

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6530375号
(P6530375)

(45) 発行日 令和1年6月12日 (2019.6.12)

(24) 登録日 令和1年5月24日 (2019.5.24)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15 Z N A
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 9/88 (2006.01)	C 1 2 N 9/88
C 1 2 N 15/60 (2006.01)	C 1 2 N 15/60

請求項の数 26 (全 311 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-507665 (P2016-507665)	(73) 特許権者	509240479
(86) (22) 出願日	平成26年4月10日 (2014.4.10)		ダニスコ・ユーエス・インク
(65) 公表番号	特表2016-519577 (P2016-519577A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94
(43) 公表日	平成28年7月7日 (2016.7.7)		304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/033688	(73) 特許権者	513158760
(87) 国際公開番号	W02014/169144		ザ・グッドイヤー・タイヤ・アンド・ラバー・カンパニー
(87) 国際公開日	平成26年10月16日 (2014.10.16)		アメリカ合衆国、オハイオ州 44316
審査請求日	平成29年4月10日 (2017.4.10)		、アクロン イノベーション・ウェイ 200
(31) 優先権主張番号	61/834,359	(74) 代理人	100071010
(32) 優先日	平成25年6月12日 (2013.6.12)		弁理士 山崎 行造
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118647
(31) 優先権主張番号	61/810,696		弁理士 赤松 利昭
(32) 優先日	平成25年4月10日 (2013.4.10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アセチル補酵素 A 由来代謝産物、イソブレン、イソブレンノイド前駆体、およびイソブレンノイドの改善された生産のためのホスホケトラゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、前記組換え細胞が、(i) ホスホケトラゼ活性を有して配列番号 8 と少なくとも 85% の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および (ii) 完全 MVA 経路の 1 つまたは複数のポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の核酸を含んでなり、前記組換え細胞が、(a) グルコース上の細胞増殖、(b) キシロース上の細胞増殖、(c) 細胞内アセチルリン酸の産生、または (d) グルコースー 6 ーリン酸上の細胞増殖のパラメータの 1 つまたは複数で、1.0 を超える性能指標値を有し、前記性能指標値は、E. ガリナラム (E. gallinarum) からのホスホケトラゼ (配列番号 93) を発現する対応する細胞に対する単位活性として計算される、組換え細胞。

【請求項 2】

ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、前記組換え細胞が、(i) ホスホケトラゼ活性を有して配列番号 8 と少なくとも 85% の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および (ii) 完全 MVA 経路の 1 つまたは複数のポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホケトラゼ活性を有する前記ポリペプチドが、(a) タンパク質溶解度、(b) タンパク質発現、または (c) フルクトースー 6 ーリン酸 (F6P) 比活性のパラメータの 1 つまたは複数で、1.0 を超える性能指標値を有し、前記性能指標値は、E. ガリナラム (E. gallinarum) からのホスホケトラゼ (配列番号 93) に対す

10

20

る単位活性として計算される、組換え細胞。

【請求項3】

前記ポリペプチドが、配列番号23と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる、請求項1又は2に記載の組換え細胞。

【請求項4】

ホスホクエクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、前記組換え細胞が、(i) ホスホクエクトラーゼ活性を有して配列番号11と少なくとも85%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、前記組換え細胞が、(a) グルコース上の細胞増殖、(b) キシロース上の細胞増殖、(c) 細胞内アセチルリン酸の産生、または(d) グルコース-6-リン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有し、前記性能指標値は、E. ガリナラム(E. gallinarum)からのホスホクエクトラーゼ(配列番号93)を発現する対応する細胞に対する単位活性として計算される、組換え細胞。

10

【請求項5】

ホスホクエクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、前記組換え細胞が、(i) ホスホクエクトラーゼ活性を有して配列番号11と少なくとも85%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホクエクトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドが、(a) タンパク質溶解度、(b) タンパク質発現、または(c) フルクトース-6-リン酸(F6P)比活性のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有し、前記性能指標値は、E. ガリナラム(E. gallinarum)からのホスホクエクトラーゼ(配列番号93)に対する単位活性として計算される、組換え細胞。

20

【請求項6】

前記ポリペプチドが、配列番号32、又は配列番号34と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる、請求項4又は5に記載の組換え細胞。

【請求項7】

前記組換え細胞を適切な培地中で培養するステップが、エリスロース-4-リン酸の細胞内量、グリセルアルデヒド-3-リン酸の細胞内量、またはリン酸の細胞内量の1つまたは複数を増大させる、請求項1~6のいずれか一項に記載の組換え細胞。

30

【請求項8】

ホスホクエクトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドが、(a) キシルロース-5-リン酸からグリセルアルデヒド-3-リン酸およびアセチルリン酸を合成できる、または(b) フルクトース-6-リン酸からエリスロース-4-リン酸およびアセチルリン酸を合成できる、請求項1~7のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項9】

完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドが、(a) 2分子のアセチルCoAを縮合してアセトアセチルCoAを形成する酵素；(b) アセトアセチルCoAとアセチルCoAを縮合してHMG-CoAを形成する酵素(例えばHMGシンターゼ)；(c) HMG-CoAをメバロン酸に変換する酵素；(d) メバロン酸をメバロン酸5-リン酸にリン酸化する酵素；(e) メバロン酸5-リン酸をメバロン酸5-ピロリン酸に変換する酵素；および(f) メバロン酸5-ピロリン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する酵素から選択される、請求項1~8のいずれか一項に記載の組換え細胞。

40

【請求項10】

イソプレンを産生できる組換え細胞であって、請求項1~6のいずれか一項に記載の組換え細胞が、イソプレシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸をさらに含んでなり、適切な培地中の前記組換え細胞の培養が、(a) イソペン率または(b) イソペン比生産性のパラメータの1つまたは複数で1.0を超える性能指標値である、イソプレンの生産を提供する、組換え細胞。

50

【請求項 1 1】

前記イソプレニンシンターゼポリペプチドが、クズ属 (*Pueraria*) またはポプラ属 (*Populus*) または雑種ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) × ヤマナラシ (*Populus tremula*) からのポリペプチドである、請求項 1 0 に記載の組換え細胞。

【請求項 1 2】

前記組換え細胞が、1 つまたは複数の 1-デオキシ-D-キシルロース-5-リン酸 (DXP) 経路ポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の核酸をさらに含んでなる、請求項 9 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項 1 3】

10

イソプレノイド前駆体を産生できる組換え細胞であって、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組換え細胞が適切な培地中で培養されて、前記イソプレノイド前駆体を産生する、組換え細胞。

【請求項 1 4】

イソプレノイドを産生できる組換え細胞であって、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組換え細胞が、ピロリン酸ポリプレニルシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸をさらに含んでなり、適切な培地中の組換え細胞の培養がイソプレノイドの生産を提供する、組換え細胞。

【請求項 1 5】

アセチル CoA 由来代謝産物を産生できる組換え細胞であって、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組換え細胞を適切な培地中で培養するステップが、アセチル CoA 由来代謝産物の生産を提供する、組換え細胞。

20

【請求項 1 6】

核酸が、誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターの下に置かれ、および、任意に、(i) 1 つまたは複数のマルチコピープラスミドにクローン化され、または (ii) 細胞染色体に組み込まれる、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項 1 7】

前記組換え細胞が、グラム陽性細菌細胞、グラム陰性細菌細胞、真菌細胞、糸状菌細胞、藻類細胞または酵母細胞である、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

30

【請求項 1 8】

前記組換え細胞が、コリネバクテリウム属 (*Corynebacteria*)、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、ストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*)、ストレプトミセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*)、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、およびヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) からなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

40

【請求項 1 9】

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、セキテルペン (sekiterpene)、およびポリテルペンからなる群から選択される、請求項 1 4 に記載の組換え細胞。

【請求項 2 0】

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、 β -ピネン、サビ

50

ネン、 γ -テルピネン、テルピンデン、およびバレンセンからなる群から選択される、請求項 14 に記載の組換え細胞。

【請求項 21】

前記アセチル CoA 由来代謝産物が、ポリケチド、ポリヒドロキシ酪酸、脂肪アルコール、および脂肪酸からなる群から選択される、請求項 15 に記載の組換え細胞。

【請求項 22】

前記アセチル CoA 由来代謝産物が、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、アスパラギン、プロリン、アルギニン、メチオニン、スレオニン、システイン、コハク酸、リジン、ロイシン、アセトン、イソプロパノール、イソブテン、プロペン、およびイソロイシンからなる群から選択される、請求項 15 に記載の組換え細胞。

10

【請求項 23】

(a) 請求項 10 に記載の組換え細胞をイソプレンを生産するのに適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレンを生産するステップとを含んでなる、イソプレンを生産する方法。

【請求項 24】

(a) 請求項 13 に記載の組換え細胞をイソプレノイド前駆体を生産するのに適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレノイド前駆体を生産するステップとを含んでなる、イソプレノイド前駆体を生産する方法。

【請求項 25】

(a) 請求項 14 に記載の組換え細胞をイソプレノイドを生産するのに適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレノイドを生産するステップとを含んでなる、イソプレノイドを生産する方法。

20

【請求項 26】

(a) 請求項 15 に記載の組換え細胞をアセチル CoA 由来代謝産物を生産するのに適した条件下で培養するステップと、(b) アセチル CoA 由来代謝産物を生産するステップとを含んでなる、アセチル CoA 由来代謝産物を生産する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

30

本出願は、そのそれぞれの開示の内容全体を参照によって本明細書に援用する、2013 年 4 月 10 日に提出された米国仮特許出願第 61/810,696 号明細書、および 2013 年 6 月 12 日に提出された米国仮特許出願第 61/834,359 号明細書の優先権を主張する。

【0002】

本発明は、アセチル補酵素 A 由来代謝産物の生産増大能力がある、異種ホスホクセラゼ (PKL) ポリペプチドを含んでなる培養された組換え細胞、ならびに同細胞を作成して使用する方法に関する。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、イソプレノイド前駆体、イソプレン、およびイソプレノイドの生産のための、1 つまたは複数のメバロン酸 (MVA) 経路ポリペプチドをさらに含んでなる。

40

【背景技術】

【0003】

解糖は、炭素源が、ポリケチド、脂肪酸、アミノ酸、ビタミン、イソプレン、イソプレノイド、フェノール類、およびアルカロイドをはじめとする必須生物学的化合物の合成における重要な中間体である、アセチル補酵素 A (アセチル CoA) などの中間体化合物に、代謝的に変換されるようにする。これらのアセチル CoA 由来代謝産物のいくつかは、工業的有用性を有する。例えば、イソプレン (2-メチル-1,3-ブタジエン) は、多様な合成ポリマーの、中でも注目すべきことには合成ゴムの、重要な出発原料である。イソプレンは、石油分画によって得られ得る；しかしこの素材の精製は、費用がかさみ時間がかかる。炭化水素の C5 ストリームの石油分解からは、約 15% のイソプレンのみが製

50

造される。年間およそ800,000トンのシスポリイソプレンが、イソプレンの重合から製造される；このポリイソプレンの大部分は、タイヤおよびゴム産業で利用される。イソプレンはまた、履物、機械製品、医療用品、スポーツ用品、およびラテックスなどの他の製品中で、合成エラストマーとして使用するために、共重合される。イソプレンはまた、多様な微生物、植物、および動物種によって、自然に生産され得る。特に、メバロン酸（MVA）経路および非メバロン酸（DXP）経路の2つの経路が、イソプレンの天然生成について同定されている。

【0004】

イソプレノイドもまた、工業的有用性を実証するアセチルCoA誘導代謝産物である。例えば、イソプレノイドは、医薬品中で、そしてバイオ燃料、食品添加剤、およびその他の特殊化学薬品として使用される。29,000種を超えるイソプレノイド化合物が同定されており、新しいイソプレノイドが毎年発見されている。イソプレノイドは、イソプレノイドの比較的複雑な構造を形成するための基本的構成単位としてイソプレノイド前駆体分子を使用する、微生物および植物種などの天然物から単離し得る。イソプレノイドは、ほとんどの生きている生物および細胞に不可欠であり、細胞膜流動性および電子伝達を維持する手段を提供する。自然界では、イソプレノイドは、植物中の天然殺虫剤としての多様な役割において機能し、シナモン、クローブ、およびショウガに付随する香りを与える。さらに、製薬業界および化学産業界は、医薬品、栄養補給食品、着香剤、および農業害虫防除剤として、イソプレノイドを利用する。生物学的システムにおけるそれらの重要性和、広範な用途における有用性を考慮して、イソプレノイドは、科学者によって注視され続けてきた。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、およびイソプレノイドの生産における最近の進歩は、しっかりした商業的工程の要求を満たすのに十分であり得る、速度、力価、および純度で、イソプレンおよびイソプレノイドを生産する方法を開示する（例えば、国際公開第2009/076676A2号パンフレット、および米国特許第7,915,026号明細書を参照されたい）；しかし同物質の生産量および収率を改善する交互の（*alternate*）経路が、依然として必要とされる。

【0006】

例えば、理論的には、アセチルCoAの3つの分子は、可逆反応中の単一グルコース分子に由来し得る。しかし生物は、典型的に、最大2分子のアセチルCoAのみを産生し、残りの質量はCO₂として失われる。CO₂の放出は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼによって触媒される反応である、ピルビン酸からのアセチルCoA形成中に起こる。1つの炭素原子の損失は、アセチルCoA由来代謝産物、イソプレノイド前駆体、イソプレン、およびイソプレノイド分子の生産収率の低下につながる。この反応損失の例外は、一酸化炭素デヒドロゲナーゼおよびアセチルCoAシンターゼ酵素に依存して、嫌気的アセトゲン中で二酸化炭素をアセチルCoAに還元する、Wood-Ljungdahl経路である。

【0007】

したがって必要なのは、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、およびイソプレノイドの生産において、Wood-Ljungdahl経路酵素に依存しない経路を利用して、1分子のグルコースから3分子のアセチルCoAを潜在的に生成し得る、交互の（*alternate*）代謝過程を利用する、組換え細胞である。

【0008】

本明細書に記載される本発明はこれらの問題に対処して、追加的な利点もまた提供する。

【0009】

本明細書全体を通じて、様々な特許、特許出願およびその他の各種文献（例えば学術誌

10

20

30

40

50

論文)に言及する。本明細書で引用される全ての特許、特許出願、および文献の開示は、あらゆる目的のために、その内容全体を参照によって本明細書に援用する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本明細書で提供される本発明は、培養組換え細胞；これらの細胞の組成物；およびこれらの細胞を使用して、エリスロースー４ーリン酸（E4P）、グリセルアルデヒドー３ーリン酸（GAP）、およびアセチルリン酸（AcP）などの代謝中間体の生産を増大させ、ならびにイソプレノイド前駆体、イソプレン、イソプレノイド、および／またはアミノ酸などのアセチルCoA由来分子の生産を増大させる方法を特に開示する。

【0011】

したがって、一態様では、本明細書で提供されるのは、ホスホケトラーゼ経路を通る炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞は、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは、配列番号1と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0012】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号2と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0013】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号3と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0014】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号4と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0015】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号5と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0016】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号6と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0017】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号7と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0018】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号8と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0019】

10

20

30

40

50

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号9と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0020】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号10と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0021】

10

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0022】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号12と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0023】

20

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号13と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0024】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号14と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0025】

30

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号15と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0026】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号16と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0027】

40

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号17と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0028】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号18と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0029】

50

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号19と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0030】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号20と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0031】

10

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号21と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0032】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号22と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0033】

20

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号23と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0034】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号24と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0035】

30

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号25と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0036】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号26と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0037】

40

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号27と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0038】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号28と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0039】

50

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号29と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0040】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号30と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0041】

10

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号31と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0042】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号32と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0043】

20

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号33と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0044】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号34と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0045】

30

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号35と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0046】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号36と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0047】

40

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号37と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0048】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号38と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0049】

50

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号39と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0050】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号40と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0051】

10

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号41と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0052】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号42と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0053】

20

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号43と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0054】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号44と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0055】

30

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号45と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0056】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号46と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0057】

40

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号47と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0058】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号48と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0059】

50

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号49と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0060】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号50と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0061】

別の態様では、本明細書で提供されるのはホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞はホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは配列番号51と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。

【0062】

いくつかの態様では、上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかでは、適切な培地中の組換え細胞の培養は、エリスロースー4ーリン酸の細胞内量、グリセルアルデヒドー3ーリン酸の細胞内量、またはリン酸の細胞内量の1つまたは複数を増大させる。その他の態様では、上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかでは、ホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドは、キシロースー5ーリン酸から、グリセルアルデヒドー3ーリン酸およびアセチルリン酸を合成できる。その他の態様では、上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかでは、ホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドは、フルクトースー6ーリン酸から、エリスロースー4ーリン酸およびアセチルリン酸を合成できる。

【0063】

その他の態様では、本明細書で提供されるのは、イソプレンを産生できる、上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかで開示される組換え細胞であって、組換え細胞は、(i) 完全MV A経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(ii) イソプレンシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸をさらに含んでなり、適切な培地中の組換え細胞の培養は、イソプレンの生産を提供する。上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかで開示される細胞の別の態様では、完全MV A経路の1つまたは複数のポリペプチドは、(a) 2分子のアセチルCoAを縮合してアセトアセチルCoAを形成する酵素；(b) アセトアセチルCoAとアセチルCoAを縮合してHMG-CoAを形成する酵素（例えば、HMGシンターゼ）；(c) HMG-CoAをメバロン酸に変換する酵素；(d) メバロン酸をメバロン酸5ーリン酸にリン酸化する酵素；(e) メバロン酸5ーリン酸をメバロン酸5ーピロリン酸に変換する酵素；および(f) メバロン酸5ーピロリン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する酵素から選択される。上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかで開示される細胞の別の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、植物イソプレンシンターゼポリペプチドである。上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかで開示される細胞の別の態様では、植物イソプレンシンターゼポリペプチドは、クズ属(*Pueraria*)またはポプラ属(*Populus*)または雑種ウラジロハコヤナギ(*Populus alba*)×ヤマナラシ(*Populus tremula*)からのポリペプチドである。上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかで開示される細胞の別の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドは、プエラリア・モンタナ(*Pueraria montana*)またはプエラリア・ロバタ(*Pueraria lobata*)、ポプルス・トレムロイデス(*Populus tremuloides*)、ウラジロハコヤナギ(*Populus alba*)、セイヨウハコヤナギ(*Populus nigra*)、およびコットンウッド(*Populus trichocarpa*)からなる群から選択される。上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかで開示

10

20

30

40

50

される細胞の別の態様では、組換え細胞は、1-デオキシ-D-キシロース-5-リン酸（DXP）経路ポリペプチドの1つまたは複数をコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる。

【0064】

その他の態様では、本明細書で提供されるのは、イソプレノイド前駆体を産生できる、上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかで開示される組換え細胞であって、組換え細胞は、完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり、適切な培地中の組換え細胞の培養は、イソプレノイド前駆体の生産を提供する。

【0065】

その他の態様では、本明細書で提供されるのは、イソプレノイドを産生できる、上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかで開示される組換え細胞であって、組換え細胞は、(i) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(ii) 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する異種核酸をさらに含んでなり、適切な培地中の組換え細胞の培養は、イソプレノイドの生産を提供する。

【0066】

その他の態様では、本明細書で提供されるのは、アセチルCoA由来代謝産物を産生できる組換え細胞であって、適切な培地中の上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかで開示される組換え細胞の培養は、アセチルCoA由来代謝産物の生産を提供する。

【0067】

いくつかの態様では、上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかでは、核酸は、誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターの下に置かれる。上記のおよび／または本明細書のいずれかの実施形態のその他の態様では、核酸は、1つまたは複数のマルチコピープラスミドにクローン化される。上記のおよび／または本明細書のいずれかの実施形態のその他の態様では、核酸は、細胞染色体に組み込まれる。

【0068】

上記のおよび／または本明細書のいずれかの実施形態のその他の態様では、組換え細胞は、グラム陽性細菌細胞、グラム陰性細菌細胞、真菌細胞、糸状菌細胞、藻類細胞または酵母細胞である。上記のおよび／または本明細書のいずれかの実施形態のその他の態様では、組換え細胞は、コリネバクテリウム属（*Corynebacteria*）種（例えば、*C. glutamicum*）、バチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）、ストレプトミセス・リビダンス（*Streptomyces lividans*）、ストレプトミセス・コエリカラー（*Streptomyces coelicolor*）、ストレプトミセス・グリセウス（*Streptomyces griseus*）、大腸菌（*Escherichia coli*）、パントエア・シトレア（*Pantoea citrea*）、トリコデルマ・リーゼイ（*Trichoderma reesei*）、アスペルギルス・オリゼ（*Aspergillus oryzae*）およびアスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、およびヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）からなる群から選択される。

【0069】

上記のおよび／または本明細書のいずれかの実施形態のその他の態様では、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、セキテルペン（*sekiterpene*）、およびポリテルペンからなる群から選択される。上記のおよび／または本明細書のいずれかの実施形態のその他の態様では、イソプレノイドは、セスキテルペンである。上記のおよび／または本明細書のいずれかの実施形態のその他の態様では、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、 α -ファメセン

10

20

30

40

50

、 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、 β -ピネン、サビネン、 γ -テルピネン、テルピンデン、およびバレンセンからなる群から選択される。

【0070】

上記のおよび／または本明細書のいずれかの実施形態のその他の態様では、アセチルCoA由来代謝産物は、ポリケチド、ポリヒドロキシ酪酸、脂肪アルコール、および脂肪酸からなる群から選択される。上記のおよび／または本明細書のいずれかの実施形態のその他の態様では、アセチルCoA由来代謝産物は、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、アスパラギン、プロリン、アルギニン、メチオニン、スレオニン、システイン、コハク酸、リジン、ロイシン、およびイソロイシンからなる群から選択される。上記のおよ

10

【0071】

上記のおよび／または本明細書のいずれかの実施形態のその他の態様では、適切な培地は、炭素源を含んでなる。上記のおよび／または本明細書のいずれかの実施形態のその他の態様では、炭素源は、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、C6糖、C5糖、および転化糖からなる群から選択される炭水化物である。

【0072】

その他の態様では、本明細書で提供されるのは、(a) 上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかで開示される組換え細胞をイソプレンの生産に適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレンを生産するステップとを含んでなる、イソプレンを生産する方法である。

20

【0073】

その他の態様では、本明細書で提供されるのは、(a) 上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかで開示される組換え細胞をイソプレノイド前駆体の生産に適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレノイド前駆体を生産するステップとを含んでなる、イソプレノイド前駆体を生産する方法である。

【0074】

その他の態様では、本明細書で提供されるのは、(a) 上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかで開示される組換え細胞をイソプレノイドの生産に適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレノイドを生産するステップとを含んでなる、イソプレノイドを生産する方法である。

30

【0075】

その他の態様では、本明細書で提供されるのは、(a) 上記のおよび／または本明細書の実施形態のいずれかで開示される組換え細胞をアセチルCoA由来代謝産物の生産に適した条件下で培養するステップと、(b) アセチルCoA由来代謝産物を生産するステップとを含んでなる、アセチルCoA由来代謝産物を生産する方法である。

【0076】

その他の態様では、本明細書で提供されるのは、(a) ポリペプチドをコードする異種核酸を含んでなる、組換え細胞を培養するステップであって、グルコースまたはキシロースを炭素源とする培養条件下で、組換え細胞にトランスケトララーゼ活性 (tktAB) 欠陥があるステップと；(b) 組換え細胞の細胞増殖を評価するステップと、(c) 細胞増殖の存在に基づいて、前記ポリペプチドの生体内ホスホケトララーゼ活性を検出するステップとを含んでなる、ポリペプチドの生体内ホスホケトララーゼ活性を組換え細胞内で検出する方法である。

40

【0077】

その他の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示される、スクリーニングし、同定し、および／または検出する任意の方法によって作成される、ホスホケトララーゼ活性がある単離ポリペプチドである。

50

【0078】

その他の態様では、本明細書で提供されるのは、ホスホケトララーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞は、ホスホケトララーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは、配列番号8と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。その他の態様では、本明細書で提供されるのは、ホスホケトララーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトララーゼ活性を有して配列番号8と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホケトララーゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、(a) グルコース上の細胞増殖、(b) キシロース上の細胞増殖、(c) 細胞内アセチルリン酸の産生、または(d) グルコースー6ーリン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。その他の態様では、本明細書で提供されるのは、ホスホケトララーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトララーゼ活性を有して配列番号8と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホケトララーゼ活性を有する前記ポリペプチドは、(a) タンパク質溶解度、(b) タンパク質発現、または(c) フルクトースー6ーリン酸(F6P)比活性のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号23と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号24と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号25と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号27と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号28と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号29と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。

【0079】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、ホスホケトララーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞は、ホスホケトララーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、ポリペプチドは、配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる。別の態様では、本明細書で提供されるのは、ホスホケトララーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトララーゼ活性を有して配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホケトララーゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、(a) グルコース上の細胞増殖、(b) キシロース上の細胞増殖、(c) 細胞内アセチルリン酸の産生、または(d) グルコースー6ーリン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。別の態様では、本明細書で提供されるのは、ホスホケトララーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトララーゼ活性を有して配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んで

なるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および (i i) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホケトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドは、(a) タンパク質溶解度、(b) タンパク質発現、または(c) フルクトースー6ーリン酸(F6P) 比活性のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号32と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号33と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号34と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号35と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号36と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号37と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号38と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号39と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号40と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号41と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号42と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号43と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号44と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号45と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号46と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。

【0080】

上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、適切な培地中の組換え細胞の培養は、エリスロースー4ーリン酸の細胞内量、グリセルアルデヒドー3ーリン酸の細胞内量、またはアセチルリン酸の細胞内量の1つまたは複数を増大させる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドは、キシロースー5ーリン酸から、グリセルアルデヒドー3ーリン酸およびアセチルリン酸を合成できる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドは、フルクトースー6ーリン酸から、エリスロースー4ーリン酸およびアセチルリン酸を合成できる。

【0081】

上述のまたは本明細書の態様のいずれかの別の実施形態では、完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドは、(a) 2分子のアセチルCoAを縮合して、アセトアセチルCoAを形成する酵素；(b) アセトアセチルCoAとアセチルCoAを縮合して、HMG-CoAを形成する酵素（例えばHMGシンターゼ）；(c) HMG-CoAをメバロン酸に変換する酵素；(d) メバロン酸をメバロン酸5ーリン酸にリン酸化する酵素；(e) メバロン酸5ーリン酸をメバロン酸5ーピロリン酸に変換する酵素；および(f) メバロン酸5ーピロリン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する酵素から選択される。

【0082】

その他の態様では、本明細書で提供されるのは、イソプレンを産生できる組換え細胞であって、組換え細胞（本明細書で提供される任意の組換え細胞など）は、イソプレニンシ

10

20

30

40

50

ターゼポリペプチドをコードする異種核酸をさらに含んでなり、適切な培地中の組換え細胞の培養は、(a) イソプレン収率または (b) イソプレン比生産性のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値がある、イソプレンの生産を提供する。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、イソプレンシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、植物イソプレンシンターゼポリペプチドである。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、植物イソプレンシンターゼポリペプチドは、クズ属 (*Pueraria*) またはポプラ属 (*Populus*) または雑種ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) × ヤマナラシ (*Populus tremula*) からのポリペプチドである。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、イソプレンシンターゼポリペプチドは、プエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*)、プエラリア・ロバタ (*Pueraria lobata*)、ポプルス・トレムロイデス (*Populus tremuloides*)、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*)、セイヨウハコヤナギ (*Populus nigra*)、およびコットンウッド (*Populus trichocarpa*) からなる群から選択される。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、1つまたは複数の1-デオキシ-D-キシロース-5-リン酸 (DXP) 経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる。

【0083】

その他の態様では、本明細書で提供されるのは、イソプレノイド前駆体を産生できる組換え細胞であって、組換え細胞 (本明細書で提供される任意の組換え細胞など) は、適切な培地中で培養されて、前記イソプレノイド前駆体を産生する。

【0084】

その他の態様では、本明細書で提供されるのは、イソプレノイドを産生する組換え細胞であって、組換え細胞 (本明細書で提供される任意の組換え細胞など) は、ピロリン酸ポリプレニルシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸をさらに含んでなり、適切な培地中の組換え細胞の培養は、イソプレノイドの生産を提供する。

【0085】

なおも別の態様では、本明細書で提供されるのは、アセチルCoA由来代謝産物を産生できる組換え細胞であって、適切な培地中の組換え細胞 (本明細書で提供される任意の組換え細胞など) の培養は、アセチルCoA由来代謝産物の生産を提供する。

【0086】

上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、核酸は、誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターの下に置かれる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、核酸は、1つまたは複数のマルチコピープラスミドにクローン化される。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、核酸は、細胞染色体に組み込まれる。

【0087】

上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、グラム陽性細菌細胞、グラム陰性細菌細胞、真菌細胞、糸状菌細胞、藻類細胞または酵母細胞である。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、コリネバクテリウム属 (*Corynebacteria*)、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、ストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*)、ストレプトミセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*)、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、およびアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、およびヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) か

10

20

30

40

50

らなる群から選択される。

【0088】

上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、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、セキテルペン (sequiterpene)、およびポリテルペンからなる群から選択される。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、イソプレノイドは、セスキテルペンである。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、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、 α -ファメセン、 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、 β -ピネン、サビネン、 γ -テルピネン、テルペンデン、およびパレンセンからなる群から選択される。

10

【0089】

上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチルCoA由来代謝産物は、ポリケチド、ポリヒドロキシ酪酸、脂肪アルコール、および脂肪酸からなる群から選択される。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチルCoA由来代謝産物は、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、アスパラギン、プロリン、アルギニン、メチオニン、スレオニン、システイン、コハク酸、リジン、ロイシン、およびイソロイシンからなる群から選択される。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチルCoA由来代謝産物は、アセトン、イソプロパノール、イソブテン、およびプロペンからなる群から選択される。

20

【0090】

上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、適切な培地は、炭素源を含んでなる。上述のまたは本明細書の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、炭素源は、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖、C6糖、C5糖、および転化糖からなる群から選択される炭水化物である。

【0091】

その他の態様では、(a) 組換え細胞 (本明細書で提供される任意の組換え細胞など) をイソプレンの生産に適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレンを生産するステップとを含んでなる、イソプレンを生産する方法もまた、本明細書で提供される。その他の態様では、(a) 組換え細胞 (本明細書で提供される任意の組換え細胞など) をイソプレノイド前駆体の生産に適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレノイド前駆体を生産するステップとを含んでなる、イソプレノイド前駆体を生産する方法もまた、本明細書で提供される。

30

【0092】

その他の態様では、(a) 組換え細胞 (本明細書で提供される任意の組換え細胞など) をイソプレノイドの生産に適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレノイドを生産するステップとを含んでなる、イソプレノイドを生産する方法もまた、本明細書で提供される。

【0093】

その他の態様では、本明細書でまた提供されるのは、(a) 組換え細胞 (本明細書で提供される任意の組換え細胞など) をアセチルCoA由来代謝産物の生産に適した条件下で培養するステップと、(b) アセチルCoA由来代謝産物を生産するステップとを含んでなる、アセチルCoA由来代謝産物を生産する方法である。

40

【0094】

その他の態様では、本明細書でまた提供されるのは、(a) ポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなる、組換え細胞を培養するステップであって、グルコースまたはキシロースを炭素源とする培養条件下で、組換え細胞にトランスケトラーゼ活性 (tktAB) 欠陥があるステップと；(b) 組換え細胞の細胞増殖を評価するステップと、(c) 細胞増殖の存在に基づいて、前記ポリペプチドの生体内ホスホケトラーゼ活性を検出するステップとを含んでなる、ポリペプチドの生体内ホスホケトラーゼ活性を組換え細胞内

50

で検出する方法である。

【0095】

その他の態様では、本明細書でまた提供されるのは、上述のまたは本明細書の方法のいずれかによって検出されるホスホクトラーゼ活性がある、単離ポリペプチドである。

【図面の簡単な説明】

【0096】

【図1】ホスホクトラーゼ（PKL）存在下の操作された代謝経路を描写する。PKLは、基質選択性に基づいて、X5Pのみに作用するキシロロースー5ーリン酸（X5P）ホスホクトラーゼ（EC4. 1. 2. 9）と、X5PおよびF6Pの双方に同等の活性で作用するキシロロースー5ーリン酸／フルクトースー6ーリン酸（F6P）ホスホクトラーゼ（EC4. 1. 2. 22）の2つのタイプに分類されている。PKL触媒反応中でF6Pおよび／またはX5Pから形成されるアセチルリン酸（Ac-P）は、引き続いて、MVA経路で使用されるアセチルCoAに変換され、または酢酸に変換され得る。PKL触媒反応の他の生成物、すなわち、X5PおよびF6Pからそれぞれ生成されるグリセルアルデヒドー3ーリン酸（GAP）およびエリスロースー4ーリン酸（E4P）は、操作された代謝経路を通じて再循環させ、収率を最大化し得る。アセチルCoAは、ポリケチド、脂肪酸、およびリジンのようなアミノ酸など、多くの生成物に変換され得る。

