



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタナール経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該4-ヒドロキシブタナール経路が、4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼ；スクシニル-CoAレダクターゼ(アルデヒド形成)；及び、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼを含む、前記非天然微生物体。

【請求項 2】

4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタナール経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該4-ヒドロキシブタナール経路が、スクシニル-CoAレダクターゼ(アルデヒド形成)；4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ；及び、4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼを含む、前記非天然微生物体。

10

【請求項 3】

前記少なくとも1つの外因性核酸が、異種核酸である、請求項1又は2記載の非天然微生物体。

【請求項 4】

請求項1～3のいずれか1項記載の非天然微生物体を、4-ヒドロキシブタナールを生成するための条件下且つ十分な時間にわたり培養することを含む、4-ヒドロキシブタナールの生成方法。

20

【請求項 5】

前記非天然微生物体が、実質的に嫌気性培養培地内にある、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタナール経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該4-ヒドロキシブタナール経路が、4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼ；アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ；及び、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼを含む、前記非天然微生物体。

【請求項 7】

4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタナール経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該4-ヒドロキシブタナール経路が、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ；4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ；及び、4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼを含む、前記非天然微生物体。

30

【請求項 8】

前記少なくとも1つの外因性核酸が、異種核酸である、請求項6又は7のいずれか1項記載の非天然微生物体。

【請求項 9】

請求項6～8のいずれか1項記載の非天然微生物体を、4-ヒドロキシブタナールを生成するための条件下且つ十分な時間にわたり培養することを含む、4-ヒドロキシブタナールの生成方法。

40

【請求項 10】

前記非天然微生物体が、実質的に嫌気性培養培地内にある、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタナール経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該4-ヒドロキシブタナール経路が、コハク酸レダクターゼ；4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ；及び、4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼを含む、前記非天然微生物体。

【請求項 12】

50

前記微生物体が、コハク酸レダクターゼ；4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ；及び、4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼをコードしている3つの外因性核酸を含む、請求項11記載の非天然微生物体。

【請求項13】

前記少なくとも1つの外因性核酸が、異種核酸である、請求項11記載の非天然微生物体。

【請求項14】

請求項11～13のいずれか1項記載の非天然微生物体を、4-ヒドロキシブタナールを生成するための条件下且つ十分な時間にわたり培養することを含む、4-ヒドロキシブタナールの生成方法。

【請求項15】

前記非天然微生物体が、実質的に嫌気性培養培地内にある、請求項14記載の方法。

【請求項16】

4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタナール経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該4-ヒドロキシブタナール経路が、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、又はグルタミン酸デヒドロゲナーゼ若しくはグルタミン酸トランスアミナーゼ及びグルタミン酸デカルボキシラーゼ及び4-アミノ酪酸デヒドロゲナーゼ又は4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ；4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ；及び、4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼを含む、前記非天然微生物体。

【請求項17】

前記微生物体が、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、又はグルタミン酸デヒドロゲナーゼ若しくはグルタミン酸トランスアミナーゼ及びグルタミン酸デカルボキシラーゼ及び4-アミノ酪酸デヒドロゲナーゼ又は4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ；4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ；及び、4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼをコードしている少なくとも3つの外因性核酸を含む、請求項16記載の非天然微生物体。

【請求項18】

前記少なくとも1つの外因性核酸が、異種核酸である、請求項16記載の非天然微生物体。

【請求項19】

請求項16～18のいずれか1項記載の非天然微生物体を、4-ヒドロキシブタナールを生成するための条件下且つ十分な時間にわたり培養することを含む、4-ヒドロキシブタナールの生成方法。

【請求項20】

前記非天然微生物体が、実質的に嫌気性培養培地内にある、請求項19記載の方法。

【請求項21】

4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタナール経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該4-ヒドロキシブタナール経路が、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ；及び、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼを含む、前記非天然微生物体。

【請求項22】

前記微生物体が、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ；及び、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼをコードしている3つの外因性核酸を含む、請求項21記載の非天然微生物体。

【請求項23】

前記少なくとも1つの外因性核酸が、異種核酸である、請求項21記載の非天然微生物体。

【請求項24】

10

20

30

40

50

請求項21～23のいずれか1項記載の非天然微生物体を、4-ヒドロキシブタナールを生成するための条件下且つ十分な時間にわたり培養することを含む、4-ヒドロキシブタナールの生成方法。

【請求項25】

前記非天然微生物体が、実質的に嫌気性培養培地内にある、請求項24記載の方法。

【請求項26】

ブトレシンを生成するのに十分な量で発現されるブトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むブトレシン経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該ブトレシン経路が、コハク酸レダクターゼ；4-アミノ酪酸デヒドロゲナーゼ又は4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ；4-アミノ酪酸レダクターゼ；及び、ブトレシンデヒドロゲナーゼ又はブトレシントランスアミナーゼを含む、前記非天然微生物体。

10

【請求項27】

前記微生物体が、コハク酸レダクターゼ；4-アミノ酪酸デヒドロゲナーゼ又は4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ；4-アミノ酪酸レダクターゼ；及び、ブトレシンデヒドロゲナーゼ又はブトレシントランスアミナーゼをコードしている4つの外因性核酸を含む、請求項26記載の非天然微生物体。

【請求項28】

前記少なくとも1つの外因性核酸が、異種核酸である、請求項26記載の非天然微生物体。

【請求項29】

請求項26～28のいずれか1項記載の非天然微生物体を、ブトレシンを生成するための条件下且つ十分な時間にわたり培養することを含む、ブトレシンの生成方法。

20

【請求項30】

前記非天然微生物体が、実質的に嫌気性培養培地内にある、請求項29記載の方法。

【請求項31】

ブトレシンを生成するのに十分な量で発現されるブトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むブトレシン経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該ブトレシン経路が、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ；4-アミノ酪酸デヒドロゲナーゼ又は4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ；4-アミノ酪酸レダクターゼ；及び、ブトレシンデヒドロゲナーゼ又はブトレシントランスアミナーゼを含む、前記非天然微生物体。

30

【請求項32】

前記微生物体が、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ；4-アミノ酪酸デヒドロゲナーゼ又は4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ；4-アミノ酪酸レダクターゼ；及び、ブトレシンデヒドロゲナーゼ又はブトレシントランスアミナーゼをコードしている4つの外因性核酸を含む、請求項31記載の非天然微生物体。

【請求項33】

前記少なくとも1つの外因性核酸が、異種核酸である、請求項31記載の非天然微生物体。

【請求項34】

請求項31～33のいずれか1項記載の非天然微生物体を、ブトレシンを生成するための条件下且つ十分な時間にわたり培養することを含む、ブトレシンの生成方法。

40

【請求項35】

前記非天然微生物体が、実質的に嫌気性培養培地内にある、請求項34記載の方法。

【請求項36】

ブトレシンを生成するのに十分な量で発現されるブトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むブトレシン経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該ブトレシン経路が、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ又はグルタミン酸トランスアミナーゼ；グルタミン酸デカルボキシラーゼ；4-アミノ酪酸レダクターゼ；及び、ブトレシンデヒドロゲナーゼ又はブトレシントランスアミナーゼを含む、前記非天然微生物

50

物体。

【請求項 37】

前記微生物体が、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ又はグルタミン酸トランスアミナーゼ；グルタミン酸デカルボキシラーゼ；4-アミノ酪酸レダクターゼ；及び、ブトレシンデヒドロゲナーゼ又はブトレシントランスアミナーゼをコードしている4つの外因性核酸を含む、請求項36記載の非天然微生物体。

【請求項 38】

前記少なくとも1つの外因性核酸が、異種核酸である、請求項36記載の非天然微生物体。

【請求項 39】

請求項36～38のいずれか1項記載の非天然微生物体を、ブトレシンを生成するための条件下且つ十分な時間にわたり培養することを含む、ブトレシンの生成方法。

【請求項 40】

前記非天然微生物体が、実質的に嫌気性培養培地内にある、請求項39記載の方法。

【請求項 41】

ブトレシンを生成するのに十分な量で発現されるブトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むブトレシン経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該ブトレシン経路が、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-アミノ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ又は5-アミノ-2-オキソペンタン酸トランスアミナーゼ；5-アミノ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ；及び、ブトレシンデヒドロゲナーゼ又はブトレシントランスアミナーゼを含む、前記非天然微生物体。

【請求項 42】

前記微生物体が、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-アミノ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ又は5-アミノ-2-オキソペンタン酸トランスアミナーゼ；5-アミノ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ；及び、ブトレシンデヒドロゲナーゼ又はブトレシントランスアミナーゼをコードしている4つの外因性核酸を含む、請求項41記載の非天然微生物体。

【請求項 43】

前記少なくとも1つの外因性核酸が、異種核酸である、請求項41記載の非天然微生物体。

【請求項 44】

請求項41～43のいずれか1項記載の非天然微生物体を、ブトレシンを生成するための条件下且つ十分な時間にわたり培養することを含む、ブトレシンの生成方法。

【請求項 45】

前記非天然微生物体が、実質的に嫌気性培養培地内にある、請求項44記載の方法。

【請求項 46】

ブトレシンを生成するのに十分な量で発現されるブトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むブトレシン経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該ブトレシン経路が、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-アミノ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ又は5-アミノ-2-オキソペンタン酸トランスアミナーゼ；オルニチンデヒドロゲナーゼ又はオルニチントランスアミナーゼ；及び、オルニチンデカルボキシラーゼを含む、前記非天然微生物体。

【請求項 47】

前記微生物体が、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-アミノ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ又は5-アミノ-2-オキソペンタン酸トランスアミナーゼ；オルニチンデヒドロゲナーゼ又はオルニチントランスアミナーゼ；及び、オルニチンデカルボキシラーゼをコードしている4つの外因性核酸を含む、請求項46記載の非天然微生物体。

【請求項 48】

前記少なくとも1つの外因性核酸が、異種核酸である、請求項46記載の非天然微生物体。

10

20

30

40

50

【請求項 49】

請求項46～48のいずれか1項記載の非天然微生物体を、ブトレシンを生成するための条件下且つ十分な時間にわたり培養することを含む、ブトレシンの生成方法。

【請求項 50】

前記非天然微生物体が、実質的に嫌気性培養培地内にある、請求項49記載の方法。

【請求項 51】

4-ヒドロキシブチリル-CoA(4-HBCoA)を生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブチリル-CoA経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブチリル-CoA経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該4-ヒドロキシブチリル-CoA経路が、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ；及び、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)を含む、前記非天然微生物体。

10

【請求項 52】

前記微生物体が、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ；及び、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)をコードしている3つの外因性核酸を含む、請求項51記載の非天然微生物体。

【請求項 53】

前記少なくとも1つの外因性核酸が、異種核酸である、請求項51記載の非天然微生物体。

【請求項 54】

請求項51～53のいずれか1項記載の非天然微生物体を、4-ヒドロキシブチリル-CoAを生成するための条件下且つ十分な時間にわたり培養することを含む、4-ヒドロキシブチリル-CoAの生成方法。

20

【請求項 55】

前記非天然微生物体が、実質的に嫌気性培養培地内にある、請求項54記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の背景)

本出願は、内容全体が引用により本明細書中に組み込まれている、2009年10月13日に出版された米国特許仮出願第61/251,287号の優先権の利益を主張するものである。

30

【0002】

本発明は、一般には、生物体のインシリコ設計及び生物体工学に関し、より詳細には、1,4-ブタンジオール、4-ヒドロキシブチリル-CoA、4-ヒドロキシブタナール、又はブトレシンの生合成能を有する生物体に関する。

【背景技術】

【0003】

化合物4-ヒドロキシブタン酸(4-ヒドロキシブタン酸、4-ヒドロキシ酪酸、4-HB)は、様々な汎用化学物質及び特殊化学物質のための構成単位として工業的潜在性を有する4-炭素カルボン酸である。特に4-HBは、溶媒、樹脂、ポリマー前駆体及び特殊化学物質を含む1,4-ブタンジオール系列の化学物質への新たな入口点として働く潜在性を有する。1,4-ブタンジオール(BDO)は、約30億lb/年の世界市場を有するポリマー中間体及び工業用溶媒である。BDOは、現在、石油化学前駆体、主にアセチレン、無水マレイン酸及び酸化プロピレンから製造されている。

40

【0004】

例えば、アセチレンをレッペ合成反応(Kroschwitz及びGrantの文献、Encyclopedia of Chem. Tech., John Wiley and Sons, Inc., ニューヨーク(1999))で2分子のホルムアルデヒドと反応させた後、触媒水素化を行って1,4-ブタンジオールを形成する。米国で製造されたアセチレンの90%がブタンジオールの製造に消費されることが推定されている。代替的に、それを、ブタンから誘導された無水マレイン酸のエステル化及び触媒水素化によっ

50

て形成することができる。下流において、ブタンジオールを、例えば、ピロリドン及びN-メチル-ピロリドンに更に変換することができる。ブチロラクトンへの酸化、又はテトラヒドロフランへの水素化分解によって更に変換することができる。これらの化合物は、ポリマー中間体、溶媒及び添加剤としての様々な用途を有し、全体でほぼ20億lb/年の市場を有する。

【0005】

再生可能なものを石油系供給原料に代わって使用するばかりでなく、より小さいエネルギー及び資本の集約的プロセスを使用する代替手段によって、これらの化学物質の製造方法を開発することが望ましい。エネルギー省は、ブタンジオール系列の製品を製造するための生物学的に製造される主要な中間体として、1,4-二酸及び特にコハク酸を提案した(DOE Report、「バイオマスからの高付加価値化学物質(Top Value-Added Chemicals from Biomass)」、2004)。しかしコハク酸は、単離及び精製のコストが高く、ブタンジオールへの触媒還元の高い温度及び圧力を必要とする。

【0006】

従って、商業的な量の1,4-ブタンジオール及びその化学前駆体を効果的に製造するための代替的な手段が必要である。本発明は、この必要性を満たすとともに、関連する利点を提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要旨)

本発明は、1,4-ブタンジオール(BDO)、4-ヒドロキシブタナール(4-HBaI)、4-ヒドロキシブチリル-CoA(4-HBCoA)、及び/又はブトレシンを生成するのに十分な量で発現されたBDO、4-HBaI及び/又はブトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO、4-HBaI、4-HBCoA及び/又はブトレシン経路を含む非天然微生物体を提供する。この微生物体は、更にBDO、4-HBaI、4-HBCoA及び/又はブトレシンの発現を最適化することができる。加えて本発明は、当該微生物体を使用してBDO、4-HBaI、4-HBCoA及び/又はブトレシンを生成する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】4-ヒドロキシ酪酸(4-HB)及び1,4-ブタンジオール生成への生化学経路を示す概略図である。最初の5つの工程は、エシェリキア・コリ(*Escherichia coli*)に対して内因性であり、残りは、非相同的に発現され得る。生合成反応を触媒する酵素は、(1)スクシニル-CoAシンターゼ；(2)CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ；(3)-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ；(4)グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ；(5)グルタミン酸デカルボキシラーゼ；(6)CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ；(7)4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ；(8)-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ；(9)4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼ；(10)酪酸キナーゼ；(11)ホスホトランスブチリラーゼ(phosphotransbutyrylase)；(12)アルデヒドデヒドロゲナーゼ；(13)アルコールデヒドロゲナーゼである。

【図2】E. コリにおけるホモセリン生合成を示す概略図である。

【図3】4-HB経路遺伝子の様々な組合せを発現するプラスミドを保持するE. コリ株を使用するグルコース最小培地での4-HBの生成を示す図である。(a)培養ブロスにおける4-HB濃度；(b)培養ブロスにおけるコハク酸濃度；(c)600nmで測定された培養OD。棒のセットは、24時間、48時間、及び(測定した場合の)72時間の時点を表す。x軸上の符号は、使用した菌株/プラスミド組合せを示す。第1の指標は、宿主株：1、MG1655 *lacI*^Q；2、MG1655 *gabD lacI*^Q；3、MG1655 *gabD aldA lacI*^Qを指す。第2の指標は、使用したプラスミド組合せ：1、pZE 13-0004-0035及びpZA33-0036；2、pZE13-0004-0035及びpZA33-0010n；3、pZE 13-0004-0008及びpZA33-0036；4、pZE13-0004-0008及びpZA33-0010n；5、対照ベクターpZE13及びpZA33を指す。

10

20

30

40

50

【図4】マイコバクテリウム・ツベルクローシス由来の α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼを発現するE.コリ株におけるグルコースからの4-HBの生成を示す図である。菌株1~3は、pZE13-0032及びpZA33-0036を含む。菌株4は、空ベクターpZE13及びpZA33のみを発現する。宿主株は、1及び4、MG1655 *lacI*^Q；2、MG1655 *gabD lacI*^Q；3、MG1655 *gabD aldA lacI*^Qである。棒は、24時間及び48時間における濃度を指す。

【図5】組換えE.コリ株における10mM 4-HBからのBDOの生成を示す図である。番号付けした位置は、P.ギンギバリス由来の*cat2*を発現するpZA33-0024を含むMG1655*lacI*^Q、並びにpZE13上に発現される以下の遺伝子：1、なし(対照)；2、0002；3、0003；4、0003n；5、0011；6、0013；7、0023；8、0025；9、0008n；10、0035を用いた実験に対応する。遺伝子番号は、表6に規定されている。各位置について、棒は、それぞれ好気性、微好気性及び嫌気性条件を指す。微好気性条件は、培養チューブを排気せずに密閉することによって作製された。

10

【図6】4g/Lの非標識グルコース(a、c、e及びg)、均一標識¹³C-グルコース(b、d、f及びh)が補給されたM9最小培地で成長したMG1655*lacI*^Q pZE13-0004-0035-0002 pZA33-0034-0036によって生成された4-HB及びBDOの質量スペクトルを示す図である。(a)及び(b)、2個の炭素原子を含む誘導体化BDOの質量116特異的断片；(c)及び(d)、1個の炭素原子を含む誘導体化BDOの質量177特異的断片；(e)及び(f)、2個の炭素原子を含む誘導体化4-HBの質量117特異的断片；(g)及び(h)、4個の炭素原子を含む誘導体化4-HBの質量233特異的断片。

【図7】 α -ブチロラクトンの生成のためのバイオプロセスの概略流れ図である。パネル(a)は、バッチ式分離を用いた流加発酵を図示し、パネル(b)は、連続分離を用いた流加発酵を図示する。

20

【図8A - 8B】例示的な1,4-ブタンジオール(BDO)経路を示す図である。図8Aは、スクシニル-CoAからのBDO経路を示す図である。図8Bは、アルファケトグルタル酸からのBDO経路を示す図である。

【図9A - 9C】例示的なBDO経路を示す図である。図9A及び9Bは、4-アミノ酪酸からの経路を示す図である。図9Cは、アセトアクチル(acetoactyl)-CoAから4-アミノ酪酸への経路を示す図である。

【図10】アルファ-ケトグルタル酸からの例示的なBDO経路を示す図である。

【図11】グルタミン酸からの例示的なBDO経路を示す図である。

【図12】アセトアセチル-CoAからの例示的なBDO経路を示す図である。

30

【図13】ホモセリンからの例示的なBDO経路を示す図である。

【図14A - 14C】E.コリスクシニル-CoAシンターゼのヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。図14Aは、E.コリ*sucCD*オペロンのヌクレオチド配列(配列番号:)を示す図である。図14B(配列番号:)及び図14C(配列番号:)は、*sucCD*オペロンによってコードされるスクシニル-CoAシンターゼサブユニットのアミノ酸配列を示す図である。

【図15A - 15B】マイコバクテリウム・ボビス(*Mycobacterium bovis*)アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼのヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。図15Aは、マイコバクテリウム・ボビス*sucA*遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号:)を示す図である。図15Bは、マイコバクテリウム・ボビスアルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼのアミノ酸配列(配列番号:)を示す図である。

40

【図16】嫌気性(微好気性)条件下でのアルファ-ケトグルタル酸を介する最小培地中でのグルコースからの4-ヒドロキシ酪酸のE.コリにおける生合成を示す図である。宿主株はECKh-401である。実験は、プラスミドpZA33上に存在する上流経路遺伝子に基づいて以下のように標示される：1)4hbd-*sucA*；2)*sucCD-sucD-4hbd*；3)*sucCD-sucD-4hbd-sucA*。

【図17】コハク酸及びアルファ-ケトグルタル酸を介する最小培地でのグルコースからの4-ヒドロキシ酪酸のE.コリにおける生合成を示す図である。宿主株は野生型MG1655である。実験は、プラスミドpZE13及びpZA33上に存在する遺伝子に基づいて以下のように標示する：1)空の調節ベクター；2)空のpZE13、pZA33-4hbd；3)pZE13-*sucA*、pZA33-4hbd。

【図18A - 18B】図18Aは、ポルフィロモナス・ギンギバリス(*Porphyromonas gingivalis*)からのCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(*sucD*)のヌクレオチド配

50

列(配列番号:)を示す図であり、図18Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号:)を示す図である。

【図19A - 19B】図19Aは、ポルフィロモナス・ギンギバリスからの4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(4hbd)のヌクレオチド配列(配列番号:)を示す図であり、図19Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号:)を示す図である。

【図20A - 20B】図20Aは、ポルフィロモナス・ギンギバリスからの4-ヒドロキシ酪酸CoAトランスフェラーゼ(cat2)のヌクレオチド配列(配列番号:)を示す図であり、図20Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号:)を示す図である。

【図21A - 21B】図21Aは、クロストリジウム・アセトブチリウム(*Clostridium acetobutylicum*)からのホスホトランスブチリラーゼ(ptb)のヌクレオチド配列(配列番号:)を示す図であり、図21Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号:)を示す図である。 10

【図22A - 22B】図22Aは、クロストリジウム・アセトブチリウムからの酪酸キナーゼ(bukI)のヌクレオチド配列(配列番号:)を示す図であり、図22Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号:)を示す図である。

【図23A - D】C.アセトブチリウム原生配列と比べてより優勢なE.コリコドンのための変更コドンを含むC.アセトブチリウム020(ホスホトランスブチリラーゼ)についての代替的ヌクレオチド配列を示す図である。図23A~23D(それぞれ020A~020D、配列番号:)は、より優勢なコドンで置き換えられた希E.コリコドン数が増加する($A < B < C < D$)配列を含む。

【図24A - D】C.アセトブチリウム原生配列と比べてより優勢なE.コリコドンのための変更コドンを含むC.アセトブチリウム021(酪酸キナーゼ)についての代替的ヌクレオチド配列を示す図である。図24A~24D(それぞれ021A~021B、配列番号:)は、より優勢なコドンで置き換えられた希E.コリコドン数が増加する($A < B < C < D$)配列を含む。 20

【図25A - 25B】E.コリにおける発現のために最適化されたコドンによる酪酸キナーゼ(BK)及びホスホトランスブチリラーゼ(PTB)の発現の向上を示す図である。図25Aは、タンパク質に対してクーマシーブルーで染色されたドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を示す図である：レーン1、インサートを有さない対照ベクター；レーン2、E.コリにおけるC.アセトブチリウム原生配列の発現；レーン3、020B-021Bコドン最適化PTB-BKの発現；レーン4、020C-021Cコドン最適化PTB-BKの発現。BK及びPTBの位置が示されている。図25Bは、コドン最適化020B-021B(2021B)及び020C-021C(2021C)と比較した原生C.アセトブチリウム配列(2021n)のBK及びPTB活性を示す図である。 30

【図26】BDO生成酵素：Cat2(034)；2021n；2021B；2021Cを発現する様々な菌株におけるBDO及びガンマ-ブチラクトン(γ -butyrolactone)(GBL)の生成を示す図である。

【図27A - 27B】図27Aは、原生クロストリジウム・バイジェリンキー(*Clostridium biejerinckii*)ald遺伝子(025n)のヌクレオチド配列(配列番号:)を示す図であり、図27Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号:)を示す図である。

【図28A - 28D】より優勢なコドンで置き換えられた希少コドン数が増加する($A < B < C < D$)クロストリジウム・バイジェリンキーald遺伝子の代替的な遺伝子配列(それぞれ025A-025D、配列番号:)を示す図である。

【図29】原生C.バイジェリンキーald遺伝子及びコドン最適化変異体；インサートなし(インサートを有さない対照)、025n、025A、025B、025C、025Dの発現を示す図である。 40

【図30A - 30B】様々な菌株におけるBDO又はBDOとエタノールの生成を示す図である。図30Aは、原生C.バイジェリンキーald遺伝子を含む菌株(025n)又はE.コリにおける発現のために最適化されたコドンを含む変異体(025A~025D)におけるBDO生成を示す図である。図30Bは、コドン最適化変異体025Bと比較した、C.アセトブチリウムAdhE2酵素を発現する菌株(002C)におけるエタノール及びBDOの生成を示す図である。第3のセットは、P.ギンギバリスsucD(035)の発現を示す図である。全ての場合において、P.ギンギバリスCat2(034)も発現される。

【図31A - 31B】図31Aは、ゲオバシルス・サーモグルコシダシウス(*Geobacillus thermoglucosidasius*)からのadh1遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号:)を示す図であり、 50

図31Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号:)を示す図である。

【図3 2 A - 3 2 B】図32Aは、E. コリにおけるゲオバシルス・サーモグルコシダシウスadh1遺伝子の発現を示す図である。全細胞溶解物又は上澄みのいずれかをSDS-PAGEによって分析し、インサートを有さないプラスミド、083(ジオトリカム・カピタタム(*Geotrichum capitatum*)N-ベンジル-3-ピロリジノールデヒドロゲナーゼ)インサートを有するプラスミド、及び084(ゲオバシルス・サーモグルコシダシウスadh1)インサートを有するプラスミドに対してクーマシーブルーで染色した。図32Bは、ブチルアルデヒド(菱形)又は4-ヒドロキシブチルアルデヒド(正方形)を基質とする084の活性を示す図である。

【図3 3】様々な菌株におけるBDOの生成を示す図である:インサートを有さないプラスミド; 025B; 025B-026n; 025B-026A; 025B-026B; 025B-026C; 025B-050; 025B-052; 025B-053; 025B-055; 025B-057; 025B-058; 025B-071; 025B-083; 025B-084; PTSlacO-025B; PTSlacO-025B-026n。

10

【図3 4】ベクターpRE118-V2についてのプラスミドマップを示す図である。

【図3 5】aceF及びlpdA遺伝子を包含するECKh-138領域の配列を示す図である。K. ニューモニエ(*K. pneumoniae*)lpdA遺伝子に下線が引かれ、Glu354Lys変異体における変化したコドンには網掛けされている。

【図3 6】原生E. コリlpdAと変異体K. ニューモニエlpdAとのタンパク質配列比較を示す図である。

【図3 7】菌株AB3、MG1655 ldhA及びECKh-138における4-ヒドロキシ酪酸(左棒)及びBDO(右棒)の生成を示す図である。全ての菌株が、E. コリsucCD、P. ギンギバリスsucD、P. ギンギバリス4hbdを中コピープラスミドpZA33上に発現させ、P. ギンギバリスCat2、C. アセトブチリクムAdhE2を高コピープラスミドpZE13上に発現させた。

20

【図3 8】pflB-p6プロモーター及びリボソーム結合部位(RBS)に融合したaceE遺伝子の5'末端のヌクレオチド配列を示す図である。イタリック体の5'配列は、pdhオペロンから反対方向に転写されるaroP遺伝子の出発点を示す。イタリック体の3'配列は、aceE遺伝子のお発点を示す。大文字:pflB RBS。下線:FNR結合部位。太字:pflB-p6プロモーター配列。

【図3 9】菌株ECKh-456におけるaceF-lpdA領域におけるヌクレオチド配列(配列番号:)を示す図である。

【図4 0】菌株ECKh-439、ECKh-455及びECKh-456の各々についての4-ヒドロキシ酪酸、BDO及びピルビン酸(それぞれ左棒から右棒)の生成を示す図である。

30

【図4 1 A - 4 1 B】図41Aは、mdh遺伝子の欠失に関する組換え部位の概略を示す図である。図41Bは、プラスミドpKD3からのmdh遺伝子のFRT部位及び相同領域が隣接するクロラムフェニコール耐性遺伝子(CAT)の増幅のPCR生成物の配列を示す図である。

【図4 2】菌株ECKh-401におけるarcA欠失領域の配列を示す図である。

【図4 3】菌株ECKh-422の変異体gl tA遺伝子を包含する領域の配列を示す図である。

【図4 4】野生型gl tA遺伝子産物及びR163L変異体のクエン酸シンターゼ活性を示す図である。アッセイを0.4mMのNADHの不在下(菱形)又は存在下(正方形)で実施した。

【図4 5】いずれも完全BDO経路に関する遺伝子をプラスミドに発現している菌株ECKh-401及びECKh-422における4-ヒドロキシ酪酸(左棒)及びBDO(右棒)の生成を示す図である。

40

【図4 6】中央代謝フラックス及び代謝標識実験からの関連する95%信頼区間を示す図である。値は、1mmol/時のグルコース取込み率に対して正規化されたモルフラックスである。その結果は、炭素フラックスがクエン酸シンターゼを通じて酸化方向に導かれること、及びほとんどの炭素がTCA回路を完了するのでなく、BDO経路に入ることを示している。

【図4 7】いずれもBDO経路全体をプラスミドに発現している菌株ECKh-138及びECKh-422についての細胞外生成物の形成を示す図である。測定された生成物は、酢酸(Ace)、ピルビン酸(Pyr)、4-ヒドロキシ酪酸(4HB)、1,4-ブタンジオール(BDO)、エタノール(EtOH)、並びにガンマ-ブチロラクトン(GBL)、コハク酸及び乳酸を含む他の生成物であった。

【図4 8】H. インフルエンザ(*H. influenzae*)ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(pepek)でPEPカルボキシラーゼ(ppc)を置き換えた後の領域の配列を示す図である。p

50

epkコード領域に下線が引かれている。

【図49】50mMのNaHCO₃を含む最小培地で成長させた進化したpepCK菌株の成長を示す図である。

【図50】*P. ギンギバリス* Cat2及び*C. ベイジェリンキー* AldをプラスミドpZS*13に発現している菌株ECKh-453における生成物の形成を示す図である。測定された生成物は、1,4-ブタンジオール(BDO)、ピルビン酸、4-ヒドロキシ酪酸(4HB)、酢酸、 γ -ブチロラクトン(GBL)及びエタノールであった。

【図51】2つの菌株ECKh-453及びECKh-432のBDO生成を示す図である。いずれも*P. ギンギバリス* Cat2及び*C. ベイジェリンキー* Aldを発現するプラスミドpZS*13を含む。示されるように27又は18ゲージのニードルで穿刺された容器を用いて培養物を好気性条件下で成長させた。

【図52】プロモーター、sucCD遺伝子、sucD遺伝子、4hbd遺伝子及びターミネーター配列を含むポリシストロン性DNA断片の挿入の領域における菌株ECKh-426のゲノムDNAのヌクレオチド配列を示す図である。

【図53】プロモーター、sucA遺伝子、*C. クルイベリ* (*C. kluyveri*) 4hbd遺伝子及びターミネーター配列を含むポリシストロン性配列の挿入領域における菌株ECKh-432の染色体領域のヌクレオチド配列を示す図である。

【図54】染色体に組み込まれている上流BDO経路コード化遺伝子を有し、下流BDO経路遺伝子を保持するプラスミドを含むECKh-432菌株の最小培地におけるグルコースからのBDO合成を示す図である。

【図55】rrnC領域に対して相同な領域が隣接する非ホストランスフェラーゼ(非PTS)スクロース利用遺伝子を含むPCR生成物を示す図である。

【図56】rrnCオペロンにおける組み込み部位の概略図を示す図である。

【図57】グルコース上で成長された菌株ECKh-432及びスクロース上で成長された菌株ECKh-463の成長の48時間後に培養物OD600に対して正規化された平均生成物濃度を示す図である。いずれも*P. ギンギバリス* Cat2及び*C. ベイジェリンキー* Aldを発現するプラスミドpZS*13を含む。データは、各菌株の6つ組の培養物に対する。測定された生成物は、1,4-ブタンジオール(BDO)、4-ヒドロキシ酪酸(4HB)、 γ -ブチロラクトン(GBL)、ピルビン酸(PYR)及び酢酸(ACE)(それぞれ左棒から右棒)であった。

【0009】

【図58】スクシニル-CoA及びアルファ-ケトグルタル酸から、1,4-ブタンジオールへの例示的な経路を示す図である。略号：A)スクシニル-CoAレダクターゼ(アルデヒド形成)、B)アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、C)4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、D)4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼ、E)1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ。

【図59A - 59B】図59Aは、ノカルジア・イオウエンシス(*Nocardia iowensis*)由来のカルボン酸レダクターゼ(GNM_720)のヌクレオチド配列(配列番号:)を示し、図59Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号:)を示す。

【図60A - 60B】図60Aは、コドン最適化されたホスホバンテテイントランスフェラーゼのヌクレオチド配列(配列番号:)を示し、図60Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号:)を示す。

【図61】プラスミドpZS*-13S-720 721optのプラスミド地図を示す。

【図62A - 62B】コハク酸、スクシニル-CoA、及びアルファ-ケトグルタル酸から、1,4-ブタンジオールへの経路を示す図である。略号：A)スクシニル-CoAレダクターゼ(アルデヒド形成)、B)アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、C)4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、D)4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼ、E)1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ、F)コハク酸レダクターゼ、G)スクシニル-CoAトランスフェラーゼ、H)スクシニル-CoAヒドロラーゼ、I)スクシニル-CoAシンターゼ(又はスクシニル-CoAリガーゼ)、J)グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、K)グルタミン酸トランスアミナーゼ、L)グルタミン酸デカルボキシラーゼ、M)4-アミノ酪酸デヒドロゲナーゼ、N)4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ、O)4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、P)ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、Q)4-ヒドロ

10

20

30

40

50

キシブチリル-CoAレダクターゼ(アルデヒド形成)、R)ヒドロキシブチリル-リン酸レダクターゼ、S)スクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、T)4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、U)4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、V)4-ヒドロキシブチリル-CoAシンテターゼ(又は4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ)、W)4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、X)アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ、Y)5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、Z)5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、AA)5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)。

【図63】コハク酸、スクシニル-CoA、及びアルファ-ケトグルタル酸から、プトレシンへの経路を示す図である。略号：A)スクシニル-CoAレダクターゼ(アルデヒド形成)、B)アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、C)4-アミノ酪酸レダクターゼ、D)プトレシンデヒドロゲナーゼ、E)プトレシントランスアミナーゼ、F)コハク酸レダクターゼ、G)スクシニル-CoAトランスフェラーゼ、H)スクシニル-CoAヒドロラーゼ、I)スクシニル-CoAシンテターゼ(又はスクシニル-CoAリガーゼ)、J)グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、K)グルタミン酸トランスアミナーゼ、L)グルタミン酸デカルボキシラーゼ、M)4-アミノ酪酸デヒドロゲナーゼ、N)4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ、O)アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ、P)5-アミノ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、Q)5-アミノ-2-オキソペンタン酸トランスアミナーゼ、R)5-アミノ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、S)オルニチンデヒドロゲナーゼ、T)オルニチントランスアミナーゼ、U)オルニチンデカルボキシラーゼ。

【図64A-64B】図64Aは、マイコバクテリウム・スメグマチス(*Mycobacterium smegmatis*)mc(2)155由来のカルボン酸レダクターゼ(890と指定)のヌクレオチド配列(配列番号：)を示し、図64Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号：)を示す。

【図65A-65B】図65Aは、マイコバクテリウム・アビウム(*Mycobacterium avium*)亜種パラツベルクローシスK-10由来のカルボン酸レダクターゼ(891と指定)のヌクレオチド配列(配列番号：)を示し、図65Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号：)を示す。

【図66A-66B】図66Aは、マイコバクテリウム・マリヌム(*Mycobacterium marinum*)M由来のカルボン酸レダクターゼ(892と指定)のヌクレオチド配列(配列番号：)を示し、図66Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号：)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

(発明の詳細な説明)

本発明は、4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)、 γ -ブチロラクトン、1,4-ブタンジオール(BDO)、4-ヒドロキシブタナール(4-HBaI)、4-ヒドロキシブチリル-CoA(4-HBCoA)、及び/又はプトレシンの生合成生成能を有する細胞及び生物体の設計及び生成に関する。本発明は特に、BDO、4-HBaI、4-HBCoA及び/又はプトレシン経路酵素をコードしている1つ以上の核酸を導入することによって、BDO、4-HBaI、4-HBCoA及び/又はプトレシンを生成することが可能な微生物体の設計に関する。

【0011】

一実施態様において、本発明は、4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)、1,4-ブタンジオール(BDO)、4-HBaI、4-HBCoA及び/又はプトレシンの生合成生成のための代謝設計を特定するエシェリキア・コリ代謝のインシリコ化学量論モデルを利用する。本明細書に記載されている結果は、代謝経路を設計及び組換え操作して、エシェリキア・コリ及び他の細胞又は生物体における4-HBaI、4-HBCoA、又は4-HB、及び1,4-ブタンジオール又はプトレシンなどの下流生成物の生合成を達成できることを示す。例えばインシリコ設計のための4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BOD及び/又はプトレシンの生合成生成を、設計された代謝遺伝子型を有する菌株を構築することによって確認することができる。これらの代謝操作された細胞又は生物体を適応進化させて、理論的最大成長に近づく条件下を含む4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BOD及び/又はプトレシン生合成を更に増強することができる。

【0012】

一実施態様において、設計された菌株の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BOD及び/又はブ

トレシン生合成特性は、それらを遺伝的に安定にし、特に、連続バイオプロセスに有用なものとする。異なる非原生又は異種性の反応能力をE. コリ又は他の宿主生物体に取り込んで、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ及びCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、又はグルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼのいずれかから4-HB及び1,4-ブタンジオール生成代謝経路に繋がる個別の菌株設計手法が特定された。これらの代謝経路の各々からのE. コリ及び酵母種における4-HBの生合成を生じさせるインシリコ代謝設計が特定された。1,4-ブタンジオール中間体 -ブチロラクトンを、pH7.5未満の条件下、特に酸性条件下、例えば、pH5.5未満、例えば、pH7未満、pH6.5未満、pH6未満、特にpH5.5以下での自発的環化によって培養物で生成することができる。

10

【0013】

ブラットホームの計算論的コンポーネントを介して同定された菌株を、4-HB、1,4-ブタンジオール若しくは他の中間体及び/又は下流生成物の生合成生成に繋がる予測代謝変化のいずれかを遺伝子操作することによって実際に生成させることができる。また更なる実施態様において、これらの化合物の生合成生成を示す菌株を更に適応進化させて、生成物生合成を更に増強することができる。適応進化の後の生成物生合成収量のレベルを、システムの計算論的コンポーネントによって予測することができる。

【0014】

他の具体的な実施態様において、コハク酸から4-HB及び4-HB-CoAへの酵素工程をコードしている4-HB生合成経路を発現するように微生物体を構築した。宿主微生物体におけるコハク酸補酵素Aトランスフェラーゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、NAD依存性4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシ酪酸補酵素Aトランスフェラーゼの同時発現は、4-HB生合成経路を欠いた宿主微生物体と比較して4-HBの有意な生成をもたらした。更なる具体的な実施態様において、 α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ及びNAD依存性4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼをコードしている核酸を導入することによって、 α -ケトグルタル酸を基質として利用する4-HB生成微生物体を作製した。

20

【0015】

別の具体的な実施態様において、4-HBの存在下で培養されると1,4-ブタンジオール(BDO)を生合成するBDO生合成経路を含む微生物体を構築した。BDO生合成経路は、多機能性アルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼのいずれかをコードしている核酸、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼ及びアルコールデヒドロゲナーゼをコードしている核酸からなっていた。4-HB基質上での成長を支援するために、これらのBDO生成微生物体は、ホスホトランスヒドロキシブチラーゼ(phosphotranshydroxybutyrylase)とともに、4-ヒドロキシ酪酸CoAトランスフェラーゼ又は4-酪酸キナーゼをも発現した。また更なる具体的な実施態様において、機能性4-HB生合成経路及び機能性BDO生合成経路をコードしている核酸の外因性発現を介してBDOを合成する微生物体を作製した。4-HB生合成経路は、コハク酸補酵素Aトランスフェラーゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、NAD-依存性4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシ酪酸補酵素Aトランスフェラーゼからなっていた。BDO経路は、多機能性アルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼからなっていた。BDOを生成するための更なる経路を本明細書に更に記載する(図8~13参照)。

30

40

【0016】

更なる実施態様において、4-ヒドロキシブタナール、4-ヒドロキシブチリル-CoA又は1,4-ブタンジオール代謝経路において機能するカルボン酸レダクターゼ酵素のクローン化及び発現が、本明細書に記載されている。4-ヒドロキシブチルアルデヒド(4-ヒドロキシブタナール)を形成するためにアシル-CoAレダクターゼに対抗してカルボン酸レダクターゼを利用する利点は、BDOの生成に付随するエタノール及びGBL副産物の形成がより少ないことを含む。トリカルボン酸(TCA)回路代謝産物、例えばコハク酸、スクシニル-CoA、及び/又はアルファ-ケトグルタル酸から1,4-ブタンジオール及びブトレシンを生成するための、追加の多くの経路の一部としてのカルボン酸レダクターゼの適用も、本明細書において明らかにされている。

50

【0017】

本明細書に使用されているように、「非天然」という用語は、本発明の微生物体又は微生物に関して使用される場合は、微生物体が、記載の種の野生型菌株を含む記載の種の天然菌株において通常は見いだされない少なくとも1つの遺伝子変異を有することを指すことを意図する。遺伝子変異は、例えば、代謝ポリペプチドをコードしている発現可能な核酸を導入する修飾、他の核酸付加、核酸除去及び/又は微生物体の遺伝物質の他の機能的破壊を含む。当該修飾は、例えば、記載の種についての異種ポリペプチド、同種ポリペプチド又は異種及び同種の両方のポリペプチドに対するコード領域及びそれらの機能性断片を含む。更なる修飾は、例えば、修飾が遺伝子又はオペロンの発現を改変する非コード調節領域を含む。例示的な代謝ポリペプチドは、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン系列の化合物のための生合成経路内の酵素又はタンパク質を含む。

10

【0018】

代謝修飾は、その天然の状態から改変された生化学反応を指す。従って、非天然微生物は、代謝ポリペプチド又はそれらの機能性断片をコードしている核酸に対する遺伝子修飾を有することができる。例示的な代謝修飾を本明細書に開示する。

【0019】

本明細書に使用されているように、「単離された」という用語は、微生物体に関して使用される場合は、記載の微生物体が天然に見出されるとき、少なくとも1つの構成成分を実質的に含まない生物体を指すことを意図する。該用語は、微生物がその天然環境に見いだされるときに、一部又は全ての構成成分から除去される微生物体を含む。該用語は、微生物体が非天然環境に見いだされるときに、一部又は全ての成分から除去される微生物体を含む。従って、単離された微生物体とは、それが天然に見いだされるとき、又はそれが非天然環境で成長、貯蔵若しくは維持されるときに、他の物質から部分的又は完全に分離される。単離微生物体の具体的な例としては、部分的に純粋な微生物、実質的に純粋な微生物及び非天然の培地で培養された微生物が挙げられる。

20

【0020】

本明細書に使用されているように、「微生物(microbial)」、「微生物体」又は「微生物(microorganism)」は、古細菌、細菌又は真核細菌のドメイン内に含まれる微視的細胞として存在する任意の生物体を指すことを意図する。従って、該用語は、微視的サイズを有する原核又は真核細胞又は生物体を包含することを意図し、あらゆる種の細菌、古細菌及び真正細菌、並びに酵母及び真菌などの真核微生物を含む。該用語は、生化学物質の生成のために培養することができる任意の種の細胞培養物をも含む。

30

【0021】

本明細書に使用されているように、「4-ヒドロキシブタン酸」という用語は、化学式 $C_4H_8O_3$ 及び分子質量104.11g/mol(そのナトリウム塩については126.09g/mol)を有する酪酸の4-ヒドロキシ誘導体を指すことを意図する。化学化合物4-ヒドロキシブタン酸は、当該技術分野において、4-HB、4-ヒドロキシ酪酸、ガンマ-ヒドロキシ酪酸又はGHBとしても知られる。該用語は、本明細書で使用されるように、化合物の様々な塩形のいずれかを含み、例えば4-ヒドロキシブタン酸塩及び4-ヒドロキシ酪酸塩を含むことを意図する。4-HBについての塩形の具体的な例としては、4-HBナトリウム及び4-HBカリウムが挙げられる。従って、4-ヒドロキシブタン酸、4-HB、4-ヒドロキシ酪酸塩、4-ヒドロキシブタン酸塩、ガンマ-ヒドロキシ酪酸及びGHBという用語、並びに他の当該技術分野で認識されている名称は、本明細書において同義的に使用される。

40

【0022】

本明細書に使用されているように、「モノマー」という用語は、4-HBに関して使用される場合は、非ポリマー又は非誘導体化形の4-HBを指すことを意図する。ポリマー4-HBの具体的な例としては、ポリ-4-ヒドロキシブタン酸、並びに例えば4-HBと3-HBのコポリマーが挙げられる。4-HBの誘導体化形の具体的な例は、4-HB-CoAである。他のポリマー4-HB形及び4-HBの他の誘導体化形も当該技術分野で既知である。

【0023】

50

本明細書に使用されているように、「 γ -ブチロラクトン」という用語は、化学式 $C_4H_6O_2$ 及び分子質量86.089g/molを有するラク톤を指すことを意図する。化学化合物 γ -ブチロラクトンは、当該技術分野において、GBL、ブチロラクトン、1,4-ラク톤、4-ブチロラクトン、4-ヒドロキシ酪酸ラク톤及びガンマ-ヒドロキシ酪酸ラク톤としても既知である。該用語は、本明細書に使用されるときは、化合物の様々な塩形のいずれかを含むことを意図する。

【0024】

本明細書に使用されているように、「1,4-ブタンジオール」という用語は、化学式 $C_4H_{10}O_2$ 及び分子質量90.12g/molを有する、2つのヒドロキシル基を保持するアルカンブタンのアルコール誘導体を指すことを意図する。化学化合物1,4-ブタンジオールは、当該技術分野においてBDOとしても既知であり、本明細書ではBDO系列の化合物と称する系列の化合物に対する化学中間体又は前駆体である。

10

【0025】

本明細書において使用されているように、「4-ヒドロキシブタナール」という用語は、化学式 $C_4H_8O_2$ 及び分子質量88.10512g/molを有する、アルデヒドを指すことを意図する。化学化合物4-ヒドロキシブタナール(4-HBaI)は、当該技術分野において4-ヒドロキシブチルアルデヒドとしても既知である。

【0026】

本明細書において使用されているように、「ブトレシン」という用語は、化学式 $C_4H_{12}N_2$ 及び分子質量88.15148g/molを有する、ジアミンを指すことを意図する。化学化合物ブトレシンは、当該技術分野において、1,4-ブタンジアミン、1,4-ジアミノブタン、ブチレンジアミン、テトラメチレンジアミン、テトラメチルジアミン、及び1,4-ブチレンジアミンとしても既知である。

20

【0027】

本明細書に使用されているように、「テトラヒドロフラン」という用語は、化学式 C_4H_8O 及び分子質量72.11g/molを有する芳香族化合物フランの完全水素化類似体に対応する複素環式有機化合物を指すことを意図する。化学化合物テトラヒドロフランは、当該技術分野において、THF、テトラヒドロフラン、1,4-エポキシブタン、ブチレンオキシド、シクロテトラメチレンオキシド、オキサシクロペンタン、ジエチレンオキシド、オキシラン、フラニジン、ヒドロフラン、テトラメチレンオキシドとしても既知である。該用語は、それが本明細書に使用されるときは、前記化合物の様々な塩形のいずれかを含むことを意図する。

30

【0028】

本明細書に使用されているように、「CoA」又は「補酵素A」という用語は、多くの酵素(アポ酵素)の活性が活性酵素システムを形成するのにその存在が必要とされる有機補因子又は補欠分子族(酵素の非タンパク質部分)を指すことを意図する。補酵素Aは、特定の縮合酵素において機能し、アセチル又は他のアシル基転移並びに脂肪酸合成及び酸化、ピルビン酸酸化及び他のアセチル化において作用する。

【0029】

本明細書に使用されているように、「実質的に嫌気性」という用語は、培養又は成長条件に関して使用されるときは、酸素の量が、培養プロセス中の溶存酸素について飽和の約10%未満であることを指すことを意図する。該用語は、また、約1%未満の酸素の雰囲気で維持される液体培地又は固体培地の密閉チャンバーを含むことを意図する。

40

【0030】

本発明の非天然微生物体は、遺伝子変異を低下させることなく、5を超える世代に対して培養することができる微生物を指す安定遺伝子変異を含むことができる。一般に、安定遺伝子変異は、10を超える世代にわたって持続する修飾を含み、特に安定な修飾は、約25を超える世代にわたって持続し、より特定すると安定な遺伝子修飾は、無限を含めて、50を超える世代にわたって持続することになる。

【0031】

50

当業者は、本明細書に例示される代謝修飾を含む遺伝子変異は、好適な由来生物体又は宿主生物体、例えば、E. コリ、酵母又は本明細書に開示されている他の生物体、並びにそれらの対応する代謝反応、又は所望の代謝経路に関するそれらの対応する代謝反応に関する酵素をコードしている遺伝子などの所望の遺伝物質のための好適な由来生物体に関して記載されることを理解するであろう。しかし、多種多様な生物体の完全ゲノム配列決定及びゲノムの分野における高度な技能を考慮すると、当業者は、本明細書に示される教示及び指針を実質的に全ての他の生物体に容易に適用することが可能である。例えば、記載の種以外の種から同一又は類似のコード化核酸を取り込むことによって、本明細書に例示されるE. コリ代謝の変調を他の種に容易に適用することができる。当該遺伝子変異としては、例えば、概してホモログ種の遺伝子変異、及び特にオルソログ、パラログ又は非オルソログ遺伝子置換が挙げられる。

10

【0032】

オルソログは、垂直血統によって関連づけられ、異なる生物体において実質的に同様又は同一の機能に関与する1つ以上の遺伝子である。例えば、マウスエポキシドヒドロラーゼとヒトエポキシドヒドロラーゼをエポキシドの加水分解の生物的功能についてオルソログと見なすことができる。遺伝子は、例えば、それらが相同であることを示すための十分な量の配列類似性を共有するか、又は共通の祖先からの進化によって関連づけられる場合に、垂直血統によって関連づけられる。遺伝子が、三次元構造は共有するが、一次配列類似性が識別可能でない程度に共通の祖先から進化したことを示すための十分な量の配列類似性を必ずしも共有しない場合に、遺伝子をオルソログと見なすこともできる。オルソログである遺伝子は、アミノ酸配列同一性が約25%～100%の配列類似性を有するタンパク質をコードすることができる。25%未満のアミノ酸類似性を共有するタンパク質をコードしている遺伝子は、それらの三次元構造も類似性を示す場合に垂直血統によって生じたと見なすこともできる。組織プラスミノーゲン活性化因子及びエラスターゼを含むセリンプロテアーゼ系列の酵素のメンバーは、共通の祖先からの垂直血統によって生じたと見なされる。

20

【0033】

オルソログは、例えば進化を介して構造又は全体活性が分岐した遺伝子又はそれらのコード化された遺伝子産物を含む。例えば、1つの種が2つの機能を示す遺伝子産物をコードし、当該機能が第2の種において異なる遺伝子に分けられた場合は、これら3つの遺伝子及びそれらの対応する生成物はオルソログと見なされる。生化学生成物の成長連結生成を含む生成では、導入又は破壊すべき代謝活性を保持するオルソログ遺伝子を非天然微生物の構築に選択すべきであることを当業者は理解するであろう。分離可能な活性を示すオルソログの例は、異なる活性が、2つ以上の種の間又は単一種内の異なる遺伝子産物に分離された場合である。具体例は、2種類のセリンプロテアーゼ活性であるエラスターゼタンパク質分解とプラスミノーゲンタンパク質分解をプラスミノーゲン活性化因子及びエラスターゼとしての異なる分子に分離することである。第2の例は、マイコプラズマ5'-3'エキソヌクレアーゼ及びドロソフィラDNAポリメラーゼIII活性の分離である。第1の種由来のDNAポリメラーゼは、第2の種由来のエキソヌクレアーゼ又はポリメラーゼのいずれか又は両方に対してオルソログであり、且つその逆も同じであることを見なすことができる。

30

40

【0034】

対照的に、パラログは、例えば、複製、そしてその後の進化的分岐によって関連づけられるホモログであり、類似又は共通するが、同一でない機能を有する。パラログは、例えば同一種又は異なる種から由来又は派生し得る。例えば、ミクロソームエポキシドヒドロラーゼ(エポキシドヒドロラーゼI)及び可溶性エポキシドヒドロラーゼ(エポキシドヒドロラーゼII)は、同じ種において異なる反応を触媒し、且つ2つの異なる機能を有する、共通の祖先から同時進化した2つの異なる酵素を表すため、パラログであることを見なすことができる。パラログは、互いに著しい配列類似性を有する同一種由来のタンパク質であり、それは、それらが相同であるか、又は共通の祖先からの同時進化を介して関連づけられていることを示唆する。パラログタンパク質系列のグループは、HipAホモログ、ルシフェラー

50

ゼ遺伝子及びペプチダーゼ等を含む。

【0035】

非オルソログ遺伝子置換は、異なる種における参照遺伝子機能に代わることができる1つの種からの非オルソログ遺伝子である。置換は、例えば、異なる種における参照機能と比較して、本来の種における実質的に同様又は類似の機能を実施できることを含む。一般に、非オルソログ遺伝子置換は、参照機能をコードしている既知の遺伝子に構造的に関連するものとして識別可能であるが、構造的関連性が低い、機能的に類似の遺伝子及びそれらの対応する遺伝子産物も、本明細書に使用されるときに該用語の意味の範囲内に含まれる。機能的類似性は、例えば、置換しようとする機能をコードしている遺伝子と比較して、非オルソログ遺伝子産物の活性部位又は結合領域において少なくともある程度の構造的類似性を必要とする。従って、非オルソログ遺伝子は、例えば、パラログ又は非関連遺伝子を含む。

10

【0036】

従って、4-HB、GBL、4-HBaI、4-HBCoA、BDO及び/又はブトレシン生合成能を有する本発明の非天然微生物体を同定及び構築するのに際して、当業者は、本明細書に示される教示及び指針を特定の種に適用すると、代謝修飾の同定が、オルソログの同定及び包含又は不活性化を含み得ることを理解するであろう。パラログ及び/又は非オルソログ遺伝子置換が、類似又は実質的に類似の代謝反応を触媒する酵素をコードしている被参照微生物に存在する範囲で、当業者は、これらの進化的に関連する遺伝子を利用することもできる。

【0037】

20

オルソログ、パラログ及び非オルソログ遺伝子置換を当業者に周知の方法によって決定することができる。例えば、2つのポリペプチドについての核酸又はアミノ酸配列の調査は、比較配列間の配列同一性及び類似性を明らかにすることになる。そのような類似性に基づいて、当業者は、タンパク質が共通の祖先からの進化を介して関連することを示すのに十分に高度な類似性であるかどうかを判断することができる。Align、BLAST及びClustal W等の当業者に周知のアルゴリズムは、生の配列類似性又は同一性を比較及び判断するとともに、重み又はスコアを割り当てることができる配列のギャップの存在又は有意性を判断する。そのようなアルゴリズムも当該技術分野で既知であり、ヌクレオチド配列類似性又は同一性を判断するのに同様に適用可能である。関連性を判断するための十分な類似性についてのパラメータは、統計的類似性、又はランダムポリペプチドにおける類似の対応を見いだす可能性、及び決定された対応の有意性を計算するための周知の方法に基づいて計算される。望まれる場合は、2つ以上の配列のコンピュータ比較を当業者によって視覚的に最適化することもできる。関連遺伝子産物又はタンパク質は、高い類似性、例えば、25%~100%の配列同一性を有することが期待できる。関連しないタンパク質は、十分なサイズのデータベースを走査した場合に、偶然に生じることが期待される程度(約5%)と本質的に同じである同一性を有し得る。5%~24%の配列は、比較した配列が関連することを結論づけるための十分な相同性を表す場合もあるし、表さない場合もある。データセットのサイズが与えられた当該対応の有意性を判断するための追加の統計解析を実施して、これらの配列の関連性を判断することができる。

30

【0038】

40

BLASTアルゴリズムを使用して2つ以上の配列の関連性を判断するための例示的なパラメータを、例えば、以下の記載のようにすることができる。簡単に述べると、BLASTバージョン2.0.8(1999年1月5日)及び以下のパラメータ: Matrix:0 BLOSUM62; gap open:11; gap extension:1; x_dropoff:50; expect:10.0; wordsize:3; filter:onを使用して、アミノ酸配列アラインメントを実施することができる。BLASTNバージョン2.0.6(1998年9月16日)及び以下のパラメータ: Match:1; mismatch:-2; gap open:5; gap extension:2; x_dropoff:50; expect:10.0; wordsize:11; filter:offを使用して、核酸配列アラインメントを実施することができる。例えば比較の厳密さを向上又は低下させ、2つ以上の配列の関連性を判断するために上記パラメータにどのような修正を加えることができるかを当業者は把握するであろう。

50

【0039】

4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、又はグルタミン酸デカルボキシラーゼをコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)生合成経路を有する微生物体を含む非天然微生物生触媒又は微生物体であって、該外因性核酸が、モノマー4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)を生成するのに十分な量で発現される非天然微生物生触媒又は微生物体が本明細書で開示される。4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼは、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ又は4-HBデヒドロゲナーゼとも称する。スクシニル-CoAシンテターゼは、スクシニル-CoAシンターゼ又はスクシニル-CoAリガーゼとも称する。

10

【0040】

4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、又は -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼをコードしている少なくとも1つの外因性核酸を有する4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)生合成経路を有する微生物体を含む非天然微生物生触媒又は微生物体であって、該外因性核酸が、モノマー4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)を生成するのに十分な量で発現される非天然微生物生触媒又は微生物体も本明細書で開示される。

【0041】

非天然微生物生触媒又は微生物体は、本発明の化合物を生合成生成するための代謝反応の組合せを使用する微生物体を含むことができる。生合成された化合物を細胞内で生成し、且つ/又は培養培地に分泌することができる。非天然微生物によって生成される例示的な化合物としては、例えば、4-ヒドロキシブタン酸、1,4-ブタンジオール及び -ブチロラクトンが挙げられる。

20

【0042】

一実施態様において、非天然微生物体は、4-HBを生成するように操作される。この化合物は、1,4-ブタンジオール系列の化合物への1つの有用な入口点である。コハク酸から、又はスクシニル-CoAを介してコハク酸から、又は -ケトグルタル酸から4-HBを形成するための生化学反応を図1の工程1~8に示す。

【0043】

出発成分からBDO、4-HBaI、4-HBCoA及び/又はブトレシン生成物への変換が達成されるのであれば、BDO、4-HBaI、4-HBCoA及び/又はブトレシン経路の適切な酵素の任意の組合せを使用できることが理解される。従って、本明細書に開示されている代謝経路のいずれかを利用できること、及び本明細書に開示されているように、所望の経路を達成するために適切な酵素をどのように選択すべきかを当業者が十分理解することが理解される。

30

【0044】

別の実施態様において、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、4-アミノ酪酸-CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリルCoAヒドロラーゼ、4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼを含む非天然微生物体の本明細書で開示される(実施例VII表17参照)。このBDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを更に含むことができる。

40

【0045】

本明細書に開示されているように、該経路の様々な組合せを利用できることが当業者に理解される。例えば、非天然微生物体において、核酸は、4-アミノ酪酸-CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ又は4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ; 4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブチリル-CoAトランスアミナ

50

ーゼ；及び、4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼをコードすることができる。他の例示的な組合せを以下に具体的に記載し、図8～13に更に見いだすことができる。例えば、BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを更に含むことができる。

【0046】

加えて、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、4-アミノ酪酸-CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリルCoAヒドロラーゼ、4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼを含み、且つ1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを更に含むことができる、非天然微生物体が本明細書で開示される(実施例VII及び表18)。例えば、該外因性核酸は、4-アミノ酪酸-CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、又は4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ；4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)；及び4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼをコードすることができる。加えて、該核酸は、4-アミノ酪酸-CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、又は4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ；4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ；4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ；及び4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼをコードすることができる。

10

20

【0047】

同じくBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、4-アミノ酪酸キナーゼ、4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-リン酸デヒドロゲナーゼ、又は4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含む非天然微生物体が本明細書で開示される(実施例VII及び表19)。例えば、外因性核酸は、4-アミノ酪酸キナーゼ；4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)；4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ；及び4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼをコードすることができる。代替的に、外因性核酸は、4-アミノ酪酸キナーゼ；[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ；4-ヒドロキシブチリル-リン酸デヒドロゲナーゼ；及び4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)をコードすることができる。

30

40

【0048】

加えて、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、アルファ-ケトグルタル酸5-キナーゼ、2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ、アルファ-ケトグルタル酸-CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)を含む非天然微生物体も本明細書で開示される(実施例VIII及び表20)。該BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダク

50

ターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを更に含むことができる。例えば、外因性核酸は、アルファ-ケトグルタル酸5-キナーゼ；2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)；2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ；及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼをコードすることができる。代替的に、外因性核酸は、アルファ-ケトグルタル酸5-キナーゼ；2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)；2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ；及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)をコードすることができる。代替的に、外因性核酸は、アルファ-ケトグルタル酸-CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ；アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ；及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼをコードすることができる。別の実施態様において、外因性核酸は、アルファ-ケトグルタル酸-CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ、又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ；アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)をコードすることができる。代替的に、外因性核酸は、アルファ-ケトグルタル酸-CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ、又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ；アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)；及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼをコードすることができる。更に別の実施態様において、外因性核酸は、アルファ-ケトグルタル酸-CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ、又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ；アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)；及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)をコードすることができる。

10

20

30

40

50

【0049】

更に、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、グルタミン酸-CoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ、グルタミル-CoAリガーゼ、グルタミン酸5-キナーゼ、グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、グルタミル-CoAレダクターゼ、グルタミン酸-5-セミアルデヒドレダクターゼ、グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)を含む非天然微生物体が本明細書で開示される(実施例IX及び表21参照)。例えば、外因性核酸は、グルタミン酸-CoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ、又はグルタミル-CoAリガーゼ；グルタミル-CoAレダクターゼ；グルタミン酸-5-セミアルデヒドレダクターゼ；2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ；及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)をコードすることができる。代替的に、外因性核酸は、グルタミン酸5-キナーゼ；グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)；グルタミン酸-5-セミアルデヒドレダクターゼ；2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ；及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)をコードすることができる。更に別の実施態様において、外因性核酸は、グルタミン酸-CoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ、又はグルタミル-CoAリガーゼ；グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)；2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ；及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)をコードすることができる。

酸)をコードすることができる。更に別の実施態様において、外因性核酸は、グルタミン酸5-キナーゼ；グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)；2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ；及び、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)をコードすることができる。

【0050】

また、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒ
10
ドラターゼ、ビニルアセチル-CoA -イソメラーゼ、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒ
ドラターゼを含む非天然微生物体が本明細書で開示される(実施例X及び表22参照)。例えば、外因性核酸は、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ；3-ヒドロキシブチリル
-CoAデヒドラターゼ；ビニルアセチル-CoA -イソメラーゼ；及び4-ヒドロキシブチリル-
CoAデヒドラターゼをコードすることができる。

【0051】

更に、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO
20
経路が、ホモセリンデアミナーゼ、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリン-CoA
ヒドロラーゼ、ホモセリン-CoAリガーゼ、ホモセリン-CoAデアミナーゼ、4-ヒドロキシブ
タ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ
、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エン酸レダクターゼ
、4-ヒドロキシブチリル-CoA-トランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラ
ーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダ
クターゼを含む非天然微生物体が本明細書で開示される(実施例XI及び表23参照)。例えば
、外因性核酸は、ホモセリンデアミナーゼ；4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランス
フェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノ
イル-CoAリガーゼ；4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼをコードすることが
できる。代替的に、外因性核酸は、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリン-CoA
30
ヒドロラーゼ、又はホモセリン-CoAリガーゼ；ホモセリン-CoAデアミナーゼ；及び4-ヒ
ドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼをコードすることができる。更なる実施態様
において、外因性核酸は、ホモセリンデアミナーゼ；4-ヒドロキシブタ-2-エン酸レダク
ターゼ；及び4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒ
ドロラーゼ、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼをコードすることができる。代替
的に、外因性核酸は、ホモセリン-CoAトランスフェラーゼ、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ、
又はホモセリン-CoAリガーゼ；ホモセリン-CoAデアミナーゼ；及び4-ヒドロキシブタ-2-
エノイル-CoAレダクターゼをコードすることができる。

【0052】

更に、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BD
40
O経路が、スクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒ
ドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナ
ーゼ(リン酸化)を含む非天然微生物体が本明細書で開示される(表15参照)。当該BDO経路
は、スクシニル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブ
チリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロ
キシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoA
レダクターゼ(アルコール形成)、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを更に含むこ
とができる。

【0053】

加えて、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なく

10

20

30

40

50

とも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、4-アミノ酪酸オキシレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含む非天然微生物体が本明細書で開示される(表16参照)。当該BDO経路は更に、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを含むことができる。

10

【0054】

上記経路は、単に例示である。当業者は、要望に応じて、本明細書に開示されるものから適切な経路を容易に選択して、好適なBDO経路又は他の代謝経路を得ることができる。

【0055】

本発明は、生成物を増加させるか、又は望ましくない副産物を減少させることによってBDOなどの所望の生成物の生成の向上を可能にする遺伝子修飾された生物体を提供する。本明細書に開示されているように、本発明は、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体を提供する。一実施態様において、微生物体は、外因性スクシニル-CoAシンテターゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XII参照)。例えば、スクシニル-CoAシンテターゼは、エシェリキア・コリsucCD遺伝子によってコードすることができる。

20

【0056】

別の実施態様において、微生物体は、外因性アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XIII参照)。例えば、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼは、マイコバクテリウム・ボビス(*Mycobacterium bovis*)sucA遺伝子によってコードすることができる。更に別の実施態様において、微生物体は、外因性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ並びに場合により4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XIII参照)。例えば、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(CoA依存性)、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼは、ポルフィロモナス・ギンギバリス(*Porphyromonas gingivalis*)W83遺伝子によってコードすることができる。更なる実施態様において、微生物体は、外因性酪酸キナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XIII参照)。例えば、酪酸キナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼは、クロストリジウム・アセトブチリクム(*Clostridium acetobutylicum*)buk1及びptb遺伝子によってコードすることができる。

30

【0057】

更に別の実施態様において、微生物体は、外因性4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XIII参照)。例えば、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼは、クロストリジウム・ベイジェリンキー(*Clostridium beijerinckii*)ald遺伝子によってコードすることができる。加えて本発明の実施態様において、微生物体は、外因性4-ヒドロキシブタナールレダクターゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XIII参照)。例えば、4-ヒドロキシブタナールレダクターゼは、ゲオバシルス・サーモグルコシダシウス(*Geobacillus thermoglucosidasius*)adh1遺伝子によってコードすることができる。別の実施態様において、微生物体は、外因性ピルビン酸デヒドロゲナーゼサブユニットを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XIV参照)。例えば、外因性ピルビン酸デヒドロゲナーゼはNADH非感受性であり得る。ピルビン酸デヒドロゲナーゼサブユニットは、クレブシエラ・ニューモニエ(*Klebsiella pneumoniae*)lpdA遺伝子によってコードすることができる。特定の実施態様において、微生物体のピルビン酸デ

40

50

ヒドロゲナーゼサブユニット遺伝子にビルビン酸ギ酸リアーゼプロモーターの制御を受けさせることができる。

【0058】

更に別の実施態様において、微生物体は、好気性呼吸器制御調節系をコードしている遺伝子を破壊するように遺伝子修飾されている(実施例XV参照)。例えば、この破壊は、arcA遺伝子の破壊であり得る。当該生物体は、リンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードしている遺伝子の破壊を更に含むことができる。更なる実施態様において、微生物体は、外因性NADH非感受性クエン酸シンターゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XV参照)。例えば、NADH非感受性クエン酸シンターゼは、glfAのR163L変異体などのglfAによってコードすることができる。更に別の実施態様において、微生物体は、外因性ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XVI参照)。例えば、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼは、ヘモフィルス・インフルエンザ(Haemophilus influenza)ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子によってコードすることができる。

10

【0059】

本明細書に開示されている多くの遺伝子修飾のいずれかを単独で、又は本明細書に開示されている遺伝子修飾の1つ以上との様々な組み合わせで使用して、BDO生成微生物体におけるBDOの生成を増大させることができることが理解される。特定の実施態様において、微生物体は、BDOの生成の増大をもたらすあらゆる遺伝子修飾を取り込むように遺伝子修飾することができる。特定の実施態様において、BDO経路を含む微生物体は、外因性スクシニル-CoAシンターゼを発現し；外因性アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼを発現し；外因性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ並びに場合により4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼを発現し；外因性酪酸キナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼを発現し；外因性4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼを発現し；且つ、外因性4-ヒドロキシブタニールレダクターゼを発現し；外因性ビルビン酸デヒドロゲナーゼを発現し；好気性呼吸器制御調節系をコードしている遺伝子を破壊し；外因性NADH非感受性クエン酸シンターゼを発現し；並びに、外因性ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼを発現するように遺伝子修飾することができる。生成の向上のための当該菌株は、実施例XII~XIXに記載されている。従って上記修飾に加えて、当該菌株は、本明細書に開示されている他の修飾を更に含むことができる。当該修飾としては、内因性乳酸デヒドロゲナーゼ(ldhA)、アルコールデヒドロゲナーゼ(adhE)、及び/又はビルビン酸ギ酸リアーゼ(pf1B)の欠失が挙げられるが、それらに限定されない(実施例XII~XIX及び表28参照)。

20

30

【0060】

加えて、外因的に発現される酵素をコードしている1つ以上の遺伝子が宿主生物体のfimD座に組み込まれている微生物体が提供される(実施例XVII参照)。例えば、BDO経路酵素をコードしている1つ以上の遺伝子を、BDOの生成の増大のためにfimD座に組み込むことができる。更に、BDOの生成を増大させる非ホスホトランスフェラーゼスクロース取り込み系を発現する微生物体が提供される。

【0061】

40

本明細書に開示されている遺伝子修飾微生物体は、特定のBDO経路酵素を含む微生物体で例示されるが、当該改変を、遺伝子修飾の存在下での生成の増強に好適なBDO、4-HBAI、4-HBCoA及び/又はブトレシン経路を有する任意の微生物体に取り込むことができることが理解される。従って、本発明の微生物体は、本明細書に開示されているBDO、4-HBAI、4-HBCoA及び/又はブトレシン経路のいずれかを有することができる。例えば、BDO経路は、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンターゼ、CoA-依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシ酪酸:CoAトランスフェラーゼ、4-酪酸キナーゼ、ホスホトランスブチリラーゼ、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ又はアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼを含むことができる(図1参照)。代替的に、BDO経路は、4-アミノ酪

50

酸-CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼを含むことができる(表17参照)。当該BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを更に含むことができる。

【0062】

加えて、BDO経路は、4-アミノ酪酸-CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼを含むことができる(表18参照)。また、BDO経路は、4-アミノ酪酸キナーゼ、4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-リン酸デヒドロゲナーゼ、又は4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むことができる(表19参照)。当該経路は、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを更に含むことができる。

【0063】

BDO経路は、アルファ-ケトグルタル酸5-キナーゼ、2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ、アルファ-ケトグルタル酸-CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)を含むこともできる(表20参照)。当該BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを更に含むことができる。加えて、BDO経路は、グルタミン酸-CoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ、グルタミル-CoAリガーゼ、グルタミン酸5-キナーゼ、グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、グルタミル-CoAレダクターゼ、グルタミン酸-5-セミアルデヒドレダクターゼ、グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)を含むことができる(表21参照)。当該BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを更に含むことができる。

【0064】

加えて、BDO経路は、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、ビニルアセチル-CoA -イソメラーゼ、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼを含むことができる(表22参照)。また、BDO経路は、ホモセリンデアミナーゼ、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリンCoAヒドロラーゼ、ホモセリンCoAリガーゼ、ホモセリンCoAデアミナーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エン酸レダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼを含むことができる(表23参照)。当該BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形

10

20

30

40

50

成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを更に含むことができる。

【0065】

BDO経路は、スクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を更に含むことができる(表15参照)。当該経路は、スクシニル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを更に含むことができる。また、BDO経路は、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、4-アミノ酪酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むことができる(表16参照)。当該BDO経路は、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを更に含むことができる。

10

20

【0066】

本発明は加えて、4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタナール経路を含む非天然微生物体であって、該4-ヒドロキシブタナール経路が、スクシニル-CoAレダクターゼ(アルデヒド形成)；4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ；及び、4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼを含む、非天然微生物体を提供する(図58、工程A-C-D参照)。本発明はまた、4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタナール経路を含む非天然微生物体であって、該4-ヒドロキシブタナール経路が、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ；4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ；及び、4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼを含む、非天然微生物体を提供する(図58、工程B-C-D)。

30

【0067】

本発明は更に、4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタナール経路を含む非天然微生物体であって、該4-ヒドロキシブタナール経路が、コハク酸レダクターゼ；4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、及び4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼを含む、非天然微生物体を提供する(図62、工程F-C-D参照)。更に別の実施態様において、本発明は、4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタナール経路を含む非天然微生物体であって、該4-ヒドロキシブタナール経路が、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、又はグルタミン酸デヒドロゲナーゼ又はグルタミン酸トランスアミナーゼ及びグルタミン酸デカルボキシラーゼ及び4-アミノ酪酸デヒドロゲナーゼ又は4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ；4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ；及び、4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼを含む、非天然微生物体を提供する(図62、工程B又は((J若しくはK)-L-(M若しくはN))-C-D参照)。

40

【0068】

本発明はまた、4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタナール経路を含む非天然微生物体であって、該4-ヒドロキシブタナール経路が、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナー

50

ぜ；及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼを含む、非天然微生物体を提供する(図62、工程X-Y-Z参照)。更に別の実施態様において、本発明は、4-ヒドロキシブチリル-CoAを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブチリル-CoA経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブチリル-CoA経路を含む非天然微生物体であって、該4-ヒドロキシブチリル-CoA経路が、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ；及び、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)を含む非天然微生物体を提供する(図62、工程X-Y-AA参照)。

【0069】

本発明は加えて、ブトレシンを生成するのに十分な量で発現されるブトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むブトレシン経路を含む非天然微生物体であって、該ブトレシン経路が、コハク酸レダクターゼ；4-アミノ酪酸デヒドロゲナーゼ又は4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ；4-アミノ酪酸レダクターゼ；及び、ブトレシンデヒドロゲナーゼ又はブトレシントランスアミナーゼを含む、非天然微生物体を提供する(図63、工程F-M/N-C-D/E参照)。更に別の実施態様において、本発明は、ブトレシンを生成するのに十分な量で発現されるブトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むブトレシン経路を含む非天然微生物体であって、該ブトレシン経路が、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ；4-アミノ酪酸デヒドロゲナーゼ又は4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ；4-アミノ酪酸レダクターゼ；及び、ブトレシンデヒドロゲナーゼ又はブトレシントランスアミナーゼを含む、非天然微生物体を提供する(図63、工程B-M/N-C-D/E参照)。本発明は加えて、ブトレシンを生成するのに十分な量で発現されるブトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むブトレシン経路を含む非天然微生物体であって、該ブトレシン経路が、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ又はグルタミン酸トランスアミナーゼ；グルタミン酸デカルボキシラーゼ；4-アミノ酪酸レダクターゼ；及び、ブトレシンデヒドロゲナーゼ又はブトレシントランスアミナーゼを含む、非天然微生物体を提供する(図63、工程J/K-L-C-D/E参照)。

【0070】

別の実施態様において本発明は、ブトレシンを生成するのに十分な量で発現されるブトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むブトレシン経路を含む非天然微生物体であって、該ブトレシン経路が、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-アミノ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ又は5-アミノ-2-オキソペンタン酸トランスアミナーゼ；5-アミノ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ；及び、ブトレシンデヒドロゲナーゼ又はブトレシントランスアミナーゼを含む、非天然微生物体を提供する(図63、工程O-P/Q-R-D/E参照)。またブトレシンを生成するのに十分な量で発現されるブトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むブトレシン経路を含む非天然微生物体であって、該ブトレシン経路が、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-アミノ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ又は5-アミノ-2-オキソペンタン酸トランスアミナーゼ；オルニチンデヒドロゲナーゼ又はオルニチントランスアミナーゼ；及び、オルニチンデカルボキシラーゼを含む、非天然微生物体が提供される(図63、工程O-P/Q-S/T-U参照)。

【0071】

更なる実施態様において、本発明は、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路を有する非天然微生物体であって、該非天然微生物体が、本明細書に開示されたいずれかの経路の基質を変換する酵素又はタンパク質をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むものを提供する(例えば、実施例及び図1、8-13、58、62及び63参照)。BDO生成に関する例示的实施態様において、微生物体は、基質を生成物へ変換、コハク酸をスクシニル-CoAへ；スクシニル-CoAをコハク酸セミアルデヒドへ；コハク酸セミアルデヒドを4-ヒドロキシ酪酸へ；4-ヒドロキシ酪酸を4-ヒドロキシブチリル-リン酸へ；4-ヒドロキシブチリル-リン酸を4-ヒドロキシブチリル-CoAへ；4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブタナールへ；及び、4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールへからなる群から

10

20

30

40

50

選択されるよう変換することができる。4-HBaIを生成する経路において、微生物体は、例えば、コハク酸をコハク酸セミアルデヒドへ；コハク酸セミアルデヒドを4-ヒドロキシ酪酸へ；及び、4-ヒドロキシ酪酸を4-ヒドロキシブタナールへ変換することができる。加えて当該生物体は、BDOを生成するために、4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールへ変換する活性を含むことができる。4-HBaIを生成する更に別の経路は、例えば、アルファ-ケトグルタル酸をコハク酸セミアルデヒドへ；コハク酸セミアルデヒドを4-ヒドロキシ酪酸へ；及び、4-ヒドロキシ酪酸を4-ヒドロキシブタナールへであることができる。4-HBaIを生成する代替経路は、例えば、アルファ-ケトグルタル酸を2,5-ジオキソペンタン酸へ；2,5-ジオキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸へ；及び、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸を4-ヒドロキシブタナールへであることができる。例示的4-ヒドロキシブチリル-CoA経路は、例えば、アルファ-ケトグルタル酸を2,5-ジオキソペンタン酸へ；2,5-ジオキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸へ；及び、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸を4-ヒドロキシブチリル-CoAへであることができる。例示的ブトレシン経路は、例えば、コハク酸をスクシニル-CoAへ；スクシニル-CoAをコハク酸セミアルデヒドへ；コハク酸セミアルデヒドを4-アミノ酪酸へ；4-アミノ酪酸を4-アミノブタナールへ；及び、4-アミノブタナールをブトレシンへであることができる。代替的ブトレシン経路は、例えば、コハク酸をコハク酸セミアルデヒドへ；コハク酸セミアルデヒドを4-アミノ酪酸へ；4-アミノ酪酸を4-アミノブタナールへ；及び、4-アミノブタナールをブトレシンへであることができる。当業者は、これらは単なる例示であること、並びに所望の生成物を生成するのに適した本明細書に開示され且つその適切な活性が変換に利用可能である任意の基質-生成物対を、本明細書の教示を基に当業者は容易に決定することができることを理解するであろう。従って本発明は、酵素又はタンパク質をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む非天然微生物体であって、該酵素又はタンパク質が、経路の基質及び生成物を変換するものを提供する(図1、8-13、58、62及び63参照)。

10

20

30

40

50

【0072】

概して本発明は、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路を含む微生物体として本明細書に説明されているが、加えて、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路の中間体を生成するのに十分な量で発現される4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路酵素又はタンパク質をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む非天然微生物体を提供することは理解される。例えば、本明細書に記載の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO及びブトレシン経路は、図1、8-13、58、62及び63に例示されている。従って本発明は、例えばBDOを生成するBDO経路を含む微生物体に加え、更にBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む非天然微生物体であって、該微生物体が、該経路の中間体よりもむしろ生成物としてBDO経路中間体を生成するものを提供する。例えば図62に示されたひとつの例示的实施態様において、本発明は、中間体よりもむしろ生成物としてスクシニル-CoA、コハク酸セミアルデヒド、4-ヒドロキシ酪酸、4-ヒドロキシブチリル-リン酸、4-ヒドロキシブチリル-CoA、又は4-ヒドロキシブタナールを生成する微生物体を提供する。別の例示的实施態様は、例えば、中間体よりもむしろ生成物としてアルファ-ケトグルタル酸、2,5-ジオキソペンタン酸、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸、又は4-ヒドロキシブタナールを生成する微生物体を含む。ブトレシン経路の例示的实施態様は、例えば、中間体よりもむしろ生成物としてグルタミン酸、4-アミノ酪酸、又は4-アミノブタナールを生成する微生物体を含む。ブトレシン経路の代替的实施態様は、例えば、中間体よりもむしろ生成物として2,5-ジオキソペンタン酸、5-アミノ-2-オキソペンタン酸、又はオルニチンを生成する微生物体を含む。

【0073】

図1、8-13、58、62及び63の経路を含む、実施例において説明され且つ図面に例示されたように、本明細書に開示の任意の経路は、所望のように任意の経路中間体又は生成物を生成する非天然微生物体を作製するために利用することができることが理解される。本明細書に開示されたように、中間体を生成する当該微生物体は、所望の生成物を生成するために下流の経路酵素を発現する別の微生物体と組み合わせて使用することができる。しか

し、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路中間体を生成する非天然微生物体は、所望の生成物として中間体を生成するために利用することができることが理解される。

【0074】

代謝反応、その反応物質又は生成物の一般的言及により、或いは被参照代謝反応、反応物質又は生成物に関連した若しくはそれらを触媒する酵素をコードしている1つ以上の核酸又は遺伝子の具体的言及により、本発明を本明細書に記載する。別に本明細書に明記される場合を除いて、当業者は、また、反応の言及が、反応の反応物質及び生成物の言及を構成することを理解するであろう。同様に、別に本明細書に明記される場合を除いて、また、反応物質又は生成物の言及は、反応を指し、また、これらの代謝構成要素のいずれかの言及が、被参照反応、反応物質又は生成物を触媒する酵素をコードしている1つ以上の遺伝子を指す。同様に、代謝生化学、酵素学及びゲノム解析の周知の分野を考慮すると、本明細書における遺伝子又はコード化核酸の言及は、対応する被コード化酵素及びそれが触媒する反応、並びに該反応の反応物質及び生成物の言及を構成する。

10

【0075】

本発明の微生物体を使用する生合成様式を介する4-HBの生成は、モノマー4-HBを生成することができるため、特に有用である。本発明の非天然微生物並びに4-HB及びBDO系統の化合物のそれらの生合成は、また、4-HB生成物が、(1)分泌可能であり；(2)補酵素Aなどの任意の誘導体化を避けることができ；(3)生合成時の熱力学的変化を回避し；(4)BDOの直接的な生合成を可能にし；且つ、(5)酸性pH培地における4-HBの γ -ブチロラクトン(GBL)への自発的化学変換を可能にするため、特に有用である。後者の特性は、また、例えば1,4-ブタンジオール及び/又はテトラヒドロフラン(THF)などのBDO系統の化合物の効率的な化学合成又は生合成に特に有用である。

20

【0076】

微生物体は、一般に4-HBを合成する能力が欠如しており、従って、1,4-ブタンジオール系統の化合物の範囲内であることが本明細書に開示されている化合物、又は1,4-ブタンジオール系統の化合物の範囲内であることが当業者に知られる化合物のいずれかを合成する能力も欠如している。更に、必須の代謝酵素機能の全てを有する生物体は、記載の酵素及び本明細書に例示される生化学経路から4-HBを生成することが知られていない。むしろ、恐らくは以下に更に記載されるいくつかの嫌気性微生物を除いては、酵素機能を有する微生物は、4-HBを基質として使用して、例えばコハク酸を生成する。対照的に、本発明の非天然微生物体は、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO及び/又はブトレシンを生成物として生成することができる。前述のように、そのモノマー型における4-HBの生合成は、BDO系統の化合物の化学合成に特に有用であるだけでなく、BDO系統の化合物の更なる生合成を可能にし、化学合成手順を完全に回避する。

30

【0077】

4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO及び/又はブトレシンを生成することができる本発明の非天然微生物体は、宿主微生物体が、本発明の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO及び/又はブトレシン生合成経路の少なくとも1つの完全な生化学合成のための機能的能力を含むことを確保することによって生成される。少なくとも1つの必須の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA又はBDO生合成経路を確保することで、4-HB生合成機能が宿主微生物体に付与される。

40

【0078】

いくつかの4-HB生合成経路を本明細書に例示し、図示の目的で図1に示す。追加の4-HB及びBDO経路を図8～13に記載する。1つの4-HB生合成経路は、コハク酸からの4-HBの生合成(コハク酸経路)を含む。この4-HB経路に関与する酵素は、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼを含む。この経路において、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼは、図1に示される矢印方向に対する逆反応を触媒する。別の4-HB生合成経路は、スクシニル-CoAを介するコハク酸からの生合成(スクシニル-CoA経路)を含む。この4-HB経路に関与する酵素は、スクシニル-CoAシンターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼを含む。3つの他の4-HB生合成経路は、 α -ケトグルタル酸

50

からの4-HBの生合成(α -ケトグルタル酸経路)を含む。従って、第3の4-HB生合成経路は、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ及び4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼを介するコハク酸セミアルデヒドの生合成である。第4の4-HB生合成経路は、 α -ケトグルタル酸からの4-HBの生合成をも含むが、 α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼを利用して、コハク酸セミアルデヒド合成を触媒する。4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼは、コハク酸セミアルデヒドの4-HBへの変換を触媒する。第5の4-HB生合成経路は、スクシニル-CoAを介する α -ケトグルタル酸からの生合成を含み、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼを利用して、上記のスクシニル-CoA経路に入り込むスクシニル-CoAを生成する。これらの4-HB生合成経路、それらの基質、反応物質及び生成物のそれぞれを以下の実施例に更に記載する。本明細書に記載されるように、4-HBを、適切な酵素の包含によりBDOに更に生合成変換し、BDOを生成することができる(実施例参照)。従って、4-HB経路を、4-HBをBDOに変換するための酵素と併用して、BDO経路を生成できることが理解される。

10

20

30

40

50

【0079】

1つ以上の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生合成経路に關与する1種以上の酵素をコードしている発現可能な核酸を導入することによって、本発明の非天然微生物体を作製することができる。生合成のために選択された宿主微生物体に於いて、特定の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生合成経路の一部又は全てに対する核酸を発現することができる。例えば、選択された宿主が所望の生合成経路、例えば、コハク酸から4-HBへの経路において1つ以上の酵素を欠乏する場合は、欠乏する酵素、例えば、この例ではCoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼの両方を発現可能な核酸が、後の外因性発現のために宿主に導入される。代替的に、選択された宿主がいくつかの経路酵素の外因性発現を示すが、他の酵素を欠乏する場合は、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生合成を達成するために欠乏する酵素のコード化核酸が必要になる。例えば、選択された宿主が内因性CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼを示すが、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼを欠乏する場合は、4-HB生合成を達成するためにこの酵素に関するコード化核酸が必要になる。従って、外因性酵素又はタンパク質活性を導入して所望の生合成経路を得ることによって、本発明の非天然微生物体を作製することができ、或いは1つ以上の外因性酵素又はタンパク質と一緒に、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO及び/又はブトレシンなどの所望の生成物を生成する1つ以上の外因性酵素又はタンパク質活性を導入することによって、所望の生合成経路を得ることができる。

【0080】

同様にして、4-HB生合成が、コハク酸からスクシニル-CoA経路を介して生じる(スクシニル-CoA経路)ように選択される場合は、酵素スクシニル-CoAシンターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び/又は4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼの宿主欠乏に関するコード化核酸が、レシピエント宿主において外因的に発現されるべきである。 α -ケトグルタル酸からコハク酸セミアルデヒド経路を介する4-HB生合成(α -ケトグルタル酸経路)の選択は、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ及び/又は4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、又は α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ及び4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼに関する酵素の1種以上の宿主欠乏に対する外因性発現を利用することができる。当業者は、本明細書に開示されるように、4-HB又はBDOの生成のための経路酵素を容易に決定することができる。

【0081】

選択された宿主微生物体の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生合成経路構成要素に於いて、本発明の非天然微生物体は、少なくとも1つの外因性に発現された4-HB、4-HB、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路のコード化核酸、及び1つ以上の4-HB又はBDO生合成経路に関する最大全てのコード化核酸を含むことになる。例えば、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生合成を、対応するコード化核酸の外因性発現を介して、経路酵

素又はタンパク質が欠乏した宿主に確立することができる。4-HB、4-HB、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路の全ての酵素又はタンパク質が欠乏した宿主において、該経路の全ての酵素又はタンパク質の外因性発現を含むことができるが、宿主が経路酵素又はタンパク質の少なくとも1つを含む場合でも経路の全ての酵素又はタンパク質を発現できることが理解される。望ましいならば、4-HB、4-HB、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生成の経路の全ての酵素又はタンパク質の外因性発現を含むことができる。例えば、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼコード化核酸の外因性発現を介して、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼが欠乏した宿主における5つ全ての経路から4-HB生合成を確立することができる。対照的に、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、 α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼの8つ全ての酵素の外因性発現を介して、全ての8つの酵素が欠乏した宿主において5つ全ての経路から4-HB生合成を確立することができる。

【0082】

本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、発現可能な形で導入すべきコード化核酸の数は、少なくとも、選択された宿主微生物体の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路欠乏に相応することを当業者は理解するであろう。従って、本発明の非天然微生物体は、1つ以上の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生合成経路を構成する、本明細書に開示される酵素をコードしている1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ又は最大全ての核酸を有することができる。いくつかの実施態様において、非天然微生物体は、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生合成を促進又は最適化する、或いは他の有用な機能を宿主微生物体に付与する他の遺伝子修飾を含むこともできる。そのような他の機能の1つは、例えば、コハク酸、スクシニル-CoA、 α -ケトグルタル酸、4-アミノ酪酸、グルタミン酸、アセトアセチル-CoA及び/又はホモセリンなどの4-HB経路前駆体の1種以上の合成の増強を含むことができる。

【0083】

一般に、宿主微生物体は、自然に生成された分子として、又は所望の前駆体の新たな生成、若しくは宿主微生物体によって自然に生成される前駆体の生成の増大をもたらす操作された生成物のいずれかとして、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路の前駆体を生成するように選択される。例えば、スクシニル-CoA、 α -ケトグルタル酸、4-アミノ酪酸、グルタミン酸、アセトアセチル-CoA及びホモセリンは、E. コリなどの宿主生物体において自然に生成される。宿主生物体を操作して、本明細書に開示される前駆体の生成を増強することができる。加えて、所望の前駆体を生成するために操作された微生物体を宿主生物体として使用し、更に操作して、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路の酵素又はタンパク質を発現させることができる。

【0084】

いくつかの実施態様において、本発明の非天然微生物体は、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシンを合成する酵素能を含む宿主から作製される。この特定の実施態様において、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路生成物の合成又は蓄積を増強して、例えば、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路反応を4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシンの生成に向けて誘導することが有用であり得る。合成又は蓄積の増強を、例えば、本明細書に開示される4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路酵素の1種以上をコードしている核酸の過剰発現によって達成することができる。1種以上の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路酵素の過剰発現は、例えば、1つ以上の内因性遺伝子の外因性発現を介して、或いは1つ以上の異種遺伝子の外因性発現を介して起こり得る。従って、天然生物体を、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生合成経路酵素をコードしている最大全ての核酸まで1つ、2つ、3つ、4つ、5つ及び6つ等の核酸の過剰発現を介して、本発明の非天然4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生成微生物体になるように容易に作製することができる。加えて、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO

10

20

30

40

50

又はブトレシン生合成経路において酵素の活性を増強させる外因性遺伝子の変異誘発によって非天然生物体を作製することができる。

【0085】

特に有用な実施態様において、コード化核酸の外因性発現が採用される。外因性発現は、発現要素及び/又は調節要素を宿主及び用途に合わせて調整して、使用者によって制御される所望の発現レベルを達成する能力を付与する。しかし、例えば、誘導性プロモーター又は他の調節要素と連結されたときに負の調節エフェクターを除外するか、又は遺伝子のプロモーターを誘導することによって、内因性発現を他の実施態様に利用することもできる。従って、天然の誘導性プロモーターを有する内因性遺伝子を、適切な誘導剤を供給することによって上方制御することができ、又は内因性遺伝子の調節領域を操作して、誘導性調節要素を取り込むことによって、所望の時間における内因性遺伝子の増強された発現の調節を可能にする。同様に、誘導性プロモーターを、非天然微生物体に導入された外因性遺伝子に対する調節要素として含めることができる(実施例参照)。

【0086】

「外因性」とは、本明細書に使用されるように、被参照分子又は被参照活性が宿主微生物体に導入されることを指すことを意図する。分子を、例えば、コード化核酸の宿主遺伝物質への導入、例えば宿主染色体への組み込みによって、又はプラスミドなどの非染色体遺伝物質として導入することができる。従って、該用語は、コード化核酸の発現に関して使用されるときは、コード化核酸の発現可能な形での微生物体への導入を指す。該用語は、生合成活性に関して使用されるときは、宿主参照生物体に導入される活性を指す。その供給源は、例えば、宿主微生物体への導入後に被参照活性を発現する同種又は異種コード化核酸であり得る。従って、「内因性」という用語は、宿主に存在する被参照分子又は活性を指す。同様に、該用語は、コード化核酸の発現に関して使用されるときは、微生物体内に含まれるコード化核酸の発現を指す。「異種」という用語は、被参照種以外の供給源に由来する分子又は活性を指すのに対して、「同種」は、その宿主微生物体に由来する分子又は活性を指す。よって、本発明のコード化核酸の外因性発現は、異種又は同種コード化核酸のいずれか、又は両方を利用することができる。

【0087】

1つよりも多い外因性核酸が微生物体に含まれる場合、前述のように1つよりも多い外因性核酸は、被参照コード化核酸又は生合成活性を指すことが理解される。本明細書に開示されたように、そのような1つよりも多い外因性核酸は、個別の核酸分子で、ポリシストロン性核酸分子で、又はそれらの組み合わせで宿主微生物体へ導入されることができ、依然1つよりも多い外因性核酸と考えられることが更に理解される。例えば、本明細書に開示されたように、微生物体は、所望の経路酵素又はタンパク質をコードしている2つ以上の外因性核酸を発現するように操作されることができ、所望の活性をコードしている2つの外因性核酸が宿主微生物体に導入されている場合、これら2つの外因性核酸は、例えば単独のプラスミドに、個別のプラスミドに単独の核酸として導入され、宿主染色体に単位置又は多位置で組み込まれ、且つ依然2つの外因性核酸と考えられることができることが理解される。同様に、2つよりも多い外因性核酸を、所望の組み合わせで、例えば単独のプラスミドに、個別のプラスミドにおいて、宿主生物体へ導入され、宿主染色体に単位置又は多位置で組み込まれ、且つ依然2つ以上の外因性核酸、例えば3つの外因性核酸と考えられることができることが理解される。従って、被参照外因性核酸又は生合成活性の数とは、宿主生物体へ導入される個別の核酸の数ではなく、コード化核酸の数又は生合成活性の数を指す。

【0088】

4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路酵素のためのコード化核酸の供給源としては、例えば、被コード化遺伝子産物が、被参照反応を触媒することが可能であるあらゆる種を挙げることができる。当該種は、古細菌及び真正細菌を含む細菌、並びに酵母、植物、昆虫、動物、及びヒトを含む哺乳類を含む真核生物を含むが、それらに限定されない原核生物体及び真核生物体の両方を含む。当該供給源の例示的な種としては、例えば、

