

(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 I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 P 5/02 (2006.01)	C 1 2 P 5/02	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 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) 国際出願番号 PCT/US2012/035655
 (87) 国際公開番号 W02012/149469
 (87) 国際公開日 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・ユーエス・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
 00
 (74) 代理人 100071010
 弁理士 山崎 行造
 (74) 代理人 100118647
 弁理士 赤松 利昭

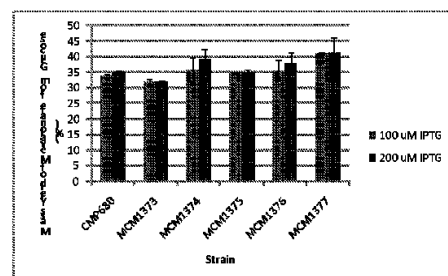
最終頁に続く

(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、イソブレン、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 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、イソブレン、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であって、

a . E . ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子、

b . E . カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子、

c . E . ファシウム (*E. faecium*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子、並びに

d . L . グレイ (*L. grayi*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v 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、前記 m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子が、チオラーゼ、H M G - C o A 合成酵素、及び H M G - C o 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、前記細胞が、

i . 前記 M V A 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

i i . イソペ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、

m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子を含まないイソペ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、細胞。

10

【請求項 2】

前記 M V A 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 1 に記載の細胞。

20

【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 . パートニイ (*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 C L 1 9 0 (*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。

30

【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】

前記イソペン合成酵素ポリペプチドは、植物のイソペ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】

前記イソペ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*) x 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。

40

【請求項 7】

前記イソペ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】

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

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 (I D I) 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 I D I ポリペプチドをコードしている核酸が、I D I 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 I D I ポリペプチドが、酵母 I D I 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 I D I ポリペプチドをコードしている核酸が、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、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。

【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。

20

【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. 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. ハロデュランス* (*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、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) イソペン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) イソペンレンを生産させる工程と、を含む、方法。

【請求項 20】

(c) 前記イソペン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】

イソペンレン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. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子、

50

(b) *E. casseliflavus* 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子、

(c) *E. faecium* 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子、及び

(d) *L. grayi* 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v 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、前記 *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 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、*m v a E* 遺伝子及び *m v 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、多量にイソプレノイド前駆体を生産する、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. 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 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. gallinarum* 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子、

10

20

30

40

50

(b) E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子、

(c) E. ファシウム (*E. faecium*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子、及び

(d) L. グレイ (*L. grayi*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v 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、前記 m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子が、チオラーゼ、H M G - C o A 合成酵素、及び H M G - C o 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、前記細胞が、

i . 前記 M V A 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

i i . 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、m v a E 遺伝子及び m v a S 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 M V A 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 . パートニイ (*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・セレビシエ (*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 C L 1 9 0 (*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*)

50

ens)、B. クラウシイ (B. clausii)、B. ハロデュランス (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、請求項 36 に記載の細胞。

【請求項 40】

前記細胞が、大腸菌 (E. coli) である、請求項 39 に記載の細胞。

【請求項 41】

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 31 ~ 40 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 42】

前記イソプレノイドが、セスキテルペンである、請求項 41 に記載の細胞。

【請求項 43】

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、 α -ファルネセン、 β -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、 α -ピネン、サビネン、 β -テルピネン、テルピンデン (terpindene) 及びバレンセンからなる群から選択される、請求項 31 ~ 41 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 44】

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 31 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 45】

(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 44 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(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61/481,098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

【0002】

(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】

【0003】

R-メバロン酸は、アセチルCoA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CoA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-CoAシンターゼ及びHMG-CoA還元酵素の活性により触媒される。解糖によるグルコースのアセチルCoA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-CoAシンターゼ及びHMG-CoA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。

【0004】

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。

【 0 0 0 5 】

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（ I P P ）及びジメチルアリルニリン酸（ D M A P P ）である。 I P P 及び D M A P P は、イソプレレン並びにイソプレノイドの前駆体である。イソプレレン（ 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。

【 0 0 0 6 】

イソプレノイドは、イソプレノイド前駆体分子の I P P 及び D M A P P から誘導される化合物である。これまでに 2 9 , 0 0 0 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だてとなるため、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、及び病虫害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、科学者らによる関心を十分に集めている。

【 0 0 0 7 】

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。

【 0 0 0 8 】

これまでに各種速度、力価及び純度でのイソプレ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 2 0 0 9 / 0 7 6 6 7 6 （ A 2 ）及び米国特許第 7 , 9 1 5 , 0 2 6 号を参照されたい）。しかしながら、イソプレ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。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

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。

【 0 0 1 0 】

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、本開示に係る全ての特許、特許出願及び刊行物は、すべての目的に関し、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。

【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、MV A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ペ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ペ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、MV A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.パートニイ (*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・セレビシエ (*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、イソペン合成酵素ポリペプチドは、植物のイソペ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、イソペ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*)) x 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、イソペ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、植物のイソペン合成酵素ポリペプチドは、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) イソペ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. 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. ハロデュランス (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。

【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、イソブレン生産に好適な培養条件下で培養する工程、並びにイソブレンを生産させる工程を含む、イソブレンの生産方法が提供される。一態様では、方法は更に、イソブ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、イソブ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. ガリナラム (E. gallinarum) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子、E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子、E. ファシウム (E. faecium) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子、並びに L. グレイ (L. grayi) 由来の m v a E 遺伝子及び m v 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、m v a E 遺伝子及び m v a S 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、m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子を含まないイソブレノイド前駆体生産細胞と比較して、イソブ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. 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. ハロデュランス (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。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. パートニイ* (*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、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. シトレア* (*P. citrea*)、*枯草菌* (*B. subtilis*)、*B. リケニフォルミス* (*B. licheniformis*)、*B. レントス* (*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. ハロデュランス* (*B. halodurans*)、*B. メガテリウム* (*B. mega*

20

30

40

50

terium)、B. コアギュランズ (*B. coagulans*)、B. サーキュランズ (*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。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、
- ファルネセン、
- 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、
- ビネン、サビネン、
- テルピネン、テルピンデン (terpindene) 及びパレンセンからなる群から選択される。

10

【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 m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子、(b) E. ファシウム (*E. faecium*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子、(c) E. ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子、及び (d) E. カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v 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、m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子は、チオラーゼ、H M G - C o A 合成酵素、及び H M G - C o 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、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 m v a E 遺伝子及び m v a S 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 m v a 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 m v a S 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 m v a E 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 m v a S 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 m v a E 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 m v a S 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 m v a E 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 m v a S 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. レントス (*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

20

30

40

50

・ハロデュランス (*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 *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子；(b) *E. ファシウム* (*E. faecium*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子；(c) *E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子並びに (d) *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v 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、*m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子は、チオラーゼ、*H M G - C o A* 合成酵素、及び *H M G - C o 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、*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 *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 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 *m v a 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 *m v a S* 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 *m v a E* 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 *m v a S* 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 *m v a E* 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 *m v a S* 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 *m v a E* 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 *m v a S* 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. ハロデュランス* (*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 *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子；(b) *E. ファシウム* (*E. faecium*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び

10

20

30

40

50

m v a S 遺伝子；(c) E . ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子並びに (d) E . カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v 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、m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子は、チオラーゼ、H M G - C o A 合成酵素、及び H M G - C o 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、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 m v a E 遺伝子及び m v a S 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 (C P I) を有する。一態様では、L . グレイ (*L. grayi*) 由来の m v a 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 m v a S 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 m v a E 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 m v a S 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 m v a E 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 m v a S 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 m v a E 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 m v a S 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 . レントス (*B. lentus*)、B . プレビス (*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 . ハロデュランス (*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。

【 0 0 2 1 】

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 m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子；(b) E . ファシウム (*E. faecium*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子；(c) E . ガリナラム (*E. gallinarum*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子並びに (d) E . カッセリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v 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、m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子は、チオラーゼ、H M G - C o A 合成酵素、及び H M G - C o 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、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 m v a E 遺伝子及び m v a S 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 m v a 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 m v a S 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

m v a E 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 m v a S 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 m v a E 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 m v a S 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 m v a E 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 m v a S 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 . レントス (B. lentus)、B . プレビス (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。

10

20

30

40

50

【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 m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子、(i i) E . ファシウム (E. faecium) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子、(i i i) E . ガリナラム (E. gallinarum) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子及び (i v) E . カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の m v a E 遺伝子及び m v 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む細胞を培養する工程、m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子は、チオラーゼ、H M G - C o A 合成酵素、及び H M G - C o A 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 3 4 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 m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子；(b) E . ファシウム (E. faecium) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子；(c) E . ガリナラム (E. gallinarum) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子並びに (d) E . カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の m v a E 遺伝子及び m v 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、m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子は、チオラーゼ、H M G - C o A 合成酵素、及び H M G - C o 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、かつ細胞は、(i) M V A 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 (i i) イソペ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、m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子を含まないイソペン生産細胞 (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 m v a

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 m v a S 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 m v a E 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 m v a S 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 m v a E 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 m v a S 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 m v a E 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 m v a S 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 m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子、(b) E . ファシウム (E. faecium) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子、(c) E . ガリナラム (E. gallinarum) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子並びに (d) E . カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の m v a E 遺伝子及び m v 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 つ以上の異種核酸は、コドン最適化されている。一態様では、M V A 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・セレビシエ (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 C L 1 9 0 (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である。一態様では、イソブ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) x 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、イソブ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)、ポブラ・ニグラ (Populus nigra) 及びポブラ・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、植物のイソブレン合成酵素ポリペプチドは、クズ (kudzu) イソブ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 (I D I) 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、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異種核酸である。他の態様では、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。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 . レントス (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. ハロデュランス* (*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。

【0024】

他の態様では、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 (細菌細胞など) を提供し、細胞は、(a) *L. グレイ* (*L. grayi*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子、(b) *E. ファシウム* (*E. faecium*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子、(c) *E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子並びに (d) *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v 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、*m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子は、チオラーゼ、*H M G - C o A* 合成酵素、及び *H M G - C o 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、(i) *M V A* 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) *D X P* 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、*m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 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 *m v a 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 *m v a S* 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 *m v a E* 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 *m v a S* 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 *m v a E* 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 *m v a S* 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 *m v a E* 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 *m v a S* 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 *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子、(b) *E. ファシウム* (*E. faecium*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子、(c) *E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子並びに (d) *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v 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 つ以上の異種核酸は、コドン最適化されている。一態様では、*M V A* 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*・*セレビシエ* (*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、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である。一態様では、イソブ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*) x 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、イソブ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*)、ポブラ・ニグラ (*Populus nigra*) 及びポブラ・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、植物のイソブレン合成酵素ポリペプチドは、クズ (*ku* *dzu*) イソブ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、
 10
 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。他の態様では、IDI ポリペプチドをコードしている核酸は、IDI 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、IDI ポリペプチドは、酵母の IDI ポリペプチドである。一態様では、IDI ポリペプチドをコードしている核酸は、IDI 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 - キシルロース 5 - リン酸 (DXP) へと変換する酵素、(b) 1 - デオキシ - d - キシルロース 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
 20
 チル - D - エリスリトール (CDP - MEP) 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 - MEP) 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 HDM
 30
 APP) 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 . 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 . プレビス (*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. amyl
 40
 oliquefaciens*)、B . クラウシイ (*B. clausii*)、B . ハロデュランス (*B. halodurans*)、B . メガテリウム (*B. megaterium*)、B . コアギュランス (*B. coagulans*)、B . サークュランス (*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。

【0025】

他の態様では、本発明は、イソブレンの生産量を増大させる方法を提供し、方法は、(a) (a) L . グレイ (*L. grayi*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子；(b) E . ファシウム (*E. faecium*) 由来の m v a E 遺伝子及び m v a S 遺伝子；(c) E . ガリ
 50

ナラム (*E. gallinarum*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子並びに (d) *E. カッセルリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v 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む細胞 (細菌細胞など) を培養する工程、*m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子は、チオラーゼ、*H M G - C o A* 合成酵素、及び *H M G - C o 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、(i) *M V A* 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 (i i) イソプレニル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、*m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子を含まないイソプレニル生産細胞 (細菌細胞など) と比較して、多量のイソプレニルを生産する。一部の態様では、細胞は、*D X P* 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、イソプレニルを回収する工程を更に含む。一部の態様では、細胞は 3 4 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。

【 0 0 2 6 】

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 *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子; (b) *E. ファシウム* (*E. faecium*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子; (c) *E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子並びに (d) *E. カッセルリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v 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、*m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子は、チオラーゼ、*H M G - C o A* 合成酵素、及び *H M G - C o 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、(i) *M V A* 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 (i i) 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、*m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子を含まないイソプレニル生産細胞 (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 *m v a 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 *m v a S* 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 *m v a E* 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 *m v a S* 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 *m v a E* 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 *m v a S* 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. カッセルリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a E* 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. カッセルリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a S* 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 *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子、(b) *E. ファシウム* (*E. faecium*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子、(c) *E. ガリナラム* (*E. gallinarum*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子並びに (d) *E. カッセルリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a E* 遺伝子及び *m v 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. レントス* (*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* (

10

20

30

40

50

B. clausii)、B. ハロデュランス (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 - 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・セレビシエ (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、 - 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、テルピネン (terpene) 及びパレンセンからなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【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) DXPP 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プレノイド生産細胞 (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. casseliflavus* 由来の *m v a* E 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. casseliflavus* 由来の *m v a S* 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. grayi* 由来の *m v a* E 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子、(b) *E. faecium* 由来の *m v a* E 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子、(c) *E. gallinarum* 由来の *m v a* E 遺伝子及び *m v a S* 遺伝子並びに (d) *E. casseliflavus* 由来の *m v a* E 遺伝子及び *m v 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 つ以上の異種核酸は、コドン最適化されている。一態様では、*M V A* 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. mazei* ・メバロン酸キナーゼ、*Lactobacillus* ・メバロン酸キナーゼポリペプチド、*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、*Saccharomyces cerevisiae* ・メバロン酸キナーゼポリペプチド、*Streptococcus* ・メバロン酸キナーゼポリペプチド、*Streptococcus pneumoniae* ・メバロン酸キナーゼポリペプチド、*Streptomyces* ・メバロン酸キナーゼポリペプチド、及び *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. 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、ファルネシルピロリン酸 (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 (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。他の態様では、IDI ポリペプチドをコードしている核酸は、IDI 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、IDI ポリペプチドは、酵母の IDI ポリペプチドである。一態様では、IDI ポリペプチドをコードしている核酸は、IDI 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、*D X P* 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* - キシルロース 5 - リン酸 (*D X P*) へと変換する酵素、(b) 1 - デオキシ - *d* - キシルロース 5 - リン酸 (*D X P*) を 2 - *C* - メチル - *D* - エリスリトール 4 - リン酸 (*M E P*) 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 (*M E P*) を 4 - (シチジン 5' - ジホスホ) - 2 - メチル - *D* - エリスリトール (*C D P - M E*) 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 (*C D P - M E*) 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 (*C D P - M E P*) 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 (*C D P - M E P*) 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 (*M E - C P P* 又は *c M E P P*) 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 (*H M B P P* 又は *H D M A P P*) 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 (*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. リケニフォルミス* (*B. licheniformis*)、*B. レンタス* (*B. lentus*)、*B. プレビス* (*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* (*B. amyloliquefaciens*)、*B. クラウシイ* (*B. clausii*)、*B. ハロデュラン* (*B. halodurans*)、*B. メガテリウム* (*B. megaterium*)、*B. コアギュラン* (*B. coagulans*)、*B. サーキュラン* (*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* (*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。

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】 p D W 3 4 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 M V P 濃度。

【図 4】各 15 L 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プレレン収率を示す。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プレレン収率 (%) は、E . フェカリス (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、総イソプレレン量 (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。

【図 5】各 15 L 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 . フェカリス (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 - t₀]。式中、総和は t₀ ~ 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。

【図 6】各 15 L 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 . フェカリス (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 * 68.117 g / mol / OD。HGER はイソプレレンの放出速度 (Evolution Rate) (mmol / L / hr) である。OD = 吸光度 = 550 nm での吸光度 * 水への希釈倍率。

【図 7】遺伝子操作し、M . パートニイ (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プレレン生産量。

【図 8】大腸菌 (E. coli) の 15 L スケールでの発酵時の 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発現。

【図 9】株 DW 3 2 6 由来の m v a E が可視化されたウェスタンブロット。第 1 レーン - 基準マーカー、第 2 レーン - 0.4 ug の精製 m v a E、第 3 ~ 7 レーン - 0、25、50、100、200 μM の IPTG により誘導を行った株 DW 3 2 6 由来の可溶化サンプル。

【図 10】S a f e s t a i n 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 m v a E タンパク質画分。

【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、イソプレレン、イソプレノイド前駆体分子、及びイソプ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 / 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 m v a E 及び m v a S 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、イソプレレン、イソプレノイド

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 *mv a E* 及び *mv a S* 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 *mv a E* 及び *mv a S* 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; Tabbata, 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 *mv a E* 及び *mv a S* 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 *mv a E* 及び *mv a S* 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)」(Mullis 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「イソブレン」は、2-メチル-1,3-ブタジエン (CAS # 78-79-5

50

）を指す。3,3-ジメチルアリルニリン酸(DMA PP)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DMA PP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「イソプレン」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時、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時、「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。

10

【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時、「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。

20

【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、プラスミド又はウイ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。

30

【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mv a E及びmv a S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。

40

【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】

50

本明細書で使用する時、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。

10

【0047】

本明細書で使用する時、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時、「イソプレン」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時、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、イソプレノイド単位を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時、「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時、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時、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を指す。

【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時、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（MV A 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、及びイソプ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MV A、DMA P P及びIPPの主要な供給源を提供する。

20

【0058】

MV A 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 - Co A還元酵素及びHMG - Co A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Co Aに変換される。次に、アセトアセチルCo Aは、HMG - Co Aシンターゼの酵素作用により、3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル - Co A（HMG - Co A）へと変換される。このCo - A誘導体をHMG - Co A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】

m v a E 及びm v a S 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、m v a E 遺伝子は、チオラーゼ活性及びHMG - Co A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、m v a E 遺伝子産物は、真性細菌で見られる、IPP生合成に関係する最初の二機能性酵素となるものであり、HMG - Co A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m v a S 遺伝子は、HMG - Co A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、イソプレン前駆体（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 m v a E 及び m v a S 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 m v a E 及び m v a S 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 m v a E 及び m v a S 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 m v a E 及び m v a S 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 m v a E 及び m v a S 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

【 0 0 6 1 】

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 m v a E 及び m v a S 遺伝子に関しては、単独での使用、あるいは M V A 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 m v a E 及び m v a S 遺伝子を組み合わせた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。

【 0 0 6 2 】

【 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 m v a E 及び m v a S 遺伝子の組み合わせ

	L. グレイ (L. grayi)、 mvaE	E. フェシウム (E. faecium)、 mvaE	E. ガリナラム (E. gallinarum)、 mvaE	E. カッセリフラバス (E. casseliflavus)、 mvaE
L. グレイ (L. grayi)、 mvaS	L. グレイ (L. grayi)、 mvaE L. グレイ (L. grayi)、 mvaS	E. フェシウム (E. faecium)、 mvaE L. グレイ (L. grayi)、 mvaS	E. ガリナラム (E. gallinarum)、 mvaE L. グレイ (L. grayi)、 mvaS	E. カッセリフラバス (E. casseliflavus)、 mvaE L. グレイ (L. grayi)、 mvaS
E. フェシウム (E. faecium)、 mvaS	L. グレイ (L. grayi)、 mvaE E. フェシウム (E. faecium)、 mvaS	E. フェシウム (E. faecium)、 mvaE E. フェシウム (E. faecium)、 mvaS	E. ガリナラム (E. gallinarum)、 mvaE E. フェシウム (E. faecium)、 mvaS	E. カッセリフラバス (E. casseliflavus)、 mvaE E. フェシウム (E. faecium)、 mvaS
E. ガリナラム (E. gallinarum)、 mvaS	L. グレイ (L. grayi)、 mvaE E. ガリナラム (E. gallinarum)、 mvaS	E. フェシウム (E. faecium)、 mvaE E. ガリナラム (E. gallinarum)、 mvaS	E. ガリナラム (E. gallinarum)、 mvaE E. ガリナラム (E. gallinarum)、 mvaS	E. カッセリフラバス (E. casseliflavus)、 mvaE E. ガリナラム (E. gallinarum)、 mvaS
E. カッセリフラバス (E. casseliflavus)、 mvaS	L. グレイ (L. grayi)、 mvaE E. カッセリフラバス (E. casseliflavus)、 mvaS	E. フェシウム (E. faecium)、 mvaE E. カッセリフラバス (E. casseliflavus)、 mvaS	E. ガリナラム (E. gallinarum)、 mvaE E. カッセリフラバス (E. casseliflavus)、 mvaS	E. カッセリフラバス (E. casseliflavus)、 mvaE E. カッセリフラバス (E. casseliflavus)、 mvaS

30

40

【 0 0 6 3 】

m v a E ポリペプチド及び核酸例

m v a E 遺伝子は、チオラーゼ活性及び H M G - C o A 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。m v a E 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 C o - A をアセトアセチル C o A に変換するのに対し、H M G - C o A 還元酵素ポリペプチドの酵素活性は、3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル - C o A をメバロン酸に変換する。m v a E 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 m v a E 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。

50

【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 Co A に変換する能力並びに 3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル - Co A 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。「保存的なアミノ酸置換」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）。「非保存的なアミノ酸置換」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】

20

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 Co A に変換する能力及び / 又は 3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル - Co A 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。

【0066】

一態様では、メバロン酸、イソプレネン、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. faecium* (*E. faecium*)、*E. gallinarum* (*E. gallinarum*)、*E. casseliflavus* (*E. casseliflavus*) 及び *L. grayi* (*L. grayi*) に由来するものが挙げられる。当業者は、大腸菌 (*E. coli*) B L 2 1 (D E 3) 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 を利用して精製した後、すなわちメバロン酸、イソプレネン又イソプレノイドを生産する大腸菌 (*E. coli*) B L 2 1 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 Safestain 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】