【図2】同定されたPKLの22個のクラスターの中心代表的配列の略図である。

【図3】クラスター1の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図4】クラスター2の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図5】クラスター3の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図6】クラスター4の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図7】クラスター5の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図8】クラスター6の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図9】クラスター7の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図10】クラスター8の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図11】クラスター9の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図12】クラスター10の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図13】クラスター11の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図14】クラスター12の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図15】クラスター13の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図16】クラスター14の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図17】クラスター15の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図18】クラスター16の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図19】クラスター17の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図20】クラスター18の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図21】クラスター19の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図22】クラスター20の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図23】クラスター21の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図24】クラスター22の中で同定されたホスホクトラーゼの略図である。

【図25】エンテロコッカス・ガリナルム（*Enterococcus gallinarum*）ホスホクトラーゼを発現する、pCMP1321のプラスミドマップを描写する。

【図26】ビフィドバクテリウム・デンチウム（*Bifidobacterium dentium*）ホスホクトラーゼを発現する、pMCS530のプラスミドマップを描写する。

【図27】ビフィドバクテリウム・ビフィダム（*Bifidobacterium bifidum*）ホスホクトラーゼを発現する、pMCS531のプラスミドマップを描写する。

【図28】ビフィドバクテリウム・ガリウム（*Bifidobacterium gal*

10

20

30

40

50

licum) ホスホケトラゼを発現する、pMCS532のプラスミドマップを描写する。

【図29】ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) ホスホケトラゼを発現する、pMCS533のプラスミドマップを描写する。

【図30】バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*) ホスホケトラゼを発現する、pMCS534のプラスミドマップを描写する。

【図31】クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) 最適化ホスホケトラゼを発現する、pMCS535のプラスミドマップを描写する。

【図32】ホスホケトラゼを発現する株中のタンパク質発現を示す、一連のSDS-PAGEクマシー染色ゲルである。B. ロングム (*B. longum*) PKL (レーン1)、E. ガリナーラム (*E. gallinarum*) PKL (レーン2)、C. アセトブチリカム (*C. acetobutylicum*) PKL (レーン3)、B. デンチウム (*B. dentium*) PKL (レーン4)、B. ビフィダム (*B. bifidum*) PKL (レーン5)、B. ガリカム (*B. gallicum*) PKL (レーン6)、L. ブフネリ (*L. buchneri*) PKL (レーン7)、B. フィトフィルマンズ (*B. phytofirmans*) PKL (レーン8)、およびC. アセトブチリカム (*C. acetobutylicum*) コドン最適化PKL (レーン9) を発現する細胞からのA) 可溶性タンパク質、およびB) 不溶性タンパク質である。

【図33】Ac-P収率によって測定された、F6P基質の存在下における、B. ロングム (*B. longum*) PKL、E. ガリナーラム (*E. gallinarum*) PKL、C. アセトブチリカム (*C. acetobutylicum*) PKL、B. デンチウム (*B. dentium*) PKL、B. ビフィダム (*B. bifidum*) PKL、B. ガリカム (*B. gallicum*) PKL、L. ブフネリ (*L. buchneri*) PKL、B. フィトフィルマンズ (*B. phytofirmans*) PKL、およびC. アセトブチリカム (*C. acetobutylicum*) コドン最適化PKLの生体外活性を示すグラフである。

【図34】トランスケトラゼ変異株が、6種の芳香族化合物とピリドキシンを含有する補給剤の添加時のみ、グルコース上で増殖したことを示すグラフである。

【図35】E. ガリナーラム (*E. gallinarum*) およびC. アセトブチリカム (*C. acetobutylicum*) からのホスホケトラゼが、補給剤無添加のグルコース上におけるトランスケトラゼ変異株の増殖を回復させたことを示すグラフである。

【図36】トランスケトラゼ変異株が、6種の芳香族化合物とピリドキシンを含有する補給剤添加または無添加のキシロース上で、増殖しなかったことを示すグラフである。

【図37】E. ガリナーラム (*E. gallinarum*) およびC. アセトブチリカム (*C. acetobutylicum*) からのホスホケトラゼが、補給剤無添加のキシロース上におけるトランスケトラゼ変異株の増殖を回復させたことを示すグラフである。

【図38】好ましくは、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流が増大するように上方制御された、宿主変異を描写する略図である。炭素流を調節するための関心のある遺伝子としては、リボース-5-リン酸イソメラーゼA (rpiA)、D-リブローズ-5-リン酸-3-エピメラーゼ (rpe)、トランスケトラゼA (tktA)、トランスアルドラーゼB (talB)、および/またはリン酸アセチルトランスフェラーゼ (pta) が挙げられる。

【図39】好ましくは、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流が増大するように下方制御された、宿主変異を描写する略図である。炭素流を調節するための関心のある遺伝子としては、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (zwf)、6-ホスホフルクトキナーゼ-1 (pfkA)、フルクトース二リン酸アルドラーゼ (fba)、グリセルアルデ

10

20

30

40

50

ヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼA (gapA)、酢酸キナーゼ (ackA)、クエン酸シンターゼ (glutA) および／またはptsオペロンが挙げられる。

【図40】MD891 (ackA-) 宿主中の様々なPKL酵素の累積イソプレン収率を描写する。

【図41】MD891 (ackA-) 宿主中の様々なPKL酵素の発酵終了時 (EOF) イソプレン力価を描写する。

【図42】本明細書で開示される組成物、細胞、または方法のいずれかに従った、PKL同時発現に適したプラスミドの一般的なプラスミドマップを描写する。

【発明を実施するための形態】

【0097】

本明細書で提供される本発明は、ホスホクトラーゼポリペプチドを発現するように操作されている組換え細胞内で、アセチル補酵素A由来代謝産物、イソプレノイド前駆体分子、イソプレンおよび／またはイソプレノイドを生産するための組成物と方法を特に開示する。本発明のホスホクトラーゼ酵素は、下でより詳細に記載されるように、様々な基質を使用し得る。特定の実施形態では、本発明は、キシロロース-5-リン酸からグリセルアルデヒド-3-リン酸およびアセチルリン酸への変換を触媒できるホスホクトラーゼポリペプチドを発現するように操作されている組換え細胞内で、アセチル補酵素A由来代謝産物、イソプレノイド前駆体分子、イソプレンおよび／またはイソプレノイドを生産するための組成物と方法を提供する。他の実施形態では、本発明は、フルクトース-6-リン酸からエリスロース-4-リン酸およびアセチルリン酸への変換を触媒できるホスホクトラーゼポリペプチドを発現するように操作されている組換え細胞内で、アセチル補酵素A由来代謝産物、イソプレノイド前駆体分子、イソプレンおよび／またはイソプレノイドを生産するための組成物と方法を提供する。なおも別の実施形態では、本発明は、セドヘプツロース-7-リン酸からリボース-5-リン酸およびアセチルリン酸への変換を触媒できるホスホクトラーゼポリペプチドを発現するように操作されている組換え細胞内で、アセチル補酵素A由来代謝産物、イソプレノイド前駆体分子、イソプレンおよび／またはイソプレノイドを生産するための組成物と方法を提供する。なおも別の実施形態では、本発明は、キシロロース-5-リン酸からグリセルアルデヒド-3-リン酸およびアセチルリン酸への変換、および／またはフルクトース-6-リン酸からエリスロース-4-リン酸およびアセチルリン酸への変換、および／またはセドヘプツロース-7-リン酸からリボース-5-リン酸およびアセチルリン酸への変換を触媒できる、ホスホクトラーゼポリペプチドを発現するように操作されている組換え細胞内で、アセチル補酵素A由来代謝産物、イソプレノイド前駆体分子、イソプレンおよび／またはイソプレノイドを生産するための組成物と方法を提供する。

【0098】

宿主細胞内で代謝経路を操作するために、組換え的に発現されたホスホクトラーゼが使用されている。米国特許第7,785,858号明細書を参照されたい。Sonderger et al. (Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70:5, 2892-97) は、エタノールを過剰産生するためのサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 中のホスホクトラーゼの使用を記載する。Fleige et al. (Appl Microbial Biotechnol., 2011, 91:3, 769-76) は、生物が増殖のための唯一の炭素源としてフルクトースを利用する能力を回復させる、改変ラルストニア・オイトロファ (Ralstonia eutropha) 株中におけるビフィドバクテリウム属 (Bifidobacterium) ホスホクトラーゼ遺伝子 (Meile et al., 前出) の発現を記載する。

【0099】

理論的には、アセチルCoAの3つの分子は、可逆反応中の単一グルコース分子に由来し得る。しかし生物は、典型的に、最大2分子のアセチルCoAのみを産生し、残りの質量はCO₂として失われる。CO₂の放出は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼによって触媒

10

20

30

40

50

される反応である、ピルビン酸からのアセチルC o A形成中に起こる。1つの炭素原子の損失は、アセチルC o A由来代謝産物、イソプレノイド前駆体、イソプレン、およびイソプレノイド分子の生産収率の低下につながる。この反応損失の例外は、一酸化炭素デヒドロゲナーゼおよびアセチルC o Aシンターゼ酵素に依存して、嫌気的アセトゲン中で二酸化炭素をアセチルC o Aに還元する、Wood-Ljungdahl経路である。

【0100】

本発明は、Wood-Ljungdahl経路酵素に依存しない経路を利用して、1分子のグルコースから、3分子のアセチルC o Aを潜在的に生成し得る交互の(alternate)代謝過程を提供する。それに代えて、それは特定の生物に見られるホスホクトラーゼ酵素を使用する[例えば、Biology of the Prokaryotes (ed. Lengeler, Drews and Schlegel); Blackwell Science, New York, 1999, p. 299-301; Meile et al., J. of Bacteriology, 2001, 183:9, 2929-36; Jeong et al., J. Microbiol. Biotechnol., 2007, 17:5, 822-829を参照されたい]。ホスホクトラーゼ酵素は、典型的な代謝に見られるピルビン酸酸化を介さない、キシルロース-5-リン酸またはフルクトース-6-リン酸からの(アセチルリン酸を介する)アセチルC o A形成を可能にする。

【0101】

ホスホクトラーゼは、それらの基質選択性に基づいて、X5Pのみに作用するキシルロース-5-リン酸(X5P)ホスホクトラーゼと、X5PおよびF6Pの双方に作用するX5P/フルクトース-6-リン酸(F6P)ホスホクトラーゼの2つのタイプに分類されている(Suzuki et al., Acta Cryst. F66, 2010, 66:8, 941-43)。ホスホクトラーゼは、無機リン酸(P_i)を使用して、X5PまたはF6Pの切断を触媒し、アセチルリン酸(アセチル-P)、H₂O、およびグリセルアルデヒド-3-リン酸またはエリスロース-4-リン酸を生成する。引き続いて高エネルギー代謝産物アセチル-Pは、酢酸キナーゼによって酢酸に変換され、経路中のADPからATPが生成される(図1)。1つのグルコースあたり3つのアセチルC o Aの最大収率を達成し得るように、アセチルリン酸に加えて、操作された代謝経路を通じて、酵素反応から生成されるグリセルアルデヒド-3-リン酸を再循環させ得る。顕著なことに、ホスホクトラーゼによって生成されるアセチルC o Aは、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ媒介反応で観察されるような炭素(例えばCO₂)の損失を排除する。

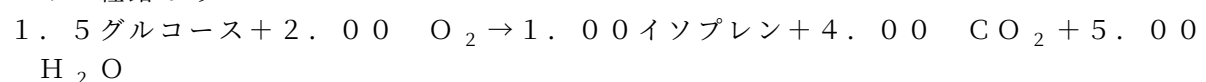
【0102】

ホスホクトラーゼはまた、セドヘプツロース-7-リン酸に作用して、それをリボース-5-リン酸とアセチルリン酸に変換し得る。このようなホスホクトラーゼの非限定的例は、セドヘプツロース-7-リン酸に対する触媒活性を有する、ビフィドバクテリウム・ロングム(Bifidobacterium longum)ホスホクトラーゼである。

【0103】

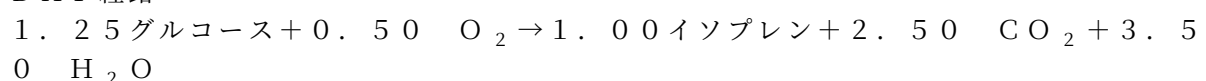
本発明は、生成物収率を向上させるための、アセチルC o A由来代謝産物、イソプレノイド前駆体、イソプレンおよび/またはイソプレノイドの生産における、ホスホクトラーゼ酵素の使用を対象とする。具体的には、以下の平衡状態方程式で表わされる、理論的なイソプレン生成物収率が向上する(生物が、1モルのグルコースから6モルのCO₂への完全酸化から、ATPを産生できるという仮説による)：

MVA経路のみ



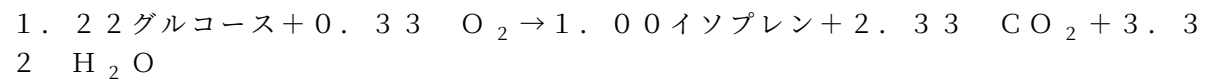
理論的収率-0.252 g イソプレン/g グルコース

DXP経路



理論的収率＝0.302 g イソブレン / g グルコース

MVA + ホスホクトラゼ経路



理論的収率＝0.309 g イソブレン / g グルコース

【0104】

メバロン酸依存生合成経路は、例えば、ジメチルアリル二リン酸 (DMA PP) および イソペンテニルピロリン酸 (IPP) などのイソプレノイド前駆体分子の生成に、特に重要である。上方メバロン酸経路の酵素は、グルコースから生成されるアセチル CoA を、3つの酵素反応を通じてメバロン酸に変換する。理論に束縛されることなく、アセチル CoA 生合成を増大させるためのホスホクトラゼポリペプチドの使用によって生成される細胞内 E4P、GAP、および Ac-P 貯留の増大は、上方メバロン酸依存生合成経路の生産性増大をもたらす得て、それはメバロン酸の生合成と、結果的に、DMA PP および IPP などの下流イソプレノイド前駆体分子の生合成とを実質的に増大させる (図1)。さらに、アセチル CoA の生合成増大は、脂肪酸、アミノ酸、およびアセトンなどのアセチル CoA 由来代謝産物の合成増大をもたらす得る (図1)。したがって、この交互の (alternate) PKL 経路による、細胞内量 CoA (intracellular amount - CoA) 生産の増大は、商業的応用に有利である。

【0105】

アセトンは、クロストリジウム・アセトブチリカム (Clostridium acetobutylicum) などの特定の微生物によって産生される。それは、アセチル CoA アセチルトランスフェラーゼ (EC 2.3.1.9) による、2分子のアセチル CoA のアセトアセチル CoA への縮合で開始する。次に、アセトアセチル CoA は、酢酸または酪酸との反応によってアセト酢酸に変換されて、アセチル CoA またはブチリル CoA の生産がもたらされる。この反応は、アセトアセチル CoA トランスフェラーゼ (EC 2.8.3.8) などの酵素によって触媒される。アセトアセチル CoA トランスフェラーゼは、大腸菌 (E. coli) または C. アセトブチリカム (C. acetobutylicum) などの様々な生物から知られている。しかし、3-オキソ酸 CoA トランスフェラーゼ (EC 2.8.3.5) またはコハク酸 CoA リガーゼ (EC 6.2.1.5) などの他の酵素もまた、この反応を触媒し得る。反応の最後のステップでは、アセト酢酸は、アセト酢酸デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.4) によって触媒される脱炭酸ステップによって、アセトンに変換される。アセトンは、引き続いて、アセトン、イソブレン、およびプロペンに関して、その内容全体を参照によって本明細書に明示的に援用する、国際公開第 2013/07786 号パンフレットに記載されるようにして、イソプロパノール、イソブテンおよび／またはプロペンに変換され得る。

【0106】

したがって、特定の態様では、本発明は、増大した細胞内量のエリスロース-4-リン酸、増大した細胞内量のグリセルアルデヒド-3-リン酸、および／または増大した細胞内量のリン酸がある組換え細胞を提供し、細胞は、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなり、細胞は、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含まない細胞と比較して、増大した細胞内量のエリスロース-4-リン酸、増大した細胞内量のグリセルアルデヒド-3-リン酸、および／または増大した細胞内量のリン酸を産生する。

【0107】

いくつかの態様では、本発明は、増大した細胞内量のアセチル CoA がある組換え細胞を提供し、細胞は、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなり、細胞は、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含まない細胞と比較して、増大した細胞内量のアセチル CoA を産生する。

【0108】

10

20

30

40

50

特定の態様では、本発明は、メバロン酸の生産を向上させる能力がある組換え細胞を提供し、細胞は、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸と、上流MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸とを含んでなり、細胞はホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含まない細胞と比較して、増大した量のメバロン酸を産生する。

【0109】

その他の態様では、本発明は、イソプレノイド前駆体の生産を向上させる能力がある組換え細胞を提供し、細胞は、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸と、完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸とを含んでなり、細胞はホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含まない細胞と比較して、増大した量のイソプレノイド前駆体を産生する。

10

【0110】

なおも別の態様では、本発明は、イソプレンを産生できる組換え細胞を提供し、細胞は、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸と、(i) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(ii) イソプレンスンターゼポリペプチドをコードする異種核酸を含んでなり、細胞は、回収可能量のイソプレンを産生できる。特定の実施形態では、本発明は、イソプレンの生産を向上させる能力がある組換え細胞を提供し、細胞は、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸と、(i) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(ii) イソプレンスンターゼポリペプチドをコードする異種核酸を含んでなり、細胞はホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含まないイソペン産生細胞と比較して、増大した量のイソプレンを産生する。

20

【0111】

なおも別の態様では、本発明は、イソプレノイドを産生できる組換え細胞を提供し、細胞は、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸と、(i) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(ii) 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する異種核酸を含んでなり、細胞は、回収可能量のイソプレノイドを産生できる。特定の実施形態では、本発明は、イソプレノイドの生産を向上させる能力がある組換え細胞を提供し、細胞は、(i) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(ii) 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する異種核酸を含んでなり、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸と、細胞はホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含まないイソプレノイド産生細胞と比較して、増大した量のイソプレノイドを産生する。

30

【0112】

その他の態様では、本発明は、アセチルCoA由来代謝産物を産生できる組換え細胞を提供し、細胞は、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなり、細胞は、回収可能量のアセチルCoA由来代謝産物を産生できる。特定の実施形態では、本発明は、アセチルCoA由来代謝産物の生産を向上させる能力がある組換え細胞を提供し、細胞は、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなり、細胞は、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含まない細胞のアセチルCoA由来代謝産物の産生と比較して、増大した量のアセチルCoA由来代謝産物を産生する。

40

【0113】

本明細書の態様のいずれにおいても、本発明は、組換え細胞を提供し、細胞は、ホスホ

50

ケトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなり得て、リボース-5-リン酸イソメラーゼ (r p i A および/または r p i B)、D-リブロー-5-リン酸-3-エピメラーゼ (r p e)、トランスケトラゼ (t k t A および/または t k t B)、トランスアルドラーゼ B (t a l B)、リン酸アセチルトランスフェラーゼ (p t a および/または e u t D)、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (z w f)、6-ホスホフルクトキナーゼ-1 (p f k A および/または p f k B)、フルクトース二リン酸アルドラーゼ (f b a、f b a A、f b a B、および/または f b a C)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (g a p A および/または g a p B)、酢酸キナーゼ (a c k A)、クエン酸シンターゼ (g l t A)、E I (p t s I)、E I I C B^{G1c} (p t s G)、E I I A^{G1c} (c r r)、および/または H P r (p t s H) をはじめとする遺伝子の1つまたは複数の活性が調節されて、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流が改善するようにさらに操作し得る。

10

【0114】

いくつかの実施形態では、本発明は、イソプレンを産生できる組換え細胞を提供し、細胞は、ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸と、(i) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、(ii) イソプレシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸を含んでなり、(iii) 1つまたは複数の遺伝子の活性が調節されて、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流が増大するようにさらに操作され、細胞は、ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含まないイソペン産生細胞と比較して、増大した量のイソプレンを産生する。

20

【0115】

いくつかの実施形態では、本発明は、イソプレノイドを産生できる組換え細胞を提供し、細胞は、ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする、1つまたは複数の異種核酸と、(i) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、(ii) 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する異種核酸を含んでなり、(iii) 1つまたは複数の遺伝子の活性が調節されて、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流が増大するようにさらに操作され、細胞は、ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含まないイソプレノイド産生細胞と比較して、増大した量のイソプレノイドを産生する。

30

【0116】

その他の実施形態では、本発明は、アセチルCoA由来代謝産物の生産を向上させる能力がある組換え細胞を提供し、細胞は、ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなり、1つまたは複数の遺伝子の活性が調節されて、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流が増大するようにさらに操作され、細胞は、ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含まない細胞のアセチルCoA由来代謝産物産生と比較して、増大した量のアセチルCoA由来代謝産物を産生する。

【0117】

一般技術

40

特に断りのない限り、本発明の実施は、当該分野の技術範囲内である、(組換え技術をはじめとする) 従来の分子生物学技術、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学を採用する。このような技術は、文献、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 第2版 (Sambrook et al., 1989); “Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait 編, 1984); “Animal Cell Culture” (R. I. Freshney 編, 1987); “Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.); “Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel et al., 編., 1987, and periodic updates); “PCR: The Polymer

50

ase Chain Reaction”, (Mullis et al., 編, 1994). Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 第2版, J. Wiley & Sons (New York, N. Y. 1994)、および March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 第4版, John Wiley & Sons (New York, N. Y. 1992) で詳しく説明され、当業者に、本出願で使用される多くの用語について、一般的指針を提供する。

【0118】

定義

10

「イソプレレン」という用語は、2-メチル-1, 3-ブタジエン (CAS # 78-79-5) を指す。それは、3, 3-ジメチルアリルニリン酸 (DMA PP) からのピロリン酸除去からの、直接的および最終揮発性 C5 炭化水素生成物であり得る。これは、IPP 分子の DMA PP 分子への結合または重合を伴わなくてもよい。「イソプレレン」という用語は、本明細書で特に断りのない限り、通常、その生産方法に限定されることは意図されない。

【0119】

本明細書の用法では、「ポリペプチド」という用語は、ポリペプチド、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド断片、および融合ポリペプチドを含む。

20

【0120】

本明細書の用法では、「単離ポリペプチド」は、2、5、10、20、50以上の異なるポリペプチドライブラリーなどのポリペプチドライブラリーの一部でなく、それが自然界で一緒に存在する少なくとも1つの構成要素から分離される。単離ポリペプチドは、例えば、ポリペプチドをコードする組換え核酸の発現によって得られ得る。

【0121】

「異種ポリペプチド」とは、宿主細胞とは異なる生物、種、または株に由来する核酸配列によってコードされる、ポリペプチドを意味する。いくつかの実施形態では、異種ポリペプチドは、自然界で同一宿主細胞に見られる、野生型ポリペプチドと同じでない。

【0122】

本明細書の用法では、「核酸」は、一本鎖または二本鎖形態のどちらかで、共有結合的に共に連結した2つ以上のデオキシリボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドを指す。

30

【0123】

「組換え核酸」とは、それに関心のある核酸が由来する生物の天然ゲノム中で、関心のある核酸の側面に位置する1つまたは複数の核酸（例えば、遺伝子）を含まない、関心のある核酸を意味する。したがって用語は、例えば、ベクターに、自己複製プラスミドまたはウイルスに、または原核生物または真核生物ゲノム DNA に、組み込まれた組換え DNA、またはその他の配列から独立した別個の分子（例えば、PCR または制限エンドヌクレアーゼ消化によって生じる、cDNA、ゲノム DNA 断片、または cDNA 断片）として存在する組換え DNA を含む。

40

【0124】

「異種核酸」は、宿主細胞とは異なる生物、種または株に由来する核酸配列を意味する。いくつかの実施形態では、異種核酸は、天然で同一宿主細胞に見られる野生型核酸と同じでない。例えば、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallicum*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) からのホスホケトラー

50

ゼ遺伝子によってコードされ、大腸菌（*E. coli*）を形質転換するのに使用される核酸は、異種核酸である。

【0125】

本明細書の用法では、「ホスホケトラゼ」、「ホスホケトラゼ酵素」、または「ホスホケトラゼポリペプチド」という用語は、同義的に使用されて、5-リン酸（5-phosphate）をグリセルアルデヒド-3-リン酸およびアセチルリン酸に変換し、および／またはフルクトース-6-リン酸をエリスロース-4-リン酸およびアセチルリン酸に変換するポリペプチドを指す。一般に、ホスホケトラゼは、ケトースに作用する。特定の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、キシロース-5-リン酸から、グリセルアルデヒド-3-リン酸およびアセチルリン酸への変換を触媒する。その他の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、フルクトース-6-リン酸から、エリスロース-4-リン酸およびアセチルリン酸への変換を触媒する。その他の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、セドヘプツロース-7-リン酸から、生成物（例えばリボース-5-リン酸）およびアセチルリン酸への変換を触媒する。

10

【0126】

本明細書の用法では、「発現調節配列」は、興味深い核酸の転写を誘導する核酸配列を意味する。発現調節配列は、構成的または誘導性プロモーターなどのプロモーター、またはエンハンサーであり得る。発現調節配列は、「天然」または異種であり得る。天然発現調節配列は、発現される遺伝子と同じ生物、種、または株に由来する。異種発現調節配列は、発現される遺伝子と異なる生物、種、または株に由来する。「誘導性プロモーター」は、環境的または発生的調節下において、活性のプロモーターである。

20

【0127】

「作動可能に連結する」とは、核酸発現制御配列（プロモーターなど）と第2の核酸配列の間の機能的連結を意味し、発現調節配列は、第2の配列に対応する、核酸の転写を誘導する。

【0128】

本明細書の用法では、「最少培地（単数）」または「最少培地（複数）」という用語は、細胞増殖で可能な最少栄養素を含有して、通常はアミノ酸が不在である増殖培地を指す。最少培地は、典型的に、（1）細菌増殖のための炭素源；（2）細菌種および増殖条件間で変動し得る様々な塩；および（3）水を含有する。炭素源は、下でより詳細に考察されるように、グルコースのような単糖類から、酵母抽出物などの他のバイオマスのより複雑な加水分解物まで、著しく変動し得る。塩は、通常、マグネシウム、窒素、リン、およびイオウなどの必須元素を提供して、細胞がタンパク質および核酸を合成できるようにする。最少培地はまた、特定のプラスミドの維持などについて選択するために、抗生物質などの選択的薬剤によって補足し得る。例えば、微生物が、アンピシリンまたはテトラサイクリンなどの特定の抗生物質に耐性があれば、抵抗性を欠く細胞が増殖するのを防ぐために、その抗生物質を培地に添加し得る。培地は、特定のアミノ酸などの所望の生理学的または生化学的特性について選択するために、必要に応じて、その他の化合物で補足し得る。

30

【0129】

本明細書の用法では、「イソプレノイド」という用語は、各単位が特定パターンに配列された5つの炭素原子からなる、2つ以上の炭化水素単位から構成される天然有機化合物クラスの大規模かつ多様なクラスを指す。本明細書の用法では、「イソプレン」は、「イソプレノイド」の定義から明示的に除外される。

40

【0130】

本明細書の用法では、「テルペノイド」という用語は、多様な様式で構築および修飾されて、グループ構成員中で使用されるイソプレノイド単位数に基づいてグループ分けされた、五炭素イソプレノイド単位に由来する有機分子の大規模かつ多様なクラスを指す。ヘミテルペノイドは、1つのイソプレノイド単位を有する。モノテルペノイドは、2つのイソプレノイド単位を有する。セスキテルペノイドは、3つのイソプレノイド単位を有する

50

。ジテルペノイドは、4つのイソプレノイド単位を有する。セスタテルペノイドは、5つのイソプレノイド単位を有する。トリテルペノイドは、6つのイソプレノイド単位を有する。テトラテルペノイドは、8つのイソプレノイド単位を有する。ポリテルペノイドは、8つを超えるイソプレノイド単位を有する。

【0131】

本明細書の用法では、「イソプレノイド前駆体」は、テルペノイドまたはイソプレノイドの生合成において、生物によって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的例としては、例えば、メバロナート（例えばメバロン酸（MVA））、イソペンテニルピロリン酸（IPP）、およびジメチルアリルニリン酸（DMAPP）が挙げられる。

10

【0132】

本明細書の用法では、「質量収率」という用語は、百分率として表される、組換え細胞によって消費されたグルコース質量で除した、組換え細胞によって生成された生成物の質量を指す。

【0133】

「比生産性」とは、生成物生成時間、細胞密度、および培養物容積で除した、組換え細胞によって生成された生成物の質量を意味する。

【0134】

「力価」は、培養液の容積で除した、組換え細胞によって生成された生成物の質量を意味する。

20

【0135】

本明細書の用法では、「細胞生産性指標（CPI）」という用語は、培養物中に生じた組換え細胞の質量で除した、組換え細胞によって産生された生成物の質量を指す。

【0136】

本明細書で特に断りのない限り、本明細書で使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が関係する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。

【0137】

本明細書の用法では、単数の用語「a」、「an」、および「the」は、文脈上明白に別段の記載がない限り、複数への言及を含む。

30

【0138】

本明細書全体を通じて記載されるあらゆる最大数値限界は、あたかもより低い数値限界が本明細書に明示的に記載されているかのように、あらゆるより低い数値限界を含むことが意図される。本明細書全体を通じて示されるあらゆる最小数値限界は、あたかもより高い数値限界が本明細書に明示的に記載されているかのように、あらゆるより高い数値限界を含む。本明細書全体を通じて示されるあらゆる数値範囲は、あたかもより狭い数値範囲が本明細書に明示的に記載されているかのように、このようなより広い数値範囲に含まれるあらゆるより狭い数値範囲を含む。

【0139】

ホスホクトラーゼポリペプチドを発現する組換え細胞

40

ホスホクトラーゼ酵素は、キシロースー5ーリン酸からグリセルアルデヒドー3ーリン酸およびアセチルリン酸への変換、および／またはフルクトースー6ーリン酸からエリスロースー4ーリン酸およ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、ホスホクトラーゼ酵素は、キシロースー5ーリン酸からグリセルアルデヒドー3ーリン酸およびアセチルリン酸への変換を触媒できる。その他の実施形態では、ホスホクトラーゼ酵素は、フルクトースー6ーリン酸からエリスロースー4ーリン酸およびアセチルリン酸への変換を触媒できる。その他の実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、セドヘプツロースー7ーリン酸から、生成物（例えばリボースー5ーリン酸）およびアセチルリン酸への変換を触媒する。したがって、理論により拘束されることなく、本明細書に記載されるホスホクトラーゼの発現は、炭水化物源から生成されるアセチルリン酸量の増

50

大をもたらし得る。このアセチルリン酸は、アセチルC o Aに変換され得て、次にそれは、M V A経路の酵素機能によって使用され、メバロン酸、イソプレノイド前駆体分子、イソプレンおよび／またはイソプレノイドが生成され得て、またはそれは、M V A経路の酵素機能によって使用されて、アセチルC o A由来代謝産物が生成され得る。

【0140】

本明細書の用法では、「アセチルC o A由来代謝産物」という用語は、アセチルC o Aから前記代謝産物への触媒性変換から生成される、代謝産物を指し得る。変換は、一段階反応または多段階合成反応であり得る。例えば、アセトンは、1) アセチルC o Aアセチルトランスフェラーゼによる、2分子のアセチルC o AのアセトアセチルC o Aへの縮合；2) アセチルC o AまたはブチリルC o Aの生成をもたらす、酢酸または酪酸との反応による、アセトアセチルC o Aのアセト酢酸への変換；および3) アセト酢酸デカルボキシラーゼによって触媒される脱炭酸ステップによる、アセト酢酸のアセトンへの変換の三段階反応（例えば多段階合成反応）によってアセチルC o Aから生成される、アセチルC o A由来代謝産物である。アセトンは、引き続いてイソプロパノール、イソブテンおよび／またはプロペンに変換され得て、それらもまたアセチルC o A由来代謝産物であることが、本明細書で明示的に検討される。いくつかの実施形態では、アセチルC o A由来代謝産物は、ポリケチド、ポリヒドロキシ酪酸、脂肪アルコール、および脂肪酸からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、アセチルC o A由来代謝産物は、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、アスパラギン、プロリン、アルギニン、メチオニン、スレオニン、システイン、コハク酸、リジン、ロイシン、およびイソロイシンからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、アセチルC o A由来代謝産物は、アセトン、イソプロパノール、イソブテン、およびプロペンからなる群から選択される。したがって炭水化物基質から生成されるこれらの化合物（例えば、アセチルC o A、アセチルC o A由来代謝産物、アセチルーP、E 4 Pなど）の量が増大してもよい。

【0141】

アセチルーPおよびアセチルC o Aの生産は、増大をより高い細胞内濃度に反映させずに、増大させ得る。特定の実施形態では、ホスホクエラーゼ反応が起こっているにもかかわらず、細胞内アセチルーPまたはアセチルC o A濃度は不変であり、または低下することさえある。

【0142】

例示的なホスホクエラーゼポリペプチドおよび核酸

例示的なホスホクエラーゼ核酸としては、ホスホクエラーゼポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的なホスホクエラーゼポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸、ならびに本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する変異ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。（例えば、図2～24および実施例2を参照されたい）。それに加えて、表1および表2は、本発明の実施形態で使用してもよい、異なる生物種からの特定の例示的なホスホクエラーゼの非限定的一覧を提供する。

