

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-519811

(P2014-519811A)

(43) 公表日 平成26年8月21日(2014.8.21)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21	Z N A	4 B 0 2 4
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15		4 B 0 6 4
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19		4 B 0 6 5
C 12 P 5/02 (2006.01)	C 12 P 5/02		
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 127 頁)

(21) 出願番号	特願2014-508154 (P2014-508154)
(86) (22) 出願日	平成24年4月27日 (2012.4.27)
(85) 翻訳文提出日	平成25年12月25日 (2013.12.25)
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/035655
(87) 國際公開番号	W02012/149469
(87) 國際公開日	平成24年11月1日 (2012.11.1)
(31) 優先権主張番号	61/481,098
(32) 優先日	平成23年4月29日 (2011.4.29)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(71) 出願人	509240479 ダニスコ・ユース・インク アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94 304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロ ード 925
(71) 出願人	513158760 ザ・グッドイヤー・タイヤ・アンド・ラバ ー・カンパニー アメリカ合衆国、オハイオ州 44316 、アクロン イノベーション・ウェイ 2 OO
(74) 代理人	100071010 弁理士 山崎 行造
(74) 代理人	100118647 弁理士 赤松 利昭

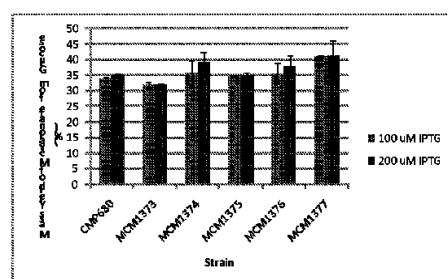
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】チオラーゼ、HMG-CoA合成酵素及びHMG-CoA還元酵素活性を有するポリペプチドをコードしている遺伝子を使用するメバロン酸、イソプレン、及びイソプレノイドの生産

## (57) 【要約】

本発明は、生物のリステリア・グレイ DSM 20600 1 (Listeria grayi DSM 20601)、エンテロコッカス・ファシウム (Enterococcus faecium)、エンテロコッカス・ガリナラム EG 2 (Enterococcus gallinarum EG2) 及びエンテロコッカス・カッセリファバス (Enterococcus casseliflavus) 由来のmv a E 及びmv a S 遺伝子を異種発現させることにより、微生物においてメバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、及び/又はイソプレノイドの生産を増大させるための組成物及び方法を特徴とする。

FIGURE 1:



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

イソブレンの生産量を増大させることのできる組み換え細胞であって、  
 a . E . ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、  
 b . E . カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、  
 c . E . ファシウム (*E. faecium*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、並びに  
 d . L . グレイ (*L. grayi*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、  
 からなる群から選択されるスクレオチド配列を含む 1 つ以上の異種核酸を含み、前記 mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子が、チオラーゼ、HMG-CoA 合成酵素、及び HMG-CoA 還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、前記細胞が、  
 i . 前記 MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸、及び  
 ii . イソブレン合成酵素ポリペプチドをコードしている異種核酸、を更に含み、  
 mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を含まないイソブレン生産細胞と比較して、イソブレンの生産量が増大している、細胞。

## 【請求項 2】

前記 MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている核酸が、(a) メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素、(b) 5 - ホスホメバロン酸を 5 - ジホスホメバロン酸へと変換する酵素、及び(c) 5 - ジホスホメバロン酸をイソペンテニルピロリノ酸へと変換する酵素、から選択される酵素を含む、請求項 1 に記載の細胞。

## 【請求項 3】

前記メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素が、M . マゼイ (*M. mazei*) · メバロン酸キナーゼ、M . バートニイ (*M. burtonii*) · メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) · メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス · サケイ (*Lactobacillus sakei*) · メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母 · メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロマイセス · セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) · メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) · メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス · ニューモニアエ (*Streptococcus pneumoniae*) · メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) · メバロン酸キナーゼポリペプチド、及びストレプトマイセス CL190 (*Streptomyces CL190*) · メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の細胞。

## 【請求項 4】

前記メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素が、M . マゼイ (*M. mazei*) メバロン酸キナーゼである、請求項 3 に記載の細胞。

## 【請求項 5】

前記イソブレン合成酵素ポリペプチドは、植物のイソブレン合成酵素ポリペプチド又はこれらの変異体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の細胞。

## 【請求項 6】

前記イソブレン合成酵素ポリペプチドが、クズ属 (*Pueraria*) 又はハコヤナギ属 (*Populus*) 、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) × ヤマナラシ (*Populus tremula*) などの交雑種、又はこれらの変異体由来のポリペプチドである、請求項 5 に記載の細胞。

## 【請求項 7】

前記イソブレン合成酵素ポリペプチドが、プエラリア · モンタナ (*Pueraria montana*) 、プエラリア · ロバタ (*Pueraria lobata*) 、ヤマナラシ (*Populus tremuloides*) 、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) 、ポプラ · ニグラ (*Populus nigra*) 及びポプラ · トリコカルパ (*Populus trichocarpa*) からなる群から選択される、請求項 6 に記載の細胞。

## 【請求項 8】

前記植物のイソブレン合成酵素ポリペプチドが、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) のイソブレン合成酵素ポリペプチドである、請求項 5 に記載の細胞。

10

20

30

40

50

**【請求項 9】**

前記細胞が、イソペンテニル - ジホスフェート - イソメラーゼ (IDH) のポリペプチドをコードしている核酸を更に 1 種以上含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の細胞。

**【請求項 10】**

前記 IDH ポリペプチドをコードしている核酸が、IDH ポリペプチドをコードしている異種核酸である、請求項 9 に記載の細胞。

**【請求項 11】**

前記 IDH ポリペプチドが、酵母 IDH ポリペプチドである、請求項 10 に記載の細胞。

10

**【請求項 12】**

前記 IDH ポリペプチドをコードしている核酸が、IDH ポリペプチドをコードしている内在性の核酸のコピーである、請求項 9 に記載の細胞。

**【請求項 13】**

前記 1 つ以上の核酸が、誘導型プロモータ又は常時発現型プロモータ下に配置される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の細胞。

**【請求項 14】**

前記 1 つ以上の核酸が、マルチコピープラスミドにクローン化される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の細胞。

20

**【請求項 15】**

前記 1 つ以上の核酸が、前記細胞の染色体に組み込まれる、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の細胞。

**【請求項 16】**

前記細胞が、グラム陽性細菌細胞若しくはグラム陰性細菌細胞、大腸菌 (*Escherichia*) 細胞、パントエア (*Pantoea*) 細胞、真菌細胞、糸状菌細胞、トリコデルマ (*Trichoderma*) 細胞、アスペルギルス (*Aspergillus*) 細胞又は酵母細胞である、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の細胞。

**【請求項 17】**

前記細胞が、大腸菌 (*E. coli*)、*P. citrea*、枯草菌 (*B. subtilis*)、*B. licheniformis*、*B. lentus*、*B. brevis*、*B. stearothermophilus*、*B. alkalophilus*、*B. amyloliquefaciens*、*B. clausii*、*B. halodurans*、*B. megaterium*、*B. coagulans*、*B. circulans*、*B. lautus*、*B. thuringiensis*、*S. albus*、*S. lividans*、*S. coelicolor*、*S. griseus*、シュードモナス種 (*Pseudomonas* sp.) 及び *P. alcaligenes* 細胞からなる群から選択される、請求項 16 に記載の細胞。

30

**【請求項 18】**

前記細胞が、大腸菌 (*E. coli*) である、請求項 17 に記載の細胞。

40

**【請求項 19】**

イソプレンの生産方法であって、(a) イソプレン生産に好適な培養条件下で請求項 1 に記載の宿主細胞を培養する工程と、(b) イソプレンを生産させる工程と、を含む、方法。

**【請求項 20】**

(c) 前記イソプレンを回収する工程、を更に含む、請求項 19 に記載の方法。

**【請求項 21】**

イソプレノイド前駆体の生産量を増大させる事のできる組み換え細胞であって、

(a) *E. gallinarum* 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、

50

(b) E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、

(c) E. ファシウム (*E. faecium*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、及び

(d) L. グレイ (*L. grayi*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む 1 つ以上の異種核酸を含み、前記 mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子が、チオラーゼ、HMG-CoA 合成酵素、及び HMG-CoA 還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、前記細胞が、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を含まないイソプレノイド前駆体生産細胞と比較して、多量にイソブレン前駆体を生産する、細胞。

**【請求項 22】**

前記 1 つ以上の核酸が、誘導型プロモータ又は常時発現型プロモータ下に配置される、請求項 21 に記載の細胞。

**【請求項 23】**

前記 1 つ以上の核酸が、マルチコピープラスミドにクローン化される、請求項 21 ~ 22 のいずれか一項に記載の細胞。

**【請求項 24】**

前記 1 つ以上の核酸が、前記細胞の染色体に組み込まれる、請求項 21 ~ 22 のいずれか一項に記載の細胞。

**【請求項 25】**

前記細胞が、グラム陽性細菌細胞、グラム陰性細菌細胞、大腸菌 (*Escherichia*) 細胞、パントエア (*Pantoea*) 細胞、真菌細胞、糸状菌細胞、トリコデルマ (*Trichoderma*) 細胞、アスペルギルス (*Aspergillus*) 細胞又は酵母細胞である、請求項 21 ~ 24 のいずれか一項に記載の細胞。

**【請求項 26】**

前記細胞が、大腸菌 (*E. coli*)、P. シトレア (*P. citrea*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、B. リケニフォルミス (*B. licheniformis*)、B. レンタス (*B. lentus*)、B. ブレビス (*B. brevis*)、B. ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*)、B. アルカロフィルス (*B. alkalophilus*)、B. アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*)、B. クラウシイ (*B. clausii*)、B. ハロドュランス (*B. halodurans*)、B. メガテリウム (*B. megaterium*)、B. コアギュランス (*B. coagulans*)、B. サーキュランス (*B. circulans*)、B. ロータス (*B. laetus*)、B. チューリングエンシス (*B. thuringiensis*)、S. アルバス (*S. albus*)、S. リビダンス (*S. lividans*)、S. コエリカラー (*S. coelicolor*)、S. グリセウス (*S. griseus*)、シュードモナス種 (*Pseudomonas* sp.) 及び P. アルカリゲネス (*P. alcaligenes*) 細胞からなる群から選択される、請求項 25 のいずれか一項に記載の細胞。

**【請求項 27】**

前記細胞が、大腸菌 (*E. coli*) である、請求項 26 に記載の細胞。

**【請求項 28】**

前記イソプレノイド前駆体が、メバロン酸 (MVA) である、請求項 21 ~ 27 のいずれか一項に記載の細胞。

**【請求項 29】**

イソプレノイド前駆体の生産方法であって、(a) イソプレノイド前駆体の生産に好適な条件下で請求項 21 に記載の宿主細胞を培養する工程、並びに (b) 前記イソプレノイド前駆体を生産させる工程、を含む、方法。

**【請求項 30】**

(c) 前記イソプレノイド前駆体を回収する工程、を更に含む、請求項 29 に記載の方法。

**【請求項 31】**

イソプレノイドの生産量を増大させることのできる組み換え細胞であって、

(a) E. ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、

10

20

30

40

50

(b) E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、

(c) E. ファシウム (*E. faecium*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、及び

(d) L. グレイ (*L. grayi*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む 1 つ以上の異種核酸を含み、前記 mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子が、チオラーゼ、HMG-CoA 合成酵素、及び HMG-CoA 還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、前記細胞が、  
i. 前記 MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸、及び  
ii. ポリブレニルピロリン酸合成酵素をコードしている 1 つ以上の核酸、

を更に含み、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を含まないイソプレノイド生産細胞と比較して、イソプレノイドの生産量が増大している、細胞。 10

#### 【請求項 3 2】

前記 MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている核酸が、(a) メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素、(b) 5 - ホスホメバロン酸を 5 - ジホスホメバロン酸へと変換する酵素、及び(c) 5 - ジホスホメバロン酸をイソペンテニルピロリン酸へと変換する酵素、から選択される酵素を含む、請求項 3 1 に記載の細胞。

#### 【請求項 3 3】

前記メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素が、M. マゼイ (*M. mazei*)・メバロン酸キナーゼ、M. バートニイ (*M. burtonii*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス (*Lactobacillus*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ (*Lactobacillus sakei*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母・メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロマイセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニアエ (*Streptococcus pneumoniae*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトマイセス (*Streptomyces*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、及びストレプトマイセス CL190 (*Streptomyces CL190*)・メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群から選択される、請求項 3 1 又は 3 2 に記載の細胞。 20

#### 【請求項 3 4】

前記メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素が、M. マゼイ (*M. mazei*) メバロン酸キナーゼである、請求項 3 3 に記載の細胞。 30

#### 【請求項 3 5】

前記 1 つ以上の核酸が、誘導型プロモータ又は常時発現型プロモータ下に配置される、請求項 3 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の細胞。

#### 【請求項 3 6】

前記 1 つ以上の核酸が、マルチコピープラスミドにクローン化される、請求項 3 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の細胞。

#### 【請求項 3 7】

前記 1 つ以上の核酸が、前記細胞の染色体に組み込まれる、請求項 3 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の細胞。 40

#### 【請求項 3 8】

前記細胞が、グラム陽性細菌細胞、グラム陰性細菌細胞、大腸菌 (*Escherichia*) 細胞、パントエア (*Pantoea*) 細胞、真菌細胞、糸状菌細胞、トリコデルマ (*Trichoderma*) 細胞、アスペルギルス (*Aspergillus*) 細胞又は酵母細胞である、請求項 3 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の細胞。

#### 【請求項 3 9】

前記細胞が、大腸菌 (*E. coli*)、P. シトリア (*P. citrea*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、B. リケニフォルミス (*B. licheniformis*)、B. レンタス (*B. lentus*)、B. ブレビス (*B. brevis*)、B. ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*)、B. アルカロフィルス (*B. alkalophilus*)、B. アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaci* 50

ens)、B. クラウシイ (B. clausii)、B. ハロドュランス (B. halodurans)、B. メガテリウム (B. megaterium)、B. コアギュランス (B. coagulans)、B. サーキュランス (B. circulans)、B. ロータス (B. laetus)、B. チューリングンシス (B. thuringiensis)、S. アルバス (S. albus)、S. リビダンス (S. lividans)、S. コエリカラー (S. coelicolor)、S. グリセウス (S. griseus)、シュードモナス種 (Pseudomonas sp.) 及び P. アルカリゲネス (P. alkaligenes) 細胞からなる群から選択される、請求項 3 6 に記載の細胞。

#### 【請求項 4 0】

前記細胞が、大腸菌 (E. coli) である、請求項 3 9 に記載の細胞。

#### 【請求項 4 1】

前記イソプレノイドが、モノテルペン、ジテルペン、トリテルペン、テトラテルペン、セスキテルペン (sesquiterpenes) 及びポリテルペンからなる群から選択される、請求項 3 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の細胞。

#### 【請求項 4 2】

前記イソプレノイドが、セスキテルペンである、請求項 4 1 に記載の細胞。

#### 【請求項 4 3】

前記イソプレノイドが、アビエタジエン、アモルファジエン、カレン、- ファルネセン、- ファルネセン、ファルネソール、グラニオール、グラニルグラニオール、リナロール、リモネン、ミルセン、ネロリドール、オシメン、パチヨロール、- ピネン、サビネン、- テルピネン、テルピンデン (terpinene) 及びバレンセンからなる群から選択される、請求項 3 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の細胞。

#### 【請求項 4 4】

イソプレノイドの生産方法であって、(a) イソプレノイドの生産に好適な培養条件下で請求項 3 1 に記載の宿主細胞を培養する工程と、(b) 前記イソプレノイドを生産させる工程と、を含む、方法。

#### 【請求項 4 5】

(c) 前記イソプレノイドを回収する工程、を更に含む、請求項 4 4 に記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【技術分野】

##### 【0 0 0 1】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2011年4月29日出願の、米国特許仮出願番号第 6 1 / 4 8 1 , 0 9 8 号の優先権を主張する。この特許文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる

##### 【0 0 0 2】

(発明の分野)

本開示は、組成物、並びに微生物におけるメバロン酸、イソプレン、イソプレノイド及びイソプレノイド前駆体分子の生産を向上させる方法、並びにこれを生産するための方法、に関する。

##### 【背景技術】

##### 【0 0 0 3】

R - メバロン酸は、アセチル C o A をイソペンテニルジホスフェート及びジメチルアリールジホスフェートに変換するメバロン酸依存性生合成経路の中間体である。アセチル C o A のメバロン酸への変換は、メバロン酸依存性生合成経路上流 (MVA 経路) の、チオラーゼ、HMG - C o A シンターゼ及び HMG - C o A 還元酵素の活性により触媒され得る。解糖によるグルコースのアセチル C o A へのモル当量での変換 (molar conversion) に基づき、MVA 経路上流の酵素であるチオラーゼ、HMG - C o A シンターゼ及び HMG - C o A 還元酵素を用いメバロン酸を生産させた場合、理論上の質量収率は 54.8 % である。

##### 【0 0 0 4】

商業分野では、メバロン酸は、従来、生分解性ポリマーを製造する際の添加剤として化

10

20

30

40

50

粧品に使用されており、他の化学物質を合成する際のキラル体の構成成分としての価値を有する。

#### 【0005】

メバロン酸依存性経路の生成物は、イソペンテニルピロリン酸（IPP）及びジメチルアリルニリン酸（DAPP）である。IPP及びDAPPは、イソプレン並びにイソプレノイドの前駆体である。イソプレン（2-メチル-1,3-ブタジエン）は天然ゴムのモノマーであり、かつその他の、総じてイソプレノイドと呼ばれる非常に多様な天然化合物に一般的な構造モチーフでもある。更に、イソプレンは、各種合成ポリマー、特に合成ゴムの重要な出発物質である。

#### 【0006】

イソプレノイドは、イソプレノイド前駆体分子のIPP及びDAPPから誘導される化合物である。これまでに29,000種以上のイソプレノイド化合物が同定されており、かつ毎年新規のイソプレノイドが発見されている。イソプレノイドは、主な構成単位としてイソプレノイド前駆体分子を使用して、より複雑なイソプレノイド構造を形成する、微生物及び植物種などの天然物から単離することができる。イソプレノイドは、細胞膜の流動性及び電子輸送を維持する手立てとなるため、多くの生命体及び細胞にとって非常に重要である。天然では、イソプレノイドは、植物に含まれる天然の駆虫成分として多様な役割を果たし、桂皮、丁子及びショウガには特有の香りをもたらす。更に、製薬及び化学業界では、イソプレノイドを、薬剤、栄養補助剤、矯味矯臭剤、及び病害虫防除剤として使用する。これまでに、生態系における重要性及び広範な用途における有用性が考慮され、イソプレノイドは、科学者による関心を十分にを集めている。

10

20

30

#### 【0007】

メバロン酸及びイソプレノイドを得る際の従来法としては、生物材料（例えば、植物、微生物及び動物）からの抽出、並びに製造所における部分合成又は全有機合成が挙げられる。しかしながら、このような手法は、殆どの場合十分なものではないことが判明している。特に、イソプレノイドに関しては、多くの場合その分子構造が複雑な性質を有していることを考慮すると、一般的に複数の工程が必要とされる有機合成を実施して所望の生成物を得るのは難しい。加えて、これらの化学合成の工程は、生物材料からイソプレノイドを抽出し得る毒性の溶媒を使用することを伴う。更に、一般的に、生物材料はイソプレノイド分子をほんの微量でしか含有しないことから、通常、これらの抽出及び精製方法では、所望のイソプレノイドの収率は比較的低くなる。残念なことに、イソプレノイドを比較的大量に得ることが難しいため、生物材料からのイソプレノイドの抽出の実用は限定されていた。

#### 【0008】

これまでにも各種速度、力価及び純度でのイソプレン及びイソプレノイドの生産方法が開示されている（例えば、国際公開第2009/076676（A2）及び米国特許第7,915,026号を参照されたい）。しかしながら、イソプレン及びイソプレノイドの生産を向上させること、並びにこれらの収率を上昇させることが引き続き必要とされている。

40

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

本明細書では、メバロン酸依存性生合成経路の中間体としてのメバロン酸の生産量を増加させ、並びにイソプレン、イソプレノイド前駆体及び／又はイソプレノイドなどのメバロン酸に由来する分子の生産量を増加させるための、組成物及び方法を開示することにより、このような改良法を提供する。

#### 【0010】

本明細書を通じ、各種特許、特許出願及び他の種類の刊行物（例えば、学術論文）を参照する。本明細書に引用する、本開示に関係する全ての特許、特許出願及び刊行物は、すべての目的に關し、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0011】

本明細書に提供される発明は、特に、組み換え細胞によるイソプレンの生産量を増大させるための組成物及び方法を開示する。本発明は、生物のリステリア・グレイ DSM 20601 (*Listeria grayi* DSM 20601)、エンテロコッカス・ファシウム (*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ガリナラム EG2 (*Enterococcus gallinarum* EG2) 及びエンテロコッカス・カッセリファバス (*Enterococcus casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS 遺伝子を発現させる(例えば、異種発現)ことにより、微生物においてメバロン酸、イソプレノイド前駆体分子、及び/又はイソプレノイドの生産を増大させるための組成物及び方法も提供する。

10

## 【0012】

適宜に、本明細書では、イソプレンの生産量を増大させることのできる組み換え細胞が提供され、細胞は、E. ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、E. ファシウム (*E. faecium*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、及び L. グレイ (*L. grayi*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子からなる群から選択される又クレオチド配列を含む1つ以上の異種核酸を含み、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子は、チオラーゼ、HMG-CoA合成酵素、及び HMG-CoA還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、細胞は、MVA経路の下流のポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸及びイソプレン合成酵素ポリペプチドをコードしている異種核酸を更に含み、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を含まないイソプレン生産細胞と比較して、イソプレンの生産量が増大している。一部の態様では、MVA経路下流のポリペプチドをコードしている核酸には、(a) メバロン酸をメバロン酸5-リン酸へとリン酸化する酵素、(b) 5-ホスホメバロン酸を5-ジホスホメバロン酸へと変換する酵素、及び(c) 5-ジホスホメバロン酸をイソペンテニルピロリン酸へと変換する酵素、から選択される酵素を含む。本開示の任意の態様に関し、一部の態様では、メバロン酸を5-ホスホメバロン酸へとリン酸化する酵素は、M. マゼイ (*M. mazei*)・メバロン酸キナーゼ、M. バートニイ (*M. burtonii*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス (*Lactobacillus*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ (*Lactobacillus sakei*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母・メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロマイセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニアエ (*Streptococcus pneumoniae*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトマイセス (*Streptomyces*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、及びストレプトマイセス CL190 (*Streptomyces CL190*)・メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群から選択される。一部の態様では、メバロン酸を5-ホスホメバロン酸へとリン酸化する酵素は、M. マゼイ (*M. mazei*)・メバロン酸キナーゼである。本開示の任意の態様に関し、一部の態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、植物のイソプレン合成酵素ポリペプチド又はこれらの変異体である。一部の態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、クズ属 (*Pueraria*)又はハコヤナギ属 (*Populus*)、ウラジロハコヤナギ(ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*))×ヤマナラシ (*Populus tremula*)などの交雑種、又はこれらの変異体由来のポリペプチドである。一部の態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、プエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*)、プエラリア・ロバタ (*Pueraria lobata*)、ヤマナラシ (*Populus tremuloides*)、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*)、ポプラ・ニグラ (*Populus nigra*)及びポプラ・トリコカルパ (*Populus trichocarpa*)からなる群から選択される。一部の態様では、植物のイソプレン合成酵素ポリペプチドは、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*)イソプレン合成酵素ポリペプチドである。本開示の任意の態様に関し、一部の態様では、細胞は、イソペンテニル-ジホスフェート - イソメラーゼ (IDI) ポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸を更に含む。一部の態様では、IDI ポリペプチドをコードしている核

20

30

40

50

酸は、I D I ポリペプチドをコードしている異種核酸である。一部の態様では、I D I ポリペプチドは酵母のI D I ポリペプチドである。一部の態様では、I D I ポリペプチドをコードしている核酸は、I D I ポリペプチドをコードしている内在性の核酸のコピーである。本開示の任意の態様に関し、一部の態様では、1つ以上の核酸は、誘導型プロモータ又は常時発現型プロモータの下に配置される。本開示の任意の態様に関し、一部の態様では、1つ以上の核酸は、マルチコピープラスミドにクローン化される。本開示の任意の態様に関し、一部の態様では、1つ以上の核酸は、細胞の染色体に組み込まれる。本開示の任意の態様に関し、一部の態様では、細胞は、グラム陽性細菌細胞又はグラム陰性細菌細胞、大腸菌細胞、パントエア(*Pantoea*)細胞、真菌細胞、糸状菌細胞、トリコデルマ(*Trichoderma*)細胞、アスペルギルス(*Aspergillus*)細胞又は酵母細胞である。一部の態様では、細胞は、大腸菌(*E. coli*)、*P. citrea*、枯草菌(*B. subtilis*)、*B. licheniformis*、*B. lentus*、*B. brevis*、*B. stearothermophilus*、*B. alkalophilus*、*B. amyloliquefaciens*、*B. clausii*、*B. halodurans*、*B. megaterium*、*B. coagulans*、*B. circulans*、*B. lautus*、*B. thuringiensis*、*S. albus*、*S. lividans*、*S. coelicolor*、*S. griseus*、シュードモナス種(*Pseudomonas* sp.)及び*P. alcaligenes*細胞からなる群から選択される。  
一部の態様では、細胞は大腸菌(*E. coli*)である。

10

20

30

40

50

## 【0013】

他の態様では、本明細書は、本明細書で提供される任意の態様で開示される宿主細胞を、イソプレン生産に好適な培養条件下で培養する工程、並びにイソプレンを生産させる工程を含む、イソプレンの生産方法が提供される。一態様では、方法は更に、イソプレンを回収する工程、を含む。

## 【0014】

更なる態様では、本明細書では、イソプレノイド前駆体の生産量を増大させることのできる組み換え細胞が提供され、細胞は、*E. gallinarum*由来のmv a E遺伝子及びmv a S遺伝子、*E. casseliflavus*由来のmv a E遺伝子及びmv a S遺伝子、並びに*L. grayi*由来のmv a E遺伝子及びmv a S遺伝子からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む1つ以上の異種核酸を含み、mv a E遺伝子及びmv a S遺伝子は、チオラーゼ、HMG-CoA合成酵素、及びHMG-Co A還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、細胞は、mv a E遺伝子及びmv a S遺伝子を含まないイソプレノイド前駆体生産細胞と比較して、イソプレノイド前駆体の生産量が増大している。一部の態様では、1つ以上の核酸は、誘導型プロモータ又は常時発現型プロモータの下に配置される。本開示の任意の態様に関し、一部の態様では、1つ以上の核酸は、マルチコピープラスミドにクローン化される。本開示の任意の態様に関し、一部の態様では、1つ以上の核酸は、細胞の染色体に組み込まれる。本開示の任意の態様に関し、一部の態様では、細胞は、グラム陽性細菌細胞、グラム陰性細菌細胞、大腸菌(*Escherichia*)細胞、パントエア(*Pantoea*)細胞、真菌細胞、糸状菌細胞、トリコデルマ(*Trichoderma*)細胞、アスペルギルス(*Aspergillus*)細胞又は酵母細胞である。一部の態様では、細胞は、大腸菌(*E. coli*)、*P. citrea*、枯草菌(*B. subtilis*)、*B. licheniformis*、*B. lentus*、*B. brevis*、*B. stearothermophilus*、*B. alkalophilus*、*B. amyloliquefaciens*、*B. clausii*、*B. halodurans*、*B. megaterium*、*B. coagulans*、*B. circulans*、*B. lautus*、*B. thuringiensis*

ゲンシス (*B. thuringiensis*)、*S. アルバス* (*S. albus*)、*S. リビダンス* (*S. lividans*)、*S. コエリカラー* (*S. coelicolor*)、*S. グリセウス* (*S. griseus*)、シュードモナス種 (*Pseudomonas sp.*) 及び *P. アルカリゲネス* (*P. alcaligenes*) 細胞からなる群から選択される。一部の態様では、細胞は大腸菌 (*E. coli*) である。本開示の任意の態様に關し、一部の態様では、イソプレノイド前駆体は、メバロン酸 (MVA) である。

#### 【0015】

他の態様では、本明細書では、本明細書で開示される任意の態様に記載される宿主細胞を、イソプレノイドの生産に好適な培養条件下で培養する工程、並びにイソプレノイドを生産させる工程を含む、イソプレノイド前駆体の生産方法が提供される。一態様では、方法は、イソプレノイド前駆体を回収する工程を更に含む。

10

#### 【0016】

更に他の態様では、本明細書では、イソプレノイドの生産量を増大させることのできる組み換え細胞が提供され、細胞は、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、*E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、*E. ファシウム* (*E. faecium*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、並びに *L. グレイ* (*L. grayi*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む 1 つ以上の異種核酸を含み、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子は、チオラーゼ、HMG-CoA 合成酵素、及び HMG-CoA 還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、細胞は、MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸及びポリプレニルピロリン酸合成酵素をコードしている 1 つ以上の核酸を更に含み、細胞は、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を含まないイソプレノイド生産細胞と比較して、イソプレノイドの生産量が増大している。一部の態様では、MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている核酸には、(a) メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素、(b) 5 - ホスホメバロン酸を 5 - ジホスホメバロン酸へと変換する酵素、及び (c) 5 - ジホスホメバロン酸をイソペントニルピロリン酸へと変換する酵素、から選択される酵素を含む。本開示の任意の態様に關し、一部の態様では、メバロン酸を 5 - ホスホメバロン酸へとリン酸化する酵素は、*M. マゼイ* (*M. mazei*)・メバロン酸キナーゼ、*M. バートニイ* (*M. burtonii*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、*ラクトバチルス* (*Lactobacillus*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、*ラクトバチルス・サケイ* (*Lactobacillus sakei*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母・メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロマイセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニアエ (*Streptococcus pneumoniae*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトマイセス (*Streptomyces*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、及びストレプトマイセス CL190 (*Streptomyces CL190*)・メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群から選択される。一部の態様では、メバロン酸を 5 - ホスホメバロン酸へとリン酸化する酵素は、*M. マゼイ* (*M. mazei*)・メバロン酸キナーゼである。本開示の任意の態様に關し、一部の態様では、1 つ以上の核酸は、誘導型プロモータ又は常時発現型プロモータの下に配置される。本開示の任意の態様に關し、一部の態様では、1 つ以上の核酸は、マルチコピー・プラスミドにクローン化される。本開示の任意の態様に關し、一部の態様では、1 つ以上の核酸は、細胞の染色体に組み込まれる。本開示の任意の態様に關し、一部の態様では、細胞は、グラム陽性細菌細胞、グラム陰性細菌細胞、大腸菌 (*Escherichia*) 細胞、パントエア (*Pantoea*) 細胞、真菌細胞、糸状菌細胞、トリコデルマ (*Trichoderma*) 細胞、アスペルギルス (*Aspergillus*) 細胞又は酵母細胞である。一部の態様では、細胞は、大腸菌 (*E. coli*)、*P. シトレア* (*P. citrea*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、*B. リケニフォルミス* (*B. licheniformis*)、*B. レンタス* (*B. lenthus*)、*B. ブレビス* (*B. brevis*)、*B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*)、*B. アルカロフィルス* (*B. alkalophilus*)、*B. アミロリケファシエンス* (*B. amylolyticus*)、*B. クラウシイ* (*B. clausii*)、*B. ハロドュランス* (*B. halodurans*)、*B. メガテリウム* (*B. megaterium*) からなる群から選択される。

20

30

40

50

terium)、B. コアギュランス (B. coagulans)、B. サーキュランス (B. circulans)、B. ロータス (B. lautus)、B. チューリングエンシス (B. thuringiensis)、S. アルバス (S. albus)、S. リビダンス (S. lividans)、S. コエリカラ (S. coelicolor)、S. グリセウス (S. griseus)、シュードモナス種 (Pseudomonas sp.) 及び P. アルカリゲネス (P. alcaligenes) 細胞からなる群から選択される。一部の態様では、細胞は大腸菌 (E. coli) である。本開示の任意の態様に関し、一部の態様では、イソプレノイドは、モノテルペン、ジテルペン、トリテルペン、テトラテルペン、セスキテルペン (sesquiterpenes) 及びポリテルペンからなる群から選択される。一部の態様では、イソプレノイドは、セスキテルペンである。本開示の任意の態様に関し、一部の態様では、イソプレノイドは、アビエタジエン、アモルファジエン、カレン、 $\alpha$ -ファルネセン、 $\beta$ -ファルネセン、ファルネソール、ゲラニオール、ゲラニルゲラニオール、リナロール、リモネン、ミルセン、ネロリドール、オシメン、パチヨロール、 $\alpha$ -ピネン、サビネン、 $\beta$ -テルピネン、テルピンデン (terpinene) 及びバレンセンからなる群から選択される。  
【0017】

他の態様では、本明細書で開示される任意の態様に記載される宿主細胞を、イソプレノイドの生産に好適な培養条件下で培養する工程、並びにイソプレノイドを生産させる工程を含む、イソプレノイドの生産方法が提供される。一態様では、方法は更に、イソプレノイドを回収する工程、を包含する。

#### 【0018】

一態様では、本発明は、メバロン酸の生産量を増大させることのできる組み換え細胞 (細菌細胞など) を提供し、細胞は、(a) L. グレイ (L. grayi) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、(b) E. ファシウム (E. faecium) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、(c) E. ガリナラム (E. gallinarum) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、及び (d) E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む 1 つ以上の異種核酸を含み、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子は、チオラーゼ、HMG-CoA 合成酵素、及び HMG-CoA 還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、細胞は、L. グレイ (L. grayi)、E. ファシウム (E. faecium)、E. ガリナラム (E. gallinarum)、又は E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を含まない細胞 (細菌細胞など) と比較して、より高い質量収率でメバロン酸を生産する。一態様では、L. グレイ (L. grayi) 由来の mvaE 遺伝子は、配列番号 1 と一致する核酸を含む。他の態様では、L. グレイ (L. grayi) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 2 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ファシウム (E. faecium) 由来の mvaE 遺伝子は、配列番号 3 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ファシウム (E. faecium) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 4 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ガリナラム (E. gallinarum) 由来の mvaE 遺伝子は、配列番号 5 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ガリナラム (E. gallinarum) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 6 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE 遺伝子、配列番号 7 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 8 と一致する核酸を含む。一態様では、1 つ以上の異種核酸は、誘導型プロモータの調節下又は常時発現型プロモータの調節下に配置することができる。一態様では、1 つ以上の異種核酸は、コドン最適化されている。一部の態様では、1 つ以上の異種核酸は、マルチコピー・プラスミドにクローン化されている。他の態様では、1 つ以上の異種核酸は、細胞 (細菌細胞など) の染色体に組み込まれる。一態様では、細胞は、グラム陽性細胞又はグラム陰性細胞のいずれかの細菌細胞である。他の態様では、細胞は、大腸菌 (E. coli)、P. シトレア (P. citrea)、枯草菌 (B. subtilis)、B. リケニフォルミス (B. licheniformis)、B. レンタス (B. lentus)、B. ブレビス (B. brevis)、B. ステアロサーキュラス (B. stearothermophilus)、B. アルカロフィルス (B. alkalophilus)、B. アミロリケファシエンス (B. amylolyticus)、B. クラウシイ (B. clausii)、B.

10

20

30

40

50

. ハロドュランス (*B. halodurans*)、*B.* メガテリウム (*B. megaterium*)、*B.* コアギュランス (*B. coagulans*)、*B.* サーキュランス (*B. circulans*)、*B.* ロータス (*B. lautus*)、*B.* チューリンゲンシス (*B. thuringiensis*)、*S.* アルバス (*S. albus*)、*S.* リビダンス (*S. lividans*)、*S.* コエリカラー (*S. coelicolor*)、*S.* グリセウス (*S. griseus*)、シュードモナス種 (*Pseudomonas sp.*) 及び *P.* アルカリゲネス (*P. alkaligenes*) 細胞からなる群から選択される細菌細胞である。他の態様では、細菌細胞は大腸菌 (*E. coli*) 細胞である。

#### 【0019】

他の態様では、本発明は、メバロン酸の生産量を増大させることのできる組み換え細胞（細菌細胞など）を提供し、細胞は、(a) *L.* グレイ (*L. grayi*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子；(b) *E.* ファシウム (*E. faecium*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子；(c) *E.* ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子並びに(d) *E.* カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む1つ以上の異種核酸を含み、*mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子は、チオラーゼ、HMG-CoA合成酵素、及びHMG-CoA還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、細胞は、*L.* グレイ (*L. grayi*)、*E.* ファシウム (*E. faecium*)、*E.* ガリナラム (*E. gallinarum*)、又は *E.* カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子を含まない細胞（細菌細胞など）と比較して、高い最大力価でメバロン酸を生産する。一態様では、*L.* グレイ (*L. grayi*) 由来の *mvaE* 遺伝子は、配列番号1と一致する核酸を含む。他の態様では、*L.* グレイ (*L. grayi*) 由来の *mvaS* 遺伝子は、配列番号2と一致する核酸を含む。他の態様では、*E.* ファシウム (*E. faecium*) 由来の *mvaE* 遺伝子は、配列番号3と一致する核酸を含む。他の態様では、*E.* ファシウム (*E. faecium*) 由来の *mvaS* 遺伝子は、配列番号4と一致する核酸を含む。他の態様では、*E.* ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の *mvaE* 遺伝子は、配列番号5と一致する核酸を含む。他の態様では、*E.* ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の *mvaS* 遺伝子は、配列番号6と一致する核酸を含む。他の態様では、*E.* カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の *mvaE* 遺伝子、配列番号7と一致する核酸を含む。他の態様では、*E.* カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の *mvaS* 遺伝子は、配列番号8と一致する核酸を含む。一態様では、1つ以上の異種核酸は、誘導型プロモータの調節下又は常時発現型プロモータの調節下に配置することができる。一態様では、1つ以上の異種核酸は、コドン最適化されている。一部の態様では、1つ以上の異種核酸は、マルチコピープラスミドにクローン化されている。他の態様では、1つ以上の異種核酸は、細胞（細菌細胞など）の染色体に組み込まれる。一態様では、細胞は、グラム陽性細胞又はグラム陰性細胞のいずれかの細菌細胞である。他の態様では、細胞は、大腸菌 (*E. coli*)、*P.* シトреア (*P. citrea*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、*B.* リケニフォルミス (*B. licheniformis*)、*B.* レンタス (*B. lentus*)、*B.* ブレビス (*B. brevis*)、*B.* ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*)、*B.* アルカロフィルス (*B. alkalophilus*)、*B.* アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*)、*B.* クラウシイ (*B. clausii*)、*B.* ハロドュランス (*B. halodurans*)、*B.* メガテリウム (*B. megaterium*)、*B.* コアギュランス (*B. coagulans*)、*B.* サーキュランス (*B. circulans*)、*B.* ロータス (*B. lautus*)、*B.* チューリンゲンシス (*B. thuringiensis*)、*S.* アルバス (*S. albus*)、*S.* リビダンス (*S. lividans*)、*S.* コエリカラー (*S. coelicolor*)、*S.* グリセウス (*S. griseus*)、シュードモナス種 (*Pseudomonas sp.*) 及び *P.* アルカリゲネス (*P. alkaligenes*) 細胞からなる群から選択される細菌細胞である。他の態様では、細菌細胞は大腸菌 (*E. coli*) 細胞である。

#### 【0020】

他の態様では、本発明は、メバロン酸の生産量を増大させることのできる組み換え細胞（細菌細胞など）を提供し、細胞は、(a) *L.* グレイ (*L. grayi*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子；(b) *E.* ファシウム (*E. faecium*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び

10

20

30

40

50

mvaS遺伝子；(c) E.ガリナラム(*E. gallinarum*)由来のmvaE遺伝子及びmvaS遺伝子並びに(d) E.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)由来のmvaE遺伝子及びmvaS遺伝子、からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む1つ以上の異種核酸を含み、mvaE遺伝子及びmvaS遺伝子は、チオラーゼ、HMG-CoA合成酵素、及びHMG-CoA還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、細胞は、L.グレイ(*L. grayi*)、E.ファシウム(*E. faecium*)、E.ガリナラム(*E. gallinarum*)又はE.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)由来のmvaE遺伝子及びmvaS遺伝子を含まない細胞(細菌細胞など)と比較して、高い細胞生産性指数(CPI)を有する。一態様では、L.グレイ(*L. grayi*)由来のmvaE遺伝子は、配列番号1と一致する核酸を含む。他の態様では、L.グレイ(*L. grayi*)由来のmvaS遺伝子は、配列番号2と一致する核酸を含む。他の態様では、E.ファシウム(*E. faecium*)由来のmvaE遺伝子は、配列番号3と一致する核酸を含む。他の態様では、E.ファシウム(*E. faecium*)由来のmvaS遺伝子は、配列番号4と一致する核酸を含む。他の態様では、E.ガリナラム(*E. gallinarum*)由来のmvaE遺伝子は、配列番号5と一致する核酸を含む。他の態様では、E.ガリナラム(*E. gallinarum*)由来のmvaS遺伝子は、配列番号6と一致する核酸を含む。他の態様では、E.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)由来のmvaE遺伝子、配列番号7と一致する核酸を含む。他の態様では、E.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)由来のmvaS遺伝子は、配列番号8と一致する核酸を含む。一態様では、1つ以上の異種核酸は、誘導型プロモータの調節下又は常時発現型プロモータの調節下に配置することができる。一態様では、1つ以上の異種核酸は、コドン最適化されている。一部の態様では、1つ以上の異種核酸は、マルチコピープラスミドにクローニングされている。他の態様では、1つ以上の異種核酸は、細胞(細菌細胞など)の染色体に組み込まれる。一態様では、細胞は、グラム陽性細胞又はグラム陰性細胞のいずれかの細菌細胞である。他の態様では、細胞は、大腸菌(*E. coli*)、*P.シトレア*(*P. citrea*)、枯草菌(*B. subtilis*)、*B.リケニフォルミス*(*B. licheniformis*)、*B.レンタス*(*B. lentus*)、*B.ブレビス*(*B. brevis*)、*B.ステアロサーモフィルス*(*B. stearothermophilus*)、*B.アルカロフィルス*(*B. alkalophilus*)、*B.アミロリケファシエンス*(*B. amylolyticus*)、*B.クラウシイ*(*B. clausii*)、*B.ハロドュランス*(*B. halodurans*)、*B.メガテリウム*(*B. megaterium*)、*B.コアギュランス*(*B. coagulans*)、*B.サーキュランス*(*B. circulans*)、*B.ロータス*(*B. Iautus*)、*B.チューリングンシス*(*B. thuringiensis*)、*S.アルバス*(*S. albus*)、*S.リビダンス*(*S. lividans*)、*S.コエリカラ*(*S. coelicolor*)、*S.グリセウス*(*S. griseus*)、シュードモナス種(*Pseudomonas sp.*)及び*P.アルカリゲネス*(*P. alkaligenes*)細胞からなる群から選択される細菌細胞である。他の態様では、細菌細胞は大腸菌(*E. coli*)細胞である。

#### 【0021】

他の態様では、本発明は、メバロン酸の生産量を増大させることのできる組み換え細胞(細菌細胞など)を提供し、細胞は、(a)L.グレイ(*L. grayi*)由来のmvaE遺伝子及びmvaS遺伝子；(b)E.ファシウム(*E. faecium*)由来のmvaE遺伝子及びmvaS遺伝子；(c)E.ガリナラム(*E. gallinarum*)由来のmvaE遺伝子及びmvaS遺伝子並びに(d)E.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)由来のmvaE遺伝子及びmvaS遺伝子からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む1つ以上の異種核酸を含み、mvaE遺伝子及びmvaS遺伝子は、チオラーゼ、HMG-CoA合成酵素、及びHMG-CoA還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、L.グレイ(*L. grayi*)、E.ファシウム(*E. faecium*)、E.ガリナラム(*E. gallinarum*)又はE.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)由来のmvaE遺伝子及びmvaS遺伝子を含まない細胞(細菌細胞など)と比較して、より高い質量収率でメバロン酸を生産する。一態様では、L.グレイ(*L. grayi*)由来のmvaE遺伝子は、配列番号1と一致する核酸を含む。他の態様では、L.グレイ(*L. grayi*)由来のmvaS遺伝子は、配列番号2と一致する核酸を含む。他の態様では、E.ファシウム(*E. faecium*)由来の

10

20

30

40

50

mvaE 遺伝子は、配列番号 3 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ファシウム (E. faecium) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 4 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ガリナラム (E. gallinarum) 由来の mvaE 遺伝子は、配列番号 5 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ガリナラム (E. gallinarum) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 6 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE 遺伝子、配列番号 7 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 8 と一致する核酸を含む。一態様では、1つ以上の異種核酸は、誘導型プロモータの調節下又は常時発現型プロモータの調節下に配置することができる。一態様では、1つ以上の異種核酸は、コドン最適化されている。一部の態様では、1つ以上の異種核酸は、マルチコピープラスミドにクローン化されている。他の態様では、1つ以上の異種核酸は、細胞（細菌細胞など）の染色体に組み込まれる。一態様では、細胞は、グラム陽性細胞又はグラム陰性細胞のいずれかの細菌細胞である。他の態様では、細胞は、大腸菌 (E. coli)、P. シトリア (P. citrea)、枯草菌 (B. subtilis)、B. リケニフォルミス (B. licheniformis)、B. レンタス (B. lentus)、B. ブレビス (B. brevis)、B. ステアロサーモフィルス (B. stearothermophilus)、B. アルカロフィルス (B. alkalophilus)、B. アミロリケファシエンス (B. amyloliquefaciens)、B. クラウシイ (B. clausii)、B. ハロドュランス (B. halodurans)、B. メガテリウム (B. megaterium)、B. コアギュランス (B. coagulans)、B. サーキュランス (B. circulans)、B. ロータス (B. lautus)、B. チューリングンシス (B. thuringiensis)、S. アルバス (S. albus)、S. リビダンス (S. lividans)、S. コエリカラ (S. coelicolor)、S. グリセウス (S. griseus)、シュードモナス種 (Pseudomonas sp.) 及び P. アルカリゲネス (P. alcaligenes) 細胞からなる群から選択される細菌細胞である。他の態様では、細菌細胞は大腸菌 (E. coli) 細胞である。

### 【0022】

他の態様では、本発明は、メバロン酸の生産量を増加させる方法を提供し、方法は、(a) (i) L. グレイ (L. grayi) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、(ii) E. ファシウム (E. faecium) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、(iii) E. ガリナラム (E. gallinarum) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子及び (iv) E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む1つ以上の異種核酸を含む細胞を培養する工程、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子は、チオラーゼ、HMG-CoA 合成酵素、及び HMG-CoA 還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードする、並びに (b) メバロン酸を生産させる工程、を含む。一部の態様では、方法は更に、メバロン酸を回収する工程、を含む。一部の態様では、細胞は 34 度で培養する。一部の態様では、1つ以上の異種核酸は、低～中間コピー数プラスミドで発現させる。一部の態様では、1つ以上の異種核酸は、高発現型プロモータの調節下にある。

### 【0023】

他の態様では、本発明は、イソプレンの生産量を増大させることのできる組み換え細胞（細菌細胞など）を提供し、細胞は、(a) L. グレイ (L. grayi) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子；(b) E. ファシウム (E. faecium) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子；(c) E. ガリナラム (E. gallinarum) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子並びに (d) E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む1つ以上の異種核酸を含み、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子は、チオラーゼ、HMG-CoA 合成酵素、及び HMG-CoA 還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、かつ細胞は、(i) MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸及び (ii) イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードしている異種核酸を更に含み、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を含まないイソプレン生産細胞（細菌細胞など）と比較して、多量のイソプレンを生産する。一態様では、L. グレイ (L. grayi) 由来の mva

10

20

30

40

50

E 遺伝子は、配列番号 1 と一致する核酸を含む。他の態様では、L. グレイ (L. grayi) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 2 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ファシウム (E. faecium) 由来の mvaE 遺伝子は、配列番号 3 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ファシウム (E. faecium) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 4 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ガリナラム (E. gallinarum) 由来の mvaE 遺伝子は、配列番号 5 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ガリナラム (E. gallinarum) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 6 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE 遺伝子、配列番号 7 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 8 と一致する核酸を含む。一態様では、(a) L. グレイ (L. grayi) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、(b) E. ファシウム (E. faecium) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、(c) E. ガリナラム (E. gallinarum) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子並びに (d) E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む 1 つ以上の異種核酸は、コドン最適化されている。一態様では、MVA 経路下流のポリペプチドは、(a) メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素、(b) 5 - ホスホメバロン酸を 5 - ジホスホメバロン酸へと変換する酵素並びに (c) 5 - ジホスホメバロン酸をイソペンテニルピロリン酸へと変換する酵素、から選択される酵素を含む。他の態様では、メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素は、M. マゼイ (M. mazei) ・メバロン酸キナーゼ、ラクトバチルス (Lactobacillus) ・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ (Lactobacillus sakei) ・メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母・メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロマイセス・セレヴィシエ (Saccharomyces cerevisiae) ・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス (Streptococcus) ・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニアエ (Streptococcus pneumoniae) ・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトマイセス CL190 (Streptomyces CL190) ・メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群から選択される。他の態様では、メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素は M. マゼイ (M. mazei) ・メバロン酸キナーゼである。他の態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、植物のイソプレン合成酵素ポリペプチドである。一態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、クズ属 (Pueraria) 又はハコヤナギ属 (Populus) 由来の、あるいはウラジロハコヤナギ (Populus alba) × ヤマナラシ (Populus tremula) などの交雑種由来のポリペプチドである。他の態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、プエラリア・モンタナ (Pueraria montana) 又はプエラリア・ロバタ (Pueraria lobata) 、ヤマナラシ (Populus tremuloides) 、ウラジロハコヤナギ (Populus alba) 、ボプラ・ニグラ (Populus nigra) 及びボプラ・トリコカルパ (Populus trichocarpa) からなる群から選択される。他の態様では、植物のイソプレン合成酵素ポリペプチドは、クズ (kudzu) イソプレン合成酵素ポリペプチドである。一態様では、細胞 (細菌細胞など) は、イソペンテニル - ジホスフェート - イソメラーゼ (IDH) ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸を更に含む。他の態様では、IDH ポリペプチドをコードしている核酸は、IDH ポリペプチドをコードしている異種核酸である。他の態様では、IDH ポリペプチドは、酵母の IDH ポリペプチドである。一態様では、IDH ポリペプチドをコードしている核酸は、IDH ポリペプチドをコードしている内在性の核酸のコピーである。他の態様では、1 つ以上の異種核酸は、誘導型プロモータ又は常時発現型プロモータ下に配置される。一部の態様では、1 つ以上の異種核酸は、マルチコピー・プラスミドにクローン化されている。他の態様では、1 つ以上の異種核酸は、細胞の染色体に組み込まれる。更に別の態様では、細胞は、グラム陽性細菌細胞又はグラム陰性細菌細胞である。他の態様では、細胞は、大腸菌 (E. coli) 、P. シトレア (P. citrea) 、枯草菌 (B. subtilis) 、B. リケニフォルミス (B. licheniformis) 、B. レンタス (B. lentus) 、B. ブレビス (B. brevis) 、B. ステアロサー・モフィルス (B. stearothermophilus) 10  
20  
30  
40  
50

、*B.* アルカロフィルス (*B. alkalophilus*) 、*B.* アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*) 、*B.* クラウシイ (*B. clausii*) 、*B.* ハロドュランス (*B. halodurans*) 、*B.* メガテリウム (*B. megaterium*) 、*B.* コアギュランス (*B. coagulans*) 、*B.* サーキュランス (*B. circulans*) 、*B.* ロータス (*B. laetus*) 、*B.* チューリングンシス (*B. thuringiensis*) 、*S.* アルバス (*S. albus*) 、*S.* リビダンス (*S. lividans*) 、*S.* コエリカラーゼ (*S. coelicolor*) 、*S.* グリセウス (*S. griseus*) 、シュードモナス種 (*Pseudomonas* sp.) 及び *P.* アルカリゲネス (*P. alcaligenes*) 細胞からなる群から選択される。他の態様では、細胞は大腸菌 (*E. coli*) である。