40

Hedl 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 Co A チオラーゼ活性並びに HMG - Co A 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 Co A チオラーゼ活性は、アセトアセチル Co A 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 Co A 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 Co A、10 mM の MgCl₂、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 (eu) は、1 分間で 1 µmol のアセトアセチル Co A

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、340nm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、0.4mMのNADPH、1.0mMの(R,S)-HMG-CoA、100mMのKCl及び100mMの K_xPO_4 (pH 6.5)というものである。アッセイは最終用量200 μ L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、1euは、1分間で1 μ molのNADP(H)が代謝回転されることを意味する。これは、0.5 μ mol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】

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ブロスを含む振とうチューブに培養物を接種し、34℃にて、250rpm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 μ M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、600rpmで24時間インキュベートした。次に各培養物1mLを3,000 \times 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 \times 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 karşı 比較して、メバロン酸濃度を定量することができる。

【0069】

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

10

20

30

40

50

番号5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・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*) 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・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、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。

【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 (andinclude)、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 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。リステリア・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11に対し、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、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*) 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11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・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13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*) 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13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 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・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*) 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15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・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)

10

20

30

40

50

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 15 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、M V A 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、M V A 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】

m v a E 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、m v a E 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、m v a E 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、m v a E 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】

m v a S ポリペプチド及び核酸例

m v a S 遺伝子は、H M G - C o A 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 C o A を、3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル - C o A (H M G - C o A) を変換させることができる。m v a S 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 m v a S 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 m v a S 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 m v a S ポリペプチド活性（すなわち、アセトアセチル C o A を 3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル - C o A 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。m v a S 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、m v a S 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 C o A を 3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル - C o A に変換する能力を改良するアミノ酸置換を、m v a S ポリペプチドに導入することができる。一部の態様では、m v a S 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、H M G - C o A 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 m v a S 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、H M G - C o A 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 C o A の消失を分光光度を元に評価することにより、検定できる。30℃ 下で、50 mM の Tris / HCl (pH 8.0)、10 mM の MgCl₂ 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 mM のアセトアセチル - C o A 及び 5 µL の抽出サンプルを加え、続いてアセチル C o A (100 µM) 及び 10 ユニットの P T A を同時に加えることができる。次に、H M G - C o A シンターゼの活性を、アセチル C o A 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 M - MgCl₂) での、アセトアセチル C o A の吸収係数は、 $12.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 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 C o A 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ブロスを含む振とうチューブに培養物を接種し、34℃にて、250rpm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200µM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、600rpm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。

10

20

30

40

50

【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 核酸は、配列番号4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 核酸は、配列番号4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 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*）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 核酸は、配列番号8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*) m v a S 遺伝子によりコードされる m v a S 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】

m v a S ポリペプチドの例としては、m v a S 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 S 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。m v a S ポリペプチドの例としては、例えば、リステリア・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 m v a S ポリペプチドが挙げられる。リステリア・グレイ (*Listeria grayi*) D S M 20601 m v a S 遺伝子によりコードされる m v a S 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。リステリア・グレイ (*Listeria grayi*) D S M 20601 m v a S 遺伝子によりコードされる m v a S 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*) m v a S 遺伝子によりコードされる m v a S 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*) m v a S 遺伝子によりコードされる m v a S 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 m v a S 遺伝子によりコードされる m v a S 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 m v a S 遺伝子によりコードされる m v a S 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*) m v a S 遺伝子によりコードされる m v a S 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*) m v a S 遺伝子によりコードされる m v a S 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】

m v a S 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、m v a S 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、m v a S 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、m v a S 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

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 *m v a E* 及び *m v a S* 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 つ以上の *m v a E* 及び *m v a S* 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 *m v a E* 及び *m v a S* 遺伝子を発現させることができる。詳細には、*m v a E* 及び *m v a S* 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. レントス* (*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. ハロデュランス* (*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*) 細胞のいずれかにおいて発現させることができる。加えて、*m v a E* 及び *m v a S* 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。

10

20

【0081】

本発明の組成物及び方法には、数多くの種類の嫌気生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、イソプレネン、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、イソプレネン、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

50

【 0 0 8 3 】

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、B e r k a & B a r n e t t , B i o t e c h n o l o g y A d v a n c e s , (1 9 8 9) , 7 (2) : 1 2 7 ~ 1 5 4 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・ロンギブラキアタム (*Trichoderma longibrachiatum*)、*T. ビリデ* (*T. viride*)、*T. コニング* (*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. lanuginosa*)、*H. グリセア* (*H. grisea*)、クリソスポリウム属 (*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. ジャポニクス* (*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*)、*ニューロスボラ*属 (*Neurospora* sp.) (例えば、*N. クラッサ* (*N. crassa*)、*ヒポクレア*属 (*Hypocrea* sp.)、*ムコール*属 (*Mucor* sp.) (例えば、*M. ミエヘイ* (*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. ジャポニクス* (*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 2 0 1 1 / 0 0 4 5 5 6 3 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。

【 0 0 8 4 】

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、R o m a n o s e t a l . , Y e a s t , (1 9 9 2) , 8 (6) : 4 2 3 ~ 4 8 8 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 , 6 5 9 , 0 9 7 号及び米国特許出願公開番号第 2 0 1 1 / 0 0 4 5 5 6 3 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)。

【 0 0 8 5 】

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、S a u n d e r s 及び W a r m b r o d t , 「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), N a t i o n a l A g r i c u l t u r a l L i b r a r y , B e l t s v i l l e , M D 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 2 0 1 1 / 0 0 4 5 5 6 3 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 (*Oscillatoriales*)、ネンジュモ目 (*Nostocales*)、又はステイゴネマ目 (*Stigonematales*) (例えば、L i n d b e r g e t a l . , M e t a b . E n g . , (2 0 1 0) 1 2 (1) : 7 0 ~ 7 9 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 2010/029774 号、米国特許第 2009/028254 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 *mvaE* 及び *mvaS* 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 *mvaE* 及び *mvaS* 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 *mvaE* 及び *mvaS* 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 *mvaE* 及び *mvaS* 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。

【0087】

細胞培養培地例

本明細書で使用する時、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。

【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、1 L につき (1) 200 mL の滅菌 M9 塩類 (1 L 当たり $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (64 g)、 KH_2PO_4 (15 g)、 NaCl (2.5 g) 及び NH_4Cl (5.0 g))；(2) 2 mL の 1 M の MgSO_4 (滅菌)；(3) 20 mL の 20% (重量/体積) グルコース（又は他の炭素源）；及び (4) 100 μL の 1 M の CaCl_2 (滅菌) を含有する。TM3 最少培地は、1 L につき (1) 13.6 g の K_2HPO_4 ；(2) 13.6 g の KH_2PO_4 ；(3) 2 g の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；(4) 2 g のクエン酸一水和物；(5) 0.3 g のクエン酸鉄アンモニウム；(6) 3.2 g の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ；(7) 0.2 g の酵母エキス；及び (8) 1 mL の 1000 X 微量元素溶液を含有す

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 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；(3)10gの NaCl ；(4)1gの $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；(4)1gの $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ；(5)1gの $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；(6)100mgの $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ；(7)100mgの H_3BO_3 ；及び(8)100mgの $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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_2HPO_4 、(2)硫酸マグネシウム $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、(3)クエン酸一水和物 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、(4)クエン酸鉄アンモニウム $\text{NH}_4\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 、(5)酵母エキス(biospringer)、(6)1000X改変微量金属溶液、(7)硫酸50%(重量/体積)、(8)foamblast 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、単糖、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】

単糖の例としては、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、C6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C5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 イソプレノ合成酵素、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、培地中で培養される。

【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 CO₂、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中で 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. フェシウム (*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

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 *m v a E* 及び *m v a S* 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 *m v a E* 及び *m v a S* 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 경우에는、*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 *m v a E* 及び *m v 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。

20

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 *m v a E* 及び *m v a S* 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m v a E及びm v a S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時間後に、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．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m v a E及びm v a S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．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m v a E及びm v a S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

30

【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．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m v a E及びm v a S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．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m v a E及びm v a S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つ以上の異種核酸は、宿主細胞の染色体に組み込まれた異種核酸である。

30

40

【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

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85mg/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mv a E遺伝子及びmv a S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mv a Eポリペプチド及びmv a S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mv a Eポリペプチド及びmv a S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105g/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50g/L、60g/L、70g/L、80g/L、90g/L、100g/L、110g/L、120g/L、130g/L、140g/L、150g/L、160g/L、170g/L、180g/L、190g/L又は200g/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mv a E遺伝子及びmv a S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mv a Eポリペプチド及びmv a S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

）*m v a E* ポリペプチド及び*m v a S* 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価で、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を超えるピーク力価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超のピーク力価で、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価で、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：（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*m v a E* 遺伝子及び*m v a S* 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*m v a E* ポリペプチド及び*m v a S* 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*m v a E* ポリペプチド及び*m v a S* 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*m v a E* 遺伝子及び*m v a S* 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*m v a E* ポリペプチド及び*m v a S* 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*）*m v a E* ポリペプチド及び*m v a S* 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。

40

50

【 0 1 1 5 】

メバロン酸生産に関する本方法は、メバロン酸のC P I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)、1 0 (g / g)、1 1 (g / g)、1 2 (g / g)、1 3 (g / g)、1 4 (g / g)、1 5 (g / g)、2 0 (g / g)、2 5 (g / g)又は3 0 (g / g)のC P I並びに包括的にこれらの数値の間の任意の数値のC P I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。

【 0 1 1 6 】

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增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 . 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m v a E及びm v 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 . 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m v a E及びm v 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 , 0 0 0 , 0 0 0倍(例えば、約1 ~ 約5 0 0 , 0 0 0倍、約1 ~ 約5 0 , 0 0 0倍、約1 ~ 約5 , 0 0 0倍、約1 ~ 約1 , 0 0 0倍、約1 ~ 約5 0 0倍、約1 ~ 約1 0 0倍、約1 ~ 約5 0倍、約5 ~ 約1 0 0 , 0 0 0倍、約5 ~ 約1 0 , 0 0 0倍、約5 ~ 約1 , 0 0 0倍、約5 ~ 約5 0 0倍、約5 ~ 約1 0 0倍、約1 0 ~ 約5 0 , 0 0 0倍、約5 0 ~ 約1 0 , 0 0 0倍、約1 0 0 ~ 約5 , 0 0 0倍、約2 0 0 ~ 約1 , 0 0 0倍、約5 0 ~ 約5 0 0倍又は約5 0 ~ 約2 0 0倍)に増大させることができる。

【 0 1 1 7 】

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 . 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)m v a E及びm v 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 . 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m v a E及びm v 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 , 0 0 0 , 0 0 0倍(例えば、約1 ~ 約5 0 0 , 0 0 0倍、約1 ~ 約5 0 , 0 0 0倍、約1 ~ 約5 , 0 0 0倍、約1 ~ 約1 , 0 0 0倍、約1 ~ 約5 0 0倍、約1 ~ 約1 0 0倍、約1 ~ 約5 0倍、約5 ~ 約1 0 0 , 0 0 0倍、約5 ~ 約1 0 , 0 0 0倍、約5 ~ 約1 , 0 0 0倍、約5 ~ 約5 0 0倍、約5 ~ 約1 0 0倍、約1 0 ~ 約5 0 , 0 0 0倍、約5 0 ~ 約1 0 , 0 0 0倍、約1 0 0 ~ 約5 , 0 0 0倍、約2 0 0 ~ 約1 , 0 0 0倍、約5 0 ~ 約5 0 0倍又は約5 0 ~ 約2 0 0倍)に増大させることができる。

【 0 1 1 8 】

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 . 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m v a E及びm v 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 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %

、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、100000倍、200000倍、500000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。

【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)

イソプレン(2-メチル-1,3-ブタジエン)は、多様な用途で利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利用される。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でもある。

【0121】

イソプレンは、イソプレシンターゼの触媒作用によりDMAPP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。

【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. grayi*）、*E. faecium*）、*E. gallinarum*）又は *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む。

10

【0123】

一部の態様では、本明細書に記載の細胞は、イソブレン生産細胞である。一態様では、イソブレン生産細胞は、イソブ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、イソブレン生産細胞は、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、イソブ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 *IDP* 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、イソブレン生産細胞は、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、イソブ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 *IDP* 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、調節可能の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、調節可能の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、調節可能の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、調節可能の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、イソペンテニルリン酸イソメラーゼ (*IDP*) を更に含む。本明細書に提供される細胞は、イソブレンシンターゼ、*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. 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・セレビシエ (*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 C L 1 9 0 (*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、M V A 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、M V A 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、M V A 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、M V A 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、M V A 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、M V A 経路下流のポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように低発現型プロモータに連結される。一部の態様では、異種 M V A 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・パートニイ (*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、M V A 経路下流の異種ポリペプチドは、M・パートニイ (*M. burtonii*) 由来のメバロン酸キナーゼである。

10

20

【 0 1 2 7 】

M V A 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。M V A 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 】

M V A 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 (M V K) ; (i i) ホスホメバロン酸キナーゼ (P M K) ; (i i i) ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (M V D) ; 及び (i v) イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ (I D I) も挙げられる。詳細には、下流の M V K 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 M V K 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。M V A 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 2 0 1 0 / 0 0 8 6 9 7 8 号に見出すことができ、この内容は、M V K 経路下流のポリペプチド及び M V K 経路下流のポリペプチド変異体に関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。

30

【 0 1 2 9 】

本明細書に記載の細胞のうち任意のものは、I D I 核酸 (例えば、I D I 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 I D I) は、イソペンテニルジホスフェート (I P P) 及びジメチルアリルニリン酸 (D M A P P) の相互変換を触媒する (例えば、I P P を D M A P P へと変換し及び / 又は D M A P P を I P P へと変換する)。I D I ポリペプチドの例としては、I D I 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ボでポリペプチドが I P P 及び D M A P P を相互変換する能力を測定することで、ポリペプチドが I D I 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。I D I 核酸の例としては、I D I 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。I D I 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。

40

50

【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、イソプ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 (*Methanosarcina mazei*) 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 (*Streptomyces*)・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 (*Methanosarcina mazei*)・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】

イソプレニ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、イソプレン合成酵素ポリペプチド又はイソプ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、イソプレニ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、イソプレニ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、イソプレニ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、イソプレニ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、経路の内在性イソプレニ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、イソプレニ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、イソプレニ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*) x 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、イソプレニ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、イソプレニ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、イソプレニ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、イソプレニ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、イソプレニ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

様では、イソプレニ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】

イソプレニ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。イソプレニ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】

イソプレニンターゼの核酸の例としては、イソプレニ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。イソプレニ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)をイソプレニンに変換する。イソプレニンターゼポリペプチドの例としては、イソプレニ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。イソプレニ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、イソプレニンターゼ変異体は、酵素活性が向上しているなどして、活性が向上されている。一部の態様では、イソプレニンターゼ変異体は、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をイソプレニ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ニ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ニ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 MgCl₂、1mM(250µg/mL)DMAPP、65µLの植物抽出緩衝液(PEB)(50mM Tris-HCl(pH 8.0)、20mM MgCl₂、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、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、イソプレニンターゼポリペプチドは、植物のイソプレニ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、イソプレニンターゼポリペプチドは、プエラリア(Pueraria)に由来するイソプレニンターゼ又はそれらの変異体である。一部の態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、ハコヤナギ属(Populus)由来のイソプレニンターゼ又はそれらの変異体である。一部の態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、ポプラ(poplar)のイソプレニ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、イソプレニンターゼポリペプチドは、クズのイソプレニ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、イソプレニ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) x 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、イソプレニ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、イソプレニンターゼポリペ

50

ブチド又は核酸は、プエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*) (クズ) (Sharky et al., Plant Physiology 137: 700~712, 2005)、プエラリア・ロバタ (*Pueraria lobata*)、ポブラ (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*) x 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) に由来するポリペブチド又は核酸である。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペブチドは、プエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*)、プエラリア・ロバタ (*Pueraria lobata*)、ポブラ・トレムロイド (*Populus tremuloides*)、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*)、ポブラ・ニグラ (*Populus nigra*) 又はポブラ・トリコカルパ (*Populus trichocarpa*) 由来のイソブレンシンターゼ、又はこれらの変異体である。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペブチドは、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) 由来のイソブ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、イソブレンシンターゼ (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ブレンシンターゼ) をコードしている核酸は、コドンをも最適化されている。

10

【0139】

一部の態様では、イソブレンシンターゼ核酸又はポリペブチドは、天然に生じるポリペブ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ブチド又は核酸)。一部の態様では、イソブレンシンターゼ核酸又はポリペブチドは、野生型又は天然に生じるポリペブチド又は核酸ではない。一部の態様では、イソブレンシンターゼ核酸又はポリペブチドは、野生型又は天然に生じるポリペブ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ブチド又は核酸の変異体)。

20

【0140】

一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペブチドは変異体である。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペブチドは、野生型又は天然型イソブ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ブ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ブ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、イソブレンシンターゼポリペブチドは、天然型イソブレンシンターゼ変異体であり、かつ天然型イソブ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)。

30

40

【0141】

一部の態様では、変異体は、野生型又は天然型イソブ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

50

とも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 100 %、少なくとも約 110 %、少なくとも約 120 %、少なくとも約 130 %、少なくとも約 140 %、少なくとも約 150 %、少なくとも約 160 %、少なくとも約 170 %、少なくとも約 180 %、少なくとも約 190 %、少なくとも約 200 %の活性を有する。変異体は、野生型又は天然型イソブ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ブレンシンターゼの変異体は、野生型又は天然型イソブレンシンターゼのアミノ酸配列と、少なくとも約 40 %、50 %、60 %、70 %、75 %、80 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、又は 99.9 %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ブレンシンターゼの変異体は、野生型又は天然型イソブレンシンターゼのアミノ酸配列と、約 70 % ~ 約 99.9 %、約 75 % ~ 約 99 %、約 80 % ~ 約 98 %、約 85 % ~ 約 97 %、又は約 90 % ~ 約 95 %のうちのいずれかの程度で配列相同性を有する。

10

20

30

【0142】

一部の態様では、変異体は、野生型又は天然型イソブ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ブ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以上であってよく、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。天然型イソブレンシンターゼとしては、植物由来の任意のイソブレンシンターゼを挙げることができ、例えば、クズ (kudzu) イソブレンシンターゼ、ポプラ (poplar) イソブレンシンターゼ、ヨーロッパナラ (English oak) イソブレンシンターゼ、及びヤナギ (willow) イソブ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*) 由来のイソブ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*) 由来のイソブ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*) イソブ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*) 由来のイソブ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、異種イソブ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)。

【0143】

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。

【0144】

【表 2】

表2:ウラジロハコヤナギ(<i>P. alba</i>)のイソプレシンターゼ変異体(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】

本開示のイソプレシ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シン合成酵素又はイソプレシ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、イソプレシン合成酵素及びイソプレシ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シンターゼの発現を駆動させることができる。

【0147】

好適なイソプレニンターゼとしては、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。本開示のイソプレニ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 つに使用することのできるイソプレニンターゼの種類は、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、IDI 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、イソプレニンターゼ、IDI 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、イソプレニンターゼ、IDI 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、イソプレニンターゼ、IDI 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 - キシルロース - 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

40

50

の例としては、並びにD X P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】

D X Sポリペプチドの例としては、D X S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ビルビン酸及びD - グリセルアルデヒド - 3 - リン酸を1 - デオキシ - D - キシルロース - 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D X 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。D X Sポリペプチド及び核酸の例並びにD X S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、D X Sポリペプチドは、ビルビン酸及びD - グリセルアルデヒド3 - リン酸を1 - デオキシ - d - キシルロース5 - リン酸（D X 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ビルビン酸及び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D X 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。

20

【0153】

D X Rポリペプチドは、1 - デオキシ - d - キシルロース5 - リン酸（D X P）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D X Pを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがD X 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。

【0154】

M C T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M C T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】

C M K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C M K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】

M C S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M C 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。

40

【0157】

H D S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

50

トロで、細胞抽出物中で又はインビボでME - CPPを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがHDS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。

【0158】

HDR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(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。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HMBPPを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがHDR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。

【0159】

MVA経路下流、イソプレニンターゼ、IDI及びDXP経路のポリペプチドに関する生物資源

10

イソプレニンターゼ、IDI、DXP経路及び/又はMVA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、イソプレニンターゼ、IDI、DXP経路及び/又はMVA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MVA経路を含有する。イソプレニンターゼの核酸は、例えば、イソプレニ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MVA経路の核酸は、例えば、MVA経路を含有する任意の生物から得ることができる。IDI及びDXP経路の核酸は、例えば、IDI及びDXP経路を含有する任意の生物から得ることができる。

20

【0160】

イソプレニンターゼ、DXP経路、IDI、及び/又はMVA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(*Methanosarcina*)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CAC35696(*Populus alba* × *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。イソプレニンターゼ、IDI及び/又はMVA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

【0161】

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。

40

【0162】

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*)などのパチルス株、P.シトレア(*P. citrea*)などのバントエア(*Pantoea*)株、P.アルカリゲネス(*P. alcaligenes*)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。

【0163】

50

本明細書で使用する時、「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. プレービス* (*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. amyloliquefaciens*)、*B. クラウシイ* (*B. clausii*)、*B. ハロデュランス* (*B. halodurans*)、*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・チューリングェンシス (*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、耐久性の高い内生孢子の形成は、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

【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*) x 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。

30

【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 (*Oscillatoriales*)、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。

40

【0168】

ホスホケトラ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

50

の態様では、ホスホケトラ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】

ホスホケトラゼ酵素は、キシロース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、並びにノ又はフルクトース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、ホスホケトラゼ酵素は、キシロース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、更にこれを利用して、MV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、イソブレン及びノ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、又は減少する場合すらある。

【0170】

ホスホケトラゼの核酸の例としては、ホスホケトラ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、ホスホケトラゼの核酸は、ホスホケトラ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(Meile 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。

【0172】

他の態様では、ホスホケトラ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(Pedobactor saltans)、ストレプトマイセス・グリセウス(Streptomyces griseus)、及びノ又はノカルディオプシス・ダッソンビレイ(Nocardiosis dassonvillei)から単離したホスホケトラゼが挙げられる。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・ドウドロフ経路に關与する経路