エシェリキア・コリ(*Escherichia coli*)、サッカロミセス・セレビスシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・クルイベリ(*Saccharomyces kluyveri*)、クロストリジウム・クルイベリ(*Clostridium kluyveri*)、クロストリジウム・アセトブチリウム(*Clostridium acetobutylicum*)、クロストリジウム・ベイジェリンキー(*Clostridium beijerinckii*)、クロストリジウム・サッカロペルブチルアセトニウム(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*)、クロストリジウム・パーフリンゲンス(*Clostridium perfringens*)、クロストリジウム・ジフィシレ(*Clostridium difficile*)、クロストリジウム・ボツリヌム(*Clostridium botulinum*)、クロストリジウム・チロブチリウム(*Clostridium tyrobutyricum*)、クロストリジウム・テタノモルフム(*Clostridium tetanomorphum*)、クロストリジウム・テタニ(*Clostridium tetani*)、クロストリジウム・プロピオニウム(*Clostridium propionicum*)、クロストリジウム・アミノブチリウム(*Clostridium aminobutyricum*)、クロストリジウム・スブテルミナレ(*Clostridium subterminale*)、クロストリジウム・スティックランジ(*Clostridium sticklandii*)、ラルストニア・ユートロファ(*Ralstonia eutropha*)、マイコバクテリウム・ボビス(*Mycobacterium bovis*)、マイコバクテリウム・ツベルクローシス(*Mycobacterium tuberculosis*)、ポルフィロモナス・ギンギバリス(*Porphyromonas gingivalis*)、アラビドプシス・サリアナ(*Arabidopsis thaliana*)、サーマス・サーモフィルス(*Thermus thermophilus*)、シュードモナス・アエルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・ストutzeri(*Pseudomonas stutzeri*)、シュードモナス・フルオレセンス(*Pseudomonas fluorescens*)を含むシュードモナス(*Pseudomonas*)種、ホモサピエンス(*Homo sapiens*)、オリクトラグス・クニクルス(*Oryctolagus cuniculus*)、ロドバクター・スパエロイデス(*Rhodobacter spaeiroides*)、サーモアナエロバクター・ブロッキー(*Thermoanaerobacter brockii*)、メタロスファエラ・セデュラ(*Metallosphaera sedula*)、ロイコノストク・メセンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides*)、クロロフレクスウス・アウランチアクス(*Chloroflexus aurantiacus*)、ロセイフレクスウス・カステンホルジー(*Roseiflexus castenholzii*)、エリスロバクター(*Erythrobacter*)、シモンドシア・キネンシス(*Simmondsia chinensis*)、アシネトバクター・カルコアセチカス(*Acinetobacter calcoaceticus*)及びアシネトバクター・バイリイ(*Acinetobacter baylyi*)を含むアシネトバクター(*Acinetobacter*)種、ポルフィロモナス・ギンギバリス(*Porphyromonas gingivalis*)、スルホロブス・トコダイ(*Sulfolobus tokodaii*)、スルホロブス・ソルファタリクス(*Sulfolobus solfataricus*)、スルホロブス・アシドカルダリウス(*Sulfolobus acidocaldarius*)、バシルス・スブチリス(*Bacillus subtilis*)、バシルス・セレウス(*Bacillus cereus*)、バシルス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*)、バシルス・ブレビス(*Bacillus brevis*)、バシルス・プミルス(*Bacillus pumilus*)、ラツス・ノルベギクス(*Rattus norvegicus*)、クレブシエラ・ニューモニエ(*Klebsiella pneumonia*)、クレブシエラ・オキシトカ(*Klebsiella oxytoca*)、ユーグレナ・グラシリス(*Euglena gracilis*)、トレボネマ・デンチコラ(*Treponema denticola*)、ムーレラ・サーモアセチカ(*Moorella thermoacetica*)、サーモトガ・マリティマ(*Thermotoga maritima*)、ハロバクテリウム・サリナルム(*Halobacterium salinarum*)、ゲオバシルス・ステアロサーモフィルス(*Geobacillus stearothermophilus*)、アエロピルム・ペルニクス(*Aeropyrum pernix*)、サス・スクロファ(*Sus scrofa*)、カエノルハブジチス・エレカニス(*Caenorhabditis elegans*)、コリネバクテリウム・グルタミウム(*Corynebacterium glutamicum*)、アシドアミノコッカス・フェルメンタンス(*Acidaminococcus fermentans*)、ラクトコッカス・ラクチス(*Lactococcus lactis*)、ラクトバシルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*)、ストレプトコッカス・サーモフィルス(*Streptococcus thermophilus*)、エンテロバクター・アエロゲネス(*Enterobacter aerogenes*)、カンジダ(*Candida*)、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、ペジコッカス・ペントサセウス(*Pediacoccus pentosaceus*)、ザイモモナス・モビルス(*Zymomonas mobilis*)、アセトバクター・パステウリアンス(*Acetobacter pasteurians*)、クルイベロマイセス・ラクチス(*Kluyveromyces lactis*)、ユーバクテリウム・バルケリ(*Eubacterium barkeri*)、バクテロイデス・カピロサス(*Bacteroides capillosus*)、アナエロツルンカス・コリホミニス(*Anaerotruncus*

colihominis)、ナトラナエロビウス・サーモフィルスム(Natranaerobius thermophilum)、カンピロバクター・ジェジュニ(Campylobacter jejuni)、ヘモフィルス・インフルエンザ(Haemophilus influenzae)、セラチア・マルセセンス(Serratia marcescens)、シトロバクター・アマロナチクス(Citrobacter amalonaticus)、ミクソコッカス・キサントス(Myxococcus xanthus)、フソバクテリウム・ヌレアツム(Fusobacterium nucleatum)、ペニシリウム・クリソゲナム(Penicillium chrysogenum)、海洋性ガンマプロテオバクテリア、酪酸産生菌、ノカルジア・イオウエンシス(Nocardia iowensis)、ノカルジア・ファルシニカ(Nocardia farcinica)、ストレプトマイセス・グリセウス(Streptomyces griseus)、シゾサッカロミセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)、ゲオバシルス・サーモゲルコシダシウス(Geobacillus thermoglucosidasius)、サルモネラ・ティフィムリウム(Salmonella typhimurium)、ビブリオ・コレラ(Vibrio cholera)、ヘリコバクター・ピロリ(Heliobacter pylori)、ニコチアナ・タバカム(Nicotiana tabacum)、オリザ・サティバ(Oryza sativa)、ハロフェラックス・メディテラネイ(Haloferax mediterranei)、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)、アクロモバクター・デニトリフィカンス(Achromobacter denitrificans)、フソバクテリウム・ヌクレアタム(Fusobacterium nucleatum)、ストレプトマイセス・クラブリゲヌス(Streptomyces clavuligenus)、アシネトバクター・パウマニ(Acinetobacter baumannii)、ムス・ムスキュラス(Mus musculus)、ラカンセア・クルイベリ(Lachancea kluyveri)、トリコモナス・バギナリス(Trichomonas vaginalis)、トリパノソーマ・ブルセイ(Trypanosoma brucei)、シュードモナス・ストutzeri(Pseudomonas stutzeri)、ブラディリゾビウム・ジャポニカム(Bradyrhizobium japonicum)、メソリゾビウム・ロティ(Mesorhizobium loti)、ボス・タウラス(Bos taurus)、ニコチアナ・グルチノサ(Nicotiana glutinosa)、ビブリオ・バルニフィカス(Vibrio vulnificus)、セレノモナス・ルミナンチウム(Selenomonas ruminantium)、ビブリオ・パラヘモリチカス(Vibrio parahaemolyticus)、アルカエオグロブス・フルギダス(Archaeoglobus fulgidus)、ハロアーキュラ・マリスモルツイ(Haloarcula marismortui)、ピロバキュラム・アエロフィラム(Pyrobaculum aerophilum)、マイコバクテリウム・スメグマチス(Mycobacterium smegmatis)MC2 155、マイコバクテリウム・アビウム(Mycobacterium avium)亜種パラツベルクローシスK-10、マイコバクテリウム・マリヌム(Mycobacterium marinum)M、ツカムレラ・ポーロメタボラ(Tsukamurella paurometabola)DSM 20162、シアノビウム(Cyanobium)PCC7001、ディクチオステリウム・ディスコデウム(Dictyostelium discoideum)AX4、及び本明細書に開示されている他のバクテリア(実施例参照)を含む。例えば、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生合成を有する微生物体を、E. コリ及び酵母宿主に関して本明細書に例示する。しかし、今では、395種の微生物ゲノム並びに様々な酵母、真菌、植物及び哺乳類ゲノムを含む550を超える種について完全ゲノム配列が利用可能である(これらの半数超がNCBIなどの公的なデータベースで利用可能である)ため、例えば、既知の遺伝子のホモログ、オルソログ、パラログ及び非オルソログ遺伝子置換、並びに生物体間の遺伝子改変の交換を含む、関連種又は遠縁種における1つ以上の遺伝子に関する必須の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生合成活性をコードしている遺伝子の同定は、当該技術分野において慣例であり且つ周知である。よって、E. コリ又は酵母などの特定の生物体に関して本明細書に記載されている本発明の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン、及び他の化合物の生合成を可能にする代謝の変調を、原核生物体及び真核生物体を含む他の微生物に容易に適用することができる。本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、1つの生物において例示される代謝の変調を他の生物にも等しく適用できることを把握するであろう。

【0089】

代替的4-HB、4-HBaI、BDO又はブトレシン生合成経路が非関連種に存在する場合など、場合によっては、例えば、被参照反応に取って代わる類似するが同一でない代謝反応を触媒する非関連種からの1つ以上のパラログの外因性発現によって、4-HB、4-HBaI、BDO又はブトレシン生合成を宿主種に付与することができる。異なる生物体の間の代謝ネットワーク間に一定の差異が存在するため、当業者は、異なる生物体の間の実際の遺伝子使用が異

10

20

30

40

50

なり得ることを理解するであろう。しかし、本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、モノマー-4-HB、4-HBAI、BDO又はブトレシンなどの4-HBを合成する関心対象の種において微生物体を構築するために、本明細書に例示するものに対する同族の代謝の変調を使用して、本発明の教示及び方法を全ての微生物体に適用できることも理解するであろう。

【0090】

例えば、細菌、酵母、真菌、又は発酵プロセスに適用可能な様々な他の微生物のいずれかから、宿主微生物体を選択し、且つそれらにおいて非天然微生物体を作製することができる。例示的な細菌としては、エシェリキア・コリ、クレブシエラ・オキシトカ(*Klebsiella oxytoca*)、アナエロビオスピリウム・スクシニシプロデュセンス(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)、アクチノバシルス・スクシノゲネス(*Actinobacillus succinogenes*)、マンハイミア・スクシニシプロデュセンス(*Mannheimia succiniciproducens*)、リゾビウム・エトリ(*Rhizobium etli*)、バシルス・スプチリス、コリネバクテリウム・グルタミカム、グルコノバクター・オキシダンス(*Gluconobacter oxydans*)、ザイモモナス・モビリス(*Zymomonas mobilis*)、ラクトコッカス・ラクチス、ラクトバシルス・プランタルム、ストレプトマイセス・コエリコロル(*Streptomyces coelicolor*)、クロストリジウム・アセトブチリウム、シュードモナス・フルオレセンス、及びシュードモナス・ブチダから選択される種が挙げられる。例示的な酵母又は真菌としては、サッカロミセス・セレビシアエ、シゾサッカロミセス・ボンベ、クルイペロマイセス・ラクチス、クルイペロマイセス・マルキシアニス(*Kluyveromyces marxianus*)、アスペルギルス・テレウス、アス 20
ペルギルス・ニゲル(*Aspergillus niger*)及びピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)、リゾプス・アリズス(*Rhizopus arrhizus*)、リゾプス・オリザエ(*Rhizobus oryzae*)などから選択される種が挙げられる。E. コリは、遺伝子工学に好適な十分に特徴づけられた微生物体であるため、特に有用な宿主生物体である。他の特に有用な宿主生物体としては、サッカロミセス・セレビシアエなどの酵母が挙げられる。任意の好適な微生物宿主生物体を、代謝改変及び/又は遺伝子改変を導入し、所望の生成物を生成するために使用することができることは理解される。

【0091】

非天然4-HB-、4-HBAI-、4-HBCoA-、BDO-、又はブトレシン-生成宿主を構築し且つ発現レベルを試験するための方法を、例えば、当該技術分野で周知の組換え及び検出方法によって実施することができる。当該方法を、例えば、Sambrookらの文献、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第3版、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク(2001)；Ausubelらの文献、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley and Sons、ボルチモア、MD(1999)に見いだすことができる。例えば、4-HB及びGBLを、Spherisorb 5 ODS1カラム並びに70%の10mMリン酸緩衝液(pH=7)及び30%のメタノールの移動相を使用するHPLCによって分離し、215nmでUV検出器を使用して検出することができる(Hennesseyらの文献、J. Forensic Sci. 46(6):1-9 (2004))。BDOは、ガスクロマトグラフィーによって、又はAminex HPX-87Hカラム及び0.5mM硫酸の移動相を使用するHPLC及び屈折率検出器によって検出される(Gonzalez-Pajueloらの文献、Met. Eng. 7:329-336 (2005))。 30

【0092】

4-HB、4-HBAI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生成のための経路に関係する外因性核酸配列を、接合、電気穿孔、化学的形質転換、形質導入、形質移入及び超音波形質転換を含むが、それらに限定されない当該技術分野で周知の技術を用い、安定的又は一過的に宿主細胞に導入することができる。E. コリ又は他の原核細胞における外因性発現では、真核性核酸の遺伝子又はcDNAにおけるいくつかの核酸配列は、望まれる場合は原核宿主細胞への形質転換前に除去することができるN末端ミトコンドリア又は他の標的化シグナルなどの標的化シグナルをコードすることができる。例えば、ミトコンドリアリーダー配列を除去すると、E. コリにおける発現が増強される(Hoffmeisterらの文献、J. Biol. Chem. 280:4329-4338(2005))。酵母又は他の真核細胞における外因性発現では、遺伝子を、リーダー配列を加えることなく細胞質ゾルに発現することができ、又はミトコンドリア若しくは他の 40 50

細胞小器官を標的化することができ、或いは宿主細胞に好適なミトコンドリア標的化シグナル若しくは分泌シグナルなどの好適な標的化配列を加えることによって分泌を標的化することができる。従って、標的化配列を除去又は包含するための核酸配列に対する適切な修飾を外因性核酸配列に取り込んで、所望の特性を付与することができることが理解される。更に、当該技術分野で周知の技術を用いて遺伝子をコドン最適化して、タンパク質の最適化発現を達成することができる。

【0093】

宿主生物体において機能的な発現制御配列に機能的に結合された、本明細書に例示される1つ以上の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシン生合成経路及び/又は1つ以上の生合成コード化核酸を保持するように1つ以上の発現ベクターを構築することができる。本発明の微生物宿主生物体における使用に適用可能な発現ベクターは、例えば、宿主染色体への安定な組込みのために機能するベクター及び選択配列又は選択マーカを含むプラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター、エピソーム及び人工染色体を含む。加えて、発現ベクターは、1つ以上の選択マーカ遺伝子及び適切な発現制御配列を含むことができる。例えば、抗生物質又は毒素に対する耐性を提供し、栄養要求性欠乏を補完し、又は培養培地に存在しない重要栄養物を供給する選択マーカ遺伝子を含むこともできる。発現制御配列は、当該技術分野で周知である構成性及び誘導性プロモーター、転写エンハンサー及び転写ターミネーターなどを含むことができる。2つ以上の外因性コード化核酸が同時発現される場合は、両核酸を例えば単独の発現ベクター又は個別の発現ベクターに挿入することができる。単独ベクター発現では、コード化核酸を1つの共通の発現制御配列に機能的に結合させるか、又は1つの誘導性プロモーター及び1つの構成性プロモーターなどの異なる発現制御配列に連結させることができる。代謝経路又は合成経路に係る外因性核酸配列の形質転換を、当該技術分野で周知の方法を使用して確認することができる。当該方法は、例えば、mRNAのノーザンブロット又はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅などの核酸分析、或いは遺伝子産物の発現に関する免疫ブロッティング、或いは導入された核酸配列又はその対応する遺伝子産物の発現を試験するための他の好適な分析法を含む。当業者に、外因性核酸が、所望の生成物を生成するのに十分な量で発現されることが理解され、且つ当該技術分野で周知の方法及び本明細書に開示される方法を使用して、発現レベルを最適化して十分な発現を得ることができることが更に理解される。

【0094】

本発明の非天然微生物体は、モノマー4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシンなどの4-HBを生成するのに十分な量の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの核酸を外因的に発現するために、本明細書に例示される、当該技術分野で周知の方法を使用して構築される。本発明の微生物体は、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシンを生成するのに十分な条件下で培養されることが理解される。各経路における4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシン酵素についての例示的な発現のレベルを以下の実施例に更に記載する。本明細書に示される教示及び指針に従って、本発明の非天然微生物体は、モノマー4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシンなどの4-HBの生合成を達成して、約0.1~200mM以上、例えば0.1~25mM以上の細胞内濃度を得ることができる。一般に、モノマー4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシンなどの4-HBの細胞内濃度は、約3~150mM以上、特定すると約5~125mM以上、より特定すると約8~100mM以上、例えば約3~20mM、特定すると約5~15mM以上、より特定すると約8~12mMであり、約10mM、20mM、50mM、80mM以上を含む。これらの例示的な各範囲の間及びそれを超える細胞内濃度を、本発明の非天然微生物体から達成することができる。特定の実施態様において、本発明の微生物体、特に本明細書に開示されているものなどの菌株(例えば、実施例XII~XIX及び表28参照)は、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシンの生成を増大させ、且つ/又は望ましくない副産物を減少させることによって、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシンなどの所望の生成物の生成の向上をもたらすことができる。当該生成レベルとしては、本明細書に開示されている量、及び約1グラムから約25グラム毎リットル、例えば、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19

10

20

30

40

50

、20、21、22、23、24グラム毎リットル又は更にそれを超える生成物量を含む量が挙げられるが、それらに限定されない。

【0095】

本明細書に開示された培養条件及び発酵条件に加え、BDO、4-HB、4-HBCoA、4-HBaI及び/又はブトレシンの生合成を達成する成長条件は、該培養条件への浸透圧保護剤の添加を含むことができる。いくつかの実施態様において、本発明の非天然微生物体は、浸透圧保護剤の存在下で、本明細書に説明されているように維持、培養又は発酵され得る。簡単に述べると、浸透圧保護剤は、オスモライトとして作用し、且つ本明細書に説明されている微生物体が浸透圧ストレスを耐え抜くよう補助する化合物を指す。浸透圧保護剤は、ベタイン、アミノ酸、及び糖トレハロースを含むが、これらに限定されるものではない。そのようなものの非限定的例は、グリシンベタイン、ブラリーヌベタイン、ジメチルテチン、ジメチルスルホニオプロプリオネート、3-ジメチルスルホニオ-2-メチルプロプリオネート、ピペコリン酸、ジメチルスルホニオアセテート、コリン、L-カルニチン及びエクトインが挙げられる。一態様において、浸透圧保護剤はグリシンベタインである。当業者には、本明細書に説明されている微生物体の浸透圧ストレスからの保護に適した浸透圧保護剤の量及び種類は、使用される微生物体によって決まることが理解される。培養条件における浸透圧保護剤の量は、例えば、わずかに約0.1mM、わずかに約0.5mM、わずかに約1.0mM、わずかに約1.5mM、わずかに約2.0mM、わずかに約2.5mM、わずかに約3.0mM、わずかに約5.0mM、わずかに約7.0mM、わずかに約10mM、わずかに約50mM、わずかに約100mM又はわずかに約500mMであることができる。

10

20

【0096】

いくつかの実施態様において、培養条件としては、嫌気性又は実質的に嫌気性の成長条件又は維持条件を含む。例示的な嫌気性条件は、既に記載されており、当該技術分野で周知である。発酵プロセスの例示的な嫌気性条件は、本明細書に記載されており、例えば、2007年8月10日に出版された米国特許公報第2009/0047719号に記載されている。これらの条件のいずれかを、非天然微生物体並びに当該技術分野で周知の他の嫌気性条件とともに採用することができる。当該嫌気性又は実質的に嫌気性条件下において、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生産体は、5~10mM以上の細胞内濃度、並びに本明細書に例示される全ての他の濃度で4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシンを合成することができる。上記記載は細胞内濃度を指すが、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生成微生物体は、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシンを細胞内で生成し、且つ/又は該生成物を培養培地に分泌することができることが理解される。

30

【0097】

培養条件は、例えば、液体培養手順、並びに発酵及び他の大規模培養手順を含むことができる。本明細書に記載されるように、本発明の生合成生成物の特に有用な収率を、嫌気性又は実質的に嫌気性培養条件下で得ることができる。

【0098】

本明細書に記載されるように、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシンの生合成を達成するための1つの例示的な成長条件は、嫌気性培養又は発酵条件を含む。特定の実施態様において、本発明の非天然微生物体を、嫌気性又は実質的に嫌気性条件下で維持、培養又は発酵することができる。簡単に述べると、嫌気性条件は、酸素が欠乏した環境を指す。実質的に嫌気性条件は、例えば、培地における溶存酸素濃度が飽和の0~10%に維持される培養、バッチ式発酵又は連続発酵を含む。実質的に嫌気性条件は、1%未満の酸素の雰囲気中で維持された密閉チャンバーの内部の液体培地中又は固体寒天中での成長又は休止細胞をも含む。例えば、培養物にN₂/CO₂混合物又は他の好適な1つ以上の無酸素ガスを散布することによって、この酸素の百分率を維持することができる。

40

【0099】

本発明は、また、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシ酪酸:CoAトランスフェラーゼ、グルタミン酸:

50

コハク酸セミアルデヒドトランスアミラーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、CoA非依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)及び1,4-ブタンジオール(BDO)生合成経路を有する微生物体を含む非天然微生物生触媒であって、該外因性核酸が、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現される非天然微生物生触媒を提供する。4-ヒドロキシ酪酸:CoAトランスフェラーゼは、4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとしても知られる。追加の4-HB又はBDO経路酵素も本明細書に開示される(実施例及び図8~13参照)。

【0100】

本発明は、4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)及び1,4-ブタンジオール(BDO)生合成経路を有する微生物体を含む非天然微生物生触媒であって、該経路が、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシ酪酸:CoAトランスフェラーゼ、4-酪酸キナーゼ、ホスホトランスブチリラーゼ、 α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ又はアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼを含み、該外因性核酸が、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現される非天然微生物生触媒を提供する。

【0101】

BDOを生合成する非天然微生物体を作製することもできる。本発明の4-HB生成微生物体のように、BDO生成微生物体は、BDOを細胞内生成するか、又は培養培地中に分泌することができる。4-HBを合成する微生物体の構築について既に示されている教示及び指針に従い、追加のBDO経路を4-HB生成微生物体に取り込んで、BDO及び他のBDO系統の化合物を合成する生物体を作製することができる。BDO及びその下流生成物の化学合成は既知である。BDO生合成が可能な本発明の非天然微生物体は、図1に例示される入口点として4-HBを使用して、これらの化学合成を回避する。以下に更に記載するように、4-HB生産体を使用して、例えば、4-HBをGBLに、次いでBDO又はTHFに化学的に変換することができる。代替的に、4-HB生産体を、4-HB及び/又はGBLのBDOへの変換のための生合成能を含むように更に修飾することができる。

【0102】

4-HB生産体に導入する追加のBDO経路は、例えば、宿主欠損背景における外因性発現、或いは工程9~13として図1に例示される酵素の1種以上の過剰発現を含む。1つの当該経路は、例えば、アルデヒドデヒドロゲナーゼとアルコールデヒドロゲナーゼが、個別の酵素であるか、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼとアルコールデヒドロゲナーゼ活性の両方を有する多機能性酵素であり得る、図1に工程9、12及び13として示される反応を実行するのに必要である酵素活性を含む。別の当該経路は、例えば、ここでもアルデヒドデヒドロゲナーゼとアルコールデヒドロゲナーゼが、個別の酵素であるか、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼとアルコールデヒドロゲナーゼ活性の両方を有する多機能性酵素であり得る、図1に工程10、11、12及び13として示される反応を実行するのに必要である酵素活性を含む。よって、4-HB生産体に導入する追加のBDO経路は、例えば、宿主欠損背景における外因性発現、又は4-ヒドロキシ酪酸:CoAトランスフェラーゼ、酪酸キナーゼ、ホスホトランスブチリラーゼ、CoA非依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼの1つ以上の過剰発現を含む。4-HBを修飾することが可能な内因性アシルCoAシンテターゼの不在下で、非天然BDO生成微生物体は、4-HBに対して選択的な外因性アシル-CoAシンテターゼ、又は4-HBの4-HB-CoAへの正味反応変換を有する複数の酵素の組合せを更に含むことができる。以下の実施例に更に例示されるように、酪酸キナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼは、BDO経路活性を示し、4-HB基質を用いて図1に図示される変換を触媒する。従って、これらの酵素は、本明細書では、それぞれ4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ及びホスホトランスヒドロキシブチリラーゼと称することもできる。

【0103】

4-HBからBDOへのこれらのインピボ変換に使用できる例示的なアルコールデヒドロゲナーゼ及びアルデヒドデヒドロゲナーゼを以下の表1に示す。

表1. 4-HBからBDOへの変換のためのアルコールデヒドロゲナーゼ及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ

【表 1】

アルコールデヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.1	アルコールデヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.81	ヒドロキシビルビン酸レダクターゼ	
ec:1.1.1.2	アルコールデヒドロゲナーゼ(NADP+)	60	ec:1.1.1.82	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(NADP+)	
ec:1.1.1.4	(R,R)-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.83	D-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.5	アセトインデヒドロゲナーゼ		(脱炭酸)		
ec:1.1.1.6	グリセロールデヒドロゲナーゼ	65	ec:1.1.1.84	ジメチルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.7	プロパンジオールリン酸		ec:1.1.1.85	3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ	
デヒドロゲナーゼ			ec:1.1.1.86	ケトール酸レダクトイソメラーゼ	
ec:1.1.1.8	グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.87	ホモイソクエン酸デヒドロゲナーゼ	
(NAD+)			ec:1.1.1.88	ヒドロキシメチルグルタリル-CoA	10
ec:1.1.1.11	D-アラビニトール4-デヒドロゲナーゼ		レダクターゼ		
ec:1.1.1.12	L-アラビニトール4-デヒドロゲナーゼ	70	ec:1.1.1.90	アリール-アルコールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.13	L-アラビニトール2-デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.91	アリール-アルコールデヒドロゲナーゼ(NADP+)	
ec:1.1.1.14	L-イジトール2-デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.92	オキサログリコール酸レダクターゼ	
ec:1.1.1.15	D-イジトール2-デヒドロゲナーゼ		(脱炭酸)		
ec:1.1.1.16	ガラクトクトール2-デヒドロゲナーゼ	75	ec:1.1.1.94	グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.17	マンニトール-1-リン酸5-		[NAD(P)+]		
デヒドロゲナーゼ			ec:1.1.1.95	ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.18	イノシトール2-デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.97	3-ヒドロキシベンジル-アルコール	
ec:1.1.1.21	アルデヒドレダクターゼ		デヒドロゲナーゼ		
ec:1.1.1.23	ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ	80	ec:1.1.1.101	アシルグリセロ-リン酸レダクターゼ	
ec:1.1.1.26	グリオキシル酸レダクターゼ		ec:1.1.1.103	L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.27	L-乳酸デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.104	4-オキソプロリンレダクターゼ	
ec:1.1.1.28	D-乳酸デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.105	レチノールデヒドロゲナーゼ	20
ec:1.1.1.29	グリセリン酸デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.110	インドール乳酸デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.30	3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ	85	ec:1.1.1.112	インダノールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.31	3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.113	L-キシロース1-デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.35	3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.129	L-トレオニン酸3-デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.36	アセトアセチル-CoAレダクターゼ		ec:1.1.1.137	リビトール-5-リン酸2-デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.37	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.138	マンニトール2-デヒドロゲナーゼ (NADP+)	
ec:1.1.1.38	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	90	ec:1.1.1.140	ソルビトール-6-リン酸2-デヒドロゲナーゼ	
(オキサロ酢酸-脱炭酸)			ec:1.1.1.142	D-ピニトールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.39	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.143	セクオイトールデヒドロゲナーゼ	
(脱炭酸)			ec:1.1.1.144	ペリリル-アルコールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.40	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.156	グリセロール2-デヒドロゲナーゼ(NADP+)	
(オキサロ酢酸-脱炭酸)(NADP+)		95	ec:1.1.1.157	3-ヒドロキシブチリル-CoA	
ec:1.1.1.41	イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(NAD+)		デヒドロゲナーゼ		30
ec:1.1.1.42	イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(NADP+)		ec:1.1.1.163	シクロペンタノールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.54	アリール-アルコールデヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.164	ヘキサデカノールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.55	ラクタルデヒドレダクターゼ(NADPH)	100	ec:1.1.1.165	2-アルキン-1-オールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.56	リビトール2-デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.166	ヒドロキシシクロヘキサノールカルボン酸	
ec:1.1.1.59	3-ヒドロキシプロピオン酸デヒドロゲナーゼ		デヒドロゲナーゼ		
ec:1.1.1.60	2-ヒドロキシ-3-オキソプロピオン酸レダクターゼ		ec:1.1.1.167	ヒドロキシマロン酸デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.61	4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.174	シクロヘキサン-1,2-ジオールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.66	ω-ヒドロキシデカン酸	105	ec:1.1.1.177	グリセロール-3-リン酸1-	
デヒドロゲナーゼ			デヒドロゲナーゼ(NADP+)		
ec:1.1.1.67	マンニトール2-デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.178	3-ヒドロキシ-2-メチルブチリル-CoA	
ec:1.1.1.71	アルコールデヒドロゲナーゼ[NAD(P)+]		デヒドロゲナーゼ		
ec:1.1.1.72	グリセロールデヒドロゲナーゼ(NADP+)		ec:1.1.1.185	L-グリコールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.73	オクタノールデヒドロゲナーゼ	110	ec:1.1.1.190	インドール-3-アセトアルデヒド	
ec:1.1.1.75	(R)-アミノプロパノールデヒドロゲナーゼ		レダクターゼ(NADH)		40
ec:1.1.1.76	(S,S)-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.191	インドール-3-アセトアルデヒド	
ec:1.1.1.77	ラクタルデヒドレダクターゼ		レダクターゼ(NADPH)		
ec:1.1.1.78	メチルグリオキサールレダクターゼ		ec:1.1.1.192	長鎖-アルコールデヒドロゲナーゼ	
(NADH-依存性)			ec:1.1.1.194	コニフェリル-アルコールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.79	グリオキシル酸レダクターゼ(NADP+)	115	ec:1.1.1.195	シンナミル-アルコールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.80	イソプロパノールデヒドロゲナーゼ(NADP+)		ec:1.1.1.198	(+)-ボルネオールデヒドロゲナーゼ	
			ec:1.1.1.202	1,3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ	
			ec:1.1.1.207	(-)-メントールデヒドロゲナーゼ	

ec:1.1.1.208	(+)-ネオメントールデヒドロゲナーゼ		ec:1.2.1.20	グルタル酸セミアルデヒド	
ec:1.1.1.216	ファルネソールデヒドロゲナーゼ		デヒドロゲナーゼ		
ec:1.1.1.217	ベンジル-2-メチル-ヒドロキシ酪酸		ec:1.2.1.21	グリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼ	
デヒドロゲナーゼ			ec:1.2.1.22	ラクツアルデヒドデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.222	(R)-4-ヒドロキシフェニル乳酸	65	ec:1.2.1.23	2-オキソアルデヒドデヒドロゲナーゼ	
デヒドロゲナーゼ			(NAD+)		
ec:1.1.1.223	イソペリテノールデヒドロゲナーゼ		ec:1.2.1.24	コハク酸セミアルデヒド	
ec:1.1.1.226	4-ヒドロキシシクロヘキサノカルボン酸		デヒドロゲナーゼ		
デヒドロゲナーゼ			ec:1.2.1.25	2-オキソイソ吉草酸デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.229	ジエチル2-メチル-3-オキソコハク酸	70	(アシル化)		
レダクターゼ			ec:1.2.1.26	2,5-ジオキソ吉草酸デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.237	ヒドロキシフェニルビルビン酸レダクターゼ		ec:1.2.1.27	メチルマロン酸セミアルデヒド	10
ec:1.1.1.244	メタノールデヒドロゲナーゼ		デヒドロゲナーゼ(アシル化)		
ec:1.1.1.245	シクロヘキサノールデヒドロゲナーゼ		ec:1.2.1.28	ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.250	D-アラビニトール2-デヒドロゲナーゼ		(NAD+)		
ec:1.1.1.251	ガラクトクトール1-リン酸5-		ec:1.2.1.29	アリール-アルデヒドデヒドロゲナーゼ	
デヒドロゲナーゼ			ec:1.2.1.30	アリール-アルデヒドデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.255	マンニトールデヒドロゲナーゼ		(NADP+)		
ec:1.1.1.256	フルオレン-9-オールデヒドロゲナーゼ		ec:1.2.1.31	L-アミノアジピン酸-セミアルデヒド	
ec:1.1.1.257	4-(ヒドロキシメチル)ベンゼンスルホン酸		デヒドロゲナーゼ		
デヒドロゲナーゼ			ec:1.2.1.32	アミノムコン酸セミアルデヒド	
ec:1.1.1.258	6-ヒドロキシヘキサノ酸デヒドロゲナーゼ		デヒドロゲナーゼ		
ec:1.1.1.259	3-ヒドロキシピメロイル-CoA		ec:1.2.1.36	レチナルデヒドロゲナーゼ	
デヒドロゲナーゼ			ec:1.2.1.39	フェニルアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.261	グリセロール-1-リン酸	85	ec:1.2.1.41	グルタミン酸-5-セミアルデヒド	20
デヒドロゲナーゼ[NAD(P)+]			デヒドロゲナーゼ		
ec:1.1.1.265	3-メチルブタナールレダクターゼ		ec:1.2.1.42	ヘキサデカナールデヒドロゲナーゼ	20
ec:1.1.1.283	メチルグリオキサールレダクターゼ		(アシル化)		
(NADPH-依存性)			ec:1.2.1.43	ギ酸デヒドロゲナーゼ(NADP+)	
ec:1.1.1.286	イソクエン酸-ホモイソクエン酸	90	ec:1.2.1.45	4-カルボキシ-2-ヒドロキシムコン酸-6-	
デヒドロゲナーゼ			セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ		
ec:1.1.1.287	D-アラビニトールデヒドロゲナーゼ(NADP+)		ec:1.2.1.46	ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ	
ブタノールデヒドロゲナーゼ			ec:1.2.1.47	4-トリメチルアンモニオブチルアルデヒド	
アルデヒドデヒドロゲナーゼ		95	デヒドロゲナーゼ		
ec:1.2.1.2	ギ酸デヒドロゲナーゼ		ec:1.2.1.48	長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ	
ec:1.2.1.3	アルデヒドデヒドロゲナーゼ(NAD+)		ec:1.2.1.49	2-オキソアルデヒドデヒドロゲナーゼ	
ec:1.2.1.4	アルデヒドデヒドロゲナーゼ(NADP+)		(NADP+)		
ec:1.2.1.5	アルデヒドデヒドロゲナーゼ[NAD(P)+]		ec:1.2.1.51	ビルビン酸デヒドロゲナーゼ(NADP+)	
ec:1.2.1.7	ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼ	00	ec:1.2.1.52	オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ	30
(NADP+)			(NADP+)		
ec:1.2.1.8	ベタイン-アルデヒドデヒドロゲナーゼ		ec:1.2.1.53	4-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒド	
ec:1.2.1.9	グリセルアルデヒド-3-リン酸		デヒドロゲナーゼ		
デヒドロゲナーゼ(NADP+)			ec:1.2.1.57	ブタナールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.2.1.10	アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ	105	ec:1.2.1.58	フェニルグリオキシル酸デヒドロゲナーゼ	
(アセチル化)			(アシル化)		
ec:1.2.1.11	アスパラギン酸セミアルデヒド		ec:1.2.1.59	グリセルアルデヒド-3-リン酸	
デヒドロゲナーゼ			デヒドロゲナーゼ(NAD(P)+)(リン酸化)		
ec:1.2.1.12	グリセルアルデヒド-3-リン酸		ec:1.2.1.62	4-ホルミルベンゼンスルホン酸	
デヒドロゲナーゼ(リン酸化)		110	デヒドロゲナーゼ		
ec:1.2.1.13	グリセルアルデヒド-3-リン酸		ec:1.2.1.63	6-オキソヘキサノ酸デヒドロゲナーゼ	
デヒドロゲナーゼ(NADP+)(リン酸化)			ec:1.2.1.64	4-ヒドロキシベンズアルデヒド	
ec:1.2.1.15	マロン酸セミアルデヒド		デヒドロゲナーゼ		
デヒドロゲナーゼ			ec:1.2.1.65	サリチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ	40
ec:1.2.1.16	コハク酸セミアルデヒド	115	ec:1.2.1.66	マイコチオール-依存性ホルムアルデヒド	
デヒドロゲナーゼ[NAD(P)+]			デヒドロゲナーゼ		
ec:1.2.1.17	グリオキシル酸デヒドロゲナーゼ(アシル化)		ec:1.2.1.67	バニリンデヒドロゲナーゼ	
ec:1.2.1.18	マロン酸セミアルデヒド		ec:1.2.1.68	コニフェリル-アルデヒドデヒドロゲナーゼ	
デヒドロゲナーゼ(アセチル化)			ec:1.2.1.69	フルオロアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ	
ec:1.2.1.19	アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ	20	ec:1.2.1.71	スクシニルグルタミン酸-セミアルデヒド	
			デヒドロゲナーゼ		

【0104】

他の例示的な酵素及び経路を本明細書に開示する(実施例参照)。更に、基質が天然基質でない反応を実行するために酵素を利用できることが理解される。非天然基質の活性は天然基質より低くてよいが、当該酵素を天然酵素として、又は本明細書に開示されるように

定方向進化若しくは適応進化を使用して修飾された酵素として利用できることが理解される(実施例も参照)。

【0105】

本明細書に開示される経路のいずれかを介するBDO生成は、部分的に、前駆体のBDOへの変換のための適切な酵素の同定に基づく。それらの反応工程のいくつかに対する多くの具体的な酵素が同定された。反応前駆体に特異的な酵素が同定されていない転換では、その反応工程を触媒するのに最も適する酵素候補が同定された。酵素は、以下に記載するように、広範な基質に対して作用することが証明されている。加えて、タンパク質操作の分野における進歩は、天然基質でなくても、基質に対して効率的に作用するように酵素を変質することを実現可能にする。BDO経路に好適な多様なクラスの広範な特異性の酵素、並びに酵素を非天然基質に対して作用するように進化させるために使用された方法のいくつかの例を以下に記載する。

【0106】

BDO経路における重要なクラスの酵素は、ケトン又はアルデヒドをアルコールに相互変換するオキシドレダクターゼ(1.1.1)である。このクラスにおける多くの例示的な酵素は、広範な基質に対して作用することができる。土壌細菌ブレビバクテリウム(*Brevibacterium*)種KU 1309から精製されたアルコールデヒドロゲナーゼ(1.1.1.1)は、高度な活性で過剰の脂肪族並びに芳香族アルコールに対して作用することが証明された(Hiranoらの文献、J. Biosc. Bioeng. 100:318-222 (2005))。表2は、異なるアルコールに対する酵素の活性及びその K_m を示す。酵素は、可逆的であり、いくつかのアルデヒドに対しても非常に高い活性を有する(表3)。

【0107】

表2. ブレビバクテリウム種KU由来のアルコールデヒドロゲナーゼの各種アルコールを酸化する相対的活性

【表2】

基質	相対的活性 (0%)	K_m (mM)
2-フェニルエタノール	100*	0.025
(S)-2-フェニルプロパノール	156	0.157
(R)-2-フェニルプロパノール	63	0.020
ベンジルアルコール	199	0.012
3-フェニルプロパノール	135	0.033
エタノール	76	
1-ブタノール	111	
1-オクタノール	101	
1-ドデカノール	68	
1-フェニルエタノール	46	
2-プロパノール	54	

*19.2U/mgに相当する2-フェニルエタノールの活性を100%とした。

表3. ブレビバクテリウム種KU由来のアルコールデヒドロゲナーゼの各種カルボニル化合物を還元する相対的活性

【表 3】

基質	相対的活性 (%)	K _m (mM)
フェニルアセトアルデヒド	100	0.261
2-フェニルプロピオンアルデヒド	188	0.864
1-オクチルアルデヒド	87	
アセトフェノン	0	

【0108】

10

ラルストニア・ユートロファ(*Ralstonia eutropha*)からの乳酸デヒドロゲナーゼ(1.1.1.27)は、2-オキソ酪酸、2-オキソペンタン酸及び2-オキソグルタル酸(2-オキソアジピン酸に類似したC5化合物)などのいくつかの2-オキソ酸に対して高い活性を有することが明らかにされた別の酵素である(Steinbuechel及びSchlegelの文献、Eur. J. Biochem. 130:329-334(1983))。表4の第2欄は、異なる基質に対するR.ユートロファ(以前にはA.ユートロファス)のldhAの活性を示す(Steinbuechel及びSchlegelの文献、前掲、1983)。

【0109】

表4. ピルビン酸と比較した様々な基質におけるR.ユートロファldhA(Steinbuechel及びSchlegelの文献、前掲、1983)のインビトロ活性

【表 4】

20

基質	A.ユートロファス 由来の L(+)-乳酸 デヒドロゲナーゼ	活性(%) ウサギ筋肉 由来の L(+)-乳酸 デヒドロゲナーゼ	L.レイクマニ 由来の D(-)-乳酸 デヒドロゲナーゼ
グリオキシル酸	8.7	23.9	5.0
ピルビン酸	100.0	100.0	100.0
2-オキソ酪酸	107.0	18.6	1.1
2-オキソ吉草酸	125.0	0.7	0.0
3-メチル-2- オキソ酪酸	28.5	0.0	0.0
3-メチル-2- オキソ吉草酸	5.3	0.0	0.0
4-メチル-2- オキソペンタン酸	39.0	1.4	1.1
オキサロ酢酸	0.0	33.1	23.1
2-オキソグルタル酸	79.6	0.0	0.0
3-フルオロピルビン酸	33.6	74.3	40.0

30

【0110】

40

2-オキソ酸をそれらのアシルCoA対応物に変換できるオキシドレダクターゼ(1.2.1)も複数の基質を受け入れることが示された。例えば、2-オキソイソ吉草酸デヒドロゲナーゼ(1.2.1.25)としても知られる分枝鎖2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体(BCKAD)は、分枝鎖アミノ酸分解経路に参加して、バリン、ロイシン及びイソロイシンの2-ケト酸誘導体をそれらのアシル-CoA誘導体及びCO₂に変換する。ラッス・ノルベギクス(Paxtonらの文献、Biochem. J. 234:295-303 (1986))及びサッカロミセス・セレビシアエ(Sinclairらの文献、Biochem. Mol. Biol. Int. 32:911-922 (1993))を含むいくつかの生物において、この複合体は、分枝鎖アミノ酸前駆体に加えて、2-オキソブタン酸及びアルファ-ケトグルタル酸などの直鎖状オキソ酸を含む広い基質範囲を有することが示された。

【0111】

50

別のクラスの酵素、即ちアミノトランスフェラーゼ(2.6.1)の一員は、複数の基質に対

して作用することが報告された。E. コリに発現されるピロコッカス・フルシオウス (*Pyrococcus furiosus*) 由来のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspAT) が同定され、その組換えタンパク質は、酵素が、アスパラギン酸及びアルファ-ケトグルタル酸に対して最も高い活性を有し、アラニン、グルタミン酸及び芳香族アミノ酸に対してより低いながらも有意な活性を有することを証明するように特徴づけられた (Wardらの文献、*Archaea* 133-141 (2002))。別の場合において、レイシュマニア・メキシカナ (*Leishmania mexicana*) から同定され、E. コリにおいて発現されるアミノトランスフェラーゼ (Vernalらの文献、*FEMS Microbiol. Lett.* 229:217-222 (2003)) は、それぞれチロシン (チロシンに対して活性100%とみなす)、フェニルアラニン (90%)、トリプトファン (85%)、アスパラギン酸 (30%)、ロイシン (25%) 及びメチオニン (25%) に対して広い基質特異性を有することが報告された (Vernalらの文献、*Mol. Biochem. Parasitol.* 96:83-92 (1998))。同様の広い特異性が、トリパノソマ・クルジ (*Trypanosoma cruzi*) 由来のチロシンアミノトランスフェラーゼについて報告されているが、これらの酵素は、いずれも配列相同性が6%にすぎない。後者の酵素は、効率的なアミノ供与体として、ロイシン、メチオニン、並びにチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン及びアラニンを受け入れることができる (Nowickiらの文献、*Biochem. Biophys. Acta* 1546: 268-281 (2001))。

10

【0112】

CoAトランスフェラーゼ (2.8.3) は、1つを超える基質に対して作用する能力を有することが証明された。具体的には、CoAトランスフェラーゼは、クロストリジウム・アセトブチリクム (*Clostridium acetobutylicum*) から精製され、酢酸、プロピオン酸、及び酪酸に対して最も高い活性を有することが報告された。それは、吉草酸、イソ酪酸及びクロトン酸に対しても有意な活性を有していた (Wiesenbornらの文献、*Appl. Environ. Microbiol.* 55:323-329 (1989))。別の研究において、酢酸-CoAトランスフェラーゼ (EC2.8.3.8) としても知られるE. コリ酵素アシル-CoA: 酢酸-CoAトランスフェラーゼは、イソ酪酸 (Matthies及びSchinkの文献、*Appl. Environ. Microbiol.* 58:1435-1439 (1992))、吉草酸 (Vanderwinkelらの文献、*Biochem. Biophys. Res Commun.* 33:902-908 (1968b))、及びブタン酸 (Vanderwinkelらの文献、*Biochem. Biophys. Res Commun.* 33:902-908 (1968a)) を含む様々な分枝状及び直鎖状アシル-CoA基質からCoA部分を酢酸に転移することが証明された。

20

【0113】

他の酵素クラスは、酵素に対する広い基質特異性を追加的に支援する。いくつかのイソメラーゼ (5.3.3) も複数の基質に対して作用することが証明された。例えば、シュードモナス・ストutzeri (*Pseudomonas stutzeri*) のL-ラムノースイソメラーゼは、様々なアルドース (aldose) とケトースの間の異性化を触媒する (Yoshidaらの文献、*J. Mol. Biol.* 365:1505-1516 (2007))。これらは、L-ラムノースとL-ラムヌロース、L-マンノースとL-フルクトース、L-キシロースとL-キシルロース、D-リボースとD-リブロース、及びD-アロースとD-プシコースの間の異性化を含む。

30

【0114】

更に別のクラスの酵素、ホスホトランスフェラーゼ (2.7.1) において、L-ホモセリンをリン酸L-ホモセリンに変換するE. コリ由来のホモセリンキナーゼ (2.7.1.39) は、多くのホモセリン類似体をリン酸化することが判明した。これらの基質において、R位のカルボキシル官能基が、エステル又はヒドロキシメチル基によって置き換えられた (Huo及びViolaの文献、*Biochemistry* 35:16180-16185 (1996))。表5は、このキナーゼの広い基質特異性を実証する。

40

【0115】

表5. ホモセリンキナーゼの基質特異性

【表 5】

基質	k_{cat}	% k_{cat}	K_m (mM)	k_{cat}/K_m
L-ホモセリン	18.3 ± 0.1	100	0.14 ± 0.04	184 ± 17
D-ホモセリン	8.3 ± 1.1	32	31.8 ± 7.2	0.26 ± 0.03
L-アスパラギン酸 β -セミアルデヒド	2.1 ± 0.1	8.2	0.28 ± 0.02	7.5 ± 0.3
L-2-アミノ-1,4- ブタンジオール	2.0 ± 0.5	7.9	11.6 ± 6.5	0.17 ± 0.06
L-2-アミノ-5- ヒドロキシ吉草酸	2.5 ± 0.4	9.9	1.1 ± 0.5	2.3 ± 0.3
L-ホモセリン メチルエステル	14.7 ± 2.6	80	4.9 ± 2.0	3.0 ± 0.6
L-ホモセリン エチルエステル	13.6 ± 0.8	74	1.9 ± 0.5	7.2 ± 1.7
L-ホモセリン イソプロピルエステル	13.6 ± 1.4	74	1.2 ± 0.5	11.3 ± 1.1
L-ホモセリン <i>n</i> - プロピルエステル	14.0 ± 0.4	76	3.5 ± 0.4	4.0 ± 1.2
L-ホモセリン イソブチルエステル	16.4 ± 0.8	84	6.9 ± 1.1	2.4 ± 0.3
L-ホモセリン <i>n</i> -ブチル エステル	29.1 ± 1.2	160	5.8 ± 0.8	5.0 ± 0.5

10

20

【 0 1 1 6 】

BDO経路に有用な別のクラスの酵素は、酸-チオールリガーゼ(6.2.1)である。他のクラスにおける酵素と同様に、このクラスにおける特定の酵素は、広い基質特異性を有することが確認された。例えば、シュードモナス・ブチダ由来のアシルCoAリガーゼは、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、ヘキサノ酸、ヘプタン酸及びオクタン酸を含むいくつかの脂肪族基質、並びにフェニル酢酸及びフェノキシ酢酸などの芳香族化合物に対して作用することが証明された(Fernandez-Valverdeらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 59:1149-1154 (1993))。関連酵素であるリゾビウム・トリフォリ(Rhizobium trifoli)由来のマロニルCoAシンターゼ(6.3.4.9)は、いくつかの二酸、即ちマロン酸エチル、マロン酸プロピル、マロン酸アリル、マロン酸イソプロピル、マロン酸ジメチル、マロン酸シクロプロピル、マロン酸シクロプロピルメチレン、マロン酸シクロブチル及びマロン酸ベンジルをそれらの対応するモノチオエステルに変換することが可能であった(Pohlらの文献、J. Am. Chem. Soc. 123:5822-5823 (2001))。同様に、デカルボキシラーゼ(4.1.1)も広い基質範囲を有することが判明した。ケト酸デカルボキシラーゼとも呼ばれるピルビン酸デカルボキシラーゼ(PDC)は、ピルビン酸のアセトアルデヒドへの脱炭酸を触媒するアルコール発酵における重要な酵素である。サッカロミセス・セレビスシアエから単離された酵素は、2-ケト酪酸、2-ケト吉草酸、及び2-フェニルピルビン酸を含む脂肪族2-ケト酸に対して広い基質範囲を有する(Li及びJordanの文献、Biochemistry 38:10004-10012 (1999))。同様に、ベンゾイルギ酸デカルボキシラーゼは、広い基質範囲を有し、酵素工学の研究の標的であった。シュードモナス・ブチダ由来の酵素が広範囲に研究され、この酵素の結晶構造が利用可能である(Polovnikovaらの文献、Biochemistry 42:1820-1830 (2003); Hassonらの文献、Biochemistry 37:9918-9930 (1998))。分枝鎖アルファ-ケト酸デカルボキシラーゼ(BCKA)は、3から6個の炭素の鎖長が異なる様々な化合物に対して作用することが証明された(Oku及びKanedaの文献、J. Biol. Chem. 263:18386-18396 (1998); Smitらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 71:303-311 (2005b))。ラクトコッカス・ラクチスの酵素は、2-オキソブタン酸、2-オキソヘキサノ酸、2-オキソペンタン酸、3-メチル-2-オキソブタン酸、4-メチル-2-オキソブタン酸及びイソカプロン酸を含む様々な分枝状及び直鎖状基

30

40

50

質に対して特徴づけられた(Smitらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 71:303-311(2005a))。

【0117】

興味深いことに、1つの主要な活性を有することが知られる酵素は、全く異なる機能を触媒することも報告された。例えば、バシルス・ステアロサーモフィルス及びバシルス・スプチリスの補因子依存性ホスホグリセリン酸ムターゼ(5.4.2.1)は、ホスファターゼとしても機能することが知られる(Rigdenらの文献、Protein Sci. 10:1835-1846 (2001))。B.ステレオサーモフィルス由来の酵素は、3-ホスホグリセリン酸、アルファ-ナフチルリン酸、p-ニトロフェニルリン酸、AMP、フルクトース-6-リン酸、リボース-5-リン酸及びCMPを含むいくつかの基質に対して活性を有することが知られる。

10

【0118】

酵素が自然に広い基質特異性を有するこれらの例とは対照的に、多くの酵素が、それらの非天然基質に対するそれらの特異性を広げるために、定方向進化を使用して修飾された。代替的に、定方向進化を使用して、酵素の基質嗜好性を変化させた。従って、天然基質に対する効率的な機能、例えば効率の向上、又は非天然基質に対する効率的な機能、例えば効率の増大のために所与の酵素を操作することが実現可能である。例えば、シュードモナス・アエルギノサ由来のリパーゼのエナンチオ選択性が有意に向上したことが報告されている(Reetzらの文献、Agnew. Chem. Int. Ed Engl. 36:2830-2832 (1997))。この酵素は、(S)-酸のために、エナンチオマー過剰率(ee)が2%にすぎない2-メチルデカン酸p-ニトロフェニルを加水分解した。しかし、4回連続したエラープローン変異誘発及びスクリーニングの後には、81% eeで必須の反応を触媒する変異体が生成された(Reetzらの文献、Agnew. Chem. Int. Ed Engl. 36:2830-2832 (1997))。

20

【0119】

酵素を非天然基質のアレイに対して機能するように修飾するために、定方向進化法が使用された。P.アエルギノサにおけるリパーゼの基質特異性が、活性部位付近のアミノ酸残基の無作為化によって拡大された。これは、この酵素によるアルファ置換カルボン酸エステルの受け入れを可能にした(Reetzらの文献、Agnew. Chem. Int. Ed Engl. 44:4192-4196 (2005))。酵素の別の成功裡の修飾において、野生型酵素によってあまり受け入れられない一分枝状基質を受け入れるE.コリアミノトランスフェラーゼを生成するためにDNAシャフリングが採用された(Yanoらの文献、Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 95:5511-5515 (1998))。具体的には、4回のシャフリングの終了時に、バリン及び2-オキシバリンに対するアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの活性が5倍程度まで増加したのに対して、天然基質、アスパラギン酸に対する活性を30分の1まで低下させた。最近、非天然及び無生物基質4-ヒドロキシ-4-(6-メトキシ-2-ナフチル)-2-ブタノンにおける炭素-炭素結合開裂を触媒するのに使用することが可能であるレトロ-アルドラーゼを設計するために、アルゴリズムが使用された(Jiangらの文献、Science 319:1387-1391 (2008))。これらのアルゴリズムは、新しい酵素を設計するために4つの異なる触媒モチーフの異なる組合せを使用し、実験的特徴づけのための選択された設計の20種は、触媒されていない反応と比較して速度が4倍向上した(Jiangらの文献、Science 319:1387-1391 (2008))。従ってこれらの操作手法は、酵素が作用できる基質のアレイを拡大することが可能であるだけでなく、非常に効率的な酵素の設計及び構築を可能にする。例えば、DNAシャフリング法(一過性鋳型に対するランダムキメラ生成又はRACHITT)は、複合基質上の脱硫速度が向上するとともに、非天然基質の変換が20倍速い操作されたモノオキシゲナーゼをもたらすことが報告された(Cocoらの文献、Nat. Biotechnol. 19:354-359 (2001))。同様に、緩慢な変異体トリオースリン酸イソメラーゼ酵素の比活性が、1.3倍から19倍まで向上された(Hermesらの文献、Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 87:696-700 (1990))。比活性のこの向上は、タンパク質の全長に対して無作為変異誘発を使用することによって達成され、6個のアミノ酸残基の変異に対して向上を追跡することが可能であった。

30

40

【0120】

所望の基質に対する酵素の基質特異性を改変するためのタンパク質操作手法の効果は、

50

いくつかの研究においても実証された。サーマス・サーモフィルス由来のイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼは、それが次に基質としてのリンゴ酸及びD-乳酸に対して作用することが可能になるように、活性部位に近い残基を変化させることによって修飾された(Fujitaらの文献、Biosci. Biotechnol. Biochem. 65:2695-2700 (2001))。この研究並びに他の研究において、1つ又はいくつかの残基を修飾して基質特異性を改変できることが指摘された。例えば、単一のアミノ酸が推定基質結合領域において変化したジヒドロフラボノール4-レダクターゼは、ジヒドロケンペロールを優先的に還元することが可能であった(Johnsonらの文献、Plant. J. 25:325-333 (2001))。エシェリキア・コリ由来の非常に特異的なイソクエン酸デヒドロゲナーゼの基質特異性は、活性部位における1個の残基を変化させることによってイソクエン酸をイソプロピルリンゴ酸に変化した(Doyleらの文献、Biochemistry 40:4234-4241 (2001))。同様に、NAD⁺依存性1,5-ヒドロキシプロスタグランジンデヒドロゲナーゼの補因子特異性は、N末端付近のいくつかの残基を変化させることによって、NADP⁺に改変された(Choらの文献、Arch. Biochem. Biophys. 419:139-146 (2003))。配列分析及び分子モデル化分析を使用して、修飾のための重要な残基が同定され、それらが部位特異的変異誘発によって更に調査された。

10

20

30

40

50

【0121】

酵素の天然基質と比較して非天然基質に有利になるように酵素の機能を変化させた多くの例が、多様なクラスの酵素にわたって存在する。フコシダーゼが、DNAシャフリング及びスクリーニングによってE. コリのガラクトシダーゼから進化された(Zhangらの文献、Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 94:4504-4509 (1997))。同様に、E. コリ由来のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼが、ホモロジーモデル化及び部位特異的変異誘発を使用して、チロシンアミノトランスフェラーゼに変換された(Onuffer及びKirschの文献、Protein Sci., 4:1750-1757 (1995))。P. プチダ由来のベンゾイルギ酸デカルボキシラーゼの活性部位における2つの残基の部位特異的変異誘発は、天然基質及び非天然基質に対する親和性(K_m)を改変することが報告された(Siegertらの文献、Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005))。サッカロミセス・セレビスシアエ由来のシトクロムcペルオキシダーゼ(CCP)を定方向分子進化させて、古典的ペルオキシダーゼ基質グアイアコールに対する活性が増強された変異体を作製することで、CCPの基質特異性をタンパク質シトクロムcから小型有機分子に変化させた。3回のDNAシャフリング及びスクリーニングの後に、グアイアコールに対する活性が300倍に増大し、天然基質に対するものと比較してこの基質に対する特異性が1000倍まで増大した変異体が単離された(Ifflandらの文献、Biochemistry 39:10790-10798 (2000))。

【0122】

いくつかの場合において、親酵素のいずれとも異なる基質嗜好性を有する酵素が得られた。例えば、ポリ塩素化ビフェニルのビフェニルジオキシゲナーゼ媒介分解が、2つの細菌、即ちシュードモナス・シュードアルカルゲンス(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)及びブルクホルデリア・セパシア(*Burkholderia cepacia*)の遺伝子をシャフリングすることによって促進された(Kumamaruらの文献、Nat. Biotechnol. 16:663-666 (1998))。得られたキメラビフェニルオキシゲナーゼは、いずれの親酵素とも異なる基質嗜好性を示し、その酵素にとって本来は劣った基質である関連ビフェニル化合物並びにトルエン及びベンゼンなどの芳香族単環炭化水素に対する分解活性を高めた。

【0123】

酵素特異性を変化させることに加えて、酵素が天然には低い活性を有する基質に対する活性を高めることも可能である。1つの研究は、(とりわけリジン、アルギニン、アラニン、セリン、メチオニン、システイン、ロイシン及びヒスチジンに対する)広い基質特異性を有するが、トリプトファンに対する活性が低いP. プチダ由来のアミノ酸ラセマーゼをランダム変異誘発によって著しく向上させることが可能であることを実証した(Kinoらの文献、Appl. Microbiol. Biotechnol. 73:1299-1305 (2007))。同様に、ウシBCKADの活性部位が、代替基質のアセチル-CoAに有利になるように操作された(Meng及びChuangの文献、Biochemistry 33:12879-12885 (1994))。これらの手法の興味深い局面は、ランダム法を適

用して、効果的な活性を有するこれらの変異酵素を作製しても、活性の向上をもたらす正確な変異又は構造変化を同定できることである。例えば、前記研究において、トリプトファンに対する活性の向上を促進する変異が2つの異なる位置に対して追跡された。

【0124】

発現するのが困難であるタンパク質を発現させるために定方向進化も使用された。例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼにランダム変異誘発及び遺伝子組換えさせることによって、野生型と比較して14倍を超える活性を有する変異体が同定された(Linらの文献、Biotechnol. Prog. 15:467-471 (1999))。

【0125】

定方向進化の別の例は、一連の所望の機能を達成するために酵素に施すことができる大規模な修飾を示す。パシルス・ステアロサーモフィルス由来の酵素乳酸デヒドロゲナーゼが部位特異的変異誘発され、異なるヒドロキシ酸に対する特異性を決定づけると考えられる部位において3つのアミノ酸置換が生じた(Clarkeらの文献、Biochem. Biophys. Res. Commun. 148:15-23 (1987))。これらの変異の後に、ピルビン酸と比較したオキサロ酢酸に対する特異性が、オキサロ酢酸と比較したピルビン酸に対する触媒特性が1000である野生型酵素とは対照的に500まで高められた。この酵素は、分枝鎖置換ピルビン酸に対する活性を有するように、部位特異的変異誘発を使用して更に操作された(Wilksらの文献、Biochemistry 29:8587-8591 (1990))。具体的には、酵素は、アルファ-ケトイソカプロン酸に対する K_{cat} が55倍に高められた。3つの構造修飾を同じ酵素に施して、その基質特異性を乳酸からリンゴ酸に変化させた。この酵素は、活性が高く、リンゴ酸に対して特異的であった(Wilksらの文献、Science 242:1541-1544 (1988))。続いて、B.ステアロサーモフィルス由来の同じ酵素が、アンモニウム基を含むものなどの、正に帯電した側鎖を有するアルファ-ケト酸に対して高度な触媒活性を有するように操作された(Hoganらの文献、Biochemistry 34:4225-4230 (1995))。該酵素の102位置に導入された酸性アミノ酸を有する変異体は、当該側鎖アンモニウム基の結合に有利であった。得られた結果は、オメガ-アミノ-アルファ-ケト酸基質に対する k_{cat}/K_m 値の25倍までの向上を示すことを証明した。興味深いことに、この酵素は、また、乳酸デヒドロゲナーゼの代わりにフェニル乳酸デヒドロゲナーゼとして機能するように構造的に修飾された(Wilksらの文献、Biochemistry 31:7802-7806 (1992))。制限部位が、遺伝子の領域を励起することを可能にする酵素に対する遺伝子に導入された。この領域は、通常はバルク溶媒から活性部位をシールし、且つ基質特異性の主たる決定因子であるポリペプチドの移動表面ループ(残基98~110)をコードした。基質特異性が変化したヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼが生成されるように、可変長及び配列ループが挿入された。より長いループ構成の場合は、ピルビン酸に対する活性が100万分の1に低下したが、フェニルピルビン酸に対する活性はほとんど変化しなかった。390000倍の特異性(k_{cat}/K_m)の切換が達成された。ピルビン酸と比較したフェニルピルビン酸に対するこの酵素の1700:1の選択性は、フェニル乳酸デヒドロゲナーゼに必要とされる選択性である。上記研究は、酵素工学の様々な手法を使用して、本明細書に開示されるBDO経路のための酵素を得ることができることを示している。

【0126】

本明細書に開示されているように、アセチル-CoA、スクシニル-CoA、アルファ-ケトグルタル酸、グルタミン酸、4-アミノ酪酸及びホモセリンを含む多くの中央代謝中間体から1,4-ブタンジオールへの生合成経路を利用することができる。アセチル-CoA、スクシニル-CoA及びアルファ-ケトグルタル酸は、細胞呼吸のために酸素を利用するほぼ全ての生細胞に全体として存在し、多くの嫌気性生物体に切断された形で存在する一連の反応物であるトリカルボン酸(TCA)回路の共通の中間体である。グルタミン酸は、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ又は多くのアミノ基転移反応のいずれかを介してアルファ-ケトグルタル酸から誘導されるアミノ酸である(図8B参照)。4-アミノ酪酸をグルタミン酸の脱炭酸(図8B参照)によって、又は図9Cに開示される経路を介してアセトアセチル-CoAから形成することができる。アセトアセチル-CoAは、酵素アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼ、又は同等にアセトアセチル-CoAチオラーゼによる2個のアセチル-CoA分子の縮合から誘導さ

れる。ホモセリンは、アスパラギン酸を介してオキサロ酢酸から形成される、トレオニン及びメチオニン代謝における中間体である。オキサロ酢酸のホモセリンへの変換には、1個のNADH、2個のNADPH及び1個のATPが必要である。

【0127】

先に例示した経路以外の経路を採用して、非天然微生物生物体にBDOの生合成を生成することもできる。一実施態様において、L-ホモセリンからBDOへの経路を使用して生合成を達成することができる(図13)。この経路は、グルコース1モル当たり0.90モルのモル収率を有し、これは還元当量を利用できることによって制限されると思われる。第2の経路は、アセトアセチル-CoAからBDOを合成し、グルコース1モル当たり1.091モルの最大理論収率を達成することが可能である(図9参照)。いずれかの経路の実行を、2つの外因性酵素をE. コリなどの宿主生物体に導入することによって達成することができ、且つ両経路は、スクシニル-CoAを介してBDO生成を更に補完することができる。経路酵素、熱力学、理論的収率及び全体的な実現可能性を以下に更に記載する。

【0128】

ホモセリン経路を、BDO生成微生物体を作製するように操作することもできる。ホモセリンは、アスパラギン酸を介してオキサロ酢酸から形成されるトレオニン及びメチオニン代謝における中間体である。オキサロ酢酸のホモセリンへの変換には、1個のNADH、2個のNADPH及び1個のATPが必要である(図2)。一旦形成されると、ホモセリンは、トレオニン及びメチオニンの両方のための生合成経路に供給される。たいていの生物体において、高量のトレオニン又はメチオニンが逆戻りして、ホモセリン生合成経路を抑圧する(Caspiらの文献、Nucleic Acids Res. 34:D511-D516 (1990))。

【0129】

ホモセリンの4-ヒドロキシ酪酸(4-HB)への転換を本明細書に開示される2つの酵素工程で達成することができる。この経路の第1の工程は、推定上のアンモニアリアーゼによるホモセリンの脱アミノ化である。工程2において、生成物アルケン、4-ヒドロキシブタ-2-エン酸が、1個のNADHを消費して推定上のレダクターゼにより4-HBに還元される。次いで、4-HBをBDOに変換することができる。

【0130】

上記転換を触媒するために利用可能な酵素が本明細書に開示されている。例えば、経路の工程1におけるアンモニアリアーゼは、アスパラギン酸アンモニア-リアーゼ(アスパルターゼ)の化学的性質に酷似している。アスパルターゼは、微生物において広範に及ぶ酵素であり、広く特徴づけられてきた(Viola, R.E.の文献、Mol. Biol. 74:295-341 (2008))。E. コリアスパルターゼの結晶構造が解明された(Shiらの文献、Biochemistry 36:9136-9144 (1997))ため、その基質特異性をホモセリンを含むように改変する酵素の活性部位における変異を直接操作することが可能である。工程2におけるオキシドレダクターゼは、E. コリTCA回路におけるフマル酸レダクターゼを含むいくつかの十分に特徴づけられた酵素に類似する化学的性質を有する。この反応の熱力学が極めて好ましいため、広い基質特異性を有する内因性レダクターゼは、4-ヒドロキシブタ-2-エン酸を還元できる可能性が高い。嫌気性条件下でのこの経路の収率は、グルコース1モル当たり0.9モルのBDOである。

【0131】

スクシニル-CoA経路は、よりエネルギー的に効率が低いという事実のため、より高い収率を有することが判明した。ホモセリン経路を介する1個のオキサロ酢酸分子のBDOへの変換には、2当量ATPの消費が必要になる。PEPカルボキシキナーゼが可逆的であると想定すると、グルコースの2個のオキサロ酢酸分子への変換は最大で3個のATP分子を生成することができるため、ホモセリンを介するグルコースのBDOへの全変換は、負のエネルギー収率を有する。予想されるように、エネルギーが呼吸を介して生成され得ると想定すると、ホモセリン経路の最大収率は、グルコース1モル当たり1.05モルまで増加し、これはスクシニル-CoA経路収率の96%である。スクシニル-CoA経路は、炭素フラックスの一部を、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ及びTCA回路の酸化的分枝を介して誘導して、エネルギーを消費せずに還元当量及びスクシニル-CoAの両方を生成することができる。従って、フラック

スの全てがオキサロ酢酸を介してスクシニル-CoAからBDOに誘導されることがないため、それは、ホモセリン経路と同じエネルギー上の問題に遭遇しない。全体にわたり、ホモセリン経路はBDOへの高収率経路を示す。

【0132】

アセト酢酸経路を操作して、BDO生成微生物体を作製することもできる。アセト酢酸を、アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼ及びアセトアセチル-CoAトランスフェラーゼを含む、脂肪酸代謝に関与する酵素によってアセチル-CoAから形成することができる。アセト酢酸を介する生合成経路は、また、一酸化炭素、二酸化炭素又はメタノールなどの単独の炭素の化合物を代謝させてアセチル-CoAを形成することができる微生物体に特に有用である。

10

【0133】

アセトアセチル-CoAから4-アミノ酪酸への3工程経路(図9C参照)を使用して、アセトアセチル-CoAを介してBDOを合成することができる。図8Bに示されるように、4-アミノ酪酸をコハク酸セミアルデヒドに変換することができる。スクシニル-CoAから除去された1つの還元工程又は α -ケトグルタル酸から除去された1つの脱炭酸工程であるコハク酸セミアルデヒドを、3つの還元工程に従ってBDOに変換することができる(図1)。簡単に述べると、この経路の工程1は、例えば、atoA及びatoD遺伝子によってコードされたE. コリアセトアセチル-CoAトランスフェラーゼによるアセトアセチル-CoAのアセト酢酸への変換を含む(Hanaiらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 73:7814-7818 (2007))。アセトアセチル-CoA生合成の工程2は、 α -アミノトランスフェラーゼによるアセト酢酸の3-アミノブタン酸への変換を含む。アルカリゲンス・デニトリフィカンス(*Alcaligenes denitrificans*)の α -アミノ酸:ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ(α -APT)は、E. コリに過剰発現され、インビトロで3-アミノブタン酸に対する高い活性を有することが示された(Yunらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 70:2529-2534 (2004))。

20

【0134】

工程2において、推定上のアミノムターゼは、アミン基を炭素骨格の3位から4位にシフトさせる。3-アミノブタン酸に対してこの機能を果たすアミノムターゼは特徴づけられていないが、クロストリジウム・スティックランジ(*Clostridium sticklandii*)の酵素は、極めて類似したメカニズムを有する。酵素D-リジン-5,6-アミノムターゼは、リジン生合成に関与する。

30

【0135】

アセトアセチル-CoAからBDOへの合成経路は、通常、グルタミン酸の脱炭酸から形成されるE. コリにおける代謝物質である4-アミノブタン酸を通る。4-アミノブタン酸は、一旦形成されると、生化学的に特徴づけられた酵素である4-アミノブタン酸トランスアミナーゼ(2.6.1.19)によってコハク酸セミアルデヒドに変換され得る。

【0136】

この経路における候補酵素を選択するための1つの検討事項は、工程2及び3に関与する酵素の立体選択性である。アルカリゲンス・デニトリフィカンスの α -ABTは、3-アミノブタン酸のL-立体異性体に特異的であり、D-リジン-5,6-アミノムターゼは、D-立体異性体を必要とする可能性が高い。相補的な立体選択性を有する酵素が最初に見いだされないか、又は操作されない場合は、L-3-アミノブタン酸をD-3-アミノブタン酸に変換することができるラセマーゼ活性を有する第3の酵素をこの経路に加えることができる。アミノ酸ラセマーゼは広範に及んでいるが、これらの酵素が α -アミノ酸に対して機能できるかどうかは未知である。

40

【0137】

嫌気性条件下でのこの経路の最大理論モル収率は、グルコース1モル当たり1.091モルである。アセトアセチル-CoAからBDOへのフラックスを生成するために、アセチル-CoA:アセトアセチル-CoAトランスフェラーゼが可逆的であると想定することが必要であった。E. コリにおけるこの酵素の機能は、最初にそれらをチオエステルに変換することによって短鎖脂肪酸を代謝させることである。

50

【0138】

酢酸を消費する方向のアセチル-CoA:アセトアセチル-CoAトランスフェラーゼの作用は、E. コリにおいて実験的に実証されていないが、他の生物体における類似の酵素に関する研究は、この反応が可逆的であるという仮定を裏づけている。腸細菌ロセブリア種及びF. プラスニツィの酵素ブチリル-CoA:酢酸:CoAトランスフェラーゼは、酢酸を利用する方向に作用して、酪酸を生成する(Duncanらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 68:5186-5190 (2002))。別の極めて類似する酵素、即ちトリパノソマ・ブルセイ(*Trypanosoma brucei*)のアセチル:コハク酸CoAトランスフェラーゼも酢酸を利用する方向に作用する。この反応は、平衡に近い $r_{xn}G$ を有するため、高濃度の酢酸は、関心対象の方向に反応を誘導し得る可能性が高い。グルコース1モル当たり1.09モルの最大理論BDO生成速度では、E. コリは、発酵副産物を伴わずにグルコース1モル当たり1.098モルのATPを生成できることがシミュレーションによって想定される。このATP収率は、細胞の成長、維持及び生成に十分なものでなければならない。アセトアセチル-CoA生物経路は、アセチル-CoAからBDOへの高収量経路である。

10

【0139】

従って、選択された宿主に4-HB生合成を確立するための既に例示した様々な修飾のいずれかに加えて、BDO生成微生物体は、4-HB経路代謝修飾の先述の組合せ及び置換のいずれか、並びにCoA非依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ若しくはアルコールデヒドロゲナーゼ、又はGBL及び/若しくはBDOのための生合成経路を生成する本明細書に開示される他の酵素の発現のいずれかの組合せを含むことができる。従って、本発明のBDO生産体は、例えば、本明細書に開示される4-HB経路のいずれか及び/又はBDO経路のいずれかに対応する1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ又は最大全ての酵素の外因性発現を有することができる。

20

【0140】

遺伝子修飾微生物体の設計及び構築は、BDOを生成するための十分な量の発現を達成するための当該技術分野で周知の方法を使用して実施される。特に、本発明の非天然微生物体は、前述のように、約0.1~25mM以上などの約0.1~200mM以上の細胞内濃度をもたらすBDOの生合成を達成することができる。例えば、BDOの細胞内濃度は、約3~20mM、特定すると約5~15mM以上、より特定すると約10mM以上を含む約8~12mMである。これらの例示的な範囲の各々の間又はそれを超える細胞内濃度を本発明の非天然微生物体から達成することができる。4-HB生産体の場合と同様に、BDO生産体を嫌気性条件下で維持、培養又は発酵することができる。

30

【0141】

本発明は、更に、4-HBを生成するための方法を提供する。該方法は、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、 α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ若しくはグルタミン酸デカルボキシラーゼをコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)生合成経路を有する非天然微生物体を、モノマー4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)を生成するのに十分な時間にわたって実質的に嫌気性条件下で培養することを含む。該方法は、例えば、4-HBのGBLへの及びBDO又はTHFへの化学変換を追加的に含むことができる。

40

【0142】

加えて4-HBを生成するための方法が提供される。該方法は、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ又は α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼをコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)生合成経路を有する非天然微生物体を、モノマー4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)を生成するのに十分な時間にわたって実質的に嫌気性条件下で培養することを含む。4-HB生成物を培養培地に分泌させることができる。

【0143】

50

更に、BDOを生成するための方法が提供される。該方法は、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシ酪酸:CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、ホスホトランスヒドロキシブチリラーゼ、 β -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ又はアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼをコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)及び1,4-ブタンジオール(BDO)生合成経路を有する微生物体を含む非天然微生物生触媒又は微生物体を、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な時間にわたって培養することを含む。BDO生成物を培養培地に分泌させることができる。

【0144】

10

加えて、本発明のBDO経路を有する非天然微生物体を培養することによってBDOを生成するための方法が提供される。BDO経路は、BDOを生成するための条件下且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むことができ、該BDO経路は、4-アミノ酪酸-CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼを含む(実施例VII及び表17参照)。

【0145】

代替的に、BDO経路は、BDOを生成するための条件下且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むことができ、該BDO経路は、4-アミノ酪酸-CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼを含む(実施例VII及び表18参照)。

20

【0146】

加えて、本発明は、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、4-アミノ酪酸キナーゼ、4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-リン酸デヒドロゲナーゼ又は4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法を提供する(実施例VII及び表19参照)。

30

【0147】

本発明は、更に、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、アルファ-ケトグルタル酸5-キナーゼ、2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ、アルファ-ケトグルタル酸-CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタル- β -ヒドロラーゼ、アルファ-ケトグルタル- β -CoAリガーゼ、アルファ-ケトグルタル- β -CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、アルファ-ケトグルタル- β -CoAレダクターゼ(アルコール形成)、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法を提供する(実施例VIII及び表20参照)。

40

【0148】

本発明は、追加的に、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下

50

且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、グルタミン酸-CoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ、グルタミル-CoAリガーゼ、グルタミン酸5-キナーゼ、グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、グルタミル-CoAレダクターゼ、グルタミン酸-5-セミアルデヒドレダクターゼ、グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法を提供する(実施例IX及び表21参照)。

10

【0149】

本発明は、追加的に、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、ビニルアセチル-CoA -イソメラーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼを含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法を含む(実施例X及び表22参照)。

【0150】

また、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、ホモセリンデアミナーゼ、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリンCoA-ヒドロラーゼ、ホモセリン-CoAリガーゼ、ホモセリン-CoAデアミナーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エン酸レダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼを含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法が提供される(実施例XI及び表23参照)。

20

【0151】

本発明は、追加的に、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、スクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法を提供する。当該BDO経路は、スクシニル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを更に含むことができる。

30

【0152】

また、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、4-アミノ酪酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法が提供される。

40

【0153】

本発明は、追加的に、生成物を増加させるか、又は望ましくない副産物を減少させることによってBDOなどの所望の生成物の生成の向上を可能にする、本明細書に開示されてい

50

る遺伝子改変された生物体を使用して所望の生成物を生成する方法を提供する。従って、本発明は、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するための方法であって、本明細書に開示されている非天然微生物体を、BDOを生成するための条件下且つ十分な時間にわたって培養することを含む方法を提供する。一実施態様において、本発明は、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む、非天然微生物体を使用してBDOを生成する方法を提供する。一実施態様において、微生物体は、外因性スクシニル-CoAシンターゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XII参照)。例えば、スクシニル-CoAシンターゼは、エシェリキア・コリsucCD遺伝子によってコードすることができる。

【0154】

別の実施態様において、微生物体は、外因性アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XIII参照)。例えば、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼは、マイコバクテリウム・ボビスsucA遺伝子によってコードすることができる。更に別の実施態様において、微生物体は、外因性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ並びに場合により4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XIII参照)。例えば、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(CoA依存性)、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼは、ポルフィロモナス・ギンギバリスW83遺伝子によってコードすることができる。更なる実施態様において、微生物体は、外因性酪酸キナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XIII参照)。例えば、酪酸キナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼは、クロストリジウム・アセトブチリクムbuk1及びptb遺伝子によってコードすることができる。

【0155】

更に別の実施態様において、微生物体は、外因性4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XIII参照)。例えば、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼは、クロストリジウム・ベイジェリンキーald遺伝子によってコードすることができる。加えて、本発明の実施態様において、微生物体は、外因性4-ヒドロキシブチナールレダクターゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XIII参照)。例えば、4-ヒドロキシブチナールレダクターゼは、ゲオバシルス・サーモグルコシダシウスadh1遺伝子によってコードすることができる。別の実施態様において、微生物体は、外因性ピルビン酸デヒドロゲナーゼサブユニットを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XIV参照)。例えば、外因性ピルビン酸デヒドロゲナーゼはNADH非感受性であり得る。ピルビン酸デヒドロゲナーゼサブユニットは、クレブシエラ・ニューモニエIpdA遺伝子によってコードすることができる。特定の実施態様において、微生物体のピルビン酸デヒドロゲナーゼサブユニット遺伝子にピルビン酸ギ酸リアーゼプロモーターの制御を受けさせることができる。

【0156】

更に別の実施態様において、微生物体は、好気性呼吸器制御調節系をコードしている遺伝子を破壊するように遺伝子修飾されている(実施例XV参照)。例えば、破壊は、arcA遺伝子の破壊であり得る。当該生物体は、リンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードしている遺伝子の破壊を更に含むことができる。更なる実施態様において、微生物体は、外因性NADH非感受性クエン酸シンターゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XV参照)。例えば、NADH非感受性クエン酸シンターゼは、glfAのR163L変異体などのglfAによってコードすることができる。更に別の実施態様において、微生物体は、外因性ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼを発現するように遺伝子修飾されている(実施例XVI参照)。例えば、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼは、ヘモフィルス・インフルエンザのホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子によってコードすることができる。BDOの生成の向上のための本明細書に例示される菌株を、適切な修飾を加えて同様に使用して、他の所望の生成物、例えば、4-ヒドロキシ酪酸又は本明細書に開示されている他の

10

20

30

40

50

所望の生成物を生成することができることが理解されよう。

【0157】

本発明は追加的に、4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、スクシニル-CoA レダクターゼ(アルデヒド形成)；4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ；及び、4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼを含む4-ヒドロキシブタナール経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、4-ヒドロキシブタナールを生成するための方法を提供する(図58、工程A-C-D参照)。本発明はまた、4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ；4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ；及び、4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼを含む4-ヒドロキシブタナール経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、4-ヒドロキシブタナールを生成するための方法を提供する(図58、工程B-C-D参照)。

10

20

30

40

50

【0158】

本発明は更に、4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、コハク酸レダクターゼ；4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、及び4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼを含む4-ヒドロキシブタナール経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、4-ヒドロキシブタナールを生成するための方法を提供する(図62、工程F-C-D参照)。更に別の実施態様において、本発明は、4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、又はグルタミン酸デヒドロゲナーゼ又はグルタミン酸トランスアミナーゼ及びグルタミン酸デカルボキシラーゼ及び4-アミノ酪酸デヒドロゲナーゼ又は4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ；4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ；及び、4-ヒドロキシ酪酸レダクターゼを含む4-ヒドロキシブタナール経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、4-ヒドロキシブタナールを生成するための方法を提供する(図62、工程B又は((J若しくはK)-L-(M若しくはN))-C-D参照)。

【0159】

本発明はまた、4-ヒドロキシブタナールを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブタナール経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ；及び、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼを含む4-ヒドロキシブタナール経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、4-ヒドロキシブタナールを生成するための方法を提供する(図62、工程X-Y-Z参照)。本発明は更に、4-ヒドロキシブチリル-CoAを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブチリル-CoA経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ；及び、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)を含む4-ヒドロキシブチリル-CoA経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、4-ヒドロキシブチリル-CoAを生成するための方法を提供する(図62、工程X-Y-AA参照)。

【0160】

本発明は追加的に、ブトレシンを生成するのに十分な量で発現されるブトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、コハク酸レダクターゼ；4-アミノ酪酸デヒドロゲナーゼ又は4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ；4-アミノ酪酸レダクターゼ；及び、ブトレシンデヒドロゲナーゼ又はブトレシントランスアミナーゼを含むブトレシン経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、ブトレシンを生成するための方法を提供する(図63、工程F-M/N-C-D/E参照)。更に別の実施態様において、本発明は、ブトレシンを生成するのに十分な量で発現されるブトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ；4-アミノ酪酸デヒドロゲナーゼ又は4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ；4-アミノ酪酸レダクターゼ

；及び、プトレシンデヒドロゲナーゼ又はプトレシントランスアミナーゼを含むプトレシン経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、プトレシンを生成するための方法を提供する(図63、工程B-M/N-C-D/E参照)。本発明は追加的に、プトレシンを生成するのに十分な量で発現されるプトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ又はグルタミン酸トランスアミナーゼ；グルタミン酸デカルボキシラーゼ；4-アミノ酪酸レダクターゼ；及び、プトレシンデヒドロゲナーゼ又はプトレシントランスアミナーゼを含むプトレシン経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、プトレシンを生成するための方法を提供する(図63、工程J/K-L-C-D/E参照)。

【0161】

本発明は、別の実施態様において、プトレシンを生成するのに十分な量で発現されるプトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-アミノ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ又は5-アミノ-2-オキソペンタン酸トランスアミナーゼ；5-アミノ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ；及び、プトレシンデヒドロゲナーゼ又はプトレシントランスアミナーゼを含むプトレシン経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、プトレシンを生成するための方法を提供する(図63、工程O-P/Q-R-D/E参照)。また、プトレシンを生成するのに十分な量で発現されるプトレシン経路酵素をコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含み、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ；5-アミノ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ又は5-アミノ-2-オキソペンタン酸トランスアミナーゼ；オルニチンデヒドロゲナーゼ又はオルニチントランスアミナーゼ；及び、オルニチンデカルボキシラーゼを含むプトレシン経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、プトレシンを生成するための方法も提供される(図63、工程O-P/Q-S/T-U参照)。本明細書に開示された経路のいずれかを含む微生物体を、4-HB、4-HBaI、BDO又はプトレシンを含む、所望の生成物又は中間体を生成するために使用することができることが理解される。

【0162】

本発明の方法において、1つ以上の外因性核酸のいずれかを微生物体に導入して、本発明の非天然微生物体を作製できることが理解される。例えば、4-HB、BDO、THF又はGBL生合成経路を微生物体に付与するように核酸を導入することができる。代替的に、コード化核酸を導入して、4-HB、BDO、THF又はGBL生合成の能力を付与するための必要な反応のいくつかを触媒する生合成の能力を有する中間微生物体を作製することができる。例えば、4-HB生合成経路を有する非天然微生物体は、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ；4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼとCoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ；4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼとCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ；CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼとスクシニル-CoAシンテターゼ；及び、スクシニル-CoAシンテターゼとグルタミン酸デカルボキシラーゼ等の組合せなどの所望の酵素をコードしている少なくとも2つの外因性核酸を含むことができる。従って、生合成経路の2つ以上の酵素の任意の組合せを本発明の非天然微生物体に含めることができることが理解される。同様に、所望の生合成経路の酵素の組合せが対応する所望の生成物の生成をもたらすのであれば、要望に応じて、生合成経路の3つ以上の酵素、例えば、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼとCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ；CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼとスクシニル-CoAシンテターゼ；4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼとCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼとグルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ等の任意の組合せを本発明の非天然微生物体に含めることができることが理解される。

【0163】

同様に、例えば、BDO生成を付与するために導入される任意の1つ以上の外因性核酸に関して、BDO生合成経路を有する非天然微生物体は、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ；4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと4

10

20

30

40

50

-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼ; 4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと酪酸キナーゼ; 4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼとホスホトランスブチリラーゼ; 4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼ; 4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとアルコールデヒドロゲナーゼ; 4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼ、4-アミノ酪酸-CoAトランスフェラーゼと4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ; 4-アミノ酪酸キナーゼと4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)等の組合せなどの所望の酵素をコードしている少なくとも2つの外因性核酸を含むことができる。従って、生合成経路の2つ以上の酵素の任意の組合せを本発明の非天然微生物体を含めることができることが理解される。同様に、生合成経路の3つ以上の酵素、例えば、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼと4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼ; 4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと酪酸キナーゼとホスホトランスブチリラーゼ; 4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼ; 4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼとアルコールデヒドロゲナーゼ; 酪酸キナーゼとホスホトランスブチリラーゼとアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼ; 4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼと4-アミノブチリル-CoAレダクターゼと4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ; 3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼと3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼと4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ等の任意の組合せを本発明の非天然微生物体を含めることができることが理解される。同様に、所望の生合成経路の酵素の組合せが対応する所望の生成物の生成をもたらすのであれば、要望に応じて、本明細書に開示される生合成経路の4つ又は5つ以上の酵素の任意の組合せを本発明の非天然微生物体を含めることができる。

10

20

30

40

50

【0164】

本明細書に記載の非天然微生物体のいずれかを培養して、本発明の生合成生成物を生成及び/又は分泌させることができる。例えば、4-HB生産体を4-HBの生合成生成のために培養することができる。4-HBを以下に説明するように単離又は処理して、GBL、THF及び/又はBDOを生成することができる。同様に、BDO生産体をBDOの生合成生成のために培養することができる。本明細書に開示されるように、BDO系統の化合物の化学合成のために、BDOを単離又は更に処理することができる。

【0165】

成長培地は、例えば、炭素源を非天然微生物に供給することができる任意の炭水化物源を含むことができる。当該供給源は、例えば、グルコース、スクロース、キシロース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、フルクトース及びデンプンなどの糖を含む。他の炭水化物源は、例えば、再生可能な原料及びバイオマスを含む。本発明の方法において原料として使用できる例示的な種類のバイオマスは、セルロース系バイオマス、ヘミセルロース系バイオマス及びリグニン原料又は原料の一部を含む。当該バイオマス原料は、例えば、グルコース、スクロース、キシロース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、フルクトース及びデンプンなどの炭素源として有用な炭水化物基質を含む。本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン及び本発明の他の化合物の生成のための本発明の微生物体を培養するために、先に例示したもの以外の再生可能な原料及びバイオマスを使用することもできることを理解するであろう。

【0166】

従って、本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、炭水化物などの炭素源上で成長させると本発明の生合成化合物を分泌する非天然微生物体を作製できることを理解するであろう。当該化合物は、例えば、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン、並びに4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路及び/若しくは4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路の組合せにおける中間体代謝物質を含む。必要なこと

は、図1に示される1つ以上の酵素活性を操作して、例えば、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシン生合成経路の一部又は全てを含む所望の化合物又は中間体の生合成を達成することである。従って本発明は、炭水化物上で成長すると4-HBを分泌し、炭水化物上で成長するとBDOを分泌し、且つ/又は炭水化物上で成長すると図1、8-13、58、62若しくは63に示される中間代謝物質のいずれかを分泌する非天然微生物体を提供する。本発明のBDO生成微生物体は、例えば、コハク酸、スクシニル-CoA、 α -ケトグルタル酸、コハク酸セミアルデヒド、4-HB、4-ヒドロキシブチリルリン酸、4-ヒドロキシブチリル-CoA(4-HB-CoA)及び/又は4-ヒドロキシブチリアルデヒドから合成を開始することができる。

【0167】

いくつかの実施態様において、培養条件は、嫌気性又は実質的に嫌気性の成長又は維持条件を含む。例示的な嫌気性条件は、既に説明されており、当該技術分野で周知である。発酵プロセスのための例示的な嫌気性条件を以下の実施例に記載する。これらの条件のいずれかを、非天然微生物体並びに当該技術分野で周知の他の嫌気性条件とともに採用することができる。当該嫌気性条件下において、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシン生産体は、5~10mM以上の細胞内濃度、並びに既に例示された全ての他の濃度でそれぞれモノマー4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシンを合成することができる。

【0168】

本発明の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシン生成非天然微生物体に関して多くの下流化合物を生成することもできる。本発明の4-HB生成微生物体に関して、モノマー4-HB及びGBLが培養培地に平衡状態で存在する。4-HBのGBLへの変換を、例えば、微生物体を酸性pH培地で培養することによって効率的に達成することができる。7.5以下のpH、特に5.5以下のpHは、自然に4-HBをGBLに変換する。

【0169】

当該技術分野で周知の様々な方法を使用して、得られたGBLを4-HB及び他の成分から分離することができる。当該分離方法は、例えば、実施例に例示される抽出手順、並びに連続液液抽出、浸透気化、メンブレン濾過、メンブレン分離、逆浸透、電気透析、蒸留、結晶化、遠心、抽出濾過、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー及び限外濾過を含む方法を含む。上記方法の全てが当該技術分野で周知である。分離されたGBLを例えば蒸留によって更に精製することができる。

【0170】

本発明の4-HB生成非天然微生物体から生成することができる別の下流化合物は、例えばBDOを含む。この化合物を例えばGBLの化学的水素化によって合成することができる。化学的水素化反応は、当該技術分野で周知である。1つの例示的な手順は、1,4-ブタンジオールを生成するために、異種又は同種水素化触媒を水素、又は化学量論的若しくは触媒的に使用される水素化物系還元剤とともに使用して、培養物に由来する4-HB及び/又はGBL或いはこれらの2つの成分の混合物を化学的に還元することを含む。

【0171】

当該技術分野で周知の他の手順も上記化学反応に等しく適用可能であり、例えば、酸化銅及び酸化亜鉛触媒による蒸気相でのガンマ-ブチロラク톤の水素化分解が記載されている国際公開公報第82/03854号(Bradleyらの特許)を含む。英国特許第1,230,276号には、酸化銅-酸化クロム触媒を使用するガンマ-ブチロラク톤の水素化が記載されている。水素化は、液相で実施される。高い反応器全圧を有するバッチ反応も例示されている。反応器における反応物質及び生成物の分圧は、それぞれの露点を十分に上回る。英国特許第1,314,126号には、酸化ニッケル-コバルト-トリウム触媒による液相でのガンマ-ブチロラク톤の水素化が記載されている。バッチ反応が、高い反応器全圧、及びそれぞれの成分の露点を十分に上回る成分分圧を有するものとして例示されている。英国特許1,344,557号には、酸化銅-酸化クロム触媒による液相でのガンマ-ブチロラク톤の水素化が記載されている。場合によっては蒸気相又は蒸気含有混合相が好適であることが示される。高い反応器全圧を使用する連続流管状反応器が例示されている。英国特許第1,512,751号には、酸化銅-酸化クロム触媒による液相でのガンマ-ブチロラク톤の1,4-ブタンジオールへの

水素化が記載されている。高い反応器全圧を有し、確定可能な場合は、それぞれの露点を十分に上回る反応物質及び生成物の分圧を有するバッチ反応が例示されている。米国特許第4,301,077号には、Ru-Ni-Co-Zn触媒によるガンマ-ブチロラク톤の1,4-ブタンジオールへの水素化が記載されている。この反応を液相又は気相或いは気液混合相で実施することができる。反応器全圧が高く、反応器生産性が比較的低い連続流液相反応が例示されている。米国特許第4,048,196号には、酸化銅-酸化亜鉛触媒を用いたガンマ-ブチロラク톤の液相水素化による1,4-ブタンジオールの製造が記載されている。更に、高い反応器全圧並びに高い反応物質及び生成物の分圧で動作する連続流管状反応器が例示されている。また、米国特許第4,652,685号には、ラク톤のグリコールへの水素化が記載されている。

10

【0172】

本発明の4-HB生成微生物体から生成できる更なる下流化合物は、例えばTHFを含む。この化合物を例えばGBLの化学的水素化によって合成することができる。GBLのTHFへの変換のために適用可能な当該技術分野で周知の1つの例示的な手順は、例えば、異種又は同種水素化触媒を水素、又は化学量論的若しくは触媒的に使用される水素化物系還元剤とともに使用して、培養物に由来する4-HB及び/又はGBL或いはこれらの2つの成分の混合物を化学的に還元して、テトラヒドロフランを生成することを含む。当該技術分野で周知の他の手順も上記化学反応に等しく適用可能であり、例えば、大表面積ゾル-ゲル経路で調製された水素化触媒が記載されている米国特許第6,686,310号を含む。マレイン酸のテトラヒドロフラン(THF)及び1,4-ブタンジオール(BDO)への還元、並びにガンマブチロラクトンからテトラヒドロフラン及び1,4-ブタンジオールへの還元のためのプロセスも記載されている。

20

【0173】

これらの培養条件は、例えば、液体培養手順並びに発酵及び他の大規模培養手順を含むことができる。以下の実施例に更に記載されるように、嫌気性又は実質的に嫌気性培養条件下で本発明の生合成生成物の特に有用な収率を得ることができる。

【0174】

4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシンの生成について試験する好適な精製及び/又はアッセイを、周知の方法を使用して実施することができる。好適な2つ組みの培養物、例えば3つ組培養物を、試験すべき各操作菌株について成長させることができる。例えば、操作生成宿主における生成物及び副産物の形成を監視することができる。最終生成物及び中間体並びに他の有機化合物を、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)、GC-MS(ガスクロマトグラフィー-質量分析)及びLC-MS(液体クロマトグラフィー-質量分析)、又は当該技術分野で周知の慣例の手順を使用する他の好適な分析法などの方法によって分析することができる。発酵プロセスへの生成物の放出を、培養上澄みを用いて試験することもできる。例えば、グルコース及びアルコールに対しては屈折率検出器を使用し、有機酸に対してはUV検出器を使用するHPLC(Linらの文献、Biotechnol. Bioeng. 90:775-779 (2005))、又は当該技術分野で周知の他の好適なアッセイ及び検出方法によって、副産物及び残留グルコースを定量することができる。外因性DNA配列の個々の酵素又はタンパク質活性を、当該技術分野で周知の方法を使用してアッセイすることもできる。

30

40

【0175】

当該技術分野で周知の様々な方法を使用して、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生成物を培養物における他の成分から分離することができる。当該分離方法は、例えば、抽出手順、並びに連続液液抽出、浸透気化、メンブレン濾過、メンブレン分離、逆浸透、電気透析、蒸留、結晶化、遠心、抽出濾過、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー及び限外濾過を含む方法を含む。上記方法の全てが当該技術分野で周知である。

【0176】

本発明は、更に、4-HBを製造する方法を提供する。該方法は、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-Co

50

Aシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸：コハク酸セミアルデヒドトランスアミラーゼ、 α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ又はグルタミン酸デカルボキシラーゼをコードしている少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)生合成経路を有する非天然微生物体を、モノマー4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)を生成するのに十分な時間にわたって実質的に嫌気性条件下で発酵させることを含み、そのプロセスは、流加発酵及びバッチ分離；流加発酵及び連続分離、又は連続発酵及び連続分離を含む。

【0177】

4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、GBL、BDO及び/又はTHF又はブトレシンの製造のために、上記培養及び化学的水素化をスケールアップし、連続的に成長させることができる。例示的な成長手順は、例えば、流加発酵及びバッチ分離；流加発酵及び連続分離、又は連続発酵及び連続分離を含む。これらのプロセスの全てが当該技術分野で周知である。4-HB生産体を採用すると、上記水素化手順を発酵などの連続培養法と同時に採用することによって、4-HB生合成とGBL、BDO及び/又はTHFへの化学的変換を同時に行うことが可能になる。他の水素化手順も当該技術分野で周知であり、本発明の方法に等しく適用され得る。

【0178】

発酵手順は、商業的な量の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシンの生合成生成に特に有用である。概して、且つ非連続培養手順と同様に、連続的及び/又はほぼ連続的な4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシンの生成は、対数期の成長を維持及び/又はほぼ維持するための十分な栄養物及び培地で本発明の非天然4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生成生物体を培養することを含む。当該条件下の連続培養は、例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日又は7日以上を含むことができる。加えて、連続培養は、1週間、2週間、3週間、4週間又は5週間以上及び数カ月までを含むことができる。代替的に、本発明の生物体を、特定の用途に好適であれば数時間培養することができる。連続的及び/又はほぼ連続的な培養条件は、これらの例示的な期間内の全ての時間間隔を含むこともできることが理解されるべきである。本発明の微生物体を培養する時間は、所望の目的のための十分な量の生成物を生成するのに十分な時間に対応することが更に理解される。

【0179】

発酵手順は、当該技術分野で周知である。簡単に述べると、本発明の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO若しくはブトレシン又は中間体を含む他の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO若しくはブトレシン誘導生成物の生合成生成のための発酵を、例えば、流加発酵及びバッチ分離；流加発酵及び連続分離、又は連続発酵及び連続分離に利用することができる。当該技術分野で周知のバッチ及び連続発酵手順を、以下の実施例に更に例示する。

【0180】

モノマー4-HBを含む、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシンのそれぞれ実質的な量の連続生成のために、本発明の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生産体を使用する上記発酵手順に加えて、4-HB生産体には、例えば、モノマー4HBの例えばGBL、BDO及び/又はTHFへの化学的変換について先述されたような、生成物を他の化合物又は生成物へ変換するための化学合成手順を同時に施すことができる。同様に、例えば、BDO生産体にはBDOの例えばTHF、GBL、ピロリドン及び/又は他のBDO系統の化合物への化学的変換について先述されたような化学合成手順を同時に施すことができる。加えて、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生産体の生成物を発酵培養物から分離し、続いて望ましいならば、本明細書に開示されるように生成物を他の化合物へ化学変換させることができる。

【0181】

簡単に述べると、発酵プロセスにおけるGBLの水素化を、Frostらの文献(Biotechnology Progress 18:201-211 (2002))に記載されているように実施することができる。発酵時の水素化のための別の手順は、例えば、米国特許第5,478,952号に記載されている方法を含む。この方法を以下の実施例に更に例示する。

【0182】

10

20

30

40

50

従って、本発明は、また、 γ -ブチロラクトン (GBL)、テトラヒドロフラン (THF) 又は 1,4-ブタンジオール (BDO) を製造する方法を提供する。該方法は、4-ヒドロキシブタン酸 (4-HB) 及び/又は 1,4-ブタンジオール (BDO) 生合成経路を有し、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、CoA-非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoA シンテターゼ、CoA-依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシ酪酸:CoA トランスフェラーゼ、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、 γ -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブタン酸キナーゼ、ホスホトランスブチリラーゼ、CoA-非依存性 1,4-ブタンジオールセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA-依存性 1,4-ブタンジオールセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA-非依存性 1,4-ブタンジオールアルコールデヒドロゲナーゼ又は CoA-依存性 1,4-ブタンジオールアルコールデヒドロゲナーゼをコードしている少なくとも 1 つの外因性核酸を含む経路を有する非天然微生物体を、1,4-ブタンジオール (BDO)、GBL 又は THF を生成するための十分な時間にわたって実質的に嫌気性条件下で発酵することを含み、該発酵は、流加発酵及びバッチ分離；流加発酵及び連続分離、又は連続発酵及び連続分離を含む。

10

20

30

40

50

【0183】

本明細書に記載の 4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO 又は ブトレシン 及び本発明の他の生成物の生合成に加え、本発明の非天然微生物体及び方法を、互いの組合せで、並びに当該技術分野で周知の他の微生物体及び方法との組合せで利用して、他の経路による生成物生合成を達成することができる。例えば、4-HB 生産体及び化学的工程の使用以外の、又は BDO 生産体の直接的な使用以外の BDO を生成するための 1 つの別法は、本明細書に例示される 4-HB 又は 4-HB 生成物を BDO に変換することが可能な別の微生物体を添加することによるものである。

【0184】

1 つの当該手順は、例えば、以上及び以下に記載されている、4-HB を生成するための本発明の 4-HB 生成微生物体の発酵を含む。次いで、4-HB を、例えば BDO、GBL 及び/又は THF に変換する第 2 の微生物体に対する基質として使用することができる。4-HB を第 2 の生物体の別の培養物に直接添加するか、又は例えば細胞分離によって 4-HB 生産体の本来の培養物からこれらの微生物体を除去し、次いで第 2 の生物体の発酵プロセスへの後の添加を利用して、中間精製工程を経ずに、最終生成物を生成することができる。BDO への変換のために基質として 4-HB を生化学的に利用する能力を有する 1 つの例示的な第 2 の生物体は、例えばク

【0185】

従って当該手順は、例えば、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO 又は ブトレシン 経路中間体を生成する微生物体の発酵を含む。次に 4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO 又は ブトレシン 経路中間体は、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO 又は ブトレシン 経路中間体を 4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO 又は ブトレシン へ変換する第 2 の微生物体の基質として使用することができる。4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO 又は ブトレシン 経路中間体は、第 2 の生物体の別の培養物へ直接添加することができるか、又は例えば細胞分離によって 4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO 又は ブトレシン 経路中間体生産体の本来の培養物からこれらの微生物体を除去し、次いで第 2 の生物体の発酵プロセスへの引き続きの添加を利用して、中間体精製工程を経ずに、最終生成物を生成することができる。

【0186】

他の実施態様において、本発明の非天然微生物体及び方法を多種多様な副経路にて組み合わせ、例えば、記載の 4-HB 及び/又は BDO の生合成を達成することができる。これらの実施態様において、本発明の所望の生成物のための生合成経路を異なる微生物体に分離することができる、それらの異なる微生物体を同時培養して、最終生成物を生成することができる。当該生合成スキームにおいて、1 つの微生物体の生成物は、最終生成物が合成されるまで第 2 の微生物体に対する基質である。例えば、1 つの経路中間体を別の経路中間体又は生成物に変換する、例えば、内因性コハク酸などの基質を、4-HB を介して最終生成物 BD