【0143】

例示的なホスホクエラーゼの生化学的特性としては、タンパク質発現、タンパク質溶解度、および活性が挙げられるが、これに限定されるものではない。ホスホクエラーゼはまた、異なる生物タイプ（例えば、グラム陽性細菌、ラン藻、放線菌）間の多様性、通性低温嫌気性菌、所望の種の近縁種（例えば、大腸菌（E. coli））、および熱耐性をはじめとするが、これに限定されるものではない、その他の特性に基づいて選択し得る。

【0144】

場合によっては、生物のゲノム中にホスホフルクトキナーゼ遺伝子が欠失していれば、特定の生物からのホスホクエラーゼを選択し得る。

【0145】

さらに別の実施例では、ホスホクエラーゼは、アミノ酸配列の二次構造および／または

実施例 1 に記載される方法に基づいて選択し得る。

【0146】

なおも別の例では、ホスホケトララーゼは、実施例 6 に記載されるような生体外アッセイに基づいて選択し得る。

【0147】

なおも別の例では、ホスホケトララーゼは、実施例 7 に記載されるような生体内アッセイに基づいて選択し得る。いくつかの態様では、本明細書で提供されるのは、(a) ポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなる、組換え細胞を培養するステップであって、グルコースまたはキシロースを炭素源とする培養条件下で、組換え細胞にトランスケトララーゼ活性 (t k t A B) 欠陥があるステップと；(b) 組換え細胞の細胞増殖を評価するステップと、(c) 観察された細胞増殖の量に基づいて、前記ポリペプチドの生体内ホスホケトララーゼ活性の存在を判定するステップとを含んでなる、ポリペプチドの生体内ホスホケトララーゼ活性の存在を判定する方法である。いくつかの態様では、本明細書で提供されるのは、(a) ホスホケトララーゼ活性を有することが疑われるポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなる、組換え細胞を培養するステップであって、グルコースまたはキシロースを炭素源とする培養条件下で、組換え細胞にトランスケトララーゼ活性 (t k t A B) 欠陥があるステップと；(b) 組換え細胞の細胞増殖を評価するステップと、(c) 細胞増殖が観察された場合、ホスホケトララーゼ活性があるポリペプチドを同定するステップとを含んでなる、ホスホケトララーゼ活性があるポリペプチドを同定する方法である。いくつかの態様では、本明細書で提供されるのは、(a) ポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなる、組換え細胞を培養するステップであって、グルコースまたはキシロースを炭素源とする培養条件下で、組換え細胞にトランスケトララーゼ活性 (t k t A B) 欠陥があるステップと；(b) 組換え細胞の細胞増殖を評価するステップと、(c) 細胞増殖の存在に基づいて、前記ポリペプチドの生体内ホスホケトララーゼ活性を検出するステップとを含んでなる、ポリペプチドの生体内ホスホケトララーゼ活性を組換え細胞内で検出する方法である。

【0148】

本明細書で提供されるように、ホスホケトララーゼ活性は、アセチル C o A 由来代謝産物、イソプレノイド前駆体 (例えば I P P)、イソプレン、および／またはイソプレノイドの生産を改善し得る。本明細書で提供されるのは、ホスホケトララーゼを含んでなる組換え宿主であって、細胞は、少なくとも 1 つの関心のある特性を示して、アセチル C o A 由来代謝産物、イソプレノイド前駆体 (例えば I P P)、イソプレン、および／またはイソプレノイドの生産を改善する。

【0149】

いくつかの態様では、少なくとも 1 つの関心のある特性は、比生産性、収率、力価、および細胞性能指数 (例えば増殖) からなる群から選択されるが、これに限定されるものではない。本明細書の用法では、「性能指標」は、計算された、親分子と比較した単位当たり活性を指す。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの態様では、性能指標の計算で使用される親分子は、E. ガリナーラム (E. g a l l i n a r u m) からのホスホケトララーゼである。いくつかの実施形態では、親分子は、定義上、1 の性能指標を有する。その他の実施形態では、1 を超える性能指標 ($P I > 1.0$) は、親分子と比較して改善されたホスホケトララーゼ (例えば E. ガリナーラム (E. g a l l i n a r u m) からのホスホケトララーゼ) 活性を示す。

【0150】

特定の実施形態では、本明細書の用途のための適切なホスホケトララーゼとしては、可溶性ホスホケトララーゼが挙げられる。タンパク質溶解度の測定技術は、当該技術分野で周知である。タンパク質溶解度を測定する技術としては、本明細書の実施例で開示されるものが挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書の用途のためのホスホケトララーゼとしては、少なくとも 20 % の溶解度があるものが挙げられる。いくつかの実施形態では、ホスホケトララーゼ溶解度は、約 5 % ~ 約 100 %、約 10 % ~ 約 100 %、約 15 % ~ 約 1

10

20

30

40

50

00%、約20%～約100%、約25%～約100%、約30%～約100%、約35%～約100%、約40%～約100%、約45%～約100%、約50%～約100%、約55%～約100%、約60%～約100%、約65%～約100%、約70%～約100%、約75%～約100%、約80%～約100%、約85%～約100%、または約90%～約100%のいずれかである。いくつかの実施形態では、ホスホケトラーゼ溶解度は、約5%～約100%である。いくつかの実施形態では、溶解度は、5%～100%である。いくつかの実施形態では、ホスホケトラーゼ溶解度は、約100、90、80、70、60、50、40、30、20または10未満のいずれかであるが、約5%以上である。いくつかの実施形態では、溶解度は、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または95%のいずれかを超える。

10

【0151】

所望の動態特性があるホスホケトラーゼは、イソプレンの生産を増大させる。動態特性としては、比活性、 K_{cat} 、 K_i 、および K_m が挙げられるが、これに限定されるものではない。いくつかの態様では、 k_{cat} は、少なくとも約0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.1、8.2、8.4、8.6、8.8、9.0、9.2、9.4、9.6、9.8、10.0、10.2、10.4、10.6、10.8、11.0、11.2、11.4、11.6、11.8、12.0、12.2、12.4、12.6、12.8、13.0、13.2、13.4、13.6、13.8、14.0、14.2、14.4、14.6、14.8、15.0、15.2、15.4、15.6、15.8、16.0、16.2、16.4、16.6、16.8、17.0、17.2、17.4、17.6、17.8、18.0、18.2、18.4、18.6、18.8、19.0、19.2、19.4、19.6、19.8、20.0、21、22、23、24、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、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400、500、600、700、または800である。その他の態様では、 k_{cat} は、少なくとも約0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.1、8.2、8.4、8.6、8.8、9.0、9.2、9.4、9.6、9.8、10.0、10.2、10.4、10.6、10.8、11.0、11.2、11.4、11.6、11.8、12.0、12.2、12.4、12.6、12.8、13.0、13.2、13.4、13.6、13.8、14.0、14.2、14.4、14.6、14.8、15.0、15.2、15.4、15.6、15.8、16.0、16.2、16.4、または16.6である。

20

30

40

【0152】

いくつかの態様では、 K_m は、少なくとも約1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、16、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、30.5、31、31.5、32、32.5、33、33.5、34、34.5、35、35.5、36、36.5、37、37.5、38、38.5、39、39.5、40、40.5、41、41.5

50

、42、42.5、43、43.5、44、44.5、45、45.5、46、46.5、47、47.5、48、48.5、49、49.5、50、50.5、51、51.5、52、52.5、53、53.5、54、54.5、55、55.5、または56である。その他の態様では、 k_m は、少なくとも約2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、16、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、または22である。

【0153】

興味深い特性としては、ホスホクトラーゼポリペプチドを含まない組換え細胞と比較して増大した、細胞内活性、比生産性、収率、および細胞性能指標が挙げられるが、これに限定されるものではない。いくつかの実施形態では、比生産性は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。一実施形態では、比生産性は、約40mg/L/OD/hrである。いくつかの実施形態では、収率は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。別の実施形態では、MVA収率は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。別の実施形態では、イソプレレン収率は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。

【0154】

その他の実施形態では、本明細書に記載されるホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドと、完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸とを含んでなる組換え細胞の（a）グルコース上の細胞増殖、（b）キシロース上の細胞増殖、（c）グルコースー6ーリン酸上の細胞増殖、または（d）細胞内アセチルリン酸の産生をはじめとするが、これに限定されるものではない興味深い特性の性能指標値が、ホスホクトラーゼ活性を有する親ポリペプチド（例えばE. ガリナーラム（E. gallinarum）からのホスホクトラーゼ）と比較して、1を超える、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3.2を超える、3.4を超える、3.6を超える、3.8を超える、4を超える、4.2を超える、4.4を超える、4.6を超える、4.8を超える、5を超える、5.2を超える、5.4を超える、5.6を超える、5.8を超える、6を超える、6.2を超える、6.4を超える、6.6を超える、6.8を超える、7を超える、7.2を超える、7.4を超える、7.6を超える、7.8を超える、8を超える、8.2を超える、8.4を超える、8.6を超える、8.8、9を超える、9.2を超える、9.4を超える、9.6を超える、9.8を超える、または10を超え、またはそれを上回る。

【0155】

その他の実施形態では、完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる、組換え細胞内の（a）タンパク質溶解度、（b）タンパク質発現、または（c）ホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドのF6P比活性をはじめとするが、これに限定されるものではない興味深い特性の性能指標値が、ホスホクトラーゼ活性を有する親ポリペプチド（例えばE. ガリナーラム（E. gallinarum）からのホスホクトラーゼ）と比較して、1を超える、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3

10

20

30

40

50

． 2 を超える、 3． 4 を超える、 3． 6 を超える、 3． 8 を超える、 4 を超える、 4． 2 を超える、 4． 4 を超える、 4． 6 を超える、 4． 8 を超える、 5 を超える、 5． 2 を超える、 5． 4 を超える、 5． 6 を超える、 5． 8 を超える、 6 を超える、 6． 2 を超える、 6． 4 を超える、 6． 6 を超える、 6． 8 を超える、 7 を超える、 7． 2 を超える、 7． 4 を超える、 7． 6 を超える、 7． 8 を超える、 8 を超える、 8． 2 を超える、 8． 4 を超える、 8． 6 を超える、 8． 8、 9 を超える、 9． 2 を超える、 9． 4 を超える、 9． 6 を超える、 9． 8 を超える、 または 10 を超え、 またはそれを上回る。

【0156】

その他の実施形態では、 (i) ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチド、 (ii) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、 および (iii) イソプレシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸を含んでなる、 組換え細胞の (a) イソプレン収率、 タンパク質溶解度または (b) イソプレン比生産性をはじめとするが、 これに限定されるものではない興味深い特性の性能指標値が、 ホスホケトラゼ活性を有する親ポリペプチド（例えばE. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホケトラゼ）と比較して、 1 を超える、 1． 1 を超えるなど、 1． 2 を超えるなど、 1． 4 を超える、 1． 6 を超える、 1． 8 を超える、 2 を超える、 2． 2 を超える、 2． 4 を超える、 2． 6 を超える、 2． 8 を超える、 3 を超える、 3． 2 を超える、 3． 4 を超える、 3． 6 を超える、 3． 8 を超える、 4 を超える、 4． 2 を超える、 4． 4 を超える、 4． 6 を超える、 4． 8 を超える、 5 を超える、 5． 2 を超える、 5． 4 を超える、 5． 6 を超える、 5． 8 を超える、 6 を超える、 6． 2 を超える、 6． 4 を超える、 6． 6 を超える、 6． 8 を超える、 7 を超える、 7． 2 を超える、 7． 4 を超える、 7． 6 を超える、 7． 8 を超える、 8 を超える、 8． 2 を超える、 8． 4 を超える、 8． 6 を超える、 8． 8、 9 を超える、 9． 2 を超える、 9． 4 を超える、 9． 6 を超える、 9． 8 を超える、 または 10 を超え、 またはそれを上回る。

【0157】

その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0． 1、 0． 2、 0． 3、 0． 4、 0． 5、 0． 6、 0． 7、 0． 8、 0． 9、 1． 0、 1． 1、 1． 2、 1． 3、 1． 4、 1． 5、 1． 6、 1． 7、 1． 8、 1． 9、 2、 3、 4、 5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0． 1～0． 5、 約0． 25～0． 75、 約0． 5～1、 約0． 75～1． 25、 約1～1． 5、 約1． 25～1． 75、 約1． 5～2、 約1． 75～2． 25、 約2～2． 5、 約2． 25～2． 75、 約2． 5～3、 約2． 75～3． 25、 約3～3． 5、 約3． 25～3． 75、 約3． 5～4、 約3． 75～4． 25、 約4～4． 5、 約4． 25～4． 75、 約4． 5～5、 約4． 75～5． 25、 約5～5． 5、 約5． 25～5． 75、 約5． 5～6、 約6． 25～6． 75、 約6． 5～7、 約6． 75～7． 25、 約7～7． 5、 約7． 75～8． 25、 約8～8． 5、 約8． 25～8． 75、 約8． 5～9、 約8． 75～9． 25、 約9～9． 5、 約9． 25～9． 75、 または約9． 5～10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0． 1～2、 約1～3、 約2～4、 約3～5、 約4～6、 約5～7、 約6～8、 約7～9、 または約8～10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホケトラゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0． 1、 0． 2、 0． 3、 0． 4、 0． 5、 0． 6、 0． 7、 0． 8、 0． 9、 1． 0、 1． 1、 1． 2、 1． 3、 1． 4、 1． 5、 1． 6、 1． 7、 1． 8、 1． 9、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10倍以上増大する。

【0158】

本明細書で提供されるのは、微生物から単離されたホスホケトラゼである。いくつかの態様では、ホスホケトラゼは、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、好気性細菌、嫌気性細菌、好熱性細菌、好冷細菌、好塩性細菌またはラン藻からなる群から単離される。いくつかの態様では、ホスホケトラゼは、真菌から単離される。その他の態様では、例示的なホスホケトラゼ核酸としては、例えば、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (

Burkholderia phytofirmans)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリウム (*Bifidobacterium gallicum*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホケトラゼが挙げられる。その他の態様では、例示的なホスホケトラゼ核酸としては、例えば、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトラゼが挙げられる。その他の態様では、例示的なホスホケトラゼ核酸としては、例えば、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リスティア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離されたホスホケトラゼが挙げられる。なおも別の態様では、例示的なホスホケトラゼ核酸としては、例えば、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニューリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エ

10

20

30

40

50

レモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングア (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホケトラゼが挙げられる。

【0159】

使用し得る他のホスホケトラゼとしては、*B. longum* (*B. longum*)、*L. plantarum* (*L. plantarum*)、*C. acetobutylicum* (*C. acetobutylicum*)、*L. reuteri* (*L. reuteri*)、*L. paraplantarum* (*L. paraplantarum*)、*R. palustris* (*R. palustris*)、*Nostoc punctiforme* (*Nostoc punctiforme*)、*B. animalis* (*B. animalis*)、*B. breve* (*B. breve*)、*G. vaginalis* (*G. vaginalis*)、*E. gallinarum* (*E. gallinarum*)、*M. paludis* (*M. paludis*)、*Pantoea* 属 (*Pantoea*) 種、*R. aquatilis* (*R. aquatilis*)、*N. punctiforme* (*N. punctiforme*)、*S. avermitilis* (*S. avermitilis*)、および *T. fusca* (*T. fusca*) が挙げられるが、これに限定されるものではない。使用し得る追加的なホスホケトラゼとしては、*Burkholderia phytofirmans* (*Burkholderia phytofirmans*)、*Lactobacillus buchneri* (*Lactobacillus buchneri*)、*Bifidobacterium galli* (*Bifidobacterium galli*)、*Bifidobacterium dentium* (*Bifidobacterium dentium*)、*Bifidobacterium bifidum* (*Bifidobacterium bifidum*)、および *Clostridium acetobutylicum* (*Clostridium acetobutylicum*) が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0160】

標準法を使用して、ペプチドが、D-フルクトース-6-リン酸またはD-キシルロース-5-リン酸をアセチル-Pに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どうかを判定し得る。次にアセチル-Pは、分光光度法で検出し得るフェリルアセチルヒドロキサム酸に変換し得る (Meile et al., J. Bact. 183: 2929-2936, 2001)。本明細書に記載されるようなホスホケトラゼペプチド活性を有すると同定される任意のポリペプチドは、本発明で使用するのに適する。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、キシルロース-5-リン酸から、グリセルアルデヒド-3-リン酸およびアセチルリン酸への変換を触媒する。その他の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、フルクトース-6-リン酸から、エリスロース-4-リン酸およびアセチルリン酸への変換を触媒する。なおも別の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、セドヘプツロース-7-リン酸からリボース-5-リン酸およびアセチルリン酸への変換を触媒できる。なおも別の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、キシルロース-5-リン酸からグリセルアルデヒド-3-リン酸およびアセチルリン酸への変換、および／またはフルクトース-6-リン酸からエリスロース-4-リン酸およびアセチルリン酸への変換、および／またはセドヘプツロース-7-リン酸からリボース-5-リン酸およびアセチルリン酸への変換を触媒する。

【0161】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、ホスホケトラゼ核酸は、本明細書に記載されるホスホケトラゼ核酸配列のいずれかと、少なくとも約99%、98%、97

10

20

30

40

50

%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号52のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、シェewanella・バルチカ (*Shewanella baltica*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号53のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号54のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ラクトバチルス・クリスパタス (*Lactobacillus crispatus*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号55のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号56のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号57のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号58のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号59のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号60のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、バークホルデルリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号61のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号62のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列

10

20

30

40

50

番号63のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、シズサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号64のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号65のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号66のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、シアノセイス属 (*Cyanothecce*) 種によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号67のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号68のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号69のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号70のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号71のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号72のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。

いくつかの実施形態では、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号73のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*) ホスホクトラーゼ遺伝子によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号74および76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%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、テト

10

20

30

40

50

ラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号75のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、マイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号77のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号78のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号79のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号80のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、キングセラ・オラリス (*Kingella oralis*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号81のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号82のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、グラニュリカタセラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号83のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号84のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号85のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号86のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号87のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%

10

20

30

40

50

、87%、86%、または87%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号88のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または88%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、キングラ・キングア (*Kingella kingae*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号89のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*) ホスホクトラーゼ遺伝子によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号90および91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%、または85%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、マイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) によってコードされるホスホクトラーゼ核酸は、配列番号92のホスホクトラーゼ遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または92%の配列同一性を有し得る。

【0162】

いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号1によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または65%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、シェワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号2によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、または70%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号3によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、または70%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号4によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、または70%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号5によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または65%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号6によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、または70%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホ

10

20

30

40

50

ケトラゼポリペプチドは、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種
 ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号7によってコードされるホスホケトラゼポリ
 ペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、
 92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、
 70%、65%、または60%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホス
 ホケトラゼポリペプチドは、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus*
faecium) ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号8によってコードされる
 ホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95
 %、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85
 %、80%、75%、70%、または65%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形
 態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella* *mi*
croti) ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号9によってコードされるホスホ
 ケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、9
 5%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、8
 0%、75%、または70%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホ
 ケトラゼポリペプチドは、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus*
salivarius) ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号10によってコー
 ドされるホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96
 %、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86
 %、85%、80%、75%、70%、65%、または60%の配列同一性を有し得る。
 いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、ストレプトコッカス・アガ
 ラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*) ホスホケトラゼア
 ミノ酸配列：配列番号11によってコードされるホスホケトラゼポリペプチドと、少
 なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、
 90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または6
 5%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチ
 ドは、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*
) ホスホケトラゼアミノ酸配列番号12によってコードされるホスホケトラゼポリペ
 プチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、9
 2%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、7
 0%、または65%の配列同一性を有し得る。
 いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、バークホルデリア・ゼノボ
 ランス (*Burkholderia xenovorans*) ホスホケトラゼアミノ酸
 配列番号13によってコードされるホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99
 %、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89
 %、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または65%の配列同
 一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、マイコバ
 クテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellu*
lare) ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号14によってコードされるホスホケ
 トラゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95
 %、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80
 %、75%、70%、65%、または60%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形
 態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*
) 種ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号15によってコードされるホスホケトラ
 ゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、
 93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、
 75%、70%、65%、または60%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態で
 は、ホスホケトラゼポリペプチドは、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosac*
charomyces pombe) ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号16に
 よってコードされるホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、9

10

20

30

40

50

7 %、96 %、95 %、95 %、93 %、92 %、91 %、90 %、89 %、88 %、87 %、86 %、85 %、80 %、75 %、70 %、65 %、60 %、55 %、または50 %の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) ホスホケトラゼアミノ酸配列番号17によってコードされるホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、95 %、93 %、92 %、91 %、90 %、89 %、88 %、87 %、86 %、85 %、80 %、75 %、または70 %の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号18によってコードされるホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、95 %、93 %、92 %、91 %、90 %、89 %、88 %、87 %、86 %、85 %、80 %、75 %、70 %、65 %、60 %、55 %、または50 %の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号19によってコードされるホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、95 %、93 %、92 %、91 %、90 %、89 %、88 %、87 %、86 %、85 %、80 %、75 %、70 %、または65 %の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*) ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号20によってコードされるホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、95 %、93 %、92 %、91 %、90 %、89 %、88 %、87 %、86 %、85 %、80 %、75 %、70 %、65 %、60 %、55 %、または50 %の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号21によってコードされるホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、95 %、93 %、92 %、91 %、90 %、89 %、88 %、87 %、86 %、85 %、80 %、75 %、70 %、65 %、または60 %の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、ネオサルトリヤ・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) ホスホケトラゼアミノ酸配列番号22によってコードされるホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、95 %、93 %、92 %、91 %、90 %、89 %、88 %、87 %、86 %、85 %、80 %、75 %、または70 %の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号23によってコードされるホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、95 %、93 %、92 %、91 %、90 %、89 %、88 %、87 %、86 %、85 %、80 %、75 %、70 %、または65 %の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*) ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号24によってコードされるホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、95 %、93 %、92 %、91 %、90 %、89 %、88 %、87 %、86 %、85 %、80 %、75 %、70 %、または65 %の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号25によってコードされるホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、95 %、93 %、92 %、91 %、90 %、89 %、88 %、87 %、86 %、85 %、80 %、75 %、70 %、または65 %の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma*

10

20

30

40

50

plasma alligatoris) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号 26 によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または 65% の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号 27 によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または 65% の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号 28 によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または 65% の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号 29 によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または 65% の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号 30 によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または 65% の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、マイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号 31 によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または 65% の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号 32 によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または 65% の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号 33 によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または 65% の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号 34 によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または 65% の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号 35 によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、8

10

20

30

40

50

7%、86%、85%、80%、75%、70%、または65%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号36によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または65%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、グラニュリカタセラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号37によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または65%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号38によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または65%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号39によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または65%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号40によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または65%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドはエレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号41によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または65%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドはアエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号42によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または65%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、キングセラ・キングアエ (*Kingella kingae*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号43によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または65%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号44によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または65%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*) ホスホクトラーゼアミノ酸配列：配列番号45によってコードされるホスホクトラーゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、

10

20

30

40

50

97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、
 87%、86%、85%、80%、75%、70%、または65%の配列同一性を有し得
 る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、マイコプラズマ・コラ
 ンビナム (*Mycoplasma columbinum*) ホスホケトラゼアミノ酸配
 列：配列番号46によってコードされるホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約
 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、
 89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、70%、または65%の配
 列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、バー
 クホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*) ホスホケトラゼアミノ酸配列番号47によってコードされるホスホケトラゼポリ
 ペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%
 、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%
 、または70%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラゼポリ
 ペプチドは、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号48によってコードされるホスホケトラ
 ゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、
 93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、80%、
 75%、または70%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、ホスホケトラ
 ゼポリペプチドは、ビフィドバクテリウム・ガリウム (*Bifidobacterium gallicum*) ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号49によってコードさ
 れるホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、
 95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、
 85%、80%、75%、または70%の配列同一性を有し得る。いくつかの実施形態で
 は、ホスホケトラゼポリペプチドは、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*) ホスホケトラゼアミノ酸配列：配列番号50
 によってコードされるホスホケトラゼポリペプチドと、少なくとも約99%、98%、
 97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、
 87%、86%、85%、80%、75%、または70%の配列同一性を有し得る。いく
 つかの実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、と、ビフィドバクテリウム・ビ
 フィダム (*Bifidobacterium bifidum*) ホスホケトラゼアミノ
 酸配列：配列番号51によってコードされるホスホケトラゼポリペプチド少なくとも約
 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、
 89%、88%、87%、86%、85%、80%、75%、または70%の配列同一性
 を有し得る。

【0163】

本明細書で使用し得るホスホケトラゼ酵素の追加的な例は、特にホスホケトラゼ酵
 素に関する全ての開示に関して、参照によって本明細書に援用する、米国特許第7, 78
 5, 858号明細書および国際公開第2011/159853号パンフレットに記載され
 る。

【0164】

いくつかの態様では、本明細書で提供されるのは、ホスホケトラゼ経路を通過する炭
 素流を増大できる組換え細胞であって、組換え細胞は、本明細書に記載されるように、ホ
 スホケトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなる。いく
 つかの実施形態では、ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチドは、バークホルデリア
 ・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラク
 トバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバ
 クテリウム・ガリウム (*Bifidobacterium gallicum*)、ビフィ
 ドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビ
 フィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)
 、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium ac*

10

20

30

40

50

etobutylicum) から単離される。その他の態様では、ホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドは、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデルア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離される。その他の態様では、ホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドは、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離される。なおも別の態様では、ホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチドは、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングア (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコ

10

20

30

40

50

プラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離される。

【0165】

本明細書の実施形態のいずれにおいても、組換え細胞は、リボース-5-リン酸イソメラーゼ (rpiA および/または rpiB)、D-リブロース-5-リン酸-3-エピメラーゼ (rpe)、トランスケトラーゼ (tktA および/または tktB)、トランスアルドラーゼ B (talB)、リン酸アセチルトランスフェラーゼ (pta および/または eutD) からなる群から選択される遺伝子の活性の1つまたは複数を増大させるように、さらに操作し得る。別の実施形態では、組換え細胞は、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (zwf)、6-ホスホフルクトキナーゼ-1 (pfkA および/または pfkB)、フルクトース二リン酸アルドラーゼ (fba、fbaA、fbaB、および/または fbaC)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (gapA および/または gapB)、酢酸キナーゼ (ackA)、クエン酸シンターゼ (gltA)、E I (ptsI)、E I I C B^{G1c} (ptsG)、E I I A^{G1c} (crr)、および/または HPr (ptsH) をはじめとする遺伝子の1つまたは複数の遺伝子の活性を低下させるように、さらに操作し得る。

【0166】

組換え細胞を使用して増大した量のアセチル CoA およびアセチル由来代謝産物を生産する方法

本明細書でまた提供されるのは、アセチル CoA を生産する方法である。いくつかの態様では、アセチル CoA を生産する方法は、(a) 本明細書に記載されるようなホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流が増大するように操作された、アセチル CoA を産生できる組換え細胞 (上述の組換え細胞のいずれかをはじめとする) またはそれらの子孫を含んでなる組成物を培養するステップと; (b) メバロン酸を生産するステップとを含んでなる。いくつかの態様では、アセチル CoA を生産する方法は、アセチル CoA の生産に適した条件下で、本明細書に記載される組換え細胞のいずれかを培養して、組換え細胞にアセチル CoA を産生させるステップを含んでなる。いくつかの態様では、アセチル CoA を生産する方法は、アセチル CoA を回収するステップをさらに含んでなる。

【0167】

本明細書に記載されるように、アセチル CoA を生産する方法は、(a) ホスホケトラーゼポリペプチドを内在性に発現しない、(大腸菌 (*E. coli*) 細胞をはじめとするが、これに限定されるものではない) 組換え細胞を培養するステップであって、細胞が、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする、遺伝子の1つまたは複数のコピーを異種性に発現するステップと; (b) アセチル CoA を生産するステップとを含んでなる。特定の実施形態では、組換え細胞は、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および/またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホケトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シェewanella・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ

(*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothece*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、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*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングア (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criqueti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。

いくつかの実施形態では、組換え細胞は、表1、表2および／または図面3～24に列挙される生物から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、実施例7に記載されるようにして、生体内スクリーニングアッセイから同定されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。さらに組換え細胞は、細胞を最少培

10

20

30

40

50

地中で培養した際に、バークホルデリア・フィトフィルムス (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallicum*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothece*) 種、ネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、マイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングセラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urina*

10

20

30

40

50

e)、キングラ・キングア (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) からのホスホケトラゼポリペプチドをコードする遺伝子の1つまたは複数の異種コピーを欠く同一細胞を上回る濃度で、アセチルCoAを産生し得る。特定の実施形態では、本明細書に記載されるホスホケトラゼポリペプチドをコードする異種核酸の1つまたは複数のコピーは、宿主細胞の染色体に組み込まれた異種核酸である。

【0168】

本明細書でまた提供されるのは、アセチルCoA由来代謝産物を生産する方法である。いくつかの態様では、アセチルCoA由来代謝産物を生産する方法は、(a) 本明細書に記載されるようなホスホケトラゼ経路を通過する炭素流が増大するように操作された、アセチルCoA由来代謝産物を産生できる組換え細胞 (上述の組換え細胞のいずれかをはじめとする) またはそれらの子孫を含んでなる組成物を培養するステップと; (b) メバロン酸を生産するステップとを含んでなる。いくつかの態様では、アセチルCoA由来代謝産物を生産する方法は、アセチルCoA由来代謝産物の生産に適した条件下で、本明細書に記載される組換え細胞のいずれかを培養して、組換え細胞にアセチルCoA由来代謝産物を産生させるステップとを含んでなる。いくつかの態様では、アセチルCoAを生産する方法は、アセチルCoA由来代謝産物を回収するステップをさらに含んでなる。

【0169】

本明細書に記載されるように、アセチルCoA由来代謝産物を生産する方法は、(a) ホスホケトラゼポリペプチドを内在性に発現しない、(大腸菌 (*E. coli*) 細胞をはじめとするが、これに限定されるものではない) 組換え細胞を培養するステップであって、細胞がホスホケトラゼポリペプチドをコードする、遺伝子の1つまたは複数のコピーを異種性に発現するステップと; (b) アセチルCoA由来代謝産物を生産するステップとを含んでなる。特定の実施形態では、組換え細胞は、バークホルデリア・フィトフィルマンス (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallicum*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパタス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレブ

10

20

30

40

50

トミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。

いくつかの実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングアエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、表1、表2および／または図面3～24に列挙される生物から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、実施例7に記載されるようにして、生体内スクリーニングアッセイから同定されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。さらに組換え細胞は、細胞を最少培地中で培養した際に、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus r*

10

20

30

40

50

hamnosus)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothece*) 種、ネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、マイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングアエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) からのホスホケトラゼポリペプチドをコードする遺伝子の1つまたは複数の異種コピーを欠く同一細胞を上回る濃度で、アセチルCoA由来代謝産物を産生し得る。特定の実施形態では、本明細書に記載されるホスホケトラゼポリペプチドをコードする異種核酸の1つまたは複数のコピーは、宿主細胞の染色体に組み込まれた異種核酸である。

本明細書の実施形態のいずれかでは、アセチルC o A由来代謝産物は、ポリケチド、ポリヒドロキシ酪酸、脂肪アルコール、または脂肪酸の1つまたは複数であり得る。本明細書の実施形態のいずれかでは、アセチルC o A由来代謝産物は、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、アスパラギン、プロリン、アルギニン、メチオニン、スレオニン、システイン、リジン、ロイシン、およびイソロイシンからなる群から選択されるアミノ酸の1つまたは複数であり得る。いくつかの実施形態では、アセチルC o A由来代謝産物は、コハク酸である。本明細書の実施形態のいずれかでは、アセチルC o A由来代謝産物は、アセトン、イソプロパノール、イソブテン、またはプロペンの1つまたは複数であり得る。

【0171】

本明細書でまた提供されるのは、ホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、アセチルC o A由来代謝産物を生産するステップとを含んでなる、アセチルC o A由来代謝産物を生産する方法であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトラーゼ活性を有して配列番号8と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i)のホスホケトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、(a) グルコース上の細胞増殖、(b) キシロース上の細胞増殖、(c) 細胞内アセチルリン酸の産生、または(d) グルコース-6-リン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号23と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号24と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号25と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号27と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号28と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号29と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号30と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号31と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチド(例えばE. ガリナラム(E. gallinarum)からのホスホケトラーゼ)と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3.2を超える、3.4を超える、3.6を超える、3.8を超える、4を超える、4.2を超える、4.4を超える、4.6を超える、4.8を超える、5を超える、5.2を超える、5.4を超える、5.6を超える、5.8を超える、6を超える、6.2を超える、6.4を超える、6.6を超える、6.8を超える、7を超える、7.2を超える、7.4を超える、7.6を超える、7.8を超える、8を超える、8.2を超える、8.4を超える、8.6を超える、8.8、9を超える、9.2を超える、9.4を超える、9.6を超える、9.8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~0.5、約0.25~0.75、約0.5~1、約0.75~1.25、約1~1.5、約1.25~1.75、約1.5~2、約1.75~2.25、約2~2.5、約2.25~2.75、約2.5~3、約2.75~3.25、約3~3.5、約3.25~3.75、約3.5~4、約3.75~4.25、約4~4.5、約4.25~4.75、約