## 【0024】

他の態様では、イソブレンの生産量を増大させることのできる組み換え細胞（細菌細胞など）を提供し、細胞は、(a) *L.* グレイ (*L. grayi*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子、(b) *E.* ファシウム (*E. faecium*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子、(c) *E.* ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子並びに(d) *E.* カッセリファバース (*E. casseliflavus*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む1つ以上の異種核酸を含み、*mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子は、チオラーゼ、HMG-CoA合成酵素、及び HMG-CoA還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、細胞は、(i) MVA経路下流のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、(ii) イソブレン合成酵素ポリペプチドをコードしている異種核酸、及び(iii) DXP経路のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、を更に含み、*mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子を含まないイソブレン生産細胞（細菌細胞など）と比較して、多量のイソブレンを生産する。一態様では、*L.* グレイ (*L. grayi*) 由来の *mvaE* 遺伝子は、配列番号1と一致する核酸を含む。他の態様では、*L.* グレイ (*L. grayi*) 由来の *mvaS* 遺伝子は、配列番号2と一致する核酸を含む。他の態様では、*E.* ファシウム (*E. faecium*) 由来の *mvaE* 遺伝子は、配列番号3と一致する核酸を含む。他の態様では、*E.* ファシウム (*E. faecium*) 由来の *mvaS* 遺伝子は、配列番号4と一致する核酸を含む。他の態様では、*E.* ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の *mvaE* 遺伝子は、配列番号5と一致する核酸を含む。他の態様では、*E.* ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の *mvaS* 遺伝子は、配列番号6と一致する核酸を含む。他の態様では、*E.* カッセリファバース (*E. casseliflavus*) 由来の *mvaE* 遺伝子、配列番号7と一致する核酸を含む。他の態様では、*E.* カッセリファバース (*E. casseliflavus*) 由来の *mvaS* 遺伝子は、配列番号8と一致する核酸を含む。一態様では、(a) *L.* グレイ (*L. grayi*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子、(b) *E.* ファシウム (*E. faecium*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子、(c) *E.* ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子並びに(d) *E.* カッセリファバース (*E. casseliflavus*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子、からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む1つ以上の異種核酸は、コドン最適化されている。一態様では、MVA経路下流のポリペプチドは、(a) メバロン酸をメバロン酸5-リン酸へとリン酸化する酵素、(b) 5-ホスホメバロン酸を5-ジホスホメバロン酸へと変換する酵素並びに(c) 5-ジホスホメバロン酸をイソペニテニルピロリン酸へと変換する酵素、からなる群から選択される酵素を含む。他の態様では、メバロン酸をメバロン酸5-リン酸へとリン酸化する酵素は、*M.* マゼイ (*M. mazei*)・メバロン酸キナーゼ、ラクトバチルス (*Lactobacillus*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ (*Lactobacillus sakei*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母・メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロマイセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニアエ (*Streptococcus pneumoniae*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトマイセス (*Streptomyces*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、及びストレプトマイセス CL190 (*Streptomyces CL190*)・メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群から選択される。他の態様では、メバロン酸をメバロン酸5-リン酸へとリン酸化する酵素は*M.*

10

20

30

40

50

マゼイ (*M. mazei*)・メバロン酸キナーゼである。他の態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、植物のイソプレン合成酵素ポリペプチドである。一態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、クズ属 (*Pueraria*) 又はハコヤナギ属 (*Populus*) 由来の、あるいはウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) × ヤマナラシ (*Populus tremula*) などの交雑種由来のポリペプチドである。他の態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、ブエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*) 又はブエラリア・ロバタ (*Pueraria lobata*)、ヤマナラシ (*Populus tremuloides*)、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*)、ポプラ・ニグラ (*Populus nigra*) 及びポプラ・トリコカルパ (*Populus trichocarpa*) からなる群から選択される。他の態様では、植物のイソプレン合成酵素ポリペプチドは、クズ (*ku dzu*) イソプレン合成酵素ポリペプチドである。一態様では、細胞 (細菌細胞など) は、イソペンテニル-ジホスフェート - イソメラーゼ (IDH) ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸を更に含む。他の態様では、IDH ポリペプチドをコードしている核酸は、IDH ポリペプチドをコードしている異種核酸である。他の態様では、IDH ポリペプチドは、酵母の IDH ポリペプチドである。一態様では、IDH ポリペプチドをコードしている核酸は、IDH ポリペプチドをコードしている内在性の核酸のコピーである。一態様では、DXP 経路に関係するポリペプチドは、(a) ピルビン酸及び D - グリセルアルデヒド 3 - リン酸を 1 - デオキシ - d - キシリロース 5 - リン酸 (DXP) へと変換する酵素、(b) 1 - デオキシ - d - キシリロース 5 - リン酸 (DXP) を 2 - C - メチル - D - エリスリトール 4 - リン酸 (MEP) へと変換する酵素、(c) 2 - C - メチル - D - エリスリトール 4 - リン酸 (MEP) を 4 - (シチジン 5' - ジホスホ) - 2 - メチル - D - エリスリトール (CDP-ME) へと変換する酵素、(d) 4 - (シチジン 5' - ジホスホ) - 2 - C - メチル - D - エリスリトール (CDP-ME) を 2 - ホスホ - 4 - (シチジン 5' - ジホスホ) - 2 - C - メチル - D - エリスリトール (CDP-MEP) へと変換する酵素、(e) 2 - ホスホ - 4 - (シチジン 5' - ジホスホ) - 2 - C - メチル - D - エリスリトール (CDP-MEP) を、2 - C - メチル - D - エリスリトール 2, 4 - シクロジホスフェート (ME-CPP 又は cMEPP) へと変換する酵素、(f) 2 - C - メチル - D - エリスリトール 2, 4 - シクロジホスフェートを (E) - 4 - ヒドロキシ - 3 - メチルブタ - 2 - エン - 1 イルジホスフェート (HMBPP 又は HDMAPP) へと変換する酵素、並びに (g) (E) - 4 - ヒドロキシ - 3 - メチルブタ - 2 - エン - 1 イルジホスフェートをイソペンテニルジホスフェート (IPP) 及びジメチルアリールジホスフェート (DMAPP) へと変換する酵素、からなる群から選択される酵素を含む。他の態様では、1 つ以上の異種核酸は、誘導型プロモータ又は常時発現型プロモータ下に配置される。一部の態様では、1 つ以上の異種核酸は、マルチコピープラスミドにクローン化されている。他の態様では、1 つ以上の異種核酸は、細胞の染色体に組み込まれる。更に別の態様では、細胞は、グラム陽性細菌細胞又はグラム陰性細菌細胞である。他の態様では、細胞は、大腸菌 (*E. coli*)、*P. citrea*、枯草菌 (*B. subtilis*)、*B. licheniformis* (*B. licheniformis*)、*B. lentus*、*B. brevis* (*B. brevis*)、*B. stearothermophilus* (*B. stearothermophilus*)、*B. alkalophilus* (*B. alkalophilus*)、*B. amylolyquefaciens* (*B. amylolyquefaciens*)、*B. clausii* (*B. clausii*)、*B. halodurans* (*B. halodurans*)、*B. megaterium* (*B. megaterium*)、*B. coagulans* (*B. coagulans*)、*B. circulans* (*B. circulans*)、*B. laetus* (*B. laetus*)、*B. thuringiensis* (*B. thuringiensis*)、*S. albus* (*S. albus*)、*S. lividans* (*S. lividans*)、*S. coelicolor* (*S. coelicolor*)、*S. griseus* (*S. griseus*)、シュードモナス種 (*Pseudomonas sp.*) 及び *P. alcaligenes* (*P. alcaligenes*) 細胞からなる群から選択される。他の態様では、細胞は大腸菌 (*E. coli*) である。

#### 【0025】

他の態様では、本発明は、イソプレンの生産量を増大させる方法を提供し、方法は、(a) (a) *L. grayi* (*L. grayi*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子；(b) *E. faecium* (*E. faecium*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子；(c) *E. galilaei*

10

20

30

40

50

ナラム (*E. gallinarum*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子並びに (d) E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む 1 つ以上の異種核酸を含む細胞（細菌細胞など）を培養する工程、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子は、チオラーゼ、HMG-CoA 合成酵素、及び HMG-CoA 還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、細胞は、(i) MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸並びに (ii) イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードしている異種核酸を更に含み、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を含まないイソプレン生産細胞（細菌細胞など）と比較して、多量のイソプレンを生産する。一部の態様では、細胞は、DXP 経路のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸を更に含む。一部の態様では、方法は、イソプレンを回収する工程を更に含む。一部の態様では、細胞は 34 度で培養する。一部の態様では、1 つ以上の異種核酸は、染色体外のプラスミドで発現させる。一部の態様では、1 つ以上の異種核酸は、細胞（細菌細胞の染色体など）の染色体に組み込まれる。

## 【0026】

他の態様では、本発明は、イソプレノイド前駆体及び / 又はイソプレノイドの生産量を増大させることのできる組み換え細胞（細菌細胞など）を提供し、細胞は、(a) L. グレイ (*L. grayi*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子；(b) E. ファシウム (*E. faecium*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子；(c) E. ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子並びに (d) E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む 1 つ以上の異種核酸を含み、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子は、チオラーゼ、HMG-CoA 合成酵素、及び HMG-CoA 還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、細胞は、(i) MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸並びに (ii) ポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドをコードしている異種核酸を更に含み、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を含まないイソプレン生産細胞（細菌細胞など）と比較して、少なくとも多量のイソプレノイド及び / 又はイソプレノイド前駆体を生産する。一態様では、L. グレイ (*L. grayi*) 由来の mvaE 遺伝子は、配列番号 1 と一致する核酸を含む。他の態様では、L. グレイ (*L. grayi*) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 2 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ファシウム (*E. faecium*) 由来の mvaE 遺伝子は、配列番号 3 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ファシウム (*E. faecium*) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 4 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の mvaE 遺伝子は、配列番号 5 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 6 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 遺伝子、配列番号 7 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 8 と一致する核酸を含む。一態様では、(a) L. グレイ (*L. grayi*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、(b) E. ファシウム (*E. faecium*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、(c) E. ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子並びに (d) E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む 1 つ以上の異種核酸は、コドン最適化されている。他の態様では、1 つ以上の異種核酸は、誘導型プロモータ又は常時発現型プロモータ下に配置される。一部の態様では、1 つ以上の異種核酸は、マルチコピープラスミドにクローン化されている。他の態様では、1 つ以上の異種核酸は、細胞の染色体に組み込まれる。更に別の態様では、細胞は、グラム陽性細菌細胞又はグラム陰性細菌細胞である。他の態様では、細胞は、大腸菌 (*E. coli*)、P. シトレア (*P. citrea*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、B. リケニフォルミス (*B. licheniformis*)、B. レンタス (*B. lentus*)、B. ブレビス (*B. brevis*)、B. ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*)、B. アルカロフィルス (*B. alkophilus*)、B. アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*)、B. クラウシイ (

10

20

30

40

50

B. clausii)、B. ハロドュランス (B. halodurans)、B. メガテリウム (B. megaterium)、B. コアギュランス (B. coagulans)、B. サーキュランス (B. circulans)、B. ロータス (B. lautus)、B. チューリンゲンシス (B. thuringiensis)、S. アルバス (S. albus)、S. リビダンス (S. lividans)、S. コエリカラー (S. coelicolor)、S. グリセウス (S. griseus)、シュードモナス種 (Pseudomonas sp.) 及び P. アルカリゲネス (P. alcaligenes) 細胞からなる群から選択される。他の態様では、細胞は大腸菌 (E. coli) である。一態様では、MVA 経路下流のポリペプチドは、(a) メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素、(b) 5 - ホスホメバロン酸を 5 - デジホスホメバロン酸へと変換する酵素並びに (c) 5 - デジホスホメバロン酸をイソペニテニルピロリン酸へと変換する酵素、から選択される酵素を含む。他の態様では、メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素は、M. マゼイ (M. mazei)・メバロン酸キナーゼ、ラクトバチルス (Lactobacillus)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ (Lactobacillus sakei)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母・メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロマイセス・セレヴィイシエ (Saccharomyces cerevisiae)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス (Streptococcus)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニアエ (Streptococcus pneumoniae)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトマイセス (Streptomyces)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、及びストレプトマイセス CL190 (Streptomyces CL190)・メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群から選択される。他の態様では、メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素は M. マゼイ (M. mazei)・メバロン酸キナーゼである。他の態様では、ポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドは、ファルネシリルピロリン酸 (FPP) シンターゼを含む。他の態様では、イソプレノイドは、モノテルペン、ジテルペン、トリテルペン、テトラテルペン、セスキテルペン (sesquiterpene) 及びポリテルペンからなる群から選択される。他の態様では、イソプレノイドはセスキテルペンである。一部の態様では、イソプレノイドは、アビエタジエン、アモルファジエン、カレン、 $\alpha$ -ファルネセン (farnesene)、 $\beta$ -ファルネセン、ファルネソール、ゲラニオール、ゲラニルゲラニオール、リナロール、リモネン、ミルセン、ネロリドール、オシメン、パチョロール、 $\alpha$ -ピネン、サビネン、 $\beta$ -テルピネン、テルピンデン (terpinene) 及びバレンセンからなる群から選択される。

## 【0027】

他の態様では、本発明は、イソプレノイド前駆体及び / 又はイソプレノイドの生産量を増大させることのできる組み換え細胞 (細菌細胞など) を提供し、細胞は、(a) L. グレイ (L. grayi) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子；(b) E. ファシウム (E. faecium) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子；(c) E. ガリナラム (E. gallinarum) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子並びに (d) E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む 1 つ以上の異種核酸を含み、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子は、チオラーゼ、HMG-CoA 合成酵素、及び HMG-CoA 還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、細胞は、(i) MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、(ii) ポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドをコードしている異種核酸並びに (iii) DXP 経路のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、を更に含み、mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を含まないイソブレン生産細胞 (細菌細胞など) と比較して、多量のイソブレンを生産する。一態様では、L. グレイ (L. grayi) 由来の mvaE 遺伝子は、配列番号 1 と一致する核酸を含む。他の態様では、L. グレイ (L. grayi) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 2 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ファシウム (E. faecium) 由来の mvaE 遺伝子は、配列番号 3 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ファシウム (E. faecium) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 4 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ガリナラム (E. gallinarum) 由来の mvaE 遺伝子は、配列番号 5 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. ガリナラム (E. gallinarum) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 6 と一致す

10

20

30

40

50

る核酸を含む。他の態様では、E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 遺伝子、配列番号 7 と一致する核酸を含む。他の態様では、E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaS 遺伝子は、配列番号 8 と一致する核酸を含む。一態様では、(a) L. グレイ (*L. grayi*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、(b) E. ファシウム (*E. faecium*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、(c) E. ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子並びに(d) E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子、からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む 1 つ以上の異種核酸は、コドン最適化されている。一態様では、MVA 経路下流のポリペプチドは、(a) メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素、(b) 5 - ホスホメバロン酸を 5 - ジホスホメバロン酸へと変換する酵素並びに(c) 5 - ジホスホメバロン酸をイソペンテニルピロリン酸へと変換する酵素、からなる群から選択される酵素を含む。他の態様では、メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素は、M. マゼイ (*M. mazei*)・メバロン酸キナーゼ、ラクトバチルス (*Lactobacillus*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ (*Lactobacillus sakei*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母・メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロマイセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニアエ (*Streptococcus pneumoniae*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトマイセス (*Streptomyces*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、及びストレプトマイセス CL190 (*Streptomyces CL190*)・メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群から選択される。他の態様では、メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素は M. マゼイ (*M. mazei*)・メバロン酸キナーゼである。他の態様では、ポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドは、ファルネシリピロリン酸 (FPP) シンターゼを含む。一態様では、細胞 (細菌細胞など) は、イソペンテニル - ジホスフェート - イソメラーゼ (IDH) ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸を更に含む。他の態様では、IDH ポリペプチドをコードしている核酸は、IDH ポリペプチドをコードしている異種核酸である。他の態様では、IDH ポリペプチドは、酵母の IDH ポリペプチドである。一態様では、IDH ポリペプチドをコードしている核酸は、IDH ポリペプチドをコードしている内在性の核酸のコピーである。一態様では、DXP 経路に関係するポリペプチドは、(a) ピルビン酸及び D - グリセルアルデヒド 3 - リン酸を 1 - デオキシ - d - キシリロース 5 - リン酸 (DXP) へと変換する酵素、(b) 1 - デオキシ - d - キシリロース 5 - リン酸 (DXP) を 2 - C - メチル - D - エリスリトール 4 - リン酸 (MEP) へと変換する酵素、(c) 2 - C - メチル - D - エリスリトール 4 - リン酸 (MEP) を 4 - (シチジン 5' - ジホスホ) - 2 - メチル - D - エリスリトール (CDP-ME) へと変換する酵素、(d) 4 - (シチジン 5' - ジホスホ) - 2 - C - メチル - D - エリスリトール (CDP-ME) を 2 - ホスホ - 4 - (シチジン 5' - ジホスホ) - 2 - C - メチル - D - エリスリトール (CDP-MEP) へと変換する酵素、(e) 2 - ホスホ - 4 - (シチジン 5' - ジホスホ) - 2 - C - メチル - D - エリスリトール (CDP-MEP) を、2 - C - メチル - D - エリスリトール 2, 4 - シクロジホスフェート (ME-CPP 又は cMEPP) へと変換する酵素、(f) 2 - C - メチル - D - エリスリトール 2, 4 - シクロジホスフェートを (E) - 4 - ヒドロキシ - 3 - メチルブタ - 2 - エン - 1 イルジホスフェート (HMAPP 又は HDMAAPP) へと変換する酵素、並びに(g) (E) - 4 - ヒドロキシ - 3 - メチルブタ - 2 - エン - 1 イルジホスフェートをイソペンテニルジホスフェート (IPP) 及びジメチルアリールジホスフェート (DMAAPP) へと変換する酵素、からなる群から選択される酵素を含む。他の態様では、1 つ以上の異種核酸は、誘導型プロモータ又は常時発現型プロモータ下に配置される。一部の態様では、1 つ以上の異種核酸は、マルチコピー・プラスミドにクローニングされている。他の態様では、1 つ以上の異種核酸は、細胞の染色体に組み込まれる。更に別の態様では、細胞は、グラム陽性細菌細胞又はグラム陰性細菌細胞である。他の態様では、細胞は、大腸菌 (*E. coli*)、P. シトリア (*P. citrea*)

10

20

30

40

50

、枯草菌 (*B. subtilis*) 、 *B.* リケニフォルミス (*B. licheniformis*) 、 *B.* レンタス (*B. lentus*) 、 *B.* ブレビス (*B. brevis*) 、 *B.* ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*) 、 *B.* アルカロフィルス (*B. alkalophilus*) 、 *B.* アミロリケファシエンス (*B. amylolyquefaciens*) 、 *B.* クラウシイ (*B. clausii*) 、 *B.* ハロドュランス (*B. halodurans*) 、 *B.* メガテリウム (*B. megaterium*) 、 *B.* コアギュランス (*B. coagulans*) 、 *B.* サーキュランス (*B. circulans*) 、 *B.* ロータス (*B. lautus*) 、 *B.* チューリングエンシス (*B. thuringiensis*) 、 *S.* アルバス (*S. albus*) 、 *S.* リビダンス (*S. lividans*) 、 *S.* コエリカラ (*S. coelicolor*) 、 *S.* グリセウス (*S. griseus*) 、 シュードモナス種 (*Pseudomonas* sp.) 及び *P.* アルカリゲネス (*P. alcaligenes*) 細胞からなる群から選択される。他の態様では、細胞は大腸菌 (*E. coli*) である。

10

## 【0028】

他の態様では、本発明は、イソプレノイド及び／又はイソプレノイド前駆体分子の生産量を増大させる方法を提供し、方法は、(a) *L.* グレイ (*L. grayi*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子；(b) *E.* ファシウム (*E. faecium*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子；(c) *E.* ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子並びに(d) *E.* カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の *mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子、からなる群から選択される又クレオチド配列を含む1つ以上の異種核酸を含む細胞を培養する工程、*mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子は、チオラーゼ、HMG-CoA合成酵素、及びHMG-CoA還元酵素の触媒活性を有するポリペプチドをコードしており、細胞は、(i) MVA経路下流のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸並びに(ii) ポリプレニルピロリン酸合成酵素をコードしている異種核酸、を更に含み、*mvaE* 遺伝子及び *mvaS* 遺伝子を含まないイソプレノイド及び／又はイソプレノイド前駆体分子生産細胞（細菌細胞など）と比較して、多量のイソプレノイド及び／又はイソプレノイド前駆体分子を生産する。一部の態様では、細胞は、DXP経路のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を更に含む。一部の態様では、方法は、イソプレノイド及び／又はイソプレノイド前駆体分子を回収する工程、を更に含む。一部の態様では、細胞は34で培養する。一部の態様では、1つ以上の異種核酸は、染色体外のプラスミドで発現させる。一部の態様では、1つ以上の異種核酸は、細胞（細菌細胞の染色体など）の染色体に組み込まれる。

20

## 【0029】

他の態様では、本発明は、メバロン酸の生産量を増大させることのできる組み換え宿主（例えば、細菌）細胞を提供し、細胞は、次の生物、*E.* ガリナラム (*E. gallinarum*) 、*E.* ファシウム (*E. faecium*) 、*E.* カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 又は *L.* グレイ (*L. grayi*) の1つ以上に由来し、分解耐性を示す *mvaE* 遺伝子産物を含む。

30

## 【0030】

他の態様では、本発明は、イソプレンの生産量を増大させることのできる組み換え宿主（例えば、細菌）細胞を提供し、細胞は、イソプレンを生産する次の生物、*E.* ガリナラム (*E. gallinarum*) 、*E.* ファシウム (*E. faecium*) 、*E.* カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 又は *L.* グレイ (*L. grayi*) の1つ以上に由来し、分解耐性を示す *mvaE* 遺伝子産物を含む。

40

## 【0031】

他の態様では、本発明は、イソプレノイドの生産量を増大させることのできる組み換え宿主（例えば、細菌）細胞を提供し、細胞は、イソプレンを生産する次の生物、*E.* ガリナラム (*E. gallinarum*) 、*E.* ファシウム (*E. faecium*) 、*E.* カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 又は *L.* グレイ (*L. grayi*) の1つ以上に由来し、分解耐性を示す *mvaE* 遺伝子産物を含む。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0032】

【図1】グルコースからのメバロン酸の質量収率を示すグラフ。エラーバーは、2回の反復試行により示される標準偏差を表す。

50

【図2】pDW34のプラスミドマップ。

【図3】発酵開始から40時間後のE.フェカリス(*E. faecalis*)、E.ガリナラム(*E. gallinarum*)及びE.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)のMVP濃度。

【図4】各15Lスケールでの発酵により、経時的にグルコースに対して得られるイソブレン収率を示す。E.ガリナラム(*E. gallinarum*)又はE.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)（それぞれ三角形及び四角形）を使用して実施したすべての試験では、グルコースに対するイソブレン収率(%)は、*E. faecalis*(*E. faecalis*)の上流経路の酵素を使用して実施した2試験(白抜き及び黒塗りの菱型)よりも高かった。グルコースに対する収率(%)は、総イソブレン量(t)/[(供給重量(0)-供給重量(t)+83.5)\*0.59)]として算出した。式中、0.59はグルコース供給溶液中のグルコースの重量%であり、83.5は、t=0の時点で発酵容器にバッチ供給(feed batched)したグラム重量である。各供給量は、独立して重量%として測定した。  
10

【図5】各15Lスケールでの発酵により得られた、容積生産量を経時的に示す。E.ガリナラム(*E. gallinarum*)又はE.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)（それぞれ三角形及び四角形）を使用して実施したすべての試験では、総容積生産量は、*E. faecalis*(*E. faecalis*)の上流経路の酵素を使用して実施した2試験(白抜き及び黒塗りの菱型)よりも高かった。容積生産量は、次式を使用して算出した：容積生産量(g/L/hr)=[(HGER(t)/1000\*68.117)]/[t-t<sub>0</sub>]。式中、総和はt<sub>0</sub>~tである。タンクのターンアラウンド・タイム(turnaround time)は係数に含めなかった。  
20

【図6】各15Lスケールでの発酵により得られた、比生産量を経時的に示す。E.ガリナラム(*E. gallinarum*)又はE.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)（それぞれ三角形及び四角形）を使用して実施したすべての試験では、最大比生産量は、*E. faecalis*(*E. faecalis*)の上流経路の酵素を使用して実施した2試験(白抜き及び黒塗りの菱型)よりも高かった。比生産量は、次式を使用して算出した：比生産量(mg/L/hr/OD)=HGER\*68.117g/mol/OD。HGERはイソブレンの放出速度(Evolution Rate)(mmol/L/hr)である。OD=吸光度=550nmでの吸光度\*水への希釈倍率。

【図7】遺伝子操作し、*M.バートニイ*(*M. burtonii*)メバロン酸キナーゼ又は*M.マゼイ*(*M. mazei*)メバロン酸キナーゼを大腸菌(*E. coli*)染色体上で発現させた大腸菌(*E. coli*)株の、小規模試験における生育及びイソブレン生産量。  
30

【図8】大腸菌(*E. coli*)の15Lスケールでの発酵時の*M.マゼイ*(*M. mazei*)及び*M.バートニイ*(*M. burtonii*)メバロン酸キナーゼの発現。

【図9】株DW326由来のmvaEが可視化されたウェスタンプロット。第1レーン-基準マーカー、第2レーン-0.4ugの精製mvaE、第3~7レーン-0、25、50、100、200μMのIPTGにより誘導を行った株DW326由来の可溶化サンプル。

【図10】Safe stainにより染色したSDS-PAGEゲル。各レーンは次のサンプルを含有している：第1レーン-基準マーカー、第2~15レーン-His-tag標識を利用し精製し、ニッケルカラムから溶出させたmvaEタンパク質画分。  
40

【発明を実施するための形態】

### 【0033】

細菌細胞などの微生物細胞は、組み換えタンパク質の生産に広く使用される宿主である。これらの細胞は、メバロン酸、イソブレン、イソブレノイド前駆体分子、及びイソブレノイドなどの他の産物の生産に使用することもできる。本発明は、微生物リストリア・グレイDSM 20601(*Listeria grayi* DSM 20601)、エンテロコッカス・ファシウム(*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ガリナラムEG2(*Enterococcus gallinarum* EG2)及び/又はエンテロコッカス・カッセリファバス(*Enterococcus casseliflavus*)に由来するmvaE及びmvaS遺伝子によりコードされるポリペプチドを異種発現している細胞(細菌細胞など)を使用して、メバロン酸、イソブレン、イソブレノイド

前駆体分子及びイソプレノイドの収率及び力価を増大させて生産するための組成物及び方法を特に提供する。

#### 【0034】

メバロン酸依存型生合成経路は、イソプレノイド前駆体分子のメバロン酸（MVA）、ジメチルアリルニリン酸（DMAPP）及びイソペンテニルピロリン酸（IPP）の生産に特に重要である。メバロン酸経路上流の酵素は、グルコースから生成されたアセチルCoAを、3つの酵素反応によりメバロン酸へと変換する。統合して、上記細菌種由来のmvae及びmvapS遺伝子は、メバロン酸経路上流の酵素活性を保有しているポリペプチドをコードする。理論に束縛されるものではないが、メバロン酸依存性生合成経路の上流において、これら3つの酵素活性の効率及び生産性を向上させることで、メバロン酸の細胞内濃度が、ひいては下流のイソプレノイド前駆体分子（DMAPP及びIPPなど）の濃度が実質的に上昇すると考えられる。したがって、これらの株によるメバロン酸の生産収率の増加は、商業用途に有利なものである。

10

#### 【0035】

これまでに、異なる細菌種（E. フェカリス（E. faecalis））のmvae及びmvapS遺伝子を大腸菌（E. coli）株に組み込み、予めメバロン酸を生産させるという手法が示されている（米国特許出願公開番号2005/0287655（A1）号；Tabata, K. and Hashimoto, S. - I. Biotechnology Letters 26: 1487~1491, 2004を参照されたい）。しかしながら、本発明者らは、L. グレイ（L. grayi）、E. ファシウム（E. faecium）、E. ガリナラム（E. gallinarum）及びE. カッセリファバス（E. casseliflavus）由来のmvae及びmvapS遺伝子を発現している細胞（細菌細胞など）で生産されるメバロン酸の質量収率は、E. フェカリス（E. faecalis）由来のmvae及びmvapS遺伝子を含有している大腸菌（E. coli）株により生産されるメバロン酸の質量収率も大きくなることを発見した。したがって、本発明の組成物及び方法は、これまでに当該技術分野で実施されているものと比較して、メバロン酸の生産量を増大させるのに利用可能な微生物株の数、並びにこれらの細胞（細菌細胞など）により生産されるメバロン酸の量の両方で、改善を示す。

20

#### 【0036】

##### 一般的技術

本発明の実施においては、特に断らないかぎりにおいて、当業者の技能の範囲内に含まれる従来の分子生物学（組み換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の技術を用いる。これらの手法は、次の文献：「分子クローニング：実験マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」第2版（Sambrook et al.、1989年）；「オリゴヌクレオチド合成（Oligonucleotide Synthesis）」（M. J. Gait, ed., 1984）；「動物細胞の培養（Animal Cell Culture）」（R. I. Freshney, ed., 1987年）；「酵素学的実験法（Methods in Enzymology）」（Academic Press, Inc.）；「分子生物学標準プロトコル（Current Protocols in Molecular Biology）」（F. M. Ausubel et al., eds., 1987年、定期的に改定）；「PCR：ポリメラーゼ連鎖反応（PCR: The Polymerase Chain Reaction）」（Mueller et al., eds., 1994年）。Singleton et al.、「微生物学及び分子生物学辞典（Dictionary of Microbiology and Molecular Biology）第2版」、J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994年)、及びMarch「有機化学反応、機序及び構造第4版（Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed.）」、John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992)中に十分に説明されており、これらの文献は、本出願で使用される数多くの用語の一般的な指針を当業者に提供する。

30

40

#### 【0037】

##### 用語の定義

用語「イソプレン」は、2-メチル-1,3-ブタジエン（C A S # 78-79-5

50

)を指す。3,3-ジメチルアリルニリン酸(DMAPP)からピロリン酸を除去することで、揮発性のC5炭化水素を、直接的に及び最終的に生成することができる。IPP分子をDMAPP分子に結合又は重合させることは包含しない場合がある。用語「イソブレン」は、概して、本明細書に別途記載のない限り、生産方法を限定されることを意図しない。

#### 【0038】

本明細書で使用するとき、用語「ポリペプチド」には、ポリペプチド、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド断片、及び融合ポリペプチドが含まれる。

#### 【0039】

本明細書で使用するとき、「単離ポリペプチド」は、2、5、10、20、又は50個以上の異なるポリペプチドのライブラリなどといった、ポリペプチドのライブラリの一部を意味するものではなく、天然に生じる少なくとも1つの成分から分離されたポリペプチドを意味する。例えば、ポリペプチドをコードしている組み換え核酸を発現させることで単離ポリペプチドを得ることができる。

#### 【0040】

「異種ポリペプチド」は、宿主細胞と異なる生物、種、又は株由来の核酸配列によりコードされるポリペプチドを意味する。一部の実施形態では、異種ポリペプチドは、同様の宿主細胞に天然に見られる野生型ポリペプチドと同一ではない。

#### 【0041】

本明細書で使用するとき、「核酸」は、共有結合により単鎖又は二本鎖のいずれかの形態で連結している、2つ以上のデオキシリボヌクレオチド及び/又はリボヌクレオチドを指す。

#### 【0042】

「組み換え核酸」とは、目的の核酸が由来する生物に天然に生じるゲノムにおいて、目的の核酸に隣接する1つ以上の核酸(例えば遺伝子)を含まない、目的の核酸のことを意味する。したがって、この用語には、例えば、ベクターに組み込まれた、プラスミド又はウィルスに自己複製的に組み込まれた、原核生物若しくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれた、又は他の配列とは独立して別個の分子(例えば、cDNA、ゲノムDNA断片、又はPCRにより生産された若しくは制限エンドヌクレアーゼによる消化により生産されたcDNA断片)として存在する、組み換えDNAが含まれる。

#### 【0043】

「異種核酸」は、宿主細胞と異なる生物、種又は株由来の核酸配列を意味する。一部の実施形態では、異種核酸は、同様の宿主細胞に天然に見られる野生型核酸と同一ではない。例えば、大腸菌(*E. coli*)を形質転換させるか、又は大腸菌の染色体に組み込むかされる、*L.グレイ*(*L. grayi*)、*E. ファシウム*(*E. faecium*)、*E. ガリナラム*(*E. gallinarum*)及び*E. カッセリファバス*(*E. casseliflavus*)由来のmvaE及びmvaS遺伝子によりコードされる核酸は、異種核酸である。

#### 【0044】

本明細書において使用するところの「発現制御配列」とは、対象とする核酸の転写を指示する核酸配列のことを意味する。発現制御配列は、常時発現型若しくは誘導型のプロモータ又はエンハンサなどのプロモータであり得る。発現制御配列は「ネイティブ」な配列又は異種性の配列であり得る。ネイティブな発現制御配列は、遺伝子を発現させる生物、種又は株と同様の生物、種又は株に由来する配列である。異種性の発現制御配列は、遺伝子を発現させる生物、種又は株とは異なる生物、種又は株に由来する配列である。「誘導型プロモータ」は、環境下、又は発育制限下で活性であるプロモータである。

#### 【0045】

「調節可能に連結された」は、核酸発現制御配列(プロモータなど)及び第2の核酸配列間の機能的連結を意味し、発現制御配列は、第2の配列に対応する核酸の転写を指示する。

#### 【0046】

10

20

30

40

50

本明細書で使用するとき、用語「最少培地 (minimal medium又はminimal media)」は、細胞増殖に必要とされる最低限の栄養素を含有し、概してアミノ酸の存在していない増殖培地を指す。最少培地は、典型的には（1）細胞（細菌細胞など）の生育用の炭素供給源、（2）各種塩類（細胞種（例えば、細菌細胞種など）及び生育条件に応じ変更することができる）及び（3）水、を含有する。炭素源は、グルコースなどの単糖から、本明細書で以下により詳細に記載されるような、他のバイオマスのより複雑な加水分解物、例えば、酵母エキスなどといった多様なものであり得る。塩は、概してマグネシウム、窒素、リン及びイオウなどの必須元素を提供し、細胞がタンパク質及び核酸を合成できるようにする。また、最少培地には、特定のプラスミド及び同様物を維持すべく選択するために、抗菌剤などの選択剤を添加することもできる。例えば、微生物が、例えばアンピシリン又はテトラサイクリンなどの特定の抗菌剤に耐性である場合、耐性を欠く細胞の生育を阻害する目的で培地に抗菌剤を添加することができる。培地には、所望される生理学的又は化学的特性について選択するのに必要とされる、例えば特定のアミノ酸などといった他の化合物を添加することができる。

10

## 【0047】

本明細書で使用するとき、用語「イソプレノイド」は、2つ以上の炭化水素単位からなり、各単位は、特定の様式で配置された5つの炭素原子からなる、天然に生じる有機化合物類の、広範にわたるかつ多様な部類を指す。本明細書で使用するとき、「イソブレン」は、明らかに「イソプレノイド」の定義から除外される。

20

## 【0048】

本明細書で使用するとき、用語「テルペノイド」は、多様な様式で組み立てられ及び修飾され、構成員として使用されたイソプレノイド単位の数に基づき分類される、炭素数5のイソプレノイド単位に由来する有機分子の、広範にわたるかつ多様な部類を指す。ヘミテルペノイドは、イソプレノイド単位を1つ有する。モノテルペノイドは、イソプレノイド単位を2つ有する。セスキテルペノイドは、イソプレノイド単位を3つ有する。ジテルペノイドは、イソブレン単位を4つ有する。セステルテルペノイドは、イソプレノイド単位を5つ有する。トリテルペノイドは、イソプレノイド単位を6つ有する。テトラテルペノイドは、イソプレノイド単位を8つ有する。ポリテルペノイドは、イソプレノイド単位を8つ超有する。

30

## 【0049】

本明細書で使用するとき、「イソプレノイド前駆体」は、テルペノイド又はイソプレノイドの生合成時に生物により使用される任意の分子を指す。イソプレノイド前駆体分子の非限定例としては、例えば、メバロン酸（MVA）、イソペンテニルピロリン酸（IPP）及びジメチルアリルニリン酸（DMAPP）が挙げられる。

## 【0050】

本明細書で使用するとき、用語「質量収率」は、細胞（細菌細胞など）により生産される生産物の質量を、細胞（細菌細胞など）により消費されたグルコースの質量より除算し、100を乗じたものを指す。

## 【0051】

「比生産量」は、細胞（細菌細胞など）により生産される生産物の質量を、生産物の生産にかかった時間、細胞密度及び培養体積により除したものを意味する。

40

## 【0052】

「力価」は、細胞（細菌細胞など）により生産される生産物の質量を、培養体積により除したものを意味する。

## 【0053】

本明細書で使用するとき、用語「細胞生産性指数（CPI）」は、細胞（細菌細胞など）により生産される生産物の質量を、培養により生産された細胞（細菌細胞など）の質量により除したもの指す。

## 【0054】

本明細書において別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術及び科学

50

用語は、本発明の属する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同様の意味を持つ。

#### 【0055】

本明細書で使用するとき、単数形「a」、「an」、及び「the」には、文脈に明示されない限り、対象物が複数ある場合をも包含する。

#### 【0056】

本明細書を通じて与えられるあらゆる最大数の限定は、あらゆるより小さい数値の限定を、あたかもそのようなより小さい数値の限定が明確に書かれているかのように包含するものと理解されることが意図される。本明細書の全体を通じて与えられるすべての最小の数値的限定には、これよりも大きいすべての数値的限定が、あたかもこうしたより大きい数値的限定が本明細書に明確に記載されているものと同様に含まれる。本明細書の全体を通じて与えられるすべての数値的範囲には、これよりも狭い数値的範囲が、あたかもこうしたより狭い数値的範囲がすべて本明細書に明確に記載されているものと同様に含まれる。

10

#### 【0057】

イソプレノイド前駆体（例えば、メバロン酸）の生産量を増大させることのできる組み換え細胞（細菌細胞など）

メバロン酸依存性生合成経路（MVA経路）は、全ての高等真核生物及び特定種の細菌に存在する、重要な代謝経路である。メバロン酸経路は、タンパク質のプレニル化、細胞膜の維持、タンパク質の固定及びN-グリコシル化などの、多様な工程において使用される分子の生産に重要であり、並びにテルペン、テルペノイド、イソプレノイド、及びイソブレンの生合成時の主成分として機能するイソプレノイド前駆体分子のMVA、DMAP及びIPPの主要な供給源を提供する。

20

#### 【0058】

MVA経路の上流において、細胞の代謝により生産されたアセチルCo-Aは、チオラーゼ、HMG-CoA還元酵素及びHMG-CoAシンターゼの酵素活性を有するポリペプチドの作用により、メバロン酸に変換される。はじめに、アセチルCo-Aは、チオラーゼの作用によりアセトアセチルCoAに変換される。次に、アセトアセチルCoAは、HMG-CoAシンターゼの酵素作用により、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリル-CoA（HMG-CoA）へと変換される。このCo-A誘導体をHMG-CoA還元酵素により還元してメバロン酸を生成する。この反応は、メバロン酸経路によるイソプレノイド生産の律速段階となる。次に、メバロン酸は、メバロン酸キナーゼの作用により5-ホスホメバロン酸に変換され、5-ホスホメバロン酸は、続いてホスホメバロン酸キナーゼの酵素活性により、5-ジホスホメバロン酸に変換される。最後に、酵素の5-ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼの活性により、5-ジホスホメバロン酸からIPPが形成される。

30

#### 【0059】

mvaE及びmvaSポリペプチドをコードしている遺伝子

L.グレイ（*L. grayi*）、E.ファシウム（*E. faecium*）、E.ガリナラム（*E. gallinarum*）及びE.カッセリファバス（*E. casseliflavus*）においては、mvaE遺伝子は、チオラーゼ活性及びHMG-CoA還元酵素活性を両方保有しているポリペプチドをコードしている。実際に、mvaE遺伝子産物は、真性細菌で見られる、IPP生合成に関する最初の二機能性酵素となるものであり、HMG-CoA還元酵素の第一例は、天然において他のタンパク質と融合していた（Hedl, et al., J. Bacteriol. 2002 April; 184(8): 2116~2122）。それに対し mvaS 遺伝子は、HMG-CoAシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする。

40

#### 【0060】

したがって、細胞（細菌（例えば、大腸菌（*E. coli*））細胞など）は、イソブレン前駆体（例えば、メバロン酸）の生産量、最大力価及び細胞生産性を増大させるために、L.グレイ（*L. grayi*）、E.ファシウム（*E. faecium*）、E.ガリナラム（*E. gallinaru*

50

m) 及び / 又は E . カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS 遺伝子を 1 つ以上発現するよう遺伝子操作することができる 1 つ以上の mvaE 及び mvaS 遺伝子をマルチコピー プラスミドで発現させることもできる。プラスミドは高コピー数 プラスミド、低コピー数 プラスミド又は中程度コピー数 プラスミドであってよい。あるいは、1 つ以上の mvaE 及び mvaS 遺伝子を宿主細胞の染色体に組み込むことができる。プラスミド上の、あるいは宿主細胞染色体の一部に組み込まれた、1 つ以上の mvaE 及び mvaS 遺伝子のいずれもの異種発現に際し、遺伝子発現は、誘導型プロモータ又は常時発現型プロモータのいずれかにより駆動できる。プロモータは、1 つ以上の mvaE 及び mvaS 遺伝子の発現を強力に駆動することができ、弱く駆動することができ、あるいは中程度に駆動することができる。

10

## 【0061】

L . グレイ (*L. grayi*)、E . フェシウム (*E. faecium*)、E . ガリナラム (*E. gallinarum*) 及び / 又は E . カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS 遺伝子に関しては、単独での使用、あるいは MVA 経路上流のタンパク質をコードしているその他の 1 つ以上の mvaE 及び mvaS 遺伝子を組み合わせての使用といった各種選択も、本発明の範囲内のものとして企図される。したがって、表 1 において企図される任意の遺伝子の組み合わせを、上記の任意の手法において、細胞（細菌細胞など）に発現させることができる。

## 【0062】

## 【表 1】

20

表 1 : 本発明に関し企図される宿主細胞において発現させる mvaE 及び mvaS 遺伝子の組み合わせ

	L . グレイ ( <i>L. grayi</i> )、 mvaE	E . フェシウム ( <i>E. faecium</i> )、 mvaE	E . ガリナラム ( <i>E. gallinarum</i> )、 mvaE	E . カセリフラバス ( <i>E. casseliflavus</i> )、 mvaE
L . グレイ ( <i>L. grayi</i> )、 mvaS	L . グレイ ( <i>L. grayi</i> )、 mvaE L . グレイ ( <i>L. grayi</i> )、 mvaS	E . フェシウム ( <i>E. faecium</i> )、 mvaE L . グレイ ( <i>L. grayi</i> )、 mvaS	E . ガリナラム ( <i>E. gallinarum</i> )、 mvaE L . グレイ ( <i>L. grayi</i> )、 mvaS	E . カセリフラバス ( <i>E. casseliflavus</i> )、 mvaE L . グレイ ( <i>L. grayi</i> )、 mvaS
E . フェシウム ( <i>E. faecium</i> )、 mvaS	L . グレイ ( <i>L. grayi</i> )、 mvaE E . フェシウム ( <i>E. faecium</i> )、 mvaS	E . フェシウム ( <i>E. faecium</i> )、 mvaE E . フェシウム ( <i>E. faecium</i> )、 mvaS	E . ガリナラム ( <i>E. gallinarum</i> )、 mvaE E . フェシウム ( <i>E. faecium</i> )、 mvaS	E . カセリフラバス ( <i>E. casseliflavus</i> )、 mvaE E . フェシウム ( <i>E. faecium</i> )、 mvaS
E . ガリナラム ( <i>E. gallinarum</i> )、 mvaS	L . グレイ ( <i>L. grayi</i> )、 mvaE E . ガリナラム ( <i>E. gallinarum</i> )、 mvaS	E . フェシウム ( <i>E. faecium</i> )、 mvaE E . ガリナラム ( <i>E. gallinarum</i> )、 mvaS	E . ガリナラム ( <i>E. gallinarum</i> )、 mvaE E . ガリナラム ( <i>E. gallinarum</i> )、 mvaS	E . カセリフラバス ( <i>E. casseliflavus</i> )、 mvaE E . ガリナラム ( <i>E. gallinarum</i> )、 mvaS
E . カセリフラバス ( <i>E. casseliflavus</i> )、 mvaS	L . グレイ ( <i>L. grayi</i> )、 mvaE E . カセリフラバス ( <i>E. casseliflavus</i> )、 mvaS	E . フェシウム ( <i>E. faecium</i> )、 mvaE E . カセリフラバス ( <i>E. casseliflavus</i> )、 mvaS	E . ガリナラム ( <i>E. gallinarum</i> )、 mvaE E . カセリフラバス ( <i>E. casseliflavus</i> )、 mvaS	E . カセリフラバス ( <i>E. casseliflavus</i> )、 mvaE E . カセリフラバス ( <i>E. casseliflavus</i> )、 mvaS

30

## 【0063】

## mvaE ポリペプチド及び核酸例

mvaE 遺伝子は、チオラーゼ活性及び HMG - CoA 還元酵素活性を両方保有しているポリペプチドをコードする。mvaE 遺伝子によりコードされているポリペプチドのチオラーゼ活性は、アセチルCoA をアセトアセチルCoA に変換するのに対し、HMG - CoA 還元酵素ポリペプチドの酵素活性は、3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタルリル - CoA をメバロン酸に変換する。mvaE ポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに mvaE ポリペプチドの活性を少なくとも 1 つ有する、本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。

40

## 【0064】

変異型 mvaE ポリペプチドとしては、1つ以上のアミノ酸残基がアミノ酸置換を受けており、かつ mvaE ポリペプチド活性（すなわち、アセチルCo-A をアセトアセチルCoA に変換する能力並びに 3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタルリル - CoA をメバロン酸に変換する能力）を保持しているものが挙げられる。アミノ酸置換は、保存的なものであっても非保存的なものであってもよく、アミノ酸残基の置換は遺伝子暗号によりコードされていてもコードされていなくてもよい。標準的な 20 個のアミノ酸「記号 (alphabet)」を、側鎖の類似性に基づき化学的なファミリーに分けた。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、極性無電荷側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を持つアミノ酸が挙げられる。「保存的アミノ酸置換」では、アミノ酸残基は、化学的に類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される（すなわち、塩基性側鎖を有するアミノ酸は、塩基性側鎖を有する別のアミノ酸により置換される）。「非保存的アミノ酸置換」では、アミノ酸残基は、化学的に異なる側鎖を有するアミノ酸残基で置換される（すなわち、塩基性側鎖を有するアミノ酸は、芳香族側鎖を有する別のアミノ酸により置換される）。

10

## 【0065】

mvaE ポリペプチド中にアミノ酸置換を導入することで、分子の官能性を改良することができる。例えば、mvaE ポリペプチドの、基質に対する結合親和性を増加させるアミノ酸置換、あるいはアセチルCo-A をアセトアセチルCoA に変換する能力及び / 又は 3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタルリル - CoA をメバロン酸に変換する能力を改良するアミノ酸置換を、mvaE ポリペプチドに導入することができる。一部の態様では、mvaE ポリペプチド変異体は、1つ以上の保存的なアミノ酸置換を含有する。

20

## 【0066】

一態様では、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体及び / 又はイソプレノイドを生産する際には、分解されていない又は分解しにくい mvaE タンパク質を使用することができる。使用することのできる、分解されていない又は分解しにくい mvaE 遺伝子産物の例としては、限定するものではないが、E. フェシウム (E. faecium)、E. ガリナラム (E. gallinarum)、E. カセリフラブス (E. casseliflavus) 及び L. グレイ (L. grayi) に由来するものが挙げられる。当業者は、大腸菌 (E. coli) BL21 (DE3) において mvaE タンパク質を発現させ、任意の標準的な分子生物学手法により断片が存在していないか調べることができる。例えば、His-tag をを利用して精製した後、すなわちメバロン酸、イソプレン又イソプレノイドを生産する大腸菌 (E. coli) BL21 において発現させた後、本明細書に記載の検出法を使用して、SDS-PAGE ゲルを Safe stain で染色することにより、断片が存在していないことを確認することができる。

30

## 【0067】

Hedlef et al. (J Bacteriol. 2002, April; 184(8): 2116 ~ 2122) に記載のものなどの標準法を使用して、アセトアセチルCoA チオラーゼ活性並びに HMG-CoA 還元酵素活性を測定することにより、ポリペプチドが mvaE 活性を有しているか評価することができる。代表的なアッセイでは、アセトアセチルCoA チオラーゼ活性は、アセトアセチルCoA の形成又はリオリシスに伴う吸光度の変化を分光光度計により 302 nm にて監視することで測定できる。アセトアセチルCoA 合成を判定するための各反応に関する標準的なアッセイ条件は、1 mM のアセチルCoA、10 mM の MgCl<sub>2</sub>、50 mM のトリス (pH 10.5) というものであり、反応は酵素の添加により開始される。アッセイは最終用量 200 μL で実施できる。アッセイに関し、1 酵素単位 (e.u.) は、1 分間で 1 μmol のアセトアセチルCoA

40

50

を合成又はチオリシスすることを意味する。他の代表的なアッセイでは、HMG-CoA還元酵素活性は、分光光度計により、340 nmでのNADP(H)の出現又は消失をもとに監視することもできる。HMG-CoAのメバロン酸への還元的脱アシル化について測定した各反応の標準的なアッセイ条件は、0.4 mMのNADPH、1.0 mMの(R,S)-HMG-CoA、100 mMのKCl及び100 mMのK<sub>x</sub>PO<sub>4</sub>(pH 6.5)というものである。アッセイは最終用量200 μLで実施する。反応は酵素の添加により開始される。アッセイに関し、1 euは、1分間で1 μmolのNADP(H)が代謝回転されることを意味する。これは、0.5 μmolのHMG-CoA又はメバロン酸が代謝回転することに相当する。

## 【0068】

10

あるいは、細胞(細菌細胞など)におけるメバロン酸の生産量は、限定するものではないが、ガスクロマトグラフィー(米国特許出願公開番号第2005/0287655(A1)号を参照されたい)又はHPLC(米国特許出願第12/978,324号を参照されたい)で測定することができる。代表的なアッセイの際には、1種以上の抗生物質を添加したLBプロスを含有させた振とうチューブに培養物を接種し、34にて、250 rpmで14時間インキュベートする。次に、1%グルコース、0.1%酵母エキス及び200 μMのIPTGを添加したTM3培地を入れたウェルプレート中で、最終的なODが0.2になるよう培養物を希釈する。次に、プレートを、Breath Easier membrane(Diversified Biotech)でシールし、振とう/恒温器で、34にて、600 rpmで24時間インキュベートした。次に各培養物1 mLを3,000 × gで5分遠心分離する。次に、上清に20%硫酸を添加し、氷上で5分インキュベートする。次に、混合物を3000 × gで5分遠心分離し、HPLC解析のため上清を回収する。メバロン酸(Sigma)の標準曲線と比較して、試料中のメバロン酸濃度を測定する。更に、当該技術分野において既知の任意の手法によりグルコースオキシダーゼアッセイを実施し、グルコース濃度を測定する。HPLCを使用し、各試料により得られた屈折率を、濃度既知の各種メバロン酸溶液のHPLCをもとに作成した検量線に対し比較して、メバロン酸濃度を定量することができる。

20

## 【0069】

30

mvaE核酸の例としては、mvaEポリペプチド活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又はポリペプチド融合物をコードしている核酸が挙げられる。mvaEポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。mvaE核酸の例としては、例えば、リステリア・グレイ(Listeria grayi)DSM 20601、エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)、エンテロコッカス・ガリナルム(Enterococcus gallinarum)EG2及び/又はエンテロコッカス・カセリフラブス(Enterococcus casseliflavus)から単離したmvaE核酸が挙げられる。リステリア・グレイ(Listeria grayi)DSM 20601 mvaE遺伝子によりコードされるmvaE核酸は、配列番号1に対し、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%配列同一性を有し得る。他の態様では、リステリア・グレイ(Listeria grayi)DSM 20601 mvaE遺伝子によりコードされるmvaE核酸は、配列番号1に対し、84%、83%、82%、81%又は80%配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)mvaE遺伝子によりコードされるmvaE核酸は、配列番号3に対し、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%又は85%配列同一性を有し得る。他の態様では、エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)mvaE遺伝子によりコードされるmvaE核酸は、配列番号3に対し、少なくとも約84%、83%、82%、81%又は80%配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ガリナルム(Enterococcus gallinarum)EG2 mvaE遺伝子によりコードされるmvaE核酸は、配列

40

50

番号 5 に対し、少なくとも約 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 5 %、9 3 %、9 2 %、9 1 %、9 0 %、8 9 %、8 8 %、8 7 %、8 6 %又は8 5 %配列同一性を有し得る。他の態様では、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) E G 2 m v a E 遺伝子によりコードされる m v a E 核酸は、配列番号 5 に対し、少なくとも約 8 4 %、8 3 %、8 2 %、8 1 %又は8 0 %配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) m v a E 遺伝子によりコードされる m v a E 核酸は、配列番号 7 に対し、少なくとも約 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 5 %、9 3 %、9 2 %、9 1 %、9 0 %、8 9 %、8 8 %、8 7 %、8 6 %又は8 5 %配列同一性を有し得る。他の態様では、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) m v a E 遺伝子によりコードされる m v a E 核酸は、配列番号 7 に対し、少なくとも約 8 4 %、8 3 %、8 2 %、8 1 %又は8 0 %配列同一性を有し得る。本明細書における任意の態様では、M V A 経路上流のポリペプチドは、配列番号 1 ~ 8 のうちのいずれか 1 つと、少なくとも約 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 5 %、9 3 %、9 2 %、9 1 %、9 0 %、8 9 %、8 8 %、8 7 %、8 6 %、8 5 %、8 4 %、8 3 %、8 2 %、8 1 %又は8 0 %配列同一性を有する核酸によりコードされ得る。本明細書における任意の態様では、M V A 経路上流のポリペプチドは、配列番号 1 ~ 8 のうちのいずれか 1 つを有する核酸によりコードされ得る。