0に変換するための生合成経路を含む微生物体を構築することによって、BDOの生合成を先述のように達成することができる。代替的に、同じ容器内の2つの生物体を使用する同時培養又は同時発酵によりBDOを微生物体から生合成生成することもできる。第1の微生物体は、4-HBをコハク酸から生成する遺伝子を有する4-HB生産体であり、第2の微生物体は、4-HBをBDOに変換する遺伝子を有するBDO生産体である。例えば、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシンの生合成は、1つの経路中間体を別の経路中間体又は生成物に変換する生合成経路を含む微生物体の構築により達成することができる。代替的に、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシンはまた、同じ容器内の2つの生物体を使用する同時培養又は同時発酵により微生物体から生合成生成することができ、ここで第1の微生物体は4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシン中間体を生成し、第2の微生物体はこの中間体を4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシンに変換する。 10

【0187】

本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、副経路を有する他の非天然微生物体の同時培養、並びに本発明の4-HB、BDO、GBL及びTHF生成物を生成するための当該技術分野で周知の他の化学的及び/又は生化学的手順の組合せにより、他の微生物体とともに本発明の非天然微生物体及び方法に対する多種多様な組合せ及び置換が存在することを理解するであろう。

【0188】

本発明の方法において、1つ以上の外因性核酸のいずれかを微生物体に導入し、本発明の非天然微生物体を作製することが理解される。例えば、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシン生合成経路を微生物体に付与するために、核酸を導入することができる。代替的に、コード化核酸を導入し、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシン生合成能を付与するのに必須の反応の一部を触媒する生合成能を有する中間体微生物体を作製することができる。例えば、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシン生合成経路を有する非天然微生物体は、本明細書に開示された酵素の組合せ(実施例及び図1、8-13、58、62及び63参照)などの、所望の酵素又はタンパク質をコードしている少なくとも2つの外因性核酸を含むことができる。従って本発明の非天然微生物体には、生合成経路の2つ以上の酵素又はタンパク質の任意の組合せが含まれ得ることが理解される。同様に、所望の生合成経路の酵素及び/又はタンパク質の組合せが対応する所望の生成物の生成を生じる限りは、本発明の非天然微生物体には、例えば、所望且つ本明細書に明らかにされたように、生合成経路の3つ以上の酵素又はタンパク質の任意の組合せなどが含まれ得ることが理解される。同様に、所望の生合成経路の酵素及び/又はタンパク質の組合せが対応する所望の生成物の生成を生じる限りは、本発明の非天然微生物体には、所望のように、本明細書に明らかにされた生合成経路の4つ以上の酵素又はタンパク質の任意の組合せが含まれ得る。 20 30

【0189】

より良好な生産体を作製するために、代謝モデル化を利用して成長条件を最適化することができる。モデル化を使用して、該経路の利用を更に最適化する遺伝子ノックアウトを設計することもできる(例えば、米国特許公報第2002/0012939号、同第2003/0224363号、同第2004/0029149号、同第2004/0072723号、同第2003/0059792号、同第2002/0168654号及び同第2004/0009466号並びに米国特許第7,127,379号参照)。モデル化分析は、代謝を4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はプトレシンのより効率的な生成にシフトさせることの細胞成長に対する影響の確実な予測を可能にする。 40

【0190】

所望の生成物の生合成に有利である代謝の変調を同定及び設計するための1つの計算論的方法は、OptKnock計算論的フレームワークである(Burgardらの文献、Biotechnol. Bioeng. 84:647-657(2003))。OptKnockは、目標生成物を過剰生成する遺伝的に安定な微生物をもたらす遺伝子欠失又は破壊戦略を示唆する代謝モデル化及びシミュレーションプログラムである。具体的には、該フレームワークは、所望の生化学物質を細胞成長の必須副産物とする遺伝子操作を示唆するために、微生物の完全代謝及び/又は生化学ネットワークを調査する。戦略的に配置された遺伝子欠失又は他の機能的遺伝子破壊を介して、生化学 50

的生成と細胞成長とを組み合わせることによって、バイオリアクターにおける長時間の後に操作菌株に加えられた成長選択圧力は、強制成長に組合せた生化学生成の結果として性能を向上させる。最後に、遺伝子欠失が構築されると、OptKnockによって選択された遺伝子がゲノムから完全に除去されることになるため、設計された菌株がそれらの野生型状態に復帰する可能性は無視できる。従って、この計算論的手法は、所望の生成物の生合成をもたらす代替経路を同定するために使用され得るか、又は所望の生成物の生合成の更なる最適化のために非天然微生物体と併用され得る。

【0191】

簡単に述べると、OptKnockは、本明細書では、細胞代謝をモデル化するための計算論的方法及びシステムを指すように使用される用語である。OptKnockプログラムは、特定の制約をフラックス収支解析(FBA)モデルに組み込むモデル及び方法のフレームワークに関する。これらの制約は、例えば、定性的動態情報、定性的制御情報、及び/又はDNAマイクロアレイ実験データを含む。OptKnockは、また、例えば、フラックス収支モデルを介して誘導されたフラックス境界を緻密化し、続いて遺伝子付加又は欠失の存在下で代謝ネットワークの性能限界を探索することによって、様々な代謝上の問題に対する解を計算する。OptKnock計算論的フレームワークは、代謝ネットワークの性能限界の効果的な問い合わせを可能にするモデル公式の構築を可能にし、得られた混合整数線形プログラミング問題を解くための方法を提供する。本明細書においてOptKnockと称する代謝モデル化及びシミュレーション方法は、例えば、2002年1月10日に出願された米国特許公報第2002/0168654号、2002年1月10日に出願された国際特許第PCT/US02/00660号、及び2007年8月10日に出願された米国特許公報第2009/0047719号に記載されている。

【0192】

生成物の生合成生成に有利である代謝の変調を同定及び設計するための別の計算論的方法は、SimPheny(登録商標)という名称の代謝モデル化及びシミュレーションシステムである。この計算論的方法及びシステムは、例えば、2002年6月14日に出願された米国特許公報第2003/0233218号、及び2003年6月13日に出願された国際特許出願第PCT/US03/18838号に記載されている。SimPheny(登録商標)は、インシリコにおいてネットワークモデルを作製し、生物系の化学反応を介して質量、エネルギー又は電荷のフラックスをシミュレートして、系における化学反応のあらゆる可能な機能性を含む解空間を画定することによって、生物系のための許容活性の範囲を決定するために使用できる計算論的システムである。この手法は、含まれる反応の既知の化学量論などの制約、並びに反応を介する最大限のフラックスに伴う反応の熱力学及び容量の制約によって解空間が画定されるため、制約ベースのモデル化と呼ばれる。これらの制約によって画定される空間を調べて、生物系又はその生化学的成分の表現的な能力及び挙動を確認することができる。

【0193】

これらの計算論的手法は、生物系が柔軟であり、多くの異なる方式で同じ結果に到達できるため、生物学的現実と一致する。生物系は、全ての生態系が直面しなければならない基本的な制約によって制限された進化メカニズムを介して設計される。従って、制約ベースのモデル化戦略は、これらの包括的な現実を包含する。更に、制約の緻密化を介してネットワークモデルに対して更なる制限を連続的に加える能力は、解空間サイズの縮小をもたらすことによって、生理学的性能又は表現型を予測できる精度を向上させる。

【0194】

本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、宿主微生物体において所望の化合物の生合成を設計及び実施する代謝モデル化及びシミュレーションのための様々な計算論的フレームワークを適用することができる。当該代謝モデル化及びシミュレーション方法は、例えば、SimPheny(登録商標)及びOptKnockとして先に例示した計算論的システムを含む。本発明を例示するために、モデル化及びシミュレーションのためのOptKnock計算論的フレームワークに関していくつかの方法を本明細書に記載する。当業者は、OptKnockを使用する代謝の変調の同定、設計及び実施を、当該技術分野で周知の当該他の代謝モデル化及びシミュレーション計算論的フレームワーク及び方法のいずれかに適用する方式

を把握するであろう。

【0195】

上記方法は、破壊する代謝反応の1つのセットを提供することになる。そのセット又は代謝修飾内の各反応を排除させると、生物体の成長期を通じて、必須生成物としての所望の生成物を得ることができる。その反応が既知であるため、二層のOptKnock問題の解は、また、反応のセット内の各反応を触媒する1つ以上の酵素をコードしている1つ以上の関連遺伝子を提供することになる。反応のセット、及び各反応に参加する酵素をコードしているそれらの対応する遺伝子の同定は、一般には、酵素とコード化遺伝子の間の関係を有する反応データベースによる反応の相関を介して実施される。

【0196】

いったん同定されると、所望の生成物の生成を達成するために破壊されることになる反応のセットが、セット内の各代謝反応をコードしている少なくとも1つの遺伝子の機能的破壊によって標的細胞又は生物体において実施される。反応セットの機能的破壊を達成する1つの特に有用な手段は、各コード化遺伝子の欠失によるものである。しかし場合によっては、例えば、プロモーター又は制御因子に対するシス結合部位などの制御領域の変異、欠失を含む他の遺伝子異常によって、或いは多くの箇所のいずれかにおけるコード化配列の切断によって、反応を破壊することが有益であり得る。例えば、生成物の連結の迅速な評価が所望される場合、又は遺伝子復帰が起こりそうもない場合に、遺伝子セットを完全に欠失させないこれらの後者の異常が有益であり得る。

【0197】

所望の生成物の成長連結生合成を含む生合成をもたらすことができる、破壊又は代謝修飾すべき反応の更なるセットに繋がる上記二層OptKnock問題に対する更なる生産的解を同定するために、整数カットと称される最適化方法を実施することができる。この方法は、各反復において整数カットと呼ばれる追加的な制約を組み込みながら、先に例示したOptKnock問題を反復して解くことによって進行する。整数カット制約は、解法手順が、生成物生合成を成長に強制的に連結させる任意の先の反復において同定された全く同一の反応セットを選択するのを効果的に防止する。例えば、既に同定された成長連結代謝修飾が、破壊のための反応1、2及び3を指定すると、次の制約は、後続の解において同じ反応が同時に考慮されることを防止する。整数カット法は、当該技術分野で周知であり、例えば、Burgardらの文献、Biotechnol. Prog. 17:791-797(2001)に見いだされ得る。代謝モデル化及びシミュレーションのためのOptKnock計算論的フレームワークとそれらの併用に関して本明細書に記載されている全ての方法と同様に、反復的計算論的解析における冗長性を低減する整数カット法を、例えばSimPheny(登録商標)を含む当該技術分野で周知の他の計算論的フレームワークに適用することができる。

【0198】

本明細書に例示される方法は、同定された遺伝子改変を保持するように操作された細胞又は生物体の成長への標的の生化学生成物の生成の強制連結を含む、所望の生成物を生合成生成する細胞及び生物体の構築を可能にする。従って本明細書に記載の計算論的方法は、OptKnock又はSimPheny(登録商標)から選択されるインシリコ法によって同定される代謝修飾の同定及び実施を可能にする。代謝修飾のセットは、例えば、1つ以上の生合成経路酵素の添加、及び/又は例えば遺伝子欠失による破壊を含む1つ以上の代謝反応の機能的破壊を含むことができる。

【0199】

前述のように、OptKnock方法論は、変異微生物ネットワークが、長時間の成長選択に曝されると、それらの計算により推定された最大成長表現型の方に進化し得ることを前提として開発された。別の表現をすると、その手法は、選択圧力下で自己最適化する生物体の能力を強化する。OptKnockフレームワークは、ネットワーク化学量論に基づく生化学的生成と細胞成長の間の連結を強制する遺伝子欠失の組合せの網羅的列挙を可能にする。最適遺伝子/反応ロックアウトの同定は、得られたネットワークに対する最適な成長解が興味深い生化学物質を過剰生成するように活性反応のセットを選択する二層最適化問題の解を

必要とする(Burgardらの文献、Biotechnol. Bioeng. 84:647-657 (2003))。

【0200】

E. コリ代謝のインシリコ化学量論モデルを採用して、既に例示されており、且つ例えば、米国特許公報第2002/0012939号、同第2003/0224363号、同第2004/0029149号、同第2004/0072723号、同第2003/0059792号、同第2002/0168654号及び同第2004/0009466号並びに米国特許第7,127,379号に記載されている代謝経路のための必須遺伝子を同定することができる。本明細書に開示されるように、OptKnock数理フレームワークを適用して、所望の生成物の成長連結生成をもたらす遺伝子欠失を正確に適用することができる。更に、二層OptKnock問題の解は、欠失の1つのセットのみを提供する。全ての有意味の解、即ち成長連結生成形成をもたらすロックアウトの全てのセットを列挙するために、整数カットと称される最適化技術を実施することができる。これは、前述のように、各反復において整数カットと称する追加的な制約を組み込みながらOptKnock問題を反復的に解くことを含む。

10

【0201】

先に例示された方法及び以下の実施例に更に示される方法は、同定された遺伝子改変を含むように操作された細胞又は生物体の成長に対する標的生化生成物の強制連結生成を含む生合成生成を行う細胞及び生物体の構築を可能にする。この点において、4-HB及び1,4-ブタンジオールが生合成をもたらす代謝の変調が同定された。同定された代謝の変調を用いて構築された微生物株は、非修飾微生物体と比較して、高量の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシンを生成する。これらの菌株を、有利には、例えば、負の選択圧力に曝すことなく、連続発酵プロセスにおいて、4-HB、BDO、THF、GBL、4-HBaI、4-HBCoA又はブトレシンの商業的生産に使用することができる。

20

【0202】

従って、本明細書に記載の計算論的方法は、OptKnock又はSimPheny(登録商標)から選択されるインシリコ法によって同定される代謝修飾の同定及び実施を可能にする。代謝修飾のセットは、例えば、1つ以上の生合成経路酵素の付加、及び/又は例えば遺伝子欠失による破壊を含む1つ以上の代謝反応の機能的破壊を含むことができる。

【0203】

本発明の様々な実施態様の活性に実質的に影響を及ぼさない修飾も、本明細書に示される本発明の定義内に含まれることが理解される。よって、以下の実施例は、本発明を例示することを意図し、限定するものではない。

30

【0204】

本明細書に記載の非天然微生物体のいずれかを培養して、本発明の生合成生成物を生成及び/又は分泌することができる。例えば、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生産体を4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシンの生合成生成のために培養することができる。

【0205】

4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシンの生成のために、組換え株を炭素源及び他の必須栄養物とともに培地で培養する。プロセス全体のコストを低減するために発酵槽に嫌気性条件を維持することが大いに望ましい。例えば、最初に培地に窒素を散布し、次いでフラスコを隔壁及びクリンプキャップで密封することによって当該条件を得ることができる。嫌氣的に成長が観察されない菌株では、限定された通気のために隔壁に小穴をあけることによって微好気性条件を適用することができる。例示的な嫌気性条件は、既に記載されており、当該技術分野で周知である。例示的な好気性及び嫌気性条件は、例えば、2007年8月10日に出版された米国出願公開第2009/0047719号に記載されている。発酵を、本明細書に開示されているように、バッチ式、流加又は連続法で実施することができる。

40

【0206】

望まれる場合は、培養培地を望ましいpHに維持する必要に応じて、NaOH又は他の塩基などの塩基或いは酸を添加することによって、培地のpHを所望のpH、特に7付近のpHなどの中性のpHに維持することができる。分光光度計(600nm)を使用して光学密度を測定することによって成長速度を測定し、経時的な炭素源枯渇を監視することによってグルコース取

50

込み速度を測定することができる。

【0207】

先に例示されているものなどの再生可能原料に加えて、本発明の4-HB、4-HBAl、4-HBCoA、BDO又はプトレシン生成微生物体をその炭素源としてのシンガス上での成長のために修飾することができる。この具体的な実施態様において、1つ以上のタンパク質又は酵素を4-HB、4-HBAl、4-HBCoA、BDO又はプトレシン生成生物体に発現させて、シンガス又は他の気体炭素源を利用するための代謝経路を提供する。

【0208】

シンガス又は生産体ガスとしても既知である合成ガスは、石炭の、並びに農業作物及び残留物を含むバイオマス材料などの炭素質材料のガス化の主要生成物である。シンガスは、主に、 H_2 とCOの混合物であり、石炭、石炭油、天然ガス、バイオマス及び廃棄有機物を含むが、それらに限定されない任意の有機原料のガス化から得ることができる。ガス化は、一般には、高い燃料対酸素比の下で実施される。シンガスは、多くが H_2 及びCOであるが、 CO_2 及び他のガスを少量含むこともできる。従って合成ガスは、CO及び更には CO_2 などのコスト効率の高い気体炭素源を提供する。

【0209】

Wood-Ljungdahl経路は、CO及び H_2 のアセチル-CoA及び酢酸などの他の生成物への変換を触媒する。CO及びシンガスを利用することが可能な生物体は、一般には、Wood-Ljungdahl経路によって包含される酵素及び転換の同じ基本的セットを介して CO_2 及び CO_2/H_2 混合物を利用する能力をも有する。微生物による CO_2 の酢酸への H_2 依存性変換は、COを同じ生物体によって利用することもできること、及び同じ経路が関与することが明らかになったはるか以前に認識されていた。多くのアセトゲンは、 CO_2 の存在下で成長し、必要な還元当量を供給するための水素が存在する限り酢酸などの化合物を生成することが示された(例えば、Drakeの文献、Acetogenesis、3-60頁、Chapman及びHall、ニューヨーク、(1994)参照)。これを以下の式で要約することができる：



従って、Wood-Ljungdahl経路を有する非天然微生物は、アセチル-CoA及び他の所望の生成物を生成するために CO_2 と H_2 の混合物をも利用することができる。

【0210】

Wood-Ljungdahl経路は、当該技術分野で周知であり、2つのブランチ、即ち(1)メチルブランチ及び(2)カルボニルブランチに分けることができる12の反応からなる。メチルブランチは、シンガスをメチル-テトラヒドロ葉酸(メチル-THF)に変換するのに対して、カルボニルブランチは、メチル-THFをアセチル-CoAに変換する。メチルブランチにおける反応は、以下の酵素又はタンパク質：フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼ、メチルテトラヒドロ葉酸シクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ及びメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼによって順に触媒される。カルボニルブランチにおける反応は、以下の酵素又はタンパク質：メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ(例えばAcsE)、コリノイド鉄-硫黄タンパク質、ニッケル-タンパク質アセンブリタンパク質(例えばAcsF)、フェレドキシン、アセチル-CoAシンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ及びニッケル-タンパク質アセンブリタンパク質(例えばCooC)：によって順に触媒される。4-HB、4-HBAl、4-HBCoA、BDO又はプトレシン経路を生成するための十分な数のコード化核酸を導入するための本明細書に示される教示及び指針に従って、当業者は、少なくとも、宿主生物体に存在しないWood-Ljungdahl酵素又はタンパク質をコードしている核酸を導入することに関して、同じ操作設計を実施できることを理解するであろう。従って、修飾された生物体が完全なWood-Ljungdahl経路を含むように、1つ以上のコード化核酸を本発明の微生物体に導入すると、シンガス利用能が付与されることになる。

【0211】

加えて、還元的(可逆性)トリカルボン酸回路、及び/又はヒドロゲナーゼ活性はまた、CO、 CO_2 及び/又は H_2 をアセチル-CoA及び酢酸などの他の生成物へ変換するために使用する

ことができる。還元的TCA経路により炭素固定が可能である生物体は、1つ以上の以下の酵素：ATPクエン酸-リアーゼ、クエン酸リアーゼ、アコニターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、アルファ-ケトグルタル酸：フェロドキシノキシドレダクターゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、スクシニル-CoAトランスフェラーゼ、フマル酸レダクターゼ、フマラーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、NAD(P)H：フェロドキシノキシドレダクターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、及びヒドロゲナーゼ：を利用することができる。具体的には、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ及びヒドロゲナーゼによりCO及び/又はH₂から抽出された還元当量が、還元的TCA回路によるアセチル-CoA又は酢酸へのCO₂固定に利用される。酢酸は、アセチル-CoAトランスフェラーゼ、酢酸キナーゼ/ホスホトランスアセチラーゼ、及びアセチル-CoAシンテターゼなどの酵素により、アセチル-CoAへ変換され得る。アセチル-CoAは、ピルビン酸：フェロドキシノキシドレダクターゼ及び糖新生の酵素により、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン前駆体、グリセルアルデヒド-3-リン酸、ホスホエノールピルビン酸、及びピルビン酸へ変換され得る。4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路を生成するための十分な数のコード化核酸の導入に関して本明細書に示される教示及び指針に従い、当業者は、宿主生物体の非存在下で、還元的TCA経路酵素又はタンパク質をコードしている核酸を少なくとも導入することに関して、同じ操作設計を実行することができることを理解するであろう。従って、修飾された生物体が完全な還元的TCA経路を含むような1以上のコード化核酸の本発明の微生物体への導入は、シンガス利用能を付与する。

10

20

30

40

50

【0212】

従って、本明細書に示される教示及び指針を考慮して、当業者は、炭水化物などの炭素源上で成長させると、本発明の生合成化合物を分泌する非天然微生物体を作製できることが理解される。当該化合物は、例えば、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン、及び4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路における中間代謝物質のいずれかを含む。必要なことは、必要とされる酵素又はタンパク質活性の1種以上を操作して、例えば、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生合成経路の一部又は全ての包含を含む所望の化合物又は中間体の生合成を達成することだけである。従って本発明は、炭水化物又は他の炭素源上で成長させると4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシンを生成及び/又は分泌するか、若しくは炭水化物又は他の炭素源上で成長させると4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路に示される中間代謝物質のいずれかを生成及び/又は分泌する非天然微生物体を提供する。本発明の4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン生成微生物体は、本明細書に開示されるように、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路における中間体から合成を開始することができる。

【0213】

より良好な生産体を作製するために、代謝モデル化を利用して成長条件を最適化することができる。モデル化を使用して、該経路の利用を追加的に最適化する遺伝子ノックアウトを設計することもできる(例えば、米国特許公報第2002/0012939号、同第2003/0224363号、同第2004/0029149号、同第2004/0072723号、同第2003/0059792号、同第2002/0168654号及び同第2004/0009466号並びに米国特許第7,127,379号参照)。モデル化分析は、代謝を4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシンのより効率的な生成にシフトさせることの細胞成長に対する影響の確実な予測を可能にする。

【0214】

所望の生成物の生合成に有利である代謝の変調を同定及び設計するための1つの計算論的方法は、OptKnock計算論的フレームワークである(Burgardらの文献、Biotechnol. Bioeng. 84:647-657 (2003))。OptKnockは、目標生成物を過剰生成する遺伝的に安定な微生物をもたらす遺伝子欠失戦略を示唆する代謝モデル化及びシミュレーションプログラムである。具体的には、該フレームワークは、所望の生化学物質を細胞成長の必須副産物とする遺伝子操作を示唆するために、微生物の完全代謝及び/又は生化学ネットワークを調査する。戦略的に配置された遺伝子欠失又は他の機能的遺伝子破壊を介して、生化学的生成と細胞成長とを連結することによって、バイオリアクターにおける長時間の後に操作された

菌株に加えられた成長選択圧力は、強制的成長連結生化学生成の結果として性能を向上させる。最後に、遺伝子欠失が構築されると、OptKnockによって選択された遺伝子がゲノムから完全に除去されることになるため、設計された菌株がそれらの野生型状態に復帰する可能性は無視できる。従って、この計算論的手法は、所望の生成物の生合成をもたらす代替経路を同定するために使用され得るか、又は所望の生成物の生合成の更なる最適化のために非天然微生物体と併用され得る。

【0215】

簡単に述べると、OptKnockは、本明細書では、細胞代謝をモデル化するための計算論的方法及びシステムを指すように使用される用語である。OptKnockプログラムは、特定の制約をフラックス収支解析(FBA)モデルに組み込むモデル及び方法のフレームワークに関する。これらの制約は、例えば、定性的動態情報、定性的制御情報、及び/又はDNAマイクロアレイ実験データを含む。OptKnockは、また、例えば、フラックス収支モデルを介して誘導されたフラックス境界を緻密化し、続いて遺伝子付加又は欠失の存在下で代謝ネットワークの性能限界を探索することによって、様々な代謝上の問題に対する解を計算する。OptKnock計算論的フレームワークは、代謝ネットワークの性能限界の効果的な問い合わせを可能にするモデル公式の構築を可能にし、得られた混合整数線形プログラミング問題を解くための方法を提供する。本明細書においてOptKnockと称する代謝モデル化及びシミュレーション方法は、例えば、2002年1月10日に出願された米国特許公報第2002/0168654号、2002年1月10日に出願された国際特許第PCT/US02/00660号、及び2007年8月10日に出願された米国特許公報第2009/0047719号に記載されている。

10

20

【0216】

生成物の生合成生成に有利である代謝の変調を同定及び設計するための別の計算論的方法是、SimPheny(登録商標)という名称の代謝モデル化及びシミュレーションシステムである。この計算論的方法及びシステムは、例えば、2002年6月14日に出願された米国特許公報第2003/0233218号、及び2003年6月13日に出願された国際特許出願第PCT/US03/18838号に記載されている。SimPheny(登録商標)は、インシリコにおいてネットワークモデルを作製し、生物系の化学反応を介して質量、エネルギー又は電荷のフラックスをシミュレートして、系における化学反応のあらゆる可能な機能性を含む解空間を画定することによって、生物系のための許容活性の範囲を決定するために使用できる計算論的システムである。この手法は、含まれる反応の既知の化学量論などの制約、並びに反応を介する最大限のフラックスに伴う反応の熱力学及び容量の制約によって解空間が画定されるため、制約ベースのモデル化と呼ばれる。これらの制約によって画定される空間を調べて、生物系又はその生化学的成分の表現的な能力及び挙動を確認することができる。

30

【0217】

これらの計算論的手法は、生物系が柔軟であり、多くの異なる方式で同じ結果に到達できるため、生物学的現実と一致する。生物系は、全ての生態系が直面しなければならない基本的な制約によって制限された進化メカニズムを介して設計される。従って、制約ベースのモデル化戦略は、これらの包括的な現実を包含する。更に、制約の緻密化を介してネットワークモデルに対して更なる制限を連続的に加える能力は、解空間のサイズの縮小をもたらすことによって、生理学的性能又は表現型を予測できる精度を向上させる。

40

【0218】

本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、宿主微生物体において所望の化合物の生合成を設計及び実施する代謝モデル化及びシミュレーションのための様々な計算論的フレームワークを適用することができる。当該代謝モデル化及びシミュレーション方法は、例えば、SimPheny(登録商標)及びOptKnockとして先に例示した計算論的システムを含む。本発明を例示するために、モデル化及びシミュレーションのためのOptKnock計算論的フレームワークに関していくつかの方法を本明細書に記載する。当業者は、OptKnockを使用する代謝の変調の同定、設計及び実施を当該技術分野で周知の当該他の代謝モデル化及びシミュレーション計算論的フレームワーク及び方法のいずれかに適用する方法を把握するであろう。

50

【0219】

上記方法は、破壊する代謝反応の1つのセットを提供することになる。そのセット又は代謝修飾内の各反応を排除させると、生物体の成長期を通じて、必須生成物としての所望の生成物を得ることができる。反応が既知であるため、二層のOptKnock問題の解は、また、反応のセット内の各反応を触媒する1つ以上の酵素をコードしている1つ以上の関連遺伝子を提供することになる。反応のセット、及び各反応に参加する酵素をコードしているそれらの対応する遺伝子の同定は、一般には、酵素とコード化遺伝子の間の関係を有する反応データベースによる反応の相関を介して実施される。

【0220】

いったん同定されると、所望の生成物の生成を達成するために破壊されることになる反応のセットが、セット内の各代謝反応をコードしている少なくとも1つの遺伝子の機能的破壊によって標的細胞又は生物体において実施される。反応セットの機能的破壊を達成する1つの特に有用な手段は、各コード化遺伝子の欠失によるものである。しかし場合によっては、例えば、プロモーター又は制御因子に対するシス結合部位などの制御領域の変異、欠失を含む他の遺伝子異常によって、或いは多くの箇所のいずれかにおけるコード化配列の切断によって、反応を破壊することが有益であり得る。例えば、生成物の連結の迅速な評価が所望される場合、又は遺伝子復帰が起こりそうもない場合に、遺伝子セットを完全に欠失させないこれらの後者の異常が有益であり得る。

【0221】

所望の生成物の成長連結生合成を含む生合成をもたらすことができる、破壊又は代謝修飾すべき反応の更なるセットに繋がる上記二層OptKnock問題に対する更なる生産的解を同定するために、整数カットと称される最適化方法を実施することができる。この方法は、各反復において整数カットと呼ばれる追加的な制約を組み込みながら、先に例示したOptKnock問題を反復して解くことによって進行する。整数カット制約は、解法手順が、生成物生合成を成長に強制的に連結させる任意の先の反復において同定された全く同一の反応セットを選択するのを効果的に防止する。例えば、既に同定された成長連結代謝修飾が、破壊のための反応1、2及び3を指定すると、次の制約は、後続の解において同じ反応が同時に考慮されることを防止する。整数カット法は、当該技術分野で周知であり、例えば、Burgardらの文献、Biotechnol. Prog. 17:791-797(2001)に見いだされ得る。代謝モデル化及びシミュレーションのためのOptKnock計算論的フレームワークとそれらの併用に関して本明細書に記載されている全ての方法と同様に、反復的計算論的解析における冗長性を低減する整数カット法を、例えばSimPheny(登録商標)を含む当該技術分野で周知の他の計算論的フレームワークに適用することができる。

【0222】

本明細書に例示される方法は、同定された遺伝子改変を保持するように操作された細胞又は生物体の成長への標的生化学生成物の生成の強制連結を含む、所望の生成物を生合成生成する細胞及び生物体の構築を可能にする。従って、本明細書に記載の計算論的方法は、OptKnock又はSimPheny(登録商標)から選択されるインシリコ法によって同定される代謝修飾の同定及び実施を可能にする。代謝修飾のセットは、例えば、1つ以上の生合成経路酵素の添加、及び/又は例えば遺伝子欠失による破壊を含む1つ以上の代謝反応の機能的破壊を含むことができる。

【0223】

前述のように、OptKnock方法論は、変異微生物ネットワークが、長時間の成長選択に曝されると、それらの計算により推定された最大成長表現型の方に進化し得ることを前提として開発された。別の表現をすると、その手法は、選択圧力下で自己最適化する生物体の能力を強化する。OptKnockフレームワークは、ネットワーク化学量論に基づく生化学的生成と細胞成長の間の連結を強制する遺伝子欠失の組合せの網羅的列举を可能にする。最適遺伝子/反応ロックアウトの同定は、得られたネットワークに対する最適な成長解が興味深い生化学物質を過剰生成するように活性反応のセットを選択する二層最適化問題の解を必要とする(Burgardらの文献、Biotechnol. Bioeng. 84:647-657 (2003))。

10

20

30

40

50

【0224】

E. コリ代謝のインシリコ化学量論モデルを採用して、既に例示されており、且つ例えば、米国特許公報第2002/0012939号、同第2003/0224363号、同第2004/0029149号、同第2004/0072723号、同第2003/0059792号、同第2002/0168654号及び同第2004/0009466号並びに米国特許第7,127,379号に記載されている代謝経路のための必須遺伝子を同定することができる。本明細書に開示されるように、OptKnock数理フレームワークを適用して、所望の生成物の成長連結生成をもたらす遺伝子欠失を正確に適用することができる。更に、二層OptKnock問題の解は、欠失の1つのセットのみを提供する。全ての有意味の解、即ち成長連結生成形成をもたらすロックアウトの全てのセットを列挙するために、整数カットと称される最適化技術を実施することができる。これは、前述のように、各反復において整数カットと称する追加的な制約を組み込みながらOptKnock問題を反復的に解くことを含む。

10

【0225】

本明細書に開示されているように、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路の所望の活性をコードしている核酸は、宿主生物体に導入することができる。場合によっては、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路酵素又はタンパク質の活性を、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシンの生成を増大するように修飾することが望ましい。例えば、タンパク質又は酵素の活性を増加する既知の変異を、コード化核酸分子に導入することができる。加えて、最適化方法を、酵素又はタンパク質の活性を増加、及び/又は活性の阻害を減少、例えば負の調節因子の活性を減少するために適用することができる。

20

【0226】

当該最適化方法のひとつは、定方向進化である。定方向進化は、酵素の特性を改善及び/又は改変するために特定に遺伝子に標的化された変異の導入に關与する強力な手法である。改善及び/又は改変された酵素は、多くの酵素変種(例えば $>10^4$ 種)の自動化されたスクリーニングを可能にする鋭敏なハイスループットスクリーニングアッセイの開発及び実行を通じて、同定することができる。最適化された特性を伴う酵素をもたらすよう、典型的には、変異誘発及びスクリーニングの反復ラウンドが実行される。変異誘発の遺伝子の領域の同定を補助することができる計算論的アルゴリズムも開発されており、作製され且つスクリーニングされる必要がある酵素変異体の数を著しく減少することができる。多様な変異体ライブラリーの作製に効果がある、多くの定方向進化技術が開発されており(総説に関して、Hibbertらの文献、Biomol.Eng 22:11-19 (2005); Huisman及びLalondeの文献、「製薬及びバイオ産業における生触媒(Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries)」、717-742頁(2007)、Patel(編集)、CRC Press; Otten及びQuaxの文献、Biomol.Eng 22:1-9 (2005); 並びに、Senらの文献、Appl Biochem.Biotechnol 143:212-223 (2007)を参照)、これらの方法は、多くの酵素クラスにわたり広範な特性を改善するために成功裡に適用されている。定方向進化技術により改善及び/又は改変される酵素の特徴は、例えば、非天然基質の変換に関する選択性/特異性; 堅固な高温処理に関する温度安定性; 低又は高pH条件下でのバイオプロセッシングに関するpH安定性; 高い生成物力価を実現し得る、基質又は生成物の忍容性; 非天然基質を含むよう拡大する基質結合を含む、結合(K_m); 生成物、基質、又は重要な中間体による阻害を除去する、阻害(K_i); 所望のフラックスを実現するよう酵素反応速度を増加する、活性(k_{cat}); タンパク質収量及び全般的経路フラックスを増加する、発現レベル; 好気性条件下での空気感受性酵素の操作に関する、酸素安定性; 並びに、酸素の非存在下での好気性酵素の操作に関する、嫌気性活性: を含む。

30

40

【0227】

特定の酵素の所望の特性を標的化するために遺伝子を変異誘発及び多様化する多くの例示的方法が開発されている。当該方法は、当業者に周知である。これらのいずれかを使用し、4-HB、4-HBaI、4-HBCoA、BDO又はブトレシン経路酵素又はタンパク質の活性を改変及び/又は最適化することができる。当該方法は、PCR反応におけるDNAポリメラーゼの忠実度を減少することによりランダム点変異を導入する、EpPCR(Pritchardらの文献、J Theor

50

.Biol. 234:497-509 (2005)) ; 鋳型として環状プラスミド全体が使用されること、及びプラスミドを増幅し、引き続きそこでプラスミドが縦列反復配列で再環状化される細胞へ形質転換するために、最後の2ヌクレオチド上のエキソヌクレアーゼ耐性チオリン酸連結を伴うランダム6-merが使用されること以外はepPCRに類似している、エラープローンローリングサークル増幅法(epRCA)(Fujiiらの文献、Nucleic Acids Res. 32:e145 (2004) ; 及び、Fujiiらの文献、Nat. Protoc. 1:2493-2497 (2006)) ; キメラ遺伝子ライブラリー作製のために、DNAポリメラーゼの存在下でのアニーリング及び伸長のサイクルにより再構成されるランダム断片のプールを作製するための、典型的には2つ以上の変異体遺伝子のDnaI又はEndoVなどのヌクレアーゼによる消化に關与する、DNA又はファミリーシャッフリング(Stemmerの文献、Proc Natl Acad Sci USA 91:10747-10751 (1994) ; 及び、Stemmerの文献、Nature 370:389-391 (1994)) ; 鋳型プライミング、それに続く変性及び非常に短時間のアニーリング/伸長(5秒と短い)を伴う2工程PCRの反復サイクルを必要とする、付着伸長(StEP)(Zhaoらの文献、Nat. Biotechnol. 16:258-261 (1998)) ; 鋳型の異なるセグメントに相補的である多くの短いDNA断片を作製するために、ランダム配列プライマーを使用する、ランダムプライミング組換え(Shaoらの文献、Nucleic Acids Res 26:681-683 (1998))を含むが、これらに限定されるものではない。

10

【 0 2 2 8 】

追加的方法は、線状プラスミドDNAを使用し、ミスマッチ修復により再度対形成されるヘテロ二本鎖を形成する、ヘテロ二本鎖組換え(Volkovらの文献、Nucleic Acids Res. 27:e18 (1999) ; 及び、Volkovらの文献、Methods Enzymol. 328:456-463 (2000)) ; 一本鎖DNA(ssDNA)のDnaI断片化及びサイズ分画を利用する、一過性鋳型上でのランダムキメラ遺伝子形成(Random Chimeragenesis on Transient Templates)(RACHITT)(Cocoらの文献、Nat. Biotechnol. 19:354-359 (2001)) ; 鋳型のプールとして使用される一方向性ssDNA断片の存在下でプライマーから鎖を一方向に成長させる鋳型切り換えを必要とする、切断型鋳型上の組換え伸長(Recombined Extension on Truncated templates)(RETT)(Leeらの文献、J. Molec. Catalysis 26:119-129 (2003)) ; 分子間の組換えの制御に縮重プライマーを使用する、縮重オリゴヌクレオチド遺伝子シャッフリング(DOGS)(Bergquist及びGibbsの文献、Methods Mol.Biol. 352:191-204 (2007) ; Bergquistらの文献、Biomol.Eng 22:63-72 (2005) ; Gibbsらの文献、Gene 271:13-20 (2001)) ; 関心対象の遺伝子又は遺伝子断片の1塩基対欠失を持つコンビナトリアルライブラリーを作製する、ハイブリッド酵素作製のための反復切断(ITCHY)(Ostermeierらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:3562-3567 (1999) ; 及び、Ostermeierらの文献、Nat. Biotechnol. 17:1205-1209 (1999)) ; 切断を作製するためにホスホチオエートdNTPを使用する以外は、ITCHYに類似した、ハイブリッド酵素作製のためのチオ-反復切断(THIO-ITCHY)(Lutzらの文献、Nucleic Acids Res 29:E16 (2001)) ; 遺伝子組み換えのための2つの方法ITCHYとDNAシャッフリングを組合せた、SCRATCHY(Lutzらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:11248-11253 (2001)) ; epPCRにより作製された変異を、その後それらの使用可能な活性の保持についてスクリーニング/選択する、ランダムドリフト変異誘発(RNDM)(Bergquistらの文献、Biomol. Eng. 22:63-72 (2005)) ; イノシンなどの「普遍的」塩基の存在下で伸長するための鋳型として使用されるホスホチオエートヌクレオチドのランダム取り込み及び切断を使用するランダム長断片のプールを作製し、イノシン-含有相補体の複製がランダム塩基取り込み、引き続き変異誘発を生じる、ランダム変異誘発法である、配列飽和変異誘発(SeSaM)(Wongらの文献、Biotechnol. J. 3:74-82 (2008) ; Wongらの文献、Nucleic Acids Res. 32:e26 (2004) ; 及び、Wongらの文献、Anal. Biochem. 341:187-189 (2005)) ; 「標的における全ての遺伝的多様性」をコードしているように設計されたオリゴヌクレオチドの重複を使用し、シャッフされた後代の非常に高度な多様性を可能にする、合成シャッフリング(Nessらの文献、Nat. Biotechnol. 20:1251-1255 (2002)) ; dUTP取り込みの組合せを利用し、それに続くウラシルDNAグリコシラーゼ、その後のピペリジンによる処理で、エンドポイントDNA断片化を実行する、ヌクレオチド交換及び切除技術(NexT)(Mullerらの文献、Nucleic Acids Res. 33:e117 (2005)) ; を含む。

20

30

40

50

【0229】

更なる方法は、リンカーを使用し2つの遠縁の又は無関係の遺伝子間の融合を促進し、これら2つの遺伝子間で様々なキメラが作製され、結果的にシングルクロスオーバーハイブリッドのライブラリーを生じる、配列相同性-非依存型タンパク質組換え(SHIPREC)(Sieberらの文献、Nat. Biotechnol. 19:456-460 (2001))；出発材料が、挿入断片を含む超らせん二本鎖DNA(dsDNA)プラスミド及び所望の変異部位で縮重する2つのプライマーを含む、Gene Site Saturation Mutagenesis(商標)(GSSM(商標))(Kretzらの文献、Methods Enzymol. 388:3-11 (2004))；限定された領域を多数の可能性のあるアミノ酸配列改変と置換するために、短いオリゴヌクレオチドカセットの使用が関与する、コンビナトリアルカセット変異誘発(CCM)(Reidhaar-Olsonらの文献、Methods Enzymol. 208:564-586 (1991))；及び、Reidhaar-Olsonらの文献、Science 241:53-57 (1988))；CCMと本質的に類似し、且つホットスポット及びホット領域を同定するためにepPCRを高い変異率で使用し、次にタンパク質配列空間の規定された領域を対象とするようCMCMにより伸長する、コンビナトリアルマルチカセット変異誘発(CMCM)(Reetzらの文献、Angew. Chem. Int. Ed Engl. 40:3589-3591 (2001))；DNAポリメラーゼIIIの変異体サブユニットをコードしているmutD5遺伝子を利用し、馴化したtsミュータープラスミドを、選択時にランダム及び自然変異頻度で20～4000倍増加させ、且つ選択が不要な場合、有害変異の累積を阻止する、変異株技術(Selifonovaらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 67:3645-3649 (2001))；Lowらの文献、J. Mol. Biol. 260:359-3680 (1996))：を含む。

10

【0230】

20

更なる例示的方法は、選択されたアミノ酸のコンビナトリアル変異を評価及び最適化する、多次元変異誘発法である、ルック-スルー変異誘発(LTM)(Rajpalらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:8466-8471 (2005))；一度に複数の遺伝子に、又は単独遺伝子の大きいキメラライブラリー(多重変異)を作製するために適用することができるDNAシャッフルリング法である、遺伝子再構成(Verenium社により供給されるTunable GeneReassembly(商標)(TGR(商標)))；特定の折り畳みを有する構造的に規定されたタンパク質骨格を固定し、且つ折り畳み及び全般的タンパク質エネルギーを安定化させることができるアミノ酸置換のための配列空間を検索する最適化アルゴリズムであり、且つ一般に既知の三次元構造を有するタンパク質に最も効果的に働く、インシリコタンパク質自動設計(PDA)(Hayesらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:15926-15931 (2002))；及び、酵素改善のための可能性のある部位の選択のための構造/機能の知識の使用、Stratagene QuikChange(Stratagene社；カリフォルニア州、San Diego)などの変異誘発法を使用する選択部位での飽和変異誘発の実行、所望の特性に関するスクリーニング/選択、並びに改善されたクロームの使用、別の部位での開始及び所望の活性が実現されるまでの繰り返しの継続が関与する、反復飽和変異誘発(ISM)(Reetzらの文献、Nat. Protoc. 2:891-903 (2007))；及び、Reetzらの文献、Angew. Chem. Int. Ed Engl. 45:7745-7751 (2006))を含む。

30

【0231】

変異誘発のために前述の方法のいずれかを、単独で、又は任意の組合せで使用することができる。加えて、本明細書に説明されているように、定方向進化方法のひとつ又は組合せを、適応進化技術と一緒に、使用することができる。

40

【0232】

本発明の様々な実施態様の活性に実質的に影響を与えない修飾も、本明細書に示される発明の定義内で提供されることが理解される。よって、以下の実施例は、本発明を例示するものであり、限定しないことを意図する。

【実施例】

【0233】

(実施例I)

(4-ヒドロキシブタン酸の生合成)

本実施例では、4-HB生成のための例示的な生化学合成経路について記載する。

【0234】

50

微生物における4-HB合成についてのこれまでの報告は、生分解性プラスチックポリ-ヒドロキシアルカン酸(PHA)の製造における中間体としてこの化合物に焦点をおいていた(米国特許第6,117,658号)。ポリ-3-ヒドロキシ酪酸ポリマー(PHB)に対して4-HB/3-HBコポリマーを使用すると、より脆性の小さいプラスチックを得ることができる(Saito及びDoiの文献、Intl. J. Biol. Macromol, 16:99-104 (1994))。本明細書に記載のモノマー4-HBの製造は、いくつかの理由で基本的に独特の方法である：(1)該生成物は、細胞内で生成され、細胞に留まるPHAとは異なり、分泌される；(2)ヒドロキシブタン酸ポリマーを生成する生物体では、遊離4-HBが生成されず、補酵素A誘導体がポリヒドロキシアルカン酸シンターゼによって使用される；(3)該ポリマーの場合は、顆粒状生成物の形成が熱力学を変化させる；及び、(4)細胞外pHは、該ポリマーの生成にとって重要でないが、4-HBが遊離酸の状態で存在するか共役塩基状態で存在するかということ、並びに4-HBとGBLの平衡に影響を与えることになる。

10

【0235】

4-HBを、コハク酸セミアルデヒドを中間体として、TCA回路の中央代謝物質であるコハク酸から2つの酵素還元工程で生成することができる(図1)。これらの酵素の第1の酵素、即ちコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼは、NADH-及びNADPH-依存性の両酵素が見いだされたE. コリを含む多くの生物体に固有である(Donnelly及びCooperの文献、Eur. J. Biochem. 113:555-561 (1981)；Donnelly及びCooperの文献、J. Bacteriol. 145:1425-1427 (1981)；Marek及びHensonの文献、J. Bacteriol. 170:991-994 (1988))。S. セレピシアエにおけるコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を裏付ける証拠も存在し(Ramosらの文献、Eur. J. Biochem. 149:401-404 (1985))、配列相同性によって推定遺伝子が同定された。しかし、たいていの報告は、この酵素が、図1に示されるコハク酸合成の方向に進み(Donnelly及びCooperの文献、前掲；Lutke-Eversloh及びSteinbuchelの文献、FEBS Microbiol. Lett. 181:63-71 (1999))、4-HB及びガンマ-アミノ酪酸の分解経路に参加することを示している。コハク酸セミアルデヒドは、また、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ及びグルタミン酸デカルボキシラーゼの2つの酵素の作用によりTCA回路中間体 - ケトグルタル酸を介してE. コリなどの特定の微生物体によって固有に生成される。コハク酸を分解するために必須の嫌気性菌クロストリジウム・クルイベリによって使用される代替経路は、コハク酸をスクシニル-CoAに活性化させ、次いでこの方向に機能することが知られる代替的コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼを使用してスクシニル-CoAをコハク酸セミアルデヒドに変換する(Sohling及びGottschalkの文献、Eur. J. Biochem. 212:121-127 (1993))。しかし、この経路は、コハク酸をスクシニル-CoAに変換するのに必要とされるATPのエネルギーコストを有する。

20

30

【0236】

本経路の第2の酵素、即ち4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼは、E. コリ又は酵母に固有ではなく、C. クルイベリ及びラルストニア・ユートロファなどの様々な細菌に見いだされる(Lutke-Eversloh及びSteinbuchelの文献、前掲；Sohling及びGottschalkの文献、J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)；Valentinらの文献、Eur. J. Biochem. 227:43-60 (1995)；Wolff及びKenealyの文献、Protein Expr. Purif. 6:206-212 (1995))。これらの酵素は、NADH依存性であることが知られるが、NADPH依存型も存在する。アルファ-ケトグルタル酸から4-HBへの更なる経路がE. コリにおいてポリ(4-ヒドロキシ酪酸)を蓄積させることが実証された(Songらの文献、Wei Sheng Wu Xue. Bao. 45:382-386(2005))。組換え株は、2つの原生E. コリ遺伝子：グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ及びグルタミン酸デカルボキシラーゼとともに、3つの異種遺伝子：PHAシンターゼ(R. ユートロファ)、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(R. ユートロファ)及び4-ヒドロキシ酪酸:CoAトランスフェラーゼ(C. クルイベリ)の過剰発現を必要とした。代替的に、図1の工程4及び5を、ユーグレナ・グラシリスに同定されるものなどのアルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼによって実施することができる(Shigeokaらの文献、Biochem. J. 282(Pt2):319-323(1992)；Shigeoka及びNakanoの文献、Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28(1991)；Shigeoka及びNakanoの文献、Biochem J. 292(Pt 2):463-467(1993))。しかし

40

50

、この酵素はこれまで、何らかの生物体における4-HB又は関連ポリマーの製造に影響を及ぼすようには適用されていない。

【0237】

各生物体のインシリコ代謝モデルを使用して、エシェリキア・コリ及びサッカロミセス・セレビシアエの2つの微生物における4-ヒドロキシ酪酸の微生物の生成能力を調べた。4-HBへの潜在的な経路は、図1に示されるようコハク酸、スクシニル-CoA、又はアルファ-ケトグルタル酸中間体を介して進行する。

【0238】

4-HB生成経路におけるコハク酸からの第1の工程は、NADH又はNADPH依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼを介するコハク酸のコハク酸セミアルデヒドへの変換を含む。E. コリにおいて、gabDは、NADP依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼであり、4-アミノ酪酸取込み及び分解に関与する遺伝子集団の一部である(Niegemannらの文献、Arch. Microbiol. 160:454-460 (1993); Schneiderらの文献、J. Bacteriol. 184:6976-6986 (2002))。sadは、NAD依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性に対する酵素をコードしていると考えられる(Marek及びHensonの文献、前掲)。S. セレビシアエは、細胞質ゾルに局在する、推定上UGA2に割り当てられたNADPH依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼのみを含む(Huhらの文献、Nature 425:686-691 (2003))。E. コリ及びS. セレビシアエの両方における4-HBへのコハク酸経路を想定する最大収率計算は、非原生4-HBデヒドロゲナーゼがそれらの代謝ネットワークに加えられたという前提のみを必要とする。

10

20

【0239】

スクシニル-CoAから4-ヒドロキシ酪酸への経路が、4-ヒドロキシ酪酸モノマー単位を含むポリヒドロキシアリカン酸を製造するための方法の一部として、米国特許第6,117,658号に記載された。クロストリジウム・クルイベリは、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有することが知られる1つの生物体の例である(Sohling及びGottschalkの文献、前掲; Sohling及びGottschalkの文献、前掲)。この研究において、C. クルイベリ又は別の生物体由来のこの酵素は、スクシニル-CoAから4-HBへの経路を完成するために非原生又は異種4-HBデヒドロゲナーゼとともにE. コリ又はS. セレビシアエにおいて発現される。アルファ-ケトグルタル酸から4-HBへの経路は、E. コリにおいてポリ(4-ヒドロキシ酪酸)を乾燥細胞重量の30%まで蓄積させることが証明された(Songらの文献、前掲)。E. コリ及びS. セレビシアエは、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ及びグルタミン酸デカルボキシラーゼの両方を固有に又は内因的に有するため(Colemanらの文献、J. Biol. Chem. 276:244-250(2001))、非原生4-HBデヒドロゲナーゼが存在することのみを想定することによって、AKGから4-HBへの経路を両方の生物体に完成することができる。

30

【0240】

(実施例II)

(コハク酸及びアルファ-ケトグルタル酸からの1,4-ブタンジオールの生合成)

本実施例では、微生物体からの4-HB及びBDOの構築及び生合成生成を例示する。4-HB及びBDOのための経路は、本明細書に開示されている。

40

【0241】

上記経路に利用できるいくつかの代替的な酵素が存在する。コハク酸をスクシニル-CoAに変換するための原生又は内因性酵素(図1の工程1)の代わりに、工程9と同様に機能する、cat1遺伝子C. クルイベリによってコードされたCoAトランスフェラーゼなどのCoAトランスフェラーゼと交換することができる(Sohling及びGottschalkの文献、Eur. J. Biochem. 212:121-127 (1993))。しかし、この酵素による酢酸の生成は、それがアセチル-CoAに逆変換されるのではなく、分泌され得るため、最適であり得ない。この点において、工程9における酢酸形成を除外することも有利であり得る。CoAトランスフェラーゼに対する1つの代替として、4-HBを最初にATPによってリン酸化し、次いで酢酸のアセチルCoAへの変換のためのE. コリにおける酢酸キナーゼ/ホスホトランスアセチラーゼ経路と同様にCoA誘導体

50

に変換するメカニズムを採用することができる。この経路の正味のコストは、アセチル-CoAを酢酸から再生するのに必要とされるのと同じである1個のATPである。酵素ホスホトランスブチリラーゼ(ptb)及び酪酸キナーゼ(bk)は、C. アセトブチリクムにおける酪酸生成のために非ヒドロキシル化分子に対してこれらの工程を実施することが知られている(Car yらの文献、Appl Environ Microbiol 56:1576-1583 (1990); Valentine, R. C.及びR. S. Wolfeの文献、J Biol Chem. 235:1948-1952 (1960))。これらの酵素は可逆的であり、合成が4-HBの方向に進行することを可能にする。

【0242】

コハク酸に加えて、又はコハク酸の代わりにアルファ-ケトグルタル酸を介してBDOを生成することもできる。既に記載し、以下に更に例示するように、生成物生合成を実施するための1つの経路は、内因性酵素を使用して、 α -ケトグルタル酸を介してコハク酸セミアルデヒドを生成することである(図1、工程4~5)。別法は、この変換を1つの工程で実施することができる α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼを使用することである(図1、工程8; Tianらの文献、Proc Natl Acad Sci US. A 102:10670-10675 (2005))。

10

【0243】

BDO生成微生物体の異なる菌株を構築するために、確認のために適用可能な遺伝子の一覧を結集させた。簡単に述べると、4-HB及び/又はBDO生合成経路内の1つ以上の遺伝子を、利用可能な文献情報源、NCBI 遺伝子データベース及びホモロジー検索を使用して、図1に示される完全なBDO生成経路の工程毎に同定した。この研究でクローン化及び評価された遺伝子を、ポリペプチド配列の適切な文献及びURL引用とともに以下の表6に示す。更に以下に記載されるように、いくつかの遺伝子をコドン最適化のために合成し、他の遺伝子を、原生又は野生型生物体のゲノムDNAからPCRを介してクローン化した。遺伝子によっては、両方の手法を使用し、この場合、原生遺伝子は、実験に使用される際に、遺伝子識別番号に対する添字「n」によって示される。DNA配列のみが相違し、タンパク質は同一であることに留意されたい。

20

【0244】

表6. 宿主BDO-生成微生物体において発現された遺伝子

【表 6】

遺伝子ID 番号	反応番号 (図1)	遺伝子 名	微生物源	酵素名	タンパク質配列のリンク先	参照番号
0001	9	Cat2	クロストリジウム・ クルイベリ DSM555	4-ヒドロキシ酪酸 CoA トランスフェラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=nuccore&id= 1228100	1
0002	12/13	adhE	クロストリジウム・ アセトブチリウム ATCC824	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&val= 15004739	2
0003	12/13	adhE2	クロストリジウム・ アセトブチリウム ATCC824	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=NP_149325. 1	2
0004	1	Cat1	クロストリジウム・ クルイベリ DSM555	コハク酸 CoA トランスフェラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=nuccore&id= 1228100	1
0008	6	sucD	クロストリジウム・ クルイベリ DSM555	コハク酸 セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ (CoA-依存性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=nuccore&id= 1228100	1
0009	7	4-HBd	ラウスニア・ ユートロファH16	4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ (NAD-依存性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=YP_726053. 1	2
0010	7	4-HBd	クロストリジウム・ クルイベリ DSM555	4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ (NAD-依存性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=nuccore&id= 1228100	1
0011	12/13	adhE	<i>E.コリ</i>	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pe c/genes.List.DetailAction.do?f romListFlag=true&featureTyp e=1&orfId=1219	
0012	12/13	yqhD	<i>E.コリ</i>	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pe c/genes.List.DetailAction.do	
0013	13	bdhB	クロストリジウム・ アセトブチリウム ATCC824	ブタノール デヒドロゲナーゼII	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=NP_349891. 1	2
0020	11	ptb	クロストリジウム・ アセトブチリウム ATCC824	ホスホ-トランス ブチラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=1 5896327	2
0021	10	buk1	クロストリジウム・ アセトブチリウム ATCC824	酪酸キナーゼI	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=2 0137334	2
0022	10	buk2	クロストリジウム・ アセトブチリウム ATCC824	酪酸キナーゼII	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=2 0137415	2

10

20

30

0023	13	adhEm	嫌気性汚水 消化微生物 コンソーシアの メタライブラリ から単離	アルコール デヒドロゲナーゼ		(37)d}
0024	13	adhE	クロストリジウム・ サーモセラム	アルコール デヒドロゲナーゼ	www.genome.jp/dbget- bin/www_bget?ctc:Cthe_0423	
0025	13	ald	クロストリジウム・ ベイジェリンキー	CoA- アシル化アルデヒド デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=4 9036681	(31)d}
0026	13	bdhA	クロストリジウム・ アセトブチリウム ATCC824	ブタノール デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=NP_349892. 1	2
0027	12	bld	クロストリジウム・ サッカロペル ブチル アセトニウム	ブチルアルデヒド デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=3 1075383	4
0028	13	bdh	クロストリジウム・ サッカロペル ブチル アセトニウム	ブタノール デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=1 24221917	4
0029	12/13	adhE	クロストリジウム・ テタニ	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.genome.jp/dbget- bin/www_bget?ctc:CTC01366	
0030	12/13	adhE	クロストリジウム・ パープリンゲンス	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.genome.jp/dbget- bin/www_bget?cpe:CPE2531	
0031	12/13	adhE	クロストリジウム・ ジフィシレ	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.genome.jp/dbget- bin/www_bget?cdf:CD2966	
0032	8	sucA	マイコバクテリウム ・ボビス BCG, Pasteur	α -ケトグルタル酸 デカルボキシラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=YP_977400. 1	5
0033	9	cat2	クロストリジウム・ アミノブチリウム	4-ヒドロキシ酪酸 CoA トランスフェラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&val= 6249316	
0034	9	cat2	ポルフィロモナス ・ギンギバリス W83	4-ヒドロキシ酪酸 CoA トランスフェラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&val= 34541558	
0035	6	sucD	ポルフィロモナス ・ギンギバリス W83	コハク酸 セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ (CoA-依存性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=NP_904963. 1	
0036	7	4-HBd	ポルフィロモナス ・ギンギバリス W83	NAD-依存性 4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=NP_904964. 1	
0037	7	gbd	非培養細菌	4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=nucleotide&id= 5916168	6
0038	1	sucCD	E.コリ	スクシニル-CoA シンテターゼ	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pe c/genes.List.DetailAction.do	

10

20

30

40

¹Sohling及びGottschalkの文献、Eur. J. Biochem. 212:121-127 (1993) ; Sohling及びGottschalkの文献、J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)

²Nollingらの文献、J., J. Bacteriol. 183:4823-4838 (2001)

³Pohlmannらの文献、Nat. Biotechnol. 24:1257-1262 (2006)

⁴Kosakaらの文献、Biosci. Biotechnol. Biochem. 71:58-68 (2007)

⁵Broschらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:5596-5601 (2007)

⁶Henneらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 65:3901-3907 (1999)

【 0 2 4 5 】

(BDO経路のための発現ベクターの構築) ベクター骨格及びいくつかの菌株をDr. Rolf Lutz of Expressys(www.expressys.de/)から得た。ベクター及び菌株は、Dr. Rolf Lutz

50

及びProf. Hermann Bujardによって開発されたpZ発現システムに基づく(Lutz, R. 及びH. Bujardの文献、Nucleic Acids Res 25:1203-1210 (1997)。得られたベクターは、pZE13luc、pZA33luc、pZS*13luc及びpZE22lucであり、スタッファー断片としてルシフェラーゼ遺伝子を含んでいた。ルシフェラーゼスタッファー断片を、適切な制限酵素部位により隣接されたlacZ-アルファ断片で置き換えるために、ルシフェラーゼスタッファー断片を、最初にEcoRI及びXbaIによる消化によって各ベクターから除去した。lacZ-アルファ断片は、以下のプライマーにより、pUC19からPCR増幅した：

【化1】

lacZalpha-RI

5'GACGAATTCGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGTCCAATTCACTGGCCGTCG
TTTAC3'

lacZalpha 3'BB

5'-GACCCTAGGAAGCTTTCTAGAGTCGACCTATGCGGCATCAGAGCAGA-3'

。

【0246】

これにより、EcoRI部位、NheI部位、リボソーム結合部位、SalI部位及び開始コドンの5'末端を有する断片が作製された。この断片の3'末端には、停止コドン、XbaI部位、HindIII部位及びAvrII部位が含まれていた。このPCR生成物をEcoRI及びAvrIIにより消化させ、EcoRI及びXbaIにより消化されたベースベクターに結合した(XbaI及びAvrIIは、適合末端を有し、非部位を生成する)。NheI及びXbaI制限酵素部位は、互いに結合させることができる適合末端を生成する(ただし、いずれの酵素によっても消化されないNheI/XbaI非部位を生成する)ため、ベクターにクローン化された遺伝子は、互いに「バイオブリック」され得る(http://openwetware.org/wiki/Synthetic_Biology:BioBricks)。簡単に述べると、遺伝子の間の部位が各添加後に破壊されるため、この方法は、(部位が遺伝子に対して内在的でなければ)同じ2つの制限部位を使用して、無数の遺伝子をベクターに連結することを可能にする。

【0247】

全てのベクターは、pZ記号の後に、複製起点、抗生物質耐性マーカー及びプロモーター/制御単位を示す文字及び数字が続く。複製起点は、2番目の文字であり、起源に基づいて、ColE1に対するE、p15Aに対するA、及びpSC101に対するSによって表される。最初の数字は、抗生物質耐性マーカーを表す(アンピシリンに対する1、カナマイシンに対する2、クロラムフェニコールに対する3、スペクチノマイシンに対する4及びテトラサイクリンに対する5)。最後の数字は、関心対象の遺伝子を制御したプロモーターを規定する($P_{LtetO-1}$ に対する1、 $P_{LlacO-1}$ に対する2、 $P_{AllacO-1}$ に対する3及び $P_{lac/ara-1}$ に対する4)。MCS及び関心対象の遺伝子が直後に続く。ここに述べる研究では、上記バイオブリック挿入のために修飾された2つのベースベクター、pZA33及びpZE13を採用した。一旦関心対象の遺伝子がそれらにクローン化されると、表6に示される4桁の遺伝子コードを使用して、得られたプラスミドを、例えばpZA33-XXXX-YYYYのように表す。

【0248】

(宿主株の構築) 本明細書に記載の全ての研究における親株は、E. コリK-12株MG1655である。adhE、gabD及びaldAにおける無マーカー欠失株を、redET法(Datsenko, K.A. 及びB. L. Wannerの文献、Proc Natl Acad Sci USA 97:6640-6645 (2000))を使用して、第三者によるサービス契約に基づいて構築した。次の菌株を、バクテリオファージP1媒介形質導入(Miller, J.の文献、Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratories, ニューヨーク(1973))を介して構築した。菌株C600Z1(lacI^q、PN25-tetR、Sp^R、lacY1、leuB6、mcrB⁺、supE44、thi-1、thr-1、tonA21)をExpressysから入手し、P1形質導入のためのlacI^q対立遺伝子源として使用した。バクテリオファージP1virを、lacI^qに結合したスペクチノマイシン耐性遺伝子を有するE. コリ株C600Z1上で成長させた。C600Z1上

で成長したP1溶菌液を使用して、スペクチノマイシン耐性についての選択によりMG1655を感染させた。次いで、スペクチノマイシン耐性コロニーを、 $P_{AllacO-1}$ プロモーターに結合した遺伝子の発現を抑制する形質導入体の能力を測定することによって、結合した $lacI^Q$ について選別した。得られた菌株をMG1655 $lacI^Q$ と命名した。同様の手順を使用して、 $lacI^Q$ を欠失株に導入した。

【0249】

(コハク酸からの4-HBの生成) コハク酸から4-HB生産体を構築するために、以下に記載するように、コハク酸から4-HB及び4-HB-CoAまでの工程(図1の1、6、7及び9)をコードしている遺伝子を、pZA33及びpZE13ベクター上に構成した。様々な遺伝子の組合せ、並びに対照として不完全な経路を保持する構築物を評価した(表7及び8)。次いで、イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加することによって、誘導性発現を可能にする、 $lacI^Q$ を含む宿主株に、プラスミドを形質転換した。野生型、及び原生コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(図1の工程2)をコードしている遺伝子が欠失した宿主の両方を試験した。

【0250】

最初に、経路遺伝子を含むプラスミド構築物に対して、宿主として菌株MG1655 $lacI^Q$ を使用して、異種酵素の活性をインビトロアッセイで試験した。細胞を、構築物毎に適切な抗生物質を含むLB培地(Difco)にて好気性条件で成長させ、光学密度(OD600)が約0.5になったときに1mMのIPTGを添加することによって誘導させた。細胞を6時間後に収穫し、以下に記載するように酵素アッセイを実施した。

【0251】

(インビトロ酵素アッセイ) 活性アッセイのための粗抽出物を得るために、細胞を、10分間にわたる4500rpmの遠心(Beckman-Coulter、Allegera X-15R)によって収穫した。ペレットを、ベンゾナーゼ及びリゾチームを含む0.3mLのBugBuster試薬(Novagen)に再懸濁させ、静かに振盪しながら室温で15分間溶解させた。無細胞溶解物を、4 にて30分間にわたって14000rpmで遠心させること(Eppendorf遠心器5402)によって得た。試料中の細胞タンパク質を、Bradfordらの方法(Anal. Biochem. 72:248-254 (1976))を使用して測定し、特定の酵素アッセイを以下に記載するように実施した。活性を、活性の1単位が、 $1\mu\text{mol}$ の基質を室温にて1分間で変換するのに必要とされる酵素の量で定義される単位/mgタンパク質で報告する。概して、報告された値は、少なくとも3つ組のアッセイの平均値である。

【0252】

既に記載したSohling及びGottschalkの手順(J. Bacteriol. 178:871-880 (1996))に従って、スクシニル-CoAと酢酸からのアセチル-CoAの形成を監視することによって、スクシニル-CoAトランスフェラーゼ(Cat1)活性を測定した。ATPの存在下でのコハク酸とCoAからのスクシニル-CoAの形成を追跡することによって、スクシニル-CoAシンテターゼ(SucCD)活性を測定した。実験は、Cha及びParksの文献(J. Biol. Chem. 239:1961-1967 (1964))に記載される手順に従った。コハク酸セミアルデヒド及びCoAの存在下における340nmでのNADのNADHへの変換(Sohling及びGottschalkの文献、Eur. J. Biochem. 212:121-127 (1993))を追跡することによってCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(SucD)活性を測定した。コハク酸セミアルデヒドの存在下における340nmでのNADHのNADへの酸化を監視することによって、4-HBデヒドロゲナーゼ(4-HBd)酵素活性を測定した。この実験は、公開されたGerhardtらの手順(Arch. Microbiol. 174:189-199 (2000))に従った。Scherf及びBuckelの文献(Appl. Environ. Microbiol. 57:2699-2702 (1991))からの改良手順を使用して、4-HB CoAトランスフェラーゼ(Cat2)活性を測定した。アセチル-CoA及び4-HB又は酪酸からの4-HB-CoA又はブチリル-CoAの形成を、HPLCを使用して測定した。

【0253】

アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALD)を、いくつかの文献情報源から適用された手順(Durreらの文献、FEMS Microbiol. Rev. 17:251-262 (1995); Palosaari及びRogersの文献、J. Bacteriol. 170:2971-2976 (1988); 及びWelchら

10

20

30

40

50

の文献、Arch. Biochem. Biophys. 273:309-318 (1989))を使用して、還元方向にアッセイした。NADHの酸化の後に、室温にて全体で240秒間にわたって4秒毎に340nmにおける吸光度を読み取った。還元アッセイを(KOHでpH7.5に調整された)100mMのMOPS、0.4mMのNADH、及び1~50 μ lの細胞抽出物にて実施した。ADHに対する100mMアセトアルデヒド又はブチルアルデヒド100 μ l或いはALDに対する1mMアセチル-CoA又はブチリル-CoA 100 μ lの試薬を添加することによって反応を開始させる。分光光度計を迅速にブランクにし、次いで動態の読取りを開始する。340nm(6000)におけるNAD(P)Hのモル吸光係数及び抽出物のタンパク質濃度とともに、1分間当たりの340nmの吸光度における得られた減少勾配を使用して、比活性を測定することができる。

【0254】

PTBの酵素活性を、Caryらの文献(J. Bacteriol. 170:4613-4618 (1988))に記載されているようにブチリル-CoAからブチリル-リン酸への方で測定する。それは、変換のための無機リン酸エステルを提供し、それに続き試薬5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)又はDTNBによる遊離CoAが増加する。DTNBは、遊離CoAなどのチオール基と迅速に反応して、412nmで吸収する黄色の2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸(TNB)を放出し、これは14140Mcm⁻¹のモル吸光係数を有する。アッセイ緩衝液は、pH7.4の150mMリン酸カリウム、0.1mMのDTNB及び0.2mMブチリル-CoAを含んでおり、2~50 μ Lの細胞抽出物を添加することによって反応を開始させた。ATPを消費する酪酸からブチリル-リン酸の形成の方でBKの酵素活性を測定する。手順は、Roseらの文献、J. Biol. Chem. 211:737-756(1954)に既に記載されている酢酸キナーゼに対するアッセイと同様である。しかし、Sigmaによって提供された別の酢酸キナーゼ酵素アッセイプロトコールがより有用且つ高感度であることを見いだした。このアッセイは、酢酸キナーゼによるATPのADPへの変換を、ピルビン酸キナーゼによるADP及びホスホエノールピルビン酸(PEP)のATP及びピルビン酸への連結された変換、それに続く乳酸デヒドロゲナーゼによるピルビン酸及びNADHの乳酸及びNAD⁺への変換に結びつける。酪酸を酢酸に代用することは、アッセイがBK酵素活性を追跡することを可能にするための唯一の主たる改変である。アッセイ混合物は、pH7.6の80mMのトリエタノールアミン緩衝液、200mM酪酸ナトリウム、10mMのMgCl₂、0.1mMのNADH、6.6mMのATP、1.8mMホスホエノールピルビン酸を含んでいた。ピルビン酸キナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、及びミオキナーゼを製造者の説明書に従って添加した。2~50 μ lの細胞抽出物を添加することによって反応を開始させ、NADH酸化を示す340nmの吸光度の低下に基づいて反応を監視した。

【0255】

(HPLCによるCoA誘導体の分析) 補酵素A(CoA)転移を含む酵素反応を監視するためにHPLCに基づくアッセイを開発した。開発された方法は、インビトロ反応混合物に存在するCoA、アセチルCoA(AcCoA)、ブチリルCoA(BuCoA)及び4-ヒドロキシ酪酸CoA(4-HBCoA)の定量測定による酵素活性の特徴づけを可能にした。低 μ Mへの感度の低下、並びに関心対象の全てのCoA誘導体の優れた分解能が達成された。

【0256】

化学物質及び試料の調製を以下のように実施した。簡単に述べると、CoA、AcCoA、BuCoA及び全ての他の化学物質をSigma-Aldrichから入手した。溶媒、即ちメタノール及びアセトニトリルは、HPLCグレードであった。標準検量線は、0.01~1mg/mL濃度範囲で優れた直線性を示した。酵素反応混合物は、100mMのTris HCl緩衝液(pH7)を含み、アリコート異なる時点で採取し、ギ酸(0.04%の最終濃度)で反応停止させ、HPLCによって直接分析した。

【0257】

二元ポンプ、ガス抜き装置、恒温自動サンプラー及びカラム区画室を備えたAgilent 1100 HPLCシステムを使用してHPLC分析を実施し、ダイオードアレイ検出器(DAD)を分析に使用した。4.6 \times 150mmの逆相カラムKromasil 100 5 μ m C18(Peeke Scientific)を採用した。25mMのリン酸カリウム(pH7)及びメタノール又はアセトニトリルを1mL/分の流量で水性及び有機溶媒として使用した。2つの方法を開発し：十分に分解されたCoA、AcCoA及びBuCoA

の分析のためのより急速な勾配を用いる短い方法、並びに近接して溶離するAcCoAと4-HBCoAとを区別するためのより長い方法である。短い方法では、アセトニトリル勾配(0分-5%、6分-30%、6.5分-5%、10分-5%)を採用し、CoA、AcCoA及びBuCoAに対してそれぞれ2.7、4.1及び5.5分の保持時間を得た。長い方法では、メタノールを0分-5%、20分-35%、20.5分-5%、25分-5%の直線勾配で使用した。CoA、AcCoA、4-HBCoA及びBuCoAに関する保持時間は、それぞれ5.8、8.4、9.2及び16.0分であった。注入容量は、5 μ Lであり、カラム温度は30 $^{\circ}$ Cであり、UV吸光度は260nmで監視した。

【0258】

結果は、4つの経路工程の各々の活性を示したが(表7)、活性は、明らかに、遺伝子給源、ベクターにおける遺伝子の位置、及びそれが発現される他の遺伝子の状況に依存する。例えば、遺伝子0035は、0008によってコードされるものよりより活性のあるコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードし、0036及び0010nは、0009よりより活性のある4-HBデヒドロゲナーゼ遺伝子である。同じオペロン上にそれに先行する別の遺伝子が存在する場合に、より良好な4-HBデヒドロゲナーゼ活性であることも認められる。

【0259】

表7. 4-HB-CoA経路における遺伝子を発現するプラスミドを含むMG1655lacI^q由来の細胞抽出液のインビトロ酵素活性。活性は単位/mgタンパク質で記載し、活性1単位は、1分間に室温で1 μ molの基質を変換するのに必要な酵素量として定義した。

【表7】

試料番号	pZE13 (a)	pZA33 (b)	OD600	細胞タンパク質(c)	Cat1	SucD	4HBd	Cat2
1	cat1 (0004)		2.71	6.43	1.232	0.00		
2	cat1 (0004)-sucD (0035)		2.03	5.00	0.761	2.57		
3	cat1 (0004)-sucD (0008)		1.04	3.01	0.783	0.01		
4	sucD (0035)		2.31	6.94		2.32		
5	sucD (0008)		1.10	4.16		0.05		
6		4hbd (0009)	2.81	7.94	0.003		0.25	
7		4hbd (0036)	2.63	7.84			3.31	
8		4hbd (0010n)	2.00	5.08			2.57	
9	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	2.07	5.04	0.600	1.85	0.01	
10	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	2.08	5.40	0.694	1.73	0.41	
11	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	2.44	4.73	0.679	2.28	0.37	
12	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	1.08	3.99	0.572	-0.01	0.02	
13	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0.77	2.60	0.898	-0.01	0.04	
14	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0.63	2.47	0.776	0.00	0.00	
15		cat2 (0034)	2.56	7.86				1.283
16		cat2(0034)-4hbd(0036)	3.13	8.04			24.86	0.993
17		cat2(0034)-4hbd(0010n)	2.38	7.03			7.45	0.675
18		4hbd(0036)-cat2(0034)	2.69	8.26			2.15	7.490
19		4hbd(0010n)-cat2(0034)	2.44	6.59			0.59	4.101

colEI起点及びアンピシリン耐性を有する高コピープラスミドpZE13におけるPlacから発現される遺伝子。遺伝子識別番号は表6に示される。

pACYC起点及びクロラムフェニコール耐性を有する中コピープラスミドpZA33におけるPlacから発現される遺伝子。

(c)mgタンパク質/ml抽出液として与えられた細胞タンパク質

【0260】

次いで、4-HB経路に遺伝子を含む組換え株を、中央代謝中間体から4-HBをインビボで生成する能力について評価した。細胞をOD600約0.4までLB培地中にて嫌気性条件で成長させ、次いで1mMのIPTGで誘導した。1時間後、コハク酸ナトリウムを10mMまで添加し、更に24時間及び48時間後に分析のために試料を採取した。培養プロセス中の4-HBを以下に記載されるようにGC-MSによって分析した。それらの結果は、組換え株が24時間後に2mMを超える4-HBを生成できるのに対して、対照株では本質的に0であることを示している(表8)。

【0261】

表8. 4-HB経路遺伝子の各種組合せを発現するプラスミドを保持するE. コリ株におけるコハク酸からの4-HBの生成

【表 8】

試料番号	宿主株	pZE13	pZA33	24時間			48時間		
				OD600	4HB, μ M	4HB norm. (a)	OD600	4HB, μ M	4HB norm. (a)
1	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	0.47	487	1036	1.04	1780	1711
2	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0027)	0.41	111	270	0.99	214	217
3	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	0.47	863	1835	0.48	2152	4484
4	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	0.46	956	2078	0.49	2221	4533
5	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	0.38	493	1296	0.37	1338	3616
6	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0027)	0.32	26	81	0.27	87	323
7	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0.24	506	2108	0.31	1448	4672
8	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0.24	78	324	0.56	233	416
9	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	0.53	656	1237	1.03	1643	1595
10	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0027)	0.44	92	209	0.98	214	218
11	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	0.51	1072	2102	0.97	2358	2431
12	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	0.51	981	1924	0.97	2121	2186
13	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	0.35	407	1162	0.77	1178	1530
14	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0027)	0.51	19	36	1.07	50	47
15	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0.35	584	1669	0.78	1350	1731
16	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0.32	74	232	0.82	232	283
17	MG1655 lacIq	ベクターのみ	ベクターのみ	0.8	1	2	1.44	3	2
18	MG1655 lacIq gabD	ベクターのみ	ベクターのみ	0.89	1	2	1.41	7	5

(a) 正規化した4-HB濃度 (μ M/OD600単位)

【0 2 6 2】

CoAトランスフェラーゼ(cat1)を使用して、コハク酸からスクシニル-CoAを生成することに対する別法は、スクシニル-CoAシンターゼをコードしている原生E. コリsucCD遺伝子を使用することである。この遺伝子クラスターを、4-HBに対する残りの工程のための候補遺伝子とともにpZE13上にクローン化して、pZE13-0038-0035-0036を作製した。

【0 2 6 3】

(グルコースからの4-HBの生成) 上記実験は、中央代謝中間体(コハク酸)から4-HBへの機能的経路を実証しているが、工業的方法では、グルコース又はスクロースなどの低コスト炭水化物原料からの化学物質の生成が必要になる。従って、次の実験セットは、グルコース上での成長時に細胞によって生成された内因性コハク酸が、4-HB経路を促進し得るかどうかを判断することを目的とした。20g/Lのグルコース、緩衝能を向上させるための100 mMの3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、10 μ g/mLのチアミン及び適切な抗生物質が補給されたM9最小培地(6.78g/LのNa₂HPO₄、3.0g/LのKH₂PO₄、0.5g/LのNaCl、1.0g/LのNH₄Cl、1mMのMgSO₄、0.1mMのCaCl₂)にて嫌気性条件で細胞を成長させた。OD600が約0.2に達したときに0.25mMのIPTGを添加し、誘導後24時間毎に4-HB分析のために試料を採取した。全ての場合において、最良の菌株において約1mMの最大値で4-HBが24時間後に安定水準に達した(図3a)のに対して、コハク酸濃度は上昇し続けた(図3b)。これは、該経路へのコハク酸の供給が恐らくは限定的でないこと、及びボトルネックが酵素そのものの活性又はNADH利用能であることを示している。0035及び0036は、明らかに、それぞれCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-HBデヒドロゲナーゼの最良の遺伝子候補である。既知(gabD)又は推定上(aldA)の原生コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードしている遺伝子の一方又は双方を除外しても性能に対する影響がほとんどなかった。最後に、細胞は、対照より4-HB産生株においてはるかに低いODまで成長したことに留意されたい(図3c)。

【0 2 6 4】

グルコースから4-HBの生成のための代替経路は、 α -ケトグルタル酸を介する。 α -ケトグルタル酸からコハク酸セミアルデヒドを直接生成するために(図1の工程8)、マイコバクテリウム・ツベルクロシス由来の α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼの使用(Tianらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:10670-10675 (2005))を調べた。この遺伝子(0032)がインビボで機能的であることを実証するために、それをpZA33上の4-HBデヒドロゲナーゼ(遺伝子0036)と同じ宿主においてpZE13上に発現させた。この菌株は、1mMのIPTGによる誘導後の24時間以内に1.0mMを超える4-HBを生成することが可能であった(図4)。この

菌株は、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼを発現しないため、スクシニル-CoAを介するコハク酸セミアルデヒドの生成の可能性が排除される。コハク酸セミアルデヒドの生成に関与する原生遺伝子がこの経路で機能し得る可能性もある(図1の工程4及び5)；しかし、pZE13-0032プラスミドが宿主の外に出たときに生成される4-HBの量は無視できる。

【0265】

(4-HBからのBDOの生成) 4-HBからのBDOの生成には、デヒドロゲナーゼによって触媒される2つの還元工程が必要であった。アルコールデヒドロゲナーゼ及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ(それぞれADH及びALD)は、ともに分子上のカルボン酸基をアルコール基に還元できる、又は逆にアルコールのカルボン酸への酸化を実施できる、NAD⁺/H及び/又はNADP⁺/H依存性酵素である。この生体内転換は、野生型クロストリジウム・アセトブチリウムにおいて実証されたが(Jewellらの文献、Current Microbiology、13:215-19 (1986))、関与する酵素も関与する遺伝子も同定されなかった。加えて、4-HB-CoAに対する活性化が最初に必要であるかどうか(図1の工程9)、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼ(工程12)が4-HBに対して直接作用できるかどうか把握されていない。4-HB及び経路中間体に対する非ヒドロキシル化類似体による既知の活性に基づいて、又はこれらの特徴づけられた遺伝子に対する類似性により、C.アセトブチリウム及び関連生物体からの候補酵素の一覧を作製した(表6)。これらの候補の一部は多機能性デヒドロゲナーゼであるため、それらは、潜在的に酸(又はCoA誘導体)のアルデヒドへの、及びアルデヒドのアルコールへの両方のNAD(P)H依存性還元を触媒する。E.コリにおけるこれらの遺伝子を用いた研究を開始する前に、C.アセトブチリウムATCC824を使用して、上記の結果を最初に検証した。30にて10%CO₂、10%H₂及び80%N₂の嫌気性雰囲気中で、10mMの4-HBが補給されたSchaedlerブロス(Accumedia、ランシング、MI)で細胞を成長させた。定期的に培養試料を採取し、遠心し、以下に記載されるようにブロスをGC-MSによってBDOについて分析した。0.1mM、0.9mM及び1.5mMのBDO濃度をそれぞれ1日、2日及び7日のインキュベート後に検出した。4-HBを添加せずに成長した培養物にはBDOが検出されなかった。生成されたBDOがグルコースから誘導されることを実証するために、最良のBDO産生株MG1655 lacI^Q pZE13-0004-0035-0002 pZA33-0034-0036を、4g/Lの均一標識された¹³C-グルコースが補給されたM9最小培地で成長させた。細胞を1mMのIPTGで0.67のODにおいて誘導し、試料を24時間後に採取した。培養上澄みの分析を質量分析によって実施した。

【0266】

次に、4-HBからBDOの変換経路のための遺伝子候補を、E.コリ宿主MG1655 lacI^Qに発現されたときの活性について試験した。pZA33に発現された各遺伝子候補を含む組換え株を、37にて4時間にわたって0.25mMのIPTGの存在下で成長させて、酵素の発現を十分に誘導した。誘導の4時間後、細胞を収穫し、上記のようにADH及びALD活性についてアッセイした。4-HB-CoA及び4-ヒドロキシブチルアルデヒドは商業的に入手可能でないため、非ヒドロキシル化基質を使用してアッセイを実施した(表9)。C.アセトブチリウムadhE2(0002)及びE.コリadhE(0011)についての4炭素基質と2炭素基質との活性の比率は、文献(Atsumiらの文献、Biochem. Biophys. Acta. 1207-1-11 (1994))に既に報告されているものと同様であった。

【0267】

表9. アルデヒドデヒドロゲナーゼ及びアルコールデヒドロゲナーゼの遺伝子候補を発現するpZA33を含むMG1655 lacI^Q由来の細胞抽出液のインビトロ酵素活性。活性は、 $\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$ 細胞タンパク質で表す。N.D.、決定せず。

【表 9】

遺伝子	基質	アルデヒドデヒドロゲナーゼ		アルコールデヒドロゲナーゼ	
		ブチリル-CoA	アセチル-CoA	ブチルアルデヒド	アセトアルデヒド
0002		0.0076	0.0046	0.0264	0.0247
0003n		0.0060	0.0072	0.0080	0.0075
0011		0.0069	0.0095	0.0265	0.0093
0013		N.D.	N.D.	0.0130	0.0142
0023		0.0089	0.0137	0.0178	0.0235
0025		0	0.0001	N.D.	N.D.
0026		0	0.0005	0.0024	0.0008

10

【0268】

BDO生成実験では、ポルフィロモナス・ギンギバリスW83(遺伝子0034)由来のcat2を、4-HBの4-HB-CoAへの変換のためにpZA33上に含め、候補デヒドロゲナーゼ遺伝子をpZE13上に発現させた。宿主株は、MG1655lacI^Qであった。アルコールデヒドロゲナーゼ及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ候補とともに、基質の類似性により、この工程で機能するCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(sucD)の能力をも試験した。細胞を、10mMの4-HBが補給されたLB培地中でOD約0.5まで成長させ、1mMのIPTGで誘導し、24時間後に培養ブロス試料を採取し、以下に記載されるようにBDOについて分析した。C. アセトブチリクム由来のadhE2、C. クルイベリ由来のsucD、又はP. ギンギバリス由来のsucDを使用すると最良のBDO生成が生じた(図5)。興味深いことに、生成されたBDOの絶対量は、好気性条件下の方が大きかった；しかし、これは、主として、嫌気性培養物においてより低い細胞密度が達成されたことによる。細胞ODに対して正規化すると、単位バイオマス当たりのBDO生成量は、嫌気性条件下の方が大きい(表10)。

20

【0269】

表10. C. アセトブチリクム由来adhE2、C. クルイベリ由来sucD、又はP. ギンギバリス由来sucD(図3の実験2、9及び10からのデータ)を発現する細胞の培養液、並びに陰性対照(実験1)からの絶対及び正規化BDO濃度

【表 10】

発現された遺伝子	条件	BDO (μM)	OD (600nm)	BDO/OD
なし	好気性	0	13.4	0
なし	微好気性	0.5	6.7	0.09
なし	嫌気性	2.2	1.26	1.75
0002	好気性	138.3	9.12	15.2
0002	微好気性	48.2	5.52	8.73
0002	嫌気性	54.7	1.35	40.5
0008n	好気性	255.8	5.37	47.6
0008n	微好気性	127.9	3.05	41.9
0008n	嫌気性	60.8	0.62	98.1
0035	好気性	21.3	14.0	1.52
0035	微好気性	13.1	4.14	3.16
0035	嫌気性	21.3	1.06	20.1

40

【0270】

50

前述のように、副産物として酢酸を生成しない、4-HBを4-HB-CoAに変換するための経路を使用することが有利であり得る。この目的で、図1の工程10及び11を介してこの変換を実施するためのC.アセトブチリクム由来のホスホトランスブチリラーゼ(ptb)及び酪酸キナーゼ(bk)の使用を試験した。C.アセトブチリクム由来の原生ptb/bkオペロン(遺伝子0020及び0021)をクローン化し、pZA33に発現させた。得られた構築物を含む細胞の抽出物を採取し、本明細書に記載のように2つの酵素活性についてアッセイした。BKの比活性は約65U/mgであり、PTBの比活性は約5U/mgであった。活性1単位(U)は、室温における1分間の1 μ Mの基質の変換と定義される。最後に、構築物を4-HBのBDOへの変換への参画について試験した。宿主株を上記pZA33-0020-0021構築物及びpZE13-0002で形質転換し、上記の図5に使用された好気性手順を使用するBDO生成におけるcat2の使用と比較した。cat2を使用した場合には2mMであるのに対して、BK/PTB菌株は、1mMのBDOを生成した(表11)。興味深いことに、それらの結果は、宿主株が原生adhE遺伝子の欠失を含むかどうかによって左右されていた。

10

【0271】

表11. P.ギンギバリス(0034)由来cat2又はpZA33におけるC.アセトブチリクム由来PTB/BK遺伝子のいずれかとともにpZE13におけるC.アセトブチリクム由来adhE2を発現する細胞の培養液からの絶対及び正規化BDO濃度。宿主株は、MG1655 lacI^Q、又はMG1655 adhE lacI^Qである。

【表11】

遺伝子	宿主株	BDO (μ M)	OD (600nm)	BDO/OD
0034	MG1655 lacI ^Q	0.827	19.9	0.042
0020+0021	MG1655 lacI ^Q	0.007	9.8	0.0007
0034	MG1655 Δ adhE lacI ^Q	2.084	12.5	0.166
0020+0021	MG1655 Δ adhE lacI ^Q	0.975	18.8	0.052

20

【0272】

(グルコースからのBDOの生成) 経路確認の最終工程は、E.コリにおける経路の4-HB及びBDOセグメントの両方を発現させ、グルコース最小培地におけるBDOの生成を実証することである。全ての必要な遺伝子が2つのプラスミドに適合するように新たなプラスミドを構築した。概して、cat1、adhE及びsucD遺伝子をpZE13から発現させ、cat2及び4-HBdをpZA33から発現させた。遺伝子源及び遺伝子順序の様々な組合せをMG1655 lacI^Qバックグラウンドで試験した。20g/Lのグルコース、緩衝能を向上させるための100mMの3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、10 μ g/mLのチアミン及び適切な抗生物質が補給されたM9最小培地(6.78g/LのNa₂HPO₄、3.0g/LのKH₂PO₄、0.5g/LのNaCl、1.0g/LのNH₄Cl、1mMのMgSO₄、0.1mMのCaCl₂)にて嫌気性条件で細胞を成長させた。接種の約15時間後に0.25mMのIPTGを添加し、誘導の24及び48時間後に培養上澄み試料を採取し、BDO、4-HB、コハク酸について分析を行った。BDOの生成量は、遺伝子順序への依存性を示すように思われた(表12)。pZA33上に最初にcat2を発現させた後に4-HBdを発現させ、pZE13上にcat1を発現させた後にP.ギンギバリスsucDを発現させて、0.5mMを超える最大のBDO生成量が得られた。C.アセトブチリクムadhE2をpZE13上の最後の位置に追加すると、わずかな向上がもたらされ、4-HB及びコハク酸もより高い濃度で生成された。

30

40

【0273】

表12. 20g/Lグルコースを補充した最小培地で成長させた、BDO経路遺伝子の組合せを発現する組換えE.コリ株におけるBDO、4-HB、及びコハク酸の生成。濃度は、mMである。

【表 1 2】

試料	pZE13	pZA33	導入OD	24時間				48時間			
				OD600nm	Su	4HB	BDO	OD600nm	Su	4HB	BDO
1	cat1(0004)-sucD(0035)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.92	1.29	5.44	1.37	0.240	1.24	6.42	1.49	0.280
2	cat1(0004)-sucD(0008N)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.36	1.11	6.90	1.24	0.011	1.06	7.63	1.33	0.011
3	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0035)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.20	0.44	0.34	1.84	0.050	0.60	1.93	2.67	0.119
4	cat1(0004)-sucD(0035)-adhE(0002)	4hbd (0036)-cat2(0034)	1.31	1.90	9.02	0.73	0.073	1.95	9.73	0.82	0.077
5	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0008N)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.17	0.45	1.04	1.04	0.008	0.94	7.13	1.02	0.017
6	cat1(0004)-sucD(0008N)-adhE(0002)	4hbd (0036)-cat2(0034)	1.30	1.77	10.47	0.25	0.004	1.80	11.49	0.28	0.003
7	cat1(0004)-sucD(0035)	cat2(0034)-4hbd(0036)	1.09	1.29	5.63	2.15	0.461	1.38	6.66	2.30	0.520
8	cat1(0004)-sucD(0008N)	cat2(0034)-4hbd(0036)	1.81	2.01	11.28	0.02	0.000	2.24	11.13	0.02	0.000
9	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0035)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0.24	1.99	2.02	2.32	0.106	0.89	4.85	2.41	0.186
10	cat1(0004)-sucD(0035)-adhE(0002)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0.98	1.17	5.30	2.08	0.569	1.33	6.15	2.14	0.640
11	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0008N)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0.20	0.53	1.38	2.30	0.019	0.91	8.10	1.49	0.034
12	cat1(0004)-sucD(0008N)-adhE(0002)	cat2(0034)-4hbd(0036)	2.14	2.73	12.07	0.16	0.000	3.10	11.79	0.17	0.002
13	ベクターのみ	ベクターのみ	2.11	2.62	9.03	0.01	0.000	3.00	12.05	0.01	0.000

10

【 0 2 7 4】

(GCMSによるBDO、4-HB及びコハク酸の分析) 発酵試料及び細胞培養試料におけるBDO、4-HB及びコハク酸をシリル化によって誘導体化し、文献報告から採用された方法(Simonovらの文献、J. Anal. Chem. 59:965-971(2004))を使用してGCMSにより定量分析した。開発された方法は、1 μ Mまでの良好な感度の低下、少なくとも25mMまでの直線性、並びに優れた選択性及び再現性を示した。

【 0 2 7 5】

試料調製を以下のように実施した：100 μ Lの濾過した(0.2 μ m又は0.45 μ mシリンジフィルタ)試料、例えば発酵ブロス、細胞培養物又は標準溶液を、スピード・バク・コンセンレータ(Savant SVC-100H)にて室温で約1時間にわたって乾燥させた後、内部標準としてのジメチルホルムアミド中の10mMシクロヘキサノール溶液20 μ Lを添加した。混合物を、均質になるように渦攪拌し、且つ水浴(Branson 3510)にて15分間にわたって音波処理した。100 μ Lのシリル化誘導体化試薬、即ち1%トリメチルクロロシランを含むN,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロ-アセトイミド(BSTFA)を添加し、混合物を70℃で30分間インキュベートした。誘導体化試料を5分間遠心し、透明溶液をGCMSに直接注入した。全ての化学物質及び試薬は、J. T. Bakerから購入したBDOを除いて、Sigma-Aldrichからのものであった。

20

【 0 2 7 6】

電子衝撃イオン化(EI)モードで動作される質量選択性検出器(MSD)5973Nにインターフェース接続されたAgilentガスクロマトグラフ6890Nで実施されるGCMSを分析に使用した。30 m \times 0.25mm(内径) \times 0.25 μ m(膜厚)のDB-5MS毛管カラム(J&W Scientific、Agilent Technologies)を使用した。20:1の分割比で1 μ Lの試料を導入する分割注入モードでGCを動作させた。注入ポート温度は、250℃であった。ヘリウムをキャリアガスとして使用し、流量を1.0mL/分に維持した。関心対象の分析物の良好な分解能及び最小のマトリックス干渉を確保するように、温度勾配プログラムを最適化した。オーブンを最初に1分間にわたって80℃に保持し、次いで2℃/分で120℃まで昇温させた後、100℃/分で320℃まで高速昇温させ、最終的に6分間にわたって320℃に保持した。MSインターフェース転送ラインを280℃に維持した。「小質量」MS同調設定及び30~400m/z質量範囲走査を使用し、データを取得した。全分析時間は、3分間の溶媒遅延を含む29分間であった。保持時間は、BSTFA誘導体化シクロヘキサノール、BDO、4-HB及びコハク酸に対してそれぞれ5.2、10.5、14.0及び18.2分に対応する。定量分析では、以下の特異的マスフラグメントを選択した(抽出イオンクロマトグラム)：m/zを内部標準シクロヘキサノールに対して157、BDOに対して116、4-HB及びコハク酸の両方に対して147とした。試料マトリックスをできるだけマッチさせるために、対応する細胞培養物又は発酵培地中の分析物溶液を使用して、標準検量線を作製した。環境データ分析ChemStationソフトウェア(Agilent Technologies)を使用してGCMSデータを処理した。

30

40

【 0 2 7 7】

それらの結果は、生成された4-HB及びBDOのほとんどが¹³Cで標識されていることを示していた(図6、右側)。非標識グルコースで成長された並行培養物からの質量スペクトルを

50

比較のために示す(図6、左側)。認められるピークは、代謝物質からの異なる数の炭素原子を含む誘導体化分子のフラグメントに対するものであることに留意されたい。誘導体化試薬は、天然標識分布する炭素及び珪素原子をも若干与えるため、結果は、厳密に定量的でない。

【0278】

(代替経路を使用する4-HBからのBDOの生成) また、様々な代替経路をBDO生成について試験した。これは、コハク酸をスクシニル-CoA(表13、第2～3列)に変換する原生E. コリ Su cCD酵素の使用、 α -ケトグルタル酸経路における α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼの使用(表13、第4列)、及び4HBのCoA誘導体を生成するための代替的手段としてのPTB/BKの使用(表13、第1列)を含む。これらの変異体を包含する、表13に示される遺伝子を発現するプラスミドを含む菌株を構築した。それらの結果は、全ての場合において、4-HB及びBDOの生成が生じたことを示している(表13)。

10

【0279】

表13. 20g/Lグルコースを補充した最小培地で嫌氣的に成長させ、且つ0.1mM IPTGによる誘導の24時間後に集菌した、種々のBDO経路変異のための組換えE. コリ株遺伝子におけるBDO、4-HB、及びコハク酸の生成。濃度はmMである。

【表13】

pZE13上の遺伝子	pZA33上の遺伝子	コハク酸	4-HB	BDO
0002+0004+0035	0020n-0021n-0036	0.336	2.91	0.230
0038+0035	0034-0036	0.814	2.81	0.126
0038+0035	0036-0034	0.741	2.57	0.114
0035+0032	0034-0036	5.01	0.538	0.154

20

【0280】

(実施例III)

(4-ヒドロキシブタン酸、 γ -ブチロラクトン及び1,4-ブタンジオールの生合成)

本実施例では、発酵及び他のバイオプロセスを使用する4-ヒドロキシブタン酸、 γ -ブチロラクトン及び1,4-ブタンジオールの生合成生成について記載する。

30

【0281】

4-HB発酵工程を、精製GBL、1,4-ブタンジオール(BDO)及びテトラヒドロフラン(THF)を生成するための完全なプロセスに統合するための方法を以下に記載する。4-HB及びGBLは平衡であるため、発酵プロセスは、両化合物を含むことになる。この平衡は、低いpHにおいては、GBLに有利になるようにシフトする。従って、発酵は、pH7.5以下、一般にはpH5.5以下で操作することができる。バイオマスの除去後、生成物の流れは分離工程に入り、そこでGBLを除去し、4-HBが豊富な残留流れをリサイクルする。最後に、GBLを蒸留して、あらゆる不純物を除去する。該プロセスは、3つの方法：1)流加発酵及びバッチ分離；2)流加発酵及び連続分離；3)連続発酵及び連続分離：の1つで操作する。これらの方式の最初の2つを図7に概略的に示す。以下に記載される統合された発酵手順は、また、BDO及び後続のBDO系統の生成物の生合成のための本発明のBDO生成細胞に使用される。

40

【0282】

(4-HB/GBLを生成するための発酵プロトコール(バッチ))：5g/Lのリン酸カリウム、2.5g/Lの塩化アンモニウム、0.5g/Lの硫酸マグネシウム及び30g/Lのトウモロコシ浸出液を含む5Lのプロス、並びに20g/Lの初期グルコース濃度を使用して、N₂/CO₂混合物が散布された10Lバイオリアクターにて生成生物体を成長させる。細胞が成長し、グルコースを利用すると、追加の70%のグルコースを、グルコース消費量をほぼ均衡化させる速度でバイオリアクターに供給する。バイオリアクターの温度を摂氏30度に維持する。4-HBが20～200g/Lの濃度に達し、細胞密度が5～10g/Lになるまで、成長を約24時間続ける。pHは制御されず、典型的には実験の終了時までpH3～6まで低下することになる。培養期間が終了する

50

と、発酵槽内容物を細胞分離ユニット(例えば遠心器)に通して、細胞及び細胞デブリを除去し、発酵ブロスを生成物分離ユニットに移す。4-HB/GBLの有機溶液を得るために、水非混和性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準分離手順によって、4-HB及び/又はGBLの単離を行う。次いで、得られた溶液に標準的な蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離されるGBL(沸点204~205)を得る。