10

20

30

40

50

エントナー・ドウドロフ (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 経路のみを有するのに対し、ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) は E D 経路のみを有する (P e e k h a u s a n d C o n w a y . 1 9 9 8 . J . B a c t . 1 8 0 : 3 4 9 5 ~ 3 5 0 2 ; S t u l k e a n d H i l l e n . 2 0 0 0 . A n n u . R e v . M i c r o b i o l . 5 4 , 8 4 9 ~ 8 8 0 ; D a w e s e t a l . 1 9 6 6 . B i o c h e m . J . 9 8 : 7 9 5 ~ 8 0 3) 。

【 0 1 7 4 】

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 1 分子の H_2O 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 - リン酸アルドラーゼ (e d a) はアルドール縮合を触媒する (E g a n e t a l . 1 9 9 2 . J . B a c t . 1 7 4 : 4 6 3 8 ~ 4 6 4 6) 。 2 つの遺伝子はオペロンの関係である。

【 0 1 7 5 】

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 (例えば、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 - リン酸アルドラーゼ遺伝子 (例えば、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、イソプレネン、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

【 0 1 7 6 】

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 - リン酸アルドラーゼ (e d a) の活性は、酵素に関係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 %、1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % 低下させる。

30

【 0 1 7 7 】

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。

40

【 0 1 7 8 】

ペントースリン酸経路の酸化経路に関与する経路

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、各種代謝経路に関係する中間体を細胞に提供する。この経路は、N A D P H 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 (z w f)、6 - ホスホグルコノラクトナーゼ (p g l) 又は 6 - ホス

50

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 (トランスケトラーゼ (*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*) 。

【 0 1 7 9 】

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 (トランスケトラーゼ、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 - リン酸及びキシルロース 5 - リン酸へと変換させ、以降に続くメバロン酸、イソプレノ、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。トランスケトラーゼ、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、トランスケトラーゼ、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、内在性トランスケトラーゼ、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、内在性トランスケトラーゼ、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。トランスケトラーゼ、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。トランスケトラーゼ、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、トランスケトラーゼ、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。

【 0 1 8 0 】

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*) 。

【 0 1 8 1 】

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 - リン酸及びキシルロース 5 - リン酸へと変換させ、以降に続くメバロン酸、イソプレノ、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%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、イソプレノイド前駆体分子、及び/又はイソプ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、イソプレノイド、及び/又はイソプ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。

【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に関係する内在性遺伝子の活性を減少させることにより、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

20

30

40

50

【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. 11: 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CoA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-ptA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・セレビシエ (*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。

【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。

【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、酵素に関係する他の分子的操作によっても低下させることができる。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】

一部の例では、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活性を減弱させることで、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 (*ldhA* - 図 5) により、ピルビン酸から生成される (Bunch, P. et al. 1997. *Microbiol.* 143: 187 ~ 195)。乳酸の生成は NADH の酸化によりなされるため、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プレノ、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）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、一態様では、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、酵素に関係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、一部の例では、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】

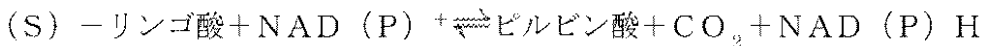
リンゴ酸酵素の関与する経路

リンゴ酸酵素（大腸菌 (*E. coli*) では *sf c A* 及び *ma e B*）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）アナプレロティックな酵素である：

50

【 0 1 9 4 】

【 数 1 】



【 0 1 9 5 】

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)⁺であり、これらにより3種の生成物、すなわち、ピルビン酸、CO₂、及びNADPHが生成される。

【 0 1 9 6 】

NADP依存性リンゴ酸酵素(maeB-図5)(Iwikura, 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)。

10

【 0 1 9 7 】

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/又はイソペン生産に関係する開始基質(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用い、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。

20

【 0 1 9 8 】

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。

30

【 0 1 9 9 】

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。

40

【 0 2 0 0 】

リンゴ酸酵素の活性は、酵素に関係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。

【 0 2 0 1 】

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C o A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a c e E、a c e F、及びl p d A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C o A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、P L . 6 (a a t t c a t a t a a a a a a c a t a c a g a t a a c c a t c t g c g g t g a t a a a t t a t c t c t g g c g g t g t t g a c a t a a a t a c c a c t g g c g g t g a t a c t g a g c a c a t c a g c a g g a c g c a c t g a c c a c c a t g a a g g t g - 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

20

30

40

50

【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 (E 1)、(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ができ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。

【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 (E 1)、(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ドを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。

【0204】

これらの方法のうち任意のものをを用いることで、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C o - 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。組み合わせで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 (g l t A) はAと表記し、ホスホトランスアセチラーゼ (p t a B) はBと表記し、酢酸キナーゼ (a c k A) はCと表記し、乳酸デヒドロゲナーゼ (l d h A) はDと表記し、リンゴ酸酵素 (s f c A又はm a e B) はEと表記し、ピルビン酸デカルボキシラーゼ (a c e E、a c e F及び/又はl p d A) 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a c e E、a c e F、及び/又はl p d A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。

【0206】

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 (T C A) 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) ホスホトランスアセチラーゼ及び / 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) ビ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 - 1 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、ビ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 (O g a s a w a r a , H . e t a l . 2 0 0 7 . J . B a c t . 1 8 9 : 5 5 3 4 ~ 5 5 4 1) 。一態様では、p d h R 制御因子を欠失させることにより、ビ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、P G L 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 (P G L) を導入し、使用することができる。P G L 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、P G L 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 P G L 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、P G L を欠失させることで、P G L を発現している微生物と比較して、包括的に約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、又は 1 0 0 % 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、P G L を欠失させることで、P G L を発現している微生物と比較して、包括的に約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、又は 1 0 0 % 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、P G L を欠失させることで、P G L を発現している微生物と比較して、包括的に約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、又は 1 0 0 % 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、P G L を欠失させることで、P G L を発現している微生物と比較して、包括的に約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、又は 1 0 0 % 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、イソペ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、高濃度でイソペンを生産することができる。一部の 경우에는、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ペ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ペン生産細胞（細菌細胞など）と比較して、少なくとも5%多量にイソペ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ペンを生産することができる。

【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ペ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、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。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る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、及びイソペ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。

【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、イソペ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*）

及び／又はE．カッセリファバス（*E. casseliflavus*）m v a E及びm v a S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時、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（C P I）、イソブレンの力価、イソブレンの質量収率及び／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、M V A経路下流のポリペプチド、D X P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．カッセリフラバス（*E. casseliflavus*）由来のm v a E及びm v a S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m v a E及びm v 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ブ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100,000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500～約500倍又は約500～約200倍）に増大させることができる。

10

20

【0213】

イソブレンの生産量は、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、200,000倍、500,000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ブレンを生産する方法

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m v a E及びm v a Sポリペプチド、M V A経路下流のポリペプチド及び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、イソブレンの生産方法も提供する。イソブレンは、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ブ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、イソブレン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／又はE．カッセリファバス（*E. casseliflavus*）由来のm v a E及びm v 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含む細胞（細菌細胞など）を培養する工程、並びに（b）イソブレンを生産させる工程を含む、イソブレンの生産方法も提供する。細胞は、上記のM V A経路下流のポリペプチド（例えば、M V K、P M K、M V D及び／又はI D I）及び上記の任意のイソブレン合成酵素ポリペプチド（例えば、プエラリア（*Pueraria*）のイソブレン合成酵素）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ブ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）を使用するイソブ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、イソプレンの生産方法は更に、イソプレンを回収する工程を含む。

【0216】

一部の態様では、生産されるイソペン量は、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ペン量を指しているものである。一部の態様では、生産されたイソプレンの量は、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ペン量を指しているものである。一部の態様では、生産されたイソプ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ペン量を指しているものである。一部の態様では、生産されるイソペン量は、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ペン量を指しているものである。一部の態様では、イソプレンの生産量は、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のイソペ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ペン (nmole) / 細胞湿潤重量 (g) / 時間 (nmole / g_{wcm} / hr) 値でイソペンを生産する。一部の態様では、イソプレンの量は約 2 ~ 約 5,000 nmole / g_{wcm} / hr であり、例えば、約 2 ~ 約 100 nmole / g_{wcm} / hr、約 100 ~ 約 500 nmole / g_{wcm} / hr、約 150 ~ 約 500 nmole / g_{wcm} / hr、約 500 ~ 約 1,000 nmole / g_{wcm} / hr、約 1,000 ~ 約 2,000 nmole / g_{wcm} / hr 又は約 2,000 ~ 約 5,000 nmole / g_{wcm} / hr である。一部の態様では、イソプレンの量は約 20 ~ 約 5,000 nmole / g_{wcm} / hr、約 100 ~ 約 5,000 nmole / g_{wcm} / hr、約 200 ~ 約 2,000 nmole / g_{wcm} / hr、約 200 ~ 約 1,000 nmole / g_{wcm} / hr、約 300 ~ 約 1,000 nmole / g_{wcm} / hr 又は約 400 ~ 約 1,000 nmole / g_{wcm} / hr である。

20

30

【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ペン (ng) / 細胞湿潤重量 (g) / 時間 (ng / g_{wcm} / h) 値でイソペンを生産する。一部の態様では、イソプレンの量は、約 2 ~ 約 5,000 ng / g_{wcm} / h であり、例えば、約 2 ~ 約 100 ng / g_{wcm} / h、約 100 ~ 約 500 ng / g_{wcm} / h、約 500 ~ 約 1,000 ng / g_{wcm} / h、約 1,000 ~ 約 2,000 ng / g_{wcm} / h 又は約 2,000 ~ 約 5,000 ng / g_{wcm} / h である。一部の態様では、イソプレンの量は、約 20 ~ 約 5,000 ng / g_{wcm} / h、約 100 ~ 約 5,000 ng / g_{wcm} / h、約 200 ~ 約 2,000 ng / g_{wcm} / h、約 200 ~ 約 1,000 ng / g_{wcm} / h、約 300 ~ 約 1,000 ng / g_{wcm} / h 又は約 400 ~ 約 1,000 ng / g_{wcm} / 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

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)/ブロス(L)(mg/Lブロス、ブロス体積には、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ブロスであり、例えば、約2~約100mg/Lブロス、約100~約500mg/Lブロス、約500~約1、000mg/Lブロス、約1、000~約2、000mg/Lブロス、又は約2、000~約5、000mg/Lブロスなどである。一部の態様では、イソブレンの量は、約20~約5、000mg/Lブロス、約100~約5、000mg/Lブロス、約200~約2、000mg/Lブロス、約200~約1、000mg/Lブロス、約300~約1、000mg/Lブロス、又は約400~約1、000mg/Lブロスである。

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、MV A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、MV A経路下流のポリペプチド、DX P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mv a E及びmv a S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mv a E及びmv a S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、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

30

40

【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

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 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ペンレン生産量、すなわち、*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 つ以上の異種核酸を発現していない細胞によるイソペン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。

【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。

【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ペン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 個のイソペンレン単位を含み、セスキテルペンは 15 個の炭素原子又は 3 個のイソペンレン単位を含み、ジテルペンは 20 個の炭素原子又は 4 個のイソペンレン単位を含み、セステルテルペンは 25 個の炭素原子又は 5 個のイソペンレン単位を含む。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、これらの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、一般的にアシル基（ジメチルアシルニリン酸 (C_5 -DMAPP)、ゲラニルピロリン酸 (C_{10} -GPP)、ファルネシルピロリン酸 (C_{15} -FPP)、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (C_{20} -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_5 -IPP) (Hsieh et al., Plant Physiol. 2011 Mar; 155(3): 1079~90)。

【0226】

L. grayi、*E. faecium*、*E. gallinarum* 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ペン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 DXPP 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

ることにより、結果的により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、イソペンテニルニリ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の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分子及び／又はイソプレノイド（イソプレンを含む）のモル収率の上昇につながる。

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、MV A経路上流の1種以上の異種ポリペプチド、MV A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IDI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、イソプレン生産細胞には、内因性及び異種性の、MV A経路上流のポリペプチド、MV A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IDI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、プレノール（すなわち、3-メチル-2-ブテン-1-オール）、イソプレノール（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ルピロリン酸、アルテミシニン、又はピサボロールである。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、 α -ファルネセン（ α -farnesene）、 β -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、 γ -ピネン、サビネン、 δ -テルピネン、テルピンデン（terpindene）及びパレンセンからなる群から選択することもできる。

【0229】

一部の態様では、テトラテルペノイドは、リコピン又はカロチン（カロチノイド）である。本明細書で使用するとき、用語「カロチノイド」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。カロチノイドとしては、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ロテンが挙げられる。一部の態様では、カロチノイドはキサントフィル及びカロテンからなる群から選択される。一

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、 α -カロチン、 β -カロチン、 γ -カロチン、 δ -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、イソプレノイド前駆体分子をより複雑なイソプ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、イソプレニ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 diphosphate）（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): 1079~90; 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 & Bolland, *J Org Chem.* 2010 Aug 20; 75(16): 5590~600に記載されている。

30

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 *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、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

ッセルリファバス (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a E* 及び *m v a S* 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、*M V A* 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. 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. カッセルリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a E* 及び *m v a S* 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. 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. カッセルリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a E* 及び *m v 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、メバロン酸 (*M V A*) 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、*D X P* 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、*I D I* 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、*F P P* 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で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. カッセルリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a E* 及び *m v 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、メバロン酸 (*M V A*) 経路下流のポリペプチド、*D X P* 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

30

【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. 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. カッセルリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a E* 及び *m v 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、*M V A* 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 (*C P I*)、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、*M V A* 経路下流のポリペプチド、*D X P* 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. カッセルリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a E* 及び *m v a S* 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. カッセルリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a E* 及び *m v a*

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 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。

【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 m v a E 及び m v 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、M V A 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）。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 m v a E 及び m v 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 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。

【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 m v a E 及び m v 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 m v a E 及び m v a S ポリペプチド、M V A 経路下流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

は *E. カッセリファバス* (*E. casseliflavus*) 由来の *m v a E* 及び *m v 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 *M V A* 経路下流のポリペプチド (例えば、*M V K*、*P M K*、*M V D* 及び / 又は *I D I*) 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 *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 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 *m v a E* ポリペプチド及び *m v a S* 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 *m v a E* ポリペプチド及び *m v a S* 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 *m v a E* 及び *m v a S* 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 *m v a E* 及び *m v 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、*M V A* 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 (*C P I*)、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、*M V A* 経路下流のポリペプチド、*D X P* 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 *m v a E* 及び *m v a S* 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, 0 0 0, 0 0 0 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 *m v a E* 及び *m v 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、約 1 0 % ~ 約 1, 0 0 0, 0 0 0 倍 (例えば、約 1 ~ 約 5 0 0, 0 0 0 倍、約 1 ~ 約 5 0, 0 0 0 倍、約 1 ~ 約 5, 0 0 0 倍、約 1 ~ 約 1, 0 0 0 倍、約 1 ~ 約 5 0 0 倍、約 1 ~ 約 1 0 0 倍、約 1 ~ 約 5 0 倍、約 5 ~ 約 1 0 0, 0 0 0 倍、約 5 ~ 約 1 0, 0 0 0 倍、約 5 ~ 約 1, 0 0 0 倍、約 5 ~ 約 5 0 0 倍、約 5 ~ 約 1 0 0 倍、約 1 0 ~ 約 5 0, 0 0 0 倍、約 5 0 ~ 約 1 0, 0 0 0 倍、約 1 0 0 ~ 約 5, 0 0 0 倍、約 2 0 0 ~ 約 1, 0 0 0 倍、約 5 0 ~ 約 5 0 0 倍又は約 5 0 ~ 約 2 0 0 倍) に増大させることができる。

【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 *m v a E* 及び *m v 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 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 倍、2 倍、5 倍、1 0 倍、2 0 倍、5 0 倍、1 0 0 倍、2 0 0 倍、5 0 0 倍、1 0 0 0 倍、2 0 0 0 倍、5 0 0 0 倍、1 0, 0 0 0 倍、2 0, 0 0 0 倍、5 0, 0 0 0 倍、1 0 0, 0 0 0 倍、2 0 0, 0 0 0 倍、5 0 0, 0 0 0 倍又は 1, 0 0 0, 0 0 0 倍に増大させることもできる。

【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 *m v a E* 遺伝子及び *m v a S* 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、3 4 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 *m v a E* ポリペプチド及び *m v a S* 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。

【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 *m v a E* 及び *m v a S* ポリペプチド、イソプレニルピロリン酸合成酵素及び / 又は 1 つ以上の *M V A* 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、これらに限定されるものではないが、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、プレオマイシン、ネオマイシン又はクロラムフェニコール)、及び / 又は宿主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*

m) 又は E . カッセリファバス (E. casseliflavus) 由来の m v a E 及び m v a S 核酸の 1 つ以上のコピー、イソプレレン合成酵素、ポリプレニルピロリン酸合成酵素並びに / 又は M V A 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 m v a E 及び m v a S 核酸、イソプレレン合成酵素及び / 又は M V A 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、イソプレレンシンターゼ、I D I 、D X P 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 D E A E - 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 D N A 沈殿物とのインキュベーション、D N A 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 D N A 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 D N A 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 2009/07667 6 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】

【0256】

実施例1：大腸菌 (*E. coli*) 株 CMP 451 (BL21 pgl + PL.2 mKK DyI GI1.2 gltA を含有)、CMP 452 及び CMP 453 の構築

BL21 (Novagen) 中のクエン酸シンターゼ遺伝子 (gltA) 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 GI1.2 (米国特許第7,371,558号) により置き換えた。gltA に関して報告されている2種の野生型プロモータ (Wilde, 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 Up gltA Cm - F (5' - TATTTAAATTTTAAATCATCTAAATTTGACAAATCATTTCAACAAAGTTTGTTACAAATTAACCCCTCACTAAAGGGCGG - 3') 及び DngltA1.xgicm - R (5' - TCAACAGCTGTATCCCCGTTGAGGGTGAGTTTGTCTTTTGTATCAGCCATATATTTCCACCAAGCTATTTGTTAGTGAAATAAAGTGGTTGAATTTATTTGCTCAGGATGTGGGCATHGTCAAGGGCTAATACGACTCACTATAGGGCTCG - 3')、並びにテンプレートとして Gene Bridges (Heidelberg, Germany) のプラスミド FRT - gb2 - Cm - FRT 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 gltA PromSeqF : 5' - GGCAGTATAGGCTGTTTCAACAAATC - 3' 及び gltA PromSeqR : 5' - CTTGACCCAGCGTGCCCTTTCAGC - 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 30 µL の H₂O に再懸濁し、95 で4分加熱し、スピンドウンしたもの。50 µL の PCR 反応には、この溶液のうち 2 µL をテンプレートとして使用する) とを使用し PCR 増幅させた。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 GI1.2、GI1.5 及び GI1.6 (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 (CMP 141、CMP 142 及び CMP 143 ; 表3)。

【0257】

【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 GI 1. 2 gltA ackA-pta::Cm	CMP451
CMP620	BL21 pgl+PL. 2 mKKDyI GI 1. 2 gltA ML ackA-pta::Cm ldhA::Kan	CMP604
CMP635	BL21 pgl+PL. 2 mKKDyI GI 1. 2 gltA ML ackA-pta ldhA	CMP620
CMP646	BL21 attB:Cm(to restore LowerP)col1	BL21(Novagen)
CMP676	BL21 pgl+PL. 2 mKKDyI GI 1. 2 gltA ML ackA-pta ldhA attB::Cm	CMP635
CMP680	BL21 pgl+PL. 2 mKKDyI GI 1. 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

10

20

【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を除去し、MD09-314株を作製する。

30

【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を除去し、それぞれ株CMP451、CMP452、及びCMP453を生成した(表3)。

40

【0260】

実施例2:大腸菌(E. coli)株CMP604(BL21 pgl+PL. 2 mKKDyI GI 1. 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を含有しているTriple Trip

50

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ackACF(5'-GTGCAAAATTCACAACTCAGCGG)及びptaCR(CACCAACGTATCGGGCAT TGCC-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ackA-pta座に組み入れた(米国特許出願第12/978,324号)。LB+5ug/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、MD491と名づけた。MD491のP1可溶化液を調製し、CMP 451株の形質導入に使用した。LB+5ug/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(BL21 pgl+PL.2 mKK DyI GI 1.2 gltA ML ackA-pta::Cm ldhA::Kanを含有)及びCMP 635(BL21 pgl+PL.2 mKK DyI GI 1.2 gltA ML ackA-pta ldhA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ldhAseqR(5'-GGCTTACCGTTTACGCTTTTCAGC-3')及びldhAseqF2(5'-CTAATGC AATACGTGTCCCGAGC-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ldhA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、MD09-313株のldhA座に組み入れた。LB+20ug/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+20ug/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+50ug/mLのカルベニシリンで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^S及びKan^Sコロニーを選択し、CMP 635と名づけた。

20

30

【0262】

実施例4:大腸菌(E. coli)株CMP 676(BL21 pgl+PL.2 mKK DyI GI 1.2 gltA ML ackA-pta ldhA attB::Cmを含有)の構築

挿入部位attB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'-AAAATTTTTCATTCTGTGACAGAGAAAAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTCACATGGAGTTTGGCAGGATGTTTGTATTACATGGGAATTAGCCATGGTCC-3')及びCMP 172(5'-GACCAAGCCGCGTAACCTGGCAAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGGCATTTTCTTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-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BL21(Novagen)における組み換え反応に使用し、挿入部位attBに組み入れた。これにより生成されたCMP 646株を、LB+5ug/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

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 μ g / mL に播種し、1つのコロニーを選択しCMP 676と名づけた。

【0263】

実施例5：大腸菌 (*E. coli*) 株CMP 680 (BL21 pgl + PL.2 mKK DyI GI.1.2 gltA ML ackA - pta ldhA attB::Cm, 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CMP 676に導入した。コロニーをLB + 50 μ g / 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、CMP 680と命名した。

【0264】

(i) メバロン酸収率アッセイ

50 μ g / mL のスペクチノマイシン (Novagen) を添加した2 mL のLBブ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 \pm 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 μ M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 \pm 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 \times gで5分遠心分離した。250 μ Lの上清に、19 μ L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 \times gで5分遠心分離し、HPLC解析のため上清を回収した。200 μ 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。

【0265】

(ii) HPLCによるメバロン酸の検出：

50 \pm 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 mm \times 4.6 mm (カタログ番号125 - 0129) を取り付けした300 mm \times 7.8 mm BioRad - Aminex HPLC - 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0.01 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。屈折率検出器によりメバロン酸を検出した。