10

## 【0070】

m v a E ポリペプチドの例としては、m v a E ポリペプチドに関する活性を少なくとも 1 つ有するポリペプチド、ペプチド又は融合ポリペプチド断片が挙げられる。m v a E ポリペプチドの例としては (and include)、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド、並びに本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体変異体が挙げられる。m v a E ポリペプチドの例としては、例えば、リストリア・グレイ (*Listeria grayi*) D S M 2 0 6 0 1、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) E G 2 及び / 又はエンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) から単離した m v a E ポリペプチドが挙げられる。リストリア・グレイ (*Listeria grayi*) D S M

20

2 0 6 0 1 m v a E 遺伝子によりコードされる m v a E ポリペプチドは、配列番号 1 1 に対し、少なくとも約 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 5 %、9 3 %、9 2 %、9 1 %、9 0 %、8 9 %、8 8 %、8 7 %、8 6 %、配列同一性を有し得る。他の態様では、リストリア・グレイ (*Listeria grayi*) D S M 2 0 6 0 1 m v a E 遺伝子によりコードされる m v a E ポリペプチドは、配列番号 1 1 に対し、少なくとも約 8 4 %、8 3 %、8 2 %、8 1 %又は8 0 %配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) m v a E 遺伝子によりコードされる m v a E ポリペプチドは、配列番号 1 3 に対し、少なくとも約 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 5 %、9 3 %、9 2 %、9 1 %、9 0 %、8 9 %、8 8 %、8 7 %、8 6 %又は8 5 %配列同一性を有し得る。他の態様では、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) m v a E 遺伝子によりコードされる m v a E ポリペプチドは、配列番号 1 3 に対し、少なくとも約 8 4 %、8 3 %、8 2 %、8 1 %又は8 0 %配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) E G 2 m v a E 遺伝子によりコードされる m v a E ポリペプチドは、配列番号 9 に対し、少なくとも約 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 5 %、9 3 %、9 2 %、9 1 %、9 0 %、8 9 %、8 8 %、8 7 %、8 6 %又は8 5 %配列同一性を有し得る。他の態様では、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) E G 2 m v a E 遺伝子によりコードされる m v a E ポリペプチドは、配列番号 9 に対し、少なくとも約 8 4 %、8 3 %、8 2 %、8 1 %又は8 0 %配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) m v a E 遺伝子によりコードされる m v a E ポリペプチドは、配列番号 1 5 に対し、少なくとも約 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 5 %、9 3 %、9 2 %、9 1 %、9 0 %、8 9 %、8 8 %、8 7 %、8 6 %又は8 5 %配列同一性を有し得る。他の態様では、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)

30

40

50

*mvaE* 遺伝子によりコードされる *mvaE* ポリペプチドは、配列番号 1~5 に対し、少なくとも約 84%、83%、82%、81% 又は 80% 配列同一性を有し得る。本明細書における任意の態様では、MVA 経路上流のポリペプチドは、配列番号 9~16 のうちのいずれか 1 つと、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81% 又は 80% 配列同一性を有するポリペプチドによりコードされ得る。本明細書における任意の態様では、MVA 経路上流のポリペプチドは、配列番号 9~16 のうちのいずれか 1 つを有するポリペプチドによりコードされ得る。

## 【0071】

*mvaE* 核酸は、細胞（バクテリア細胞など）において、マルチコピー プラスミド上で発現させることができる。プラスミドは高コピー数 プラスミド、低コピー数 プラスミド又は中程度コピー数 プラスミドであってよい。あるいは、*mvaE* 核酸は、宿主細胞の染色体に組み込むこともできる。プラスミド上の、あるいは宿主細胞染色体の一部に組み込まれた、*mvaE* 核酸の異種発現に際し、核酸の発現は、誘導型プロモータ又は常時発現型プロモータのいずれかにより駆動できる。プロモータは、*mvaE* 核酸の発現を強力に駆動することができ、弱く駆動することができ、あるいは中程度に駆動することができる。

10

## 【0072】

*mvaS* ポリペプチド及び核酸例

*mvaS* 遺伝子は、HMG-CoA シンターゼ活性を保有するポリペプチドをコードする。このポリペプチドは、アセトアセチル CoA を、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリル-CoA (HMG-CoA) を変換させることができ。*mvaS* ポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに*mvaS* ポリペプチドの活性を少なくとも 1 つ有する、本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。

20

## 【0073】

変異型*mvaS* ポリペプチドとしては、1 つ以上のアミノ酸残基がアミノ酸置換を受けており、かつ*mvaS* ポリペプチド活性（すなわち、アセトアセチル CoA を 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリル-CoA をメバロン酸に変換する能力）を保持しているものが挙げられる。*mvaS* ポリペプチド中にアミノ酸置換を導入することで、分子の官能性を改良することができる。例えば、*mvaS* ポリペプチドの、基質に対する結合親和性を増加させるアミノ酸置換、あるいはアセトアセチル CoA を 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリル-CoA に変換する能力を改良するアミノ酸置換を、*mvaS* ポリペプチドに導入することができる。一部の態様では、*mvaS* ポリペプチド変異体は、1 つ以上の保存的なアミノ酸置換を含有する。

30

## 【0074】

Quant et al. (Biochem J., 1989, 262: 159~164) に記載のものなどの標準法を使用して、HMG-CoA シンターゼの活性を測定することにより、ポリペプチドが*mvaS* 活性を有するか評価することもできる。代表的なアッセイでは、HMG-CoA 合成酵素の活性は、303 nm での吸光度の変化を監視することにより、エノール形態のアセトアセチル CoA の消失を分光光度を元に評価することで、検定できる。30 下で、50 mM の Tris / HCl (pH 8.0)、10 mM の MgCl<sub>2</sub> 及び 0.2 mM のジチオスレイトールを含有する標準的な 1 mL のアッセイ系に、5 mM のアセチルリン酸、10 μM - アセトアセチル-CoA 及び 5 μL の抽出サンプルを加え、続いてアセチル CoA (100 μM) 及び 10 ユニットの PTA を同時に加えることができる。次に、HMG-CoA シンターゼの活性を、アセチル CoA 添加前及び添加後の速度 (rate) の差として測定する。使用した条件下 (pH 8.0、10 mM - MgCl<sub>2</sub>) での、アセトアセチル CoA の吸収係数は、12.2 × 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> である。定義によると、1 ユニットの酵素活性により、1 分当たり 1 μmol のアセトアセチル CoA が変換されることになる。

40

## 【0075】

50

あるいは、細胞（細菌細胞など）におけるメバロン酸の生産量は、限定するものではないが、ガスクロマトグラフィー（米国特許出願公開番号第2005/0287655（A1）号を参照されたい。この特許文献の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。）又はHPLC（米国特許出願公開番号第2011/0159557（A1）号を参照されたい。この特許文献の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。）により測定することができる。代表的なアッセイの際には、1種以上の抗生物質を添加したLBプロスを含有させた振とうチューブに培養物を接種し、34にて、250 rpmで14時間インキュベートする。次に、1%グルコース、0.1%酵母エキス及び200 μMのIPTGを添加したTM3培地を入れたウェルプレート中で、最終的なODが0.2になるよう培養物を希釈する。次に、プレートを、Breath Easier membrane（Diversified Biotech）でシールし、振とう／恒温器で、34にて、600 rpmで24時間インキュベートした。次に各培養物1mLを3,000×gで5分遠心分離する。次に、上清に20%硫酸を添加し、氷上で5分インキュベートする。次に、混合物を3000×gで5分遠心分離し、HPLC解析のため上清を回収する。メバロン酸（Sigma）の標準曲線と比較して、試料中のメバロン酸濃度を測定する。更に、当該技術分野において既知の任意の手法によりグルコースオキシダーゼアッセイを実施し、グルコース濃度を測定する。HPLCを使用し、各試料により得られた屈折率を、濃度既知の各種メバロン酸溶液のHPLCをもとに作成した検量線に対し比較して、メバロン酸濃度を定量することができる。

## 【0076】

mvaS核酸の例としては、mvaSポリペプチド活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又はポリペプチド融合物をコードしている核酸が挙げられる。mvaSポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。核酸の例としては、例えば、リステリア・グレイ（Listeria grayi）DSM 20601、エンテロコッカス・フェシウム（Enterococcus faecium）、エンテロコッカス・ガリナルム（Enterococcus gallinarum）EG2及び／又はエンテロコッカス・カセリフラブス（Enterococcus casseliflavus）から単離したmvaSが挙げられる。リステリア・グレイ（Listeria grayi）DSM 20601 mvaS遺伝子によりコードされるmvaS核酸は、配列番号2に対し、少なくとも約9.9%、9.8%、9.7%、9.6%、9.5%、9.5%、9.3%、9.2%、9.1%、9.0%、8.9%、8.8%、8.7%、8.6%又は8.5%配列同一性を有し得る。リステリア・グレイ（Listeria grayi）DSM 20601 mvaS遺伝子によりコードされるmvaS核酸は、配列番号2に対しても、少なくとも約8.4%、8.3%、8.2%、8.1%又は8.0%配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェシウム（Enterococcus faecium）mvaS遺伝子によりコードされるmvaS核酸は、配列番号4に対し、少なくとも約9.9%、9.8%、9.7%、9.6%、9.5%、9.5%、9.3%、9.2%、9.1%、9.0%、8.9%、8.8%、8.7%、8.6%又は8.5%配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェシウム（Enterococcus faecium）mvaS遺伝子によりコードされるmvaS核酸は、配列番号4に対し、少なくとも約8.4%、8.3%、8.2%、8.1%又は8.0%配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ガリナルム（Enterococcus gallinarum）EG2 mvaS遺伝子によりコードされるmvaS核酸は、配列番号6に対し、少なくとも約9.9%、9.8%、9.7%、9.6%、9.5%、9.5%、9.3%、9.2%、9.1%、9.0%、8.9%、8.8%、8.7%、8.6%又は8.5%配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ガリナルム（Enterococcus gallinarum）EG2 mvaS遺伝子によりコードされるmvaS核酸は、配列番号6に対し、少なくとも約8.4%、8.3%、8.2%、8.1%又は8.0%配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・カセリフラブス（Enterococcus casseliflavus）mvaS遺伝子によりコードされるmvaS核酸は、配列番号8に対し、少なくとも約9.9%、9.8%、9.7%、9.6%、9.5%、9.5%、9.3%、9.2%、9.1%、9.0%、8.9%、8.8%、8.7%、8.6%又は8.5%配列同一性を有し得る。エンテロ

10

20

30

40

50

コッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) mvaS 遺伝子によりコードされるmvaS 核酸は、配列番号8に対し、少なくとも約84%、83%、82%、81%又は80%配列同一性を有し得る。

#### 【0077】

mvaS ポリペプチドの例としては、mvaS ポリペプチドに関する活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ペプチド又は融合ポリペプチド断片が挙げられる。mvaS ポリペプチドの例としては、天然に生じるポリペプチド、並びに本明細書に記載の任意の生物資源由来のポリペプチド並びに本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体が挙げられる。mvaS ポリペプチドの例としては、例えば、リストリア・グレイ (*Listeria grayi*) D S M 20601、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) E G 2 及び/又はエンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) から単離したmvaS ポリペプチドが挙げられる。リストリア・グレイ (*Listeria grayi*) D S M 20601 mvaS 遺伝子によりコードされるmvaS ポリペプチドは、配列番号12に対し、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%又は85%配列同一性を有し得る。リストリア・グレイ (*Listeria grayi*) D S M 20601 mvaS 遺伝子によりコードされるmvaS ポリペプチドは、配列番号12に対しても、少なくとも約84%、83%、82%、81%又は80%配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) mvaS 遺伝子によりコードされるmvaS ポリペプチドは、配列番号14に対し、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%又は85%配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) mvaS 遺伝子によりコードされるmvaS ポリペプチドは、配列番号14に対し、少なくとも約84%、83%、82%、81%又は80%配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) E G 2 mvaS 遺伝子によりコードされるmvaS ポリペプチドは、配列番号10に対し、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%又は85%配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) E G 2 mvaS 遺伝子によりコードされるmvaS ポリペプチドは、配列番号10に対し、少なくとも約84%、83%、82%、81%又は80%配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) mvaS 遺伝子によりコードされるmvaS ポリペプチドは、配列番号16に対し、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%又は85%配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) mvaS 遺伝子によりコードされるmvaS ポリペプチドは、配列番号16に対し、少なくとも約84%、83%、82%、81%又は80%配列同一性を有し得る。

#### 【0078】

mvaS 核酸は、細胞（バクテリア細胞など）において、マルチコピープラスミド上で発現させることができる。プラスミドは高コピー数プラスミド、低コピー数プラスミド又は中程度コピー数プラスミドであってよい。あるいは、mvaS 核酸は、宿主細胞の染色体に組み込むことができる。プラスミド上の、あるいは宿主細胞染色体の一部に組み込まれた、mvaS 核酸の異種発現に際し、核酸の発現は、誘導型プロモータ又は常時発現型プロモータのいずれかにより駆動できる。プロモータは、mvaS 核酸の発現を強力に駆動することができ、弱く駆動することができ、あるいは中程度に駆動することができる。

#### 【0079】

##### 宿主細胞例

当業者であれば、具体的な宿主株における遺伝子発現を最適化する特定の配列を含有するよう、発現ベクターが設計されることを認識するであろう。このような最適化配列とし

10

20

30

40

50

ては、限定するものではないが、複製起点、プロモータ、及びエンハンサが挙げられる。本明細書で参照するベクター及び配列は例示目的で記載され、本発明の範囲を狭めることを意味するものではない。

### 【0080】

遺伝子の異種発現に使用することのできる任意の微生物又はそれらの子孫微生物を使用して、*L.グレイ*(*L. grayi*)、*E.ファシウム*(*E. faecium*)、*E.ガリナラム*(*E. gallinarum*)及び／又は*E.カッセリファバス*(*E. casseliflavus*)由来の1つ以上のmvaE及びmvaS遺伝子を発現させることができる。異種発現させるために組み換え細胞を作製して、*L.グレイ*(*L. grayi*)、*E.ファシウム*(*E. faecium*)、*E.ガリナラム*(*E. gallinarum*)及び／又は*E.カッセリファバス*(*E. casseliflavus*)由来の1つ以上 10 のmvaE及びmvaS遺伝子を発現させるために使用することができる。グラム陽性又はグラム陰性細菌などの細菌細胞を使用して、上記の任意のmvaE及びmvaS遺伝子を発現させることができる。詳細には、mvaE及びmvaS遺伝子は、*P.シトレア*(*P. citrea*)、枯草菌(*B. subtilis*)、*B.リケニフォルミス*(*B. licheniformis*)、*B.レンタス*(*B. lentus*)、*B.ブレビス*(*B. brevis*)、*B.ステアロサーモフィルス*(*B. stearothermophilus*)、*B.アルカロフィルス*(*B. alkalophilus*)、*B.アミロリケファシエンス*(*B. amyloliquefaciens*)、*B.クラウシイ*(*B. clausii*)、*B.ハロドュランス*(*B. halodurans*)、*B.メガテリウム*(*B. megaterium*)、*B.コアギュランス*(*B. coagulans*)、*B.サーキュランス*(*B. circulans*)、*B.ロータス*(*B. lautus*)、*B.チューリングンシス*(*B. thuringiensis*)、*S.アルバス*(*S. albus*)、*S.リビダンス*(*S. lividans*)、*S.コエリカラ*(*S. coelicolor*)、*S.グリセウス*(*S. griseus*)、シュードモナス種(*Pseudomonas sp.*)及び*P.アルカリゲネス*(*P. alcaligenes*)細胞のいずれかにおいて発現させることができる。加えて、mvaE及びmvaS遺伝子は、ラクトバチルス・ラクチス(*Lactobacillus lactis*)又はラクトバチルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*)などの任意のラクトバチルス種(*Lactobacillus spp.*)で発現させることができる。 20

### 【0081】

本発明の組成物及び方法には、数多くの種類の嫌気性細胞を宿主細胞として使用することができる。本発明の一態様では、本明細書に記載の任意の組成物又は方法に関し記載される細胞は、絶対嫌気性細胞及びその子孫細胞である。絶対嫌気性菌は、典型的には、条件下に酸素が存在する場合には良好に増殖しない。絶対嫌気性菌が低濃度の酸素に対しある程度の耐性を示す場合には、少量の酸素が存在してもよいことは理解されるであろう。一態様では、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体及びイソプレノイドを生産するよう遺伝子操作を行った絶対嫌気性菌を、本明細書に記載のいずれかの方法及び／又は組成物用の宿主細胞として提供し、実質的に無酸素条件下で増殖させることができる。この場合、存在する酸素量は嫌気性菌の増殖、維持、及び／又は発酵に有害なものではない。 30

### 【0082】

本発明の他の態様では、本明細書に記載の組成物又は方法のいずれかにおいて記載され及び／又は使用される宿主細胞は、通性嫌気性細胞及びその子孫細胞である。酸素が存在する場合、通性嫌気性菌は、好気呼吸により(例えば、TCAサイクルを利用するなどして)細胞ATPを生成し得る。しかしながら、通性嫌気性菌も、酸素の非存在下で増殖させることができる。絶対嫌気性菌とは対照的に、通性嫌気性菌はより多量の酸素の存在下で死滅し、又は増殖性が乏しくなる。したがって、一態様では、通性嫌気性菌は、本明細書で提供される組成物及び／又は方法のいずれかにおいて、宿主細胞として使用でき、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体及びイソプレノイドを生成するよう遺伝子操作を行うことができる。通性嫌気性の宿主細胞は、実質的に無酸素(存在する酸素量が、増殖、嫌気性菌の維持、及び／又は発酵に有害なものではないことを意味する)条件下で増殖させることができ、あるいは酸素がより多量に存在している場合にも増殖することができる。 40

10

20

30

40

50

## 【0083】

宿主細胞は、糸状真菌細胞及びその子孫細胞であってもよい。(例えば、Berk a & Barnett, Biotechnology Advances, (1989), 7(2): 127~154を参照されたい)。一部の態様では、糸状菌細胞はトリコデルマ・ロンギプラキアタム(*Trichoderma longibrachiatum*)、T. ビリデ(*T. viride*)、T. コニンギ(*T. koningii*)、T. ハルジアナム(*T. harzianum*)、ペニシリウム属(*Penicillium* sp.)、ヒュミコラ・インソレンス(*Humicola insolens*)、ヒュミコラ・ラヌギノス(*H. lanuginose*)、H. グリセア(*H. grisea*)、クリソスピロウム属(*Chrysosporium* sp.)、C. ラックノウエンス(*C. lucknowense*)、グリオクラジウム属(*Gliocladium* sp.)、アスペルギルス属(*Aspergillus* sp.) (例えば、A. オリゼ(*A. oryzae*)、A. ニガー(*A. niger*)、ショウユコウジカビ(*A. sojae*)、A. ジャボニクス(*A. japonicus*)、A. ニデュランス(*A. nidulans*)、又はアワモリコウジカビ(*A. awamori*))、フザリウム属(*Fusarium* sp.) (例えば、F. ロゼウム(*F. roseum*)、F. グラミニウム(*F. graminum*)、F. セレアリス(*F. cerealis*)、F. オキシスポラム(*F. oxysporum*)、又はF. ベネナタム(*F. venenatum*))、ニューロスプロラ属(*Neurospora* sp.) (例えば、N. クラッサ(*N. crassa*)、ヒポクレア属(*Hypocreah* sp.)、ムコール属(*Mucor* sp.) (例えば、M. ミエハイ(*M. miehei*))、リゾプス属(*Rhizopus* sp.)又はエメリセラ属(*Emericella* sp.)のいずれか由来のものであってよい。一部の態様では、真菌は、A. ニデュランス(*A. nidulans*)、アワモリコウジカビ(*A. awamori*)、A. オリゼ(*A. oryzae*)、A. アクレタス(*A. aculeatus*)、A. ニガー(*A. niger*)、A. ジャボニクス(*A. japonicus*)、T. リーゼイ(*T. reesei*)、T. ビリデ(*T. viride*)、F. オキシスポラム(*F. oxysporum*)又はF. ソラニ(*F. solani*)である。特定の実施形態では、本明細書において使用するプラスミド又はプラスミド成分としては、米国特許出願公開番号第2011/0045563号(この特許文献の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載のものが挙げられる。

## 【0084】

宿主細胞は、サッカロマイセス属(*Saccharomyces* sp.)、シゾサッカロマイセス属(*Schizosaccharomyces* sp.)、ピキア属(*Pichia* sp.)、又はカンジダ属(*Candida* sp.)などの酵母であってもよい。一部の態様では、サッカロマイセス種(*Saccharomyces* sp.)は、サッカロマイセス・セレヴィシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)である(例えば、Romanos et al., Yeast, (1992), 8(6): 423~488を参照されたい。この文献の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。特定の実施形態では、本明細書において使用するプラスミド又はプラスミド成分としては、米国特許第7,659,097号及び米国特許出願公開番号第2011/0045563号に記載のものが挙げられる(これらの特許文献の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

## 【0085】

宿主細胞は、緑藻類、紅藻類、灰色藻類、クロララクニオン藻類、ミドリムシ類、クロミスタ類、又は渦鞭毛藻類などの藻類であってもよい。(例えば、Saunders及びWarmbrodt、「藻類及び酵母などの菌類における遺伝子発現(Gene Expression in Algae and Fungi, Including Yeast)」(1993年), National Agricultural Library, Beltsville, MDを参照されたい。これらの特許文献の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。特定の実施形態では、本明細書において使用するプラスミド又はプラスミド成分としては、米国特許出願公開番号第2011/0045563号(この特許文献の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載のものが挙げられる。一部の態様では、宿主細胞は、形態学に基づき次の群:クロオコッカス目(*Chroococcales*)、プレウロカプサ目(*Pleurocapsales*)、ユレモ目(*Oscillatoriaceae*)、ネンジュモ目(*Nostocales*)、又はステイゴネマ目(*Stigonematales*) (例えば、Lindberg et al., Metab. Eng., (2010) 12(1): 70~79を参照されたい)のいずれかに分類さ

れるラン藻である。特定の実施形態では、本明細書において使用するプラスミド又はプラスミド成分としては、米国特許広報第2010/0297749号、米国特許第2009/0282545号及び国際公開第2011/034863号に記載のものが挙げられる（これらの特許文献の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

#### 【0086】

本明細書に記載の組成物及び方法において、大腸菌（*E. coli*）宿主細胞を使用して、*L. グレイ*（*L. grayi*）、*E. ファシウム*（*E. faecium*）、*E. ガリナラム*（*E. gallinarum*）及び／又は*E. カッセリファバス*（*E. casseliflavus*）由来の1種以上のmv a E及びmv a Sポリペプチドを発現させることができる。一態様では、宿主細胞は、メバロン酸を生産することができ、*L. グレイ*（*L. grayi*）、*E. ファシウム*（*E. faecium*）、*E. ガリナラム*（*E. gallinarum*）及び／又は*E. カッセリファバス*（*E. casseliflavus*）由来のmv a E及びmv a Sポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸を発現する大腸菌（*E. coli*）株組み換え細胞又はそれらの子孫細胞である。大腸菌（*E. coli*）宿主細胞は、*L. グレイ*（*L. grayi*）、*E. ファシウム*（*E. faecium*）、*E. ガリナラム*（*E. gallinarum*）及び／又は*E. カッセリファバス*（*E. casseliflavus*）由来のmv a E及びmv a Sポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸を異種発現しないことを除き同一の細胞と比較して、上回る生産量、ピーク力価及び細胞生産性でメバロン酸を生産することができる。加えて、大腸菌（*E. coli*）において異種発現させる、*L. グレイ*（*L. grayi*）、*E. ファシウム*（*E. faecium*）、*E. ガリナラム*（*E. gallinarum*）及び／又は*E. カッセリファバス*（*E. casseliflavus*）由来のmv a E及びmv a Sポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸は、染色体コピーであってよい（例えば、大腸菌（*E. coli*）染色体に組み込まれる）。他の態様では、大腸菌（*E. coli*）細胞は培養物である。  
10  
20

#### 【0087】

##### 細胞培養培地例

本明細書で使用するとき、用語「最少培地（minimal medium又はminimal media）」は、概して細胞増殖に必要とされる最低限の栄養素を含有している増殖培地を指すが、常に1種以上のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10種以上のアミノ酸）が存在していないわけではない。最少培地は、典型的には、（1）細胞（例えば、細菌）の生育用の炭素源、（2）各種塩類（細胞（例えば、細菌）種及び生育条件に応じ変更することができる）及び（3）水、を含有する。炭素源は、グルコースなどの単糖から、本明細書で以下により詳細に記載されるような、他のバイオマスのより複雑な加水分解物、例えば、酵母エキスなどといった多様なものであり得る。塩は、概してマグネシウム、窒素、リン及びイオウなどの必須元素を提供し、細胞がタンパク質及び核酸を合成できるようにする。また、最少培地には、特定のプラスミド及び同様物を維持すべく選択するために、抗菌剤などの選択剤を添加することもできる。例えば、微生物が、例えばアンピシリン又はテトラサイクリンなどの特定の抗菌剤に耐性である場合、耐性を欠く細胞の生育を阻害する目的で培地に抗菌剤を添加することができる。培地には、所望される生理学的又は生化学的特性について選択するのに必要とされる、例えば特定のアミノ酸などといった他の化合物を添加することができる。  
30

#### 【0088】

宿主細胞を培養するにあたり、任意の最少培地処方を使用することができる。最少培地の処方例としては、例えば、M9最少培地及びTM3最少培地が挙げられる。M9最少培地は、1Lにつき（1）200mLの滅菌M9塩類（1L当たりNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O（64g）、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>（15g）、NaCl（2.5g）及びNH<sub>4</sub>Cl（5.0g））；（2）2mLの1MのMgSO<sub>4</sub>（滅菌）；（3）20mLの20%（重量/体積）グルコース（又は他の炭素源）；及び（4）100μLの1MのCaCl<sub>2</sub>（滅菌）を含有する。TM3最少培地は、1Lにつき（1）13.6gのK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>；（2）13.6gのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>；（3）2gのMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O；（4）2gのクエン酸一水和物；（5）0.3gのクエン酸鉄アンモニウム；（6）3.2gの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>；（7）0.2gの酵母エキス；及び（8）1mLの1000X微量元素溶液を含有す  
40  
50

る。pHは約6.8に調整し、溶液はろ過滅菌する。1000X微量元素は、(1)40gのクエン酸一水和物；(2)30gのMnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O；(3)10gのNaCl；(4)1gのFeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O；(4)1gのCoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O；(5)1gのZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O；(6)100mgのCuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O；(7)100mgのH<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>；及び(8)100mgのNaMoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>Oを含有する。pHは約3.0に調節する。

#### 【0089】

その他の最小培地の例は、(1)リン酸カリウムK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、(2)硫酸マグネシウムMgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O、(3)クエン酸一水和物C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>\*H<sub>2</sub>O、(4)クエン酸鉄アンモニウムNH<sub>4</sub>FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>、(5)酵母エキス(biospringer)、(6)1000X改变微量金属溶液、(7)硫酸50%（重量/体積）、(8)formblast 882(Emerald Performance Materials)及び(9)微量塩溶液を3.36mL含有する。成分のすべてを一緒に加え、脱イオン水に溶解させ、次に加熱滅菌する。続いて室温に冷却し、水酸化アンモニウム(28%)によりpHを7.0に調節し、用量に調整する。滅菌後にビタミン溶液及びスペクチノマイシンを加え、pHを調整する。

#### 【0090】

宿主細胞を培養するにあたり任意の炭素源を使用することができる。用語「炭素源」は、宿主細胞又は微生物により代謝させることのできる、1つ以上の炭素を含有している化合物を指す。例えば、宿主細胞を培養するにあたり使用される細胞培地には、宿主細胞の生存能を維持させる又は宿主細胞を増殖させるのに好適な任意の炭素源を包含させることができる。一部の態様では、炭素源は炭水化物（例えば、单糖、二糖、オリゴ糖、又は多糖など）、又は転化糖（例えば、酵素により処理したスクロースシロップ）である。

#### 【0091】

一部の態様では、炭素源としては、酵母エキス又は酵母エキスの1つ以上の成分が挙げられる。一部の態様では、酵母エキスの濃度は、酵母エキスの0.1%（重量/体積）、0.09%（重量/体積）、0.08%（重量/体積）、0.07%（重量/体積）、0.06%（重量/体積）、0.05%（重量/体積）、0.04%（重量/体積）、0.03%（重量/体積）、0.02%（重量/体積）、又は0.01%（重量/体積）である。一部の態様では、炭素源には、酵母エキス（又は酵母エキスの1つ以上の成分）及び他の炭素源、例えばグルコースの両方を含む。

#### 【0092】

单糖の例としては、グルコース及びフルクトースが挙げられ、オリゴ糖の一例としては、ラクトース及びスクロースが挙げられ、並びに多糖の例としては、デンプン及びセルロースが挙げられる。炭水化物の例としては、C<sub>6</sub>糖（例えば、フルクトース、マンノース、ガラクトース、又はグルコース）及びC<sub>5</sub>糖（例えば、キシロース又はアラビノース）が挙げられる。

#### 【0093】

##### 細胞培養条件例

本発明の組み換え細胞を維持し及び生育させるのに好適な材料及び方法は、以下、例えば、実施例の節に記載される。細胞（例えば、細菌）培養物の維持及び生育に好適な他の材料及び方法は当該技術分野において周知である。例示的な手法としては、国際公開第2009/076676号、米国特許出願第12/335,071号（米国特許出願公開第2009/0203102号）、国際公開第2010/003007号、米国特許出願公開第2010/0048964号、国際公開第2009/132220号、米国特許出願公開第2010/0003716号、Gerhardt et al.（編の一般細菌学に関する手法についてのマニュアル）、American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1994)又はBrock in Biotechnology: テキスト「工業微生物学(Industrial Microbiology)」第2版(1989)Sinauer Associates, Inc. (Su

10

20

30

40

50

nderland, MA) が挙げられる。一部の態様では、細胞は、宿主細胞に挿入する核酸にコードされた、mvaE、mvaSイソプレン合成酵素、DXP経路(例えば、DXS)、IDI、MVA経路又はPGL、のポリペプチドのうちの、1種以上を発現させる条件下で、培地内で培養される。

#### 【0094】

細胞を培養するにあたり、標準的な細胞培養条件を使用することができる(例えば、国際公開第2004/033646号及び該当特許中に引用される参考文献を参照されたい)。一部の態様では、細胞は適切な温度、気体混合物、及びpH(例えば、約20～約37、約6%～約84%のCO<sub>2</sub>、及び約5～約9のpH)にて増殖及び維持される。一部の態様では、細胞は適切な細胞培地内で35で増殖する。一部の態様では、発酵の際のpH範囲は約pH 5.0～約pH 9.0(例えば、約pH 6.0～約pH 8.0、又は約6.5～約7.0)である。細胞は、宿主細胞に必要とされる条件に基づき、好気性、無酸素性、又は嫌気性条件下で生育させることができる。加えて、細胞を培養するにあたり、より特異的な細胞培養条件を使用することができる。例えば一部の実施形態では、細胞(例えば、大腸菌(*E. coli*)細胞などの細菌細胞)は、34下で、*L.グレイ*(*L. grayi*)、*E. フエシウム*(*E. faecium*)、*E. ガリナラム*(*E. gallinarum*)及び/又は*E. カセリフラブス*(*E. casseliflavus*)由来のmvaE及びmvaSポリペプチドなどをコードしている1つ以上の異種核酸を、高発現型プロモータの調節下の低～中間コピー数のプラスミドにより発現する。

#### 【0095】

使用することのできる標準的な培養条件、並びに回分式、流加式、又は連続式発酵などの発酵様式は、国際公開第2009/076676号、米国特許出願第12/335,071号(米国特許出願公開第2009/0203102号)、国際公開第2010/003007号、米国特許出願公開第2010/0048964号、国際公開第2009/132220号、米国特許出願公開第2010/0003716号に記載されている(これらの特許文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。回分式発酵及び流加式発酵は一般的かつ当該技術分野では周知のものであり、その例は、Brock, Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Second Edition (1989) Sinauer Associates, Inc. に見ることができる。

#### 【0096】

一部の態様では、細胞はグルコース制限条件下で培養される。「グルコース制限条件」は、添加されるグルコースの量が、細胞により消費されるグルコース量の約105%以下(例えば、約100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、又は10%)であることを意味する。特定の態様では、培養培地に添加されるグルコース量は、特定の期間中に細胞により消費されるグルコース量とほぼ同様である。一部の態様では、細胞の増殖速度は、細胞培地中のグルコースの量により維持することのできる速度で細胞が増殖するよう、添加するグルコース量を制限することで制御される。一部の態様では、グルコースは細胞培養時に蓄積しない。様々な態様で、細胞はグルコース制限条件下で、約1、2、3、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、又は70時間以上培養される。様々な態様で、細胞は、細胞を培養する合計時間の長さの約5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、95又は100%以上の時間にわたって、グルコース制限条件下で培養される。任意の特定の理論に束縛されることを意図するものではないが、グルコース制限条件は、細胞をより都合よく制御し得るものであると考えられる。

#### 【0097】

一部の態様では、細胞(細菌細胞など)は回分式培養で生育させる。細胞(細菌細胞など)は、流加式培養又は連続式培養により生育させることもできる。加えて、細胞(細菌細胞など)は、限定するものではないが、上記のいずれかの最少培地などの最少培地で培養することができる。最少培地には、更に1.0%(重量/体積)グルコース又は任意の

10

20

30

40

50

他の 6 単糖以下の糖などを添加してもよい。具体的には、最少培地には 1 % (重量 / 体積)、0.9 % (重量 / 体積)、0.8 % (重量 / 体積)、0.7 % (重量 / 体積)、0.6 % (重量 / 体積)、0.5 % (重量 / 体積)、0.4 % (重量 / 体積)、0.3 % (重量 / 体積)、0.2 % (重量 / 体積)、又は 0.1 % (重量 / 体積) のグルコースが添加される。加えて、最少培地には 0.1 % (重量 / 体積) 以下の酵母エキスを添加してもよい。具体的には、最少培地には 0.1 % (重量 / 体積)、0.09 % (重量 / 体積)、0.08 % (重量 / 体積)、0.07 % (重量 / 体積)、0.06 % (重量 / 体積)、0.05 % (重量 / 体積)、0.04 % (重量 / 体積)、0.03 % (重量 / 体積)、0.02 % (重量 / 体積) 又は 0.01 % (重量 / 体積) の酵母エキスを添加してもよい。あるいは、最少培地には 1 % (重量 / 体積)、0.9 % (重量 / 体積)、0.8 % (重量 / 体積)、0.7 % (重量 / 体積)、0.6 % (重量 / 体積)、0.5 % (重量 / 体積)、0.4 % (重量 / 体積)、0.3 % (重量 / 体積)、0.2 % (重量 / 体積) 又は 0.1 % (重量 / 体積) のグルコース及び 0.1 % (重量 / 体積)、0.09 % (重量 / 体積)、0.08 % (重量 / 体積)、0.07 % (重量 / 体積)、0.06 % (重量 / 体積)、0.05 % (重量 / 体積)、0.04 % (重量 / 体積)、0.03 % (重量 / 体積)、0.02 % (重量 / 体積) 又は 0.01 % (重量 / 体積) の酵母エキスを添加してもよい。  
10

#### 【0098】

イソプレノイド前駆体（例えば、メバロン酸）の生産量を増大させることのできる組み換え細胞（細菌細胞など）

本明細書に記載の組み換え細胞（細菌細胞など）は、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 及び / 又は *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている異種核酸の 1 つ以上のコピーを含まないことを除き同一の細胞を上回る濃度で、イソプレノイド前駆体（例えば、メバロン酸）を生産する能力を有する。一実施形態では、本明細書に記載の組み換え細胞（細菌細胞など）は、所望により最少培地で培養した場合に、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 及び / 又は *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている異種核酸の 1 つ以上のコピーを含まないことを除き同一の細胞を上回る濃度で、メバロン酸を生産する能力を有する。一部の場合では、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 及び / 又は *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸は、宿主細胞の染色体に組み込まれた異種核酸である。細胞（細菌細胞など）は、メバロン酸又はその他のイソプレノイド前駆体を約 85 mg / L / hr / OD 超で生産することができる。あるいは、細胞（細菌細胞など）は、約 30 mg / L / hr / OD、40 mg / L / hr / OD、50 mg / L / hr / OD、60 mg / L / hr / OD、70 mg / L / hr / OD、80 mg / L / hr / OD、90 mg / L / hr / OD、100 mg / L / hr / OD、110 mg / L / hr / OD、120 mg / L / hr / OD、130 mg / L / hr / OD、140 mg / L / hr / OD、150 mg / L / hr / OD、160 mg / L / hr / OD、170 mg / L / hr / OD、180 mg / L / hr / OD、190 mg / L / hr / OD 又は 200 mg / L / hr / OD 超で、並びに包括的にこれらの数値の間の任意の数値で、メバロン酸又はその他のイソプレノイド前駆体を生産することができる。  
30  
40

#### 【0099】

本明細書に記載の組み換え細胞（細菌細胞など）は、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 及び / 又は *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている異種核酸の 1 つ以上のコピーを含まないことを除き同一の細胞を上回る最大力価で、イソプレノイド前駆体（例えば、メバロン酸）を生産する。一実施形態では、本明細書に記載の組み換え細胞（細菌細胞など）は、所望により最少培地で培養した場合に、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 及び  
50

/ 又は E . カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている異種核酸の 1 つ以上のコピーを含まないことを除き同一の細胞を上回る最大力価で、メバロン酸を生産する。細胞(細菌細胞など)は、発酵開始から 48 時間に後、約 105 g / L の最大力価でメバロン酸(又はその他のイソプレノイド前駆体)を生産することができる。あるいは、細胞(細菌細胞など)は、発酵開始から 48 時間に後に、約 50 g / L、60 g / L、70 g / L、80 g / L、90 g / L、100 g / L、110 g / L、120 g / L、130 g / L、140 g / L、150 g / L、160 g / L、170 g / L、180 g / L、190 g / L、200 g / L、210 g / L、220 g / L、230 g / L、240 g / L、250 g / L、260 g / L、270 g / L、280 g / L、290 g / L、300 g / L 超の最大力価で、並びに包括的にこれらの数値の間の任意の数値の最大力価でメバロン酸(又はその他のイソプレノイド前駆体)を生産することができる。

10

## 【0100】

本明細書に記載の組み換え細胞(細菌細胞など)は、*L. grayi* (*L. grayi*)、*E. faecium* (*E. faecium*)、*E. gallinarum* (*E. gallinarum*) 及び / 又は *E. casseliflavus* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている異種核酸の 1 つ以上のコピーを含まないことを除き同一の細胞を上回る細胞生産性指数(CPI)を有する。本明細書に記載の組み換え細胞(細菌細胞など)は、所望により最少培地で培養した場合に、*L. grayi* (*L. grayi*)、*E. faecium* (*E. faecium*)、*E. gallinarum* (*E. gallinarum*) 及び / 又は *E. casseliflavus* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている異種核酸の 1 つ以上のコピーを含まないことを除き同一の細胞を上回る細胞生産性指数(CPI)を有する。細胞(細菌細胞など)は、メバロン酸(又はその他のイソプレノイド前駆体)に関し少なくとも約 4.5 (g / g) の CPI を有し得る。あるいは、細胞(細菌細胞など)は、メバロン酸(又はその他のイソプレノイド前駆体)に関し少なくとも約 1 (g / g)、2 (g / g)、3 (g / g)、4 (g / g)、5 (g / g)、6 (g / g)、7 (g / g)、8 (g / g)、9 (g / g)、10 (g / g)、11 (g / g)、12 (g / g)、13 (g / g)、14 (g / g)、15 (g / g)、20 (g / g)、25 (g / g) 又は 30 (g / g) の CPI 並びに包括的にこれらの数値の間の任意の数値の CPI を有し得る。

20

## 【0101】

本明細書に記載の組み換え細胞(細菌細胞など)の、グルコースからのイソプレノイド前駆体(例えば、メバロン酸)の質量収率は、*L. grayi* (*L. grayi*)、*E. faecium* (*E. faecium*)、*E. gallinarum* (*E. gallinarum*) 及び / 又は *E. casseliflavus* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている異種核酸の 1 つ以上のコピーを含まないことを除き同一の細胞の質量収率を上回る。一実施形態では、本明細書に記載の組み換え細胞(細菌細胞など)の、グルコースからのメバロン酸の質量収率は、所望により最少培地で培養した場合に、*L. grayi* (*L. grayi*)、*E. faecium* (*E. faecium*)、*E. gallinarum* (*E. gallinarum*) 及び / 又は *E. casseliflavus* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている異種核酸の 1 つ以上のコピーを含まないことを除き同一の細胞の質量収率を上回る。細胞(細菌細胞など)は、少なくとも約 38 % の質量収率で、グルコースからメバロン酸(又はその他のイソプレノイド前駆体)を生産することができる。あるいは、細胞(細菌細胞など)は、少なくとも約 25 %、26 %、27 %、28 %、29 %、30 %、31 %、32 %、33 %、34 %、35 %、36 %、37 %、38 %、39 %、40 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、47 %、48 %、49 %、50 % 又は 55 % 並びに包括的にこれらの数値の間の任意の数値の質量収率でグルコースからメバロン酸(又はその他のイソプレノイド前駆体)を生産できる。

40

## 【0102】

一部の態様では、本明細書に記載の細胞は、メバロン酸生産細胞である。一態様では、メバロン酸生産細胞は、メバロン酸を生産することのできる野生型細胞である。他の態様

50

では、メバロン酸生産細胞は、非天然のMVA経路上流のポリペプチドを1つ以上含有するよう遺伝子操作を施した、非天然に生じる細胞である。

#### 【0103】

組み換え細胞（細菌細胞など）を使用してイソプレノイド前駆体（例えば、メバロン酸）を多量に生産する方法

本明細書では、メバロン酸などのイソプレノイド前駆体の生産方法も提供する。一部の態様では、イソプレノイド前駆体の生産方法は、(a)イソプレノイド前駆体を生産することのできる組み換え細胞（本明細書に記載の任意の細菌細胞を含む）又はそれらの子孫細胞を含む組成物を培養する工程、並びに(b)イソプレノイド前駆体を生産させる工程、を含む。一部の態様では、イソプレノイド前駆体の生産方法は、イソプレノイド前駆体を生産させるのに好適な条件下で、本明細書に記載の任意の組み換え細胞を培養する工程、並びに組み換え細胞にイソプレノイド前駆体を生産させる工程、を含む。一部の態様では、イソプレノイド前駆体の生産方法は、イソプレノイド前駆体を回収する工程を更に含む。

10

#### 【0104】

一部の態様では、メバロン酸の生産方法は、(a)メバロン酸を生産することのできる組み換え細菌細胞（上記の任意の細菌細胞を含む）又はそれらの子孫細胞を含む組成物を培養する工程、並びに(b)メバロン酸を生産させる工程、を含む。一部の態様では、メバロン酸を生産させる方法は、メバロン酸の生産に好適な条件下で、本明細書に記載の任意の組み換え細胞を培養する工程、並びに組み換え細胞にメバロン酸を生産させる工程、を含む。一部の態様では、メバロン酸の生産方法は、メバロン酸を回収する工程を更に含む。

20

#### 【0105】

メバロン酸（又はその他のイソプレノイド前駆体）の生産方法には、(a)L.グレイ(*L. grayi*)、E.ファシウム(*E. faecium*)、E.ガリナラム(*E. gallinarum*)及び/又はE.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)由来のmvaE遺伝子及びmvaS遺伝子を内因的に有さない細胞（限定するものではないが、大腸菌(*E. coli*)細胞などの細菌細胞など）を、所望により最少培地で培養する工程、細胞は、L.グレイ(*L. grayi*)、E.ファシウム(*E. faecium*)、E.ガリナラム(*E. gallinarum*)又はE.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)由来のmvaEポリペプチド及びmvaSポリペプチドをコードしている遺伝子の1つ以上のコピーを異種発現する；並びに(b)メバロン酸（又はその他のイソプレノイド前駆体）を生産させる工程、を含ませることもできる。細胞（細菌細胞など）は、L.グレイ(*L. grayi*)、E.ファシウム(*E. faecium*)、E.ガリナラム(*E. gallinarum*)又はE.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)由来のmvaE及びmvaSポリペプチドなどをコードしている異種遺伝子の1つ以上のコピーを含まない同様の細胞よりも高濃度でメバロン酸（又はその他のイソプレノイド前駆体）を生産できる。一部の場合では、L.グレイ(*L. grayi*)、E.ファシウム(*E. faecium*)、E.ガリナラム(*E. gallinarum*)及び/又はE.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)由来のmvaE及びmvaSポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸は、宿主細胞の染色体に組み込まれた異種核酸である。

30

#### 【0106】

イソプレノイド前駆体の生産に関する本発明の方法では、約85mg/L/hr/OD超でイソプレノイド前駆体を生産することができる。あるいは、イソプレノイド前駆体は、約30mg/L/hr/OD、40mg/L/hr/OD、50mg/L/hr/OD、60mg/L/hr/OD、70mg/L/hr/OD、80mg/L/hr/OD、90mg/L/hr/OD、100mg/L/hr/OD、110mg/L/hr/OD、120mg/L/hr/OD、130mg/L/hr/OD、140mg/L/hr/OD、150mg/L/hr/OD、160mg/L/hr/OD、170mg/L/hr/OD、180mg/L/hr/OD、190mg/L/hr/OD又は200mg/L/hr/OD超の量で、並びに包括的にこれらの数値の間の任意の数値の量で、生産さ

40

50

せることができる。一部の態様では、イソプレノイド前駆体の生産方法は、イソプレノイド前駆体を回収する工程を更に含む。

#### 【0107】

メバロン酸の生産にあたり、本開示の方法では、約 85 mg / L / hr / OD 超でメバロン酸を生産できる。あるいは、メバロン酸は、約 30 mg / L / hr / OD、40 mg / L / hr / OD、50 mg / L / hr / OD、60 mg / L / hr / OD、70 mg / L / hr / OD、80 mg / L / hr / OD、90 mg / L / hr / OD、100 mg / L / hr / OD、110 mg / L / hr / OD、120 mg / L / hr / OD、130 mg / L / hr / OD、140 mg / L / hr / OD、150 mg / L / hr / OD、160 mg / L / hr / OD、170 mg / L / hr / OD、180 mg / L / hr / OD、190 mg / L / hr / OD 又は 200 mg / L / hr / OD 超のメバロン酸で、並びに包括的にこれらの数値の間の任意の数値で、生産させることができる。一部の態様では、メバロン酸の生産方法は、メバロン酸を回収する工程を更に含む。  
10

#### 【0108】

イソプレノイド前駆体の生産方法には、次の工程 (a) 並びに (b) を包含させることができ : (a) L. グレイ (L. grayi)、E. ファシウム (E. faecium)、E. ガリナラム (E. gallinarum) 及び / 又は E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を内因的に有していない細胞 (限定するものではないが、大腸菌 (E. coli) 細胞などの細菌細胞など) を培養する工程、細胞 (細菌細胞など) は、L. グレイ (L. grayi)、E. ファシウム (E. faecium)、E. ガリナラム (E. gallinarum) 又は E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE ポリペプチド及び mvaS ポリペプチドをコードしている遺伝子の 1 つ以上のコピーを異種発現している、並びに (b) イソプレノイド前駆体を生産させる工程、細胞 (細菌細胞など) は、発酵開始から 48 時間後に、L. グレイ (L. grayi)、E. ファシウム (E. faecium)、E. ガリナラム (E. gallinarum) 又は E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE ポリペプチド及び mvaS ポリペプチドをコードしている異種遺伝子の 1 つ以上のコピーを含まない同一の細胞を上回る最大力価で、イソプレノイド前駆体を生産する。所望により、上記の細胞は最少培地で培養する。  
20

#### 【0109】

イソプレノイド前駆体の生産に関する本発明の方法では、発酵開始から 48 時間後に、約 105 g / L 超のピーク力価でイソプレノイド前駆体を生産することができる。あるいは、細胞 (細菌細胞など) は、発酵開始から 48 時間後に、約 50 g / L、60 g / L、70 g / L、80 g / L、90 g / L、100 g / L、110 g / L、120 g / L、130 g / L、140 g / L、150 g / L、160 g / L、170 g / L、180 g / L、190 g / L 又は 200 g / L 超の最大力価で、並びに包括的にこれらの数値の間の任意の数値の最大力価でイソプレノイド前駆体を生産させることができる。一部の態様では、イソプレノイド前駆体の生産方法は、イソプレノイド前駆体を回収する工程、を更に含む。  
30

#### 【0110】

メバロン酸の生産方法には、同様に、次の工程 (a) 並びに (b) を包含させることができる : (a) L. グレイ (L. grayi)、E. ファシウム (E. faecium)、E. ガリナラム (E. gallinarum) 及び / 又は E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を内因的に有さない細胞 (限定するものではないが、大腸菌 (E. coli) 細胞などの細菌細胞など) を、所望により最少培地で培養する工程、細胞 (細菌細胞など) は、L. グレイ (L. grayi)、E. ファシウム (E. faecium)、E. ガリナラム (E. gallinarum) 又は E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE ポリペプチド及び mvaS ポリペプチドをコードしている遺伝子の 1 つ以上のコピーを異種発現する、並びに (b) メバロン酸を生産させる工程、細胞 (細菌細胞など) は、細胞を最少培地で培養した場合に、L. グレイ (L. grayi)、E. ファシウム (E. faecium)、E. ガリナラム (E. gallinarum) 又は E. カッセリファバス (E. casseliflavus)  
40  
50

) mvaE ポリペプチド及び mvaS ポリペプチドをコードしている遺伝子の 1 つ以上の異種コピーを含まない同一の細胞を上回る最大力値で、メバロン酸を生産する。

#### 【0111】

メバロン酸生産にあたり、本開示の方法では、発酵開始後 48 時間で約 105 g/L を超えるピーク力値でメバロン酸を生産することができる。あるいは、細胞（細菌細胞など）は、48 時間の発酵後に、約 50 g/L、60 g/L、70 g/L、80 g/L、90 g/L、100 g/L、110 g/L、120 g/L、130 g/L、140 g/L、150 g/L、160 g/L、170 g/L、180 g/L、190 g/L 又は 200 g/L 超のピーク力値で、並びに包括的にこれらの数値の間の任意の数値のピーク力値で、メバロン酸を生産し得る。一部の態様では、メバロン酸の生産方法は、メバロン酸を回収する工程を更に含む。10

#### 【0112】

イソプレノイド前駆体の生産方法には、次の工程 (a) 並びに (b) を包含させることができるもの：(a) L. グレイ (L. grayi)、E. ファシウム (E. faecium)、E. ガリナラム (E. gallinarum) 及び / 又は E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を内因的に有していない細胞（限定するものではないが、大腸菌 (E. coli) 細胞などの細菌細胞など）を培養する工程、細胞（細菌細胞など）は、L. グレイ (L. grayi)、E. ファシウム (E. faecium)、E. ガリナラム (E. gallinarum) 又は E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE ポリペプチド及び mvaS ポリペプチドをコードしている遺伝子の 1 つ以上のコピーを異種発現する、並びに (b) イソプレノイド前駆体を生産させる工程、細胞（細菌細胞など）は、L. グレイ (L. grayi)、E. ファシウム (E. faecium)、E. ガリナラム (E. gallinarum) 又は E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE ポリペプチド及び mvaS ポリペプチドをコードしている遺伝子の 1 つ以上の異種コピーを含まない同一の細胞を上回る CPI を、イソプレノイド前駆体に関して有する。所望により、上記の細胞は最少培地で培養する。20

#### 【0113】

イソプレノイド前駆体の生産に関する本発明の方法では、イソプレノイド前駆体に関し少なくとも 4.5 (g/g) の CPI を有する細胞を使用してイソプレノイド前駆体を生産することができる。あるいは、細胞（細菌細胞など）は、少なくとも約 1 (g/g)、2 (g/g)、3 (g/g)、4 (g/g)、5 (g/g)、6 (g/g)、7 (g/g)、8 (g/g)、9 (g/g)、10 (g/g)、11 (g/g)、12 (g/g)、13 (g/g)、14 (g/g)、15 (g/g)、20 (g/g)、25 (g/g) 又は 30 (g/g) の CPI 並びに包括的にこれらの数値の間の任意の数値の CPI を有し得る。一部の態様では、イソプレノイド前駆体の生産方法は、イソプレノイド前駆体を回収する工程を更に含む。30

#### 【0114】

メバロン酸の生産方法には、同様に、次の工程 (a) 並びに (b) を包含させることができる：(a) L. グレイ (L. grayi)、E. ファシウム (E. faecium)、E. ガリナラム (E. gallinarum) 及び / 又は E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を内因的に有さない細胞（限定するものではないが、大腸菌 (E. coli) 細胞などの細菌細胞など）を培養する工程、細胞（細菌細胞など）は、L. グレイ (L. grayi)、E. ファシウム (E. faecium)、E. ガリナラム (E. gallinarum) 又は E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaE ポリペプチド及び mvaS ポリペプチドをコードしている遺伝子の 1 つ以上のコピーを異種発現する；並びに (b) メバロン酸を生産させる工程、細胞（細菌細胞など）は、細胞を最少培地で培養した場合に、L. グレイ (L. grayi)、E. ファシウム (E. faecium)、E. ガリナラム (E. gallinarum) 又は E. カッセリファバス (E. casseliflavus) mvaE ポリペプチド及び mvaS ポリペプチドをコードしている遺伝子の 1 つ以上の異種コピーを含まない同一の細胞を上回る CPI を、メバロン酸に関して有する。4050

