Arin オキソ酸#41 A1 – 139 時間(ウェル A9/seq 1820)--- DHIV PEAK ECD_1
3-091215-Arin オキソ酸#43 [1 ピークを手動で指定] アセト乳酸, 54.2 ppm ECD_1
4-091215-Arin オキソ酸#45 [dionex によって修正, 1 ピークを手動で指定] 100 ppm 乳酸塩 ECD_1
5-091215-Arin オキソ酸#46 [1 ピークを手動で指定] ギ酸塩, 42.9 ppm ECD_1
6-091215-Arin オキソ酸#48 [dionex によって修正, 1 ピークを手動で指定] ピルビン酸塩, 42.9 ppm ECD_1
7-091215-Arin オキソ酸#50 [dionex によって修正, 2 ピークを手動で指定] 100 ppm 酢酸塩+ 100 ppm イソ酪酸塩 (4 uL 注入) ECD_1
LC1 によって収集された DHMB
乳酸塩- 10.640
酢酸塩- 10.814
DHIV - 11.157
アセト乳酸 - 12.170 (UV)
イソ酪酸塩 - 12.367
ギ酸塩 - 12.267
ピルビン酸塩 - 13.747
μS
分

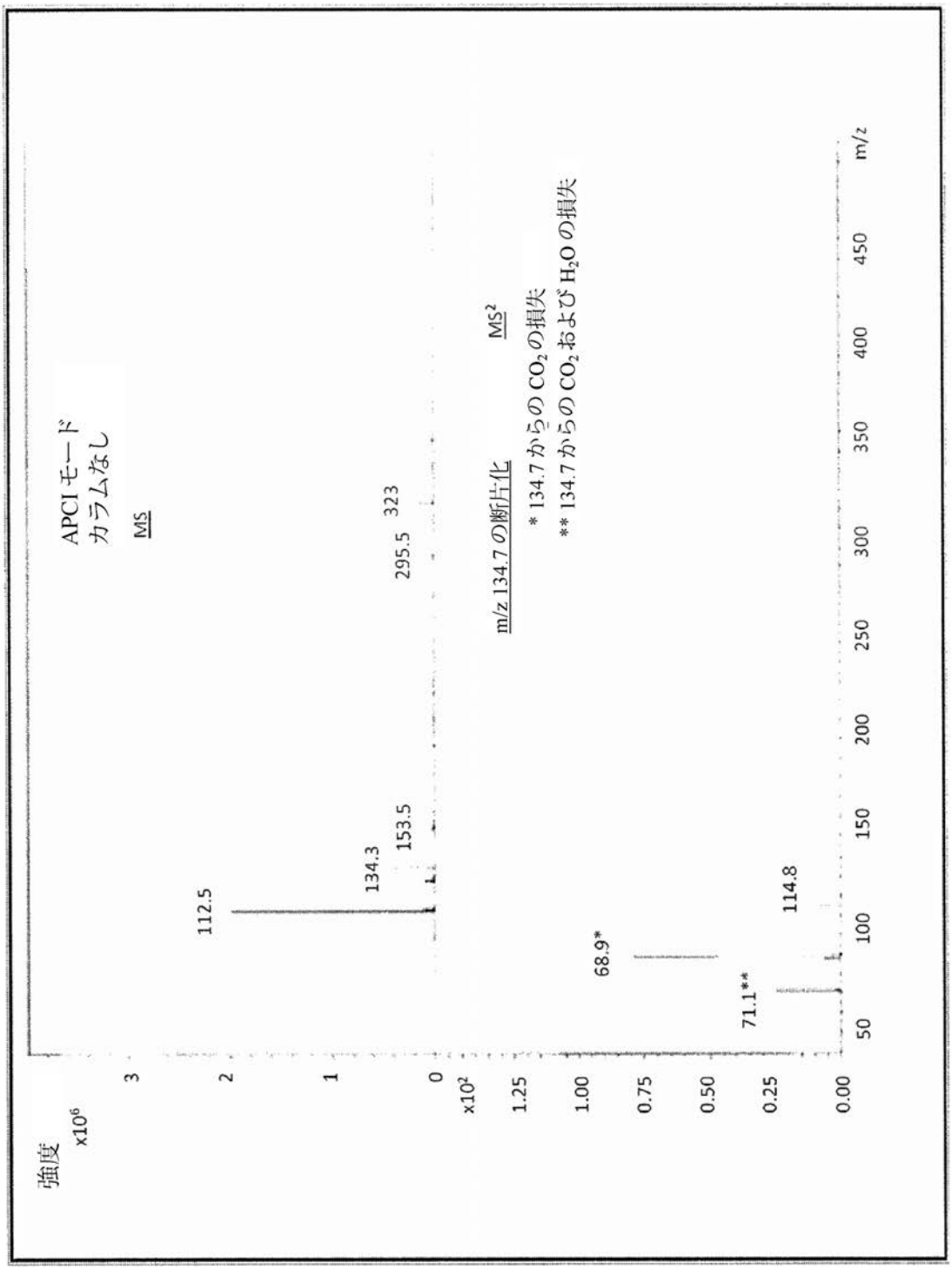
【図１０】



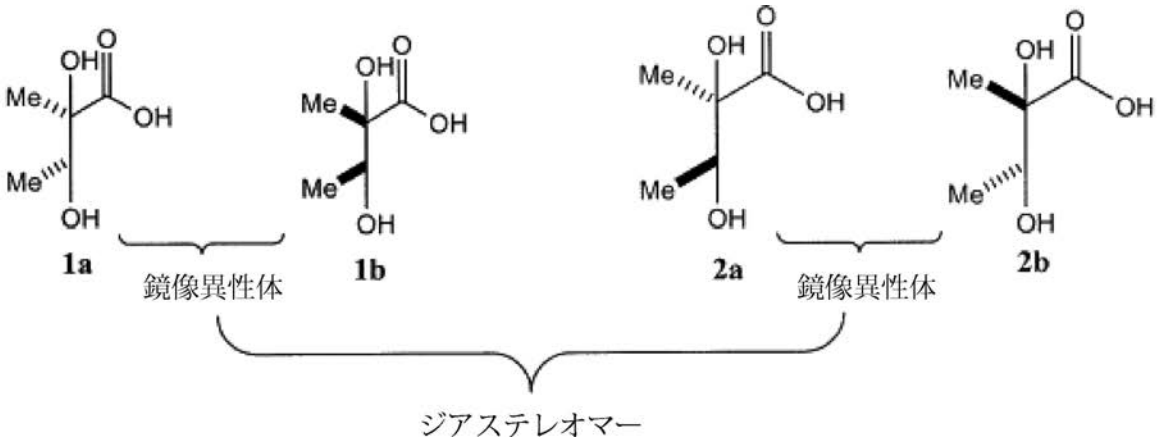
【図１１】


(b)
(a)
3.00
3.03
0.39
0.10
0.09
0.77
1.23
1.37
0.16
0.24
2.76
2.58
1.32
1.91
1.09
1.84
0.27
0.83
0.52
(c)
5.0
4.4
3.8
3.2
2.6
2.0
1.4
0.8
0.2
f1 (ppm)
OH
O
OH
OH
H3C
(a)
(c) H
(b) H3C
2,3-ジヒドロキシ-2-メチルブタン酸
(DH2MB)

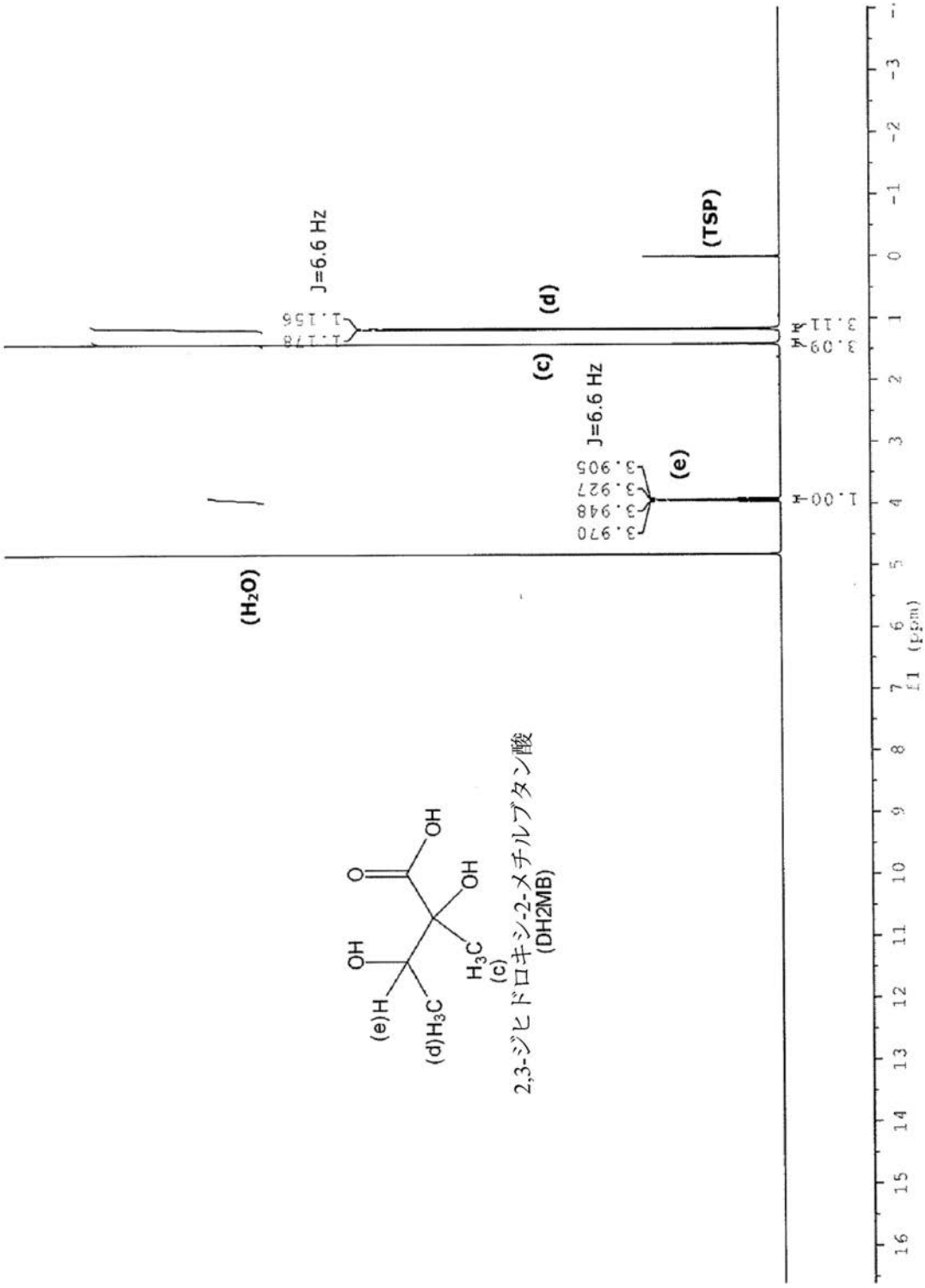
【図１２】


強度
x10⁶
APCI モード
カラムなし
MS
112.5
134.3
153.5
295.5
323
m/z 134.7 の断片化
MS²
* 134.7 からの CO₂ の損失
** 134.7 からの CO₂ および H₂O の損失
68.9*
71.1**
114.8
x10²
m/z