【0283】

(4-HB/GBLを生成するための発酵プロトコール(完全連続))：初期グルコース濃度を30~50g/Lにすることを除いては、上記の装置及び培地組成を使用して生成生物体を最初にバッチ方式で成長させる。グルコースを使い果たすと、同じ組成の供給培地を0.5L/時~1L/時の速度で連続的に供給し、液体を同じ速度で回収する。バイオリアクター中の4-HB濃度を30~40g/Lの一定値に維持し、細胞密度を3~5g/Lの一定値に維持する。温度を摂氏30度に維持し、必要に応じて濃NaOH及びHClを使用してpHを4.5に維持する。バイオリアクターを1カ月間にわたって連続的に動作させ、4-HBの濃度の一貫性を確認するために試料を毎日採取する。連続方式では、新たな供給培地が供給される毎に発酵槽内容物を絶えず除去する。次いで、細胞、培地並びに生成物4-HB及び/又はGBLを含む排出流に、細胞及び細胞デブリを除去する又は除去しない連続生成物分離手順を施し、4-HB/GBLの有機溶液を得るために、水非混和性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する連続液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準連続分離手順を行う。続いて、得られた溶液に標準連続蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離されるGBL(沸点204~205)を得る。

10

20

【0284】

(GBL還元プロトコール)：一旦GBLを上記のように単離及び精製すると、それに当該技術分野で周知のもの(引用参考文献)などの還元プロトコールを施して、1,4-ブタンジオール又はテトラヒドロフラン(THF)或いはそれらの混合物を生成する。水素圧下でGBLと組み合わせられた不均一又は均一水素化触媒は、生成物1,4-ブタンジオール又はテトラヒドロフラン(THF)又はそれらの混合物を生じることが周知である。GBL単離及び精製の前に、上記のように発酵ブロスから分離された4-HB/GBL生成物混合物にこれらの同じ還元プロトコールを直接施して、生成物1,4-ブタンジオール又はテトラヒドロフラン又はそれらの混合物を得ることができることに留意することは重要である。次いで、得られた生成物1,4-ブタンジオール及びTHFを、当該技術分野で周知の手順によって単離及び精製する。

30

【0285】

(BDO又はTHFを直接生成するための発酵及び水素化プロトコール(バッチ))：5g/Lのリン酸カリウム、2.5g/Lの塩化アンモニウム、0.5g/Lの硫酸マグネシウム及び30g/Lのトウモロコシ浸出液を含む5Lのブロス、並びに20g/Lの初期グルコース濃度を使用して、N₂/CO₂混合物が散布された10Lバイオリアクターにおいて細胞を成長させる。細胞が成長し、グルコースを利用すると、追加の70%のグルコースを、グルコース消費量をほぼ均衡化させる速度でバイオリアクターに供給する。バイオリアクターの温度を摂氏30度に維持する。4-HBが20~200g/Lの濃度に達し、細胞密度が全般的に5~10g/Lになるまで、成長を約24時間続ける。pHは制御されず、典型的には実験の終了時までpH3~6まで低下することになる。培養期間が終了すると、発酵槽内容物を細胞分離ユニット(例えば遠心器)に通して、細胞及び細胞デブリを除去し、発酵ブロスを還元ユニット(例えば水素化容器)に移し、そこで4-HB/GBL混合物を1,4-ブタンジオール又はTHF又はそれらの混合物に直接還元する。還元手順の完了後に、反応器内容物を生成物分離ユニットに移す。1,4-ブタンジオール及び/又はTHFの有機溶液を得るために、水非混和性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準分離手順によって、1,4-ブタンジオール及び/又はTHFの単離を行うことになる。次いで、得られた溶液に標準的な蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離される1,4-ブタンジオール及び/又はTHFを得る。

40

【0286】

50

(BDO又はTHFを直接生成するための発酵及び水素化プロトコール(完全連続))：初期グルコース濃度を30～50g/Lにすることを除いては、上記の装置及び培地組成を使用して細胞を最初にバッチ方式で成長させる。グルコースを使い果たすと、同じ組成の供給培地を0.5L/時～1L/時の速度で連続的に供給し、液体を同じ速度で回収する。バイオリアクター中の4-HB濃度を30～40g/Lの一定値に維持し、細胞密度を3～5g/Lの一定値に維持する。温度を摂氏30度に維持し、必要に応じて濃NaOH及びHClを使用してpHを4.5に維持する。バイオリアクターを1カ月間にわたって連続的に動作させ、4-HBの濃度の一貫性を確認するために試料を毎日採取する。連続方式では、新たな供給培地が供給される毎に発酵槽内容物を絶えず除去する。次いで、細胞、培地並びに生成物4-HB及び/又はGBLを含む排出流を細胞分離ユニット(例えば遠心器)に通して、細胞及び細胞デブリを除去し、発酵ブロス連続還元ユニット(例えば水素化容器)に移し、そこで4-HB/GBL混合物を1,4-ブタンジオール又はTHF又はそれらの混合物に直接還元する。還元手順の完了後に、反応器内容物を連続生成物分離ユニットに移す。1,4-ブタンジオール及び/又はTHFの有機溶液を得るために、水非混和性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準連続分離手順によって、1,4-ブタンジオール及び/又はTHFの単離を行う。次いで、得られた溶液に標準的な蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離される1,4-ブタンジオール及び/又はTHFを得る。

10

【0287】

(BDOを直接生成するための発酵プロトコール(バッチ))：5g/Lのリン酸カリウム、2.5g/Lの塩化アンモニウム、0.5g/Lの硫酸マグネシウム及び30g/Lのトウモロコシ浸出液を含む5Lのブロス、並びに20g/Lの初期グルコース濃度を使用して、N₂/CO₂混合物が散布された10Lバイオリアクターにおいて生成生物体を成長させる。細胞が成長し、グルコースを利用すると、追加の70%のグルコースを、グルコース消費量をほぼ均衡化させる速度でバイオリアクターに供給する。バイオリアクターの温度を摂氏30度に維持する。BDOが20～200g/Lの濃度に達し、細胞密度が全般的に5～10g/Lになるまで、成長を約24時間続ける。培養期間が終了すると、発酵槽内容物を細胞分離ユニット(例えば遠心器)に通して、細胞及び細胞デブリを除去し、発酵ブロスを生成物分離ユニットに移す。BDOの有機溶液を得るために、水非混和性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準分離手順によって、BDOの単離を行うことになる。次いで、得られた溶液に標準的な蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離されるBDO(沸点228～229)を得る。

20

30

【0288】

(BDOを直接生成するための発酵プロトコール(完全連続))：初期グルコース濃度を30～50g/Lにすることを除いては、上記の装置及び培地組成を使用して生成生物体を最初にバッチ方式で成長させる。グルコースを使い果たすと、同じ組成の供給培地を0.5L/時～1L/時の速度で連続的に供給し、液体を同じ速度で回収する。バイオリアクター中のBDO濃度を30～40g/Lの一定値に維持し、細胞密度を3～5g/Lの一定値に維持する。温度を摂氏30度に維持し、必要に応じて濃NaOH及びHClを使用してpHを4.5に維持する。バイオリアクターを1カ月間にわたって連続的に動作させ、BDOの濃度の一貫性を確認するために試料を毎日採取する。連続方式では、新たな供給培地が供給される毎に発酵槽内容物を絶えず除去する。次いで、細胞、培地並びに生成物BDOを含む排出流に、細胞及び細胞デブリを除去する又は除去しない連続生成物分離手順を施し、BDOの有機溶液を得るために、水非混和性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する連続液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準連続分離手順によって行う。続いて、得られた溶液に標準連続蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離されるBDO(沸点228～229)を得る(融点20)。

40

【0289】

(実施例IV)

(例示的なBDO経路)

50

本実施例では、1,4-ブタンジオール(BDO)合成経路についての例示的な酵素及び対応する遺伝子を記載する。

【0290】

例示的なBDO合成経路を図8～13に示す。図8～13に示される経路は、共通の中央代謝中間体から1,4-ブタンジオールまでである。図8～13に示される全ての転換は、表14に示される転換の18の一般的範疇に含まれる。各範疇のいくつかの生化学的に特徴づけられた候補遺伝子を以下に記載する。宿主生物体においてクローン化及び発現されると図9～13の適切な転換を触媒するために適用できる遺伝子を具体的に列挙する。図9～13の主要工程の各々についての上から3つの例示的な遺伝子を表15～23に示す(以下参照)。図8に示される経路のために提供された例示的な遺伝子は、本明細書に記載されている。

10

【0291】

表14. 共通の中央代謝中間体を1,4-ブタンジオールに変換するのに必要な酵素種。各ラベルの最初の3つの数字は、最初の3つの酵素コミッション番号に対応する。コミッション番号の数字は、基質特異性に非依存的な一般的な転換の種類を示す。

【表14】

ラベル	機能
1.1.1.a	オキシドレダクターゼ(ケトンからヒドロキシル又はアルデヒドからアルコールへ)
1.1.1.c	オキシドレダクターゼ(2工程、アシル-CoAからアルコール)
1.2.1.b	オキシドレダクターゼ(アシル-CoAからアルデヒド)
1.2.1.c	オキシドレダクターゼ(2-オキソ酸からアシル-CoA、脱炭酸)
1.2.1.d	オキシドレダクターゼ(リン酸化/脱リン酸化)
1.3.1.a	CH-CHドナーに作用するオキシドレダクターゼ
1.4.1.a	アミノ酸に作用するオキシドレダクターゼ
2.3.1.a	アシルトランスフェラーゼ(リン酸基の転移)
2.6.1.a	アミノトランスフェラーゼ
2.7.2.a	ホストトランスフェラーゼ、カルボキシル基受容体
2.8.3.a	CoAトランスフェラーゼ
3.1.2.a	チオールエステル ヒドロラーゼ(CoA特異的)
4.1.1.a	カルボキシリアーゼ
4.2.1.a	ヒドロリアーゼ
4.3.1.a	アンモニアリアーゼ
5.3.3.a	イソメラーゼ
5.4.3.a	アミノムターゼ
6.2.1.a	酸-チオールリガーゼ

20

30

【0292】

(1.1.1.a-オキシドレダクターゼ(アルデヒドからアルコール又はケトンからヒドロキシル))

40

アルデヒドからアルコール。アルデヒドからアルコールの変換を触媒する酵素、即ちアルコールデヒドロゲナーゼ又は同等にアルデヒドレダクターゼをコードしている例示的な遺伝子は、C2-C14の中鎖アルコールデヒドロゲナーゼをコードしているalrA(Taniらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 66:5231-5235 (2000))、サッカロミセス・セレビスシアエ由来のADH2(Atsumiらの文献、Nature 451:86-89 (2008))、C(3)より長い分子を選択するE. コリ由来のyqhD(Sulzenbacherらの文献、Journal of Molecular Biology 342:489-502 (2004))、並びにブチリアルデヒドをブタノールに変換するC. アセトブチリウム由来のbdhI及びbdhII(Walterらの文献、Journal of Bacteriology 174:7149-7158 (1992))を含む。これらの例示的な遺伝子産物の各々についてのタンパク質配列を、入手可能であれば、以

50

下のGenBank寄託番号を使用して見いだすことができる。

【表 1 5】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>alrA</i>	BAB12273.1	9967138	アシネトバクター種M-1株
<i>ADH2</i>	NP_014032.1	6323961	サッカロミセス・セレビスアエ
<i>yqhD</i>	NP_417484.1	16130909	エシェリキア・コリ
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	15896543	クロストリジウム・アセトブチリウム
<i>bdh II</i>	NP_349891.1	15896542	クロストリジウム・アセトブチリウム

10

【 0 2 9 3 】

4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性を示す酵素(EC 1.1.1.61)もこの範疇に含まれる。当該酵素は、ラルストニア・ユートロファ(Bravoらの文献、J. Forensic Sci 49:379-387 (2004))、クロストリジウム・クルイベリ(Wolffらの文献、Protein Expr. Purif. 6:206-212 (1995))及びアラビドプシス・サリアナ(Breitkreuzらの文献、J. Biol. Chem. 278:41552-41556 (2003))において特徴づけられた。

【表 1 6】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>4hbd</i>	YP_726053.1	113867564	ラルストニア・ユートロファH16
<i>4hbd</i>	L21902.1	146348486	クロストリジウム・クルイベリDSM555
<i>4hbd</i>	Q94B07	75249805	アラビドプシス・サリアナ

20

【 0 2 9 4 】

別の例示的な酵素は、3-ヒドロキシイソ酪酸のメチルマロン酸セミアルデヒドへの可逆的酸化を触媒する3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼである。この酵素は、バリン、ロイシン及びイソロイシン分解に関与し、細菌、真核生物及び哺乳類において同定された。サーマス・サーモフィルスHB8由来のP84067によってコードされた酵素を構造的に特徴づけた(Lokanathらの文献、J Mol Biol 352:905-17 (2005))。同位体標識された基質を使用して、ヒト3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼの可逆性を実証した(Manningらの文献、Biochem J 231:481-484 (1985))。この酵素をコードしている更なる遺伝子は、ホモサピエンスの3hidh(Hawesらの文献、Methods Enzymol. 324:218-228 (2000))及びオリクトラガス・クニクルス(Chowdhuryらの文献、Biosci. Biotechnol Biochem. 60:2043-2047 (1996) ; Hawesらの文献、Methods Enzymol. 324:218-228 (2000))、シュードモナス・アエルギノサのmmsb、及びシュードモナス・プチダのdhat(Aberhartらの文献、J Chem. Soc. [Perkin 1] 6:1404-1406 (1979) ; Chowdhuryらの文献、Biosci. Biotechnol Biochem. 67:438-441 (2003) ; Chowdhuryらの文献、Biosci. Biotechnol Biochem. 60:2043-2047 (1996))を含む。

30

【表 1 7】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>P84067</i>	P84067	75345323	サーマス・サーモフィルス
<i>mmsb</i>	P28811.1	127211	シュードモナス・アエルギノサ
<i>dhat</i>	Q59477.1	2842618	シュードモナス・プチダ
<i>3hidh</i>	P31937.2	12643395	ホモ・サピエンス
<i>3hidh</i>	P32185.1	416872	オリクトラガス・クニクルス

40

【 0 2 9 5 】

いくつかの3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ酵素は、また、マロン酸セミアルデ

50

ヒドを3-ヒドロキシプロピオン酸(3-HP)に変換することが示された。この活性を示す3つの遺伝子候補は、シュードモナス・アエルギノサPA01(62)由来の*mmsB*、シュードモナス・プチダKT2440由来の*mmsB*(Liaoらの米国特許公報第2005/0221466号)、及びシュードモナス・プチダE23由来の*mmsB*(Chowdhuryらの文献、Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:2043-2047 (1996))である。アルカリゲネス・ファエカリスM3Aにおける3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素も同定された(Gokamらの米国特許第7,393,676号; Liaoらの米国特許公報第2005/0221466号)。ロドバクター・スバエロイデスを含む他の生物体からの更なる遺伝子候補を配列類似性によって推定することができる。

【表 18】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>mmsB</i>	AAA25892.1	151363	シュードモナス・アエルギノサ
<i>mmsB</i>	NP_252259.1	15598765	シュードモナス・アエルギノサ PA01
<i>mmsB</i>	NP_746775.1	26991350	シュードモナス・プチダ KT2440
<i>mmsB</i>	JC7926	60729613	シュードモナス・プチダ E23
<i>orfB1</i>	AAI26884	16588720	ロドバクター・スバエロイデス

10

【0296】

マロン酸セミアルデヒドの3-HPへの変換を2つの他の酵素：NADH依存性3-ヒドロキシプロピオン酸デヒドロゲナーゼ及びNADPH依存性マロン酸セミアルデヒドレダクターゼによって実施することもできる。NADH依存性3-ヒドロキシプロピオン酸デヒドロゲナーゼは、細菌及び植物におけるプロピオン酸からのベータ-アラニン生合成経路に関連すると考えられる(Rathinasabapathiの文献、B. Journal of Plant Pathology 159:671-674 (2002); Stadtman, E.R.の文献、J. Am. Chem. Soc. 77:5765-5766 (1955))。この酵素は、今日まで生物体における遺伝子と対応づけられていない。NADPH依存性マロン酸セミアルデヒドレダクターゼは、独立栄養性CO₂固定細菌における逆反応を触媒する。酵素活性は、メタロスファエラ・セデュラにおいて検出されたが、遺伝子のアイデンティティは把握されていない(Alberらの文献、J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006))。

20

【0297】

ケトンからヒドロキシル。ケトンヒドロキシル官能基に変換するいくつかの例示的なアルコールデヒドロゲナーゼが存在する。E. コリ由来の2つの当該酵素をリンゴ酸デヒドロゲナーゼ(mdh)及び乳酸デヒドロゲナーゼ(ldhA)によってコードしている。加えて、ラルストニア・ユートロファ由来の乳酸デヒドロゲナーゼは、乳酸、2-オキソ酪酸、2-オキソペンタン酸及び2-オキソグルタル酸などの様々な鎖長の基質に対して高度な活性を示すことが証明された(Steinbuchel, A.及びH. G. Schlegelの文献、Eur. J. Biochem. 130:329-334 (1983))。アルファ-ケトアジピン酸のアルファ-ヒドロキシアジピン酸への変換を、ラット及びヒト胎盤に見いだされることが報告された酵素である2-ケトアジピン酸レダクターゼによって触媒することができる(Sudaらの文献、Arch. Biochem. Biophys. 176:610-620 (1976); Sudaらの文献、Biochem. Biophys. Res. Commun. 77:586-591 (1977))。この工程のための追加的候補は、クローン化され、特徴づけられたヒト心臓由来のミトコンドリア3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(bdh)である(Marksらの文献、J. Biol. Chem. 267:15459-15463 (1992))。この酵素は、3-ヒドロキシ酸に対して作用するデヒドロゲナーゼである。別の例示的なアルコールデヒドロゲナーゼは、C. ベイジェリンキーにおいて(Ismailの文献、J. Bacteriol. 175:5097-5105 (1993))及びT. ブロッキーにおいて(Lamedらの文献、Biochem. J. 195:183-190 (1981); Peretz及びBursteinの文献、Biochemistry 28:6549-6555 (1989))示されたように、アセトンをイソプロパノールに変換する。

30

40

【表 19】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>mdh</i>	AAC76268.1	1789632	エシェリキア・コリ
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	16129341	エシェリキア・コリ
<i>ldh</i>	YP_725182.1	113866693	ラルストニア・ユートロファ
<i>bdh</i>	AAA58352.1	177198	ホモ・サピエンス
<i>adh</i>	AAA23199.2	60592974	クロストリジウム・ペイジェリンキー NRRL B593
<i>adh</i>	P14941.1	113443	サーモアナエロバクター・ブロッキー-HTD4

10

【0298】

アセトアセチル-CoAを3-ヒドロキシブチリル-CoAに変換する例示的な3-ヒドロキシアシルデヒドロゲナーゼは、C.アセトブチリウム由来の*hbd*(Boyntonらの文献、Journal of Bacteriology 178:3015-3024 (1996))、C.ペイジェリンキー由来の*hbd*(Colbyらの文献、Appl Environ.Microbiol 58:3297-3302 (1992))、及びメタロファエラ・セデュラ由来のいくつかの類似酵素(Bergらの文献、Archaea. Science. 318:1782-1786 (2007))を含む。

【表 20】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>hbd</i>	NP_349314.1	15895965	クロストリジウム・アセトブチリウム
<i>hbd</i>	AAM14586.1	20162442	クロストリジウム・ペイジェリンキー
<i>Msed_1423</i>	YP_001191505	146304189	メタロスファエラ・セデュラ
<i>Msed_0399</i>	YP_001190500	146303184	メタロスファエラ・セデュラ
<i>Msed_0389</i>	YP_001190490	146303174	メタロスファエラ・セデュラ
<i>Msed_1993</i>	YP_001192057	146304741	メタロスファエラ・セデュラ

20

【0299】

(1.1.1.c-オキシドレダクターゼ(2工程、アシル-CoAからアルコール))

アシル-CoAをアルコールに変換する例示的な2工程オキシドレダクターゼは、基質を転換するもの、例えば、アセチル-CoAをエタノールに転換するもの(例えば、E.コリ由来の*adhE*(Kesskerらの文献、FEBS. Lett. 281:59-63 (1991))、及びブチリル-CoAをブタノールに転換するもの(例えば、C.アセトブチリウム由来の*adhE2*(Fontaineらの文献、J. Bacteriol. 184:821-830 (2002))を含む。ロイコノストク・メセンテロイデスにおける*adhE*によってコードされる酵素は、アセチル-CoAをエタノールに還元することに加えて、分枝鎖化合物イソブチルアルデヒドをイソブチリル-CoAに酸化することが証明された(Kazahayaらの文献、J. Gen.Appl.Microbiol. 18:43-55 (1972); Kooらの文献、Biotechnol Lett. 27:505-510 (2005))。

30

【表 21】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>adhE</i>	NP_415757.1	16129202	エシェリキア・コリ
<i>adhE2</i>	AAK09379.1	12958626	クロストリジウム・アセトブチリウム
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	ロイコノストク・メセンテロイデス

40

【0300】

別の例示的な酵素は、マロニル-CoAを3-HPに変換することができる。この活性を有するNADPH依存性酵素は、それが3-ヒドロキシプロピオン酸回路に關与するクロロフレクス・アウランチクスにおいて特徴づけられた(Huglerらの文献、J. Bacteriol. 184:2404-24

50

10 (2002) ; Strauss及びFuchsの文献、Eur. J. Biochem. 215:633-643 (1993))。300kDaの質量を有するこの酵素は、基質特異性が高く、他の既知のオキシドレダクターゼとの配列類似性をほとんど示さない(Huglerらの文献、J.Bacteriol. 184:2404-2410 (2002))。他の生物体におけるこの酵素もこの特異的反応を触媒することが示されなかった；しかし、他の生物体が類似の経路を有し得るバイオインフォマティクスの証拠が存在する(Klattらの文献、Environ. Microbiol. 9:2067-2078 (2007))。ロセイフレクスウス・カステンホルジー、エリスロバクター種NAP1及び海洋性ガンマプロテオバクテリアHTCC2080を含む他の生体の酵素候補を配列類似性によって推定することができる。

【表 2 2】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>mcr</i>	AAS20429.1	42561982	クロフレクスウス・アウランチアクス
<i>Rcas_2929</i>	YP_001433009.1	156742880	ロセイフレクスウス・カステンホルジー
<i>NAP1_02720</i>	ZP_01039179.1	85708113	エリスロバクター種NAP1
<i>MGP2080_00535</i>	ZP_01626393.1	119504313	海洋性ガンマ プロテオバクテリアHTCC2080

10

【 0 3 0 1 】

より長鎖のアシル-CoA分子を、アルコール形成脂肪酸アシル-CoAレダクターゼをコードしているホホバ(シモンドシア・キネンシス)FARなどの酵素によって還元することができる。E. コリにおけるその過剰発現は、FAR活性及び脂肪族アルコールの蓄積をもたらした(Metzらの文献、Plant Physiology 122:635-644 (2000))。

20

【表 2 3】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>FAR</i>	AAD38039.1	5020215	シモンドシア・キネンシス

【 0 3 0 2 】

(1.2.1.b-オキシドレダクターゼ(アシル-CoAからアルデヒド))

いくつかのアシル-CoAデヒドロゲナーゼは、アシル-CoAを、その対応するアルデヒドに還元することが可能である。当該酵素をコードしている例示的な遺伝子は、脂肪酸アシル-CoAレダクターゼをコードしているアシネトバクター・カルコアセチカス*acr1*(Reiser及びSomerville、J. Bacteriology 179:2969-2975 (1997))、アシネトバクター種M-1脂肪酸アシル-CoAレダクターゼ(Ishigeらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195 (2002))、並びにクロストリジウム・クルイベリにおける*sucD*遺伝子によってコードされるCoA及びNADP依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(Sohling及びGottschalkの文献、J Bacteriol 178:871-80 (1996) ; Sohling及びGottschalkの文献、J Bacteriol. 178:871-880 (1996))を含む。P. ギンギパリスの*SucD*は、別のコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼである(Takahashiらの文献、J. Bacteriol. 182:4704-4710 (2000))。bphGによってコード化される、シュドモナス種におけるアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼをアシル化する酵素は、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド及びホルムアルデヒドを酸化及びアシル化することが証明されたため、更に別の酵素である(Powlowskiらの文献、J Bacteriol. 175:377-385 (1993))。

30

40

【表 2 4】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>acrI</i>	YP_047869.1	50086359	アシネトバクター・カルコアセチカス
<i>acrI</i>	AAC45217	1684886	アシネトバクター・バイリイ
<i>acrI</i>	BAB85476.1	18857901	アシネトバクター種M-1株
<i>sucD</i>	P38947.1	730847	クロストリジウム・クルイペリ
<i>sucD</i>	NP_904963.1	34540484	ボルフィロモナス・ギンギバリス
<i>bphG</i>	BAA03892.1	425213	シュードモナス種

10

【0303】

アシル-CoAをその対応するアルデヒドに変換する追加的酵素型は、マロニル-CoAをマロン酸セミアルデヒドに転換するマロニル-CoAレダクターゼである。マロニル-CoAレダクターゼは、好熱酸性古細菌における3-ヒドロキシプロピオン酸回路を介する独立栄養性炭素固定における重要な酵素である(Bergらの文献、Science 318:1782-1786 (2007) ; Thauer, R.K.の文献、Science 318:1732-1733 (2007))。該酵素は、NADPHを補因子として利用し、メタロスファエラ種及びスルホロブス種において特徴づけられた(Alberらの文献、J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006) ; Huglerらの文献、J. Bacteriol. 184:2404-2410 (2002))。該酵素は、メタロスファエラ・セデュラにおけるMsed_0709によってコードされる(Alberらの文献、J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006) ; Bergらの文献、Science 318:1782-1786 (2007))。スルホロブス・トコダイ由来のマロニル-CoAをコードしている遺伝子をクローニングし、E. コリに異種発現させた(Alberらの文献、J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006))。これらの酵素のアルデヒドデヒドロゲナーゼ機能性は、クロロフレクス・アウランチアクスの二機能性デヒドロゲナーゼに類似するが、配列類似性がほとんどない。両マロニル-CoAレダクターゼ酵素候補は、アスパルチル-4-リン酸のアスパラギン酸セミアルデヒドへの還元及び同時脱リン酸化を触媒する酵素であるアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼとの高度な配列類似性を有する。スルホロブス・ソルファタリクス及びスルホロブス・アシドカルダリウスを含む他の生物体におけるタンパク質に対する配列相同性によって更なる遺伝子候補を見いだすことができる。

20

30

【表 2 5】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	メタロスファエラ・セデュラ
<i>mcr</i>	NP_378167.1	15922498	スルホロブス・トコダイ
<i>asd-2</i>	NP_343563.1	15898958	スルホロブス・ソルファタリクス
<i>Saci_2370</i>	YP_256941.1	70608071	スルホロブス・アシドカルダリウス

【0304】

(1.2.1.c-オキシドレダクターゼ(2-オキソ酸からアシル-CoA、脱炭酸))

この系統の酵素は、1)分枝鎖2-ケト酸デヒドロゲナーゼ、2)アルファ-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ、及び3)ピルビン酸デヒドロゲナーゼ多酵素複合体(PDHC)を含む。これらの酵素は、2-ケト酸のアシル化酸化脱炭酸をもたらす一連の部分反応を触媒する多酵素複合体である。2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体のそれぞれは、中間的代謝における重要な位置を占め、酵素活性は、典型的には厳密に制御される(Friesらの文献、Biochemistry 42:6996-7002 (2003))。それらの酵素は、アルファ-ケト酸デカルボキシラーゼ(E1)、ジヒドロリポアミドアシルトランスフェラーゼ(E2)及びジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ(E3)の3つの触媒成分の多コピーで構成された複雑であるが、共通の構造体を共有する。E3成分は、生物体における全ての2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体の間で共有される

40

50

が、E1及びE2成分は、異なる遺伝子によってコードされる。酵素成分は、複合体に多くのコピーで存在し、基質チャネリングを介して反応の指向性配列を触媒するために多数の補因子を利用する。これらのデヒドロゲナーゼ複合体の全体的なサイズは非常に大きく、分子質量は、400万～1000万Daである(即ち、リボソームより大きい)。

【0305】

2-ケト酸デヒドロゲナーゼ系統における酵素の活性は、通常、E. コリにおける嫌気性条件下では低く、又は限定される。NADH(又はNADPH)の生成が増加すると、酸化還元不均衡を招く可能性があり、NADHそのものは、酵素機能に対する阻害因子として働く。工学的試みによって、E. コリピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の嫌気性活性が高められた(Kimらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007); Kimらの文献、J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008); Zhouらの文献、Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008))。例えば、NADHの阻害効果を、E3成分におけるH322Y変異を操作することによって克服することができる(Kimらの文献、J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008))。個々の成分、及びそれらが複合体において如何に協働するかということについての構造的な研究は、この系統における酵素の触媒メカニズム及び構造への洞察を与える(Aevarssonらの文献、Nat. Struct. Biol. 6:785-792 (1999); Zhouらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14802-14807 (2001))。デヒドロゲナーゼ複合体の基質特異性は、異なる生物体で変動するが、一般に、分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼは、最も広い基質範囲を有する。

【0306】

アルファ-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ(AKGD)は、アルファ-ケトグルタル酸をスクシニル-CoAに変換し、TCA回路を介する代謝フラックスの制御の主たる部位である(Hansford, R.G.の文献、Curr. Top. Bioenerg. 10:217-278 (1980))。E. コリにおける遺伝子sucA、sucB及びlpdによってコードされると、AKGD遺伝子発現は、嫌気性条件下で、且つグルコース上での成長時に下方制御される(Parkらの文献、Mol. Microbiol. 15:473-482 (1995))。AKGDの基質範囲は狭いが、E2成分の触媒的中核の構造的な研究により、基質特異性に関与する特異的残基が正確に指摘されている(Knappらの文献、J. Mol. Biol. 280:655-668 (1998))。odhA(E1及びE2)並びにpdhD(E3、共有ドメイン)によってコードされるバシルス・スプチリスAKGDは、転写レベルで制御され、生物体の炭素源及び成長期に依存する(Resnekovらの文献、Mol. Gen. Genet. 234:285-296(1992))。酵母において、E3成分をコードしているLPD1遺伝子は、グルコースによって転写レベルで制御される(Roy及びDawesの文献、J. Gen. Microbiol. 133:925-933 (1987))。KGD1によってコードされるE1成分もグルコースによって制御され、HAP2及びHAP3の生成物によって活性化される(Repetto及びTzagoloffの文献、Mol. Cell Biol. 9:2695-2705 (1989))。生成物NADH及びスクシニル-CoAによって阻害されるAKGD酵素複合体は、その損なわれた機能がいくつかの神経疾患に関連づけられてきたように、哺乳類系において十分に研究されている(Tretter及びdam-Viziの文献、Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 360:2335-2345 (2005))。

【表26】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>sucA</i>	NP_415254.1	16128701	エシェリキア・コリ K12株 MG1655亜株
<i>sucB</i>	NP_415255.1	16128702	エシェリキア・コリ K12株 MG1655亜株
<i>lpd</i>	NP_414658.1	16128109	エシェリキア・コリ K12株 MG1655亜株
<i>odhA</i>	P23129.2	51704265	バシルス・スプチリス
<i>odhB</i>	P16263.1	129041	バシルス・スプチリス
<i>pdhD</i>	P21880.1	118672	バシルス・スプチリス
<i>KGD1</i>	NP_012141.1	6322066	サッカロミセス・セレビシアエ
<i>KGD2</i>	NP_010432.1	6320352	サッカロミセス・セレビシアエ
<i>LPD1</i>	NP_116635.1	14318501	サッカロミセス・セレビシアエ

10

20

30

40

50

【 0 3 0 7 】

2-オキソイソ吉草酸デヒドロゲナーゼとしても知られる分枝鎖2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体(BCKAD)は、分枝鎖アミノ酸分解経路に関与して、バリン、ロイシン及びイソロイシンの2-ケト酸誘導体をそれらのアシル-CoA誘導体とCO₂に変換する。バシルス・スプチリス(Wangらの文献、Eur. J. Biochem. 213:1091-1099 (1993))、ラツス・ノルベギクス(Nambaらの文献、J. Biol. Chem. 244:4437-4447 (1969))、及びシュードモナス・ブチダ(Sokatchの文献、J. Bacteriol. 148:647-652 (1981))を含む多くの生物体における複合体が研究された。バシルス・スプチリスにおいて、該酵素は、遺伝子pdhD(E3成分)、bfmBB(E2成分)、bfmBAA及びbfmBAB(E1成分)によってコードされる(Wangらの文献、Eur. J. Biochem. 213:1091-1099 (1993))。哺乳類において、該複合体は、特定のホスファターゼ及びプロテインキナーゼによるリン酸化によって制御される。複合体は、ラット肝細胞において研究されており(Chiccoらの文献、J. Biol. Chem. 269:19427-19434 (1994))、遺伝子Bckdha(E1アルファ)、Bckdhb(E1ベータ)、Dbt(E2)及びDld(E3)によってコードされる。シュードモナス・ブチダBCKAD複合体のE1及びE3成分が結晶化され(Aevanssonらの文献、Nat. Struct. Biol. 6:785-792 (1999) ; Matteviの文献、Science 255:1544-1550 (1992))、酵素複合体の研究が行われた(Sokatchらの文献、J. Bacteriol. 148:647-652 (1981))。P. ブチダBCKAD遺伝子の転写は、bkdRの遺伝子産物によって活性化される(Hesterらの文献、Eur. J. Biochem. 233:828-836 (1995))。ラツス・ノルベギクス(Paxtonらの文献、Biochem. J. 234:295-303 (1986))及びサッカロミセス・セレピシアエ(Sinclairらの文献、Biochem. Mol. Biol. Int. 31:911-922 (1993))を含むいくつかの生物体において、この複合体は、分枝鎖アミノ酸前駆体に加えて、2-オキソ酪酸及びアルファ-ケトグルタル酸などの直鎖状オキソ酸を含む広い基質範囲を有することが証明された。ウシBCKADの活性部位を代替的基質アセチル-CoAに有利になるように操作した(Meng及びChuangの文献、Biochemistry 33:12879-12885 (1994))。

【表 2 7】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>bfmBB</i>	NP_390283.1	16079459	バシルス・スプチリス
<i>bfmBAA</i>	NP_390285.1	16079461	バシルス・スプチリス
<i>bfmBAB</i>	NP_390284.1	16079460	バシルス・スプチリス
<i>pdhD</i>	P21880.1	118672	バシルス・スプチリス
<i>lpdV</i>	P09063.1	118677	シュードモナス・ブチダ
<i>bkdB</i>	P09062.1	129044	シュードモナス・ブチダ
<i>bkdA1</i>	NP_746515.1	26991090	シュードモナス・ブチダ
<i>bkdA2</i>	NP_746516.1	26991091	シュードモナス・ブチダ
<i>Bckdha</i>	NP_036914.1	77736548	ラツス・ノルベギクス
<i>Bckdhb</i>	NP_062140.1	158749538	ラツス・ノルベギクス
<i>Dbt</i>	NP_445764.1	158749632	ラツス・ノルベギクス
<i>Dld</i>	NP_955417.1	40786469	ラツス・ノルベギクス

【 0 3 0 8 】

ピルビン酸のアセチル-CoAへの変換を触媒するピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体についても広範囲に研究が行われた。E. コリ酵素において、E1成分における特異的残基が、基質特異性に関与する(Bisswanger, H.の文献、J Biol Chem. 256:815-822 (1981) ; Bremer, J.の文献、Eur. J Biochem. 8:535-540 (1969) ; Gongらの文献、J Biol Chem. 275:13645-13653 (2000))。既に述べたように、酵素工学的試みにより、嫌気性条件下でのE. コリPDH酵素活性が向上した(Kimらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007) ; Kimの文献、J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008) ; Zhouらの文献、Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008))。E. コリPDHとは対照的に、B. スプチリス複合体は活性があり、嫌気

性条件下での成長に必要とされる(Nakanoの文献、J. Bacteriol. 179:6749-6755 (1997))。グリセロール上での成長時に特徴づけられたクレブシエラ・ニューモニエPDHも嫌気性条件下で活性がある(Menzelらの文献、J. Biotechnol. 56:135-142 (1997))。ウシ腎臓由来の酵素複合体(Zhouらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14802-14807 (2001))及びアゾトバクター・ビネランジ(*Azotobacter vinelandii*)由来のE2触媒領域の結晶構造が入手可能である(Matteviらの文献、Science 255:1544-1550 (1992))。いくつかの哺乳類PDH酵素複合体は、2-オキソブタン酸などの代替的基質と反応することができるが、ラッス・ノルベギクスPDH及びBCKADの動態比較は、BCKADが、基質としての2-オキソブタン酸上でより高い活性を有することを示している(Paxtonらの文献、Biochem. J. 234:295-303 (1986))。

10

【表 2 8】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>aceE</i>	NP_414656.1	16128107	エシェリキア・コリ K12株 MG1655亜株
<i>aceF</i>	NP_414657.1	16128108	エシェリキア・コリ K12株 MG1655亜株
<i>lpd</i>	NP_414658.1	16128109	エシェリキア・コリ K12株 MG1655亜株
<i>pdhA</i>	P21881.1	3123238	バシルス・スプチリス
<i>pdhB</i>	P21882.1	129068	バシルス・スプチリス
<i>pdhC</i>	P21883.2	129054	バシルス・スプチリス
<i>pdhD</i>	P21880.1	118672	バシルス・スプチリス
<i>aceE</i>	YP_001333808.1	152968699	クレブシエラ・ニューモニエMGH78578
<i>aceF</i>	YP_001333809.1	152968700	クレブシエラ・ニューモニエMGH78578
<i>lpdA</i>	YP_001333810.1	152968701	クレブシエラ・ニューモニエMGH78578
<i>Pdha1</i>	NP_001004072.2	124430510	ラッス・ノルベギクス
<i>Pdha2</i>	NP_446446.1	16758900	ラッス・ノルベギクス
<i>Dlat</i>	NP_112287.1	78365255	ラッス・ノルベギクス
<i>Dld</i>	NP_955417.1	40786469	ラッス・ノルベギクス

20

【0309】

30

上記の大きい多酵素2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体の代替として、いくつかの嫌気性生物体は、2-ケト酸オキシドレダクターゼ系統(OFOR)の酵素を利用して、2-ケト酸のアシル化酸化脱炭酸を触媒する。デヒドロゲナーゼ複合体と異なり、これらの酵素は、鉄-硫黄クラスターを含み、異なる補因子を利用し、NAD(P)Hの代わりに電子受容体としてフェレドキシン又はフラボキシシンを使用する。この系統のたいていの酵素は、基質としてピルビン酸(POR)に特異的であるが、いくつかの2-ケト酸:フェレドキシンオキシドレダクターゼは、アルファ-ケトグルタル酸及び2-オキソブタン酸を含む基質として広範囲の2-ケト酸を受け入れることが示された(Fukuda及びWakagiの文献、Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002); Zhangらの文献、J. Biochem. 120:587-599 (1996))。1つの当該酵素は、遺伝子ST2300によってコードされたアルファ及びベータサブユニットを含む好熱酸性古細菌スルホロブス・トコダイ7由来のOFORである(Fukuda及びWakagiの文献、Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002); Zhangらの文献、J. Biochem. 120:587-599 (1996))。E. コリにおいてこのタンパク質を効率的に発現させるためにプラスミド系発現システムが開発されており(Fukudaらの文献、Eur. J. Biochem. 268:5639-5646 (2001))、基質特異性に関与する残基が決定された(Fukuda及びWakagiの文献、Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002))。最近、アエロピルム・ペルニクス(*Aeropyrum pernix*)株K1由来の2つのOFORもE. コリにクローン化され、特徴づけられ、広範囲の2-オキソ酸と反応することが判明した(Nishizawaらの文献、FEBS Lett. 579:2319-2322 (2005))。これらのOFOR候補の遺伝子配列が入手可能であるが、それらは、今日までGenBank識別子が割り当てられていない。類似の酵素が全ての古細菌、いくつかの嫌気性細菌及びミトコンドリアのない真核生

40

50

物に存在するバイオインフォマティクスの証拠が存在する(Fukuda及びWakagiの文献、Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2005))。このクラスの酵素は、還元フェレドキシンを使用して、フェレドキシンNADレダクターゼによりNADHを生成することができるため、エネルギーの観点からも興味深い(Petidemangeらの文献、Biochem. Biophys. Acta 421:334-337 (1976))。また、酵素のほとんどが嫌気性条件下で作用するように設計されるため、嫌気性条件下での活性に必要な酵素操作が、2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体系統における酵素と比べて少なく済む。

【表 2 9】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
ST2300	NP_378302.1	15922633	スルホロブス・トコダイ7

10

【 0 3 1 0 】

(1.2.1.d-オキシドレダクターゼ(リン酸化/脱リン酸化))

このクラスにおける例示的な酵素は、グリセルアルデヒド-3-リン酸をD-グリセレート1,3-ビスリン酸に変換するグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(例えば、E. コリ gapA(Branlant及びBranlantの文献、Eur. J. Biochem. 150:61-66 (1985)))、L-アスパラギン酸-4-セミアルデヒドをL-4-アスパルチル-リン酸に変換するアスパラギン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(例えば、E. コリ asd(Biellmannらの文献、Eur. J. Biochem. 104:53-58 (1980)))、N-アセチル-L-グルタミン酸-5-セミアルデヒドをN-アセチル-L-グルタミル-5-リン酸に変換するN-アセチル-ガンマ-グルタミル-リン酸レダクターゼ(例えば、E. コリ argC(Parsotらの文献、Gene 68:275-283 (1988)))、及びL-グルタミン酸-5-セミアルデヒドをL-グルタミル-5-リン酸に変換するグルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(例えば、E. コリ proA(Smithらの文献、J. Bacteriol. 157:545-551 (1984)))を含む。

20

【表 3 0】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
gapA	P0A9B2.2	71159358	エシェリキア・コリ
asd	NP_417891.1	16131307	エシェリキア・コリ
argC	NP_418393.1	16131796	エシェリキア・コリ
proA	NP_414778.1	16128229	エシェリキア・コリ

30

【 0 3 1 1 】

(1.3.1.a-CH-CH供与体に作用するオキシドレダクターゼ)

例示的なエノイル-CoAレダクターゼは、クロトノイル-CoAのブチリル-CoAへの還元を自然に触媒するC. アセトブチリクム由来のbcdの遺伝子産物である(Atsumiらの文献、Metab Eng (2007) ; Boyntonらの文献、Journal of Bacteriology 178:3015-3024 (1996))。電子伝達フラビンタンパク質をコードしているC. アセトブチリクム etfAB遺伝子の発現と並行してbcdを発現させることによってこの酵素の活性を高めることができる。エノイル-CoAレダクターゼ工程の更なる候補は、E. グラシリス由来のミトコンドリアエノイル-CoAレダクターゼである(Hoffmeisterらの文献、Journal of Biological Chemistry 280:4329-4338 (2005))。そのミトコンドリア標的リーダー配列の除去に続いてこの配列から誘導された構築物をE. コリにクローン化することで活性酵素を得た(Hoffmeisterらの文献、前掲、(2005))。この手法は、真核生物遺伝子、特に、原核生物体において、特定の細胞内区画に遺伝子産物を標的化することができるリーダー配列を有する遺伝子を発現させる技術分野の当業者に周知である。原核生物トレボネマ・デクチコラ由来のこの遺伝子の近いホモログTDE0597は、E. コリにおいてクローン化及び発現された第3のエノイル-CoAレダクター

40

50

ぜを表す(Tucci及びMartinの文献、FEBS Letters 581:1561-1566 (2007))。

【表 3 1】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>bcd</i>	NP_349317.1	15895968	クロストリジウム・アセトブチリウム
<i>etfA</i>	NP_349315.1	15895966	クロストリジウム・アセトブチリウム
<i>etfB</i>	NP_349316.1	15895967	クロストリジウム・アセトブチリウム
TER	Q5EU90.1	62287512	ユーグレナ・グラシリス
TDE0597	NP_971211.1	42526113	トレボネマ・デンチコラ

10

【0 3 1 2】

例示的な2-エン酸レダクターゼ(EC1.3.1.31)酵素は、多種多様な、 α -不飽和カルボン酸及びアルデヒドのNADH依存性還元を触媒することが知られる(Rohdichらの文献、J. Biol. Chem. 276:5779-5787 (2001))。2-エン酸レダクターゼは、C.チロブチリウム及びC.サーモアセチウム(現在ムーレラ・サーモアセチウム(*Moorella thermoacetica*)と呼ぶ)(Rohdichらの文献、前掲、(2001))を含むいくつかのクロストリジア種における*enr* (Giesel及びSimonの文献、Arch Microbiol. 135(1):51-57 (2001))によってコードされる。最近公表されたC.クルイベリのゲノム配列において、エン酸レダクターゼに対する9つのコード配列が報告され、そのうちの1つが特徴づけられた(Seedorfらの文献、Proc Natl Acad Sci U. S. A. 105(6):2128-33 (2008))。C.チロブチリウム及びC.サーモアセチウムの両方に由来する*enr*遺伝子がクローン化及び配列決定され、互いに59%の同一性を示す。前者の遺伝子は、C.クルイベリにおける特徴づけられた遺伝子に対して約75%の類似性を示すことも判明した(Giesel及びSimonの文献、Arch Microbiol. 135(1):51-57 (1983))。これらの配列に基づいて、*enr*は、E.コリにおけるジエノイルCoAレダクターゼ(*fadH*)に極めて類似していることが報告された(163 Rohdichらの文献、前掲(2001))。C.サーモアセチウム*enr*遺伝子は、また、E.コリにおいて酵素活性型で発現された(163 Rohdichらの文献、前掲(2001))。

20

【表 3 2】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>fadH</i>	NP_417552.1	16130976	エシェリキア・コリ
<i>enr</i>	ACA54153.1	169405742	クロストリジウム・ボツリヌスA3株
<i>enr</i>	CAA71086.1	2765041	クロストリジウム・チロブチリウム
<i>enr</i>	CAA76083.1	3402834	クロストリジウム・クルイベリ
<i>enr</i>	YP_430895.1	83590886	ムーレラ・サーモアセチカ

30

【0 3 1 3】

(1.4.1.a-アミノ酸に作用するオキシドレダクターゼ)

40

アミノ酸に作用するほとんどのオキシドレダクターゼは、NAD⁺あるいはNADP⁺を受容体とするアルファ-アミノ酸の酸化的脱アミノ化を触媒する。アミノ酸に作用する例示的なオキシドレダクターゼは、*gdhA*によってコードされるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(脱アミノ化)、*ldh*によってコードされるロイシンデヒドロゲナーゼ(脱アミノ化)、及び*nadX*によってコード化されるアスパラギン酸デヒドロゲナーゼ(脱アミノ化)を含む。エシェリキア・コリ由来の*gdhA*遺伝子産物(Korberらの文献、J. Mol. Biol. 234:1270-1273 (1993)) ; McPherson及びWoottonの文献、Nucleic Acids Res. 11:5257-5266 (1983))、サーモトガ・マリティマ由来の*gdh*(Kortらの文献、Extremophiles 1:52-60 (1997)) ; Lebbinkらの文献、J. Mol. Biol. 280:287-296 (1998) ; Lebbinkらの文献、J. Mol. Biol. 289:357-369 (1999))、及びハロバクテリウム・サリナルム由来の*gdhA1*(Ingoldsbyらの文献、Gen

50

e 349:237-244 (2005))は、グルタミン酸の2-オキシグルタル酸とアンモニアへの可逆的相互変換を触媒し、それぞれNADP(H)、NAD(H)又はその両方に有利に働く。バシルス・セレウスのldh遺伝子は、ロイシン、イソロイシン、バリン及び2-アミノブタン酸を含む広範な基質を有するLeuDHタンパク質をコードしている(Ansorge及びKulaの文献、Biotechnol Bioeng. 68:557-562 (2000) ; Stoyanらの文献、J. Biotechnol 54:77-80 (1997))。アスパラギン酸デヒドロゲナーゼをコードしているサーモトガ・マリティマ由来のnadX遺伝子は、NADの生合成に関与する(Yangらの文献、J.Biol.Chem. 278:8804-8808 (2003))。

【表 3 3】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>gdhA</i>	P00370	118547	エシェリキア・コリ
<i>gdh</i>	P96110.4	6226595	サーモトガ・マリティマ
<i>gdhA1</i>	NP_279651.1	15789827	ハロバクテリウム・サリナリム
<i>ldh</i>	P0A393	61222614	バシルス・セレウス
<i>nadX</i>	NP_229443.1	15644391	サーモトガ・マリティマ

10

【 0 3 1 4 】

lysDH遺伝子によってコードされるリジン6-デヒドロゲナーゼ(脱アミノ化)は、L-リジンの -アミノ基の酸化的脱アミノ化を触媒し、2-アミノアジピン酸-6-セミアルデヒドを形成し、次にそれが非酵素的に環化して、1-ピペリジン-6-カルボン酸を形成する(Misono及びNagasakiの文献、J.Bacteriol. 150:398-401 (1982))。ゲオバシルス・ステアロサーモフィルス由来のlysDH遺伝子は、好熱性NAD依存性リジン6-デヒドロゲナーゼをコードしている(Heydariらの文献、Appl Environ. Microbiol 70:937-942 (2004))。加えて、アエロピルム・ペルニクスK1由来のlysDH遺伝子は、ゲノムプロジェクトから相同性により同定される。

20

【表 3 4】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>lysDH</i>	AB052732	13429872	ゲオバシルス・ステアロサーモフィルス
<i>lysDH</i>	NP_147035.1	14602185	アエロピルム・ペルニクスK1
<i>ldh</i>	P0A393	61222614	バシルス・セレウス

30

【 0 3 1 5 】

(2.3.1.a-アシルトランスフェラーゼ(リン酸基の転移))

例示的なリン酸転移アシルトランスフェラーゼは、ptaによってコードされるホスホトランスアセチラーゼ及びptbによってコードされるホスホトランスブチリラーゼを含む。E. コリ由来のpta遺伝子は、アセチル-CoAをアセチル-リン酸に、又はその逆に変換することができる酵素をコードしている(Suzuki, T.の文献、Biochim. Biophys. Acta 191:559-569(1969))。この酵素は、そのプロセスでアセチル-CoAの代わりにプロピオニル-CoAを利用し、プロピオン酸を形成することもできる(Hesslingerらの文献、Mol. Microbiol 27:477-492 (1998))。同様に、C. アセトブチリウム由来のptb遺伝子は、ブチリル-CoAをブチリル-リン酸に変換することができる酵素をコードしている(Walterらの文献、Gene 134(1):p. 107-11 (1993) ; Huangらの文献、J Mol Microbiol Biotechnol 2(1):p.33-38 (2000))。更なるptb遺伝子を酪酸産生菌L2-50(Louisらの文献、J. Bacteriol.186:2099-2106 (2004))及びバシルス・メガテリウム(Vazquezらの文献、Curr. Microbiol 42:345-349 (2001))に見い出すことができる。

40

【表 3 5】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>pta</i>	NP_416800.1	16130232	エシェリキア・コリ
<i>ptb</i>	NP_349676	15896327	クロストリジウム・アセトブチリウム
<i>ptb</i>	AAR19757.1	38425288	酪酸産生菌L2-50
<i>ptb</i>	CAC07932.1	10046659	バシルス・メガテリウム

【 0 3 1 6 】

10

(2.6.1.a-アミノトランスフェラーゼ)

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼは、アミノ基をアスパラギン酸からアルファ-ケトグルタル酸に転移して、グルタミン酸及びオキサロ酢酸を形成する。この変換は、例えば、エシェリキア・コリ由来のaspC(Yagiらの文献、FEBS Lett. 100:81-84 (1979) ; Yagiらの文献、Methods Enzymol. 113:83-89 (1985))、サッカロミセス・セレビシア由来のAAT2(Yagiらの文献、J Biochem. 92:35-43 (1982))、及びアラビドプシス・サリアナ由来のASP5(48, 108, 225 48. de la et al., Plant J 46:414-425 (2006) ; Kwok及びHansonの文献、J Exp. Bot. 55:595-604 (2004) ; Wilkie及びWarrenの文献、Protein Expr. Purif. 12:381-389 (1998))の遺伝子産物によって触媒される。バリンアミノトランスフェラーゼは、バリン及びピルビン酸の2-ケトイソ吉草酸及びアラニンへの変換を触媒する。E.コリ遺伝子avtAは、1つの当該酵素をコードしている(Whalen及びBergの文献、J. Bacteriol. 150:739-746 (1982))。この遺伝子産物は、また、 α -ケト酪酸のアミノ化を触媒し、 α -アミノ酪酸を生成するが、この反応におけるアミン供与体は同定されていない(Whalen及びBergの文献、J. Bacteriol. 158:571-574 (1984))。E.コリserCの遺伝子産物は、2つの反応のホスホセリンアミノトランスフェラーゼ及びホスホヒドロキシトレオニンアミノトランスフェラーゼを触媒し(Lam及びWinklerの文献、J. Bacteriol. 172:6518-6528 (1990))、非リン酸化基質に対する活性は検出できなかった(Drewkeらの文献、FEBS. Lett. 390:179-182 (1996))。

20

【表 3 6】

30

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>aspC</i>	NP_415448.1	16128895	エシェリキア・コリ
<i>AAT2</i>	P23542.3	1703040	サッカロミセス・セレビシア
<i>ASP5</i>	P46248.2	20532373	アラビドプシス・サリアナ
<i>avtA</i>	YP_026231.1	49176374	エシェリキア・コリ
<i>serC</i>	NP_415427.1	16128874	エシェリキア・コリ

【 0 3 1 7 】

40

Cargillは、マロニル-セミアルデヒドを介してベータ-アラニンから3-HPを生成するためのベータ-アラニン/アルファ-ケトグルタル酸アミノトランスフェラーゼを開発した(PC T/US2007/076252(Jessenら))。サッカロミセス・クルイペリにおけるSkPYD4の遺伝子産物は、また、ベータ-アラニンをアミノ基供与体として優先的に使用することが示された(Andersenらの文献、FEBS. J. 274:1804-1817 (2007))。SkUGA1は、サッカロミセス・セレビシアGABAアミノトランスフェラーゼ、UGA1のホモログをコードしている(Ramosらの文献、Eur. J. Biochem. 149:401-404 (1985))のに対して、SkPYD4は、 β -アラニン及びGABAアミノ交換反応の両方に関与する酵素をコードしている(Andersenらの文献、FEBS. J. 274:1804-1817 (2007))。3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼは、メチルマロン酸セミアルデヒドから3-アミノ-2-メチルプロピオン酸への転換を触媒する。該酵素は、ラッス・ノルベギクス及びサス・スクロファにおいて特徴づけられ、Abatによってコ

50

ードされる(Kakimotoらの文献、Biochim. Biophys. Acta 156:374-380 (1968) ; Tamakiらの文献、Methods Enzymol. 324:376-389 (2000))。3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼに対して高度な配列相同性を有する他の生物体における酵素候補は、*C.エレガンス*の*Gta-1*及び*バシルス・スプチルス*の*gabT*を含む。更に、遺伝子*gabT*によってコードされる*E. コリ*の原生GABAアミノトランスフェラーゼの1つは、広い基質特異性を有することが示された(Liuらの文献、Biochemistry 43:10896-10905 (2004) ; Schulzらの文献、Appl Environ Microbiol 56:1-6 (1990))。puuEの遺伝子産物は、*E. コリ*における他の4-アミノ酪酸トランスアミナーゼを触媒する(Kuriharaらの文献、J. Biol. Chem. 280:4602-4608 (2005))。

【表 3 7】

10

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	98626772	サッカロミセス・クルイベリ
<i>SkUGA1</i>	ABF58894.1	98626792	サッカロミセス・クルイベリ
<i>UGA1</i>	NP_011533.1	6321456	サッカロミセス・セレビシアエ
<i>Abat</i>	P50554.3	122065191	ラツス・ノルベギクス
<i>Abat</i>	P80147.2	120968	サス・スクロファ
<i>Gta-1</i>	Q21217.1	6016091	カエノルハブジチス・エレガンス
<i>gabT</i>	P94427.1	6016090	バシルス・スプチリス
<i>gabT</i>	P22256.1	120779	エシェリキア・コリK12
<i>puuE</i>	NP_415818.1	16129263	エシェリキア・コリK12

20

【 0 3 1 8 】

阻害因子に結合しない*E. コリ*4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ及び阻害因子に結合した*E. コリ*4-アミノ酪酸トランスアミナーゼのX線結晶構造が報告された(Liuらの文献、Biochemistry 43:10896-10905 (2004))。基質結合及び基質特異性が研究され且つ示唆された。活性部位残基の役割が、部位特異的変異誘発及びX線結晶構造解析によって研究された(Liuらの文献、Biochemistry 44:2982-2992 (2005))。構造情報に基づいて、新規の酵素活性を有する*E. コリ*4-アミノ酪酸トランスアミナーゼを操作する試みがなされた。これらの研究は、BDO経路のためのトランスアミナーゼ活性を発展させる基礎を提供する。

30

【 0 3 1 9 】

(2.7.2.a-ホストトランスフェラーゼ、カルボキシル基受容体)

例示的なキナーゼは、*ackA*によってコードされる*E. コリ*酢酸キナーゼ(Skarstedt及びSilversteinの文献、J. Biol. Chem. 251:6775-6783 (1976))、*buk1*及び*buk2*によってコードされる*C. アセトブチリクム*酪酸キナーゼ(Walterらの文献、Gene 134(1):107-111 (1993) ; Huangらの文献、J Mol Microbiol Biotechnol 2(1):33-38 (2000))、及び*proB*によってコードされる*E. コリ*ガンマ-グルタミルキナーゼ(Smithらの文献、J. Bacteriol. 157:545-551 (1984))を含む。これらの酵素は、それぞれ酢酸、酪酸、及びグルタミン酸をリン酸化する。*E. コリ*由来の*ackA*遺伝子産物は、プロピオン酸をもリン酸化する(Hesslingerらの文献、Mol. Microbiol 27:477-492 (1998))。

40

【表 3 8】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>ackA</i>	NP_416799.1	16130231	エシェリキア・コリ
<i>buk1</i>	NP_349675	15896326	クロストリジウム・アセトブチリクム
<i>buk2</i>	Q97II1	20137415	クロストリジウム・アセトブチリクム
<i>proB</i>	NP_414777.1	16128228	エシェリキア・コリ

50

【 0 3 2 0 】

(2.8.3.a-補酵素Aトランスフェラーゼ)

CoA-トランスフェラーゼ系統において、酢酸-CoAトランスフェラーゼ(EC2.8.3.8)としても知られるE. コリ酵素アシル-CoA:酢酸-CoAトランスフェラーゼは、イソ酪酸(Matthies及びSchinkの文献、Appl Environ Microbiol 58:1435-1439 (1992))、吉草酸(Vanderwinkelらの文献、Biochem. Biophys. Res Commun. 33:902-908 (1968))、及びブタン酸(Vanderwinkelの文献、前掲(1968))を含む様々な分枝状及び直鎖状アシル-CoA基質からCoA部分を酢酸に転移することが証明された。この酵素は、E. コリ種K12におけるatoA(アルファサブユニット)及びatoD(ベータサブユニット)(Korolevらの文献、Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr. 58:2116-2121 (2002) ; Vanderwinkelの文献、前掲(1968))、並びにコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032におけるactA及びcg0592(Duncanらの文献、Appl Environ Microbiol 68:5186-5190 (2002))によってコードされる。配列相同性によって見いだされる更なる遺伝子は、エシェリキア・コリUT189のatoD及びatoAを含む。

10

【表 3 9】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>atoA</i>	P76459.1	2492994	エシェリキア・コリK12
<i>atoD</i>	P76458.1	2492990	エシェリキア・コリK12
<i>actA</i>	YP_226809.1	62391407	コリネバクテリウム・グルタミクムATCC 13032
<i>cg0592</i>	YP_224801.1	62389399	コリネバクテリウム・グルタミクムATCC 13032
<i>atoA</i>	ABE07971.1	91073090	エシェリキア・コリUT189
<i>atoD</i>	ABE07970.1	91073089	エシェリキア・コリUT189

20

【 0 3 2 1 】

類似の転換が、それぞれスクシニル-CoAアセチルトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAアセチルトランスフェラーゼ及びブチリル-CoAアセチルトランスフェラーゼの活性を示すことが証明されたクロストリジウム・クルイベリの*cat1*、*cat2*及び*cat3*の遺伝子産物によって触媒される(Seedorfらの文献、Proc Natl Acad Sci U.S.A. 105(6):2128-2133 (2008) ; Sohling及びGottschalkの文献、J Bacteriol 178(3):871-880 (1996))。]

30

【表 4 0】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>cat1</i>	P38946.1	729048	クロストリジウム・クルイベリ
<i>cat2</i>	P38942.2	1705614	クロストリジウム・クルイベリ
<i>cat3</i>	EDK35586.1	146349050	クロストリジウム・クルイベリ

【 0 3 2 2 】

嫌気性細菌アシドアミノコッカス・フェルメンタンス由来のグルタコン酸-CoA-トランスフェラーゼ(EC2.8.3.12)酵素は、二酸グルタコニル-CoA及び3-ブテノイル-CoAと反応する(Mack及びBuckelの文献、FEBS Lett. 405:209-212 (1997))。この酵素をコードしている遺伝子は、*gctA*及び*gctB*である。この酵素は、活性は低いが検出可能であり、他のCoA誘導体は、グルタリル-CoA、2-ヒドロキシグルタリル-CoA、アジビル-CoA及びアクリリル-CoAを含む(Buckelらの文献、Eur. J. Biochem. 118:315-321 (1981))。該酵素は、E. コリにおいてクローン化及び発現された(Macらの文献、Eur. J. Biochem. 226:41-51 (1994))。

40

【表 4 1】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>gctA</i>	CAA57199.1	559392	アシドアミノコッカス・フェルメンタンス
<i>gctB</i>	CAA57200.1	559393	アシドアミノコッカス・フェルメンタンス

【0323】

(3.1.2.a-チオールエステルヒドロラーゼ (CoA特異的))

CoAヒドロラーゼ系統において、酵素3-ヒドロキシイソブチリル-CoAヒドロラーゼは、3-HIBCoAに対して特異的であり、パリン分解時に所望の転換を効率的に触媒することが証明された(Shimomuraらの文献、J Biol Chem 269:14248-14253 (1994))。この酵素をコードしている遺伝子は、ラツス・ノルベギクス(Shimomuraらの文献、前掲(1994); Shimomuraらの文献、Methods Enzymol. 324:229-240 (2000))、及びホモサピエンス(Shimomuraらの文献、前掲、2000)の*hibch*を含む。配列相同性による候補遺伝子は、サッカロミセス・セレビシアエの*hibch*及びバシルス・セレウスのBC_2292を含む。

【表 4 2】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>hibch</i>	Q5XIE6.2	146324906	ラツス・ノルベギクス
<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	146324905	ホモ・サピエンス
<i>hibch</i>	P28817.2	2506374	サッカロミセス・セレビシアエ
BC_2292	Q81DR3	81434808	バシルス・セレウス

【0324】

アジピル-CoAのアジピン酸への変換をアシル-CoAヒドロラーゼ又は同等にチオエステラーゼによって実施することができる。最高のE. コリ遺伝子候補は、アジピル-CoAに対する活性を有するジカルボン酸アセチルトランスフェラーゼであるヒト*acot8*(Westinらの文献、J Biol Chem 280(46):38125-38132 (2005))に対して高い類似性を示す*tesB*(Naggertらの文献、J. Biol Chem. 266(17):11044-11050 (1991))である。この活性は、ラット肝臓においても特徴づけられた(Deanaの文献、Biochem. Int. 26(4):p.767-773 (1992))。

【表 4 3】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>tesB</i>	NP_414986	16128437	エシェリキア・コリ
<i>acot8</i>	CAA15502	3191970	ホモ・サピエンス
<i>acot8</i>	NP_570112	51036669	ラツス・ノルベギクス

【0325】

他の潜在的E. コリチオールエステルヒドロラーゼは、*tesA*(Bonner及びBlochの文献、J Biol Chem. 247(10):3123-3133 (1972))、*ybgC*(Kuznetsovaらの文献、FEMS Microbiol Rev. 29(2):263-279 (2005); Zhuangらの文献、FEBS Lett. 516(1-3):161-163 (2002))、*paal*(Songらの文献、J Biol Chem. 281(16):11028-11038 (2006))、及び*ybdB*(Leducらの文献、J Bacteriol. 189(19):7112-7126 (2007))の遺伝子産物を含む。

【表 4 4】

遺伝子	寄託番号 n No.	遺伝子 識別番号	生物体
<i>tesA</i>	NP_415027	16128478	エシェリキア・コリ
<i>ybgC</i>	NP_415264	16128711	エシェリキア・コリ
<i>paal</i>	NP_415914	16129357	エシェリキア・コリ
<i>ybdB</i>	NP_415129	16128580	エシェリキア・コリ

【0326】

10

いくつかの真核性アセチル-CoAヒドロラーゼ(EC3.1.2.1)は、広い基質特異性を有する。ラッス・ノルベギクス脳由来の酵素(Robinsonらの文献、Biochem. Biophys. Res. Commun. 71:959-965 (1976))は、ブチリル-CoA、ヘキサノイル-CoA及びマロニル-CoAと反応することができる。

【表 4 5】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>acot12</i>	NP_570103.1	18543355	ラッス・ノルベギクス

20

【0327】

(4.1.1.a-カルボキシ-リアーゼ)

例示的なカルボキシ-リアーゼは、2-アセト乳酸をアセトインに変換するクエン酸異化及び分枝鎖アミノ酸生合成に関与するアセト乳酸デカルボキシラーゼである。ラクトコッカス・ラクチスにおいて、該酵素は、遺伝子*aldB*によってコードされる6つのサブユニットで構成され、バリン、ロイシン及びイソロイシンによって活性化される(Goupilらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 62:2636-2640 (1996); Goupil-Feuilleratらの文献、J. Bacteriol. 182:5399-5408 (2000))。この酵素は、E. コリにおいて過剰発現され、特徴づけられた(Phalipらの文献、FEBS Lett. 351:95-99 (1994))。他の生物体において、該酵素は、ストレプトコッカス・サーモフィルスの*aldC*(Monnetらの文献、Lett. Appl. Microbiol. 36:399-405 (2003))、バシルス・ブレビスの*aldB*(Diderichsenらの文献、J. Bacteriol. 172:4315-4321 (1990); Najmudinらの文献、Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 59:1073-1075 (2003))、及びエンテロバクター・アエロゲネスの*budA*(Diderichsenらの文献、J. Bacteriol. 172:4315-4321 (1990))によってコードされる二量体である。バシルス・ブレビス由来の酵素は、バシルス・スプチリスにおいてクローン化及び過剰発現され、結晶学的に特徴づけられた(Najmudinらの文献、Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 59:1073-1075 (2003))。加えて、ロイコノストク・ラクチス由来の酵素は、精製され、特徴づけられたが、遺伝子は単離されていない(O'Sullivanらの文献、FEMS Microbiol. Lett. 194:245-249 (2001))。

30

【表 4 6】

40

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>aldB</i>	NP_267384.1	15673210	ラクトコッカス・ラクチス
<i>aldC</i>	Q8L208	75401480	ストレプトコッカス・サーモフィルス
<i>aldB</i>	P23616.1	113592	バシルス・ブレビス
<i>budA</i>	P05361.1	113593	エンテロバクター・アエロゲネス

【0328】

アコニット酸デカルボキシラーゼは、カンジダ菌株及び糸状菌アスペルギルス・テレウ

50

スにおけるイタコン酸生合成の最終工程を触媒する(Bonnarmeらの文献、J Bacteriol. 177:3573-3578 (1995); Willike及びVorlopの文献、Appl Microbiol Biotechnol 56:289-295 (2001))。イタコン酸は、バイオ技術的に興味深い化合物であるが、アコニット酸デカルボキシラーゼ遺伝子又はタンパク質配列は、今日まで報告されていない。

【 0 3 2 9 】

4-オキサロクロネートデカルボキシラーゼは、多くの生物体から単離され、特徴づけられた。この酵素をコードしている遺伝子は、シュードモナス種(菌株600)のdmpH及びdmpE(Shinglerらの文献、J Bacteriol. 174:711-724 (1992))、シュードモナス・プチダのxylII及びxylIII((Kato及びAsanoの文献、Arch. Microbiol 168:457-463 (1997); Lian及びWhitmanの文献、J. Am. Chem. Soc. 116:10403-10411 (1994); Stanleyらの文献、Biochemistry 39:3514 (2000))、並びにラルストニア・ユートロファ JMP134のReut_B5691及びReut_B5692 (Hughesらの文献、J Bacteriol. 158:79-83 (1984))を含む。シュードモナス種(菌株600)由来の酵素をコードしている遺伝子は、E. コリにおいてクローン化及び発現された(Shinglerらの文献、J Bacteriol. 174:711-724 (1992))。

【 表 4 7 】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>dmpH</i>	CAA43228.1	45685	シュードモナス種CF600
<i>dmpE</i>	CAA43225.1	45682	シュードモナス種CF600
<i>xylII</i>	YP_709328.1	111116444	シュードモナス・プチダ
<i>xylIII</i>	YP_709353.1	111116469	シュードモナス・プチダ
<i>Reut_B5691</i>	YP_299880.1	73539513	ラルストニア・ユートロファ JMP134
<i>Reut_B5692</i>	YP_299881.1	73539514	ラルストニア・ユートロファ JMP134

【 0 3 3 0 】

ケイヒ酸(フェニルアクリレート)及び置換ケイヒ酸誘導体の対応するスチレン誘導体への変換を触媒する更なるクラスのデカルボキシラーゼが特徴づけられた。これらの酵素は、様々な生物体に広く存在し、E. コリにおいてクローン化及び発現されたこれらの酵素をコードしている特定の遺伝子は、サッカロミセス・セレピシアエ由来のpad1(Clausenらの文献、Gene 142:107-112 (1994))、ラクトバシルス・プランタルム由来のpdc(Barthelmebsらの文献、Appl Environ Microbiol 67:1063-1069 (2001); Qiらの文献、Metab Eng 9:268-276 (2007); Rodriguezらの文献、J. Agric. Food Chem. 56:3068-3072 (2008))、クレブシエラ・オキシトカ由来のpofK(pad)(Hashidokoらの文献、Biosci. Biotech. Biochem. 58:217-218 (1994); Uchiyamaらの文献、Biosci. Biotechnol. Biochem. 72:116-123 (2008))、ベジコッカス・ペントサセウスの(Barthelmebsらの文献、Appl Environ Microbiol 67:1063-1069(2001))、並びにバシルス・スプチリス及びバシルス・ブミルス由来のpadC(Lingenらの文献、Protein Eng 15:585-593 (2002))である。シュードモナス・フルオレセンス由来のフェルラ酸デカルボキシラーゼも精製され、特徴づけられた(Huangらの文献、J. Bacteriol. 176:5912-5918 (1994))。重要なこととして、このクラスの酵素は、安定しており、外因性又は内的結合補因子をいずれも必要としないため、これらの酵素の作成は、生体内変換に理想的に適することが示された(Sariaslaniの文献、Annu. Rev. Microbiol. 61:51-69 (2007))。

【表 4 8】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>padl</i>	AB368798 BAG32372.1	188496948 188496949	サッカロミセス・セレピシアエ
<i>pdC</i>	U63827 AAC45282.1	1762615, 1762616	ラクトバシルス・ブランタルム
<i>pofK (pad)</i>	AB330293, BAF65031.1	149941607, 149941608	クレブシエラ・オキシトカ
<i>padC</i>	AF017117 AAC46254.1	2394281, 2394282	バシルス・スプチリス
<i>pad</i>	AJ276891 CAC16794.1	11322456, 11322458	ペジコッカス・ペントサセウス
<i>pad</i>	AJ278683 CAC18719.1	11691809, 11691810	バシルス・ブルミス

10

【0331】

更なるデカルボキシラーゼ酵素は、アルファ-ケトグルタル酸からコハク酸セミアルデヒドを形成することができる。これらは、その対応する遺伝子配列がまだ確認されていないユーグレナ・グラシリス由来の(Shigeokaらの文献、Biochem. J. 282(Pt 2):319-323 (1992); Shigeoka及びNakanoの文献、Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28 (1991); Shigeoka及びNakanoの文献、Biochem. J. 292 (Pt 2):463-467 (1993))、及びマイコバクテリウム・ツベルクローシス由来の(Tianらの文献、Proc Natl Acad Sci U.S.A. 102:10670-10675 (2005))アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ酵素を含む。加えて、グルタミン酸デカルボキシラーゼ酵素は、グルタミン酸をE. コリ*gadA*及び*gadB*遺伝子の生成物などの4-アミノ酪酸に変換することができる(De Biaseらの文献、Protein. Expr. Purif. 8:430-438 (1993))。

20

【表 4 9】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>kgd</i>	O50463.4	160395583	マイコバクテリウム・ツベルクローシス
<i>gadA</i>	NP_417974	16131389	エシェリキア・コリ
<i>gadB</i>	NP_416010	16129452	エシェリキア・コリ

30

【0332】

(ケト酸デカルボキシラーゼ)

ケト酸デカルボキシラーゼとも呼ばれるピルビン酸デカルボキシラーゼ(PDC、EC4.1.1.1)は、ピルビン酸のアセトアルデヒドへの脱炭酸を触媒する、アルコール発酵における重要な酵素である。この酵素は、2-ケト酪酸、2-ケト吉草酸、3-ヒドロキシピルビン酸及び2-フェニルピルビン酸を含む、脂肪族2-ケト酸に対する広い基質範囲を有する(Bergらの文献、Science 318:1782-1786 (2007))。pdcによってコードされるザイモナス・モビリス由来のPDCは、異なる基質に対する親和性を変化させた指向的操作研究の対象になってきた(Siebertらの文献、Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005))。サッカロミセス・セレピシアエ由来のPDCも広範に研究され、活性の改変のために操作され、E. コリにおいて機能性に発現された((Killenberg-Jabsらの文献、Eur. J. Biochem. 268:1698-1704 (2001); Li及びJordanの文献、Biochemistry 38:10004-10012 (1999); ter Schureらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 64:1303-1307 (1998))。この酵素の結晶構造は入手可能である(Killenberg-Jabsの文献、Eur. J. Biochem. 268:1698-1704(2001))。他の十分に特徴づけられたPDC候補は、アセトバクター・パステウリアンス(Chandraらの文献、Arch. Micro

40

50

biol. 176:443-451 (2001))、及びクルイベロマイセス・ラクチス(Kriegerらの文献、Eur. J. Biochem. 269:3256-3263 (2002))由来の酵素を含む。

【表 5 0】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>pdC</i>	P06672.1	118391	ザイモナス・モビルス
<i>pdC1</i>	P06169	30923172	サッカロミセス・セレビシアエ
<i>pdC</i>	Q8L388	75401616	アセトバクター・パスデウリアンス
<i>pdC1</i>	Q12629	52788279	クルイベロマイセス・ラクチス

10

【 0 3 3 3 】

PDCのように、ベンゾイルギ酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.7)は、広い基質範囲を有し、酵素工学研究の目標になってきた。シュードモナス・プチダ由来の酵素は、広範に研究され、この酵素の結晶構造が入手可能である(Hassonらの文献、Biochemistry 37:9918-9930 (1998) ; Polovnikovaらの文献、Biochemistry 42:1820-1830 (2003))。シュードモナス・プチダ酵素の活性部位における2つの残基の部位特異的変異誘発は、天然及び非天然基質の親和性(Km)を変化させた(Siegertの文献、Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005))。この酵素の特性が、指向的操作によって更に改良された(Lingenらの文献、Protein Eng 15:585-593 (2002)) ; Lingenの文献、Chembiochem 4:721-726 (2003))。mdICによってコードされるシュードモナス・アエルギノサ由来の酵素も実験的に特徴づけられた(Barrowmanらの文献、FEMS Microbiology Letters 34:57-60 (1986))。シュードモナス・ストツゼリ、シュードモナス・フルオレセンス及び他の生物体由来の更なる遺伝子を配列相同性によって推定するか、又はシュードモナス・プチダにおいて開発された成長選択システムを使用して同定することができる(Henningらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 72:7510-7517 (2006))。

20

【表 5 1】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>mdIC</i>	P20906.2	3915757	シュードモナス・プチダ
<i>mdIC</i>	Q9HUR2.1	81539678	シュードモナス・アエルギノサ
<i>dpgB</i>	ABN80423.1	126202187	シュードモナス・ストツゼリ
<i>ilvB-1</i>	YP_260581.1	70730840	シュードモナス・フルオレセンス

30

【 0 3 3 4 】

(4.2.1.a-ヒドロ-リアーゼ)

ユーバクテリウム・パルケリの2-(ヒドロキシメチル)グルタル酸デヒドラターゼは、例示的なヒドロ-リアーゼである。この酵素は、ニコチン酸異化の観点で研究され、hmdによってコードされる(Alhapelらの文献、Proc Natl Acad Sci USA 103:12341-12346 (2006))。高度な配列相同性を有する類似の酵素が、バクテロイデス・カピロサス、アナエロトルンクス・コリホミニス及びナタラナエロピウス・サーモフィルスに見いだされる。

40

【表 5 2】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>hmd</i>	ABC88407.1	86278275	ユーバクテリウム・バルケリ
<i>BACCAP_02294</i>	ZP_02036683.1	154498305	バクテロイデス・カピロサスATCC 29799
<i>ANACOL_02527</i>	ZP_02443222.1	167771169	アナエロツルンカス・コリホミニスDSM 17241
<i>NtherDRAFT_2368</i>	ZP_02852366.1	169192667	ナタラナエロビウス・サーモフィルスJW/NM-WN-LF

【 0 3 3 5 】

10

第2の例示的なヒドロ-リアーゼは、リンゴ酸のフマル酸への脱水を触媒する酵素であるフマル酸ヒドラターゼである。この酵素についての豊富な構造情報が入手可能であり、研究者は、該酵素を成功裡に操作して、活性、阻害及び局在性を改変させた(Weaver, T.の文献、Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr. 61:1395-1401 (2005))。更なるフマル酸ヒドラターゼは、エシェリキア・コリ(Estevezらの文献、Protein Sci. 11:1552-1557 (2002) ; Hong及びLeeの文献、Biotechnol. Bioprocess Eng. 9:252-255 (2004) ; Rose及びWeaverの文献、Proc Natl Acad Sci USA 101:3393-3397 (2004))、カンピロバクター・ジェジュニ(Smithらの文献、Int. J Biochem. Cell Biol 31:961-975 (1999))及びサーマス・サーモフィルス(Mizobataらの文献、Arch. Biochem. Biophys. 355:49-55 (1998))由来の*fumC*、並びにラッス・ノルベギクス(Kobayashiらの文献、J Biochem. 89:1923-1931 (1981))由来の*fumH*によってコードされるものを含む。高度な配列相同性を有する類似の酵素は、アラビドプシス・サリアナ由来の*fum1*及びコリネバクテリウム・グルタミクム由来の*fumC*を含む。

20

【表 5 3】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>fumC</i>	P05042.1	120601	エシェリキア・コリK12
<i>fumC</i>	O69294.1	9789756	カンピロバクター・ジェジュニ
<i>fumC</i>	P84127	75427690	サーマス・サーモフィルス
<i>fumH</i>	P14408.1	120605	ラッス・ノルベギクス
<i>fumI</i>	P93033.2	39931311	アラビドプシス・サリアナ
<i>fumC</i>	Q8NRN8.1	39931596	コリネバクテリウム・グルタミクム

30

【 0 3 3 6 】

2-メチルリンゴ酸デヒドラターゼとも呼ばれるシトラリンゴ酸ヒドロリラーゼは、2-メチルリンゴ酸をメサコン酸に変換する。2-メチルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性が、グルタミン酸分解VI経路の観点で、クロストリジウム・テタノモルフム、モルガネラ・モルガニ、シトロバクター・アマロナチクスにおいて検出された(Kato及びAsanoの文献、Arch. Microbiol 168:457-463 (1997)) ; しかし、この酵素をコードしている遺伝子は、今日まで配列決定されていない。

40

【 0 3 3 7 】

C.アセトブチリクム由来の*crt*の遺伝子産物は、3-ヒドロキシブチリル-CoAのクロトニール-CoAへの脱水を触媒する(Atsumiらの文献、Metab Eng. ; 29 (2007) ; Boyntonらの文献、Journal of Bacteriology 178:3015-3024 (1996))。P.ブチダのエノイル-CoAヒドラターゼである*phaA*及び*phaB*は、フェニル酢酸異化を通じて二重結合のヒドロキシル化を実行すると考えられる(Oliveraらの文献、Proc Natl Acad Sci USA 95(11):6419-6424 (1998))。P.フルオレセンス由来の*paaA*及び*paaB*は、相似転換を触媒する(14 Oliveraらの文献、前掲、1998)。最後に、いくつかのエシェリキア・コリ遺伝子は、*maoC*(Park及びLeeの文献、J Bacteriol 185(18):5391-5397 (2003))、*paaF*(Park及びLeeの文献、Biotechnol

50

Bioeng. 86(6):681-686 (2004a) ; Park及びLeeの文献、Appl Biochem Biotechnol. 113-116:335-346 (2004b) ; Ismailらの文献、Eur J Biochem 270(14):p.3047-3054 (2003))、及びpaaG(Park及びLeeの文献、前掲、2004 ; Park及びLeeの文献、前掲、2004b ; Ismailら、前掲、2003)を含むエノイル-CoAヒドラーゼ機能性を示すことが証明された。

【表 5 4】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>maoC</i>	NP_415905.1	16129348	エシェリキア・コリ
<i>paaF</i>	NP_415911.1	16129354	エシェリキア・コリ
<i>paaG</i>	NP_415912.1	16129355	エシェリキア・コリ
<i>crt</i>	NP_349318.1	15895969	クロストリジウム・アセトブチリウム
<i>paaA</i>	NP_745427.1	26990002	シュードモナス・プチダ
<i>paaB</i>	NP_745426.1	26990001	シュードモナス・プチダ
<i>phaA</i>	ABF82233.1	106636093	シュードモナス・フルオレセンス
<i>phaB</i>	ABF82234.1	106636094	シュードモナス・フルオレセンス

10

【 0 3 3 8 】

E. コリ 遺伝子 *fadA* 及び *fadB* は、ケトアシル-CoAチオラーゼ、3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ及びエノイル-CoAヒドラーゼの活性を示す多酵素複合体をコードしている(Yangらの文献、Biochemistry 30(27):p. 6788-6795 (1991) ; Yangらの文献、J Biol Chem 265(18): p. 10424-10429 (1990) ; Yangらの文献、J Biol Chem 266(24):p. 16255 (1991) ; Nakahigashi及びInokuchiの文献、Nucleic Acids Res 18(16):p. 4937 (1990))。 *fadI* 及び *fadJ* 遺伝子は、類似の機能をコードし、且つ嫌気性条件でのみ自然に発現される(Campbellらの文献、Mol Microbiol 47(3):p. 793-805 (2003))。(ネガチブレギュレータ *fadR* をノックアウトすることによって) *fadB* を活性化し、非原生ケトチオラーゼ(ラルストニア・ユートロファ由来の *phaA*) を同時発現することを含む、E. コリにおいてポリ[(R)-3-ヒドロキシ酪酸]を生成する方法が既に記載されている(Satoらの文献、J Biosci Bioeng 103(1):38-44 (2007))。この研究は、 β -酸化酵素、特に、3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ及びエノイル-CoAヒドラーゼの両活性をコードしている *fadB* の遺伝子産物が、アセチル-CoA前駆体からより長い鎖分子を生成するための経路の一部として機能できることを明確に実証している。

20

30

【表 5 5】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>fadA</i>	YP_026272.1	49176430	エシェリキア・コリ
<i>fadB</i>	NP_418288.1	16131692	エシェリキア・コリ
<i>fadI</i>	NP_416844.1	16130275	エシェリキア・コリ
<i>fadJ</i>	NP_416843.1	16130274	エシェリキア・コリ
<i>fadR</i>	NP_415705.1	16129150	エシェリキア・コリ

40

【 0 3 3 9 】

(4.3.1.a-アンモニア-リアーゼ)

アスパラギン酸のフマル酸への脱アミノ化を触媒するアスパルターゼ(EC 4.3.1.1)は、微生物において一般的な酵素であり、広く特徴づけられた(Viola, R. E. の文献、Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol 74:295-341 (2000))。 *aspA* によってコードされるE. コリ アスパルターゼの結晶構造が解明された(Shiらの文献、Biochemistry 36:9136-9144 (1997))。このE. コリ酵素は、代替的な基質のアスパラギン酸フェニルメチルエステル、アスパラギン、アスパラギン酸ベンジル及びリンゴ酸と反応することも示された(Maらの文献

50

、Ann N.Y. Acad Sci 672:60-65 (1992))。個別の研究において、基質特異性を改変させるために、この酵素に対して定方向進化が採用された(Asanoらの文献、Biomol. Eng 22:95-101 (2005))。アスパルターゼ機能性を有する酵素は、ヘモフィルス・インフルエンザ(Sjostromらの文献、Biochim. Biophys. Acta 1324:182-190 (1997))、シュードモナス・フルオレセンス(Takagiらの文献、J. Biochem. 96:545-552 (1984))、バシルス・スプチルス(Sjostromらの文献、Biochim. Biophys. Acta 1324:182-190 (1997))及びセラチア・マルセセンス(Takagi及びKisumiの文献、J Bacteriol. 161:1-6 (1985))においても特徴づけられた。

【表 5 6】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>aspA</i>	NP_418562	90111690	エシェリキア・コリK12亜種MG1655
<i>aspA</i>	P44324.1	1168534	ヘモフィルス・インフルエンザ
<i>aspA</i>	P07346.1	114273	シュードモナス・フルオレセンス
<i>ansB</i>	P26899.1	114271	バシルス・スプチリス
<i>aspA</i>	P33109.1	416661	セラチア・マルセセンス

10

【 0 3 4 0 】

ベータ-メチルアスパルターゼ又は3-メチルアスパラギン酸アンモニア-リアーゼとしても知られる3-メチルアスパルターゼ(EC 4.3.1.2)は、トレオ-3-メチルアスパラギン酸のメサコン酸への脱アミノ化を触媒する。クロストリジウム・テタノモルフム由来の3-メチルアスパルターゼがクローン化され、E. コリにおいて機能性に発現され、結晶化された(Asuncionらの文献、Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr. 57:731-733 (2001) ; Asuncionらの文献、J Biol Chem. 277:8306-8311 (2002) ; Bottingらの文献、Biochemistry 27:2953-2955 (1988) ; Godaらの文献、Biochemistry 31:10747-10756 (1992))。シトロバクター・アマロナチクスにおいて、この酵素は、BAA28709によってコードされる(Kato及びAsanoの文献、Arch. Microbiol 168:457-463 (1997))。3-メチルアスパルターゼもE. コリYG1002から結晶化されたが(Asano及びKatoの文献、FEMS Microbiol Lett. 118:255-258 (1994))、そのタンパク質配列は、GenBankなどの公的データベースに列挙されていない。配列相同性を使用して、C. テタニのCTC_02563及びエシェリキア・コリO157:H7のECs0761を含む更なる候補遺伝子を特定することができる。

20

30

【表 5 7】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
MAL	AAB24070.1	259429	クロストリジウム・テタノモルフム
BAA28709	BAA28709.1	3184397	シトロバクター・アマロナチクス
CTC_02563	NP_783085.1	28212141	クロストリジウム・テタニ
ECs0761	BAB34184.1	13360220	エシェリキア・コリO157:H7 Sakai株

40

【 0 3 4 1 】

エノイル-CoA生成物を形成するアンモニア-リアーゼ酵素候補は、ベータ-アラニル-CoAを脱アミノ化するベータ-アラニル-CoAアンモニア-リアーゼ(EC 4.3.1.6)、及び3-アミノブチリル-CoAアンモニア-リアーゼ(EC 4.3.1.14)を含む。2つのベータ-アラニル-CoAアンモニアリアーゼが、クロストリジウム・プロピオニクムにおいて同定され、特徴づけられた(Herrmannらの文献、FEBS J. 272:813-821 (2005))。他のベータ-アラニル-CoAアンモニアリアーゼは、今日まで特定されていないが、遺伝子候補を配列類似性によって同定することができる。1つの当該候補は、ミクソコッカス・キサントスのMXAN_4385である。

【表 5 8】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>ac12</i>	CAG29275.1	47496504	クロストリジウム・プロピオニクム
<i>ac11</i>	CAG29274.1	47496502	クロストリジウム・プロピオニクム
<i>MXAN_4385</i>	YP_632558.1	108756898	ミクソコッカス・キサントス

【 0 3 4 2 】

(5.3.3.a-イソメラーゼ)

クロストリジウム・アミノブチリウム及びC.クルイベリの両方に由来する4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼは、4-ヒドロキシブチリル-CoAのクロトノイル-CoAへの可逆的変換を触媒し、固有のビニルアセチル-CoA -イソメラーゼ活性を保持する(Scherf及びBuckelの文献、Eur. J Biochem. 215:421-429 (1993) ; Scherfらの文献、Arch. Microbio 161:239-245 (1994))。N末端アミノ酸配列を含む両原生酵素が精製され、特徴づけられた(Scherf及びBuckelの文献、前掲、1993 ; Scherfらの文献、前掲、1994)。C.アミノブチリウム及びC.クルイベリ由来のabfD遺伝子は、これらのN末端アミノ酸配列と厳密に一致するため、4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ/ビニルアセチル-CoA イソメラーゼをコードしている。加えて、ポルフィロモナス・ギンギバリスATCC 33277由来のabfD遺伝子は、ゲノムプロジェクトから相同性を介して同定される。

【表 5 9】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>abfD</i>	YP_001396399.1	153955634	クロストリジウム・クルイベリDSM 555
<i>abfD</i>	P55792	84028213	クロストリジウム・アミノブチリウム
<i>abfD</i>	YP_001928843	188994591	ポルフィロモナス・ギンギバリスATCC 33277

【 0 3 4 3 】

(5.4.3.a-アミノムターゼ)

リジン2,3-アミノムターゼ(EC 5.4.3.2)は、リジンを(3S)-3,6-ジアミノヘキサン酸に変換して、アミン基を2位から3位にシフトさせる例示的なアミノムターゼである。該酵素は、フソバクテリウム・ヌレアツム(kamA)(Barkerらの文献、J. Bacteriol. 152:201-207 (1982))及びクロストリジウム・スブテルミナレ(kamA)(Chirpichらの文献、J. Biol. Chem. 245:1778-1789(1970))を含む、リジンを酢酸及び酪酸に発酵させる細菌に見いだされる。クロストリジウム・スブテルミナレ由来の酵素が結晶化された(Leporeらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 102:13819-13824 (2005))。この機能をコードしている酵素は、バシルス・スブチルスのyodOによってもコードされる(Chenらの文献、Biochem. J. 348 Pt 3:539-549 (2000))。該酵素は、ピリドキサル5'-リン酸を補因子として利用し、S-アデノシルメチオニン(S-Adenosylmethoionine)による活性化を必要とし、L-リジンのみと反応する立体選択性を有する。該酵素は、代替的な基質と反応することが示されていない。

【表 6 0】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>yodO</i>	O34676.1	4033499	バシルス・スブチリス
<i>kamA</i>	Q9XBQ8.1	75423266	クロストリジウム・スブテルミナレ
<i>kamA</i>	Q8RHX4	81485301	フソバクテリウム・ヌレアツム亜種ヌレアツム

【 0 3 4 4 】

第2のアミノムターゼ、即ちベータ-リジン5,6-アミノムターゼ(EC 5.4.3.3)は、(3S)-3,6-ジアミノヘキサン酸を(3S,5S)-3,5-ジアミノヘキサン酸に転換して、末端アミノ基を6

位から5位にシフトさせる酢酸及び酪酸へのリジン発酵の次の工程を触媒する。この酵素は、また、リジンの2,5-ジアミノヘキサン酸への変換を触媒し、リジン5,6-アミノムターゼ(EC 5.4.3.4)とも呼ばれる。該酵素は、クロストリジウム・スティックランジ(*kamD*、*kamE*)において結晶化された(Berkovitchらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 101:15870-15875 (2004))。ポルフィロモナス・ギンギバリス由来の酵素も特徴づけられた(Tangらの文献、Biochemistry 41:8767-8776 (2002))。

【表 6 1】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>kamD</i>	AAC79717.1	3928904	クロストリジウム・スティックランジ
<i>kamE</i>	AAC79718.1	3928905	クロストリジウム・スティックランジ
<i>kamD</i>	NC_002950.2	34539880, 34540809	ポルフィロモナス・ギンギバリスW83
<i>kamE</i>	NC_002950.2	34539880, 34540810	ポルフィロモナス・ギンギバリスW83

10

【 0 3 4 5 】

オルニチン4,5-アミノムターゼ(EC 5.4.3.5)は、末端アミンを隣接炭素にシフトさせ、D-オルニチンを2,4-ジアミノペンタン酸に変換する。クロストリジウム・スティックランジの酵素は、*oraE*及び*oraS*の2つの遺伝子によってコードされ、E. コリにおいてクローン化、配列決定及び発現された(Chenらの文献、J. Biol. Chem. 276:44744-44750 (2001))。この酵素は、今日まで他の生物体において特徴づけられていない。

20

【表 6 2】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>oraE</i>	AAK72502	17223685	クロストリジウム・スティックランジ
<i>oraS</i>	AAK72501	17223684	クロストリジウム・スティックランジ

【 0 3 4 6 】

チロシン2,3-アミノムターゼ(EC 5.4.3.6)は、アミンを2位から3位にシフトさせることによってチロシンを3-アミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロパン酸に可逆的に変換するチロシン生合成に参与する。ストレプトマイセス・グロビスボルスにおいて、該酵素は、チロシン誘導体と反応することも示された(Christensonらの文献、Biochemistry 42:12708-12718 (2003))。配列情報は、入手可能でない。

30

【 0 3 4 7 】

ロイシン2,3-アミノムターゼ(EC 5.4.3.7)は、ロイシン分解及び生合成を通じて、L-ロイシンをベータ-ロイシンに変換する。ロイシン2,3-アミノムターゼに対するアッセイは、多くの生物体における活性を検出したが(Poston, J. M.の文献、Methods Enzymol. 166:130-135 (1988))、該酵素をコードしている遺伝子は、今日まで同定されていない。

【 0 3 4 8 】

Cargillは、L-アラニンをD-アラニンに変換することで、4つの生化学工程でピルビン酸から3-HPへの経路を生成する、新規の2,3-アミノムターゼ酵素を開発した(Liaoらの米国特許公報第2005-0221466号)。

40

【 0 3 4 9 】

(6.2.1.a-酸-チオールリガーゼ)

例示的な酸-チオールリガーゼは、インビボで可逆的な反応である、1個のATPのコンカミナント消費を伴うコハク酸からのスクシニル-CoAの形成をととも触媒するE. コリの*sucCD*の遺伝子産物である(Buckらの文献、Biochemistry 24(22):p.6245-6252 (1985))。更なる例示的なCoA-リガーゼは、配列がまだ特徴づけられていないラットのジカルボン酸-CoAリガーゼ(Vamecqらの文献、Biochem J. 230(3):p. 683-693 (1985))、P. チリソゲヌム由来の2つの特徴づけられたフェニル酢酸-CoAリガーゼ(Lamas-Maceirasらの文献、Biochem J 395(1):147-155 (2006) ; Wangらの文献、Biochem Biophys Res Commun. 360(2):453-458 (2007))、シュードモナス・プチダ由来のフェニル酢酸-CoAリガーゼ(Martinez-Blanco

50

らの文献、J Biol Chem. 265(12):7084-7090 (1990))、及びバシルス・スプチルス由来の6-カルボキシヘキサン酸-CoAリガーゼ(Bowerらの文献、J Bacteriol 178(14):4122-4130 (1996))を含む。

【表 6 3】

遺伝子	寄託番号	遺伝子 識別番号	生物体
<i>sucC</i>	NP_415256.1	16128703	エシェリキア・コリ
<i>sucD</i>	AAC73823.1	1786949	エシェリキア・コリ
<i>phl</i>	CAJ15517.1	77019264	ペニシリウム・クリソゲヌム
<i>phlB</i>	ABS19624.1	152002983	ペニシリウム・クリソゲヌム
<i>paaF</i>	AAC24333.2	22711873	シュードモナス・プチダ
<i>bioW</i>	NP_390902.2	50812281	バシルス・スプチリス

10

【0350】

(実施例V)

(スクシニル-CoAからの例示的なBDO経路)

本実施例では、スクシニル-CoAからの例示的なBDO経路について記載する。

【0351】

スクシニル-CoAからのBDO経路は、本明細書に記載されるとともに、これまでに記載されている(それぞれが参照により本明細書に組み込まれている、2008年3月14日に出願された米国出願第12/049,256号、及び2008年3月14日に出願されたPCT出願第US08/57168号参照)。更なる経路を図8Aに示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードしている例示的な遺伝子とともに表15に列挙する。

20

【0352】

簡単に述べると、スクシニル-CoAをスクシニル-CoAレダクターゼ(又はコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によってコハク酸セミアルデヒドに変換することができる。コハク酸セミアルデヒドを、既に記載されているように4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-ヒドロキシ酪酸に変換することができる。代替的に、スクシニル-CoAをスクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって4-ヒドロキシ酪酸に変換することができる。4-ヒドロキシ酪酸を、既に記載されているように4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)によって、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ(若しくは4-ヒドロキシブチリル-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシ酪酸を、既に記載されているように4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ(EC 2.7.2.a)によって4-ヒドロキシブチリル-リン酸に変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-リン酸を、既に記載されているようにホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ(EC 2.3.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-リン酸を、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを、既に記載されているように1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

30

40

【0353】

表15. スクシニル-CoAからのBDO経路

50

【表 6 4】

図	EC クラス	所望の 基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手できる場合)	生物体	既知の基質
8A	1.2.1.b	スクシニル-CoA	コハク酸 セミアルデヒド	スクシニル-CoA レダクターゼ(又は コハク酸セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム・ クルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ポルフィロモナス・ ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808. 1	メタロスファエラ・ セデュラ	マロニル-CoA
8A	1.1.1.a	コハク酸 セミアルデヒド	4- ヒドロキシ酪酸	4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ	<i>4hbd</i>	YP_726053.1	ラルストニア・ ユートロファH16	4-ヒドロキシ酪酸
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム・ クルイペリDSM 555	4-ヒドロキシ酪酸
					<i>4hbd</i>	Q94B07	アラビドプシス・ サリアナ	4-ヒドロキシ酪酸
8A	1.1.1.c	スクシニル-CoA	4- ヒドロキシ酪酸	スクシニル-CoA レダクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム・ アセトブチリクム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロロフレクスウス・ アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンドシア・ キネンシス	長鎖アシル-CoA

10

20

30

40

8A	2.8.3.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoAトランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム・ クレイペリ	コハク酸、 4-ヒドロキシ酪酸、 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシドアミノコッカス・ フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシェリキア・コリ	ブタン酸
8A	3.1.2.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoAヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシェリキア・コリ	アジピル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス・ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ・サピエンス	3- ヒドロキシプロパノイ ル-CoA
8A	6.2.1.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoAリガーゼ(又は4- ヒドロキシブチリル-CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシェリキア・コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシリウム・ クリソゲスム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス・ スプチリス	6-カルボキシヘキサ ン酸