## 【0115】

メバロン酸生産に関する本方法は、メバロン酸のCPIが少なくとも4.5(g/g)である細胞を使用することによりメバロン酸を生産することができる。あるいは、細胞(細菌細胞など)は、少なくとも約1(g/g)、2(g/g)、3(g/g)、4(g/g)、5(g/g)、6(g/g)、7(g/g)、8(g/g)、9(g/g)、10(g/g)、11(g/g)、12(g/g)、13(g/g)、14(g/g)、15(g/g)、20(g/g)、25(g/g)又は30(g/g)のCPI並びに包括的にこれらの数値の間の任意の数値のCPIを有し得る。一部の態様では、メバロン酸の生産方法は、メバロン酸を回収する工程を更に含む。

## 【0116】

本明細書では、メバロン酸生産量及び/又はその他のイソプレノイド前駆体の生産量が増大している上記の任意の細胞を使用する方法が提供される。細胞によるメバロン酸(又はその他のイソプレノイド前駆体)の生産量は、*L. grayi*(*L. grayi*)、*E. faecium*(*E. faecium*)、*E. gallinarum*(*E. gallinarum*)及び/又は*E. casseliflavus*(*E. casseliflavus*)由来のmvaE及びmvaSポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を発現させることにより増大させることができる。メバロン酸(又はその他のイソプレノイド前駆体)の生産量は、*L. grayi*(*L. grayi*)、*E. faecium*(*E. faecium*)、*E. gallinarum*(*E. gallinarum*)及び/又は*E. casseliflavus*(*E. casseliflavus*)由来のmvaE及びmvaSポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を発現していない細胞によるメバロン酸(又はその他のイソプレノイド前駆体)の生産量と比較して、約1,000,000倍(例えば、約1~約500,000倍、約1~約50,000倍、約1~約5,000倍、約1~約1,000倍、約1~約500倍、約1~約100倍、約1~約50倍、約5~約100倍、約5~約10,000倍、約5~約1,000倍、約5~約100倍、約5~約1,000倍、約5~約500倍、約5~約100倍、約5~約10,000倍、約5~約500倍又は約50~約10,000倍)に増大させることができる。

10

20

30

40

## 【0117】

本開示の任意の方法による、細胞によるメバロン酸(又はその他のイソプレノイド前駆体)生産量は増大させることができる(例えば、*L. grayi*(*L. grayi*)、*E. faecium*(*E. faecium*)、*E. gallinarum*(*E. gallinarum*)及び/又は*E. casseliflavus*(*E. casseliflavus*)mvaE及びmvaSポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を発現させることにより増大させることができる)。メバロン酸(又はその他のイソプレノイド前駆体)の生産量は、天然に生じる細胞(例えば、*L. grayi*(*L. grayi*)、*E. faecium*(*E. faecium*)、*E. gallinarum*(*E. gallinarum*)及び/又は*E. casseliflavus*(*E. casseliflavus*)由来のmvaE及びmvaSポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を発現していない細胞)によるメバロン酸(又はその他のイソプレノイド前駆体)生産量と比較して、約1,000,000倍(例えば、約1~約500,000倍、約1~約50,000倍、約1~約5,000倍、約1~約1,000倍、約1~約500倍、約1~約100倍、約1~約50倍、約5~約100倍、約5~約10,000倍、約5~約500倍、約5~約100倍、約5~約1,000倍、約5~約500倍、約5~約100倍、約5~約10,000倍、約5~約500倍又は約50~約10,000倍)に増大させることができる。

40

## 【0118】

メバロン酸(又はその他のイソプレノイド前駆体)の生産量は、天然に生じる細胞による、すなわち*L. grayi*(*L. grayi*)、*E. faecium*(*E. faecium*)、*E. gallinarum*(*E. gallinarum*)及び/又は*E. casseliflavus*(*E. casseliflavus*)由来のmvaE及びmvaSポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を発現していない細胞によるメバロン酸(又はその他のイソプレノイド前駆体)の生産量と比較して、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%

50

、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍、10,000倍、20,000倍、50,000倍、100,000倍、200,000倍、500,000倍、又は1,000,000倍のいずれかだけ増大させることもできる。

#### 【0119】

加えて、より具体的な細胞培養条件を使用して、本明細書に記載の方法により細胞を培養することができる。例えば、一部の態様では、メバロン酸の生産方法は、次の工程(a)並びに(b)を包含する；(a)L.グレイ(*L. grayi*)、E.ファシウム(*E. faecium*)、E.ガリナラム(*E. gallinarum*)及び/又はE.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)由来のmvaE遺伝子及びmvaS遺伝子を内因的に有さない細胞を、34下最少培地で培養する工程(限定するものではないが、大腸菌(*E. coli*)細胞などの細菌細胞など)、細胞(細菌細胞など)は、L.グレイ(*L. grayi*)、E.ファシウム(*E. faecium*)、E.ガリナラム(*E. gallinarum*)又はE.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)由来のmvaEポリペプチド及びmvaSポリペプチドをコードしている遺伝子の1つ以上のコピーを、低～中間コピー数のプラスミドにおいて高発現型プロモータの調節下で発現する、並びに(b)メバロン酸を生産させる工程。一部の態様では、メバロン酸の生産方法は、メバロン酸を回収する工程を更に含む。他の態様では、イソプレノイド前駆体の生産方法は、次の工程(a)並びに(b)を包含する；(a)L.グレイ(*L. grayi*)、E.ファシウム(*E. faecium*)、E.ガリナラム(*E. gallinarum*)及び/又はE.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)由来のmvaE遺伝子及びmvaS遺伝子を内因的に有さない細胞(限定するものではないが、大腸菌(*E. coli*)細胞などの細菌細胞など)を、34下で、最小培地で培養する工程、細胞(細菌細胞など)は、L.グレイ(*L. grayi*)、E.ファシウム(*E. faecium*)、E.ガリナラム(*E. gallinarum*)又はE.カッセリファバス(*E. casseliflavus*)由来のmvaEポリペプチド及びmvaSポリペプチドの1つ以上のコピーを、低～中間コピー数のプラスミドにおいて高発現型プロモータの調節下で異種発現する、並びに(b)イソプレノイド前駆体を生産させる工程。一部の態様では、イソプレノイド前駆体の生産方法は、イソプレノイド前駆体を回収する工程を更に含む。  
10  
20

#### 【0120】

イソプレンの生産性を向上させることのできる組み換え細胞(細菌細胞など)  
30  
イソプレン(2-メチル-1,3-ブタジエン)は、多様な用途で使用される重要な有機化合物である。例えば、イソプレンは、合成ゴムの製造時など、数多くの化学組成物及びポリマーの合成時に、中間体又は出発物質として使用される。イソプレンはまた、多くの植物及び動物により天然に合成される重要な生体物質もある。

#### 【0121】

イソプレンは、イソプレンシンターゼの触媒作用によりD M A P Pから製造される。したがって、理論に束縛されるものではないが、上記の任意の組成物及び方法により、細胞(細菌細胞など)において、イソプレノイド前駆体の生産(cellular production)を増大させることは、より多量のイソプレンを生産させるのと同様であると考えられる。グルコースからのイソプレノイド前駆体生産量のモル収率を増大させ、適切な酵素活性濃度で、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ並びにイソプレン及びイソプレノイド生産に好適な他の酵素と組み合わせると、イソプレンのモル収率の増大につながる。理論に束縛されるものではないが、上記の任意の組成物及び方法により、細胞(細菌細胞など)におけるメバロン酸生産を増大させることは、より多量のイソプレンを生産させるのと同様であると考えられる。グルコースからのメバロン酸生産量のモル収率を上昇させ、適切な酵素活性濃度で、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ並びにイソプレン及びイソプレノイド生産に好適な他の酵素と組み合わせると、イソプレノイド前駆体及びイソプレノイド(イソプレンを含む)のモル収率の上昇につながる。  
40  
50

## 【0122】

メバロン酸又は上記のその他のイソプレノイド前駆体の生産量を増大させることのできる L. グレイ (L. grayi) 、 E. ファシウム (E. faecium) 、 E. ガリナラム (E. gallinarum) 又は E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の mvaS 及び mvaS ポリペプチドをコードしている異種核酸の 1 つ以上のコピーを発現している任意の宿主細胞には、イソプレンの生産量を増加させることもできる。一部の態様では、これらの細胞は、 MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、及びイソプレンシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸を更に含む。一部の態様では、これらの細胞は、 MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸、及びイソプレン合成酵素ポリペプチドをコードしている異種核酸を更に含む。

10

## 【0123】

一部の態様では、本明細書に記載の細胞は、イソプレン生産細胞である。一態様では、イソプレン生産細胞は、イソプレンを生産することのできる野生型細胞である。他の態様では、イソプレン生産細胞は、非天然に生じる細胞であり、異種の、 MVA 経路上流のポリペプチド、 MVA 経路下流の異種ポリペプチド、イソプレン合成酵素ポリペプチド、 DXP 経路の異種ポリペプチド、及び / 又は IDI ポリペプチドのうちの 1 つ以上を含有するよう遺伝子操作を施されている。更なる態様では、イソプレン生産細胞は、内在性及び異種性の、 MVA 経路上流のポリペプチド、 MVA 経路下流のポリペプチド、イソプレン合成酵素ポリペプチド、 DXP 経路のポリペプチド、及び / 又は IDI ポリペプチドを両方含有するよう遺伝子操作を施されている。

20

## 【0124】

## MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている核酸

本発明の一部の態様では、本明細書に記載の組成物又は方法の任意のものに記載の細胞は、メバロン酸 (MVA) 経路下流のポリペプチドをコードしている核酸を 1 つ以上更に含む。一部の態様では、 MVA 経路下流のポリペプチドは内在性ポリペプチドである。一部の態様では、 MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように常時発現型プロモータに連結される。一部の態様では、 MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように誘導型プロモータに連結される。一部の態様では、 MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように高発現型プロモータに連結される。特定の態様では、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性 MVA 経路下流のポリペプチドが過剰発現するよう設計する。一部の態様では、 MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように低発現型プロモータに連結される。

30

## 【0125】

メバロン酸生合成経路の下流は、メバロン酸キナーゼ (MVK) 、ホスホメバロン酸キナーゼ (PMK) 及びジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (MVD) を含む。一部の態様では、 MVA 経路の下流は、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ (IDI) を更に含む。本明細書に提供される細胞は、イソプレンシンターゼ、 MVA 経路上流の 1 種以上のポリペプチド及び / 又は MVA 経路下流の 1 種以上のポリペプチドをコードしている核酸を含み得る。 MVA 経路下流のポリペプチドは、 (a) メバロン酸を 5 - ホスホメバロン酸へとリン酸化する酵素、 (b) 5 - ホスホメバロン酸を 5 - ジホスホメバロン酸へと変換する酵素、 (c) 5 - ジホスホメバロン酸をイソペンテニルピロリン酸へと変換する酵素、のうちの任意の酵素であり得る。より詳細には、メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素は、 M. マゼイ (M. mazei) ・メバロン酸キナーゼ、ラクトバチルス (Lactobacillus) ・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ (Lactobacillus sakei) ・メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母・メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロマイセス・セレヴィシエ (Saccharomyces cerevisiae) ・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス (Streptococcus) ・メバロン酸キナーゼポリペプチド、メタノコッカシド (Methanococcoides) ・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニアエ (Streptococcus pneumoniae) ・メバロン酸キ

40

50

ナーゼポリペプチド、ストレプトマイセス (*Streptomyces*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、及びストレプトマイセス CL 190 (*Streptomyces CL190*)・メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群のものであってよい。他の態様では、メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素は M . マゼイ (*M. mazei*)・メバロン酸キナーゼである。

#### 【 0 1 2 6 】

一部の態様では、MVA 経路下流のポリペプチドは異種ポリペプチドである。一部の態様では、細胞は、MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている異種核酸のコピーを 1 つ以上含む。一部の態様では、MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように常時発現型プロモータに連結される。一部の態様では、MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように誘導型プロモータに連結される。一部の態様では、MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように高発現型プロモータに連結される。一部の態様では、MVA 経路下流のポリペプチドは、サッカロマイセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、メタノコッカシド・バートニイ (*Methanococcoides burtonii*) 又はメタノサルシナ・マゼイ (*Methanosarcina mazei*) 由来のポリペプチドである。一部の態様では、MVA 経路下流の異種ポリペプチドは、M . バートニイ (*M. burtonii*) 由来のメバロン酸キナーゼである。

10

20

30

40

50

#### 【 0 1 2 7 】

MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている核酸は、細胞のゲノムに組み込むことができ、あるいは細胞で安定的に発現させることができる。MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている核酸は更に、ベクター上に存在させてもよい。

#### 【 0 1 2 8 】

MVA 経路下流のポリペプチドの例としては、次の ( i ) メバロン酸キナーゼ ( MVK ) ; ( i i ) ホスホメバロン酸キナーゼ ( PMK ) ; ( i i i ) ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ ( MVD ) ; 及び ( i v ) イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ ( IDI ) も挙げられる。詳細には、下流の MVK ポリペプチドは、メタノサルシナ (*Methanosarcina*) 属由来のものであってよく、更に詳細には、下流の MVK ポリペプチドは、メタノサルシナ・マゼイ (*Methanosarcina mazei*) 由来のものであってよい。MVA 経路下流のポリペプチドのその他の例は、米国特許出願公開第 2010 / 0086978 号に見出すことができ、この内容は、MVK 経路下流のポリペプチド及び MVK 経路下流のポリペプチド変異体に關し参照によりその全文が明示的に本明細書に組み込まれる。

#### 【 0 1 2 9 】

本明細書に記載の細胞のうち任意のものは、IDI 核酸 ( 例えば、IDI をコードしている内在性又は異種核酸 ) を含み得る。イソペンテニルジホスフェートイソメラーゼポリペプチド ( イソペンテニル - ジホスフェート - イソメラーゼ又は IDI ) は、イソペンテニルジホスフェート ( IPP ) 及びジメチルアリルニリン酸 ( DMAPP ) の相互変換を触媒する ( 例えば、IPP を DMAPP へと変換し及び / 又は DMAPP を IPP へと変換する )。IDI ポリペプチドの例としては、IDI ポリペプチドの活性を少なくとも 1 つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、及び融合ポリペプチドが挙げられる。標準法 ( 本明細書に記載されるものなど ) を用い、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビオでポリペプチドが IPP 及び DMAPP を相互変換する能力を測定することで、ポリペプチドが IDI ポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。IDI 核酸の例としては、IDI ポリペプチド活性を少なくとも 1 つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又はポリペプチド融合物をコードしている核酸が挙げられる。IDI ポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。

## 【0130】

特に、MVA経路下流のポリペプチドとしては、MVA経路下流のポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド及び融合ポリペプチドが挙げられる。MVA経路下流の核酸の例としては、MVA経路下流のポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又は融合ポリペプチドをコードしている核酸が挙げられる。MVA経路下流のポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載されるような任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸が挙げられる。更に、イソブレンの生産量を増加させるような、MVA経路下流のポリペプチド変異体も、良好に使用することができる。

## 【0131】

一部の態様では、MVA経路下流のポリペプチドは、サッカロマイセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) 又はメタノサルシナ・マゼイ (*Methanosaeca mazae*) 由来のポリペプチドである。一部の態様では、MVKポリペプチドは、ラクトバチルス (*Lactobacillus*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ (*Lactobacillus sakei*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母・メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロマイセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニアエ (*Streptococcus pneumoniae*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトマイセス CL190 (*Streptomyces CL190*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド及びメタノサルシナ・マゼイ (*Methanosaeca mazae*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、からなる群から選択される。本開示のプロモータのうちのいずれか(例えば、本開示に記載され、本開示の実施例において識別される、誘導型プロモータ及び常時発現型プロモータなどのプロモータ)を使用して、本開示のいずれかのMVAポリペプチドの発現を駆動させることができる。

## 【0132】

## イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている核酸

本発明の一部の態様では、本明細書に記載の任意の組成物又は方法に記載の細胞は、イソブレン合成酵素ポリペプチド又はイソブレン合成酵素活性を有するポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸を更に含む。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは内在性ポリペプチドである。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、常時発現型プロモータに調節可能なように連結される。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、誘導型プロモータに調節可能なように連結される。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、高発現型プロモータに調節可能なように連結される。特定の態様では、細胞は、野生型細胞と比較して、経路の内在性イソブレンシンターゼポリペプチドを過剰発現するよう遺伝子操作する。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、低発現型プロモータに調節可能なように連結される。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、クズ属 (*Pueraria*) 又はハコヤナギ属 (*Populus*)、又はウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) × ヤマナラシ (*Populus tremula*) などの交雑種由来のポリペプチドである。

## 【0133】

一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは異種ポリペプチドである。一部の態様では、細胞は、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸のコピーを1つ以上含む。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、常時発現型プロモータに調節可能なように連結される。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、誘導型プロモータに調節可能なように連結される。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、高発現型プロモータに調節可能なように連結される。一部の態

10

20

30

40

50

様では、イソプレンシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、低発現型プロモータに調節可能なように連結される。

#### 【0134】

イソプレンシンターゼポリペプチドをコードしている核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、あるいは細胞で安定的に発現させることができる。イソプレンシンターゼポリペプチドをコードしている核酸は、更にベクターに組み込むこともできる。

#### 【0135】

イソプレンシンターゼの核酸の例としては、イソプレンシンターゼポリペプチドの活性を少なくとも1種有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又は融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。イソプレンシンターゼポリペプチドは、ジメチルアリールジホスフェート(DMAPP)をイソプレンに変換する。イソプレンシンターゼポリペプチドの例としては、イソプレンシンターゼポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、並びに融合ポリペプチドが挙げられる。イソプレンシンターゼポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載されるような任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸が挙げられる。加えて、イソプレンシンターゼ変異体は、酵素活性が向上しているなどして、活性が向上されていてよい。一部の態様では、イソプレンシンターゼ変異体は、安定性(例えば、熱安定性)が改良されている、及び/又は溶解性が改良されているなどして、その他の特性が改良されている。

10

#### 【0136】

インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボで、ポリペプチドがDMAPPをイソプレンへと変換する能力を測定して、ポリペプチドがイソプレンシンターゼポリペプチド活性を有するか否かを判定する際には、標準法を使用できる。細胞抽出物中のイソプレン合成酵素ポリペプチド活性は、例えば、Silver et al., J. Biol. Chem. 270: 13010~13016, 1995に記載のとおりに測定することができる。代表的なアッセイでは、DMAPP(Sigma)は窒素流下で濃縮させ、乾燥させ、100mMリン酸カリウム緩衝液(pH 8.2)を用い100mMに再水和し、-20で保存する。アッセイを実施するために、金属製スクリューキャップとテフロンコーティングのなされたシリコン製隔壁(Agilent Technologies)とを取り付けた20mLヘッドスペースバイアルに、5μLの1M MgCl<sub>2</sub>、1mM(250μg/mL)DMAPP、65μLの植物抽出緩衝液(PEB)(50mM Tris-HCl(pH 8.0)、20mM MgCl<sub>2</sub>、5%グリセロール、及び2mM DTT)を入れ、ここに細胞抽出物25μLを加え、振盪させながら37で15分間培養した。200μLの250mM EDTAを加えて反応をクエンチさせL、GC/MSにより定量することができる。

20

30

#### 【0137】

一部の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドは、植物のイソプレンシンターゼポリペプチド又はそれらの変異体である。一部の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドは、ブエラリア(Pueraria)に由来するイソプレンシンターゼ又はそれらの変異体である。一部の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドは、ハコヤナギ属(Populus)由来のイソプレンシンターゼ又はそれらの変異体である。一部の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドは、ポプラ(poplar)のイソプレンシンターゼポリペプチド又はそれらの変異体である。一部の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドはクズのイソプレンシンターゼポリペプチド又はそれらの変異体である。一部の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドは、クズ属(Pueraria)又はハコヤナギ属(Populus)、ウラジロハコヤナギ(Populus alba) × ヤマナラシ(Populus tremula)などの交雑種、又はこれらの変異体(variant)由来のポリペプチドである。

40

#### 【0138】

一部の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチド又は核酸は、マメ科、例えば、マメ亜科(Faboideae)由来のものである。特定の態様では、イソプレンシンターゼポリペ

50

10 プチド又は核酸は、プエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*) (クズ) (Sharke yet al.、Plant Physiology 137: 700~712, 2005)、プエラリア・ロバタ (*Pueraria lobata*)、ポプラ (ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*)、セイヨウハコヤナギ (*Populus nigra*)、コットンウッド (*Populus trichocarpa*)、又はウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) × トレムラ (*tremula*) (CAC 35696) Miller et al.、Planta 213: 483~487, 2001)、アスペン (aspen) (ヤマナラシなど) Silver et al., JBC 270 (22): 13010~1316, 1995)、又はヨーロッパナラ (*Quercus robur*) (Zimmer et al.、国際特許出願公開第98/02550号) に由来するポリペプチド又は核酸である。一部の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドは、プエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*)、プエラリア・ロバタ (*Pueraria lobata*)、ポプラ・トレムロイド (*Populus tremuloides*)、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*)、ポプラ・ニグラ (*Populus nigra*) 又はポプラ・トリコカルパ (*Populus trichocarpa*) 由来のイソプレンシンターゼ、又はこれらの変異体である。一部の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドは、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) 由来のイソプレンシンターゼであるか、又はこれらの変異体である。一部の態様では、イソプレンシンターゼ (例えば、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) 又はこれらの変異体由来のイソプレンシンターゼ) をコードしている核酸は、コドンを最適化されている。

## 【0139】

20 一部の態様では、イソプレンシンターゼ核酸又はポリペプチドは、天然に生じるポリペプチド又は核酸である (例えば、ハコヤナギ属 (*Populus*) から天然に生じるポリペプチド又は核酸)。一部の態様では、イソプレンシンターゼ核酸又はポリペプチドは、野生型又は天然に生じるポリペプチド又は核酸ではない。一部の態様では、イソプレンシンターゼ核酸又はポリペプチドは、野生型又は天然に生じるポリペプチド又は核酸の変異体である (例えば、ハコヤナギ属 (*Populus*) の野生型又は天然に生じるポリペプチド又は核酸の変異体)。

## 【0140】

30 一部の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドは変異体である。一部の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドは、野生型又は天然型イソプレンシンターゼの変異体である。一部の態様では、変異体は、野生型又は天然型イソプレンシンターゼと比較して、触媒活性が向上しているなど、活性が向上している。活性 (例えば、触媒活性) の向上は、少なくとも約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は 95% のうちのいずれかの程度であり得る。一部の態様では、触媒活性などの活性の向上は、少なくとも約 1 倍、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、75 倍、又は 100 倍のいずれかである。一部の態様では、触媒活性などの活性の向上は、約 10% ~ 約 100 倍である (例えば、約 20% ~ 約 100 倍、約 50% ~ 約 50 倍、約 1 倍 ~ 約 25 倍、約 2 倍 ~ 約 20 倍、又は約 5 倍 ~ 約 20 倍)。一部の態様では、変異体は、野生型又は天然型イソプレンシンターゼと比較して、可溶性が向上している。可溶性の向上は、少なくとも約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は 95% のうちのいずれかの程度であり得る。可溶性の向上は、少なくとも約 1 倍、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、75 倍、又は 100 倍のうちのいずれかの程度であり得る。一部の態様では、溶解性の向上は、約 10% ~ 約 100 倍のうちのいずれかの程度であり得る (例えば、約 20% ~ 約 100 倍、約 50% ~ 約 50 倍、約 1 倍 ~ 約 25 倍、約 2 倍 ~ 約 20 倍、又は約 5 倍 ~ 約 20 倍)。一部の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドは、天然型イソプレンシンターゼ変異体であり、かつ天然型イソプレンシンターゼと比較して、安定性が向上している (熱安定性など)。

## 【0141】

50 一部の態様では、変異体は、野生型又は天然型イソプレンシンターゼの活性の、少なくとも約 10%、少なくとも約 20%、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なく

とも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 1 0 0 %、少なくとも約 1 1 0 %、少なくとも約 1 2 0 %、少なくとも約 1 3 0 %、少なくとも約 1 4 0 %、少なくとも約 1 5 0 %、少なくとも約 1 6 0 %、少なくとも約 1 7 0 %、少なくとも約 1 8 0 %、少なくとも約 1 9 0 %、少なくとも約 2 0 0 %の活性を有する。変異体は、野生型又は天然型イソプレンシンターゼとの配列類似性を保有し得る。一部の態様では、野生型又は天然型イソプレンシンターゼの変異体は、野生型又は天然型イソプレンシンターゼのアミノ酸配列と、少なくとも約 4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %、又は 9 9 . 9 %のうちのいずれかの程度で配列相同性を有する。一部の態様では、野生型又は天然型イソプレンシンターゼの変異体は、野生型又は天然型イソプレンシンターゼのアミノ酸配列と、約 7 0 %～約 9 9 . 9 %、約 7 5 %～約 9 9 %、約 8 0 %～約 9 8 %、約 8 5 %～約 9 7 %、又は約 9 0 %～約 9 5 %のうちのいずれかの程度で配列相同性を有する。  
10

#### 【 0 1 4 2 】

一部の態様では、変異体は、野生型又は天然型イソプレンシンターゼ内に変異を持つ。一部の態様では、変異体は、少なくとも 1 箇所にアミノ酸置換、少なくとも 1 箇所にアミノ酸挿入、及び / 又は少なくとも 1 箇所にアミノ酸欠失を有する。一部の態様では、変異体は、少なくとも 1 箇所にアミノ酸置換を有する。一部の態様では、変異体と、野生型又は天然型イソプレンシンターゼとの間で異なっているアミノ酸残基の数は、1 以上であつてよく、例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、又は 50 以上のアミノ酸残基が異なっていてよい。天然型イソプレンシンターゼとしては、植物由来の任意のイソプレンシンターゼを挙げることができ、例えば、クズ (kudzu) イソプレンシンターゼ、ポプラ (poplar) イソプレンシンターゼ、ヨーロッパナラ (English oak) イソプレンシンターゼ、及びヤナギ (willow) イソプレンシンターゼが挙げられる。一部の態様では、変異体は、ウラジロハコヤナギ (Populus alba) 由来のイソプレンシンターゼの変異体である。一部の態様では、ウラジロハコヤナギ (Populus alba) 由来のイソプレンシンターゼ変異体は、少なくとも一箇所にアミノ酸置換、少なくとも 1 箇所にアミノ酸挿入、及び / 又は少なくとも 1 箇所にアミノ酸欠失を有する。一部の態様では、変異体は、切断型のウラジロハコヤナギ (Populus alba) イソプレンシンターゼである。一部の態様では、変異体（例えば、ウラジロハコヤナギ (Populus alba) 由来のイソプレンシンターゼの変異体）をコードしている核酸は、コドンを最適化させたものである（例えば、異種イソプレンシンターゼを発現させる宿主細胞に基づきコドンを最適化している）。  
20

#### 【 0 1 4 3 】

一部の態様では、変異体は、次の表（表 2）に記載の、ウラジロハコヤナギ (P. alba) のアミノ酸配列と一致させた変異を 1 つ以上（すなわち、2、3、4、5、6 など）含む。

#### 【 0 1 4 4 】

10

20

30

【表2】

表2:ウラジロハコヤナギ( <i>P. alba</i> )のイソプレンシンターゼ変異体(MEA)				
A118E	E472R	S510V	K161K	A118P
S22K	K463F	I342I	W392A	A118Q
S21R	K463T	K348F	W392C	A118A
S22K	R71K	K348Y	W392F	E41M
S22R	R71L	K348K	S288Y	G111S
E58L	R71M	C437L	M228Y	S74Q
T481V	R71V	T240C	A3T	S74S
T481Y	R71R	M460M	W392Y	K36D
T502F	K393L	R461A	W392W	S282H
T381L	F542L	H424P	F89D	S282I
T381M	P538K	H424H	F89E	S282W
T381Y	P538R	A448L	F89F	S282Y
T383H	P538P	A448Q	E41Y	S282S
T383L	A503A	A448V	E41E	K36S
E480I	L436I	G389D	R43E	K36T
E480R	L436Y	S444E	R43L	K36W
K393V	L436F	S444S	K36E	K36Y
K393I	E488L	H511Y	K36H	K36K
E415H	E488M	H511H	K36N	
E415V	E488T	R071I	K36P	
E415Y	E488W	R071K	K36Q	
R71H	E488E	R071L	A453I	
R71I	I342Y	K374Y	A453V	
E58Y	C437M	K374K	A453A	
E135G	C437W	L526E	V409I	
A363L	C437Y	L526Q	V409T	
K374Y	C437C	L526L	K161C	
T381I	M460A	R242G	K161E	
L436L	I447T	R242R	K161N	
H254R	I447V	A443G	K161Q	
H254C	I447Y	A443Q	G99E	
E488C	S444D	A443R	G99G	
E488F	G389E	A443S	S288A	
T383Y	L376I	S13S	S288C	
K414I	L376M	V268I	S288T	
K414R	L376L	V268V	W392I	
K414S	I504F	K161A	W392M	
K414W	I504I	V409V	W392S	
E472C	E467W	D323F	W392T	
E472L	S510C	G99D	W392V	

## 【0145】

本開示のイソプレン合成酵素ポリペプチドは、国際公開第2009/132220号、同第2010/124146号、米国特許出願第2010/0086978号に記載のいずれかのイソプレン合成酵素又はイソプレン合成酵素変異体であってよい。これらの文献に記載される、イソプレン合成酵素及びイソプレン合成酵素変異体に関するすべての内容は、参照により本開示に明示的に組み込む。

## 【0146】

本開示のプロモータのうちのいずれか（例えば、本開示に記載され、本開示の実施例において定義される、誘導型プロモータ及び常時発現型プロモータなどのプロモータ）を使用して、本開示のいずれかのイソプレンシンターゼの発現を駆動させることができる。

10

20

30

40

50

## 【0147】

好適なイソブレンシンターゼとしては、限定するものではないが、Genbank受入番号AY341431、AY316691、AY279379、AJ457070、及びAY182241として識別されるものが挙げられる。本開示のイソブレンシンターゼをコードしている微生物の製造法を含む組成物又は方法のうちのいずれか1つに使用するとのできるイソブレンシンターゼの種類は、国際公開第2009/076676号、同第2010/003007号、同第2009/132220号、同第2010/031062号、同第2010/031068号、同第2010/031076号、同第2010/013077号、同第2010/031079号、同第2010/148150号、同第2010/124146号、同第2010/078457号、及び同第2010/148256号にも記載されている。10

## 【0148】

DXP経路のポリペプチドをコードしている核酸

本発明の一部の態様では、本明細書に記載の任意の組成物又は方法に記載の細胞は、DXSポリペプチド又はDXP経路の他のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を更に含む。一部の態様では、細胞は更に、DXSポリペプチド又は他のDXP経路ポリペプチドをコードしている内在性の核酸の染色体コピーを含む。一部の態様では、大腸菌(*E. coli*)細胞は更に、ID1ポリペプチド及びDXSポリペプチド又は他のDXP経路ポリペプチドをコードしている核酸を1つ以上含む。一部の態様では、1つの核酸は、イソブレンシンターゼ、ID1ポリペプチド及びDXSポリペプチド又は他のDXP経路ポリペプチドをコードしている。一部の態様では、1つのプラスミドは、イソブレンシンターゼ、ID1ポリペプチド及びDXSポリペプチド又は他のDXP経路ポリペプチドをコードしている。一部の態様では、マルチコピープラスミド(multiple plasmids)は、イソブレンシンターゼ、ID1ポリペプチド及びDXSポリペプチド又は他のDXP経路ポリペプチドをコードしている。20

## 【0149】

DXSポリペプチドの例としては、DXSポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、及び融合ポリペプチドが挙げられる。標準法(本明細書に記載されるものなど)を用い、ポリペプチドが、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビオでピルビン酸及びD-グリセルアルデヒド-3-リン酸を1-デオキシ-D-キシリロース-5-リン酸へと変換する能力を測定することで、ポリペプチドがDXSポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。DXSポリペプチド及び核酸の例並びにDXS活性の測定法は、国際公開第2009/076676号、米国特許出願第12/335,071号(米国特許出願公開第2009/0203102号)、国際公開第2010/003007号、米国特許出願公開第2010/0048964号、国際公開第2009/132220号、及び米国特許出願公開第2010/0003716号に、より詳細に記載される。30

## 【0150】

DXP経路に含まれるポリペプチドの例としては、限定するものではないが、次の任意のポリペプチド: DXSポリペプチド、DXRポリペプチド、MCTポリペプチド、CMKポリペプチド、MCSポリペプチド、HDSポリペプチド、HDRポリペプチド、及びDXP経路のポリペプチドの活性を1つ、又は2つ以上有するDXP経路ポリペプチド(例えば、融合ポリペプチド)、が挙げられる。特に、DXP経路ポリペプチドとしては、DXP経路のポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド及び融合ポリペプチドが挙げられる。DXP経路に関する核酸の例としては、DXP経路のポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又は融合ポリペプチドをコードしている核酸が挙げられる。DXP経路に含まれるポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。DXP経路のポリペプチド及び核酸4050

の例としては、並びにDXP経路のポリペプチド活性を測定する方法については、国際公開第2010/148150号に、より詳細に記載されている。

#### 【0151】

DXSポリペプチドの例としては、DXSポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、及び融合ポリペプチドが挙げられる。標準法(本明細書に記載されるものなど)を用い、ポリペプチドが、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボでピルビン酸及びD-グリセルアルデヒド-3-リン酸を1-デオキシ-D-キシリロース-5-リン酸へと変換する能力を測定することで、ポリペプチドがDXSポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。DXSポリペプチド及び核酸の例並びにDXS活性の測定法は、国際公開第2009/076676号、米国特許出願第12/335,071号(米国特許出願公開第2009/0203102号)、国際公開第2010/003007号、米国特許出願公開第2010/0048964号、国際公開第2009/132220号、及び米国特許出願公開第2010/0003716号に、より詳細に記載される。10

#### 【0152】

特に、DXSポリペプチドは、ピルビン酸及びD-グリセルアルデヒド3-リン酸を1-デオキシ-d-キシリロース5-リン酸(DXP)へと変換する。標準法を用い、ポリペプチドが、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボでピルビン酸及びD-グリセルアルデヒド-3-リン酸を変換する能力を測定することで、ポリペプチドがDXSポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。20

#### 【0153】

DXRポリペプチドは、1-デオキシ-d-キシリロース5-リン酸(DXP)を2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸(MEP)へと変換する。標準法を用い、ポリペプチドが、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボでDXPを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがDXRポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。

#### 【0154】

MCTポリペプチドは、2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸(MEP)を4-(シチジン5'-ジホスホ)-2-メチル-D-エリスリトール(CDP-ME)へと変換する。標準法を用い、ポリペプチドが、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボでMEPを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがMCTポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。30

#### 【0155】

CMKポリペプチドは、4-(シチジン5'-ジホスホ)-2-C-メチル-D-エリスリトール(CDP-ME)を2-ホスホ-4-(シチジン5'-ジホスホ)-2-C-メチル-D-エリスリトール(CDP-MEP)へと変換する。標準法を用い、ポリペプチドが、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボでCDP-MEを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがCMKポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。

#### 【0156】

MCSポリペプチドは、2-ホスホ-4-(シチジン5'-ジホスホ)-2-C-メチル-D-エリスリトール(CDP-MEP)を2-C-メチル-D-エリスリトール2,4-シクロジホスフェート(ME-CPP又はcMEPP)へと変換する。標準法を用い、ポリペプチドが、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボでCDP-MEPを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがMCSポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。40

#### 【0157】

HDSポリペプチドは、2-C-メチル-D-エリスリトール2,4-シクロジホスフェートを(E)-4-ヒドロキシ-3-メチルブタ-2-エン-1-イルジホスフェート(HMBPP又はHDMAPP)へと変換する。標準法を用い、ポリペプチドが、インビ

10

20

30

40

50

トロで、細胞抽出物中で又はインビボでM E - C P P を変換する能力を測定することで、ポリペプチドがH D S ポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。

#### 【 0 1 5 8 】

H D R ポリペプチドは、(E) - 4 - ヒドロキシ - 3 - メチルブタ - 2 - エン - 1 - イルジホスフェートをイソペンテニルジホスフェート(I P P )及びジメチルアリールジホスフェート(D M A P P )へと変換する。標準法を用い、ポリペプチドが、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボでH M B P P を変換する能力を測定することで、ポリペプチドがH D R ポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。

#### 【 0 1 5 9 】

M V A 経路下流、イソプレンシンターゼ、I D I 及びD X P 経路のポリペプチドに関する生物資源

イソプレンシンターゼ、I D I 、D X P 経路及び/又はM V A 経路下流の核酸(及びそれらにコードされるポリペプチド)は、イソプレンシンターゼ、I D I 、D X P 経路及び/又はM V A 経路下流の核酸を天然に含有する任意の生物から得ることができる。イソプレンは、バクテリア、酵母、植物及び動物などの様々な生物により天然に生成される。一部の生物は、イソプレンの生産に関係するM V A 経路を含有する。イソプレンシンターゼの核酸は、例えば、イソプレンシンターゼを含有する任意の生物から得ることができる。したがってM V A 経路の核酸は、例えば、M V A 経路を含有する任意の生物から得ることができる。I D I 及びD X P 経路の核酸は、例えば、I D I 及びD X P 経路を含有する任意の生物から得ることができる。

10

20

30

40

#### 【 0 1 6 0 】

イソプレンシンターゼ、D X P 経路、I D I 、及び/又はM V A 経路の核酸の核酸配列は、細菌、真菌、植物、藻類、又はシアノバクテリアから単離することができる。生物資源の例としては、例えば、酵母、例えばサッカロマイセス(Saccharomyces)種(例えば、サッカロマイセス・セレヴィシエ(S. cerevisiae))、バクテリア、例えば、エシェリキア(Escherichia)種(例えば、大腸菌(E. coli))、又はメタノサルシナ(Methan osarcina)種(例えば、メタノサルシナ・マゼイ(Methanosarcina mazei))、植物、例えばクズ又はポプラ(例えば、ウラジロハコヤナギ(Populus alba)、又はウラジロハコヤナギ×ヤマナラシ C A C 3 5 6 9 6 (Populus alba x tremula CAC35696))又はアスペン(例えば、アメリカヤマナラシ(Populus tremuloides))が挙げられる。イソプレンシンターゼ、I D I 及び/又はM V A 経路ポリペプチドに関係し、使用することのできる資源例は、同様に、国際公開第2009/076676号、同第2010/003007号、同第2009/132220号、同第2010/031062号、同第2010/031068号、同第2010/031076号、同第2010/013077号、同第2010/031079号、同第2010/148150号、同第2010/078457号、及び同第2010/148256号に記載されている。

30

40

#### 【 0 1 6 1 】

一部の態様では、生物資源は酵母であり、例えば、サッカロマイセス属(Saccharomyces sp.)、シゾサッカロマイセス属(Schizosaccharomyces sp.)、ピキア属(Pichia sp.)又はカンジダ属(Candida sp.)である。

#### 【 0 1 6 2 】

一部の態様では、宿主細胞は、B. リケノフォルミス(B. licheniformis)又は枯草菌(B. subtilis)などのバチルス株、P. シトレア(P. citrea)などのパントエア(Pantoea)株、P. アルカリゲネス(P. alkaligenes)などのシュードモナス属(Pseudomonas)株、S. リビダンス(S. lividans)又はS. ルビギノーサス(S. rubiginosus)などのストレプトマイセス(Streptomyces)株、大腸菌(E. coli)などのエシェリキア(Escherichia)株、エンテロバクター株(Enterobacter)、ストレプトコッカス(Streptococcus)株、又はメタノサルシナ・マゼイ(Methanosarcina mazei)などの古細菌株である。

50

#### 【 0 1 6 3 】

本明細書で使用するとき、「バチルス（*Bacillus*）」属としては、当業者に既知の「バチルス（*Bacillus*）属」のすべての種を包含し、限定するものではないが、例えば、枯草菌（*B. subtilis*）、*B.* リケニフォルミス（*B. licheniformis*）、*B.* レンタス（*B. lentus*）、*B.* ブレービス（*B. brevis*）、*B.* ステアロサーモフィルス（*B. stearothermophilus*）、*B.* アルカロフィルス（*B. alkalophilus*）、*B.* アミロリケファシエンス（*B. amylolyticus*）、*B.* クラウシイ（*B. clausii*）、*B.* ハロデュランス（*B. halo durans*）、*B.* メガテリウム（*B. megaterium*）、*B.* コアグランス（*B. coagulans*）、*B.* サークランス（*B. circulans*）、*B.* ロータス（*B. lautus*）、及びバチルス・チューリングンシス（*B. thuringiensis*）が挙げられる。バチルス属は分類上の再編成を受け続けるものと認識される。したがって、属には、これまでに再分類された種、限定するものではないが、現在では「ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス（*Geobacillus stearothermophilus*）」と命名されている*B.* ステアロサーモフィルス（*B. stearothermophilus*）などの生物を包含するものと意図される。酸素存在下での、耐久性の高い内生胞子の形成は、バチルス属を定義する特性であると考慮されるものの、この特性は、現在、アリシクロバチルス（*Alicyclobacillus*）、アムピバチルス（*Amphibacillus*）、アネウリニバチルス（*Aneurinibacillus*）、アノキシバチルス（*Anoxybacillus*）、ブレビバチルス（*Brevibacillus*）、フィロバチルス（*Filobacillus*）、グラシリバチルス（*Gracilibacillus*）、ハロバチルス（*Halobacillus*）、パエニバチルス（*Paenibacillus*）、サリバチルス（*Salibacillus*）、サーモバチルス（*Thermobacillus*）、ウレイバチルス（*Ureibacillus*）、及びバルジバチルス（*Virgibacillus*）と命名されている属にも当てはまる。

10

20

30

40

50

#### 【0164】

一部の態様では、生物資源はグラム陽性細菌である。非限定的な例としては、ストレプトマイセス株（例えば、*S.* リビダンス（*S. lividans*）、*S.* コエリカラー（*S. coelicolor*）、又は*S.* グリセウス（*S. griseus*））及びバチルス株が挙げられる。一部の態様では、生物資源は、大腸菌（*E. coli*）又はシュードモナス属（*Pseudomonas* sp.）などのグラム陰性細菌である。

#### 【0165】

一部の態様では、微生物源は植物であり、例えば、マメ科（Fabaceae）、例えばマメ亜科（Faboideae）などの植物である。一部の態様では、生物資源はクズ、ポプラ（例えば、ウラジロハコヤナギ（*Populus alba*）×トレムラ（*tremula*）C A C 3 5 6 9 6など）、アスペン（例えば、アメリカヤマナラシ（*Populus tremuloides*））、又はヨーロッパナラ（*Quercus robur*）である。

#### 【0166】

一部の態様では、微生物源は、藻類、例えば緑藻、紅藻、灰色藻、クロララクニオン藻、ミドリムシ目、クロミスタ、又は渦鞭毛藻類である。

#### 【0167】

一部の態様では、生物資源は、形態に基づき次の群：クロオコッカス（Chroococcales）、プレウロカプサ（Pleurocapsales）、ユレモ（Oscillatoriaceae）、ネンジュモ（Nostocales）、又はスティゴネマ（Stigonematales）のいずれかに分類される、ラン藻である。

#### 【0168】

ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている核酸

本発明の一部の態様では、本開示の組成物又は方法のいずれかに記載の組み換え細胞は、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸、又はホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドを更に含む。一部の態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドは内在性ポリペプチドである。一部の態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように常時発現型プロモータに連結される。一部の態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように誘導型プロモータに連結される。一部の態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように高発現型プロモータに連結される。一部

の態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている内在性の核酸を1つ以上（例えば、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている内在性の核酸の2、3、又は4つ以上のコピー）を使用する。特定の態様では、細胞は、野生型細胞と比べ、内在性のホスホケトラーゼポリペプチドが過剰発現するよう遺伝子操作される。一部の態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように低発現型プロモータに連結される。

#### 【0169】

ホスホケトラーゼ酵素は、キシリロース5-リン酸のグリセルアルデヒド3-リン酸及びアセチルリン酸への変換、並びに／又はフルクトース6-リン酸のエリトロース4-リン酸及びアセチルリン酸への変換を触媒する。特定の実施形態では、ホスホケトラーゼ酵素は、キシリロース5-リン酸のグリセルアルデヒド3-リン酸及びアセチルリン酸への変換を触媒する。他の実施形態では、ホスホケトラーゼ酵素は、フルクトース6-リン酸のエリトロース4-リン酸及びアセチルリン酸への変換を触媒する。したがって、理論に束縛されるものではないが、本明細書で説明されるとおりホスホケトラーゼを発現させることにより、炭水化物資源から生成されるアセチルリン酸量を増加させることができる。このアセチルリン酸をアセチルCoAへと変換させ、更にこれをを利用して、MVA経路に関係する酵素活性により、メバロン酸、イソプレノイド前駆体分子、イソプレン及び／又はイソプレノイドを生成させることができる。したがって、炭水化物基質より生成されるこれらの化合物量を増加させることができる。あるいは、細胞内濃度の上昇という形式で生成性の向上が反映されずとも、アセチル-P及びAcCoAの生成量を増加させることができる。特定の実施形態では、細胞内アセチル-P又はアセチルCoA濃度は、ホスホケトラーゼによる反応が生じた場合でさえ変化せず一定であり、又は減少する場合もある。

10

20

30

#### 【0170】

ホスホケトラーゼの核酸の例としては、ホスホケトラーゼポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又はポリペプチド融合物をコードしている核酸が挙げられる。ホスホケトラーゼのポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。一部の態様では、ホスホケトラーゼの核酸は、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている異種核酸である。

#### 【0171】

標準法を使用し、ペプチドがD-フルクトース6-リン酸又はD-キシリロース5-リン酸をアセチル-Pへと変換する能力を測定することで、ポリペプチドがホスホケトラーゼペプチド活性を有するかを判断できる。次に、アセチル-Pはフェリルアセチルヒドロキサム酸(ferryl acetyl hydroxamate)へと変換され得る。この変換は、分光測定により検出可能である(Meille et al., J. Bact. 183: 2929~2936, 2001)。本発明での使用には、本明細書に記載されるとおりホスホケトラーゼペプチド活性を有するとして判定された任意のポリペプチドが好適である。

40

#### 【0172】

他の態様では、ホスホケトラーゼの核酸の例としては、限定するものではないが、ラクトバチルス・ロイテリ(Lactobacillus reuteri)、ビフィドバクテリウム・ロンガム(Bifidobacterium longum)、フェリモナス・バレアリカ(Ferrimonas balearica)、ペドバクター・サルタンス(Pedobacter saltans)、ストレプトマイセス・グリセウス(Streptomyces griseus)、及び／又はノカルディオプシス・ダッソンビレイ(Nocardiopsis dassonvillei)から単離したホスホケトラーゼが挙げられる。本明細書において使用することのできるホスホケトラーゼ酵素のその他の例は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,785,858号に記載されている。

#### 【0173】

エントナー・ドウドロフ経路に関する経路

50

エントナー・ドゥドロフ( E D )経路は、エムデン・マイヤーホフ・パルナス( E M P - 解糖)経路とは異なる経路である。大腸菌( *E. coli* )などの一部の生物が E D 経路及び E M P 経路の両方を内包するのに対し、その他の生物はいずれか 1 つの経路のみを有する。枯草菌( *Bacillus subtilis* )は、 E M P 経路のみを有する( Peekhaus and Conway . 1998 . J. Bact. 180 : 3495 ~ 3502 ; Stulke and Hillen . 2000 . Annals Rev. Microbiol. 54 , 849 ~ 880 ; Dawes et al. 1966 . Biochem. J. 98 : 795 ~ 803 )。

## 【 0174 】

10

ホスホグルコン酸デヒドラターゼ( e d d )は、 6 - ホスホ - D - グルコネートから一分子の H<sub>2</sub>O を除去して 2 - デヒドロ - 3 - デオキシ - D - グルコネート 6 - リン酸を生成するのに対し、 2 - ケト - 3 - デオキシグルコネート 6 - リン酸アルドラーーゼ( e d a )はアルドール縮合を触媒する( Egane et al. 1992 . J. Bact. 174 : 4638 ~ 4646 )。 2 つの遺伝子はオペロンの関係である。

## 【 0175 】

ホスホケトラーゼ経路に指向する代謝経路を E D 経路に迂回させることもできる。 E D 経路に取り込まれる代謝産物が損失することを回避するため、ホスホグルコン酸デヒドラターゼ遺伝子( 例えは、内在性ホスホグルコン酸デヒドラターゼ遺伝子 )及び / 又は 2 - ケト - 3 - デオキシグルコナーゼ 6 - リン酸アルドラーーゼ遺伝子( 例えは、内在性 2 - ケト - 3 - デオキシグルコネート 6 - リン酸アルドラーーゼ遺伝子 )活性を減弱させる。 1 つの手法としては、ホスホグルコン酸デヒドラターゼ( e d d )及び / 又は 2 - ケト - 3 - デオキシグルコネート 6 - リン酸アルドラーーゼ( e d a )を欠失させることで減弱を行うことができる。この欠失は、クロラムフェニコール又はカナマイシンカセットにより片方又はいずれもの遺伝子を置き換え、その後カセットを除去することで導入される。これらの酵素活性を存在させずとも、ホスホケトラーゼ酵素によってより多くの炭素を取り込むことができ、ひいてはメバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、及び / 又はイソプレノイドの収率を増加させることができる。

20

## 【 0176 】

30

ホスホグルコン酸デヒドラターゼ( e d d )及び / 又は 2 - ケト - 3 - デオキシグルコネート 6 - リン酸アルドラーーゼ( e d a )の活性は、酵素に関する他の分子操作により減少させることもできる。酵素活性を低下させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して、任意の量で低下させることができる。一部の例では、酵素活性を、少なくとも約 1 % 、 2 % 、 3 % 、 4 % 、 5 % 、 6 % 、 7 % 、 8 % 、 9 % 、 10 % 、 15 % 、 20 % 、 25 % 、 30 % 、 35 % 、 35 % 、 40 % 、 45 % 、 50 % 、 55 % 、 60 % 、 65 % 、 70 % 、 75 % 、 80 % 、 85 % 、 90 % 、 95 % 、 96 % 、 97 % 、 98 % 、又は 99 % 低下させる。

## 【 0177 】

40

一部の場合では、内在性ホスホグルコン酸デヒドラターゼ遺伝子及び / 又は内在性 2 - ケト - 3 - デオキシグルコネート 6 - リン酸アルドラーーゼ遺伝子の活性を減弱させることにより、内在性ホスホグルコン酸デヒドラターゼ遺伝子及び / 又は内在性酢酸キナーゼ 2 - ケト - 3 - デオキシグルコネート 6 - リン酸アルドラーーゼ遺伝子の発現を減弱させていない細胞と比較して、多量の炭素がメバロン酸依存性生合成経路に取り込まれることになる。

## 【 0178 】

50

## ペントースリン酸経路の酸化経路に関する経路

大腸菌( *E. coli* )は、ペントースリン酸経路を使用してヘキソース及びペントースを分解し、各種代謝経路に関する中間体を細胞に提供する。この経路は、 NADPH の主要な生成経路でもある。ペントースリン酸経路は、酸化経路( グルコース 6 - リン酸 1 - デヒドロゲナーゼ( zwf )、 6 - ホスホグルコノラクトナーゼ( pg1 )又は 6 - ホス

ホグルコネートデヒドロゲナーゼ (gnd) などの酵素による) 及び非酸化経路 (トランスクレトラーゼ (tktA) 、トランスアルドラーゼ (talA 又は talB) 、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ及び(又は)リボース - 5 - リン酸エピメラーゼなどの酵素による) から構成される (Sprenger. 1995. Arch. Microbiol. 164: 324 ~ 330) 。

#### 【0179】

ホスホケトラーゼ酵素を炭素に直接作用させるために、ペントースリン酸経路の非酸化分岐経路 (トランスクレトラーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ及び(又は)リボース - 5 - リン酸エピメラーゼ) の発現を調節して (例えば、酵素の活性を増強させて) 、より多量の炭素をフルクトース 6 - リン酸及びキシリロース 5 - リン酸へと変換させ、以降に続くメバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、及び / 又はイソプレノイドの生産量を増加させることもできる。トランスクレトラーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ及び(又は)リボース - 5 - リン酸エピメラーゼ活性を増加させることで、活性を操作しなかった場合と比較して、比活性又は総活性を任意の量で増加させることができる。一部の例では、酵素活性は少なくとも約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % 上昇する。一部の態様では、トランスクレトラーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ及び(又は)リボース - 5 - リン酸エピメラーゼの活性は、内在性トランスクレトラーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ及び(又は)リボース - 5 - リン酸エピメラーゼの活性を増強させることにより調節される。このような上昇は、内在性トランスクレトラーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ及び(又は)リボース - 5 - リン酸エピメラーゼ遺伝子のプロモータを常時高発現型の合成プロモータにより置き換えることで得られる。トランスクレトラーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ及び(又は)リボース - 5 - リン酸エピメラーゼをコードしている遺伝子を、プラスミド上の適切なプロモータの後にクローン化させてもよい。トランスクレトラーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ及び(又は)リボース - 5 - リン酸エピメラーゼの活性を増大させることにより、トランスクレトラーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ及び(又は)リボース - 5 - リン酸エピメラーゼの発現を増加させていない細胞と比較して、多量の炭素をメバロン酸依存型の生合成経路に取り込ませることができる。