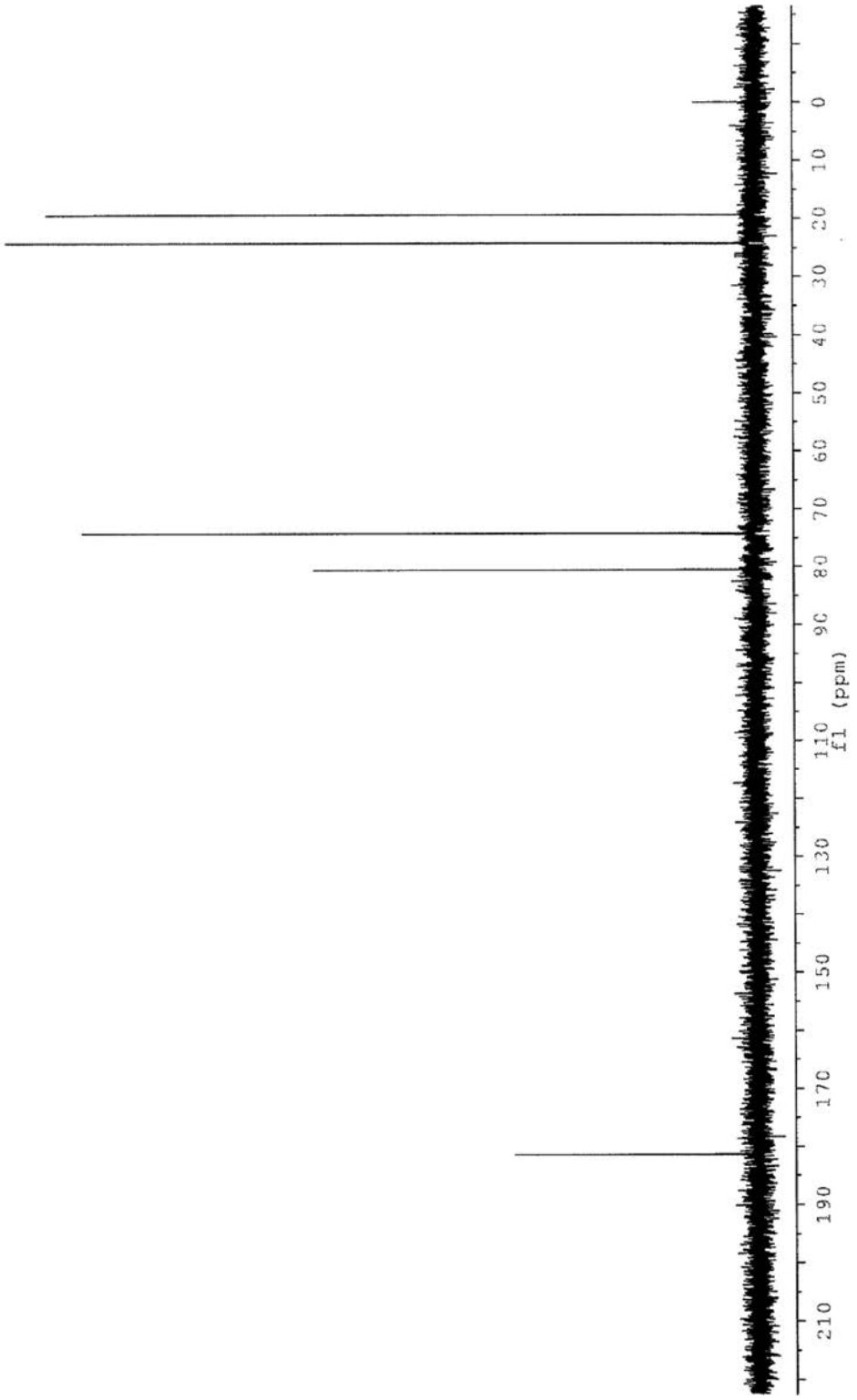
【図１３】



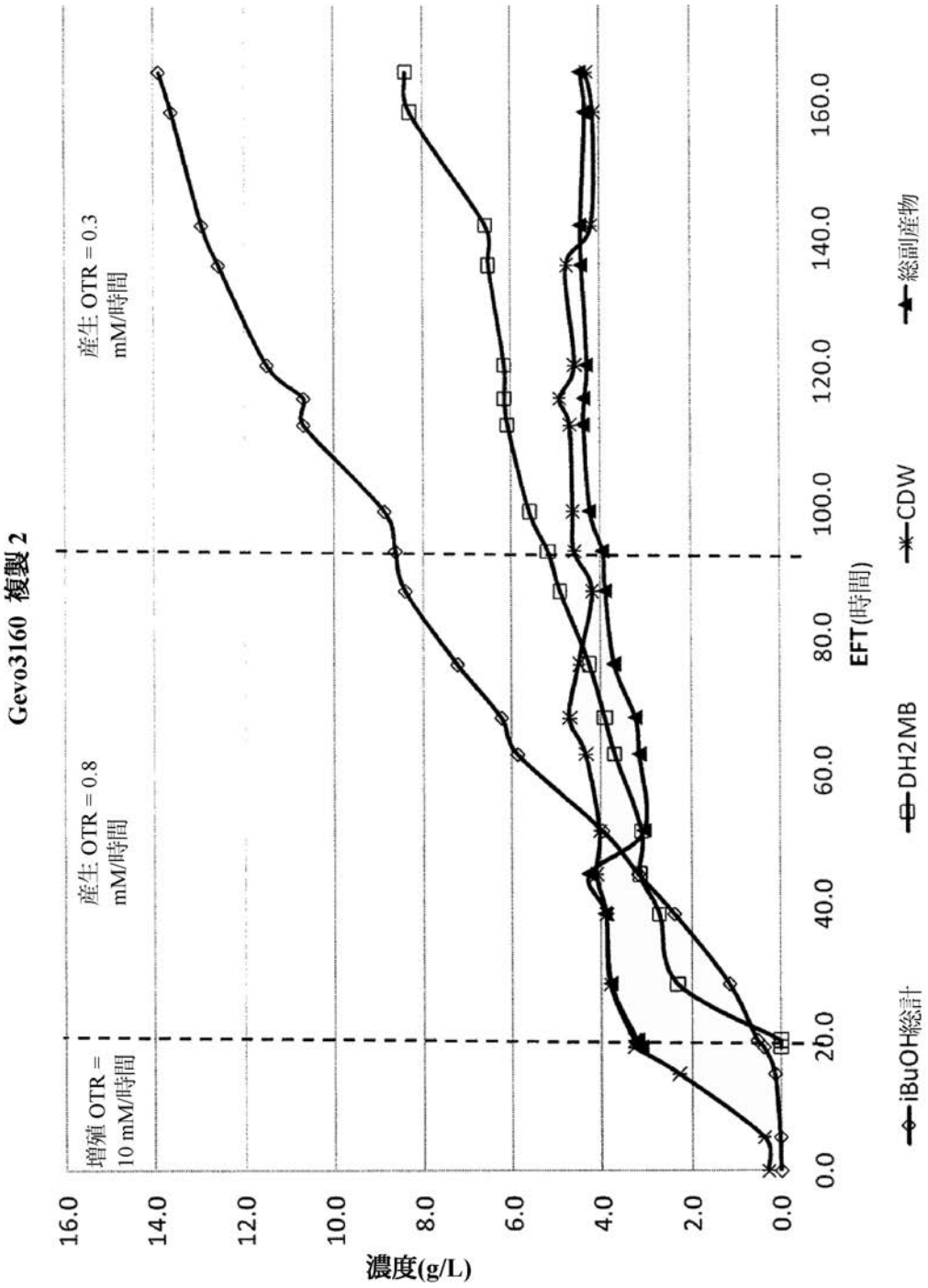
【図１４】


(H2O)
(e)
(c)
(d)
(TSP)
J=6.6 Hz
J=6.6 Hz
3.970
3.948
3.927
3.905
1.178
1.155
1.00
3.09
3.11
f1 (ppm)
2,3-ジヒドロキシ-2-メチルブタン酸
(DH2MB)
OH
O
OH
OH
H3C
(c)
(e)H
(d)H3C