10

20

30

40

8A	2.7.2.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリ ル-リン酸	4- ヒドロキシ酪酸 キナーゼ	<i>ackA</i>	NP_416799.1	エシエリキア・コリ	酪酸、プロピオン酸
					<i>buk1</i>	NP_349675	クロストリジウム・ アセトブチリクム	酪酸
					<i>buk2</i>	Q97II1	クロストリジウム・ アセトブチリクム	酪酸
8A	2.3.1.a	4- ヒドロキシブチリ ル-リン酸	4- ヒドロキシ ブチリル-CoA	ホスホトランス- 4-ヒドロキシ ブチリラーゼ	<i>ptb</i>	NP_349676	クロストリジウム・ アセトブチリクム	ブチリル-リン酸
					<i>ptb</i>	AAR19757.1	酪酸産生菌L2-50	ブチリル-リン酸
					<i>ptb</i>	CAC07932.1	バシルス・メガテリウム	ブチリル-リン酸
8A	1.2.1.d	4- ヒドロキシブチリ ル-リン酸	4- ヒドロキシ ブタナール	4- ヒドロキシブタナール デヒドロゲナーゼ (リン酸化)	<i>asd</i>	NP_417891.1	エシエリキア・コリ	L-4- アスパルチル-リン酸
					<i>proA</i>	NP_414778.1	エシエリキア・コリ	L-グルタミル- 5-リン酸
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシエリキア・コリ	グリセルアルデヒド- 3-リン酸

10

20

30

40

8A	1.2.1.b	4- ヒドロキシ ブチリル-CoA	4- ヒドロキシ ブタナール	4- ヒドロキシブチリル- CoAレダクターゼ (又は4-ヒドロキシブタ ナールデヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム・ クルイベリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ポルフィロモナス・ ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808. 1	メタロスファエテラ・ セデューラ	マロニル-CoA
8A	1.1.1.c	4- ヒドロキシ ブチリル-CoA	1,4- ブタンジオール	4- ヒドロキシブチリル- CoAレダクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム・ アセトブチリウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロロフレクスウス・ アウランチアックス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンドシア・ キネンシス	長鎖アシル-CoA
8A	1.1.1.a	4- ヒドロキシ ブタナール	1,4- ブタンジオール	1,4- ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サツカロミセス・ セレシニアエ	一般的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア・コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム・ クルイベリDSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

50

【 0 3 5 4 】

(実施例VI)

(アルファ-ケトグルタル酸からの更なる例示的なBDO経路)

本実施例では、アルファ-ケトグルタル酸からの例示的なBDO経路について記載する。

【0355】

スクシニル-CoAからのBDO経路は、本明細書に記載されるとともに、これまでに記載されている(それぞれが参照により本明細書に組み込まれている、2008年3月14日に出願された米国出願第12/049,256号及び2008年3月14日に出願されたPCT出願第US08/57168号参照)。更なる経路を図8Bに示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードしている例示的な遺伝子とともに表16に示す。

【0356】

簡単に述べると、アルファ-ケトグルタル酸を、既に記載されているようにアルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.a)によってコハク酸セミアルデヒドに変換することができる。代替的に、アルファ-ケトグルタル酸をグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(EC 1.4.1.a)によってグルタミン酸に変換することができる。4-アミノ酪酸を4-アミノ酪酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)(EC 1.4.1.a)又は4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によってコハク酸セミアルデヒドに変換することができる。グルタミン酸をグルタミン酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.a)によって4-アミノ酪酸に変換することができる。コハク酸セミアルデヒドを、既に記載されているように4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-ヒドロキシ酪酸に変換することができる。4-ヒドロキシ酪酸を、既に記載されているように4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)によって、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ(若しくは4-ヒドロキシブチリル-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシ酪酸を4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ(EC 2.7.2.a)によって4-ヒドロキシブチリル-リン酸に変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-リン酸を、既に記載されているようにホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ(EC 2.3.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-リン酸を4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを、既に記載されているように4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを、既に記載されているように1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

【0357】

表16. アルファ-ケトグルタル酸からのBDO経路

10

20

30

【表 6 5】

図	EC クラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手できる場合)	生物体	既知の基質
8B	4.1.1.a	アルファア- ケトグルタル酸	コハク酸 セミアルデヒド	アルファア- ケトグルタル酸 デカルボキシラーゼ	<i>kgd</i>	O50463.4	マイコバクテリウム・ ツベルクロシス	アルファア- ケトグルタル酸
					<i>gadA</i>	NP_417974	エシェリキア・コリ	グルタミン酸
					<i>gadB</i>	NP_416010	エシェリキア・コリ	グルタミン酸
8B	1.4.1.a	アルファア- ケトグルタル酸	グルタミン酸	グルタミン酸 デヒドロゲナーゼ	<i>gdhA</i>	P00370	エシェリキア・コリ	グルタミン酸
					<i>gdh</i>	P96110.4	サーモトガ・マリディマ	グルタミン酸
					<i>gdhA1</i>	NP_279651.1	ハロバクテリウム・ サリナラム	グルタミン酸
8B	1.4.1.a	4-アミノ酪酸	コハク酸 セミアルデヒド	4-アミノ酪酸 オキシドレタクターゼ (脱アミノ化)	<i>lysDH</i>	AB052732	デオバシルス・ ステアロサ-モフィルス	リジン
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	アエロピルム・ ペルニクスKI	リジン
					<i>ldh</i>	P0A393	バシルス・セレウス	ロイシン、 イソロイシン、 バリン、 2-アミノブタン酸

10

20

30

40

8B	2.6.1.a	4-アミノ酪酸	コハク酸 セミアルデヒド	4- アミノ酪酸トランス アミナーゼ	<i>gabT</i>	P22256.1	エシエリキア・コリ	4-アミノ酪酸
					<i>puuE</i>	NP_415818.1	エシエリキア・コリ	4-アミノ酪酸
					<i>UGAI</i>	NP_011533.1	サッカロミセス・ セレビシアエ	4-アミノ酪酸
8B	4.1.1.a	グルタミン酸	4-アミノ酪酸	グルタミン酸 デカルボキシラーゼ	<i>gadA</i>	NP_417974	エシエリキア・コリ	グルタミン酸
					<i>gadB</i>	NP_416010	エシエリキア・コリ	グルタミン酸
					<i>kgd</i>	O50463.4	マイコバクテリウム・ ツベルクロシス	アルファ- ケトグルタル酸
8B	1.1.1.a	コハク酸 セミアルデヒド	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ	<i>4hbd</i>	YP_726053.1	ラルストニア・ ユートロファH16	4- ヒドロキシ酪酸
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム・ クルイペリDSM 555	4- ヒドロキシ酪酸
					<i>4hbd</i>	Q94B07	アラビドプシス・サリアナ	4- ヒドロキシ酪酸
8B	2.8.3.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシ アチリル-CoA	4- ヒドロキシ アチリル-CoA トランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム・ クルイペリ	コハク酸、 4- ヒドロキシ酪酸、 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシドアミノコッカス・ フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア・コリ	ブタン酸

10

20

30

40

8B	3.1.2.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシ アチリル-CoA	4- ヒドロキシブチリル- CoAヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア・コリ	アジピル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス・ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ・サピエンス	3- ヒドロキシ プロパノイル-CoA
8B	6.2.1.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシ アチリル-CoA	4- ヒドロキシブチリル- CoAリガーゼ (又は4-ヒドロキシブチ リル-CoAシンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエリキア・コリ	コハク酸
					<i>phi</i>	CAJ15517.1	ペニシリウム・ クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス・スブチリス	6- カルボキシ ヘキサノ酸
8B	2.7.2.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシ アチリル-リン酸	4- ヒドロキシ酪酸 キナーゼ	<i>ackA</i>	NP_416799.1	エシエリキア・コリ	酢酸、 プロピオン酸
					<i>buk1</i>	NP_349675	クロストリジウム・ アセトアチリウム	酪酸
					<i>buk2</i>	Q97111	クロストリジウム・ アセトアチリウム	酪酸

10

20

30

40

8B	2.3.1.a	4- ヒドロキシ ブチリル-リン酸	4- ヒドロキシ ブチル-CoA	ホスホトランス- 4-ヒドロキシ ブチリラーゼ	<i>ptb</i>	NP_349676	クロストリジウム・ アセトブチリウム	ブチリル-リン酸
					<i>ptb</i>	AAR19757.1	酪酸産生菌L2-50	ブチリル-リン酸
					<i>ptb</i>	CAC07932.1	バシルス・メガテリウム	ブチリル-リン酸
8B	1.2.1.d	4- ヒドロキシ ブチリル-リン酸	4- ヒドロキシ ブタナール	4- ヒドロキシブタナール デヒドロゲナーゼ (リン酸化)	<i>asd</i>	NP_417891.1	エシェリキア・コリ	L-4- アスパルチル- リン酸
					<i>proA</i>	NP_414778.1	エシェリキア・コリ	L- グルタミル5- リン酸
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシェリキア・コリ	グリセル アルデヒド- 3-リン酸
8B	1.2.1.b	4- ヒドロキシ ブチリル-CoA	4- ヒドロキシ ブタナール	4- ヒドロキシブチリル- CoAレダクターゼ (又は4- ヒドロキシブタナール デヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム・ クルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ポルフィロモナス・ ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ・ セデューラ	マロニル-CoA
8B	1.1.1.c	4- ヒドロキシ ブチリル-CoA	1,4- ブタンジオール	4- ヒドロキシブチリル- CoAレダクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム・ アセトブチリウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロアフレクスウス・ アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディシア・キネンシス	長鎖アシル-CoA

10

20

30

40

8B	1.1.1.a	4- ヒドロキシル ブタナール	1,4- ブタンジオール	1,4- ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	ADH2	NP_014032.1	サッカロミセス・ セレピシアエ	一般的
					yqhD	NP_417484.1	エシエリキア・コリ	>C3
					4hbd	L21902.1	クロストリジウム・ クルイペリDSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

50

(4-アミノ酪酸からのBDO経路)

本実施例では、4-アミノ酪酸からの例示的なBDO経路について記載する。

【0359】

図9Aは、4-アミノ酪酸をBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードしている例示的な遺伝子とともに表17に列挙する。

【0360】

簡単に述べると、4-アミノ酪酸を4-アミノ酪酸-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又は4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ(又は4-アミノブチリル-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-アミノブチリル-CoAに変換することができる。4-アミノブチリル-CoAを4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)(EC 1.4.1.a)又は4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によって4-オキシブチリル-CoAに変換することができる。4-オキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

10

20

【0361】

表17. 4-アミノ酪酸からのBDO経路

【表 6 6】

図	EC クラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手できる場合)	生物体	既知の基質
9A	2.8.3.a	4-アミノ酪酸	4-アミノプチリル-CoA	4-アミノ酪酸-CoA トランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EIDK35586.1	クロストリジウム・ クルイペリ	コハク酸 4-ヒドロキシ酪酸、 酪酸
					<i>gciA, gciB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシドアミノコッカス・ フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシェリキア・コリ	ブタン酸
9A	3.1.2.a	4-アミノ酪酸	4-アミノプチリル-CoA	4-アミノプチリル-CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシェリキア・コリ	アジピル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス・ノルベギクス	アチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ・サピエンス	3- ヒドロキシ プロパノイル-CoA
9A	6.2.1.a	4-アミノ酪酸	4-アミノプチリル-CoA	4-アミノ酪酸-CoA リガーゼ (又は4-アミノプチリル-CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシェリキア・コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAI15517.1	ペニシリウム・ クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス・スブチリス	6- カルボキシ ヘキサン酸

10

20

30

40

表17続き

9A	1.4.1.a	4- アミノブチリル- CoA	4- オキソブチリル- CoA	4- アミノブチリル-CoA オキシドレダクターゼ (脱アミノ化)	<i>lysDH</i>	AB052732	デオバシルス・ ステアロサーモフィルス	リジン
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	アエロビウム・ ペルニクスKI	リジン
					<i>ldh</i>	P0A393	バシルス・セレウス	ロイシン、 イソロイシン、 バリン、 2-アミノブタン酸
9A	2.6.1.a	4- アミノブチリル- CoA	4- オキソブチリル- CoA	4- アミノブチリル-CoA トランスアミナーゼ	<i>gabT</i>	P22256.1	エシエリキア・コリ	4-アミノ酪酸
					<i>abat</i>	P50554.3	ラツス・ノルベギクス	3- アミノ-2- メチルプロピオン酸
					<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	サツカロミセス・ クルイペリ	β-アラニン
9A	1.1.1.a	4- オキソブチリル- CoA	4- ヒドロキシブチリル- CoA	4- ヒドロキシブチリル- CoA デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サツカロミセス・ セレピシアエ	一般的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア・コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム・ クルイペリDSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

表17続き

8	1.1.1.c	4- ヒドロキシブチル- CoA	1,4- ブタンジオール	4- ヒドロキシブチル- CoA (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム・ アセトブチリウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロフレクサス・ アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンドシア・ キネンシス	長鎖アシル-CoA
8	1.2.1.b	4- ヒドロキシブチル- CoA	4- ヒドロキシ ブタナール	4- ヒドロキシブチル- CoA (又は4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム・ クルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ポルフィロモナス・ ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ・ セデュラ	マロニル-CoA
8	1.1.1.a	4- ヒドロキシ ブタナール	1,4- ブタンジオール	1,4- ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス・ セレビシアエ	一般的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア・コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム・ クルイペリDSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

50

【 0 3 6 2 】

4-アミノ酪酸をBDOに変換する別の例示的なBDO経路を図9Aに示す。当該例示的なBDO経

路の酵素を、これらの酵素をコードしている例示的な遺伝子とともに表18に列挙する。

【 0 3 6 3 】

簡単に述べると、4-アミノ酪酸を4-アミノ酪酸-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又は4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ(又は4-アミノブチリル-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-アミノブチリル-CoAに変換することができる。4-アミノブチリル-CoAを4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって4-アミノブタン-1-オールに変換することができる。代替的に、4-アミノブチリル-CoAを4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-アミノブタナールデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって4-アミノブタナールに変換し、且つ4-アミノブタナールを4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-アミノブタン-1-オールに変換することができる。4-アミノブタン-1-オールを4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)(EC 1.4.1.a)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

10

【 0 3 6 4 】

表18. 4-アミノ酪酸からのBDO経路

【表 6 7】

図	ECクラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手できる場合)	生物体	既知の基質
9A	2.8.3.a	4-アミノ酪酸	4-アミノプロピルル- CoA	4- アミノ酪酸-CoA トランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム・ クルイペリ	コハク酸、 4- ヒドロキシ酪酸、 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシドアミノコッカス・ フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシェリキア・コリ	ブタン酸
9A	3.1.2.a	4-アミノ酪酸	4-アミノプロピルル- CoA	4- アミノプロピルル-CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシェリキア・コリ	アジピル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス・ノルベギクス	アチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ・サピエンス	3- ヒドロキシ プロパノイル-CoA
9A	6.2.1.a	4-アミノ酪酸	4-アミノプロピルル- CoA	4- アミノ酪酸-CoA リガーゼ (又は4-アミノプロピルル- CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシェリキア・コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシリウム・ クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス・スブチリス	6- カルボキシ ヘキサン酸

10

20

30

40

表18続き

9A	1.1.1.c	4- アミノブチリル- CoA	4- アミノブタン- 1-オール	4-アミノブチリル-CoA レダクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム・ アセトブチリクム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロフレクサス・ アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディア・ キネンシス	長鎖アシル-CoA
9A	1.2.1.b	4- アミノブチリル- CoA	4- アミノブタン- オール	4- アミノブチリル-CoA レダクターゼ (又は4-アミノブタン- アルデヒドデヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム・ クルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ボルフィロモナス・ ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ・ セデユラ	マロニル-CoA
9A	1.1.1.a	4- アミノブタン- オール	4- アミノブタン- 1-オール	4- アミノブタン-1-オール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サツカロミセス・ セレビスシアエ	一般的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア・コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム・ クルイペリDSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

表18続き

9A	1.4.1.a	4- アミノブタン- 1-オール	4- ヒドロキシ ブタナール	4- アミノブタン-1-オール オキシドレダクターゼ (脱アミノ化)	lysDH	AB052732	ゲオバシルス・ ステアロサ-モフィルス	リジン
					lysDH	NP_147035.1	アエロピルム・ ペルニクス KI	リジン
					ldh	P0A393	バシルス・セレウス	ロイシン、 イソロイシン、 バリン、 2-アミノブタン酸
9A	2.6.1.a	4- アミノブタン- 1-オール	4- ヒドロキシ ブタナール	4- アミノブタン-1-オール トランスアミナーゼ	gabT	P22256.1	エシエリキア・コリ	4-アミノ酪酸
					abat	P50554.3	ラッス・ノルベギクス	3-アミノ- 2-メチル プロパン酸
					SkyPYD4	ABF58893.1	サッカロミセス・ クルイペリ	ベーターアラニン
9A	1.1.1.a	4- ヒドロキシ ブタナール	1,4- ブタンジオール	1,4- ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	ADH2	NP_014032.1	サッカロミセス・ セレピシアエ	一般的
					yqhD	NP_417484.1	エシエリキア・コリ	>C3
					4hbd	L21902.1	クロストリジウム・ クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

50

【 0 3 6 5 】

図9Bは、4-アミノ酪酸をBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路

の酵素を、これらの酵素をコードしている例示的な遺伝子とともに表19に列挙する。

【0366】

簡単に述べると、4-アミノ酪酸を4-アミノ酪酸キナーゼ(EC 2.7.2.a)によって[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸に変換することができる。[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸を4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によって4-アミノブタナールに変換することができる。4-アミノブタナールを4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-アミノブタン-1-オールに変換することができる。4-アミノブタン-1-オールを4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)(EC 1.4.1.a)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。代替的に、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸を[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)(EC 1.4.1.a)又は[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によって[(4-オキシブタノリル)オキシ]ホスホン酸に変換することができる。[(4-オキシブタノリル)オキシ]ホスホン酸を4-ヒドロキシブチリル-リン酸デヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-リン酸に変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-リン酸を4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

10

20

【0367】

表19. 4-アミノ酪酸からのBDO経路

【表 6 8】

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手できる場合)	生物体	既知の基質
9B	2.7.2.a	4-アミノ酪酸	[(4- アミノブタノリル) オキシ] ホスホン酸	4- アミノ酪酸 キナーゼ	<i>ackA</i>	NP_416799.1	エシエリキア・コリ	酢酸、プロピオン酸
					<i>bukI</i>	NP_349675	クロストリジウム・ アセトブチリクム	酪酸
					<i>proB</i>	NP_414777.1	エシエリキア・コリ	グルタミン酸
9B	1.2.1.d	[(4- アミノブタノリル) オキシ] ホスホン酸	4- アミノブタナール	4- アミノブチル アルデヒド デヒドロゲナーゼ (リン酸化)	<i>asd</i>	NP_417891.1	エシエリキア・コリ	L-4-アスパルチルリン酸
					<i>proA</i>	NP_414778.1	エシエリキア・コリ	L-グルタミル5-リン酸
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシエリキア・コリ	グリセルアルデヒド-3-リン酸
9B	1.1.1.a	4- アミノブタナール	4- アミノブタン-1- オール	4- アミノブタン- 1-オール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス・ セレビスシアエ	一般的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア・コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム・ クルイペリDSM 555	コハク酸セミアルデヒド

10

20

30

40

9B	1.4.1.a	4- アミノブタン-1- オール	4- ヒドロキシ ブタナール	4- アミノブタン-1- オールオキシド レタクトーゼ (脱アミノ化)	<i>lysDH</i>	AB052732	デオバシルス・ ステアロサモフィルス	リジン
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	アエロピルム・ ペルニクスKI	リジン
					<i>ldh</i>	POA393	バシルス・セレウス	ロイシン、イソロイシン、 バリン、2-アミノブタン酸
9B	2.6.1.a	4- アミノブタン-1- オール	4- ヒドロキシ ブタナール	4- アミノブタン- 1-オール トランスアミナーゼ	<i>gabT</i>	P22256.1	エシエリキア・コリ	4-アミノ酪酸
					<i>abat</i>	P50554.3	テツス・ノルベギクス	3-アミノ-2- メチルプロパン酸
					<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	サツカロミセス・ クルイベリ	ベータ-アラニン
9B	1.4.1.a	[(4- アミノブタノリル) オキシ] ホスホン酸	[(4- オキシブタノリル) オキシ] ホスホン酸	[(4- アミノブタノリル) オキシ]ホスホン酸 オキシド レタクトーゼ (脱アミノ化)	<i>lysDH</i>	AB052732	デオバシルス・ ステアロサモフィルス	リジン
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	アエロピルム・ ペルニクスKI	リジン
					<i>ldh</i>	POA393	バシルス・セレウス	ロイシン、イソロイシン、 バリン、2-アミノブタン酸

10

20

30

40

表19続き

9B	2.6.1.a	[(4- アミノプタノリル) オキシ]ホスホン酸	[(4- オキシプタノリル) オキシ]ホスホン酸	[(4- アミノプタノリル) オキシ]ホスホン酸 トランスアミナーゼ	<i>gabT</i>	P22256.1	エシェリキア・コリ	4-アミノ酪酸
					<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	サッカロミセス・ クルイペリ	ベータ-アラニン
					<i>serC</i>	NP_415427.1	エシェリキア・コリ	ホスホセリン、 ホスホヒドロキシトレオニン
9B	1.1.1.a	[(4- オキシプタノリル) オキシ]ホスホン酸	4- ヒドロキシ フチリル-リン酸	4- ヒドロキシ アチリル-リン酸 デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス・ セレビスアエ	一般的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア・コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム・ クルイペリDSM 555	コハク酸セミアルデヒド
9B	1.2.1.d	4- ヒドロキシ アチリル-リン酸	4- ヒドロキシ アタナール	4- ヒドロキシ アチアルデヒド デヒドロゲナーゼ (リン酸化)	<i>asd</i>	NP_417891.1	エシェリキア・コリ	L-4-アスパルチル-リン酸
					<i>proA</i>	NP_414778.1	エシェリキア・コリ	L-グルタミル-5-リン酸
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシェリキア・コリ	グリセルアルデヒド-3-リン酸

10

20

30

40

表19 続き

9B	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナ ール	1,4-ブタンジオー ール	1,4-ブタンジオー ール デヒドロゲナーゼ	ADH2	NP_014032.1	サッカロミセス・ セレビシアエ	一般的
					yqhD	NP_417484.1	エシエリキア・コリ	>C3
					4hbd	L21902.1	クロストリジウム・ クルイペリ DSM 555	コハク酸セミアルデヒド

【 0 3 6 8 】

図9Cは、アセト酢酸を介する例示的な経路を示す。

【 0 3 6 9 】

(実施例VIII)

(アルファ-ケトグルタル酸の例示的なBDO経路)

本実施例では、アルファ-ケトグルタル酸からの例示的なBDO経路について記載する。

【0370】

図10は、アルファ-ケトグルタル酸をBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードしている例示的な遺伝子とともに表20に列挙する。

【0371】

簡単に述べると、アルファ-ケトグルタル酸をアルファ-ケトグルタル酸5-キナーゼ(EC 2.7.2.a)によってアルファ-ケトグルタリル-リン酸に変換することができる。アルファ-ケトグルタリル-リン酸を2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によって2,5-ジオキソペンタン酸に変換することができる。2,5-ジオキソペンタン酸を2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ(EC 1.1.1.a)によって5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸に変換することができる。代替的に、アルファ-ケトグルタル酸をアルファ-ケトグルタル酸-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ(又はアルファ-ケトグルタリル-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によってアルファ-ケトグルタリル-CoAに変換することができる。アルファ-ケトグルタリル-CoAをアルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(又は2,5-ジオキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって2,5-ジオキソペンタン酸に変換することができる。2,5-ジオキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼによって5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸に変換することができる。代替的に、アルファ-ケトグルタリル-CoAをアルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸に変換することができる。5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.a)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)(EC 1.2.1.c)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。

【0372】

表20. アルファ-ケトグルタル酸からのBDO経路

10

20

30

【表 6 9】

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物体	既知の基質
10	2.7.2.a	アルファ- ケトグルタル酸	アルファ- ケトグルタルリ ン酸	アルファ- ケトグルタル酸 5-キナーゼ	<i>ackA</i>	NP_416799.1	エシエリキア・コリ	酢酸、プロピオン酸
					<i>bukI</i>	NP_349675	クロストリジウム・ アセトアチリクム	酪酸
					<i>proB</i>	NP_414777.1	エシエリキア・コリ	グルタミン酸
10	1.2.1.d	アルファ- ケトグルタル リン酸	2,5- ジオキソペンタン 酸	2,5- ジオキソペンタン 酸セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ (リン酸化)	<i>proA</i>	NP_414778.1	エシエリキア・コリ	L-グルタミル-5-リン酸
					<i>asd</i>	NP_417891.1	エシエリキア・コリ	L-4-アスパルチル-リン酸
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシエリキア・コリ	グリセルアルデヒド-3-リン酸
10	1.1.1.a	2,5- ジオキソペンタン 酸	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	2,5- ジオキソペンタン 酸レダクターゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス・ セラピシアエ	一般的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア・コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム・クルイペリ DSM 555	コハク酸セミアルデヒド

10

20

30

40

表20 続き

10	2.8.3.a	アルファ- ケトグルタル酸	アルファ- ケトグルタル- CoA	アルファ- ケトグルタル酸 CoAトランスフェ ラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム・クルイペリ	コハク酸、4-ヒドロキシ酪酸、 酪酸
					<i>gciA, gciB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコツカス・ フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシェリキア・コリ	ブタン酸
10	3.1.2.a	アルファ- ケトグルタル酸	アルファ- ケトグルタル- CoA	アルファ- ケトグルタル- CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシェリキア・コリ	アジピル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス・ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ・サピエンス	3-ヒドロキシプロパノイル-CoA
10	6.2.1.a	アルファ- ケトグルタル酸	アルファ- ケトグルタル- CoA	アルファ-ケト グルタル- CoA リガーゼ(又は アルファ-ケト グルタル- CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシェリキア・コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシリウム・クリゾゲス	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス・スブチリス	6-カルボキシヘキサン酸

10

20

30

40

表 20 続き

10	1.2.1.b	アルファ- ケトグルタリル- CoA	2,5- ジオキソペンタン 酸	アルファ-ケト グルタリル-CoA レダクターゼ(又は 2,5-ジオキソ ペンタン酸 デヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム・クレイベリ	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808 .1	メタロスファエラ・セデュラ	マロニル-CoA
					<i>bphG</i>	BAA03892.1	シュードモナス種	アセトアルデヒド、プロピオン アルデヒド、ブチルアルデヒド、 イソブチルアルデヒド及び ホルムアルデヒド
10	1.1.1.a	2,5- ジオキソペンタン 酸	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸 デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i> <i>yqhD</i> <i>4hbd</i>	NP_014032.1 NP_417484.1 L21902.1	サッカロミセス・セレビシアエ、 エシェリキア・コリ、 クロストリジウム・クレイベリ DSM 555	一般的、>C3、 コハク酸セミアルデヒド
10	1.1.1.c	アルファ- ケトグルタリル- CoA	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	アルファ-ケト グルタリル-CoA レダクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム・ アセトブチリクム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロフレクサス・ アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディシア・キネネシス	長鎖アシル-CoA

10

20

30

40

10	4.1.1.a	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	4- ヒドロキシブタナ ール	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸 デカルボキシラー ゼ	<i>pdC</i>	P06672.1	ザイモナス・モビルス	2-オキソペンタン酸
					<i>mdIC</i>	P20906.2	シュードモナス・プチダ	2-オキソペンタン酸
					<i>pdC1</i>	P06169	サッカロミセス・セレビシアエ	ピルビン酸
10	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナ ール	1,4-ブタンジオー ル	1,4-ブタンジオー ル デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス・セレビシアエ	一般的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア・コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム・ クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド
10	1.2.1.c	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸 デヒドロゲナーゼ (脱炭酸)	<i>sucA, sucB, lpd</i>	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	エシェリキア・コリ	アルファ-ケトグルタル酸
					<i>bfnBB, bfnBAA, bfnBAB, bfnBAB, pdhD</i>	NP_390283.1, NP_390285.1, NP_390284.1, P21880.1	バシルス・スブチリス	バリン、ロイシン及びイソロイシ ンの2-ケト酸誘導体
					<i>Bckdha, Bckdhb, Ddt, Dld</i>	NP_036914.1, NP_062140.1, NP_445764.1, NP_955417.1	ラツス・ノルベギクス	バリン、ロイシン及びイソロイシ ンの2-ケト酸誘導体

10

20

30

40

(グルタミン酸からの例示的なBDO経路)

本実施例では、グルタミン酸からの例示的なBDO経路について記載する。

【0374】

図11は、グルタミン酸をBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードしている例示的な遺伝子とともに表21に列挙する。

【0375】

簡単に述べると、グルタミン酸をグルタミン酸-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、グルタミル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又はグルタミル-CoAリガーゼ(又はグルタミル-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によってグルタミル-CoAに変換することができる。代替的に、グルタミン酸をグルタミン酸5-キナーゼ(EC 2.7.2.a)によってグルタミン酸-5-リン酸に変換することができる。グルタミン酸-5-リン酸をグルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によってグルタミン酸-5-セミアルデヒドに変換することができる。グルタミル-CoAをグルタミル-CoAレダクターゼ(又はグルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によってグルタミン酸-5-セミアルデヒドに変換することができる。グルタミン酸-5-セミアルデヒドをグルタミン酸-5-セミアルデヒドレダクターゼ(EC 1.1.1.a)によって2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸に変換することができる。代替的に、グルタミル-CoAをグルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸に変換することができる。2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸を2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)(EC 1.4.1.a)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によって5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸に変換することができる。5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.a)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。代替的に、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱炭酸)(EC 1.2.1.c)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。

10

20

【0376】

表21. グルタミン酸からのBDO経路

【表 7 0】

図	EC クラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手できる場合)	生物体	既知の基質
11	2.8.3.a	グルタミン酸	グルタミル-CoA	グルタミン酸CoA トランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム・ クルイペリ	コハク酸、4-ヒドロキシ 酪酸、酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコッカス・ フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア・コリ	ブタン酸
11	3.1.2.a	グルタミン酸	グルタミル-CoA	グルタミル-CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア・コリ	アジビル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラッス・ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ・サピエンス	3-ヒドロキシプロパノイル -CoA
11	6.2.1.a	グルタミン酸	グルタミル-CoA	グルタミル-CoA リガーゼ(又はグルタミ ル-CoAシンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエリキア・コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CA115517.1	ペニシルム・ クリソゲスム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス・スブチリス	6-カルボキシヘキサン酸
11	2.7.2.a	グルタミン酸	グルタミル-5- リン酸	グルタミル-5- キナーゼ	<i>ackA</i>	NP_416799.1	エシエリキア・コリ	酢酸、プロピオン酸
					<i>buk1</i>	NP_349675	クロストリジウム・ アセトブチリクム	酪酸
					<i>proB</i>	NP_414777.1	エシエリキア・コリ	グルタミン酸

10

20

30

40

表21 続き

11	1.2.1.d	グルタミン酸-5-リン酸	グルタミン酸-5-セミアルデヒド	グルタミン酸-5-セミアルデヒド (リン酸化)	<i>proA</i>	NP_414778.1	エシエリキア・コリ	L-グルタミン-5-リン酸
					<i>asd</i>	NP_417891.1	エシエリキア・コリ	L-4-アスパルチル-リン酸
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシエリキア・コリ	グリセルアルデヒド-3-リン酸
11	1.2.1.b	グルタミン酸-5-リン酸	グルタミン酸-5-セミアルデヒド	グルタミン酸-5-セミアルデヒド (リン酸化)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム・クルイベリ	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ・セデューラ	マロニル-CoA
					<i>bphG</i>	BAA03892.1	シュードモナス種	アセトアルデヒド、 プロピオンアルデヒド、 ブチルアルデヒド、 イソブチルアルデヒド 及びホルムアルデヒド
11	1.1.1.a	グルタミン酸-5-セミアルデヒド	2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸	グルタミン酸-5-セミアルデヒド レタクタゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス・セレブシアエ	一般的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア・コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム・クルイベリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

表21 続き

11	1.1.1.c	グルタミル-CoA	2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸	グルタミル-CoA レダクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム・ アセトアチリクム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロフアレクスウス・ アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディア・ キネンシス	長鎖アシル-CoA
11	1.4.1.a	2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸	5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸	2-アミノ-5-ヒドロキシ ペンタン酸オキシド レダクターゼ(脱アミノ化)	<i>gdhA</i>	P00370	エシエリキア・コリ	グルタミン酸
					<i>ldh</i>	P0A393	バシルス・セレウス	ロイシン、イソロイシン、 バリン、2-アミノブタン酸
					<i>nadX</i>	NP_229443.1	サーモトガ・ マリディマ	アスパラギン酸
11	2.6.1.a	2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸	5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸	2-アミノ-5-ヒドロキシ ペンタン酸トランス アミナーゼ	<i>aspC</i>	NP_415448.1	エシエリキア・コリ	アスパラギン酸
					<i>AAT2</i>	P23542.3	サツカロミセス・ セレビスアエ	アスパラギン酸
					<i>avtA</i>	YP_026231.1	エシエリキア・コリ	バリン、アルファ- アミノ酪酸

10

20

30

40

表21 続き

11	4.1.1.a	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	4- ヒドロキシブタナール	5-ヒドロキシ-2-オキソ ペンタン酸 デカルボキシラーゼ	<i>pdC</i>	P06672.1	ザイモナス・モビルス	2-オキソペンタン酸
					<i>mdlC</i>	P20906.2	シュードモナス・ブチダ	2-オキソペンタン酸
					<i>pdC1</i>	P06169	サッカロミセス・ セレビスシアエ	ピルビン酸
11	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナール	1,4-ブタンジオール	1,4-ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス・ セレビスシアエ	一般的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア・コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム・ クルイベリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド
11	1.2.1.c	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	4- ヒドロキシブチル CoA	5-ヒドロキシ-2-オキソ ペンタン酸 デヒドロゲナーゼ (脱炭酸)	<i>sucA, sucB, lpd</i>	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	エシェリキア・コリ	アルファ-ケトグルタル酸
					<i>bfmBB, bfmBAA, bfmBAB, bfmBAB, pdhD</i>	NP_390283.1, NP_390285.1, NP_390284.1, P21880.1	バシルス・スブチリス	バリン、ロイシン及び イソロイシンの 2-ケト酸誘導体
					<i>Bckdha, Bckdhb, Dbt, Dld</i>	NP_036914.1, NP_062140.1, NP_445764.1, NP_955417.1	ラツス・ノルベギクス	バリン、ロイシン及び イソロイシンの 2-ケト酸誘導体

10

20

30

40

50

(アセトアセチル-CoAからの例示的なBDO経路)

本実施例では、アセトアセチル-CoAからの例示的なBDO経路について記載する。

【0378】

図12は、アセトアセチル-CoAをBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードしている例示的な遺伝子とともに表22に列挙する。

【0379】

簡単に述べると、アセトアセチル-CoAを3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって3-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。3-ヒドロキシブチリル-CoAを3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ(EC 4.2.1.a)によってクロトノイル-CoAに変換することができる。クロトノイル-CoAをビニルアセチル-CoA イソメラーゼ(EC 5.3.3.3)によってビニルアセチル-CoAに変換することができる。ビニルアセチル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ(EC 4.2.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

10

20

【0380】

表22. アセトアセチル-CoAからのBDO経路

【表 7 1】

図	ECクラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物体	既知の基質
12	1.1.1.a	アセトアセチル- CoA	3- ヒドロキシブチリル -CoA	3-ヒドロキシブチリル- CoAデヒドロゲナーゼ	<i>hbd</i>	NP_349314.1	クロストリジウム・ アセトブチリウム	3-ヒドロキシブチリル- CoA
					<i>hbd</i>	AAM14586.1	クロストリジウム・ バイジェリンキー	3-ヒドロキシブチリル- CoA
					<i>Msed_1423</i>	YP_001191505	メタロスファエラ・セデラ	3-ヒドロキシブチリル- CoA と推測
12	4.2.1.a	3- ヒドロキシブチリル CoA	クロトノイル-CoA	3-ヒドロキシブチリル- CoAデヒドロゲナーゼ	<i>crt</i>	NP_349318.1	クロストリジウム・ アセトブチリウム	3-ヒドロキシブチリル- CoA
					<i>maoC</i>	NP_415905.1	エシェリキア・コリ	3-ヒドロキシブチリル- CoA
					<i>paaf</i>	NP_415911.1	エシェリキア・コリ	3-ヒドロキシブチリル- CoA
12	5.3.3.3	クロトノイル-CoA	ピニルアセチル- CoA	ピニルアセチル-CoA Δ-イソメラーゼ	<i>abfD</i>	YP_001396399.1	クロストリジウム・ クルイペリ DSM 555	4-ヒドロキシブチリル- CoA
					<i>abfD</i>	P55792	クロストリジウム・ アミノブチリウム	4-ヒドロキシブチリル- CoA
					<i>abfD</i>	YP_001928843	ボルフィロモナス・ ギンギバリス ATCC 33277	4-ヒドロキシブチリル- CoA
12	4.2.1.a	ピニルアセチル- CoA	4- ヒドロキシブチリル CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoA デヒドラターゼ	<i>abfD</i>	YP_001396399.1	クロストリジウム・ クルイペリ DSM 555	4-ヒドロキシブチリル- CoA

10

20

30

40

表22 続き

					<i>abfD</i>	P55792	クロストリジウム・アミノプロチウム	4-ヒドロキシブチリル-CoA
					<i>abfD</i>	YP_001928843	ポルフィロモナス・ギンギバリス ATCC 33277	4-ヒドロキシブチリル-CoA
12	1.1.1.c	4-ヒドロキシブチリル-CoA	1,4-ブタンジオール	4-ヒドロキシブチリル-CoA レダクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム・アセトプロチウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロブレクサス・アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンドシア・キネンシス	長鎖アシル-CoA
12	1.2.1.b	4-ヒドロキシブチリル-CoA	4-ヒドロキシブタナール	4-ヒドロキシブチリル-CoA レダクターゼ(又は、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム・クルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ポルフィロモナス・ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ・セデュラ	マロニル-CoA
12	1.1.1.a	4-ヒドロキシブタナール	1,4-ブタンジオール	1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス・セレビスアエ	一般的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア・コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム・クルイペリ DSM 555	コハク酸セミアルデヒド

10

20

30

40

50

【0381】

(実施例X1)

(ホモセリンからの例示的なBDO経路)

本実施例では、ホモセリンからの例示的なBDO経路について記載する。

【0382】

図13は、ホモセリンをBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードしている例示的な遺伝子とともに表23に列挙する。

【0383】

簡単に述べると、ホモセリンをホモセリンデアミナーゼ(EC 4.3.1.a)によって4-ヒドロキシブタ-2-エン酸に変換することができる。代替的に、ホモセリンをホモセリンCoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又はホモセリン-CoAリガーゼ(又はホモセリン-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によってホモセリン-CoAに変換することができる。ホモセリン-CoAをホモセリン-CoAデアミナーゼ(EC 4.3.1.a)によって4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブタ-2-エン酸を4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ(又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブタ-2-エン酸を4-ヒドロキシブタ-2-エン酸レダクターゼ(EC 1.3.1.a)によって4-ヒドロキシ酪酸に変換することができる。4-ヒドロキシ酪酸を4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又は4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ(又は4-ヒドロキシブチリル-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAを4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼ(EC 1.3.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

【0384】

表23. ホモセリンからのBDO経路

10

20

30

【表 7 2】

図	ECクラス	所望の 基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物体	既知の基質
13	4.3.1.a	ホモセリン	4-ヒドロキシブタ-2- エン酸	ホモセリン デアミナーゼ	<i>aspA</i>	NP_418562	エシエリキア・コリ	アスパラギン酸
					<i>aspA</i>	P44324.1	ヘモフィルス・ インフルエンザ	アスパラギン酸
					<i>aspA</i>	P07346	シュートモナス・ フルオレセンス	アスパラギン酸
13	2.8.3.a	ホモセリン	ホモセリン- CoA	ホモセリンCoA トランスフェラーゼ	<i>cat1</i> , <i>cat2</i> , <i>cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム・ クルイペリ	コハク酸、 4-ヒドロキシ酪酸、 酪酸
					<i>gctA</i> , <i>gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコッカス・ フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA</i> , <i>atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア・コリ	ブタン酸
13	3.1.2.a	ホモセリン	ホモセリン- CoA	ホモセリン-CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア・コリ	アジビル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス・ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ・サビエンス	3- ヒドロキシプロパノイ ル-CoA

10

20

30

40

表 23 続き

13	6.2.1.a	ホモセリン	ホモセリン- CoA	ホモセリン-CoA リガーゼ(又は ホモセリン-CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエリキア・コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシルム・ クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	ハシルス・スプチリス	6- カルボキシヘキサ ン酸
13	4.3.1.a	ホモセリン- CoA	4-ヒドロキシブタ-2- エノイル-CoA	ホモセリン-CoA デアミナーゼ	<i>acI1</i>	CAG29274.1	クロストリジウム・ プロビオニクム	ベータ-アラニル-CoA
					<i>acI2</i>	CAG29275.1	クロストリジウム・ プロビオニクム	ベータ-アラニル-CoA
					<i>MXAN_438 5</i>	YP_632558.1	ミクソコッカス・ キサンタス	ベータ-アラニル-CoA
13	2.8.3.a	4-ヒドロキシブタ- 2-エン酸	4-ヒドロキシブタ-2- エノイル-CoA	4-ヒドロキシブタ-2- エノイル-CoA トランスフェラーゼ	<i>catI, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム・ クルイペリ	コハク酸、4- ヒドロキシ酪酸、 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシドミノコッカス・ フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア・コリ	ブタン酸

10

20

30

40

表 23 続き

13	3.1.2.a	4-ヒドロキシブタ-2-エン酸	4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoA	4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア・コリ	アジピル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス・ノルベギクス	ブチル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ・サビエンス	3-ヒドロキシプロパノイル-CoA
13	6.2.1.a	4-ヒドロキシブタ-2-エン酸	4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoA	4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ (又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエリキア・コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシリウム・クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス・スプチャリス	6-カルボキシヘキサノ酸
13	1.3.1.a	4-ヒドロキシブタ-2-エン酸	4-ヒドロキシ酪酸	4-ヒドロキシブタ-2-エン酸レダクターゼ	<i>enr</i>	CAA71086.1	クロストリジウム・チロブチリクム	
					<i>enr</i>	CAA76083.1	クロストリジウム・クルイベリ	
					<i>enr</i>	YP_430895.1	ムーレラ・サーモアセチカ	

10

20

30

40

表 23 続き

13	2.8.3.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoAトランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム・ ケルイペリ	コハク酸、4- ヒドロキシ酪酸、 酪酸
					<i>gclA, gclB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシダミノコッカス・ フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア・コリ	ブタン酸
13	3.1.2.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoAヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア・コリ	アジビル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス・ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ・サビエンス	3- ヒドロキシプロパノイ ル-CoA
13	6.2.1.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoAリガーゼ(又は4- ヒドロキシブチリル-CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエリキア・コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシリウム・ クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス・スブチリス	6- カルボキシヘキサノ 酸

10

20

30

40

表 23 続き

13	1.3.1.a	4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoA	4-ヒドロキシブチリル-CoA	4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼ	<i>bcd, etfA, etfB</i>	NP_349317.1, NP_349315.1, NP_349316.1	クロストリジウム・アセトブチリウム	
					<i>TER</i>	Q5EU90.1	ユーグレナ・グラーシリス	
					<i>TDE0597</i>	NP_971211.1	トレボネマ・デンチコラ	
8	1.1.1.c	4-ヒドロキシブチリル-CoA	1,4-ブタンジオール	4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム・アセトブチリウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロフロレクスウス・アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディア・キネンシス	長鎖アシル-CoA
8	1.2.1.b	4-ヒドロキシブチリル-CoA	4-ヒドロキシブタナール	4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ (又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム・クルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ボルフィロモナス・ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Mscd_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ・セデュラ	マロニル-CoA
8	1.1.1.a	4-ヒドロキシブタナール	1,4-ブタンジオール	1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス・セレビスアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア・コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム・クルイペリ DSM 555	コハク酸セミアルデヒド

10

20

30

40

50

(スクシニル-CoAシンテターゼを発現するBDO産生株)

本実施例では、スクシニル-CoAシンテターゼを発現するBDO産生株におけるBDOの増大された生成について記載する。

【0386】

先に記載されているように、コハク酸は、スクシニル-CoAへの変換によるBDOの生成のための前駆体であり得る(国際公開公報第2008/115840号、国際公開公報第2009/023493号、米国特許公報第2009/0047719号、米国特許公報第2009/0075351号をも参照)。従って、スクシニル-CoAシンテターゼをコードしているE. コリsucCD遺伝子を過剰発現するように宿主株を遺伝子修飾した。E. コリsucCDオペロンのヌクレオチド配列を図14Aに示し、コードされたスクシニル-CoAシンテターゼサブユニットについてのアミノ酸配列を図14B及び図14Cに示す。簡単に述べると、E. コリsucCD遺伝子をE. コリ染色体DNAからのPCRによってクローン化し、標準的な分子生物手法を用いてPA1lacO-1プロモーターの後ろのマルチコピープラスミドpZS⁺13、pZA13及びpZE33に導入した(Lutz及びBujardの文献、Nucleic Acids Res. 25:1203-1210 (1997))。

10

【0387】

スクシニル-CoAシンテターゼをコードしているE. コリsucCD遺伝子を過剰発現させた。それらの結果は、スクシニル-CoAシンテターゼを発現するsucCDを菌株に導入すると、原生レベルの発現、又はスクシニル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼであるcat1の発現と比較して、様々な菌株におけるBDO生成が向上することを示した。従って、スクシニル-CoAシンテターゼをコードしている原生E. コリsucCD遺伝子を過剰発現させることによってBDO生成を向上させた。

20

【0388】

(実施例XIII)

(BDO経路酵素をコードしている異種遺伝子の発現)

本実施例では、BDOの生成の向上をもたらす様々な非原生経路酵素の発現について記載する。

【0389】

(アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ) アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼをコードしているマイコバクテリウム・ボビスsucA遺伝子を宿主株に発現させた。M. ボビスsucAの過剰発現は、BDO生成を向上させた(国際公開公報第2008/115840号、国際公開公報第2009/023493号、米国特許公報第2009/0047719号、米国特許公報第2009/0075351号をも参照)。M. ボビスsucAのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列並びにコードされたアルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼを図15に示す。

30

【0390】

M. ボビスsucAを発現する菌株を構築するために、以下に示すプライマーを使用して、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼをコードしているsucA遺伝子の断片を、マイコバクテリウム・ボビスBCGのゲノムDNA(ATCC 19015; 米国培養細胞系統保存機関(American Type Culture Collection)、マナサス、VA)から増幅した。完全長遺伝子を4つの増幅DNA断片のライゲーション反応によって構成し、P_{PA1lacO-1}プロモーターの後ろの発現ベクターpZS⁺13及びpZE23にクローン化した(Lutz及びBujardの文献、Nucleic Acids Res. 25:1203-1210 (1997))。構成された遺伝子のヌクレオチド配列をDNA配列決定によって検証した。

40

【0391】

【化 2】

断片1についてのプライマー:

5'-ATGTACCGCAAGTTCCGC-3' (配列番号:)

5'-CAATTTGCCGATGCCCAG-3' (配列番号:)

断片2についてのプライマー:

5'-GCTGACCACTGAAGACTTTG-3' (配列番号:)

5'-GATCAGGGCTTCGGTGTAG-3' (配列番号:)

断片3についてのプライマー:

5'-TTGGTGCGGGCCAAGCAGGATCTGCTC-3' (配列番号:)

5'-TCAGCCGAACGCCTCGTCGAGGATCTCCTG-3' (配列番号:)

断片4についてのプライマー:

5'-TGGCCAACATAAGTTCACCATTCGGGCAAAAC-3' (配列番号:)

5'-TCTCTTCAACCAGCCATTCGTTTTGCCCCG-3' (配列番号:)

【0392】

インビトロ及びインビボアッセイの両方を使用して、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼの機能的発現を実証した。SucA酵素活性を、既に報告されている方法(Tianらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:10670-10675 (2005))に従って測定した。反応混合物は、50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)、0.2mMのピロリン酸チアミン、1mMのMgCl₂、0.8mMのフェリシアニド、1mMのアルファ-ケトグルタル酸及び細胞粗溶解物を含んでいた。酵素活性を430nmでのフェリシアニドの還元によって監視した。SucA酵素のインビボ機能を、E. コリ全細胞培養物を使用して検証した。SucA酵素及び4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(4Hbd)をコードしているプラスミドで形質転換されたE. コリMG1655lacI^qの単一コロニーを、適切な抗生物質を含む5mLのLB培地に接種した。細胞を37℃で一晩好気的に培養した。この一晩培養物の200μLを、20g/Lのグルコース、緩衝能を向上させるための100mMの3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、10μg/mLのチアミン及び適切な抗生物質が補給された8mLのM9最小培地(6.78g/LのNa₂HPO₄、3.0g/LのKH₂PO₄、0.5g/LのNaCl、1.0g/LのNH₄Cl、1mMのMgSO₄、0.1mMのCaCl₂)に導入した。最初に蓋付き嫌気性ボトルに5分間にわたって窒素を流し、次いで接種後に23Gニードルで隔壁に穴をあけることによって微好気性条件を確立した。成長時にニードルをボトル内に維持して、少量の空気をボトルに導入させた。培養物が中対数成長期に達すると、0.2mMのイソプロピル β-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を用いてタンパク質発現を誘導した。対照として、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼをコードしているプラスミドのみ及び空ベクターのみで形質転換されたE. コリMG1655lacI^q菌株を同じ条件下で培養した(表23参照)。LCMS法を使用して培養培地における4-ヒドロキシ酪酸(4HB)の蓄積を監視した。マイコバクテリウムアルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼを発現するE. コリ株のみが、有意な量の4HBを生成した(図16参照)。

【0393】

表24. 様々なプラスミド制御を含み且つsucA及び4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼをコードしている3種の菌株

【表 7 3】

	宿主	pZE13	pZA33
1	MG1655 lacIq	ベクター	ベクター
2	MG1655 lacIq	ベクター	4hbd
3	MG1655 lacIq	sucA	4hbd

【 0 3 9 4 】

個別の実験により、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ経路は、還元的TCA回路と無関係に機能することが証明された。E. コリ株ECKh-401(adhE ldhA pflB lpdA::K.p.lpdA322 mdh arcA)を宿主株として使用した(表25参照)。3つの構築物は全て、4HBデヒドロゲナーゼをコードしている遺伝子(4Hbd)を含んでいた。構築物1は、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼをコードしている遺伝子(sucA)をも含んでいた。構築物2は、還元的TCA回路を介する4HBの合成に必要とされるスクシニル-CoAシンテターゼをコードしている遺伝子(sucCD)及びCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードしている遺伝子(sucD)を含んでいた。構築物3は、構築物1及び2の全ての遺伝子を含む。これら3種のE. コリ株を、第2の培養が微好気性条件下であったことを除いては上記と同じ条件下で培養した。SucA酵素を発現することによって、構築物3は、4HB合成のための還元的TCA回路に依存する構築物2より多くの4HBを生成した(図17参照)。

【 0 3 9 5 】

4HB及びBDOの生成に対するアルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼの貢献に関する更なる裏付けを、フラックス分析実験によって提供した。染色体上にsucCD-sucD及びsucAの両方を含むECKh-432の培養物を、1-13C-グルコース(60%)とU-13C-グルコース(40%)の混合物を含むM9最小培地で成長させた。バイオマスを収穫し、タンパク質を単離して、アミノ酸に加水分解し、アミノ酸の標識分布を既に記載されているようにガスクロマトグラフィー-質量分析(GCMS)によって分析した(Fischer及びSauerの文献、Eur. J. Biochem. 270:880-891 (2003))。加えて、分泌された4HB及びBDOの標識分布を国際公開公報第2008/115840A2号に記載されているようにGCMSによって分析した。このデータを用いて、確立された方法(Suthersらの文献、Metab. Eng. 9:387-405 (2007))を使用して細胞内フラックス分布を計算した。それらの結果は、アルファ-ケトグルタル酸の56%~84%がアルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼを介してBDO経路に誘導されることを示していた。残りは、アルファ-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼによって酸化され、次いでそれがスクシニル-CoA経路を介してBDOに入った。

【 0 3 9 6 】

これらの結果は、プラスミドに発現されたマイコバクテリウム・ボビスBCGのsucA遺伝子を含む4-ヒドロキシ酪酸産生株を実証している。この遺伝子をコードしているプラスミドが存在しない場合は、sucD(CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ)が発現されなければ4-ヒドロキシ酪酸生成はごくわずかである。M. ボビス遺伝子は、その酵素生成物が既に特徴づけられたマイコバクテリウム・ツベルクローシス遺伝子の近いホモログである(Tianらの文献、前掲、2005)。

【 0 3 9 7 】

(コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(CoA-依存性)、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼ) ボルフィロモナス・ギンギバリスW83からの遺伝子は、1,4-ブタンジオール生成のための経路の有効な構成成分であり得る(国際公開公報第2008/115840号、国際公開公報第2009/023493号、米国特許公報第2009/0047719号、米国特許公報第2009/0075351号をも参照)。ボルフィロモナス・ギンギバリスからのCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(sucD)のヌクレオチド配列を図18Aに示し、コードされたアミノ酸配列を図18Bに示す。ボルフィロモナス・ギンギバリスからの4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(4hbd)のヌクレオチド配列を図19Aに示し、コードされたアミノ酸配列を図19Bに示す。ボルフィロモナス・ギン

ギバリスからの4-ヒドロキシ酪酸CoAトランスフェラーゼ(cat2)のヌクレオチド配列を図20Aに示し、コードされたアミノ酸配列を図20Bに示す。

【0398】

簡単に述べると、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(CoA依存性)及び4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、並びに場合によっては更に4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAをコードしているポルフィロモナス・ギンギバリスW83由来の遺伝子を、P.ギンギバリス染色体DNAからのPCRによってクローン化し、標準的な分子生物手法を使用して、PA1lacO-1プロモーターの後ろのマルチコピープラスミドpZS*13、pZA13及びpZE33に導入した(Lutz及びBujardの文献、Nucleic Acids Res. 25:1203-1210 (1997))。次いで、これらのプラスミドを宿主株に導入した。

10

【0399】

ポルフィロモナス・ギンギバリスW83遺伝子を上記のように産生株に導入した。いくつかの菌株は、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(CoA依存性)及び4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼのみを含み、4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼを含んでいなかった。

【0400】

(酪酸キナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼ) 酪酸キナーゼ(BK)及びホスホトランスブチリラーゼ(PTB)酵素を利用して、4-ヒドロキシブチリル-CoAを生成することができる(国際公開公報第2008/115840号、国際公開公報第2009/023493号、米国特許公報第2009/0047719号、米国特許公報第2009/0075351号をも参照)。特に、クロストリジウム・アセト

20

【0401】

最初の実験は、E. コリにおける原生C.アセトブチリウムPTB(020)及びBK(021)遺伝子のクローン化及び発現を含んでいた。必要であれば、各遺伝子の開始コドン及び停止コドンを、E. コリにおけるより最適な発現のために、それぞれ「ATG」及び「TAA」に修飾した。C.アセトブチリウム遺伝子配列(020N及び021N)並びにそれらの対応する翻訳ペプチド配列を図21及び図22に示す。

【0402】

PTB及びBK遺伝子は、C.アセトブチリウムにオペロンとして存在し、PTB(020)遺伝子が最初に発現される。これらの2つの遺伝子は、下流BK(021)遺伝子の再開リボソーム結合部位を含む配列"atta aagttaagtg gaggaatggtt aac"(配列番号：)によって連結される。この状況における2つの遺伝子をE. コリにおける発現のための発現ベクターにおけるlac調節プロモーターに融合した(Lutz及びBujardの文献、Nucleic Acids Res. 25:1203-1210 (1997))。

30

【0403】

これらのベクター構築物からの2つのタンパク質の発現は、E. コリにのみ希に存在するC.アセトブチリウム遺伝子における高頻度コドンにより、外因的に発現された他の遺伝子と比較して低いことが判明した。従って、E. コリ遺伝子配列により高度に発現される代替物には、希少コドンを変化させる新たな020及び021遺伝子が予測された。このコドン最適化法は、既に記載されているアルゴリズムに従うものであった(Sivaramanらの文献、Nucleic Acids Res. 36:e16 (2008))。この方法は、特定のコドンが両側で隣接する場合のそれらの出現頻度と関連してコドン置換を予測する。増加する数の希少コドンが近傍のコドンの状況におけるそれらの頻度に基づいて、より優勢なコドンで置き換えられる(A<B<C<D)ようにして、020(図23)及び021(図24)の代替的遺伝子配列を決定した。原生020及び021ペプチド配列と比較した実際のペプチド配列の変化は、これらの予測配列に導入されなかった。

40

【0404】

コドン最適化に起因するBK及びPTBタンパク質の発現の向上を図25Aに示す。原生遺伝子配列の発現をレーン2に示し、020B-021B及び020C-021Cの発現をそれぞれレーン3及び4に示す。コドン最適化オペロン020B-021B(2021B)及び020C-021C(2021C)におけるより高レベ

50

ルのタンパク質発現は、また、同等に発現されたE. コリ粗抽出物における原生オペロン(021n)と比較して活性の向上をもたらした(図25B)。

【0405】

コドン最適化オペロンを、菌株ECKh-432(*adhE* *ldhA* *pflB* *lpdA*::K.p.*lpdA*322 *mdh* *arcA* *gltAR*163L *fimD*::E. コリ*sucCD*, P. ギンギバリス*sucD*, P. ギンギバリス4*hbd* *fimD*::M. ボビス*sucA*, C. クルイベリ4*hbd*)において、C. アセトブチリウムアルデヒドデヒドロゲナーゼとともにプラスミドに発現させて、完全なBDO経路を提供した。上記のように好気性条件を維持するために23Gのニードルを使用して、20g/Lのグルコースを含むM9最小培地で細胞を培養した。結果として生じたグルコースの最終生成物BDOへの変換を測定した。PTB-BK酵素対の直接的生成物である、4Hb-CoAから誘導される自発的再配列分子であるガンマ-ブチリラクトン(GBL)の蓄積も測定した。図26は、原生2021nオペロンの発現が、4HB及び遊離CoAを4HB-CoAに変換することが可能な代替的酵素機能Cat2(034)に匹敵するBDOレベルをもたらしたことを示している。034のGBLレベルは、2021nより有意に高く、このことは、前者の酵素が、原生遺伝子から発現されたPTB-BKより高い活性を有することを示唆している。しかし、BDO及びGBLの両レベルは、コドン最適化変異体2021B及び2021Cが発現された場合は、034又は2021nのいずれかより高く、このことは、PTB及びBKに対する遺伝子のコドン最適化がE. コリにおけるBDO合成に対するそれらの貢献を有意に高めることを示している。

10

【0406】

これらの結果は、酪酸キナーゼ(BK)及びホスホトランスブチリラーゼ(PTB)酵素を採用して、4-ヒドロキシ酪酸を4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができることを実証している。これにより、生成された4-ヒドロキシブチリル-CoAの1モル当たり1モルの酢酸を生成することになる4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼなどの転移酵素が必要でなくなる。クロストリジウム・アセトブチリウムからの酵素は、BDO生成のための多くの操作された菌株に存在する。

20

【0407】

(4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ) クロストリジウム・ベイジェリンキー*ald*遺伝子を機能的BDO経路の一部として利用することができる(国際公開公報第2008/115840号、国際公開公報第2009/023493号、米国特許公報第2009/0047719号、米国特許公報第2009/0075351号をも参照)。クロストリジウム・ベイジェリンキー*ald*を利用して、BDO産生株におけるエタノール生成を減少させることもできる。また、具体的なコドン最適化*ald*変異体(GNM0025B)は、BDO生成を向上させることが判明した。

30

【0408】

原生C. ベイジェリンキー*ald*遺伝子(025n)及び酵素の予測タンパク質配列を図27に示す。クロストリジウム・アセトブチリウムPTB及びBK遺伝子に見られるように、原生C. ベイジェリンキー*ald*遺伝子の発現は、E. コリにおいて非常に低かった。従って、この遺伝子に対する4つのコドン最適化変異体を予測した。図28A~28Dは、増加する数の希少コドンが近傍コドンの状況におけるそれらの頻度に基づいて、より優勢なコドンで置き換えられる(A<B<C<D)、025に対する代替的な遺伝子配列を示す(25A、P=0.05; 25B、P=0.1; 25C、P=0.15; 25D、P=1)。原生025ペプチド配列と比較した実際のペプチド配列の変化は、これらの予測配列に導入されなかった。コドン最適化は、C. ベイジェリンキー*ald*の発現を有意に増大させて(図29参照)、BDO経路全体を発現する細胞におけるグルコースのBDOへの有意により高度な変換をもたらした(図30A)。

40

【0409】

原生遺伝子及びコドン最適化遺伝子を、宿主株ECKh-432(*adhE* *ldhA* *pflB* *lpdA*::K.p.*lpdA*322 *mdh* *arcA* *gltAR*163L *ackA* *fimD*::E. コリ*sucCD*, P. ギンギバリス*sucD*, P. ギンギバリス4*hbd* *fimD*::M. ボビス*sucA*, C. クルイベリ4*hbd*)において、P. ギンギバリスCat2とともにプラスミドに発現させることで、完全なBDO経路を含めた。上記のように20g/Lグルコースを含むM9最小培地において細胞を好気的に培養した。(コドン最適化変異体遺伝子025Bから発現された)C. ベイジェリンキー*Ald*酵素によるBDO及びエタノール

50

の相対的生成を、*C. アセトブチリクム* AdhE2酵素と比較した(図30B参照)。*C. アセトブチリクム* AdhE2酵素(002C)は、BDOよりエタノールをほぼ4倍多く生成した。比較すると、*C. ベイジェリンキー* Ald(025B)は(内因性ADH活性に関連して)、等しい量のBDOを生成したが、002Cと比較してこの酵素ではBDO対エタノールの生成比が逆転していた。これは、*C. ベイジェリンキー* Aldが、*C. アセトブチリクム* AdhE2よりもアセチル-CoAに対して4HB-CoAに特異的であるため、BDO経路に含めるのに前者が好適な酵素であることを示唆している。

【0410】

クロストリジウム・ベイジェリンキーald遺伝子(Tothらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 65:4973-4980 (1999))を、4-ヒドロキシブチリル-CoAの4-ヒドロキシブタナールへの変換を触媒するための候補として試験した。50種を超えるアルデヒドデヒドロゲナーゼを4-ヒドロキシブチリル-CoAの4-ヒドロキシブチルアルデヒドへの変換を触媒するそれらの能力についてスクリーニングした。この酵素がアセチル-CoAでなく4-ヒドロキシブチリル-CoAを基質として嗜好するため、BDO産生株へ組み込むのに*C. ベイジェリンキー* ald遺伝子を選択した。これは、アルデヒドデヒドロゲナーゼ機能性を有するたいていの他の酵素(例えば、*C. アセトブチリクム* からのadhE2(Fontaineらの文献、J Bacteriol. 184:821-830 (2002))が優先的にアセチル-CoAをアセトアルデヒドに変換し、それが次にエタノールに変換されるため重要である。*C. ベイジェリンキー* 遺伝子を利用すると、BDO生成生物体において副産物として生成されるエタノールの量が減少する。また、この遺伝子のコドン最適化型は、*E. コリ*において極めて十分に発現する(Sivaramanらの文献、Nucleic Acids Res. 36:e16 (2008))。

【0411】

(4-ヒドロキシブタナールレダクターゼ) *ゲオバシルス・サーモグルコシダシウス* (M10 EXG)からのadh1の4-ヒドロキシブタナールレダクターゼ活性を利用した。これは、4-ヒドロキシブタナールレダクターゼ活性を内因性レベルよりも高めることによってBDO生成の向上をもたらした。

【0412】

複数のアルコールデヒドロゲナーゼを4-ヒドロキシブタナールのBDOへの還元を触媒するそれらの能力についてスクリーニングした。ブチルアルデヒドに対して高い活性を有するたいていのアルコールデヒドロゲナーゼが、4-ヒドロキシブチルアルデヒドに対してはるかに低い活性を示した。1つの注目すべき例外は、4-ヒドロキシブタナール及びブタナールの両方に対して高い活性を示す*ゲオバシルス・サーモグルコシダシウス* M10EXG(Jeonらの文献、J. Biotechnol. 135:127-133 (2008))からのadh1遺伝子(GNM0084)である。

【0413】

ゲオバシルス・サーモグルコシダシウス からのadh1遺伝子の原生遺伝子配列及びコードされたタンパク質配列を図31に示す。*G. サーマグルコシダシウス* adh1遺伝子を*E. コリ*に発現させた。

【0414】

Adh1酵素(084)は、*E. コリ*におけるその原生遺伝子から極めて十分に発現した(図32A参照)。ADH酵素アッセイにおいて、*E. コリ*発現酵素は、ブチルアルデヒド又は4HB-アルデヒドを基質として使用した場合に非常に高度な還元活性を示した(図32B参照)。これらの基質について決定したKm値は、それぞれ1.2mM及び4.0mMであった。これらの活性値は、Adh1酵素が、試験された全ての候補の4HB-アルデヒドの還元に対する活性が最も高いことを示していた。

【0415】

C. ベイジェリンキー aldと結合させたときにBDO生成を増強させるその能力について084酵素を試験した。084遺伝子を*C. ベイジェリンキー* ald変異体025B遺伝子の後ろに挿入して、両遺伝子の結合発現をもたらす合成オペロンを作製した。同様の構築物が025Bを他のADH候補遺伝子と連結させ、BDO生成に対して各ADHを025Bとともに含む効果を試験した。使用した宿主株は、BDO経路の残りを染色体上に含むECKh-459(adhE ldhA pflB lpdA: :fnr-pflB6-K.p.lpdA322 mdh arcA gltAR163L fimD::*E. コリ* sucCD, *P. ギンギバリス*

ucD, P.ギンギバリス4hbd fimD:: M.ボビスsucA, C.クルイベリ4hbd fimD::C.アセトブチリクムbuk1, C.アセトブチリクムptb)であった。025Bとともに発現された084ADHは、025Bのみ(図33の左矢印)と比較すると、内因性ADH機能との組合せにおいて、最も高量のBDO(図33の右矢印)を示した。それは、また、026A-C、クロストリジウム・アセトブチリクムのブタノールデヒドロゲナーゼのコード最適化変異体；050、ザイモモナス・モビリスのアルコールデヒドロゲナーゼI；052、シトロバクター・フロインディイの1,3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ；053、ラクトバチラス・ブレビスの1,3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ；057、バクテロイデス・フラギリリスのラクトアルデヒドレダクターゼ；058、E.コリの1,3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ；071、バシルス・スプチリスの168アルファ-ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼなどで示される025Bと組み合わせられると他のADH酵素より多くのBDOを生成した。「PT5lacO」で標示される構築物は、遺伝子がPT5lacOプロモーターによって駆動される構築物である。全ての他の場合において、PA1lacO-1プロモーターを使用した。これは、084ADHをBDO経路に含めるとBDO生成が増大したことを示している。

10

【0416】

(実施例XIV)

(ピルビン酸デヒドロゲナーゼを発現するBDO産生株)

本実施例では、BDO生成を向上させるためのピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDH)の利用について記載する。クレブシエラ・ニューモニエIpdA遺伝子の異種発現を使用してBDO生成を向上させた。

20

【0417】

計算上では、1,4-ブタンジオールの最大理論収率を達成するためにピルビン酸のアセチルCoAへのNADH生成変換が必要である(国際公開公報第2008/115840号、国際公開公報第2009/023493号、米国特許公報第2009/0047719号、米国特許公報第2009/0075351号；国際公開公報2008/018930号；Kimらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007)；Kimらの文献、J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008)；Menzelらの文献、J. Biotechnol. 56:135-142 (1997)をも参照)。PDH活性の欠如は、BDOの最大嫌気性理論収率を、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)活性を達成できない場合に11%低下させ、PEPCK活性を達成できる場合に3%低下させることが示された。しかし、より重要なことに、ADHEr、ASPT、LDH_D、MDH及びPFLiのノックアウトを有する、国際公開公報2009/023493号及び米国特許公報第2009/0047719号に記載されているOptKnock株#439においてPDH活性が存在しないと、BDOの最大嫌気性収率が、PEPCK活性が存在しない場合又は存在する場合にそれぞれ54%又は43%低下する。外部電子受容体の存在下で、PDH活性の欠如は、ノックアウト株の最大収率を、PEPCK活性が存在しない場合又は存在する場合にそれぞれ10%又は3%低下させる。

30

【0418】

PDHは、中央代謝の最も複雑な酵素の1つであり、ジヒドロリポイルトランスアセチラーゼ(E2)コアの外側に結合するピルビン酸デカルボキシラーゼ(E1)の24個のコピー及びジヒドロリポイルデヒドロゲナーゼ(E3)の12個の分子で構成される。PDHは、高いNADH/NAD、ATP/ADP及びアセチル-CoA/CoA比によって阻害される。この酵素は、たいていはIpdAによってコードされるE3のNADH感受性により、必然的に、E.コリなどの生物体における酸素が制限された条件又は嫌気性条件下で非常に低い活性を示す。このため、クレブシエラ・ニューモニエからのIpdA遺伝子のNADH非感受型をクローン化し、発現させて、NADH/NAD比が大きくなると推定される条件下でPDHの活性を高めた。

40

【0419】

(原生IpdAの置換) クレブシエラ・ニューモニエのピルビン酸デヒドロゲナーゼオペロンは、ヌクレオチドレベルでE.コリの同等のオペロンと78~95%の間の同一性がある。K.ニューモニエは、グリセロールの存在下で嫌氣的に成長する能力を有することが示された(Menzelらの文献、J. Biotechnol. 56:135-142 (1997)；Menzelらの文献、Biotechnol. Bioeng. 60:617-626 (1998))。E.コリのオペロンのIpdA遺伝子における2つの変異は、嫌気

50

的に成長するその能力を向上させることも示された(Kimらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007); Kimらの文献、J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008))。鋳型としてのゲノムDNA(ATCC700721D)並びにプライマー

【化3】

KP-lpdA-Bam (5'-acacgcggatccaacgtcccgg-3')(配列番号:) 及び KP-lpdA-Nhe (5'-agcggctccgctagccgcttatg-3')(配列番号:)

を使用して、K. ニューモニエの lpdA 遺伝子をPCRによって増幅させた。得られた断片をベクター-pCR-BluntII-TOPO(Invitrogen; カールスバッド、CA)にクローン化して、プラスミドpCR-KP-lpdAを得た。

10

【0420】

対抗選択の手段として非複製プラスミド及びバシルス・スプチリスからの sacB 遺伝子を使用して染色体遺伝子置換を行った(Gayらの文献、J. Bacteriol. 153:1424-1431(1983))。使用したベクターは、サイズが3.6kbであり、カナマイシン耐性遺伝子を保持する、ori T配列及びIS配列が欠失したpRE118(ATCC87693)である。配列を確認し、ベクターをpRE118-V2と命名した(図34参照)。

【0421】

LpdA遺伝子に隣接するE. コリ断片を、プライマーの組合せ:

【化4】

EC-aceF-Pst (5'-aagccgttgctgcagctcttgagc-3')(配列番号:) + EC-aceF-Bam2 (5'-atctccggcggtcgatccgctcg-3')(配列番号:) 及び EC-yacH-Nhe (5'-aaagcggctagccacgcccgc-3')(配列番号:) + EC-yacH-Kpn (5'-attacacgaggtacccaacg-3')(配列番号:)

20

を使用して、PCRによって増幅させた。K. ニューモニエの lpdA 遺伝子を含むBamHI-XbaI断片をプラスミドpCR-KP-lpdAから単離し、次いでそれぞれPstI+BamHI及びNheI-KpnIで消化される上記E. コリ断片、並びにKpnI及びPstIで消化されるpRE118-V2プラスミドに連結させた。(pRE118-M2.1 lpdA yacと呼ばれる)得られたプラスミドを、His322残基のTry残基への変異のためのプライマー

【化5】

30

KP-lpdA-HisTyr-F (5'-atgctggcgtacaaaggtgtcc-3')(配列番号:) 及び (5'-ggacacctttgtacgccagcat-3')(配列番号:)

の組合せ、又は残基Glu354のLys残基への変異のためのプライマー

【化6】

KP-lpdA-GluLys-F (5'-atcgctacactaaaccagaagtgg-3')(配列番号:) 及び KP-lpdA-GluLys-R (5'-ccactctgtgttagttaggcgat-3')(配列番号:)

の組合せを使用して部位特異的変異誘発(SDM)させた。ポリメラーゼPfu Turbo(Stratagene; サンディエゴ、CA)を用いてPCRを実施した。断片全体の配列並びに所望の変異のみの存在を検証した。得られたプラスミドを形質転換によってE. コリのエレクトロコンピテント細胞 adhE::Frt- ldhA::Frtに導入した。染色体における第1の組込み事象を、カナマイシン(25又は50mg/L)を含むLB寒天プレート上で選択した。1つが挿入の領域の外側に位置し、1つがカナマイシン遺伝子

40

【化7】

(5'-aggcagttccataggatggc-3')(配列番号:)

内に位置する2つのプライマーを使用して、PCRによって正確な挿入を検証した。正確な挿入を伴うクローンを分解のために選択した。それらを純粋な液体LB中で所望の温度にて2回二次培養し、順次的な希釈物をLB-無塩-スクロース10%プレート上に播種した。スクロ

50

ース含有プレート上で成長したクローンをLB-低塩寒天培地上でのカナマイシン耐性遺伝子の欠失についてスクリーニングし、*lpdA*遺伝子置換をPCR及び包含領域の配列決定によって検証した。挿入領域の配列を検証し、それを以下に記載する。変異Glu354Lysを有する(4-4-P1と命名された)1つのクローンを選択した。次いで、このクローンにE.コリ PflB::FrtのP1溶解物を形質導入して、ECKh-138株(*adhE* *ldhA* *pflB* *lpdA*::K.p.*lpdA* 322)を得た。

【0422】

*aceF*及び*lpdA*遺伝子を包含するECKh-138領域の配列を図35に示す。K.ニューモニエ*lpdA*遺伝子に下線が引かれ、Glu354Lys変異体における変化したコドンには網掛けされている。原生E.コリ*lpdA*と変異体K.ニューモニエ*lpdA*のタンパク質配列比較を図36に示す。

10

【0423】

BDO産生株にK.ニューモニエ*lpdA*を使用する有益性を評価するために、強い誘導性プロモーターからBDO経路全体を発現するプラスミドで宿主株AB3及びECKh-138を形質転換した。具体的には、E.コリ*sucCD*、P.ギンギバリス*sucD*、P.ギンギバリス*4hbd*を中コピープラスミドpZA33において発現させ、P.ギンギバリス*Cat2*及びC.アセトブチリクム*AdhE2*を高コピープラスミドpZE13において発現させた。これらのプラスミドは、文献(Lutz及びH. Bujardの文献、Nucleic Acids Res 25:1203-1210 (1997))に記載されており、BDO経路発現のためのそれらの使用は、実施例XIII及び国際公開公報第2008/115840に記載されている。

【0424】

20g/Lのグルコース、緩衝能を向上させるための100mMの3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、10 µg/mLのチアミン及び適切な抗生物質が補給されたM9最小培地(6.78g/LのNa₂HPO₄、3.0g/LのKH₂PO₄、0.5g/LのNaCl、1.0g/LのNH₄Cl、1mMのMgSO₄、0.1mMのCaCl₂)にて37 °Cで細胞を嫌氣的に成長させた。最初に蓋付き嫌気性ボトルに5分間にわたって窒素を流し、次いで接種後に23Gニードルで隔壁に穴をあけることによって微好気性条件を確立した。成長時にニードルをボトル内に維持して、少量の空気をボトルに導入させた。経路遺伝子を誘導するために、OD600が約0.2に達すると0.25mMのIPTGを添加し、誘導後24時間毎に分析のために試料を採取した。培養上澄みを、実施例II及び国際公開公報第2008/115840号に記載されているようにBDO、4HB及び他の副産物について分析した。ECKh-138におけるBDO及び4HB生成は、48時間後に、AB3における、又は先の試験で使用した宿主MG1655 *ldhA*における生成より有意に高かった(図37)。

20

30

【0425】

(PDHプロモーター置換) *Fnr*結合部位、*pflB*プロモーターの1つ及びそのリボソーム結合部位(RBS)を含む転写融合体により*pdhR*リプレッサーを置き換えることで、嫌気性プロモーターにより*aceEF-lpd*オペロンを発現させると、嫌氣的に*pdh*活性が高められることが以前に示されている(Zhouらの文献、Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008))。*Fnr*結合部位、*pflB*-p6プロモーター及びRBS結合部位を含む融合体を、重複PCRによって構築した。2つの断片が増幅され、一方はプライマー:

【化8】

aceE-上流-RC (5'-tgacatgtaacacctaccttctgtgcctgtgccagtgggtgctgtgatatagaag-

3')(配列番号:)及び *pflB*p6-Up-Nde (5'-ataataatacatatgaacctgcgagttacgggcctataagccaggcg-

40

3')(配列番号:)

を使用し、他方はプライマー

【化9】

aceE-EcoRV-EC (5'-

agtttttcgatctgcatcagacaccggcacattgaaacgg-3')(配列番号:) 及び *aceE*-上流 (5'-

ctggcacaggcacagaaggtaggtgttacatgtcagaacgtttacacaatgacgtgatc-3')(配列番号:)

を使用する。重複PCRによりそれら2つの断片を集成し、最終的なDNA断片を制限酵素NdeI

50

及びBamHIで消化した。続いて、上記のようにpRE118-V2を使用して、この断片をE. コリオペロンのaceE遺伝子上流に導入した。この置換を菌株ECKh-138及びECKh-422において実施した。aceE遺伝子の5'領域を包含するヌクレオチド配列を検証し、それを図37に示す。図37は、pf1B-p6プロモーター及びリボソーム結合部位(RBS)に融合されたaceE遺伝子の5'末端のヌクレオチド配列を示す。イタリック体の5'配列は、pdhオペロンから反対方向に転写されるaroP遺伝子の出発点を示す。イタリック体の3'配列は、aceE遺伝子の出発点を示す。大文字:pf1B RBS。下線:FNR結合部位。太字:pf1B-p6プロモーター配列。

【0426】

(lpdAプロモーター置換) fnr結合部位、pf1B-p6プロモーター及びpf1B遺伝子のRBSを含むプロモーター領域を、染色体DNA鋳型並びにプライマー

10

【化10】

aceF-pf1Bp6-fwd (5'- agacaaatcggttgccgtttgtaagccaggcgagatatgatctatatc-

3')(配列番号:)及び lpdA-RBS-B-rev (5'-

gagttttgatttcagttactcatcatgtaaacctacattctgtgtgatag-3')(配列番号:)

を使用してPCRによって増幅させた。プラスミド2-4aを、プライマー

【化11】

B-RBS-lpdA fwd (5'-

ctatatcacagcaagaaggtaggtgttacatgatgagtactgaaatcaaaactc-3')(配列番号:)及び pf1Bp6-aceF-rev

20

(5'- gatatagatcatatctcgcttgcttaacaaacggcaaccgatttgtct-3')(配列番号:)

を使用してPCRによって増幅させた。得られた2つの断片を、BPSクローニングキット(BPS Bioscience; サンディエゴ、CA)を使用して集成した。得られた構築物を配列決定し、検証し、上記のpRE118-V2法を使用して菌株ECKh-439に導入した。得られた菌株ECKh-456にaceF-lpdA領域を包含するヌクレオチド配列を図39に示す。

【0427】

その構造が以下に示される宿主株ECKh-439(adhE ldhA pf1B lpdA::K.p.lpdA322 mdh arcA gltAR163L ackA fimD::E. コリリスucCD, P. ギンギバリスsucD, P. ギンギバリス4hbd fimD:: M. ボビスucA, C. クルイベリ4hbd)、並びにpdhR及びlpdAプロモーター置換誘導体ECKh-455及びECKh-456を、BDO生成について試験した。これらの菌株を、P. ギンギバリスCat2及びC. ベイジェリンキーAldを含むpZS*13で形質転換して完全BDO経路を得た。細胞を、上記のように20g/Lグルコースが補給されたM9最小培地で培養した。0.2mMのIPTGによる誘導の48時間後のBDO、4HB及びピルビン酸の濃度を図40に示した。これらのプロモーター置換菌株は、同質遺伝子系の親よりわずかに多くのBDOを生成する。

30

【0428】

これらの結果は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの発現がBDO産生株におけるBDOの生成を増大させることを実証した。

【0429】

(実施例XV)

40

(クエン酸シンターゼ及びアコニターゼを発現するBDO産生株)

本実施例では、クエン酸シンターゼ及びアコニターゼの活性を向上させてBDOの生成を増大させることについて記載する。gltAへのR163L変異は、BDO生成を向上させることが判明した。また、arcAノックアウトを使用してBDO生成を向上させた。

【0430】

計算上では、1,4-ブタンジオールの最大理論収率を達成するためにクエン酸シンターゼ(CS)及びアコニターゼ(ACONT)を介するフラックスが必要であることが確認された(国際公開公報第2008/115840号、国際公開公報第2009/023493号、米国特許公報第2009/0047719号、米国特許公報第2009/0075351号をも参照)。CS又はACONT活性の欠如は、嫌気性条件下で最大理論収率を14%低下させる。外部電子受容体の存在下で、最大収率は、PEPCK活性が

50

存在しない場合又は存在する場合に、CS又はACONTを介するフラックスがなければそれぞれ9%又は6%低下する。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDH)については、ADHEr、ASPT、LDH_D、MDH及びPFLiがノックアウトされるノックアウト株バックグラウンドにおいてCS及びACONTの重要性が著しく増幅される(デザイン#439)(引用により本明細書中に組み込まれている国際公開公報第2009/023493号及び米国特許公報第2009/0047719号参照)。

【0431】

国際公開公報第2009/023493号及び米国特許公報第2009/0047719号に記載されている最小OptKnock株設計は、ECKh-138の外にリンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードしているmdh遺伝子の1つの更なる欠失を有していた。この遺伝子の欠失は、還元的TCA回路を介するコハク酸へのフラックスを防止することを意図する。赤色相同組換え法(Datsenko及びWannerの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645(2000))を使用して、mdh欠失を実施した。以下のオリゴヌクレオチドを使用して、pKD3から、FRT部位が隣接するクロラムフェニコール耐性遺伝子(CAT)をPCR増幅した：

10

S-mdh-Kan 5' - **TAT TGT GCA TAC AGA TGA ATT TTT ATG CAA ACA GTC AGC**
CCT GAA GAA GGG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C - 3' (配列番号:)

AS-mdh-Kan 5' - **CAA AAA ACC GGA GTC TGT GCT CCG GTT TTT TAT TAT CCG**
CTA ATC AAT TAC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G - 3' (配列番号:)

20

。

【0432】

下線が引かれた領域は、pKD3プラスミドに対する相同性を示し、太字の配列は、mdh ORFの配列の上流及び下流の配列相同性を指す。精製後、PCR生成物を、pRedET(tet)で形質転換され、製造者の説明書(www.genebridges.com/gb/pdf/K001%20Q%20E%20BAC%20Modification%20Kit-version2.6-2007-screen.pdf)に従って調製されたECKh-138エレクトロコンピテント細胞に電気穿孔した。PCR生成物を、それが図41に示されるようにmdh遺伝子の上流領域でECKh-138ゲノムに組み込むように設計した。

【0433】

30

組換え体をクロラムフェニコール耐性について選択し、ストリークを精製した。mdh遺伝子の喪失及びCATの挿入を診断PCRによって検証した。CAT遺伝子を除去するために、FLPリコンビナーゼを含む温感性プラスミドpCP20(Datsenko及びWannerの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645 (2000))を30℃で細胞に形質転換し、アンピシリン耐性(AMP)について選択した。形質転換体を非選択的に42℃で一晩成長させて、FLP合成を熱的に誘発し、プラスミドの喪失を引き起こした。次いで、培養物ストリークを精製し、個々のコロニーを全ての抗生物質耐性の喪失について試験した。大多数が、FRT隣接耐性遺伝子及びFLPヘルパープラスミドを同時に喪失していた。「FRT」瘢痕残留物も存在した。得られた菌株をECKh-172と命名した。

【0434】

40

CS及びACONTは、嫌気性条件下で高度な活性を有さないか、又は高度に発現されない。この目的のため、TCA回路の全体的な調節因子をコードしているarcA遺伝子を欠失させた。arcAは、微好気性条件を通じて作用して、低酸素量に対して敏感である中央代謝酵素aceE、pflB及びadhEの活性を可能にする遺伝子産物の発現を誘発する。微好氣的に、arcA/arcBの欠失は、ldh、icd、glutA、mdh及びgdh遺伝子の比活性を高めることが示された(Salmonらの文献、J. Biol. Chem. 280:15084-15096 (2005) ; Shalel-Levanonらの文献、Biotechnol. Bioeng. 92(2):147-159 (2005))。E. コリMG1655のarcA遺伝子の上流及び下流領域を、それぞれプライマー

【化 1 3】

ArcA-up-EcoRI (5'-ataataatagaattcggttgctacctaattgccaaactaaatcgaaacagg-3')(配列番号:)を
 ArcA-up-KpnI (5'-tattattatggtaccaatatcatgcagcaaacgggtgcaacattgccg-3')(配列番号:)とともに使用し、
 ArcA-down-EcoRI (5'-tgatctggaagaattcatcggtttaccaccgtcaaaaaaacggcg-3')(配列番号:)を
 ArcA-down-PstI (5'-ataaaaccctgcagcggaacgaagttttatccattttggttacctg-3')(配列番号:)

とともに使用してPCRによって増幅させた。続いて、これらの断片を制限酵素EcoRI及びKpnI(上流断片)並びにEcoRI及びPstI(下流)で消化させた。次いで、それらをPstI及びKpnIで消化されたpRE118-V2プラスミドに連結させて、プラスミドpRE118- arcAを得た。プラスミドpRE118- arcAの配列を検証した。pRE118- arcAを、E. コリ株ECKh-172のエレクトロコンピテント細胞(adhE ldhA pflB lpdA::K.p.lpdA322 mdh)に導入した。上記のようにLB-無塩-スクロースプレート上で組み込み及び分解後、得られた菌株ECKh-401の染色体におけるarcA遺伝子の欠失を配列決定によって検証し、それを図42に示す。

10

【0 4 3 5】

E. コリのgltA遺伝子は、クエン酸シンターゼをコードしている。この遺伝子は、NADHによってアロステリック阻害されることが既に示されており、この阻害に關与するアミノ酸が特定された(Pereiraらの文献、J. Biol. Chem. 269(1):412-417 (1994); Stokellらの文献、J. Biol. Chem. 278(37):35435-35443 (2003))。E. コリMG1655のgltA遺伝子を、プライマー

20

【化 1 4】

gltA-up (5'-ggaagagaggctggtaccagaagccacagcagga-3')(配列番号:) 及び gltA-PstI

(5'-gtaatcactgcgtaagcgccatgccccggcggttaattc-3')(配列番号:)

を使用してPCRによって増幅させた。増幅した断片をKpnI及びPstIで消化した後にpRE118-V2にクローン化した。得られたプラスミドをpRE118-gltAと命名した。次いで、このプラスミドを、プライマー

【化 1 5】

R163L-f (5'-attgccgcgttctctctgctgtcga-3')(配列番号:) 及び R163L-r (5'-

30

cgacagcaggaggaaacgcggcaat-3')(配列番号:)

を使用して部位特異的変異誘発(SDM)させて、残基Arg163をLys残基に変化させた。断片全体の配列を配列決定によって検証した。赤色相同組換え法の変法(Datsenko及びWannerの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645 (2000))を使用して、Frt痕を残さずに原生gltA遺伝子をR163L変異対立遺伝子で置き換えた。全般的な組換え手順は、上記mdh欠失を作製するのに使用したものと同じである。第1に、赤色相同組換え法を使用してrpsLヌル変異を導入することによって、菌株ECKh-172をストレプトマイシン耐性にした。次に、組換えを実施して、この菌株における野生型gltAコード領域全体を、カナマイシン耐性遺伝子(kanR)及びE. コリrpsL遺伝子の野生型コピーで構成されるカセットで置き換えた。rpsLヌル変異を保持するE. コリ株に導入されると、該カセットは、細胞を薬物ストレプトマイシンに対して耐性からストレプトマイシン感受性に変化させる。次いで、適切な相同末端とともに、gltA遺伝子の各変異型を含むDNA断片を導入し、得られたコロニー成長をストレプトマイシンの存在下で試験した。これを、kanR/rpsLカセットが変異gltA遺伝子で置き換えられた菌株について選択した。この変異遺伝子の適正な座への挿入を、PCR及びDNA配列決定分析によって確認した。得られた菌株は、ECKh-422と命名され、遺伝子型 adhE ldhA pflB lpdA::K.p.lpdA322 mdh arcA gltAR163Lを有する。菌株ECKh-422の変異gltA遺伝子を包含する領域を、図43に示すように配列決定によって検証した。

40

【0 4 3 6】

次いで、菌株ECKh-401及びgltAR163L変異体ECKh-422の粗抽出物をクエン酸シンターゼ

50

活性について評価した。細胞を4500rpmの遠心(Beckman-Coulter、Allegra X-15R；フーコトン、CA)によって10分間にわたって収集した。ベンゾナーゼ及びリゾチームを含む0.3 mLのBugBuster(Novagen/EMD；サンディエゴ、CA)試薬にペレットを再懸濁させ、静かに振盪しながら溶解を室温で15分間進行させた。無細胞溶解物を4 で30分間にわたる14000rpmの遠心(Eppendorf遠心器5402；ハンブルグ、ドイツ)によって得た。試料中の細胞タンパク質を、Bradford法(Bradfordの文献、Anal. Biochem. 72:248-254 (1976))を使用して測定した。

【0437】

アセチル-CoAとオキサロ酢酸との反応から放出される遊離補酵素A(HS-CoA)の形成を追跡することによってクエン酸シンターゼ活性を測定した。HS-CoAの遊離チオール基は、5, 5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)と反応して、5-チオ-2-ニトロ安息香酸(TNB)を形成する。次いで、410nm(412nmで最大)の吸光度を測定することによってTNBの濃度を分光光度的に監視する。アッセイ混合物は、100mMのトリス/HCl緩衝液(pH7.5)、20mMのアセチル-CoA、10mMのDTNB及び20mMのオキサロ酢酸を含んでいた。NADH阻害の評価のために、0.4mMのNADHをも反応物に添加した。5 μ lの細胞抽出物を添加することによってアッセイを開始し、経時的な吸光度変化を追跡することによって反応速度を測定した。比活性1単位は、タンパク質1mg当たり1分間毎に変換される生成物の μ molで定義される。

【0438】

図44は、野生型glutA遺伝子産物及びR163L変異体のクエン酸シンターゼ活性を示す。アッセイを0.4mMのNADHの不在下又は存在下で実施した。

【0439】

菌株ECKh-401及びECKh-422を、BDO経路全体を発現するプラスミドで形質転換した。E. コリ sucCD、P. ギンギバリス sucD、P. ギンギバリス hbd 及び M. ボビス sucA を低コピープラスミド pZS*13 に発現させ、P. ギンギバリス Cat2 及び C. アセトブチリクム AdhE2 を中コピープラスミド pZE23 に発現させた。これらの菌株の培養物を、上記のように20g/Lグルコース及び適切な抗生物質が補給されたM9最小培地にて微好気性に成長させた。2つ組みの培養物から平均した誘導の48時間後の4HB及びBDO濃度を図45に示す。いずれもECKh-422の方がECKh-401より高く、glutA変異により向上したクエン酸シンターゼ活性が、BDO経路へのフラックスの増大をもたらすことが証明される。

【0440】

このセクションに記載されている宿主株改変は、酸化的TCA回路を介して炭素フラックスを方向転換することを意図し、それは、国際公開公報第2009/023493号及び米国特許公報第2009/0047719号に記載されているOptKnock株設計と一致する。フラックスが実際にこの経路を介して誘導されることを実証するために、(実施例XVIIに記載されているように)上流経路が染色体に組み込まれた型のECKh-422である菌株ECKh-432を使用して ^{13}C フラックス分析を実施した。BDO経路を完成するために、P. ギンギバリス Cat2 及び C. ベイジェリンキー Ald を pZS*13 から発現させた。4つの並行培養物を、4つの異なる標識比(^{1-13}C 、グルコース分子内の第1の炭素原子のみが ^{13}C で標識されている；均一- ^{13}C 、全ての炭素原子が ^{13}C である)の4g/Lの全グルコースを含むM9最小培地(6.78g/Lの Na_2HPO_4 、3.0g/Lの KH_2PO_4 、0.5g/LのNaCl、1.0g/Lの NH_4Cl 、1mMの MgSO_4 、0.1mMの CaCl_2)にて成長させた。

1. 80mol % 非標識、20mol % 均一- ^{13}C
2. 10mol % 非標識、90mol % 均一- ^{13}C
3. 90mol % ^{1-13}C 、10mol % 均一- ^{13}C
4. 40mol % ^{1-13}C 、60mol % 均一- ^{13}C

【0441】

並行非標識培養物を2つ組みで成長させ、そこから高頻度で試料を採取して、成長速度、グルコース取込み速度及び生成物形成速度を評価した。後対数期において、標識培養物を収穫し、タンパク質を単離し、アミノ酸に加水分解し、既に記載されているようにアミノ酸の標識分布をガスクロマトグラフィー-質量分析(GCMS)によって分析した(Fischer及びSauerの文献、Eur. J. Biochem. 270:880-891 (2003))。加えて、標識培養物からプロ

10

20

30

40

50

ス中に分泌された4HB及びBDOの標識分布を、国際公開公報第2008115840号に記載されているようにGCMSによって分析した。このデータを集合的に使用して、確立された方法(Suthe rsらの文献、Metab. Eng. 9:387-405 (2007))を使用して細胞内フラックス分布を計算した。得られた中央代謝フラックス及び関連する95%信頼区間を図46に示す。値は、1mmol/時のグルコース取込み速度に対して正規化されたモルフラックスである。その結果は、炭素フラックスが、クエン酸合成を介して酸化方向に誘導されること、及びたいいの炭素が、TCA回路を完成させるのではなくBDO経路に入ることを示している。また、この菌株におけるmdh欠損により、リンゴ酸とオキサロ酢酸との間にフラックスが実質的に存在しないことが確認される。

【0442】

BDO生成にOptKnockを使用して設計された菌株(国際公開公報第2009/023493号及び米国特許公報第2009/0047719号参照)などのノックアウト株を使用する利点を、ECKh-422の典型的な発酵プロファイルと、BDOが還元的TCA回路を介してコハク酸から生成される本来の菌株ECKh-138のプロファイルとを比較することによって確認することができる(図47参照)。20g/Lのグルコースが補給されたM9最小培地を使用して、2LのBiostat B+バイオリアクター(Sartorius; セデックス、フランス)にて1Lの初期培養容量で発酵を実施した。温度を37℃で制御し、2MのNH₄OH又はNa₂CO₃を使用してpH7.0で制御した。細胞を約10のOD600に好氣的に成長させ、その時点で培養物を0.2mMのIPTGで誘導させた。誘導の1時間後に、空気流量を微好気性条件に向けて0.02標準リットル毎分まで減少させた。攪拌速度を700rpmに設定した。濃縮グルコースを供給して、容器内のグルコース濃度を0.5~10g/Lの間に維持した。上記実施例と同様に、BDO経路全体を保持するプラスミドで両菌株を形質転換した。ECKh-138では、酢酸、ピルビン酸及び4HBが発酵の主流であるのに対して、ECKh-422ではBDOが主たる生成物である。

【0443】

(実施例XVI)

(BDO菌株発現ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ)

本実施例では、BDO生成を向上させるためのホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)の利用について記載する。ヘモフィルス・インフルエンザPEPCK遺伝子を異種発現に使用した。

【0444】

計算上では、1,4-ブタンジオールの最大理論収率を達成するためにオキサロ酢酸のホスホエノールピルビン酸へのATP生成変換が必要であることが確認された(国際公開公報第2008/115840号、国際公開公報第2009/023493号、米国特許公報第2009/0047719号、米国特許公報第2009/0075351号をも参照)。PEPCK活性の欠如は、BDOの最大理論収率を、嫌気性条件の場合に12%低下させ、硝酸塩又は酸素などの外部電子受容体が存在する場合に3%低下させることが示された。

【0445】

E. コリなどの生物体において、PEPCKは、オキサロ酢酸からホスホエノールピルビン酸へのグルコース新生及びATP消費方向に作用する。E. コリのPEPCKの速度論的制限は、それが、PEPからのオキサロ酢酸の形成を効果的に触媒することを防止していると仮定された。ATPを生成しないが効率的な成長に必要とされるPEPカルボキシラーゼ(PPC)は、ホスホエノールピルビン酸からオキサロ酢酸を形成するためにE. コリによって自然に利用される。従って、3つの非原生PEPCK酵素(表26)をグルコース最小培地におけるE. コリのPPC変異株の成長を補完するそれらの能力について試験した。

【0446】

表26. ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ配列の供給源

10

20

30

40

【表 7 4】

PEPCK 供給菌株	寄託番号、GenBank 参照配列
ヘモフィラス・インフルエンザ	NC_000907.1
アクチノバシルス・スクシノゲネス	YP_001343536.1
マンヘイミア・スクシニシプロデュセンス	YP_089485.1

【0 4 4 7】

成長補完試験は、Keioコレクションから得られた ppc変異E. コリJW3978における候補遺伝子のプラスミドベースの発現を含んでいた(Babaらの文献、Molecular Systems Biology 2:2006.0008(2006))。遺伝子を発現ベクターpZA23(中コピー)及びpZE13(高コピー)におけるPA1lacO-1プロモーターの後ろにクローン化した。これらのプラスミドは、既に記載されており(Lutz及びBujardの文献、Nucleic Acids Res. 25:1203-1210 (1997))、発現BDO経路遺伝子におけるそれらの使用は、既に国際公開公報第2008115840号に記載されている。

10

【0 4 4 8】

前培養物を、4g/Lのグルコースを含むM9最小培地にて好氣的に成長させた。全ての前培養物にアスパラギン酸(2mM)を補給して、PEPCK発現に無関係にTCA回路中間体を生成するための供給源を伴う ppc変異体を提供した。M9最小培地を、4g/Lのグルコースを含むが、アスパラギン酸を添加せず、IPTGを0.5mMまで添加した試験条件にも使用した。表27は、成長補完試験の結果を示す。

20

【0 4 4 9】

表27. ベクターpZA23又はpZE13から発現されたH. インフルエンザ、A. スクシノゲネス及びM. スクシノプロデュセンス由来のPEPCKを持つ ppc変異体の補完

【表 7 5】

PEPCK 供給菌株	ベクター	時間(時)	OD ₆₀₀
H.インフルエンザ	pZA23BB	40	0.950
Δppc 対照	pZA23BB	40	0.038
A.スクシノゲネス	pZA23BB	40	0.055
M.スクシノプロデュセンス	pZA23BB	40	0.214
A.スクシノゲネス	pZE13BB	40	0.041
M.スクシノプロデュセンス	pZE13BB	40	0.024
Δppc 対照	pZE13BB	40	0.042

30

【0 4 5 0】

ヘモフィルス・インフルエンザPEPCKは、プラスミドベースのスクリーニングで試験された遺伝子の中でも最も良く ppc変異体E. コリにおける成長を補完することが判明した。次いで、上記pRE118-V2を用いたSacB対抗選択法を使用して、この遺伝子を野生型E. コリ(MG1655)のPPC座に組み込んだ(Gayらの文献、J. Bacteriol. 153:1424-1431(1983))。PEPCKを組み込んでE. コリ原生PPCプロモーターを維持したが、非原生PEPCKターミネーターを利用した。ppcをH. インフルエンザpepckで置き換えた後のこの領域の配列を図48に示す。pepckコード領域に下線が引かれている。

40

【0 4 5 1】

適応進化の技術を適用して、E. コリ変異体(ppc::H. inf pepCK)の成長速度を向上させた。4g/Lグルコース及び50mM炭酸水素ナトリウムを含むM9最小培地を使用して、この菌株を嫌気性環境で培養及び進化させた。高い炭酸水素ナトリウム濃度を使用して、オキサロ酢酸形成へとPEPCK反応の平衡を導いた。指数成長を維持するために、0.5のOD600が達成