10

20

30

40

50

4. 5～5、約4. 75～5. 25、約5～5. 5、約5. 25～5. 75、約5. 5～6、約6. 25～6. 75、約6. 5～7、約6. 75～7. 25、約7～7. 5、約7. 75～8. 25、約8～8. 5、約8. 25～8. 75、約8. 5～9、約8. 75～9. 25、約9～9. 5、約9. 25～9. 75、または約9. 5～10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1～2、約1～3、約2～4、約3～5、約4～6、約5～7、約6～8、約7～9、または約8～10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナラム (E. gallinarum) からのホスホクトラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

10

【0172】

本明細書でさらに提供されるのは、ホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、アセチルCoA由来代謝産物を生産するステップとを含んでなる、アセチルCoA由来代謝産物を生産する方法であって、組換え細胞は、(i) ホスホクトラーゼ活性を有して配列番号8と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホクトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドは、(a) タンパク質溶解度、(b) タンパク質発現、または(c) フルクトースー6ーリン酸(F6P)比活性のパラメータの1つまたは複数で、1. 0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号23と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号24と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号25と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号27と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号28と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号29と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号30と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号31と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチド(例えばE. ガリナラム (E. gallinarum) からのホスホクトラーゼ)と比較して、1. 1を超えるなど、1. 2を超えるなど、1. 4を超える、1. 6を超える、1. 8を超える、2を超える、2. 2を超える、2. 4を超える、2. 6を超える、2. 8を超える、3を超える、3. 2を超える、3. 4を超える、3. 6を超える、3. 8を超える、4を超える、4. 2を超える、4. 4を超える、4. 6を超える、4. 8を超える、5を超える、5. 2を超える、5. 4を超える、5. 6を超える、5. 8を超える、6を超える、6. 2を超える、6. 4を超える、6. 6を超える、6. 8を超える、7を超える、7. 2を超える、7. 4を超える、7. 6を超える、7. 8を超える、8を超える、8. 2を超える、8. 4を超える、8. 6を超える、8. 8、9を超える、9. 2を超える、9. 4を超える、9. 6を超える、9. 8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1～0. 5、約0. 25～0. 75、約0. 5～1、約0. 75～1. 25、約1～1. 5、約1. 25～1. 75、約1. 5～2、約1. 75～2. 25、約2～2. 5、約2. 25～2. 75、約2. 5～3、約2. 75～3. 25、約3～3. 5、約

20

30

40

50

3.25~3.75、約3.5~4、約3.75~4.25、約4~4.5、約4.25~4.75、約4.5~5、約4.75~5.25、約5~5.5、約5.25~5.75、約5.5~6、約6.25~6.75、約6.5~7、約6.75~7.25、約7~7.5、約7.75~8.25、約8~8.5、約8.25~8.75、約8.5~9、約8.75~9.25、約9~9.5、約9.25~9.75、または約9.5~10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~2、約1~3、約2~4、約3~5、約4~6、約5~7、約6~8、約7~9、または約8~10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム (*E. gallinarum*) からのホスホケトラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0173】

本明細書でさらに提供されるのは、ホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、アセチルCoA由来代謝産物を生産するステップとを含んでなる、アセチルCoA由来代謝産物を生産する方法であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトラーゼ活性を有して配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホケトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、(a) グルコース上の細胞増殖、(b) キシロース上の細胞増殖、(c) 細胞内アセチルリン酸の産生、または(d) グルコース-6-リン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号32と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号33と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号34と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号35と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号36と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号37と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号38と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号39と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号40と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号41と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号42と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号43と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号44と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号45と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号46と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチド(例えばE. ガリナーラム (*E. gallinarum*) からのホスホケトラーゼ)と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3.2を超える、3.4を超える、3.6を超える、3.8を超える、4を超える、4.2を超える、4.4を超える、4.6を超える、4.8を超える、5を超える、5.2を超える、5.4を超える、5.6を超える、5.8を超える、6を超える、6.2を超える、6.4を超える、6.6を超える、6.8を超える、7を超える、7.2を超える、7.4を超える、7.6を超える、7.8を超

10

20

30

40

50

える、8を超える、8.2を超える、8.4を超える、8.6を超える、8.8、9を超える、9.2を超える、9.4を超える、9.6を超える、9.8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~0.5、約0.25~0.75、約0.5~1、約0.75~1.25、約1~1.5、約1.25~1.75、約1.5~2、約1.75~2.25、約2~2.5、約2.25~2.75、約2.5~3、約2.75~3.25、約3~3.5、約3.25~3.75、約3.5~4、約3.75~4.25、約4~4.5、約4.25~4.75、約4.5~5、約4.75~5.25、約5~5.5、約5.25~5.75、約5.5~6、約6.25~6.75、約6.5~7、約6.75~7.25、約7~7.5、約7.75~8.25、約8~8.5、約8.25~8.75、約8.5~9、約8.75~9.25、約9~9.5、約9.25~9.75、または約9.5~10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~2、約1~3、約2~4、約3~5、約4~6、約5~7、約6~8、約7~9、または約8~10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナラム (E. gallinarum) からのホスホクトラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0174】

本明細書でさらに提供されるのは、ホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、アセチルCoA由来代謝産物を生産するステップとを含んでなる、アセチルCoA由来代謝産物を生産する方法であって、組換え細胞は、(i) ホスホクトラーゼ活性を有して配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii) 完全MV A経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホクトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドは、(a) タンパク質溶解度、(b) タンパク質発現、または(c) フルクトース-6-リン酸 (F6P) 比活性のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号32と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号33と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号34と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号35と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号36と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号37と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号38と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号39と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号40と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号41と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号42と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号43と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号44と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号45と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号46と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。そ

10

20

30

40

50

の他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチド（例えばE. ガリナーラム（E. gallinarum）からのホスホケトラゼ）と比較して、1. 1を超えるなど、1. 2を超えるなど、1. 4を超える、1. 6を超える、1. 8を超える、2を超える、2. 2を超える、2. 4を超える、2. 6を超える、2. 8を超える、3を超える、3. 2を超える、3. 4を超える、3. 6を超える、3. 8を超える、4を超える、4. 2を超える、4. 4を超える、4. 6を超える、4. 8を超える、5を超える、5. 2を超える、5. 4を超える、5. 6を超える、5. 8を超える、6を超える、6. 2を超える、6. 4を超える、6. 6を超える、6. 8を超える、7を超える、7. 2を超える、7. 4を超える、7. 6を超える、7. 8を超える、8を超える、8. 2を超える、8. 4を超える、8. 6を超える、8. 8、9を超える、9. 2を超える、9. 4を超える、9. 6を超える、9. 8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1～0. 5、約0. 25～0. 75、約0. 5～1、約0. 75～1. 25、約1～1. 5、約1. 25～1. 75、約1. 5～2、約1. 75～2. 25、約2～2. 5、約2. 25～2. 75、約2. 5～3、約2. 75～3. 25、約3～3. 5、約3. 25～3. 75、約3. 5～4、約3. 75～4. 25、約4～4. 5、約4. 25～4. 75、約4. 5～5、約4. 75～5. 25、約5～5. 5、約5. 25～5. 75、約5. 5～6、約6. 25～6. 75、約6. 5～7、約6. 75～7. 25、約7～7. 5、約7. 75～8. 25、約8～8. 5、約8. 25～8. 75、約8. 5～9、約8. 75～9. 25、約9～9. 5、約9. 25～9. 75、または約9. 5～10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1～2、約1～3、約2～4、約3～5、約4～6、約5～7、約6～8、約7～9、または約8～10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム（E. gallinarum）からのホスホケトラゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0175】

ホスホケトラゼポリペプチドとMV A経路の1つまたは複数のポリペプチドとを発現する組換え細胞

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および特定の細菌に存在する、主要代謝経路である。タンパク質プレニル化、細胞膜保守、タンパク質固着、およびN-グリコシル化などの多様なプロセスで使用される分子の生成に重要であるのに加えて、メバロン酸経路は、テルペン、テルペノイド、イソプレノイド、およびイソプレノ生合成のための基礎原料の役割を果たす、イソプレノイド前駆体分子DMA PPおよびIPPの主要な供給源を提供する。

【0176】

完全MV A経路は、上流および下流経路の2つのグループに細分化し得る。MV A経路の上流部分では、（a）（i）チオラーゼ活性または（i i）アセトアセチルCoAシンターゼ活性、（b）HMG-CoA還元酵素活性、および（c）HMG-CoAシンターゼ酵素活性のいずれかを有するポリペプチドの作用によって、細胞代謝中に生成されたアセチルCoAがメバロン酸に変換される。最初に、アセチルCoAが、チオラーゼまたはアセトアセチルCoAシンターゼ（アセチルCoAおよびマロニルCoAを使用する）の作用によって、アセトアセチルCoAに変換される。次に、アセトアセチルCoAが、HMG-CoAシンターゼの酵素作用によって、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoA（HMG-CoA）に変換される。このCoA誘導体は、HMGCoA還元酵素によ

ってメバロン酸に還元され、これはイソプレノイド生産のメバロン酸経路の律速段階である。下流MVA経路では、メバロン酸は、次にメバロン酸キナーゼ作用によって、メバロン酸5-リン酸に変換され、それは引き続いてホスホメバロン酸キナーゼの酵素活性によって、5-ジホスホメバロン酸に変換される。最後に、メバロン酸5-ピロリン酸デカルボキシラーゼ酵素の活性によって、5-ジホスホメバロン酸からIPPが生成される。

【0177】

したがって特定の実施形態では、本発明の組換え細胞は、MVA経路を通じて、メバロン酸、イソプレノイド前駆体、イソプレンまたはイソプレノイドを産生する能力を有する組換え細胞であって、組換え細胞は、(i) キシルロース-5-リン酸からグリセルアルデヒド-3-リン酸およびアセチルリン酸を合成する能力があるホスホケトラーゼをコードする、異種遺伝子、(ii) 1つまたは複数のMVAポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種遺伝子、および(iii) 宿主細胞内における、アセトアセチルCoAからのメバロン酸、イソプレノイド前駆体、イソプレンまたはイソプレノイドの合成を可能にする、メバロン酸、イソプレノイド前駆体、またはイソプレンまたはイソプレノイド生合成に関与する1つまたは複数の異種遺伝子を含んでなる。別の実施形態では、本発明の組換え細胞は、(i) フルクトース6-リン酸からエリスロース4-リン酸およびアセチルリン酸を合成する能力があるホスホケトラーゼをコードする、異種遺伝子、(ii) 1つまたは複数のMVAポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種遺伝子、および(iii) 宿主細胞内における、アセトアセチルCoAからのメバロン酸、イソプレノイド前駆体、イソプレンまたはイソプレノイドの合成を可能にする、メバロン酸、イソプレノイド前駆体、イソプレンまたはイソプレノイド生合成に関与する1つまたは複数の異種遺伝子を含んでなる、メバロン酸、イソプレノイド前駆体、イソプレンまたはイソプレノイドを産生する能力を有する組換え細胞である。

【0178】

上流MVA経路ポリペプチド

MVA経路の上流部分は、(a) (i) チオラーゼ活性または(ii) アセトアセチルCoA合成活性、(b) HMG-CoA還元酵素、および(c) HMG-CoAシンターゼ酵素活性のいずれかを有するポリペプチドの作用によって、メバロン酸に変換される最初の基質として、細胞代謝中に生じるアセチルCoAを使用する。最初に、アセチルCoAが、チオラーゼまたはアセトアセチルCoAシンターゼ（アセチルCoAおよびマロニルCoAを利用する）の作用によって、アセトアセチルCoAに変換される。次に、アセトアセチルCoAは、HMG-CoAシンターゼの酵素作用によって、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoA（HMG-CoA）に変換される。このCoA誘導体は、HMG-CoA還元酵素によってメバロン酸に還元され、これはイソプレノイド生成のメバロン酸経路の律速段階である。

【0179】

上流MVA経路ポリペプチドの非限定的例としては、アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ（AA-CoAチオラーゼ）ポリペプチド、アセトアセチルCoAシンターゼポリペプチド、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoAシンターゼ（HMG-CoAシンターゼ）ポリペプチド、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoA還元酵素（HMG-CoA還元酵素）ポリペプチドが挙げられる。上流MVA経路ポリペプチドとしては、上流MVA経路ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。例示的な上流MVA経路核酸としては、上流MVA経路ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的なMVA経路ポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する、天然ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。したがって、上流MVA経路ポリペプチドをコードする任意の遺伝子を、本発明で使用し得ることが、本明細書で検討される。

【0180】

特定の実施形態では、*L. grayi* (*L. grayi*)、*E. faecium* (*E. faecium*)、*E. gallinarum* (*E. gallinarum*)、*E. casseliflavus* (*E. casseliflavus*) および／または *E. faecalis* (*E. faecalis*) からの *mvaE* および *mvaS* 遺伝子の様々な選択肢が、単独で、または上流 *MVA* 経路からの 1 つまたは複数のタンパク質をコードするその他の *mvaE* および *mvaS* 遺伝子との組み合わせで、本発明の範囲内で検討される。別の実施形態では、本発明の範囲内で、(i) 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA シンターゼ (*HMG-CoA* シンターゼ) ポリペプチドおよび 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA 還元酵素 (*HMG-CoA* 還元酵素) ポリペプチドをコードする 1 つまたは複数のその他の遺伝子との組み合わせで、アセトアセチル-CoA シンターゼ遺伝子が検討される。したがって、特定の態様では、本明細書に記載される方法のいずれかにおいて、本明細書で検討される遺伝子組み合わせのいずれかを組換え細胞内で発現させ得る。

10

【0181】

本明細書で使用する上流 *MVA* 経路ポリペプチドの追加的な非限定的例は、国際公開第 2009/076676 号パンフレット；国際公開第 2010/003007 号パンフレット、および国際公開第 2010/148150 号パンフレットに記載される。

【0182】

mvaE および *mvaS* ポリペプチドをコードする遺伝子

特定の実施形態では、*L. grayi* (*L. grayi*)、*E. faecium* (*E. faecium*)、*E. gallinarum* (*E. gallinarum*)、*E. casseliflavus* (*E. casseliflavus*) および／または *E. faecalis* (*E. faecalis*) からの *mvaE* および *mvaS* 遺伝子の様々な選択肢が、単独で、または上流 *MVA* 経路からの 1 つまたは複数のタンパク質をコードするその他の *mvaE* および *mvaS* 遺伝子との組み合わせで、本発明の範囲内で検討される。*L. grayi* (*L. grayi*)、*E. faecium* (*E. faecium*)、*E. gallinarum* (*E. gallinarum*)、*E. casseliflavus* (*E. casseliflavus*)、および *E. faecalis* (*E. faecalis*) 中で、*mvaE* 遺伝子は、チオラーゼおよび *HMG-CoA* 還元酵素活性の双方を持つポリペプチドをコードする。事実上、*mvaE* 遺伝子産物は、真正細菌中で発見された最初の *IPP* 生合成の二機能性酵素、および天然で別のタンパク質に融合する *HMG-CoA* 還元酵素の最初の例に相当する (*Hedl, et al., J. Bacteriol.* 2002 年 4 月; 184 (8): 2116-2122)。他方、*mvaS* 遺伝子は、*HMG-CoA* シンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする。

20

30

【0183】

したがって、組換え細胞 (例えば、大腸菌 (*E. coli*) は、*L. grayi* (*L. grayi*)、*E. faecium* (*E. faecium*)、*E. gallinarum* (*E. gallinarum*)、*E. casseliflavus* (*E. casseliflavus*) および／または *E. faecalis* (*E. faecalis*) からの 1 つまたは複数の *mvaE* および *mvaS* 遺伝子を発現して、メバロン酸を産生するように改変し得る。1 つまたは複数の *mvaE* および *mvaS* 遺伝子は、マルチコピープラスミド上で発現させ得る。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、または中程度コピー数プラスミドであり得る。代案としては、1 つまたは複数の *mvaE* および *mvaS* 遺伝子は、宿主細胞の染色体に組み込み得る。プラスミド上の、または宿主細胞の染色体に組み込まれた部分としての双方の、1 つまたは複数の *mvaE* および *mvaS* 遺伝子の異種性発現で、遺伝子の発現は、誘導性プロモーターまたは構成的発現プロモーターのどちらかによって駆動され得る。プロモーターは、1 つまたは複数の *mvaE* および *mvaS* 遺伝子発現の強力な駆動機構であり得て、それは発現の弱い駆動機構であり得て、またはそれは発現の中程度の駆動機構であり得る。

40

【0184】

例示的な *mvaE* ポリペプチドおよび核酸

50

m v a E 遺伝子は、チオラーゼおよび H M G - C o A 還元酵素活性の双方を持つポリペプチドをコードする。m v a E 遺伝子によってコードされるポリペプチドのチオラーゼ活性が、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、ポリペプチドの H M G - C o A 還元酵素の酵素活性は、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。例示的な m v a E ポリペプチドおよび核酸としては、m v a E ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸、ならびに本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する変異ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。

【0185】

変異 m v a E ポリペプチドとしては、m v a E ポリペプチド活性（すなわちアセチル C o A をアセトアセチル C o A に変換する能力、ならびに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）を保ちながら、その中で1つまたは複数のアミノ酸残基がアミノ酸置換を受けたものが挙げられる。アミノ酸置換は、保存的または非保存的であり得て、このような置換アミノ酸残基は、遺伝コードによってコードされ得て、またはコードされ得ない。標準的な20のアミノ酸「アルファベット」が、それらの側鎖類似性に基づいて、化学物質ファミリーに分類されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β-分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）のあるアミノ酸が挙げられる。「保存的アミノ酸置換」は、その中でアミノ酸残基が、化学的に類似した側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものである（すなわち塩基性側鎖を有するアミノ酸が、塩基性側鎖を有する別のアミノ酸で置換される）。「非保存的アミノ酸置換」は、その中でアミノ酸残基が、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ものである（すなわち塩基性側鎖を有するアミノ酸が、芳香族側鎖を有する別のアミノ酸で置換される）。

【0186】

m v a E ポリペプチド内にアミノ酸置換を導入して、分子の機能性を改善し得る。例えば、基質に対する m v a E ポリペプチドの結合親和性を増大させ、またはアセチル C o A をアセトアセチル C o A に変換する能力および／または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能力を改善するアミノ酸置換を m v a E ポリペプチドに導入し得る。いくつかの態様では、変異 m v a E ポリペプチドは、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換を含有する。

【0187】

一態様では、メバロン酸、イソプレノイド前駆体、イソプレン、および／またはイソプレノイドを生成するために、分解されないまたは分解を起こしにくい m v a E タンパク質を使用し得る。使用し得る、分解されないまたは分解を起こしにくい m v a E の遺伝子産物の例としては、生物 E. faecium (E. faecium)、E. gallinarum (E. gallinarum)、E. casseliflavus (E. casseliflavus)、E. faecalis (E. faecalis)、および L. grayi (L. grayi) からのものが挙げられるが、これに限定されるものではない。当業者は、任意の標準的分子生物学的技術によって、大腸菌 (E. coli) BL21 (DE3) 中で m v a E タンパク質を発現させて、断片の不在を探し得る。例えば、断片の不在は、His タグ媒介精製に続いて、Saferestain 染色された SDS-PAGE ゲル上で同定し得て、またはメバロン酸、イソプレン、またはイソプレノイド産生大腸菌 (E. coli) BL21 内で発現される場合は、本明細書に記載される検出方法を使用して同定し得る。

【0188】

Hedl et al., (J Bacteriol. 2002年4月; 184 (8))

10

20

30

40

50

：2116-2122）に記載されるものなどの標準法を使用して、アセトアセチルCoAチオラーゼならびにHMG-CoA還元酵素活性を測定することで、ポリペプチドがmvaE活性を有するかどうかを判定し得る。例示的なアッセイでは、アセトアセチルCoAチオラーゼ活性が、分光光度計によって測定され、アセトアセチルCoAの形成またはチオ開裂に伴う302nmにおける吸光度の変化が、モニターされる。アセトアセチルCoAの合成を判定するための各反応の標準アッセイ条件は、1mMのアセチルCoA、10mMのMgCl₂、50mMのトリス、pH10.5であり、反応は酵素の添加によって開始される。アッセイは、200μlの最終容量を採用し得る。アッセイでは、1酵素単位（eu）が、1分間の1μmolアセトアセチルCoA中の合成またはチオ開裂に相当する。別の例示的なアッセイでは、分光光度計によって、340nmにおけるNADP（H）の出現または消失によって、HMG-CoA還元酵素活性をモニターし得る。HMG-CoAのメバロン酸への還元脱アシル化を示すために測定される各反応の標準アッセイ条件は、0.4mMのNADPH、1.0mMの（R，S）-HMG-CoA、100mMのKCl、および100mMのK_xPO₄、pH6.5である。アッセイは、200μlの最終容量を採用する。反応は、酵素を添加することで開始される。アッセイでは、1euは、1分間の1μmolのNADP（H）中の代謝回転に相当する。これは、0.5μmolのHMG-CoAまたはメバロン酸の代謝回転に相当する。

【0189】

代案としては、組換え細胞内のメバロン酸の生成は、制限なしに、ガスクロマトグラフィー（米国特許出願公開第2005/0287655A1号明細書を参照されたい）またはHPLC（米国特許出願公開第2011/0159557号明細書A1を参照されたい）によって測定し得る。例示的なアッセイとして、1つまたは複数の抗生物質で補足されたLBブ罗斯を含有する振盪管に、培養物を接種して、34℃、250rpmで、14時間培養し得る。次に、1%グルコース、0.1%酵母抽出物、および200μMのIPTGで補足されたTM3培地を含有するウェルプレート内で、培養物を0.2の最終ODに希釈し得る。次にプレートをBreath Easierメンブレン（Diversified Biotech）で密封し、振盪機／インキュベーター内で、34℃、600rpmで24時間培養する。次に1mLの各培養物を3,000×gで5分間遠心分離する。次に上清を20%硫酸に添加して、氷上で5分間インキュベートする。次に混合物を3000×gで5分間遠心分離して、HPLC分析のために上清を収集する。サンプル中のメバロン酸濃度は、メバロン酸（Sigma）の標準曲線と比較することで判定される。グルコース濃度は、当該技術分野で公知のいずれかの方法に従って、グルコースオキシダーゼアッセイを実施することでさらに測定し得る。HPLCを使用して、各サンプルの屈折率応答と、既知濃度の様々なメバロン酸を含有する溶液を通過させて得られる検量線とを比較することにより、メバロン酸レベルを定量化し得る。

【0190】

例示的なmvaE核酸としては、mvaEポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的なmvaEポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸、ならびに本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する変異ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。例示的なmvaE核酸としては、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、エンテロコッカス・ファエカリス（*Enterococcus faecalis*）、および／またはエンテロコッカス・カセリフラブス（*Enterococcus casseliflavus*）から単離されたmvaE核酸が挙げられる。リステリア・グレイ（*Listeria grayi*）DSM 20601 mvaE遺伝子によってコードされるmvaE核酸は、配列番号95と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%

10

20

30

40

50

、88%、87%、86%、または85%の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 遺伝子によってコードされる mvaE 核酸は、配列番号96と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の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*) EG2mvaE 遺伝子によってコードされる mvaE 核酸は、配列番号97と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の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*) mvaE 遺伝子によってコードされる mvaE 核酸は、配列番号98と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*) mvaE 遺伝子によってコードされる mvaE 核酸は、以前、メバロン酸を産生する大腸菌 (*E. coli*) で開示された mvaE 遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る (米国特許出願公開第2005/0287655A1号明細書; Tabata, K. and Hashimoto, S. - I. *Biotechnology Letters* 26:1487-1491, 2004を参照されたい)。

【0191】

mvaE 核酸は、組換え細胞内で、マルチコピープラスミド上で発現させ得る。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、または中程度コピー数プラスミドであり得る。代案としては、mvaE 核酸は、宿主細胞の染色体に組み込み得る。プラスミド上の、または宿主細胞の染色体に組み込まれた部分としての双方の、mvaE 核酸の異種性発現で、核酸の発現は、誘導性プロモーターまたは構成的発現プロモーターのどちらかによって駆動され得る。プロモーターは、mvaE 核酸発現の強力な駆動機構であり得て、それは発現の弱い駆動機構であり得て、またはそれは発現の中程度の駆動機構であり得る。

【0192】

例示的な mvaS ポリペプチドおよび核酸

mvaS 遺伝子は、HMG-CoA シンターゼ活性を持つポリペプチドをコードする。このポリペプチドは、アセトアセチル CoA を 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA (HMG-CoA) に変換し得る。例示的な mvaS ポリペプチドおよび核酸としては、mvaS ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸、ならびに本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する変異ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。

【0193】

変異 mvaS ポリペプチドとしては、mvaS ポリペプチド活性 (すなわちアセトアセチル CoA を 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA に変換する能力) を保ちながら、その中で1つまたは複数のアミノ酸残基がアミノ酸置換を受けたものが挙げられる。mvaS ポリペプチドにアミノ酸置換を導入して、分子機能性を改善し得る。例えば、mvaS ポリペプチドの基質に対する結合親和性を増大させ、またはアセトアセチル CoA を 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA に変換する能力を改善するアミノ酸置換を、mvaS ポリペプチドに導入し得る。いくつかの態様では、変異 mvaS ポリペプチドは、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換を含有する。

【0194】

Quant et al. (*Biochem J.*, 1989, 262:159-164) に記載されるものなどの標準法を使用して、HMG-CoA シンターゼ活性を測定することで、ポリペプチドが mvaS 活性を有するかどうかを判定し得る。例示的なアッセ

イでは、303 nmにおける吸光度の変化をモニターすることで、アセトアセチルCoAのエノール形態の消失を分光光度的に測定することで、HMG-CoAシンターゼ活性をアッセイし得る。30℃で、50 mmのトリス/HCl、pH 8.0、10 mMのMgCl₂、および0.2 mMのジチオスレイトールを含有する、標準1 mlアッセイシステム；5 mM-アセチルリン酸、10, MアセトアセチルCoA、および5 μlの抽出物サンプルを添加し得て、アセチルCoA (100 μM) および10単位のPTAの同時添加がそれに続く。次にHMG-CoAシンターゼ活性をアセチルCoA添加前後の速度差として測定する。使用された条件下 (pH 8.0、10 mM-MgCl₂) におけるアセトアセチルCoAの吸収係数は、 $12.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。定義上、1単位の酵素活性は、1分あたり1 μmolのアセトアセチルCoAの変換を引き起こす。

10

【0195】

代案としては、組換え細胞内のメバロン酸の生成は、制限なしに、ガスクロマトグラフィー (米国特許出願公開第2005/0287655A1号明細書を参照されたい) またはHPLC (米国特許出願公開第2011/0159557号明細書A1を参照されたい) によって測定し得る。例示的なアッセイとして、培養物を、1つまたは複数の抗生物質で補足されたLBブロスを含有する振盪管に接種して、34℃、250 rpmで、14時間培養し得る。次に、1%グルコース、0.1%酵母抽出物、および200 μMのIPTGで補足されたTM3培地を含有するウェルプレート内で、培養物を0.2の最終ODに希釈し得る。次に、プレートをBreath Easierメンブレン (Diversified Biotech) で密封し、振盪機/インキュベーター内で、34℃、600 rpmで24時間培養する。次に、1 mLの各培養物を3,000×gで5分間遠心分離する。次に、上清を20%硫酸に添加して、氷上で5分間インキュベートする。次に、混合物を3000×gで5分間遠心分離して、HPLC分析のために上清を収集する。サンプル中のメバロン酸濃度は、メバロン酸 (Sigma) の標準曲線と比較することで判定される。グルコース濃度は、当該技術分野で公知のいずれかの方法に従って、グルコースオキシダーゼアッセイを実施することでさらに測定し得る。HPLCを使用して、各サンプルの屈折率応答と、既知濃度の様々なメバロン酸を含有する溶液を通過させて得られる検量線とを比較することにより、メバロン酸レベルを定量化し得る。

20

【0196】

例示的なmvaS核酸としては、mvaSポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的なmvaSポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸、ならびに本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する変異ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。例示的なmvaS核酸としては、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、エンテロコッカス・ファエカリス (Enterococcus faecalis)、および/またはエンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus) から単離されたmvaS核酸が挙げられる。リステリア・グレイ (Listeria grayi) DSM 20601 mvaS遺伝子によってコードされるmvaS核酸は、配列番号99と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の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遺伝子によってコードされるmvaS核酸は、配列番号100と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の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遺伝子によってコードされるmvaS核酸は、配列番号101と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、

30

40

50

95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の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* 遺伝子によってコードされる *mvaS* 核酸は、配列番号102と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*) *mvaS* 遺伝子によってコードされる *mvaS* 核酸は、以前、メバロン酸を産生する大腸菌 (*E. coli*) で開示された *mvaE* 遺伝子と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る (米国特許出願公開第2005/0287655A1号明細書; Tabata, K. and Hashimoto, S. - I. *Biotechnology Letters* 26:1487-1491, 2004を参照されたい)。

10

【0197】

mvaS 核酸は、組換え細胞内で、マルチコピープラスミド上で発現させ得る。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、または中程度コピー数プラスミドであり得る。代案としては、*mvaS* 核酸は、宿主細胞の染色体に組み込み得る。プラスミド上の、または宿主細胞の染色体に組み込まれた部分としての双方の、*mvaS* 核酸の異種性発現で、核酸の発現は、誘導性プロモーターまたは構成的発現プロモーターのどちらかによって駆動され得る。プロモーターは、*mvaS* 核酸発現の強力な駆動機構であり得て、それは発現の弱い駆動機構であり得て、またはそれは発現の中程度の駆動機構であり得る。

20

【0198】

アセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子

アセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子 (別名 *nphT7*) は、マロニルCoAおよびアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する活性を有して、2つのアセチルCoA分子からアセトアセチルCoAを合成する最小の活性 (例えば、皆無の活性) を有する酵素をコードする遺伝子である。 *nphT7* に関する教示については、例えば、その内容を本明細書に明示的に援用する、Okamura et al., *PNAS* Vol 1107, No. 25, pp. 11265-11270 (2010) を参照されたい。ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) の放線菌CL190株からのアセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子は、特開2008-61506A号公報および米国特許出願公開第2010/0285549号明細書に記載される。アセトアセチルCoAシンターゼはまた、アセチルCoA:マロニルCoAアシル基転移酵素とも称され得る。使用し得る代表的なアセトアセチルCoAシンターゼ (またはアセチルCoA:マロニルCoAアシル基転移酵素) は、Genbank AB540131.1である。

30

【0199】

本明細書に記載される態様または実施形態のいずれにおいても、マロニルCoAおよびアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する能力を有する酵素を使用し得る。このような酵素の非限定的例は、本明細書に記載される。本明細書に記載される特定の実施形態では、マロニルCoAおよびアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する活性を有する、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) の放線菌に由来するアセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子を使用し得る。このようなアセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子の一例は、アミノを有するタンパク質をコードする遺伝子である。このようなタンパク質は、マロニルCoAおよびアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する活性を有するアセトアセチルCoAシンターゼに対応する配列番号103のアミノ酸配列を有し、2つのアセチルCoA分子からアセトアセチルCoAを合成する活性を有しない。

40

【0200】

一実施形態では、配列番号103のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝

50

子は、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種 CL190 株の放線菌類から入手されるゲノム DNA をテンプレートとして、および特開第 2008-61506 A 号公報を参照してデザインし得る 1 対のプライマーを使用して、核酸増幅法 (例えば PCR) によって得られ得る。

【0201】

本明細書に記載されるように、本発明で使用するためのアセトアセチル CoA シンターゼ遺伝子は、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種 CL190 株の放線菌類からの配列番号 103 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子に限定されない。マロニル CoA およびアセチル CoA からアセトアセチル CoA を合成する能力を有して、2 つのアセチル CoA 分子からアセトアセチル CoA を合成しない、タンパク質をコードする任意の遺伝子を本明細書に記載する方法で使用し得る。特定の実施形態では、アセトアセチル CoA シンターゼ遺伝子は、配列番号 103 のアミノ酸配列と高度に類似し、またはそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有して、マロニル CoA およびアセチル CoA からアセトアセチル CoA を合成する機能を有する、タンパク質をコードする遺伝子であり得る。「高度に類似」または「実質的に同一」という表現は、例えば、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、および少なくとも約 99 % の同一性を指す。上で使用されるように、同一性は、異なるアミノ酸配列および配列番号 103 のアミノ酸配列中のアミノ酸残基間の同一性の百分率に相当し、それは配列類似性を検索するプログラムを使用して、配列番号 103 および異なるアミノ酸配列の、アミノ酸配列のアライメントを実施することで計算される。