【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mvaS遺伝子を発現している大腸菌 (*E. coli*) 株MCM 1373 - 1377の構築

(i) 遺伝子の同定及び選択

E. フェカリス (*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ウェブサイトが存在する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. フェカリス (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】

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 (Listeria grayi)	62	64
エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium)	60	59
エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum) EG2	60	65
エンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus)	60	66

【0269】

【表5】

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 (Listeria grayi)	59	70
エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium)	61	60
エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum) EG2	60	69
エンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus)	59	71

【0270】

(ii) プラスミド pDW83、pMCM1223~pMCM1225

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) (GeneOracle) 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 (GeneOracle) 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テントセル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EcSeq1F~4R (表6) を使用して配列決定 (Quintara Biosciences) を行い、確認した。

【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' -GGATTAGTTCAAAATTTGGC-3'
Ec Seq 4F	5' -CGGTTAATGGCAGTTATGA-3'
Ec Seq 1R	5' -TCGTTTCGCCTGTAAACTGCT-3'
Ec Seq 2R	5' -TGCTCTATTTTCAGTACCTTT-3'
Ec Seq 3R	5' -TGTAAGTTTCAGGCCACGCC-3'
Ec Seq 4R	5' -CCTCAGCCTTGTGTAAATAA-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ン化した。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	<i>mvaE</i>	<i>mvaS</i>	由来及び抗生物質
<i>pMCM1223</i>	<i>pCL-Ptrc-Upper-GeMM_161</i> (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 アセチルトランスフェラーゼ/ ヒドロキシメチルグルタリル-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リル-CoA シントナーゼ [<i>Listeria grayi</i> DSM 20601]	<i>pSC101</i> , スペクチノマイシン (50ug/mL)
<i>pMCM1224</i>	<i>pCL-Ptrc-Upper-GeMM_162</i> (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 トランスフェラーゼ/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シントナーゼ [エンテロコッカス・ファシウム (<i>Enterococcus faecium</i>)]	<i>pSC101</i> , スペクチノマイシン (50ug/mL)
<i>pMCM1225</i>	<i>pCL-Ptrc-Upper-GeMM_163</i> (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 アセチルトランスフェラーゼ/ ヒドロキシメチルグルタリル-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リル-CoA シントナーゼ [エンテロコッカス・ ガリナルム (<i>Enterococcus gallinarum</i>) EG2]	<i>pSC101</i> , スペクチノマイシン (50ug/mL)

30

【0274】

(iii) *pCL-pTrc-Upper(E. faecalis)* - *leaderless construction* (*pCHL276*)

MCM82 プラスミドの *pCL-pTrc-Upper(E. faecalis)* から余分な *RBS* を除去するべくプライマー (*CL483F*: 5' - AGGAGG AATAAACCATGAAACAGTAGTTATTATTGATGCATTAC - 3'; *CL484R*: 5' - ACTACTGTTTTTCATGGTTTATTTCCTCCTTATTTTAATCGATAC - 3') を設計した。PCR 反応液の組成は、テンプレート DNA の *MCM82* (100 ng)、50 uM の各順方向及びリバースプライマー、1 µL の 10 mM の dNTP (Roche)、5 µL の 10 X の Pfu II 反応緩衝液 (Agilent)、1 µL の Pfu II 融合酵素 (Agilent) 及び 40 µL の水から構成された。Bio-Rad サーマルサイ클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 反応の実施後に 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 を加え、3

40

50

7 で一晩インキュベートした。2 μ Lの反応液によりTOP10 cells (Invitrogen)を形質転換させ、LB + 50 μ g/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' - AGGAGGAATAAACCATGGAGAAGTTGTTCATCATTTGACGCAC - 3' ; CL486R: 5' - ACTTCTTTC CATGGTTTATTCCTCCTTATTTAATCG - 3')を設計した。PCR反応液の組成は、テンプレートDNAのpDW83 (100 ng)、50 μ Mの各順方向 (CL483F) 及び逆方向 (CL484R) プライマー、1 μ Lの10 mMのdNTP (Roche)、5 μ Lの10xのPfu II反応緩衝液 (Agilent)、1 μ LのPfu II融合酵素 (Agilent) 及び40 μ L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 μ L)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 μ LのDpnIを添加し、37 で一晩インキュベートした。2 μ Lの反応液によりTOP10 cells (Invitrogen)を形質転換させ、LB + 50 μ g/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。

【0276】

(v) 高収率のMVA生産株MCM1373 ~ 1377の構築

宿主CMP676を対数増殖期中期まで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 μ Lの細胞懸濁液と1 μ LのプラスミドDNAを組み合わせ、2 mmの電気穿孔法キュベットに移し、25 μ FD、200 ohms、2.5 kVで電気穿孔を行い、直ちに500 μ L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、50 μ g/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 + 50 μ g/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 μ Lのプロスに1 mL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。

【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 1 L 当たり) :

リン酸カリウム (K_2HPO_4) (7.5 g)、硫酸マグネシウム ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (2 g)、クエン酸一水和物 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) (2 g)、クエン酸鉄アンモニウム ($NH_4FeC_6H_5O_7$) (0.34 g)、酵母エキス (biospringer) (0.5 g)、1000X 改変微量金属溶液 (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。

【0278】

1000X 改変微量金属溶液 (1 L 当たり) :

クエン酸 * H_2O (40 g)、 $MnSO_4$ * H_2O (30 g)、 $NaCl$ (10 g)、 $FeSO_4$ * $7H_2O$ (1 g)、 $CoCl_2$ * $6H_2O$ (1 g)、 $ZnSO_4$ * $7H_2O$ (1 g)、 $CuSO_4$ * $5H_2O$ (100 mg)、 H_3BO_3 (100 mg)、 $NaMoO_4$ * $2H_2O$ (100 mg)。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 μm のフィルタを用いる過滅菌した。

【0279】

マクロ塩溶液 (1 L 当たり) :

$MgSO_4$ * $7H_2O$ (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。

10

【0280】

ビタミン溶液 (1 L 当たり) :

チアミン塩酸塩 (1.0 g)、D-(+)-ビオチン (1.0 g)、ニコチン酸 (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 を 3.0 に調整し、次に溶液を用量に調整し、孔径 0.22 μm 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 (1 L 当たり) :

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

20

【0282】

供給溶液 # 1 (1 kg 当たり) :

グルコース (0.590 kg)、脱イオン水 (0.394 kg)、 K_2HPO_4 (7.4 g) 及び Foamblast 882 (8.94 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。

【0283】

(i i) 実験法

表 8 に記載の大腸菌 (*E. coli*) B L 2 1 株により 15 L 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。

30

【0284】

【表 8】

表 8 : 15 L 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 gItA ML ackA-pta IdhA attB::Cm, pCLPtrcUpper(rbs)(pCHL276))
MCM1373	HMB GI 1.2 gItA ML ackA-pta IdhA attB::Cm+pCL-Ptrc-Upper_Ef
MCM1374	HMB GI 1.2 gItA ML ackA-pta IdhA attB::Cm+pCL-Ptrc-Upper_Ec
MCM1375	HMB GI 1.2 gItA ML ackA-pta IdhA attB::Cm+pCL-Ptrc-Upper_Listeria
MCM1376	HMB GI 1.2 gItA ML ackA-pta IdhA attB::Cm+pCL-Ptrc-Upper_Efaecium
MCM1377	HMB GI 1.2 gItA ML ackA-pta IdhA attB::Cm+pCL-Ptrc-Upper_Eg

40

【0285】

大腸菌 (*E. coli*) 株を凍結したバイアルを解凍し、2.8 L 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。550 nm (OD 550) 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 500 mL を 15 L のバイオリアクタに接種し、初期槽容量を 5 L に調整した。

【0286】

本実験は、所望の発酵 pH 7.0 及び温度 34 °C 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

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。バッチのグルコースが枯渇するとすぐに、 pH の上昇 ($\text{pH} \geq 7.05$) 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 ($\text{pH} \geq 7.05$) に応じ実施した。パルスは 30 分持続させ、規模 (g/min) は、ブ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、 $400 \mu\text{M}$ 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、Hidden 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 時間おきにブロス試料を採取した。ブロスのグルコース、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、希釈したブロス懸濁液の 550 nm での吸光度を測定し、希釈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、質量収率に関係する生産指数、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)。

10

20

【0288】

(iii) 小規模メバロン酸収率アッセイ

2 mL の LB ブロスに凍結保存品由来の $50 \mu\text{g/mL}$ のスペクチノマイシン (Novagen) 及び $50 \mu\text{g/mL}$ 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、一晚培養物を接種した。次に、培養物を、 34°C 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 $200 \mu\text{M}$ 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°C にて、 600 rpm で 24 時間インキュベートした。各培養物 1 mL を $3,000 \times g$ で 5 分遠心分離した。 $250 \mu\text{L}$ 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した。次に、混合物を $3,000 \times g$ で 5 分遠心分離し、HPLC 解析のため上清を回収した。 $200 \mu\text{L}$ 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。

30

40

【0289】

(iv) HPLC によるメバロン酸の検出：

50°C 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) を取り付けした $300 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$ BioRad - Aminex HPLC - 87 H 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。

50

【0290】

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、質量収率 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収率

(S. D. は、2つの同型培養から得られる標準偏差値を表す)

株	IPTG (μ M)	質量収率 (%)	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、質量収率 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：累積質量収率 (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	質量収率 (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. フェカリス (<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*)

s) 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、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 $87.5 \sim 100.1 \text{ g/L/hr}$ / OD でグルコースから生成された (表 11)。

【0295】

【表 11】

表 11：各株に関し観察された最大比生産量 (各株に関し 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. フェカリス (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%

10

【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 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、メバロン酸力価 $108.2 \sim 115.4 \text{ g/L}$ の範囲であり (表 12)、かつ C P I は $4.86 \sim 5.80$ メバロン酸 (g) / グルコース (g) の範囲であった (表 13)。

20

【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 時間の時点で観察された平均ブロス力価)

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. フェカリス (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%

30

40

【0298】

【表 13】

表 13：各株の C P I 値（44 及び 48 時間の時点で各試験組に観察された平均 C P I 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	リステリア・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・ガリナラム (Enterococcus gallinarum)EG2	5.80	0.52	8.9%

10

【0299】

実施例 8：イソブレン生産株の構築

M C M 5 2 1 可溶化液を使用し、C M P 6 7 6 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を除去する（Gene Bridges、Heidelberg、Germany）。M C M 5 2 1 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 r b s 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 p M C M 1 2 2 3 (L. grayi)、p M C M 1 2 2 4 (E. faecium)、p M C M 1 2 2 5 (E. ガリナラム (E. gallinarum))、p C H L 2 7 6 (E. フェカリス (E. faecalis)) 又は p C H L 2 7 7 (E. カセリフラブス (E. casseliflavus)) を、プラスミド p D W 3 4 変異体と同時に電気穿孔した（米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 1 9 6 9 7 7 号；図 2 を参照されたい）。p D W 3 4 変異体のプラスミドは、活性の向上しているイソブレンシンターゼ変異体を含むしている。L B + スペクチノマイシン 5 0 u g / m L + カルベニシリン 5 0 u g / m L 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. ガリナラム (E. gallinarum) 由来の M V A 経路上流を利用した M V P 濃度の増大

30

E. カッセリファバス (E. casseliflavus) 又は E. ガリナラム (E. gallinarum) のいずれか由来の M V A 経路上流を利用させた場合に、E. フェカリス (E. faecalis) 由来の M V A 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 (M V P) 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 (P M K) 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 M V P 濃度を上昇させると、M V A 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。

【0301】

(i) 材料及び方法

40

大腸菌 (E. coli) の代謝産物抽出物：9 m L の氷冷無水メタノールを入れたチューブに約 3 m L 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、試料としたブロス量を算出し、以降の解析に備え - 8 0 で保管した。代謝産物の抽出並びに濃縮の際には、0.25 m L の細胞懸濁液アリコート (O D₆₀₀ で測定した時の培養物の細胞密度が 5 0 を下回る場合には 0.4 m L のアリコートを使用する) を 1.5 m L のメタノール / 酢酸アンモニウム緩衝液 (5 m M, p H = 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 (33 µm 30 mg / 3 m L P o l y m e r i c W e a k A n i o n E x c h a n g e) の S t r a t a - X - A W カラムに充填する。まず 1.5 m L のメタノール / 酢酸アンモニウム緩衝液 (5 m M, p H =

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NH₄OH/メタノール(1:14, v/v) 混合液を使用し、次に0.3 mLの濃NH₄OH/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XCalibur及びLCQuan(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に記載のとおり濃度勾配を与えた。移動相Aは100 mM酢酸アンモニウム(SigmaUltra等級, 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イ温度はそれぞれ5℃及び4℃に下げた。充填量は10 µLであった。

【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、イオントランスファチューブ温度: 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MVPP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¹³C₁₀-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¹³C₁₀-ATPを酵素処理し、¹³C₁₀-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。

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、GPP 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. カッセリファパス (*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、イソプ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) :

K_2HPO_4 (13.6 g)、 KH_2PO_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)、1000X 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】

1000X 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)、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)、 H_3BO_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、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る過滅菌した。

30

【0308】

(ii) 実験手順

ルリア・ベルターニブロス + 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のスペクチノマイシン及び 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $^\circ\text{C}$ 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 μM の IPTG を加える。発酵工程の間、定期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。100 μL の全ブロスに GC バイアルに入れ密閉し、34 $^\circ\text{C}$ かつ 200 rpm で 30 分間インキュベートする。70 $^\circ\text{C}$ 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。記録される比生産量は、イソペン量の GC による読み取り値 ($\mu\text{g}/\text{L}$) 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】

(iii) 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. カッセリファパス (*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、C P I 及び / 又はイソブレン力価の増大が観察された。

【 0 3 1 0 】

実施例 1 1 : 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) によるイソブレン生産

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、15 L スケールで流加式培養により生育させた大腸菌 (E. coli) (B L 2 1) におけるイソブレン生産量を評価した。M V A 経路上流の酵素の遺伝子は、E . フェカリス (E. faecalis) (D W 7 0 9 株及び D W 7 1 7 株)、E . カッセリファパス (E. casseliflavus) (D W 7 1 8) 又は E . ガリナラム (E. gallinarum) (D W 7 1 9、M C M 2 1 5 8) のいずれかに由来した。

10

【 0 3 1 1 】

(i) 材料及び方法

株構築：生産宿主株として、大腸菌 (Escherichia coli) を、イソブレン合成酵素 (I s p S) 変異体と、異なる 4 種の M V A 経路上流のうちの 1 種を含有させたプラスミドとにより同時形質転換させて、株 D W 7 0 9、D W 7 1 7、D W 7 1 8、及び D W 7 1 9 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 C M P 1 1 3 3 (B L 2 1 p g l P L . 2 m K K D y I G I 1 . 2 g l t A y h f S F R T P y d d V I s p A y h f S t h i F R T t r u n c I s p A) に、I s p S 変異体を保持している p D W 2 4 0 (p T r c P . a l b a I s p S M E A - m M V K (C a r b 5 0))、及び p M C M 8 2 (米国特許出願公開番号第 2 0 0 9 / 0 2 0 3 1 0 2 号)、p C H L 2 7 6 ((p C L _ p T r c - U p p e r (E . f a e c a l i s) - l e a d e r l e s s)、p C H L 2 7 7 (p C L _ p T r c - U p p e r (E . c a s s e l i f l a v u s) - l e a d e r l e s s) 又は p M C M 1 2 2 5 (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 D W 7 0 9、D W 7 1 7、D W 7 1 8 及び D W 7 1 9 が得られた。これらのイソブレン生産株は、I s p S 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 M V A 経路上流、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) 由来の l e a d e r l e s s M V A 経路上流、エンテロコッカス・カッセリファパス (Enterococcus casseliflavus) 由来の M V A 経路上流、又はエンテロコッカス・ガリナラム (Enterococcus gallinarum) 由来の M V A 経路上流のいずれかとを発現していた (表 1 5 を参照されたい)。

20

30

【 0 3 1 2 】

【表 15】

表 15：イソプレレン生産株

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(lspS variant)___ mMVK, pCLPtrcUpper___E. faecalis	CMP1133	pDW240, pMCM82
DW717	BL21 GI1. 2gltA PL. 2 MKKDyl t pgl pgl ⁻ , yhfSFRTPyddVlspAyhfs thiFRTtruncispA, pTrc(lspS variant)___ mMVK, pCLPtrcUpper___E. faecalis___ leaderless	CMP1133	pDW240, pCHL276
DW718	BL21 GI1. 2gltA PL. 2 MKKDyl t pgl pgl ⁻ , yhfSFRTPyddVlspAyhfs thiFRTtruncispA, pTrc(lspS variant)___ mMVK, pCLPtrcUpper___E. casseliflavus	CMP1133	pDW240, pCHL277
DW719	BL21 GI1. 2gltA PL. 2 MKKDyl t pgl pgl ⁻ , yhfSFRTPyddVlspAyhfs thiFRTtruncispA, pTrc(lspS variant)___ mMVK, pCLPtrcUpper___E. gallinarum	CMP1133	pDW240, pMCM1225
MCM2158	pgl ⁻ FRT-PL. 2-2cis-RBS10000- MVK(burtonii)+pTrcAlba-MVKdel2+ pCL-Ptrc-Upper___Egallinarum	CMP1133	pDW240

10

20

【0313】

培地組成（発酵培地 1 L 当たり）：K₂HPO₄（7.5 g）、MgSO₄・7H₂O（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。

30

【0314】

1000X 改変微量金属溶液（1 L 当たり）：クエン酸・H₂O（40 g）、MnSO₄・H₂O（30 g）、NaCl（10 g）、FeSO₄・7H₂O（1 g）、CoCl₂・6H₂O（1 g）、ZnSO₄・7H₂O（1 g）、CuSO₄・5H₂O（100 mg）、H₃BO₃（100 mg）、NaMoO₄・2H₂O（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。

【0315】

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）、ニコチン酸（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 を 3.0 に調整し、次に溶液を用量に調整し、孔径 0.22 µm のフィルタを用いる過滅菌した。

40

【0316】

マクロ塩溶液（1 L 当たり）：MgSO₄・7H₂O（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。

【0317】

供給溶液（1 kg 当たり）：グルコース（0.590 kg）、脱イオン水（0.393 kg）、K₂HPO₄（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

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 1 k g 当たり）マクロ塩溶液（5 . 5 4 m L）、ビタミン溶液（6 . 5 5 m L）、1 0 0 0 X 改変微量金属溶液（0 . 8 2 m L）である。

【0318】

本実験は、所望の発酵 pH（7 . 0）及び温度（3 4 ）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。5 5 0 n m（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 5 0 0 m L を 1 5 L のパイオリアクタに接種し、初期槽容量を 5 L 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 . 7 g / 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 OD₅₅₀ が 6 になったなら、2 0 0 μ M 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、1 0 g / m i n 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 6 4 ~ 6 8 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。パ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 i S C A N（Hamilton Sundstrand）及び H i d e n H P R 2 0（H i d e n A n a l y t i c a l）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 CO₂ 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、H a m i l t o n C o m p a n y 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 H P L C 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 i）結果：

【0323】

【表 1 6】

表 1 6：イソブレン生産指数

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

40

【0324】

表 1 6 に要約する通り、E . フェカリス（*E. faecalis*）の M V A 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*

50

eliflavus) のいずれかの M V A 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 C o - A 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 1 7)。このアセチル C o A 濃度の低下は、細胞中で M V A 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。

【 0 3 2 5 】

【表 1 7】

表 1 7 : 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 M V A 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 2 4 時間 (E F T) 後のアセチル C o A 濃度 (mM)

10

上流	E. フェカリス (E. faecalis) (DW717) - 20時間	E. カッセリファバス (E. casseliflavus) (DW718) - 24時間	E. ガリナラム (E. gallinarum) (DW719) - 24時間
アセチルCoA (mM)	6. 34	3. 57	3. 56

【 0 3 2 6 】

実施例 12 : M. パートニイ (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) 株の生育及びイソプレレン生産

20

本実施例は、遺伝子操作し、M. パートニイ (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、生育及びイソプレレン生産量に関する小規模試験を詳述する。

【 0 3 2 7 】

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 5 0 μ g / m L (N o v a g e n) 及びスペクチノマイシン 5 0 μ g / m L (N o v a g e n) を添加した L B ブロス 2 m L 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、3 4 下 2 4 0 r p m で 1 4 時間インキュベートした。次に、1 % グルコース、0 . 0 2 % 酵母エキス、5 0 μ g / m L のカルベニシリン及び 5 0 μ g / m L のスペクチノマイシンを添加した 2 m L の T M 3 培地を入れた、5 m L 4 8 ウェルプレート (A x y g e n S c i e n t i f i c) で、最終的な O D が 0 . 2 になるよう培養物を希釈した。プレートを、B r e a t h E a s i e r m e m b r a n e (D i v e r s i f i e d B i o t e c h) でシールし、S h e l L a b 振とう / 恒温器で、3 4 にて、6 0 0 r p m でインキュベートした。O D 0 . 4 の時点で、2 0 0 μ M の I P T G 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、4、8、1 6、3 2 m M になるよう培地にメバロン酸を加えた。I P T G による誘導の直後、1、2、3、4、及び 5 時間後に O D を測定した。

30

【 0 3 2 8 】

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

10

【0329】

イソプレンの生産量：遺伝子操作型大腸菌（*E. coli*）の GC / MS によりイソペ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 μ L の培養ブros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、イソプレンを測定するために GC / MS に移した。

20

【0330】

GC / MS によるイソプレンの検出：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（30 m \times 0.25 mm；0.25 μ m 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 1 mL / 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 5793 N 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、イソペン（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。校正表を使用して、イソプレンの絶対量を定量したところ、1 μ g / L ~ 2000 μ g / 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 ~ 100 ng / L であると推定された。

30

【0331】

(ii) 結果：

MCM2131 の生育は、0 ~ 16 mM 濃度のメバロン酸では阻害されなかった。MCM2131 は、32 mM 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 ~ 42 mg / 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。

40

【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、16 mM のメバロン酸を供給した場合に 40 mg / 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 ~ 16 mM 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