50

される毎に、培養物を2倍に希釈した。3週間の適応進化にわたる約100世代の後に、嫌気性成長速度が約8時間から野生型の成長速度、即ち約2時間まで向上した。進化後に、個々のコロニーを単離し、嫌気性ボトルにおける成長を初期変異体及び野生型菌株のそれと比較した(図49参照)。4g/Lのグルコース及び50mMの炭酸水素ナトリウムを含むM9培地を使用した。

【0452】

次いで、上記ppc/pepck遺伝子置換手順を、今回は宿主としてBDO産生株ECKh-432(*adhE* *ldhA* *pflB* *lpdA*::K.p.*lpdA*322 *mdh* *arcA* *gltAR*163L *ackA* *fimD*::E.コリ*sucCD*, P.ギンギパリス*sucD*, P.ギンギパリス4*hbd* *fimD*::M.ボビス*sucA*, C.クルイベリ4*hbd*)及びECKh-439を使用して繰り返した。これらの菌株は、先に記載されているTCA回路強化物並びに染色体に組み込まれた上流経路を含む。ECKh-439は、酢酸キナーゼをコードしている*ackA*遺伝子が欠失したECKh-432の誘導体である。上記の*sacB*対抗選択法を使用してこの欠失を実施した。

10

【0453】

ECKh-453と呼ばれる、ECKh-439の *ppc*::H. *inf* *pepCK*誘導体を発酵で実験した。P.ギンギパリスCat2及びC.ベイジェリンキーAldを含むpZS*13によって下流BDO経路を供給した。これを、20g/Lのグルコース及び50mMのNaHCO₃が補給されたM9最小培地を使用して、2LのBiostat B+バイオリアクター(Sartorius)において1Lの初期培養容量で実施した。温度を37℃で制御し、2MのNH₄OH又はNa₂CO₃を使用してpHを7.0で制御した。細胞を約2のOD600まで好氣的に成長させ、その時点で培養物を0.2mMのIPTGで誘導させた。誘導の1時間後に、空気流量を微好気性条件に向けて0.01標準リットル毎分まで減少させた。攪拌速度を最初に700rpmに設定した。培養密度が高くなるに従って、発酵を通じて通気量を徐々に増加させた。濃縮グルコース溶液を供給して、容器内のグルコース濃度を0.5~10g/Lの間に維持した。生成物プロファイルを図50に示す。BDO及び酢酸が約1対1のモル比で生成される観察された表現型は、デザイン#439(ADHEr、ASPT、LDH_D、MDH、PFLi)について国際公開公報第2009/023493号で予測されたものと極めて類似している。アスパラギン酸アンモニア-リアーゼを介する自然のフラックスが低いため、ASPT反応を標的とする欠失は不要であると思われた。

20

【0454】

OptKnock株の重要な特徴は、関心対象の代謝物の生成が一般的に成長に連結され、更に生成が指数成長時並びに静止期に生じることである。ECKh-432及びECKh-453の成長連結可能性を、対数期を通じて頻りにサンプリングしながら微好気性ボトルにおける成長によって評価した。4g/Lのグルコース及び10mMのNaHCO₃(ECKh-432の場合)又は50mMのNaHCO₃(ECKh-453の場合)のいずれかを含むM9培地を使用し、接種から0.2mMのIPTGを含んだ。ECKh-432の微好気性成長に関して18Gニードルを使用し、ECKh-453に関して18G及び27Gニードルの両方を試験した。ニードルゲージが高次であるほど通気量が少なくなる。図51に示されるように、ECKh-432は、5g/Lのグルコースが消費されるまでBDOの生成を開始せず、それは静止期の開始に対応している。ECKh-453は、実験全体を通じてBDOをより均一に生成する。加えて、成長連結は、この培養物の通気量が減少するにつれて向上する。

30

【0455】

(実施例XVII)

(特定の組込み部位におけるBDO経路コード遺伝子の組込み)

本実施例では、より効率的な発現及び安定性を提供するための様々なBDO経路遺伝子の*fimD*座への組込みについて記載する。

40

【0456】

4HBに至る上流BDO経路全体を*fimD*座においてE.コリ染色体に組み込んだ。赤色相同組換え法(Datsenko及びWannerの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645 (2000))を使用して上流経路のコハク酸分枝をE.コリ染色体に組み込んだ。受容E.コリ株はECKh-422(*adhE* *ldhA* *pflB* *lpdA*::K.p.*lpdA*322 *mdh* *arcA* *gltAR*163L)であった。プロモーター、*sucCD*遺伝子、*sucD*遺伝子及び4*hbd*遺伝子及びターミネーター配列を含むポ

50

リシストロン性DNA断片を、pKD3プラスミドのAflIII部位に挿入した。以下のプライマーを使用して、プラスミドからのクロラムフェニコールマーカータともオペロンを増幅した。下線が引かれた配列は、目標挿入部位に対して相同である。

【化 1 6】

5'-GTTTGCACGCTATAGCTGAGGTTGTTGTCTTCCAGCAACGTACCGTATACAA

TAGGCGTATCACGAGGCCCTTTC-3' (配列番号:)

5'-GCTACAGCATGTCACACGATCTCAACGGTCGGATGACCAATCTGGCTGGTAT

GGGAATTAGCCATGGTCC-3' (配列番号:)

10

DpnI 処理及びDNA電気泳動に続いて、精製されたPCR生成物を使用して、プラスミドpKD46を保持するE. コリ株を形質転換した。候補菌株を、クロラムフェニコールを含むプレート上で選択した。候補菌株のゲノムDNAを精製した。挿入配列を増幅し、DNA配列決定によって確認した。クロラムフェニコール耐性マーカータフリパーゼによって染色体から除去した。挿入及びマーカータ除去後の領域のヌクレオチド配列を図52に示す。

【0 4 5 7】

上流経路のアルファ-ケトグルタル酸分枝を相同組換えによって染色体に組み込んだ。この修飾に使用されるプラスミドは、カナマイシン耐性遺伝子、レバンスクラゼをコードしている遺伝子(sacB)及びR6K条件複製起点を含む、実施例XIVに示されるベクターpRE118-V2から誘導された。この組込みプラスミドは、プロモーター、sucA遺伝子、C. クルイベリ4hbd遺伝子及びターミネーターが、目標挿入部位の隣接領域に対して相同である2つの1.5-kbDNA断片の間に挿入されるポリシストロン性配列をも含んでいた。得られたプラスミドを使用して、E. コリ株を形質転換した。カナマイシンを含むプレート上で組込み候補を選択した。正確な組込み部位をPCRによって検証した。染色体から抗生物質マーカータを分離させるために、スクロースを含む培地上での成長について細胞を選択した。最終菌株をPCR及びDNA配列決定によって検証した。挿入及びマーカータ除去後の染色体領域のヌクレオチド配列を図53に示す。

20

【0 4 5 8】

得られた上流経路組込み菌株ECKh-432を、下流経路遺伝子を保持するプラスミドで形質転換した。構築物は、最小培地にてグルコースからBDOを生成することができる(図54参照)。

30

【0 4 5 9】

(実施例XVIII)

(ビルビン酸副産物の形成を減少するための非ホスホトランスフェラーゼスクロース取込み系の使用)

本実施例では、スクロースのBDOへの変換における副産物としてのビルビン酸を減少させるための非ホスホトランスフェラーゼ(PTS)スクロース取込み系の利用について記載する。

【0 4 6 0】

ホスホトランスフェラーゼ(PTS)系を介するスクロースの利用のために操作された菌株は、副産物としてかなりの量のビルビン酸を生成する。従って、スクロースの移入にはホスホエノールビルビン酸(PEP)のビルビン酸への変換が伴わないため、非PTSスクロース系を使用して、ビルビン酸の形成を減少することができる。これは、PEPの蓄積及びPPC又はPEPCKを介するオキサロ酢酸へのフラックスを増大させることになる。

40

【0 4 6 1】

非PTSスクロースオペロンのrrnC領域への挿入を実施した。rrnC領域に対して相同の領域が隣接する非PTSスクロース遺伝子を含むPCR生成物を生成するために、2つのオリゴを使用して、Mach1(商標)(Invitrogen、カールスバッド、CA)からcsc遺伝子をPCR増幅した。この菌株は、スクロースを異化することが可能であることが知られるE. コリ株であるW菌株の子孫である(Orencio-Trejoらの文献、Biotechnology Biofuels 1:8 (2008))。その

50

配列は、E. コリW菌株K011(寄託番号AY314757)に由来し(Shuklaらの文献、Biotechnol. Lett. 26:689-693 (2004))、スクロースペルメアーゼ(cscB)、D-フルクトキナーゼ(cscK)、スクロースヒドロラーゼ(cscA)及びLacI関連スクロース特異的抑制因子(cscR)をコードしている遺伝子を含む。cscRの最初の53個のアミノ酸をASプライマーの配置によって効果的に除去した。オリゴの配列は：

【化17】

rrnC 23S del S –CSC 5'-TGT GAG TGA AAG
TCA CCT GCC TTA ATA TCT CAA AAC TCA TCT TCG GGT GAC GAA ATA TGG
CGT GAC TCG ATA C-3' (配列番号:) 及び rrnC 23S del AS –CSC 5'-TCT GTA TCA
GGC TGA AAA TCT TCT CTC ATC CGC CAA AAC AGC TTC GGC GTT AAG ATG
CGC GCT CAA GGA C-3' (配列番号:)

10

であった。下線が引かれた領域は、cscオペロンに対する相同性を示し、太字の配列は、rrnC領域の上流及び下流の配列相同性を指す。PCR生成物全体の配列を図55に示す。

【0462】

精製後、PCR生成物を、pRedET(tet)で形質転換され、製造者の説明書(www.genebridges.com/gb/pdf/K001%20Q%20E%20BAC%20Modification%20Kit-version2.6-2007-screen.pdf)に従って調製されたMG1655エレクトロコンピテント細胞に電気穿孔した。PCR生成物を、それが染色体のrrnC領域へのゲノムに組み込まれるように設計した。それは、図56に示されるように、rrnC(23S rRNA)の上流の191個のヌクレオチド、rrnC rRNA遺伝子の全て及びrrnCの下流の3個のヌクレオチドを効果的に欠失させ、それをスクロースオペロンで置き換えた。

20

【0463】

形質転換体を、0.4%スクロースを含むM9最小塩培地上で成長させ、個々のコロニーを、診断PCRによってスクロースオペロンの存在について試験した。rrnC::cscAKB領域全体を、P1形質導入(Sambrookらの文献、「分子クローニング:実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク(2001))によってBDO宿主株ECKh-432に移入して、ECKh-463(adhE ldhA pflB lpdA::K.p.lpdA322 mdh arcA gltAR163L fimD::E. コリsucCD, P. ギンギバリスsucD, P. ギンギバリス4hbd fimD::M. ボビスsucA, C. クルイベリ4hbd rrnC::cscAKB)を得た。組換え体をスクロース上の成長によって選択し、診断PCRによって検証した。

30

【0464】

ECKh-463を、P. ギンギバリスCat2及びC. ベイジェリンキーAldを含むpZS⁺13で形質転換して、完全BDO経路を得た。細胞を、10g/Lのスクロースが補給されたM9最小培地(6.78g/LのNa₂HPO₄、3.0g/LのKH₂PO₄、0.5g/LのNaCl、1.0g/LのNH₄Cl、1mMのMgSO₄、0.1mMのCaCl₂)にて培養した。0.2mMのIPTGは、開始時から培養物に存在していた。23Gニードルを有するボトルを使用して嫌気性条件を維持した。対照として、スクロースの代わりに10g/Lのグルコースを用いたことを除いて、同じプラスミドを含むECKh-432を同じ培地上で培養した。図57は、48時間の成長後の培養OD600に対して正規化された平均生成物濃度を示す。そのデータは、各菌株の6つ組みの培養物に関するものである。これは、スクロース上のECKh-463からのBDO生成が、スクロース上の親株のそれと類似していることを実証する。

40

【0465】

(実施例XIX)

(BDO産生株の概要)

本実施例では、様々なBDO産生株について記載する。

【0466】

表28は、以上の実施例XII~XVIIIに開示されている様々なBDO産生株の概要を示す。

表28. 様々なBDO産生株の概要

【表 7 6】

菌株 #	宿主株 #	宿主染色体	宿主の説明	プラスミドベース
1		Δ ldhA	<i>E. コリ</i> MG1655の 単一欠損 誘導体	<i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. キンギバリス</i> sucD, <i>P. キンギバリス</i> 4hbd, <i>P.</i> <i>キンギバリス</i> Cat2, <i>C.</i> アセトブチリウム AdhE2
2	AB3	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB	コハク酸産生株； <i>E. コリ</i> MG1655の 誘導体	<i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. キンギバリス</i> sucD, <i>P. キンギバリス</i> 4hbd, <i>P.</i> <i>キンギバリス</i> Cat2, <i>C.</i> アセトブチリウム AdhE2
3	ECKh- 138	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322	ピルビン酸 デヒドロゲナーゼ フラックスを 増大させるための lpdAの向上	<i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. キンギバリス</i> sucD, <i>P. キンギバリス</i> 4hbd, <i>P.</i> <i>キンギバリス</i> Cat2, <i>C.</i> アセトブチリウム AdhE2
4	ECKh- 138	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322		<i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. キンギバリス</i> sucD, <i>P. キンギバリス</i> 4hbd, <i>C.</i>

				アセトブチリウム buk1, C. アセトブチリウム ptb, C. アセトブチリウム AdhE2
5	ECKh-401	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA$	酸化的TCA回路を通じフラックスを方向付けるためのmdh及びarcAの欠失	<i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. キンギバリス</i> sucD, <i>P. キンギバリス</i> 4hbd, <i>P. キンギバリス</i> Cat2, C. アセトブチリウム AdhE2
6	ECKh-401	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA$		<i>M. ボビス</i> sucA, <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. キンギバリス</i> sucD, <i>P. キンギバリス</i> 4hbd, <i>P. キンギバリス</i> Cat2, C. アセトブチリウム AdhE2
7	ECKh-422	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA$ gltAR163L	嫌気性活性の向上のためのクエン酸シンテターゼにおける変異	<i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. キンギバリス</i> sucD, <i>P. キンギバリス</i> 4hbd, <i>P. キンギバリス</i> Cat2, C. アセトブチリウム AdhE2
8	ECKh-422	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA$ gltAR163L		<i>M. ボビス</i> sucA, <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. キンギバリス</i> sucD, <i>P. キンギバリス</i> 4hbd, <i>P. キンギバリス</i> Cat2, C. アセトブチリウム AdhE2
9	ECKh-422	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA$ gltAR163L		<i>M. ボビス</i> sucA, <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. キンギバリス</i> sucD, <i>P. キンギバリス</i> 4hbd, <i>P. キンギバリス</i> Cat2, C. ペイジェリンキーAld
10	ECKh-426	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA$ gltAR163L fimD:: <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. キンギバリス</i> sucD, <i>P. キンギバリス</i> 4hbd	ECKh-422に組み込まれた上流経路のコハク酸分枝	<i>P. キンギバリス</i> Cat2, C. ペイジェリンキーAld
11	ECKh-432	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA$ gltAR163L fimD:: <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. キンギバリス</i> sucD, <i>P. キンギバリス</i> 4hbd fimD:: <i>M. ボビス</i> sucA, <i>C. クレイベリ</i> 4hbd	ECKh-422に組み込まれたコハク酸及びアルファ-ケトグルタル酸上流経路分枝	<i>P. キンギバリス</i> Cat2, C. ペイジェリンキーAld
12	ECKh-432	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA$ gltAR163L fimD:: <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. キンギバリス</i> sucD, <i>P. キンギバリス</i> 4hbd fimD:: <i>M. ボビス</i> sucA, <i>C. クレイベリ</i> 4hbd		<i>C. アセトブチリウム</i> buk1, C. アセトブチリウム ptb, C. ペイジェリンキーAld
13	ECKh-439	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA$ gltAR163L $\Delta ackA$ fimD:: <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. キンギバリス</i> sucD, <i>P. キンギバリス</i> 4hbd fimD:: <i>M. ボビス</i> sucA, <i>C. クレイベリ</i> 4hbd	ECKh-432の酢酸キナーゼ欠失	<i>P. キンギバリス</i> Cat2, C. ペイジェリンキーAld
14	ECKh-453	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA$ gltAR163L $\Delta ackA$ $\Delta ppc::H.i.ppc$ fimD:: <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. キンギバリス</i> sucD, <i>P. キンギバリス</i> 4hbd fimD:: <i>M. ボビス</i> sucA, <i>C. クレイベリ</i> 4hbd	ECKh-432の酢酸キナーゼ欠失及びPPC/PEPCK置換	<i>P. キンギバリス</i> Cat2, C. ペイジェリンキーAld
15	ECKh-456	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA::fnr-pf1B6-K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA$ gltAR163L fimD:: <i>E. コリ</i>	ECKh-432におけるlpdAプロモーターの嫌気性プロモーターとの置換	<i>P. キンギバリス</i> Cat2, C. ペイジェリンキーAld

10

20

30

40

		sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P. ギンギバリス</i> 4hbd fimD:: <i>M. ボビス</i> sucA, <i>C. クレイベリ</i> 4hbd	ECKh-432	
16	ECKh-455	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfIB \Delta lpdA$:: K.p.lpdA322 $\Delta pdhR$:: <i>fnr</i> - <i>pfIB</i> 6 $\Delta mdh \Delta arcA$ <i>gltAR</i> 163L fimD:: <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P. ギンギバリス</i> 4hbd fimD:: <i>M. ボビス</i> sucA, <i>C. クレイベリ</i> 4hbd	ECKh-432における <i>pdhR</i> 及び <i>aceEF</i> プロモーターの嫌気性プロモーターとの置換	<i>P. ギンギバリス</i> Cat2, <i>C. ベイジェリンキー</i> Ald
17	ECKh-459	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfIB \Delta lpdA$:: K.p.lpdA322 $\Delta mdh \Delta arcA$ <i>gltAR</i> 163L fimD:: <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P. ギンギバリス</i> 4hbd fimD:: <i>M. ボビス</i> sucA, <i>C. クレイベリ</i> 4hbd fimD:: <i>C. アセトブチリクム</i> buk1, <i>C. アセトブチリクム</i> ptb	ECKh-432への BK/PTBの組み込み	<i>C. ベイジェリンキー</i> Ald
18	ECKh-459	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfIB \Delta lpdA$:: K.p.lpdA322 $\Delta mdh \Delta arcA$ <i>gltAR</i> 163L fimD:: <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P. ギンギバリス</i> 4hbd fimD:: <i>M. ボビス</i> sucA, <i>C. クレイベリ</i> 4hbd fimD:: <i>C. アセトブチリクム</i> buk1, <i>C. アセトブチリクム</i> ptb		<i>C. ベイジェリンキー</i> Ald, <i>G. サーモグルコシダシウス</i> adh1
19	ECKh-463	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfIB \Delta lpdA$:: K.p.lpdA322 $\Delta mdh \Delta arcA$ <i>gltAR</i> 163L fimD:: <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P. ギンギバリス</i> 4hbd fimD:: <i>M. ボビス</i> sucA, <i>C. クレイベリ</i> 4hbd <i>rrnC</i> :: <i>cscAKB</i>	ECKh-432に挿入された非-PTS スクロース遺伝子	<i>P. ギンギバリス</i> Cat2, <i>C. ベイジェリンキー</i> Ald
20	ECKh-463	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfIB \Delta lpdA$:: K.p.lpdA322 $\Delta mdh \Delta arcA$ <i>gltAR</i> 163L fimD:: <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P. ギンギバリス</i> 4hbd fimD:: <i>M. ボビス</i> sucA, <i>C. クレイベリ</i> 4hbd <i>rrnC</i> :: <i>cscAKB</i>		<i>C. アセトブチリクム</i> buk1, <i>C. アセトブチリクム</i> ptb, <i>C. ベイジェリンキー</i> Ald

10

20

30

【 0 4 6 7 】

表28に概要が示された菌株は、以下の通りである。菌株1：内因性 *ldhA* の欠失を有する *E. コリ* MG1655 の単一欠失誘導体；*E. コリ* sucCD、*P. ギンギバリス* sucD、*P. ギンギバリス* 4hbd、*P. ギンギバリス* Cat2、*C. アセトブチリクム* AdhE2 のプラスミド発現。菌株2：宿主株 AB3、コハク酸産生株、内因性 *adhE* *ldhA* *pfIB* の欠失を有する *E. コリ* MG1655 の誘導体；*E. コリ* sucCD、*P. ギンギバリス* sucD、*P. ギンギバリス* 4hbd、*P. ギンギバリス* Cat2、*C. アセトブチリクム* AdhE2 のプラスミド発現。

【 0 4 6 8 】

菌株3：宿主株 ECKh-138、内因性 *adhE*、*ldhA*、*pfIB* の欠失、内因性 *lpdA* の欠失、及び *lpdA* 座に Glu354Lys 変異を有する *クレブシエラ・ニューモニエ* *lpdA* の染色体挿入；*E. コリ* sucCD、*P. ギンギバリス* sucD、*P. ギンギバリス* 4hbd、*P. ギンギバリス* Cat2、*C. アセトブチリクム* AdhE2 のプラスミド発現；菌株はピルビン酸デヒドロゲナーゼフラックスを増大させるための *lpdA* の向上をもたらす。菌株4：宿主株 ECKh-138、内因性 *adhE*、*ldhA*、*pfIB* 及び *lpdA* の欠失、Glu354Lys 変異を有する *クレブシエラ・ニューモニエ* *lpdA* の染色体挿入；*E. コリ* sucCD、*P. ギンギバリス* sucD、*P. ギンギバリス* 4hbd、*C. アセトブチリクム* buk1、*C. アセトブチリクム* ptb、*C. アセトブチリクム* AdhE2 のプラスミド発現。

【 0 4 6 9 】

菌株5：宿主株 ECKh-401、内因性 *adhE*、*ldhA*、*pfIB* の欠失、内因性 *lpdA* の欠失、及び *lpdA*

40

50

A座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失；E. コリsucCD、P. ギンギバリスsucD、P. ギンギバリス4hbd、P. ギンギバリスCat2、C. アセトブチリクムAdhE2のプラスミド発現；菌株は、酸化TCA回路を通じフラックスへ向かうためのmdh及びarcAにおける欠失を有する。菌株6：宿主株ECKh-401、内因性adhE、ldhA、pfIBの欠失、内因性IpdAの欠失、及びIpdA座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失；M. ボビスsucA、E. コリsucCD、P. ギンギバリスsucD、P. ギンギバリス4hbd、P. ギンギバリスCat2、C. アセトブチリクムAdhE2のプラスミド発現。

【0470】

菌株7：宿主株ECKh-422、内因性adhE、ldhA、pfIBの欠失、内因性IpdAの欠失、及びIpdA座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gl tA Arg163Leu変異体によるgl tAの染色体置換；E. コリsucCD、P. ギンギバリスsucD、P. ギンギバリス4hbd、P. ギンギバリスCat2、C. アセトブチリクムAdhE2のプラスミド発現；菌株は、嫌気性活性を向上させるためのクエン酸シンターゼの変異を有する。菌株8：菌株ECKh-422、内因性adhE、ldhA、pfIBの欠失、内因性IpdAの欠失、及びIpdA座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gl tA Arg163Leu変異体によるgl tAの染色体置換；M. ボビスsucA、E. コリsucCD、P. ギンギバリスsucD、P. ギンギバリス4hbd、P. ギンギバリスCat2、C. アセトブチリクムAdhE2のプラスミド発現。菌株9：宿主株ECKh-422、内因性adhE、ldhA、pfIBの欠失、内因性IpdAの欠失、及びIpdA座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gl tA Arg163Leu変異体によるgl tAの染色体置換；M. ボビスsucA、E. コリsucCD、P. ギンギバリスsucD、P. ギンギバリス4hbd、P. ギンギバリスCat2、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現。

【0471】

菌株10：宿主株ECKh-426、内因性adhE、ldhA、pfIBの欠失、内因性IpdAの欠失、及びIpdA座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gl tA Arg163Leu変異体によるgl tAの染色体置換、fimD座におけるE. コリsucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入；P. ギンギバリスCat2、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現；菌株は、fimD座において菌株ECKh-422に組み込まれた上流経路のコハク酸分枝を有する。菌株11：宿主株ECKh-432、内因性adhE、ldhA、pfIBの欠失、内因性IpdAの欠失、及びIpdA座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gl tA Arg163Leu変異体によるgl tAの染色体置換、fimD座におけるE. コリsucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるM. ボビスsucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入；P. ギンギバリスCat2、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現；菌株は、ECKh-422に組み込まれたコハク酸及びアルファ-ケトグルタル酸上流経路分枝を有する。菌株12：宿主株ECKh-432、内因性adhE、ldhA、pfIBの欠失、内因性IpdAの欠失、及びIpdA座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gl tA Arg163Leu変異体によるgl tAの染色体置換、fimD座におけるE. コリsucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるM. ボビスsucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入；C. アセトブチリクムbuk1、C. アセトブチリクムptb、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現。

【0472】

菌株13：宿主株ECKh-439、内因性adhE、ldhA、pfIBの欠失、内因性IpdAの欠失、及びIpdA座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gl tA Arg163Leu変異体によるgl tAの染色体置換、内因性ackAの欠失、fimD座におけるE. コリsucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるM. ボビスsucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入；P. ギンギバリスCat2、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現；菌株は、菌株ECKh-432において酢酸キナーゼ欠失を有する。菌株14：宿主株ECKh-453、内因性adhE、ldhA、pfIBの欠失、内因性IpdAの欠失

10

20

30

40

50

、及びIpdA座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu変異体によるgltAの染色体置換、内因性ackAの欠失、内因性ppcの欠失、及びppc座におけるヘモフィルス・インフルエンザppckの挿入、fimD座におけるE. コリsucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるM. ボビスsucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入；P. ギンギバリスCat2、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現；菌株は、菌株ECKh-432において酢酸キナーゼ欠失及びPPC/PEPCK置換を有する。

【 0 4 7 3 】

菌株15：宿主株ECKh-456、内因性adhE、ldhA、pfIBの欠失、内因性IpdAの欠失、及びIpdA座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu変異体によるgltAの染色体置換、fimD座におけるE. コリsucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるM. ボビスsucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入、fnr結合部位、pfIB-p6プロモーター及びpfIBのRBSによるIpdAプロモーターの置換；P. ギンギバリスCat2、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現；菌株は、菌株ECKh-432において嫌気性プロモーターによるIpdAプロモーターの置換を有する。菌株16：宿主株ECKh-455、内因性adhE、ldhA、pfIBの欠失、内因性IpdAの欠失、及びIpdA座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu変異体によるgltAの染色体置換、fimD座におけるE. コリsucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるM. ボビスsucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入、fnr結合部位、pfIB-p6プロモーター及びpfIBのRBSによるpdhR及びaceEFプロモーターの置換；P. ギンギバリスCat2、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現；菌株は、ECKh-432において嫌気性プロモーターによるpdhR及びaceEFプロモーターの置換を有する。

【 0 4 7 4 】

菌株17：宿主株ECKh-459、内因性adhE、ldhA、pfIBの欠失、内因性IpdAの欠失、及びIpdA座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu変異体によるgltAの染色体置換、fimD座におけるE. コリsucCD、P. ギンギバリスsucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるM. ボビスsucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入、fimD座におけるC. アセトブチリクムbuk1、C. アセトブチリクムptbの染色体挿入；C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現；菌株はBK/P TBの菌株ECKh-432への組込みを有する。菌株18：宿主株ECKh-459、内因性adhE、ldhA、pfIBの欠失、内因性IpdAの欠失、及びIpdA座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu変異体によるgltAの染色体置換、fimD座におけるE. コリsucCD、P. ギンギバリスsucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるM. ボビスsucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入、fimD座におけるC. アセトブチリクムbuk1、C. アセトブチリクムptbの染色体挿入；C. ベイジェリンキーAld、G. サーマグルコシダシウスadh1のプラスミド発現。

【 0 4 7 5 】

菌株19：宿主株ECKh-463、内因性adhE、ldhA、pfIBの欠失、内因性IpdAの欠失、及びIpdA座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu変異体によるgltAの染色体置換、fimD座におけるE. コリsucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるM. ボビスsucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入、rrnC座における非PTSスクロースオペロン遺伝子スクロースペルメアーゼ(cscB)、D-フルクトキナーゼ(cscK)、スクロースヒドロラーゼ(cscA)及びLacI関連スクロース特異的抑制因子(cscR)の挿入；P. ギンギバリスCat2、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現；菌株は、菌株ECKh-432に挿入された非PTSスクロース遺伝子を有する。菌株20：宿主株ECKh-463、内因性adhE、ldhA、pfIBの欠失、内因性IpdAの欠失、及びIpdA座にGlu354Lys変異を有するクレブシエラ・ニューモニエIpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu変異体によるgltAの染色体置換、fimD座におけるE. コリsucCD、P. ギンギバリスsucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD

座におけるM.ボビスsucA、C.クルイベリ4hbdの染色体挿入、rrnC座における非PTSスクロースオペロンの挿入；C.アセトブチリクムbuk1、C.アセトブチリクムptb、C.ペイジェリンキーAldのプラスミド発現。

【 0 4 7 6 】

表28に示されているものを含み、本明細書に開示されているBDO産生株に加えて、BDOの生成を更に増大させ、且つ/又は望ましくない副産物を減少させる更なる修飾を組み込むことができることが理解される。例えば、BDO産生株、又は表28の菌株は、更なるノックアウトを組み込んで、BDOの生成を更に増大させるか、又は望ましくない副産物を減少させることができる。例示的なノックアウトは、既に記載されている(米国特許公報2009/0047719号参照)。当該ノックアウト株としては、

【化 18】

ADHEr, NADH6; ADHEr, PPCK; ADHEr, SUCD4; ADHEr, ATPS4r;
 ADHEr, FUM; ADHEr, MDH; ADHEr, PFLi, PPCK; ADHEr, PFLi, SUCD4; ADHEr, ACKr,
 NADH6; ADHEr, NADH6, PFLi; ADHEr, ASPT, MDH; ADHEr, NADH6, PPCK; ADHEr,
 PPCK, THD2; ADHEr, ATPS4r, PPCK; ADHEr, MDH, THD2; ADHEr, FUM, PFLi; ADHEr,
 PPCK, SUCD4; ADHEr, GLCpts, PPCK; ADHEr, GLUDy, MDH; ADHEr, GLUDy, PPCK;
 ADHEr, FUM, PPCK; ADHEr, MDH, PPCK; ADHEr, FUM, GLUDy; ADHEr, FUM, HEX1;
 ADHEr, HEX1, PFLi; ADHEr, HEX1, THD2; ADHEr, FRD2, LDH_D, MDH; ADHEr, FRD2,
 LDH_D, ME2; ADHEr, MDH, PGL, THD2; ADHEr, G6PDHy, MDH, THD2; ADHEr, PFLi,
 PPCK, THD2; ADHEr, ACKr, AKGD, ATPS4r; ADHEr, GLCpts, PFLi, PPCK; ADHEr,
 ACKr, ATPS4r, SUCOAS; ADHEr, GLUDy, PFLi, PPCK; ADHEr, ME2, PFLi, SUCD4;
 ADHEr, GLUDy, PFLi, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, LDH_D, SUCD4; ADHEr, FUM, HEX1,
 PFLi; ADHEr, MDH, NADH6, THD2; ADHEr, ATPS4r, MDH, NADH6; ADHEr, ATPS4r,
 FUM, NADH6; ADHEr, ASPT, MDH, NADH6; ADHEr, ASPT, MDH, THD2; ADHEr,
 ATPS4r, GLCpts, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, GLUDy, MDH; ADHEr, ATPS4r, MDH, PPCK;
 ADHEr, ATPS4r, FUM, PPCK; ADHEr, ASPT, GLCpts, MDH; ADHEr, ASPT, GLUDy,
 MDH; ADHEr, ME2, SUCD4, THD2; ADHEr, FUM, PPCK, THD2; ADHEr, MDH, PPCK,
 THD2; ADHEr, GLUDy, MDH, THD2; ADHEr, HEX1, PFLi, THD2; ADHEr, ATPS4r,
 G6PDHy, MDH; ADHEr, ATPS4r, MDH, PGL; ADHEr, ACKr, FRD2, LDH_D; ADHEr,
 ACKr, LDH_D, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, FUM, GLUDy; ADHEr, ATPS4r, FUM, HEX1;
 ADHEr, ATPS4r, MDH, THD2; ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D; ADHEr, ATPS4r, MDH,
 PGDH; ADHEr, GLCpts, PPCK, THD2; ADHEr, GLUDy, PPCK, THD2; ADHEr, FUM,
 HEX1, THD2; ADHEr, ATPS4r, ME2, THD2; ADHEr, FUM, ME2, THD2; ADHEr, GLCpts,
 GLUDy, PPCK; ADHEr, ME2, PGL, THD2; ADHEr, G6PDHy, ME2, THD2; ADHEr,
 ATPS4r, FRD2, LDH_D, ME2; ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D, MDH; ADHEr, ASPT,
 LDH_D, MDH, PFLi; ADHEr, ATPS4r, GLCpts, NADH6, PFLi; ADHEr, ATPS4r, MDH,
 NADH6, PGL; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH, NADH6; ADHEr, ACKr, FUM, GLUDy,
 LDH_D; ADHEr, ACKr, GLUDy, LDH_D, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH,
 THD2; ADHEr, ATPS4r, MDH, PGL, THD2; ADHEr, ASPT, G6PDHy, MDH, PYK; ADHEr,
 ASPT, MDH, PGL, PYK; ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, SUCOAS; ADHEr, ASPT, FUM,
 LDH_D, MDH; ADHEr, ASPT, LDH_D, MALS, MDH; ADHEr, ASPT, ICL, LDH_D, MDH;
 ADHEr, FRD2, GLUDy, LDH_D, PPCK; ADHEr, FRD2, LDH_D, PPCK, THD2; ADHEr,
 ACKr, ATPS4r, LDH_D, SUCD4; ADHEr, ACKr, ACS, PPC, PPCK; ADHEr, GLUDy,
 LDH_D, PPC, PPCK; ADHEr, LDH_D, PPC, PPCK, THD2; ADHEr, ASPT, ATPS4r, GLCpts,
 MDH; ADHEr, G6PDHy, MDH, NADH6, THD2; ADHEr, MDH, NADH6, PGL, THD2;
 ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, GLCpts, MDH; ADHEr, ATPS4r, GLCpts, MDH, PGL; ADHEr,
 ACKr, LDH_D, MDH, SUCD4.

10

20

30

40

が挙げられるが、それらに限定されない。

50

【 0 4 7 7 】

表29は、E. コリなどの宿主生物体のロックアウトされる対応する遺伝子の反応を示す。
表29における略語に対応する代謝物質を表30に示す。

【 0 4 7 8 】

表29. E. コリに生じる特定の反応を防ぐためにロックアウトされる対応する遺伝子
【 表 7 7 】

反応略号	反応化学量論 *	各反応を触媒する 酵素をコードする 遺伝子
ACKr	$[c] : ac + atp \rightleftharpoons actp + adp$	(b3115又はb2296 又は b1849)
ACS	$[c] : ac + atp + coa \rightarrow accoa + amp + ppi$	b4069
ACt6	$ac[p] + h[p] \rightleftharpoons ac[c] + h[c]$	非遺伝子関連
ADHEr	$[c] : etoh + nad \rightleftharpoons acald + h + nadh$	(b0356又はb1478 又は b1241)
	$[c] : acald + coa + nad \rightleftharpoons accoa + h + nadh$	(b1241又はb0351)
AKGD	$[c] : akc + coa + nad \rightarrow co2 + nadh + succoa$	(b0116 及び b0726

		及び b0727)	
ASNS2	[c] : asp-L + atp + nh4 --> amp + asn-L + h + ppi	b3744	
ASPT	[c] : asp-L --> fum + nh4	b4139	
ATPS4r	adp[c] + (4) h[p] + pi[c] <==> atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]	((b3736 及び b3737 及び b3738) 並びに (b3731 及び b3732 及び b3733 及び b3734 及び b3735)) 又は ((b3736 及び b3737 及び b3738) 及び (b3731 及び b3732 及び b3733 及び b3734 及び b3735) 及び b3739))	10
CBMK2	[c] : atp + co2 + nh4 <==> adp + cbp + (2) h	(b0521又はb0323又は b2874)	
EDA	[c] : 2ddg6p --> g3p + pyr	b1850	
ENO	[c] : 2pg <==> h2o + pep	b2779	
FBA	[c] : fdp <==> dhap + g3p	(b2097又はb2925又は b1773)	
FBP	[c] : fdp + h2o --> f6p + pi	(b4232又はb3925)	20
FDH2	for[p] + (2) h[c] + q8[c] --> co2[c] + h[p] + q8h2[c] for[p] + (2) h[c] + mqn8[c] --> co2[c] + h[p] + mql8[c]	((b3892 及び b3893 及び b3894)又は(b1474 及び b1475 及び b1476))	
FRD2	[c] : fum + mql8 --> mqn8 + succ [c] : 2dmmql8 + fum --> 2dmmq8 + succ	(b4151 及び b4152 及び b4153 及び b4154)	
FTHFD	[c] : 10fthf + h2o --> for + h + thf	b1232	
FUM	[c] : fum + h2o <==> mal-L	(b1612又はb4122又は b1611)	
G5SD	[c] : glu5p + h + nadph --> glu5sa + nadp + pi	b0243	30
G6PDHy	[c] : g6p + nadp <==> 6pgl + h + nadph	b1852	
GLCpts	glc-D[p] + pep[c] --> g6p[c] + pyr[c]	((b2417 及び b1101 及び b2415 及び b2416)又は(b1817 及び b1818 及び b1819 及び b2415 及び b2416)又は (b2417 及び b1621 及び b2415 及び b2416))	
GLU5K	[c] : atp + glu-L --> adp + glu5p	b0242	
GLUDy	[c] : glu-L + h2o + nadp <==> akgl + h + nadph + nh4	b1761	40
GLYCL	[c] : gly + nad + thf --> co2 + mlthf + nadh + nh4	(b2904 及び b2903 及び b2905 及び b0116)	
HEX1	[c] : atp + glc-D --> adp + g6p + h	b2388	
ICL	[c] : icit --> glx + succ	b4015	
LDH_D	[c] : lac-D + nad <==> h + nadh + pyr	(b2133又はb1380)	
MALS	[c] : accoa + glx + h2o --> coa + h + mal-L	(b4014又はb2976)	
MDH	[c] : mal-L + nad <==> h + nadh + oaa	b3236	

ME2	[c] : mal-L + nadp --> co2 + nadph + pyr	b2463	
MTHFC	[c] : h2o + methf <==> 10fthf + h	b0529	
NADH12	[c] : h + mqn8 + nadh --> mql8 + nad [c] : h + nadh + q8 --> nad + q8h2 [c] : 2dmmq8 + h + nadh --> 2dmmql8 + nad	b1109	
NADH6	(4) h[c] + nadh[c] + q8[c] --> (3) h[p] + nad[c] + q8h2[c] (4) h[c] + mqn8[c] + nadh[c] --> (3) h[p] + mql8[c] + nad[c] 2dmmq8[c] + (4) h[c] + nadh[c] --> 2dmmql8[c] + (3) h[p] + nad[c]	(b2276 及び b2277 及び b2278 及び b2279 及び b2280 及び b2281 及び b2282 及び b2283 及び b2284 及び b2285 及び b2286 及び b2287 及び b2288)	10
PFK	[c] : atp + f6p --> adp + fdp + h	(b3916又はb1723)	
PFLi	[c] : coa + pyr --> accoa + for	((b0902 及び b0903) 及び b2579)又は(b0902 及び b0903)又は(b0902 及び b3114)又は(b3951 及び b3952))	
PGDH	[c] : 6pgc + nadp --> co2 + nadph + ru5p-D	b2029	
PGI	[c] : g6p <==> f6p	b4025	
PGL	[c] : 6pgl + h2o --> 6pgc + h	b0767	
PGM	[c] : 2pg <==> 3pg	(b3612又はb4395又は b0755)	20
PPC	[c] : co2 + h2o + pep --> h + oaa + pi	b3956	
PPCK	[c] : atp + oaa --> adp + co2 + pep	b3403	
PRO1z	[c] : fad + pro-L --> 1pyr5c + fadh2 + h	b1014	
PYK	[c] : adp + h + pep --> atp + pyr	b1854又はb1676)	
PYRt2	h[p] + pyr[p] <==> h[c] + pyr[c]	非遺伝子関連	
RPE	[c] : ru5p-D <==> xu5p-D	(b4301又はb3386)	
SO4t2	so4[e] <==> so4[p]	(b0241又はb0929 又は b1377又はb2215)	
SUCD4	[c] : q8 + succ --> fum + q8h2	(b0721 及び b0722 及び b0723 及び b0724)	30
SUCOAS	[c] : atp + coa + succ <==> adp + pi + succoa	(b0728 及び b0729)	
SULabc	atp[c] + h2o[c] + so4[p] --> adp[c] + h[c] + pi[c] + so4[c]	((b2422 及び b2425 及び b2424 及び b2423)又は(b0763 及び b0764 及び b0765)又は (b2422 及び b2424 及び b2423 及び b3917))	
TAL	[c] : g3p + s7p <==> e4p + f6p	(b2464又はb0008)	
THD2	(2) h[p] + nadh[c] + nadp[c] --> (2) h[c] + nad[c] + nadph[c]	(b1602 及び b1603)	40
THD5	[c] : nad + nadph --> nadh + nadp	(b3962又は(b1602 及び b1603))	
TPI	[c] : dhap <==> g3p	b3919	

表30. 表29に使用された略号に対応する代謝物質名

【表 7 8】

代謝物質 略号	代謝物質名
10fthf	10-ホルミルテトラヒドロ葉酸
1pyr5c	1-ピロリン-5-カルボン酸
2ddg6p	2-デヒドロ-3-デオキシ-D-グルコン酸 6-リン酸
2dmmq8	2-デメチルメナキノン8
2dmmql8	2-デメチルメナキノール8
2pg	D-グリセリン酸 2-リン酸
3pg	3-ホスホ-D-グリセリン酸
6pgc	6-ホスホ-D-グルコン酸
6pgl	6-ホスホ-D-グルコノ-1,5-ラクトン
ac	酢酸
acald	アセトアルデヒド
accoa	アセチル-CoA
actp	アセチルリン酸
adp	ADP
akg	2-オキソグルタル酸
amp	AMP
asn-L	L-アスパラギン
asp-L	L-アスパラギン酸
atp	ATP
cbp	カルバモイルリン酸
co2	CO2
coa	補酵素A
dhap	ジヒドロキシアセトンリン酸
e4p	D-エリトロース4-リン酸
etoh	エタノール
f6p	D-フルクトース6-リン酸
fad	酸化型フラビンアデニンジヌクレオチド
fadh2	還元型フラビンアデニンジヌクレオチド
fdp	D-フルクトース1,6-ビスリン酸
for	ギ酸
fum	フマル酸
g3p	グリセルアルデヒド3-リン酸
g6p	D-グルコース6-リン酸
glc-D	D-グルコース
glu5p	L-グルタミン酸 5-リン酸
glu5sa	L-グルタミン酸 5-セミアルデヒド
glu-L	L-グルタミン酸
glx	グリオキシル酸
gly	グリシン
h	H+
h2o	H2O
icit	イソクエン酸
lac-D	D-乳酸
mal-L	L-リンゴ酸
methf	5,10-メテニルテトラヒドロ葉酸

10

20

30

40

mlthf	5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸
mql8	メナキノール8
mqn8	メナキノン8
nad	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
nadh	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
nadp	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸
nadph	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸
nh4	アンモニウム
oaa	オキサロ酢酸
pep	ホスホエノールピルビン酸
pi	リン酸
ppi	ジリン酸
pro-L	L-プロリン
pyr	ピルビン酸
q8	ユビキノン-8
q8h2	ユビキノール-8
ru5p-D	D-リブロース5-リン酸
s7p	セドヘプツロース7-リン酸
so4	硫酸
succ	コハク酸
succoa	スクシニル-CoA
thf	5,6,7,8-テトラヒドロ葉酸
xu5p-D	D-キシロース5-リン酸

10

20

【 0 4 7 9 】

(実施例XX)

(BDO生成の例示的経路)

本実施例は、BDO経路酵素としてカルボン酸レダクターゼを使用する、4-ヒドロキシブタナール(4-HBaI)及び/又はBDOを生成する例示的経路を説明する。

【 0 4 8 0 】

BDO生成の例示的経路は、4-ヒドロキシ酪酸を4-ヒドロキシブタナールへ変換するためのNAD⁺又はNADP⁺アリアル-アルデヒドデヒドロゲナーゼ(E.C.:1.2.1.29及び1.2.1.30)、及び4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールへ変換するためのアルコールデヒドロゲナーゼの使用を含む。4-ヒドロキシ酪酸は、図58に示したように、トリカルボン酸回路中間体スクシニル-CoA及び/又はアルファ-ケトグルタル酸から誘導され得る。

30

【 0 4 8 1 】

(アリアル-アルデヒドデヒドロゲナーゼ(又はカルボン酸レダクターゼ)) アリアル-アルデヒドデヒドロゲナーゼ、又は同等のカルボン酸レダクターゼは、ノカルジア・イオウエンシスにおいて認めることができる、カルボン酸レダクターゼは、カルボン酸のそれらの対応するアルデヒドへのマグネシウム、ATP及びNADPH-依存性還元を触媒し(Venkitasubramanianらの文献、J. Biol. Chem. 282:478-485 (2007))、4-ヒドロキシ酪酸の4-ヒドロキシブタナールへの変換を触媒することが可能である。carによりコードされたこの酵素は、クローン化され、且つE.コリにおいて機能性に発現される(Venkitasubramanianらの文献、J. Biol. Chem. 282:478-485 (2007))。npt遺伝子産物の発現は、転写後修飾を介し該酵素の活性を向上した。npt遺伝子は、不活性アポ酵素を活性ハロ酵素に変換する特異的ホスホパントテン酸トランスフェラーゼ(PPTase)をコードしている。この酵素の天然の基質はパニリン酸であり、この酵素は、広く芳香族基質及び脂肪族基質を受け入れる(Venkitasubramanianらの文献、「製薬及びバイオ産業における生触媒」、R.N. Patel編集、第15章、425-440頁、CRC Press LLC、ボカラトン、FL、(2006))。

40

【 0 4 8 2 】

【表 7 9】

遺伝子名	遺伝子識別番号	GenBank 寄託番号	生物体
<i>car</i>	40796035	AAR91681.1	ノカルジア・イオウエンシス (NRRL 5646種)
<i>npt</i>	114848891	ABI83656.1	ノカルジア・イオウエンシス (NRRL 5646種)

【 0 4 8 3 】

10

更なる*car*及び*npt*遺伝子は、配列相同性を基に同定することができる。

【表 8 0】

遺伝子名	遺伝子識別番号	GenBank 寄託番号	生物体
<i>fadD9</i>	121638475	YP_978699.1	マイコバクテリウム・ボビスBCG
<i>BCG_2812c</i>	121638674	YP_978898.1	マイコバクテリウム・ボビスBCG
<i>nfa20150</i>	54023983	YP_118225.1	ノカルジア・ファルシニカ IFM 10152
<i>nfa40540</i>	54026024	YP_120266.1	ノカルジア・ファルシニカ IFM 10152
<i>SGR_6790</i>	182440583	YP_001828302.1	ストレプトマイセス・グリセウス亜種 グリセウスNBRC 13350
<i>SGR_665</i>	182434458	YP_001822177.1	ストレプトマイセス・グリセウス亜種 グリセウスNBRC 13350
<i>MSMEG_2956</i>	YP_887275.1	YP_887275.1	マイコバクテリウム・スメグマチス <i>MC2 155</i>
<i>MSMEG_5739</i>	YP_889972.1	118469671	マイコバクテリウム・スメグマチス <i>MC2 155</i>
<i>MSMEG_2648</i>	YP_886985.1	118471293	マイコバクテリウム・スメグマチス <i>MC2 155</i>
<i>MAP1040c</i>	NP_959974.1	41407138	マイコバクテリウム・アビウム亜種 パラツベルクローシス <i>K-10</i>
<i>MAP2899c</i>	NP_961833.1	41408997	マイコバクテリウム・アビウム亜種 パラツベルクローシス <i>K-10</i>
<i>MMAR_2117</i>	YP_001850422.1	183982131	マイコバクテリウム・マリヌム <i>M</i>
<i>MMAR_2936</i>	YP_001851230.1	183982939	マイコバクテリウム・マリヌム <i>M</i>
<i>MMAR_1916</i>	YP_001850220.1	183981929	マイコバクテリウム・マリヌム <i>M</i>
<i>TpauDRAFT_33060</i>	ZP_04027864.1	227980601	ツカムレラ・ ポーロメタボラ <i>DSM 20162</i>
<i>TpauDRAFT_20920</i>	ZP_04026660.1	ZP_04026660.1	ツカムレラ・ ポーロメタボラ <i>DSM 20162</i>
<i>CPCC7001_1320</i>	ZP_05045132.1	254431429	シアノビウム <i>PCC7001</i>
<i>DDBDRAFT_0187729</i>	XP_636931.1	66806417	ディクチオステリウム・ディスコ デウム <i>AX4</i>

20

30

40

【 0 4 8 4 】

ストレプトマイセス・グリセウスに認められる更なる酵素候補は、*griC*及び*griD*遺伝子によりコードされている。*griC*又は*griD*のいずれかの欠失は、3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸代謝のシャント生成物である、細胞外3-アセチルアミノ-4-ヒドロキシ安息香酸の蓄積につながる(Suzukiらの文献、J. Antibiot. 60(6):380-387 (2007))ので、この酵素は、3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸を3-アミノ-4-ヒドロキシベンズアルデヒドへ変換すると考えられる。*griC*及び*griD*の、ノカルジア・イオウエンシス*npt*に配列が類似した酵

50

素であるSGR_665との同時発現は、有益であり得る。

【表 8 1】

遺伝子名	遺伝子識別番号	GenBank 寄託番号	生物体
<i>griC</i>	182438036	YP_001825755.1	ストレプトマイセス・グリセウス亜種 グリセウス NBRC 13350
<i>griD</i>	182438037	YP_001825756.1	ストレプトマイセス・グリセウス亜種 グリセウス NBRC 13350

10

【 0 4 8 5 】

類似した特徴を持つ酵素であるアルファ-アミノアジピン酸レダクターゼ(AAR, EC 1.2.1.31)は、いくつかの真菌種におけるリジン生合成経路に参与する。この酵素は天然に、アルファ-アミノアジピン酸をアルファ-アミノアジピン酸セミアルデヒドに還元する。そのカルボキシル基は最初に、アデニル酸のATP依存性形成により活性化され、これは次にNAD(P)Hにより還元され、アルデヒド及びAMPを生じる。CARのように、この酵素はマグネシウムを利用し、PPTaseによる活性化を必要とする。AAR及びそれに対応するPPTaseの酵素候補は、サッカロミセス・セレビシアエ(Morrisらの文献、Gene 98:141-145 (1991))、カンジダ・アルビカンス(Guoらの文献、Mol. Genet. Genomics 269:271-279 (2003))、及びシゾサッカロミセス・ボンベ(Fordらの文献、Curr. Genet. 28:131-137 (1995))において認められる。S. ボンベ由来のAARは、E. コリにおいて発現された場合に、著しい活性を示した(Guoらの文献、Yeast 21:1279-1288 (2004))。ペニシリウム・クリソゲナム由来のAARは、代替基質としてS-カルボキシメチル-L-システインを受け入れたが、アジピン酸、L-グルタミン酸又はジアミノピメリン酸とは反応しなかった(Hijarrubiaらの文献、J. Biol. Chem. 278:8250-8256 (2003))。P. クリソゲナムPPTaseをコードしている遺伝子は、今日まで同定されていない。

20

【表 8 2】

遺伝子名	遺伝子識別番号	GenBank 寄託番号	生物体
<i>LYS2</i>	171867	AAA34747.1	サッカロミセス・セレビシアエ
<i>LYS5</i>	1708896	P50113.1	サッカロミセス・セレビシアエ
<i>LYS2</i>	2853226	AAC02241.1	カンジダ・アルビカンス
<i>LYS5</i>	28136195	AAO26020.1	カンジダ・アルビカンス
<i>Lys1p</i>	13124791	P40976.3	シゾサッカロミセス・ボンベ
<i>Lys7p</i>	1723561	Q10474.1	シゾサッカロミセス・ボンベ
<i>Lys2</i>	3282044	CAA74300.1	ペニシリウム・クリソゲナム

30

【 0 4 8 6 】

BDO生成のためのカルボン酸レダクターゼの使用にはいくつかの利点がある。カルボン酸レダクターゼによる4-ヒドロキシ酪酸から4-ヒドロキシブタナールの形成には、アシル-CoA又はアシル-リン酸レダクターゼによる4-ヒドロキシ酪酸の活性型(例えば、4-ヒドロキシブチリル-CoA、4-ヒドロキシブチリル-Pi)からの4-ヒドロキシブタナールの形成に比べ、少なくとも2つの利点がある。第一に、副産物としてのガンマ-ブチロラクトン(GBL)の形成が非常に減少する。4-ヒドロキシ酪酸の活性型は、不活性4-ヒドロキシ酪酸よりもより容易に環化してGBLとなると考えられる。カルボン酸レダクターゼの使用は、遊離の活性4-ヒドロキシ酪酸中間体を経る必要性を無くし、その結果BDO生成に付随する副産物としてのGBLの形成を減少する。第二に、副産物としてのエタノールの形成が大きく減少する。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブタナール又は1,4-ブタンジオールへ変換するために、各々、アルデヒド-又はアルコール-形成4-ヒドロキシブチリル-CoAレダク

40

50

ターゼが使用される場合に、エタノールが変動量で形成されることが多い。これは、全てではないが、ほとんどのアルデヒド-又はアルコール-形成4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼは、4-ヒドロキシブチリル-CoAに加え、アセチル-CoAを基質として受け入れることができるからである。アルデヒド-形成酵素は、例えばアセチル-CoAのアセトアルデヒドへの変換を触媒することが多く、これは引き続き原生又は非原生アルコールデヒドロゲナーゼによりエタノールへ還元される。基質としてアセチル-CoAを受け入れるアルコール-形成4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼは、アセチル-CoAを直接エタノールへ変換するであろう。カルボン酸レダクターゼ酵素は、アルデヒド-又はアルコール-形成アシル-CoAレダクターゼ酵素よりもアセチル-CoAに対する活性がはるかに少ないように見え、従ってそれらのBDO生成への適用は最小のエタノール副産物形成を生じる(下記参照)。

10

【0487】

(実施例XXI)

(カルボン酸レダクターゼ酵素を使用する1,4-ブタンジオールの生合成)

本実施例は、カルボン酸レダクターゼ酵素を使用し1,4-ブタンジオールを生成する微生物体の作製を説明する。

【0488】

図58に記載の1,4-ブタンジオール合成の経路を操作するために、エシェリキア・コリを標的生物体として使用する。E. コリは、1,4-ブタンジオールを生成することが可能である非天然微生物を作製するのに良好な宿主を提供する。E. コリは、遺伝子操作し易く、且つ様々な酸素化条件下で、エタノール、酢酸、ギ酸、乳酸、及びコハク酸などの様々な生成物を効果的に生成することが可能であることがわかっている。

20

【0489】

(4-ヒドロキシ酪酸経路遺伝子の染色体への組み込み：ECKh-432の構築) カルボン酸レダクターゼ酵素を、その構築について実施例XVIIに記載されたECKh-432と命名されたE. コリ株において発現した。この菌株は、fimD座においてE. コリ染色体に組み込まれた、4HBに至るBDO経路の構成成分を含んだ。

【0490】

実施例XVIIに記載のように、上流経路のコハク酸分枝は、赤色相同組換え法(Datsenko及びWannerの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645 (2000))を用いE. コリ染色体に組み込んだ。プロモーター、スクシニル-CoAリガーゼをコードしているE. コリsucCD遺伝子、スクシニル-CoAレダクターゼ(アルデヒド形成)(図58工程A)をコードしているボルフィロモナス・ギンギバリスのsucD遺伝子、及び4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(図58工程C)をコードしているボルフィロモナス・ギンギバリスの4hbd遺伝子、及びターミネーター配列を含むポリシストロン性DNA断片を、pKD3プラスミドのAflIII部位に挿入した。

30

【0491】

実施例XVIIに記載のように、上流経路のアルファ-ケトグルタル酸分枝を相同組換えによって染色体に組み込んだ。この修飾に使用されるプラスミドは、カナマイシン耐性遺伝子、レバンスクラゼをコードしている遺伝子(sacB)及びR6K条件複製起点を含む、pRE118-V2(oriT及びIS配列が欠失されたpRE118(ATCC87693))であった。この組み込みプラスミドは、プロモーター、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ(図58工程B)をコードしているマイコバクテリウム・ボビス由来のsucA遺伝子、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(図58工程C)をコードしているクロストリジウム・クルイベリ4hbd遺伝子及びターミネーターが、目標挿入部位の隣接領域に対して相同性である2つの1.5-kbDNA断片の間に挿入されるポリシストロン性配列をも含んでいた。得られたプラスミドを使用して、E. コリ株を形質転換した。カナマイシンを含むプレート上で組み込み候補を選択した。正確な組み込み部位をPCRによって検証した。染色体から抗生物質マーカーを分離させるために、スクロースを含む培地上での成長について細胞を選択した。最終菌株をPCR及びDNA配列決定によって検証した。

40

【0492】

50

レシピエントE.コリ株は、その構築が実施例XVに記載されたECKh-422(adhE l dhA pf l B l pdA::K.p.lpdA322 mdh arcA gl tAR163L)であった。ECKh-422は、gl tAによりコードされたクエン酸シンターゼのNADH-非感受性に繋がる変異gl tAR163Lを含んでいる。これは、以下に記載の染色体へ組み込まれたクレブシエラ・ニューモニエ由来のl pdA遺伝子のNADH-非感受性型を更に含む。

【0493】

原生l pdAの置換は、実施例XIVに記載のように、クレブシエラ・ニューモニエ由来のNADH-非感受性l pdAにより置換された。得られたベクターは、pRE118-V2と命名した(図34参照)。

【0494】

(カルボン酸レダクターゼ及びPPTaseのクローン化及び発現) 1,4-ブタンジオールを生成するよう操作されたE.コリ株を作製するために、周知の分子生物学技術(例えば、Sambrookの文献、前掲、2001; Ausubelの文献、前掲、1999参照)を使用し、カルボン酸レダクターゼ及びホスホパンテテイントランスフェラーゼをコードしている核酸をE.コリにおいて発現した。特に、car遺伝子(AAR91681.1)及びnpt遺伝子(ABI83656.1)を、PA1/lacOプロモーター下でpZS*13ベクター(Expressys、リュルツハイム、ドイツ)にクローン化した。car遺伝子(GNM_720)は、ノカルジアゲノムDNAからのPCRによりクローン化した。その核酸配列及びタンパク質配列は、それぞれ図59A及び59Bに示す。

【0495】

npt遺伝子(GNM_721)のコドン最適化型を、GeneArt(レーゲンスブルグ、ドイツ)により合成した。その核酸配列及びタンパク質配列は、それぞれ図60A及び60Bに示す。GNM_720及びGNM_721のpZS*13へのクローン化から得られるベクターは、図61に示す。

【0496】

プラスミドをECKh-432へ形質転換し、1,4-ブタンジオール生成に必要なタンパク質及び酵素を発現した。GNM_720のみ及びGNM_721のみを含むプラスミドの改変型も構築した。

【0497】

(カルボン酸レダクターゼを使用する1,4-BDO生成の実証) 1,4-ブタンジオール経路の機能的発現をE.コリ全細胞培養を用い実証した。GNM_720及びGNM_721の両方を含むpZS*13プラスミドで形質転換されたE.コリECKh-432の単独コロニーを、適宜抗生物質を含有するLB培地5mLに接種した。同様に、GNM_720及びGNM_721のいずれかを含むpZS*13プラスミドで形質転換されたE.コリECKh-432の単独コロニーを、適宜抗生物質を含有するLB培地の更なる5mLアリコートに接種した。微好気性培養物10mLを、第一の培養物1%と共に適宜抗生物質を含む新鮮な最小インピボ変換培地(下記参照)の接種により開始した。

【0498】

最小インピボ変換培地の調製(1000mLについて)は下記である：

【表83】

	最終濃度
1M MOPS/KOH 緩衝液	40 mM
グルコース(40%)	1%
10XM9 塩溶液	1X
MgSO ₄ (1 M)	1 mM
微量無機物(×1000)	1X
1M NaHCO ₃	10 mM

【0499】

最初に蓋付き嫌気性ボトルに5分間にわたって窒素を流し、次いで接種後に18Gニードルで隔壁に穴をあけることによって微好気性条件を確立した。成長時にニードルをボトル内に維持して、少量の空気をボトルに導入させた。培養物が中対数成長期に達すると、0.2mMのIPTGを用いてタンパク質発現を誘導した。この時点をも、時間=0時と見なす。培養物上澄みを、前記及びWO2008115840に記載のように、BDO、4HB、及び他の副産物について分析

10

20

30

40

50

した(表31参照)。

表31. 様々な菌株におけるBDO、4-HB及び他の生成物の生成

【表 8 4】

菌株	pZS*135	mM								
		OD600	OD600	PA	SA	LA	4HB	BDO	GBL	EtOH _{enz}
ECKh-432	720	0.420	2.221	6.36	0.00	0.10	7.71	3.03	0.07	>LLOQ
ECKh-432	721	0.323	2.574	1.69	0.00	0.00	12.60	0.00	0.00	>LLOQ
ECKh-432	720/721	0.378	2.469	1.70	0.00	0.01	4.23	9.16	0.24	1.52

10

PA = ピルビン酸、SA = コハク酸、LA = 乳酸、4HB = 4-ヒドロキシ酪酸、BDO = 1,4-ブタンジオール、GBL = ガンマ-ブチロラクトン、EtOH = エタノール、LLOQ = 定量下限

【0500】

これらの結果は、ECKh-432におけるBDO形成には、カルボン酸レダクターゼ遺伝子GNM_720が必要であること、及びその有効性は、PPTase、GNM_721との同時発現により増加することを実証している。GNM_720単独又はGNM_721との組合せで発現する菌株において、GBL及びエタノールは、BDOよりもはるかに少ない量で生成された。

【0501】

(カルボン酸レダクターゼを利用するBDOへの追加経路) カルボン酸レダクターゼは、コハク酸、スクシニル-CoA、及びアルファ-ケトグルタル酸のTCA回路代謝産物から1,4-ブタンジオールへの多くの経路の構成成分として機能できると予想される。これらの経路のいくつかを図62に示している。全ての経路は、炭素源としてグルコースを仮定すると、1mol/molよりも大きい等しい理論BDO収量をもたらす得る。同様の高い理論収量を、とりわけスクロース、キシロース、アラビノース、合成ガスを含む追加の基質から得ることができる。図62の工程C及びEを触媒するのに十分な内因性アルコールデヒドロゲナーゼ活性が存在する場合、カルボン酸レダクターゼ単独又はPPTaseとの組合せの発現(すなわち、図62の工程F及びDを触媒するため)は、コハク酸からの1,4-ブタンジオール生成に十分であることが予想される。図62の工程AからZの候補酵素は、セクションXXIIIに記載されている。

20

【0502】

30

(実施例XXII)

(カルボン酸レダクターゼを利用するブトレシンへの経路)

本実施例は、カルボン酸レダクターゼを利用する例示的ブトレシン経路を説明する。

【0503】

1,4-ジアミノブタン又はブタンジアミンとしても知られているブトレシンは、式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ の有機化学化合物である。これはアジピン酸と反応し、商標名Stanyl(商標)でDSM(ヘルレン、オランダ)により市販されている、ポリアミドナイロン-4,6を生じることができる。ブトレシンは、例えば、生存している及び死亡した生物体におけるアミノ酸の自然な分解により自然に生成される。原生オルニチン生合成機構並びにオルニチンデカルボキシラーゼを過剰発現することにより、ブトレシンを生成するようE.コリが操作されている(Qianらの文献、Biotechnol. Bioeng. 104(4):651-662 (2009))。

40

【0504】

図63は、コハク酸、スクシニル-CoA、又はアルファ-ケトグルタル酸からのブトレシンの生成に繋がり、且つカルボン酸レダクターゼを利用する、いくつかの更なる生合成経路を示している。これらの経路は、アシル-CoAレダクターゼにより4-アミノブタナールへ還元される4-アミノブチリル-CoAなどの4-アミノ酪酸の活性型の形成を必要としないが、そのラクタムである2-ピロリジノンへ容易に環化することができることに留意されたい(Ohugiraらの文献、J. Biol. Chem. 256:7642-7651 (1981))。全ての経路は、炭素源としてグルコースを仮定すると、1mol/molよりも大きい等しい理論的ブトレシン収量をもたらす得る。同様の高い理論収量を、とりわけスクロース、キシロース、アラビノース、合成ガ

50

スを含む追加の基質から得ることができる。図63の工程AからUの候補酵素は、実施例XXII Iに記載されている。

【0505】

(実施例XXIII)

(C4化合物生成の例示的酵素)

本実施例は、1,4-ブタンジオール、4-ヒドロキシブタナール及びブトレシンなどのC4化合物の生成のための例示的酵素を説明する。

【0506】

(酵素クラス) 図58、62及び63に記された全ての転換は、表32に示された転換の全般的範疇に収まる。本実施例は、各範疇の多くの生化学的に特徴付けられた遺伝子を説明する。クローン化及び発現された場合に図58、62及び63の好適な転換を触媒するよう適用され得る遺伝子が、具体的に列記されている。各標示の最初の3つの数字は、基質特異性と無関係の転換の一般的種類を示す最初の3つの酵素委員会(Enzyme Commission)番号に対応している。

表 32. 図58、62及び63に示された酵素転換のクラス

【表 8 5】

表示	機能
1.1.1.a	オキシドレダクターゼ(オキソからアルコール)
1.1.1.c	オキシドレダクターゼ(2工程、アシル-CoAからアルコール)
1.2.1.b	オキシドレダクターゼ(アシル-CoAからアルデヒド)
1.2.1.c	オキシドレダクターゼ(2-オキソ酸からアシル-CoA、脱炭酸)
1.2.1.d	オキシドレダクターゼ(ホスホン酸レダクターゼ)
1.2.1.e	酸レダクターゼ
1.4.1.a	オキシドレダクターゼ(アミノ化)
2.3.1.a	アシルトランスフェラーゼ(リン酸基のCoAへの転移)
2.6.1.a	アミノトランスフェラーゼ
2.7.2.a	ホスホトランスフェラーゼ(カルボキシ受容体)
2.8.3.a	CoAトランスフェラーゼ
3.1.2.a	CoAヒドロラーゼ
4.1.1.a	カルボキシ-リアーゼ
6.2.1.a	CoAシンテターゼ

【0507】

(1.1.1.a オキシドレダクターゼ(オキソからアルコール))

(アルデヒドからアルコール) 図58、62及び63に記載された3つの転換は、アルデヒドからアルコールへの変換に関与する。これらは、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(図58及び62の工程C)、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(図58及び62の工程E)、及び5-ヒドロキシ-2-ペンタン酸(図62の工程Y)である。アルデヒドからアルコールへの変換を触媒する酵素、すなわちアルコールデヒドロゲナーゼ又は同等にアルデヒドレダクターゼをコードしている例示的遺伝子は、C2-C14の中鎖アルコールデヒドロゲナーゼをコードしているalrA(Taniらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 66:5231-5235 (2000))、サッカロミセス・セレビシア由来のADH2(Atsumiらの文献、Nature 451:86-89 (2008))、C(3)より長い分子に適したE. コリ由来のyqhD(Sulzenbacherらの文献、J. Mol. Biol. 342:489-502 (2004))、及びブチリルアルデヒドをブタノールへ変換するC. アセトブチリウム由来のb dh I及びbdh II(Walterらの文献、J. Bacteriol. 174:7149-7158 (1992))を含む。各例示的遺伝子産物のタンパク質配列は、下記GenBank寄託番号を使用し認めることができる：

【表 8 6】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>alrA</i>	BAB12273.1	9967138	アシネトバクター種M-1株
<i>ADH2</i>	NP_014032.1	6323961	サッカロミセス・セレビシアエ
<i>yqhD</i>	NP_417484.1	16130909	エシェリキア・コリ
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	15896543	クロストリジウム・アセトブチリクム
<i>bdh II</i>	NP_349891.1	15896542	クロストリジウム・アセトブチリクム

【 0 5 0 8 】

10

4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性を示す酵素(EC 1.1.1.61)も、この範疇に入る。当該酵素は、ラルストニア・ユートロファ(Bravoらの文献、J. Forensic Sci. 49:379-387 (2004))、クロストリジウム・クルイベリ(Wolffらの文献、Protein Expr. Purif. 6:206-212 (1995))、及びアラビドプシス・サリアナ(Breitkreuzらの文献、J. Biol. Chem. 278:41552-41556 (2003))において特徴付けられている。

【表 8 7】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>4hbd</i>	YP_726053.1	113867564	ラルストニア・ユートロファH16
<i>4hbd</i>	EDK35022.1	146348486	クロストリジウム・クルイベリDSM 555
<i>4hbd</i>	Q94B07	75249805	アラビドプシス・サリアナ

20

【 0 5 0 9 】

ゲオバシルス・サーモグルコシダシウスM10EXG由来の*adh1*遺伝子(Jeonらの文献、J. Biotechnol. 135:127-133 (2008))も、4-ヒドロキシブタナール及びブタナールの両方に対し高い活性を示すことが記載されている(前記参照)。従ってこの酵素は、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ活性を示す。

【表 8 8】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>adh1</i>	AAR91477.1	40795502	ゲオバシルス・サーモグルコシダシウス M10EXG

30

【 0 5 1 0 】

別の例示的酵素は、3-ヒドロキシイソ酪酸からメチルマロン酸セミアルデヒドへの可逆的酸化を触媒する3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼである。この酵素は、バリン、ロイシン及びイソロイシン分解に関与し、且つ細菌、真核生物、及び哺乳動物において同定されている。サーマス・サーモフィルスHB8由来のP84067によりコードされた酵素が構造的に特徴付けられている(Lokanathらの文献、J. Mol. Biol. 352:905-17 (2005))。同位体標識された基質を用いて、ヒト3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼの可逆性が実証された(Manningらの文献、Biochem. J. 231:481-484 (1985))。この酵素をコードしている更なる遺伝子は、ホモ・サピエンス(Hawesらの文献、Methods Enzymol. 324:218-228 (2000))及びオリクトラグス・クニクルス(Chowdhuryらの文献、Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:2043-2047 (1996) ; Hawesらの文献、Methods Enzymol. 324:218-228 (2000))の3hidh、シュードモナス・アエルギノサの*mmsb*、並びにシュードモナス・プチダの*dhat*(Aberhartらの文献、J. Chem. Soc. [Perkin 1] 6:1404-1406 (1979) ; Chowdhuryらの文献、Biosci. Biotechnol. Biochem. 67:438-441 (2003) ; Chowdhuryらの文献、Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:2043-2047 (1996))がある。

40

【表 8 9】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>P84067</i>	P84067	75345323	サーマス・サーモフィルス
<i>mmsb</i>	P28811.1	127211	シュードモナス・アエルギノサ
<i>dhat</i>	Q59477.1	2842618	シュードモナス・プチダ
<i>3hidh</i>	P31937.2	12643395	ホモ・サピエンス
<i>3hidh</i>	P32185.1	416872	オリクトラグス・クニクルス

【0511】

10

いくつかの3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ酵素も、マロン酸セミアルデヒドを3-ヒドロキシプロピオン酸(3-HP)に変換することが示されている。この活性を示す3つの遺伝子候補は、シュードモナス・アエルギノサPA01(62)由来の*mmsB*、シュードモナス・プチダKT2440由来の*mmsB*(Liaoらの米国特許公報第2005/0221466号)、及びシュードモナス・プチダE23由来の*mmsB*(Chowdhuryらの文献、Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:2043-2047 (1996))がある。アルカリゲネス・ファエカリスM3Aにおいて3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性を持つ酵素も同定されている(Gokamらの米国特許第7,393,676号; Liaoらの米国特許公報第2005/0221466号)。ロドバクター・スパエロイデスを含む他の生物体由来の追加の遺伝子候補が、配列類似性により推定され得る。

【表 9 0】

20

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>mmsB</i>	AAA25892.1	151363	シュードモナス・アエルギノサ
<i>mmsB</i>	NP_252259.1	15598765	シュードモナス・アエルギノサPA01
<i>mmsB</i>	NP_746775.1	26991350	シュードモナス・プチダKT2440
<i>mmsB</i>	JC7926	60729613	シュードモナス・プチダE23
<i>orfB1</i>	AAL26884	16588720	ロドバクター・スパエロイデス

【0512】

30

マロン酸セミアルデヒドの3-HPへの変換は、2つの他の酵素NADH依存性3-ヒドロキシプロピオン酸デヒドロゲナーゼ及びNADPH依存性マロン酸セミアルデヒドレダクターゼによっても達成され得る。NADH依存性3-ヒドロキシプロピオン酸デヒドロゲナーゼは、細菌及び植物におけるプロピオン酸からのベータ-アラニン生合成経路に関与すると考えられる(Rathinasabapathiの文献、J. Plant Pathol. 159:671-674 (2002); Stadtmanの文献、J. Am. Chem. Soc. 77:5765-5766 (1955))。この酵素は、今日までいかなる生物体の遺伝子とも関連されていない。NADPH依存性マロン酸セミアルデヒドレダクターゼは、独立栄養のCO₂-固定菌において、逆反応を触媒する。この酵素活性はメタロスファエラ・セデュラにおいて検出されているが、遺伝子の同定は不明である(Alberらの文献、J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006))。

【0513】

40

(1.1.1.c オキシドレダクターゼ(2工程、アシル-CoAからアルコール))

図62の工程S及びWは、それぞれ、4-ヒドロキシ酪酸及び1,4-ブタンジオールを形成することができる二機能性レダクターゼ酵素を示している。アシル-CoAをアルコールへ変換する例示的2工程オキシドレダクターゼは、アセチル-CoAなどの基質をエタノールへ転換する酵素(例えば、E. コリ由来の*adhE*(Kesslerらの文献、FEBS. Lett. 281:59-63 (1991))、及びブチリル-CoAをブタノールへ転換する酵素(例えば、C. アセトブチリウム由来の*adhE2*(Fontaineらの文献、J. Bacteriol. 184:821-830 (2002)))を含む。C. アセトブチリウム*adhE2*遺伝子は、4-ヒドロキシブチリル-CoAを1,4-ブタンジオールへ変換することが示された(前記参照)。アセチル-CoAのエタノールへの還元に加え、ロイコノストク・メセンテロイデスにおいて*adhE*によりコードされた酵素は、分枝鎖化合物イソブチルアルデヒドをイ

50

ソブチリル-CoAに酸化することが示されている(Kazahayaらの文献、J., Gen. Appl. Microbiol. 18:43-55 (1972) ; Kooらの文献、Biotechnol. Lett. 27:505-510 (2005))。

【表 9 1】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>adhE</i>	NP_415757.1	16129202	エシェリキア・コリ
<i>adhE2</i>	AAK09379.1	12958626	クロストリジウム・アセトブチリウム
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	ロイコノストク・メセンテロイデス

【 0 5 1 4 】

10

別の例示的酵素は、マロニル-CoAを3-HPに変換することができる。この活性を持つNADPH依存性酵素は、クロロフレクスウス・アウランチアクスにおいて特徴付けられ、ここでこれは3-ヒドロキシプロピオン酸回路に参与している(Huglerらの文献、J. Bacteriol. 184:2404-2410 (2002) ; Strauss及びFuchsの文献、Eur. J. Biochem. 215:633-643 (1993))。この酵素は、質量300kDaであり、高度の基質特異性があり、且つ他の既知のオキシドレダクターゼとほとんど配列類似性を示さない(Huglerらの文献、J. Bacteriol. 184:2404-2410 (2002))。他の生物体の酵素は、この特異的反応を触媒することを示さなかったが；しかし、他の生物体が類似の経路を有し得ることのバイオインフォマティック的証拠が存在する(Klattらの文献、Environ. Microbiol. 9:2067-2078 (2007))。ロセイフレクスウス・カステンホルジー、エリスロバクター種NAP1及び海洋性ガンマプロテオバクテリアHTCC2080を含む他の生物体における酵素候補が、配列類似性により推定され得る。

20

【表 9 2】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>mcr</i>	AAS20429.1	42561982	クロロフレクスウス・アウランチアクス
<i>Rcas_2929</i>	YP_001433009.1	156742880	ロセイフレクスウス・カステンホルジー
<i>NAP1_02720</i>	ZP_01039179.1	85708113	エリスロバクター種NAP1
<i>MGP2080_00535</i>	ZP_01626393.1	119504313	海洋性ガンマ プロテオバクテリアHTCC2080

30

【 0 5 1 5 】

長鎖アシル-CoA分子は、アルコール-形成脂肪酸アシル-CoAレダクターゼをコードしているホホバ(シモンドシア・キネンシス)FARなどの酵素により還元され得る。E. コリにおけるその過剰発現は、FAR活性及び脂肪族アルコールの蓄積を生じる(Metzらの文献、Plant Physiol. 122:635-644 2000))。

【表 9 3】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>FAR</i>	AAD38039.1	5020215	シモンドシア・キネンシス

40

【 0 5 1 6 】

(1.2.1.b オキシドレダクターゼ(アシル-CoAからアルデヒド))

図58、62及び63の工程Aは、アルデヒド形成スクシニル-CoAレダクターゼによるスクシニル-CoAのコハク酸セミアルデヒドへの変換に参与している。図62の工程Qは、アルデヒド-形成4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼによる4-ヒドロキシブチリル-CoAの4-ヒドロキシブタナールへの変換を示している。いくつかのアシル-CoAデヒドロゲナーゼは、アシル-CoAをその対応するアルデヒドへ還元することが可能である。そのような酵素をコードしている例示的遺伝子は、脂肪酸アシル-CoAレダクターゼをコードしているアシネトバクター・カルコアセチカス*acr1*(Reiser及びSomervilleの文献、J. Bacteriol. 179:296

50

9-2975 (1997))、アシネトバクター種M-1脂肪酸アシル-CoAレダクターゼ(Ishigeらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195 (2002))、及びクロストリジウム・クルイベリのsucD遺伝子によりコードされたCoA-及びNADP-依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(Sohling及びGottschalkの文献、J. Bacteriol. 178:871-80 (1996) ; Sohling及びGottschalkの文献、J. Bacteriol. 178:871-880 (1996))を含む。P.ギンギバリスのsucDは、別のアルデヒド-形成スクシニル-CoAレダクターゼである(Takahashiらの文献、J. Bacteriol. 182:4704-4710 (2000))。bphGによりコードされたシュードモナス種においてアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼをアシル化する酵素は、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド及びホルムアルデヒドを酸化及びアシル化することが実証されているので、更に別の酵素である(Powlowskiらの文献、J. Bacteriol. 175:377-385 (1993))。アセチル-CoAのエタノールへの還元に加え、ロイコノストク・メセンテロイデスのadhEによりコードされた酵素は、分枝鎖化合物イソブチルアルデヒドのイソブチリル-CoAへの酸化を示す(Kooらの文献、Biotechnol. Lett. 27:505-510 (2005))。ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼは、クロストリジウム・サッカロペルブチルアセトニウムなどの溶媒生成性(solventogenic)生物体において、ブチリル-CoAをブチルアルデヒドへ変換する、同様の反応を触媒する(Kosakaらの文献、Biosci. Biotechnol. Biochem. 71:58-68 (2007))。

10

【表 9 4】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>acr1</i>	YP_047869.1	50086359	アシネトバクター・カルコアセチカス
<i>acr1</i>	AAC45217	1684886	アシネトバクター・バイリイ
<i>acr1</i>	BAB85476.1	18857901	アシネトバクター種M-1株
<i>sucD</i>	P38947.1	730847	クロストリジウム・クルイベリ
<i>sucD</i>	NP_904963.1	34540484	ポルフィロモナス・ギンギバリス
<i>bphG</i>	BAA03892.1	425213	シュードモナス種
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	ロイコノストク・メセンテロイデス
<i>bld</i>	AAP42563.1	31075383	クロストリジウム・サッカロペルブチルアセトニウム

20

30

【 0 5 1 7 】

アシル-CoAをその対応するアルデヒドへ変換する追加の酵素型は、マロニル-CoAをマロン酸セミアルデヒドへ転換するマロニル-CoAレダクターゼである。マロニル-CoAレダクターゼは、好熱好酸性古細菌における3-ヒドロキシプロピオン酸回路を介した独立栄養炭素固定の重要な酵素である(Bergらの文献、Science 318:1782-1786 (2007) ; Thauerの文献、Science 318:1732-1733 (2007))。この酵素は、補因子としてNADPHを利用し、メタロスファエラ(Metallosphaera)種及びスルフォロブス(Sulfolobus)種において特徴付けられている(Alberらの文献、J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006) ; Huglerらの文献、J. Bacteriol. 184:2404-2410 (2002))。この酵素は、メタロスファエラ・セデュラのMsed_0709によりコードされている(Alberらの文献、J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006) ; Bergらの文献、Science 318:1782-1786 (2007))。スルホロブス・トコダイ由来のマロニル-CoAレダクターゼをコードしている遺伝子をクローン化し、且つE.コリにおいて異種発現した(Alberらの文献、J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006))。これらの酵素のアルデヒドデヒ

40

50

ドロゲナーゼの機能性は、クロロフレクスウス・アウランチアクス由来の二機能性デヒドロゲナーゼに類似しているが、これらに配列類似性はほとんどない。両方のマロニル-CoAレダクターゼ酵素候補は、アスパラギン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼに対する高い配列類似性を有し、この酵素は、還元、及び同時のアスパルチル-4-リン酸のアスパラギン酸セミアルデヒドへの脱リン酸化を触媒する。追加の遺伝子候補は、スルホロブス・ソルファタリクス及びスルホロブス・アシドカルダリウスを含む他の生物体におけるタンパク質への配列相同性により認められる。CoA-アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼの更に別の候補は、クロストリジウム・ベイジェリンキー由来のald遺伝子である(Tothらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 65:4973-4980 (1999))。この酵素は、アセチル-CoA及びブチリル-CoAをそれらの対応するアルデヒドへ還元することが報告されている。この遺伝子は、サルモネラ・ティフィムリウム及びE. コリのアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードしているeutEに非常に類似している(Tothらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 65:4973-4980 (1999))。

10

20

30

40

50

【表 9 5】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	メタロスファエラ・セデュラ
<i>mcr</i>	NP_378167.1	15922498	スルホロブス・トコダイ
<i>asd-2</i>	NP_343563.1	15898958	スルホロブス・ソルファタリクス
<i>Saci_2370</i>	YP_256941.1	70608071	スルホロブス・アシドカルダリウス
<i>Ald</i>	AAT66436	49473535	クロストリジウム・ベイジェリンキー
<i>eutE</i>	AAA80209	687645	サルモネラ・ティフィムリウム
<i>eutE</i>	P77445	2498347	エシェリキア・コリ

【0518】

(1.2.1.c オキシドレダクターゼ(2-オキソ酸からアシル-CoA、脱炭酸))

図62の工程AAは、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸の4-ヒドロキシブチリル-CoAへの変換を示している。この転換の候補酵素は、1)分枝鎖2-ケト酸デヒドロゲナーゼ、2)アルファ-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ、及び3)ピルビン酸デヒドロゲナーゼ多酵素複合体(PDHC)を含む。これらの酵素は、2-ケト酸のアシル化酸化的脱炭酸を生じる一連の部分反応を触媒する多酵素複合体である。2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体の各々は中間代謝の重要な位置を占め、酵素活性は典型的には厳密に調節される(Friesらの文献、Biochemistry 42:6996-7002 (2003))。これらの酵素は複合体を共有するが、共通の構造は、アルファ-ケト酸デカルボキシラーゼ(E1)、ジヒドロリポアミドアシルトランスフェラーゼ(E2)及びジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ(E3)の3つの触媒構成成分の多コピーを構成する。このE3構成成分は、生物体の全ての2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体の間で共有されるが、E1及びE2構成成分は、異なる遺伝子によりコードされる。酵素構成成分は、複合体において多くのコピーで存在し、基質チャネリングを介し反応の指定された配列を触媒するために複数の補因子を利用する。これらのデヒドロゲナーゼ複合体の全体のサイズは非常に大きく、分子質量は400万~1000万Daである(すなわち、リボソームより大きい)。

【0519】

2-ケト酸デヒドロゲナーゼ系統における酵素の活性は、E. コリにおける嫌気性条件下では、通常低いか又は限定されている。NADH(又はNADPH)生成の増加は酸化還元不均衡に繋

がり、NADHそれ自身、酵素機能に対し阻害因子として働く。操作の研究は、E. コリピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の嫌気性活性を増大した(Kimらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007) ; Kimらの文献、J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008) ; Zhouらの文献、Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008))。例えばNADHの阻害作用は、E3成分におけるH322Y変異の操作により克服することができる(Kimらの文献、J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008))。個別の構成成分の構造研究及びそれらが複合体において一緒に作用する様式は、この系統の酵素の触媒機構及び配置の洞察をもたらす(Aevarssonらの文献、Nat. Struct. Biol. 6:785-792 (1999) ; Zhouらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14802-14807 (2001))。デヒドロゲナーゼ複合体の基質特異性は、異なる生物体で変動するが、一般に分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼは最も広範な基質範囲を有する。

10

【 0 5 2 0 】

アルファ-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ(AKGD)は、アルファ-ケトグルタル酸をスクシニル-CoAに変換し、TCA回路を介した代謝フラックス制御の主要部位である(Hansford, R. G.の文献、Curr. Top. Bioenerg. 10:217-278 (1980))。E. コリにおいて遺伝子*sucA*、*sucB*及び*lpd*によりコードされたAKGD遺伝子発現は、嫌気性条件下且つグルコース上での成長時に下方制御される(Parkらの文献、Mol. Microbiol. 15:473-482 (1995))。AKGDの基質範囲は狭いが、E2構成成分の触媒的コアの構造研究は、基質特異性に寄与する特異的残基を特定する(Knappらの文献、J. Mol. Biol. 280:655-668 (1998))。*odhA*(E1及びE2)並びに*pdhD*(E3、共有されたドメイン)によりコードされたバシルス・スプチリスAKGDは、転写レベルで調節され、且つ炭素給源及び生物体の成長相に左右される(Resnekovらの文献、Mol. Gen. Genet. 234:285-296 (1992))。酵母において、E3構成成分をコードしているLPD1遺伝子は、グルコースにより転写レベルで調節される(Roy及びDawesの文献、J. Gen. Microbiol. 133:925-933 (1987))。KGD1によりコードされたE1構成成分も、グルコースにより調節され、HAP2及びHAP3の生成物により活性化される(Repetto及びTzagoloffの文献、Mol. Cell Biol. 9:2695-2705 (1989))。生成物NADH及びスクシニル-CoAにより阻害されるAKGD酵素複合体は、哺乳動物系においてよく研究されており、その損なわれた機能は、いくつかの神経系疾患に結びつけられている(Tretter及びdam-Viziの文献、Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 360:2335-2345 (2005))。

20

【 表 9 6 】

30

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>sucA</i>	NP_415254.1	16128701	エシェリキア・コリ K12 株 MG1655亜株
<i>sucB</i>	NP_415255.1	16128702	エシェリキア・コリ K12 株 MG1655亜株
<i>lpd</i>	NP_414658.1	16128109	エシェリキア・コリ K12 株 MG1655亜株
<i>odhA</i>	P23129.2	51704265	バシルス・スプチリス
<i>odhB</i>	P16263.1	129041	バシルス・スプチリス
<i>pdhD</i>	P21880.1	118672	バシルス・スプチリス
<i>KGD1</i>	NP_012141.1	6322066	サッカロミセス・セレビシアエ
<i>KGD2</i>	NP_010432.1	6320352	サッカロミセス・セレビシアエ
<i>LPD1</i>	NP_116635.1	14318501	サッカロミセス・セレビシアエ

40

【 0 5 2 1 】

分枝鎖2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体(BCKAD)は、2-オキソイソ吉草酸デヒドロゲナーゼとしても知られており、これは分枝鎖アミノ酸分解経路に関与し、バリン、ロイシン及びイソロイシンの2-ケト酸誘導体をそれらのアシル-CoA誘導体とCO₂に変換する。この複合体は、バシルス・スプチリス(Wangらの文献、Eur. J. Biochem. 213:1091-1099 (199

50

3))、ラツス・ノルベギクス(Nambaらの文献、J. Biol. Chem. 244:4437-4447 (1969))及びシュードモナス・プチダ(Sokatchの文献、J. Bacteriol. 148:647-652 (1981))を含む多くの生物体において研究されている。バシルス・スプチリスにおいて、この酵素は、遺伝子 *pdhD* (E3構成成分)、*bfmBB* (E2構成成分)、*bfmBAA* 及び *bfmBAB* (E1構成成分) によりコードされている(Wangらの文献、Eur. J. Biochem. 213:1091-1099 (1993))。哺乳動物において、本複合体は、特異的ホスファターゼ及びプロテインキナーゼによるリン酸化により調節される。本複合体は、ラットの肝細胞において研究され(Chiccoらの文献、J. Biol. Chem. 269:19427-19434 (1994))、遺伝子 *Bckdha* (E1)、*Bckdhb* (E1)、*Dbt* (E2)、及び *Dld* (E3) によりコードされている。シュードモナス・プチダBCKAD複合体のE1及びE3構成成分は結晶化され(Aevarssonらの文献、Nat. Struct. Biol. 6:785-792 (1999); Matteviの文献、Science 255:1544-1550 (1992))、本酵素複合体が研究されている(Sokatchらの文献、J. Bacteriol. 148:647-652 (1981))。P. プチダBCKAD遺伝子の転写は、*bkdR* の遺伝子産物により活性化される(Hesterらの文献、Eur. J. Biochem. 233:828-836 (1995))。ラツス・ノルベギクス(Paxtonらの文献、Biochem. J. 234:295-303 (1986))及びサッカロミセス・セレピシアエ(Sinclairらの文献、Biochem. Mol. Biol. Int. 31:911-922 (1993))を含む一部の生物体において、この複合体は、分枝鎖アミノ酸前駆体に加え、2-オキソブタン酸及びアルファ-ケトグルタル酸などの直鎖オキソ酸を含む、広範な基質範囲を有することが示されている。ウシBCKADの活性部位を、代替基質アセチル-CoAを好ましいように操作した(Meng及びChuangの文献、Biochemistry 33:12879-12885 (1994))。

【表 9 7】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>bfmBB</i>	NP_390283.1	16079459	バシルス・スプチリス
<i>bfmBAA</i>	NP_390285.1	16079461	バシルス・スプチリス
<i>bfmBAB</i>	NP_390284.1	16079460	バシルス・スプチリス
<i>pdhD</i>	P21880.1	118672	バシルス・スプチリス
<i>lpdV</i>	P09063.1	118677	シュードモナス・プチダ
<i>bkdB</i>	P09062.1	129044	シュードモナス・プチダ
<i>bkdA1</i>	NP_746515.1	26991090	シュードモナス・プチダ
<i>bkdA2</i>	NP_746516.1	26991091	シュードモナス・プチダ
<i>Bckdha</i>	NP_036914.1	77736548	ラツス・ノルベギクス
<i>Bckdhb</i>	NP_062140.1	158749538	ラツス・ノルベギクス
<i>Dbt</i>	NP_445764.1	158749632	ラツス・ノルベギクス
<i>Dld</i>	NP_955417.1	40786469	ラツス・ノルベギクス

【 0 5 2 2 】

ピルビン酸のアセチル-CoAへの変換を触媒するピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体も広範に研究されている。本E. コリ酵素において、E1構成成分の特異的残基が基質特異性に寄与する(Biszwanger, H. の文献、J Biol Chem. 256:815-822 (1981); Bremer, J. の文献、Eur. J Biochem. 8:535-540 (1969); Gongらの文献、J Biol Chem. 275:13645-13653 (2000))。前述のように、酵素工学の研究は、嫌気性条件下でのE. コリPDH酵素活性を改善した(Kimらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007); Kimの文献、J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008); Zhouらの文献、Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008))。E. コリPDHとは対照的に、B. スプチリス複合体は活性があり、嫌気性条件下での成長に必要とされる(Nakanoの文献、J. Bacteriol. 179:6749-6755 (1997))。グリセロール上での成長時に特徴付けられたクレブシエラ・ニューモニエPDHも、嫌気性条件下で活性がある(Menzelらの文献、J. Biotechnol. 56:135-142 (1997))。ウシ腎臓由来の酵素複合体の結晶構造(Zhouらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14802-14807 (2001))及び

アゾトバクター・ビネランディ (*Azotobacter vinelandii*) 由来のE2触媒ドメインが入手可能である (Matteviらの文献、*Science* 255:1544-1550 (1992))。一部の哺乳動物のPDH酵素複合体は、2-オキソブタン酸などの代替基質と反応することができるが、ラツス・ノルベギクスPDH及びBCKADの動態比較は、BCKADは、基質としての2-オキソブタン酸に対しより高い活性を有することを示している (Paxtonらの文献、*Biochem. J.* 234:295-303 (1986))。

【表 9 8】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>aceE</i>	NP_414656.1	16128107	エシェリキア・コリ K12 株 MG1655亜株
<i>aceF</i>	NP_414657.1	16128108	エシェリキア・コリ K12 株 MG1655亜株
<i>lpd</i>	NP_414658.1	16128109	エシェリキア・コリ K12 株 MG1655亜株
<i>pdhA</i>	P21881.1	3123238	バシルス・スプチリス
<i>pdhB</i>	P21882.1	129068	バシルス・スプチリス
<i>pdhC</i>	P21883.2	129054	バシルス・スプチリス
<i>pdhD</i>	P21880.1	118672	バシルス・スプチリス
<i>aceE</i>	YP_001333808.1	152968699	クレブシエラ・ニューモニエ MGH78578
<i>aceF</i>	YP_001333809.1	152968700	クレブシエラ・ニューモニエ MGH78578
<i>lpdA</i>	YP_001333810.1	152968701	クレブシエラ・ニューモニエ MGH78578
<i>Pdha1</i>	NP_001004072.2	124430510	ラツス・ノルベギクス
<i>Pdha2</i>	NP_446446.1	16758900	ラツス・ノルベギクス
<i>Dlat</i>	NP_112287.1	78365255	ラツス・ノルベギクス
<i>Dld</i>	NP_955417.1	40786469	ラツス・ノルベギクス

【 0 5 2 3 】

前述の多数の多酵素2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体の代替として、いくつかの嫌気性生物体は、2-ケト酸オキシドレダクターゼ系統 (OFOR) の酵素を利用し、2-ケト酸のアシル化酸化脱炭酸を触媒する。デヒドロゲナーゼ複合体とは異なり、これらの酵素は鉄-硫黄クラスターを含み、異なる補因子を利用し、且つNAD(P)Hの代わりに電子受容体としてフェレドキシン又はフラボドキシンを使用する。この系列のほとんどの酵素は基質としてのピルビン酸 (POR) に特異性であるが、いくつかの2-ケト酸：フェレドキシンオキシドレダクターゼはアルファ-ケトグルタル酸及び2-オキソブタン酸を含む広範な2-ケト酸を基質として受け入れることが示されている (Fukuda及びWakagiの文献、*Biochim. Biophys. Acta* 1597:74-80 (2002) ; Zhangらの文献、*J. Biochem.* 120:587-599 (1996))。当該酵素の一つは、好熱好酸性古細菌スルホロブス・トコダイ7由来のOFORであり、これは遺伝子S T2300によりコードされた 及び サブユニットを含む (Fukuda及びWakagiの文献、*Biochim. Biophys. Acta* 1597:74-80 (2002) ; Zhangらの文献、*J. Biochem.* 120:587-599 (1996))。E. コリにおいてこのタンパク質を効率的に発現するための、プラスミドベースの発現系が開発されており (Fukudaらの文献、*Eur. J. Biochem.* 268:5639-5646 (2001))、基質特異性に関連した残基が決定された (Fukuda及びWakagiの文献、*Biochim. Biophys. Acta* 1597:74-80 (2002))。アエロピルム・ベルニクスK1株由来の2つのOFORも、最近E. コリにクローン化され、特徴決定され、且つ広範な2-オキソ酸と反応することがわかった (Nishizawaらの文献、*FEBS Lett.* 579:2319-2322 (2005))。これらのOFOR候補の遺伝子配列が

利用可能であるが、これらは今日まで寄託されたGenBank識別子を有さない。全ての古細菌、一部の嫌気性細菌及びミトコンドリアを持たない真核生物において類似した酵素が存在することのバイオインフォマティックス的証拠が存在する(Fukuda及びWakagiの文献、Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2005))。還元されたフェロドキシンを使用し、フェロドキシン-NADレダクターゼによりNADHを生成することができるので、このクラスの酵素はエネルギーの観点からも興味深い(Petitdemangeらの文献、Biochim. Biophys. Acta 421:334-337 (1976))。同じく、ほとんどの酵素は嫌気性条件下で作用するように設計されているので、嫌気性環境における活性について、2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体系統の酵素に比べ、より少ない酵素の操作が必要である。

【表 9 9】

10

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
ST2300	NP_378302.1	15922633	スルホロブス・トコダイ7

【 0 5 2 4 】

(1.2.1.d オキシドレダクターゼ(ホスホン酸レダクターゼ))

4-ヒドロキシブチリル-リン酸の4-ヒドロキシブタナールへの変換は、ECクラス1.2.1のオキシドレダクターゼにより触媒され得る。アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ASD、EC 1.2.1.11)は、4-アスパルチルリン酸のアスパラギン酸-4-セミアルデヒドへのNADPH依存性還元を触媒する。ASDは、アミノ酸生合成に関与し、最近抗微生物薬標的として研究されている(Hadfieldらの文献、Biochemistry 40:14475-14483 (2001))。E. コリASD構造が解明され(Hadfieldらの文献、J. Mol. Biol. 289:991-1002 (1999))、該酵素は、代替基質ベータ-3-メチルアスパルチルリン酸を受け入れることが示された(Shamesらの文献、J. Biol. Chem. 259:15331-15339 (1984))。ヘモフィルス・インフルエンザ酵素は、活性部位での基質結合親和性を変更するための酵素工学研究の対象である(Blancoらの文献、Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 60:1388-1395 (2004) ; Blancoらの文献、Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 60:1808-1815 (2004))。他のASD候補が、マイコバクテリウム・ツベルクローシス(Shafianiらの文献、J. Appl. Microbiol. 98:832-838 (2005))、メタノコッカス・ジャナスキ(Methanococcus jannaschii)(Faehnleらの文献、J. Mol. Biol. 353:1055-1068 (2005))、感染性微生物ビブリオ・コレラ及びヘリコバクター・ピロリ(Mooreらの文献、Protein Expr. Purif. 25:189-194 (2002))において認められる。関連酵素候補は、S. セレビスシアエ(Pauwelsらの文献、Eur. J. Biochem. 270:1014-1024 (2003))、B. スブチリス(O'Reilly及びDevineの文献、Microbiology 140 (Pt 5):1023-1025 (1994))、及び他の生物体において認められた、アセチルグルタミルリン酸をアセチルグルタミン酸-5-セミアルデヒドに天然に還元する酵素である、アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ(EC 1.2.1.38)である。

【表 1 0 0】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>asd</i>	NP_417891.1	16131307	エシェリキア・コリ
<i>asd</i>	YP_248335.1	68249223	ヘモフィルス・インフルエンザ
<i>asd</i>	AAB49996	1899206	マイコバクテリウム・ツベルクローシス
VC2036	NP_231670	15642038	ビブリオ・コレラ
<i>asd</i>	YP_002301787.1	210135348	ヘリコバクター・ピロリ
ARG5,6	NP_010992.1	6320913	サッカロミセス・セレビスシアエ
<i>argC</i>	NP_389001.1	16078184	バシルス・スブチリス