【0202】

その他の実施形態では、アセトアセチル CoA シンターゼ遺伝子は、1 つ以上アミノ酸の置換、欠失、付加、または挿入によって、配列番号 103 のアミノ酸配列から誘導されるアミノ酸配列を有し、マロニル CoA およびアセチル CoA からアセトアセチル CoA を合成する機能を有する、タンパク質をコードする遺伝子であってもよい。本明細書では、「より多くのアミノ酸」という表現は、例えば、2 ~ 30 個のアミノ酸、好ましくは 2 ~ 20 個のアミノ酸、より好ましくは 2 ~ 10 個のアミノ酸、最も好ましくは 2 ~ 5 個のアミノ酸を指す。

【0203】

なおも別の実施形態では、アセトアセチル CoA シンターゼ遺伝子は、ストリンジェントな条件下で、配列番号 103 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの部分または全体とハイブリダイズでき、マロニル CoA およびアセチル CoA からアセトアセチル CoA を合成する機能を有するタンパク質をコードできる、ポリヌクレオチドからなってもよい。本明細書では、ストリンジェントな条件下のハイブリダイゼーションは、60 °C で 2 回の SSC 洗浄条件下における結合維持に相当する。ハイブリダイゼーションは、J. Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (2001) に記載される方法などの従来 of 既知の方法によって実施し得る。

【0204】

本明細書に記載されるように、配列番号 103 のアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を有するアセトアセチル CoA シンターゼをコードする遺伝子は、例えば、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種 CL190 株から得られたのではない放線菌類などの、潜在的にあらゆる生物から単離し得る。さらに、本明細書の用途のためのアセトアセチル CoA シンターゼ遺伝子は、当該技術分野で知られている方法によって、配列番号 103 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを改変することで得られ得る。ヌクレオチド配列の変異誘発は、クンケル法またはギャップド二本鎖法、またはそれらのどちらかに類似した方法などの既知の方法によって実施し得る。例えば、変異誘発は、変異誘発

キット（例えば製品名；Mutant-KおよびMutant-G（TAKARA Bio））、部位特異的変異誘発のための製品名；LA PCR in vitro Mutagenesisシリーズキット（TAKARA Bio）などを使用して、実施してもよい。

【0205】

配列番号103のアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を有するアセトアセチルCoAシンターゼの活性は、下述するように評価し得る。具体的には、評価されるタンパク質をコードする遺伝子を、その中で遺伝子が発現し得るように、最初に宿主細胞に導入し、クロマトグラフィーなどの技術によるタンパク質の精製がそれに続く。評価される得られたタンパク質含有する緩衝液に、基質としてマロニルCoAおよびアセチルCoAを添加し、例えば、所望の温度（例えば、10℃～60℃）での培養がそれに続く。反応完了後、失われた基質量および／または生成された生成物量（アセトアセチルCoA）を判定する。したがって試験されるタンパク質が、マロニルCoAおよびアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する機能を有するかどうかを評価し、合成程度を評価することが可能である。このような場合、評価される得られたタンパク質を含有する緩衝液に、基質としてアセチルCoAのみを入れて、失われた基質量および／または生成された生成物量を同様に判定することで、タンパク質が2つのアセチルCoA分子から、アセトアセチルCoAを合成する活性を有するかどうかを調べることが可能である。

10

【0206】

メバロン酸の生産増大能力がある組換え細胞

20

本明細書に記載される組換え細胞（例えば組換え細菌細胞）は、本明細書に記載される様々な酵素経路に対する任意の操作なしの同一細胞を上回る量および／または濃度で、メバロン酸を産生し得る。したがって、本明細書に記載される様々な経路の調節のために操作されている組換え細胞（例えば細菌細胞）は、メバロン酸の生産向上に有用である。

【0207】

したがって、特定の態様では、本発明は、メバロン酸の生産を向上させる能力がある組換え細胞を提供し、細胞は、ホスホクエーラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸と、上流MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸とを含んでなり、細胞はホスホクエーラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含まない細胞と比較して、増大した量のメバロン酸を産生する。

30

【0208】

特定の態様では、本明細書に記載される組換え細胞は、バークホルデリア・フィトフィルマンス（*Burkholderia phytofirmans*）、ラクトバチルス・ブフネリ（*Lactobacillus buchneri*）、ビフィドバクテリウム・ガリクム（*Bifidobacterium gallium*）、ビフィドバクテリウム・デンチウム（*Bifidobacterium dentium*）、ビフィドバクテリウム・ビフィダム（*Bifidobacterium bifidum*）、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム（*Clostridium acetobutylicum*）から単離されたホスホクエーラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム（*Mycobacterium gilvum*）、シェワネラ・バルチカ（*Shewanella baltica*）、ラクトバチルス・ラムノーサス（*Lactobacillus rhamnosus*）、ラクトバチルス・クリスパータス（*Lactobacillus crispatus*）、ビフィドバクテリウム・ロングム（*Bifidobacterium longum*）、ロイコノストック・シトレウム（*Leuconostoc citreum*）、ブラディリゾビウム属（*Bradyrhizobium*）種、エンテロコッカス・フェシウム（*Enterococcus faecium*）、ブルセラ・ミクロチ（*Brucella microti*）、ラクトバチルス・サリバリウス（*Lactobacillus salivarius*）、ストレプトコッカス

40

50

・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecaceae*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。別の実施形態では、組換え細胞は、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。なおも別の実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニューリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボビス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニューリカタラ・エレガンシス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングアエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、表1、表2および／または図面3～24に列挙される生物から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。

【0209】

一実施形態では、組換え細胞は、L. グレイー (*L. grayi*)、E. フェシウム (*E. faecium*)、E. ガリナーラム (*E. gallinarum*)、E. カセリフラブス (*E. casseliflavus*)、および／またはE. ファエカリス (*E. faecalis*) からのmvaEおよびmvaSポリペプチドをコードする異種核酸の1

つまたは複数のコピーをさらに含んでなる。別の実施形態では、組換え細胞は、アセトアセチル CoA シンターゼと、上流 MVA 経路の 1 つまたは複数のポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の核酸とをさらに含んでなる。

【0210】

一実施形態では、組換え細胞は、リボース-5-リン酸イソメラーゼ (rpiA および／または rpiB)、D-リブロース-5-リン酸-3-エピメラーゼ (rpe)、トランスケトララーゼ (tktA および／または tktB)、トランスアルドラーゼ B (talB)、リン酸アセチルトランスフェラーゼ (pta および／または eutD) からなる群から選択される、遺伝子の 1 つまたは複数の活性を増大させるように、さらに操作し得る。別の実施形態では、組換え細胞は、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (zwf) 、6-ホスホフルクトキナーゼ-1 (pfkA および／または pfkB)、フルクトース二リン酸アルドラーゼ (fba、fbaA、fbaB、および／または fbaC)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (gapA および／または gapB)、酢酸キナーゼ (ackA)、クエン酸シンターゼ (gltA)、EI (ptsI)、EIICB^{Glc} (ptsG)、EIIA^{Glc} (crr)、および／または HPr (ptsH) をはじめとする遺伝子の 1 つまたは複数の遺伝子の活性を低下させるように、さらに操作し得る。

10

【0211】

一態様では、本明細書に記載される組換え細胞は、ホスホケトララーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、異種核酸の 1 つまたは複数のコピーを欠く同一細胞を上回る容積生産性で、メバロン酸を産生し得る。特定の実施形態では、組換え細胞は、2.00 g/L/hr を超えるメバロン酸を産生し得る。代案としては、組換え細胞は、包括的に、約 1.0 g/L/hr、1.2 g/L/hr、1.4 g/L/hr、1.6 g/L/hr、1.8 g/L/hr、2.0 g/L/hr、2.2 g/L/hr、2.4 g/L/hr、2.6 g/L/hr、2.8 g/L/hr、3.0 g/L/hr、3.2 g/L/hr、3.4 g/L/hr、3.6 g/L/hr、3.8 g/L/hr、4.0 g/L/hr、4.2 g/L/hr、4.4 g/L/hr、4.6 g/L/hr、4.8 g/L/hr、5.0 g/L/hr、5.2 g/L/hr、5.4 g/L/hr、5.6 g/L/hr、5.8 g/L/hr、6.0 g/L/hr を超える、ならびにこれらの数字間の任意の数値のメバロン酸を産生し得る。

20

30

【0212】

一態様では、本明細書に記載される組換え細胞は、ホスホケトララーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、異種核酸の 1 つまたは複数のコピーを欠く同一細胞を上回る力価で、メバロン酸を産生し得る。これらの組換え細胞は、約 48 時間の発酵後に、100 g/L を超えるピーク力価のメバロン酸を産生し得る。代案としては、組換え細胞は、48 時間の発酵後に、包括的に、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 を超える、ならびにこれらの数字の間の任意の数値のピーク力価のメバロン酸を産生し得る。

40

【0213】

その他の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、MVA 経路に向かう炭素流を増大させ、したがって同様に操作されていない細胞と比較して、より高い力価のメバロン酸を産生する、1 つまたは複数の変異をさらに含んでなる。このような実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、ホスホケトララーゼ活性を有するホスホケトララーゼポリペプチドをコードする、異種核酸の 1 つまたは複数のコピーを欠く同一細胞を上回るピーク力価で、メバロン酸を産生する。一実施形態では、組換え細胞は、リボース-5-リン酸イソメラーゼ (rpiA および／または rpiB)、D-リブロース-5-リン酸-3-エピメラーゼ (rpe)、トランスケトララーゼ (tktA および／または tktB

50

)、トランスアルドラーゼB (t a l B)、リン酸アセチルトランスフェラーゼ (p t a および/またはe u t D) からなる群から選択される、遺伝子の1つまたは複数の活性を増大させるように、さらに操作し得る。別の実施形態では、組換え細胞は、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (z w f)、6-ホスホフルクトキナーゼ-1 (p f k A および/またはp f k B)、フルクトース二リン酸アルドラーゼ (f b a、f b a A、f b a B、および/またはf b a C)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (g a p A および/またはg a p B)、酢酸キナーゼ (a c k A)、クエン酸シンターゼ (g l t A)、E I (p t s I)、E I I C B^{G 1 c} (p t s G)、E I I A^{G 1 c} (c r r)、および/またはH P r (p t s H) をはじめとする遺伝子の1つまたは複数の遺伝子の活性を低下させるように、さらに操作し得る。

10

【0214】

一態様では、本明細書に記載される組換え細胞は、ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを欠く同一細胞を上回るメバロン酸の細胞生産性指数 (C P I) で、メバロン酸を産生し得る。組換え細胞は、少なくとも約3.0 (g/g) のメバロン酸C P Iを有し得る。代案としては、組換え細胞は、包括的に、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)、または30 (g/g) の、ならびにこれらの数字の間の任意の数値のメバロン酸のC P Iを有し得る。

20

【0215】

特定の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、MVA経路に向かう炭素流を増大させる1つまたは複数の変異をさらに含んでなり、それは、同様に操作されていない細胞と比較して、メバロン酸のより高い細胞生産性指標 (C P I) をもたらす。さらに、本明細書に記載される組換え細胞は、ホスホケトラゼ活性を有するホスホケトラゼポリペプチドをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを欠く同一細胞を上回るC P Iを有する。一実施形態では、組換え細胞は、リボース-5-リン酸イソメラーゼ (r p i A および/またはr p i B)、D-リブローズ-5-リン酸-3-エピメラーゼ (r p e)、トランスケトラゼ (t k t A および/またはt k t B)、トランスアルドラーゼB (t a l B)、リン酸アセチルトランスフェラーゼ (p t a および/またはe u t D) からなる群から選択される、遺伝子の1つまたは複数の活性を増大させるように、さらに操作し得る。別の実施形態では、これらの組換え細胞は、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (z w f)、6-ホスホフルクトキナーゼ-1 (p f k A および/またはp f k B)、フルクトースビスホスフェートアルドラーゼ (f b a、f b a A、f b a B、および/またはf b a C)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (g a p A および/またはg a p B)、酢酸キナーゼ (a c k A)、クエン酸シンターゼ (g l t A)、E I (p t s I)、E I I C B^{G 1 c} (p t s G)、E I I A^{G 1 c} (c r r)、および/またはH P r (p t s H) 遺伝子をはじめとする、1つまたは複数の遺伝子の活性を低下させるように、さらに操作し得る。

30

【0216】

さらに、本明細書に記載される細胞は、ホスホケトラゼ活性を有するホスホケトラゼポリペプチドをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを欠く同一細胞を上回るグルコースからのメバロン酸の質量収率を有する。組換え細胞は、グルコースから、少なくとも約28%のメバロン酸の質量収率を生じ得る。代案としては、組換え細胞は、グルコースから、包括的に、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%、または55%の、ならびにこれらの数字の間の任意の数値のメバロン酸の質量収率を産生し得る。

40

【0217】

50

特定の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、MV A経路に向かう炭素流を増大させる1つまたは複数の変異をさらに含んでなり、それは、同様に操作されていない細胞と比較して、メバロン酸の質量収率をもたらす。さらに、本明細書に記載される組換え細胞は、ホスホケトラゼ活性を有するホスホケトラゼポリペプチドをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを欠く同一細胞を上回るメバロン酸の質量収率を有する。一実施形態では、組換え細胞は、リボース-5-リン酸イソメラーゼ (r p i Aおよび/または r p i B)、D-リブローズ-5-リン酸-3-エピメラーゼ (r p e)、トランスケトラゼ (t k t Aおよび/または t k t B)、トランスアルドラーゼ B (t a l B)、リン酸アセチルトランスフェラーゼ (p t a および/または e u t D) からなる群から選択される、遺伝子の1つまたは複数の活性を増大させるように、さらに操作し得る。別の実施形態では、これらの組換え細胞は、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (z w f)、6-ホスホフルクトキナーゼ-1 (p f k Aおよび/または p f k B)、フルクトースビスホスフェートアルドラーゼ (f b a、f b a A、f b a B、および/または f b a C)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (g a p Aおよび/または g a p B)、酢酸キナーゼ (a c k A)、クエン酸シンターゼ (g l t A)、E I (p t s I)、E I I C B^{G 1 c} (p t s G)、E I I A^{G 1 c} (c r r)、および/または H P r (p t s H) 遺伝子をはじめとする、1つまたは複数の遺伝子の活性を低下させるように、さらに操作し得る。

10

【0218】

一態様では、本明細書に記載される組換え細胞は、ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸の1つまたは複数のコピーを欠く同一細胞と比較して、発酵ブロス中により少量の酢酸を蓄積する一方で、メバロン酸を産生する。組換え細胞は、48時間の発酵中に、4.5 g/L未満の酢酸を発酵ブロス中に蓄積する一方で、増大したメバロン酸レベルを生じ得る。代案としては、組換え細胞は、48時間の発酵中に、包括的に、約8.0 g/L、7.5 g/L、7.0 g/L、6.5 g/L、6.0 g/L、5.5 g/L、5.0 g/L、4.5 g/L、4.0 g/L、3.5 g/L、3.0 g/L、2.5 g/L、2.0 g/L、または1.5 g/L未満の、ならびにこれらの数字の間の任意の数値酢酸を発酵ブロス中に蓄積する一方で、増大したメバロン酸レベルを生じ得る。特定の実施形態では、発酵ブロス中の酢酸蓄積低下は、発酵稼働中の細胞生存率を改善し得る。

20

30

【0219】

特定の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、同様に操作されていない細胞と比較して、発酵ブロス中により少量の酢酸を蓄積する一方で、MV A経路に向かう炭素流を増大させて、メバロン酸レベルの増大をもたらす、1つまたは複数の変異をさらに含んでなる。特定の実施形態では、発酵ブロス中の酢酸蓄積低下は、発酵稼働中の細胞生存率を改善し得る。

【0220】

本明細書でまた提供されるのは、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できるメバロン酸産生組換え細胞であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトラゼ活性を有して配列番号8と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii) 上流MV A経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホケトラゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、(a) グルコース上の細胞増殖、(b) キシロース上の細胞増殖、(c) 細胞内アセチルリン酸の産生、または(d) グルコース-6-リン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号23と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号24と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号25と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いく

40

50

つかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 27 と、少なくとも 90 % の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 28 と、少なくとも 90 % の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 29 と、少なくとも 90 % の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 30 と、少なくとも 90 % の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 31 と、少なくとも 90 % の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチド（例えば E. ガリナーラム（*E. gallinarum*）からのホスホケトラゼ）と比較して、1. 1 を超えるなど、1. 2 を超えるなど、1. 4 を超える、1. 6 を超える、1. 8 を超える、2 を超える、2. 2 を超える、2. 4 を超える、2. 6 を超える、2. 8 を超える、3 を超える、3. 2 を超える、3. 4 を超える、3. 6 を超える、3. 8 を超える、4 を超える、4. 2 を超える、4. 4 を超える、4. 6 を超える、4. 8 を超える、5 を超える、5. 2 を超える、5. 4 を超える、5. 6 を超える、5. 8 を超える、6 を超える、6. 2 を超える、6. 4 を超える、6. 6 を超える、6. 8 を超える、7 を超える、7. 2 を超える、7. 4 を超える、7. 6 を超える、7. 8 を超える、8 を超える、8. 2 を超える、8. 4 を超える、8. 6 を超える、8. 8、9 を超える、9. 2 を超える、9. 4 を超える、9. 6 を超える、9. 8、または 10 を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約 0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5 倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約 0. 1 ~ 0. 5、約 0. 25 ~ 0. 75、約 0. 5 ~ 1、約 0. 75 ~ 1. 25、約 1 ~ 1. 5、約 1. 25 ~ 1. 75、約 1. 5 ~ 2、約 1. 75 ~ 2. 25、約 2 ~ 2. 5、約 2. 25 ~ 2. 75、約 2. 5 ~ 3、約 2. 75 ~ 3. 25、約 3 ~ 3. 5、約 3. 25 ~ 3. 75、約 3. 5 ~ 4、約 3. 75 ~ 4. 25、約 4 ~ 4. 5、約 4. 25 ~ 4. 75、約 4. 5 ~ 5、約 4. 75 ~ 5. 25、約 5 ~ 5. 5、約 5. 25 ~ 5. 75、約 5. 5 ~ 6、約 6. 25 ~ 6. 75、約 6. 5 ~ 7、約 6. 75 ~ 7. 25、約 7 ~ 7. 5、約 7. 75 ~ 8. 25、約 8 ~ 8. 5、約 8. 25 ~ 8. 75、約 8. 5 ~ 9、約 8. 75 ~ 9. 25、約 9 ~ 9. 5、約 9. 25 ~ 9. 75、または約 9. 5 ~ 10 以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約 0. 1 ~ 2、約 1 ~ 3、約 2 ~ 4、約 3 ~ 5、約 4 ~ 6、約 5 ~ 7、約 6 ~ 8、約 7 ~ 9、または約 8 ~ 10 以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム（*E. gallinarum*）からのホスホケトラゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約 0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5、6、7、8、9、10 倍以上増大する。

【0221】

本明細書でさらに提供されるのは、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できるメバロン酸産生組換え細胞であって、組換え細胞は、（i）ホスホケトラゼ活性を有して配列番号 8 と少なくとも 65 % の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および（ii）上流 MVA 経路の 1 つまたは複数のポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の核酸を含んでなり、（i）のホスホケトラゼ活性を有する前記ポリペプチドは、（a）タンパク質溶解度、（b）タンパク質発現、または（c）フルクトース-6-リン酸（F6P）比活性のパラメータの 1 つまたは複数で、1. 0 を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 23 と、少なくとも 90 % の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 24 と、少なくとも 90 % の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 25 と、少なくとも 90 % の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 26 と、少なくとも 90 % の配列同一性を含

10

20

30

40

50

んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号27と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号28と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号29と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号30と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号31と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチド（例えばE. ガリナーラム（E. gallinarum）からのホスホクトラーゼ）と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3.2を超える、3.4を超える、3.6を超える、3.8を超える、4を超える、4.2を超える、4.4を超える、4.6を超える、4.8を超える、5を超える、5.2を超える、5.4を超える、5.6を超える、5.8を超える、6を超える、6.2を超える、6.4を超える、6.6を超える、6.8を超える、7を超える、7.2を超える、7.4を超える、7.6を超える、7.8を超える、8を超える、8.2を超える、8.4を超える、8.6を超える、8.8、9を超える、9.2を超える、9.4を超える、9.6を超える、9.8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~0.5、約0.25~0.75、約0.5~1、約0.75~1.25、約1~1.5、約1.25~1.75、約1.5~2、約1.75~2.25、約2~2.5、約2.25~2.75、約2.5~3、約2.75~3.25、約3~3.5、約3.25~3.75、約3.5~4、約3.75~4.25、約4~4.5、約4.25~4.75、約4.5~5、約4.75~5.25、約5~5.5、約5.25~5.75、約5.5~6、約6.25~6.75、約6.5~7、約6.75~7.25、約7~7.5、約7.75~8.25、約8~8.5、約8.25~8.75、約8.5~9、約8.75~9.25、約9~9.5、約9.25~9.75、または約9.5~10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~2、約1~3、約2~4、約3~5、約4~6、約5~7、約6~8、約7~9、または約8~10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム（E. gallinarum）からのホスホクトラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0222】

本明細書でさらに提供されるのは、ホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できるメバロン酸産生組換え細胞であって、組換え細胞は、（i）ホスホクトラーゼ活性を有して配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および（ii）上流MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、（i）のホスホクトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、（a）グルコース上の細胞増殖、（b）キシロース上の細胞増殖、（c）細胞内アセチルリン酸の産生、または（d）グルコース-6-リン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号32と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号33と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号34と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

では、ポリペプチドは、配列番号35と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号36と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号37と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号38と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号39と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号40と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号41と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号42と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号43と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号44と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号45と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号46と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチド（例えばE. ガリナラム（*E. gallinarum*）からのホスホケトラゼ）と比較して、1. 1を超えるなど、1. 2を超えるなど、1. 4を超える、1. 6を超える、1. 8を超える、2を超える、2. 2を超える、2. 4を超える、2. 6を超える、2. 8を超える、3を超える、3. 2を超える、3. 4を超える、3. 6を超える、3. 8を超える、4を超える、4. 2を超える、4. 4を超える、4. 6を超える、4. 8を超える、5を超える、5. 2を超える、5. 4を超える、5. 6を超える、5. 8を超える、6を超える、6. 2を超える、6. 4を超える、6. 6を超える、6. 8を超える、7を超える、7. 2を超える、7. 4を超える、7. 6を超える、7. 8を超える、8を超える、8. 2を超える、8. 4を超える、8. 6を超える、8. 8、9を超える、9. 2を超える、9. 4を超える、9. 6を超える、9. 8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1～0. 5、約0. 25～0. 75、約0. 5～1、約0. 75～1. 25、約1～1. 5、約1. 25～1. 75、約1. 5～2、約1. 75～2. 25、約2～2. 5、約2. 25～2. 75、約2. 5～3、約2. 75～3. 25、約3～3. 5、約3. 25～3. 75、約3. 5～4、約3. 75～4. 25、約4～4. 5、約4. 25～4. 75、約4. 5～5、約4. 75～5. 25、約5～5. 5、約5. 25～5. 75、約5. 5～6、約6. 25～6. 75、約6. 5～7、約6. 75～7. 25、約7～7. 5、約7. 75～8. 25、約8～8. 5、約8. 25～8. 75、約8. 5～9、約8. 75～9. 25、約9～9. 5、約9. 25～9. 75、または約9. 5～10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1～2、約1～3、約2～4、約3～5、約4～6、約5～7、約6～8、約7～9、または約8～10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナラム（*E. gallinarum*）からのホスホケトラゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0223】

本明細書で提供されるのは、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できるメバロン酸産生組換え細胞であって、組換え細胞は、（i）ホスホケトラゼ活性を有して配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および（ii）上流MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする

10

20

30

40

50

1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホクテラーゼ活性を有する前記ポリペプチドは、(a) タンパク質溶解度、(b) タンパク質発現、または(c) フルクトース-6-リン酸(F6P)比活性のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号32と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号33と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号34と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号35と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号36と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号37と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号38と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号39と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号40と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号41と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号42と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号43と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号44と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号45と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号46と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホクテラーゼ活性を有するポリペプチド(例えばE. ガリナーラム(E. gallinarum)からのホスホクテラーゼ)と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3.2を超える、3.4を超える、3.6を超える、3.8を超える、4を超える、4.2を超える、4.4を超える、4.6を超える、4.8を超える、5を超える、5.2を超える、5.4を超える、5.6を超える、5.8を超える、6を超える、6.2を超える、6.4を超える、6.6を超える、6.8を超える、7を超える、7.2を超える、7.4を超える、7.6を超える、7.8を超える、8を超える、8.2を超える、8.4を超える、8.6を超える、8.8、9を超える、9.2を超える、9.4を超える、9.6を超える、9.8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~0.5、約0.25~0.75、約0.5~1、約0.75~1.25、約1~1.5、約1.25~1.75、約1.5~2、約1.75~2.25、約2~2.5、約2.25~2.75、約2.5~3、約2.75~3.25、約3~3.5、約3.25~3.75、約3.5~4、約3.75~4.25、約4~4.5、約4.25~4.75、約4.5~5、約4.75~5.25、約5~5.5、約5.25~5.75、約5.5~6、約6.25~6.75、約6.5~7、約6.75~7.25、約7~7.5、約7.75~8.25、約8~8.5、約8.25~8.75、約8.5~9、約8.75~9.25、約9~9.5、約9.25~9.75、または約9.5~10以上のいずれかをを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~2、約1~3、約2~4、約3~5、約4~6、約5~7、約6~8、約7~9、または約8~10以上のいずれかをを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム(E. gallinarum)からのホスホクテラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、

10

20

30

40

50

0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0224】

組換え細胞を使用して増大した量のメバロン酸を生産する方法

本明細書でまた提供されるのは、メバロン酸を生産する方法である。いくつかの態様では、メバロン酸を生産する方法は、(a) 本明細書に記載されるようなホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流が増大するように操作された、メバロン酸を生産できる組換え細胞（上述の組換え細胞のいずれかをはじめとする）またはそれらの子孫を含んでなる組成物を培養するステップと；(b) メバロン酸を生産するステップとを含んでなる。いくつかの態様では、メバロン酸を生産する方法は、メバロン酸の生産に適した条件下で、本明細書に記載される組換え細胞のいずれかを培養して、組換え細胞にメバロン酸を生産させるステップとを含んでなる。いくつかの態様では、メバロン酸を生産する方法は、メバロン酸を回収するステップをさらに含んでなる。

10

【0225】

本明細書に記載されるように、メバロン酸を生産する方法は、(a) ホスホケトラーゼポリペプチドを内在性に発現しない、(大腸菌 (*E. coli*) 細胞をはじめとするが、これに限定されるものではない) 組換え細胞を培養するステップであって、細胞が、1つまたは複数のMVA経路ペプチドを発現する1つまたは複数の異種核酸と並んで、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする遺伝子の1つまたは複数のコピーを異種性に発現するステップと；(b) メバロン酸を生産するステップとを含んでなる。特定の実施形態では、組換え細胞は、バークホルデルシア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホケトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Bruella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクタエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデルシア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecaceae*) 種、および／またはネオサルトリヤ・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態

20

30

40

50

では、組換え細胞は、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離されたホスホケトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングセラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカテラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカテラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングセラ・キングアエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホケトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、表1、表2および／または図面3～24に列挙される生物から単離されたホスホケトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。

さらに、組換え細胞は、細胞を最少培地中で培養した際に、1つまたは複数のMVA経路ペプチドを発現する1つまたは複数の異種核酸と並んで、バークホルデリア・フィトフィルマンス (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シェewanella・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)

10

20

30

40

50

、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechenensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothece*) 種、ネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、マイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングセラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングセラ・キングアエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) からのホスホケトラーゼポリペプチドをコードする遺伝子の1つまたは複数の異種コピーを欠く同一細胞を上回る濃度で、メバロン酸を産生し得る。特定の

の実施形態では、バークホルデリア・フィトフィルムランス (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus*

10

20

30

40

50

s crispatus)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種、ネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、マイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parvaanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングアエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) からのホスホケトラーゼポリペプチドをコードする異種核酸の1つまたは複数のコピーは、宿主細胞の染色体に組み込まれた異種核酸である。

【0226】

メバロン酸を生産するための本方法は、2.00 g/L/hr のメバロン酸を超える容積生産性を有する細胞を使用して、メバロン酸を生産し得る。代案としては、組換え細胞は、包括的に、約 1.0 g/L/hr、1.2 g/L/hr、1.4 g/L/hr、1.