50

染色体のみでマゼイ (Mazei) M V K o f f 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_2HPO_4 (7.5 g)、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (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 $\cdot H_2O$ (40 g)、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ (30 g)、NaCl (10 g)、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1 g)、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (1 g)、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (1 g)、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (100 mg)、 H_3BO_3 (100 mg)、 $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ (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) : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (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)、ニコチン酸 (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_2HPO_4 (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 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】

(ii) 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 AEB SF (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 = 20 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 -

40

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. パートニイ (M. burtonii) MVKを検出した。イメージャーのStorm及びImageQuant TLソフトウェア (GE Healthcare) を使用し、特異的なタンパク質定量化を行った。

【0340】

(iii) 結果

ウェスタンブロット解析によるタンパク質定量に基づく、MCM2125におけるM. パートニイ (M. burtonii) のメパロン酸キナーゼの発現は、DW708株におけるM. マゼイ (M. mazei) のメパ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) 株によるメパロン酸の生産

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. プランタルム (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カー並びにP30合成プロモータとを含有している (Rud 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-Al

50

d r i c h , S t . L o u i s , M O) を添加した L B 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、Q i a p r e p ミニキット (Q i a g e n I n c , V a l e n c i a , C A) を使用してプラスミド p D M 2 0 _ T を調製する。

【 0 3 4 6 】

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 m v a E 及び m v a S を含むメバロン酸経路上流を、プライマー U P _ E F _ B a m H I (S E Q) 及び U P _ E F _ R _ X h o (S E Q) を使用して、テンプレート p C L - P t r c U p p e r (p C H L 2 7 6) から P C R により増幅させる。得られる P C R 産物を B a m H I 及び X h o I により消化し、Z y m o c l e a n ゲル DNA 回収キット (Z y m o R e s e a r c h C o r p) を使用しゲル精製する。

10

【 0 3 4 7 】

エンテロコッカス・ガリナラム (Enterococcus gallinarum) 由来の m v a E 及び m v a S をコードしている遺伝子を、プライマー U P _ E F _ B a m H I (S E Q) 及び U P _ E G _ R _ X h o (S E Q) を使用して、テンプレート p C L - P t r c - u p p e r _ G c - M M 1 6 3 から P C R により増幅させる。得られる P C R 産物を B a m H I 及び X h o I により消化し、Z y m o c l e a n ゲル DNA 回収キット (Z y m o R e s e a r c h C o r p) を使用しゲル精製する。

【 0 3 4 8 】

ベクター p D M 2 0 _ T を B a m H I 及び S a l I により 2 回消化し、D N A C l e a n a n d C o n c e n t r a t o r - 5 キット (Z y m o R e s e a r c h C o r p) により精製する。

20

【 0 3 4 9 】

消化したベクター p D M 2 0 _ T 及び U P _ E F 断片を、キットの取扱説明書に従って Q u i c k L i g a t i o n キット (N E B) を使用して連結させる。連結させた核酸により T O P 1 0 ケミカルコンピテントセル (I n v i t r o g e n) を形質転換させ、2 5 µ g / m L のクロラムフェニコールを添加した L B 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 p D M 2 0 _ T _ E F と表記する。

【 0 3 5 0 】

消化したベクター p D M 2 0 _ T 及び U P _ E G 断片を、キットの取扱説明書に従って、Q u i c k L i g a t i o n キット (N E B) を使用して連結させる。連結させた核酸により T O P 1 0 ケミカルコンピテントセル (I n v i t r o g e n) を形質転換させ、2 5 µ g / m L のクロラムフェニコールを添加した L B 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 p D M 2 0 _ T _ E G と表記する。

30

【 0 3 5 1 】

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 2 0 1 1 / 0 2 4 4 5 3 6 (A 1) 号に記載の手順に従い、プラスミド p D M 2 0 _ T , p D M 2 0 _ T _ U P _ E F 及び p D M 2 0 _ T _ U P _ E G によりラクトバチルス・プランタルム (Lactobacillus plantarum) P N 0 5 1 2 (A T C C 株番号 P T A - 7 7 2 7 ; (米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 1 2 4 7 7 4 (A 1) 号) を形質転換させる。1 % グリシン (S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s , M O) を添加した、5 m L のラクトバチルス (Lactobacilli) 用 M R S 培地 (B e c t o n D i c k e n s o n , S p a r k s , M D) に、P N 0 5 1 2 細胞を接種し、3 0 °C で一晩生育させる。1 % グリシンを添加した 1 0 0 m L の M R S 培地に O D 6 0 0 が 0 . 1 となるよう一晩培養物を接種し、O D 6 0 0 が 0 . 7 になるまで 3 0 °C で生育させる。4 °C にて 3 7 0 0 × g で 8 分間処理して細胞を回収し、1 0 0 m L の冷 1 m M M g C l 2 (S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s , M O) で洗浄し、4 °C にて 3 7 0 0 × g で 8 分間遠心分離し、1 0 0 m L の冷 3 0 % P E G - 1 0 0 0 (S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s , M O) で洗浄し、次に 4 °C にて 3 7 0 0 × g で 2 0 分間遠心分離し、次に 1 m L の冷 3 0 % P E G - 1 0 0 0 に再懸濁させる。電極間隔 1 m m の

40

50

冷キュベット内で、60 μ Lの細胞と約100 ngのプラスミドDNAを混合し、1.7 kV、25 μ 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 mMのスクロース (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 及び100 mMのMgCl₂を添加した1 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 μ g/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】

III. 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 μ g/mLのクロラムフェニコールを添加した20 mLのラクトバチルス (Lactobacilli) MRS培地で一晚生育させる。培養物を30 で14時間 (一晚) インキュベートする。5 mLの48ウェルプレート (Axygen Scientific) に、10 μ g/mLクロラムフェニコールを添加した2 mLのMRSを入れ、最終ODが0.2となるよう一晚培養物を希釈する。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 rpmで24時間インキュベートする。各培養物1 mLを3,000 gで5分間遠心分離する。250 μ Lの上清に19 μ 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 μ 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 mm \times 4.6 mm (カタログ番号125-0129)を取り付けた300 mm \times 7.8 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 N硫酸を使用し、流速0.6 mL/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、ブロスのメバロン酸濃度を定量することができる。

【0355】

(ii) 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、イソプ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*) を使用したイソブレン生産用の株の構築

ラクトバチルス (*Lactobacillus*) においてイソブ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。イソブレン合成酵素及びIDIをコードしている遺伝子を、プラスミドのPldhL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。

【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 PldhL_F (SEQ) 及び PldhL_R (SEQ) により、テンプレート pDM5 - PldhL1 - ilvC (米国特許出願公開第 2011/0136192 号) から PldhL 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ピアルカリホスファターゼ (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA) により 37 °C で 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。

【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テント大腸菌 (*E. coli*) Top10 セル (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) を形質転換させる。37 °C 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__PldhL と呼ぶ。

【0359】

Gene Oracle Inc. (Mountain View, CA) により、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) ispS 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。

【0360】

Phusion 高忠実度 DNA ポリメラーゼを使用し、55 °C で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 ispS - yIDI オペ

10

20

30

40

50

ロンを増幅させる。

【0361】

ベクター pDM20__T__Pl dh L 及び i s p S - y I D I PCR 産物を、A v r I I 及び N d e I により消化する。ベクター及び挿入断片を連結させ、T O P 1 0 c e l l s を形質転換させた。37℃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__Pl dh - I I と呼ぶ。

【0362】

I I . I s p S - y I D I によるプラスミドへの上流経路の付加

B a m H I 及び S a l I によりベクター pDM20__T__Pl dh - I I を消化した。この消化したベクターを、B a m H I 及び X h o I により消化した E F __U P 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、B a m H I 及び X h o I により消化した E G __U P PCR 産物とも連結させる（実施例 14 を参照されたい）。連結させた核酸により T o p 1 0 c e l l s 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 pDM20 T - E F - P l d h - I I 及び pDM20 T - E G - P l d h - I I と呼ぶ。

【0363】

I I I . 下流経路組み込みベクター及び P N 0 5 1 2 l d h L 1 : : M V K - y P M K - M V D 組み込み株の構築

本節では、M V K、y P M K、M V D を発現させるため、M V A 経路下流の遺伝子を L . プランタラム (L. plantarum) の P N 0 5 1 2 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るよう設計することもできる。

【0364】

P N 0 5 1 2 株において、M V K、y P M K、M V D のコード領域が、l d h L 1 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) P N 0 5 1 2 ゲノム DNA から増幅させる。組み込みベクター p F P 9 9 6 - l d h L 1 - a r m s 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。この特許文献は参照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 M P M オペロンに対するテンプレートとして、大腸菌 (E. coli) M V K C M P 4 5 1 (M V K、y P M K、M V D 及び y I D I 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。G e n t r a P u r e G e n e キット (Q i a g e n I n c . , V a l e n c i a , C a) 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。P h u s i o n 高忠実度 PCR キット (N e w E n g l a n d B i o l a b s) を使用して、X h o I 部位、S p e I 部位、及びリボソーム結合配列を含有するプライマー M P M I X h o S p e F o r (表 23)、並びに P m e I 及び X h o I 部位を含有している M P M P m e X h o R e v 1 (表 23) により、M P M オペロンを作製する。典型的な PCR 反応液 (50 µL) は、1 X H F 緩衝液、1 µL の 10 mM の d N T P、2.5 µL の 10 µM の各プライマー、0.5 µL の P h u s i o n 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。Z y m o C l e a n a n d C o n c e n t r a t e - 5 キット (Z y m o R e s e a r c h) 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XhoI (New England Biolabs) により37℃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	CATAAGCTTGTGCGACCCATGCGAGAGTAGGGAAGTGGC
T1T2_R_Pst	CATCTGCAGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAA
UP_EF_BamHI	CATGGATCCCGATTAAATAAGGAGGAATAAACC
UP_EF_R_Xho	GTCACCTCGAGGGTACCAGCTGCAGATCTCTTAG
UP_EG_R_Xho	GTCACCTCGAGCATATGGTACCAGCTGCAGTCA
PldhL_F	CATCTGCAGTAAGTCGTATTGGCACCCTACTCAC
PldhL_R	CATCTGCAGCATATGATCCTAGGGCTTGACAAAATAAGTCATCCTCTC
II_F_Avr2	CATCCTAGGAGGAGGAGAGAAAAAAACCATG
II_R_Nde	CATCATATGTTACAACATTCTGTGAATTTGTCG
MPMI_Xho_Spe_For	CAATCTCGAGACTAGTCAAAGGAGGTAAAAAACATGGTATC
MPM_Pme_Xho_Rev1	GTTACTCGAGGTTTAAACTTATTCCTTTGGTAGACCAGTCTTTG
MPMIseqF5	GTGGCCTGGGAAATGGGAAAAGCTG
ldhseqR3	CCCCCAATCATAAGTCCACGTTTA
MPMIseqF3	CAGATATTGGAAGTGCTACTTACGGC
MPMIseqR4	TGCGGTAACGGATGCTGTGTAAACGG
ldhL_left_arm_check_UP	CAACCGAGGTACGACCACTGCCG
MPMIseqR8	GAACACGGGTACGCAGTTCCACCG
MPMIseqF6	GATGTTGCCAGAGTGATTTTAACTC
ldhL_right_arm_check_DN	GAAACTGGTTGGGAATAACTTGAGCC

【0367】

pFP996-ldhL1armsベクターを制限酵素XhoI (New England Biolabs) により消化する。消化させた後、XhoIを65℃で20分間処理し失活させる。次に、ベクター端をエピ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℃で45分インキュベートし、次に65℃で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XhoIにより消化したMPM断片を、Quick Ligationキット (NEB) を使用し25℃で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) S t b l 3 (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℃で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℃で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。プレートに30℃で一晩インキュベートする。

【0369】

プライマーMPMIseqF5 (表18) 及びldhseqR3 (表18) を使用して

、JumpStart (商標) REDTaq (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-ldhL1arms::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) Stbl3/pFP996-ldhL1arms::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】

ldhL1プロモータにより発現されるよう、及びldhL1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 (Feraïnet 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、ldhL1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込みした。

【0372】

pFP996-ldhL1arms::MPMを使用してL. プランタルム (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、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、100mLの1mMの冷MgCl₂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400Ω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MgCl₂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MPMIseqF3 (表18) 及びMPMIseqR4 (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ldhL1left arm check DN (表18)、及びプラスミド特異的なプライマーMPMIseqR8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1400bpの増幅産物が得られ、MPMI seq F6及びldhL right arm check DNにより約1600bp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】

IV. 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-Pl dh-I IとpDM20T EG-Pl dh-I Iにより形質転換させ、ラクトバチルス・プランタラム(Lactobacillus plantarum)PN0512 ldhL1::MPMを作製する。10µg/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)におけるイソペン生産量の試験

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)株によるイソペンの生産量は、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-Pl dh-I I又はpDM20T EG-Pl dh-I I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、10µg/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Micro Reactor Technologies, Inc.のCellerator TMで生育させて、イソペン生産量を解析する。各24ウェルの試験用量は4.5mLとする。一晚培養物を、10µg/mLクロラムフェニコールを添加した4.5mLのMRSにより、550nmで測定される吸光度が0.05となるよう希釈する。温度は30に維持し、pHは7.0に設定し、酸素流量は20sccmに設定し、攪拌速度は800rpm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ペンのオフガス分析を行う。サンプル調製は次の通りを行う: 100µLの全ブロスに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550nmでの吸光度(OD)を得る。比生産性は、イソペン濃度(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。

【0380】

(ii) 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ペンの比生産量を、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ろい生育させた。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、イソペンの比生産量が大きいことが示される。

40

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

M C M 5 2 1 可溶化液を使用し、C M P 6 7 6 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を除去する（Gene Bridges、Heidelberg、Germany）。M C M 5 2 1 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 r b s 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 r b s を改変させるか、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 p M C M 1 2 2 3（L．グレイ（*L. grayi*））、p M C M 1 2 2 4（E．フェシウム（*E. faecium*））、p M C M 1 2 2 5（E．ガリナラム（*E. gallinarum*））、p C H L 2 7 6（E．フェカリス（*E. faecalis*））又は p C H L 2 7 7（E．カセリフラブス（*E. casseliflavus*））を、プラスミド p D W 3 4 変異体と同時に電気穿孔した（米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 1 9 6 9 7 7 号；図 2 を参照されたい）。p D W 3 4 変異体のプラスミドは、大腸菌（*E. coli*）用にコドン最適化させたファルネセン合成酵素又は大腸菌（*E. coli*）用にコドン最適化させたアモルファジエン合成酵素を、イソプレニンターゼの代わりに含有する。L B + スペクチノマイシン 5 0 u g / m L + カルベニシリン 5 0 u g / m L 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

T M 3 培地組成（発酵培地 1 L 当たり）：K₂HPO₄（13.6 g）、KH₂PO₄（13.6 g）、MgSO₄・7H₂O（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）、(NH₄)₂SO₄（3.2 g）、酵母エキス（0.2 g）、1000X 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。次に、0.22 μm 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 10.0 g 及び抗菌剤を添加する。

30

【0383】

1000X 微量金属溶液（発酵培地 1 L 当たり）：クエン酸・H₂O（40 g）、MnSO₄・H₂O（30 g）、NaCl（10 g）、FeSO₄・7H₂O（1 g）、CoCl₂・6H₂O（1 g）、ZnSO₄・7H₂O（1 g）、CuSO₄・5H₂O（100 mg）、H₃BO₃（100 mg）、NaMoO₄・2H₂O（100 mg）。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る過滅菌した。

【0384】

(ii) 実験手順

40

ルリア・ベルターニブロス + 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 T M 3 培地（50 u g / m L のスペクチノマイシン及び 50 u g / m L のカルベニシリンを含有（250 mL のバツ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。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 ~ 0.40 mM 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、積層したドデカンに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(204 m/z)及び189 m/zフラグメントイオン又はファルネセンの分子イオン(204 m/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. グレイ(L. grayi))、MCM1224(E. フェシウム(E. faecium))、pMCM1225(E. ガリラナラム(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】

(iv) 引用文献:

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

20

【0388】

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。

30

【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。ウェスタンブ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Saferstain染色により、E. フェカリス(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、イソプレネン及びイソプレノイドの生産量を増加させるのに有用である。

40

【0390】

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

50

e s t a i nで染色して同定した後、H i s タグにより精製を行ったところ、すなわちメバロン酸、イソプレノイドを生産する大腸菌 (*E. coli*) B L 2 1 (D E 3) 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. 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*) 由来の m v a E 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 :

H i s 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 M v a E をコードしている D N A を含有するプラスミドを構築する。M v a E を大腸菌 (*E. coli*) B L 2 1 (D E 3) で発現させ、N i - 樹脂クロマトグラフィーで精製する。精製した試料を S D S - P A G E 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 9 5 % 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。ウェスタンブロットにより生産株を解析し、対象とする M v a E 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 :

E n f o r s , S . O . , S c h e p e r , 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 】

atggftaaagacattgtaataattgatgccctccgtactcccatcggttaagtaccggtgcagctctcaagatgacggcgggtggaattgggaaccgcagttacaaaggct
ctgttcgagaagaacgaccaggtcaagaccatgtagaacaagtcatttttggcaacgtttacaggcaggaacggccagaatcccgccgtcagatcgccttaattc
tggectgtccgagagatacggcttcgactattaacagggtgtgtgtgttctggcctgaagcaataagcatggcgcgccaacagatcctactcggagaagcggagla
atagtagcaggaggtatcgaalccatgacgaalgcgccgagfalfacatattataataaagaagaagacaccctctcaagccctgttctacgatgaccttcgaggtctga
ccgacgcggttagcggaaagattatgggttaacagccgaaatgttgcgaacaglacggcgtatcacgtgagggccagacgcccttgcgtatgcatcgcagatgaa
agcagcaagggcccaagaacaggcgatcttgcagctgaaatctgcctcttgaataggggacgaagttactcaggacgaggggggttcgtcaagagaccacct
cgaanaaataagctgtctcggaccatttttaagaagatgtactgttacagcgggcaacgcctcaacgatcaatgatggcgcctcagccgtgatcattgcataaaggga
gtttgtgagacaaccagattcctaccttgcgacgtacatgataftacagagataggcattgatccatcaataatgggcattgtctccgtgagtgcgataaactga
tcgacgtlaaccaaallagcatggaagaalcgatctcttgaatlaattagggcatttgcagcctcctcgggtgtagtcaaaaagagttaaagcatlccgatgaaaagatc
aatattggcgggttcgggtattgcactagggcattcttggcggccacagagcgcgcattgttaaccacctagcgcaccagttgaaacgtacacacggacgctatggtat
tgcttccctgtgattggcgggttggccttagcaatattaatagaagtgcctcagggaagatcagccggftaaaaattttatcaattggcccgtaggacccgttggt
agacttcaggagcaagccgtgatcagccagctacaaaacatgtactggcagaatgacacttctgaagatattgccgacaatctgatcgaanaataatctgaaat
ggaaatccctcttgggtgtggtttgaatctgagggtaalgataagattataccatccactagcaactgagggaaccgagtgtatcgtcctctgtaataatgtgcaaaa
atggcaaacacactggcggtttcagtcagaaftaaaagatgtttctgcgtgggcaattgtacttatgaacgtcaagaacccgcaactatcgagcatatgatcacg
gcagagaagcggcaattttcgtgccgacgcagtcacatccatcgattgtgaacgaggtgggggtctaaaagagafagtgtcgtacgttcgatgatccga
cgttctgtctattgatctgatagttgatactaaagacgcaatgggcgctaaccatcattaacaccattctcagggggttagccggccttctgagggaatcctfaccgaagaa
attctgttctctatttataaattacgcaaccgaatcaattgtgaccgccagctgtcgcataccttacgaagcactgagtaaaaaaggatgagtaaacgaatcgtgaaaaa
gtggctgtcgcactataatltgccagttagatccttgcagctgcaaccacacaagaaggattatgaatgtattgagggcgtctgttggcctcaggaaatgacacac
ggcggtgtcggcagccgacatgcgtatgttcaacgcgacagcactatcggggcttaagccagtggcaggttgcaagaaggcgcgttacacggggagatcagtcata
ccacttgactcggcagcgttggcgtgcaattgaggcttgcctaaagcgaaggcggcattcgaatcatggggtacacagagcgcgaaggagctggcagaagtcac
agctcggtagggctggcgcgaanaacctggcggcgttaagagcgttggtaggaaggaaatcacagcaaggtcacatgtcgtccaggctcgtctcttgcattatcggtag
gtgtacagggaagggttgaatcctggccgaaaaattacagggtctcgtatgaatcaggcgaacgtcagaccatctcgcagagatcagatcgcaaaaagtga
attgtga 配列番号1

【 0 3 9 5 】

L. グレイ (*L. grayi*) m v a S :

【 0 3 9 6 】

atgacatgaacgttggaaatgataaaatgtcattcttggccaccttacttttgacatgactgatctggcagtagcacgggagctc gatcccaataagttctgattgggtat
 tggccaggaccagatggcagtttaacccgaaacgcaggatattgtacatttggccacaatgtctccaaaacatactgcagctgaggaccttgataaaattgatatgt
 catagctggcaccgagagtggaaacgatgaatccaaagcgagtgccgtatgtgtctcacagggtgctcggatccagaagtgtgctcgtctcttgaatcaaaagagcctg
 ttatgggggtaccggcgctttacagttcgtgtaaacacattaggaatcactgaatcaaaaggtctgtgtagtgcacagatacgcgaataacggcctggcttctggag
 gtgaaccaacgcaagggtcagcgctgtgctatgtctgtctcaactgacccaatgacattgtttcaacgacgatagcctcgccttacacaagatactatgacttctg
 gcgaccagttggacatgactatcctatgtgctgacgggccccttagtacagagacctacalcagtcatttcagaccgtatggcaggaaatacacaacggcgcagcatg
 cactggcagacttctgctcccttagctttcatatccgtatactaaaatgggcaaaaaggcgctgctgcaatcttgaaggcgcaatcagaggggctcagaaccgtatac
 tagcaaaatatgaaaagagtagcttactccagaagggcggttaacctgtataccggtagccgtgtatctaggacttattcacttctgaaaatgcagaagaccttaagc
 tgggtatttaataaggcctctttcttacggctccgtgctgtgtggcggttttctcagaagggcggtgtgaggactatcagaacagctacttaaaacaaaacatgccgaaca
 gctggcccatagaaagcaactgacaatcgaggagtagcaaacgafgtctccgacgcgttggacgtggacaagacggcgaatacgaagacacattagcttatgacatt
 ctgtcagtcgaaacaccgtacgtgagtagcagggtga 配列番号2