40

【 0 5 2 5 】

このクラスの他の例示的酵素は、グリセルアルデヒド-3-リン酸をD-グリセリン酸1,3-

50

ビスリン酸に変換するグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(例えば、E. コリ gapA(Branlant及びBranlantの文献、Eur. J. Biochem. 150:61-66 (1985))、N-アセチル-L-グルタミン酸-5-セミアルデヒドをN-アセチル-L-グルタミル-5-リン酸に変換するN-アセチル-ガンマ-グルタミルリン酸レダクターゼ(例えば、E. コリ argC(Parsotらの文献、Gene 68:275-283 (1988))、及びL-グルタミン酸-5-セミアルデヒドをL-グルタミル-5-リン酸に変換するグルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(例えば、E. コリ proA(Smithらの文献、J. Bacteriol. 157:545-551 (1984))を含む。サルモネラ・ティフィムリウム(Mahan及びCsonkaの文献、J. Bacteriol. 156:1249-1262 (1983))及びカンピロバクター・ジェジュニ(Louie及びChanの文献、Mol. Gen. Genet. 240:29-35 (1993))由来のグルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ酵素をコードしている遺伝子は、クローン化され、E. コリにおいて発現された。

10

【表 1 0 1】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>gapA</i>	P0A9B2.2	71159358	エシェリキア・コリ
<i>argC</i>	NP_418393.1	16131796	エシェリキア・コリ
<i>proA</i>	NP_414778.1	16128229	エシェリキア・コリ
<i>proA</i>	NP_459319.1	16763704	サルモネラ・ティフィムリウム
<i>proA</i>	P53000.2	9087222	カンピロバクター・ジェジュニ

20

【 0 5 2 6 】

(1.2.1.e 酸レダクターゼ)

図58、62及び63のいくつかの工程は、酸レダクターゼによる活性化されない酸のアルデヒドへの変換を示している。これらは、4-ヒドロキシ酪酸、コハク酸、アルファ-ケトグルタル酸、及び4-アミノ酪酸の、各々、4-ヒドロキシブタナール、コハク酸セミアルデヒド、2,5-ジオキソペンタン酸、及び4-アミノブタナールへの変換を含む。1つの注目すべきカルボン酸レダクターゼは、ノカルジア・イオウエンシスにおいて認めることができ、これはカルボン酸のそれらの対応するアルデヒドへのマグネシウム、ATP及びNADPH依存性還元を触媒する(Venkitasubramanianらの文献、J. Biol. Chem. 282:478-485 (2007))。この酵素は、car遺伝子によりコードされ、且つクローン化され、E. コリにおいて機能性に発現された(Venkitasubramanianらの文献、J. Biol. Chem. 282:478-485 (2007))。npt遺伝子産物の発現は、転写後修飾を介して、該酵素の活性を向上した。npt遺伝子は、不活性アポ酵素を活性ハロ酵素に変換する特異的ホスホパンテイトランスフェラーゼ(PTase)をコードしている。この酵素の天然の基質はパニリン酸であり、該酵素は、広範な芳香族基質及び脂肪族基質を受け入れる(Venkitasubramanianらの文献、「製薬及びバイオ産業における生触媒」、R.N. Patel編集、第15章、425-440頁、CRC Press LLC, ボカラトン、FL、(2006))。

30

【表 1 0 2】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>car</i>	AAR91681.1	40796035	ノカルジア・イオウエンシス(NRRL 5646種)
<i>npt</i>	ABI83656.1	114848891	ノカルジア・イオウエンシス(NRRL 5646種)

40

【 0 5 2 7 】

追加のcar遺伝子及びnpt遺伝子を、配列相同性を基に同定することができる。

【表 1 0 3】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>fadD9</i>	YP_978699.1	121638475	マイコバクテリウム・ボビスBCG
<i>BCG_2812c</i>	YP_978898.1	121638674	マイコバクテリウム・ボビスBCG
<i>nfa20150</i>	YP_118225.1	54023983	ノカルジア・ファルシニカ IFM 10152
<i>nfa40540</i>	YP_120266.1	54026024	ノカルジア・ファルシニカ IFM 10152
<i>SGR_6790</i>	YP_001828302.1	182440583	ストレプトマイセス・グリセウス亜種 グリセウスNBRC 13350
<i>SGR_665</i>	YP_001822177.1	182434458	ストレプトマイセス・グリセウス亜種 グリセウスNBRC 13350

10

【 0 5 2 8 】

ストレプトマイセス・グリセウスにおいて認められる追加の酵素候補は、griC及びgriD遺伝子によりコードされている。この酵素は、3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸を3-アミノ-4-ヒドロキシベンズアルデヒドへ変換すると考えられ、griC又はgriDのいずれかの欠失は、3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸代謝のシャント生成物である細胞外3-アセチルアミノ-4-ヒドロキシ安息香酸の蓄積に繋がる(Suzukiらの文献、J. Antibiot. 60(6):380-387 (2007))。griC及びgriDの、ノカルジア・イオウエンシスnptに配列が類似した酵素であるSGR_665との同時発現は有益であり得る。

20

【表 104】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>griC</i>	182438036	YP_001825755.1	ストレプトマイセス・グリセウス 亜種グリセウス NBRC 13350
<i>griD</i>	182438037	YP_001825756.1	ストレプトマイセス・グリセウス 亜種グリセウス NBRC 13350
<i>MSMEG_2956</i>	YP_887275.1	YP_887275.1	マイコバクテリウム・スメグマチス <i>MC2 155</i>
<i>MSMEG_5739</i>	YP_889972.1	118469671	マイコバクテリウム・スメグマチス <i>MC2 155</i>
<i>MSMEG_2648</i>	YP_886985.1	118471293	マイコバクテリウム・スメグマチス <i>MC2 155</i>
<i>MAP1040c</i>	NP_959974.1	41407138	マイコバクテリウム・アビウム 亜種パラツベルクローシス K- 10
<i>MAP2899c</i>	NP_961833.1	41408997	マイコバクテリウム・アビウム 亜種パラツベルクローシス K- 10
<i>MMAR_2117</i>	YP_001850422.1	183982131	マイコバクテリウム・マリヌム <i>M</i>
<i>MMAR_2936</i>	YP_001851230.1	183982939	マイコバクテリウム・マリヌム <i>M</i>
<i>MMAR_1916</i>	YP_001850220.1	183981929	マイコバクテリウム・マリヌム <i>M</i>
<i>TpauDRAFT_33060</i>	ZP_04027864.1	227980601	ツカムレラ・ ポーロメタボラ <i>DSM</i> 20162
<i>TpauDRAFT_20920</i>	ZP_04026660.1	227979396	ツカムレラ・ ポーロメタボラ <i>DSM</i> 20162
<i>CPCC7001_1320</i>	ZP_05045132.1	254431429	シアノビウム <i>PCC7001</i>
<i>DDBDRAFT_0187729</i>	XP_636931.1	66806417	ディクチオステリウム・ディスコ デウム <i>AX4</i>

【0529】

類似した特徴を持つ酵素であるアルファ-アミノアジピン酸レダクターゼ(AAR、EC 1.2.1.31)は、一部の真菌種におけるリジン生合成経路に参与している。この酵素は天然には、アルファ-アミノアジピン酸をアルファ-アミノアジピン酸セミアルデヒドに還元する。カルボキシル基が最初に、アデニル酸のATP依存性形成により活性化され、次にNAD(P)Hにより還元され、アルデヒド及びAMPを生じる。この酵素はCAR同様、マグネシウムを利用し、PPTaseによる活性化を必要とする。AAR及びそれに対応するPPTaseの酵素候補は、サッカロミセス・セレピシアエ(Morrisらの文献、Gene 98:141-145 (1991))、カンジダ・アルビカンス(Guoらの文献、Mol. Genet. Genomics 269:271-279 (2003))、及びシゾサッカロミセス・ポンベ(Fordらの文献、Curr. Genet. 28:131-137 (1995))において認められる。S. ポンベ由来のAARは、E. コリにおいて発現された場合に、著しい活性を示した(Guoらの文献、Yeast 21:1279-1288 (2004))。ペニシリウム・クリソゲヌム由来のAARは、代替基質としてS-カルボキシメチル-L-システインを受け入れるが、アジピン酸、L-グルタミン酸又はジアミノピメリン酸とは反応しない(Hijarrubiaらの文献、J. Biol. Chem. 278:8250-8256 (2003))。P. クリソゲヌムPPTaseをコードしている遺伝子は、今日まで同定され

ていない。

【表 1 0 5】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>LYS2</i>	AAA34747.1	171867	サッカロミセス・セレビスシアエ
<i>LYS5</i>	P50113.1	1708896	サッカロミセス・セレビスシアエ
<i>LYS2</i>	AAC02241.1	2853226	カンジダ・アルビカンズ
<i>LYS5</i>	AAO26020.1	28136195	カンジダ・アルビカンズ
<i>LysIp</i>	P40976.3	13124791	シゾサッカロミセス・ボンベ
<i>Lys7p</i>	Q10474.1	1723561	シゾサッカロミセス・ボンベ
<i>Lys2</i>	CAA74300.1	3282044	ペニシリウム・クリソゲヌム

10

【 0 5 3 0】

(1.4.1.a オキシドレダクターゼ(アミノ化))

グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(図62及び63工程J)、4-アミノ酪酸デヒドロゲナーゼ(図62及び63工程M)、プトレシンデヒドロゲナーゼ(図63工程D)、5-アミノ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(図63工程P)、及びオルニチンデヒドロゲナーゼ(図63工程S)は、オキシドレダクターゼのアミノ化により触媒することができる。このECクラスの酵素は、受容体としてNAD⁺又はNADP⁺によるアルファ-アミノ酸の酸化的脱アミノ化を触媒し、これらの反応は典型的には可逆性である。アミノ酸を操作する例示的オキシドレダクターゼは、gdhAによりコードされたグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(脱アミノ化)、ldhによりコードされたロイシンデヒドロゲナーゼ(脱アミノ化)、及びnadXによりコードされたアスパラギン酸デヒドロゲナーゼ(脱アミノ化)がある。エシェリキア・コリ由来のgdhA遺伝子産物(Korberらの文献、J. Mol. Biol. 234:1270-1273 (1993); McPherson及びWoottonの文献、Nucleic Acids Res. 11:5257-5266 (1983))、サーモトガ・マリティマ由来のgdh(Kortらの文献、Extremophiles 1:52-60 (1997); Lebbinkらの文献、J. Mol. Biol. 280:287-296 (1998); Lebbinkらの文献、J. Mol. Biol. 289:357-369 (1999))、及びハロバクテリウム・サリナルム由来のgdhA1(Ingoldsbyらの文献、Gene 349:237-244 (2005))は、それぞれNADP(H)、NAD(H)、又は両方に嗜好性である一方、グルタミン酸の2-オキソグルタル酸及びアンモニアへの可逆的相互変換を触媒する。バシルス・セレウスのldh遺伝子は、ロイシン、イソロイシン、バリン、及び2-アミノブタン酸を含む広範な基質を有する、LeuDHタンパク質をコードしている(Ansorge及びKulaの文献、Biotechnol. Bioeng. 68:557-562 (2000); Stoyanらの文献、J. Biotechnol. 54:77-80 (1997))。アスパラギン酸デヒドロゲナーゼをコードしているサーモトガ・マリティマ由来のnadX遺伝子は、NADの生合成に關与している(Yangらの文献、J. Biol. Chem. 278:8804-8808 (2003))。

20

30

【表 1 0 6】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>gdhA</i>	P00370	118547	エシェリキア・コリ
<i>gdh</i>	P96110.4	6226595	サーモトガ・マリティマ
<i>gdhA1</i>	NP_279651.1	15789827	ハロバクテリウム・サリナルム
<i>ldh</i>	P0A393	61222614	バシルス・セレウス
<i>nadX</i>	NP_229443.1	15644391	サーモトガ・マリティマ

40

【 0 5 3 1】

更なるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子候補は、バシルス・スプチリス(Khanらの文献、Biosci. Biotechnol. Biochem. 69:1861-1870 (2005))、ニコチアナ・タバカム(Purnellらの文献、Planta 222:167-180 (2005))、オリザ・サティバ(Abikoらの文献、Plant Cell Physiol. 46:1724-1734 (2005))、ハロフェラックス・メディテラネイ(Diazらの文

50

献、Extremophiles 10:105-115 (2006))、及びハロバクテリウム・サリナルム(Haydenらの文献、FEMS Microbiol. Lett. 211:37-41 (2002))において認められる。ニコチアナ・タバカムの酵素は、gdh1及びgdh2によりコードされたアルファ及びベータサブユニットで構成されている(Purnellらの文献、Planta 222:167-180 (2005))。NADH依存性グルタミン酸デヒドロゲナーゼの過剰発現は、S. セレビスシアエの操作された菌株におけるエタノール生成を向上することがわかった(Rocaらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 69:4732-4736 (2003))。

【表 1 0 7】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>rocG</i>	NP_391659.1	16080831	バシルス・スプチリス
<i>gdh1</i>	AAR11534.1	38146335	ニコチアナ・タバカム
<i>gdh2</i>	AAR11535.1	38146337	ニコチアナ・タバカム
<i>GDH</i>	Q852M0	75243660	オリザ・サティバ
<i>GDH</i>	Q977U6	74499858	ハロフェラックス・メディテラネイ
<i>GDH</i>	P29051	118549	ハロバクテリウム・サリナルム
<i>GDH2</i>	NP_010066.1	6319986	サッカロミセス・セレビスシアエ

10

【 0 5 3 2 】

アルデヒドのそれらの対応する第一級アミンへの変換を触媒する例示的酵素は、lysDH遺伝子によりコードされたリジン6-デヒドロゲナーゼ(EC 1.4.1.18)である。lysDH遺伝子によりコードされたリジン6-デヒドロゲナーゼ(脱アミノ化)は、L-リジン - アミノ基の酸化的脱アミノ化を触媒し、2-アミノアジピン酸-6-セミアルデヒドを形成し、これは次に非酵素的に環化し、1-ピペリدين-6-カルボン酸を形成する(Misono及びNagasakiの文献、J. Bacteriol. 150:398-401 (1982))。ゲオバシルス・ステアロサーモフィルス由来のlysDH遺伝子は、好熱性のNAD-依存性リジン6-デヒドロゲナーゼをコードしている(Heydariらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 70:937-942 (2004))。アエロピルム・ペルニクスK1由来のlysDH遺伝子は、ゲノムプロジェクトから相同性により同定される。更なる酵素は、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(Hashimotoらの文献、J. Biochem. 106:76-80 (1989) ; Misono及びNagasakiの文献、J. Bacteriol. 150:398-401 (1982))、及び

20

30

【表 1 0 8】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>lysDH</i>	BAB39707	13429872	ゲオバシルス・ステアロサーモフィルス
<i>lysDH</i>	NP_147035.1	14602185	アエロピルム・ペルニクスK1
<i>lysDH</i>	NP_353966	15888285	アグロバクテリウム・ツメファシエンス
<i>lysDH</i>	AAZ94428	74026644	アクロモバクター・デニトリフィカンス

40

【 0 5 3 3 】

3-オキソ酸を3-アミノ酸へ変換する酵素は、リジンを発酵する生物体に認められる酵素である、3,5-ジアミノヘキサン酸デヒドロゲナーゼ(EC 1.4.1.11)である。この酵素をコードしている遺伝子kddが、フソバクテリウム・ヌクレアタムにおいて最近同定された(Kreimeyerらの文献、J. Biol. Chem. 282:7191-7197 (2007))。この酵素は精製され、且つ他の生物体において特徴付けられたが(Bakerらの文献、J. Biol. Chem. 247:7724-7734 (1972) ; Baker及びvan der Driftの文献、Biochemistry 13:292-299 (1974))、これらの酵素に関連した遺伝子は不明である。ミクソコッカス・キサンタス、ボルフィロモナス・ギンギバリスW83及び他の配列決定された生物体における候補を配列相同性により推定することができる。

50

【表 1 0 9】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>kdd</i>	AAL93966.1	19713113	フソバクテリウム・ヌクレアタム
<i>mxan_4391</i>	ABF87267.1	108462082	ミクソコッカス・キサンタス
<i>pg_1069</i>	AAQ66183.1	34397119	ポルフィロモナス・ギンギパリス

【 0 5 3 4 】

(2.3.1.a アシルトランスフェラーゼ(リン酸基のCoAへの転移))

図62の工程Pは、4-ヒドロキシブチリル-CoAの4-ヒドロキシブチリル-Piへの転換を示している。例示的リン酸を転移するアシルトランスフェラーゼは、ptaによりコードされたホスホトランスアセチラーゼ、及びptbによりコードされたホスホトランスブチリラーゼである。E. コリ由来のpta遺伝子は、アセチル-CoAをアセチル-リン酸に、又はその逆に変換することができる酵素をコードしている(Suzukiの文献、Biochim. Biophys. Acta 191: 559-569 (1969))。この酵素は、アセチル-CoAの代わりにプロピオニル-CoAを利用することができ、このプロセスにおいてプロピオン酸を形成する(Hesslingerらの文献、Mol. Microbiol. 27:477-492 (1998))。同様に、C. アセトブチリクム由来のptb遺伝子は、ブチリル-CoAをブチリル-リン酸へ変換することができる酵素をコードしている(Walterらの文献、Gene 134:107-111 (1993)) ; Huangらの文献、J Mol. Microbiol. Biotechnol. 2:33-38 (2000))。更なるptb遺伝子は、酪酸産生菌L2-50(Louisらの文献、J. Bacteriol. 186:2099-2106 (2004))、及びバシルス・メガテリウム(Vazquezらの文献、Curr. Microbiol. 42:345-349 (2001))において認めることができる。

【表 1 1 0】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>pta</i>	NP_416800.1	16130232	エシェリキア・コリ
<i>ptb</i>	NP_349676	15896327	クロストリジウム・アセトブチリクム
<i>ptb</i>	AAR19757.1	38425288	酪酸産生菌 L2-50
<i>ptb</i>	CAC07932.1	10046659	バシルス・メガテリウム

【 0 5 3 5 】

(2.6.1. アミノトランスフェラーゼ)

アミノトランスフェラーゼは、アルデヒド又はケトンにアミノ基に可逆的に変換する。共通のアミノ供与体/受容体組合せは、グルタミン酸/アルファ-ケトグルタル酸、アラニン/ピルビン酸、及びアスパラギン酸/オキサロ酢酸を含む。いくつかの酵素は、アルデヒドを、4-アミノ酪酸、プトレシン、及び5-アミノ-2-オキソペンタン酸などの第一級アミンへ、又はその逆に変換することが示されている。これらの酵素は、以下の転換を実行するのに特に良く適している：図62及び63の工程N、図63の工程E及びQ。リジン-6-アミノトランスフェラーゼ(EC 2.6.1.36)は、第一級アミンの形成が可能である酵素の一例である。リジンをアルファ-アミノアジピン酸セミアルデヒドに変換するこの酵素機能は、酵母及び細菌において実証されている。カンジダ・ユチリス(*Candida utilis*) (Hammer及びBodeの文献、J. Basic Microbiol. 32:21-27 (1992))、フラボバクテリウム・ルテセンス(*Fujii*らの文献、J. Biochem. 128:391-397 (2000))、及びストレプトマイセス・クラブリゲヌス(Romeroらの文献、J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 18:241-246 (1997))由来の候補が特徴付けられている。S. クラブリゲヌス由来の組換えリジン-6-アミノトランスフェラーゼは、E. コリにおいて機能性に発現される(Tobinらの文献、J. Bacteriol. 173:6223-6229 (1991))。F. ルテセンス酵素は、アミノ受容体として、アルファ-ケトグルタル酸に特異的である(Soda及びMisonoの文献、Biochemistry 7:4110-4119 (1968))。アルデヒドを

末端アミンへ変換する他の酵素は、2,4-ジアミノブタン酸:2-ケトグルタル酸4-トランスアミナーゼをコードしているアシネトバクター・バウマニのdat遺伝子産物を含む(Ikai及びYamamotoの文献、J. Bacteriol. 179:5118-5125 (1997))。その天然の基質である2,4-ジアミノ酪酸に加え、DATは、リジン、4-アミノ酪酸及びオルニチンの末端アミンをアミノ基転移させる。

【表 1 1 1】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>lat</i>	BAB13756.1	10336502	フラボバクテリウム・ルテセンス
<i>lat</i>	AAA26777.1	153343	ストレプトマイセス・クラブリゲヌス
<i>dat</i>	P56744.1	6685373	アシネトバクター・バウマニ

10

【 0 5 3 6 】

アルデヒドの末端アミンへの変換は、ガンマ-アミノ酪酸トランスアミナーゼ(GABAトランスアミナーゼ又は4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ)によっても触媒されることが出来る。この酵素は、コハク酸セミアルデヒド及びグルタミン酸を、4-アミノ酪酸及びアルファ-ケトグルタル酸に天然に相互変換し、且つ広い基質範囲を有することがわかっている(Liuらの文献、Biochemistry 43:10896-10905 (2004) ; Schulzらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 56:1-6 (1990))。E. コリにおける2つのGABAトランスアミナーゼは、gabT(Bartschらの文献、J. Bacteriol. 172:7035-7042 (1990))及びpuuE(Kuriharaらの文献、J. Biol. Chem. 280:4602-4608. (2005))によりコードされている。ムス・ムスキュラス、シュードモナス・フルオレセンス、及びサス・スクロファにおけるGABAトランスアミナーゼは、6-アミノカプロン酸を含む一連の代替基質と反応することが示されている(Cooperの文献、Methods Enzymol. 113:80-82 (1985) ; Scott及びJakobyの文献、J. Biol. Chem. 234:932-936 (1959))。

20

【表 1 1 2】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>gabT</i>	NP_417148.1	16130576	エシェリキア・コリ
<i>puuE</i>	NP_415818.1	16129263	エシェリキア・コリ
<i>abat</i>	NP_766549.2	37202121	ムス・ムスキュラス
<i>gabT</i>	YP_257332.1	70733692	シュードモナス・フルオレセンス
<i>abat</i>	NP_999428.1	47523600	サス・スクロファ

30

【 0 5 3 7 】

アルデヒドと第一級アミンの相互変換に関する更なる酵素候補は、ブトレシントランスアミナーゼ又は他のジアミンアミノトランスフェラーゼである。E. コリのブトレシンアミノトランスフェラーゼは、ygjG遺伝子によりコードされ、精製された酵素は、カダベリン及びスベルミジンもアミノ基転移することができる(Samsonovaらの文献、BMC Microbiol. 3:2 (2003))。加えてこの酵素の1,7-ジアミノヘプタンへの活性、及び2-オキソグルタル酸以外のアミノ受容体(例えば、ピルビン酸、2-オキソブタン酸)との活性が報告されている(Kimの文献、J. Biol. Chem. 239:783-786 (1964) ; Samsonovaらの文献、BMC Microbiol. 3:2 (2003))。アルファ-ケトグルタル酸よりもアミノ受容体としてのピルビン酸との活性がより高いブトレシンアミノトランスフェラーゼは、シュードモナス・アエルギノサのspuC遺伝子である(Luらの文献、J. Bacteriol. 184:3765-3773 (2002))。

40

【表 1 1 3】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>ygiG</i>	NP_417544	145698310	エシェリキア・コリ
<i>spuC</i>	AAG03688	9946143	シュードモナス・アエルギノサ

【0 5 3 8】

3-オキソ酸をアミノ基転移する酵素は、GABAアミノトランスフェラーゼ(前記)、ベータ-アラニン/アルファ-ケトグルタル酸アミノトランスフェラーゼ及び3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アミノトランスフェラーゼがある。ベータ-アラニン/アルファ-ケトグルタル酸アミノトランスフェラーゼ(W008027742)は、ベータ-アラニンと反応し、マロン酸セミアルデヒド、3-オキソ酸を形成する。サッカロミセス・クルイベリのSkPYD4の遺伝子産物は、アミノ基供与体としてベータ-アラニンを優先的に使用することが示された(Andersen及びHansenの文献、Gene 124:105-109 (1993))。SkUGA1は、サッカロミセス・セレピシアエGABAアミノトランスフェラーゼのホモログであるUGA1をコードしている(Ramosらの文献、Eur. J. Biochem. 149:401-404 (1985))のに対し、SkPYD4は、ベータ-アラニンとGABAの両方のアミノ基転移に関連した酵素をコードしている(Andersen及びHansenの文献、Gene 124:105-109 (1993))。3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼは、メチルマロン酸セミアルデヒドの3-アミノ-2-メチルプロピオン酸への転換を触媒する。この酵素は、ラッス・ノルベギクス及びサス・スクロファにおいて特徴付けられ、Abatによりコードされている(Kakimotoらの文献、Biochim. Biophys. Acta 156:374-380 (1968) ; Tamakiらの文献、Methods Enzymol. 324:376-389 (2000))。

【表 1 1 4】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	98626772	ラカンセア・クルイベリ
<i>SkUGA1</i>	ABF58894.1	98626792	ラカンセア・クルイベリ
<i>UGA1</i>	NP_011533.1	6321456	サッカロミセス・セレピシアエ
<i>Abat</i>	P50554.3	122065191	ラッス・ノルベギクス
<i>Abat</i>	P80147.2	120968	サス・スクロファ

【0 5 3 9】

いくつかのアミノトランスフェラーゼは、アミノ酸のアミノ基をアミノ基転移し、2-オキソ酸を形成する。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼは、オキソ基をオキサロ酢酸からグルタミン酸へ天然に転移し、アルファ-ケトグルタル酸及びアスパラギン酸を形成する酵素である。アスパラギン酸は、OHED及び2-AHDに構造が類似している。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性は、例えば、エシェリキア・コリ由来のaspCの遺伝子産物(Yagiらの文献、FEBS Lett. 100:81-84 (1979) ; Yagiらの文献、Methods Enzymol. 113:83-89 (1985))、サッカロミセス・セレピシアエ由来のAAT2の遺伝子産物(Yagiらの文献、J. Biochem. 92:35-43 (1982))、及びアラビドプシス・サリアナ由来のASP5の遺伝子産物(de la Torreらの文献、Plant J. 46:414-425 (2006) ; Kwok及びHansonの文献、J. Exp. Bot. 55:595-604 (2004) ; Wilkie及びWarrenの文献、Protein Expr. Purif. 12:381-389 (1998))により特徴付けられる。ラッス・ノルベギクス由来の酵素は、2-アミノヘキサニ酸及び2,4-ジアミノ酪酸などの代替基質をアミノ基転移することが知られている(Recasensらの文献、Biochemistry 19:4583-4589 (1980))。他のアミノ酸基質に作用するアミノトランスフェラーゼも、この転換を触媒することができる。バリンアミノトランスフェラーゼは、バリン及びピルビン酸の2-ケトイソ吉草酸及びアラニンへの変換を触媒する。E. コリ遺伝子avtAは、1つの当該酵素をコードしている(Whalen及びBergの文献、J. Bacteriol. 150:739-746 (1982))。この遺伝子産物は、 α -ケト酪酸のアミノ基転移を触媒し、 α -アミノ酪酸を生成するが、この反応のアミン供与体は同定されていない(Whalen及

びBergの文献、J. Bacteriol. 158:571-574 (1984))。E. コリserCの遺伝子産物は、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ及びホスホヒドロキシトレオニンアミノトランスフェラーゼの2つの反応を触媒し(Lam及びWinklerの文献、J. Bacteriol. 172:6518-6528 (1990))、ホスホリル化されない基質に対する活性は検出されなかった(Drewkeらの文献、FEBS Lett. 390:179-182 (1996))。

【表 1 1 5】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>aspC</i>	NP_415448.1	16128895	エシェリキア・コリ
<i>AAT2</i>	P23542.3	1703040	サッカロミセス・セレビシアエ
<i>ASP5</i>	P46248.2	20532373	アラビドプシス・サリアナ
<i>Got2</i>	P00507	112987	ラツス・ノルベギクス
<i>avtA</i>	YP_026231.1	49176374	エシェリキア・コリ
<i>serC</i>	NP_415427.1	16128874	エシェリキア・コリ

10

【 0 5 4 0 】

別の酵素候補は、一部の生物体におけるリジンの生合成及び分解に関与する酵素である、アルファ-アミノアジピン酸アミノトランスフェラーゼ(EC 2.6.1.39)である。この酵素は、アミノ受容体としてアルファ-ケトグルタル酸を使用し、2-アミノアジピン酸及び2-オキソアジピン酸を相互変換する。遺伝子候補が、ホモ・サピエンス(Okunoらの文献、Enzyme Protein 47:136-148 (1993))及びサーマス・サーモフィルス(Miyazakiらの文献、Microbiology 150:2327-2334 (2004))において認められている。lysNによりコードされたサーマス・サーモフィルス酵素は、オキサロ酢酸、2-オキソイソカプロン酸、2-オキソイソ吉草酸、及び2-オキソ-3-メチル吉草酸を含むいくつかの代替基質と活性がある。

20

【表 1 1 6】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>lysN</i>	BAC76939.1	31096548	サーマス・サーモフィルス
<i>AadAT-II</i>	Q8N5Z0.2	46395904	ホモ・サピエンス

30

【 0 5 4 1 】

(2.7.2.a ホスホトランスフェラーゼ(カルボキシ受容体))

ECクラス2.7.2のホスホトランスフェラーゼ酵素は、カルボン酸をホスホン酸に転換すると同時に、1個のATPを加水分解する。図62の工程0は、そのような酵素による4-ヒドロキシ酪酸の4-ヒドロキシブチリル-リン酸への変換に関与している。酪酸キナーゼ(EC 2.7.2.7)は、C. アセトブチリクムの酸産生時のブチリル-リン酸の酪酸への可逆的変換を実行する(Caryらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 56:1576-1583 (1990))。この酵素は、2つのbuk遺伝子産物のいずれかによりコードされている(Huangらの文献、J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2:33-38 (2000))。他の酪酸キナーゼ酵素は、C. ブチリクム及びC. テタノモルフムにおいて認められる(Twarog及びWolfeの文献、J. Bacteriol. 86:112-117 (1963))。サーモトガ・マリティマ由来の関連酵素イソ酪酸キナーゼも、E. コリにおいて発現され、結晶化された(Diaoらの文献、Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 59:1100-1102 (2003) ; Diao及びHassonの文献、J. Bacteriol. 191:2521-2529 (2009))。アスパルトキナーゼは、アスパラギン酸のATP依存性リン酸化を触媒し、いくつかのアミノ酸の合成に関与している。lysCによりコードされたE. コリのアスパルトキナーゼIII酵素は、広い基質範囲を有し、且つ基質特異性に関与した触媒の残基が解明されている(Keng及びViolaの文献、Arch. Biochem. Biophys. 335:73-81 (1996))。E. コリの2つの追加のキナーゼである酢酸キナーゼ及びガンマ-グルタミルキナーゼも、良い候補である。ackAによりコードされたE. コリ酢酸キナーゼ(Skarstedt及びSilversteinの文献、J. Biol. Chem. 251:6775-6783 (1976))は、酢酸に加えてプロピオン酸をリン酸化する(Hesslingerらの文献

40

50

、Mol. Microbiol. 27:477-492 (1998))。proBによりコードされたE. コリガンマ-グルタミルキナーゼ(Smithらの文献、J. Bacteriol. 157:545-551 (1984))は、グルタミン酸のガンマ炭酸基(carbonic acid group)をリン酸化する。

【表 1 1 7】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>buk1</i>	NP_349675	15896326	クロストリジウム・アセトブチリウム
<i>buk2</i>	Q97II1	20137415	クロストリジウム・アセトブチリウム
<i>buk2</i>	Q9X278.1	6685256	サーモトガ・マリディマ
<i>lysC</i>	NP_418448.1	16131850	エシェリキア・コリ
<i>ackA</i>	NP_416799.1	16130231	エシェリキア・コリ
<i>proB</i>	NP_414777.1	16128228	エシェリキア・コリ

10

【 0 5 4 2 】

アセチルグルタミン酸キナーゼは、アルギニン生合成時に、アセチル化されたグルタミン酸をリン酸化する。この酵素が代替基質を受け入れることについては不明であるが；しかし基質の結合及びリン酸化に関与したE. コリ酵素のいくつかの残基は、部位特異的変異誘発により解明されている(Marco-Marinらの文献、J. Mol. Biol. 334:459-476 (2003)；Ramon-Maiquesらの文献、Structure 10:329-342 (2002))。この酵素は、バシルス・スプ

チリス及びE. コリにおいてargBによりコードされ(Parsotらの文献、Gene 68:275-283 (1988))、S. セレビスシアエにおいてARG5,6によりコードされている(Pauwelsらの文献、Eur. J. Biochem. 270:1014-1024 (2003))。S. セレビスシアエのARG5,6遺伝子は、アセチルグルタミン酸キナーゼ及びアセチルグルタミルリン酸レダクターゼとなるようミトコンドリアマトリックスにおいて変異されているポリタンパク質前駆体をコードしている。

20

【表 1 1 8】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>argB</i>	NP_418394.3	145698337	エシェリキア・コリ
<i>argB</i>	NP_389003.1	16078186	バシルス・スプチリス
ARG5,6	NP_010992.1	6320913	サッカロミセス・セレビスシアエ

30

【 0 5 4 3 】

(2.8.3.a CoAトランスフェラーゼ)

クロストリジウム・クルイベリのcat1、cat2、及びcat3の遺伝子産物は、各々、スクシニル-CoA(図62及び63工程G)、4-ヒドロキシブチリル-CoA(図62工程T)、及びブチリル-CoAのアセチルトランスフェラーゼ活性(Seedorfらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:2128-2133 (2008)；Sohling及びGottschalkの文献、J. Bacteriol. 178:871-880 (1996))を示すことが記された。同様のCoAトランスフェラーゼ活性は、トリコモナス・バギナリス(van Grinsvenらの文献、J. Biol. Chem. 283:1411-1418 (2008))及びトリパノソーマ・ブルセイ(Riviereらの文献、J. Biol. Chem. 279:45337-45346 (2004))にも存在する。

40

【表 1 1 9】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>cat1</i>	P38946.1	729048	クロストリジウム・クルイベリ
<i>cat2</i>	P38942.2	1705614	クロストリジウム・クルイベリ
<i>cat3</i>	EDK35586.1	146349050	クロストリジウム・クルイベリ
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	トリコモナス・バギナリス G3
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	トリパノソーマ・ブルセイ

【 0 5 4 4 】

50

この種の転換に追加の有用な酵素は、酢酸-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.8)としても公知であるアシル-CoA:酢酸-CoAトランスフェラーゼであり、これはイソ酪酸(Matthies及びSchinkの文献、Appl. Environ. Microbiol. 58:1435-1439 (1992))、吉草酸(Vanderwinkelらの文献、Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908 (1968))、及びブタン酸(Vanderwinkelの文献、前掲(1968))を含む様々な分枝鎖又は直鎖のアシル-CoA基質から酢酸へ、CoA部分を転移することが知られている。この酵素は、E. コリ種K12において、atoA(アルファサブユニット)及びatoD(ベータサブユニット)によりコードされている(Korolevらの文献、Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 58:2116-2121 (2002); Vanderwinkelの文献、前掲(1968))。同様の酵素は、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC 13032(Duncanらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 68:5186-5190 (2002))、クロストリジウム・アセトブチリクム(Caryらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 56:1576-1583 (1990); Wiesenbornらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 55:323-329 (1989))、及びクロストリジウム・サッカロペルブチルアセトニクム(Kosakaらの文献、Biosci. Biotechnol. Biochem. 71:58-68 (2007))に存在している。

10

20

【表 1 2 0】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>atoA</i>	P76459.1	2492994	エシェリキア・コリ K12
<i>atoD</i>	P76458.1	2492990	エシェリキア・コリ K12
<i>actA</i>	YP_226809.1	62391407	コリネバクテリウム・グルタミクム
<i>cg0592</i>	YP_224801.1	62389399	コリネバクテリウム・グルタミクム
<i>ctfA</i>	NP_149326.1	15004866	クロストリジウム・アセトブチリクム
<i>ctfB</i>	NP_149327.1	15004867	クロストリジウム・アセトブチリクム
<i>ctfA</i>	AAP42564.1	31075384	クロストリジウム・サッカロペルブチルアセトニクム
<i>ctfB</i>	AAP42565.1	31075385	クロストリジウム・サッカロペルブチルアセトニクム

【 0 5 4 5 】

嫌気性細菌アシドアミノコッカス・フェルメンタンス由来のグルタコン酸-CoA-トランスフェラーゼ(EC 2.8.3.12)酵素は、二酸グルタコニル-CoA及び3-ブテノイル-CoAと反応する(Mack及びBuckelの文献、FEBS Lett. 405:209-212 (1997))。この酵素をコードしている遺伝子は、*gctA*及び*gctB*である。この酵素は、グルタリル-CoA、2-ヒドロキシグルタリル-CoA、アジピル-CoA及びアクリル-CoAを含む他のCoA誘導体と、低下されているが検出可能な活性を有する(Buckelらの文献、Eur. J. Biochem. 118:315-321 (1981))。この酵素は、クローン化され、E. コリにおいて発現されている(Macらの文献、Eur. J. Biochem. 226:41-51 (1994))。

30

【表 1 2 1】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>gctA</i>	CAA57199.1	559392	アシドアミノコッカス・フェルメンタンス
<i>gctB</i>	CAA57200.1	559393	アシドアミノコッカス・フェルメンタンス

40

【 0 5 4 6 】

(3.1.2.a CoAヒドロラーゼ)

3.1.2系列の酵素は、アシル-CoA分子をそれらの対応する酸に加水分解する。しかし当該酵素は、プロトンポンプ又は直接ATP加水分解などのエネルギー源に結びつけられる場合、CoA-リガーゼ又はシンテターゼ機能を強調するよう(empart)修飾することができる。いくつかの真核細胞アセチル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.1)は、広い基質特異性を有する。例えばラッス・ノルベギクス脳由来の酵素(Robinsonらの文献、Biochem. Biophys. Res

50

. Commun. 71:959-965 (1976))は、ブチリル-CoA、ヘキサノイル-CoA及びマロニル-CoAと反応する。その配列は報告されていないが、エンドウ葉のミトコンドリア由来の該酵素も広い基質特異性を有し、アセチル-CoA、プロピオニル-CoA、ブチリル-CoA、パルミトイル-CoA、オレオイル-CoA、スクシニル-CoA、及びクロトノイル-CoAに対する活性が実証されている(Zeiher及びRandallの文献、Plant. Physiol. 94:20-27 (1990))。S.セレビスシアエ由来のアセチル-CoAヒドロラーゼACH1は、別の候補ヒドロラーゼを表している(Buuらの文献、J. Biol. Chem. 278:17203-17209 (2003))。

【表 1 2 2】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>acot12</i>	NP_570103.1	18543355	ラツス・ノルベギクス
<i>ACH1</i>	NP_009538	6319456	サッカロミセス・セレビスシアエ

10

【 0 5 4 7 】

別の候補ヒドロラーゼは、ヒトジカルボン酸チオエステラーゼ*acot8*であり、これはグルタリル-CoA、アジピル-CoA、スベリル-CoA、セバシル-CoA、及びドデカンジオイル-CoAに対し活性を示し(Westinらの文献、J. Biol. Chem. 280:38125-38132 (2005))、並びに最も近縁のE. コリホモログである*tesB*も広範なCoAチオエステルを加水分解することができる(Naggertらの文献、J. Biol. Chem. 266:11044-11050 (1991))。類似の酵素が、ラット肝において特徴付けられている(Deanaの文献、Biochem. Int. 26:767-773 (1992))。他の潜在的なE. コリチオエステルヒドロラーゼは、遺伝子産物*tesA*(Bonner及びBlochの文献、J. Biol. Chem. 247:3123-3133 (1972))、*ybgC*(Kuznetsovaらの文献、FEMS Microbiol. Rev. 29:263-279 (2005) ; Zhuangらの文献、FEBS Lett. 516:161-163 (2002))、*paal*(Songらの文献、J. Biol. Chem. 281:11028-11038 (2006))、及び*ybdB*(Leducらの文献、J. Bacteriol. 189:7112-7126 (2007))を含む。

20

【表 1 2 3】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>acot8</i>	CAA15502	3191970	ホモ・サピエンス
<i>tesB</i>	NP_414986	16128437	エシェリキア・コリ
<i>acot8</i>	NP_570112	51036669	ラツス・ノルベギクス
<i>tesA</i>	NP_415027	16128478	エシェリキア・コリ
<i>ybgC</i>	NP_415264	16128711	エシェリキア・コリ
<i>paal</i>	NP_415914	16129357	エシェリキア・コリ
<i>ybdB</i>	NP_415129	16128580	エシェリキア・コリ

30

【 0 5 4 8 】

更に別の候補ヒドロラーゼは、アシドアミノコッカス・フェルメンタンス由来のグルタコン酸CoA-トランスフェラーゼである。この酵素は、部位特異的変異誘発により、グルタリル-CoA、アセチル-CoA及び3-ブテノイル-CoAに対し活性があるアシル-CoAヒドロラーゼへ転換された(Mack及びBuckelの文献、FEBS Lett. 405:209-212 (1997))。これは、スクシニル-CoA:3-ケト酸-CoAトランスフェラーゼ及びアセトアセチル-CoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼをコードしている酵素は、同じくこの反応工程に関する候補として働くが、それらの機能を変更するためには恐らく特定の変異が必要であろうということを指摘している。

40

【表 1 2 4】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>gctA</i>	CAA57199.1	559392	アシドアミノコッカス・フェルメンタンス
<i>gctB</i>	CAA57200.1	559393	アシドアミノコッカス・フェルメンタンス

【0 5 4 9】

更なるヒドロラーゼ酵素は、バリン分解時に3-ヒドロキシイソブチリル-CoAの3-ヒドロキシイソ酪酸への変換を効率的に触媒することが説明されている、3-ヒドロキシイソブチリル-CoAヒドロラーゼを含む(Shimomuraらの文献、J. Biol. Chem. 269:14248-14253 (1994))。この酵素をコードしている遺伝子は、ラツス・ノルベギクス(Shimomuraらの文献、前掲(1994)；Shimomuraらの文献、Methods Enzymol. 324:229-240 (2000))及びホモ・サピエンス(Shimomuraらの文献、前掲(1994))の*hibch*を含む。配列相同性による候補遺伝子は、サッカロミセス・セレビシアエの*hibch*及びバシルス・セレウスのBC_2292を含む。

【表 1 2 5】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>hibch</i>	Q5XIE6.2	146324906	ラツス・ノルベギクス
<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	146324905	ホモ・サピエンス
<i>hibch</i>	P28817.2	2506374	サッカロミセス・セレビシアエ
BC_2292	AP09256	29895975	バシルス・セレウス

【0 5 5 0】

(4.1.1.a カルボキシ-リラーゼ)

(アルファ-ケト酸の脱炭酸) アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ(図58、62及び63工程B)、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ(図62工程Z)、及び5-アミノ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ(図63工程R)は全て、アルファ-ケト酸の脱炭酸に関与している。ケト酸の脱炭酸は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.1)、ベンゾイルギ酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.7)、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ及び分枝鎖アルファ-ケト酸デカルボキシラーゼを含む、変動する基質特異性を持つ様々な酵素により触媒される。

【0 5 5 1】

ケト酸デカルボキシラーゼとも称されるピルビン酸デカルボキシラーゼ(PDC)は、アルコール発酵の重要な酵素であり、ピルビン酸のアセトアルデヒドへの脱炭酸を触媒する。サッカロミセス・セレビシアエ由来の該酵素は、2-ケト酪酸、2-ケト吉草酸、3-ヒドロキシピルビン酸及び2-フェニルピルビン酸を含む、脂肪族2-ケト酸に関して広い基質範囲を有する(Davieらの文献、J. Biol. Chem. 267:16601-16606 (1992))。この酵素は、広範囲にわたり研究され、改変された活性に操作され、E. コリにおいて機能性に発現されている(Killenberg-Jabsらの文献、Eur. J. Biochem. 268:1698-1704 (2001)；Li及びJordanの文献、Biochemistry 38:10004-10012 (1999)；ter Schureらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 64:1303-1307 (1998))。pdcによりコードされたザイモモナス・モビルス由来のPDCも、広い基質範囲を有し、様々な基質の親和性を改変するための直接の操作研究の対象である(Siebertらの文献、Protein Eng. Des. Sel. 18:345-357 (2005))。この酵素の結晶構造は、入手可能である(Killenberg-Jabsらの文献、Eur. J. Biochem. 268:1698-1704 (2001))。他の良く特徴付けられたPDC候補は、アセトバクター・パステウリアンス(Chandraらの文献、Arch. Microbiol. 176:443-451 (2001))及びクルイペロマイセス・ラクチス(Kriegerらの文献、Eur. J. Biochem. 269:3256-3263 (2002))由来の酵素を含む。

【表 1 2 6】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>pdC</i>	P06672.1	118391	ザイモナス・モビルス
<i>pdC1</i>	P06169	30923172	サッカロミセス・セレピシアエ
<i>pdC</i>	AM21208	20385191	アセトバクター・パステウリアンス
<i>pdC1</i>	Q12629	52788279	クルイベロマイセス・ラクチス

【 0 5 5 2 】

10

PDC同様、ベンゾイルギ酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.7)は、広い基質範囲を有し、かつ酵素工学研究の標的である。シュードモナス・ブチダ由来の酵素は、広範囲に研究され、この酵素の結晶構造は入手可能である(Hassonらの文献、Biochemistry 37:9918-9930 (1998); Polovnikovaらの文献、Biochemistry 42:1820-1830 (2003))。シュードモナス・ブチダ酵素の活性部位の2つの残基の部位特異的変異誘発は、天然及び非天然基質の親和性(Km)を変更した(Siegertらの文献、Protein Eng. Des. Sel. 18:345-357 (2005))。この酵素の特性は更に、直接操作により修飾される(Lingenらの文献、Protein Eng. 15:585-593 (2002); Lingenらの文献、Chembiochem. 4:721-726 (2003))。mdlCによりコードされるシュードモナス・アエルギノサ由来の酵素も実験により特徴付けられている(Barrowmanらの文献、FEMS Microbiol. Lett. 34:57-60 (1986))。シュードモナス・ストゼリ、シュードモナス・フルオレセンス及び他の生物体由来の追加の遺伝子候補は、配列相同性により推定されるか、又はシュードモナス・ブチダにおいて開発された成長選択システムを用い同定され得る(Henningらの文献、Appl. Environ. Microbiol. 72:7510-7517 (2006))。

20

【表 1 2 7】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>mdlC</i>	P20906.2	3915757	シュードモナス・ブチダ
<i>mdlC</i>	Q9HUR2.1	81539678	シュードモナス・アエルギノサ
<i>dpgB</i>	ABN80423.1	126202187	シュードモナス・ストゼリ
<i>ilvB-1</i>	YP_260581.1	70730840	シュードモナス・フルオレセンス

30

【 0 5 5 3 】

2-オキソ酸の脱炭酸が可能である第三の酵素は、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ(KGD)である。このクラスの酵素の基質範囲は、今日まで研究されていない。マイコバクテリウム・ツベルクローシス由来のKDC(Tianらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:10670-10675 (2005))が、クローン化され、且つ機能性に発現されている。しかしこれは、巨大であり(~130kD)且つGC-リッチであるので、菌株操作の理想的な候補ではない。KDC酵素活性は、ブラディリゾビウム・ジャボニカム及びメソリゾビウム・ロティを含む根粒菌のいくつかの種で検出されている(Greenらの文献、J. Bacteriol. 182:2838-2844 (2000))。KDC-コード遺伝子は、これらの生物体で単離されてはいないが、そのゲノム配列は入手可能であり、且つ各ゲノムのいくつかの遺伝子は推定KDCとして注釈されている。ユーグレナ・グラシリス由来のKDCも特徴決定されているが、この活性に関連した遺伝子は今日まで同定されていない(Shigeoka及びNakanoの文献、Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28 (1991))。N-末端から始まる最初の20個のアミノ酸を配列決定した(MTYKAPV KDVKFLLDKVFKV; 配列番号:)(Shigeoka及びNakanoの文献、Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28 (1991))。この遺伝子は、KDC活性に関しこのN-末端配列を含む候補遺伝子を試験することにより、同定され得た。

40

【表 1 2 8】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>kgd</i>	O50463.4	160395583	マイコバクテリウム・ツベルクローシス
<i>kgd</i>	NP_767092.1	27375563	ブラディリゾビウム・ジャポニカム
<i>kgd</i>	NP_105204.1	13473636	メソリゾビウム・ロティ

【 0 5 5 4 】

この反応を触媒する第四の候補酵素は、分枝鎖アルファ-ケト酸デカルボキシラーゼ (BC 10
KA) である。このクラスの酵素は、鎖長が炭素3~6個を変動する様々な化合物に作用する
ことが示されている (Oku及びKanedaの文献、J. Biol. Chem. 263:18386-18396 (1988) ; S
mit, B. A., J. E. Hylckama Vlieg, W. J. Engels, L. Meijer, J. T. Wouters, 及びG.
Smit.らの文献、「風味形成に関与したラクトコッカス・ラクチスの分枝鎖アルファ-ケ
ト酸デカルボキシラーゼの同定、クローン化及び特徴決定 (Identification, cloning, an
d characterization of a Lactococcus lactis branched-chain alpha-keto acid decarbo
xylase involved in flavor formation)」、Appl. Environ. Microbiol. 71:303-311 (20
05))。ラクトコッカス・ラクチスの酵素は、2-オキソブタン酸、2-オキソヘキサン酸、2-
オキソペンタン酸、3-メチル-2-オキソブタン酸、4-メチル-2-オキソブタン酸及びイソカ
プロン酸を含む様々な分枝鎖及び直鎖基質において特徴付けられている (Smitらの文献、A
ppl. Environ. Microbiol. 71:303-311 (2005))。この酵素は、構造的に特徴付けられて
いる (Bergらの文献、Science 318:1782-1786 (2007))。ラクトコッカス・ラクチス酵素と
ザイモモナス・モビルスのピルビン酸デカルボキシラーゼの間の配列のアラインメントは
、触媒残基及び基質認識残基が近くに同定され (Siegertらの文献、Protein Eng. Des. Se
l. 18:345-357 (2005))、そのためこの酵素は指向された操作のための有望な候補である
ことを指摘している。アルファ-ケトグルタル酸のBCKAによる脱炭酸は、バシルス・スプ
チリスにおいて検出されたが ; しかしこの活性は、他の分枝鎖基質に対する活性に比べ低
く (5%) (Oku及びKanedaの文献、「バシルス・スプチリスにおける分枝鎖脂肪酸の生合成
。分枝鎖脂肪酸シンテターゼに必須のデカルボキシラーゼ (Biosynthesis of branched-ch
ain fatty acids in Bacillus subtilis. A decarboxylase is essential for branched-
chain fatty acid synthetase)」、J. Biol. Chem. 263:18386-18396 (1988))、及びこの
酵素をコードしている遺伝子は、今日まで同定されていない。更なるBCKA遺伝子候補は、
ラクトコッカス・ラクチスタンパク質配列への相同性により同定され得る。この酵素に対
する多くのハイスコアBLASTpヒットは、インドールピルビン酸デカルボキシラーゼ (EC 4.
1.1.74) として注釈される。インドールピルビン酸デカルボキシラーゼ (IPDA) は、植物及
び植物細菌において、インドールピルビン酸のインドールアセトアルデヒドへの脱炭酸を
触媒する酵素である。

【表 1 2 9】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>kdcA</i>	AAS49166.1	44921617	ラクトコッカス・ラクチス

【 0 5 5 5 】

ホモ・サピエンスとボス・タウラス由来のミトコンドリア分枝鎖ケト酸デヒドロゲナー
ゼ複合体のE1サブユニットから誘導された組換え分枝鎖アルファ-ケト酸デカルボキシラ
ーゼ酵素がクローン化され、且つE. コリにおいて機能性に発現された (Davieらの文献、J.
Biol. Chem. 267:16601-16606 (1992) ; Wynnらの文献、J. Biol. Chem. 267:1881-1887
(1992) ; Wynnらの文献、J. Biol. Chem. 267:12400-12403 (1992))。これらの研究におい
て、著者らは、シャペロニンGroEL及びGroESの同時発現は、デカルボキシラーゼの比活性

10

20

30

40

50

を500倍増強することを発見した(Wynnらの文献、J. Biol. Chem. 267:12400-12403 (1992))。これらの酵素は、2つのアルファサブユニット及び2つのベータサブユニットで構成される。

【表 1 3 0】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>BCKDHB</i>	NP_898871.1	34101272	ホモ・サピエンス
<i>BCKDHA</i>	NP_000700.1	11386135	ホモ・サピエンス
<i>BCKDHB</i>	P21839	115502434	ボス・タウラス
<i>BCKDHA</i>	P11178	129030	ボス・タウラス

10

【 0 5 5 6】

(アルファ-ケト酸の脱炭酸) いくつかのオルニチンデカルボキシラーゼ(図63工程U)酵素も、リジン及び他の類似化合物に対する活性を示す。当該酵素は、ニコチアナ・グルチノサ(Lee及びChoの文献、Biochem. J. 360:657-665 (2001))、ラクトバシルス種30a(Guirard及びSnellの文献、J. Biol. Chem. 255:5960-5964 (1980))及びビブリオ・バルニフィカス(Leeらの文献、J. Biol. Chem. 282:27115-27125 (2007))において認められる。ラクトバシルス種30a由来の酵素(Momanyらの文献、J. Mol. Biol. 252:643-655 (1995))及びV. バルニフィカス由来の酵素は、結晶化されている。V. バルニフィカス酵素は、リジン脱炭酸を効率的に触媒し、基質特異性に関与した残基が解明されている(Leeらの文献、J. Biol. Chem. 282:27115-27125 (2007))。同様の酵素が、トリコモナス・バギナリスにおいて特徴付けられたが、この酵素をコードしている遺伝子は不明である(Yarlettらの文献、Biochem. J. 293 (Pt 2):487-493 (1993))。

20

【表 1 3 1】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>AF323910.1:1..1299</i>	AAG45222.1	12007488	ニコチアナ・グルチノサ
<i>odc1</i>	P43099.2	1169251	ラクトバシルス種30a
<i>VV2_1235</i>	NP_763142.1	27367615	ビブリオ・バルニフィカス

30

【 0 5 5 7】

グルタミン酸デカルボキシラーゼ酵素(図62及び63工程L)も、良く特徴付けられている。例示的グルタミン酸デカルボキシラーゼは、E. コリ(De Biaseらの文献、Protein Expr. Purif. 8:430-438 (1996))、S. セレビシアエ(Colemanらの文献、J. Biol. Chem. 276:244-250 (2001))、及びホモ・サピエンス(Buらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2115-2119 (1992); Bu及びTobinの文献、Genomics 21:222-228 (1994))において認められる。

【表 1 3 2】

40

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>GAD1</i>	NP_000808	58331246	ホモ・サピエンス
<i>GAD2</i>	NP_001127838	197276620	ホモ・サピエンス
<i>gadA</i>	NP_417974	16131389	エシェリキア・コリ
<i>gadB</i>	NP_416010	16129452	エシェリキア・コリ
<i>GAD1</i>	NP_013976	6323905	サッカロミセス・セレビシアエ

【 0 5 5 8】

50

リジンデカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.18)は、リジンのカダベリンへの脱炭酸を触媒する。この酵素の2つのアイソザイムは、遺伝子*cadA*及び*ldcC*により、*E. コリゲノム*においてコードされている。*CadA*は、酸耐性に関連し、*cadC*遺伝子産物による正の調節を受ける(Lemonnier及びLaneの文献、Microbiology 144 (Pt 3):751-760 (1998))。*CadC*は、代替基質としてヒドロキシリジン及びS-アミノエチルシステインを受け入れ、2-アミノピメリン酸及び6-ACAはこの酵素の競合阻害因子として作用する(Saboらの文献、Biochemistry 13:662-670 (1974))。定方向進化又は他の酵素工学的方法を利用し、2-アミノピメリン酸を脱炭酸するこの酵素の活性を増大することができる。構成的に発現された*ldc*遺伝子産物は、*CadA*よりも活性が低い(Lemonnier及びLaneの文献、Microbiology 144 (Pt 3):751-760 (1998))。*CadA*に対し類似のリジンデカルボキシラーゼが、最近、*ビブリオ・パラヘモリチカス*において同定された(Tanakaらの文献、J. Appl. Microbiol. 104:1283-1293 (2008))。*ldc*によりコードされたセレノモナス・ルミナンチウム由来のリジンデカルボキシラーゼは、真核細胞オルニチンデカルボキシラーゼに対する配列類似性を生じ、L-リジン及びL-オルニチンの両方を基質として受け入れる(Takatsukaらの文献、Biosci. Biotechnol. Biochem. 63:1843-1846 (1999))。活性部位残基が同定され、該酵素の基質特異性を改変するように操作された(Takatsukaらの文献、J. Bacteriol. 182:6732-6741 (2000))。

10

【表 1 3 3】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>cadA</i>	AAA23536.1	145458	エシェリキア・コリ
<i>ldcC</i>	AAC73297.1	1786384	エシェリキア・コリ
<i>ldc</i>	O50657.1	13124043	セレノモナス・ルミナンチウム
<i>cadA</i>	AB124819.1	44886078	ビブリオ・パラヘモリチカス

20

【 0 5 5 9 】

(6.2.1.a CoAシンテターゼ)

CoAシンテターゼ又はリガーゼの反応は、図62及び63の工程I、並びに図62の工程Vにより必要とされる。コハク酸又は4-ヒドロキシ酪酸は、必要な基質である。恐らくこれらの転換を実行するために酵素をコードしている例示的遺伝子は、スクシニル-CoAシンテターゼ複合体を天然に形成する*E. コリ*の*sucCD*遺伝子を含む。この酵素複合体は、1個のATPの同時消費によりコハク酸からスクシニル-CoAの形成を天然に触媒し、その反応はインビボにおいて可逆性である(Buckらの文献、Biochem. 24:6245-6252 (1985))。

30

【表 1 3 4】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>sucC</i>	NP_415256.1	16128703	エシェリキア・コリ
<i>sucD</i>	AAC73823.1	1786949	エシェリキア・コリ

40

【 0 5 6 0 】

追加の例示的CoA-リガーゼは、その配列は未だ特徴付けられていないラットのジカルボン酸-CoAリガーゼ(Vamecqらの文献、Biochemical J. 230:683-693 (1985))、*P. クリソゲヌム*由来の2つの特徴付けられたフェニル酢酸-CoAリガーゼのいずれか(Lamas-Maceirasらの文献、Biochem. J. 395:147-155 (2005) ; Wangらの文献、Biochem Biophys Res Commun 360(2):453-458 (2007))、シュードモナス・ブチダ由来のフェニル酢酸-CoAリガーゼ(Martinez-Blancoらの文献、J. Biol. Chem. 265:7084-7090 (1990))、及びバシルス・スプチリス由来の6-カルボキシヘキサノ酸-CoAリガーゼ(Boweretらの文献、J. Bacteriol. 178(14):4122-4130 (1996))を含む。更なる候補酵素は、ムス・ムスキュラス(Hasegawaらの文

50

献、Biochim. Biophys. Acta 1779:414-419 (2008))及びホモ・サピエンス(Ohgamiらの文献、Biochem. Pharmacol. 65:989-994 (2003))由来のアセトアセチル-CoAシンターゼであり、これらは天然にアセト酢酸のアセトアセチル-CoAへのATP依存性変換を触媒する。4-ヒドロキシブチリル-CoAシンターゼ活性は、メタロスファエラ・セデュラにおいて実証されている(Bergらの文献、Science 318:1782-1786 (2007))。この機能は、Msed_1422遺伝子に暫定的に割り当てられている。

【表 1 3 5】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>phl</i>	CAJ15517.1	77019264	ペニシリウム・クリソゲヌム
<i>phlB</i>	ABS19624.1	152002983	ペニシリウム・クリソゲヌム
<i>paaF</i>	AAC24333.2	22711873	シュードモナス・プチダ
<i>bioW</i>	NP_390902.2	50812281	バシルス・スプチリス
<i>AACS</i>	NP_084486.1	21313520	ムス・ムスキュラス
<i>AACS</i>	NP_076417.2	31982927	ホモ・サピエンス
<i>Msed_1422</i>	YP_001191504	146304188	メタロスファエラ・セデュラ

10

【 0 5 6 1】

20

ADP-形成するアセチル-CoAシンターゼ(ACD, EC 6.2.1.13)は、アシル-CoA エステルのそれらの対応する酸への変換をATPの同時合成と連結する別の候補酵素である。広い基質特異性を持ついくつかの酵素が文献に説明されている。AF1211によりコードされたアルカエオグロブス・フルギダス由来のACD Iは、アセチル-CoA、プロピオンル-CoA、ブチリル-CoA、酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸、イソ吉草酸、コハク酸、フマル酸、フェニル酢酸、インドール酢酸を含む様々な直鎖及び分枝鎖基質に作用することが示された(Musfeldtらの文献、J. Bacteriol. 184:636-644 (2002))。ハロアーキュラ・マリスモルツイ由来の酵素(スクシニル-CoAシンターゼと注釈された)は、基質としてプロピオン酸、酪酸、及び分枝鎖酸(イソ吉草酸及びイソ酪酸)を受け入れ、且つ前向き及び後ろ向きに作用することが示された(Brasenらの文献、Arch. Microbiol. 182:277-287 (2004))。超好熱性古細菌(crenarchaeon)ピロバキュラム・アエロフィラム由来のPAE3250によりコードされたACDは、全ての特徴付けられたACDの最も広い基質範囲を示し、アセチル-CoA、イソブチリル-CoA(好ましい基質)及びフェニルアセチル-CoAと反応する(Brasenらの文献、前掲(2004))。A.フルギダス、H.マリスモルツイ及びP.アエロフィラム由来の酵素は全て、クローン化され、機能的に発現され、且つE.コリにおいて特徴付けられた(Musfeldtらの文献、前掲; Brasenらの文献、前掲(2004))。

30

【表 1 3 6】

遺伝子	寄託番号	遺伝子識別番号	生物体
<i>AF1211</i>	NP_070039.1	11498810	アルカエオグロブス・フルギダスDSM 4304
<i>scs</i>	YP_135572.1	55377722	ハロアーキュラ・マリスモルツイATCC 43049
<i>PAE3250</i>	NP_560604.1	18313937	ピロバキュラム・アエロフィラム株 IM2

40

【 0 5 6 2】

(実施例XXIII)

(カルボン酸レダクターゼを利用するBDO生成)

本実施例は、カルボン酸レダクターゼ酵素を用い1,4-ブタンジオールを生成する微生物体の作製を説明する。

【 0 5 6 3】

50

エシェリキア・コリは、図58に説明された1,4-ブタンジオール合成経路を操作するための、標的生物体として使用される。E.コリは、1,4-ブタンジオールを生成することが可能である非天然微生物を作製する良好な宿主を提供する。E.コリは、遺伝子操作され易く、且つ様々な酸素化条件下で、エタノール、酢酸、ギ酸、乳酸、及びコハク酸などの様々な生成物を効果的に生成することが可能であることがわかっている。

【0564】

(4-ヒドロキシ酪酸経路遺伝子の染色体への組み込み：ECKh-432の構築) カルボン酸レダクターゼ酵素は、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ酵素をコードしているsad及びgabD遺伝子の更なる欠失を伴うECKh-432の子孫であるECKh-761と命名されたE.コリ株において発現された。この菌株は、4HBにつながるBDO経路の構成成分を含み、これは実施例XXIに説明されたように、fimD座でE.コリの染色体に組み込まれた。

10

【0565】

(カルボン酸レダクターゼ及びPPTaseのクローン化及び発現) 1,4-ブタンジオールを生成するように操作されたE.コリ株を作製するために、カルボン酸レダクターゼ及びホスホアンテイトランスフェラーゼをコードしている核酸を、周知の分子生物学技術を用い、E.コリにおいて発現した(例えば、Sambrookの文献、前掲、2001; Ausubelの文献、前掲、1999参照)。特に、ノカルジア・イオウエンシス由来のcar遺伝子(720と命名)、マイコバクテリウム・スメグマチスmc(2)155(890と命名)、マイコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスK-10(891と命名)及びマイコバクテリウム・マリヌムM(892と命名)を、PA1/lacOプロモーターの制御下で、pZS*13ベクター(Expressys、リュルツハイム、ドイツ)にクローン化した。npt(ABI83656.1)遺伝子(すなわち721)は、当初のミニ-FプラスミドベクターPML31の誘導體であるpKJL33Sベクターへ、pZS*13において使用されるものと同様のプロモーター及びリボソーム結合部位の制御下でクローン化した。

20

【0566】

car遺伝子(GNM_720)は、ノカルジアゲノムDNAからPCRによりクローン化した。その核酸配列及びタンパク質配列を、各々、図59A及び59Bに示した。npt遺伝子のコドン-最適化型(GNM_721)を、GeneArt(レーゲンスブルグ、ドイツ)により合成した。その核酸配列及びタンパク質配列を、各々、図60A及び60Bに示した。マイコバクテリウム・スメグマチスmc(2)155(890と命名)、マイコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスK-10(891と命名)及びマイコバクテリウム・マリヌムM(892と命名)の遺伝子及び酵素の核酸配列及びタンパク質配列は、各々、図64、65、及び66に認めることができる。これらのプラスミドは、ECKh-761に形質転換され、1,4-ブタンジオール生成に必要なタンパク質及び酵素を発現した。

30

【0567】

(カルボン酸レダクターゼを使用する1,4-BDO生成の証明) 1,4-ブタンジオール経路の機能的発現をE.コリ全細胞培養を用い実証した。各々、car遺伝子及びGNM_721を含むpZS*13及びpKJL33Sプラスミドで形質転換されたE.コリECKh-761の単独コロニーを、適宜抗生物質を含有するLB培地5mLに接種した。同様に、挿入断片のないcar-含有pZS*13プラスミド及びpKJL33Sプラスミドにより形質転換されたE.コリECKh-761の単独コロニーを、適宜抗生物質を含有するLB培地の更なる5mLアリコートに接種した。微好気性培養物10mLを、第一の培養物1.5%と共に適宜抗生物質を含む新鮮な最小インビボ変換培地(下記参照)の接種により培養開始した：

40

【0568】

最小インビボ変換培地の調製(1000mLについて)は以下である：

【表 1 3 7】

	最終濃度
1M MOPS/KOH 緩衝液	100 mM
グルコース (40%)	1%
10XM9 塩溶液	1X
MgSO ₄ (1 M)	1 mM
微量無機物 (x1000)	1X
1M NaHCO ₃	10 mM

【0 5 6 9】

10

最初に蓋付き嫌気性ボトルに5分間にわたって窒素を流し、次いで接種後に18Gニードルで隔壁に穴をあけることによって微好気性条件を確立した。成長時にニードルをボトル内に維持して、少量の空気をボトルに導入させた。培養物が中対数成長期に達すると、0.2mMのIPTGを用いてタンパク質発現を誘導した。この時点をも、時間 = 0時と見なす。培養物上澄みを、前記及びWO2008115840に記載のように、BDO、4HB、及び他の副産物について分析した(表31参照)。

【0 5 7 0】

表33は、BDOの生成を含む、様々なカルボン酸レダクターゼを発現している菌株の様々な生成物の生成を示す。

【0 5 7 1】

20

表33. 様々なカルボン酸レダクターゼを発現している菌株の様々な生成物の生成

【表 1 3 8】

					0 h		
	菌株	Cm10 pKLJ33S	Carb100 pZS*13S	Carb100 pZShc13S	OD600	OD600	
1	761	034rbs55	インサートなし		0.54	2.13	
5	761	721	720		0.48	1.88	
7	761	721	890		0.45	1.63	
8	761	721	891		0.48	1.65	
9	761	721	892		0.45	1.31	
12	761	インサートなし	720		0.50	1.72	
14	761	インサートなし	890		0.51	1.96	
15	761	インサートなし	891		0.19	2.36	
16	761	インサートなし	892		0.05	1.40	
48 h							
48 h, mM							
	PA	Su	La	4HB	BDO	GBL	EtOH _{Enz}
1	10.60	0.00	0.20	8.08	2.40	2.97	0.65
5	3.41	0.00	0.02	6.93	8.53	0.24	1.82
7	0.00	0.00	0.00	6.26	12.30	0.47	5.85
8	2.16	0.00	0.00	7.61	9.08	0.46	2.84
9	0.36	0.00	0.00	5.89	7.83	0.15	2.89
12	8.30	0.00	0.13	9.91	1.99	0.14	0.64
14	2.57	0.00	0.01	9.77	3.53	0.14	1.44
15	1.73	0.00	0.00	9.71	2.68	0.10	0.79
16	0.02	0.00	0.00	10.80	1.30	0.07	0.55
48 h, mM/OD							
	PA	Su	La	4HB	BDO	GBL	EtOH _{Enz}
1	4.98	0.00	0.09	3.80	1.13	1.40	0.31
5	1.81	0.00	0.01	3.69	4.54	0.13	0.97
7	0.00	0.00	0.00	3.84	7.55	0.29	3.59
8	1.31	0.00	0.00	4.61	5.50	0.28	1.72
9	0.27	0.00	0.00	4.50	5.99	0.12	2.21
12	4.83	0.00	0.07	5.76	1.16	0.08	0.37
14	1.31	0.00	0.01	4.99	1.80	0.07	0.74
15	0.73	0.00	0.00	4.11	1.13	0.04	0.33
16	0.01	0.00	0.00	7.71	0.93	0.05	0.39

PA = ビルビン酸、SA = コハク酸、LA = 乳酸、4HB = 4-ヒドロキシ酪酸、BDO = 1,4-ブタンジオール、GBL = ガンマ-ブチロラクトン、Etoh = エタノール、LLOQ = 定量下限

【0 5 7 2】

これらの結果は、様々なカルボン酸レダクターゼは、BDO経路において機能し、BDOを生成することができることを示している。

【0 5 7 3】

本出願全体を通じて、様々な刊行物を参照した。GenBank及びGI公開番号を含む、その全体におけるこれらの刊行物の開示内容は、本発明が関係する技術分野の状況をより十分に説明するために、本出願において引用により本明細書に組み込まれている。本発明を、先に示した実施例に関して説明したが、本発明の精神から逸脱することなく様々な修正を加えることができることが理解されるべきである。

【 図 1 】

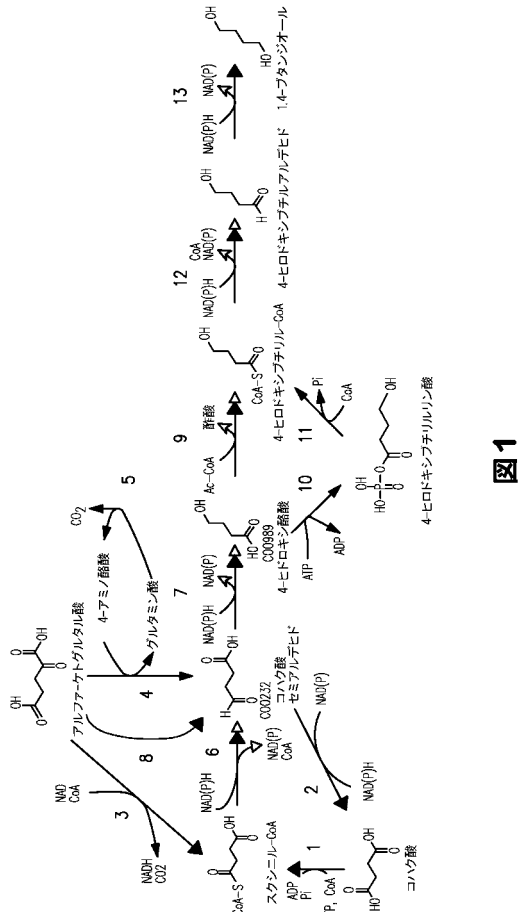


図 1

【 図 2 】

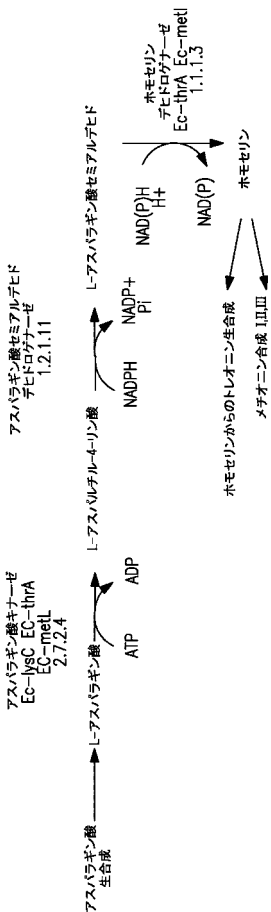


図 2

【 図 3 】

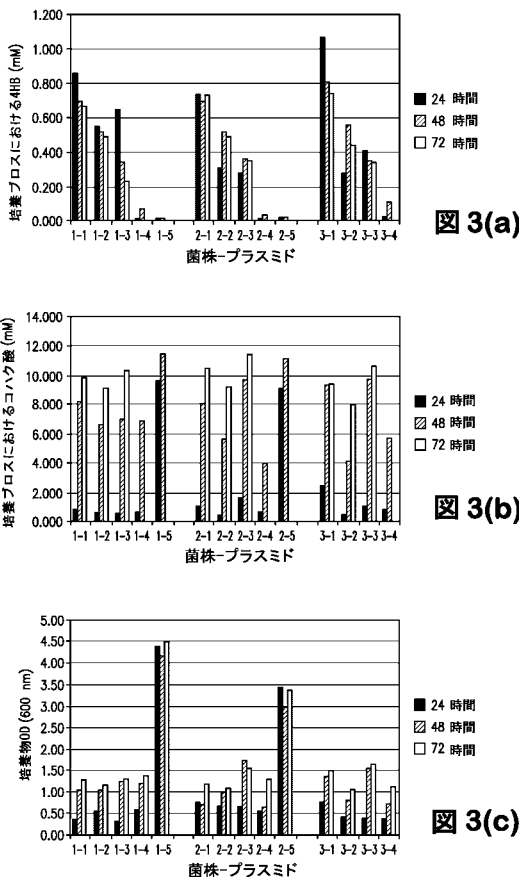


図 3(a)

図 3(b)

図 3(c)

【 図 4 】

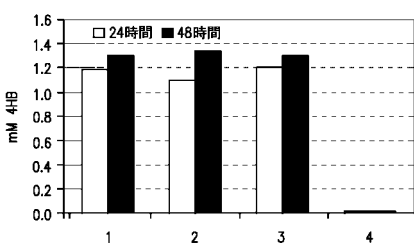


図 4

【 図 5 】

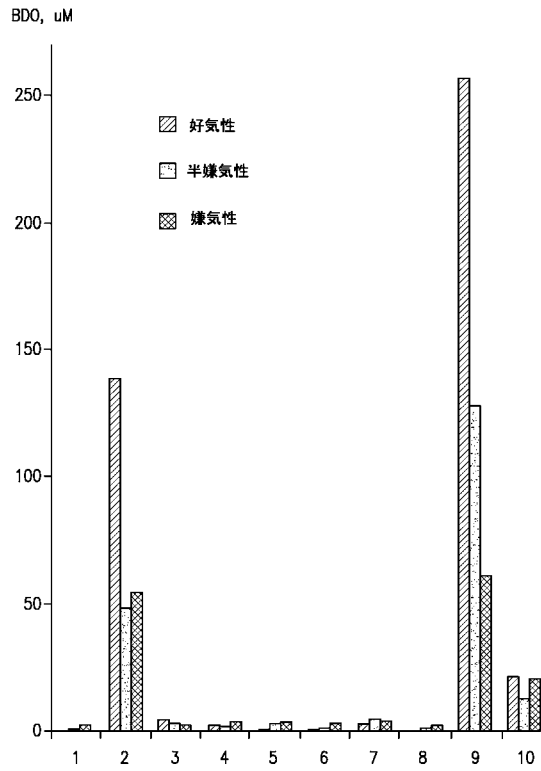


図 5

【 図 6 】

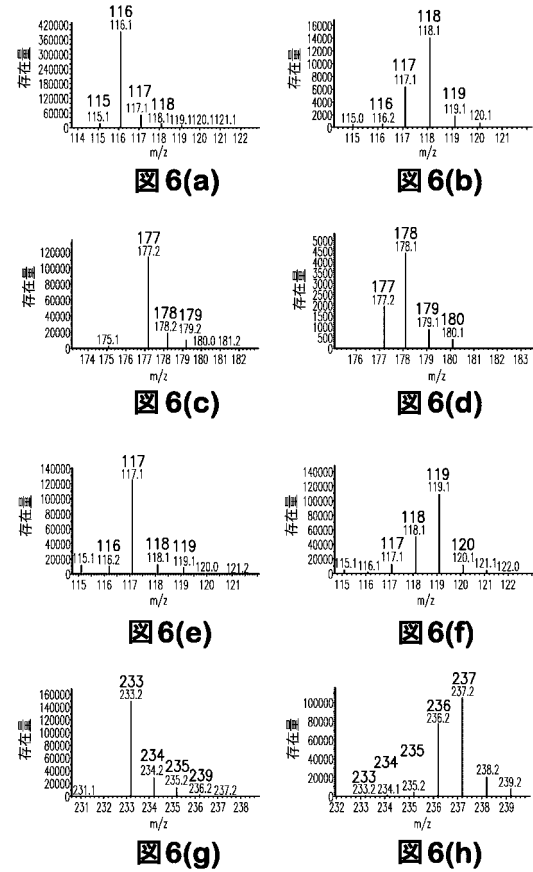


図 6(a)

図 6(b)

図 6(c)

図 6(d)

図 6(e)

図 6(f)

図 6(g)

図 6(h)

【 図 7 】

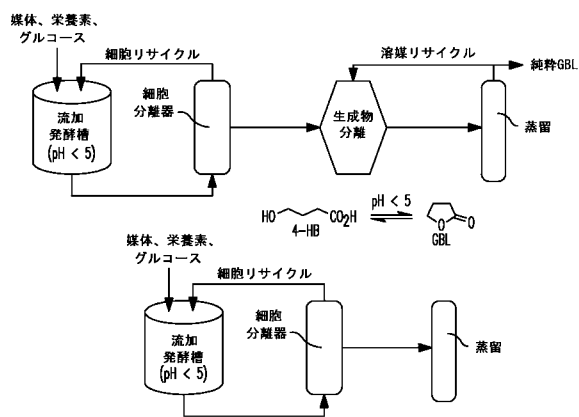


図 7

【 図 8 】

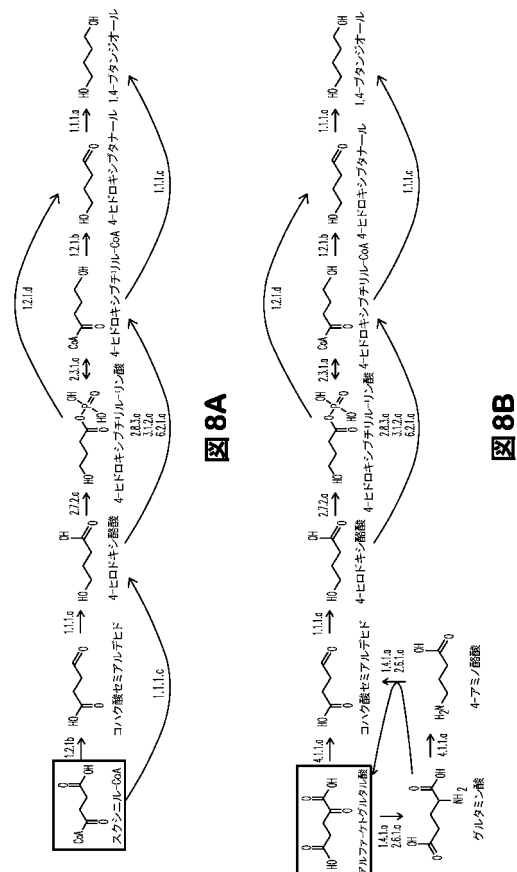


図 8A

図 8B

【図 9 A】

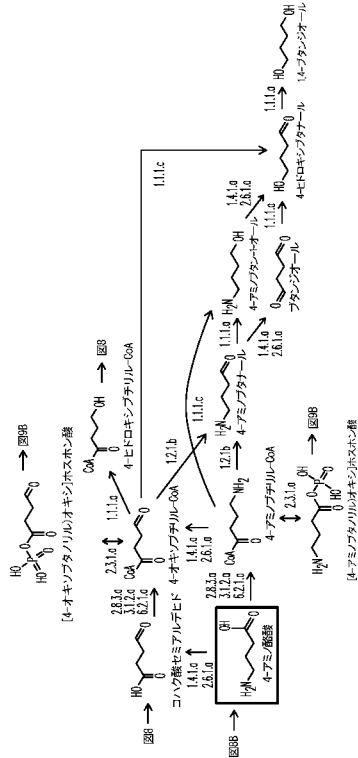


図 9A

【図 9 B - C】

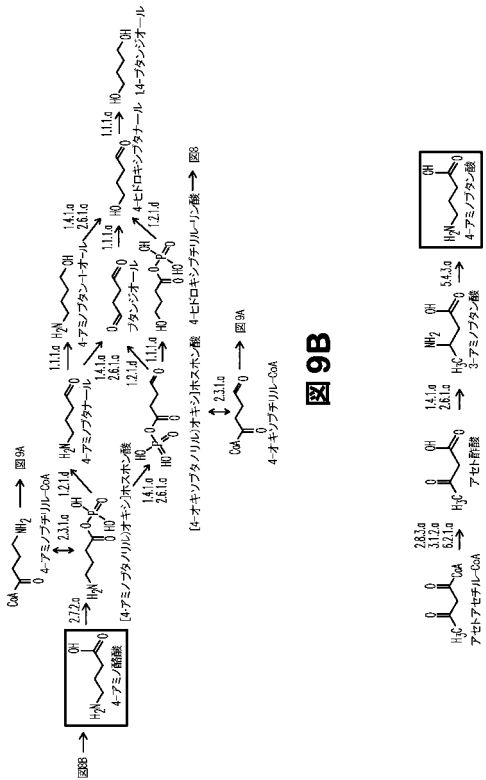


図 9B

図 9C

【図 1 0】

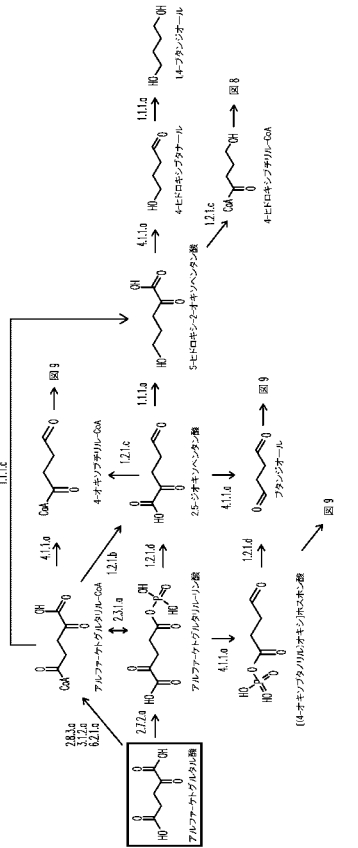


図 10

【図 1 1】

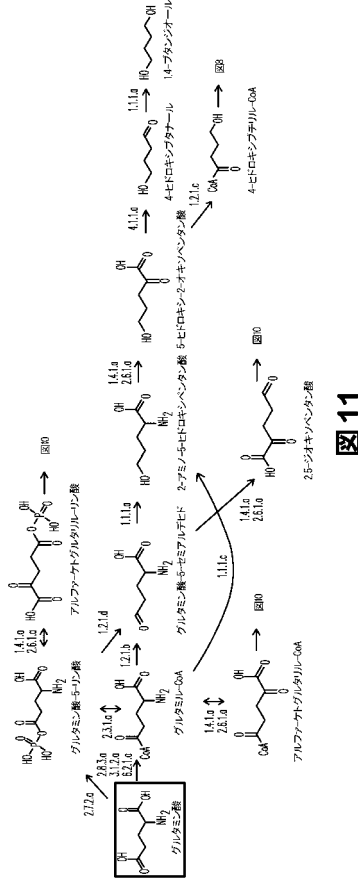


図 11

【 ㊦ 1 3 】



【 図 1 5 - 1 】

C. MSILDKNTKVICQGFSGTGHSEQAIAYGTKMVGVTGPKGGKTHLGLPVFNTVREAAVATGASVIV
VPAPFKCDLSLEIADAGIKLITTEIGPTLDMLTVKYKLEAGVRMIGPCPGVITGCEKIQGPQHIHKPGKV
GHVSRGTLTYEAVQKTTDYGFGQSTCVGIGDPGPGNFIDILEFKDPQTAEIVMIGEGGSAEEEAAYIK
EIVTSPPVVGAGVTAPKGRMGHAGAIAGGKGTAEKFAALEAGVCTVRSLADIGEALTKLVK



【 図 1 5 - 1 】

A.
ATGGCCAAATCAATCTTACCATTCTGGGCAAGCAAGTGGTGTTGAAGAGATGTACCGCAAGTTTCCG
GACGACCCCTCTTGCTGTATCCGATGCCATGGCAGGACTCTCTGGTATACAGCCGCCAACCCCTCCCT
AACCACTGCGCAGCAACCAACCCGGGTACTCTGCCACTGTTGCCGAGCGGGCGCTCGCGCGCCGCCG
AGGCACCCCAAGCCCGGCCGACACCGCGCGCGGCGACCGCGCTGCTGCCGACTGGCCGCCCAAA
ATCTCCGTTTCCCCCGCAGCGAAGGTGACGAGGTAGCGTGTGTCGGCGCGCGCCGCGCGCTGTCT
CAGAAGAATCTGCGCGTGTGGAGGTGGCCAGCGGACGAGCGTCCGGCGGCTCCGGCACAAGTCACT
TGATCGAACATCCGGATGTCATCAACCAACATTTGAAGCCAGCCCGCGCGGAAGTATGTCTACCTG
ATTGTCGGGTCAAGCCCTGGTGACGGCGGTGAAGAAATTTCCGAACATGAACCGGCATACACCGAA
GTGCAGCGCAAGCCGACCGCGGTGACCGCGCGCGGACCAACCAATCTGGCGTGTGACGTGACGTGCAAG
CAGGACCGGGAAGTCTCTCTGGTGGCGGCGTCAACGCGCTGCGAGCACTGATGATTCGGCGACT
TCGTCAAGCGCTACGAAAGATCATGACGCGCGCGCGCGACGCAAGCTGACCACTGAAGATTTTGGCG
CGGTGACGATTTCTGCGCATCTCGGGAACATCGGCACGTGATCTCTGGTGCAGCGCTGATGCCG
CGAGGCGGCGCATCATCGCGTGGCGGCGCAATGAACTACCGCGGAGTTTCAAGCGCGCAGGACGAGCG
CGCATCGCGAGCTGGGATCGGCAATCTCACTTTCAGTCTCTACGATGACGACACCGCATTCAGG
CGCGGGAATCGGCGCACTTCTCGGCGACCATCATCGAGTGTCTCTCTGAGGAGTCTTGGGAGCGAG
TCTTCTCGGAATGAGCATCTCAATCTCTCGCGGTGCGTGAGACACGCAACCCCGCATCGATCTGCG
ACGAAGAAGCTCGGCTGCTCAATTTGATCGGCGCTACCGCAACCGCGGCATCTGATGGCCGATCGC
ACCCGCTCGCGTGTGACAAGAGCTGTTTCCGCGAGTCAACCCGACCTCGGAGTGTGACCCACGCGTCA
CGCTGTGGGATCTCGATCGGGTGTGTTACCGGCTTGAGCGGCTTTCGGGTGCGCATGACAAGAACTGCG
GACGTGTCGGGCTGTGTCGCGATGCTACTGTCCGCACTCGGCTGGAGTACCGCATATCTCTGAC
CGCAACCAAAAGAGTGTCGTCGAACACCGGTTGAGACACAGCAAGCAGTCAAAACCACTGTGGCCCA
GAATATCAATCTCAGCAAGTCAACCGCGCGAGCGCTTGAAGAGTCTTACACGACCAAGTACGTGCG
CAGAAAGGAGTCTCTCGTGCGAGCGCGCAAGAGCTGATCCGATGATGAGCGCGGCTGACGACTGT
GCGTGAAGCAGCGCTCGACGAGTGTTGTCAGGAGTCGCGACGCGGCGCGCTCAAGTGTCTGGC
AATCATCTGCGCAAGCGCTATCGAGATCTTACACGAGTGTGAGGCGCAAGTGAATCTGCGCAGGCG
CAGCGCTCTGGTGACGTCAAGTACGATCTGGCGCGCAGCGGCTGACTCTCACTGATTTCTGGCGACA
GACATTCAGTGTCTGCTGACCGCAACCTGCTGCATCTGGAGGCTGCTGACCGGCTGCTGGAGGAA
GTGGCGGCGCAAGCAGATCTGCTGACCAAGCAAGCATCGACGACGCGGCAAGCGGCTGCTTCGG
TGTGCGCTGATTTGGTGCGGATCGGCTGCTGCGGTCAGGTTGTGTCGCGAGACGCTGAA
CTGGCGAATCTGGGATGACGCGCTGCGCGCGGCAAGTCAACATCATCTCAACCAAGCATGGCTT
ACACCGCGCGAGATATTCAGGTCGACGAGTACGTCACCGAGTCTGCGGAGTGTGCGGCGACCC
GACTTTTCAGCTCAACCGGACGACCGGAGCGCTGTGTCGGTGGCGGCTGTCGGTGAGGCTG
GACAACGGTCAAGAAGACGCTGCTATCGACATGCTGTACCGCCGCGCGGCGCAACGAGGGT
GACGACCGCTCGATGACCAACCTCATATGTACGACTGCTGTCGACACACCGCGCGGGCGCCCAAA
TCAACCGAAGCTGATCGGACGTGGCAATCTCGATGAAGAGGCGGAGGACGCGCTGCGGACT
ACAGGCTGCGGATCGGAACCGGTTCAACGAGTCCGGGACTGGAGAAGACAGGTGTGACGACGCT
CAGTGTGCTGASTCGGACAGAGATGATTCCTGGCGGGCTGGCATCTCGTGTGAGCAAGTGTGCTGTG
TCGGATCGGCGATCGTCTCTCGCTTCCGAACCGGCTACCGCGGACCCCGGAGTCAACCGGTC
TGGGAAGCGCCGGAGAGTGCTTGAAGGCAAGTGCATGGGCTTGTGCGGACTGTGGCGCT
GGGCTGCTGTGTTGGTCAAGGCAAGCTGTGCTGTTCTGGGGGACGAGACCGCGCGGCACTTCT
CCAGCGGAGTCTCGTTTCAACCGCAACCTGACGCGAGAGTTACACACATGAGTCTGTGGGGA
CCAATCTCGACGCGAGCGACCGCGGCAAGTTCTCGTGTACATCGCTGCCATCTCGGATGACGCG
CTCTCGGCTTCGAGTACGCGTACATCTGGGCAATCGACGCGCTGTGTCGTGGAGAGCGCGATTCT

图 15

【 図 1 6 】

B.

図 15 (続き)



图 17

【 ㊦ 1 9 B 】

B.

MLQFLKSLVTHHFDTFAEFAECLGERDLVITNEFIYEPYMKACQLPCHFVMQEKYQGEPSEMMNNIL
ADIRNIQDFRIVIGGGTVIDISKFLVCLKGLNDVLDAFRKIPUKEKELIIVPTCTGTGSEVTNISIAEIKSRHTKM
GLADDAIVADHAIIPELKLSPFFHYCAISDALIAHIESVSPKASPYRFLSEAAWIDIIVFKKIAEHGEYRFE
KLGEMIMASVNYAGIAFAGNAGVAVHALSYPLGGNYVHPHGEANQYDFTEFVKYQKNTFVIVELNWKLS
KILNCQPEVVPYQLDELGLCTTKPLHEYMGMDVEVRGAEVSLTKQRRLLANVYKLVNVDIEIGIYRRL

GATCTGGGGATCCATACCGAGAT
GGAAAGAAAAAGACACTTCACCC
TCATTTTCATCGACAAAAAATCCCGA

GA

GTCTAAAAACGGCAAAAGCATCATGGCAATTCCCTCAACAGCCAAAAACGGTACTGCATCTCGAATTGT
ACCTATAATTGCAGAGGGAGCTGCTGTAAACAACCTTCGCAACGAAGTCGATTACGTTGTAACGAATA
CGGTATAGCACAACATCAAGGAAAGAGTTTGCCCGACGCAAGAGCTCTTATTGCCATAGCCCAACC
GAGATTTCAGAGGAACATCAACGAACATCTCCGCAACAGTTTTCGATAA

【 図 2 0 B 】

M
M

AAESAHLVIGEINRQMPYVHGDNLIHSKLDYIVMADYPIYSLAKPIGEVEEAIGRNCALIEDGATLQLGIGAI
PDAALLFLKQKDLGIHTEMFSDGVELVLRSGVITGKKTKLPHGKMVATFLMGSEDDYFIDKNPDVELYVPV
DYVNDPRKADNDNMVNSINSCIDVLMGQVVSCEIGSKQSGTGQGVYDVRGAWSXKNGSMAIPSTAKN
DTSRIVPIIAEGAANVTLLRNEVDYVYETYGIAQLKGLSRQAEALIAIAHPDFREELTKHLKRKF

【 図 2 1 A 】

A.

ATGATTAAAGAGTTTAAATGAAATTTATCATGAAGGTAAAGAGCAAGAAATGAAAAAGTTGCTGT
TGCTGTAGCAAGACGACGACGAGTACTTGAAGCAGTAAAGAGTGCTTAAGAAAAATGGTATTGCAG
ATGCTATTCTGGTTGGAGACCACTGACGAAATCGTGTCAATCGCGCTTAAAAATAGGAATGGATGTA
AATGATTTTGAAATAGTAAACGAGCCTTAACGTTAAGAAGCTGCTTTAAAGCGCATAGAGCTTGT
ATCAACTGKAAAGCTGTATGTGTAAGAGGACCTTGTAAATCAGGCAATCTTTAAGATCTG
TATTAAACAAAGAGTTGGACTTTAGAACAGAAAACTATCTTCACGTTGCAATTTTGAATCT
GAGAAATTTGATAGACTATTATTTTTAAACAGATTTGCTTTCAATACTTATCCTGAATTTAAAGGA
AAAAATTTGATAGTAAACAAATTCAGTTAAGGTTGCACATGCAATAGGAATTTGAAATCCAAAGG
TTGCTCCAATTTTGTCAGTTGAGGTTTATAACCTTAAATGCCATCAACACTTGAATGCAAGCAATG
CTTTCAAAATGAGTGCACAGAGCAAAATTTAAGCTTGTGTATGTTGACGACCTTTAGCATTTGA
TATAGCTTTATCGAGAGAACGACCATCTAAGGCGATTAACGAGGAAGTTGCTGGAAGAGCTG
ATATCTTCTTAATGCCAAACATAGAAACAGGAAATGTAATAGACTTTAAACATATACAACCT
GATTCAAAAAATGGAGGAATCTTAGTTGGAACCTTCGACACAGTTGTTTTAACTTCAAGAGCTGA
CAGCCATGAAAACAAAAATGAACTCTATAGCACTTCGAGCTTTAGTTGCAGGCAATAAATAA

【 図 2 1 B 】

B.

MTKSPNEIIMVKSEKMKKVAVAVQAQDPVLRAVRDAKQNGIADAILVGDHDEIVSIALKIGMDV
NDPEIIVNEPNVKKAAALKAVELVSTGKADVMVKGLVNTATFLRSVLNKEVGLRTGKTMHSVAVFET
EKFDRLLLFLTDVAPNTYPELKKKIDIVNNSVKVAHIGIENPKVAPICAVEVINPKMPSITLDAAM
LKMSPDRQIKGCVUDGPLALLIALSBAHHKGVISVAGKADILFMPNIEITGNVMYKLTUTTT
DSKNGIILVSTGAPVVLTSRADSHETKMSITAAALVAGNK

【 図 2 2 A 】

A.

ATGTATAGATTACTAATAATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAAATGGTATTATTAAGCATGA
AAAAAGCATATTTGAGAAGACTTTTAAGCACTTCAAGCTTGAAGATAGAAAAATATAACACTATAT
TTGATCAATTTTCAATTCAGAAAGATTAATTTAGATTCGCTTAAAGAACAAACATAGAAATTA
AGTTCTTTAAATGCTGTAGTTGAAGAGCGGACCTCTTAAAGCCAAATAGTAAGTGGAACTTATGC
AGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTTAAGTAGGAGTTCAAGGTGACATCGCTCAATCTTCTG
GTGGAATATTGCAAAATGAAATAGCAAAAGAAATAAATGTTCCAGCATACATAGTTGATCCAGTT
GTGTGAGTAGGCTTGTATGAGTTTCAAGAATATCAGGAATGGCTGACACTTCCAGAAAGAAATG
ATTCCATCATTTAATCAAAAGCACTTCTGAGAGATGCAAAAGAGTTGGAJAAJAAATACG
AAGATCTTAACTTTAATCGTATGTCACATGGGTGGAGGTACTTCAGTAGGTACTATAAAGATGGT
AGAGTAATAGAAGTTAATAATACACTTGATGGAGAGGTCCTACTTCCACAGAAAGAGTGGTGG
AGTTCCCAATAGGAGATCTGTGAAGATTGTGCTTCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTAAATGA
AAAAAGATAAACCGCAAGCGCGAGTTGTAGTTACTTAAATCATATCGATTTTAAGGCTGTAGTT
GATAAAGCTTTGAAGAGGACAAATATGCACTTATATGAAGCTTTCAATTTCAAGTAGG
CAAAAGAGATAGGAAAAATGTTCAACGCTTTTAAAGGAAGATGTAGATGCAATAACTTTAAACGGCG
GAATTCGCTCAACAGAGCATGTATGAATGCCATAGAGGATAGATAAAATTCATAGCACTGTGA
TTAGATATGGTGGAGAAAGATGAACCTCTTCGCACTTCGAGAAAGTGGACCTTAGATTTTAAAGGG
AGAAGAAAAAGCTAAGGAATACAAATAA

【 図 2 2 B 】

B.

MYRLLIINFGSTSTKIGIYDDEKEIFEKTLRHSABEIEKYNTIFDQFQFRNVILDAALKRANIEV
SBLNAVVGROGLLKPISVSGTYAVNQMLDLKVGVOGHASNLGGIIANEIAKEINVPAYIVDPV
VDELDVYSRIEGBADIIPKSIIFHALNOKAVARRAYKEVKKYEDLMLIVVHMGSTSVGTHDGS
RVIEPVNLLDGGHFGPERSGVGTGLDVLRCPSNKVTVBVMKKIKNGKGVSVLTIQFAPV
DKALEGDKCALIYEAFITFOVAKEITGCKSTVLKGNVDAILITGGIAYNEHVCAIEDRVKFIAPV
VRYGGDELLALAEGLRLVLRGEEKAEYKY

【 図 2 3 - 2 】

C.

ATGATTAAAGAGTTTAAATGAAATTTATCATGAAGGTAAAGAGCAAGAAATGAAAAAGTTGCTGT
TGCTGTTGCACAAAGACGACGCGTACTGGAAGCGGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTATTGCCG
ATGCTATTCTGGTTGGCGACCATGACCAAAATCGTCTCTATCGCGCTGAAAAATGGCATGGATGTT
AATGATTTTGAAATTTGTTAAAGAGCCTAAGCGTTAAGAAAGCTGCGCTGAAGCGGTAGAGCTGGT
TTCCACCGGAAAGCTGATATGGTTAATGAAAGGCGTGGTGAATACCGCAACTTTCTTACGCGAGCG
TACTGAAACAAAGAACTTGGCTCGCGTACCCGAAAAAACCATGAGTCACGTTGCGGTATTTGAAATC
GAGAAATTTGATCGCTTGCCTGTTCTGACCGATGTTCCTTTCAATACTTATCCTGAATTTAAAGGA
AAAAATTTGATATCGTTAAACAAATAGCGTTAAGGTTGCCATGCCATTGGTATTGAAAAATCCAAAGG
TTGCTCCAATTTGTGCAAGTTGAGGTTATTAACCCGAAAAATGCCATCAACACTTGAATGCCGCAATG
CTTACCAAAATGAGTGCACCGGACCAAAATTAAGGCTTTGTGTGTTGACGCGCGCTGCGCATGGA
TATCGCGTTAAGCGAAAGAGCGGCACTACATAAAGCGGTAAACCGCGCAAGTTGCTGGAAGAGCTG
ATATCTTCTGATGCCAAACATTTGAAACAGGCAATGTAAATGTATAAACGTTTAACTTATACCACT
GATAGCAAAATGGCGGCATCCTGGTTGGAACTTTCGACCAAGTTGTTTAACTCTACCGCGCTGA
CAGCCATGAAACCAAAATGAACAGCATTTGCACCTGGCAGCGCTGGTTGCAGGCAATAAATAA

D.