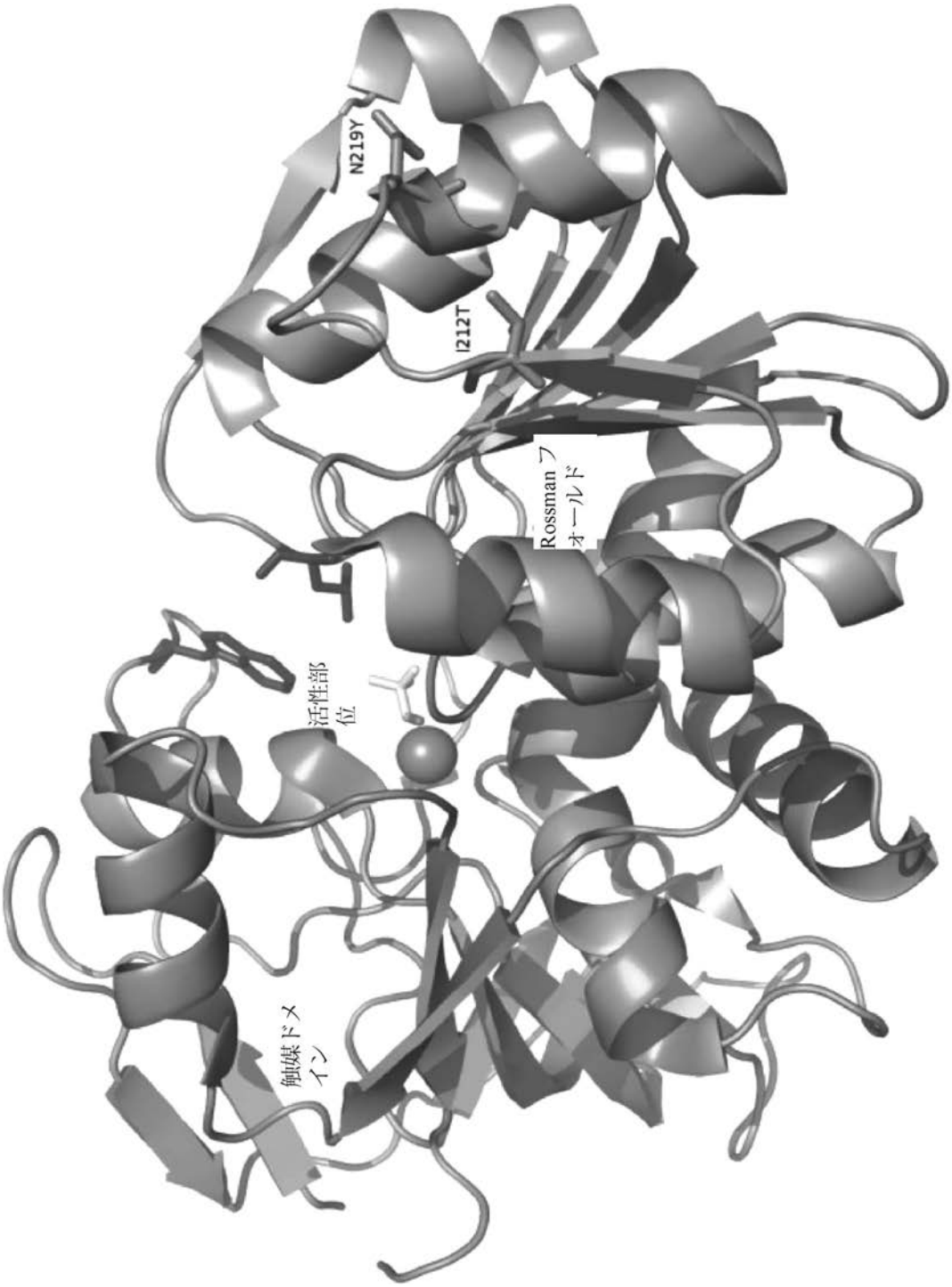
【図１５】



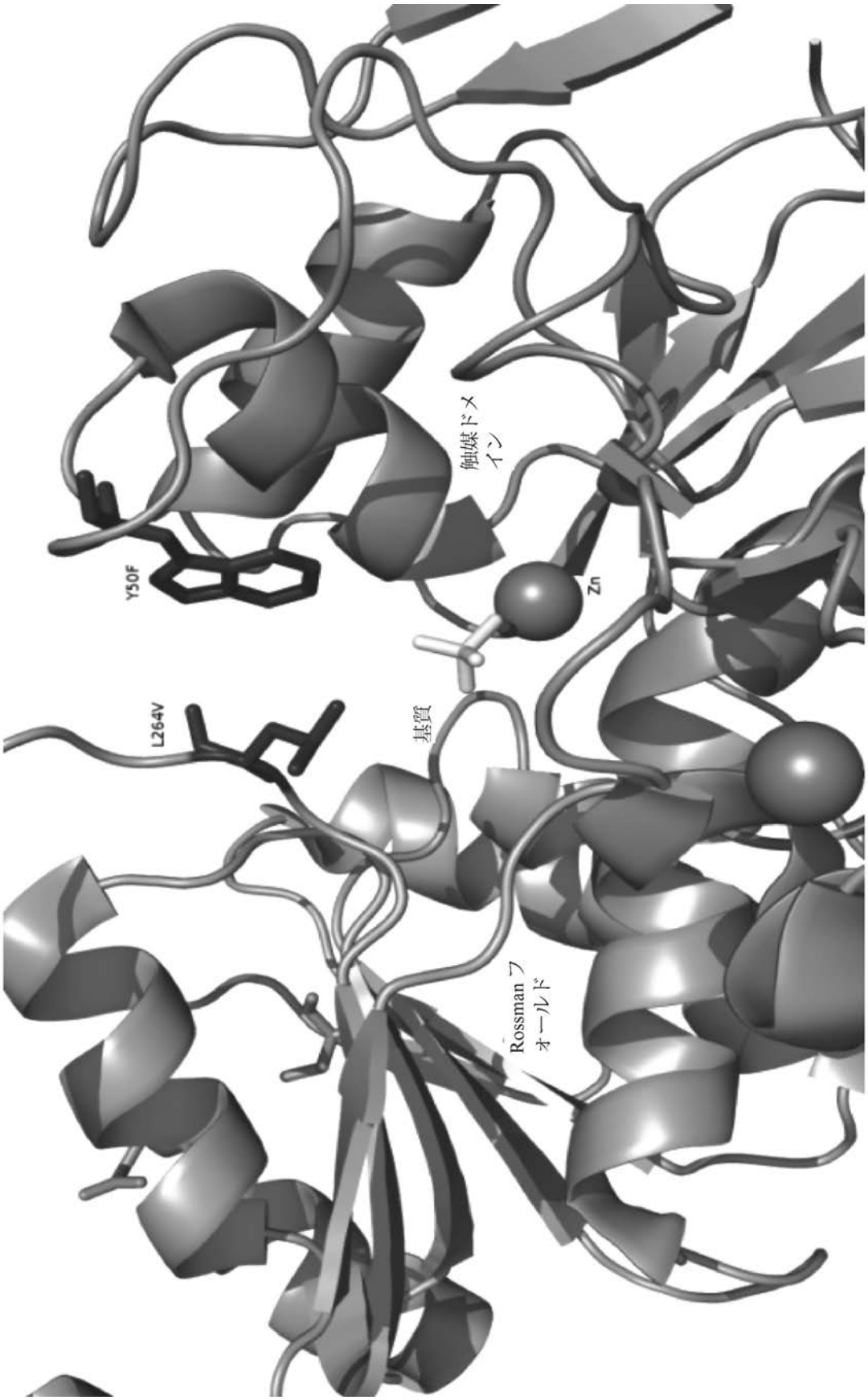
【図１６】


Gevo3160 複製 2
増殖 OTR = 10 mM/時間
産生 OTR = 0.8 mM/時間
産生 OTR = 0.3 mM/時間
濃度(g/L)
EFT(時間)
iBuOH総計
DH2MB
CDW
総副産物