#### 【0180】

##### ホスホフルクトキナーゼに関する経路

ホスホフルクトキナーゼは、解糖系でフルクトース 6 - リン酸のリン酸化を触媒する重要な酵素である。大腸菌 (*E. coli*) は pfkA 及び pfkB によりコードされる 2 種のイソ酵素を有する。細胞におけるホスホフルクトキナーゼ活性の大部分は pfkA によるものである (Kotlarz et al. 1975, Biochim. Biophys. Acta, 381: 257 ~ 268) 。

#### 【0181】

ホスホケトラーゼ酵素を炭素に直接作用させるために、ホスホフルクトキナーゼの発現を調節 (例えば、酵素活性を低下させるなど) して、より多量の炭素をフルクトース 6 - リン酸及びキシリロース 5 - リン酸へと変換させ、以降に続くメバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、及び / 又はイソプレノイドの生産量を増加させることもできる。ホスホフルクトキナーゼ活性を低下させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して、任意の量で低下させることができる。一部の例では、酵素活性を、少なくとも約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 % 低下させることができる。

10

20

30

40

50

98%、99%又は100%低下させる。一部の態様では、内在性ホスホフルクトキナーゼの活性を低下させることにより、ホスホフルクトキナーゼの活性を調節する。このような調節は、内在性ホスホフルクトキナーゼ遺伝子プロモータを常時低発現型合成プロモータと置き換えることにより行うことができる。ホスホフルクトキナーゼをコードしている遺伝子を欠失させてもよい。ホスホフルクトキナーゼの活性を低下させることで、メバロン酸依存性の生合成経路への炭素の取り込みを、ホスホフルクトキナーゼの発現を低下させていない細胞と比較して、増大させることができる。

### 【0182】

#### 宿主細胞変異

本発明は、MVA経路に取り込まれる炭素量を増大させる追加の宿主細胞変異も企図する。炭素の取り込み量を増大させることで、イソプレン、メバロン酸、イソブレノイド前駆体分子、及び／又はイソブレノイドをより多量に生産できるようになる。本明細書に記載される通りの組み換え細胞は、メバロン酸、イソプレン、イソブレノイド、及び／又はイソブレノイド前駆体の生産に取り込まれる炭素量を増大させるよう遺伝子操作することもでき、その際、(a)クエン酸シンターゼ、(b)ホスホトランスアセチラーゼ、(c)酢酸キナーゼ、(d)乳酸デヒドロゲナーゼ、(e)NADP依存性リンゴ酸酵素、及び(f)ピルビン酸デヒドロゲナーゼからなる群の酵素の1つ以上の活性を調節する。一部の態様では、本明細書において参照した任意の酵素の調節により、発現(例えば、転写又は翻訳)、生産、翻訳後修飾又は任意の他の酵素機能に影響を与えることができる。一部の実施形態では、組み換え細胞の酵素機能(例えば、触媒能)は、このような調整に関する遺伝子操作を行っていない細胞と比較して、上昇又は低下している。一実施形態では、酵素機能(例えば、活性)は、遺伝子操作を行っていない細胞と比較して、上昇している。他の実施形態では、酵素機能(例えば、活性)は、遺伝子操作を行っていない細胞と比較して、減少している。

10

20

30

40

50

### 【0183】

#### クエン酸シンターゼによる経路

クエン酸シンターゼは、オキサロ酢酸とアセチルCoAを縮合させることによるクエン酸(トリカルボン酸(TCA)回路の代謝生成物)の生成を触媒する(Ner, S. et al. 1983. Biochemistry 22: 5243~5249; Bhayana, V. and Duckworth, H. 1984. Biochemistry 23: 2900~2905)(図5)。大腸菌(E. coli)では、gltAによりコードされたこの酵素は、二量体サブユニットからなる三量体様の挙動を示す。六量体の形成により、酵素はNADHによりアロステリックに制御されるようになる。この酵素は、これまでに広く研究されている(Wiegand, G., and Remington, S. 1986. Annual Rev. Biophysics Biophys. Chem. 15: 97~117; Duckworth et al. 1987. Biochem Soc Symp. 54: 83~92; Stockell, D. et al. 2003. J. Biol. Chem. 278: 35435~43; Maurus, R. et al. 2003. Biochemistry. 42: 5555~5565)。NADHによるアロステリック阻害を回避するにあたって、これまでに、枯草菌(Bacillus subtilis)NADH感受性クエン酸シンターゼによる置き換え、又はこの酵素の添加が検討されている(Underwood et al. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1071~1081; Sanchez et al. 2005. Met. Eng. 7: 229~239)。

### 【0184】

クエン酸シンターゼによる触媒反応は、メバロン酸経路の第一工程を触媒し、同様にアセチルCoAを基質として使用するチオラーゼと直接的に競合する(Hedl et al. 2002. J. Bact. 184: 2116~2122)。したがって、当業者は、クエン酸シンターゼの発現を調節して(例えば、酵素活性を減少させて)、より多量の炭素がメバロン酸経路に取り込まれるようにすることで、メバロン酸及びイソプレンの最終

的な生産量を増加させることができる。クエン酸シンターゼ活性を低下させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して、任意の量で低下させることができる。一部の例では、酵素活性を、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%低下させる。一部の態様では、クエン酸シンターゼの活性を調節する。この調節は、NADH非感受性クエン酸シンターゼをコードしている導入遺伝子により、あるいは枯草菌(*Bacillus subtilis*)から誘導したNADH非感受性クエン酸シンターゼをコードしている導入遺伝子により、内在性クエン酸シンターゼ遺伝子の染色体を置換することで実施できる。クエン酸シンターゼの活性は、内在性クエン酸シンターゼ遺伝子のプロモータを、常時低発現型の合成プロモータと置き換えることによっても調節(例えば、低下させる)できる。クエン酸シンターゼの活性を低下させることで、メバロン酸依存性の生合成経路への炭素の取り込みを、クエン酸シンターゼの発現を低下させていない微生物と比較して、増加させることができる。

10

## 【0185】

ホスホトランスアセチラーゼ及び/又は酢酸キナーゼの関与する経路

ホスホトランスアセチラーゼ(pta)(Shimizu et al. 1969. Biochim. Biophys. Acta 191: 550~558)は、アセチルCoAとアセチルリン酸(アセチル-P)の可逆性の変換を触媒するのに対し、酢酸キナーゼ(ackA)(Kakuda, H. et al. 1994. J. Biochem. 111: 916~922)は、アセチル-Pと酢酸の可逆性の変換を触媒する。これらの遺伝子は、大腸菌(*E. coli*)においてオペロンとして転写され得る。これらの遺伝子は共に、ATPの放出により酢酸の異化を触媒する。したがって、当業者は、ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子(例えば、内在性ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子)及び/又は酢酸キナーゼ遺伝子(例えば、内在性酢酸キナーゼ遺伝子)の活性を減弱させて、利用可能なアセチルCo-Aを増加させることができる。減弱させる手法の一つとしては、ホスホトランスアセチラーゼ(pta)及び/又は酢酸キナーゼ(ackA)の欠失が挙げられる。この欠失は、クロラムフェニコールカセットにより片方又はいずれもの遺伝子を置き換え、その後カセットを除去することで導入される。酢酸は多様な理由により大腸菌(*E. coli*)により生成される(Wolfe, A. 2005. Microb. Mol. Biol. Rev. 69: 12~50)。理論に束縛されるものではないが、ackA-pt aはアセチルCoAを消費することから、これらの遺伝子を欠失させると、炭素は酢酸へと変換されなくなり、メバロン酸、イソプレノイド、イソプレノイド前駆体分子及び/又はイソプレンの収率が増加することになる。一部の態様では、ホスホトランスアセチラーゼ様酵素活性(例えば、限定するものではないが、大腸菌(*E. coli*)及びサッカロマイセス・セレヴィシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)などの生物におけるeutD遺伝子)を示すeutD遺伝子を減弱させる又は欠失させる。

20

## 【0186】

一部の態様では、組み換え微生物は、内在性ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子及び/又は内在性酢酸キナーゼ遺伝子の発現を減弱させていない微生物と比較して、酢酸の生成量が減少している。酢酸生成量の減少は、当業者に既知の所定のアッセイ法により測定できる。酢酸の生成量は、分子的な操作を行なっていない場合と比較して、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%減少する。

30

## 【0187】

ホスホトランスアセチラーゼ(pta)及び/又は酢酸キナーゼ(ackA)の活性は、酵素に関する他の分子的操作によつても低下させることができる。酵素活性を低下さ

40

50

せることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して、任意の量で低下させることができる。一部の例では、酵素活性は少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%ほど(これらの割合の間の任意の値も含む)低下する。

#### 【0188】

一部の場合では、内在性ホスホトランスマチラーゼ遺伝子及び/又は内在性酢酸キナーゼ遺伝子の活性を減弱させることで、内在性ホスホトランスマチラーゼ遺伝子及び/又は内在性酢酸キナーゼ遺伝子発現を減弱させていない微生物と比較して、メバロン酸依存性生合成経路への炭素原子の取り込みが増加する。10

#### 【0189】

##### 乳酸デヒドロゲナーゼの関与する経路

大腸菌(*E. coli*)では、D-乳酸は、乳酸デヒドロゲナーゼ酵素(1dhA-図5)により、ピルビン酸から生成される(Bunch, P. et al. 1997. Microbiology 143: 187~195)。乳酸の生成はNADHの酸化によりなされため、乳酸は、酸素制限下で、かつ還元当量のすべてを収容できない場合に生成されることになる。したがって、乳酸の生成は、炭素消費の原因となり得る。そのため、メバロン酸生産(並びに必要に応じてイソブレン、イソブレノイド前駆体分子及び/又はイソブレノイドの生産)への炭素の取り込みを向上させるため、当業者は、酵素活性を低下させるなどして乳酸デヒドロゲナーゼの活性を調節することができる。20

#### 【0190】

したがって、一様では、乳酸デヒドロゲナーゼの活性は、内在性乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の活性を減弱させることで調節できる。このような減弱は、内在性乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の欠失により実施できる。当業者に知られている、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の活性を減弱させる他の手法も使用できる。乳酸デヒドロゲナーゼの関与する経路を操作することで、組み換え微生物の生成する乳酸量は、内在性乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の発現を減弱させていない微生物と比較して、減少することになる。乳酸の生成量の減少は、当業者に知られている所定のアッセイ法により測定できる。乳酸の生成量は、分子的な操作を行なっていない場合と比較して、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%減少する。30

#### 【0191】

乳酸デヒドロゲナーゼの活性は、酵素に関するその他の分子操作により低下させることもできる。酵素活性を低下させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して任意の量で低下させることができる。場合によっては、酵素活性は、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%ほど(これらの割合の間の任意の値も含む)低下する。40

#### 【0192】

したがって、一部の場合では、内在性乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の活性を減弱させることで、内在性乳酸デヒドロゲナーゼの遺伝子発現を減弱させていない微生物と比較して、メバロン酸依存性の生合成経路への炭素の取り込みが増加する。

#### 【0193】

##### リンゴ酸酵素の関与する経路

リンゴ酸酵素(大腸菌(*E. coli*)では $sfcA$ 及び $mabB$ )は、次式に従いリンゴ酸のピルビン酸への変換を触媒する(NAD+又はNADP+を用いる)アナブレオティックな酵素である:

10

20

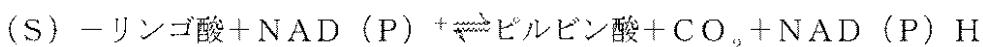
30

40

50

【0194】

【数1】



【0195】

したがって、この酵素の2種の基質は(S)-リンゴ酸及びNAD(P)<sup>+</sup>であり、これらにより3種の生成物、すなわち、ピルビン酸、CO<sub>2</sub>、及びNADPHが生成される。

【0196】

NADP依存性リンゴ酸酵素(maeB-図5)(Iwakura, M. et al. 1979, J. Biochem. 85: 1355~1365)を発現させて、1) TCAサイクルから放出された炭素を、アセチルCoAの直接的な前駆体でありそれ自体がメバロン酸経路の直接的な前駆体であるピルビン酸へと戻し、2) HMG-CoA還元酵素の反応に使用され得る過剰なNADPHを生成することにより、メバロン酸及び/又はイソプレンの収率の上昇を助けることができる(Oh, MK et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 13175~13183; Bologna, F. et al. (2007) J. Bact. 189: 5937~5946)。

【0197】

そのため、リンゴ酸酵素の活性及び/又は発現を増加させるなどして調節することにより下流でのメバロン酸、イソプレノイド前駆体、イソプレノイド及び/又はイソプレン生産に関する開始基質(ピルビン酸又はアセチルCoA)がより多く得られる。NADP依存性のリンゴ酸酵素遺伝子は、内在性遺伝子であってよい。非限定的な手法の1つとしては、NADP依存性のリンゴ酸酵素の内在性遺伝子プロモータを、常時発現型の合成発現プロモータにより置き換えるというものが挙げられる。酵素活性を増加させる手法のその他の非限定例としては、NADP依存性のリンゴ酸酵素ポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を用いるものが挙げられる。当業者は、容易に利用可能な分子生物学手技を行い、発酵又は培養する際に、maeB RNAの発現をモニターすることができる。

【0198】

したがって、一部の実施形態では、組み換え微生物は、NADP依存性のリンゴ酸酵素遺伝子の発現を増加させていない微生物と比較して、ピルビン酸の生産量が増加する。一部の態様では、NADP依存性のリンゴ酸酵素遺伝子の活性を増加させることで、NADP依存性のリンゴ酸酵素遺伝子の発現を増加させていない微生物と比較して、メバロン酸依存性の生合成経路への炭素原子の取り込みが増加する。

【0199】

ピルビン酸生成量の増加は、当業者に既知の所定のアッセイ法により測定できる。ピルビン酸の生産量は、分子的な操作を行なっていない場合と比較して、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%増加する。

【0200】

リンゴ酸酵素の活性は、酵素に関するその他の分子操作により増加させることもできる。酵素活性を増加させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して、任意の量で増加させることができる。一部の例では、酵素活性を、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%増加させる。

【0201】

10

20

30

40

50

### ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の関与する経路

ピルビン酸のアセチルCoAへの脱炭酸を触媒するピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体は、遺伝子aceE、aceF、及びlpdAによりコードされるタンパク質から構成される。これらの遺伝子の転写は、複数の制御因子により制御される。したがって、当業者は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性を調節して、アセチルCoAを増加することができる。調節により、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性及び/又は発現（例えば、常時発現）を増加させることができる。このような調節は、異なる手法により、例えば、PL.6 (aattcatataaaaaacatacagataaacccatctgcggtgataaattatctctggcggtgttgacataaaataccactggcggtgatactgagcacatcagcaggacgcactgacccatgaaggtg - ラムダプロモータ、GenBank NC\_001416)などの強力な常時発現型プロモータをオペロンの前に配置することにより、あるいは常時発現型合成プロモータを1種以上用いることにより行うことができる。

10

#### 【0202】

したがって、一態様では、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性は、(a)ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(E1)、(b)ジヒドロリポイルトランスアセチラーゼ、及び(c)ジヒドロリポイルデヒドロゲナーゼから構成されるピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体に関係する、1種以上の遺伝子の活性を増加させることで調節される。これらの遺伝子のうちの任意の1つ、2つ、又は3つを操作して、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性を増加させることは理解される。他の態様では、以降に更に説明するように、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性は、内在性ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のリプレッサー遺伝子の活性を減弱させることで調節できる。内在性ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のリプレッサーの活性は、内在性ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体リプレッサー遺伝子を欠失させることにより減弱させることができる。

20

#### 【0203】

一部の場合では、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体に関係する遺伝子の1つ以上は内在性遺伝子である。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性を増加させるその他の方法としては、微生物に、(a)ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(E1)、(b)ジヒドロリポイルトランスアセチラーゼ、及び(c)ジヒドロリポイルデヒドロゲナーゼからなる群に由来するポリペプチを1つ以上コードしている異種核酸を1つ以上導入することによるものが挙げられる。

30

#### 【0204】

これらの方法のうち任意のものを用いることで、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性の調節されていない微生物と比較して、組み換え微生物によるアセチルCo-Aの生産量を増加させることができる。ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性を調節することで、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの発現を調節していない微生物と比較して、メバロン酸依存性の生合成経路への炭素原子の取り込みを増加させることができる。

#### 【0205】

##### 変異の組み合わせ

本開示の酵素及び/又は酵素経路の何れかに関し、本開示の酵素及び/又は酵素経路の任意の組み合わせ（これらのうち2、3、4、5、又は6の組み合わせ）を調節する分子的操作は、明確に企図されることは理解される。組み合わせて詳細説明することを容易にする目的で、クエン酸シンターゼ(gltA)はAと表記し、ホスホトランスアセチラーゼ(ptaB)はBと表記し、酢酸キナーゼ(ackA)はCと表記し、乳酸デヒドロゲナーゼ(ldhA)はDと表記し、リンゴ酸酵素(sfcA又はmiaeB)はEと表記し、ピルビン酸デカルボキシラーゼ(aceE、aceF及び/又はlpdA)はFと表記する。上記の通り、ピルビン酸デカルボキシラーゼ複合体のaceE、aceF、及び/又はlpdA酵素を単独で使用して、又は3種の酵素のうち2種を、又は3種の酵素のうち3種を使用して、ピルビン酸デカルボキシラーゼの活性を増加させることができる。

40

#### 【0206】

50

したがって、酵素A～Fのうちの任意の2種の組み合わせとしては、限定するものではないが、A B、A C、A D、A E、A F、B C、B D、B E、B F、C D、C E、C F、D E、D F及びE Fを使用できる。酵素A～Fのうちの任意の3種の組み合わせとしては、限定するものではないが、A B C、A B D、A B E、A B F、B C D、B C E、B C F、C D E、C D F、D E F、A C D、A C E、A C F、A D E、A D F、A E F、B D E、B D F、B E F及びC E Fを使用できる。酵素A～Fのうちの任意の4種の組み合わせとしては、限定するものではないが、A B C D、A B C E、A B C F、A B D E、A B D F、A B E F、B C D E、B C D F、C D E F、A C D E、A C D F、A C E F、B C E F、B D E F及びA D E Fを使用できる。酵素A～Fのうちの任意の5種の組み合わせとしては、限定するものではないが、A B C D E、A B C D F、A B D E F、B C D E F、A C D E F及びA B C E Fを使用できる。他の態様では、6種の全ての酵素：A B C D E Fを使用する。

10

## 【0207】

したがって、本開示に記載する通りの組み換え微生物は、トリカルボン酸(TCA)サイクルの活性条件下で増殖しない微生物と比較して、メバロン酸生産を増加させることができ、(a)クエン酸シンターゼ、(b)ホスホトランスマセチラーゼ及び/又は酢酸キナーゼ、(c)乳酸デヒドロゲナーゼ、(d)リンゴ酸酵素、並びに(e)ピルビン酸デカルボキシラーゼ複合体からなる群の1つ以上の酵素の活性を調節することで、組み換え微生物における代謝性炭素の取り込みがメバロン酸の生産に指向する。

20

## 【0208】

## イソプレン生産量を増加させるその他の制御因子及び要因

他の分子的操作を使用して、イソプレン生産に向かう炭素取り込み量を増加させることができる。このような方法のうちの1つは、メバロン酸経路に合流する経路に対する負の制御効果を減少させ、低下させるか、又は除去するものである。例えば、一部の場合では、遺伝子a c e E F - l p d Aはオペロンであり、p d h Rの上流に遺伝子を4つ有する。p d h Rは、このオペロンの転写に対する負の制御因子である。p d h Rは、ピルビン酸の非存在下で標的プロモータに結合し、転写を抑制する。この制御因子は同様の手法でn d h及びc y o A B C Dも制御する(Ogasawara, H. et al. 2007. J. Bact. 189: 5534~5541)。一態様では、p d h R制御因子を欠失することにより、ピルビン酸の供給及びそれに伴うメバロン酸及び/又はイソプレンの生産性を向上させることができる。

30

## 【0209】

他の態様では、メバロン酸及び/又はイソプレンの生産性を向上させるために、PGLを欠損している微生物(各種大腸菌(E. coli)株など)に6-ホスホグルコノラクトナーゼ(PGL)を導入し、使用することができる。PGLは、染色体への組み込み、又はプラスミドなどの染色体外のビヒクルを用い、導入することができる。他の態様では、PGLを発現している細胞(例えば、各種大腸菌(E. coli)株などの微生物)のゲノムから、内在性のPGLを欠失させて、メバロン酸及び/又はイソプレンの生産を増大させることもできる。一部の態様では、PGLを欠失させることで、PGLを発現している微生物と比較して、包括的に約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100%ほど(これらの割合の間の任意の値も含む)、イソプレンの収率が高くなる。他の態様では、PGLを欠失させることで、PGLを発現している微生物と比較して、包括的に約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100%ほど(これらの割合の間の任意の値も含む)、イソプレンの瞬間的な収率が高くなる。他の態様では、PGLを欠失させることで、PGLを発現している微生物と比較して、包括的に約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100%ほど(これらの割合の間の任意の値も含む)、細胞生産性指数が高くなる。他の態様では、PGLを欠失させることで、PGLを発現している微生物と比較して、包括的に約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100%ほど(これらの割合の間の任意の値も含む)

40

50

、容積生産量が高くなる。他の態様では、PGLを欠失させることで、PGLを発現している微生物と比較して、包括的に約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100%ほど（これらの割合の間の任意の値も含む）、最大比生産量が高くなる。一部の態様では、PGLを欠失させることで、PGLを発現している微生物と比較して、より長い期間、最大比生産量が維持されることになる。

#### 【0210】

イソプレンの生産性を向上させることのできる組み換え細胞（細菌細胞など）

本明細書に記載の組み換え細胞（細菌細胞など）は、最小培地で培養した場合に、L.グレイ（*L. grayi*）、E.ファシウム（*E. faecium*）、E.ガリナラム（*E. gallinarum*）及び／又はE.カッセリファバス（*E. casseliflavus*）由来のmvae及びmvasポリペプチドをコードしている異種核酸の1つ以上のコピー、MVA経路下流のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を含まない同一の細胞と比較して、高濃度でイソプレンを生産することができる。一部の場合では、L.グレイ（*L. grayi*）、E.ファシウム（*E. faecium*）、E.ガリナラム（*E. gallinarum*）及び／又はE.カッセリファバス（*E. casseliflavus*）由来のmvae及びmvasポリペプチドをコードしている異種核酸の1つ以上のコピー、MVA経路下流のポリペプチドをコードしている異種核酸の1つ以上のコピー及びイソプレン合成酵素ポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸は、宿主細胞の染色体に組み込まれた異種核酸である。細胞（細菌細胞など）は、L.グレイ（*L. grayi*）、E.ファシウム（*E. faecium*）、E.ガリナラム（*E. gallinarum*）及び／又はE.カッセリファバス（*E. casseliflavus*）由来のmvae及びmvasポリペプチドを含まないイソプレン生産細胞（細菌細胞など）と比較して、少なくとも5%多量にイソプレンを生産することができる。あるいは、細胞（細菌細胞など）は、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%又は15%超、並びに包括的にこれらの数値の間の任意の数値だけ多量にイソプレンを生産することができる。

10

20

30

40

40

#### 【0211】

本発明の一態様では、L.グレイ（*L. grayi*）、E.ファシウム（*E. faecium*）、E.ガリナラム（*E. gallinarum*）及び／又はE.カッセリファバス（*E. casseliflavus*）由来のmvae及びmvasポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、メバロン酸（MVA）経路下流のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、DXP経路のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸及びイソプレン合成酵素ポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、を含む細胞（細菌細胞など）が提供される。細胞には、IDPポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を更に含ませてもよい。1つ以上の異種核酸は、調節可能なように常時発現型プロモータに連結させることができ、調節可能なように誘導型プロモータに連結させることができ、あるいは調節可能なように誘導型及び常時発現型プロモータと組み合わせて連結させることができる。1つ以上の異種核酸は、更に、調節可能なように高発現型プロモータ、低発現型プロモータ及び／又は強度が発現が中程度のプロモータに連結させることができる。L.グレイ（*L. grayi*）、E.ファシウム（*E. faecium*）、E.ガリナラム（*E. gallinarum*）及び／又はE.カッセリファバス（*E. casseliflavus*）由来のmvae及びmvasポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、メバロン酸（MVA）経路下流のポリペプチド、DXP経路のポリペプチド、及びイソプレン合成酵素ポリペプチドは、宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、あるいは細胞に安定的に発現させることができる。加えて、1つ以上の異種核酸は、ベクター上に存在させることもできる。

50

#### 【0212】

本明細書に記載の任意の組成物又は方法によるイソプレンの生産量は、増大させることができる（例えば、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、MVA経路下流のポリペプチド、DXP経路のポリペプチド並びに／あるいはL.グレイ（*L. grayi*）、E.ファシウム（*E. faecium*）、E.ガリナラム（*E. gallinarum*）

50

及び／又はE. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) mvaE 及びmvaS ポリペプチドの発現を増加させることにより）。本明細書で使用するとき、イソプレン生産量の「増大」は、本明細書に記載の任意の組成物及び方法により表される細胞による、イソプレンに関する細胞生産性指数（CPI）、イソプレンの力価、イソプレンの質量収率及び／又はイソプレンの比生産量が、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、MVA経路下流のポリペプチド、DXP経路のポリペプチド及び／又はL.グレイ（*L. grayi*）、E. フエシウム（*E. faecium*）、E. ガリナラム（*E. gallinarum*）及び／又はE. カセリフラバス（*E. casseliflavus*）由来のmvaE 及びmvaS ポリペプチドを有さない細胞によるものと比較して、上昇していることを指す。イソプレンの生産量は、約5%～約1,000,000倍増加させることができる。イソプレン生産量は、L.グレイ（*L. grayi*）、E. フエシウム（*E. faecium*）、E. ガリナラム（*E. gallinarum*）及び／又はE. カッセリファバス（*E. casseliflavus*）由来のmvaE 及びmvaS ポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を発現していない細胞によるイソプレン生産量と比較して、約10%～約1,000,000倍（例えば、約1～約500,000倍、約1～約50,000倍、約1～約5,000倍、約1～約1,000倍、約1～約500倍、約1～約100倍、約1～約50倍、約5～約100倍、約5～約1,000倍、約5～約500倍、約5～約100倍、約10～約50,000倍、約50～約10,000倍、約50～約1,000倍、約100～約5,000倍、約200～約1,000倍、約50～約500倍又は約50～約200倍）に増大させることができる。  
10

## 【0213】

イソプレンの生産量は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍、10,000倍、20,000倍、50,000倍、100,000倍又は1,000,000倍のうちの任意の割合だけ増加させることもできる。

## 【0214】

## 組み換え細胞を使用してイソプレンを生産する方法

本明細書では、L.グレイ（*L. grayi*）、E. フエシウム（*E. faecium*）、E. ガリナラム（*E. gallinarum*）及び／又はE. カッセリファバス（*E. casseliflavus*）由来のmvaE 及びmvaS ポリペプチド、MVA経路下流のポリペプチド及びイソプレン合成酵素ポリペプチドをコードしている異種核酸を1つ以上含む細胞（細菌細胞など）を培養する工程を含む、イソプレンの生産方法も提供する。イソプレンは、本開示の任意の方法に従い、本明細書に記載の任意の細胞から生産することができる。六炭糖（グルコースなど）などの炭水化物からイソプレンを生産する目的に際し、任意の細胞を使用することができる。  
30

## 【0215】

したがって、本明細書では、イソプレンの生産に好適な条件下で、L.グレイ（*L. grayi*）、E. フエシウム（*E. faecium*）、E. ガリナラム（*E. gallinarum*）及び／又はE. カッセリファバス（*E. casseliflavus*）由来のmvaE 及びmvaS ポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を含む細胞（細菌細胞など）を培養する工程、並びに（b）イソプレンを生産させる工程を含む、イソプレンの生産方法も提供する。細胞は、上記のMVA経路下流のポリペプチド（例えば、MVK、PMK、MVD及び／又はIDH）及び上記の任意のイソプレン合成酵素ポリペプチド（例えば、ブエラリア（*Pueraria*）のイソプレン合成酵素）をコードしている1つ以上の核酸分子を更に含み得る。一部の態様では、細胞（細菌細胞など）は、本明細書に記載の任意の細胞であってよい。本明細書に記載の任意のイソプレン合成酵素又はこれらの変異体、本明細書に記載の任意の微生物株（例えば、細菌など）又は植物細胞、本明細書に記載の任意のプロモータ及び／又は本明細書に記載の任意のベクターも、本明細書に記載の任意のエネルギー源（例えば、グルコース又は任意のその他の六炭糖）を使用するイソプレンの生産に使用することができる  
40  
50

。一部の態様では、イソブレンの生産方法は更に、イソブレンを回収する工程を含む。

#### 【0216】

一部の態様では、生産されるイソブレン量は、純生産量 (absolute productivity) が最大となった時点で測定されたものである。一部の態様では、細胞に関し純生産量が最大であるとは、本明細書で開示される任意のおよそのイソブレン量を指しているものである。一部の態様では、生産されたイソブレンの量は、比生産量が最大となった時点で測定されたものである。一部の態様では、細胞に関し比生産量が最大であるとは、本明細書で開示される、細胞あたりの任意のおよそのイソブレン量を指しているものである。一部の態様では、生産されたイソブレンの総量は累積値として測定される。一部の態様では、細胞の累積生産量は、本明細書で開示される任意のおよそのイソブレン量を指しているものである。一部の態様では、生産されるイソブレン量は、容積生産量が最大となった時点で測定されたものである。一部の態様では、細胞に関し容積生産量が最大であるとは、本明細書で開示される任意のおよそのイソブレン量を指しているものである。一部の態様では、イソブレンの生産量は、その時点までのグルコースに対する累積収率 (%) を測定するものである。一部の態様では、グルコースに対する累積収率 (%) は、本明細書に開示される任意の凡そイソブレン量を指しているものである。

10

#### 【0217】

一部の態様では、本明細書に記載の、任意の細胞（例えば、培養物中の細胞）は、約 1 、 10 、 25 、 50 、 100 、 150 、 200 、 250 、 300 、 400 、 500 、 600 、 700 、 800 、 900 、 1,000 、 1,250 、 1,500 、 1,750 、 2,000 、 2,500 、 3,000 、 4,000 又は 5,000 以上のうちのいずれかのイソブレン (nmole) / 細胞湿潤重量 (g) / 時間 (nmole / g<sub>wcm</sub> / hr) 値でイソブレンを生産する。一部の態様では、イソブレンの量は約 2 ~ 約 5,000 nmole / g<sub>wcm</sub> / hr であり、例えば、約 2 ~ 約 100 nmole / g<sub>wcm</sub> / hr 、約 100 ~ 約 500 nmole / g<sub>wcm</sub> / hr 、約 150 ~ 約 500 nmole / g<sub>wcm</sub> / hr 、約 500 ~ 約 1,000 nmole / g<sub>wcm</sub> / hr 、約 1,000 ~ 約 2,000 nmole / g<sub>wcm</sub> / hr 又は約 2,000 ~ 約 5,000 nmole / g<sub>wcm</sub> / hr である。一部の態様では、イソブレンの量は約 20 ~ 約 5,000 nmole / g<sub>wcm</sub> / hr 、約 100 ~ 約 5,000 nmole / g<sub>wcm</sub> / hr 、約 200 ~ 約 2,000 nmole / g<sub>wcm</sub> / hr 、約 300 ~ 約 1,000 nmole / g<sub>wcm</sub> / hr 又は約 400 ~ 約 1,000 nmole / g<sub>wcm</sub> / hr である。

20

#### 【0218】

一部の態様では、細胞は、培養時に、約 1 、 10 、 25 、 50 、 100 、 150 、 200 、 250 、 300 、 400 、 500 、 600 、 700 、 800 、 900 、 1,000 、 1,250 、 1,500 、 1,750 、 2,000 、 2,500 、 3,000 、 4,000 、 5,000 、 10,000 又は 100,000 以上のうちのいずれかのイソブレン (nmole) / 細胞湿潤重量 (g) / 時間 (ng / g<sub>wcm</sub> / h) 値でイソブレンを生産する。一部の態様では、イソブレンの量は、約 2 ~ 約 5,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h であり、例えば、約 2 ~ 約 100 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 100 ~ 約 500 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 500 ~ 約 1,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 1,000 ~ 約 2,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 又は約 2,000 ~ 約 5,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h である。一部の態様では、イソブレンの量は、約 20 ~ 約 5,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 100 ~ 約 5,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 200 ~ 約 2,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 300 ~ 約 1,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 又は約 400 ~ 約 1,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h である。

30

#### 【0219】

一部の態様では、細胞は、培養時に、約 1 、 10 、 25 、 50 、 100 、 150 、 200 、 250 、 300 、 400 、 500 、 600 、 700 、 800 、 900 、 1,000 、 1,250 、 1,500 、 1,750 、 2,000 、 2,500 、 3,000 、 4,000 、 5,000 、 10,000 又は 100,000 以上のうちのいずれかのイソブレン (ng) / 細胞湿潤重量 (g) / 時間 (ng / g<sub>wcm</sub> / h) 値でイソブレンを生産する。一部の態様では、イソブレンの量は、約 2 ~ 約 5,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h であり、例えば、約 2 ~ 約 100 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 100 ~ 約 500 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 500 ~ 約 1,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 1,000 ~ 約 2,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 又は約 2,000 ~ 約 5,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h である。一部の態様では、イソブレンの量は、約 20 ~ 約 5,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 100 ~ 約 5,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 200 ~ 約 2,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 300 ~ 約 1,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 又は約 400 ~ 約 1,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h である。

40

#### 【0219】

一部の態様では、細胞は、培養時に、約 1 、 10 、 25 、 50 、 100 、 150 、 200 、 250 、 300 、 400 、 500 、 600 、 700 、 800 、 900 、 1,000 、 1,250 、 1,500 、 1,750 、 2,000 、 2,500 、 3,000 、 4,000 、 5,000 、 10,000 又は 100,000 以上のうちのいずれかのイソブレン (ng) / 細胞湿潤重量 (g) / 時間 (ng / g<sub>wcm</sub> / h) 値でイソブレンを生産する。一部の態様では、イソブレンの量は、約 2 ~ 約 5,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h であり、例えば、約 2 ~ 約 100 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 100 ~ 約 500 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 500 ~ 約 1,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 1,000 ~ 約 2,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 又は約 2,000 ~ 約 5,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h である。一部の態様では、イソブレンの量は、約 20 ~ 約 5,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 100 ~ 約 5,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 200 ~ 約 2,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 、約 300 ~ 約 1,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h 又は約 400 ~ 約 1,000 ng / g<sub>wcm</sub> / h である。

50

0、5,000、10,000、50,000、100,000以上のうちのいずれかのイソブレン(mg)/プロス(L)(mg/Lプロス、プロス体積には、細胞及び細胞培地の体積を含む)値の累積力価(総量)でイソブレンを生産する。一部の態様では、イソブレンの量は、約2～約5,000mg/Lプロスであり、例えば、約2～約100mg/Lプロス、約100～約500mg/Lプロス、約500～約1,000mg/Lプロス、約1,000～約2,000mg/Lプロス、又は約2,000～約5,000mg/Lプロスなどである。一部の態様では、イソブレンの量は、約20～約5,000mg/Lプロス、約100～約5,000mg/Lプロス、約200～約1,000mg/Lプロス、約300～約1,000mg/Lプロス、又は約400～約1,000mg/Lプロスである。

10

## 【0220】

一部の態様では、細胞により、培養時に生産されるイソブレンは、発酵時排出気体(fermentation offgas)の体積の少なくとも約1、2、5、10、15、20又は25%を構成する。一部の態様では、イソブレンは、排出気体の体積の約1～約25%を構成し、例えば、約5～約15%、約15～約25%、約10～約20%又は約1～約10%を構成する。

## 【0221】

本明細書では、イソブレンの生産性を向上させた細胞が提供される。細胞によるイソブレンの生産量は、*L.グレイ*(*L. grayi*)、*E.ファシウム*(*E. faecium*)、*E.ガリナラム*(*E. gallinarum*)及び/又は*E.カッセリファバス*(*E. casseliflavus*)由来のmvae及びmvasポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、MVA経路下流のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、並びにイソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、の発現を増加させることにより増大させることができる。本明細書で使用するとき、イソブレン生産量の「増大」は、本明細書に記載の任意の組成物及び方法により表される細胞による、イソブレンに関する細胞生産性指数(CPI)、イソブレンの力価、イソブレンの質量収率、容積生産量及び/又はイソブレンの比生産量が、イソブレン合成酵素ポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、MVA経路下流のポリペプチド、DXP経路のポリペプチド及び/又は*L.グレイ*(*L. grayi*)、*E.ファシウム*(*E. faecium*)、*E.ガリナラム*(*E. gallinarum*)及び/又は*E.カッセリファバス*(*E. casseliflavus*)由来のmvae及びmvasポリペプチドを有さない細胞によるものと比較して、上昇していることを指す。イソブレンの生産量は、約5%～約1,000,000倍増加させることができる。イソブレン生産量は、*L.グレイ*(*L. grayi*)、*E.ファシウム*(*E. faecium*)、*E.ガリナラム*(*E. gallinarum*)及び/又は*E.カッセリファバス*(*E. casseliflavus*)由来のmvae及びmvasポリペプチドを内因的に有していない細胞によるイソブレン生産量と比較して、約10%～約1,000,000倍(例えば、約50%～約1,000,000倍、約1～約500,000倍、約1～約50,000倍、約1～約5,000倍、約1～約1,000倍、約1～約500倍、約1～約100倍、約1～約50倍、約5～約100,000倍、約5～約10,000倍、約5～約1,000倍、約5～約500倍、約5～約100倍、約10～約50,000倍、約50～約10,000倍、約100～約5,000倍、約200～約1,000倍、約50～約500倍又は約50～約200倍)に増大させることができる。

20

## 【0222】

本開示の任意の方法による、細胞によるイソブレンの生産量は、増大させることができる(例えば、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を発現させることで増大させることができる)。イソブレンの生産量は、約5%～約1,000,000倍増加させることができる。イソブレンの生産は、天然に生じる細胞(例えば、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を発現していない細胞)によりイソブレンを生産させた場合と比較して、約10%～約1,000,000倍(例えば、約50%～約1,000,000倍、約1～約500,000倍、約1～約50,000倍、約1～約5,000倍、約1～約1,000倍、約1～約500倍、約1～約100倍、約1～約50倍、約5～約100,000倍、約5～約10,000倍、約5～約1,000倍、約5～約500倍、約5～約100倍、約10～約50,000倍、約50～約10,000倍、約100～約5,000倍、約200～約1,000倍、約50～約500倍又は約50～約200倍)に増大させることができる。

30

## 【0223】

本開示の任意の方法による、細胞によるイソブレンの生産量は、増大させることができる(例えば、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を発現させることで増大させることができる)。イソブレンの生産量は、約5%～約1,000,000倍増加させることができる。イソブレンの生産は、天然に生じる細胞(例えば、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を発現していない細胞)によりイソブレンを生産させた場合と比較して、約10%～約1,000,000倍(例えば、約50%～約1,000,000倍、約1～約500,000倍、約1～約50,000倍、約1～約5,000倍、約1～約1,000倍、約1～約500倍、約1～約100倍、約1～約50倍、約5～約100,000倍、約5～約10,000倍、約5～約1,000倍、約5～約500倍、約5～約100倍、約10～約50,000倍、約50～約10,000倍、約100～約5,000倍、約200～約1,000倍、約50～約500倍又は約50～約200倍)に増大させることができる。

40

50

1～約50,000倍、約1～約5,000倍、約1～約1,000倍、約1～約500倍、約1～約100倍、約1～約100倍、約5～約100,000倍、約5～約10,000倍、約5～約1,000倍、約5～約500倍、約5～約10,000倍、約100～約5,000倍、約200～約1,000倍、約50～約500倍、又は約50～約200倍)に増加させることができる。イソプレンの生産量は、天然に生じる細胞によるイソプレン生産量、すなわち、*L.グレイ*(*L. grayi*)、*E. ファシウム*(*E. faecium*)、*E. ガリナラム*(*E. gallinarum*)及び/又は*E. カッセリファバス*(*E. casseliflavus*)由来のmvAE及びmvASポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を発現していない細胞によるイソプレン生産量と比較して、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍、10,000倍、20,000倍、50,000倍、100,000倍、200,000倍、500,000倍又は1,000,000倍に増大させることもできる。  
10

## 【0223】

イソプレノイドの生産量を増大させることのできる組み換え細胞(細菌細胞など)

イソプレノイドは、多くの生物において、MVA経路により生成されるイソプレノイド前駆体分子の合成により生産させることができる。上記のように、イソプレノイドは、重要な部類の化合物として存在し、例えば、食品及び飼料用サプリメント、風味及び臭気化合物、並びに抗癌、抗マラリア、抗真菌及び抗菌化合物を含む。  
20

## 【0224】

分子の部類の際には、イソプレノイドは、化合物を構成しているイソプレン単位の数に基づき分類される。モノテルペンは10個の炭素原子又は2個のイソプレン単位を含み、セスキテルペンは15個の炭素原子又は3個のイソプレン単位を含み、ジテルペンは20個の炭素原子又は4個のイソプレン単位を含み、セステルテルペンは25個の炭素原子又は5個のイソプレン単位を含む。ステロイド(一般的に、炭素原子を約27個含む)は、イソプレノイドを分解又は再構成した生成物である。

## 【0225】

イソプレノイドは、イソプレノイド前駆体分子のIPP及びDMAPPから生成することができる。これらの多様な化合物は、これらより単純で一般的な前駆体から誘導され、及び保存されているポリプレニルピロリン酸合成酵素群により合成される(Hsieh et al., Plant Physiol. 2011 Mar; 155(3): 1079~90)。多様な鎖長を有するこれらの直鎖プレニルピロリン酸はそれぞれに特有の生理機能を示し、及びポリプレニルピロリン酸合成酵素の非常に発達した活性部位により、一般的にアリル基(ジメチルアリルニリン酸(C<sub>5</sub>-DMAPP)、ゲラニルピロリン酸(C<sub>10</sub>-GPP)、ファルネシリルピロリン酸(C<sub>15</sub>-FPP)、ゲラニルゲラニルピロリン酸(C<sub>20</sub>-GGPP))と、相当する数のイソペンテニルピロリン酸との縮合反応を介し、認識される(C<sub>5</sub>-IPP)(Hsieh et al., Plant Physiol. 2011 Mar; 155(3): 1079~90)。  
30

## 【0226】

*L.グレイ*(*L. grayi*)、*E. ファシウム*(*E. faecium*)、*E. ガリナラム*(*E. gallinarum*)又は*E. カッセリファバス*(*E. casseliflavus*)由来のmvAE及びmvASポリペプチドをコードしている異種核酸の1つ以上のコピーを発現しており、メバロン酸又はイソプレノイド前駆体又は上記のイソプレンの生産量を増大させることのできる任意の組み換え宿主細胞では、イソプレノイド前駆体及び/又はイソプレノイドの生産量を増大させることもできる。一部の態様では、これらの細胞は、上記のように、MVA経路下流、IDI及び/又はDXP経路のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、並びにポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸を更に含む。理論に束縛されるものではないが、上記の任意の組成物及び方法により、細胞(細菌細胞など)において、イソプレノイド前駆体の生産(cellular production)を増大させ  
40

ることにより、結果的に多量のイソプレノイドを生産させることができる。グルコースからのイソプレノイド前駆体生産量のモル収率を増大させ、適切な酵素活性濃度で、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ、イソペンテニルリシン酸イソメラーゼ及びイソプレノイド生産に好適な他の酵素と組み合わせると、イソプレノイドのモル収率の増大につながる。同様に、理論に束縛されるものではないが、上記の任意の組成物及び方法により、細胞（細菌細胞など）におけるメバロン酸の生産を増大させることで、同様に、イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドなどより高分子量の生成物の生産も増大するものと考えられる。グルコースからのメバロン酸生産量のモル収率を上昇させ、適切な酵素活性濃度で、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ、イソペンテニルリシン酸イソメラーゼ並びにイソブレン及びイソプレノイド生産に好適な他の酵素と組み合わせると、イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイド（イソブレンを含む）のモル収率の上昇につながる。

10

20

30

40

50

### 【0227】

一部の態様では、本明細書に記載の細胞は、イソプレノイド生産細胞である。一部の態様では、イソプレノイド生産細胞は、イソプレノイドを生産することのできる野生型細胞である。他の態様では、イソプレノイド生産細胞は、MVA経路上流の1種以上の異種ポリペプチド、MVA経路下流のポリペプチド、ポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチド、DXP経路のポリペプチド及び／又はIDPポリペプチドを含有するよう遺伝子操作した、非天然に生じる細胞である。更なる態様では、イソブレン生産細胞には、内因性及び異種性の、MVA経路上流のポリペプチド、MVA経路下流のポリペプチド、ポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチド、DXP経路のポリペプチド及び／又はIDPポリペプチドを両方含有させることもできる。

### 【0228】

#### イソプレノイドの種類

本発明の細胞（細菌細胞など）のイソプレノイド生産量は増大させることができる。イソプレノイドの例としては、限定するものではないが、ヘミテルペノイド、モノテルペノイド、セスキテルペノイド、ジテルペノイド、セステルテルペノイド、トリテルペノイド、テトラテルペノイド、及びより高分子量のポリテルペノイドが挙げられる。一部の態様では、ヘミテルペノイドは、ブレノール（すなわち、3-メチル-2-ブテン-1-オール）、イソブレノール（すなわち、3-メチル-3-ブテン-1-オール）、2-メチル-3-ブテン-2-オール、又はイソ吉草酸である。一部の態様では、モノテルペノイドは、限定するものではないが、ゲラニルピロリン酸、オイカリプトール、リモネン、又はピネンであってよい。一部の態様では、セスキテルペノイドはファルネシリピロリン酸、アルテミシニン、又はビサボロールである。一部の態様では、ジテルペノイドは、限定するものではないが、ゲラニルゲラニルピロリン酸、レチノール、レチナール、フィトール、タキソール、フォルスコリン、又はアフィジコリンであってよい。一部の態様では、トリテルペノイドは、スクアレン又はラノステロールであってよい。イソプレノイドは、アビエタジエン、アモルファジエン、カレン、-ファルネセン(-farnesene)、-ファルネセン、ファルネソール、ゲラニオール、ゲラニルゲラニオール、リナロール、リモネン、ミルセン、ネロリドール、オシメン、パチョロール、-ピネン、サビネン、-テルピネン、テルピンデン(terpinene)及びバレンセンからなる群から選択することができる。

### 【0229】

一部の態様では、テトラテルペノイドは、リコピン又はカラチン（カラチノイド）である。本明細書で使用するとき、用語「カラチノイド」は、クロロプラスト中で、並びに植物、何らかの他の光合成生物、例えば藻類、ある種の真菌、ある種のバクテリア、のクロロプラスト中で生産される、天然に生じる有機色素群を指す。カラチノイドとしては、酸素を含有しているキサントフィル及び酸素を含有していないカラテンが挙げられる。一部の態様では、カラチノイドはキサントフィル及びカラテンからなる群から選択される。

部の態様では、キサントフィルはルテイン又はゼアキサンチンである。一部の態様では、カロチノイドは、 $\alpha$ -カロチン、 $\beta$ -カロチン、 $\gamma$ -カロチン、 $\delta$ -クリプトキサンチン又はリコピンである。

### 【0230】

ポリプレニルピロリン酸シンターゼのポリペプチドをコードしている異種核酸

本発明の一部の態様では、本明細書において任意の組成物又は方法に記載されるように、細胞は、更に、上記の通りにメバロン酸(MVA)経路下流のポリペプチドを1つ以上コードしている核酸、並びにポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸を更に含む。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドは、内在性ポリペプチドであってよい。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、常時発現型プロモータに調節可能なように連結させてよく、あるいは同様に、調節可能なように誘導型プロモータに連結させてもよい。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、更に、調節可能なように高発現型プロモータと連結させてもよい。あるいは、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている内在性の核酸は、調節可能なように低発現型プロモータと連結させてもよい。詳細には、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性のポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドを過剰発現するよう遺伝子操作することができる。

10

### 【0231】

一部の態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドは、異種ポリペプチドである。本発明の細胞は、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸の1つ以上のコピーを含む。一部の態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように常時発現型プロモータに連結されている。一部の態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように誘導型プロモータに連結されている。一部の態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように高発現型プロモータに連結されている。一部の態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように低発現型プロモータに連結されている。

20

### 【0232】

ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、あるいは細胞で安定的に発現させることができる。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている核酸は、更にベクター上に存在させてもよい。

30

### 【0233】

ポリプレニルピロリン酸シンターゼの核酸の例としては、ポリプレニルピロリン酸シンターゼの活性を少なくとも1種有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又は融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドは、イソブレノイド前駆体分子をより複雑なイソブレノイド化合物に変換する。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドの例としては、イソブレンシンターゼポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、並びに融合ポリペプチドが挙げられる。ポリプレニルピロリン酸シンターゼのポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載されるような任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸が挙げられる。加えて、ポリプレニルピロリン酸シンターゼ変異体は、酵素活性が向上しているなどして、活性が向上されていてよい。一部の態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼ変異体は、安定性(例えば、熱安定性)が改良されている、及び/又は溶解性が改良されているなどして、その他の特性が改良されている。ポリプレニルピロリン酸シンターゼの核酸の例としては、限定するものではないが、ゲラニルジホスフェート(geranyl diphosphosphate)(GPP)合成酵素、ファルネシルピロリン酸(FPP)合成酵素、及びゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)合成酵素、又はその他の任意の既知のポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドなど、ポリプレニ

40

50

ルピロリン酸シンターゼのポリペプチドをコードしている核酸を挙げることができる。

【0234】

本発明の一部の態様では、本明細書において任意の組成物又は方法に記載されるように、細胞は、ファルネシリルピロリン酸（FPP）合成酵素をコードしている1つ以上の核酸を更に含む。FPP合成酵素ポリペプチドは、内在性遺伝子によりコードされている内在性ポリペプチドであってもよい。一部の態様では、FPP合成酵素ポリペプチドは、大腸菌（*E. coli*）において内在性*ispa*遺伝子によりコードされている。FPP合成酵素ポリペプチドをコードしている内在性の核酸は、調節可能なように常時発現型プロモータに連結させることができ、あるいは同様に調節可能なように誘導型プロモータに連結させることができる。FPP合成酵素ポリペプチドをコードしている内在性の核酸は、更に、調節可能なように高発現型プロモータに連結させることができる。特に、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性FPP合成酵素ポリペプチドを過剰発現するよう遺伝子操作することができる。

10

【0235】

一部の態様では、FPP合成酵素ポリペプチドは異種ポリペプチドである。本発明の細胞は、FPP合成酵素ポリペプチドをコードしている異種核酸の1つ以上のコピーを含み得る。一部の態様では、FPP合成酵素ポリペプチドをコードしている異種核酸は、常時発現型プロモータに調節可能なように連結される。一部の態様では、FPP合成酵素ポリペプチドをコードしている異種核酸は、誘導型プロモータに調節可能なように連結される。一部の態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように高発現型プロモータに連結されている。

20

【0236】

FPP合成酵素ポリペプチドをコードしている核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、あるいは細胞で安定的に発現させることができる。FPP合成酵素ポリペプチドをコードしている核酸は、更にベクターに組み込むこともできる。

【0237】

インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボで、ポリペプチドがIPPをイソプレノイドへと変換する能力を測定して、ポリペプチドがポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチド活性を有するか否かを判定する際には、標準法を使用できる。これらの手法は当該技術分野において周知であり、例えば、米国特許第7,915,026号；Hsieh et al., Plant Physiol. 2011 Mar; 155(3): 10

30

79~90; Danner et al., Phytochemistry. 2011 Apr 12 [Epub ahead of print]; Jones et al., J Biol Chem. 2011 Mar 24 [Epub ahead of print]; Keeling et al., BMC Plant Biol. 2011 Mar 7; 11:43; Martin et al., BMC Plant Biol. 2010 Oct 21; 10:226; Kumeta & Ito, Plant Physiol. 2010 Dec; 154(4): 1998~2007; and Kollner & Boland, J Org Chem. 2010 Aug 20; 75(16): 5590~600に記載されている。

40

【0238】

イソプレノイドの生産量を増大させることのできる組み換え細胞（細菌細胞など）

本明細書に記載の組み換え細胞（細菌細胞など）は、所望により最小培地で培養した場合に、*L.グレイ*（*L. grayi*）、*E.ファシウム*（*E. faecium*）、*E.ガリナラム*（*E. gallinarum*）及び／又は*E.カッセリファバス*（*E. casseliflavus*）由来のmvae及びmvapリペプチドをコードしている異種核酸の1つ以上のコピー、MVA経路下流のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、ポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を含まない同一の細胞と比較して、高濃度でイソプレノイドを生産することができる。一部の場合では、*L.グレイ*（*L. grayi*）、*E.ファシウム*（*E. faecium*）、*E.ガリナラム*（*E. gallinarum*）及び／又は*E.カ*