【0397】

E. フェシウム (E. faecium) m v a E :

【0398】

atgaaagaagtgttatgattgatcggtcgcacacccattgggaataacagaggtagctttagctcttttacagcggfaggagctggggacactggcgcgaaggggct
 cgtggataaaacaaagcttaagaagacaaagtagaccgaagtgtatctggcaattgtcttcaggcaggaaacggacaacacgttgcgaagacaataagccctgaacag
 tggcttaccagttgacgtgcccggcgatgactattaacgaagtttggcggtccggaatgaaaggggtgtatttagcccgccaggttaatacagttaggggaggcgagagttgg
 ctatggcaggggggtacggagtcgaatgtcacaaagcaccatgtgaaaccltaccagtcagagaccaacgaatagggagagccgatalcalcaatgttlaattgacggggt
 gacggatgcgttttccaatgctcacatgggtcttactgccgaaaagggtggcgaccagtttcagtgctgcgcggaggaaacagaccggtagcgttgcagccaattga
 aagcagcgcacgggttgaagccgggggtgttctcagaagagatttccgggtlaagattagcgacagagatgtcttgaagcagggcagtaagaggcaacagc
 acttggaaaactggcgaccttggcgacgggtgttctgaagaggcgacgggtaccgctggcaatgtctcaccgctgaatgacggcgctagtgctgtgattcttgatca
 aaagaatagcgggaaaacaataatctgcttacttggcgacgataaaggaggttgggaagttggtatcgtatccttctatcatgggtattggcccaataaaggccattcaa
 aagttacagatcggtcggcgtgaacctgtccacgattgatctgttgcgaatgaatgaagcaticggcgcatctagcattgttgttctcaagagctgcaattggacgaaga
 aaaagtgaatatctatggcgggcgatagcttttagccatccaatcgcgcaagcgaggccggatactgacanccttagcatacggcctcctgctgtgagcaaaagcg
 ttatggtattgcgtcattatgtatcgccgggtggcttggctgtgctgttagaagcfaatatggagcagaccacaaaagcgttcagaagaaaaagtttaccagctta
 cccctccgagcggagatcgagcttaccgagaagaacgttctgactcaagaagggcacttatttccaggagcagacgttgcgaagaacgttccgacacatgatt
 gagaatcaggctccgaagtggaatccaatgggaattgcacaaaatltcagattaatgcaagaaaaaatggttcttatggcgactgaagaacctcaglaatagcg
 gcagcatcgaaacggcgcaaaaatctgcgggaacatttgcgggaacggcctcagcggttatgcgcggcgagattgctctgtctggcaatcagaatatcaagccgtg
 ataaatgcgtgaaatcagcaanagaagaactgattcttggcgaaacgagtcgtacccgaglatgttlaaacgcgggggaggtgttcaggaatlttctacgcgggagttta
 tgggttcttttccagcgtatttlatcaatcgacttctgtgtggacgtcaaggacgcaatgggggcaaacatgacnaacttattctcgaagcgttgcgaataaacgtcgtgaat
 ggttcccggaagaggaaatctgttctccatctgtcaaacctgctacggagtccttggcatctgcatgttgcgagattccttttgaagacgttggcgtacaagaagaatt
 ggtgaacagatcgccaagaaaattcaacaggcgagggaatatgttaagcttgaccttaccgcgcggcaaccatacaaggggattatgaacgggtatcgaaagccgtc
 gttgcgcgaacgggaaacgacacacgggctgttccgcttctattacgcatacggcggccgtlaattggctgtaccaaggttlaacggattggcagatcaagggcgataa
 actgttggtaaatgaacgttccactggctgtggcgactgtcgggtggcggtcgaacatalttaccaaaagccaaagcgttccctgccatgctggatattgattccgcaaa
 agaacttggcccaagtgatcgccgggttaggtttagcacagaatcttggcggtgttacgtgcallagtgacagagggcattcagaagggacacatgggcttgcgaagcacg
 ttctttagcgatttcgataggtgcatcggtgaggagatagagcaagtcgcgaaaaactcgtgaagctgaaaaaatgaatcagcaaacggcaatacagattttagaaa
 aaattcgcgagaatga 配列番号3

【0399】

E. フェシウム (E. faecium) m v a S :

【0400】

atgaaatcgggtattgacgtctgtcttcttaccggcaatttgtatttgacatgactgagctggcagaatcacgggggatgatccagctaaatatcatattggaatcggg
 caagatcagatggcagtgaaatcgcgcaaacgaggacatcataacttgggtgcaaacgttgcgagtaagatcgtgacagagaaagaccgcgagttgattgataggta
 atcgttggcacggaatcaggaaattgaccactccaaagcaagcgccgtgattattaccatctccttaaaattcagtcgttgcgccgttcttgcagggtaaaagaagcgttcta
 tggcggaactgtgcccgtcacatggcggaaggatgtcaaaaatctccggagcgtaaggtcttgttaattgtcgtacagatcgcggttatgtttggccagcgga
 ggagaaggttactcaaggcggtggggcggtagccatgattgattacacaaaacccccggattcttctgattgaagacgatagtgtttttctcacagaggatactatgattctg
 gcggcctgattactccgagttccctgtagtgagcgggcccccttcaaaccaacgtatatalagagagtttgcagaaggtttggaaccggcacaaggaattgtccggaagag
 ggctgggaagattatcaagctattgttttccataccctatcacgaagatgggtaagaaagcgctccagagttttagaccacacagatgaagataaccaggagcgcttaa
 tggctagatagaggagcttattcgtatagccggagaattgtgaacctgtacacagcgagcttgtaccttggcttaccagcttgggaaaactctaaaagtttacaaccg
 ggagatcggaatcgccctctttctatggcagttgtgctgggtgtccgagttcttaccgggtattttagaagaaaattaccaagagatcgttgcgtcaaaagccatcaagaat
 gctggatagccggactcggaatcggctgatgaatagacacacatttccagagacttgcagaacatggtgaatgcgccgaatatacagagcgacgtcccccttctat
 aaccaagattgagaacgacattcgttattataaaatctga 配列番号4

【0401】

E. ガリナラム (E. gallinarum) m v a E

【0402】

10

20

30

40

atggagaagttgcatcattgacgcactgcgtactccaataggaaagtaccacggctcgctgaaagattacacagctgtgaactggggacagtagcagcaaaaggcgtt
 gctggcacgaalacagcaagcaaaaagaacacatagcgcaagttatallggcaacgtctgcagccggaagtgggcagaalccaggccgacaaagcagtttacagtc
 aggatgtctcttctgatalccccgctagcacgalcaatgaagtggtggtcgggtatgaaagcgattctgatgggtatggagcaaatcagctgaacaaagcctctgtggtc
 ttaacagcgggaattgaaagcatgaccaacgcgcgctgttttagttattacaacaaggctgaggatcaatattcggcgccgggttagcacaatgatgcagatggtctaac
 agatgcttccagttccaaacaaatgggcttaaccgcagagaccgtcgtgagagatatggaattacgcgtaaggaaacagatgaatttgccttacctctcaaatgaaggc
 ggccaanagccagcggcggaanaagtttgatcaggaaatgtacccctgcagggaaataatccggaacggcttcagggacgaaggcagcagccgcgacaacagtc
 gagaagctagctgagcttaaaacgggtgtcaaaaagacggaaacagttacagcgggtaaacctctacgataaatgatggcgctgctatgggtatlaalagcatcaaatct
 tattgcgaagaacaccagattcttattcggcggtataaaggagatcgttgaggtgggttttgcggccgaaataatgggtatttcccccaataggctatagacacctgct
 gaaaaatcaagcactgacctagaggataggaatatttgagattaatgaagcctttgctgcgaggttgattgtggtagaacgcgagttggcctggaccccaaaaagt
 taatcgtatggcggtgtgtatcactcggccacgaattggggcgacgggagctcgcattgcgacgaccgttgcttaccagctgaaagataccaggagcgctacgggt
 atagcttcttattgcgttggtgggggtcttggttggtgcgacgtctcgtgaaacccalcggccacgtccacaaactaattttgatgaggaatcgtctccgaaaaactga
 gaagaagaagtttatgcgtctagctcctaacaacgcttagcgttttggagcccaaggcgctattaccgctgctgaacacctggtctccaggagatgaccttaacaa
 agagacagccaatcaacttaategaaaccaaaccagcgaaagtgaaattcttttagcgtggcctgaacttacaggtgaatgggaaagcgataatgttctctggccac
 ggaggaaccgtccgttatcgtcgtgatgcgaatggcgccaaatggctgtcttattacaacaacaaagtcaggagagggctgttaccggggtcagattgtctcatggacg
 tacaggaccagaagcaatattagcgaaagttgaatccgagcaagctaccatttgcggtggcaaatgaaacatacccgctctatcgtgaaaagaggaggaggtctgcg
 tagatcattggcaggaattcagtcggcgcaagtgacttagccacggcgatgtatcaatgacgtgatgtagatgttaaggatgcaatgggtgctaatatcatcaat
 agtatctagaaggtgttgcggaattgtttgaaaaatggttccagaagaagaatcctgttctcaattctcctaattcgcgacagaaggtctgttaacggcgacgtcgt
 cagttccgtttgataaattgtccaaaactgggaatgctgcacaagtagctgtgtaaaatagtgcacggcgggcgttctgaagatagatccatcacagagctgcccacacaca
 ataaaggtattatgagcgttgaagcgtaattcttagccaccggtatgacacccgtgcggtgtcggctgcacgtccacggttacgcggcacgcaatggcggaatgca
 agggcttacctgttgacgattatgaagatcggctgataggtcttaccattacccttggctatttgcagactgggggtgcccacaaaacttggccaaaagcacaggc
 cgccctgcgctaaactggcggttgagcggcgctgggaactggccagcctggcgaggtgtgggattagttcaaaatfttggcgctttacgagcactgtgagcgaggg
 caftcagcaaggcgacatgagtagcagctagatccctggccattagcgttaggtgcgaaaggctactgaatatagagcaactagctgcgaagctgagggcagcgacgc
 aatgaatcaggagcaggtcgttaaattctgaccgaaataagaaattaa 配列番号7

10

20

30

40

【0407】

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

【0408】

atgaacgttggaaftgataaaatcaatttttcttccgcccatttcattgatattggtggtatctcgtcatgcaagagaagttgacccaacaagttcactataggaaataggcc
 aagatcagatggcagtaaaacgaaaacgcaagatctgtaacgttcgcatgcacgccgcgaagatattctgactaagggaagatttacaggccatagatatggaat
 agtggggacagctgctggatcgacgagagcaaggcaagtgctgtcgtatgtcagcggctttaggtattcagccttttgcgcgtccttgaatlaaggaggaatgctat
 gggggcacgtccggcctcagtttgcaaaagctatgtcagggctaaccacagagcaaggtcctgtgtgtagcttccgatalagcacgctacggactggcalccggag
 gagaaccgactcaagggtgtaggtgctgtggcaatgttgatttccgtatccagctatcttgcagttgaaaaatgataatcctatgttgaccaagatatatacgattttggc
 gcccgtcgggcaatatactatgttgagacggccatctgtctaatgcccgtctatataagacagccttaaacaaagcttgcgaagcacattgcgagaaaaaccaacggact
 gctaaagattatgctgattgtcgttccatattccgtacgaaaaatgggtaagaaagctctgttagcgggttttgcggaggaagatgagacagaacaaaagcggtaaltg
 caggtatgaagaatcaattgtatcagctcgtcggactggaaatctgtatcgtcactctatctggcgctgatttcttactggagaalagtagcagtttacagggcaacg
 atcgcataggtctgtttagctatgttcagggcggttgcggaattttcagtgccctcttggaccgggtllacgagaacaaatagcgaagctgcccacaaagctctctg
 gacgacgggcaaaaactgactatcgcagagtacgaagccattgttaattgaaccattgatattgacaggaaccagtcattttaggtgacttactgtacttccatagagag
 atcaaaaacactattcgtactataacgaggagaatgaataa 配列番号8

【0409】

E. ガリナラム (E. gallinarum) E G 2 (m v a E) :

【0410】

MEEVVIIDARRTPIGKYHGLSKKFSVAVALGTAVAKDMFERNQKIKEEIAQVIGNVLQAGNGQNPARGVA
 LQSGLSVDIPASTINEVCGSLKAILMGMEQIQLGKAQVVLGAGGIESMTNAPSLSHYNKAEDTYSVPVSS
 MTL DGLTDAFSSKPMGLTAENVAQRYGISREAOQDFAYQSQMKAQAENKFAKEIVPLAGETKITITAD
 EGIRSQTTMEKLASLKPVKFTDGTVTAGNASTINDGAALVLLASKTYCETNDIPYLATIKEIVEVGIDPE
 IMGISPIKAIQTLLQNKVSLLEDIGVFEINEAFAASSIVVESELGLDPAKVNRYGGGSLGHAIGATGAR
 LATSLVYQMQEIQARYGIASLCVGGGLGLAMLLERPTIEKAKPTDKKFYELSPAERLQELNQKISSET
 KQQLSQMMLAEDTANHLIENQISEIELPMGVGMNLKVDGKAYVVPMAATEEPSVIAAMSNGAKMAGEIHTQ
 SKERLLRGQIVFSAKNPNEIEQRIENQALIFERAESQSYPSIVKREGGLRRIALRHFPADSQQESADQST
 FLSVDLFVDVKDAMGANIINAILEGVAALFREWFPNEEILFSILSNLATESLVTAVCEVFPFSALSKRGG
 TVAQKIVQASLFAKTDPRAYVTHNKGIMNGVEAVMLATGNDTRAVSAACHGYAARTGSYQGLTNWTIESD
 RLVGEITLPLAATVGGATKVLPAQAALIEISDVHSSQELAAASVGLVQNLALRALVSEGIQKGHMS
 MQARSLAIVGAEKAEIEQVAEKLQNPPMNQQQALRFLGEIREQ 配列番号9

【0411】

E. ガリナラム (E. gallinarum) E G 2 (m v a S)

【0412】

MNVGIDKINFEVPPYYLDMVDLAHAREVDPNKFITIGIGQDQMAVSKKTHDIVTFAASAAKEILEPEDLQA
IDMVIVGTESGIDESKASAVVLHRLGLGVQPFARSFEIKEACYGATAGIQFAKTHIQANPESKVLVIASDI
ARYGLRSGGEPTQGAGAVAMLLTANPRILTFENDNLMLTQDIYDFWRPLGHAYPMVDGHLNQNQVYIDSFK
KVWQAHCCERNQASISDYAAISFHIPYTKMGKKALLAVFADEVETEQERVMARYEESIVYSRRIGNLYTGS
LYLGLISLLENSSHLASAGDRIGLFSYSGSAGVSEFFSGRLVAGYENQLNKEAHTQLLDQRQKLSIEEYEA
FTDSLEIDQDAAFSDDLPSYSIREIKNTIRYYKES 配列番号10

【0413】

L. グレイ (L. grayi) (m v a E) :

【0414】

MVKDIVIIDALRTPIGKYRGQLSKMTAVELGTAVTKALFEKNDQVKDHVEQVIFGNVLQAGNGQNPARQI
ALNSGLSAEIPASTINQVCGSGLKAI SMARQQILLGEAEVIVAGGIESMTNAPSITYYNKEEDTLKPV
TMTFDGLTDAFSGKIMGLTAENVAEQYGVSRQAQDAFAYGSMKAQAQEQGIFAAEILPLEIGDEVITQ
DEGVRQETTLKLSLLRTIFKEDGTVTAGNASTINDGASAVIIASKEFAETNQIPYLAIVHDITEIGIDP
SIMGIAPVSAINKLIDRNQISMEEIDLFEINEAFAASSVVVQKELSIPDEKINIGGSGIALGHPGATGA
RIVTTLAHQKLRTHGRYGIASLCIGGGGLGLAILIEVPQEDQPVKKFYQLAREDRRLARLQEQAVISPATKH
VLAEMTLFEDIADNLIENQISEMEIPLGVALNLRVNDKSYTIPLATEEPSVIAACNNGAKMANHLGGFQS
ELKDGFLRGQIVLMNVKEPATIEHTITAEKAAIFRAAAQSHPSIVKRGGGLKEIVVRTFDDDPFTLSIDL
IVDTKDAMGANIINTILEGVAGFLREILTEEILFSILSNYATESIVTASCRIPYEALSKKGDGKRIAEKV
AAASKFAQLDPYRAATHNKGIMNGIEAVVLASGNDTRAVAAAAHAYASRDQHYRGLSQWQVAEGALHGEI
SLPLALGSGVGAIEVLPKAKAAFEIMGITEAKELAEVTAAGVLAQNLAALRALVSEGIQQGHMSLQARSL
ALSVGATGKEVEILAEKLQSGRMNQANAQTILAEIRSQKVEL 配列番号11

【0415】

L. グレイ (L. grayi) (m v a S) :

【0416】

MTMNVGIDKMSFFVPPYFVDMTDLAVARDVDPNKFILIGIGQDQMAVNPKTQDIVTFATNAKNILSAEDL
DKIDMVIVGTESGIDESKASAVVLHRLGLIQKFARSFEIKEACYGGTAALQFAVNHIRNHPESKVLVVAS
DIKYGLASGGEPTQGAGAVAMLVSTDPKIIAFNDDSLALTQDIYDFWRPVGHDYPMVDGPLSTETIYQS
FQTVWQEYTKRSQHALADFAALSFIPIYTKMGKKALLAILEGESEEAQNRI LAKYEKSIAYS RKAGNLYT
GSLYLGLISLLENAEDLKAGDLIGLFSYSGSAGVSEFFSGRLVEDYQEQLLTKKHAEQLAHRKQLTIEEYE
TMFSDRLDVDKDAEYEDTLAYSISVRNTVREYRS 配列番号12

【0417】

E. フェシウム (E. faecium) (m v a E) :

【0418】

MKEVVMIDAARTPIGKYRGSLSPTAVELGTLVTKGLLDKTKLKKDKIDQVIFGNVLQAGNGQNVARQIA
LNSGLPVDVPAMTINEVCGSGMKAVILARQLIQLGEAEVIVAGGTESMSQAPMLKPYQSETNEYGEPISS
MVNDGLTDAFSNAHMGLTAEKVATQFSVSREEQDRYALSSQLKAAHAVEAGVFSEIIPVKISDEDVLSE
DEAVRGNSTLEKGLTLRTVFSEEGTVTAGNASPLNDGASVILASKEYAENNNLPYLATIKEVAEVGIDP
SIMGIAPIKAIQKLTDRSGMNLSTIDLFEINEAFAASSIVVSQELQLDDEKVNIIYGAIALGHPIGASGA
RILTTLAYGLLREQRYGIASLCIGGGGLGLAVLLEANMEQTHKDVQKKKFYQLTPSERRSOLIEKNVLTQ
ETALIFQEQLTSEELSDHMIENQVSEVEIPMGIAQNFIQNGKKKWIPMATEEPSVIAAASNGAKICGNIC
AETPQRLMRGQIVLSGKSEYQAVINAVNHRKEELILCANESYPSIVKRGGGVQDISTREFMGSFHAYLSI
DFLVDVKDAMGANMINSILESVANKLREWFPEEEILFSILSNFATESLASACCEIPFERLGRNKEIGEQI
AKKIQQAGEYAKLDPYRAATHNKGIMNGIEAVVAATGNDTRAVSASIHAYAARNGLYQGLTDWQIKGDKL
VGKLTIVPLAVATVGASNILPKAKASLAMLIDSAKELAQVIAAVGLAQNLALRALVTEGIQKGHMLQ
ARSLAISIGAIGEEIEQVAKKLREAEMNQQTAIQILEKIREK 配列番号13

【0419】

E. フェシウム (E. faecium) (m v a S)

【0420】

MKIGIDRLSFFIPNLYLDMTELAESRGDDPAKYHIGIGQDQMAVNRANEDIIITLGANAASKIVTEKDREL
IDMVIVGTESGIDHASKASAVIIHLLKIQSFARSFEVKEACYGGTAALHMAKEYVKNHPEERKVLVIASDI
ARYGLASGGEVTQGVGAVAMMITQNPRIISIEDDSVFLTEDIYDFWRPDYSEFFPVVDGPLSNSTYIESFQ
KVWNRHKELSGRGLEDYQAI AFHIPYTKMGKKALQSVLDQTDENQERLMARYEESIRYSRRIGNLYTGS
LYLGLTSLLENSKSLQPGDRIGLFSYSGSAGVSEFFTGYLEENYQEYLFQASHQEMLDSTRITITVDEYETI
FSETLPEHGECAEYTSVPPFSITKIENDIRYYKI 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 】

MEEVVIIDALRTPIGKYHGSLKDYTAVELGTVAAKALLARNQOAKEHIAQVIIGNVLQAGSGQNPGRQVS
 LQSGLSDDIPASTINEVCSGSMKAILMGMEQIQLNKASVVLTTGGIESMTNAPLFSYYNKAEDQYSAPVST
 MMHDGLTDAFSSKPMGLTAETVAERYGITRKEQDEFAYHSQMKAQAQAAKKFDQEIIVPLTEKSGTVLQD
 EGIRAATTVEKLAELKTVFKKDGTVTAGNASTINDGAAMVLIASKSYCEEHQIPYLAVIKEIVEVGFAP
 IMGISPIKAIDTLLKNQALTIEDIGIFEINEAFAASSIVVERELGLDPKKVNRVGGGTSLGHAIGATGAR
 IATTVAYQLKDTQERYGIASLCVGGGLGLAMLLNPSATASQTNFDEESASEKTEKKKFYALAPNERLAF
 LEAQGAITAAETLVFQEMTLNKETANHLIENQISEVEIPLGVGLNLQVNGKAYNVPLATEEPSVIAAMSN
 GAKMAGPITTTISQERLLRGQIVFMDVQDPEAILAKVESEQATIFAVANETYPISIVKRGGGLRRVIGRNF
 PAESDLATAYVSIIDLMVDVKDAMGANIINSILEGVAELFRKWFPEEEILFSLSNLATESLVTATCSVPF
 DKLSKTGNRQVAGKIVHAADFADIDPYRAATHNKGIMNGVEALILATGNDTRAVSAACHGYAARNGRMQ
 GLTSWTIIEDRLIGSITLPLAIATVGATKILPKAQAALALTGVETASELASLAASVGLVQNLALRALV
 SEGIQQGHMSMQARSLAISVGAKGTEIEQLAAKLRAATQMNQEQARKFLTEIRN 配列番号15