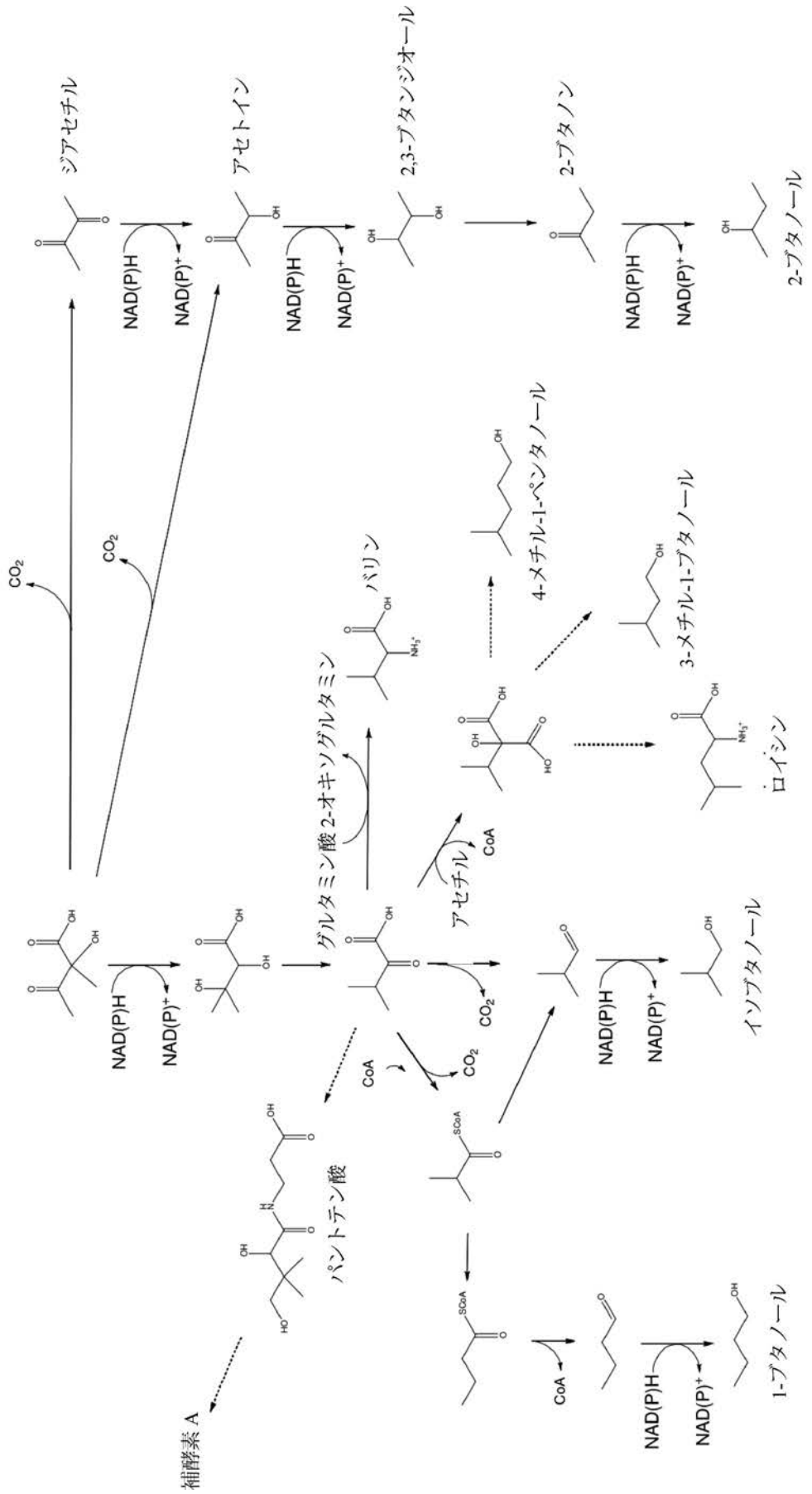
【図１７－１】



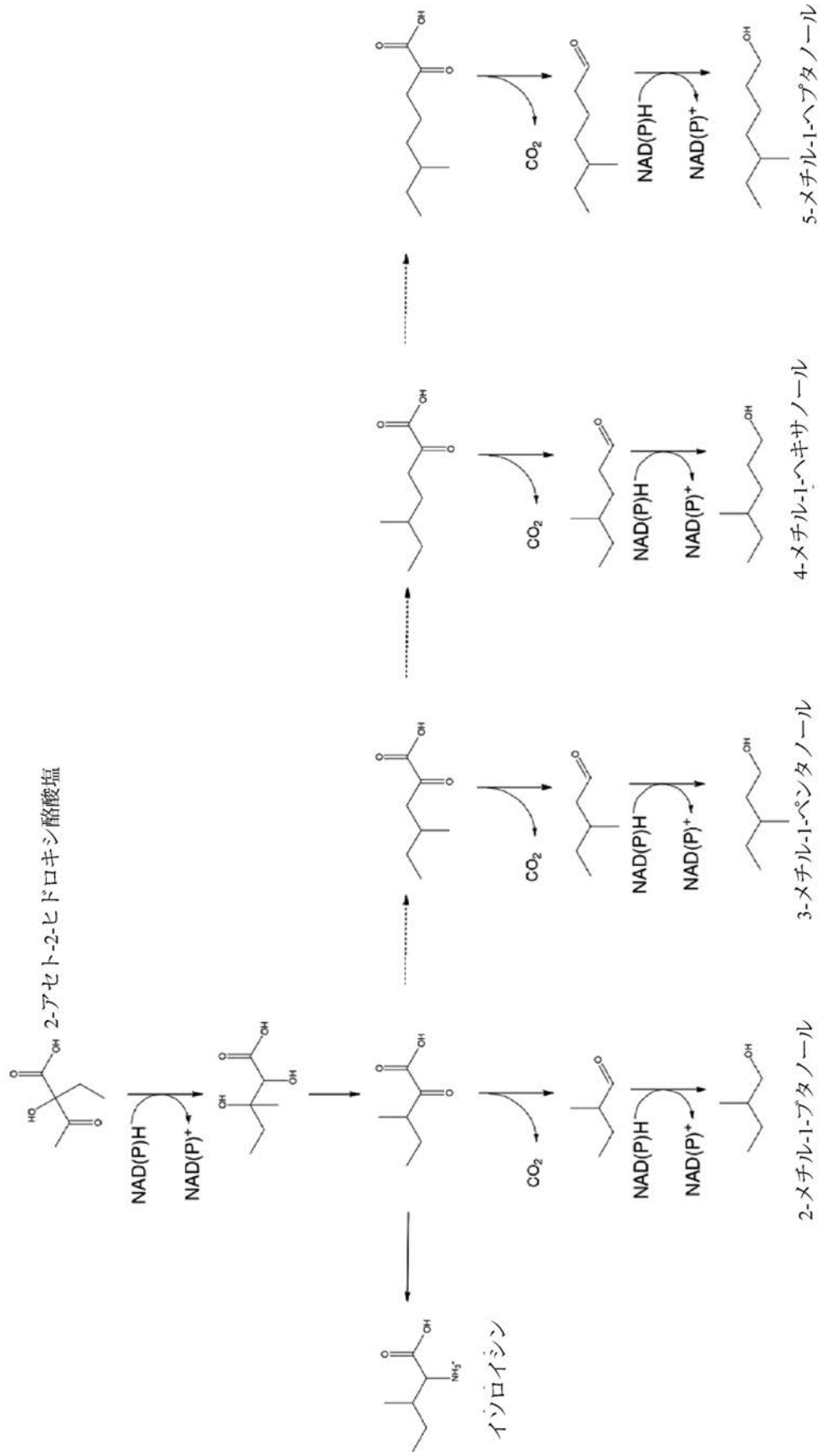
【図１７－２】



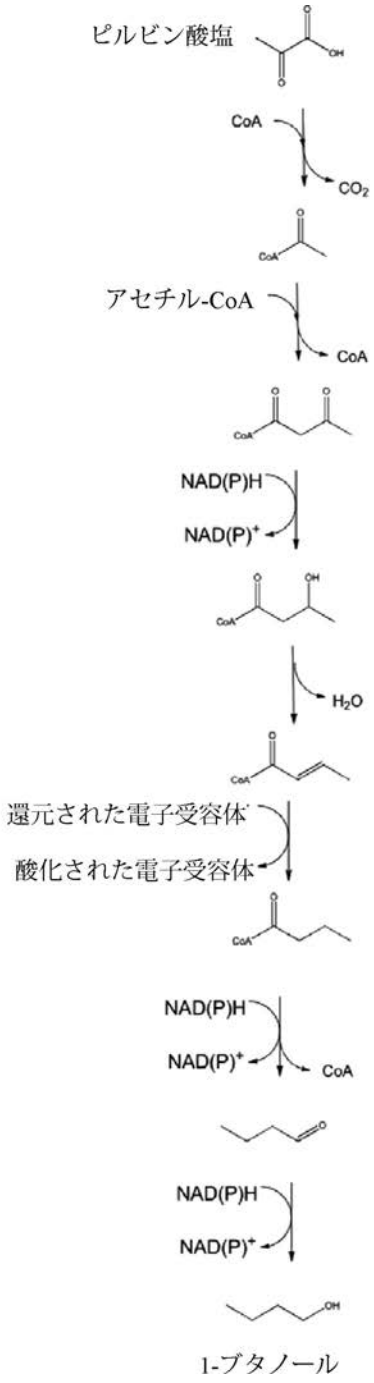
【図１８】

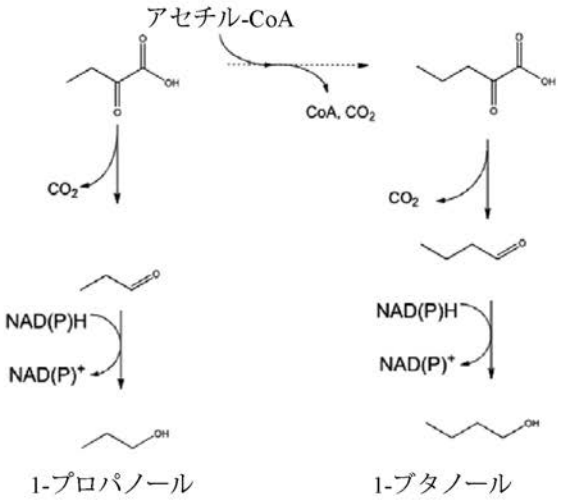

ジアセチル
アセトイン
2,3-ブタンジオール
2-ブタノン
2-ブタノール
NAD(P)H
NAD(P)+
CO2
グルタミン酸2-オキソグルタミン
バリン
4-メチル-1-ペンタノール
3-メチル-1-ブタノール
ロイシン
アセチル
CoA
パントテン酸
補酵素 A
イソブタノール
1-ブタノール

【図１９】


2-アセト-2-ヒドロキシ酪酸塩
NAD(P)H
NAD(P)+
CO2
イソロイシン
2-メチル-1-ブタノール
3-メチル-1-ペンタノール
4-メチル-1-ヘキサノール
5-メチル-1-ヘプタノール

【図２０】





【配列表】

2013519376000001.app

【国際調査報告】

61200600003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/24482

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12N 1/00, 15/74 (2011.01)
USPC - 435/254.2, 471
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8)- C12N 1/00, 15/74 (2011.01);
USPC- 435/254.2, 471

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC- 435/160, 243, 254.21, 254.22, 254.23
(Text Search)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWest (US Pat, PgPub, EPO, JPO), GoogleScholar (PL, NPL), FreePatentsOnline (US Pat, PgPub, EPO, JPO, WIPO, NPL);
Search Terms: ethyl, dihydroyxbutanoat$2, hydroyxbutanoat$2, dihydroyx, hydroxy, butanoat$2, aceto, hydroxybutyrat$2, butyrat$2, recombin$5, hydroxybutyrate, butyrate, dihydroxybutanoate, hydroxybutanoate, butanoate, keto, acid$2, 3k