50

ッセリファバス (*E. casseliflavus*) ) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている異種核酸の 1 つ以上のコピー、 MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている異種核酸の 1 つ以上のコピー及びポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸は、宿主細胞の染色体に組み込まれた異種核酸である。細胞（細菌細胞など）は、 *L. grayi* (*L. grayi*) 、 *E. faecium* 、 *E. gallinarum* 及び / 又は *E. casseliflavus* ) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドを含まないイソプレノイド生産細胞（細菌細胞など）と比較して、少なくとも 5 % 多量にイソプレノイドを生産することができる。あるいは、細胞（細菌細胞など）は、約 1 % 、 2 % 、 3 % 、 4 % 、 5 % 、 6 % 、 7 % 、 8 % 、 9 % 、 10 % 、 11 % 、 12 % 、 13 % 、 14 % 又は 15 % 超、並びに包括的にこれらの数値の間の任意の数値だけ多量にイソプレノイドを生産することができる。

10

## 【 0239 】

本発明の一態様では、 *L. grayi* (*L. grayi*) 、 *E. faecium* 、 *E. gallinarum* 及び / 又は *E. casseliflavus* ) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、メバロン酸 (MVA) 経路下流のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、 DXP 経路のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸並びにポリプレニルピロリン酸合成酵素をコードしている 1 つ以上の異種核酸を含む細胞（細菌細胞など）が提供される。細胞には、 IDI ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸を更に含ませてもよい。更に、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドは、 FPP 合成酵素ポリペプチドであってよい。 1 つ以上の異種核酸は、調節可能なように常時発現型プロモータに連結させることができ、調節可能なように誘導型プロモータに連結させることができ、あるいは調節可能なように誘導型及び常時発現型プロモータと組み合わせて連結させることができる。 1 つ以上の異種核酸は、更に、調節可能なように高発現型プロモータ、低発現型プロモータ及び / 又は強度が発現が中程度のプロモータに連結させることができる。 *L. grayi* (*L. grayi*) 、 *E. faecium* 、 *E. gallinarum* 及び / 又は *E. casseliflavus* ) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、メバロン酸 (MVA) 経路下流のポリペプチド、 DXP 経路のポリペプチド、及びポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドは、宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、あるいは細胞に安定的に発現させることができる。加えて、 1 つ以上の異種核酸は、ベクター上に存在させることもできる。

20

## 【 0240 】

本明細書では、イソプレノイドの生産量を増大させるために上記の任意の細胞を使用する方法を提供する。細胞によるイソプレノイドの生産量は、 *L. grayi* (*L. grayi*) 、 *E. faecium* 、 *E. gallinarum* 及び / 又は *E. casseliflavus* ) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、 MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、並びにポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、の発現を増加させることにより増大させることができる。本明細書で使用するとき、イソプレノイド生産量の「増大」は、本明細書に記載の任意の組成物及び方法により表される細胞による、イソプレノイドに関する細胞生産性指数 (CPI) 、イソプレノイドの力価、イソプレノイドの質量収率、及び / 又はイソプレノイドの比生産量が、ポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、 MVA 経路下流のポリペプチド、 DXP 経路のポリペプチド及び / 又は *L. grayi* (*L. grayi*) 、 *E. faecium* 、 *E. gallinarum* 及び / 又は *E. casseliflavus* ) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドを有さない細胞によるものと比較して、上昇していることを指す。イソプレノイドの生産量は、約 5 % ~ 約 1,000,000 倍増大させることができる。イソプレノイドの生産量は、 *L. grayi* (*L. grayi*) 、 *E. faecium* 、 *E. gallinarum* 及び / 又は *E. casseliflavus* ) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、 MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、及びポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、の発現を増加させることにより増大させることができる。イソプレノイドの生産量は、

30

40

50

Sポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を発現していない細胞によるイソプレノイドの生産量と比較して、約10%～約1,000,000倍（例えば、約1～約500,000倍、約1～約50,000倍、約1～約5,000倍、約1～約1,000倍、約1～約500倍、約1～約100,000倍、約5～約100,000倍、約5～約10,000倍、約5～約1,000倍、約5～約50,000倍、約50～約10,000倍、約100～約5,000倍、約200～約1,000倍、約50～約500倍又は約50～約200倍）に増大させることができる。

#### 【0241】

他の態様では、本開示の任意の方法による、細胞によるイソプレノイドの生産量は、増大させることができる（例えば、*L.グレイ* (*L. grayi*)、*E.ファシウム* (*E. faecium*)、*E.ガリナラム* (*E. gallinarum*)及び／又は*E.カッセリファバス* (*E. casseliflavus*)由来のmv a E及びmv a Sポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、MVA経路下流のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸及びポリブレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸の発現を増加させることにより）。イソプレノイドの生産量は、約5%～約1,000,000倍増大させることができる。イソプレノイドの生産量は、天然に生じる細胞（例えば、*L.グレイ* (*L. grayi*)、*E.ファシウム* (*E. faecium*)、*E.ガリナラム* (*E. gallinarum*)及び／又は*E.カッセリファバス* (*E. casseliflavus*)由来のmv a E及びmv a Sポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を発現していない細胞）によるイソプレノイド生産量と比較して、約10%～約1,000,000倍（例えば、約1～約500,000倍、約1～約50,000倍、約1～約5,000倍、約1～約1,000倍、約1～約500倍、約1～約100,000倍、約5～約100,000倍、約5～約10,000倍、約5～約1,000倍、約5～約50,000倍、約50～約10,000倍、約100～約5,000倍、約200～約1,000倍、約50～約500倍又は約50～約200倍）に増大させることができる。

#### 【0242】

イソプレノイドの生産量は、天然に生じる細胞による、すなわち*L.グレイ* (*L. grayi*)、*E.ファシウム* (*E. faecium*)、*E.ガリナラム* (*E. gallinarum*)及び／又は*E.カッセリファバス* (*E. casseliflavus*)由来のmv a E及びmv a Sポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を発現していない細胞によるイソプレノイドの生産量と比較して、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍、10,000倍、20,000倍、50,000倍又は1,000,000倍に増大させることができる。

#### 【0243】

##### 組み換え細胞を使用してイソプレノイド分子を生産する方法

本明細書では、*L.グレイ* (*L. grayi*)、*E.ファシウム* (*E. faecium*)、*E.ガリナラム* (*E. gallinarum*)及び／又は*E.カッセリファバス* (*E. casseliflavus*)由来のmv a E及びmv a Sポリペプチド、MVA経路下流のポリペプチド及びポリブレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドをコードしている異種核酸を1つ以上含む細胞（細菌細胞など）を培養する工程を含む、イソプレノイドの生産方法も提供する。イソプレノイドは、本開示の任意の方法に従い、本明細書に記載の任意の細胞から生産することができる。六炭糖（グルコースなど）などの炭水化物からイソプレノイドを生産する目的に際し、任意の細胞を使用することができる。

#### 【0244】

したがって、本明細書では、イソプレノイドの生産に好適な条件下で、*L.グレイ* (*L. grayi*)、*E.ファシウム* (*E. faecium*)、*E.ガリナラム* (*E. gallinarum*)及び／又

10

20

30

40

50

は E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸を含む細胞（細菌細胞など）を培養する工程、並びに（b）イソプレノイド前駆体及び／又はイソプレノイドを生産させる工程を含む、イソプレノイドの生産方法も提供する。細胞には、上記の MVA 経路下流のポリペプチド（例えば、MVK、PMK、MVD 及び／又は IDI）及び上記の任意のポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸分子を更に含ませることができる。一部の態様では、細胞（細菌細胞など）は、本明細書に記載の任意の細胞であってよい。本明細書に記載の任意のポリプレニルピロリン酸合成酵素又はこれらの変異体、任意の微生物株（例えば、細菌）又は本明細書に記載の植物細胞、本明細書に記載の任意のプロモータ及び／又は本明細書に記載の任意のベクターを使用し、本明細書に記載の任意のエネルギー源（例えば、グルコース又は任意の他の六炭糖）を利用して、イソプレノイドを生産することもできる。一部の態様では、イソプレノイドの生産方法は、イソプレノイドを回収する工程を更に含む。

10

## 【0245】

イソプレノイドの生産方法には、次の工程（a）並びに（b）を包含させることができる：（a）*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 及び／又は *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を内因的に有していない細胞（限定するものではないが、大腸菌 (*E. coli*) 細胞などの細菌細胞など）を培養する工程、細胞（細菌細胞など）は、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 又は *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE ポリペプチド及び mvaS ポリペプチドをコードしている遺伝子の 1 つ以上のコピーを異種発現する、並びに（b）イソプレノイドを生産させる工程、細胞（細菌細胞など）は、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 及び／又は *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE ポリペプチド及び mvaS ポリペプチドを含まないイソプレノイド生産細胞よりも多量にイソプレノイドを生産する。

20

## 【0246】

イソプレノイドの生産に関する本発明の方法では、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 及び／又は *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドを含まないイソプレノイド生産細胞（細菌細胞など）と比較して、少なくとも 5 % 多量にイソプレノイドを生産することができる。あるいは、細胞（細菌細胞など）は、約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 % 又は 15 % 超、並びに包括的にこれらの数値の間の任意の数値だけイソプレノイドを生産することができる。一部の態様では、イソプレノイドの生産方法は、イソプレノイドを回収する工程を更に含む。

30

## 【0247】

本明細書では、イソプレノイドの生産量を増大させるために上記の任意の細胞を使用する方法を提供する。細胞によるイソプレノイドの生産量は、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 及び／又は *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、MVA 経路下流のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、並びにポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、の発現を増加させることにより増大させることができる。本明細書で使用するとき、イソプレノイド生産量の「増大」は、本明細書に記載の任意の組成物及び方法により表される細胞による、イソプレノイドに関する細胞生産性指数（CPI）、イソプレノイドの力価、イソプレノイドの質量収率、及び／又はイソプレノイドの比生産量が、ポリプレニルピロリン酸合成酵素ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸、MVA 経路下流のポリペプチド、DXP 経路のポリペプチド及び／又は *L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 及び／又は *E.*

40

50

カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドを有さない細胞によるものと比較して、上昇していることを指す。イソプレノイドの生産量は、約 5 % ~ 約 1,000,000 倍増大させることができる。イソプレノイドの生産量は、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 及び / 又は *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸を発現していない細胞によるイソプレノイドの生産量と比較して、約 10 % ~ 約 1,000,000 倍 (例えば、約 1 ~ 約 500,000 倍、約 1 ~ 約 50,000 倍、約 1 ~ 約 5,000 倍、約 1 ~ 約 1,000 倍、約 1 ~ 約 500 倍、約 1 ~ 約 100 倍、約 1 ~ 約 50 倍、約 5 ~ 約 100,000 倍、約 5 ~ 約 10,000 倍、約 5 ~ 約 1,000 倍、約 5 ~ 約 10,000 倍、約 5 ~ 約 1,000 倍、約 5 ~ 約 50,000 倍、約 5 ~ 約 10,000 倍、約 100 ~ 約 5,000 倍又は約 50 ~ 約 2,000 倍) に増大させることができる。  
10

## 【0248】

イソプレノイドの生産量は、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 及び / 又は *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチドをコードしている 1 つ以上の異種核酸を発現していない細胞によるイソプレノイドの生産量と比較して、少なくとも約 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、1 倍、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍、1000 倍、2000 倍、5000 倍、10000 倍、20000 倍、50000 倍又は 1,000,000 倍に増大させることもできる。  
20

## 【0249】

加えて、より具体的な細胞培養条件を使用して、本明細書に記載の方法により細胞を培養することができる。例えば、一部の態様では、イソプレノイドの生産方法は、次の工程 (a) 並びに (b) を包含する；(a) *L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 及び / 又は *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 遺伝子及び mvaS 遺伝子を内因的に有さない細胞 (限定するものではないが、大腸菌 (*E. coli*) 細胞などの細菌細胞など) を、34 下で培養する工程、細胞 (細菌細胞など) は、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 又は *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE ポリペプチド及び mvaS ポリペプチドをコードしている遺伝子の 1 つ以上のコピーを、低 ~ 中間コピー数のプラスミドにおいて高発現型プロモータの調節下で異種発現する、並びに (b) メバロン酸などのイソプレノイドを生産させる工程。一部の態様では、メバロン酸の生産方法は、イソプレノイド前駆体分子及び / 又はイソプレノイドを回収する工程を更に含む。  
30

## 【0250】

## ベクター

本明細書に記載の任意の組成物及び方法には好適なベクターを使用することができる。例えば、好適なベクターを使用して、嫌気性菌での、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 又は *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS ポリペプチド、イソプレン合成酵素、ポリブレニルピロリン酸合成酵素及び / 又は 1 つ以上の MVA 経路ポリペプチドをコードしている遺伝子の 1 つ以上のコピーの発現を、最適化することができる。一部の態様では、ベクターには選択マーカーを含有させる。選択可能なマーカーの例としては、これらに限定するものではないが、抗生物質耐性核酸 (例えば、カナマイシン、アンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、ヒグロマイシン、フェロマイシン、ブレオマイシン、ネオマイシン又はクロラムフェニコール)、及び / 又はホスト細胞に栄養的な利点などの代謝的な利点を与える核酸が挙げられる。一部の態様では、選択マーカーは使用せずに、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. ファシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナラム* (*E. gallinaru*  
40

10

20

30

40

50

m) 又は E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS 核酸の 1つ以上のコピー、イソプレン合成酵素、ポリプレニルピロリン酸合成酵素並びに / 又は MVA 経路ポリペプチドの 1つ以上の核酸を宿主細胞のゲノムに組み込む。

#### 【0251】

本開示の実施例において特徴づけられ又は使用される任意の 1つのベクターを使用することができる。

#### 【0252】

##### 形質転換法

L. グレイ (*L. grayi*)、E. ファシウム (*E. faecium*)、E. ガリナラム (*E. gallinarum*) 又は E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の mvaE 及び mvaS 核酸、イソプレン合成酵素及び / 又は MVA 経路下流のポリペプチドのうちの、1つ以上のコピーをコードしている核酸を、適切な手法により微生物に挿入することができる。更に、イソプレンシンターゼ、IDI、DXP 経路及び / 又はポリプレニルピロリン酸シンターゼの核酸、又はこれらを含むベクターは、形質転換、電気穿孔法、核マイクロインジェクション、形質導入、形質移入（例えばリポフェクション介在型若しくは DEAE - デキストラン介在型トランスフェクション、又は組み換えファージウイルスを使用した形質移入）、リン酸カルシウム DNA 沈殿物とのインキュベーション、DNA コーティングした微粒子を用いる高速遺伝子銃照射、及びプロトプラスト融合などの、宿主細胞内に DNA コンストラクト又はベクターを導入するための標準的な技術を使用して宿主細胞（例えば本明細書において述べられるような植物細胞、真菌細胞、酵母細胞、又は細菌細胞）内に挿入することができる。一般的な形質転換法は、当該技術分野で既知である（例えば、分子生物学領域の現行のプロトコル（F. M. Ausubel et al. (eds.) Chapter 9, 1987; Sambrook et al., 「分子クローニング (Molecular Cloning)」：「実験室マニュアル (A Laboratory Manual) 第 2 版」, Cold Spring Harbor, 1989；及び Campbell et al., Curr. Genet. 16: 53 ~ 56, 1989 を参照されたい）。導入された核酸は、染色体 DNA に組み込むことができ、又は染色体外の複製配列として維持することができる。形質転換体は、当該技術分野において既知の任意の方法により選択することができる。形質転換体を選択するのに好適な手法としては、国際公開第 2009/076676 号、米国特許出願第 12/335,071 号（米国特許出願公開第 2009/0203102 号）、国際公開 2010/003007 号、米国特許出願公開第 2010/0048964 号、国際公開 2009/132220 号及び米国特許出願公開第 2010/0003716 号が挙げられる。

#### 【0253】

##### 精製方法例

一部の態様では、本明細書に記載の任意の方法は更に、生産された化合物を回収する工程を包含する。一部の態様では、本明細書に記載の任意の方法は更に、イソプレンを回収する工程を包含する。一部の態様では、イソプレンは、吸着ストリッピング法により回収される（例えば、米国特許出願公開第 2011/0178261 号を参照されたい。この特許文献の内容は、参照によりその全体が、特に吸着ストリッピング法及び精製法についての記載が、本明細書に組み込まれる）。一部の態様では、本明細書に記載の任意の方法は更に異種ポリペプチドを回収する工程を包含する。一部の態様では、本明細書に記載の任意の方法は更に、テルペノイド又はカロチノイドを回収する工程を含む。

#### 【0254】

好適な精製方法は、米国特許出願公開第 2010/0196977 (A1) 号により詳細に記載されている。

#### 【0255】

本発明は、実例として提供され、制限することを意味するものではない以降の実施例を参照することにより更に理解することができる。

#### 【実施例】

10

20

30

40

50

## 【0256】

実施例1：大腸菌（*E. coli*）株C M P 4 5 1（B L 2 1 p g l + P L . 2 m K K D y I G I 1 . 2 g l t Aを含有）、C M P 4 5 2及びC M P 4 5 3の構築 B L 2 1（Novagen）中のクエン酸シンターゼ遺伝子（g l t A）の前に位置するプロモータを、常時低発現型プロモータ、すなわちG I 1 . 2（米国特許第7,371,558号）により置き換えた。g l t Aに関して報告されている2種の野生型プロモータ（Wild e, R及びJ. Guest. 1986. J. Gen. Microbiol. 132: 3239~3251）及び合成プロモータを、遠位プロモータの-35領域の直後に挿入した。プライマーU p g l t A C m - F（5' - T A T T T A A T T T T T A A T C A T C T A A T T G A C A A T C A T T C A A C A A A G T T G T T A C A A T T A A C C C T C A C T A A A G G G C G G - 3'）及びD n g l t A 1 . x g i C m - R（5' - T C A A C A G C T G T A T C C C C G T T G A G G G T G A G T T T G C T T T G T A T C A G C C A T A T A T T C C A C C A G C T A T T T G T T A G T G A A T A A A A G T G G T T G A A T T A T T T G C T C A G G A T G T G G C A T H G T C A A G G G C T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G C T C G - 3'）並びにテンプレートとしてGene Bridges（Heidelberg, Germany）のプラスミドF R T - g b 2 - C m - F R Tを使用し、PCR産物を得た。PCR産物を精製し、redを用いる組み換えに製造元（Gene Bridges, Heidelberg, Germany）による記載の通りに使用した。更なる評価にあたって、複数種のコロニーを選択した。プロモータ領域は、プライマーg l t A P r o m S e q F : 5' - G G C A G T A T A G G C T G T T C A C A A A A T C - 3' 及びg l t A p r o m S e q R : 5' - C T T G A C C C A G C G T G C C T T T C A G C - 3' と、テンプレートとしてコロニーから抽出したDNA（コロニーを30μLのH2Oに再懸濁し、95℃で4分加熱し、スピンダウンしたもの。50μLのPCR反応には、この溶液のうち2μLをテンプレートとして使用する）とを使用しPCR增幅させた。得られたPCR産物の配列決定結果を観察した後、3種の異なるプロモータG I 1 . 2、G I 1 . 5及びG I 1 . 6（米国特許第7,371,558号）を保有しているコロニーを、更なる使用のため保存した（C M P 1 4 1、C M P 1 4 2及びC M P 1 4 3；表3）。

## 【0257】

10

20

## 【表3】

表3：大腸菌 (E. coli) 株

株	詳細	親株
CMP141	BL21 Cm-GI1.2 gltA	BL21
CMP142	BL21 Cm-GI1.5 gltA	BL21
CMP143	BL21 Cm-GI1.6 gltA	BL21
CMP258	BL21 pgl+	BL21
CMP374	BL21 pgl+PL.2-mKKDyI ldhA::Kan	MD09-314
CMP440	BL21 pgl+PL.2 mKKDyI Cm-GI1.2 gltA	MD09-314
CMP441	BL21 pgl+PL.2 mKKDyI Cm-GI1.5 gltA	MD09-314
CMP442	BL21 pgl+PL.2 mKKDyI Cm-GI1.6 gltA	MD09-314
CMP451	BL21 pgl+PL.2 mKKDyI GI1.2 gltA	CMP440
CMP452	BL21 pgl+PL.2 mKKDyI GI1.5 gltA	CMP441
CMP453	BL21 pgl+PL.2 mKKDyI GI1.6 gltA	CMP442
CMP604	BL21 pgl+PL.2 mKKDyI GI1.2 gltA ackA-pta::Cm	CMP451
CMP620	BL21 pgl+PL.2 mKKDyI GI1.2 gltA ML ackA-pta::Cm ldhA::Kan	CMP604
CMP635	BL21 pgl+PL.2 mKKDyI GI1.2 gltA ML ackA-pta ldhA	CMP620
CMP646	BL21 attB:Cm(to restore LowerP)col1	BL21(Novagen)
CMP676	BL21 pgl+PL.2 mKKDyI GI1.2 gltA ML ackA-pta ldhA attB::Cm	CMP635
CMP680	BL21 pgl+PL.2 mKKDyI GI1.2 gltA ML ackA-pta ldhA attB::Cm, pCHL276	CMP676
MCM521	BL21 neo-PL.2-mKKDyI	(米国特許出願 第12/978,324号)
MD09-313	BL21 pgl+neo-PL.2-mKKDyI	CMP258
MD09-314	BL21 pgl+PL.2-mKKDyI	MD09-313
MD491	BL21 pgl+ackA-pta::Cm	CMP258

## 【0258】

CMP258(米国特許出願第12/978,324号を参照されたい)をMCM521株のP1可溶化液により形質導入し(米国特許出願公開番号第2011/0159557号を参照されたい)、20ug/mLのカナマイシンを添加したルリア・ベルターニプレートでコロニーを選択して、MD09-313株を構築した。Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Incに記載の方法に従ってP1可溶化液を調製した。製造元により推奨されるプロトコルを用い(Gene Bridges, Heidelberg, Germany)カナマイシンマーカーを除去し、MD09-314株を作製する。

## 【0259】

株CMP141、CMP142、及びCMP143からP1可溶化液を調製し、これらを株MD09-314に形質導入し、それぞれCMP440、CMP441及びCMP442を生成した(表3)。製造元(Gene Bridges, Heidelberg, Germany)により推奨されるプロトコルを用い、クロラムフェニコールマーカーを除去し、それぞれ株CMP451、CMP452、及びCMP453を生成した(表3)。

## 【0260】

実施例2：大腸菌(E. coli)株CMP604(BL21 pgl+PL.2 mKKDyI GI1.2 gltA ML ackA-pta::Cmを含有)の構築  
クロラムフェニコールマーカーにより破壊させたackA-pta遺伝子を含有しているDNA断片を、クロラムフェニコールマーカーを含有しているTriple Trip

le 株（米国特許第 7,745,184 (B2) 号）をテンプレートとして使用し、及びプライマー-a c k A C F (5' - G T G C A A A T T C A C A A C T C A G C G G ) 及び p t a C R (C A C C A A C G T A T C G G G C A T T G C C - 3') を使用して、PCRにより増幅させた。得られた PCR 産物を、製造元 (Gene Bridges, Heidelberg, Germany) の推奨する通りに組み換え反応に使用し、CMP 258 株の a c k A - p t a 座に組み入れた（米国特許出願第 12/978,324 号）。LB + 5 ug / mL のクロラムフェニコールにてコロニーを選択した。コロニーを 1 つ選択し、MD 491 と名づけた。MD 491 の P1 可溶化液を調製し、CMP 451 株の形質導入に使用した。LB + 5 ug / mL のクロラムフェニコールにてコロニーを選択した。コロニーを 1 つ選択し、CMP 604 と名づけた。

10

## 【0261】

実施例 3：大腸菌 (E. coli) 株 CMP 620 (BL 21 pg 1 + PL. 2 mKK D y I G I 1.2 g l t A M L a c k A - p t a : : C m l d h A : : K a n を含有) 及び CMP 635 (BL 21 pg 1 + PL. 2 mKK D y I G I 1.2 g l t A M L a c k A - p t a l d h A を含有) の構築

Keio collection (Baba et al. 2006. Mol. Syst. Biol. 2: 2006.0008) の JW 1375 株をテンプレートとして使用し、プライマーは l d h A s e q R (5' - G G C T T A C C G T T A C G C T T C C A G C - 3') 及び l d h A s e q F 2 (5' - C T A A T G C A A T A C G T G T C C C G A G C - 3') を使用し、を使用し、カナマイシンマーカーにより破壊された l d h A 遺伝子を含有している DNA 断片を PCR により増幅させた。得られた PCR 産物を、製造元 (Gene Bridges, Heidelberg, Germany) の推奨する通りに組み換え反応に使用し、MD 09-313 株の l d h A 座に組み入れた。LB + 20 ug / mL のカナマイシンにてコロニーを選択した。コロニーを 1 つ選択し、CMP 374 と名づけた。CMP 374 の P1 可溶化液を調製し、CMP 604 株の形質導入に使用した。LB + 20 ug / mL のカナマイシンにてコロニーを選択した。コロニーを 1 つ選択し、CMP 620 と名づけた。株に電気穿孔法により pCP20 を導入して、クロラムフェニコール及びカナマイシンマーカーを同時に除去し (Datsenko & Wanner. 2000. PNAS 97: 6640~5)、30 下で LB + 50 ug / mL のカルベニシリソウで 2 つのコロニーを選択し、次に、これらのコロニーを、42 下で LB プレートに再画線した。これらのプレートから Cm<sup>s</sup> 及び Kan<sup>s</sup> コロニーを選択し、CMP 635 と名づけた。

20

## 【0262】

実施例 4：大腸菌 (E. coli) 株 CMP 676 (BL 21 pg 1 + PL. 2 mKK D y I G I 1.2 g l t A M L a c k A - p t a l d h A a t t B : : C m を含有) の構築

挿入部位 a t t B の上流及び下流に対する DNA 相同体と隣接しているクロラムフェニコールマーカーを含有している DNA 断片を、プラスミド pKD3 (Datsenko & Wanner, 2000, PNAS 97: 6640~5) をテンプレートとして使用し、及びプライマー-CMP 171 (5' - A A A A T T T C A T T C T G T G A C A G A G A A A A A G T A G C C G A A G A T G A C G G T T G T C A C A T G G A G T T G G C A G G A T G T T G A T T A C A T G G G A A T T A G C C A T G G T C C - 3') 及び CMP 172 (5' - G A C C A G C C G C G T A A C C T G G C A A A A T C G G T T A C G G T T G A G T A A T A A A T G G A T G C C C T G C G T A A G C G G G G C A T T T T C T T G G T G T A G G C T G G A G G C T G C T T C G - 3') を使用して、PCR により増幅させた。得られた PCR 産物を、製造元 (Gene Bridges, Heidelberg, Germany) の推奨する通りに BL 21 (NovaGen) における組み換え反応に使用し、挿入部位 a t t B に組み入れた。これにより生成された CMP 646 株を、LB + 5 ug / mL のクロラムフェニコールにて選択した。CMP 646 の P1 可溶化液を調製し、CMP 635 株に対する形質導入反応に使

30

40

50

用し、この株の染色体からメバロン酸経路下流（メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ、及びイソペンテニルニリン酸イソメラーゼ）を除去した。形質導入反応物をLB + クロラムフェニコール5 ug / mLに播種し、1つのコロニーを選択しCMP676と名づけた。

#### 【0263】

実施例5：大腸菌(*E. coli*)株CMP680(BL21 pg1+PL.2 mKK Dyi GI 1.2 gltA ML ackA-pta ldhA attB:c m, pCHL276)の構築及びメバロン酸の探知

電気穿孔法により、プラスミドpCHL276(実施例6(iii)を参照されたい)をCMP676に導入した。コロニーをLB + 50 ug / mLのスペクチノマイシンにて選択した。1つのコロニーを採取し、CMP680と命名した。  
10

#### 【0264】

##### (i) メバロン酸収率アッセイ

50 ug / mLのスペクチノマイシン(Novagen)を添加した2mLのLBプロスを入れた振盪チューブに、上記の株の一晩培養物を接種した。次に、培養物を、34下250 rpmで14時間インキュベートした。次に、1%グルコース、最終濃度0.1%の酵母エキス及び200 μMのIPTGを添加した2mLのTM3培地を入れた5mLの48ウェルプレート(Axygen Scientific)中で、最終的なODが0.2となるまで培養物を希釈した。プレートを、Breath Easier membrane(Diversified Biotech)でシールし、Shel Lab振とう/恒温器で、34にて、600 rpmで24時間インキュベートした。各培養物1mLを3,000×gで5分遠心分離した。250 μLの上清に、19 μLの20%硫酸を添加し、氷上で5分間インキュベートした。次に、混合物を3000×gで5分遠心分離し、HPLC解析のため上清を回収した。200 μLの上清を、HPLCに適した96ウェル円錐底ポリプロピレンプレート(Nunc)に移した。メバロン酸(Sigma)の標準曲線と比較して、試料中のメバロン酸濃度を測定した。製造元(Pointe Scientific, Inc.)の指定に従ってグルコースオキシダーゼアッセイを実施し、グルコース濃度を測定した。  
20

#### 【0265】

##### (ii) HPLCによるメバロン酸の検出：

50でインキュベートし、BioRad -マイクロガードCarbo-H詰め替えカラムトリッジ30mm × 4.6mm(カタログ番号125-0129)を取り付けた300mm × 7.8mm BioRad - Aminex HPX-87Hイオン排除カラム(カタログ番号125-0140)を使用し、屈折率検出器を系に包含させたAgilent

1100シリーズのHPLC系でHPLC解析を実施した。移動相に0.01N硫酸を使用し、流速0.6 mL / minで試料のHPLC解析を実施した。屈折率検出器によりメバロン酸を検出した。  
30

#### 【0266】

実施例6：リステリア・グレイ(*Listeria grayi*)DSM 20601、エンテロコッカス・フェシウム(*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ガリナルム(*Enterococcus gallinarum*)EG2及びエンテロコッカス・カセリフラブス(*Enterococcus casseliflavus*)由来のmvae及びmvap遺伝子を発現している大腸菌(*E. coli*)株MCM1373-1377の構築  
40

##### (i) 遺伝子の同定及び選択

*E. faecalis*(*E. faecalis*)mvae遺伝子産物をクエリーとして使用する一次配列相同性検索を、NCBIウェブサイトに存在するBLASTpプログラムにより実施した(Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller及びDavid J. Lipman(1997)、「ギャップ考慮型ブラスト及びPSI-BLAST：新規タンパク質データベース検索プログ

10

20

30

40

50

ラムの作成 (Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs)」、Nucleic Acids Res. 25: 3389~3402)。対象とする配列は検索結果から選択した。

#### 【0267】

概して、mvaE及びmvaS遺伝子に関し対象とする配列は、それぞれ野生型E. フエカリス (*E. faecalis*) 由来のmvaE及びmvaS核酸及びタンパク質配列に対し、59~66%ヌクレオチド配列同一性 (コドン最適化済み; 表4を参照されたい) 及び59~71%アミノ酸配列同一性 (表5) を示した。

#### 【0268】

#### 【表4】

10

表4: 野生型エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) に対する

mvaE及びmvaSヌクレオチド (コドン最適化済み) の同一性 (%)

種	mvaE遺伝子の 同一性(%)	mvaS遺伝子の 同一性(%)
リステリア・グレイ ( <i>Listeria grayi</i> )	62	64
エンテロコッカス・フェシウム ( <i>Enterococcus faecium</i> )	60	59
エンテロコッカス・ガリナルム ( <i>Enterococcus gallinarum</i> ) EG2	60	65
エンテロコッカス・カセリフラブス ( <i>Enterococcus casseliflavus</i> )	60	66

#### 【0269】

#### 【表5】

20

表5: 野生型エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) に対する

mvaE及びmvaSのアミノ酸配列の同一性 (%)

種	mvaE遺伝子の 同一性(%)	mvaS遺伝子の 同一性(%)
リステリア・グレイ ( <i>Listeria grayi</i> )	59	70
エンテロコッカス・フェシウム ( <i>Enterococcus faecium</i> )	61	60
エンテロコッカス・ガリナルム ( <i>Enterococcus gallinarum</i> ) EG2	60	69
エンテロコッカス・カセリフラブス ( <i>Enterococcus casseliflavus</i> )	59	71

#### 【0270】

(i i) プラスミド pDW83、pMCM1223~pMCM1225

30

エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) EC10由来のmvaE及びmvaSのコード配列を大腸菌 (*Escherichia coli*) (Gene Oracle)での発現のため最適化させ、発現ベクターMCM82にサブクローニングし(米国特許出願公開番号第2010/0196977号、[1023]段落)、pDW83を生成した。具体的には、制限酵素BglII及びPmeI (Roche)を使用し、一般的な分子生物学的手法により、クローニングベクターGCD126 (Gene Oracle)から、mvaESオペロンを包含しているカセットを切り出した。次にこの断片を、酵素BamHI及びPmeI (Roche)を用い予め制限酵素により消化しておいたMCM82に連結し (Roche、ラピッド・ライゲーション)、続いてアガロースゲルにより分離し (Invitrogen、E-ゲル)、一般的な分子生物学的手法により、mvaESをコードしている発現カセットをエンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) から除去した。製造元の推奨するプロトコルに従って、ライゲーション混合物によりケミカルコンピメントセルTop10 (Invitrogen) を形質転換させた。スペクチノマイシン耐性陽性形質転換体を、液体LB培地で生育させ、プラスミドを精製し (Qiagen Miniprep)、プライマーEcSeq 1F~4R (表6) を使用して配列決定 (Quintara Biosciences) を行い、確認した。

40

#### 【0271】

## 【表6】

表6：配列決定プライマー

Ec Seq 1F	5' - GGGTATGAAAGCGATTCTGA - 3'
Ec Seq 2F	5' - AGCCCAAGGCGCTATTACCG - 3'
Ec Seq 3F	5' - GGATTAGTTCAAAATTGGC - 3'
Ec Seq 4F	5' - CGGTTAATGGCACGTTATGA - 3'
Ec Seq 1R	5' - TCGTTCGCCTGTAAACTGCT - 3'
Ec Seq 2R	5' - TGCTCTATTCAGTACCTTT - 3'
Ec Seq 3R	5' - TGTAAGTTCAGGCCACGCC - 3'
Ec Seq 4R	5' - CCTCAGCCTTGTTGTAATAA - 3'

10

## 【0272】

エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイ (*Listeria grayi*) 及びエンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) 由来の mvaE 及び mvaS をコードしているプラスミドを、表7に記載の設計を使用し Gene Oracle (Mountain View, CA) により構築した。mvaE - RBS - mvaS をコードしている合成DNAを作成し、次に pMCM82 の NcoI 及び PstI 認識部位間に存在しているオペロンと置き換えてクローニングした。ベクターにより mvaE 用の RBS を提供した。

20

## 【0273】

## 【表7】

表7：エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイ (*Listeria grayi*) 及び  
エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) 由来の mvaE 及び mvaS をコードしているプラスミド  
pMCM1223～pMCM1225の設計

プラスミド番号	プラスミド名	生物資源	mvaE	mvaS	由来及び抗生物質
pMCM1223	pCL-Ptrc-Upper_GeMM_161 (リステリア・グレイ ( <i>Listeria grayi</i> ) DSM 20601)	L.グレイ ( <i>L. grayi</i> ) DSM 20601	gi   229554876   ref   ZP_04442665.1   アセチルCoA アセチルトランスクレーザー/ ヒドロキシメチルグルタルリル-CoA 還元酵素 分解性 [ <i>Listeria grayi</i> DSM 20601]	gi   229554877   ref   ZP_04442666.1   ヒドロキシメチルグルタルリル CoAシナーゼ [ <i>Listeria grayi</i> DSM 20601]	pSC101. スペクチノマイシン (50ug/mL)
pMCM1224	pCL-Ptrc-Upper_GeMM_162 (エンテロコッカス・ ファシウム ( <i>Enterococcus faecium</i> ))	エンテロコッカス・ ファシウム ( <i>Enterococcus faecium</i> )	gi   9937391   gb   AAG02444.1   AF290094...2アセチルCoAアセチル トランスクレーザー/HMG-CoA還元 酵素 [エンテロコッカス・ファシウム ( <i>Enterococcus faecium</i> )]	gi   9937390   gb   AAG02443.1   AF290094... 1 HMG-CoAシナーゼ [エンテロコッカス・ファシウム ( <i>Enterococcus faecium</i> )]	pSC101. スペクチノマイシン (50ug/mL)
pMCM1225	pCL-Ptrc-Upper_GeMM_163 (エンテロコッカス・ ガリナルム ( <i>Enterococcus gallinarum</i> )EG2)	E.ガリナルム ( <i>E. gallinarum</i> ) EG2	gi   257869528   ref   ZP_05649181.1   アセチルCoA アセチルトランスクレーザー/ ヒドロキシメチルグルタルリル-CoA還元 酵素 [エンテロコッカス・ガリナルム ( <i>Enterococcus gallinarum</i> )EG2]	gi   257869527   ref   ZP_05649180.1   ヒドロキシメチルグルタルリル CoAシナーゼ [エンテロコッカス・ ガリナルム ( <i>Enterococcus gallinarum</i> )EG2]	pSC101. スペクチノマイシン (50ug/mL)

30

## 【0274】

(iii) pCL-pTrc-Upper (E.フェカリス (*E. faecalis*)) - 1 e  
aderless construction (pCHL276)  
MCM82プラスミドの pCL-pTrc-Upper (E.フェカリス (*E. faecalis*)) から余分な RBS を除去するべくプライマー (CL483F: 5' - AGGAGGG  
AATAAACCATGAAAAACAGTAGTTATTATTGATGCATTAC -  
3'; CL484R: 5' - ACTACTGTTTCATGGTTATTCCCTCC  
TTATTAAATCGATAC - 3') を設計した。PCR 反応液の組成は、テンプレートDNAの MCM82 (100ng)、50uM の各順方向及びリバースプライマー、1uL の 10mM の dNTP (Roche)、5uL の 10X の Pfu II 反応緩衝液 (Agilent)、1uL の Pfu II 融合酵素 (Agilent) 及び 40uL の水から構成された。Bio-Rad サーマルサイクラーにより、95 度 50 秒、60 度 50 秒及び 68 度 9 分、更に 68 度 10 分の処理を行う温度プロファイルで、18 サイクルを実施した。PCR 反応の実施後に DpnI (1uL) を添加し、37 度 2 時間インキュベートしてテンプレートDNAを除去した。更に 1uL の DpnI を加え、3

40

50

7 で一晩インキュベートした。2 μLの反応液によりTOP10 cells (Invitrogen)を形質転換させ、LB + 50 μg / mLスペクチノマイシンに播種した。配列決定により適切なクローンであることが確認された。

## 【0275】

(iv) pCL\_pTrc-Upper (E. カセリフラブス (E. casseliflavus)) - leaderless construction (pCHL277)  
pDW83プラスミドのpCL\_pTrc-Upper (E. カセリフラブス (E. casseliflavus))から余分なRBSを除去するべくプライマー (CL485F: 5' - AG GAGGAATAAACCATGGAAAGAAGTTGTCATCATTGACGCCAC - 3'; CL486R: 5' - ACTTCTTCCATGGTTATTCCCTCCCTT ATTAAATCG - 3')を設計した。PCR反応液の組成は、テンプレートDNAのpDW83 (100ng)、50uMの各順方向 (CL483F) 及び逆方向 (CL484R) プライマー、1 μLの10mMのdNTP (Roche)、5 μLの10xのPfu II反応緩衝液 (Agilent)、1 μLのPfu II融合酵素 (Agilent) 及び40 μLから構成された。Bio-Radサーマルサイクラーにより、95 で50秒、60 で50秒及び68 で9分、更に68 で10分の処理を行う温度プロファイルで、18サイクルを実施した。PCR反応後にDpnI (1 μL)を添加し、37 で2時間インキュベートしてテンプレートDNAを除去した。更に1 μLのDpnIを添加し、37 で一晩インキュベートした。2 μLの反応液によりTOP10 cells (Invitrogen)を形質転換させ、LB + 50 μg / mLスペクチノマイシンに播種した。配列決定により適切なクローンであることが確認された。  
10  
20  
20

## 【0276】

(v) 高収率のMVA生産株MCM1373~1377の構築  
宿主CMP676を対数増殖期の中期まで37 にてLBで生育させ、電気穿孔に備え、培養物の1/2当量の氷冷ddH2Oにより3回洗浄し、培養物の1/10当量の氷冷ddH2Oに再懸濁した。100 μLの細胞懸濁液と1 μLのプラスミドDNAを組み合わせ、2mmの電気穿孔法キュベットに移し、25uFD、2000ohms、2.5kVで電気穿孔を行い、直ちに500 μLのLBによりクエンチした。37 で1時間振盪して細胞を回復させ、次に、50ug / mLのスペクチノマイシンを添加したLBプレートにより、37 で一晩形質転換体を選択した。37 下で、LB + 50ug / mLのスペクチノマイシンにより、OD600がおよそ1になるまで単一のコロニーを生育させた。500 μLのプロスに1mLの50%グリセロールを混合し、ドライアイス上で凍結させた。凍結させた保存液を -80 で保管した。  
30  
30

## 【0277】

実施例7：遺伝子操作を受け、メバロン酸経路の遺伝子を発現している大腸菌 (E. coli) 株を、15 Lスケールの流加式培養により増殖させた場合の、メバロン酸生産量の調査

## (i) 材料

培地組成 (発酵培地1L当たり) :

リン酸カリウム (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (7.5 g)、硫酸マグネシウム (MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O) (2 g)、クエン酸一水和物 (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> \* H<sub>2</sub>O) (2 g)、クエン酸鉄アンモニウム (NH<sub>4</sub>Fe(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>) (0.34 g)、酵母エキス (biospringer) (0.5 g)、1000X改变微量金属溶液 (1.5 mL)、硫酸 50% w/v (2.26 mL)、foamblast 882 (Emerald Performance Materials) (0.83 mL)、微量塩溶液 (3.36 mL)。すべての成分を共に加え、脱イオン水に溶解させた。この溶液を加熱滅菌した (123 で20分)。試験温度に冷却した後、水酸化アンモニウム (28%) によりpHを7.0に調節し、用量に調整する。滅菌後に、供給溶液 (Feed solution) #1 (16.7 g)、ビタミン溶液 (11.9 mL) 及びスペクチノマイシン溶液 (5 mL) を加え、pHを調整した。  
40  
50

## 【0278】

1000X 改変微量金属溶液(1L当たり) :

クエン酸<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>O(40g)、MnSO<sub>4</sub><sup>\*</sup>H<sub>2</sub>O(30g)、NaCl(10g)、FeSO<sub>4</sub><sup>\*</sup>7H<sub>2</sub>O(1g)、CoCl<sub>2</sub><sup>\*</sup>6H<sub>2</sub>O(1g)、ZnSO<sub>4</sub><sup>\*</sup>7H<sub>2</sub>O(1g)、CuSO<sub>4</sub><sup>\*</sup>5H<sub>2</sub>O(100mg)、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>(100mg)、NaMoO<sub>4</sub><sup>\*</sup>2H<sub>2</sub>O(100mg)。各成分を1成分ずつ脱イオン水に溶解させ、HCl/NaOHによりpH 3.0に調整し、次に溶液を用量に調整し、孔径0.22μmのフィルタを用いる過滅菌した。

#### 【0279】

マクロ塩溶液(1L当たり) :

MgSO<sub>4</sub><sup>\*</sup>7H<sub>2</sub>O(296g)、クエン酸一水和物(296g)、クエン酸鉄アンモニウム(49.6g)。すべての成分を水に溶解させ、用量に調整し、0.22μmのフィルタを用い、ろ過滅菌した。

#### 【0280】

ビタミン溶液(1L当たり) :

チアミン塩酸塩(1.0g)、D-(+)-ビオチン(1.0g)、ニコチン酸(1.0g)、塩酸ピリドキシン(4.0g)。各成分を1つずつ脱イオン水に溶解させ、HCl/NaOHによりpHを3.0に調整し、次に溶液を用量に調整し、孔径0.22μmのフィルタを用いる過滅菌した。

#### 【0281】

スペクチノマイシン溶液(1L当たり) :

脱イオン水により50gスペクチノマイシンを適量にし、0.22μmのフィルタによりろ過滅菌した。

#### 【0282】

供給溶液#1(1kg当たり) :

グルコース(0.590kg)、脱イオン水(0.394kg)、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(7.4g)及びFoamblast 882(8.94g)。すべての成分を合わせて混合し、オートクレーブ処理した。

#### 【0283】

(i) 実験法

表8に記載の大腸菌(E. coli)BL21株により15Lのバイオリアクタで発酵を行った。各株には同一の条件で発酵を2回実施し、すなわち生産性についての結果は2回の試行の平均として記録することができた。

#### 【0284】

#### 【表8】

表8: 15Lスケールの流加式培養で試験したメバロン酸生産株の一覧

CMP680	HMB GI 1.2 gltA ML ackA-ptc IdhA attB::Cm, pCLPtcUpper(rbs)(pCHL276)
MCM1373	HMB GI 1.2 gltA ML ackA-ptc IdhA attB::Cm+pCL-Ptc-Upperc_Ef
MCM1374	HMB GI 1.2 gltA ML ackA-ptc IdhA attB::Cm+pCL-Ptc-Upperc_Ec
MCM1375	HMB GI 1.2 gltA ML ackA-ptc IdhA attB::Cm+pCL-Ptc-Upperc_Listeria
MCM1376	HMB GI 1.2 gltA ML ackA-ptc IdhA attB::Cm+pCL-Ptc-Upperc_Efaecium
MCM1377	HMB GI 1.2 gltA ML ackA-ptc IdhA attB::Cm+pCL-Ptc-Upperc_Eg

#### 【0285】

大腸菌(E. coli)株を凍結したバイアルを解凍し、2.8Lの三角フラスコ内でトリプトン・酵母エキス培地(LB培地(ミラー))に接種し、バイオリアクタ用の接種菌液として使用した。550nm(OD550)での吸光度が1.0になるまで接種材料を生育させた後、培養物のうち500mLを15Lのバイオリアクタに接種し、初期槽容量を5Lに調整した。

#### 【0286】

本実験は、所望の発酵pH 7.0及び温度34°でのグルコースからのメバロン酸発酵をモニターするために実施した。培養を行っている間、8標準リットル/分の速度で空

10

20

30

40

50

気を吹き込み、測定値 70 kPa (0.7 bar) の背圧を保持し、インペラにより 850 rpm で攪拌を行い、かつ液体培地に伝わる力を調節して、好気性条件を維持した。

#### 【0287】

グルコース供給溶液はパルス様供給プログラムにより供給した。バッヂのグルコースが枯渇するとすぐに、pH の上昇 (pH > = 7.05) によりシグナルを受け、3 g / 分のパルスを 20 分供給した。以降、グルコースの供給は pH の上昇 (pH > = 7.05) に応じ実施した。パルスは 30 分持続させ、規模 (g / min) は、プロス中に残留するグルコースを過剰な状態に保つのに必要とされる既定の係数により、総二酸化炭素放出速度 (mmol / hr) を除したものに等しかった。52 時間の発酵期間にバイオリアクタに供給されたグルコースの供給総量は株によって異なった。誘導は、イソプロピル -D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加し実施した。細胞の OD 550 が 4 になったなら、400 μM の濃度になるよう IPTG を反応槽に添加した。バイオリアクタからの放出気体中の酸素、窒素及び二酸化炭素濃度は Hiden 質量分析器により測定した。実験工程の間、各バイオリアクタから 4 時間おきにプロス試料を採取した。プロスのグルコース、クエン酸及びメバロン酸濃度は HPLC により測定した。吸光度は、希釀したプロス懸濁液の 550 nm での吸光度を測定し、希釀係数をかけて決定し、得られた値 (OD 550) を記録した。OD 550 読み取り値は、予め、発酵の時間経過にわたって OD 550 と細胞の乾燥重量を比較することで生成した係数を用い、乾燥細胞質量へと変換した。上記所定の定義を使用し、質量収率に関する生産指数、比生産量、力価及び細胞生産性指数を、各 2 回の試行時の相当する時間で得られた結果の平均として記録した（「定義」の項を参照されたい）。

#### 【0288】

##### (i) 小規模メバロン酸収率アッセイ

2 mL の LB プロスに凍結保存品由来の 50 μg / mL のスペクチノマイシン (Novagen) 及び 50 μg / mL のカルベニシリン (Novagen) を含有させたものを入れた振盪チューブに、一晩培養物を接種した。次に、培養物を、34 下 250 rpm で 14 時間インキュベートした。次に、1% グルコース、最終濃度 1% の酵母エキス及び 200 μM の IPTG を添加した 2 mL の TM3 培地を入れた 5 mL の 48 ウェルプレート (Axygen Scientific) 中で、最終的な OD が 0.2 となるまで培養物を希釀した。プレートを、Breath Easier membrane (Diversified Biotech) でシールし、Shel Lab 振とう / 恒温器で、34 にて、600 rpm で 24 時間インキュベートした。各培養物 1 mL を 3,000 × g で 5 分遠心分離した。250 μL の上清に、19 μL の 20% 硫酸を添加し、氷上で 5 分間インキュベートした。次に、混合物を 3000 × g で 5 分遠心分離し、HPLC 解析のため上清を回収した。200 μL の上清を、HPLC に適した 96 ウェル円錐底ポリプロピレンプレート (Nunc) に移した。メバロン酸 (Sigma) の標準曲線と比較して、試料中のメバロン酸濃度を測定した。製造元 (Pointe Scientific, Inc.) の指定に従ってグルコースオキシダーゼアッセイを実施し、グルコース濃度を測定した。

#### 【0289】

##### (iv) HPLC によるメバロン酸の検出：

50 でインキュベートし、BioRad - マイクロガード Carbo - H 詰め替えカラム (トリッジ 30 mm × 4.6 mm (カタログ番号 125-0129)) を取り付けた 300 mm × 7.8 mm BioRad - Amine × HPX-87H イオン排除カラム (カタログ番号 125-0140) を使用し、Knauer K2301 屈折率検出器を系に包含させた Waters 2695 Alliance の HPLC 系で HPLC 解析を実施した。移動相に 0.01 N 硫酸を使用し、流速 0.6 mL / min で試料の HPLC 解析を実施した。各試料の屈折率を、濃度既知の各種メバロン酸溶液により作成した検量線に対し比較して、いずれものメバロン酸濃度を定量する。

#### 【0290】

10

20

30

40

50

生物のリステリア・グレイ (*Listeria grayi*) D S M 2 0 6 0 1、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) E G 2、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) 由来の m v a E 及び m v a S 遺伝子を含有している大腸菌 (*E. coli*) の回分式培養において、メバロン酸は、質量收率 3 4 . 8 % ~ 4 1 . 1 % でグルコースから生成された (図 1、表 9)。

## 【 0 2 9 1 】

## 【表 9】

表 9 : グルコースからのメバロン酸の質量收率

(S. D. は、2つの同型培養から得られる標準偏差値を表す)

10

20

30

40

株	IPTG ( $\mu$ M)	質量收率 (%)	S. D.
CMP680	100	33. 6	0. 8
MCM1373	100	31. 8	0. 8
MCM1374	100	35. 8	3. 9
MCM1375	100	34. 6	0. 2
MCM1376	100	35. 6	3. 2
MCM1377	100	41. 0	0. 1
CMP680	200	35. 3	0. 1
MCM1373	200	31. 9	0. 2
MCM1374	200	39. 2	3. 0
MCM1375	200	34. 8	1. 0
MCM1376	200	37. 9	3. 3
MCM1377	200	41. 1	4. 9

## 【 0 2 9 2 】

1 5 L 培養槽による、生物のリステリア・グレイ (*Listeria grayi*) D S M 2 0 6 0 1、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) E G 2、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) 由来の m v a E 及び m v a S 遺伝子を含有している大腸菌 (*E. coli*) の流加式培養において、メバロン酸は、質量收率 3 9 . 1 % ~ 4 3 . 4 % でグルコースから生成された (表 1 0)。

## 【 0 2 9 3 】

## 【表 1 0】

表 1 0 : 累積質量收率 (各株毎に2つの試行の3つの最終点 (final points) の平均)

株	上流の酵素	質量收率 (グルコースから生成 されるメバロン酸量) (w/w%)	標準偏差 (w/w%)	C. V. %
CMP680	E. フエカリス ( <i>E. faecalis</i> )	37. 3	0. 5	1. 34%
MCM1374	エンテロコッカス・カセリフラブス ( <i>Enterococcus casseliflavus</i> )	41. 3	1. 7	4. 12%
MCM1375	リステリア・グレイ ( <i>Listeria grayi</i> ) DSM 20601	39. 1	2. 0	5. 12%
MCM1376	エンテロコッカス・フェシウム ( <i>Enterococcus faecium</i> )	39. 7	0. 7	1. 76%
MCM1377	エンテロコッカス・ガリナルム ( <i>Enterococcus gallinarum</i> ) EG2	43. 4	1. 1	2. 53%

## 【 0 2 9 4 】

生物のリステリア・グレイ (*Listeria grayi*) D S M 2 0 6 0 1、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) E G 2、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)

50

s) 由来の mvaE 及び mvaS 遺伝子を含有している大腸菌 (E. coli) の、15 L 発酵槽による流加式培養では、メバロン酸は、最大比生産量 87.5 ~ 100.1 g/L/h / OD でグルコースから生成された (表 11)。

## 【0295】

## 【表 11】

表 11：各株に關し観察された最大比生産量 (各株に關し 2 回の試行で観察されたピーク観察値の平均)

株	上流の酵素	最大比生産量 (mg/L/hr/OD)	標準偏差 (mg/L/hr/OD)	C. V. %
CMP680	E. フエカリス (E. faecalis)	87.4	7.2	8.2%
MCM1374	エンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus)	100.1	11.6	11.6%
MCM1375	リステリア・グレイ (Listeria grayi) DSM 20601	87.5	26.7	30.5%
MCM1376	エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium)	93.9	14.2	15.1%
MCM1377	エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum) EG2	88.6	13.9	15.7%