10

20

30

40

50

6 g/L/hr、1. 8 g/L/hr、2. 0 g/L/hr、2. 2 g/L/hr、2. 4 g/L/hr、2. 6 g/L/hr、2. 8 g/L/hr、3. 0 g/L/hr、3. 2 g/L/hr、3. 4 g/L/hr、3. 6 g/L/hr、3. 8 g/L/hr、4. 0 g/L/hr、4. 2 g/L/hr、4. 4 g/L/hr、4. 6 g/L/hr、4. 8 g/L/hr、5. 0 g/L/hr、5. 2 g/L/hr、5. 4 g/L/hr、5. 6 g/L/hr、5. 8 g/L/hr、6. 0 g/L/hrを超える、ならびにこれらの数字間の任意の数値のメバロン酸を産生し得る。いくつかの態様では、メバロン酸を生産する方法は、メバロン酸を回収するステップをさらに含んでなる。

【0227】

他の実施形態では、メバロン酸を生産する方法は、(a) ホスホケトラーゼポリペプチドを内在性に発現しない、(大腸菌 (*E. coli*) 細胞をはじめとするが、これに限定されるものではない) 組換え細胞を培養するステップであって、細胞が、1つまたは複数のMVA経路ペプチドを発現する1つまたは複数の異種核酸と並んで、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする遺伝子の1つまたは複数のコピーを異種性に発現するステップと；(b) メバロン酸を生産するステップとを含んでなり得て、組換え細胞は、48時間の発酵後に、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする、遺伝子の1つまたは複数の異種コピーを欠く同一細胞を上回るピーク力価がある、メバロン酸を生産する。特定の実施形態では、組換え細胞は、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリカム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および/またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホケトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シェewanella・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクタエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種、および/またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテ

10

20

30

40

50

ロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離されたホスホクトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングセラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタセラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタセラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングセラ・キングアエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホクトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、表1、表2および／または図面3～24に列挙される生物から単離されたホスホクトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。

【0228】

メバロン酸を生産する本方法は、48時間に発酵後に、約100 g/Lピーク力価のメバロン酸を超えるピーク力価を生じ得る細胞を使用して、メバロン酸を生産し得る。代案としては、組換え細胞は、48時間の発酵後に、包括的に、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を超える、ならびにこれらの数字の間の任意の数値のピーク力価のメバロン酸を生産し得る。いくつかの態様では、メバロン酸を生産する方法は、メバロン酸を回収するステップをさらに含んでなる。

【0229】

他の実施形態では、メバロン酸を生産する方法は、(a) ホスホクトラーゼポリペプチドを内在性に発現しない、(大腸菌 (*E. coli*) 細胞をはじめとするが、これに限定されるものではない) 組換え細胞を培養するステップであって、細胞が、1つまたは複数のMVA経路ペプチドを発現する1つまたは複数の異種核酸と並んで、ホスホクトラーゼポリペプチドをコードする遺伝子の1つまたは複数のコピーを異種性に発現するステップと；(b) メバロン酸を生産するステップとを含んでなり得て、組換え細胞は、ホスホクトラーゼポリペプチドをコードする、遺伝子の1つまたは複数の異種コピーを欠く同一細胞を上回る、メバロン酸のCPIを有する。特定の実施形態では、組換え細胞は、バーク

ホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、
 ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallicum*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、
 ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、
 異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞
 は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シェewanella・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、
 ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechenensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecaceae*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸
 の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、エン
 テロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離
 されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。
 いくつかの実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングセラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニューリカタセラ・アディアセンシス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイ

10

20

30

40

50

セリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカテラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングア (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、表1、表2および／または図面3～24に列挙される生物から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。

10

【0230】

メバロン酸を生産するための本方法は、細胞を使用して、少なくとも約3.0 (g/g) のメバロン酸のCPIで、メバロン酸を生産し得る。代案としては、組換え細胞は、包括的に、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)、または30 (g/g) の、ならびにこれらの数字の間の任意の数値のメバロン酸のCPIを有し得る。いくつかの態様では、メバロン酸を生産する方法は、メバロン酸を回収するステップをさらに含んでなる。

20

【0231】

特定の実施形態では、メバロン酸を生産する方法は、(a) ホスホケトラゼポリペプチドを内在性に発現しない、(大腸菌 (*E. coli*)) 細胞をはじめとするが、これに限定されるものではない) 組換え細胞を培養するステップであって、細胞が、1つまたは複数のMVA経路ペプチドを発現する1つまたは複数の異種核酸と並んで、ホスホケトラゼポリペプチドをコードする遺伝子の1つまたは複数のコピーを異種性に発現するステップと；(b) メバロン酸を生産するステップとを含んでなり得て、組換え細胞は、ホスホケトラゼポリペプチドをコードする、遺伝子の1つまたは複数の異種コピーを欠く同一細胞と比較して、低下した酸素取り込み速度 (OUR) を示す。特定の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドをコードする、遺伝子の1つまたは複数の異種コピーを発現する組換え細胞は、ホスホケトラゼを発現しない組換え細胞と比較して、OURに最大で1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍または7倍の低下を示す。

30

【0232】

本明細書で提供されるのは、上述の細胞のいずれかを使用して、メバロン酸の生産を向上させる方法である。細胞によるメバロン酸の生産は、ホスホケトラゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸の発現によって、向上させ得る。特定の実施形態では、組換え細胞は、バークホルデリア・フィトフィルムス (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)

40

50

us)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Bruella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデルシア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングセラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングセラ・キングエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、表1、表2および／または図面3～24に列挙される生物から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸

10

20

30

40

50

の1つまたは複数のコピーを含んでなる。

【0233】

メバロン酸の生産は、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸の発現がない、メバロン酸産生細胞によるメバロン酸の生産と比較して、約1,000,000倍（例えば、約1～約500,000倍、約1～約50,000倍、約1～約5,000倍、約1～約1,000倍、約1～約500倍、約1～約100倍、約1～約50倍、約5～約100,000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、または約50～約200倍）向上させ得る。本明細書に記載される特定の実施形態では、宿主細胞は、MVA生成に向かう炭素流が増大するようにさらに操作されている。特定の実施形態では、組換え細胞は、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホケトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シェewanella・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパタス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、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*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)

10

20

30

40

50

hilus)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離されたホスホクトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングセラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタセラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エremoコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタセラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングセラ・キングアエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホクトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、表1、表2および／または図面3～24に列挙される生物から単離されたホスホクトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。

【0234】

その他の態様では、本明細書に記載される方法は、ホスホクトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸の発現がない、メバロン酸産生細胞によるメバロン酸の生産と比較して、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、100,000倍、200,000倍、500,000倍、または1,000,000倍のいずれかで、メバロン酸の生産向上を提供し得る。本明細書に記載される特定の実施形態では、宿主細胞は、MVA生成に向かう炭素流が増大するようにさらに操作されている。

【0235】

さらに、より特異的な細胞培養条件を使用して、本明細書に記載される方法で細胞を培養し得る。例えば、いくつかの態様では、メバロン酸を生産する方法は、(a) ホスホクトラーゼ遺伝子を内在性に有しない、(大腸菌 (*E. coli*) 細胞をはじめとするが、これに限定されるものではない) 組換え細胞を34℃の最少培地中で培養するステップであって、組換え細胞が、低から中程度のプラスミドコピーで、強力なプロモーター制御下において、ホスホクトラーゼポリペプチドをコードする異種遺伝子の1つまたは複数のコピーを異種性に発現するステップと、；(b) メバロン酸を生産するステップとを含んでなる。特定の実施形態では、組換え細胞は、バークホルデリア・フィトフィルマンス (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホクトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを

含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、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*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordoni*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカテラ・アディアセン (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカテラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングア (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus*

10

20

30

40

50

s c r i c e t i)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (M y c o p l a s m a c o l u m b i n u m) から単離されたホスホクトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、表1、表2および／または図面3～24に列挙される生物から単離されたホスホクトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの態様では、メバロン酸を生産する方法は、メバロン酸を回収するステップをさらに含んでなる。

【0236】

本明細書でまた提供されるのは、ホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、メバロン酸を生産するステップとを含んでなる、メバロン酸を生産する方法であって、組換え細胞は、(i) ホスホクトラーゼ活性を有して配列番号8と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii) 上流MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホクトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、(a) グルコース上の細胞増殖、(b) キシロース上の細胞増殖、(c) 細胞内アセチルリン酸の生産、または(d) グルコースー6ーリン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号23と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号24と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号25と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号27と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号28と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号29と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号30と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号31と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチド(例えばE. ガリナラム (E. g a l l i n a r u m) からのホスホクトラーゼ)と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3.2を超える、3.4を超える、3.6を超える、3.8を超える、4を超える、4.2を超える、4.4を超える、4.6を超える、4.8を超える、5を超える、5.2を超える、5.4を超える、5.6を超える、5.8を超える、6を超える、6.2を超える、6.4を超える、6.6を超える、6.8を超える、7を超える、7.2を超える、7.4を超える、7.6を超える、7.8を超える、8を超える、8.2を超える、8.4を超える、8.6を超える、8.8、9を超える、9.2を超える、9.4を超える、9.6を超える、9.8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1～0.5、約0.25～0.75、約0.5～1、約0.75～1.25、約1～1.5、約1.25～1.75、約1.5～2、約1.75～2.25、約2～2.5、約2.25～2.75、約2.5～3、約2.75～3.25、約3～3.5、約3.25～3.75、約3.5～4、約3.75～4.25、約4～4.5、約4.25～4.75、約4.5～5、約4.75～5.25、約5～5.5、約5.25～5.75、約5.5～6、約6.25～6.75、約6.5～7、約6.75～7.25、約7～7.5、約7.75～8.25、約8～8.5、約8.25～8.75、約8.5～9、約8.75～9.25、約9～9.5、約9.2

10

20

30

40

50

5～9.75、または約9.5～10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1～2、約1～3、約2～4、約3～5、約4～6、約5～7、約6～8、約7～9、または約8～10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホクトラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0237】

本明細書でまた提供されるのは、ホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、メバロン酸を生産するステップとを含んでなる、メバロン酸を生産する方法であって、組換え細胞は、(i) ホスホクトラーゼ活性を有して配列番号8と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii) 上流MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホクトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドは、(a) タンパク質溶解度、(b) タンパク質発現、または(c) フルクトース-6-リン酸 (F6P) 比活性のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号23と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号24と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号25と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号27と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号28と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号29と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号30と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号31と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチド (例えばE. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホクトラーゼ) と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3.2を超える、3.4を超える、3.6を超える、3.8を超える、4を超える、4.2を超える、4.4を超える、4.6を超える、4.8を超える、5を超える、5.2を超える、5.4を超える、5.6を超える、5.8を超える、6を超える、6.2を超える、6.4を超える、6.6を超える、6.8を超える、7を超える、7.2を超える、7.4を超える、7.6を超える、7.8を超える、8を超える、8.2を超える、8.4を超える、8.6を超える、8.8、9を超える、9.2を超える、9.4を超える、9.6を超える、9.8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1～0.5、約0.25～0.75、約0.5～1、約0.75～1.25、約1～1.5、約1.25～1.75、約1.5～2、約1.75～2.25、約2～2.5、約2.25～2.75、約2.5～3、約2.75～3.25、約3～3.5、約3.25～3.75、約3.5～4、約3.75～4.25、約4～4.5、約4.25～4.75、約4.5～5、約4.75～5.25、約5～5.5、約5.25～5.75、約5.5～6、約6.25～6.75、約6.5～7、約6.75～7.25、約7～7.5、約7.75～8.25、約

10

20

30

40

50

8～8.5、約8.25～8.75、約8.5～9、約8.75～9.25、約9～9.5、約9.25～9.75、または約9.5～10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1～2、約1～3、約2～4、約3～5、約4～6、約5～7、約6～8、約7～9、または約8～10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム (*E. gallinarum*) からのホスホクトラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0238】

本明細書でさらに提供されるのは、ホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、メバロン酸を生産するステップとを含んでなる、メバロン酸を生産する方法であって、組換え細胞は、(i) ホスホクトラーゼ活性を有して配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii) 上流MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホクトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、(a) グルコース上の細胞増殖、(b) キシロース上の細胞増殖、(c) 細胞内アセチルリン酸の生産、または(d) グルコースー6ーリン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号32と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号33と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号34と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号35と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号36と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号37と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号38と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号39と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号40と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号41と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号42と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号43と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号44と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号45と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号46と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチド(例えばE. ガリナーラム (*E. gallinarum*) からのホスホクトラーゼ)と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3.2を超える、3.4を超える、3.6を超える、3.8を超える、4を超える、4.2を超える、4.4を超える、4.6を超える、4.8を超える、5を超える、5.2を超える、5.4を超える、5.6を超える、5.8を超える、6を超える、6.2を超える、6.4を超える、6.6を超える、6.8を超える、7を超える、7.2を超える、7.4を超える、7.6を超える、7.8を超える、8を超える、8.2を超える、8.4を超える、8.6を超える、8.8、9を超える、9.2を超える、9.4を超える、9.6を超える、9.8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0.1、

10

20

30

40

50

0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1～0. 5、約0. 25～0. 75、約0. 5～1、約0. 75～1. 25、約1～1. 5、約1. 25～1. 75、約1. 5～2、約1. 75～2. 25、約2～2. 5、約2. 25～2. 75、約2. 5～3、約2. 75～3. 25、約3～3. 5、約3. 25～3. 75、約3. 5～4、約3. 75～4. 25、約4～4. 5、約4. 25～4. 75、約4. 5～5、約4. 75～5. 25、約5～5. 5、約5. 25～5. 75、約5. 5～6、約6. 25～6. 75、約6. 5～7、約6. 75～7. 25、約7～7. 5、約7. 75～8. 25、約8～8. 5、約8. 25～8. 75、約8. 5～9、約8. 75～9. 25、約9～9. 5、約9. 25～9. 75、または約9. 5～10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1～2、約1～3、約2～4、約3～5、約4～6、約5～7、約6～8、約7～9、または約8～10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホクトラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0239】

本明細書で提供されるのは、ホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、メバロン酸を生産するステップとを含んでなる、メバロン酸を生産する方法であって、組換え細胞は、(i) ホスホクトラーゼ活性を有して配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii) 上流MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホクトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドは、(a) タンパク質溶解度、(b) タンパク質発現、または(c) フルクトースー6ーリン酸(F6P)比活性のパラメータの1つまたは複数で、1. 0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号32と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号33と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号34と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号35と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号36と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号37と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号38と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号39と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号40と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号41と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号42と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号43と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号44と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号45と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号46と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチド(例えばE. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホクトラーゼ)と比較して、1. 1を超えるなど、1. 2を超えるなど、1. 4を超える、1. 6を超える、1. 8を超える、2を超える、2. 2を超える、2. 4を超える、2. 6を超える、2. 8を超える、

10

20

30

40

50

3を超える、3. 2を超える、3. 4を超える、3. 6を超える、3. 8を超える、4を超える、4. 2を超える、4. 4を超える、4. 6を超える、4. 8を超える、5を超える、5. 2を超える、5. 4を超える、5. 6を超える、5. 8を超える、6を超える、6. 2を超える、6. 4を超える、6. 6を超える、6. 8を超える、7を超える、7. 2を超える、7. 4を超える、7. 6を超える、7. 8を超える、8を超える、8. 2を超える、8. 4を超える、8. 6を超える、8. 8、9を超える、9. 2を超える、9. 4を超える、9. 6を超える、9. 8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1~0. 5、約0. 25~0. 75、約0. 5~1、約0. 75~1. 25、約1~1. 5、約1. 25~1. 75、約1. 5~2、約1. 75~2. 25、約2~2. 5、約2. 25~2. 75、約2. 5~3、約2. 75~3. 25、約3~3. 5、約3. 25~3. 75、約3. 5~4、約3. 75~4. 25、約4~4. 5、約4. 25~4. 75、約4. 5~5、約4. 75~5. 25、約5~5. 5、約5. 25~5. 75、約5. 5~6、約6. 25~6. 75、約6. 5~7、約6. 75~7. 25、約7~7. 5、約7. 75~8. 25、約8~8. 5、約8. 25~8. 75、約8. 5~9、約8. 75~9. 25、約9~9. 5、約9. 25~9. 75、または約9. 5~10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1~2、約1~3、約2~4、約3~5、約4~6、約5~7、約6~8、約7~9、または約8~10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナラム (E. gallinarum) からのホスホクトラゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0240】

イソプレンを産生できる組換え細胞

イソプレン (2-メチルー1, 3-ブタジエン) は、幅広い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、合成ゴムの製造をはじめとする、多数の化学薬品組成物およびポリマーの合成において、中間体または出発原料として用いられる。イソプレンはまた、多数の植物および動物によって天然に合成される重要な生物学的材料である。

【0241】

イソプレンは、イソプレシンターゼの酵素作用によって、DMA P Pから生成される。そのため、理論に束縛されることなく、上述の組成物および方法のいずれかによって、メバロン酸経路を含んでなる組換え細胞内で、E 4 P、G A P、A c-P、および/またはアセチルC o Aの細胞産生を増大させることは、より大量のイソプレン生産も同様にもたらすと考えられる。グルコースからのメバロン酸生成のモル収率を増大させることは、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、イソペンテニル二リン酸イソメラーゼ (例えば下流M V A経路) の、およびイソプレンおよびイソプレノイド生産のためのその他の適切な酵素の、適切な酵素活性レベルと組み合わせると、グルコースから生成されるイソプレノイド前駆体、イソプレンおよび/またはイソプレノイドのより高いモル収率につながる。

【0242】

本明細書に記載されるように、本発明は、イソプレンを産生できる組換え細胞を提供し、細胞は、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドコードする、1つまたは複数の異種核酸および (i) 完全M V A経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸 (すなわち、上流M V A経路および下流M V A経路) および (i i) イソプレシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸を含んでなり、細胞は、回収可能

のイソプレンを産生できる。特定の実施形態では、本発明は、イソプレンの生産を向上させる能力がある組換え細胞を提供し、細胞は、(i) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(ii) イソプレニンターゼポリペプチドをコードする異種核酸を含んでなり、ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする、1つまたは複数の異種核酸および細胞は、ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含まないイソプレン産生細胞と比較して、増大した量のイソプレンを産生する。

【0243】

イソプレンの生産はまた、酵素活性が調節されて、メバロン酸生成と、引き続くイソプレノイド前駆体、イソプレノイド、および／またはイソプレン生産に向かう炭素流が増大される、酵素経路操作の1つまたは複数をさらに含んでなる、本明細書に記載される組換え宿主細胞のいずれかを使用して実施し得る。アセチルCoA生成のためのホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大させるために操作された様々な酵素経路を有する、本明細書に記載される組換え細胞をメバロン酸生産と、引き続くイソプレノイド前駆体、イソプレノイド、および／またはイソプレン生産のために使用し得る。一実施形態では、組換え細胞は、リボース-5-リン酸イソメラーゼ(rpiAおよび／またはrpiB)、D-リブロー-5-リン酸-3-エピメラーゼ(rpe)、トランスケトラゼ(tktAおよび／またはtktB)、トランスアルドラーゼB(talB)、リン酸アセチルトランスフェラーゼ(ptaおよび／またはeutD)からなる群から選択される、遺伝子の1つまたは複数の活性を増大させるように、さらに操作し得る。別の実施形態では、これらの組換え細胞は、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(zwf)、6-ホスホフルクトキナーゼ-1(pkfAおよび／またはpkfB)、フルクトースビスホスフェートアルドラーゼ(fba、fbaA、fbaB、および／またはfbaC)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(gapAおよび／またはgapB)、酢酸キナーゼ(ackA)、クエン酸シンターゼ(gltA)、EI(ptsI)、EIICB^{G1c}(ptsG)、EIIA^{G1c}(crr)、および／またはHPr(ptsH)遺伝子をはじめとする、1つまたは複数の遺伝子の活性を低下させるように、さらに操作し得る。

【0244】

下流MVA経路のポリペプチドをコードする核酸

本発明のいくつかの態様では、本明細書に記載される組成または方法のいずれかに記載される細胞は、下流メバロン酸(MVA)経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる。いくつかの態様では、下流MVA経路ポリペプチドは、内在性ポリペプチドである。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする内在性核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする内在性核酸は、誘導性プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする内在性核酸は、強力プロモーターと作動可能に連結する。特定の態様では、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性下流MVA経路ポリペプチドを過剰発現するように操作される。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする内在性核酸は、弱いプロモーターと作動可能に連結する。

【0245】

下流メバロン酸生合成経路は、メバロン酸キナーゼ(MVK)、ホスホメバロン酸キナーゼ(PMK)、およびジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ(MVD)を含んでなる。いくつかの態様では、下流MVA経路は、イソペンテニル二リン酸イソメラーゼ(IDI)をさらに含んでなり得る。本明細書で提供される細胞は、イソプレニンターゼ、1つまたは複数の上流MVA経路ポリペプチド、および／または1つまたは複数の下流MVA経路ポリペプチドをコードする、少なくとも1つの核酸を含んでなり得る。下流MVA経路のポリペプチドは、(a) メバロン酸をメバロン酸5-リン酸にリン酸化する；(b) メバロン酸5-リン酸をメバロン酸5-ピロリン酸に変換する；および(c) メバロン酸5-ピロリン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する任意の酵素であり得る。より具

体的には、メバロン酸をメバロン酸 5-リン酸にリン酸化する酵素は、M. マゼイ (M. m a z e i) メバロン酸キナーゼ、ラクトバチルス属 (L a c t o b a c i l l u s) 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 (L a c t o b a c i l l u s s a k e i) 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、サッカロミセス・セレビシエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス属 (S t r e p t o c o c c u s) 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 (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトミセス属 (S t r e p t o m y c e s) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトミセス属 (S t r e p t o m y c e s) C L 1 9 0 メバロン酸キナーゼポリペプチド、および M. ブルトニイ (M. B u r t o n i i) メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群に由来し得る。別の態様では、メバロン酸をメバロン酸 5-リン酸にリン酸化する酵素は、M. マゼイ (M. m a z e i) メバロン酸キナーゼである。

10

【0246】

いくつかの態様では、下流MVA経路ポリペプチドは、異種ポリペプチドである。いくつかの態様では、細胞は、下流MVA経路ポリペプチドをコードする異種核酸の2つ以上のコピーを含んでなる。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする異種核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする異種核酸は、誘導性プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする異種核酸は、強力プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする異種核酸は、弱いプロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、異種下流MVA経路ポリペプチドは、サッカロミセス・セレビシエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e)、エンテロコッカス・ファエカリス (E n t e r o c o c c u s f a e c a l i s)、またはメタノサルシナ・マゼイ (M e t h a n o s a r c i n a m a z e i) からのポリペプチドである。

20

【0247】

下流MVA経路ポリペプチドをコードする核酸は、細胞のゲノムに組み込まれ得て、または細胞内で安定して発現され得る。下流MVA経路ポリペプチドをコードする核酸は、ベクター上にさらに存在し得る。

【0248】

例示的な下流MVA経路ポリペプチドを以下にさらに提供する：(i) メバロン酸キナーゼ (MVK)；(ii) ホスホメバロン酸キナーゼ (PMK)；(iii) ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (MVD)；および(iv) イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ (IDI)。具体的には、下流MVKポリペプチドは、メタノサルシナ属 (M e t h a n o s a r c i n a) に由来し得て、より具体的には、下流MVKポリペプチドは、メタノサルシナ・マゼイ (M e t h a n o s a r c i n a m a z e i) に由来し得る。いくつかの実施形態では、下流MVKポリペプチドは、M. ブルトニイ (M. b u r t o n i i) に由来し得る。下流MVA経路ポリペプチドの追加的な例は、下流MVK経路ポリペプチドおよび下流MVK経路ポリペプチド変異体に関して、その内容全体を明示的に参照によって本明細書に援用する、米国特許出願公開第2010/0086978号明細書にある。

30

40

【0249】

下流MVA経路ポリペプチドとしては、下流MVA経路ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。例示的な下流MVA経路核酸としては、下流MVA経路ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的な下流MVA経路ポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する、天然ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。さらに、より良いイソプレン生産の結果をもたらす、下流MVA経路ポリペプチド変異体もまた使用し得る。

50

【0250】

いくつかの態様では、下流MVA経路ポリペプチドは、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*)、またはメタノサルシナ・マゼイ (*Methanosarcina mazei*)からのポリペプチドである。いくつかの態様では、MVKポリペプチドは、ラクトバチルス属 (*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、サッカロミセス・セレビスエ (*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属 (*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、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) CL190メバロン酸キナーゼポリペプチド、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、およびM. ブルトニイ (*M. Burtonii*) 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。本明細書に記載されるいずれかのプロモーター（例えば、誘導性プロモーターおよび構成的プロモーターをはじめとする、本明細書に記載されて、本開示の実施例で同定されるプロモーター）を使用して、本明細書に記載されるMVAポリペプチドのいずれかの発現を駆動し得る。

【0251】

本明細書に記載される細胞のいずれでも、IDI核酸（例えば、IDIをコードする内在性または異種核酸）を含んでなり得る。イソペンテニルニリン酸イソメラーゼポリペプチド（イソペンテニルニリン酸ΔイソメラーゼまたはIDI）は、イソペンテニルニリン酸（IPP）とジメチルアリルニリン酸（DMAPP）の相互変換を触媒する（例えば、IPPをDMAPPに変換し、および／またはDMAPPをIPPに変換する）。例示的なIDIポリペプチドとしては、IDIポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。（本明細書に記載されるものなどの）標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内で、細胞内抽出物中で、または生体内で、IPPおよびDMAPPを相互転換する能力を測定することで、ポリペプチドがIDIポリペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。例示的なIDI核酸としては、IDIポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的なIDIポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸、ならびに本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する変異ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。

【0252】

イソプレニンターゼポリペプチドをコードする核酸

本発明のいくつかの態様では、（本明細書に記載されるような、ホスホクエーラーゼ経路を通過する炭素流を増大するように操作されている宿主細胞をはじめとする）本明細書に記載される組成物または方法のいずれかに記載される細胞は、イソプレニンターゼポリペプチドをコードし、またはイソプレニンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる。いくつかの態様では、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。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、誘導性プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、強力なプロモーターと作動可能に連結する。特定の態様では、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性イソプレニンターゼ経路ポリペプチドを過剰発現するように操作される。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポ

リペプチドをコードする内在性核酸は、弱いプロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレシンターゼポリペプチドは、クズ属 (*Pueraria*) またはポプラ属 (*Populus*) またはウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) × ヤマナラシ (*Populus tremula*) などの雑種からのポリペプチドである。

【0253】

いくつかの態様では、イソプレシンターゼポリペプチドは、異種ポリペプチドである。いくつかの態様では、細胞は、イソプレシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸の2つ以上のコピーを含んでなる。いくつかの態様では、イソプレシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、誘導性プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、強力なプロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、弱いプロモーターと作動可能に連結する。

10

【0254】

イソプレシンターゼポリペプチドをコードする核酸は、宿主細胞ゲノムに組み込み得て、または細胞内で安定して発現させ得る。イソプレシンターゼをコードする核酸は、さらにベクター上に存在し得る。

【0255】

20

例示的なイソプレシンターゼ核酸としては、イソプレシンターゼポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。イソプレシンターゼポリペプチドは、ジメチルアリルニリン酸 (DMA PP) をイソプレンに変換する。例示的なイソプレシンターゼポリペプチドとしては、イソプレシンターゼポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。例示的なイソプレシンターゼポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。さらに、イソプレシンターゼ変異体は、改善された酵素活性などの改善された活性を有し得る。いくつかの態様では、イソプレシンターゼ変異体は、改善された安定性 (例えば、熱安定性)、および/または改善された溶解度などのその他の改善された特性を有する。

30

【0256】

標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内で、細胞抽出物中で、または生体内で、DMA PPをイソプレンに変換する能力を測定することで、ポリペプチドがイソプレシンターゼポリペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。細胞抽出物中のイソプレシンターゼポリペプチド活性は、例えば、Silver et al., J. Biol. Chem. 270:13010-13016, 1995に記載されるようにして、測定し得る。1つの例示的なアッセイでは、窒素流下で、DMA PP (Sigma) を蒸発するまで乾燥させて、100 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 8.2 中で100 mMの濃度に再水和して、-20 °Cで保存し得る。アッセイを実施するために、金属ねじ蓋およびテフロン被覆ケイ素隔壁付き20 mlのHeadspaceバイアル (Agilent Technologies) 内の25 µLの細胞抽出物に、5 µLの1 M MgCl₂、1 mMの(250 µg/ml) DMA PP、65 µLの植物抽出緩衝液 (PEB) (50 mMのTris-HCl, pH 8.0、20 mMのMgCl₂、5%グリセロール、および2 MのDTT) の溶液を添加して、振盪しながら37 °Cで15分間培養し得る。反応は、200 µLの250 mM EDTAを添加することでクエンチし、GC/MSによって定量化し得る。

40

【0257】

いくつかの態様では、イソプレシンターゼポリペプチドは、植物イソプレシンターゼポリペプチドまたはその変異体である。いくつかの態様では、イソプレシンターゼポ

50

リペプチドは、クズ属 (*Pueraria*) からのイソプレニンターゼまたはその変異体である。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、ポプラ属 (*Populus*) からのイソプレニンターゼまたはその変異体である。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、ポプライソプレニンターゼポリペプチドまたはその変異体である。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、クズイソプレニンターゼポリペプチドまたはその変異体である。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、クズ属 (*Pueraria*) またはポプラ属 (*Populus*) または雑種ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) × ヤマナラシ (*Populus tremula*) からのポリペプチドまたはそれらの変異体である。

【0258】

いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドまたは核酸は、マメ亜科 (*Faboideae*) などのマメ科 (*Fabaceae*) に由来する。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドまたは核酸は、プエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*) (クズ) (Sharkey et al., Plant Physiology 137:700-712, 2005)、プエラリア・ロバタ (*Pueraria lobata*)、ポプラ (ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*))、セイヨウハコヤナギ (*Populus nigra*)、コットンウッド (*Populus trichocarpa*)、またはウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) × ヤマナラシ (*tremula*) (CAC35696) など (Miller et al., Planta 213:483-487, 2001)、アスペン (ポプルス・トレムロイデス (*Populus tremuloides*) など (Silver et al., JBC 270(22):13010-1316, 1995)、ヨーロッパナラ (*Quercus obur*) (Zimmerらに付与された国際公開第98/02550号パンフレット) からのポリペプチドまたは核酸、またはその変異体である。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、プエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*)、プエラリア・ロバタ (*Pueraria lobata*)、ポプルス・トレムロイデス (*Populus tremuloides*)、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*)、セイヨウハコヤナギ (*Populus nigra*)、またはコットンウッド (*Populus trichocarpa*) からのイソプレニンターゼまたはその変異体である。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) からのイソプレニンターゼまたはその変異体である。いくつかの態様では、イソプレニンターゼ (例えば、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) からのイソプレニンターゼまたはその変異体) をコードする核酸は、コドン最適化される。

【0259】

いくつかの態様では、イソプレニンターゼ核酸またはポリペプチドは、天然ポリペプチドまたは核酸 (例えば、ポプラ属 (*Populus*) からの天然ポリペプチドまたは核酸) である。いくつかの態様では、イソプレニンターゼ核酸またはポリペプチドは、野生型または天然ポリペプチドまたは核酸でない。いくつかの態様では、イソプレニンターゼ核酸またはポリペプチドは、野生型または天然ポリペプチドまたは核酸の変異体 (例えば、ポプラ属 (*Populus*) からの野生型または天然ポリペプチドまたは核酸の変種) である。

【0260】

いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、変種である。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、野生型または天然起源イソプレニンターゼの変種である。いくつかの態様では、変種は、野生型または天然起源イソプレニンターゼと比較して、改善された触媒活性などの改善された活性を有する。活性 (例えば、触媒活性) の増大は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%のいずれかであり得る。いくつかの態様では、触媒活性などの活性の増大は、少なくとも約1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、30倍

10

20

30

40

50

、40倍、50倍、75倍、または100倍のいずれかである。いくつかの態様では、触媒活性などの活性の増大は、約10%～約100倍（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、または約5倍～約20倍）である。いくつかの態様では、変種は、野生型または天然起源イソプレシンターゼと比較して、改善された溶解度を有する。溶解度の増大は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%のいずれかであり得る。溶解度の増大は、少なくとも約1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍、または100倍のいずれかであり得る。いくつかの態様では、溶解度の増大は、約10%～約100倍（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、または約5倍～約20倍）である。いくつかの態様では、イソプレシンターゼポリペプチドは、天然起源イソプレシンターゼの変異体であり、天然起源イソプレシンターゼと比較して、改善された安定性（熱安定性など）を有する。

10

【0261】

いくつかの態様では、変異体は、野生型または天然起源イソプレシンターゼの少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約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、野生型または天然起源イソプレシンターゼと、配列類似性を共有し得る。いくつかの態様では、野生型または天然起源イソプレシンターゼの変異体は、野生型または天然起源イソプレシンターゼと、少なくとも約40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または99.9%のいずれかのアミノ酸配列同一性を有し得る。いくつかの態様では、野生型または天然起源イソプレシンターゼの変異体は、野生型または天然起源イソプレシンターゼと、約70%～約99.9%、約75%～約99%、約80%～約98%、約85%～約97%、または約90%～約95%のアミノ酸配列同一性のいずれかを有する。

20

【0262】

いくつかの態様では、変異体は、野生型または天然起源イソプレシンターゼ中に、変異を含んでなる。いくつかの態様では、変異体は、少なくとも1つのアミノ酸置換、少なくとも1つのアミノ酸挿入、および／または少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する。いくつかの態様では、変異体は、少なくとも1つのアミノ酸置換を有する。いくつかの態様では、変異体と、野生型または天然起源イソプレシンターゼの間で異なるアミノ酸残基の数は、例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50以上のアミノ酸残基など、1つまたは複数であり得る。天然起源イソプレシンターゼとしては、例えば、葛イソプレシンターゼ、ポプライソプレシンターゼ、ヨーロッパナライソプレシンターゼ、および柳イソプレシンターゼなど、植物からの任意のイソプレシンターゼが挙げられる。いくつかの態様では、変異体は、ウラジロハコヤナギ（*Populus alba*）からのイソプレシンターゼの変異体である。いくつかの態様では、ウラジロハコヤナギ（*Populus alba*）からのイソプレシンターゼの変異体は、少なくとも1種のアミノ酸置換、少なくとも1種のアミノ酸挿入、および／または少なくとも1種のアミノ酸欠失を有する。いくつかの態様では、変異体は、トランケート型ウラジロハコヤナギ（*Populus alba*）イソプレシンターゼである。いくつかの態様では、変異体（例えば、ウラジロハコヤナギ（*Populus alba*）からのイソプレシンターゼの変異体をコードする核酸は、コドン最適化される（例えば、その中で異種イソプレシンターゼが発現される宿主細胞に基づいてコドン最適化される）。

40

【0263】

本明細書で提供されるイソプレシンターゼポリペプチドは、イソプレシンターゼお

50

よびイソプレニンシンターゼ変異体に関して、その内容全体を明示的に参照によって本明細書に援用する、国際公開第2009/132220号パンフレット、国際公開第2010/124146号パンフレット、および米国特許出願公開第2010/0086978号明細書に記載される、イソプレニンシンターゼまたはイソプレニンシンターゼ変異体のいずれかであり得る。

【0264】

本明細書に記載されるプロモーター（例えば、誘導性プロモーターおよび構成的プロモーターをはじめとする、本明細書に記載されて、本開示の実施例で同定されるいずれかのプロモーター）を使用して、本明細書に記載されるイソプレニンシンターゼのいずれかの発現を駆動し得る。

10

【0265】

適切なイソプレニンシンターゼとしては、Genbank受入番号AY341431、AY316691、AY279379、AJ457070、およびAY182241によって同定されるものが挙げられるが、これに限定されるものではない。本明細書に記載される組成物、またはイソプレニンシンターゼをコードする微生物を作成する方法をはじめとする方法のいずれかで、使用し得るイソプレニンシンターゼのタイプは、国際公開第2009/076676号パンフレット、国際公開第2010/003007号パンフレット、国際公開第2009/132220号パンフレット、国際公開第2010/031062号パンフレット、国際公開第2010/031068号パンフレット、国際公開第2010/031076号パンフレット、国際公開第2010/013077号パンフレット、国際公開第2010/031079号パンフレット、国際公開第2010/148150号パンフレット、国際公開第2010/124146号パンフレット、国際公開第2010/078457号パンフレット、国際公開第2010/148256号パンフレット、国際公開第2012/058494号パンフレット、および米国特許第8,173,410号明細書にもまた記載される。

20

【0266】

イソプレニン生合成経路

イソプレニンは、2種の異なるアルコール、3-メチル-2-ブテン-1-オール、および2-メチル-3-ブテン-2-オールから生成され得る。例えば、二段階イソプレニン生合成経路では、シンターゼ（例えば、2-メチル-3-ブテン-2-オールシンターゼ）などの酵素によって、ジメチルアリルニリン酸が2-メチル-3-ブテン-2-オールに変換され、2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼによる、2-メチル-3-ブテン-2-オールのイソプレニンへの変換がそれに続いた。別の例として、三段階イソプレニン生合成経路では、ジメチルアリルニリン酸を3-メチル-2-ブテン-1-オールに変換できるホスファターゼまたはシンターゼ（例えば、ゲラニオールシンターゼまたはファルネソールシンターゼ）のどちらかによって、ジメチルアリルニリン酸が3-メチル-2-ブテン-1-オールに変換され、2-メチル-3-ブテン-2-オールイソメラーゼによって、3-メチル-2-ブテン-1-オールが2-メチル-3-ブテン-2-オールに変換され、2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼによって、2-メチル-3-ブテン-2-オールがイソプレニンに変換される。例えば、米国特許出願公開第20130309742A1号明細書、および米国特許出願公開第20130309741A1号明細書を参照されたい。