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	EGLINTON, J.M. et al. Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of Saccharomyces cerevisiae by deleting the ALD6 aldehyde dehydrogenase gene. Yeast. 2002, Vol 19, pages 295-301: table 1; abstract	17-23, 81-86, 121, 124 --- 24, 87
A		25-40, 88-97, 122, 125
X --- A	US 2009/0305363 A1 (ANTHONY et al.) 10 December 2009 (10.12.2009) para [0008], [0122], [0123], [0216]-[0247]	126-128 --- 129
X --- Y	US 2008/0053797 A1 (SHIBA et al.) 28 February 2008 (28.02.2008) para [0105], [0155], [0187] -[0189]	142-144 and 146 --- 145 and 147
Y	DUJON, B. et al. Uniprot Direct Submission Accession Q6FRX5 [online]. 23 September 2008 [retrieved on 02 February 2012]. Retrieved from the Internet: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6FRX5.txt?version=30>, page 1	24, 87, 145
Y	US 2002/0164729 A1 (SKRALY et al.) 07 November 2002 (07.11.2002) para [0011]	147
A	ZELINSKI, T. et al. A Kinetic Study and Application of a Novel Carbonyl Reductase Isolated from Rhodococcus erythropolis. Bioorganic di Medicinal Chemistry. 1994, Vol 2(6), pages 421-428: Fig 10; abstract; pg 425, col 1, para 3; pg 426, col 1, para 3	1-16, 25-40, 120, 122

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 February 2012 (02.02.2012)	09 APR 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

19.12.2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/24462

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/0239276 A1 (DONALDSON et al.) 24 September 2009 (24.09.2009) para [0008]-[0010], [0180]-[0181]	1-16, 25-40, 74-80, 88-97, 120, 122-123, 125, 129-141
A, P	US 2011/0201073 A1 (BUELTER et al.) 18 August 2011 (18.08.2011) para [0009]-[0011], [0021], [0195]-[0196], [0199], [0210]-[0214]	1-16, 25-40, 74-80, 88-97, 120, 122-123, 125, 129-141
A	WEINER, H. et al. Uniprot Direct Submission Accession P54115 [online]. 01 October 1998 [retrieved on 02 February 2012]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.uniprot.org/uniprot/P54115.txt?version=1>, page 1.	23, 86 and 144

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/24482

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 41-73, 98-119, 165
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-- Please see Extra Sheet --