## 【0296】

最終的に、生物のリステリア・グレイ (Listeria grayi) DSM 20601、エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium)、エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum) EG2、エンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus) 由来の mvaE 及び mvaS 遺伝子を含有している大腸菌 (E. coli) の、メバロン酸力価 108.2 ~ 115.4 g/L の範囲であり (表 12)、かつ CPI は 4.86 ~ 5.80 メバロン酸 (g) / グルコース (g) の範囲であった (表 13)。

## 【0297】

## 【表 12】

表 12：各株について観察されたピークメバロン酸力価 (各試験で 48 時間の時点での観察された平均プロスカ力価)

株	上流の酵素	ピークメバロン酸力価 @48時間EFT (g/L)	標準偏差 (g/L)	C. V. %
CMP680	E. フエカリス (E. faecalis)	122.8	5.8	4.7%
MCM1374	エンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus)	115.4	4.1	3.6%
MCM1375	リステリア・グレイ (Listeria grayi) DSM 20601	108.2	4.8	4.4%
MCM1376	エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium)	110.1	12.0	10.9%
MCM1377	エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum) EG2	111.2	6.1	5.5%

## 【0298】

## 【表13】

表13：各株のCPI値（44及び48時間の時点で各試験組に観察された平均

CPI値）

株	上流の酵素	CPI (g/g)	標準偏差 (g/g)	C. V. %
CMP680	E. フェカリス(E. faecalis)	4.25	0.25	5.9%
MCM1374	エンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus)	5.70	0.37	6.5%
MCM1375	リストリア・グレイ(Listeria grayi) DSM 20601	4.86	0.73	15.0%
MCM1376	エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium)	5.29	0.12	2.3%
MCM1377	エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum) EG2	5.80	0.52	8.9%

10

## 【0299】

## 実施例8：イソプレン生産株の構築

MCM521可溶化液を使用し、CMP676にメバロン酸経路の下流を形質導入することができる（表3を参照されたい）。製造元に従いカナマイシンマーカーを除去する（Gene Bridges, Heidelberg, Germany）。MCM521の下流の経路は、別の遺伝子を使用することにより各遺伝子の前に位置するrbsを改変し、オペロン上流のプロモータを変更することで改変することができる。プラスミドpMCM1223(L. grayi)、pMCM1224(E. faecium)、pMCM1225(E.ガリナルム(E. gallinarum))、pCHL276(E. フェカリス(E. faecalis))又はpCHL277(E. カセリフラブス(E. casseliflavus))を、プラスミドpDW34変異体と同時に電気穿孔した（米国特許出願公開第2010/0196977号；図2を参照されたい）。pDW34変異体のプラスミドは、活性の向上しているイソプレンシターゼ変異体を含有している。LB+スペクチノマイシン50ug/mL+カルベニシリソ50ug/mLでコロニーを選択することができる。

20

## 【0300】

実施例9：E. カッセリファバス(E. casseliflavus)又はE. ガリナルム(E. gallinarum)由来のMVA経路上流を利用したMVP濃度の増大

30

E. カッセリファバス(E. casseliflavus)又はE. ガリナルム(E. gallinarum)のいずれか由来のMVA経路上流を利用させた場合に、E. フェカリス(E. faecalis)由来のMVA経路上流を利用させた場合と比較して、5-ホスホメバロン酸(MVP)濃度が顕著に増大することが、これらの試験により強調される。メバロン酸5-リン酸は、ホスホメバロン酸キナーゼ(PMK)の基質である。適宜に、理論に束縛されるものではないが、細胞中のMVP濃度を上昇させると、MVA経路上流に取り込まれる炭素原子量が増加することになる。

40

## 【0301】

## (i) 材料及び方法

大腸菌(E. coli)の代謝産物抽出物：9mLの氷冷無水メタノールを入れたチューブに約3mLの培養物を加え、発酵槽で生育させた細菌細胞の代謝を迅速に不活性化させた。得られた試料を計量し、試料としたプロス量を算出し、以降の解析に備え-80°で保管した。代謝産物の抽出並びに濃縮の際には、0.25mLの細胞懸濁液アリコート(OD<sub>600</sub>で測定した時の培養物の細胞密度が50を下回る場合には0.4mLのアリコートを使用する)を1.5mLのメタノール/酢酸アンモニウム緩衝液(5mM, pH=8.0)混合液(6:1, v/v)を使用して希釈し、4分間遠心分離し細胞片をペレット化させた。上清を回収し、Phenomenex(33μm 30mg/3mL Polymeric Weak Anion Exchange)のStrata-X-AWカラムに充填する。まず1.5mLのメタノール/酢酸アンモニウム緩衝液(5mM, pH=50

8 . 0 ) 混合液 ( 6 : 1 v / v ) を使用し、次に 1 . 5 mL のメタノール / 酢酸アンモニウム緩衝液 ( 5 mM , pH = 8 . 0 ) 混合液 ( 1 : 1 v / v ) を使用して、細胞ペレットを 2 回抽出した。いずれの抽出の際にも細胞は遠心分離によりペレット化し、次に、得られる上清は同一の Strata - X - AW カラムに充填した。抽出 - 遠心沈降処理の間、細胞を含む試料は 4 以下に保った。1 mL の水及び 1 mL のメタノールによりカラムを洗浄した後、はじめに 0 . 3 mL の濃 NH<sub>4</sub>OH / メタノール ( 1 : 14 , v / v ) 混合液を使用し、次に 0 . 3 mL の濃 NH<sub>4</sub>OH / メタノール / 水 ( 1 : 12 : 2 , v / v / v ) 混合液を使用して、対象とする代謝産物をカラムから溶出させた。得られた溶離液に 20 μL の氷酢酸を加えて中和し、次に遠心分離を行い清澄化した。

## 【 0302 】

代謝産物の定量代謝産物の解析には、TSQ Quantum Access TSQ システム ( Thermo Scientific ) を使用し、質量分析を行った。システムの調節、データ収集及び質量スペクトルデータの評価の全ては、ソフトウェアの X Calibur 及び LC Quan ( Thermo Scientific ) を使用して実施した。LC - ESI - MS / MS 解析は、CC 8 / 4 Nucleodex - OH ガードカートリッジを使用してキラル Nucleodex - OH 5 μM HPLC カラム ( 100 × 2 mm , Macherey - Nagel , Germany ) で行った。移動相には表 14 に記載のとおりに濃度勾配を与えた。移動相 A は 100 mM 酢酸アンモニウム ( Sigma Ultragrade , Sigma ) のミリ Q 水等級の緩衝水溶液 ( pH = 8 ) であり、移動相 B はミリ Q 水等級の水であり、移動相 C は LC - MS 等級のアセトニトリル ( Chromasolv , Riedel - de Haen ) である。カラム及びサンプルトレーラー温度はそれぞれ 5 及び 4 に下げた。充填量は 10 μL であった。

10

20

30

40

## 【 0303 】

## 【 表 14 】

表 14 : 勾配 HPLC を使用して溶出させた MVA 経路の代謝産物

時間	溶媒A	溶媒B	溶媒C	流量
0. 0 分	20%	0%	80%	0. 4mL / 分
0. 5 分	20%	0%	80%	0. 4mL / 分
4. 0 分	60%	0%	40%	0. 4mL / 分
6. 5 分	60%	0%	40%	0. 4mL / 分
7. 0 分	0. 5%	59. 5%	40%	0. 5mL / 分
13. 0 分	0. 1%	34. 9%	65%	0. 5mL / 分
13. 5 分	20%	0%	80%	0. 5mL / 分
14. 0 分	20%	0%	80%	0. 5mL / 分

## 【 0304 】

エレクトロスプレーイオン化質量分析をネガティブモードで使用して質量検出を実施した ( ESI スプレー電圧 : 3 . 0 kV 、イオントランスマーカー温度 : 390 ) 。前駆イオンには次の m / z 値を選択して、対象とする代謝産物を SRM モードで検出した : IPP 及び DMAPP に関しては 245 . 0 、 GPP に関しては 313 . 1 、 FPP に関しては 381 . 1 、 MVP に関しては 227 . 0 、かつ MVP に関しては 307 . 1 。質量分析を実施する間、感度にわずかにばらつきが生じることを考慮し、一様に標識した <sup>13</sup>C<sub>10</sub>-ADP も、試料及び内部標準としての校正物質 ( Isotec , Sigma - Aldrich から得た <sup>13</sup>C<sub>10</sub>-ATP を酵素処理し、 <sup>13</sup>C<sub>10</sub>-ADP を調製した ; m / z = 436 . 1 ) の両方に当量ずつ ( 最終濃度 19 . 6 μM ) 添加した。

50

$\text{PO}_3^-$  プロダクトイオン ( $m/z = 79.0$ ) により精製されたピーク強度を積分して、試料 / 内部標準応答比をもとに代謝産物の濃度を測定した。標準の注入により得られた検量線を使用して、細胞抽出物中の代謝産物濃度を算出した。IPP、DMAPP、GP P 及び FPP 標準は Echelon Biosciences Inc から購入し、MVP 及び MVP (R-forms) は Sigma-Aldrich から購入した。

### 【0305】

#### 結果

発酵開始後 40 時間の時点では、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 及び *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来する MVA 経路上流を使用した場合の MVP 濃度は、いずれも *E. フェカリス* (*E. faecalis*) よりも高かった (図 3)。

10

### 【0306】

実施例 10：別のメバロン酸経路上流を保有しているプラスミドを株に含有させた場合、*E. フェカリス* (*E. faecalis*) の上流経路を有する経路を含有させた場合と比較して、イソブレンの生産量は増大する

#### (i) 材料

TM3 培地の組成 (発酵培地 1 L 当たり) :

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  (13.6 g)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (13.6 g)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 g)、クエン酸一水和物 (2 g)、クエン酸鉄アンモニウム (0.3 g)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (3.2 g)、酵母エキス (0.2 g)、1000 X 微量金属溶液 (1 mL)。すべての成分を共に加え、脱イオン水に溶解させる。水酸化アンモニウム (30%) により pH を 6.8 に調整し、及び容量を調整する。0.22 μm フィルタで培地をろ過滅菌する。滅菌及び pH 調整後にグルコース 10.0 g 及び抗菌剤を添加する。

20

### 【0307】

1000 X 微量金属溶液 (発酵培地 1 L 当たり) :

クエン酸  $\cdot \text{H}_2\text{O}$  (40 g)、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (30 g)、 $\text{NaCl}$  (10 g)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1 g)、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1 g)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1 g)、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (100 mg)、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  (100 mg)、 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (100 mg)。各成分を 1 成分ずつ脱イオン水に溶解させ、 $\text{HCl}/\text{NaOH}$  により pH 3.0 に調整し、次に溶液を用量に調整し、孔径 0.22 マイクロメートルのフィルタを用いろ過滅菌した。

30

### 【0308】

#### (i) 実験手順

ルリア・ベルターニプロス + 抗生物質で細胞を一晩生育させる。翌日、OD600 が 0.05 になるよう細胞を 20 mL の TM3 培地 (50 ug / mL のスペクチノマイシン及び 50 ug / mL のカルベニシリンを含有 (250 mL のバッフル付き三角フラスコ)) により希釈し、34 かつ 200 rpm でインキュベートする。2 時間生育させた後、OD600 を測定し、200 uM の IPTG を加える。発酵工程の間、規則的に試料を採取する。各時点で OD600 を測定する。また、ガスクロマトグラフ - マススペクトロメタ (GC - MS) (Agilent) によるヘッドスペースアッセイによりイソブレンのオフガス分析を行う。100 μL の全プロスを GC バイアルに入れ密閉し、34 かつ 200 rpm で 30 分間インキュベートする。70 度 5 分のインキュベーションからなる熱殺菌工程後、試料を GC に装填する。記録される比生産量は、イソブレン量の GC による読み取り値 (ug / L) を、インキュベート時間 (30 分) 及び OD600 測定値で除算した値である。

40

### 【0309】

#### (ii) 結果

pMCM1223 (*L. グレイ* (*L. grayi*))、MCM1224 (*E. フェカリス* (*E. faecium*))、pMCM1225 (*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*)) 又は pCHL277 (*E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*)) を株に含有させた場合、pCHL276 (*E. フェカリス* (*E. faecalis*)) を含有しており同一のバックグラウンドを有

50

する株と比較して、比生産性、収率、CPI及び/又はイソプレン力価の増大が観察された。

### 【0310】

実施例11：メバロン酸経路上流の遺伝子を発現している大腸菌（*E. coli*）によるイソプレン生産

本実施例では、導入したメバロン酸経路由来の遺伝子を発現させ、15Lスケールで流加式培養により生育させた大腸菌（*E. coli*）（BL21）におけるイソプレン生産量を評価した。MVA経路上流の酵素の遺伝子は、*E. フェカリス*（*E. faecalis*）（DW709株及びDW717株）、*E. カッセリファバス*（*E. casseliflavus*）（DW718）又は*E. ガリナラム*（*E. gallinarum*）（DW719、MCM2158）のいずれかに由來した。  
10

### 【0311】

#### （i）材料及び方法

株構築：生産宿主株として、大腸菌（*Escherichia coli*）を、イソプレン合成酵素（IspS）変異体と、異なる4種のMVA経路上流のうちの1種を含有させたプラスミドにより同時形質転換させて、株DW709、DW717、DW718、及びDW719を作製した。以降の標準的な分子生物学的な手法に従い、宿主株CMP1133（BL21

pgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTPyddVI  
spA yhfS thiFRTtruncIspA）に、IspS変異体を保持している  
pDW240（pTrc P. alba IspS MEA-mMVK（Carb50）  
）、及びpMCM82（米国特許出願公開番号第2009/0203102号）、pCH  
L276（（pCL\_pTrc-Upper（*E. faecalis*）-leaderless）、pCHL277（pCL\_pTrc-Upper（*E. casseliflavus*）-leaderless）又はpMCM1225（表7を参照されたい）のいずれかを電気穿孔により導入した。細胞を回復させ、選択培地に播種したところ、それぞれスペクチノマイシン及びカルベニシリンに耐性を示す株DW709、DW717、DW718及びDW719が得られた。これらのイソプレン生産株は、IspS変異体と、それぞれエンテロコッカス・フェカリス（*Enterococcus faecalis*）由来のMVA経路上流、エンテロコッカス・フェカリス（*Enterococcus faecalis*）由来のleaderless MVA経路上流、エンテロコッカス・カッセリファバス（*Enterococcus casseliflavus*）由来のMVA経路上流、又はエンテロコッカス・ガリナラム（*Enterococcus gallinarum*）由来のMVA経路上流のいずれかとを発現していた（表15を参照されたい）。  
20  
30

### 【0312】

## 【表15】

表15：イソブレン生産株

株名	遺伝子型	親宿主	プラスミド
DW709	BL21 GI1. 2gltA PL. 2 MKKDyl t pgl pgl-, yhfSFRTPyddVlspAyhfS thiFRTtruncIspA, pTrc(IspS variant) mMVK, pCLPtrcUpper_E. faecalis	CMP1133	pDW240, pMCM82
DW717	BL21 GI1. 2gltA PL. 2 MKKDyl t pgl pgl-, yhfSFRTPyddVlspAyhfS thiFRTtruncIspA, pTrc(IspS variant) mMVK, pCLPtrcUpper_E. faecalis leaderless	CMP1133	pDW240, pCHL276
DW718	BL21 GI1. 2gltA PL. 2 MKKDyl t pgl pgl-, yhfSFRTPyddVlspAyhfS thiFRTtruncIspA, pTrc(IspS variant) mMVK, pCLPtrcUpper_E. casseliflavus	CMP1133	pDW240, pCHL277
DW719	BL21 GI1. 2gltA PL. 2 MKKDyl t pgl pgl-, yhfSFRTPyddVlspAyhfS thiFRTtruncIspA, pTrc(IspS variant) mMVK, pCLPtrcUpper_E. gallinarum	CMP1133	pDW240, pMCM1225
MCM2158	pgl-FRT-PL. 2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii)+pTrcAlba-MVKdel2+pCL-Ptrc-Upper_E. gallinarum	CMP1133	pDW240

## 【0313】

培地組成（発酵培地1L当たり）：K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>（7.5g）、MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O（2g）、クエン酸一水和物（2g）、クエン酸鉄アンモニウム（0.3g）、酵母エキス（0.5g）、5.0%硫酸（1.6mL）、1000X改変微量金属溶液（1mL）。すべての成分を共に加え、脱イオン水に溶解させた。この溶液を加熱滅菌した（123で20分）。水酸化アンモニウム（28%）によりpHを7.0に調整し、用量に調整した。滅菌及びpH調製後にグルコース10g、ビタミン溶液8mL、及び抗生素質を加えた。

## 【0314】

1000X改変微量金属溶液（1L当たり）：クエン酸\*H<sub>2</sub>O（40g）、MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O（30g）、NaCl（10g）、FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O（1g）、CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O（1g）、ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O（1g）、CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O（100mg）、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>（100mg）、NaMoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O（100mg）。各成分を1つずつ脱イオン水に溶解させ、HCl/NaOHによりpHを3.0に調整し、次に溶液を用量に調整し、0.22μmのフィルタを用いろ過滅菌した。

## 【0315】

ビタミン溶液（1L当たり）：塩酸チアミン（1.0g）、D-（+）-ビオチン（1.0g）、ニコチン酸（1.0g）、塩酸ピリドキシン（4.0g）。各成分を1つずつ脱イオン水に溶解させ、HCl/NaOHによりpHを3.0に調整し、次に溶液を用量に調整し、孔径0.22μmのフィルタを用いろ過滅菌した。

## 【0316】

マクロ塩溶液（1L当たり）：MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O（296g）、クエン酸一水和物（296g）、クエン酸鉄アンモニウム（49.6g）。すべての成分を水に溶解させ、用量に調整し、0.22μmのフィルタを用い、ろ過滅菌した。

## 【0317】

供給溶液（1kg当たり）：グルコース（0.590kg）、脱イオン水（0.393kg）、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>（7.4g）、及び100%Foamblast882（8.9g）。すべての成分を合わせて混合し、オートクレーブ処理した。供給溶液をオートクレ

10

20

30

40

50

ープにより処理した後、滅菌フード中で、供給ボトルに栄養塩類を添加する。滅菌後に供給溶液に添加するものは（供給溶液1kg当たり）マクロ塩溶液（5.54mL）、ビタミン溶液（6.55mL）、1000X改変微量金属溶液（0.82mL）である。

#### 【0318】

本実験は、所望の発酵pH（7.0）及び温度（34℃）でのグルコースからのイソブレン発酵をモニターするために実施した。大腸菌（*E. coli*）株を凍結したバイアルを解凍し、トリプトン酵母エキス及び適切な抗生物質を添加した培地を入れたフラスコに接種した。550nm（OD<sub>550</sub>）での吸光度が1.0になるまで接種材料を生育させた後、培養物のうち500mLを15Lのバイオリアクタに接種し、初期槽容量を5Lに調整した。イソブレン生産株を使用し流加式発酵工程を行った。10

#### 【0319】

各バッチの培地には、グルコースを9.7g/L含有させた。誘導は、イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド（IPTG）を添加し実施した。細胞のOD<sub>550</sub>が6になったなら、200μMの濃度になるようIPTGを反応槽に添加した。培養によるグルコースの消費がpHの上昇により示されたなら、代謝に必要とされる量に足りるよう、10g/min以下の速度でグルコース供給溶液を供給した。グルコースに対するメバロン酸の最大質量収率を測定するのに十分な時間、すなわち発酵の開始から合計64～68時間にわたって発酵を行った。

#### 【0320】

解析法：イソブレンは揮発性であり、注入ガスにより槽から効率的に回収することができる。バイオリアクタのオフガス中のイソブレン濃度は、2つの質量分析器iSCAN（Hamilton Sundstrand）及びHidden HPR20（Hidden Analytical）質量分析器を使用して測定した。オフガス中の酸素、窒素及びCO<sub>2</sub>濃度は、同様の質量分析ユニットにより測定した。発酵プロセス中の溶存酸素は、Hamilton Companyにより提供された光学センサーを備えた衛生的であり滅菌可能なプローブにより測定した。20

#### 【0321】

4時間間隔でプロセス試料にHPLC解析を行い、発酵プロセス中のクエン酸、グルコース、酢酸及びメバロン酸濃度を測定した。屈折計による測定値と、濃度既知の標準を使用して予め作成した検量線とを比較して、プロセス試料中の濃度を測定した。30

#### 【0322】

（i）結果：

#### 【0323】

#### 【表16】

表16：イソブレン生産指標

株詳細／実施数	総イソブレン比 生産量(g/L/hr) (ピーク収率時)	グルコースに対する イソブレンのピーク 総収率(%) (g/g)	最大比生産量 (イソブレン(mg)/ L/hr/OD)
DW709/ 20120108	1.89	16.35	26.0
DW717/ 20120131	1.97	16.46	27.7
DW718/ 20120132	2.44	17.54	37.6
DW719/ 20120133	2.38	18.16	34.3
MCM2158/ 20120409	2.11	17.35	38.6

#### 【0324】

表16に要約する通り、*E. フェカリス* (*E. faecalis*) のMVA経路上流を使用する発酵と比較して、*E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 又は*E. カッセリファバス* (*E. cass*)

10

20

30

40

50

*eliflavus*) のいずれかの MVA 経路上流の酵素を使用する発酵の方が、合計質量収率が高く(図4)、最大容積生産量が大きく(図5)、最大比生産量が高かった(図6)。加えて、細胞中アセチルCoA濃度は、E. カッセリファバス(*E. casseliflavus*)又はE. ガリナラム(*E. gallinarum*)の経路を含有させた株と比較して、低かった(表17)。このアセチルCoA濃度の低下は、細胞中でMVA経路に取り込まれる炭素量が増加していることの指標となる。

## 【0325】

## 【表17】

表17：異なるメバロン酸経路上流を有することを除き、すなわちE. ガリナラム(*E. gallinarum*)又はE. カッセリファバス(*E. casseliflavus*)由来のMVA経路上流を有することを除き、同一のバックグラウンドをもつ株における、発酵開始から24時間(EFT)後のアセチルCoA濃度(mM)

上流	E. フェカリス ( <i>E. faecalis</i> ) (DW717)-20時間	E. カッセリファバス ( <i>E. casseliflavus</i> ) (DW718)-24時間	E. ガリナラム ( <i>E. gallinarum</i> ) (DW719)-24時間
アセチルCoA (mM)	6.34	3.57	3.56

## 【0326】

実施例12：M. バートニイ(*M. burtonii*)又はM. マゼイ(*M. mazei*)メバロン酸キナーゼを大腸菌(*E. coli*)染色体上で発現している大腸菌(*E. coli*)株の生育及びイソブレン生産

本実施例は、遺伝子操作し、M. バートニイ(*M. burtonii*)メバロン酸キナーゼ又はM. マゼイ(*M. mazei*)メバロン酸キナーゼを大腸菌(*E. coli*)染色体上で発現させた大腸菌(*E. coli*)株の、生育及びイソブレン生産量に関する小規模試験を詳述する。

## 【0327】

## 材料及び方法

生育アッセイ：冷凍保存品からカルベニシリン50μg/mL(Novagen)及びスペクチノマイシン50μg/mL(Novagen)を添加したLBプロス2mLを入れた振盪チューブに一晩培養物を接種した。次に、培養物を、34下240rpmで14時間インキュベートした。次に、1%グルコース、0.02%酵母エキス、50μg/mLのカルベニシリン及び50μg/mLのスペクチノマイシンを添加した2mLのTM3培地を入れた、5mL48ウェルプレート(Axygen Scientific)で、最終的なODが0.2になるよう培養物を希釈した。プレートを、Breath Ease membrane(Diversified Biotech)でシールし、Shel Lab振とう/恒温器で、34にて、600rpmでインキュベートした。OD 0.4の時点で、200μMのIPTGにより培養物に誘導を行った。誘導の1時間後に、最終濃度が0.2、0.4、0.8、1.6、3.2mMになるよう培地にメバロン酸を加えた。IPTGによる誘導の直後、1、2、3、4、及び5時間後にODを測定した。

## 【0328】

10

20

30

40

## 【表18】

表18：小規模試験を行った、遺伝子操作型大腸菌（*E. coli*）株の一覧

株名	表現形の略記
CMP1136	pgl-+pTrcAlba-mMVK+pCL-Ptrc-UppEr_Ef
DW708	pgl-+pTrcAlba-mMVK+pCL-Ptrc-UppEr_gallinarum
MCM2131	pgl-FRT-PL_2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii)+pTrcAlba-bMVK+pCL-Ptrc-UppEr_gallinarum
MCM2125	pgl-FRT-PL_2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii)+pTrcAlba-mMVK(del)+pCL-Ptrc-UppEr_gallinarum
MCM2126	pgl-FRT-PL_2-2cis-RBS1000-mMVK+pTrcAlba-mMVK(del)+pCL-Ptrc-UppEr_gallinarum
MCM2127	pgl-FRT-PL_2-2cis-RBS100000-mMVK+pTrcAlba-mMVK(del)+pCL-Ptrc-UppEr_gallinarum
MCM2129	pgl-FRT-PL_2-2cis-RBS1000000-mMVK+pTrcAlba-mMVK(del)+pCL-Ptrc-UppEr_gallinarum
MCM2130	pgl-FRT-PL_2-2cis-RBS10000-mMVK+pTrcAlba-mMVK(del)+pCL-Ptrc-UppEr_gallinarum

## 【0329】

イソブレンの生産量：遺伝子操作型大腸菌（*E. coli*）のGC/MSによりイソブレン生産量を解析するための試料を、誘導から1、2、3、4及び5時間後に回収した。100 μLの培養プロスを98ウェルガラス製深底ブロックに回収し、アルミニウム製シーラー（Beckman Coulter）によりシールした。ガラスブロックを34の水浴で30分間インキュベートした後、80の水浴に移し、2分間加熱滅菌した。ガラスブロックを冷却し、イソブレンを測定するためにGC/MSに移した。

## 【0330】

GC/MSによるイソブレンの検出：ヘッドスペースモードで作動するCTC Analytics (Switzerland) CombiPALオートサンプラーと適合させたAgilent 6890 GC/MSシステムを使用し、GC/MSを実施した。Agilent HP-5MS GC/MSカラム（30m × 0.25mm；0.25 μm フィルム厚）を使用して分析物を分離した。GC/MS法では、キャリアガスとして、流速1mL/分でヘリウムを使用した。注入部は、分割比50:1に設定し、250で保持した。炉の温度は、解析中37で2分保持した。Agilent 5793N質量検出器は、m/z 67で単一イオン検出（SIM）モードで作動させた。1.4~1.7分経過時点で検出器のスイッチを切り、永久ガスを溶出させた。これらの条件下で、イソブレン（2-メチル-1,3-ブタジエン）が1.78分で溶出することを観察した。較正表を使用して、イソブレンの絶対量を定量したところ、1 μg/L ~ 2000 μg/Lに相当することが判明した。この手法から、検出限界は50~100ng/Lであると推定された。

## 【0331】

(i) 結果：

MCM2131の生育は、0~16mM濃度のメバロン酸では阻害されなかった。MCM2131は、32mMのメバロン酸を加えた場合に最も比生産量が高くなったことから（30~42mg/L/h/OD）、上流経路からの非常に多量の取り込みを支持し得る。

## 【0332】

染色体にメバロン酸キナーゼのコピーを1つ有する、遺伝子操作株MCM2125、MCM2127及びMCM2130は、16mMのメバロン酸を供給した場合に40mg/L/h/ODの比生産量を実現することができる。メバロン酸濃度が0~16mMである場合にも、株の生育は阻害されなかった（図7）。

## 【0333】

実施例13：大腸菌（*E. coli*）におけるM.マゼイ（*M. mazei*）及びM.パートニイ（*M. burtonii*）メバロン酸キナーゼのプラスミド及び染色体による発現

染色体のみでマゼイ (Mazei) M V K off を発現させた場合の効果を M C M 2 1 2 6 株及び M C M 2 1 2 7 株において評価した。

### 【0334】

#### 材料及び方法

##### (i) 溶液

培地組成 (発酵培地 1 L 当たり) : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7.5 g)、MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O (2 g)、クエン酸一水和物 (2 g)、クエン酸鉄アンモニウム (0.3 g)、酵母エキス (0.5 g)、50% 硫酸 1.6 mL、1000X 改変微量金属溶液 1 mL。すべての成分を共に加え、脱イオン水に溶解させた。この溶液を加熱滅菌した (123 で 20 分)。水酸化アンモニウム (28%) により pH を 7.0 に調整し、用量に調整した。滅菌及び pH 調製後にグルコース 10 g、ビタミン溶液 8 mL、及び抗生物質を加えた。  
10

### 【0335】

1000X 改変微量金属溶液 (1 L 当たり) : クエン酸 \* H<sub>2</sub>O (40 g)、MnSO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O (30 g)、NaCl (10 g)、FeSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O (1 g)、CoCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O (1 g)、ZnSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O (1 g)、CuSO<sub>4</sub> \* 5H<sub>2</sub>O (100 mg)、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (100 mg)、NaMoO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O (100 mg)。各成分を 1 つずつ脱イオン水に溶解させ、HCl / NaOH により pH を 3.0 に調整し、次に溶液を用量に調整し、0.22 μm のフィルタを用いる過滅菌した。

### 【0336】

マクロ塩溶液 (1 L 当たり) : MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O (296 g)、クエン酸一水和物 (296 g)、クエン酸鉄アンモニウム (49.6 g)。すべての成分を水に溶解させ、用量に調整し、0.22 μm のフィルタを用い、ろ過滅菌した。  
20

### 【0337】

ビタミン溶液 (1 L 当たり) : 塩酸チアミン (1.0 g)、D- (+) - ビオチン (1.0 g)、ニコチニ酸 (1.0 g)、塩酸ピリドキシン (4.0 g)。各成分を 1 つずつ脱イオン水に溶解させ、HCl / NaOH により pH 3.0 に調整し、次に溶液を用量に調整し、0.22 μm 径のフィルタによりろ過滅菌した。

### 【0338】

供給溶液 #1 (1 kg 当たり) : グルコース (0.590 kg)、脱イオン水 (0.393 kg)、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7.4 g)、及び 100% Foamblast 882 (8.9 g)。すべての成分を合わせて混合し、オートクレーブ処理した。供給溶液をオートクレーブにより処理した後、滅菌フード内で、供給ボトルに栄養塩類を添加する。滅菌後に供給溶液に添加するものは (供給溶液 1 kg 当たり) マクロ塩溶液 (5.54 mL)、ビタミン溶液 (6.55 mL)、1000X 改変微量金属溶液 (0.82 mL) である。  
30

### 【0339】

#### (i) 方法

試料を解凍し、100 mM の Tris、100 mM の NaCl (pH 7.6)、0.1 mg / mL の DNase I、1 mg / mL のリゾチーム、及び 0.5 mM の A E B S F (4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリドヒドロクロリド) により OD = 2.0 に規格化した。OD を規格化した細胞懸濁液を、4826.3 kPa (700 psi) に設定したフレンチプレスセルに繰り返し通過させて、溶解させた。14,000 rpm で 10 分間遠心分離し、可溶化液を清澄化させた。清澄化させた可溶化液に含まれる総タンパク質量を、ブラッドフォードアッセイ (BioRad, 500-0006) を使用し評価した。次に試料を規格化し、4~12% SDS-PAGE ゲル (Life Technologies) で泳動した。iBlot 転写装置 (Life Technologies) を使用し、ニトロセルロース膜にタンパク質を転写した。BenchPro (商標) 4100 ウェスタンカード・プロセッシング・ステーション (Life Technologies) を使用して、ProSci incorporated の生成酵素に対するウサギ一次ポリクローナル抗体、並びに Alexa Fluor 488 により蛍光標識した抗ウサギ IgG ヤギ 2 次抗体 (Life Technologies, A-50

11008)により、ニトロセルロース膜上でM.マゼイ(*M. mazei*)及びM.バートニイ(*M. burtonii*)MVKを検出した。イメージヤーのStorm及びImageQuantTLソフトウェア(GE HealthCare)を使用し、特異的なタンパク質定量を行った。

#### 【0340】

##### (iii) 結果

ウェスタンプロット解析によるタンパク質定量に基づくと、MCM2125におけるM.バートニイ(*M. burtonii*)のメバロン酸キナーゼの発現は、DW708株におけるM.マゼイ(*M. mazei*)のメバロン酸キナーゼの発現と比較して、少なくとも15倍以下であった(図8)。

10

#### 【0341】

実施例14: 発現コンストラクト及びラクトバチルス(*Lactobacillus*)株によるメバロン酸の生産

##### I. MVA経路上流をコードしているプラスミドの構築

ベクターpDM20は大腸菌(*E. coli*) - ラクトバチルス(*Lactobacillus*)シャトルベクター(米国特許出願公開第2010/0081182号:この特許文献は参照により本明細書に組み込まれる)である。このベクターはpLF1レプリコン(約0.7Kbp)を最小数と、ラクトバチルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*)ATCC14917プラスミドpLF1由来のpemK-pemI toxin-antitoxin(TA)、pACYC184由来のP15Aレプリコン、大腸菌(*E. coli*)及びL.プランタラム(*L. plantarum*)の両方を選択するためのクロラムフェニコール耐性マークー並びにP30合成プロモータとを含有している(Rude et al., Microbiology(2006)152:1011~1019)。

20

#### 【0342】

pDM20プラスミドは、P30プロモータ下流のマルチクローニングサイトにpTrc99a由来のrrnBT1T2ターミネーターを加えて改変する。ターミネーター領域は、Phusion高忠実度DNAポリメラーゼ(New England Biolabs, Beverly, MA)を使用し、プライマーT1T2\_F\_Hind3\_Sal(SEQ)及びT1T2\_R\_Pst(SEQ)を使用してpTrc99aから増幅させる。

30

#### 【0343】

増幅反応は、製造元のプロトコルに従ってHF緩衝液を使用し、50μLで実施する。サイクルパラメータは次の通りである: 98で30秒、次に98で10秒、55で30秒、72で10秒、を30サイクル、最後に72で10分の最終伸長反応。PCR産物のターミネーターを、製造元のプロトコルに従い、DNA Clean and Concentrator-5キット(Zymo Research Corp., Irvine, CA)により精製する。

#### 【0344】

PCR産物及びpDM20をそれぞれHindIII及び次にPstI(NEB)により段階的に消化する。消化した挿入断片およびベクターをDNA Clean and Concentrator-5キット(Zymo Research Corp.)により精製する。

40

#### 【0345】

製造元の指示に従いQuick Ligationキット(NEB)を使用し、20μL用量で挿入断片及びベクターを連結させる。連結させた核酸を使用し、製造元のプロトコルに従ってTOP10ケミカルコンピテントセル(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)を形質転換させる。細胞及び連結させた核酸を混合し、30分間氷上でインキュベートし、次に細胞に42で45秒間熱ショックを与え、次に氷上で2分間インキュベートする。SOC培地を細胞に加え、次にこの細胞を37下で1時間振盪(220rpm)する。25μg/mLのクロラムフェニコール(Sigma-A1

50

drich, St. Louis, MO) を添加した LB プレートに細胞を播種する。形質転換細胞のコロニーの配列決定をする。配列決定後、Qia prepミニキット (Qiaagen Inc, Valencia, CA) を使用してプラスミド pDM20\_T を調製する。

#### 【0346】

エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) 由来の 2 つの遺伝子、すなわち mvaE 及び mvaS を含むメバロン酸経路上流を、プライマー UP\_EF\_BamHI (SEQ) 及び UP\_EF\_R\_Xho (SEQ) を使用して、テンプレート pCL-PtrcUpper (pCHL276) から PCR により増幅させる。得られる PCR 産物を BamHI 及び XhoI により消化し、Zymoclean ゲル DNA 回収キット (Zymo Research Corp) を使用しゲル精製する。10

#### 【0347】

エンテロコッカス・ガリラナラム (*Enterococcus gallinarum*) 由来の mvaE 及び mvaS をコードしている遺伝子を、プライマー UP\_EF\_BamHI (SEQ) 及び UP\_EG\_R\_Xho (SEQ) を使用して、テンプレート pCL-Ptrc-upper\_Gc-MM163 から PCR により増幅させる。得られる PCR 産物を BamHI 及び XhoI により消化し、Zymoclean ゲル DNA 回収キット (Zymo Research Corp) を使用しゲル精製する。

#### 【0348】

ベクター pDM20\_T を BamHI 及び SalI により 2 回消化し、DNA Clean and Concentrator - 5 キット (Zymo Research Corp) により精製する。20

#### 【0349】

消化したベクター pDM20\_T 及び UP\_EF 断片を、キットの取扱説明書に従って Quick Ligation キット (NEB) を使用して連結させる。連結させた核酸により TOP10 ケミカルコンピテントセル (Invitrogen) を形質転換させ、25 μg / mL のクロラムフェニコールを添加した LB プレートに播種する。形質転換体の配列決定をする。得られたプラスミドを pDM20\_T\_EF と表記する。

#### 【0350】

消化したベクター pDM20\_T 及び UP\_EG 断片を、キットの取扱説明書に従って、Quick Ligation キット (NEB) を使用して連結させる。連結させた核酸により TOP10 ケミカルコンピテントセル (Invitrogen) を形質転換させ、25 μg / mL のクロラムフェニコールを添加した LB プレートに播種する。形質転換体の配列決定をする。得られたプラスミドを pDM20\_T\_EG と表記する。30

#### 【0351】

I.I. メバロン酸経路上流を発現しているラクトバチルス (*Lactobacillus*) 株の作製  
米国特許出願公開第 2011/0244536 (A1) 号に記載の手順に従い、プラスミド pDM20\_T, pDM20\_T\_UP\_EF 及び pDM20\_T\_UP\_EG によりラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) PN0512 (ATCC 株番号 PTA-7727; (米国特許出願公開第 2008/0124774 (A1) 号) を形質転換させる。1% グリシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を添加した、5 mL のラクトバチルス (*Lactobacilli*) 用 MRS 培地 (Becton Dickinson, Sparks, MD) に、PN0512 細胞を接種し、30 ℃ で一晩生育させる。1% グリシンを添加した 100 mL の MRS 培地に OD600 が 0.1 となるよう一晩培養物を接種し、OD600 が 0.7 になるまで 30 ℃ で生育させる。4 にて 3700 × g で 8 分間処理して細胞を回収し、100 mL の冷 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) で洗浄し、4 にて 3700 × g で 8 分間遠心分離し、100 mL の冷 30% PEG-1000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) で洗浄し、次に 4 にて 3700 × g で 20 分間遠心分離し、次に 1 mL の冷 30% PEG-1000 に再懸濁させる。電極間隔 1 mm の40  
50

冷キュベット内で、 $60\mu\text{L}$ の細胞と約 $100\text{ng}$ のプラスミドDNAを混合し、 $1.7\text{kV}$ 、 $25\mu\text{F}$ 及び $400$ に設定したBioRad Gene Pulser (Hercules, CA)により電気穿孔を行う。 $500\text{mM}$ のスクロース (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 及び $100\text{mM}$ のMgCl<sub>2</sub>を添加した $1\text{mL}$ のMRS培地に細胞を再懸濁し、 $30$ にて2時間インキュベートし、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ のクロラムフェニコール (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を添加したMRS培地プレートに播種し、次に $30$ でインキュベートする。

### 【0352】

#### I II I . メバロン酸についての試験

本実施例は、E.ガリナラム (E. gallinarum) のメバロン酸経路上流を加えたラクトバチルス (Lactobacillus) 株によるメバロン酸の生産量は、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) 由来のメバロン酸経路上流を含有している株と比較して、増大していることを例証することを目的とする。

### 【0353】

#### (i) 材料及び方法

細胞培養 : pDM20-T\_UP\_EF 及び pDM20-T\_UP\_EG 並びに空の対照プラスミド pDM20-T を含有している L. プランタラム (L. plantarum) PN0512 を、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$  のクロラムフェニコールを添加した $20\text{mL}$  のラクトバチルス (Lactobacilli) MRS 培地で一晩生育させる。培養物を $30$ で $14$ 時間（一晩）インキュベートする。 $5\text{mL}$  の $48$ ウェルプレート (Axygen Scientific) に、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$  クロラムフェニコールを添加した $2\text{mL}$  のMRSを入れ、最終ODが $0.2$ となるよう一晩培養物を希釈する。プレートを、Breath Easier membrane (Diversified Biotech) でシールし、Shel Lab 振とう / 恒温器で、 $30$ にて、 $600\text{rpm}$ で $24$ 時間インキュベートする。各培養物 $1\text{mL}$  を $3,000\text{g}$ で $5$ 分間遠心分離する。 $250\mu\text{L}$  の上清に $19\mu\text{L}$  の $20\%$ 硫酸を添加し、氷上で $5$ 分間インキュベートする。次に、混合物を $3000\times g$ で $5$ 分間遠心分離し、HPLC 解析のため上清を回収する。 $200\mu\text{L}$  の上清を、HPLC に適した $96$ ウェル円錐底ポリプロピレンプレート (Nunc) に移す。メバロン酸 (Sigma) の標準曲線と比較して、試料中のメバロン酸濃度を測定する。製造元 (Pointe Scientific, Inc.) の指定に従ってグルコースオキシダーゼアッセイを実施し、グルコース濃度を測定する。

### 【0354】

HPLC によるメバロン酸の検出 :  $50$ でインキュベートし、BioRad -マイクロガード Carbo - H 詰め替えカートリッジ $30\text{mm} \times 4.6\text{mm}$  (カタログ番号 125-0129) を取り付けた $300\text{mm} \times 7.8\text{mm}$  BioRad - Aminex HPX - 87H イオン排除カラム (カタログ番号 125-0140) を使用し、Knauer K2301屈折率検出器を系に包含させた Waters 2695 Alliance のHPLC 系でHPLC 解析を実施する。移動相に $0.01\text{N}$ 硫酸を使用し、流速 $0.6\text{mL}/\text{min}$ でHPLC 解析を実施する。HPLC を使用し、各サンプルにより得られた屈折率を、濃度既知の各種メバロン酸溶液のHPLC をもとに作成した検量線に対し比較して、プロスのメバロン酸濃度を定量することができる。

### 【0355】

#### (i i ) 結果 :

E.ガリナラム (E. gallinarum) 由来の遺伝子によりコードされるメバロン酸経路上流を発現しているラクトバチルス (Lactobacillus) 株によるメバロン酸の比生産量を、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) 由来の遺伝子によりコードされるメバロン酸経路上流を発現している株と比較する。細菌は同一条件下で生育させた。HPLC 解析により、E.ガリナラム (E. gallinarum) の上流経路を有する株は、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) 由来の上流経路を有する株と比較して、イソブレンの比生産量が高いことが示される。E.ガリナラム (E. gallinarum)

10

20

30

40

50

又はエンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) 由来の上流経路を発現しているいずれの株も、空の対照プラスミドを含有させた株と比較して、多量のメバロン酸を生産した。

### 【0356】

実施例15：ラクトバチルス (*Lactobacillus*) を使用したイソプレン生産用の株の構築

ラクトバチルス (*Lactobacillus*) においてイソプレンを生産させるには、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) の染色体に、MVK、yPMK、MVD遺伝子からなるメバロン酸経路の下流を組み込む必要がある。イソプレン合成酵素及びIDIをコードしている遺伝子を、プラスミドのP1dhlプロモータの調節下に、オペロンとしてクローン化する。上流経路の遺伝子 (mvae 及びmvAS) を、同一のプラスミドの、対照となるP30プロモータの調節下に、オペロンとしてクローン化する。メバロン酸経路の下流を組み込んだラクトバチルス (*Lactobacillus*) を、IspS-IDIオペロン及び上流経路のオペロンを含有しているプラスミドにより形質転換させる。

10

### 【0357】

I. 大腸菌 (*E. coli*) - ラクトバチルス (*Lactobacillus*) シャトルベクターへのIspS-IDIオペロンのクローン化

*Phusion* 高忠実度DNAポリメラーゼを使用し、キットの取扱説明書に従って、HF緩衝液を使用し 50 μL の反応スケールで、プライマー P1dhl\_F (SEQ) 及び P1dhl\_R (SEQ) により、テンプレート pDM5-P1dhl1-ilvc (米国特許出願公開第2011/0136192号) から P1dhl プロモータを増幅させた。アニーリング温度は 55 °C であり、伸長は 72 °C で 10 秒である。キットのプロトコルに従い、DNA Clean and Concentrator-5 キット (Zymo Research Corp) により PCR 反応物を精製する。精製した PCR 産物及びベクター pDM20-T1 を、PstI により 37 °C で 2 時間消化する。ベクター及び挿入断片を 80 °C で 20 分間インキュベートし、PstI を失活させる。PstI により消化したベクターをエビアルカリホスファターゼ (Affymetrix Inc, SANTA CLARA, CA) により 37 °C の 30 分間処理する。65 °C で 15 分間加熱してホスファターゼ反応を停止させる。処理したベクター及び消化した PCR 産物を、いずれもキットの取扱説明書に従って DNA Clean and Concentrator-5 キット (Zymo Research Corp) により精製する。

20

### 【0358】

消化した PCR 産物及びベクターを、Quick Ligation キット (NEB) を使用して連結させる。連結させた混合物によりケミカルコンピメント大腸菌 (*E. coli*) Top10 セル (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) を形質転換させる。37 °C 下で、25 μg/mL クロラムフェニコールを添加した LB プレートにより形質転換体を選択する。DNA 配列の解析をもとに、形質転換体を選択する。得られたプラスミドを pDM20-T\_P1dhl と呼ぶ。

30

### 【0359】

Gene Oracle Inc. (Mountain View, CA) により、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) i spS 遺伝子及び yIDI 遺伝子を、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 用にコドン最適化して合成する。遺伝子は、それぞれ遺伝子の ATG 開始コドンから始まる、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) のリボソーム結合部位を有するオペロンとして合成する。IspS-yIDIオペロンを PCR Blunt II TOPO (Invitrogen) にクローン化して、PCR Blunt II TOPO-II を作製する。

40

### 【0360】

*Phusion* 高忠実度DNAポリメラーゼを使用し、55 °C のアニーリング及び 1 分の伸長反応を行い、PCR Blunt II TOPO-II からプライマー II\_F Avr2 (SEQ) 及び II\_R Nde (SEQ) により i spS-yIDI オペ

50

ロンを増幅させる。

【0361】

ベクター pDM20-T\_P1dhL 及び ipsyIDI PCR 産物を、Avr I I 及び Nde I により消化する。ベクター及び挿入断片を連結させ、TOP10 cel1s を形質転換させた。37 下で、25 μg / mL クロラムフェニコールを添加した LB プレートにより形質転換体を選択する。DNA 配列の解析をもとに、形質転換体を確認する。得られたプラスミドを pDM20-T\_P1dh-II と呼ぶ。

【0362】

II . ipsyIDI によるプラスミドへの上流経路の付加

BamHI 及び SalI によりベクター pDM20-T\_P1dh-II を消化した。この消化したベクターを、BamHI 及び XhoI により消化した EF\_UP PCR 産物と連結させる（実施例 14 を参照されたい）。この消化したベクターを、BamHI 及び XhoI により消化した EG\_UP PCR 産物とも連結させる（実施例 14 を参考されたい）。連結させた核酸により Top10 cel1s を形質転換させ、25 μg / mL クロラムフェニコールを添加した LB プレートに播種し、37 で選択する。得られたプラスミドを pDM20T-EF-P1dh-II 及び pDM20T-EG-P1dh-II と呼ぶ。

【0363】

III . 下流経路組み込みベクター及び PN0512\_1dhL1 : : MVK - yPMK - MVD 組み込み株の構築

本節では、MVK、yPMK、MVD を発現させるため、MVA 経路下流の遺伝子を L. プランタラム (L. plantarum) の PN0512 株の染色体に組み込む。遺伝子は、細胞代謝に影響を及ぼさない中立な位置など染色体の異なる位置に組み込むことができ、あるいは組み込みは細胞生理を変更させよう設計することもできる。

【0364】

PN0512 株において、MVK、yPMK、MVD のコード領域が、1dhL1 プロモータの下流に配置されるように、2 回の遺伝的乗り換えにより相同な領域が得られるよう、2 つの DNA 断片（相同断片 (homologous arms)）を設計する。プラスミドにクローン化した、左側及び右側の相同断片は、それぞれ約 1200 塩基対である。左側及び右側の相同断片は、L. プランタラム (L. plantarum) PN0512 ゲノム DNA から増幅させる。組み込みベクター pFP996-1dhL1-arms の構築法は、米国特許出願公開第 2011/0244536 (A1) 号に記載のものである。この特許文献は参考により本明細書に組み込まれる。

【0365】

下流経路の遺伝子は、増幅させる MPM オペロンに対するテンプレートとして、大腸菌 (E. coli) MVK CMP 451 (MVK、yPMK、MVD 及び yIDI のコード配列を含有している) 由来のゲノム DNA を使用し、PCR により増幅させる。Gentra Pure Gene キット (Qiagen Inc., Valencia, CA) を使用して、37 で定常相 (stationary phase) になるまで LB で生育させた培養物の細胞ペレット 1 mL から、ゲノム DNA を精製する。Phusion 高忠実度 PCR キット (New England Biolabs) を使用して、Xho I 部位、Spe I 部位、及びリボソーム結合配列を含有するプライマー-MPMI\_Xho\_Spe\_For (表 23)、並びに Pme I 及び Xho I 部位を含有している MPM\_Pme\_Xho Rev1 (表 23) により、MPM オペロンを作製する。典型的な PCR 反応液 (50 μL) は、1X HF 緩衝液、1 μL の 10 mM の dNTP、2.5 μL の 10 μM の各プライマー、0.5 μL の Phusion ポリメラーゼ及び 250 ng のゲノム DNA からなる。サイクル条件：98 で 30 秒 × 1 サイクル、続いて 98 で 10 秒、56 で 30 秒、72 で 2 分 20 秒を 30 サイクル。これらのサイクルの後、反応混合物は 72 で 10 分保持する。Zymo Clean and Concentrate-5 キット (Zymo Research) を使用して、反応物を精製する。得られた PCR 断片

10

20

30

40

50

を、制限エンドヌクレアーゼの Xho I ( New England Biolabs ) により 37 下で消化する。反応物は、Zymo Clean and Concentrate - 5 キット ( Zymo Research ) を使用して精製する。

## 【0366】

## 【表19】

表18：プライマー

名前	配列
T1T2_F_Hind3_Sal	CATAAGCTTGTGACCCATGCGAGAGTAGGAACTGCC
T1T2_R_Pst	CATCTGCAGTCATGAGCGGATACATATTGAA
UP_EF_BamHI	CATGGATCCCGATTAATAAGGAGGAATAAAC
UP_EF_R_Xho	GTCACTCGAGGGTACCAAGCTGCAGATCTCTAG
UP_EG_R_Xho	GTCACTCGAGCATATGGTACCAAGCTGCAGTC
PldhL_F	CATCTGCAGTAAGTCGTATTGGCACCACTACTCAC
PldhL_R	CATCTGCAGCATATGATCCTAGGGCTTGACAAAATAAGTCATCCTCTC
II_F_Avr2	CATCCTAGGAGGAGGAGAAAAAAACCATG
II_R_Nde	CATCATATGTTACAACATTCTGTGAATTGTCG
MPMI_Xho_Spe_For	CAATCTCGAGACTAGTCAAAGGAGGTAAAAAACATGGTATC
MPM_Pme_Xho_Rev1	GTTACTCGAGGTTAAACTATTCCCTTGGTAGACCAGTCTTG
MPMIsqF5	GTGGCCTGGAAATGGGAAAAGCTG
IdhseqR3	CCCCCAATCATAAGTCCACGTTA
MPMIsqF3	CAGATATTGGAAGTGCTACTTACGGC
MPMIsqF4	TGCGGTAACGGATGCTGTGAAACGG
IdhL_left_arm_check_UP	CAACCGAGGTACGACCACTGCCG
MPMIsqR8	GAACACGGGTACGCAGTCCACCG
MPMIsqF6	GATGTTGCCAGAGTGATTAACTC
IdhL_right_arm_check_DN	GAAACTGGTTGGGAATAACTTGAGCC

## 【0367】

pFP996-ldhL1armsベクターを制限酵素 Xho I ( New England Biolabs ) により消化する。消化させた後、Xho I を 65 度 20 分間処理し失活させる。次に、ベクター端をエビアルカリホスファターゼ ( Affymetrix ) により脱リン酸化させる。反応物を 37 度 45 分インキュベートし、次に 65 度 15 分間処理してホスファターゼを失活させる。Zymoclean Gel DNA 回収キット ( Zymo Research Corp. ) を使用し、アガロースゲルからベクターを精製する。

## 【0368】

得られた、Xho-I により消化し脱リン酸化したベクター-pFP996ldhL1arms、及び Xho I - により消化した MPM 断片を、Quick Ligation キット ( NEB ) を使用し 25 度 5 分間連結させる。連結させた核酸溶液により、ケミカルコンピテント大腸菌 ( E. coli ) Stbl3 ( Invitrogen ) セルを形質転換させる。典型的な形質転換反応は、細胞及び連結させた核酸を混合して氷上で 30 分おき、42 度 45 秒熱ショック処理を行い、氷上で 2 分間インキュベートし、並びに SOC 培地により 30 度 1 時間回復させるという工程からなる。選択を行うため、アンピシリン ( 100 µg / mL ) を添加した LB 寒天に形質転換体を播種する。プレートを 30 度一晩インキュベートする。