ATGATTAAAGAGTTTAAACGAAATTTATCATGAAGGTGAAAAAGCAAGAGATGAAAAAGTGCGCGT
TGCGGTTGCGCAGGATGAACCGGTCTGGAAGCGGTGCGCGATGCGCAAAAAAACCGTATTGCCG
ATGCCATTCTGGTTGGCGCATCAGCATGAAATTTGCTCTTATTGCGCTGAAATTTGCGATGGATGTT
AAGCATTTTGAATTTGTTAATGAACCGAAAGTGAAGAAAGCGCGCTGAAAGCGGTTGAATGGT
TTCCACCGTAAAGCGGATATGTTGATGAAAGGCTGTTGAATACCGCAACTTCTCTGCGCAGCG
TCTCGAATAAAGAGTGGGTTCGCGTACCGGTTAAACCAATGAGTCATGTTGCGGTGTTTGAACCC
GAAAAATTTGACCGTCTGCTGTTTCTGACCGATGTTGCTTTAATACCTATCCGGAATTTGAAAG
GAAAAATTTGATATCGTTAATACAGCGGTGAAAGTGCGGCATGCCATTGGTATTGAAACCCGGAAG
TGCGCGCGATTGCGCGGTTTGAAGTGAATTAACCGGAAATGCCGTCAACGCTGGAATGCCGCGATG
CTCAGCAAAATGAGCGATTCGCGGTCAAAATCAAGGCTGTGTGGTTGATGCGCGCTGCGCGCTGGA
TATCGCGCTTACGAAAGAGCGCGCATATAAGAGGCTGACGCGGAGTTGCCCGTAAAGCCG
ATATTTTCTGATGCCGATATTCGAAACCGCAACCTGATGTATTAACACCTGACTTACCAAC
GACAGCAAAAGCGCGCATTTCTGTTGGTTACCGCGCGCGGTGCTGCTGACTTCGCGCGCGCGA
CAGCCATGAAACCAAAATGAACAGCATTTGCGCTGCGCGCGCTGTTGCCCGGTAAATAATAA

図 23 (続き)

【 図 2 3 - 1 】

A.

ATGATTAAAGAGTTTAAATGAAATTTATCATGAAGGTAAAGAGCAAGAAATGAAAAAGTTGCTGT
TGCTGTAGCAAGACGACGACGAGTACTTGAAGCAGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTATTGCAG
ATGCTATTCTGGTTGGCGACCATGACGAAATCGTGTCAATCGCGCTTAAAAATAGGATGGATGTA
AATCACTTTGAAATAGTAAACGAGCCTTAACGTTAAGAAGGCTGCTTTAAAGGCGATAGAGCTGGT
ATCAACTGAAAAAGCTGATATGGTAAAGAGGACTTGTAAATCAGCAACTTTCTACGCTCTG
TATTAAACAAAGAGTTGGACTGAGAACAGGAAAACTATGTCTCAGCTTCAGATTTTGAACCT
GAGAAATTTGATCGTCTGTTATTTTAAACAGATGTTGCTTTCAATACCTTATCCTGAATTTAAAGGA
AAAAATTTGATATCGTAAACAAATTCAGTTAAGGTTGCGACATGCAATAGGATTTGAAATCCAAAGG
TTGCTCCAATTTGTGCAAGTTGAGGTTATAAACCTTAAATGCCATCAACACTTGAATGCAAGCAATG
CTTTCAAAATGAGTGCACAGAGCAAAATTTAAGCTTGTGTGTTGACGCGCCTTACGCTTGA
TATTCGCTTTATCAGAGAGACGACCATCTAAGGCGGTAAACAGGAGAGTTGCTGGAAGAGCTG
ATATCTTCTTAATGCCAAACATTTGAACAGGAAATGTAAATAGACTTTAAACATATACAACCT
GATAGCAAAATGGCGGAATCTTAGTTGGAACCTTCTGACCAAGTTGTTTTAACTTACCGCGCTGA
CAGCCATGAAACCAAAATGAACTCTATTGCACTTGCAGCTTTAGTTGCAGGCAATAAATAA

B.

ATGATTAAAGAGTTTAAATGAAATTTATCATGAAGGTAAAGAGCAAGAAATGAAAAAGTTGCTGT
TGCTGTAGCAAGACGACGACGAGTACTTGAAGCAGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTATTGCCG
ATGCTATTCTGGTTGGCGACCATGACGAAATCGTGTCTATCGCGCTGAAAAATAGGATGGATGTA
AATGATTTTGAAATTTGTTAAGCAGCCTTAACGTTAAGAAAGCTGCGTTTAAAGGCGATAGAGCTGGT
ATCAACTGAAAAAGCTGATATGGTAAAGAGGACTGGTAAATACCGCAACTTTCTTACGCTCTG
TATTAAACAAAGAGTTGTTGCTGCGGTACAGGAAAAACCATGTTCCAGCTTCAGATTTTGAACCT
GAGAAATTTGATCGTCTGTTATTTTAAACAGATGTTGCTTTCAATACCTTATCCTGAATTTAAAGGA
AAAAATTTGATATCGTTAACAATAGCGTTAAGGTTGCGACATGCCATTGGTATTGAAAAATCCAAAGG
TTGCTCCAATTTGTGCAAGTTGAGGTTAATAACCCGAAAAATGCCATCAACACTTGAATGCAAGCAATG
CTTTCAAAATGAGTGCACGCGGACAAATTAAGGTTGTGTAGTTGACGACCGCTGCGCATTTGA
TATCGCTTTATCAGAGAGACGACCACTATTAAGGCGGTAAACAGGAGAGTTGCTGGAAGAGCTG
ATATCTTCTTAATGCCAAACATTTGAACAGGAAATGTAAATAGACTTTAACTTACCGCGCTGA
CAGCCATGAAACCAAAATGAACTCTATTGCACTGCGACGCGCTGTTGCGAGCAATAAATAA

図 23

【 図 2 4 - 1 】

A.

ATGTATCGTTTACTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAAATGGTATTTATGACGATGA
AAAAAGATATTTGAGAAGAGCTTTACGTCATTTCAGCTGAAGAGATAGAAAAATATAACACTATAT
TTGATCAATTTTCAGTTTCAGAAAGAAATGTAATTCATGATGCGTTTAAAGAGCAACCACTTGAAGTA
AGTTCTTTAATGCTGTAGTTGGAAGCGCGGACTTTTAAAGCAATATGAAGTGAACCTTTATGC
AGTAAATCAAAAAATGCTTTGAAGACCTTAAAGTGGCGTTCAAGGTGACGATGCGTCAAAATCTTG
GTGCAATTTATGCAATGAAATAGCAAAAGAAATTAATGTTCCAGCATACATCGTTGATCCAGTT
GTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTTTCAGTATATCAGGAATGGCTGACATCTCAAGTAAAGATAT
ATTCATCGATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTTAGACGCTATGCAAAAGAAATTTGAAAAAATAGC
AAGATCTTAATTTAATCGTGGTCCACATGGTGGCGGTACTTCAGTAGTACTCATAAAGATGGT
AGAGTAATTTGAAGTTAATAATACCTTGAATGGAGAGGTCACCTTCACCAAGAAAGAGTGGTGG
CGTTCCAATAGGCGATCTTGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACCTTATGAAGAAGTATGA
AAAAGATAAACCGGCAAGCGCGCGCTGTTAGTTACTTAAATACTATCGATTTTAAAGGCTGTAGTT
GATAAGCTCTTGAAGGCGATAAGAAATGTGCACTTATATATGAAGCTTTTCACTTCCAGGTAGC
AAAGAGATAGAAAAATGTTCAACCGTTTAAAGGAAATGTAGATGCAATATCTTAAAGCGCG
GAATTCGCTTACACAGAGCTGTATGTAAAGCGCATAGAGGATAGATGAAATTCATTCACCTGTA
GTTCGTTATGGTGGAGAGATGAACCTTCTGCACTTGCAGAGGTGAGTTCGCGCTTTTACGCGG
AGAAGAAAAAGCTAAGGAATACAATAA

B.

ATGTATCGTTTACTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAAATGGTATTTATGACGATGA
AAAAAGATATTTGAGAAGAGCTTTACGTCATTTCAGCTGAAGAGATAGAAAAATATAACACTATAT
TTGATCAATTTTCAGTTTCGCAAGAAATGTAATTCATGATGCGTTTAAAGAGCAACCACTTGAAGTC
AGTTCTTTAATGCTGTAGTTGGAAGCGCGGACTTTTAAAGCAATTTTCAGTGAACCTTTATGC
AGTAAATCAAAAAATGCTTTGAAGACCTTAAAGTGGCGTTCAAGGTGACGATGCCAGCAATCTTG
GTGCGATTATGCAATGAAATCGCAAAAGAAATCAATGTTCCAGCATACATCGTTGATCCGGTT
GTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTAGCGGTATAGCGGAATGGCTGACATCTCAAGTAAAGATAT
ATTCATCGATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTTCGTGCGTATGCAAAAGAAATTTGTAAGAAATAGC
AAGATCTTAATTTAATCGTGGTCCACATGGTGGCGGTACTTCAGTAGTACTCATAAAGATGGT
CGCGTATTTGAAGTTAATAATACCTTGAATGGGAGAGTCCATCTCACCAGAGAGTATGTTGGTGG
CGTTCCAATTTGGCGATCTGGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACCTTATGAAGAAGTATGA
AAAAGATAAACCGGCAAGCGCGCGCTGTTAGTTACTTCACTGAATACTATCGATTTTAAAGGCTGTAGTT
GATAAGCGCTTGAAGGCGATAAGAAATGTGCACTTATATATGAAGCTTTCACTTCCAGGTAGC
AAAGAGATTTGTAATTTTCAACCGTTTAAAGGAAATGTAGATGCAATATCTTAAAGCGCG
GAATTCGCTTACACAGAGCTGTATGTAAAGCGCATAGAGGATAGATGAAATTCATTCACCTGTA
GTTCGTTATGGTGGAGAGATGAACCTTCTGCACTTGCAGAGGTGAGTTCGCGCTTTTACGCGG
CGAAGAAAAAGCAAGGAATACAATAA

図 24

【 図 2 4 - 2 】

C.

ATGTTATCGTCTGCTGATTATCAATCTCGGCTCGACCTCAACTAAAATTTGTTATTTATGACGATGA
 AAAAGAGATATTTGAAAAACGCTTACGTCATAGCGCTGAAGAGATTGAAAAATATAACCACTATTT
 TTGATCAATTTTCACTTCGCGAAAGATGTTCTCGATGCGCTGAAAGAGCAACATTGAAGTC
 AGTTTCGCTGAATGCGGTAGTTTGGTTCGCGCGCGGTCTGCTGAAGCCAAATGTCAGCGGCATCTATCG
 CGTAAATCAAAAAATGCTGGAAGACCTGAAAGTTGGCGTTTCAGGGGCGAGCATGCCAGCAATCTTG
 GTGGCAATTTGCGCAATGAAATCGCCAAAGAAATCAATGTTCCGGCATACATCGTTGATCGCGTT
 GTTGTGGATGAGCTGGATGAAGTTAGCCGTATCAGCGGAATGGCTGACATTCACGTAAGAGTAT
 TTTCCATGCACTGAATCAAAAGCGGTTGCGCGTCGCTATGCAAAAGAGTTGGTAAAAATACG
 AAGATCTTAATCTGATCGTGGTGCATATGGGTGGCGGTACTAGCGTCGGTACTCATAAAGATGGT
 CGCGTGAATGAAGTTTAATAACACCTGATGGCGCAAGGTCCTATTCACAGAACGTAGCGGTGG
 CGTTCCAAATGGCGATCTGGTACCTTTGCGCTTCAGCAACAAATATACCTATGAAGAGTTGATGA
 AAAAGATAAACGCGCAAGCGCGCTTGTAGTTACCTGAAATACATATCGATTTTAAAGCGGTAGCTT
 GATAAAGCGCTGGAAGCGGATAAGAAATGTCATGATTTATGAAGCGTTTCACTTCCAGGTGGC
 AAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTTCTGAAGGCAATGTTGATGCCATTTCTCTGACCGCGG
 GCATTGCTTACAAACGAGCATGTTTGTAAATGCCATTGAGGATCGCGTAAAAATTCATTGCACTGTG
 GTTCGTTATGTTGGCGGAAGTGAACCTGCTGGCACTGGCAGAGGTGGTCTGCGCGTTTACGCGG
 CGAAGAAAAAGCGAAAGATACAAATAA

D.

ATGTTATCGTCTGCTGATTATCAACCGCGGCGAGCACCTCAACCAAAATTTGTTATTTACGAGATGA
 AAAAGAGATTTTGAAAAAACGCTGCTCAGCGCGCAAGAGATTGAAAAATATAACCACTATTT
 TCGATCAGTTTCCAGTTCCGCAAAACGTTGATTTCTCGATGCGCTGAAAGAGCAATATTGAAGTC
 TCCTTCGCTGAATGCGGTGGTTCGCTGCGCGCGGTCTGCTGAAACGAAATGTCAGCGGCATCTATCG
 CGTTAATCAGAAAAATGCTGGAAGATCTGAAGTTGGCGGTGCAAGGGGCGAGCATGCCAGCAATCTCG
 GCGGCAATTCGCGCAATGAAATCGCCAAAGAGATCAACGTCGCGCGCTTATATCGTTCGATCGCGTG
 GTGGTTGATGAATGGATGAAGTCAGCGGTATCAGCGGCATGGCGGATATTCGCGTAAAAAGCAT
 TTTCCATGCGCTGAATCAGAAAGCGGTTGCGCGTCGCTATGCCAAAGAGTTGGGTAAAAATATG
 AAGATCTTAATCTGATTTGGTGGCATATGGGCGCGCGCACCGCTCGGTACGCAATAAGATGGT
 CGCGTGAATGAAGTGAATACACGCTGATGGCGCAAGGCGGTTCTTCGCGGCAACGTAGCGCGCG
 CGTCCGATTCGCGCATCTGCTGCGCTCTGCTTTTCAGCATATAATACCACTAGCAAGAGATTGATGA
 AAAAATCAACGCGCAAGCGCGCGGTGGTTAGCTATCTGAATACCATCGATTTTAAAGCGGTGGTT
 GATAAAGCGCTGGAAGCGGATAAAAAATGCGCGCTGATTTATGAAGCGTTTACCTTCCAGGTGGC
 GAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTCTGAAGGCAACGTTGATGCCATTTCTCTGACCGCGG
 GCATTGCTTAAACGAGCATGTTTGTAAATGCCATTGAAGATCGCGTGAATTTATTTGCGCGGTG
 GTGCTTACGCGCGCAAGATGAACCTGCTGGCGTGGCGGAAGCGGTTCTGCGCGTCTGCGCGG
 CGAAGAAAAAGCGAAAGATACAAATAA

図 24 (続き)

【 図 2 5 】

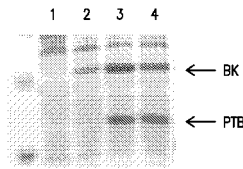


図 25A

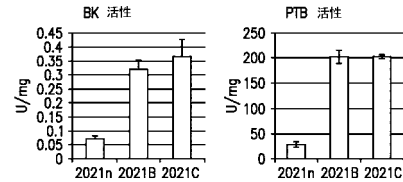


図 25B

【 図 2 6 】

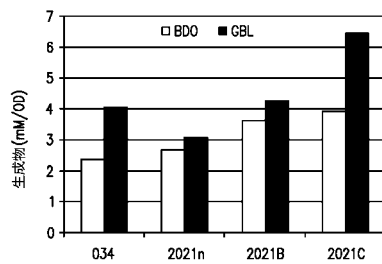


図 26

【 図 2 7 B 】

B.

MMKDLIPPTKDKVKKTNGENLNKYNKDNSSCFGVFENVENIAISSAVHAKILSLHYHTKEQREK
 IYETIRKALQNKVEFLATWLEETBGRYEDKILKHELVAKTPTGTELDITTAHSDGMLTVDEM
 SPYGVIGAITFSTNFTETVICSIGMLAAGNAVFNHPCAKKCVAFVEMINKAIIICSGGPENL
 VTTIKNPTMESLDALIKHPSIKLLCGTGGPMVKTLNLSGKKAIGAGAGNPPIVDDTDADIEKAG
 RSIIEGCSFDNNLPCEAEKVFVFNVDLLISNMLKONNAVIDNEVDQSKLIDLVLQKNNETQY
 FINKQVKGDAKFLDEIDVSPSNVKCIICVNANHPFVMTLEMPFLIRVUDIDEAIAKIAK
 IABQNRHSAYTVSKNLDNLRPEREIDTITVKNKASFGVGVBEQFTTITAGSTGEGITSA
 RNFTQRRCVLAG

【 図 2 8 - 1 】

A.

ATGAATAAAGACACACTAATACCTACAACCTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAACAT
 TAATTTAAAGAACTACAAGGATAATCTTCATGTTTCGGCGATTTCGAAAAATGTTGAAAAATGCTA
 TAAGCAGCGCTGTACACGCAACAAAGATATTTATCCCTTCATATACAAAAAGCAACCTGAAAAA
 ATCATTAATGAGATAAAGAAAGCGCGCATTTACAAAAATAAGAGGTTCTGGCTACAATGATTCTGGA
 AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAATATTAAACATGAATTTGGTAGCTAAATATATCTC
 CTGGTACAGAGATTTAACACTACTCTGCTGCTGAGGTGATTAAGGTGACAGCTGTAGAAAAATG
 TCTCCATATGGTGTATTTGGTCAATTAATCTCTTCAACATCCCACTGAACCTGATATATGTA
 TAGCATATGCGATGATTGCTGCTGGAATGCTGTAGTATTTAACGCAACCCATCGCTGAAAAAT
 TGTGTGCTTTGCTGTTGAAATGATAAATAAGGCAATATTTCATGGCGCGTCCGAAAAATCTG
 GTAAACACTATAAAAAATCCAACTAGGAGTCTCTGGATGCAATTTAAGCATCTCTCAATAAAA
 ACTCTTTGGGAACTGGGGTCCAGGAATGGTAAAAACCTGTTAAATTTCTGGTAAGAAAGCTA
 TAGGTGCTGGTGTCTGGAATCCACAGTATTTGTCGATGATCTGCTGATATAGAAAAAGCTGGT
 CSTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTGTATTGCAAAAAAGAGTATT
 TGTTTTGGAGAATGTCAGATGATTAAATATCTAACATGCTAAAAAATAATGCTGTAATTTATAA
 ATGAAGATCAAGTATCAAAATTAATCGATTAGTATTACAAAAAATAATGAAACTCAAGAAATAC
 TTATTAACAAAAATGGTAGGAAAAAGATGCAAAATTTCTCCGATGAATAGATGTTGAGTCT
 TCTCTCAATGTTAAATGATTAATCTGCAAGTAAATGCAATCCATTTGTTATGACAGAAC
 TGATGATGCCAATATGCAATTTGCAAGTATGACGCTTAAAGATATCGATGAAGCTATTAAATATGCAAG
 ATAGCAAGACAAATAGAAAACTATGTCCTATATTTATCTAAAAATATCGCAACCTGAATCG
 CTTTGAAGCTGAAATAGATACACTATTTTTGTAAAGATGCTAAATCTTTTGTGGTGTGTTGTT
 ATGAAGCAGAGGATTTACACTTTCACTATTGCTGATCTACTGTTGAGGGAATAACCTCTGCA
 CGTAATTTTACAGCCCAACGTCGCTGTGATCTGCGCGCTAA

B.

ATGAATAAAGACACACTGATCCCTACAACCTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAACAT
 TAATTTAAAGAACTACAAGGATAATAGCAGTTGTTTCGGCGATTTCGAAAAATGTTGAAAAATGCTA
 TCAGACAGCGCTGTACACGCAACAAAGATATTTATCCCTGCAATTTACAAAAAGCAACCTGAAAAA
 ATCATCACTGAGATACGTAAGGCGCGCATTTACAAAAATAAGAGGTTGCTGCTACAATGATTCTGGA
 AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAATTTAAACATGAATTTGGTAGCTAAATATATCTC
 CTGGTACAGAGATTTAACACTACTCTGCTGAGCGGTGATTAAGGTGACAGCTGTAGAAAAATG
 TCTCCATATGGTGTATTTGGTCAATTAATCTCTTCAACATCCCACTGAACCTGATATATGTA
 TAGCATATGCGATGATTGCTGCTGGAATGCTGTAGTATTTAACGCAACCCATCGCTGAAAAAT
 TGTGTGCTTTGCTGTTGAAATGATCAATAAGGCAATTTAGCTGTGCGCGTCCGAAAAATCTG
 GTAAACACTATAAAAAATCCAACTAGGAGTCTCTGGATGCAATTTAAGCATCTCTCAATAAAA
 ACTGCTTTGGGAACTGGGGTCCAGGAATGGTAAAAACCTGTTAAATTTCTGGTAAGAAAGCTA
 TTGGTGTGCTGCTGGAATCCACAGTATTTGTCGATGATCTGCTGATATGAAAAAGCTGGT
 CGTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTGTATTGCAAAAAAGAGTATT
 TGTTTTGGAGAATGTCAGATGATTAAATATCTAACATGCTGAAAAAATAATGCTGTAATTTATCA
 ATGAAGATCAGTATCAAAATTAATCGATTAGTATTACAAAAAATAATGAAACTCAAGAAATAC
 TTATTAACAAAAATGGTAGGAAAAAGATGCAAAATTTCTCCGATGAATAGATGTTGAGTCT
 TCTCTCAATGTTAAATGATTAATCTGCAAGTAAATGCAATCCATTTGTTATGACAGAAC
 TGATGATGCCAATATGCAATTTGCAAGTATGACGCTTAAAGATATCGATGAAGCTATTAAATATGCAAG
 ATAGCAAGACAAATAGAAAACTATGTCCTATATTTATCTAAAAATATCGCAACCTGAATCG
 CTTTGAAGCTGAAATAGATACACTATTTTTGTAAAGATGCTAAATCTTTTGTGGTGTGTTGTT
 ATGAAGCAGAGGATTTACACTTTCACTATTGCTGATCTACTGTTGAGGGAATAACCTCTGCA
 CGTAATTTTACAGCCCAACGTCGCTGTGATCTGCGCGCTAA

図 28

【 図 2 7 A 】

A.

ATGAATAAAGACACACTAATACCTACAACCTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAACAT
 TAATTTAAAGAACTACAAGGATAATCTTCATGTTTCGGAGTATTCGAAAAATGTTGAAAAATGCTA
 TAAGCAGCGCTGTACACGCAACAAAGATATTTATCCCTTCATATACAAAAAGCAACCTGAAAAA
 ATCATTAATGAGATAAAGAAAGCGCGCATTTACAAAAATAAGAGGTTCTGGCTACAATGATTCTAGA
 AGAAACACATATGGGAGATATGAGGATAAAATATTAAACATGAATTTGGTAGCTAAATATATCTC
 CTGGTACAGAGATTTAACACTACTCTGCTGAGGTGATATGTTTTCAGATTGTAAGAAATG
 TCTCCATATGGTGTATTTAGTGCAATATCTCTTCAACATCCCACTGAACCTGTAATATGTA
 TAGCATAGGCATGATGATGCTGGAATGCTGTAGTATTTAACGCAACCCATCGCTGAAAAAT
 GTGTTGCCCTTGTGTTGAAATGATAAATAAGCAATTTATTCATGTGGCGGTCTCGAAAAATCTA
 GTAACCACTATAAAAAATCCAACTATGAGTCTCTAGATGCAATTTAAGCATCTCTCAATAAAA
 ACTCTTTGGGAACTGGGGTCCAGGAATGGTAAAAACCTCTTAATTTCTGGTAAGAAAGCTA
 TAGGTGCTGGTGTGGAATCCACAGTATTTGATAGTATCTGCTGATTAAGAAAGCTGTT
 AGGAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGAATATAATTTACCTGTATTGCAAAAAAGAGATTT
 TGTTTTGAAGATGTTGCGATGATTATATATCAACATGCTAAAAAATAATGCTGTAATTTATAA
 ATGAAGATCAAGTATCAAAATTAATGATTAGTATTACAAAAAATAATGAACTCAAGAAATAC
 TTATTAACAAAAATGGTAGGAAAAAGATGCAAAATTTATCTTAGATGAATAGATGTTGAGTCT
 TCTCTCAATGTTAAATGATTAATCTGCAAGTAAATGCAATCCATTTGTTATGACAGAAC
 TCATGATGCCAATATTTGCCAATTTGTAAGGTTAAAGATATAGATGAAGCTATTAAATATGCAAG
 ATAGCAGAACAAATAGAAAACTATGTCCTATATTTATCTAAAAATATAGCAACCTAAATAG
 ATTTGAAGAGAAATAGATACACTATTTTTGTAAAGATGCTAAATCTTTTGTGGTGTGTTGTT
 ATGAAGCAGAGGATTTACAACTTTCACTATTGCTGATCTACTGTTGAGGGAATAACCTCTGCA
 AGGAATTTTACAGCAAGAAAGATGTTACTTGCCTGCTAA

【 図 2 8 - 2 】

ATTGTTGATGACAGAAGCTGATGATGCCAATATTGCCAATTGTGCGCGTTAAAGATATCGATGAAG
CTATTAATATCGAAGAGTTTGACAGCAACAAATAGAAACATAGTGCCATATTTATGACAAAAT
ATGCAACACCTGAACTGGTTTGAACCTGAAATCGATACACTATTTTGTAAAGAACTGCAAAAT
TTTGCTGTGGTTTGGTTATGAAGCAAGCAAGGATTTACACATTTACATTTGCTGTGGATCTACTGGTG
AGGGCATACCTTCTGCACGTAATTTTACCGGCCAACCGCGCTGTGTACTGGCGCGGCTAA

C.

TATGAATAAAGCAGCGGATCCCGACCAATTAATGATCTTGAAGATAAAAAACATGGTGGAACAACT
 TAATCTGACGAACCTACAGATGATAACGAGTTGTTCCGGCGATTCTGAAATATGTGAAATAGCTTA
 TCACGACCGCGGATCAGCAGCAAAAGATCTCTCGCTGCATTTATACCAAGAGCAACCGTGAAAAA
 AATCACTAGGATCTCGTAAGAGCGCGCATTAACAAAATGAAAGAGTGCTGGCAACATGATTTGTGA
 AGAACAACTGATTTGGAGCTGTATGAGGATAAAATACGAATCAATGCTGGTGCGAAATATACCG
 CTGCTATCAAGATTTTAAACCAACCTGCTCGAGGCGGTGTAATGGTTCGACGCGTTGTGGAATAT
 TGCCCTTATGTGTTTATGTGTGCAATTCGCCCTTACAACCAATCCAACTGAAAGCGGTTTGTAT
 TACGATTTGCGATGATTTGCTCTGGAAATAGCGGCTAGTATTTAACGCGTCAACCCTCGCTTAAAAAAT
 TGCTTGCCCTTTGCTGTGTAATAGTAATAAAGCAATTTATAGCTGTGCGCGTCCGGAANAATTTG
 GTACGATCTATAAAAATCCACACCTGAGTCTCGTGTCGCACTTTATGAACTCTCTCAATAGAA
 TATGAT
 TGGTGTGCTGCTGCTGAAATCCACAGGTATTTGTGCATGATCTGCTGATTTGAAAAAACGGGCT
 CGTAGCATCTATGAAGGCGTGTCTTTGTAAATATTTACCTTGTTATGTGACGAAAAAGAAATGAT
 TGTGTTTGTGAATATGGCCGATGATCTGATCTTCAACATCTGTGAAAAATATCCGGGTGATATCA
 ATAAGATACGAGTTAGCAAACTGATGCTGTGTTATACAAAAAATAATGAAACTCAAGATAGAT
 TTATTAACACAAAAAATAGGTAGTAGAAGATCAAAATCGTTCTTCCTGATCAATCATGTTGTAGTCT
 GCCTTCAAAATGTTAAATGCAATTTCTCGGAAGTAGCAATGCAACATGCAATTTGTGATGACCGAA
 TGATGATGCAATTTTCCGCAATTTGTCGCGTTAAAGATTTATGATGAAGATCAATTAATATATCCGAG
 ATGATGATGCAAAATTTGCGCAATTTGCGCTATTTATGATGAAAGATTTGCAACCTGATGAT
 TTTGAT
 ATGAAGCAGAGGTTTATCACTTTCACTATCTCGGACGACCGGTGAAGGCAATCTCTCTCA
 CGGAATTTACCGCGCAACCTCGCTGCTGATTTGCGCGCACTAA

D.

TGGAATAAAGATACGGGATCTCCGACACCAAAATGCTTGAAATGAAACACGTGGCGAAATATT
CAACTGAGAAAAATCAAAAGATACAACGATGCTTGGCGGTGTGAAAGACGTGAAUAGCGCA
TCTCCAGCGGGCGGTGATCGGCAAAAATATCTCTCGTGCGATTACACGAAGACGAGCGGTGAAAAA
ATTATTCACGAAATCGTAAGAGCGCGGTGCARAAACGAAAGAGTGTCCGAAACGATCTCGTGA
AGAAACGCATATGGGGCGTATATGAGATAAAATTTGAAACATGAATCGGTGGCGGAAATACACGG
CGGCGATCAAGAAATGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAG
ATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAG
CAGCATATGCGATCATGCGCGGGGATATGGCGGTGTTTATACGCGTATCTCCGTGCGAAAAATAT
GTGGCGGTGTGCGGTATGAGATGATCAAAACAGCATTTACAGTTCGCGCGCGCGGAAATATCTG
GTGCGCCACATCAAAATCCGACATCGAATCGCTGATGCGCATATCAACAAATCTTTCATCAAA
ATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAGATGAG
ATGCG
ATGCG

図 28 (続き)

【 図 2 8 - 3 】

[illegible]

図 28 (続き)

【 ㄨ 2 9 】

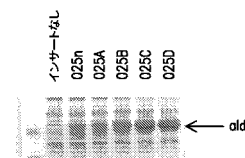


图 29

【 ㊦ 3 0 】

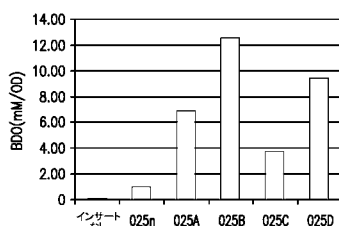


Figure 30A

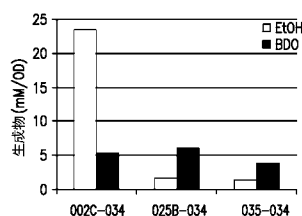


图 30B

【 図 3 1 A 】

A.

[illegible]

【图 3 1 B】

B.

MKAADVQEKPEPLKIKEVEKPSISYGEVLVRIKACGVCHTDLHAAGDWPVKPLPLIPGHEGVG
 IVEEVGPGVTHLKVGDRVGIPLWISACGHCYCLSGQEALCEHQNGAGVSDGGYAEYCRAPPIY
 VVKIPDNLSFBEAAPIFCAGVVTIKALKVTGKPGVEVAIYIGIGGLGHVAVQYAKAMGLHVAVD
 IGEKLELAKELGADLVNPNKANAQPMKEKVEGVHAAVTVASKPAQFAYSINSIRGGCTVLV
 GLPPEMPLPIFDTVLNGIKIIGSIVGTRKDLQEQALQFAAEGKVKTIIIEVQPLEKINEVFFMLK
 GEINPEVTIPLENN

【 図 3 2 】

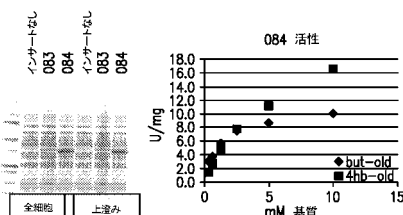


图 32A

图 32B

【 図 3 3 】

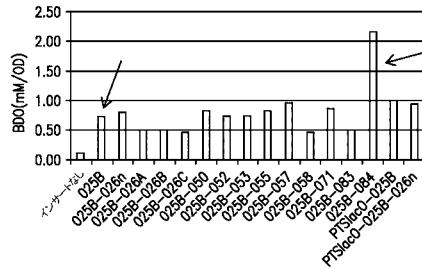


图 33

【 図 3 4 】

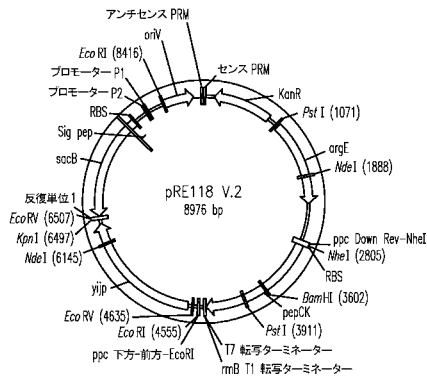


图 34

【 図 3 5 - 1 】

A.

TGGGTCACGAATCAAGGTACCGGACATCGGGGCTGTGAAGTGAATACCCGAGATCTCGGTGTA
TGCGGCGCAAGAGTTGAAGCGCAACAGCTGCTATCACTAGAGGCGCAAAAGGCTCTTAGGAAGT
TCGCTCTCCGACGGCGGGTATCGTTAAAGAGATCAAAAGTCTGTCTGGCGATAAAACCGACCGGCGC
ACTGATTATGATTTCGATTCCGCCGACCGGCTGCAGCAGCAGCTGACGCTCAGGCAGGAAGAAGAAGA
AAGAGACAGCTCCGGCAGCCGACAGCAGCGCTCGCGGCGCAAAAGAGCTTAAAGCTTCGGATATCGGA
CGCGCAAGAGTTGAAGTGACCGAAATCTCGGTGAAGTTGGCGATAAGTTGAAGCTAGAACAGTCGCTG
ATCACCTAGAGAGGCGCAAGAGCTTCTATGAAGATTCGGCGTCGGTGTGGACAGCTGAAGAGAGT
AAAGTGAAGCTGGGTGCAAAAGTGTCTACCGGCTGTATGTTATGGTCTCGAAGTCCGGGTGAAGC
AGGGCGGGCAGCTCCGGCGCTAAACAGGAAGCAGCTCGGGACGGGGCCCTGCACCAAGCGGTGGC
GTGAAGAAGAGTTAACTGTCCGGATATCGCGCGTGCAGAGTTGAAGTGAAGTGAAGTGTGGTGAAGT
CGGCGCAAAAGTTCGGCGTGAACAGTCACTGATCACTGAAGCGCAAAAGCTTCTATGAAGATTCG
CGCGCGCTTTCAGCGCTCTGAAGGAATCAAAGTGAAGTTCGGCGATAAAGTCAAAAATCGGCTCGC
TGTTATGATCTCGAAGTTGAAGGCGCAGCGCTCGCGCAGCTCTCGCAAAACGAAGGCGGACGCG
CGGATCGCGCGCAGCAAAAGTGAAGCGCGCGCAGCAGCAGCTGGAAAGGAAGGAGGCAAAATCT
AATTTCGTGAAAGAGCGCTTATGTCACGCAAGCTCCCTGTACCGGCTCTGGCAGCGAGTATTTGGTGT
TAACCTTCGAAAGTAGGCGGCTAGCGCTGAAGGCTGTATCTCGCGCAAAAGCTTCAGGCTATAGT
GAAGAAGGCTATCAAAGCTGCAGAACGAGCTCTCGCGCAGCAGCTGGCGGTGTATCTCGGTGATCTGC
GTGGCGCAAGGTGGACTTCGCAAGTTTGTGGAATGCAAGAAGTGAACGTGGCGCCATCAGAAAGA
ATCTCTGTGCGCAAGCTGAGCGAATCGGTGAATGATCCCGATGTATCACTTCGACAAACCCGATA
TACCGAGTGTGAAGCGTCTCGTAAGACAGCAACGAAGAAGCGGCAAAAGCTGAAGTGTGTGAAG
ATCACCCGGGTGTCTTCACTATGAAGACCGTGTCTGCAGCTCTTGACGAGATGCTTCGTTCAATAGTTC
CTGTGTGGAAGAGCGCTCAGCGCTCGACCTGAAGAATAATCAACATCGGTGTGGCGGTGGATATGCT
CGAACCGCTGGTGTGTTCGGTAAATCAAAGACCTCAACAGAAAGCAAGCTATCAAGCTGTCTCGCGAG
TGATGACTATTTCAAGAAAGCGGTGACAGGAAGTCACTCGGGCGAAATGACGGGCGGCTGTCTC
ACCATCTCAGACGTGCGCGCTGGCTAGCTACCACTATCGGCGGATTTGAAGCGCGGGAAGTGCAT
CTCTCGGCGTGTCCAAGTCAGGACGTGAGCGGCTGTGGAATGGAAGAAGTGTCTGCGCTGTGATG
CTGGCAATTTCTTCTCTTCGCGACCGCGTGAATCAGCGGCTGTGATGGTGGCTGTTTATCATCACTCAT
TAACAAAGCTGTCTGACATTCGCGCTGTGTGATGTAGTAAGAAGACCGGCGCAACCGGCGGCTGAA
TTTCTGTAATCTCATGAATGTATGAGTATTAGCCAATAAAGAAATCGGTTCGGCTGTGTGTTTAA
AATTGTAACTATTTAAAAATACCGCAGCTAGAAGCAACCGGTGGTGTATGTAGGTTATTCTACAT
ACCTTATGATTTCGTGGTGCAGAGCGTAGCAAGCGGCAAGTCCCAAGGAGCTACATAAGTAAGT
ATCGGGTGAAGGCGTGAAGTCAACGCTCTCGGCTCGTAAAGACAGCGGTATGAGCGCGGAGAT
AAATATATATGAGGCTCATGATGATCATGAATACAAATCAGGTCGTGTGATCTGGGGCAGGCGCCSCG
GGTATCCGCGTGGCTCGTGGCTGATTTAGGTTCTGGAACCGTAACTGTAGAGAGCTATACAACAGT
TGTGGCGGTGTTGTCTGAAGCTGGGTGTGTTCTTTCTAAAGCGCTGCTGCACGCTGGCAAAAGTATCGA
AGAGCGAAAGCGGCTCGCGCAACGGCATCTTTCCTGGCGAAGCAAGCAATGACATGATCAAGATTC
GCACCTGGAAGAAAAAGGATCACTCACTGACGCGTGGTGTGCTGTGCGATGGCCAAAGGCTGTAA
GTGAAGGTTGGTTAACGTTCTGGTAAATTTACCGCGCTCAACCCGTGAAGTGAAGGAAAGCAAAACGG
CAAAACCGCTGATCAACTTCGACACGCGCATCACTCGGCGGGGTTCCGCTCGGATTCAGTCTCGGTTATC
CCGATGAAGATCGCGGATATGGGACTCGACGAGCGGCTGGAACATGAATCTGATCAACGAACCGCATG
CTGTGTATGGGCGGCGGTATCATCGCTGTCTGGAATGGGATACGTTGAGTCTGCTGGTTCAGAGATT
CGAGTGTGGGAATCTTCGACAGGATCTTCGCGGCTCGCGCAACCGGCTGGGTGAAGCTTCACCAAA
CGCATTCGCAAGAAATTAACCTGATGTGGAAGCAAAAGTACTGCGGTGTGAAGCAAAAGAGCGG

圖 35

【 図 3 5 - 2 】

ATTATTCAGTTTCATGGGGGTAAGAAAAAGCATCGGCGGAAGCGACCGGTACAGCCAGCTGCTGCTGC
GATTCGGCCGCGTACCAAGGTAAGTAAAAACCTCAGTCAGGATGAAGCTGGCGGGAAGTTCAGCATCGCT
CGATCTCTCCGCGTGTGACAAAACATGGCCACATCGGACATCGCTGCTGCTAGCGGGAATGCTGCT
CTCAGGCCATGCTGGGGGCAAAAGGTGTCATGAAGGCCACATCGGCGAGAAGTATGCTCCGCTGTCTG
AACCATCTCTCATCGTGGAGATGTCCTCATCATCATCATCAATCAACCAAGCATGGCATGCTGGCTGCTG
CGCCGAGAGAAAGGAGGAAAGGAAGGACATCGCTCAAGAACGCCACCTCCCGTGGGCTGCTGCTCGG
GCTGCTAGTACGCTTCTGACTGCGCAAGTGGTATGACCAACCTGATCTTCATCAAGAGAACCCACGCTG
TTATCGCGCGCGCGATGTCGGCACCAACCGCGGCGAGCTCGTGGGTGAGATCGGCTGGCTATCGAG
ATGGGCTGTGACGCTGAAGACATCGCGCTGACATCCAGCGTCAACCGCATCTGCAGGATCGCTGGTGGC
CTGGCGCGCGGAAGTGTCTGAAGCGACGATACCGCAAGTCTGCAACCGCAAGGCGAAGAAAGAAATGACT
TTTCTTTTCAGAAAAGAAGCATAGCGGCTCGGGGAGCGGCTTTTATGCTCGATGTGTGTAAGACTATCT
TACTGTGTTCAAAACGCTCACTCATCATACATCTATTAAGGCGGCTTATGCTGACAGATCATCATACCGTG
GGCCGCTGAGGACATGATCTAGCATAGCATAGCGCAATTAAAAAGCGGCTAACCAACGCCGCTTTTATTCG
CTGCAATTCATCTTCAGCTCTCTGCTCCACGTCAGAGAAAGTTCGCATACGCTGACCGCTGTGCTGCT
TTATTCAGCGTCAGACATGTGGTACTGCTGTTAGACGTTGTGGGGCGGCTCTCGTAACCTTCTCCCGAA
AAACCTGACGTTGTTCAGGTGATGCCATTGAACACGCTCGCGGGGCTTACGTTGCTGTTGATTCA
GTGGGCGGCTGCTGATCTTTCTTCIT

図 35 (続き)

【 図 3 6 】

	(1)	10	20	30	40	52	Section 1
EC-IpdA	(1) MMSTEIKTQVVVLGAGPAGYSAAAFRCADLGLETIVVERVNTLGGVCNLNCGCI						
KP-IpdA 突变	(1) MMSTEIKTQVVVLGAGPAGYSAAAFRCADLGLETIVVERVNTLGGVCNLNCGCI						
	(53)	60	70	80	90	104	Section 2
EC-IpdA	(53) PSKALLHVAKVIEEAKALAEHGIVFGEPTDIDIKRTWEKVINQLTGGLA						
KP-IpdA 突变	(53) PSKALLHVAKVIEEAKALAEHGIVFGEPTDIDIKRTWEKVINQLTGGLA						
	(105)	110	120	130	140	156	Section 3
EC-IpdA	(105) MAKGRKKVVNCLGKFTGANTLEVEGENCKTVINFNDIAI AAGSRQILPFPI						
KP-IpdA 突变	(105) MAKGRKKVVNCLGKFTGANTLEVEGENCKTVINFNDIAI AAGSRQILPFPI						
	(157)	170	180	190	208	208	Section 4
EC-IpdA	(157) PHREDPRWDSDTALEKEVPBRLVMGGGI L GEMGT VYHLAGS Q I DVVMFF						
KP-IpdA 突变	(157) PHREDPRWDSDTALEKEVPBRLVMGGGI L GEMGT VYHLAGS Q I DVVMFF						
	(209)	220	230	240	250	260	Section 5
EC-IpdA	(209) DQVI PAADKQLVAVETKRISKKNLMLETKVIAVEAKEDGIVYSGMEKKAPAI						
KP-IpdA 突变	(209) DQVI PAADKQLVAVETKRISKKNLMLETKVIAVEAKEDGIVYSGMEKKAPAI						
	(261)	270	280	290	300	312	Section 6
EC-IpdA	(261) EPORYDAVLVAIGRPVNGKLDAGKAGVEVDGGRFIRVDKRLRNVPHIFAI						
KP-IpdA 突变	(261) EPORYDAVLVAIGRPVNGKLDAGKAGVEVDGGRFIRVDKRLRNVPHIFAI						
	(313)	320	330	340	350	364	Section 7
EC-IpdA	(313) GDVGQFLAHKGVBHEGHVAAEVIAKGRHYDFDKVIPSIAYTEPEVAWVGLT						
KP-IpdA 突变	(313) GDVGQFLAHKGVBHEGHVAAEVIAKGRHYDFDKVIPSIAYTEPEVAWVGLT						
	(365)	370	380	390	400	416	Section 8
EC-IpdA	(365) EKEAKEKGISYEATFPFAASGRAIASDCADGMTKLIPDKETHRVIGGAIVG						
KP-IpdA 突变	(365) EKEAKEKGISYEATFPFAASGRAIASDCADGMTKLIPDKETHRVIGGAIVG						
	(417)	430	440	450	468	468	Section 9
EC-IpdA	(417) TNGELLGLEIGLAITEMGCDAEDALTTHARPHTLESVGLAAEFVFGSITDLF						
KP-IpdA 突变	(417) TNGELLGLEIGLAITEMGCDAEDALTTHARPHTLESVGLAAEFVFGSITDLF						
	(469)	476					
EC-IpdA	(469) NPKAKKKK-						
KP-IpdA 突变	(469) NAKAKKKK-						

图 36

【図 37】

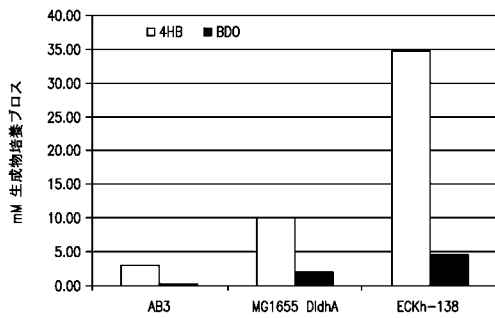


図 37

【図 38】

ataataacatcatgaacatcgaggttagcggcctataagccaggcgagatgatcatatcaattctcatcataatgctttgtta
gtatctgtcgccgacttaaaagagagtagtgaaagctgacacccctttgacttttactctcgcaatggcgaaggg
ccgaagaggcggtgtctataaagcaacacatcgcttaagactttctatctggcattaccggtgtttctcatcattcgatc
accactggcagggcacaGAAGGTAGGTATTACatgtcagaactttacacatgcgtggtatctattat

FIG. 38

【図 39 - 1】

AAGAGGTAAAAGAATAATGGCTATCGAAATCAAAGTACCGGACATCGGGGCTGATGAAGTTGAAATCA
CCGAGATCCTGGTCAAAGTGGGCGACAAGTTGAAGCCGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGGCGAC
AAAGCTCTATGGAAGTTCCTGCTCCGACGGCGGGTATCGTTAAAGAGATCAAAGTCTCTGTTGGCGAT
AAAACCCAGACCGGCGCACTGATTATGATTTTCGATTCCGCGACGGTGACGACAGCTGCACCTGCT
CAGGCAAGAGAGAAGAAAGAGCAGCTCCGGCAGCAGCACCAGCGCTCGGCGCGCAAAAGACGTTA
ACGTTCCGGATATCGGCAGCGACGAAGTTGAAGTGACCGAAATCTCGTTGAAGTTGGCGATAAAGTT
GAAGCTGAACAGTCGCTGATCAGCTGAAGAGGCGACAAGGCTTCTATGGAAGTTCGCGCTCCGTTGCT
GGACCGTGAAAAGATCAAAGTGAACGTGGGTGACAAGTGTCTACCGCTCGCTGATTATGCTGCTC
GAAGTCGCGGGTGAAGCAGGCGCGGACGCTCCGGCGCTAAACAGGAAGCAGCTCCGCGAGCGGCC
CTGCACCGCGCTGGCGTGAAGAAAGTTAACGTTCCGGATATCGGCGGTGACGAAGTTGAAGTGAAT
GAAGTGATGGTGAAGTGGGCGACAAGTTGCCGTGAACAGTCACTGATCACCGTAGAAGGCGACAA
AGCTTCTATGGAAGTTCGCGCGCGTTGCGAGCGCTGTAAGGAACCTGAAAGTCAACGTTGGCGATAA
AGTGAAGTTCGCTGATTATGATCTTCAAGTTGAAGGCGACCGCTCGCGAGCTCTGCGAA
ACAGGAAGCGGACGCGCGCACCGGACGCAAGAGCTGAAGCCCGGACGACGACGCTGCGAAA
GCGGAAGGCAATCTGAATTTGCTGAAAACGACGCTTATGTTACGCGACTCCGCTGATCCGCGCTG
GCACCGGAGTTGCTGTTAACCTTGCAGAAAGTGAAGGCGACTGGCGTAAAGCTGATCTGCGCGCA
AGAGCTTCAGGCTACGTGAAGAAGCTATCAAGCTGCAAGAGCAGCTCCGCGACGACTGGCGGTG
GTATCCCTGGCATGCTCCGTCGGCGGCAAGGTGGAATTCAGCAAGTTTGTGAAATCAAGAAAGTGAA
CTCGAGCTGCTCGCGAGCTGATGACTATTCTAAGAAAGCGCTGACGGTAAGCTGACTGCGGGCG
AAATGTCAGGCGCGTTGCTTACCATCTCCAGCATCGCGCGCTGGGTACTACCACTTCCGCGCGATTGT
GAACCGCGCGGTAAGTGGCTATCTCCGCGTTTCCAAGTCGCGATGGAAGCGGTGTTGAATGGTGAAG
AGTTCGTCGCGCTGATGCTGCGGATTCTCTCTCTCGACACCGCTGATGACGCTGCTGATGG
TGCCGCTTTCATTACCATCATTAACAACACGCTGTGACATTCGCGCTGCTGTSATGTAAGTAAAGAG
CCGCGCCACCGCGCGCTTTTCTGGTAAATCTCATGAATGATTAGGTTATAGCGAATAGACAAATC
GGTTCGCGTTTGAAGCCAGCGGAGATGATGATATATCAATTTCTATCTATAGCTGTTGTTAGTATC
TCGTGCGCACTTAATAAGAGAGAGTATGCTTCTATATCAAGCAAGAGAGTGGTATGATGATGATG
AGTACTGAAATCAAACCTCAGGTCGTGACTTGGGGCAGGCGCGAGGTTACTCTGACGCTTCGCT
TGGCTGATTTAGGTGGAACCGTCATCTAGAACGTTACAGCACCTCGGTGGTGTGTTGCTGAACG
TGGGTTGATTCCTTCTAAGCGCTGCTGACGTCGCAAGAGTTATCGAAGAGCGAAAGCGCTGGCG
AACACGGCATCTGTTTTCGCGAACCGGAAACGATGACATTGACAAAGTCCGACCTGGAAGGAAAGTCA
TCACTCAGCTGACCGGTGCTGCTGGCTGGCCTGCGCAAGGTCGTAAGTGAAGGTGGTTAACGGCTG
GGTAAATTTACCGCGCTAACACCTGGAAGTGAAGGCGAAACGCGCAACCGTATCAATTCGA
CAACGCCATCATCGCGCGGGTTCGCTCCGATTGACGTCGCGCTTATCCCGCATGAAGTCCGCGCTA
TGGGACTCCACCGACCGCTGGAACGAAATCTGACCGAAACGATGCTGGTATGGCGCGGTAT
CATCGCTGGAATGGGTACGCTATACCATGCGCTGGGTTCAGAGATTGACGTTGGTGAAGTGTTCGA
CCAGGTTATCCGCGCTGCGCAAGAGCAGTGGTGAAGTCTTACCAACGATCAGCAAGAAATTTAA
CCTGATGCTGGAAGCCAAAGTACTGCGCTTGAAGCGAAGAGCGGTATTTACGTTTCCATGGAAG
GTAAAAAGCACCGCGGGAAGCGCAGCTTACGACGAGTCTGGTGCCTATCGGCGCGTACCGAAT
GGTAAACCTCGATGACGTAAGCTGGCGTGAAGTTGACATCGCGGCTTATCCGCGTGTGACAA

図 39

【図 39 - 2】

ACAAATGCGCACCAACGTGCCGACATCTTTGCTATCGCGATATCGTGGTCAGCCGATGCTGGCGCA
CAAAGGTGTCCATGAAGGCCACGTTGCCGAGAAGTTATCTCCGGTCTGAACACTACTTCGATCCGAA
AGTGATCCCATCCATCGCTACCTAAACAGAAGTGGCATGGGTGGTGTGACCGAGAAAGAAGCGA
AAGAGAAAGGCATCAGCTACGAACCGCCACCTTCCGTCGGCTGCTCCGCGCGTCTATCGCTTCTG
ACTGCGCAGATGATGACCAAACTGATCTTCGACAAGAGACCCAGCTGTTATCGCGCGCGCGATTG
TCGGCACAACGCGCGGAGCTGCTGGTGAGATCGGCTGGCTATCGAGATGGCTGTGACGCTGAA
GACATCGCCCTGACCATCCAGCTCACCGACTCTGACAGAGTCCGTTGGCTGGCGCGGAAGTGTTC
GAAGGCAGCATCACCGACTGCCAACGCCAAAGCGAAGAAAAAGTAACTTTTCTTCAGGAAAAAG
CATAGCGGCTCCGGGAGCGCTTTTTTATGCTGATGTTAGAACTATGCTACTGTTCAAAACCGCTA
CACCTCATACACTTTAAGGGCGAATTCGAGATATCCATCACCTGCGCGCGCTCGAGCATGCATC
TAGCACATCCGGCAATTAATAAAGCGGCTAACACCGCGCTTTTTTACGCTGCAATTTACCTTCCAGT
CTTCTGCTCCAGCTTCAGAGAGAGCTTCGATACTGCTGACCGTTGCTGTTATTCAGCTGACAGTAT
GGTACTGTCTTTAGACGTTTGGGCGGCTCTCTGAACTTTTCCCGAAAAACCTGACGTTGTTGAG
TGATGCCGATTGAACACGCTGGCGGGCTTATCACGTTGCTGTTGATTGAGTGGGCGCTGCTGATCTTT
TCCTTAAACACCTGGCGCTGCTGCTGATGCGGACTGAATACGCTCACGCTGCTGCTCTCTGCTGCT
GGTTCGCGGTTAGTCTGCAATTTCTCGCAACCGCTGGCGCTGCTCAGCGAGGCGGACTGAATGC
GCTCACGCGTGCCTCTCTGCTGCTGATCTCGGGTTAGTCTGATTCTCTGCGAACTGCCTGGCG
CTGCTCAGCGAGGCGGACTGATAACGCTGACGAGCGGCTCCTTTGCTGCTGGTCAAGTGGTGGC
GACGCTGAAGTCTGGAAGTCTGATAGCTCCATAGTGTTCAGCTTCATTAACCGCTGTCGCGCTGC
CTGACGTTGGTACCTCGTGAATGACTGCTGCGGCTGTTCTGTTGCTGAACTGATTGCTGCGGCC
TGACGCTGGCTGTCGCGCTGGGCGAGTAATGCTGGCGCTCATTCGCGCTGATCGGCTGTTGA
TGAAACCGCTTTGCCATATCTGATCATGATAGGGCACCAATTACGGTAGTTTGAATGTCGCGCATG
CCATATTTCTTACGTAAGATGCTCACCGGTGATACGTTGAAATGTTGACGCTGATGATGATGTTG
GCCGTTGTTGCCAGCATTACCGTCAGATGACCGCATCTGGTGTGATGATAATCAT

図 39 (続き)

【図 40】

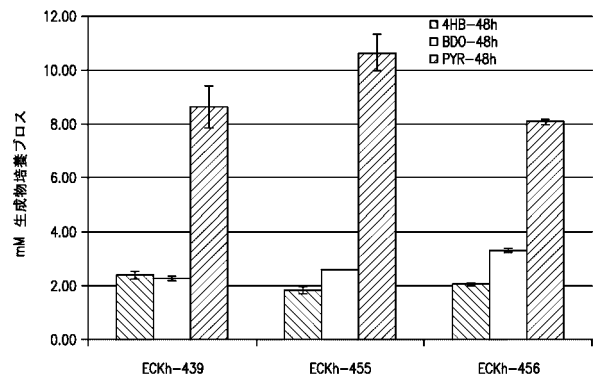


図 40

【図 41 A】

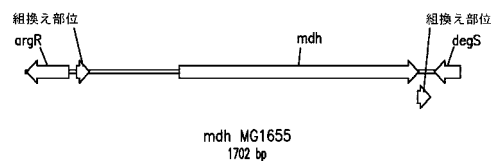


図 41A

【図 5 1】

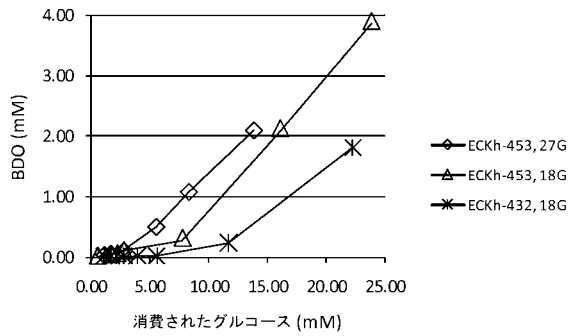


図 51

【図 5 2 - 1】

AATAGGCGTATCAGAGGCCCTTTCTGCTTCCACCTCGAGAATTGTGAGCGGATAACAATTGACATTGTGA
GCGGATAACAAGATACTGAGCACATCAGCAGGACGCACTGACCGAATTCAATTAAGTAGCAAGAGGA
GAAGTCGAGATGAACCTACATGAATATCAGGCAAAACAACTTTTGGCCGCTATGGCTTACCAGCACCG
GTGGGTTATGCTGTACTACTCCGCGCAAGCAGAAAGCCGCTTCAAAATCGGCTGCGCCGCTGCGTG
GTAGTGAATGTGACGTTACGCTGCTGGTGGCGCGGTAAGCGGCGGCTGTGAAGTTGTAAACAGCAA
AGAAGACATCCGCTTTTGCAGAAAATCGCTGGGCAAGCGTGTGTAACGTATCAAAACAGATGCCAA
TGCCCAACCGGTTAACCAGATTCTGTTGAAGCAGCAGCGATATCGTAAAGAGCTGTATCTCGGTGC
CGTTGTTGACCGTAGTTCCCGTCTGTTGCTTTATGGCTCCACCGAAGCGGCGTGGAATCGAAAA
AGTGGCGGAAGAACTCCGCACTGATCCATAAAGTTGCGCTTATCCGCTGACTGGCCGATGCGGTA
TCAGGACGCGGAGCTGGCGTTCAAATGGGTCTGGAAGGTAACCTGGTTGACGAGTTCACCAAAATCTT
CTGGGCTCGGCGACCATTTTCTGAGCGCGCACTGGCGTGTATGAAATCAACCCGCTGGTCATCAC
CAACAGGGCGATTCTGATTGCTCGACGCGCAACTGGGCGCTGACGCGCAACGCACTGTTCCGCGACGC
TGATCTGCGCAAAATGCGTGACCACTGCGAGGAAGATCCGCGTGAAGCAGAGCTGCACAGTGGGAAC
TGAATCTGCTGGCTGGACGGAACATCGTTGTATGTTAACGCGCAGGTCTGGCGATGGGTACG
ATGGACATCGTTAAATCGACGCGCGCAACCGGCTAACTCTTTCAGCTTGGCGCGCGCGCAACCAAA
GAACGTGTAAACGAAGCGTTCAAAATCATCTCTCTGACGACAAAGTGAAGCGCTTCTGGTTAACTCT
TCGGCGGTATCGTTCTGCGACCTGATCGCTGACGGTATCATCGCGCGGTAGCAGAAAGTGGGTGTTA
ACGTACCGGCTGTTGATCGCTGGAAGGTAAACACCGCAACTCGGCGCGGAAGAACTGGCTGACAGC
GGCTGAATATTATTCAGCAAAAGGTCTGACGGATGCACTGACGAGTTGTTGCGCGAGTGGAGG
GAAATAATGTCATTATTAATCGATAAAAAACCAAGGTTATCTGCCAGGCTTACCGGTAGCCAGGGG
ACTTCCACTCAGAACAGGCCATTGCATACGGCACTAAAAGTTGGTGGCGCGTAACCCAGGTAAAGG
GGCACCCACCTCGGCTCGCGGTGTTCAACACCGTGGTGAAGCGTTGCTGCCATGGCGCTACCC
GTTCTGTTATCATGATACCAACCGCTTCTGCAAGACTCCATTCTGGAAGCCATCGACGAGGCAATCA
AAGTATTATCCACTGATGAGGCACTCCGACGCTGGATATGTCGACCGTGAAGGTGAGGTG
AAGCAGGCGTTGATGATCGGCGCAACTCCGAGCGTTATCACTCCGGTGAATGCAAAATCGGTA
TCCAGCCTGGTCACTTCAAAACCGGTAAGTGGGTATCGTTTCCGTTCCGGTACACTGACCTATGA
AGCGGTTAAACAGCACCGGATTACGGTTTCCGTCAGTCGACCTGTGTCGGTATCGCGGTTGACCGGAT
CCGCGGCTCTAACTTATCGACATTCTGAAATGTTGCAAAAGATCCGCGAGCGAAGCGATCGGTGAT
GATCGGTGAGATCGCGGTAGCGCTGAAGAAGAACGACGCTGCTACATCAAGAGACGAGTATCCAAAC
CAGTTGTGGTTACATCGCTGGTGTGACTGCGCGCAAGGCAACAGTATGGGCCACGCGGTCGCTATC
ATTGCGGTGGGAAAGGAGTCTGCGGTGAGAAATTCGCTGCTTGGAAAGCGCGGCGTGAAGACCGT
TCGCAAGCTGGCGGATATCGGTGAAGCACTGAAACTGTTGAAATTAATCTAGCAAGGAGGAGATCG
GACATGGAATCAAAAGAAATGTTGAGCTTGCACGCAAGGCTCAGAAAGGATATCAAGTACCCATAA
CAAGAAACAGTTGACAAACATTTCCGAGCTGACGCAAAAGTTATTTATGAAAGACGAGTATTCGCG
TCGCAAGCAGTAGACAAACCGGATGGCGTTTACGAACCAAAAGTGGCCAAAGTCAAGGCAAAAT
CCAAAGGTGTTTGTGACCACTCCCAATAAAAAATCGATTGGTATCTCTCAATAGACGAGCGTACCG
GTATGATCGAGATTGCAAAAGCTATCGGAGTTGTAGGAGCGTGAAGCGGACGACCAACCGGATCTTA
CTCCGATGAGCAATATCATCTTTGCTCTTAAGACCTGCAATGGCATCAATTATGCCCCACCCAGATCC
AAAAATGCTCTGCACACGAGTTCGTCTGATCAAGAAAGTATCGCTCCGTTCAACGTACCGGAAGGT
ATGGTTTCAGATCTCGAAAGAACCCAGCATCGAGAAAGCAGGAACTCATGGCGCGCTAGACGTAGT
AGTTGCTACGGGTGGTATGGGATGGTGAAGTCTGATATTTCTCAGGAAGCGCTTCTTTCGGTGTGG
AGCGGTAACGTTACGTTGATCGTGAATAGCAACATCGATTGCAAGCTGCTGCAAGAAATATCATCA

図 52

【図 5 2 - 2】

CGGTGCTGCTTCGACACCGGTATCATCTGCTCAGCGCAACAGAGCATCATCAACAGAGGCTGACAA
GGAAGCAGTTTTCACAGATTCCGCAACACCGGTGATATTTCTGTGACGAAGCGGAAGGATCGGGC
TCGTGACGCTATCTCGAAAATGGAGCATCGCAAGATGTAGTAGTTCAGAGCGTTGCTTCTATTGC
CAAGAAAGCAACATCAATATCCCCAGGGTACCGGTATTCTCGTTGTTGAAGCTCGCGCGTAGGAGC
AGAAGACGTTATCTGTAAGGAAAGATGTGTCGCTTAATGTGCGCCCTCAGCTCAAGCACTCTGAAAG
AGGTGTAGAAATCGCACGTACGAACCTCGCAACGAAGGTAACGGCCACACCTGTGCTATCCACTCAA
CAATCAGGCACACATCATCTCTCGAGGATCAGAGCTGACGGTATCTGATCTGATGTAAGTGTCCGAG
TGCCACTACGACGAGGCGTACATCCAAACGCTTTCGCGTAACCAATACGCTCGGATGCGGATCATG
GGGTAATACTCTATCTCCGAGAATCTCACTAAGACACCTCTCAACATTTACGATCGCACCGTTGA
ATTCAAGCATTCACATCCCCGATGACAAAGAAATCTGGGAATCTAATCTAGCAAGGAGGAGATCGAC
ATGCAACTTTTCAAACCTCAAGAGTGAACACATCACTTTGACACTTTTGCAGAAATTTGCAAGGAATTCTG
TCTTGGAGAACGCGACTTGTGAATTAACCAAGAGTTCATCTATGAACCGTATATGAAGGATGCCAGCTC
CCCTGCCATTTTGTATGTCAGGAGAAATATGGGCAAGCGGAGCTTCTGACGAAATGATGAATAACATC
TTGGCAGACATCCGTAATATCCAGTTCGACCGGTAATCGGTATCGGAGGAGGTACGGTTATTGACATC
TCTAAACTTTTCTGTTGAAGGATTAATGATGTAATCGATGATTCGACCGCAAAATACCTCTTATCAA
AGAGAAAGAACTGATCATTTGCGCCACAACATGCGGAACGGGTAGCGAGGTGACGAACATTTCTATCG
CAGAAATCAAAAGCGGTACACCAAAATGGGATGGCTGACGATGCCATTTGTCAGACCATGCCATCA
TCATACCTGAACCTTGAAGAGCTTGCTTTCACTTCTACGATGACGATGCAATCGATGCTCTTATCCAT
GCCATCGAGTCATACGTATCTCTAAGACCACTTCAATTTCTGCTGTTGAGTGGCGGCTGGGACA
TTATCTCGAAGTATTCAAGAAATCGCCGAACCGGCTGAAATCCGCTTCAAGAAAGTGGGAGAA
TGATCATGGCCAGCAACTGTGCGGTATAGCTTGGAAATGCGAGGATGAGGACGCTCCACGCAAT
CCTACCGGTTGGGAGGCACTATCAGTCCGCGATGGAGAAGCAAACTATCAGTTCTTACAGAGGTAT
TCAAAGTATACCAAAAGAAATCTTTGCGGTATATAGTGAACCTCACTGGAAGCTCTCAAGATACT
GAAGTCCAGCCGCAATACGTATATCCGAAGCTGGATGAACCTTCTCGGATGCTTCTTCAAGAAACCT
TTGACGCAATACGCGCATGAAGGACGAAGAGGTGAAGAGCTTTGCGGAATCAGTGCTTGAAGACAGCA
AAGATTGCTCGCAACCAACTACGTAGAGCTTACTGTAGATGAGATCGAAGGTATCTACAGAAAGCTCTA
CTAATCTAGAAAGCTTCTAGAGGATCAAAATAAACGAAAGGCTCAGTGAAGAGCTGGGCTTTCTG
TTATCTGTTTGTGCGGTGAAGCTCTCTGAGTAGGACAAATCCGCGGCTAGACCTAGGCGTTG
GCTCGGACACGCTTGTGAGCGATTGTGAGGCTGGAGCTGCTCGAAGTCTTACTACTTTCTAGAGAAATG
GAACCTCGGAATAGGAATCAAGGAGGATATTCATATGGACCATGGCTAATTTCCAT

図 52 (続き)

【図 5 3 - 1】

TCGAGAAATTTATCAAAAGAGTGTGACTGTGAGCGGATAACATGATACTAGATTCAATTGTGAG
CGGATAACAATTTACACAGAATTCATTAAGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGGCAACATAAAGT
CACCTATTCGGGCAAAACGAATGGCTGGTTGAAGAGATGACCGCAAGTTCCGCGAGCACCCCTCTCGG
TCGATCCCAAGCTGGCAGATTCCTGGTTGACTACAGCCCGCAACCCACTTCCCAACAGCTGCCGCAAC
AACCGGCTTACTTCCCACTGTTGCGAGCGGCGCTGCGGCGCGCGGCAAGGACACCCCAAGCC
GGCGCAACCGCGCGCGCGCGGCAACGCGGTGCTGCGCACTGGCCGCGCAAACTGCGTTTCCCGG
CAGCGCAAGGTGACGAGGTAGCGGTGCTGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGTCAGAAAGTGTGCGC
GTCTTGTGAGGTGCGCGCGCGGACGAGCTGCGGCGCGCGCGCGCGCGCTGATGTCGACCAACCGGA
TCGTCATCAACCAAGCTTGAAGCGGACCGCGCGCGCAAGATCTGTTACGCTATTTGCTGGGTACG
CCCTGTTGCGGCGGTGAAGAAATTCGGAACATGAACCGGCACTACCAAGTGCAGCGCAAGCGCC
ACCGCGGCTACCGCGCGCGCAACCAATCTCGGCTGCGCATGACGATTCGAGCGCAAGGAGGAGAGCG
TTCTGTTGGTGGCGGATCAAGCGGTGCGAGACCATGCGATTCCGCGAGTTCTGTCAGCGCTACGA
AGACATCGATCGCGGCGCGCGCGCAAGCTGACCACTGAAGACTTTCGCGCGTGAAGATTCTGCT
GACCAATCCCGCAACATCGGCAACGCTGATCTGTTGCGCGGCTGATCCGCGCGAGGCGGCAAT
CGGCGTGGCGGCTGGAATACCCGCGAGTTTCAAGGCGCGAGGAGGACGATCCGCGAGCTGG
GCATCGGCAAAATGATCACTTTGACCTCCACGACGACGCACTCAAGGCGCGGATCGGCG
ACTTCTGCGGCACTCAGGAGTTGCTGCTCTGCGATGCTTCTGCGGAGGATCTTCCGGAAGTGA
CATCCCATATCTGCGGCTGCTGAGGACGCAACCCGATCGATGTCGACAGAAAGCTGCGGT
CATGAACCTGATCGCGCTACCGCAACCGCGGCTGATGTTGGCGGATACCGACGCTGCGGTTGA
CAAAGCTCGGTTCCGAGTCAACCGGCACTGCAAGTGTGACCGCGGCTGACGCTGSGGATCTGGA
TCGGGTGTTCAAGGTTCAGCGGCTTTCGCGGTGCGCATGACAGAAATGCGCGACGTGCTGGGCTGCT
GCGCGATGCTCTACTGCGCGACATCGCGGTGGAGTACGCCATATCTCGACCCGCAACAAAGGAGTG
GCTCGAACACCGGCTGAGACCAAGCAGCTCAACCCACTGTGGCCCAACAGAAATACATCTCAGCA
GCTCAACCGCGCGAGGCTTTGAAACGTTCTACAGACCAAGTACGTCGCGCAGAGCGGTTCTCGT
GGAAGGCGCGGAAAGCGGTGATCCGATGATGAGCGCGGATGACCACTGCGCTGAGCAGCGGCTC
GACGAGGTGCTCATCGGATGCGGACCGCGGCGGCTCAAGCTGTCGCGCAACATCTGTCGCGCAAGC
GTACTCGAGATCTTACCGAGTTGAGGCGCAACTGAATCCGTGCGAGCGCAAGGCTCGGTTGAGCT
CAAGTACCACTGCGCGCGCACCGGCTGTACTGTCAGATGTTGCGGCAACAGCAATCAAGGTGCTGCT
GACCGCAACCGTGCATCTGAGGCGCTGACCGGCTGCTGAGGAGGATGTTGCGGCGCAAGCAG
ATCTGCTCGACACGGAAGCATCGACAGCGAGCGGCAACCGGCTTCTCGGTGCTGCGCATGATGTTG
ATGGCATGCGCGCTTCCGCGTCAAGGTGCTGCTGCGGAGCTGAACTCGGCAAGCTGCTCGGCG
TACCGCTGCGCGGCACTCAACATCATGTCGAACCAAGATCGGCTTCAACACCGCGCGGATGAT
CCAGGTCGAGGAGTACTGCAACGAGTCTGCAAGATGATGCGGCGGCGGCAACGATCTTCAAGTCAAGCG
ACGACCGGAGGCGGTGCTGCTGGGTGGCGGTTGGCGGTGACTCTCGAACAGGTTCAAGAAAGGAC
GTGCTATCGCATGCTGTGCTACCGCGCGCGGCGGCAACAGGAGTTCAGGCGGCTGATGACCA
CCCCATATGACGAGCTGCTGACACCAAGCGCGGCGCGGCAAAAGCTACACCGAAGCGCTGATCGG
ACGTGCGGACATCGATGAAGGAGCGGAGGAGCGCTGCGGCACTACCAAGGCGGCTGGAACGCG
GTGTTCAACGAAGTGGCGAGCTGGAAGAGCAAGGTGTCAGCGAGCGAGTGGTGGATCGGCTCGAC
AGATGATTCGCGCGGCGGCTGCGCACTGCGGTGGAACAGTCTGCTGCGCGGATCGGCGATGCTGCT
CTGCTTTCGGAACGGCTTCAACGCGACCGCGAGTCAACCGGCTGTCGGAAGCGCGGAGAT
GGCTATGAAGGCAAGATCGATGGGCTTTGGCGAGTCTGTCGCGTGGGCTGCTGCTGGTGGCGGAG
GCAAGCTGGTGGCTTCTGCGGCGGAGGACAGCGCGCGGCGGCACTTCTCCAGCGCATCTCGTTCTCA
TCGACGCGCACTGCGGAGGATTCACACCACTGACGCTGTCGCGGCACTCAACCGGCGGCGGAG
CGGCGGAAAGTTCTGCTGCTACGACTGCGCATGTCGAGTACCGCGCGCTGCGGCTGAGTACGAGT
ACACTGTGGGCAATCGGACGCGGCTGCTGCTGAGGCGCGAGTTCGCGGCTGCTGCAACGCGCA

図 53

【 図 5 3 - 2 】

CAGTCGATCATCGACGAGTTCATCAGCTCCGGTGAGGCCAAGTGGGGCCAATTGTCCAACGCTCGTGCTG
CTGTTACCGCAGCGGGCAGAGGGGACGGGACCCGACCACTTCTGCCCGGATCGAAGCTTCTTTGCAG
TTGTGGGCGGAAGGTTTCGATGACCATCGATGCCGTGCTCCGCTCGAATCTTCCACCTGCTACGCC
GGCATGCCCTGGACGGCATCCAACGCCCGCTGATCGTGTTCACGCCCAAGTCGATGTTGCGTCAACAAG
CCGCGCTCAGCGAAATCAAGGACTTCACCGAGATCAAGTTCGCTCAGTGCTGAGGAAACCCACTATG
AGGACGGCATCGGAGACCGCAACAAGGTCAGCCGGATCTGCTGACCAAGTGGCAAGCTGTAATACGAG
CTGGCCGCCCGCAAGGCCAAGGACAACCGCAATGACCTCGCGATCGTGCGGGTTGAACAGCTCGCCCC
GCTGCCAGGCGTCTGACTGCGTGAAACGCTGGACCGCTACGAGAACGTCGAAGGATTCCTCTGGGTCCA
AGAGGAACCGGCCAACCGGGTGGTGGCCGCGATTCCGGGCTCGAACTACCGAGCTGCTGCTGACA
AGTTGGCCGGGATCAAGCGAATCTCGCGCCGGGGGATGTCAGCCCCGTGCTCAGGCTGCTGAAAGGTG
CACGCCGTCGAACAGCAGGAGATCTCGACGAGGCGTTCGGCTAATCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACA
TGAAGTTATTAAAAATTGGCACCTGATGTTTATAAAATTTGTAAGTGCAGAGGAGTTTATGAAATCTTTAA
GGTTGGAAGAGGTGACTTTTACTTACTAATGAATTTTATATAAACCTTTTCTTGAGAAATCAATGATG
GTGCAGATGCTGATTTTCAGGAGAAATATGGACTCGGTGAACCTTCTGATGAATGATAAACAATATAA
TTAAGGATATTGGAGATAAAACAATATAATAGAATTATTGCTGTAGGGGGAGGATCTGTAATAGATATAG
CCAAAATCTCAGCTCTTAAGTATACTGATGATTGGAATTTGTTGAGGGAAGAGTACCTCTTGTA
AAACAAAGAATTAATTATAGTTCCAACTACATGTGGAACAGGTTCAGAAGTTACAAATGATCAGTTGCA
GAATTAAGAGAGAACATATAAAAAAGGAATTGCTTCAGACGAATATATGCAACTTATGCAGTACTT
GTACCAGAATTTATAAAGGACTTCCATATAAGTTTTTTGTAACCAAGCTCCGTAGATGCCCTTAATACATGC
AACAGAAGCTTATGATCTCCAAATGCAATCTTATACATGATGTTTAGTGTAAGAGCTATGGAGTTA
ATTTTAAATGGATCATGCAATGGTAGAGAAAGGAATGATTACAGAGTTGAAATAATTGAGGATTTT
GTTATAGGCAGCAATATTGTCAGGTATAGCTTTTGGAATGTCAGGAGTGGGAGCGGTTACGCACTCTCA
TATCCAATAGGCGGAAATTATCATGTGCCTCATGGAGAAGCAATATATGTTTTTACAGAAATATTTA
AAACTTATTATGAGAAAAATCCAAATGGCAAGATTAAAGATGTAATAAACTATTAGCAGGCATACATA
AATGATGATGAAAGTGAAGCTTATGACAGTTTATCACAACCTTTAGATAAAATATTGTCAGAAAAACCAT
AAGAGAATATGGAATGAAAGAGGAAGAAATGAAACTTTTGCTGATTGATGTAATAGAAGGACAGCAGA
GACTGTTGGTAACAATTATGAACCTTTTCAAGAGAAGACATAGTAACACATATAAAAGTTATATTA
ATCTAGAAAGCTTCTAGAGGCATCAATAAAACGAAAGGCTCAGTCCGAAAGACTGGGCTTTGTTTT
ATCTGTTGTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAATCCGCGCCTAGACCTA

図 53 (続き)

【 図 5 4 】

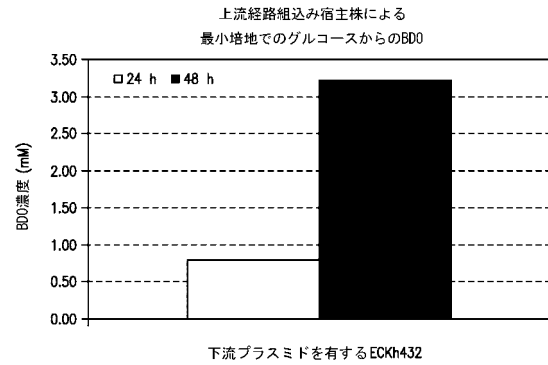


図 54

【 図 5 5 - 1 】

csdR v/5' del	
SENSE PRM	
1	TCCTTTCAG GCTGAATTC TCTCTTTCG CCGCAAGG CTTGCGGT TGAATGCG CTCACGCG CACTTTCG CTTCTGCG C AGCTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR v/5' del
101	AGGACGCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG TCCTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR v/5' del
201	TGAGGAGC CTTCTGCG CCGCAAGG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG AGCTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR v/5' del
301	TCTCTTCG CCGCAAGG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG AGGACGCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR v/5' del
401	CAGGAGCT CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG TCCTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR v/5' del
501	CTGCGGAT CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG GAGGAGCT CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR v/5' del
601	TTCAAGCG CCGCAAGG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG AGGACGCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR v/5' del
701	CGGAGGAT CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG GAGGAGCT CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR v/5' del
801	CGGAGGAT CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG GAGGAGCT CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR
901	AGGAGGAT CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG GAGGAGCT CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR
1001	CAGGAGCT CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG GAGGAGCT CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR

図 55

【 図 5 5 - 2 】

csdR	
1101	TGAGGAGC CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG AGGACGCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR
1201	AGGACGCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG TCCTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR
1301	GAGGAGCT CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG TCCTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR
1401	CTGCGGAT CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG GAGGAGCT CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR
1501	CAGGAGCT CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG TCCTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR
1601	ATGAGGAT CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG GAGGAGCT CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR
1701	CTGCGGAT CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG GAGGAGCT CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR
1801	TGAGGAGC CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG AGGACGCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR
1901	CTGAGGAT CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG GAGGAGCT CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR
2001	AGGAGGAT CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG GAGGAGCT CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR
2101	GAGGAGCT CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG CCGTTCGCG TCCTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG CACTTTCG csdR

図 55 (続き)

【 図 5 5 - 3 】

```

2201 GATCAGGCTG TTGAGAGGT TGTCTACCC GCGAGAGGT GCGAGATGA AATGAGTGA GAAGTGTGA CCGGTGCT CATAGATT TTCTAGGGG
    CAGTCCAGT AAGTCTAGA AGTATGGG CCGTCTGCG CCGTCACTT TTACCTATG TTCTACAGT GCGACAGGA GTACTTCAG AGATCTGCG
                                     cscA
2301 TTTTGCTGG CATGCAATG AGATGAGTC ATTATATCA TCTGATGTA TGTATGTTA AGTTATCT TTATAGAAAT AAGTCTGTT
    AAGAGTGGT GAGCTTAGG TCTACCGAG TATATATGT AGAGATGTT CTTTAAAGT ACTTATAGT TGTATATGA AATCTATTA TTGCGAGA
                                     cscA
2401 ACTTTATTA ATGCTATGA TATCAGAAAT GTTACATTA ACTATGAGT TTTTGATAG AATATGAGG TTTATATAA TGTACAGGA TTGTGAAA
    TTAGATATT TACATGATT ATATGTTTA GATTTGCAAT TATATGATG AAGATAGG TATATAGTAC AATATCTTT AGTATGCTT AAAAGCTTT
                                     cscK
2501 AAGAGTTTA TGTATAGG TACTGAGAT GATTTAGG GATATATG TCGATCAAG TATGATGTT AGGAGATGG GTGCGAGAT TTGTGCGA
    TTTCTCAAT ATATAGTGG ATATGCTTA GTTAAATCC CTTTATTTG ATGTGATTC ATACCGAAA TCTCTAGCG CAGCATAG AGAGAGTCT
                                     cscK
2601 ATCAGAGGG GCGTACTG CTTGCTGCG GCGCGCGCA GCTAGCTTG CCGTGGAGT GCGTAGATTA GCGTAGACA GTGGATTAT AGTGTAGTG
    TATGTGCGT GCGAGTAGG GAGCAGGAC GCGCGCGGT CAGTTGAG CCGCATCTTA GCGTCTAAT CCGTCTGTT CAGTCAATA TCGAGCGAC
                                     cscK
2701 GGGATGATC CTTTGTGCG GTTATGCAA AGAAGCTGG TACTGAGG AGTGTATAT AGTATCTGA AGCAGATGA ATGCGACGG ACATCCAGG
    CCGTATAGG GAAGACCGG CAGTATGTT TGTGTGAGG ATATGCTCC TACATATAG TCGATAGAT TGTCTTACT TACGTGAGT TGTAGTGGT
                                     cscK
2801 TGTCTGTA TGTAGAGT CAGGGGAA GTTCATTAC GTTATAGT CCGCCAGTG CCGATTTTT TTATAGAGG ACAGATGCG CTGCTGCGG
    AGACAGAT AGCTATCTA GTTCTGTT CAGTAAAG CAATATCG GCGCGTGC GCGTAGAAA AATCTCTCG TGTGTAGG GAGCAGCGC
                                     cscK
2901 ACATGCGAA TGTATACAT TGTGTCAAT TGTGTGCT GCGAGCTT CCGTATCAG GCGATTACT GCGTAGAGG CAGTCCGCA TGTGTAGGT
    TGTAGCTTT ACCATATAG AGCAGATTA AGCAGAGCA CCGTCTGA GCGAGTGT CCGTAAAGA GCGTACTCG GCGAGCGGT AGGCTCTCA
                                     cscK
3001 TTTTGCTGT TGTATCTTA TATGTGAA GATCTAGCG AAGCAGACA TTCTCGCG TTGTGTTTC GCGAGAGCT ACAGTGGG GATGTCTGA
    AAGAGTGA AGTATGATT ATATGACTT CAGTATCG TTCTGTAT AAGCAGGCG AGCAGAGG CCGTCTGTA TGTGTAGCG TACAGAGT
                                     cscK
3101 AGTCTGGA AGAGATGG CAGCTTACA GTTAAAGC ACAGAGGAT CAGATATAT GCGCTTGGC AAGAGATAT GAGTCTGCA TGTGTGTT
    TGTAGGCTT TTCTTTGAG GCGTAGCG GACTTTTT TGTCTGCTA GTCTATATA GCGAGAGCG TTCTCTGTA CTTATAGGT AGCAGACA
                                     cscK
3201 GCGTAGAGT GCGAGAGG TGTGTCTG TATAGAGA CAGTGTAC ATTGTCTG AGTGTCTG AUTGTCTG ATACAGCG GCGAGAGT
    CAGTCTCA GGTCTTCCC AGCAGAGTA AGTATGCT GTTATGTT TATAGAGG TACAGAGC TATAGAGC TATGTGCT CCGCATCTA
                                     cscK
3301 GGTGTCTG CAGTGTAT CAGCTCTG TGTCTAGG GATCTATG AGAGAGGA GAATGTAGG GATGTATG TGTCTGTA GTTGTAGG
    CCGAGAGC GCGCAGTA GTTGTGAG AGGAGTGG CAGTATG TGTCTCTT TTATAGTG GTTATGAT AGAGAGAT GCGAGCTTC
                                     cscK

```

図 55 (続き)

【 図 5 5 - 4 】

```

3401 GCTTTCAGT AACGGGAAA GGGCAGTGA CAGGCTGCG ATGTGACA GATCTGAT AGTATAGAT AAGGGGAA GTGCTCTTA TGTATATA
    GCGAGCTCA TTGCGCTTT CCGCTTACT GTGCGAGGG TACAGTGT TTATAGCT TACCTCTCA TTGCGCTT CAGAGAGAT AGATATTAT
                                     cscB
3501 GCGATGAT TTTTAGCA CAGCAGATA ATATGCGAC TGAATATCC ATTACAGAT GGTACTATC GTTTGCTAT CAGTACTCA TTCTCTTT
    CTCTGCTTA AAAATTCGT GTCTGTGAT TATACGCT ATTATAGG AGATCTTA GTATATAG CAGAGATAG CAAGGTATG ATCAATGAT AAGAGAAA
                                     cscB
3601 TATTTCTG GTCTGTGG TGTCTGAT AGCTATTT GCGTAGAGA CATAGAGT TACAGAGC GAGATGAT ACATTTAT CCGTCAACA
    AATAGAGC CAGCGACCT ACCAGCATA TCGATTAAG CCGATTTCT GTATCTCA ACTCTCTCT CTTATCTCA TGTATATTA CCGATTTGT
                                     cscB
3701 GTTATAGC ATTATATTA TGTGTCTA CCGATGCT CAGATTAAC TGTGTCTG GAAGCTCTC ATCTGTGA TGTATTTAT CTGCTCTG
    CAGGTGTG TATATATAT ACTACAGAT GCGTAGAGA GTTATTTT AGCAGATT CTTGTAGAG TATAGCTAT ACTATATTA AGCAGATG
                                     cscB
3801 AGCGATGT TTATGTTTA GTTTATGA CTTTACTG AAGCAATT TTGTAGGT GTATCTGCG GCGATATC TTGTGCTG GGTATCTG
    TGGCTGTGA AATATTAAT GCAATATC GCGATGAG TTGTGTTT TGTGTATG AGATCTCA GATAGATAG CCGATATG AAAAGTAC CCGTATAGC
                                     cscB
3901 GCGATGCG TTCTGTAT ACTTCTAG AAAAATGCG GCGAATTT CATTGAT ATAGAGAG GCGCTCTG GATCTTTG GATATATAT
    GCTTATGCG AAGAGATA TGTAGTGG TTTTATCG GCTTTAAA GTATATTA TACTTTTG CCGCGATG CTTAGTAA ACATATGA
                                     cscB
4001 TGGCGCTC TTTCGCGA TATTTTGA TATAGCTCC CAGTCAAT TGTGTGTT GTGTATTT GCGCTATC GCGCTATG TATAGTAT CAGCTGCT
    ACCGCGAG AAGGTGCT ATAAATAT ATATCGGG GTATATTA AGATCTCA GATAGTGA CCGAGCTA ACTATCTA GTTGTAGCA
                                     cscB
4101 TTATAGTA AGTATACA GTGTAGCG GCGATGCG GAGGTGAA AAGAGGAT TTATGCGAG TTTTATGA TGTATCTT TGGTCTG
    AAAATTAT TGTATGTT CAGCTGCG GGTACTGCG CTTCTATT TTCTCTCA AATATGCT AAAATCTT AGCTATAG ACCAAGAG
                                     cscB
4201 TGTATAT TGTAGAGC TGTCTTTT ATAGATTT TATGAGAG CTTTCTCG TCTTTATC AGTATAT GATCAGAG ATATAGAG
    AATATATA ACATCTGC ACCAGAGG TATGTAAA ATATGTTT GAAAAGAG AGAATAGG TCGATAGG GTTATGCT TACTCTTG
                                     cscB
4301 GCGCTGAT GTTATCTA ACTATCTA GGTGCTCT GAGGTGCT GCGATGCT TACTCTCT TTGTGAT GCGAGGCG AAAAATGCA
    CCGAGATA CAGTATGAT TATATAGT CACCATAG CTTGTGCA GATCTCTA ATAGAGAG AAGCTTAG CCGATCTG TTTTTATG
                                     cscB
4401 TACTATCG GATTTGAT TATGCTTG GTATCTTT CTGCGCTT GTTGTAGC CCGTATTA TTCTATAT GATGTATTA CAGCTATG
    ATATAGAG CTAACATA ATACCGAC GGTATGAA GAGGTGGA CAGCATGT GCGCTCAT AATATATA CTTAGATG GTATATAG
                                     cscB
4501 AGGTCTAT TGTGTATA TGTCTCTA ATAGAGGT GCGAATTT GATAGGCG TGTGTGAG GATTTCTG ATGTATTT AATATGCG
    TCGATGTA AAGCATAT AGCAGAGT TTATGCGA CTTTGA CTATCTCG ACAGCTCT CAGAGAGC TACCAAGG TTATAGCT
                                     cscB

```

図 55 (続き)

【 図 5 5 - 5 】

```

4601 TTCTCTGG ATGTGCTG TTTCAGCG GATCGGATA CTTTGGAT ACCAGGCTA CCGACAGT TTCTGCGA TTGTGGAT TGTGTCTG
    AAGAGGCT TACAGAGG AAGTGTGG CAGCTGAT GAGAGCTG TGTGTGAT GTCTGTCA AAGAGGTT AAGCTGTA ACAGAGAC
                                     cscB
4701 ATGTGTAT TTGCTATT CTTCTGAT AAAAGCGG AGCAATGT TATGAAAG CCGTACTT CAGCATATA GAGTAACT TTTCGGTT
    TACAGATA AAGTAAA GAGAGCTA TTTTTGGC TGTATCTA ATACTTTC GAGCTGGA GTGTATAT CCGATTTG AAGAGCGA
4801 GTTGTATA GTCTATAC CTTAGCGG AATATATA TATGAAAG CTTAGCTTG CTAATATG CTAATGCA AGCTATAT CAGTCTG
    CAGAGATAT CAGATATG GAGTGTGG TTTATATT ATATTTAC GATGTGAG GATATAGC GATATGAT TGTGTATA GCGAGAT
4901 TACTGTCT CAGATAT TGTGTGCG GTTCTGTA TTCTAGAG ATGTGCTA TTATGATC TGTCTGTT ATCGATTC TGTATTTA
    ATGTGAGA GTTATCTA AGTATGCG CCGAGCAT AAGCTTTC TACAGAGT AAGCTGCG ACAGAGCA TATGTAGG AGATATGT
5001 TCGAGAGT CATTGCGAG TATATGTC ATATGCGA TATTTCTA CCGAGATG AGTTTGA TATAGGCA GTTGCTTC ATGCA
    AGTCTTAC GATAGCTC ACTTATAG TGTGTGTT ATATAGAT GGGATTTC TCAAACTCT ATATTCGTT CAGTGAAG TGAATGT
                                     ANTISENSE_PR

```

図 55 (続き)

【 図 5 6 】

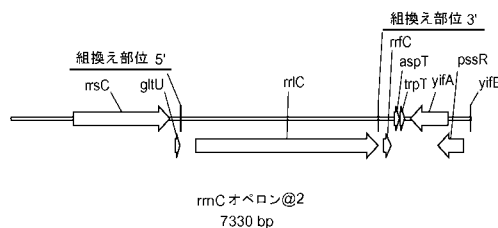


図 56

【 図 5 7 】

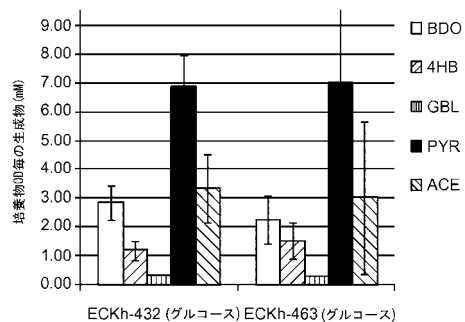


図 57

[illegible]

FIG. 66B

【配列表】

2013507145000001 . app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 10/52570
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12P 7/26, C12N 1/20 (2011.01) USPC - 435/148, 435/252.3 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) USPC- 435/148, 435/252.3 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 435/141, 435/33, 435/59.1, 435/136, 435/189, 45/471, 435/157 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB), Dialog Classic Files (654, 652, 349, 35, 65, 155); PCT Patentscope; USPTO Web Page; Google Scholar; Search terms - engineered microorganism, exogenous nucleic acid, heterologous, 4-hydroxybutanal production, recombinant enzymes, anaerobic culture, 4-hydroxybutyrate reductase, 4-hydroxybutyrate dehydrogenase		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/111513 A1 (BERRY et al.) 11 September 2009 (11.09.2009) para [0002], [0007], [0011], [0015], [0091], [0105], [0107], [0121], [0231], [0287], [0455], [0487], Fig 6	1-3, 11-20
-		6-8
Y	US 2009/0075351 A1 (BURK et al.) 19 March 2009 (19.03.2009) para [0007], [0009], [0056], [0059], [0097]	6-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 08 March 2011 (08.03.2011)		Date of mailing of the international search report 25 MAR 2011
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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/52570

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.: 4-5, 9-10
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:
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.

Group I:- claims 1-3, 6-8, 11-25, 51-55, drawn to a non-naturally occurring microbial organism having a specifically defined 4-hydroxybutanal pathway comprising exogenous nucleic acids encoding 4-hydroxybutanal pathway enzymes expressed in a sufficient amount to produce 4-hydroxybutanal, said 4-hydroxybutanal pathway. The first invention is restricted to a non-naturally occurring microbial organism having a 4-hydroxybutanal pathway comprising 4-hydroxybutyrate reductase; succinyl-CoA reductase (aldehyde forming); and 4-hydroxybutyrate dehydrogenase. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional 4-hydroxybutanal pathway(s) to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected 4-hydroxybutanal pathway(s).

NOTE: Claims 21-25 and 51-55 were not subject to this opinion because these claims are drawn to a non-elected subject matter.]

SEE CONTINUATION 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.: claims 1-3, 6-8 and 11-20, restricted to a 4-hydroxybutanal pathway comprising 4-hydroxybutyrate reductase; succinyl-CoA reductase (aldehyde forming); and 4-hydroxybutyrate dehydrogenase.
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.:

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/52570

***** Supplemental Box *****

Continuation of Box III

Group II+, claims 26-50, drawn to a non-naturally occurring microbial organism having a putrescine pathway comprising at least one exogenous nucleic acid. The first invention of Group II+ is restricted to a non-naturally occurring microbial organism having a putrescine pathway comprising succinate reductase. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional enzyme(s) to be searched and/or binding moieties to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected.

The inventions listed as Groups I+ and 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:

The inventions of Group I+ do not include the inventive concept of a non-naturally occurring microbial organism having a putrescine pathway, as required by Group II+.

The inventions of Group II+ do not include the inventive concept of a non-naturally occurring microbial organism having a 4-hydroxybutanal pathway, as required by Group I+.

The inventions of Group I+ share the technical feature of a non-naturally occurring microbial organism, comprising a microbial organism having a 4-hydroxybutanal pathway comprising at least one exogenous nucleic acid encoding a 4-hydroxybutanal pathway enzymes expressed in a sufficient amount to produce 4-hydroxybutanal. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by WO 2009/111513 A1 to Berry et al. (hereinafter "Berry") (11 September 2009) that teaches a non-naturally occurring microbial organism (engineered microorganism, para [0287], [0407], [0455], "EXAMPLE 23 Engineered Microorganisms Producing 1,4-butanediol. ... Aldehyde dehydrogenase E. coli aldH (EC 1.1.1.n) generates 4-hydroxybutanal from and NADH"; para [0487]), comprising

-- a microbial organism having a 4-hydroxybutanal pathway (para [0455], "Aldehyde dehydrogenase E. coli aldH (EC 1.1.1.n) generates 4-hydroxybutanal from 4-hydroxybutyrate and NADH") comprising

-- exogenous nucleic acids encoding (para [0010]-[0011], "[0010], "... a modified host cell is one that is genetically modified with an exogenous nucleic acid sequence encoding a single protein involved in a biosynthetic pathway involved in product or intermediate production. In other embodiments, a modified host cell is one that is genetically modified with exogenous nucleic acid sequences encoding two or more proteins involved in a biosynthetic pathway involved in product or intermediate production, for example, the first and second enzymes in a biosynthetic pathway") 4-hydroxybutanal pathway enzymes (para [0455]) expressed in a sufficient amount to produce 4-hydroxybutanal (para [0455]),

-- said 4-hydroxybutanal pathway comprising 4-hydroxybutyrate reductase (enzyme converting 4-hydroxybutanal to 1,4-butanediol, para [0455], [0487]); succinyl-CoA reductase (aldehyde forming) (enzyme converting succinyl-CoA to succinyl semialdehyde, para [0487]); and 4-hydroxybutyrate dehydrogenase (enzyme converting 4-hydroxybutyrate to 4-hydroxybutanal, para [0455], [0487]). As said microorganism was known at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another technical feature of the inventions listed as Group I+ is the specific 4-hydroxybutanal pathway recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because 1) said 4-hydroxybutanal pathways are defined as specific combinations of known in the art enzymes, and further because 2) Berry discloses one of the claimed combinations as set forth immediately above. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

The inventions of Group II+ share the technical feature of a non-naturally occurring microbial organism having a putrescine pathway comprising at least one exogenous nucleic acid. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2009/0011478 A1 (08 January 2009) to Eppelmann, et al. that discloses said microorganism (para [0001], "a microorganism having an increased level of an ornithine decarboxylase activity as compared to the native level of the ornithine decarboxylase activity" and "biochemical synthesis of 1,4-butanediamine (CAS number 110-60-1; a compound also referred to as tetramethylenediamine; in biochemical literature it is also being referred to as putrescine)". As said microorganism was known at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another technical feature of the inventions listed as Group II+ is the specific enzyme(s) recited therein. As no significant structural similarities can readily be ascertained among the enzymes, the inventions do not share a special technical feature. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ and 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

(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

(72)発明者 ウエイ ニウ

アメリカ合衆国 ネブラスカ 6 8 5 1 6 ルインクオルン ルオマ シルクルエ 6 1 0 0

(72)発明者 アントホニイ ピー . ブルガルド

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ
1 0 5 2 0

F ターム(参考) 4B024 AA03 BA80 CA04 CA20 DA06 EA04

4B064 AC24 AE01 AE57 AE58 AE63 CA02 CA19 CC24

4B065 AA01Y AA26X AB01 AC14 BA02 BB02 BB03 BB11 BB13 BB15

CA04 CA08 CA14 CA16 CA18 CA19