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1-40, 74-97, 120-147

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/24482

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-40, 74-97, 120-147, drawn to a recombinant microorganism comprising a biosynthetic pathway which uses a 3-keto acid as an intermediate, wherein said recombinant microorganism is engineering to reduce or eliminate/overexpress the expression or activity of one or more enzymes catalysing the conversion of said 3-keto acid to a 3-hydroxyacid by-product; a recombinant microorganism comprising a biosynthetic pathway which uses an aldehyde an an intermediate, wherein said recombinant microorganism is engineering to reduce or eliminate/overexpress the expression or activity of one or more enzymes catalyzing the conversion of said aldehyde to an acid by-product; a recombinant microorganism comprising a biosynthetic pathway which uses a 3-keto acid and an aldehyde as an intermediate, wherein said recombinant microorganism is: (i) engineered to reduce or eliminate the expression or activity of one or more enzymes catalyzing the conversion of said 3-keto acid to a 3-hydroxyacid byproduct; and (ii) engineered to reduce or eliminate the expression or activity of one or more enzymes catalyzing the conversion of said aldehyde to an acid by-product.

Group II: Claims 148-164, drawn to a modified alcohol dehydrogenase (ADH) comprising one or more modification.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Group I does not include the inventive concept of a modified alcohol dehydrogenase (ADH) comprising one or more modification, as required by Group II.

Groups II does not include the inventive concept of a a recombinant microorganism, as required by Group I.

Groups I-II do not share any common technical features.

Further US 2009/0081746 A1 to Liao et al. (hereinafter 'Liao') teaches a recombinant microorganism comprising an isobutanol producing metabolic pathway (para [0006]) wherein said recombinant microorganism is engineered to reduce or eliminate or overexpresses one or more enzymes (para [0006], [0084], [0086]).

Groups I-II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/282,641
(32)優先日 平成22年3月10日(2010.3.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/308,568
(32)優先日 平成22年2月26日(2010.2.26)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/304,069
(32)優先日 平成22年2月12日(2010.2.12)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100079108
弁理士 稲葉 良幸
(74)代理人 100109346
弁理士 大貫 敏史
(72)発明者 エヴァンス, ケント
アメリカ合衆国, コロラド州 ８０１１２, エングルウッド, スイート ３１０, ビルディング シー, インバネス ドライブ サウス ３４５, ジーヴォ, インコーポレイテッド内
(72)発明者 ケリー, ジュリー
アメリカ合衆国, コロラド州 ８０１１２, エングルウッド, スイート ３１０, ビルディング シー, インバネス ドライブ サウス ３４５, ジーヴォ, インコーポレイテッド内
(72)発明者 バスティアン, サビーン
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９１１２５, パサデナ, エム／シー ２１０－８５, イースト カリフォルニア ブールバード １２００, カリフォルニア インスティテュート オブ テクノロジー内
(72)発明者 アーノルド, フランシス
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９１１２５, パサデナ, エム／シー ２１０－８５, イースト カリフォルニア ブールバード １２００, カリフォルニア インスティテュート オブ テクノロジー内
(72)発明者 ブエルター, トーマス
アメリカ合衆国, コロラド州 ８０１１２, エングルウッド, スイート ３１０, ビルディング シー, インバネス ドライブ サウス ３４５, ジーヴォ, インコーポレイテッド内
(72)発明者 ホーキンス, アンドリュー
アメリカ合衆国, コロラド州 ８０１１２, エングルウッド, スイート ３１０, ビルディング シー, インバネス ドライブ サウス ３４５, ジーヴォ, インコーポレイテッド内
(72)発明者 ポーターーシェインマン, ステファニー
アメリカ合衆国, コロラド州 ８０１１２, エングルウッド, スイート ３１０, ビルディング シー, インバネス ドライブ サウス ３４５, ジーヴォ, インコーポレイテッド内
(72)発明者 メインホールド, ピーター
アメリカ合衆国, コロラド州 ８０１１２, エングルウッド, スイート ３１０, ビルディング シー, インバネス ドライブ サウス ３４５, ジーヴォ, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ダンドン，キャサリン，アスルソン
アメリカ合衆国，コロラド州 ８０１１２，エングルウッド，スイート ３１０，ビルディング シー，インバネス ドライブ サウス ３４５，ジーヴォ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 アリスティドウ，アリストス
アメリカ合衆国，コロラド州 ８０１１２，エングルウッド，スイート ３１０，ビルディング シー，インバネス ドライブ サウス ３４５，ジーヴォ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 ウラノ，ジュン
アメリカ合衆国，コロラド州 ８０１１２，エングルウッド，スイート ３１０，ビルディング シー，インバネス ドライブ サウス ３４５，ジーヴォ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 リース，ドン
アメリカ合衆国，コロラド州 ８０１１２，エングルウッド，スイート ３１０，ビルディング シー，インバネス ドライブ サウス ３４５，ジーヴォ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 ピータース，マシュー
アメリカ合衆国，コロラド州 ８０１１２，エングルウッド，スイート ３１０，ビルディング シー，インバネス ドライブ サウス ３４５，ジーヴォ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 デイ，メリッサ
アメリカ合衆国，コロラド州 ８０１１２，エングルウッド，スイート ３１０，ビルディング シー，インバネス ドライブ サウス ３４５，ジーヴォ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 ジャンカウスカス，ジャスタス
アメリカ合衆国，コロラド州 ８０１１２，エングルウッド，スイート ３１０，ビルディング シー，インバネス ドライブ サウス ３４５，ジーヴォ，インコーポレイテッド内
(72)発明者 ベリー，ルース
アメリカ合衆国，コロラド州 ８０１１２，エングルウッド，スイート ３１０，ビルディング シー，インバネス ドライブ サウス ３４５，ジーヴォ，インコーポレイテッド内

Ｆターム(参考) 4B024 AA03 AA20 BA07 BA08 BA80 CA01 CA03 CA09 CA11 CA20
DA12 EA04 GA11 HA01 HA08 HA11
4B064 AC04 AD06 AD33 CA01 CA19 CA21 CC24 DA16
4B065 AA01X AA57X AA72X AA72Y AA73X AA73Y AA87X AB01 AC14 BA01
CA44 CA46 CA47 CA60