30

40

【0267】

本発明のいくつかの態様では、本明細書に記載される組成物または方法のいずれかに記載される細胞（本明細書に記載されるように改変された宿主細胞を含む）は、2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼ、2-メチル-3-ブテン-2-オールイソメラーゼ、および3-メチル-2-ブテン-1-オールシンターゼからなる群から選択される、イソプレニン生合成経路のポリペプチドをコードする、1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる。いくつかの態様では、イソプレニン生合成経路のポリペプチドは、内在性ポリペプチドである。いくつかの態様では、イソプレニン生合成経路のポリペプチドをコードす

50

る内在性核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレレン生合成経路のポリペプチドをコードする内在性核酸は、誘導性プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレレン生合成経路のポリペプチドをコードする内在性核酸は、強力なプロモーターと作動可能に連結する。特定の態様では、細胞が、野生型細胞と比較して、イソプレレン生合成経路の内在性ポリペプチドを過剰発現するように改変される。いくつかの態様では、イソプレレン生合成経路のポリペプチドをコードする内在性核酸は、弱いプロモーターと作動可能に連結する。

【0268】

いくつかの態様では、イソプレレン生合成経路のポリペプチドは、異種ポリペプチドである。いくつかの態様では、細胞は、イソプレレン生合成経路のポリペプチドをコードする異種核酸の2つ以上のコピーを含んでなる。いくつかの態様では、イソプレレン生合成経路のポリペプチドをコードする異種核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレレン生合成経路のポリペプチドをコードする異種核酸は、誘導性プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレレン生合成経路のポリペプチドをコードする異種核酸は、強力なプロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレレン生合成経路のポリペプチドをコードする異種核酸は、弱いプロモーターと作動可能に連結する。

10

【0269】

イソプレレン生合成経路のポリペプチドをコードする核酸は、宿主細胞ゲノムに組み込み得て、または細胞内で安定して発現させ得る。イソプレレン生合成経路のポリペプチドをコードする核酸は、さらにベクター上に存在し得る。

20

【0270】

例示的なイソプレレン生合成経路のポリペプチドをコードする核酸としては、2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼポリペプチド、2-メチル-3-ブテン-2-オールイソメラーゼポリペプチド、および3-メチル-2-ブテン-1-オールシンターゼポリペプチドなどの、イソプレレン生合成経路のポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的なイソプレレン生合成経路のポリペプチド、およびイソプレレン生合成経路のポリペプチドをコードする核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。さらに、イソプレレン生合成経路のポリペプチドの変異体（例えば、2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼポリペプチド、2-メチル-3-ブテン-2-オールイソメラーゼポリペプチド、および3-メチル-2-ブテン-1-オールシンターゼポリペプチド）は、改善された酵素活性などの改善された活性を有し得る。

30

【0271】

いくつかの態様では、イソプレレン生合成経路のポリペプチドは、ホスファターゼである。例示的なホスファターゼとしては、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) または大腸菌 (*Escherichia coli*) からのホスファターゼが挙げられる。いくつかの実施形態では、ホスファターゼは、3-メチル-2-ブテン-1-オールシンターゼポリペプチドまたはその変異体である。いくつかの態様では、イソプレレン生合成経路のポリペプチドは、テルペンシンターゼ（例えば、ゲラニオールシンターゼ、ファルネソールシンターゼ、リナロールシンターゼまたはネロリドールシンターゼ）である。例示的なテルペンシンターゼとしては、スイートバジル (*Ocimum basilicum*)、レモンエゴマ (*Perilla citriodora*)、エゴマ (*Perilla frutescens*)、シナモム・テヌイピル (*Cinnamomum tenuipile*)、トウモロコシ (*Zea mays*) またはイネ (*Oryza sativa*) からのテルペンシンターゼが挙げられる。追加的な例示的テルペンシンターゼとしては、クラルキア・ブレウエリ (*Clarkia breweri*)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、セトエゴマ (*Perilla setoensis*)、エゴマ (*Perilla frutescens*)、サルナ

40

50

シ (*Actinidia arguta*)、マタタビ (*Actinidia polygama*)、クソニンジン (*Artemisia annua*)、スイートバジル (*Ocimum basilicum*)、ミズハッカ (*Mentha aquatica*)、トマト (*Solanum lycopersicum*)、タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*)、コットンウッド (*Populus trichocarpa*)、エゾヘビイチゴ (*Fragaria vesca*)、またはオランダイチゴ (*Fragaria ananassa*) からのテルペンシンターゼが挙げられる。いくつかの実施形態では、テルペンシンターゼは、3-メチル-2-ブテン-1-オールシンターゼポリペプチドまたはその変異体である。例えば、本明細書に記載されるテルペンシンターゼは、ジメチルアリルニリン酸から3-メチル-2-ブテン-1-オールへの変換を触媒し得る (例えば、3-メチル-2-ブテン-1-オールシンターゼ)。いくつかの態様では、本明細書に記載されるテルペンシンターゼは、ジメチルアリルニリン酸から2-メチル-3-ブテン-2-オールへの変換を触媒し得る (例えば、2-メチル-3-ブテン-2-オールシンターゼ)。いくつかの態様では、イソプレン生合成経路のポリペプチドは、2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼポリペプチド (例えば、アキンコラ・ターチアリカルボニス (*Aquincola tertiari carbonis*) からの2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼポリペプチド) またはその変異体である。いくつかの態様では、2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼポリペプチドは、リナロールデヒドラターゼイソメラーゼポリペプチド (例えば、カステラニエラ・デフラグランス (*Castellaniella defragrans*) Genbank 受入番号 FR669447 からのリナロールデヒドラターゼイソメラーゼポリペプチド) またはその変異体である。いくつかの態様では、イソプレン生合成経路のポリペプチドは、2-メチル-3-ブテン-2-オールイソメラーゼポリペプチドまたはその変異体である。いくつかの態様では、2-メチル-3-ブテン-2-オールイソメラーゼポリペプチドは、リナロールデヒドラターゼイソメラーゼポリペプチド (例えば、カステラニエラ・デフラグランス (*Castellaniella defragrans*) Genbank 受入番号 FR669447 からのリナロールデヒドラターゼイソメラーゼポリペプチド) またはその変異体である。

【0272】

標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、DMAPPをイソプレンに変換する能力を測定することで、ポリペプチドが所望のイソプレン生合成経路酵素活性 (例えば、2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼ活性、2-メチル-3-ブテン-2-オールイソメラーゼ活性、および3-メチル-2-ブテン-1-オール活性) を有するかどうかを判定し得る。例えば、米国特許出願公開第20130309742A1号明細書、および米国特許出願公開第20130309741A1号明細書を参照されたい。

【0273】

いくつかの態様では、イソプレン生合成経路のポリペプチド (例えば、2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼポリペプチド、2-メチル-3-ブテン-2-オールイソメラーゼポリペプチド、および3-メチル-2-ブテン-1-オールシンターゼポリペプチド) は、変異体である。いくつかの態様では、イソプレン生合成経路のポリペプチド (例えば、2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼポリペプチド、2-メチル-3-ブテン-2-オールイソメラーゼポリペプチド、および3-メチル-2-ブテン-1-オールシンターゼポリペプチド) は、イソプレン生合成経路の野生型または天然起源ポリペプチドの変異体である。いくつかの態様では、変異体は、イソプレン生合成経路の野生型または天然起源ポリペプチドと比較して、改善された触媒活性などの改善された活性を有する。活性 (例えば、触媒活性) の増大は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%のいずれかであり得る。いくつかの態様では、触媒活性などの活性の増大は、少なくとも約1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍、または100倍のいずれか

である。いくつかの態様では、触媒活性などの活性の増大は、約10%～約100倍（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、または約5倍～約20倍）である。いくつかの態様では、変異体は、イソプレレン生合成経路の野生型または天然起源ポリペプチドと比較して、改善された溶解度を有する。溶解度の増大は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%のいずれかであり得る。溶解度の増大は、少なくとも約1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍、または100倍のいずれかであり得る。いくつかの態様では、溶解度の増大は、約10%～約100倍（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、または約5倍～約20倍）である。いくつかの態様では、イソプレレン生合成経路ポリペプチドは、イソプレレン生合成経路の天然起源ポリペプチドの変異体であり、イソプレレン生合成経路の天然起源ポリペプチドと比較して、改善された安定性（熱安定性など）を有する。

10

【0274】

いくつかの態様では、変異体は、イソプレレン生合成経路の野生型または天然起源ポリペプチド（例えば、2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼポリペプチド、2-メチル-3-ブテン-2-オールイソメラーゼポリペプチド、および3-メチル-2-ブテン-1-オールシンターゼポリペプチド）の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約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、イソプレレン生合成経路の野生型または天然起源ポリペプチドと、配列類似性を共有し得る。いくつかの態様では、イソプレレン生合成経路の野生型または天然起源ポリペプチドの変異体は、イソプレレン生合成経路の野生型または天然起源ポリペプチド（例えば、2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼポリペプチド、2-メチル-3-ブテン-2-オールイソメラーゼポリペプチド、および3-メチル-2-ブテン-1-オールシンターゼポリペプチド）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%、または99.9%のいずれかのアミノ酸配列同一性を有し得る。いくつかの態様では、イソプレレン生合成経路の野生型または天然起源ポリペプチドの変異体は、イソプレレン生合成経路の野生型または天然起源ポリペプチド（例えば、2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼポリペプチド、2-メチル-3-ブテン-2-オールイソメラーゼポリペプチド、および3-メチル-2-ブテン-1-オールシンターゼポリペプチド）と、約70%～約99.9%、約75%～約99%、約80%～約98%、約85%～約97%、または約90%～約95%のいずれかのアミノ酸配列同一性を有する。

20

30

【0275】

いくつかの態様では、変異体は、イソプレレン生合成経路の野生型または天然起源ポリペプチド（例えば、2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼポリペプチド、2-メチル-3-ブテン-2-オールイソメラーゼポリペプチド、および3-メチル-2-ブテン-1-オールシンターゼポリペプチド）中に、変異を含んでなる。いくつかの態様では、変異体は、少なくとも1つのアミノ酸置換、少なくとも1つのアミノ酸挿入、および／または少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する。いくつかの態様では、変異体は、少なくとも1つのアミノ酸置換を有する。いくつかの態様では、イソプレレン生合成経路の変異体と、野生型または天然起源ポリペプチドの間で異なるアミノ酸残基の数は、例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50以上のアミノ酸残基など、1つまたは複数であり得る。いくつかの態様では、変異体（例えば、2-メチル-3-ブテン-2-オールデヒドラターゼポリペプチド、2-メチル-3-ブテン-2-オールイソ

40

50

メラゼポリペプチド、および3-メチル-2-ブテン-1-オールシンターゼポリペプチド)をコードする核酸は、コドン最適化される(例えば、イソプレネン合成経路の異種ポリペプチドがその中で発現される宿主細胞に基づいて、コドン最適化される)。

【0276】

本明細書に記載されるプロモーター(例えば、誘導性プロモーターおよび構成的プロモーターをはじめとする、本明細書に記載される本開示の実施例で同定されるプロモーター)のいずれかを使用して、本明細書に記載されるイソプレネン合成経路のポリペプチドのいずれかの発現を駆動し得る。

【0277】

DXP経路ポリペプチドをコードする核酸

本発明のいくつかの態様では、(本明細書に記載されるようにホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大させるように操作されている宿主細胞をはじめとする)本明細書に記載される組成物または方法のいずれかに記載される細胞は、DXSポリペプチドまたはその他のDXP経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸をさらに含んでなる。いくつかの態様では、細胞は、DXSポリペプチドまたはその他のDXP経路ポリペプチドをコードする内在性核酸の染色体のコピーをさらに含んでなる。いくつかの態様では、大腸菌(E. coli)細胞は、IDIポリペプチドおよびDXSポリペプチドまたはその他のDXP経路ポリペプチドをコードする、1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる。いくつかの態様では、1つの核酸が、イソプレネンシンターゼポリペプチド、IDIポリペプチド、およびDXSポリペプチドまたはその他のDXP経路ポリペプチドをコードする。いくつかの態様では、1つのプラスミドが、イソプレネンシンターゼポリペプチド、IDIポリペプチド、およびDXSポリペプチドまたはその他のDXP経路ポリペプチドをコードする。いくつかの態様では、複数のプラスミドが、イソプレネンシンターゼポリペプチド、IDIポリペプチド、およびDXSポリペプチドまたはその他のDXP経路ポリペプチドをコードする。

【0278】

例示的なDXSポリペプチドとしては、DXSポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。(本明細書に記載されるものなどの)標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、ピルビン酸および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-リン酸に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どうかを判定し得る。例示的なDXSポリペプチドおよび核酸およびDXS活性を測定する方法は、国際公開第2009/076676号パンフレット、国際公開第2010/003007号パンフレット、国際公開第2009/132220号パンフレット、および米国特許第2009/0203102号明細書、米国特許第2010/0003716号明細書、および米国特許第2010/0048964号明細書に、より詳細に記載される。

【0279】

例示的なDXP経路ポリペプチドとしては、DXP経路ポリペプチドの1つまたは2つ以上の活性を有する、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、およびポリペプチド(例えば、融合ポリペプチド)のいずれかが挙げられるが、これに限定されるものではない。特に、DXP経路ポリペプチドとしては、DXP経路ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。例示的なDXP経路核酸としては、DXP経路ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的なDXP経路ポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸、ならびに本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する変異ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。例示的なDXP経路ポリペプチド、および核酸、および

D X P経路ポリペプチド活性を測定する方法は、国際公開第2010/148150号パンフレットにより詳細に記載される。

【0280】

例示的なD X Sポリペプチドとしては、D X Sポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。(本明細書に記載されるものなどの)標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、ピルビン酸および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-リン酸に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どうかを判定し得る。例示的なD X Sポリペプチド、および核酸、およびD X S活性を測定する方法は、国際公開第2009/076676号パンフレット、国際公開第2010/003007号パンフレット、国際公開第2009/132220号パンフレット、および米国特許第2009/0203102号明細書、米国特許第2010/0003716号明細書、および米国特許第2010/0048964号明細書により詳細に記載される。

10

【0281】

特に、D X Sポリペプチドは、ピルビン酸および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)に変換する。標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、ピルビン酸および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どうかを判定し得る。

20

【0282】

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(M E P)に変換する。標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、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どうかを判定し得る。

【0283】

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(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)に変換する。標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、M E P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どうかを判定し得る。

30

【0284】

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(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)に変換する。標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、C D P-M E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どうかを判定し得る。

【0285】

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(C D P-M E P)を2-C-メチル-D-エリスリトール2、4-シクロニリン酸(M E-C P Pまたはc M E P P)に変換する。標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、C D P-M E P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どうかを判定し得る。

40

【0286】

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-シクロニリン酸を(E)-4-ヒドロキシ-3-メチルブテ-2-エン-1-イルニリン酸(H M B P PまたはH D M A P P)に変換する。標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、M E-C P Pを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがH D Sポリペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。

50

【0287】

HDRポリペプチドは、(E)-4-ヒドロキシ-3-メチルブテ-2-エン-1-イルニリン酸をイソペンテニルニリン酸 (IPP) およびジメチルアリルニリン酸 (DMA PP) に変換する。標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、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どうかを判定し得る。

【0288】

下流MVA経路、イソプレニンシンターゼ、IDI、およびDXP経路ポリペプチドの起源生物

イソプレニンシンターゼ、IDI、DXP経路、および／または下流MVA経路核酸（およびそれらがコードするポリペプチド）は、イソプレニンシンターゼ、IDI、DXP経路、および／または下流MVA経路核酸を天然に含有する、任意の生物から得られ得る。イソプレニンは、細菌、酵母、植物、および動物などの多様な生物によって、天然に形成される。いくつかの生物が、イソプレニンを生成するためのMVA経路を含有する。イソプレニンシンターゼ核酸は、例えば、イソプレニンシンターゼを含有する任意の生物から得られ得る。MVA経路核酸は、例えば、MVA経路を含有する任意の生物から得られ得る。IDIおよびDXP経路核酸は、例えば、IDIおよびDXP経路を含有する任意の生物から得られ得る。

【0289】

イソプレニンシンターゼ、DXP経路、IDI、および／またはMVA経路核酸の核酸配列は、細菌、真菌、植物、藻類、またはラン藻から単離され得る。例示的な起源生物としては、例えば、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) (例えば、*S. cerevisiae*) 種などの酵母、エシェリキア属 (*Escherichia*) (例えば、大腸菌 (*E. coli*) 種などの細菌、またはメタノサルシナ属 (*Methanosarcina*) の種 (例えば、メタノサルシナ・マゼイ (*Methanosarcina mazei*))、葛またはポプラ (例えば、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) またはウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) × ヤマナラシ (*Populus tremula*) CAC35696) またはアスペン (例えば、ポプルス・トレムロイデス (*Populus tremuloides*)) などの植物が挙げられる。使用し得る例示的なイソプレニンシンターゼ、IDI、および／またはMVA経路ポリペプチド起源は、国際公開第2009/076676号パンフレット、国際公開第2010/003007号パンフレット、国際公開第2009/132220号パンフレット、国際公開第2010/031062号パンフレット、国際公開第2010/031068号パンフレット、国際公開第2010/031076号パンフレット、国際公開第2010/013077号パンフレット、国際公開第2010/031079号パンフレット、国際公開第2010/148150号パンフレット、国際公開第2010/078457号パンフレット、および国際公開第2010/148256号パンフレットにもまた記載される。

【0290】

いくつかの態様では、起源生物は、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) 種、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*) 種、ピチア属 (*Pichia*) 種、またはカンジダ属 (*Candida*) 種などの酵母である。

【0291】

いくつかの態様では、起源生物は、*B. licheniformis* または *B. subtilis* などのバチルス属 (*Bacillus*) の株、*P. citrea* などのパントエア属 (*Pantoea*) の株、*P. alcaligenes* などのシュードモナス属 (*Pseudomonas*) の株、*S. lividans* または *S. rubiginosus* などのストレプトミセス属 (*Streptomyces*) の株、大腸菌 (*E. coli*) などのエシェリキア属 (*Escherichia*) の株、

10

20

30

40

50

hia) の株、Enterobacter の株、ストレプトコッカス属 (Streptococcus) の株、またはメタノサルシナ・マゼイ (Methanosarcina mazei) などの古細菌の株などの細菌である。

【0292】

本明細書の用法では、「バチルス属 (Bacillus)」としては、B. サブチリス (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)、および B. チューリングエンシス (B. thuringiensis) をはじめとするが、これに限定されるものではない、当業者に知られているような「バチルス属 (Bacillus)」内の全ての種が挙げられる。バチルス属 (Bacillus) は、分類学の再編成を継続的に受けていることが認識されている。したがって本属は、現在は「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) などの生物をはじめとするが、これに限定されるものではない、再分類された種を含むことが意図される。酸素の存在下における耐性内生孢子の生成は、バチルス属 (Bacillus) を決定付ける特徴と見なされるが、この特徴は、最近命名された、アリシクロバチルス属 (Allicyclobacillus)、アンフィバチルス属 (Amphibacillus)、アネウリニバチルス属 (Aneurinibacillus)、アノキシバチルス属 (Anoxybacillus)、ブレビバチルス属 (Brevibacillus)、フィロバチルス属 (Filobacillus)、グラシリバチルス属 (Gracilibacillus)、ハロバチルス属 (Halobacillus)、パエニバチルス属 (Paenibacillus)、サリバシルス属 (Salibacillus)、サーモバチルス属 (Thermobacillus)、ウレイバチルス属 (Ureibacillus)、およびバルジバチルス属 (Virgibacillus) にも当てはまる。

【0293】

いくつかの態様では、起源生物は、グラム陽性細菌である。非限定的例としては、ストレプトミセス属 (Streptomyces) (例えば、S. リビダンス (S. lividans)、S. コエリカラー (S. coelicolor)、または S. グリセウス (S. griseus)、およびバチルス属 (Bacillus) の株が挙げられる。いくつかの態様では、起源生物は、大腸菌 (E. coli) またはシュードモナス属 (Pseudomonas) 種などのグラム陰性細菌である。

【0294】

いくつかの態様では、起源生物は、マメ亜科 (Fabaceae) などのマメ科 (Fabaceae) からの植物などの植物である。いくつかの態様では、起源生物は、葛、ポプラ (ウラジロハコヤナギ (Populus alba) × ヤマナラシ (Populus tremula) CAC35696 など)、アスペン (ポプルス・トレムロイデス (Populus tremuloides) など)、またはヨーロッパナラ (Quercus robur) である。

【0295】

いくつかの態様では、起源生物は、緑藻類、紅藻類、灰色藻類、クロララクニオン藻類、ユーグレナ藻類、クロミスタ、または渦鞭毛藻類などの藻類である。

【0296】

いくつかの態様では、起源生物は、形態学に基づいて、以下の群のいずれかに分類されるラン藻などのラン藻である：クロオコッカス目 (Chroococcales)、ブレ

10

20

30

40

50

ウロカプサ目 (Pleurocapsales)、ユレモ目 (Oscillatoriales)、ネンジュモ目 (Nostocales)、またはスティゴネマ目 (Stigonematales)。

【0297】

イソプレンの生産増大能力がある組換え細胞

(本明細書に記載されるような、ホスホクトラゼ経路を通過する炭素流を増大させるように操作されている宿主細胞をはじめとする) 本明細書に記載される組換え細胞は、同一条件下で培養された場合に、異種核酸ホスホクトラゼポリペプチドの1つまたは複数のコピー、MVA経路ポリペプチドをコードする異種核酸の1つまたは複数のコピー、およびイソペンシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を欠く同一細胞を上回る濃度で、イソペンンを産生する能力を有する。細胞は、IDIポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸をさらに含んでなり得る。特定の実施形態では、ホスホクトラゼポリペプチドはバークホルデリア・フィトフィルマンズ (Burkholderia phytofirmans)、ラクトバチルス・ブフネリ (Lactobacillus buchneri)、ビフィドバクテリウム・ガリウム (Bifidobacterium gallium)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (Bifidobacterium dentium)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (Bifidobacterium bifidum)、および/またはクロストリジウム・アセトブチリカム (Clostridium acetobutylicum) に由来する。その他の実施形態では、ホスホクトラゼポリペプチドは、マイコバクテリウム・ギルバム (Mycobacterium gilvum)、シューワネラ・バルチカ (Shewanella baltica)、ラクトバチルス・ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus)、ラクトバチルス・クリスパータス (Lactobacillus crispatus)、ビフィドバクテリウム・ロングム (Bifidobacterium longum)、ロイコノストック・シトレウム (Leuconostoc citreum)、ブラディリゾビウム属 (Bradyrhizobium) 種、エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium)、ブルセラ・ミクロチ (Brucella microti)、ラクトバチルス・サリバリウス (Lactobacillus salivarius)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (Streptococcus agalactiae)、ロドコッカス・イムテケンシス (Rhodococcus imtechensis)、バークホルデリア・ゼノボランス (Burkholderia xenovorans)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (Mycobacterium intracellulare)、ニトロソモナス属 (Nitrosomonas) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、ロイコノストック・メセンテロイデス (Leuconostoc mesenteroides)、ストレプトミセス属 (Streptomyces) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (Lactobacillus buchneri)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (Streptomyces ghanaensis)、シアノセイス属 (Cyanothecae) 種、および/またはネオサルトリア・フィスケリ (Neosartorya fischeri) に由来する。別の実施形態では、ホスホクトラゼポリペプチドは、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)、エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (Enterococcus saccharolyticus)、エンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus)、マイコプラズマ・アリガトリス (Mycoplasma alligatoris)、カルノバクテリウム属 (Carnobacterium) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (Melissococcus plutonius)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (Tetragenococcus halophilus)、および/またはマイコプラズマ・ア

10

20

30

40

50

ルスリチデイス (*Mycoplasma arthritidis*) に由来する。別の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカテラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、
 ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカテラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングアエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) に由来する。
 いくつかの実施形態では、組換え細胞は、コリネバクテリウム属 (*Corynebacteria*) 種 (例えば *C. グルタミカム* (*C. glutamicum*)) である。

【0298】

一実施形態では、組換え細胞は、バークホルデルシア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。別の実施形態では、組換え細胞は、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。なおも別の実施形態では、組換え細胞は、ビフィドバクテリウム・ガリウム (*Bifidobacterium gallium*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。さらに別の実施形態では、
 組換え細胞は、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。別の実施形態では、組換え細胞は、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。なおも別の実施形態では、組換え細胞は、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。その他の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、
 ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデルシア・ゼノボランス (*Burkhold*

10

20

30

40

50

eria xenovorans)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (Mycobacterium intracellulare)、ニトロソモナス属 (Nitrosomonas) 種、シゾサッカロミセス・ボンベ (Schizosaccharomyces pombe)、ロイコノストック・メセンテロイデス (Leuconostoc mesenteroides)、ストレプトミセス属 (Streptomyces) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (Lactobacillus buchneri)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (Streptomyces ghanaensis)、シアノセイス属 (Cyanothecae) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (Neosartorya fischeri) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。なおも別の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、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)、エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (Enterococcus saccharolyticus)、エンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus)、マイコプラズマ・アリガトリス (Mycoplasma alligatoris)、カルノバクテリウム属 (Carnobacterium) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (Melissococcus plutonius)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (Tetragenococcus halophilus)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (Mycoplasma arthritidis) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。一実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (Streptococcus agalactiae)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (Mycoplasma agalactiae)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (Streptococcus gordonii)、キングラ・オラリス (Kingella oralis)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (Mycoplasma fermentans)、グラニュリカタラ・アディアセンス (Granulicatella adiacens)、マイコプラズマ・ホミニス (Mycoplasma hominis)、マイコプラズマ・クロコディリ (Mycoplasma crocodyli)、マイコバクテリウム・ボービス (Mycobacterium bovis)、ナイセリア属 (Neisseria) 種、ストレプトコッカス属 (Streptococcus) 種、エレモコッカス・コレオコラ (Eremococcus coleocola)、グラニュリカタラ・エレガンス (Granulicatella elegans)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (Streptococcus parasanguinis)、アエロコッカス・ウリナエ (Aerococcus urinae)、キングラ・キングアエ (Kingella kingae)、ストレプトコッカス・アウストラリス (Streptococcus australis)、ストレプトコッカス・クリセチ (Streptococcus criceti)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (Mycoplasma columbinum) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。

【0299】

いくつかの態様では、ホスホケトラゼをコードする異種核酸の1つまたは複数のコピー、MVA経路ポリペプチドをコードする異種核酸の1つまたは複数のコピー、およびイソプレニンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸は、宿主細胞の染色体のヌクレオチド配列に組み込まれる異種核酸である。その他の態様では、1つまたは複数の異種核酸は、プラスミドに組み込まれる。なおも別の態様では、1つまたは複数の異種核酸配列の少なくとも1つがプラスミドに組み込まれる一方で、1つまたは複数の異種核酸の少なくとも1つは細胞の染色体のヌクレオチド配列に組み込まれる。組換え細胞は、ホスホケトラゼポリペプチドを含まないイソプレニン産生細胞と比較して、少なく

10

20

30

40

50

とも5%高い量のイソプレンを産生し得る。代案としては、組換え細胞は、包括的に、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、または15%高い、ならびにこれらの数の間の任意の数値分高いイソプレンを産生し得る。

【0300】

本発明の一態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載されるようなホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、メバロン酸（MVA）経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、DXP経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、およびイソプレンシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなる、組換え細胞である。細胞は、IDIポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸をさらに含んでなり得る。1つまたは複数の異種核酸のいずれでも、構成的プロモーターと作動可能に連結し得て、誘導性プロモーターと作動可能に連結し得て、または誘導性および構成的プロモーターの組み合わせと作動可能に連結し得る。1つまたは複数の異種核酸は、さらに、強力なプロモーター、弱いプロモーター、および／または中程度のプロモーターと、作動可能に連結し得る。ホスホケトラーゼ、メバロン酸（MVA）経路ポリペプチド、DXP経路ポリペプチド、およびイソプレンシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸の1つまたは複数、を、宿主細胞のゲノムに組み込み得て、または細胞内で安定して発現させ得る。1つまたは複数の異種核酸は、ベクター上にさらに存在し得る。

【0301】

本明細書に記載される組成物また方法のいずれかに従った細胞によるイソプレンの生産は、向上させ得る（例えば、ホスホケトラーゼポリペプチド、イソプレンシンターゼポリペプチド、MVA経路ポリペプチド、および／またはDXP経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸の発現によって向上させる）。本明細書の用法では、イソプレンの生産「向上」とは、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を有しない細胞と比較した、本明細書に記載される組成物および方法のいずれかによって記載される細胞による、イソプレンの細胞生産性指標（CPI）増大、イソプレンの力価増大、イソプレンの質量収率増大、および／またはイソプレンの比生産性増大を指す。本明細書に記載される特定の実施形態では、宿主細胞は、ホスホケトラーゼ経路を通過するE4P、GAP、Ac-P、および／またはアセチルCoA生成に向かう炭素流が増大するようにさらに操作されている。

【0302】

本明細書に記載される組換え細胞によるイソプレンの生産は、約5%から約1,000,000倍向上させ得る。特定の態様では、イソプレンの生産は、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を発現しない細胞によるイソプレンの生産と比較して、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、または約50～約200倍）向上させ得る。本明細書に記載される特定の実施形態では、宿主細胞は、ホスホケトラーゼ経路を通過するMVA生成に向かう炭素流が増大するようにさらに操作されており、それによって、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を発現せず、ホスホケトラーゼ経路を通過するメバロン酸生成に向かう炭素流を増大させるように操作されていない細胞によるイソプレンの生産と比較して、イソプレンの生産向上が提供される。

【0303】

その他の態様では、本明細書に記載される組換え細胞によるイソプレンの生産は、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を発現しない細胞によるイソプレンの生産と比較して、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、100,000倍、200,000倍、500,000倍、または1,000,000倍のいずれかで、向上させ得る。本明細書に記載される特定の実施形態では、宿主細胞は、ホスホクトラーゼ経路を通過するMVA生成に向かう炭素流が増大するようにさらに操作されており、それによって、ホスホクトラーゼペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を発現せず、ホスホクトラーゼ経路を通過するメバロン酸生成に向かう炭素流を増大させるように操作されていない細胞によるイソプレンの生産と比較して、イソプレンの生産向上が提供される。

【0304】

本明細書でまた提供されるのは、ホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できるイソペン生産組換え細胞であって、組換え細胞は、(i)ホスホクトラーゼ活性を有して配列番号8と少なくとも65％の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、(ii)完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(iii)イソペンシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなり、(i)のホスホクトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、(a)グルコース上の細胞増殖、(b)キシロース上の細胞増殖、(c)細胞内アセチルリン酸の産生、または(d)グルコース-6-リン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。その他の実施形態では、性能指標値パラメータとしては、(e)イソペン収率タンパク質溶解度または(f)イソペン比生産性が、さらに挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号23と、少なくとも90％の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号24と、少なくとも90％の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号25と、少なくとも90％の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26と、少なくとも90％の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号27と、少なくとも90％の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号28と、少なくとも90％の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号29と、少なくとも90％の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号30と、少なくとも90％の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号31と、少なくとも90％の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチド(例えばE. ガリナーラム(E. gallinarum)からのホスホクトラーゼ)と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3.2を超える、3.4を超える、3.6を超える、3.8を超える、4を超える、4.2を超える、4.4を超える、4.6を超える、4.8を超える、5を超える、5.2を超える、5.4を超える、5.6を超える、5.8を超える、6を超える、6.2を超える、6.4を超える、6.6を超える、6.8を超える、7を超える、7.2を超える、7.4を超える、7.6を超える、7.8を超える、8を超える、8.2を超える、8.4を超える、8.6を超える、8.8、9を超える、9.2を超える、9.4を超える、9.6を超える、9.8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~0.5、約0.25~0.75、約0.5~1、約0.75~1.25、約1~1.5、約1.25~1.75、約1.5~2、約1.75~2.25、約2~2.5、約2.25~2.75、約2.5~3、約2.75~3.25

10

20

30

40

50

、約 3～3.5、約 3.25～3.75、約 3.5～4、約 3.75～4.25、約 4～4.5、約 4.25～4.75、約 4.5～5、約 4.75～5.25、約 5～5.5、約 5.25～5.75、約 5.5～6、約 6.25～6.75、約 6.5～7、約 6.75～7.25、約 7～7.5、約 7.75～8.25、約 8～8.5、約 8.25～8.75、約 8.5～9、約 8.75～9.25、約 9～9.5、約 9.25～9.75、または約 9.5～10 以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約 0.1～2、約 1～3、約 2～4、約 3～5、約 4～6、約 5～7、約 6～8、約 7～9、または約 8～10 以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホクトラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10 倍以上増大する。