## 【0369】

プライマー-MPMIsqF5 ( 表18 ) 及び IdhseqR3 ( 表18 ) を使用して

10

20

30

40

50

、Jump Start（商標）RED Taq（登録商標）Ready Mix（商標）反応ミックス（Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis MO）によるPCRを行い、形質転換体のコロニーを選択した。いくつかのポジティブな形質転換体をDNA配列決定により確認する。得られた組み込みプラスミドはpFP996-1dhL1arms::MPMと表記する。

#### 【0370】

アンピシリン（100 µg / mL）を添加したLBで一晩生育させた、大腸菌（E. coli）Stb13/pFP996-1dhL1arms::MPM株由来の細胞ペレットから、Qiaprep Miniキット（Qiagen Inc, Valencia, CA）を使用してプラスミドDNAを単離する。

10

#### 【0371】

1dhL1プロモータにより発現されるよう、及び1dhL1がその後欠失されるよう、MPMオペロンをラクトバチルス・プランタルム（*Lactobacillus plantarum*）PN0512株の染色体に組み込む。非標識遺伝子の欠失に際し、欠失ではなく二重乗り換えにより野生型配列又は意図する組み込みが得られたこと以外は記載（Ferain et al., 1994, J. Bact. 176: 596）の通り、同様の二工程の相同組み換え法を使用して、1dhL1プロモータから発現させたコード領域のMVK、yPMK、MVDのシングルコピーを染色体組みした。

#### 【0372】

pFP996-1dhL1arms::MPMを使用してL. plantarum（*L. plantarum*）PN0512を形質転換させて、MVK、yPMK、MVDコード領域を組み込んだ。0.5%グリシンを添加した5mLのラクトバチルス（*Lactobacilli*）MRS培地にPN0512を接種し、30で一晩生育させた。0.5%グリシンを添加した100mLのMRS培地に、OD<sub>600</sub>が0.1となるよう一晩培養物を接種し、OD<sub>600</sub>が0.7になるまで30で生育させる。4にて3700×gで8分間処理して細胞を回収し、100mLの1mMの冷MgCl<sub>2</sub>により洗浄し、4にて3700×gで8分間遠心分離し、100mLの30%冷PEG-1000により洗浄し4にて3700×gで20分間遠心分離し、次に1mLの30%冷PEG-1000に再懸濁した。電極間隔1mmの冷キュベット内で、60µLの細胞と約100ngのプラスミドDNAを混合し、1.7kV、25µF及び400に設定したBioRad Gene Pulserにより電気穿孔を行う。細胞を、500mMのスクロース及び100mMのMgCl<sub>2</sub>を含有している1mLのMRS培地に再懸濁し、30で2時間インキュベートし、次に2µg / mLのエリスロマイシン（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）を添加したMRS培地に蒔く。

20

30

#### 【0373】

オペロン特異的なプライマー-MPMI seq F3（表18）及びMPMI seq R4（表18）を使用してPCRを行い、形質転換を選択する。エリスロマイシン（1µg / mL）を添加したラクトバチルス（*Lactobacilli*）用MRS培地により、形質転換体を30にて約10継代にわたって(generations)生育させ、次にラクトバチルス（*Lactobacilli*）用MRS培地に連続的に接種して37にて約40継代分にわたって生育させる。エリスロマイシン（0.5µg / mL）を添加したラクトバチルス（*Lactobacilli*）用MRS培地に培養物を蒔く。染色体特異的なプライマーの1dhL1eft arm check DN（表18）、及びプラスミド特異的なプライマー-MPMI seq R8を使用して、コロニー-PCRにより、一重乗り換えが生じている分離株を選択する（表18）。

40

#### 【0374】

次に、一重乗り換え組み換え体をラクトバチルス（*Lactobacilli*）用MRS培地に連続的に接種して、約40継代にわたって37にて生育させる。培養物をMRS培地に蒔く。コロニーをMRSプレートに植継ぎ、37で生育させる。次に、エリスロマイシン（0.5µg / mL）を添加したMRS培地に分離株を植継ぐ。染色体に特異的なプライマー対及び遺伝子特異的なプライマー対を使用し、野生型又は二重乗り換えの存在について

50

のコロニーPCRを行い、エリスロマイシン感受性の単離株を選択する。ldhL left arm check UP 及び MPMI seq R8 により約 1400 bp の増幅産物が得られ、MPMI seq F6 及び ldhL right arm check DN . により約 1600 bp の増幅産物が得られる。PCR 産物の配列決定により組み込みを確認し、確認のなされた組み込み株を PN0512 ldhL1 : : MPM と命名した。

#### 【0375】

##### I V . イソプレンを生産する LAB 株の作製

上記の通りに電気穿孔法 (electrocompetent) を用い、pDM20T-EF-P1dh - II と pDM20T-EG-P1dh-II により形質転換させ、ラクトバチルス・プランタルム (Lactobacillus plantarum) PN0512 ldhL1 : : MPM を作製する。10 μg / mL クロラムフェニコールを添加した MRS に細胞を播種する。

10

#### 【0376】

##### 実施例 16 : ラクトバチルス (Lactobacillus) におけるイソプレン生産量の試験

本実施例は、E . ガリナラム (E. gallinarum) のメバロン酸経路上流を加えたラクトバチルス (Lactobacillus) 株によるイソプレンの生産量は、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) 由来のメバロン酸経路上流を含有している株と比較して、増大していることを例証することを目的とする。

#### 【0377】

##### ( i ) 材料及び方法

pDM20T-EF-P1dh-II 又は pDM20T-EG-P1dh-II を収容している PN0512 ldhL1 : : MPM を含有させた L . プランタラム (L. plantarum) を、10 μg / mL クロラムフェニコールを添加した MRS 培地に接種し、30 で 14 時間生育させる。株を MicroReactor Technologies, Inc. の Cellerator TM で生育させて、イソプレン生産量を解析する。各 24 ウェルの試験用量は 4 . 5 mL とする。一晩培養物を、10 μg / mL クロラムフェニコールを添加した 4 . 5 mL の MRS により、550 nm で測定される吸光度が 0 . 05 となるよう希釀する。温度は 30 に維持し、pH は 7 . 0 に設定し、酸素流量は 20 s ccm に設定し、攪拌速度は 800 rpm とした。

20

#### 【0378】

ガスクロマトグラフ - マススペクトロメータ (GC - MS) (Agilent) によるヘッドスペースアッセイによりイソプレンのオフガス分析を行う。サンプル調製は次の通りに行う：100 μL の全プロスを GC バイアルに入れて密封し、一定時間 (30 分間) にわたって 30 でインキュベートする。70 で 5 分のインキュベーションからなる熱殺菌工程後、試料を GC に装填する。

30

#### 【0379】

試験期間中、マイクロプレートリーダー (Spectramax) を使用し、波長 550 nm での吸光度 (OD) を得る。比産生性は、イソプレン濃度 (μg / L) を OD 読み取り値により除して算出する。各 24 ウェルについて、試料は小規模発酵過程にわたって 3 つの時点で採取する。

40

#### 【0380】

##### ( i i ) 結果：

E . ガリナラム (E. gallinarum) 由来の遺伝子によりコードされる上流経路を含有している、完全なメバロン酸経路を発現している株によるイソプレンの比生産量を、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) 由来のメバロン酸経路上流を含有している、完全なメバロン酸経路を発現している株による比生産量と比較する。細菌を同一の条件下で小規模発酵により生育させた。経時的なヘッドスペース測定 (米国特許出願公開番号第 2010 / 0086978 号を参照されたい) により、E . ガリナラム (E. gallinarum) の上流経路を含有させた株は、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) の上流経路を含有させた株と比較して、イソプレンの比生産量が大きいことが示される。

50

## 【0381】

実施例17：アモルファジエン又はファルネセン生産株の構築

MCM521可溶化液を使用し、CMP676にメバロン酸経路の下流を形質導入する（表3を参照されたい）。製造元に従いカナマイシンマーカーを除去する（Gene Bridges、Heidelberg、Germany）。MCM521の下流の経路は、別の遺伝子を使用することにより各遺伝子の前に位置するrbsを改変し、オペロン上流のプロモータを変更することで改変することができる。染色体上のプロモータ及び/又はrbsを変更させるか、又はプラスミドから発現させるかのいずれかにより、ファルネシルニリン酸合成酵素（ispA）を過剰発現させる。プラスミドpMCM1223（L.グレイ（L. grayi））、pMCM1224（E.フェシウム（E. faecium））、pMCM1225（E.ガリナラム（E. gallinarum））、pCHL276（E.フェカリス（E. faecalis））又はpCHL277（E.カセリフラブス（E. casseliflavus））を、プラスミドpDW34変異体と同時に電気穿孔した（米国特許出願公開第2010/0196977号；図2を参照されたい）。pDW34変異体のプラスミドは、大腸菌（E. coli）用にコドンを最適化させたファルネセン合成酵素又は大腸菌（E. coli）用にコドンを最適化させたアモルファジエン合成酵素を、イソプレンシンターゼの代わりに含有する。LB+スペクチノマイシン50ug/mL+カルベニシリン50ug/mLでコロニーを選択する。

10

## 【0382】

実施例18：その他のメバロン酸上流経路を有するプラスミドを含有させた株によるアモルファジエン又はファルネセンの生産量は、E.フェカリス（E. faecalis）上流経路を含有させた株と比較して、増大する

20

## (i) 材料

TM3培地組成（発酵培地1L当たり）：K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>（13.6g）、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>（13.6g）、MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O（2g）、クエン酸一水和物（2g）、クエン酸鉄アンモニウム（0.3g）、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>（3.2g）、酵母エキス（0.2g）、1000X微量金属溶液（1mL）。すべての成分を共に加え、脱イオン水に溶解させる。水酸化アンモニウム（30%）によりpHを6.8に調整し、及び容量を調整する。次に、0.22μmのフィルタを用い培地をろ過滅菌した。滅菌及びpH調整後にグルコース10.0g及び抗菌剤を添加する。

30

## 【0383】

1000X微量金属溶液（発酵培地1L当たり）：クエン酸 \* H<sub>2</sub>O（40g）、MnSO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O（30g）、NaCl（10g）、FeSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O（1g）、CoCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O（1g）、ZnSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O（1g）、CuSO<sub>4</sub> \* 5H<sub>2</sub>O（100mg）、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>（100mg）、NaMoO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O（100mg）。各成分を1成分ずつ脱イオン水に溶解させ、HCl/NaOHによりpH 3.0に調整し、次に溶液を用量に調整し、孔径0.22マイクロメートルのフィルタを用いて過滅菌した。

30

## 【0384】

## (i) 実験手順

40

ルリア・ベルターニプロス+抗生素で細胞を一晩生育させる。翌日、OD600が0.05になるよう細胞を20mLのTM3培地（50ug/mLのスペクチノマイシン及び50ug/mLのカルベニシリンを含有（250mLのバッフル付き三角フラスコ））により希釈し、34かつ200rpmでインキュベートする。接種前に、各培養フラスコには20%（v/v）ドデカン（Sigma-Aldrich）を積層し、これまでに記載の通り、揮発性セスキテルペン産物を捕捉する（Newman et al., 2006）。

## 【0385】

2時間生育させた後、OD600を測定し、0.05~0.40mMのイソプロピル-d-1-チオガラクトピラノシド（IPTG）を加えた。発酵工程の間、規則的に試料

50

を採取する。各時点でOD600を測定する。また、積層したドデカンを酢酸エチルに希釈し、有機層中のアモルファジエン又はファルネセン濃度を分析する。ドデカン／エチルアセテート抽出物を、従来記載されている通りの(Martin et al., Nat. Biotechnol. 2003, 21: 96~802) GC-MS法により、アモルファジエンの分子イオン(204m/z)及び189m/zフラグメントイオン又はファルネセンの分子イオン(204m/z)の観察により解析する。濃度既知のアモルファジエン又はファルネセン試料を装填して、それぞれアモルファジエン又はファルネセンの標準曲線を生成する。試料中のアモルファジエン又はファルネセンの量は、それぞれアモルファジエン又はファルネセンの標準曲線を使用し算出する。

## 【0386】

10

## (iii) 結果

pMCM1223 (*L. grayi*)、MCM1224 (*E. faecium*)、pMCM1225 (*E. gallinarum*)又はpCHL277 (*E. casseliflavus*)を株に含有させた場合、pCHL276 (*E. faecalis*)を含有しており同一のバックグラウンドを有する株と比較して、比生産性、収率、CPI及び/又はアモルファジエン若しくはファルネセン力価の増大が観察された。

## 【0387】

20

## (iv) 引用文献:

Newman, J. D., Marshal, J. L., Chang, M. C. Y., Nowroozi, F., Paradise, E. M., Pitera, D. J., Newman, K. L., Keasling, J. D., 2006. High-level production of amorphha-4,11-diene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *E. coli*. Biotechnol. Bieng. 95: 684~691.

## 【0388】

30

Martin, V. J., Pitera, D. J., Withers, S. T., Newman, J. D., Keasling, J. D., 2003. Engineering a mevalonate pathway in *E. coli* for production of terpenoids. Nat. Biotechnol. 21: 796~802.

## 【0389】

実施例19：大腸菌(*E. coli*)BL21又は大腸菌(*E. coli*)BL21(DE3)で発現させた時に分解しないMvaEタンパク質の同定

細胞で異種発現させたタンパク質が分解することで、タンパク質の合成及び分解という無駄なサイクルによりATPの損失が生じる、分解するタンパク質の触媒活性が減少する、対象とするタンパク質の定常状態の細胞内濃度が減少する、細胞生理を変更し得るストレス応答を誘導する、及び生物に由来する市販の製品に有害となる可能性のあるその他の効果が生じる恐れがある(S.-O. Enfors, 2004)。したがって、分解しにくい完全長のタンパク質を発現させることは、代謝工学の面から有益である。ウェスタンプロットにより検出される断片により示される通り、エンテロコッカス・フェカリス(*Enterococcus faecalis*)由来のMvaE遺伝子産物は、大腸菌(*E. coli*)BL21で発現させた場合に部分的に分解する(図9)。Hisタグ生成したサンプルを泳動したSDS-PAGEゲルのSafe stain染色により、*E. faecalis*(*E. faecalis*)MvaEの切断断片も検出される(図10)。分解耐性のあるMvaE遺伝子産物の同定及び使用は、メバロン酸、イソブレン及びイソブレノイドの生産量を増加させるのに有用である。

## 【0390】

40

大腸菌(*E. coli*)BL21(DE3)で発現させて、SDS-PAGEゲルをSafe

50

*estain*で染色して同定した後、*His*タグにより精製を行ったところ、すなわちメバロン酸、イソブレン又はイソブレノイドを生産する大腸菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) で発現させて記載の検出方法を使用したところ、識別可能な断片は存在していないことが示されたことから、生物の *E. faecium*、*E. galilinarum*、*E. casseliflavus* 及び *L. grayi* 由来の *mvaE* の遺伝子産物は分解していないことが立証された。

【 0 3 9 1 】

( i ) 方法：

Hisタグを付した、E.ガリナラム(*E. gallinarum*)、E.フェシウム(*E. faecium*)、E.カセリフラブス(*E. casseliflavus*)及びL.グレイ(*L. grayi*)由来のMvaEをコードしているDNAを含有するプラスミドを構築する。MvaEを大腸菌(*E. coli*)BL21(DE3)で発現させ、Ni-樹脂クロマトグラフィーで精製する。精製した試料をSDS-PAGEにより解析する。アニオン交換クロマトグラフィーにより、及び一部の場合ではゲルろ過により試料を更に精製する。均一性が95%以上になるよう精製した試料を、ポリクローナル抗体の作製に使用する。ウェスタンプロットにより生産株を解析し、対象とするMvaEに対し作製したポリクローナル抗体を用い標識した。

[ 0 3 9 2 ]

### ( i i ) 引用文献：

Enfors, S.O., Schepers, T. 「バイオプロセスにおける生理的なストレス応答 (Physiological Stress Responses in Bioprocesses)」 Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004。

[ 0 3 9 3 ]

配列

L. グレイ (L. grayi) m v a E :

【 0 3 9 4 】

atgtgttaaagacattgtataattgtgccctccgtactccatcgtaagtacctggcgcgactcataaagatgacgggggtggaaatggaaaccgcagttacaaggct  
ctgttcgagaagaacgaccaggtaaagaccatgtagaacaactgtcattttgcacgtttacaggcagggaacggccagaatccgcggcgttegatgcgccttaatc  
tggcctgtcccgagagataccggctegactattaccagggtgtgggttgcetgaaagcaataagcatggcgcgccaacagatctactcgaggaaageggaaagta  
atagtagcaggaggatcgaatccatgtacaalgcgcgaggattacatattalaalaagaagaagacacccttcataaagctgttgcgtacatgtacccttgc  
cgacgcggatlagcggaaagatattgggttaacagccgaaaalglgcgcgaaacagtacggcgtatcacgtgaggcccaggacgccttgcgtatgcgc  
agcagcaaaggcccaagaacaggccatttgcagctgaaatactgccttgcggaaataggggcgaagttattactcaggacgaggggggttcgtcaagagacc  
cgaaaaaattaatgtctgtccggaccattttaaagaagatggtaactgcggcacaacgcctcaacgatcaatgtggcgcctcageggctgtatgcgtatca  
gtttgcgagacaaaccagattccatctgcgtatgcattacatgcattatgcattgtccatcaataatggcattgtcccggtgagttgcgtatcaataactg  
tcgatgcgtatccatgtggaaatgcattgtggatgcattgtggatgcattgtggatgcattgtggatgcattgtggatgcattgtggatgcattgtgg  
atatttgccgttccggatgtcactaggccatcttgcgcacaggcgcgcgttgcacccctgcgcaccaggatgcacacacggcgtatgttat  
tgcctccctgtgcattggcgtggcttgcctgaaatattaaatagaatgtgcctcaggaaatgcattgtggatgcattgtggatgcattgtggatgcatt  
agacttcaggaggeaaggccgtatgcgcctcagatcaaaatgtactggcgcgaaatgcacttgcctgaaatgtgcattgtggatgcattgtggat  
ggaaatcccttgcgtggatgcattgtggatgcattgtggatgcattgtggatgcattgtggatgcattgtggatgcattgtggatgcattgtggat  
atggcaaaaccacccatggcgggtttcgtcagaattaaatggatgtttcgtggcaattgtacttgcattatgcattatgcattatgcattatgcatt  
gcagagaaageggcaatttgcgtccgcagcgcgcgtcacaatccatcattgtgttgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcatt  
cgatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattat  
atgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattat  
gtggatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattat  
ggggatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattatgcattat  
ccacttgcacttgc  
atgc  
atgc  
atgc  
atgc  
atgc  
atgc  
atgc  
atgc  
atgc  
atgc  
atgc  
atgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc  
atgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc  
atgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc  
atgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc  
atgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc  
atgcgcgcgcgcgcgcgcgc  
atgcgcgcgcgcgcgc  
atgcgcgcgcgc  
atgcgcgcgc  
atgcgcgc  
atgcgcgc  
atgcgc  
atgc  
atgtga 配列番号1

【 0 3 9 5 】

L. グレイ (L. grayi) m v a S :

【 0 3 9 6 】

【 0 3 9 7 】

10

E. フエシウム (E. faecium) m v a E :

【 0 3 9 8 】

20

[ 0 3 9 9 ]

E. フエシウム (E. faecium) m v a S :

[ 0 4 0 0 ]

30

40

[ 0 4 0 1 ]

E. ガリナラム (E. gallinarum) m v a E

[ 0 4 0 2 ]

10

20

30

【 0 4 0 3 】

## E. ガリナラム (E. gallinarum) m v a S :

【 0 4 0 4 】

【 0 4 0 5 】

E. カセリフラブス (E. casseliflavus) m v a E :

【 0 4 0 6 】

10

番号7

20

E. カセリフラブス (E. casseliflavus) m v a S :

【 0 4 0 8 】

30

【 0 4 0 9 】

E. ガリナラム (E. gallinarum) EG2 (mvaE) :

【 0 4 1 0 】

MEEVVIIIDARRTPIGKYHGSLKKFSAVALGTAVKADMERNQKIKEEIAQVIIGNVLQAGNGQNPARQVA  
LQSGLSVDIPASTINEVCGLSKAILMGMEQIQLGKAQVVLAGGIESMTNAPSLSHYNKAEDTYSVPVSS  
MTLDGLTDASFSSKPMGLTAENVAQRGYGISREAQDQFAYQSQMKAAKAQAENKFAKEIVPLAGETKTITAD  
EGIRSQTTEKLSLKPVFKTDGTVTAGNASTINDGAALVLASKTYCETNDIPYLATIKEIVBVGIDPE  
IMGISPIKAIQTLQNQKVSLIEDIGVFFINEAFASSIVVESELGLDPAKVNRYGGISLGHAIGATGAR  
LATSLVYQMQEIQARYGIASLCVGGGLGLAMLLERPTIEKAKPTDKKFYELSPAERLQELENQQKISSET  
KQQLSQMMLAEDTANHILIENQISEIELPMGVGMNLKVDGKAYVVPMAIEEPSVIAAMSGAKMAGEIHTQ  
SKERLLRGQIVFSAKNPNEIEQRIAENQALIFERAEQSYPSIVKREGGLRRIALRHFPADSQQESADQST  
FLSVDFLVFDVKDAMGANIINAILEGVAALFREWFPNEEILFSILSNLATESLVTAVCEVPDFSALKRGGA  
TVAQKIVQASLFAKTDPYRATHNKGIMNGVEAVMLATGNDTRAVSAACHGYAARTGSYQGLTNWTIESD  
RLVGEITLPLAIAATVGGATKVLPKAQAALEISDVHSSQELALAASVGLVQNLAALRALVSEGIQKGHMS  
MOARSLLAIAVGAEKAIEQVAEKLQRONPPMNQQOALRFLGEIREQ 配列番号9

40

MQARSLIAAVGAEKAEIEQVAEKLQNPPMNQQQALRFLGEIREQ 配列番号9

【 0 4 1 1 】

MNVGIDKINFFVPPYYLDMVDLAHAREVDPNKFTIGIGQDQMAVSKTHDIVTFAASAAKEILEPEDLQA  
 IDMIVVGIESGIDESKASAVVLHRLLGQPFARSFEIKEACYGATAGIQFAKTHIQANPESKVLVIASDI  
 ARYGLRSGGEPTQGAGAVAMLLTANPRILTFENDNLMLTQDIYDFWRPLGHAYPMVDGHSNQVYIDSFK  
 KVWQAHCERNQASISDYAAISFHIPYTKMGKKALLAVFADEVETEQERVMARYEESIVSRRIGNLYTG  
 LYLGLISLLENSSHLSAGDRIGLFSYSGAVSEFFSGRLVAGYENQLNKEAHTQLLDQRQKLSIEEYEAI  
 FIDSLEIDQDAAFSDDLPSIREIKNTIRYYKES 配列番号10

## 【 0 4 1 3 】

L . グレイ ( *L. grayi* ) ( m v a E ) :

## 【 0 4 1 4 】

MVKDIVIIDALRTPIKGKYRGQLSKMTAVELGTAVTKALFEKNDQVKDHVEQVIFGNVLQAGNGQNPARQI  
 ALNSGLSAEIPASTINQVCGSGLKAISMARQQILLGEAEVIVAGGIESMTNAPSITYYNKEEDTLSKPVP  
 TMTFDGLTDAFSGKIMGLTAENVAEQQYGVREAQDAFAYGSQMKAAKAQEQGIFAAEILPLEIGDEVITQ  
 DEGVRQETTLEKSLLRТИKEDGTVTAGNASTINDGASAVIIASKEFAETNQIPYLAIVHDITEIGIDP  
 SIMGIAPVSAINKLIDRNQISMEEIDLFEINEAFAASSVVVQKELSIPDEKINIGGSGIALGHPLGATGA  
 RIVTLAHQLKRTHGRYGIASLCIGGLGLAILIEVPQEDQPVKKFYQLAREDRLARLQEQAVisPATKH  
 VLAEMTLPEDIADNLienQISEMEIPLGVALNLRVNDKSYTIPLATEEPSVIAACNNGAKMANHLGGFQS  
 ELKDGFRLRGQIVLMNVKEPATIEHTITAEKAAIFRAAAQSHPSIVKRGGLKEIVVRTFDDDPFLSIDL  
 IVDTKDAMGANIINTILEGVAGFLREILTEEILFSILSNYATESIVTASCRIPYEALSKKGDGKRIAEV  
 AAASKFAQLDPYRAATHNKGMNGIEAVVLAGNDTRAVALAAHAYASRDQHYRGLSQWQVAEGALHGEI  
 SLPLALGSVGGAEVLPKAKAAFEIMGITEAKELAEVTAAVGLAQNLAAALRALVSEGIQQGHMSLQARSL  
 ALSVGATGKEVEILAELQGSRMNQANAQTILAEIRSQKVEL 配列番号11

## 【 0 4 1 5 】

L . グレイ ( *L. grayi* ) ( m v a S ) :

## 【 0 4 1 6 】

MTMNVGIDKMSFFVPPYFVDMTDLAVARDVDPNKFLIGIGQDQMAVNPKTQDIVTFAATNAKNILSAEDL  
 DKIDMVIVGIESGIDESKASAVVLHRLGIQKFARSFEIKEACYGGTAALQFAVNHIRNHPEVKLVVAS  
 DIAKYGLASGGEPTQGAGAVAMLVSTDPKIIAFNDDSLALTQDIYDFWRPGHDYPMDGPLSTETYIQS  
 FQTVQEYTKRSQHALADFAlSFHIPYTKMGKKALLAILEGESEEAQNRILAKYEKSIAYSRKAGNLYT  
 GSILYGLISLLENAEDLKAGDLIGLFSYSGGAVAEEFFSGRLVEDYQEQLLKTKHAEQLAHRKQLTIEEYE  
 TMFSDRLDVDKDAEYEDTLAYSISSVRNTVREYRS 配列番号12

## 【 0 4 1 7 】

E . フェシウム ( *E. faecium* ) ( m v a E ) :

## 【 0 4 1 8 】

MKEVVMIDAARTPIKGKYRGSLSPFTAVELGTLVTKGLLDKTKKKDKIDQVIFGNVLQAGNGQNVARQIA  
 LNSGLPVDPVPAWTINEVCGSGMKAVILARQLIQLGEAEELVIAGGTESMSQAPMLKPYQSETNEYGEPISS  
 MVNDGLTDAFSNAHMGLTAEKVATQFSVSREEQDRYALSQLKAAHAVEAGVFSEETIPVKISDEDVLS  
 DEAVRGNSTILEKLGILRTVSEEGTVIAGNAPLNDGASVILASKEYAENNLPLATIKEVAEVGIDP  
 SIMGIAPIKAIQKLTDMSGMLSTIDLFEINEAFAASSIVSQUELQLDEEKVNHYGGAIALGHPIGASGA  
 RILTLAYGLLREQKRYGIASLCIGGLGLAVLLEANMEQTHKDVKQKKFYQLTPSERRSQLIEKNVLTQ  
 ETALIFQEQTLSSEELSDHMIENQSEVEIPMGIAQNFQINGKKWIPMATEEPSVIAASNGAKICGNIC  
 AETPQRLMRGQIVLSKGSEYQAVINAVNHRKEELILCANESYPSIVKRGGVQDISTREFMGSFHAYLSI  
 DFLVDVKDAMGANMINISLESVANKLREWFPSEEIELFSILSNFATESLASACCEIPFERLGRNKEIGEQI  
 AKKIQQAGEYAKLDPYRAATHNKGMNGIEAVVATGNDTRAVSASIHYAARNGLYQGLTDWQIKGDKL  
 VGKLTVPLAVATVGGASNILPKAKASLAMLDIDSAKELAQVIAAVGLAQNLAAALRALVTEGIQKGHMGLQ  
 ARSLAISIGAIGEEIEQVAKKLREAEMNQQTAIQILEKIREK 配列番号13

## 【 0 4 1 9 】

E . フェシウム ( *E. faecium* ) ( m v a S )

## 【 0 4 2 0 】

MKIGIDRLSFFIPNLYLDMTELAESRGDDPAKYHIGIGQDQMAVNTRANEDIITLGANAASKIVTEKDREL  
 IDMIVVGIESGIDHSKASAVIHHLLKIQSFARSFEVKACYGGTAALHMAKEYVKNHPERKVLVIASDI  
 ARYGLASGGEVTQGVGAVAMMITQNPRLSTIEDSVFLTEDIYDFWRPDYSEFPVVDGPLSNSTYIESFQ  
 KVWNRHKELSGRGLEDYQAIASFHIPYTKMGKKALQSVLDQTDEDNQERLMARYEESIRYRIGNLYTG  
 LYLGLTSLENSKSLQPGDRIGLFSYSGGAVSEFFGYLEENYQEYLFQAQSHQEMLDSTRITVDEYETI  
 FSETLPEHGECAEYTSVPFSITKIENDIRYYKI 配列番号14

10

20

30

40

50

【 0 4 2 1 】

### E. カセリフラブス (*E. casseliflavus*) ( m v a E ) :

【 0 4 2 2 】

MEEVVIIDALRTPIGKYHGSLKDYTAVELGTVAAKALLARNQQAKEHIAQVIIGNVLQAGSGQNPGRQVS  
LQSGLSSDIPASTINEVCGSGMKAILMGMEQIQLNKASVVLGGIESMTNAPLFSYNNKAEDQYSAPVST  
MMHDGLTDAFSSKPMGLTAETVAERYGITRKEQDEFAYHSQMKAAKAQAACKFDQEIVPLTEKGTVLQD  
EGIRAAITVEKLAELKTVFKKDGTVTAGNASTINDGAAMVLIASKSYCEEHQIPYLVAVIKEIVEVGFAPE  
IMGISPIKAIDTLLKNQALTIEDIGIFEINEFAASSIVVEREGLDPKVKVNRYGGISLGHAI  
GATGARIATTVAYQLKDTQERYGIASLCVGGGLGLAMLLENPASATASQTNFDEESASEKTEKKKFYALAPNERLAF  
LEAQGAIATAETL VFQEMTLN KETANHLIENQISEVEIPLGVGLNLQVNKGAYNVPLATEEPSVIAAMSN  
GAKMAGPITTTSQERLLRGQIVFMDVQDP E AILAKVESEQATIFAVANET YPSIVKRGGGLRRVIGRNFS  
PAESDLATAYVSIDL MVDVKDAMGANTINSILEGV AELFRKWFPEEE ILSI LS N LATESL V T ATCSVPF  
DKLSK T GNGRQVAGKIVHAADFAKIDPYRAATHNK GIMNGV E ALI LAT GND TRAVS AACHGYAARNGRM  
GLTSW TI EDRLIGS ITLPLAIA TVGGATKILPKA Q A AL ALTGVETASELASLAASVGLVQNL A AL RALV  
SE GI OQGHMSMQARSLAISVGAKGTEI E QLA A K L RAAT OMNOEQARKFLTEIRN 配列番号15

10

[ 0 4 2 3 ]

E. カセリフラブス (E. casseliflavus) (mvaS)

[ 0 4 2 4 ]

MNVGIDKINFFVPPYFIDMVDLAHAREVDPNKFTIGIGQDQMAVNKKTQDIVTFAMHAAKDILTKEDLQA  
IDMVIVGTESGIDESKAJVLLHRLLGQPFARSFIEKIKEACYGATAGLQFAKAVHQANPQSKVLVVASDI  
ARYGLASGGEPTQGVGAVAMLISADPAILQLENDNLMLTQDIYDFWRPVGHQYPMDGHLSNAVYIDSFK  
QVWQAHCKNQRTAKDYAALSFHIPYTKMGKKALLAVFAEEDETEQKRLMARYEESIVYSRRTGNLYTG  
LYLGLISLLENSSSLQANDRIGLFSYGSAGAEFFSGLLVPGYEKQLAQAAHQALLDDRQKLTLIAEYEAM  
FNETIDIDODQSFEDELLYSIREIKNTIRYYNEENE 配列番号16

30

【 0 4 2 5 】

## イソプレンシンターゼ：

【 0 4 2 6 】

30

【 0 4 2 7 】

i s p A :

【 0 4 2 8 】

40

【 0 4 2 9 】

大腸菌 (E. coli) 用にコドン最適化したアモルファジエン合成酵素 :

【 0 4 3 0 】

ATGAGCCTGACCGAAGAAAAACCGATTGTCGATTCAAATTCCGCCTAGCATTGGGTGATCA  
 GTTCTGAAITATGAGAACAGGTTGAACAGGGCGTTGAGCAGATGTTAATGATCTGAAAGAA  
 GTTCGCCAGCTGCTGAAAGAACACTGGATATTCCGATGAAACATGCCAATCTGCTGAAACTGATG  
 TGAAATTCAAGCTCTGGTATCCGTATCATTTGAACGTGAAATTGATCATGCCCTGCAGTGCATT  
 TGAAACCTATGGTATAATTGGAATGGTATCGTAGCAGCTGTGGTTCTGATGCGTAAACAGG  
 GTTATTATGTTACCTGCAGCTGTTAACAACTATAAGATAAAAACGGTGCTTAAACAGAGCCTG  
 GCAAATGATGTTGAAGGTCTGCTGGAACGTATGAAGCAACCAGCATGCGTGTCCGGTGAATT  
 TCTGGAAGATGCACTGGTTTACCGTAGCCGTCTGAGCATGATGACCAAAAGATGCATTAGCACCA  
 ATCCGGCACTGTTACCGAAATCCAGCGTGCAGTAAACAGCCGTGAAACGCTGCTGCCTCGTATT  
 GAAGCAGCACAGTATATTCCGTTTATCAGCAGCAGGATAGCCATAACAAAACCTGCTGAAACTGGC  
 AAAACTGGAATTAACTGCTGAGAGCCTGCAAAAGAAAGACTGAGCCACGTTGTAATGGTGG  
 AAAGCCTTCGACATCAAAAGCGCACCGTGTGCGTATCGTATTGTTGAATGTTATTTGGGG  
 TCTGGTAGCGGTTTGAACCGCAGTATAGCCGTGACCGTGTGTTTACCAAGCAGTTGCAGTTAT  
 TACCCGATGATGATACCTATGACGCATATGGCACCTATGAGGAACGTGAAATCTTACCGAAGCCG  
 TTGAACGTTGGAGCATTACCTGCTGGATACCCCTGCCGAATATATGAAACCGATCTAAACTGTC  
 ATGGACACCTATACCGAGATGGAAGAATTCTGGCAAAAGAAGGTGTCACCGACCTGTTAATTGCGG  
 TAAAGAATTGTAAGAAATTCTGCGTAACCTGATGGTTGAAGCAAAATGGCCAATGAAGGTCAT  
 ATTCGACCAACCGAAGAACATGATCCGTTGATATTACCGGTTGCGCAAACCTGCJGACCAC  
 CTGTTATCTGGTATGAGCATAATTCAACAAAGAAAGCGTTGAATGGCAGTTAGCCGACCGCCTC  
 TGTTCTGTTAGCGGTTCTGGTCTGTCAGCATGAAACGATCTGATGACCCATAAAGCAGAACAA  
 CGTAAACATAGCAGCAGCAGCTGGAAAGCTATATGAAAGAATATAACGTGAACGAAGAGTATGCAC  
 AGACCCCTGATTTACAAAGAAGTGTGAGGACGTTGAAAGATATCAACCGTGAATATCTGACCA  
 AAGAACATCCCGTCCGCTGCTGATGGCAGITATTATCTGIGTCAGTCCCTGGAAAGTTCACTATG  
 TAAAGATAACTTACCGTATGGCGACGAATATAACATCTGATTAAAGCCTGCTGGTATCCGA  
 TGAGCATTAA

10

20

30

40

【 0 4 3 1 】

大腸菌 (E. coli) 用にコドン最適化したファルネセン合成酵素 :

【 0 4 3 2 】

ATGAGCACCCCTGCCGATTAGCAGCGTTAGCTTACGAGCAGCACCAAGTCCGCTGGTTGATGATAA  
 AGTTAGCACCAAAACCGATGTTATTGTCACACCATGAACTTTAATGCAAGCATTGGGTGATCAGT  
 TTCTGACCTATGATGAAACCGAAGATCTGGTGTGAAAGAAGCTGTTGAAAGAAACTGAAAGAAGA  
 AGTAAAGAAGCTGATCACCATCAAGGTAAGCAATGAAACCGATGCAAGCATGTTAAACGATGAA  
 CTGATCGATGCCGTTACGCGTCTGGTATTGCAATCATTTGAAGAAGAAGAATCGAAGAACGCTGCA  
 GCATATTGATGTTACCTATGGTAACAGTGGGTGATAAAGAAAATCTGCAGAGCATTAGCCTGTGGT  
 TTGCGCTGCTGCGTCAGCAGGGTTTAATGTTAGCAGCGGTGTTAAAGAATTGACGAGAAA  
 GGCAAAATCAAAGAAAGCTGTTAATGATGCAACAGGGTATTCTGGCAGCTGATGAAGCAGCAATT  
 GCGTGTGAAAGATGAAACCATCTGGATAATGCACTGGAAATTACCAALGTGACCTGATATCATTG  
 CAAAGATCCGAGCTGTGATAGCAGCCTGCGTACCCAGATTCATCAGGCAGTGAAGAACGCGCTGCG  
 TCGTCGCTGGCACGCATTGAAAGCACTGCATTATATGCCGATTATCAGCAAGAAACCAAGCCATAATG  
 AAGATCTGCTGAAACTGGCAAACCTGGATTTAGCGTCTGCACTGCACGTCATGCAACAAAAAGAAACTGAG  
 CCATATTGTAATGGGAAAGATCTGATCTGCAAGAATAAAACTGCGCGTATGTTCTGATGTTGTTG  
 TGGAGGTTATTGATCTGAGCATCTATTATGAAACCGCAGCATGCACGTACCCGTATGTTCTG  
 TGAAACCTGATGIGCTGGTTGIGCTGGATGATACGTTGATAATTATGCCACCTACGGAGGAACCTG  
 GAAATCTTACCCAGGCAGTGTGAACGTTGGAGCATTAGTTGCTGGATATGCTGCCGAAATACATGAA  
 ACTGATTTATCAAGAALCTGGTGAACCTGCACGTTGAAATGGAAGAAAGTCTGGCAAAAGGTGGTAA  
 AACATAGCAATAGTCTGTCAGGGCTTGGCAGAAAGAACACTGGTAGTCAGATTACCCCTGGTGA  
 AACCAAAATGGCAAAACGTGGTTCATGCCAGCCGCTGGAAGAGTATATGAGCGTTAGCATGGTT  
 ACCGGCACCTATGGTCTGATGATGTTGCACTGAGCTATGTTGGTCGTGGTGAATTGTTACCGAAGAAC  
 CTTAAATGGGTGAGCAGCTATCCGCTATTATCAAAGCAAGCTGTTGTTATTGTTGCCCTGATGGATG  
 ATATGTTGAGCCACAAAGAACAGAACAGCGGTCATGTTGCGCAGCAGCATGAAATGTTATAGCAA  
 AGAAAGTGGTGCAAGCGAAGAACAGCTGCGAATATATCAGCGTAAAGTGGAGATGCCIGGAA  
 AGTTATTAAATCGTGAAGACCTGCTGCCGACCGCAGTTCCGTTCCGCTGATGCCCTGCAATTAAAC  
 GGCACGTATGTGTAAGTTCTGATAGCGTTAATGATGGTTTACCCATGCCGAAGGTGATATGAAAT  
 CCTATATGAAAGCTTCTGTCATCCGATGGTTAA

40

【 0 4 3 3 】

p M C M 1 2 2 3 - p C L - P t r c - U p p e r \_ G c M M \_ 1 6 1 ( リステリア・  
 グレイ (Listeria grayi) D S M 2 0 6 0 1 ) :

【 0 4 3 4 】

50

【 0 4 3 5 】

10

20

30

(上配列表の続き)

【 0 4 3 6 】

p M C M 1 2 2 4 - p C L - P t r c - U p p e r \_ G c M M \_ 1 6 2 (エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) )

【 0 4 3 7 】

【 0 4 3 8 】

10

20

30

40

50

(上配列表の続き)

p M C M 1 2 2 5 - p C L - P t r c - U p p e r \_ G c M M \_ 1 6 3 ( エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum) E G 2 ) :

**[ 0 4 4 0 ]**

[ 0 4 4 1 ]

10

20

30

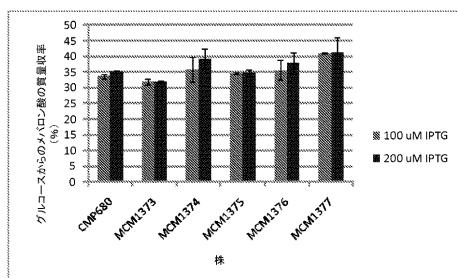
40

(上配列表の続き)

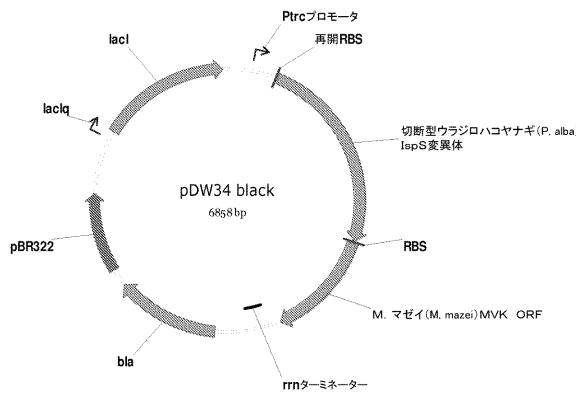
10

20

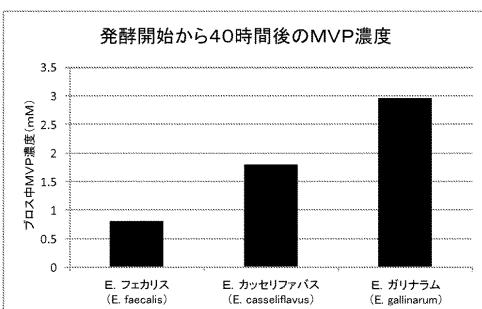
【図1】



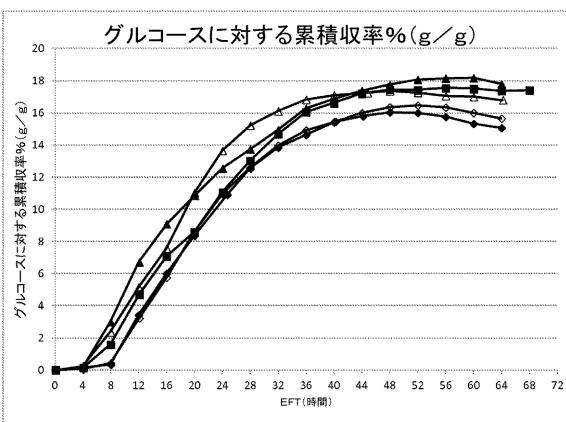
【図2】



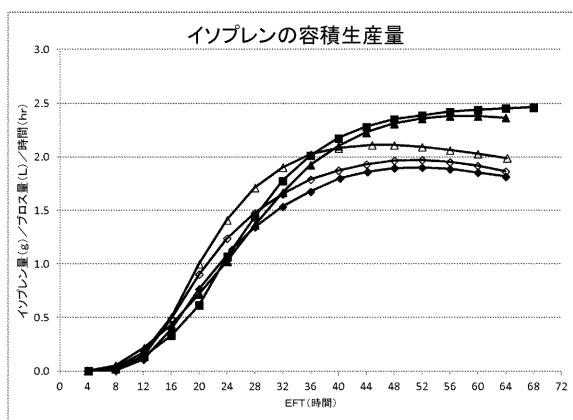
【図3】



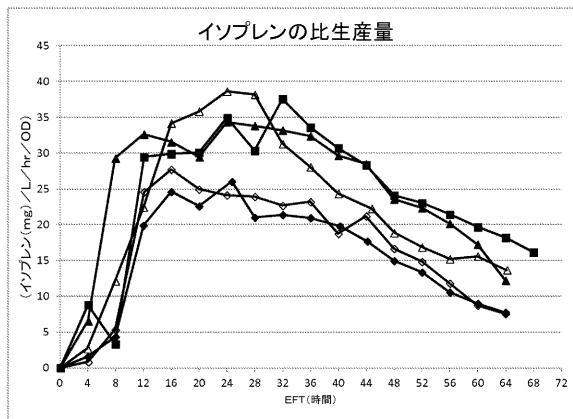
【図4】



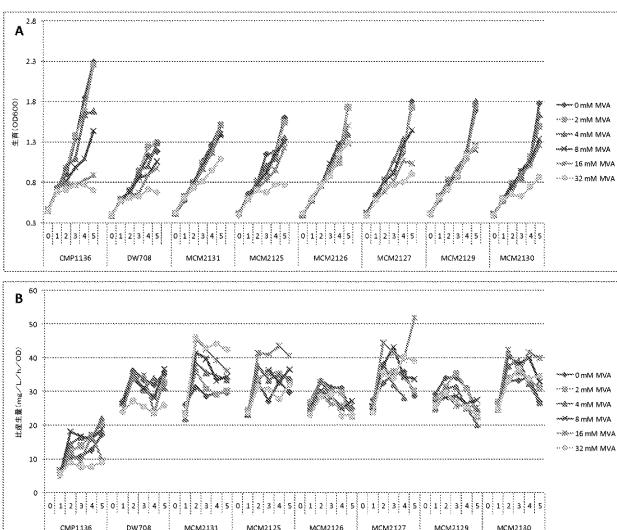
【図5】



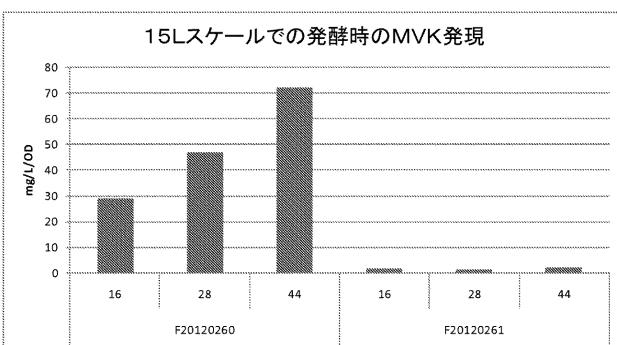
【図6】



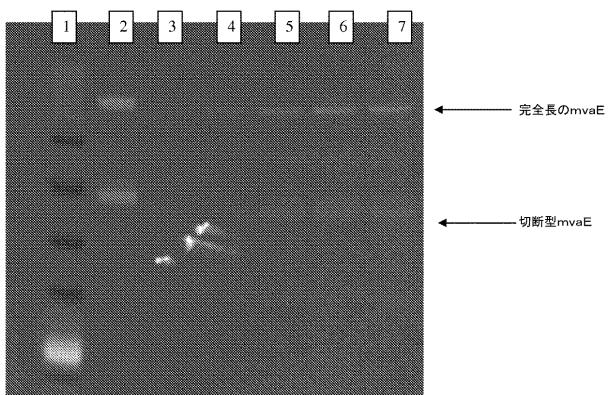
【図7】



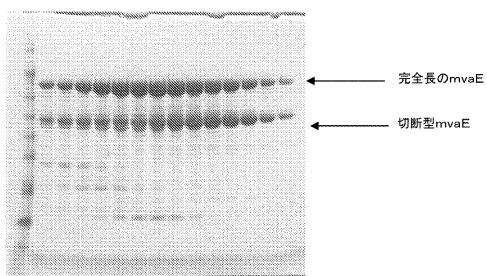
【図8】



【図9】



【図10】



【配列表】

2014519811000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2012/035655

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N1/21 C12N9/00 C12N9/10 C12P5/00 C12P7/02 C12P7/04 C12P7/42				
<b>ADD.</b> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12P C12Y				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, FSTA, WPI Data				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim No.
X	EP 1 510 583 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK [JP]) 2 March 2005 (2005-03-02) cited in the application the whole document page 4, lines 23-26 page 5, lines 45,46 page 6, lines 8,11 page 9, lines 51-55 examples 1-5 ----- -/-/			21-30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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				
Date of the actual completion of the international search  22 August 2012		Date of mailing of the international search report  28/08/2012		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  van de Kamp, Mart		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2012/035655
---

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/78935 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; SMITHKLINE BEECHAM PLC [GB]) 28 December 2000 (2000-12-28) the whole document SEQ ID NO:61,62; page 30, line 3 - page 31, line 31 SEQ ID NO:11,12; page 9, lines 1-39 claims 4, 15,16,20,21,22 -----	21-28
A	WO 2009/076676 A2 (GENENCOR INT [US]; GOODYEAR TIRE & RUBBER [US]; CERVIN MARGUERITE [US]) 18 June 2009 (2009-06-18) cited in the application the whole document example 8	1,19,21, 29,31,44
A	WO 2007/140339 A2 (AMYRIS BIOTECHNOLOGIES INC [US]; RENNIGER NEIL STEPHEN [US]; NEWMAN J) 6 December 2007 (2007-12-06) cited in the application the whole document examples 3,6,8,10 claims 1,2,13,14,36-39	1,19,21, 29,31,44
A	WO 2010/031077 A1 (DANISCO US INC [US]; GOODYEAR TIRE & RUBBER [US]; BECK ZACHARY QUINN []) 18 March 2010 (2010-03-18) the whole document paragraph [0242] example 20	1,19,21, 29,31,44
A	PITERA ET AL: "Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in <i>Escherichia coli</i> ", METABOLIC ENGINEERING, vol. 9, no. 2, 16 February 2007 (2007-02-16), pages 193-207, XP005888126, ISSN: 1096-7176 abstract	1,19,21, 29,31,44
A	HISASHI HARADA ET AL: "Novel approaches and achievements in biosynthesis of functional isoprenoids in <i>Escherichia coli</i> ", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 84, no. 6, 12 August 2009 (2009-08-12), pages 1021-1031, XP019757474, ISSN: 1432-0614 the whole document	1,19,21, 29,31,44
	----- -/-	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2012/035655
---

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MIZIORKO ET AL: "Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis", ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 505, no. 2, 15 January 2011 (2011-01-15), pages 131-143, XP027587651, ISSN: 0003-9861 the whole document -----	1,19,21, 29,31,44
A	KAZUHIKO TABATA ET AL: "Production of mevalonate by a metabolically-engineered Escherichia coli", BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 26, no. 19, 1 October 2004 (2004-10-01), pages 1487-1491, XP55013815, ISSN: 0141-5492 cited in the application the whole document -----	1,19,21, 29,31,44
A	WILDING E I ET AL: "Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 182, no. 15, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 4319-4327, XP002232852, ISSN: 0021-9193 the whole document figures 2-4 -----	1,21,31
A,P	SUZANNE M MA ET AL: "Optimization of a heterologous mevalonate pathway through the use of variant HMG-CoA reductases", METABOLIC ENGINEERING, vol. 13, no. 5, 13 July 2011 (2011-07-13), pages 588-597, XP028274826, ISSN: 1096-7176 the whole document -----	1,19,21, 29,31,44

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/035655

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
EP 1510583	A1	02-03-2005	AU EP US WO	2003234790 A1 1510583 A1 2005287655 A1 03095651 A1		11-11-2003 02-03-2005 29-12-2005 20-11-2003
WO 0078935	A1	28-12-2000	NONE			
WO 2009076676	A2	18-06-2009	AU BR CA CN EP JP KR RU US WO	2008334945 A1 P10823506 A2 2709107 A1 102027124 A 2235190 A2 2011505841 A 20100118973 A 2010128902 A 2009203102 A1 2009076676 A2		18-06-2009 10-07-2012 18-06-2009 20-04-2011 06-10-2010 03-03-2011 08-11-2010 20-01-2012 13-08-2009 18-06-2009
WO 2007140339	A2	06-12-2007	AU CA EP JP KR KR SG SV US US WO	2007267033 A1 2651747 A1 2024504 A2 2009538601 A 20090013814 A 20120053088 A 172646 A1 2008003104 A 2008274523 A1 2011287476 A1 2007140339 A2		06-12-2007 06-12-2007 18-02-2009 12-11-2009 05-02-2009 24-05-2012 28-07-2011 02-12-2009 06-11-2008 24-11-2011 06-12-2007
WO 2010031077	A1	18-03-2010	CA EP US WO	2737082 A1 2337845 A1 2010184178 A1 2010031077 A1		18-03-2010 29-06-2011 22-07-2010 18-03-2010

---

 フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,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,R,S,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,D0,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,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

(74)代理人 100138438  
弁理士 尾首 亘聰  
(74)代理人 100138519  
弁理士 奥谷 雅子  
(74)代理人 100123892  
弁理士 内藤 忠雄  
(74)代理人 100169993  
弁理士 今井 千裕  
(74)代理人 100161539  
弁理士 武山 美子  
(72)発明者 ベック、ザッカリー・キュー  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925  
(72)発明者 ミラー、マイケル・シー  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925  
(72)発明者 ペレス、キャロライン・エム  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925  
(72)発明者 プライマーク、ユリヤ・エー  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925  
(72)発明者 プッチ、ジェフ・ピー  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925  
(72)発明者 ウェレス、デレック・エイチ  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925

F ターム(参考) 4B024 AA03 BA07 BA08 CA04 CA20 DA06 EA04 FA02 GA14  
4B064 AB04 AD02 CA02 CA19 CC03 CC06 CC07 CC12 CC24 CD02  
CD07 CD09 CD20 CD21  
4B065 AA01X AA15X AA26X AA30X AA30Y AA41X AA50X AA57X AA60X AA70X  
AA72X AB01 AC14 BA02 BA03 BB02 BB03 BB08 BB12 BB14  
BB19 BB22 BB29 BC02 BC03 BC09 CA03 CA08