10

【 0 4 2 3 】

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

【 0 4 2 4 】

MNVGIDKINFFVPPYFIDMVDLAHAREVDPNKFTTIGIGQDQMAVNKKTDIVTFAMHAAKDILTKEDLQA
 IDMVIVGTESGIDESKASAVVLHRLGLIOPFARSFEIKEACYGATAGLQFAKAHVQANPQSKVLVVASDI
 ARYGLASGGEPTQGVGAVAMLI SADPAILQLENDNLMLTQDIYDFWRPVGHQYPMVDGHLNAVYIDSF
 QVWQAHCEKNQRTAKDYAALSFHIPYTKMGKKALLAVFAEEDETEQRKLMARYEESIVYSRRIGNLYTGS
 LYLGLISLLENSSSLQANDRIGLFSYSGGAVAEFFSGLLVPGYEKQLAQAAHQALLDDRQKLITAEYEAM
 FNETIDIDQDQSFEDDLLYSIREIKNTIRYYNEENE 配列番号16

20

【 0 4 2 5 】

イソブレンシンターゼ :

【 0 4 2 6 】

Atggaagctcgtcgttctcgaactcgaacctaacagctgggactatgattacctgctgctccgacacggacgagtcacatgaaglatacaaagacaaagcga
 agctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaaagcagaatttctgacctgctggaactgattgacaacgtccagcgccctgggctgggttaccgttccgag
 tctgataccctgggtgcgtggaatcgttcttctcggcggttctgagtgagglaaccaagacttccctgacggtagcgacgttcttccgtctgctgcaaacag
 gttttgaggttttcagggaagcgttcagcggttcaagaccacaaacggcaacttctggagaacctgaagggaagatacaagctactgagcctgtacgagccagc
 ttcctggctctggaagcgaanaacatcctggacgagcggaaggttttgcgaatctctcctgaaagaactgtctgaagaaaagatcggtaagagctggcagaacagg
 tgaacctgcaactggaactgccactgcacatgccgactcagcgtctggaagcagtatggtctatcgaggcctaccgtaaaaaggaggacgcgaatcaggttctgctgga
 gctggcaattctggaattacaacatgacacgtctgtataccagcgtgatctgcgtgaaacgtccgttgggtggcgtcgtgtgggttggcgaccaaaactgcacttctgctcgt
 gaccgctgattgagagcttctactggggcgtgggtgtagcattcgaaccgcaatactccgactgccgtaactccgtcgcacaaaatgttcttctgtaacattatcgaaga
 talctacgatgtalacggcaacccgtgacgaactggagctgttactgagcagtgagcgttgggacglaaacgccatcaacgacctgcccgaattacatgaactgtgctt
 ctggctctgtataactattaaacgaatcgctacgacaacctgaaagataaaggtagagaacatcctgcctgtatctgaccaaaagcctgggctgacctgtgaacgcttcc
 ctgcaagaagcgaagtggtgtgatacaaaatctactccgacgttggacgactacttccgcaacgcattgaaatccttcttggcccgctgcaactgtgttctgcttacttgc
 ctgtcgtgcagaacattaaaaaggaagagatcgaaaacctgcacaaataccatgacaccatctctcgtcttccatcttccgtctgtgcaatgacctggctagcgcgtc
 tgcggaatgtcggtgtggaacccgcaaatagcgttctgttactgacgcaactaaaggatctccgaagaactggctaccgaaagcgtgagtaactgacgatgaaac
 ctggaaaaagatgaacaaggaaaaactgggtgtgtagcctgttcgcgaaacgttcgtggaacccgcgatcaacctggcagtcgaatctcactgcacttatacaaacggc
 gacgcgcatacctctccggatgagctgacctcgcaaacgcgttctgtctgtaactcactgaaccgattctgccgttgaacgctaa

30

【 0 4 2 7 】

i s p A :

40

【 0 4 2 8 】

tggactttccgagcaactcgaagcctgcgttaagcaggccaaccaggcgtgagccgtttatcgccccactgccccttcagaacactcccggtgctgaaaccatgcag
 tatggcgcatattaggtgtaagcgcctgcgaccttctgtgttatgccaccggtcctatgtttggcgttagcacaaacacgctggagcgacccgctgctccgtagagt
 gtafccacgcttactcattaatctatgatgtattacggcgatggatgatgacgaltcgcgcgcgggttgcgacgtccatgtgaagtttggcgaagcaaacgcgattctc
 gctggcgacgtttlacaaacgctggcggttctcgallctaaagcgtgacgatalatccggaagtgtcggatcgcgacagaatttctgalttctgaactggcgagcgccag
 cggatltggcgaatgtcgggtggcagggacatgattagacgcggaagcgaacacgtaccttggacgcgcttgagcgtatctcgtcatalaaacggcgcatlg
 attcgcgcgcgttgcgttggcgttgaatagcgcggagataaaggcgtcgtctctgcccagtlactcgacaagtacgcagagagcgtcggccttgccttcaggttca
 agatgacatctcgtggtgtgtaggatactgcaacgttgggaaacgccagggtgcgcgacgcaacttggtaaaagtacctaaccctgcacttctgggtttagcga
 gcccgggaagaagcccggtatctgacgacgatgccgtcgtcgtcgtgaaacaactggctgaacagtcactcgatacctcggcactggaagcgctagcggactacat
 catccagcgtataaataa

【 0 4 2 9 】

50

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:

【0430】

ATGAGCCTGACCGAAGAAAAACCGATTTCGTCGGATTGCAAATTTTCCGCCTAGCATTGTTGGGGTGATCA
GTTTCGTGATTTATGAGAAACAGGTTGAACAGGGCGTTGAGCAGATTGTTAATGATCTGAAAAAAGAA
GTTCCGCAGCTGCTGAAAGAAGCACTGGATATTCGGATGAAACATGCCAATCTGCTGAAACAGATTGA
TGAAATTCAGCGTCTGGGTATCCCGTATCATTTTGAACGTGAAATTGATCATGCCCTGCAGTGCATTTA
TGAAACCTATGGTGATAATTGGAATGGTGATCGTAGCAGCCTGTGGTTTCGTCTGATGCGTAAACAGG
GTTATTATGTTACCTGCGACGTGTTTAACTATAAAAGATAAAAAACGGTGCCTTTAAACAGAGCCTG
GCAAATGATGTTGAAGGTCTGCTGGAACGTATGAAGCAACCAGCATGCGTGTTCGGGGTGAAATTAT
TCTGGAAGATGCACTGGGTTTTACCGTAGCCGCTGAGCATGATGACCAAAAGATGCATTTAGCACCA
ATCCGGCACTGTTTACCGAAATCCAGCGTGCCTGAAACAGCCGCTGTGGAACGCTCTGCCTCGTATT
GAAGCAGCACAGTATATTCGGTTTTATCAGCAGCAGGATAGCCATAACAAAAACCTGCTGAAACTGGC
AAAACCTGGAATTTAATCTGCTGCAGAGCCTGCATAAAGAAGAAGTGAAGCCACGTTTGTAAATGGTGG
AAAGCCTTCGACATCAAAAAAACGCACCGTGTCTGCGTGATCGTATTGTTGAATGTTATTTTTGGGG
TCTGGGTAGCGGTTTTGAACCGCAGTATAGCCGTGCACGTGTGTTTTTACCAAAAGCAGTTGCAGTTAT
TACCCTGATCGATGATACCTATGACGCATATGGCACCTATGAGGAACTGAAAATCTTTACCGAAGCCG
TTGAACGTTGGAGCATTACCTGTCTGGATACCTGCCGGAATATATGAAACCGATCTATAAACTGTTTC
ATGGACACCTATACCGAGATGGAAGAATTTCTGGCAAAAGAAGCTCGTACCGACCTGTTTAATTGCGG
TAAAGAATTTGTGAAAGAATTCGTGCGTAACCTGATGGTTGAAGCAAAATGGGCCAATGAAGGTCAT
ATTCCGACCACCGAAGAACAATGATCCGGTTGTGATTATTACCGGTTGGTGCAAACTGCTGACCAACAC
CTGTTATCTGGGTATGAGCGATATTTTACCAAAAGAAAGCGTTGAATGGGCAGTTAGCGCACCCGCCCTC
TGTTTCGTTATAGCGGTATTCTGGGTGCTGCTGTGAACGATCTGATGACCCATAAAAGCAGAAACAAAGAA
CGTAAACATAGCAGCAGCAGCCTGGAAAGCTATATGAAAGAATATAACGTGAACGAAGAGTATGCAC
AGACCTGATTTTACAAAGAAGTTGAGGACGTTTGGAAAGATATCAACCGTGAATATCTGACCACGAA
AAACATTCGCGCTCCGCTGCTGATGGCAGTTATTTATCTGTGTCAGTTCCCTGGAAGTTCAATATGCAGG
TAAAGATAAATTTACCGGTATGGGCGACGAATATAAACATCTGATTAAGGCTGCTGGTGTATCCGA
TGAGCATTTAA

10

20

【0431】

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:

【0432】

ATGAGCACCTGCCGATTAGCAGCGTTAGCTTTAGCAGCAGCACCAGTCCGCTGGTTGTTGATGATAA
AGTTAGCACCAAAACCGGATGTTATTCGTACACCATGAACTTTAATGCAAGCATTGTTGGGGTGATCAGT
TTCTGACCTATGATGAACCGGAAGATCTGGTGATGAAAAAACAGCTGGTTGAAGAACTGAAAGAAAGA
AGTTAAAAAAGAGCTGATCACCATCAAAAGTTAGCAATGAACCGATGCAGCATGTTAAACTGATTGAA
CTGATCGATGCCGTTTACCGCTCTGGGTATTGCATATCATTTTGAAGAAAGAAATCGAAAGAACCTGCA
GCATATTCATGTTACCTATGGTGAACAGTGGGTGGATAAAGAAAATCTGCAGAGCATTAGCCTGTGGT
TTCTGCTGCTGCTGCGTCAGCAGGGTTTAAATGTTAGCAGCGGTGTTGTTTAAAGATTTTATGGACGAGAAA
GGCAAATTCAAAGAAAGCCTGTTGTAATGATGCACAGGGTATTTCTGGCACCTGATGAAGCAGCATTAT
GCGTGTGTAAGATGAAACCATTTCTGGATAATGCACTGGAATTTACCAAGTGCACCTGGATATCATTG
CAAAAGATCCGAGCTGTGATAGCAGCCTGCGTACCCAGATTTCATCAGGCACCTGAAACAGCCGCTGCG
TCGTCGCTGTCGACGCATTGAAGCACTGCATTATATGCCGATTTATCAGCAAGAAACCAGCCATAATG
AAGATCTGCTGAAACCTGGCAAACTGGATTTTATGCGTTCTGCACTCCATGCACAAAAAAGAACTGAG
CCATATTTGTAATGGTGGAAAGATCTGGATCTGCAAGATAAACTGCCGATATGTTGCTGATCGTGTG
TGGAAGGTTATTTTGGATTCTGAGCATCTATTATGAACCGCAGCATGCACGTACCCGTATGTTTCTGA
TGAAACCTGTTATGTTGGCTGGTTGTTGCTGGATGATACGTTTATGATAATTTATGGCACCTACGAGGAACCTG
GAAATCTTTACCCAGGCAGTTGAACGTTGGAGCATTAGTTGCTGGATATGCTGCCGGAATACATGAA
ACTGATTTATCAAGAACTGGTGAACCTGCACGTTGAAATGGAAAGAAAGTCTGGGCAAAAGGTGGTAAA
AACATTAGCAATAGTCTGTGTGTCAGGGTCTGTTGGCAGAAAGAACTGGGTAGTCAGATTACCTGGTTGA
AACCAAAATGGCAAAACGTGGTGTTCATGCCACAGCCGCTGGAAGAGTATATGAGCGTTAGCATGGTT
ACCGGCACCTATGGTCTGATGATTCACGATAGCTATGTTGGTCTGTTGATATTTGTTACCGAAGATAC
CTTTAAATGGGTGAGCAGCTATCCGCCATTTATCAAAAGCAAGCTGTTGTTATTTGTTCCGCTGATGGATG
ATATTTGAGCCACAAAGAAGAACAAGAACCGGGTATGTTGCCAGCAGCATGAAATGTTATAGCAA
AGAAAGTTGGTGCAGCGAAGAAGAAGCCTGCCAATATATCAGCCGTAAAGTGGAAAGATGCCCTGGAA
AGTTATTAATCGTGAAAGCCTGCGTCCGACCGAGTTCCGTTTCCGCTGCTGATGCCCTGCAATTAACCT
GGCACGTATGTGTGAAGTTCTGTATAGCGTTAATGATGGTTTTACCCATGCCGAAGGTGATATGAAAT
CCTATATGAAAAGCTTCTTCGTGCATCCGATGGTTGTTTAA

30

40

【0433】

pMCM1223 - pCL - Ptrc - Upper __GcMM__161 (リステリア・
グレイ (Listeria grayi) DSM 20601):

【0434】

50

cccgtcttactgtcgggaattcgcgttgccgattcattaatgcagattctgaaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggalaac
 aatttcacacaggaacagcggcgtgagaaaaagcgaagcggcactgctcttacaattatcagacaatctgtgtggcactcgaaccggaattatcgaattacattattat
 taaaaattaaagagggtatataatglatcgaattaaataaggaggaataaacatggllaaagacattglaalaattgatgccctccgtaactccalcgglaaglaaccgggt
 cagctctcaaaagatgacggcggllggaattgggaaccgcagllacaaaggctcgtlccgagaagaacgaccaggllcaaaagaccatglaagaacaagtcaatttggcaacg
 llllacaggcagggaacggccagaalcggcccgltcagatcggccttaattctggcctgltccgcagagataccggcttcgactallaaccagggtgtgtgtgtcgtggcctga
 aagcaataagcatggcgcgccaacagatctactcggagaagcggaaatlaatagtagcaggagggtatcgaatccatgacgaatgcggcggatllacatallataataa
 agaagaagacacccctctcaaaagcctgttctctacgatgaccttcgatggctgacggcgglltagcggaaagattatgggllaacagccgaaatgttggcgaacagta
 cggcgtatcacgtgagggccaggacgctttgctgatggatcgcagatgaaagcagcaaaaggcccaagaacaggcgatttccgagctgaaatactgctcttgaata
 ggggacgaagtattactcaggacgagggggttcgtcaagagaccacccfcgaaaaaattagctcgttcggaccatttttaagaagatgtactgttacagcgggcaa
 cgcccaacgatcaatgatggcggcctcagccgtgatcattgcaicaaaggagttgtgagacaaaccagattccctaccttgcgctcgtacatgatattacagagatagg
 cattgatccatcaataatgggcattgctcccggtgagtgccatcaataaactgatcgtacgtaaccaatagcatggagaatcgatctcttgaattaatgaggcatttgc
 agcatcctcgggtgtagtlaaaaaagagllaagcattcccgatgaaaagatcaatattggcgggtccgggtattgcaclagggccatcctcttggcggccacaggagcggcgt
 tgaaccacccctagcgcaccagttgaacgtacacacggacgctatgtattggcctccctgtgcatggcgggtggccttggcctagcaatattaagaagtgcctcagga
 agatcagccgggtaaaaaatttataaattggcccgtgaggaccgtctgcttagacttcaggagcaagccgtgatcagcccgctacaaaacatgtactggcagaatga
 cacttctgaagatattggcgacaatctgatcgaataatcaatatctgaatggaaatccctctggtgtgtgcttgaatctgagggtcaatgataagattataccatccac
 tagcaactgagggaaccgagtgaatcgtgctgtaataatgggtgcaaaaagggcaaacacctggcgggttttcagtcagaattaaaagatggttctcgtggtggcaaa
 lltgtactatgaacgtcaaaagaaccggcaactatcgagcatagcatcggcagagaagaaggccaatttttctgcccgcagcgcagtcacatccatcgattgtgaacga
 ggttgggggtctaaaagagatagtagtgcgtacgttcgatgatcggacgttcctgttattgatctgatagtgatactaaagacgcaatggcgcttaacatcattaaca
 ccattctgagggtgtagccggcttctgagggaatccctaccgaagaaattctgttctctattttatcattacgcaaccgaatcaattgtgaccggcgtgtcgcatac
 ctlacgaagcactgagtaaaaagggtgatggtaaacgaalcgctgaaaaagtggctgtgtcgtcatcctaaattggccagllagatccttaccgagctgcaaccacaacaaag
 glattatgaatggtatggagggcgtcgttllggcctcaggaatgacacacggggcggcgcggcagccgcacatgctgtatgcttcaacgcgacacacatcggggcctla
 agccagltggcaggttgagaagggcggtlacacggggagatcagctacacattgactcggcagcggtggcggtgcaallgagggtcttgcctaaagcgaaggcggc
 attcgaaatcatggggatcacagaggcgaaggagctggcagaagtcacagctcgggtagggtggcgcaaaacctggcggtlaagagcgcttctttagtgaaggga
 atacagcaaggctacatgtcgtccaggctcgtctcttgcattatcgttaggtgctacaggcaagggaagtgaatcctggccgaaaaattacagggtctctgtatgaat
 caggcgaacgctcagaccatactcgcagagatcagatcgcaaaaagtgaattgtgatctagacgcactaggaggatataccaatgaccatgaacgttggaaatcgaataa
 aatgtcattcttllgtccacctlaactllgtggacatgactgaltggcagtagcacgggatgtcgateccaataagttlctgallgttatggccaggaccagatggcagllaal
 ccgaaaacgcaggatattgtacatttggcacaaatgctgcaaaaacatactgtcagctgaggaccltgataaaatgatalgttcatagtcggcaccgagagltggaatc
 gatgaatcgaagcgagltggcgtgaggttccacaggttgcgtglatccagaaglltgcgtcgtcttgaatcgaagaagcctgtlatgggggtaccggcgtttagt
 tgcgtglaaacacattaggaatcatctgaatcaaaaggttctttagttagtgcatacatatcgcgaaatagccctggccttctgaggtgaaccaacgcaagggtgcagggc
 ctgtggctatgctcgtcactgacctaaagatcattgcttcaacgacgatagcctcgcgttacacaagatattatgacttctggcgaccagttggacatgactatccta
 tggctgacgggctctttagtacagagacctacatccagtcatttcagaccgtatggcagggaatcacaaaaacggctgcagcatgactggcagacttctgctgcccttagct
 ttcatatcccgtatactaaatggcgaaaaagggcgtgcttgaatccttgaaggcgaatcagaggagggtcagaaccgtatactagcaaaaatgaaaagagtatagcc
 tactccagaaggcgggtaacctgtataccggtagcctgtatctaggaacttattcacttctgaaaaatgcagaagaccttaaaagctgggtatttaataaggcctcttllctacg
 gttccgggtgtgttggcggaglltllctcagggaaggctgttggaggactatcaggaaacagctacllaaaacaaaacatgccgaacagctggcccatagaagaacactgaca
 atcaggaggtacgaacgatgtlccgaltcgttggacgttggacaagacggcgaatcagaagacacattagctllatagcatttgcagltccgaacacccgtacgtga
 gtacaggaggttgaactgcagctgttaccatattgggaattcgaagcttggggccgaacaaaaactatctcagaagaggatctgaatagcggcgtcgaaccatcatcatc
 atcattgagtttaaacggctccagcttggctgttggcggatgagagaagattttcagcctgatacagallaaatcagaacgcagaagcggctgataaaacagaatttgc
 ctggcggcagtagcgggtgtgtccacctgacccatggcgaactcagaagtgaaacggcgtagcggcgtatgtgtgtgggtctcccatgagagtagggaa

10

20

30

【 0 4 3 5 】

(上配列表の続き)

ctgcaggcgcacaaataaacgaaaggctcagtcgaagagctgggctcttctgttattctgttggttctggtagaacgctcctctgtagtaggacaaatccggcgagcgctt
atltgaacgttgcgaagcaacggcccgagggttgccgggagcagcggccgcaataaactgccaggcgcacaaatfaagcagaaggccactctgacggatggcctttt
gcgtttctacaaactcttttgtttattttctaaatcatcacaatatgtatccgtctcatgagacaataaaccctgataaatgtctcaataatctggcgtaatagcgaagaggccgc
caccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaalggcgaalggcgccctgaltgcgtatttllccltlacgcactctgtgcgttatttlcacaccgcatalgggtgcactlca
gtacaatctgctctgatccgcatalgtlaagccagcccgacacccgccaacaccgcgtgacgagcttaglaaagccctcgcgtagatttlaalgcggatgttgcgaltactl
cgccaactattgcgataacaagaaaaagccagcccttcatgatatactcccaatttgtgtagggcttattatgcacgcttaaaaaataataaaagcagacttgacctgatagttt
ggctgtgagcaaatatgtgttagtgcacttaacgcttgaggtlaagccggccgcgaagcggcgctggccttgaacgaattgttagacattatttggcgactacettgggtgac
tcggcttccacgtagtgagacaaatcttccaaactgatctggcgcgagggccaaagcgaatcttcttcttgcacagataaagcctgtctagcttcaagtagacggcgctgalactg
ggccggcagggcgctccallgccagtcggcagcgacalccttggcgcgatlttggcggttactgcgctgtacaaatgggggaacacglaagcactacatttccgctcal
cgccagcccgatcggcgcgaggttccatagcggtlaaggtttcatttagcgccctcaaatagalcctgttcagggaaccggatcaaaagattctccggccgtggaactaac
aaggcaacgctatgttctcttgccttttgcagcaagatagccagatcaatgtcgtatctgtgtgtgctcgaagatactctgcaagaatgtacttggcgtgccattctccaaattg
cagttcgcgcttagctgataacgccacgggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatgtgtgacttctacagcgcggaatctcgtctctccagggggaagccgaagttcca
aaaggtcgttgatcaaaagctcggcggtgtttcatcaagcccttaccgttcaccgtaaccagcaaatcaataatcaactgtgtggttccagggccgcatccactgcggagccgt
acaaatgtacggcgagcaacgtcggctcgagatggcgctcgtgacgccaacctacctctgatagttgagtcgatacttcggcgatcacgccttccctcatgatgttlaacttt
gttttagggcgactgcctgtctgctaactcgttctgtctccataacatcaaacatcgaccacggcggtlaacgcgcttgcgtcttgatgccggagcgatagactgtacc
ccaaaaaacagtcataacaagccatgaaaaacgccactgcggcggttaccaccgctgcgttcgggtcaaggttcttgaccaggttgcgtgagcgcatagctacttgcatta
cagcttacgaaccgaacagcgtttatgtccacttgcgggttcgtgtcccttaccggtttccacgggtgtcgtcaccggcaacccttggcgagcagcgaagtcgagcgacttctgtc
ctggctggcggaacggcgcaaggttctggtctccacgcatcgtgcagccagtcggcgcgcttcttcttccacggcaaggttctgtgcacgcatctcccttgcgttcagg
agatcgggaagacctcggcgctcggcgcttccggcggtgtgctgcaccggatgaagtgtgttcgactctcggttlttgggaagcgagcatcgtttgttccgccacgtt
ctgtatggaacggcgatcggcgatcagtgagggttgcgaactcggcggtcaaggtatctgatttgcatacggcacgatactgtcgggagggcgaagggctccaaggat
cggcgcttgaattaccggagagcttgcacccagccctgcgcgagcaggggaataatctccacgggttttctgcccgcacacggcgcttcttgggttctgtagttgt
atcagaatcgcagatccgggttcagccgggttgcggcggaagcgctatttctccagaattgccatgattttccccacgggagggcgctactgggtcccggttgcgg
cagcttgaatcgaalaagcagcatcgcctgttcaggctgtctatgtgtgactgttgagctglaacaaagtgtctcaggtgttcaatttcatgttctagttgttcttactgtt
caccgttctattaggtgttacctgtgttcatctgttacttgcgtatgttcatgttgaacagcttgaalgcaccaaaaacctglaaaagctctgatgtatctatcttllaca
cgttttcatctgtgtcatatggacagtttcccttcatatgtaacgttgaacaggttllctacttltgttltgttagtcttgatgttctactgtatagatacaagccataagaacctc
agatccttccgtatttagccagtatgttctctagtgtgtgttctgttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcalacttacttgcattgcactcaaaaatttgcctc
aaaactgggtgagctgaatttttgcagttaaagcatcgtgtagtgttttctttagtccgttatgtaggtaggaatctgatlaatgtgtgtgtatttgttccacttcaatttlatctg
gttgttctcaagttcgggttacgagatcatttctctatctagtccaacttggaaaatcaacgtatcagtcggcgggccctcgttataccaccaatttcatattgtctgaagtgtt
taaatllacttattgttllcaaaacccattgttlaagcccttlaaaactcaaggtagtatttcaagcatlaacatgaactlaaaltcaacgaagctaattctctatatttgccttgtga
gttllcttltgtttagttcttllaalaaacacatcaaaaactcctatagagtatttgttllcaaaagacttlaacatgttccagattatatttlaagatttllaaacttgaaaagataagg
caatatctcttcaaaaaactaaattcaatttttgcgttgagaacttggcatagttgtcacttggaataatctcaaaagcctttaaaccnaaggattcctgatttccacagttctgtc
atcagctctctgtgtgtttagctaataacacataaagcatttccctactgatgttcatcatctgagcggtattgggttalaagtgaacgataaccgtccgttcttctttaggggttllc
aatcgtgggggtttagtagtgcacacagcatalaaatlagcttgggttcatgtccggtlaagcatagcgactaaatcgtctagttcatttgccttggaaaacaactaatcagacata
catctcaattgggtctaggtgattttaatcactataccaattgagatgggctagtcgaatgataattactagtccttttcccttggattgtgggtatctgtaaatctgctagaccttgc
tggaaaacttgtaaattctgctagaccttctgtaaatccgctagaccttgtgtgttttttgttataatccaagtgttlaaatttatagaataaaagaaaataaaaaagataaa
aaagaatagatccagccctgtgtataaactcactactttagtcagttccgcagatllacaaaaggaatgtcgcacacgctgttltgctctctacaaaacagacctlaaaaccc
aaaggctlaagtagcaccctcgaagctcgggcacaaatcgtgaatallccttltgtctccgaccatcaggcacctgagtcgctgtcttlltctgtgacallcagtlcgtcgtc
cacggctctggcagtggaatgggggttaaatggcactacaggcgcccttattggaatcatgcgaaggaaactaccataaatacaaaaaagcccgctacgggctctcagggg
cgtttatggcggggtctgtatgtgtgtctatctgacttlltctgttcttcagcagttcctgcctctgatttccagcttgcaccacttcgattatcccgtagacggctcattcagact
cgctaagtcacccagtaaggcggcggtatcatcaacggctta

10

20

30

40

50

【 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 】

ccccgcttctactgctcgggaattcgcgtttggccgattcatlaattgcagattctgaaatgagctgttgacaattaatcaccggctcgtataaagtgttggaattgtgagcggataac
aatftcacacaggaacacgcgccgctgagaaaaagcgaaaggcgactgctcttacaalltatcagacaattctgtgtgggcacacgaccgggaattatcgaftaactttattat
taaaaattaaagggtatataatgaltcgaftaataaaggaggaaataaaccaagaagaagtgtgtatgallgatgcggctcgcacaccalltgggaaalacagaggla
gtcttagtctctttacagcgggtggagctggggacacttggctacgaaaaggcgtctggataaaacaagaactlaagaaagacaagalagaccgaagtgalattcggcaatgtg
cttcaggcaggaanaacggacaaaacgttgcaagacaatatgccctgaacagtgtccttaccagttgacgtgccggcgatgactattaacgaagtgtccgggtccgggaatga
aagcgggtgattttagcccgccagttlaatacagttlaaggggagcgagagtttggctacgtcaggggttacggatcaalgtcacaaagcacccatgctgaaaccttaccagtc
gagaccaacgaatcggagagccgatatcatcaatggttaatgacgggctgacggatgctgtttccaalgtcaccatgtgggtcttactgccgaaaagggtgcgaccagtt
ttcagtgctcggcgagggaacaagaccgggtacgcallgtccagccaattgaaaagcagcgcacgcgggttgaagccgggggtgttctcagaagagattatccggttaagatt
agcgacgaggatgcttgaagtgaagacgagggcagtaagaggccaacagcactitgaaaaactcggcaccttgcggacgggtgtttctgaaggggcacggttaccgct
ggcaalgtcttaccgcgtgaatcagggcgctagtgctgtgallcttgcataaaaagaafacgcgggaataacataatctgcccttacctggcgacgaataaaggaggttgcgga
agttggtatcgtatcccttcatcaggtgttggcccaataaaggccalltcaaaaagttaacagatcgtcggcgtalgaacctgtccacgattgaltgttgaattaatgaag
caltcggcgcatctagcattgtgtttctcaaggctgaacttggacgaagaagaaaaagtgaatatctatgcggggcgatagcttttagcccatcgaatcggcgcaaggga
cccgcgatactgacaacctttagcatacgcgcctctgcgtgagcaaaagctttatggtatttgcgtcattatgtatcggcggttggtctgtcgtccgtcgtctgttagaagcta

【 0 4 3 8 】

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 】

[illegible]

10

20

30

40

【 0 4 4 1 】

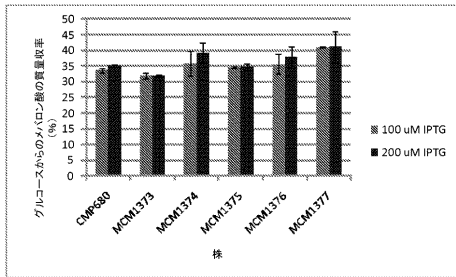
(上配列表の続き)

glatgacgggctgatactgggcccggcagggcgcctcattgcccagtcggcagcgacatccctggcgcgatttggcggtfactgcgctgtaccaaatgggggacaacgt
 aagcaactacatttcgctcagcggcagccagtcggcgggcgagttccatagcggttaagggttcatttagcgccccaatagatccctgctcaggaaccggatcaaaagagttc
 ctccggcgctggacctaccaaggaacgctatgttctcttgcctttgtcagcaagatagccagatcaatgtcgategtggctggctcgaagatccctgaagaatgtcattg
 cgctgccatttccaaattgcagttcggcgttagctggataacgccacggaaigtatgtcgtcgtgcacaacaatggtagctttacagcggcgagaatcgcctctctcca
 ggggaagccgaagttccaaaaggcgttgatcaaaagcgcggcggttggllcalcaagccttacgggtcaccgtlaaccagcaaatcaatcactgtgtggttccagggccg
 ccacccactggcgagccgtacaaatgtacggccagcaacgtcgggttcgagatggcgctcgtatgacccaactacccctgtagatgtgagtcgatacttggcgatcaccg
 ctccctcatgatgttaacttggtttagggcgacgtccctgctgctgaacatcgttgcctcctacataacataaacatcgaccacggcgtaacgcgcttgccttggatg
 cccgagggcatagactgtaccccaaaaaaacagtcataaacaagccatgaaaaccgccactgcgccgttaaccaccgctgcgttcggtaagggttctggaccagttgcgtga
 gcgcatacgtacttgcattacagcttacgaaccgaacaggttatgtcactgggttcgtgccttccatccgtttccacgggtgcgtcaccggcnaaccttggcgagcag
 cgaagtcgagggcatttctgcttggctggcgaaacgagcgcaagggttccgctccacgcatcgtcagggcattggcgcccttgcgttctctacggcnaaccttggcgagcag
 ggatcgtccctggcttcaggagatcggaagacctcgccgctcgcggcgcttgcgggtggtgctgaccccgatgaagtgggttcgcatccctcggtttctggaaggcgag
 catcgtttgttcgccagcttctgtatggaaacggcgatcgaggttgcgtccacgcatcgtcagggcattggcgcccttgcgttctctacggcnaaccttggcgagcag
 ggcaaggggctccaaagatcgggccttctgtatccggagagcttggcaccagcctgcggagcaggggaattaatccacgggttttgcgtcccgcaaacggggct
 gttctgtgtgttagttgttatcagaatcgagatccggcttcagccgggttgcggctgaaacgctatttctccagaattgccatgatttttccccacgggagcgctca
 ctggctccgtgtgtcggcagcttggatcgtatgaagcagcatcgctgttcagcgctgtatgtgtgactgttgcgtgttaacaagttgtctcagggtgtcaatttcatgttcta
 gttgctttgtttactgtttcactgttctattaggtgttactatgtgttcatctgtttacattgtcgtatgttcatgttgtaacagcttgaatgcacaaaaactcgtaaaagctct
 gatgtatctatctttttacaccgtttcactgtgtcatatggacagtttcccttggatgttaacgggtgaacagttgttctacttttggtttagtcttgccttactgatagatac
 aagagccataagaacctcagatccctccgtatttagccagtatgttctctagtgtgttcgttgggttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcacttacttgcaltg
 tcaactaaaaatttgcctcaaaactgtgagctgaattttgcagttaaagcaltggttaggttttcttagtcggttatgtaggttagaatctgatgtaatgtgttgggtatitt
 gtcaccattcattttatctgtgtgttctcaagttcgggtacgagatcatttctctatctgttcaacttggaaatcaacgtatcagtcggcgccctcgttataccacca
 ttcatattgcgtgaagtgttaafcttacttattgtttcaaaaccattggttaagccctttaaactcaggtatgtattttcaagcalttaacatgaacttaattcacaaggcta
 atctctatatttgccttgtgagtttcttgggttaggttctttaaataaccactcataaactcctatagagtatttcttcaaaagacttaacatgttccagattatattatgaattttt
 aactggaaaagataaggcaatatctcttcaactaaaaactaattcatttttgcgttgaagacttggcatagtttgcactggaaaatctcaagcctttaaaccaaaggattcct
 gatttccacagttctcgtcatcagctctctgtgttgcctttagctaatataccataagcattttccctactgatgttccatctctgagcgatttgggttaagtgaacgataccgctcg
 ttcttccctgtagggttttcaatcgtgggtgtgagtagtgcacacagcataaaatagcttgggttcagctccggttaagtcataggcactaacgcgtatgatttgccttga
 aacaactaattcagacatacatctcaattgtgttaggtgattttaaactatccaattgagatggcgtagtcattgataattactagcttcttctttaggttgtgggtatctgt
 aaattctgctagaccttggctggaacttgttaattctgctagacctctgtaattccgctagaccttgggtgttttttggttatattcaagtggttataattatagaataaag
 aaagaataaaaaaagataaaaaagaatagatccagccctgtgtataactcactacatttagtcagttccgagatattacaaaaggatgtcgaacacgtgttgcctctaca
 aaacagaccttaaaaccclaaaggcttaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaacgcgtgaatattcccttgcctccgaccatcaggaacctgagtcgtcttcttctgt
 gacattcagttcgtcgtcgcacggctcgtgcaatgaatgggggttaaatggcactacagggccttttatggattcatgcaaggaaactaccataatacaagaaaagcc
 cgtcagggccttctcagggcggtttatggcggtctgtatgtgtgtctatctgacttttgcgttcagcagttcctgccctctgatttccagctgtaccacttccgattatccc
 gtgacaggtcattcagactggcctaattgacccagtaaggcagcggtatcacaacagcgcta

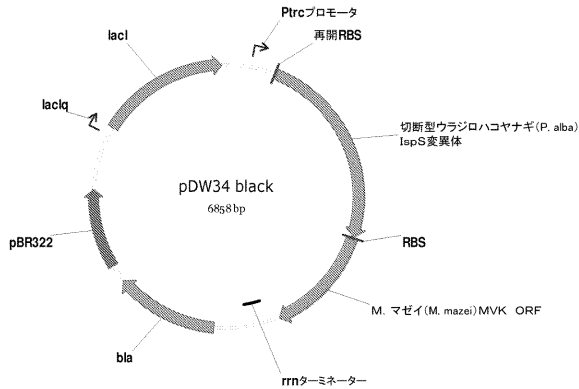
10

20

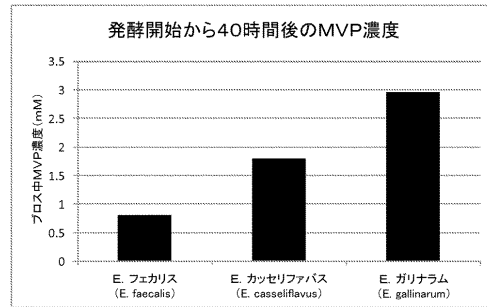
【図 1】



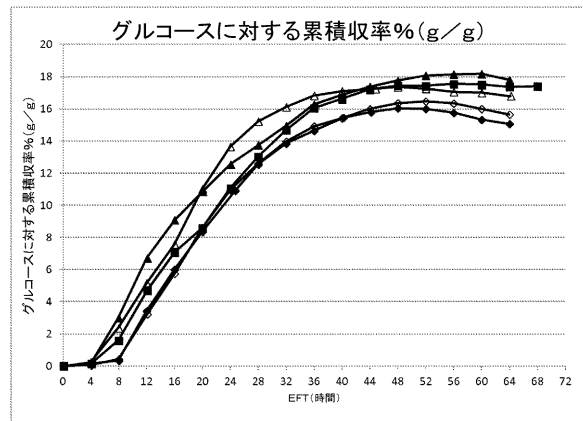
【図 2】



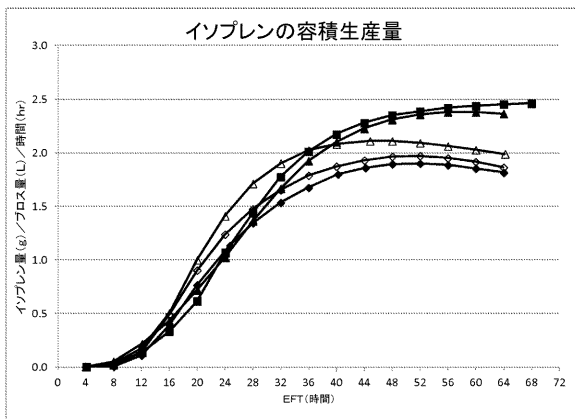
【図 3】



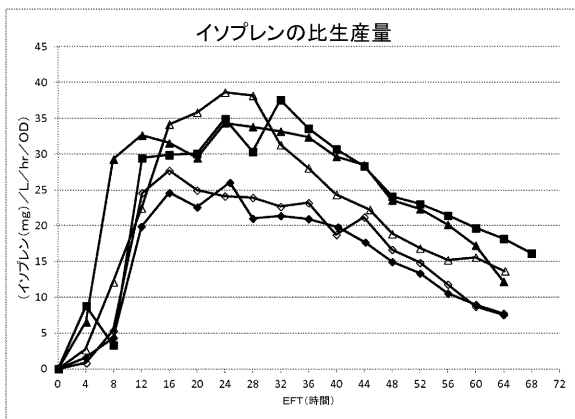
【図 4】



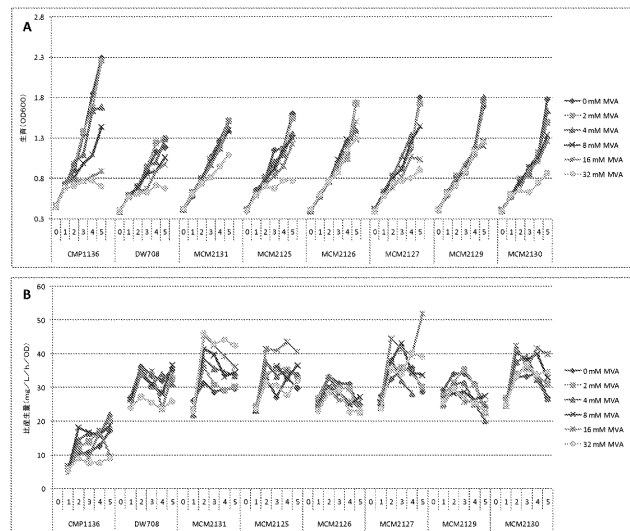
【図 5】



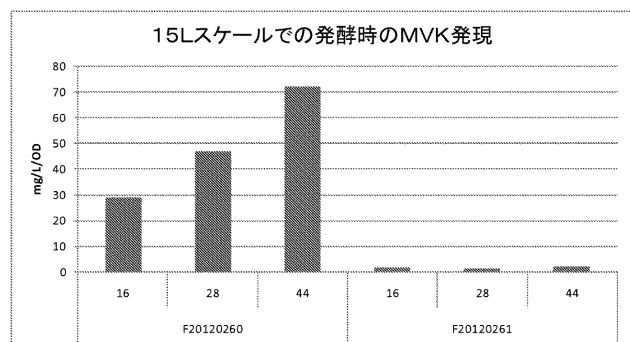
【図 6】



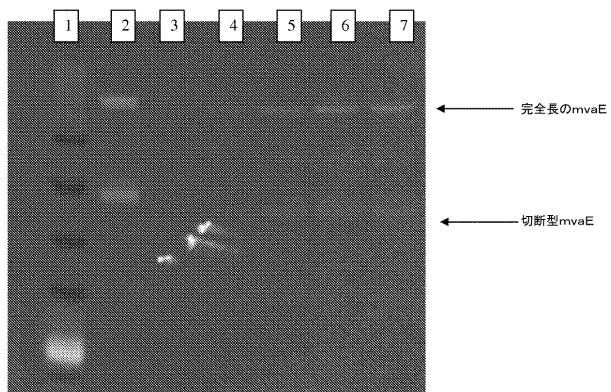
【図 7】



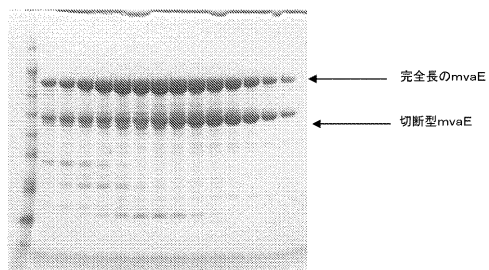
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

2014519811000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/035655

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N1/21 C12N9/00 C12N9/10 C12P5/00 C12P7/02 C12P7/04 C12P7/42 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) 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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
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 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 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]; RENNINGER 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 Escherichia coli", 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 Escherichia coli", 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 2003234790 A1 11-11-2003 EP 1510583 A1 02-03-2005 US 2005287655 A1 29-12-2005 WO 03095651 A1 20-11-2003
WO 0078935	A1	28-12-2000	NONE
WO 2009076676	A2	18-06-2009	AU 2008334945 A1 18-06-2009 BR P10823506 A2 10-07-2012 CA 2709107 A1 18-06-2009 CN 102027124 A 20-04-2011 EP 2235190 A2 06-10-2010 JP 2011505841 A 03-03-2011 KR 20100118973 A 08-11-2010 RU 2010128902 A 20-01-2012 US 2009203102 A1 13-08-2009 WO 2009076676 A2 18-06-2009
WO 2007140339	A2	06-12-2007	AU 2007267033 A1 06-12-2007 CA 2651747 A1 06-12-2007 EP 2024504 A2 18-02-2009 JP 2009538601 A 12-11-2009 KR 20090013814 A 05-02-2009 KR 20120053088 A 24-05-2012 SG 172646 A1 28-07-2011 SV 2008003104 A 02-12-2009 US 2008274523 A1 06-11-2008 US 2011287476 A1 24-11-2011 WO 2007140339 A2 06-12-2007
WO 2010031077	A1	18-03-2010	CA 2737082 A1 18-03-2010 EP 2337845 A1 29-06-2011 US 2010184178 A1 22-07-2010 WO 2010031077 A1 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, 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 9 4 3 0 4 - 1 0 1 3、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5

(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 9 4 3 0 4 - 1 0 1 3、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5

(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 9 4 3 0 4 - 1 0 1 3、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5

(72)発明者 ブライマーク、ユリヤ・エー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4 - 1 0 1 3、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5

(72)発明者 ブッチ、ジェフ・ピー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4 - 1 0 1 3、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5

(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 9 4 3 0 4 - 1 0 1 3、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5

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