【0305】

本明細書でさらに提供されるのは、ホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できるイソプレレン産生組換え細胞であって、組換え細胞は、(i) ホスホクトラーゼ活性を有して配列番号 8 と少なくとも 65% の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、(ii) 完全 MVA 経路の 1 つまたは複数のポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の核酸、および (iii) イソプレレンシンターゼポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の異種核酸を含んでなり、(i) のホスホクトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドは、(a) タンパク質溶解度、(b) タンパク質発現、または (c) フルクトース-6-リン酸 (F6P) 比活性のパラメータの 1 つまたは複数で、1.0 を超える性能指標値を有する。その他の実施形態では、性能指標値パラメータとしては、(d) イソプレレン収率タンパク質溶解度または (e) イソプレレン比生産性がさらに挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 23 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 24 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 25 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 26 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 27 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 28 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 29 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 30 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 31 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチド (例えば E. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホクトラーゼ) と比較して、1.1 を超えるなど、1.2 を超えるなど、1.4 を超える、1.6 を超える、1.8 を超える、2 を超える、2.2 を超える、2.4 を超える、2.6 を超える、2.8 を超える、3 を超える、3.2 を超える、3.4 を超える、3.6 を超える、3.8 を超える、4 を超える、4.2 を超える、4.4 を超える、4.6 を超える、4.8 を超える、5 を超える、5.2 を超える、5.4 を超える、5.6 を超える、5.8 を超える、6 を超える、6.2 を超える、6.4 を超える、6.6 を超える、6.8 を超える、7 を超える、7.2 を超える、7.4 を超える、7.6 を超える、7.8 を超える、8 を超える、8.2 を超える、8.4 を超える、8.6 を超える、8.8、9 を超える、9.2 を超える、9.4 を超える、9.6 を超える、9.8、または 10 を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5 倍以上増大する。その他の実施形態では、

10

20

30

40

50

細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~0.5、約0.25~0.75、約0.5~1、約0.75~1.25、約1~1.5、約1.25~1.75、約1.5~2、約1.75~2.25、約2~2.5、約2.25~2.75、約2.5~3、約2.75~3.25、約3~3.5、約3.25~3.75、約3.5~4、約3.75~4.25、約4~4.5、約4.25~4.75、約4.5~5、約4.75~5.25、約5~5.5、約5.25~5.75、約5.5~6、約6.25~6.75、約6.5~7、約6.75~7.25、約7~7.5、約7.75~8.25、約8~8.5、約8.25~8.75、約8.5~9、約8.75~9.25、約9~9.5、約9.25~9.75、または約9.5~10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~2、約1~3、約2~4、約3~5、約4~6、約5~7、約6~8、約7~9、または約8~10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホケトラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0306】

本明細書でさらに提供されるのは、ホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できるイソプレレン産生組換え細胞であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトラーゼ活性を有して配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、(ii) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(iii) イソプレレンシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなり、(i) のホスホケトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、(a) グルコース上の細胞増殖、(b) キシロース上の細胞増殖、(c) 細胞内アセチルリン酸の産生、または(d) グルコース-6-リン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。その他の実施形態では、性能指標値パラメータとしては、(e) イソプレレン収率タンパク質溶解度または(f) イソプレレン比生産性がさらに挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号32と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号33と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号34と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号35と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号36と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号37と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号38と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号39と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号40と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号41と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号42と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号43と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号44と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号45と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号46と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチド（例えばE. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホケトラーゼ）と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を

10

20

30

40

50

超える、2. 4を超え、2. 6を超え、2. 8を超え、3を超え、3. 2を超え
 る、3. 4を超え、3. 6を超え、3. 8を超え、4を超え、4. 2を超え、
 4. 4を超え、4. 6を超え、4. 8を超え、5を超え、5. 2を超え、5.
 4を超え、5. 6を超え、5. 8を超え、6を超え、6. 2を超え、6. 4を
 超え、6. 6を超え、6. 8を超え、7を超え、7. 2を超え、7. 4を超え
 る、7. 6を超え、7. 8を超え、8を超え、8. 2を超え、8. 4を超え、
 8. 6を超え、8. 8、9を超え、9. 2を超え、9. 4を超え、9. 6を超え
 る、9. 8、または10を超えまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形
 態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0
 . 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1
 . 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5倍以上増大する。その
 他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1～0. 5、約0. 25
 ～0. 75、約0. 5～1、約0. 75～1. 25、約1～1. 5、約1. 25～1. 7
 5、約1. 5～2、約1. 75～2. 25、約2～2. 5、約2. 25～2. 75、約2
 . 5～3、約2. 75～3. 25、約3～3. 5、約3. 25～3. 75、約3. 5～4
 、約3. 75～4. 25、約4～4. 5、約4. 25～4. 75、約4. 5～5、約4.
 75～5. 25、約5～5. 5、約5. 25～5. 75、約5. 5～6、約6. 25～6
 . 75、約6. 5～7、約6. 75～7. 25、約7～7. 5、約7. 75～8. 25、
 約8～8. 5、約8. 25～8. 75、約8. 5～9、約8. 75～9. 25、約9～9
 . 5、約9. 25～9. 75、または約9. 5～10以上のいずれかを超える。その他の
 実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1～2、約1～3、約2～4
 、約3～5、約4～6、約5～7、約6～8、約7～9、または約8～10以上のいずれ
 かを超え。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム (E. g a l l i n
 a r u m) からのホスホケトラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくと
 も約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1.
 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、
 3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0307】

本明細書で提供されるのは、ホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できるイソ
 プレン産生組換え細胞であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトラーゼ活性を有して配
 列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種
 核酸配列、(ii) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つま
 たは複数の核酸、および(iii) イソプレシンターゼポリペプチドをコードする1つ
 または複数の異種核酸を含んでなり、(i) のホスホケトラーゼ活性を有する前記ポリペ
 プチドは、(a) タンパク質溶解度、(b) タンパク質発現、または(c) フルクトース
 -6-リン酸 (F6P) 比活性のパラメータの1つまたは複数で、1. 0を超える性能指
 標値を有する。その他の実施形態では、性能指標値パラメータとしては、(d) イソプレ
 ン収率タンパク質溶解度または(e) イソプレシン比生産性がさらに挙げられる。いくつ
 かの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号32と、少なくとも90%の配列同一性を含
 んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号33と、少なくとも90
 %の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号34
 と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチ
 ドは、配列番号35と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形
 態では、ポリペプチドは、配列番号36と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる
 。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号37と、少なくとも90%の配列
 同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号38と、少な
 くとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配
 列番号39と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、
 ポリペプチドは、配列番号40と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつ
 かの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号41と、少なくとも90%の配列同一性を

10

20

30

40

50

含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 42 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 43 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 44 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 45 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 46 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチド（例えば E. ガリナーラム（*E. gallinarum*）からのホスホケトラゼ）と比較して、1. 1 を超えるなど、1. 2 を超えるなど、1. 4 を超える、1. 6 を超える、1. 8 を超える、2 を超える、2. 2 を超える、2. 4 を超える、2. 6 を超える、2. 8 を超える、3 を超える、3. 2 を超える、3. 4 を超える、3. 6 を超える、3. 8 を超える、4 を超える、4. 2 を超える、4. 4 を超える、4. 6 を超える、4. 8 を超える、5 を超える、5. 2 を超える、5. 4 を超える、5. 6 を超える、5. 8 を超える、6 を超える、6. 2 を超える、6. 4 を超える、6. 6 を超える、6. 8 を超える、7 を超える、7. 2 を超える、7. 4 を超える、7. 6 を超える、7. 8 を超える、8 を超える、8. 2 を超える、8. 4 を超える、8. 6 を超える、8. 8、9 を超える、9. 2 を超える、9. 4 を超える、9. 6 を超える、9. 8、または 10 を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約 0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5 倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約 0. 1～0. 5、約 0. 25～0. 75、約 0. 5～1、約 0. 75～1. 25、約 1～1. 5、約 1. 25～1. 75、約 1. 5～2、約 1. 75～2. 25、約 2～2. 5、約 2. 25～2. 75、約 2. 5～3、約 2. 75～3. 25、約 3～3. 5、約 3. 25～3. 75、約 3. 5～4、約 3. 75～4. 25、約 4～4. 5、約 4. 25～4. 75、約 4. 5～5、約 4. 75～5. 25、約 5～5. 5、約 5. 25～5. 75、約 5. 5～6、約 6. 25～6. 75、約 6. 5～7、約 6. 75～7. 25、約 7～7. 5、約 7. 75～8. 25、約 8～8. 5、約 8. 25～8. 75、約 8. 5～9、約 8. 75～9. 25、約 9～9. 5、約 9. 25～9. 75、または約 9. 5～10 以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約 0. 1～2、約 1～3、約 2～4、約 3～5、約 4～6、約 5～7、約 6～8、約 7～9、または約 8～10 以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム（*E. gallinarum*）からのホスホケトラゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約 0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5、6、7、8、9、10 倍以上増大する。

【0308】

組換え細胞を使用してイソプレンを生産する方法

本明細書でまた提供されるのは、本明細書に記載される組換え細胞のいずれかを培養するステップを含んでなる、イソプレンを生産する方法である。一態様では、イソprenは、本明細書に記載されるような任意のホスホケトラゼポリペプチド、1つまたは複数の MVA 経路ポリペプチド、およびイソprenシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなる、組換え細胞を培養することで、生産し得る。特定の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、バークホルデリア・フィトフィルマンズ（*Burkholderia phytofirmans*）、ラクトバチルス・ブフネリ（*Lactobacillus buchneri*）、ビフィドバクテリウム・ガリクム（*Bifidobacterium galli*）、ビフィドバクテリウム・デンチウム（*Bifidobacterium dentium*）、ビフィドバクテリウム・ビフィダム（*Bifidobacterium bifidum*）、および／またはク

ロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。その他の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シェewanella バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデルシア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothece*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。なおも別の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。一実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンシス (*Granulicatella adiacensis*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)

10

20

30

40

50

、キングラ・キングア (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホケトララーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。

【0309】

別の態様では、イソプレンは、本明細書に記載される酵素経路のいずれかの調節と、ホスホケトララーゼペプチド、MVA経路ポリペプチド、およびイソプレシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸とを含んでなる、組換え細胞を培養することで、生産し得る。特定の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallicum*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホケトララーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。その他の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothece*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトララーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。なおも別の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、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*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma*

10

20

30

40

50

a arthritidis) から単離されたホスホクトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。一実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングセラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタセラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタセラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングセラ・キングアエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホクトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。イソブレンは、本明細書に記載される細胞のいずれかから、本明細書に記載される方法のいずれかによって、生産し得る。グルコースなどの六炭糖および／またはキシロースなどの五炭糖をはじめとするが、これに限定されるものではない炭水化物からイソブレンを生産する目的で、細胞のいずれかを使用し得る。

【0310】

したがって、本明細書で提供されるのは、イソブレンを生産するのに適した条件で、ホスホクトラーゼポリペプチドとイソブレンシンターゼとをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなる、細胞を培養するステップと、(b) イソブレンを生産するステップとを含んでなる、イソブレンを生産する方法である。特定の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホクトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。その他の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・

イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。なおも別の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、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*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリティクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリ (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィル (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディ (*Mycoplasma arthritidis*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。一実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチア (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチア (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセン (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニ (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キング (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・オーストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。

【0311】

細胞は、上述のMVA経路ポリペプチド (例えば完全MVA経路)、および上述のイソプレニンターゼポリペプチド (例えばクズ属 (*Pueraria*) イソプレニンターゼ) のいずれかをコードする、1つまたは複数の核酸分子をさらに含んでなり得る。いくつかの態様では、組換え細胞は、本明細書に記載される細胞のいずれか1つであり得る。本明細書に記載されるイソプレニンターゼまたはそれらの変異体のいずれか、本明細書に記載される宿主細胞株のいずれか、本明細書に記載されるプロモーターのいずれか、および／または本明細書に記載されるベクターのいずれかもまた使用して、本明細書に記載される方法で使用し得る本明細書に記載されるエネルギー源のいずれか (例えば、グルコースまたはキシロース) を使用して、イソプレンを生産し得る。いくつかの態様では、イ

10

20

30

40

50

ソブレンを生産する方法は、イソブレンを回収するステップをさらに含んでなる。別の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリカム (*Bifidobacterium gallicum*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シェewanella バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecce*) 種、ネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、マイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングセラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニューリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニューリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Strept*

10

20

30

40

50

ococcus parasanguinis)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) に由来する。

【0312】

特定の態様では、本明細書で提供されるのは、イソプレンを生産するのに適した条件で、

バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchne* 10
ri)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallicum*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum* 20
)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・マイクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides* 30
)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種、ネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris* 40
)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プラトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、マイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans* 50
)、グラニューリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adia*

cens)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エリモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニユリカテラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングエラ・キングエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) からのホスホケトラゼポリペプチドと、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. フェシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナーラム* (*E. gallinarum*)、*E. カセリフラブス* (*E. casseliflavus*)、および／または *E. ファエカリス* (*E. faecalis*) からの *mvaE* および *mvaS* ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなる、組換え細胞を培養するステップと、(b) イソプレンを生産するステップとを含んでなる、イソプレンを生産する方法である。細胞は、上述の下流MVA経路ポリペプチド (例えば、*MVK*、*PMK*、*MVD*、および／または *IDI*) をコードする1つまたは複数の核酸分子、および上述のイソプレシンターゼポリペプチドのいずれかをさらに含んでなり得る。いくつかの態様では、組換え細胞は、本明細書に記載される細胞のいずれかであり得る。

【0313】

特定の態様では、本明細書で提供されるのは、イソプレンを生産するのに適した条件で、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリカム (*Bifidobacterium gallicum*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothece*) 種、ネオサルトリア・フィスケリ (

Neosartorya fischeri)、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)、エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (Enterococcus saccharolyticus)、エンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus)、マイコプラズマ・アリガトリス (Mycoplasma alligatoris)、カルノバクテリウム属 (Carnobacterium) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (Melissococcus plutonius)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (Tetragenococcus halophilus)、マイコプラズマ・アルスリチディス (Mycoplasma arthritidis)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (Streptococcus agalactiae)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (Mycoplasma agalactiae)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (Streptococcus gordonii)、キングラ・オラリス (Kingella oralis)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (Mycoplasma fermentans)、グラニュリカタラ・アディアセンス (Granulicatella adiacens)、マイコプラズマ・ホミニス (Mycoplasma hominis)、マイコプラズマ・クロコディリ (Mycoplasma crocodyli)、マイコバクテリウム・ボービス (Mycobacterium bovis)、ナイセリア属 (Neisseria) 種、ストレプトコッカス属 (Streptococcus) 種、エレモコッカス・コレオコラ (Eremococcus coleocola)、グラニュリカタラ・エレガンス (Granulicatella elegans)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (Streptococcus parasanguinis)、アエロコッカス・ウリナエ (Aerococcus urinae)、キングラ・キングアエ (Kingella kingae)、ストレプトコッカス・アウストラリス (Streptococcus australis)、ストレプトコッカス・クリセチ (Streptococcus criceti)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (Mycoplasma columbinum) からのホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなる、組換え細胞を培養するステップと、(b) イソプレンを生産するステップとを含んでなる、イソプレンを生産する方法である。細胞は、上述の下流MVA経路ポリペプチド (例えば、MVK、PMK、MVD、および／またはIDI) をコードする1つまたは複数の核酸分子、および上述のイソプレシンターゼポリペプチドのいずれかをさらに含んでなり得る。いくつかの態様では、組換え細胞は、本明細書に記載される細胞のいずれかであり得る。

【0314】

ホスホケトラーゼ経路を通過するメバロン酸生成に向かう炭素流動増大のために操作された様々な酵素経路を有する、本明細書に記載される組換え細胞を使用して、イソプレンを生産し得る。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、リボース-5-リン酸イソメラーゼ (rpiAおよび／またはrpiB)、D-リブロース-5-リン酸-3-エピメラーゼ (rpe)、トランスケトラーゼ (tktAおよび／またはtktB)、トランスアルドラーゼB (talB)、リン酸アセチルトランスフェラーゼ (ptaおよび／またはeutD) からなる群から選択される、遺伝子の1つまたは複数の活性が増大するようにさらに操作し得る。別の実施形態では、これらの組換え細胞は、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (zwf)、6-ホスホフルクトキナーゼ-1 (pfkAおよび／またはpfkB)、フルクトースビスホスフェートアルドラーゼ (fba、fbaA、fbaB、および／またはfbaC)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (gapAおよび／またはgapB)、酢酸キナーゼ (ackA)、クエン酸シンターゼ (glutA)、EI (ptsI)、EIICB^{G1c} (ptsG)、EIIA^{G1c} (crr)、および／またはHPr (ptsH) 遺伝子をはじめとする、1つまたは複数の遺伝子の活性を低下させるように、さらに操作し得る。

【0315】

いくつかの態様では、生産されたイソプレンの量が、ピーク絶対生産性時点で測定される。いくつかの態様では、細胞ピーク絶対生産性は、本明細書で開示されるイソペン量のいずれかに関する。いくつかの態様では、生産されたイソプレンの量が、ピーク比生産性時点で測定される。いくつかの態様では、細胞ピーク比生産性は、本明細書で開示される細胞あたりのイソペン量のいずれかに関する。いくつかの態様では、生産されたイソプレンの累積総量が測定される。いくつかの態様では、細胞累積総生産性は、本明細書で開示されるイソペン量のいずれかに関する。

【0316】

いくつかの態様では、（細胞が培養中にある実施例では）本明細書に記載される細胞のいずれかは、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 nmol e イソペン/g 湿潤細胞重量/hr (nmol e/g_{w c m}/hr) 以上のいずれかをほぼ超える、またはそのいずれかのイソペンを産生する。いくつかの態様では、イソペンの量は、約2～約100 nmol e/g_{w c m}/hr、約100～約500 nmol e/g_{w c m}/hr、約150～約500 nmol e/g_{w c m}/hr、約500～約1,000 nmol e/g_{w c m}/hr、約1,000～約2,000 nmol e/g_{w c m}/hr、または約2,000～約5,000 nmol e/g_{w c m}/hr など、約2～約5,000 nmol e/g_{w c m}/hr である。いくつかの態様では、イソペンの量は、約20～約5,000 nmol e/g_{w c m}/hr、約100～約5,000 nmol e/g_{w c m}/hr、約200～約2,000 nmol e/g_{w c m}/hr、約200～約1,000 nmol e/g_{w c m}/hr、約300～約1,000 nmol e/g_{w c m}/hr、または約400～約1,000 nmol e/g_{w c m}/hr である。

【0317】

いくつかの態様では、培養中の細胞は、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、5,000、10,000、100,000 ng イソペン/g 湿潤細胞重量/hr (ng/g_{w c m}/h) 以上のイソペンを生成する。いくつかの態様では、イソペンの量は、約2～約100 ng/g_{w c m}/h、約100～約500 ng/g_{w c m}/h、約500～約1,000 ng/g_{w c m}/h、約1,000～約2,000 ng/g_{w c m}/h、または約2,000～約5,000 ng/g_{w c m}/h などの約2～約5,000 ng/g_{w c m}/h である。いくつかの態様では、イソペンの量は、約20～約5,000 ng/g_{w c m}/h、約100～約5,000 ng/g_{w c m}/h、約200～約2,000 ng/g_{w c m}/h、約200～約1,000 ng/g_{w c m}/h、約300～約1,000 ng/g_{w c m}/h、または約400～約1,000 ng/g_{w c m}/h である。

【0318】

いくつかの態様では、培養中の細胞は、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、50,000、100,000 mg イソペン/L ブロス (mg/L_{b r o t h}、式中、ブロス容積は、細胞および細胞培地の容積を含む) 以上のいずれかをほぼ超える、またはそのいずれかである、イソペンの累積力価（総量）を生成する。いくつかの態様では、イソペンの量は、約2～約5,000 mg/L_{b r o t h} などの約2～約100 mg/L_{b r o t h}、約100～約500 mg/L_{b r o t h}、約500～約1,000 mg/L_{b r o t h}、約1,000～約2,000 mg/L_{b r o t h}、または約2,000～約5,000 mg/L_{b r o t h} である。いくつかの態様では、イソペンの量は、約20～約5,000 mg/L_{b r o t h}、約100～約5

10

20

30

40

50

、000mg/L_{broth}、約200～約2,000mg/L_{broth}、約200～約1,000mg/L_{broth}、約300～約1,000mg/L_{broth}、または約400～約1,000mg/L_{broth}である。

【0319】

いくつかの態様では、培養中の細胞によって産生されるイソプレンは、容量基準で発酵発生気体の少なくとも約1、2、5、10、15、20、または25%を構成する。いくつかの態様では、イソプレンは、発生気体の容量基準で約5～約15%、約15～約25%、約10～約20%、または約1～約10%などの約1～約25%を構成する。

【0320】

特定の実施形態では、イソプレンを生産する方法は、(a) ホスホクトラーゼポリペプチドを内在性に発現しない、(大腸菌 (*E. coli*)) 細胞をはじめとするが、これに限定されるものではない) 組換え細胞を培養するステップであって、細胞が、(i) 1つまたは複数のMVA経路ペプチドを発現する1つまたは複数の核酸、および(ii) イソプレシンターゼと並んで、ホスホクトラーゼポリペプチドをコードする遺伝子の1つまたは複数のコピーを異種性に発現するステップと、(b) イソプレンを生産するステップとを含んでなり得て、組換え細胞は、ホスホクトラーゼポリペプチドをコードする、遺伝子の1つまたは複数の異種コピーを欠く同一細胞と比較して、低下した酸素取り込み速度(OUR)を示す。特定の実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドをコードする、遺伝子の1つまたは複数の異種コピーを発現する組換え細胞は、ホスホクトラーゼを発現しない組換え細胞と比較して、OURに最大で1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍または7倍の低下を示す。

【0321】

本明細書でまた提供されるのは、イソプレン生産を向上させる能力がある細胞を含むなる、イソプレンを生産する方法である。本明細書に記載される細胞によるイソプレンの生産は、ホスホクトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドポリペプチドをコードする異種核酸の1つまたは複数のコピー、およびイソプレシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸の発現によって、向上させ得る。特定の実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドはバークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および/またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) に由来する。いくつかの実施態様では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シェewanella・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパタス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ボンベ (*Schizos*

10

20

30

40

50

accharomyces pombe)、ロイコノストック・メセンテロイデス (LeucoNostoc mesenteroides)、ストレプトミセス属 (Streptomyces) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (Lactobacillus buchneri)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (Streptomyces ghanaensis)、シアノセイス属 (Cyanothecace) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (Neosartorya fischeri) に由来する。なおも別の実施形態では、ホスホケトラゼは、エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium)、リステリア・グレイー (Listeria grayi)、エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (Enterococcus saccharolyticus)、エンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus)、マイコプラズマ・アリガトリス (Mycoplasma alligatoris)、カルノバクテリウム属 (Carnobacterium) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (Melissococcus plutonius)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (Tetragenococcus halophilus)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (Mycoplasma arthritidis) に由来する。なおも別の実施態様では、ホスホケトラゼは、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (Streptococcus agalactiae)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (Mycoplasma agalactiae)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (Streptococcus gordonii)、キングセラ・オラリス (Kingella oralis)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (Mycoplasma fermentans)、グラニュリカタセラ・アディアセンス (Granulicatella adiacens)、マイコプラズマ・ホミニス (Mycoplasma hominis)、マイコプラズマ・クロコディリ (Mycoplasma crocodyli)、マイコバクテリウム・ボービス (Mycobacterium bovis)、ナイセリア属 (Neisseria) 種、ストレプトコッカス属 (Streptococcus) 種、エレモコッカス・コレオコラ (Eremococcus coleocola)、グラニュリカタセラ・エレガン (Granulicatella elegans)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (Streptococcus parasanguinis)、アエロコッカス・ウリナエ (Aerococcus urinae)、キングセラ・キングアエ (Kingella kingae)、ストレプトコッカス・アウストラリス (Streptococcus australis)、ストレプトコッカス・クリセチ (Streptococcus criceti)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (Mycoplasma columbinum) に由来する。本明細書の用法では、イソプレンの生産「向上」とは、ホスホケトラゼポリペプチドMVA経路ポリペプチド、およびイソプレシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を有しない細胞と比較した、本明細書に記載される組成物および方法のいずれかによって記載される細胞による、イソプレンの細胞生産性指標 (CPI) 増大、イソプレンの力価増大、イソプレンの質量収率増大、および／またはイソプレンの比生産性増大を指す。イソプレンの生産は、約5%～約1,000,000倍向上させ得る。イソプレンの生産は、ホスホケトラゼ酵素を内在性に発現しないイソペン産生細胞によるイソプレンの生産と比較して、約10%～約1,000,000倍 (例えば、約50%～約1,000,000倍、約1～約500,000倍、約1～約50,000倍、約1～約5,000倍、約1～約1,000倍、約1～約500倍、約1～約100倍、約1～約50倍、約5～約100,000倍、約5～約10,000倍、約5～約1,000倍、約5～約500倍、約5～約100倍、約10～約50,000倍、約50～約10,000倍、約100～約5,000倍、約200～約1,000倍、約50～約500倍、または約50～約200倍) 向上させ得る。本明細書に記載される特定の実施形態では、本明細書に記載される方法は、ホスホケトラゼ経路を通過するMVA生成に向かう炭素流が増大するようにさらに操作

10

20

30

40

50

されている、宿主細胞を含んでなり、それによって、ホスホクトラーゼペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を発現せず、ホスホクトラーゼ経路を通過するメバロン酸生成に向かう炭素流を増大させるように操作されていない、イソプレン産生細胞によるイソプレンの生産と比較して、イソプレンの生産向上が提供される。

【0322】

その他の態様では、本明細書に記載される方法は、本明細書に記載される細胞によるイソプレンの生産向上を対象とする（例えばホスホクトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸の発現によって、向上される）。特定の実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドはバークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) に由来する。いくつかの実施態様では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) に由来する。なおも別の実施形態では、ホスホクトラーゼは、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) に由来する。なおも別の実施態様では、ホスホクトラーゼは、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus*

10

20

30

40

50

ccus gordonii)、キングラ・オラリス (Kingella oralis)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (Mycoplasma fermentans)、グラニュリカタラ・アディアセンス (Granulicatella adiacens)、マイコプラズマ・ホミニス (Mycoplasma hominis)、マイコプラズマ・クロコディリ (Mycoplasma crocodyli)、マイコバクテリウム・ボービス (Mycobacterium bovis)、ナイセリア属 (Neisseria) 種、ストレプトコッカス属 (Streptococcus) 種、エレモコッカス・コレオコラ (Eremococcus coleocola)、グラニュリカタラ・エレガンス (Granulicatella elegans)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (Streptococcus parasanguinis)、アエロコッカス・ウリナエ (Aerococcus urinae)、キングラ・キングアエ (Kingella kingae)、ストレプトコッカス・アウストラリス (Streptococcus australis)、ストレプトコッカス・クリセチ (Streptococcus criceti)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (Mycoplasma columbinum) に由来する。イソプレンの生産は、約5%～約1,000,000倍向上させ得る。イソプレンの生産は、ホスホケトラゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸の発現がないイソペン産生細胞によるイソプレンの生産と比較して、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、または約50～約200倍)向上させ得る。イソプレンの生産はまた、ホスホケトラゼをコードする1つまたは複数の異種核酸の発現がないイソペン産生細胞によるイソプレンの生産と比較して、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、100,000倍、200,000倍、500,000倍、または1,000,000倍のいずれかで、向上させ得る。本明細書に記載される特定の実施形態では、本明細書に記載される方法は、MVA生成に向かう炭素流が増大するようにさらに操作されている、宿主細胞を含んでなり、それによって、ホスホケトラゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を発現せず、メバロン酸生成に向かう炭素流を増大させるように操作されていない細胞によるイソプレンの生産と比較して、イソプレンの生産向上が提供される。

【0323】

さらに、より特異的な細胞培養条件を使用して、本明細書に記載される方法で細胞を培養し得る。例えば、いくつかの態様では、イソプレンを生産する方法は、(a)ホスホケトラゼ遺伝子を内在性に有しない、(大腸菌(E. coli)細胞をはじめとするが、これに限定されるものではない)組換え細胞を34℃の最少培地中で培養するステップであって、組換え細胞が、(i)低から中程度のプラスミドコピーで、強力なプロモーター制御下において、ホスホケトラゼポリペプチドをコードする異種遺伝子の1つまたは複数のコピー、(ii)MVA経路ポリペプチド(上流MVA経路および下流MVA経路)の1つまたは複数のポリペプチドをコードする異種核酸の1つまたは複数のコピー、および(iii)イソペンシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を異種性に発現するステップと、(b)イソプレンを生産するステップとを含んでなる。特定の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドはバークホルデリア・フィトフィルマンズ (Burkholderia phytofirmans)、ラクトバチルス・ブフネリ (Lactobacillus buchneri)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (Bifidobacterium gallicum)、ビフィドバクテリウム

・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) に由来する。いくつかの実施態様では、ホスホケトラゼポリペプチドは、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecaceae*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) に由来する。なおも別の実施形態では、ホスホケトラゼは、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) に由来する。なおも別の実施態様では、ホスホケトラゼは、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coeicola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサンガイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングアエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッ

10

20

30

40

50

カス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) に由来する。いくつかの態様では、イソプレンを生産する方法は、イソプレンを回収するステップをさらに含んでなる。

【0324】

本明細書でまた提供されるのは、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、イソプレンを生産するステップとを含んでなる、イソプレンを生産する方法であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトラゼ活性を有して配列番号8と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、(ii) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(iii) イソプレンスンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなり、(i) のホスホケトラゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、(a) グルコース上の細胞増殖、(b) キシロース上の細胞増殖、(c) 細胞内アセチルリン酸の生産、または(d) グルコース-6-リン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。その他の実施形態では、性能指標値パラメータとしては、(e) イソペン収率タンパク質溶解度または(f) イソペン比生産性がさらに挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号23と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号24と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号25と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号27と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号28と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号29と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号30と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号31と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチド(例えばE. ガリナーラム (*E. gallinarum*) からのホスホケトラゼ)と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3.2を超える、3.4を超える、3.6を超える、3.8を超える、4を超える、4.2を超える、4.4を超える、4.6を超える、4.8を超える、5を超える、5.2を超える、5.4を超える、5.6を超える、5.8を超える、6を超える、6.2を超える、6.4を超える、6.6を超える、6.8を超える、7を超える、7.2を超える、7.4を超える、7.6を超える、7.8を超える、8を超える、8.2を超える、8.4を超える、8.6を超える、8.8、9を超える、9.2を超える、9.4を超える、9.6を超える、9.8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~0.5、約0.25~0.75、約0.5~1、約0.75~1.25、約1~1.5、約1.25~1.75、約1.5~2、約1.75~2.25、約2~2.5、約2.25~2.75、約2.5~3、約2.75~3.25、約3~3.5、約3.25~3.75、約3.5~4、約3.75~4.25、約4~4.5、約4.25~4.75、約4.5~5、約4.75~5.25、約5~5.5、約5.25~5.75、約5.5~6、約6.25~6.75、約6.5~7、約6.75~7

10

20

30

40

50

． 25、約7～7.5、約7.75～8.25、約8～8.5、約8.25～8.75、約8.5～9、約8.75～9.25、約9～9.5、約9.25～9.75、または約9.5～10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1～2、約1～3、約2～4、約3～5、約4～6、約5～7、約6～8、約7～9、または約8～10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホケトラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

10

【0325】

本明細書でまた提供されるのは、ホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、イソプレンを生産するステップとを含んでなる、イソプレンを生産する方法であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトラーゼ活性を有して配列番号8と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、(ii) 完全MV A経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(iii) イソプレンスンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなり、(i) のホスホケトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドは、(a) タンパク質溶解度、(b) タンパク質発現、または(c) フルクトースー6ーリン酸 (F6P) 比活性のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。その他の実施形態では、性能指標値パラメータとしては、(d) イソペン収率タンパク質溶解度、または(e) イソペン比生産性がさらに挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号23と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号24と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号25と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号27と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号28と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号29と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号30と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号31と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチド (例えばE. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホケトラーゼ) と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3.2を超える、3.4を超える、3.6を超える、3.8を超える、4を超える、4.2を超える、4.4を超える、4.6を超える、4.8を超える、5を超える、5.2を超える、5.4を超える、5.6を超える、5.8を超える、6を超える、6.2を超える、6.4を超える、6.6を超える、6.8を超える、7を超える、7.2を超える、7.4を超える、7.6を超える、7.8を超える、8を超える、8.2を超える、8.4を超える、8.6を超える、8.8、9を超える、9.2を超える、9.4を超える、9.6を超える、9.8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1～0.5、約0.25～0.75、約0.5～1、約0.75～1.25、約1～1.5、約1.25～1.75、約1.5～2、約1

20

30

40

50

． 75～2． 25、約2～2． 5、約2． 25～2． 75、約2． 5～3、約2． 75～3． 25、約3～3． 5、約3． 25～3． 75、約3． 5～4、約3． 75～4． 25、約4～4． 5、約4． 25～4． 75、約4． 5～5、約4． 75～5． 25、約5～5． 5、約5． 25～5． 75、約5． 5～6、約6． 25～6． 75、約6． 5～7、約6． 75～7． 25、約7～7． 5、約7． 75～8． 25、約8～8． 5、約8． 25～8． 75、約8． 5～9、約8． 75～9． 25、約9～9． 5、約9． 25～9． 75、または約9． 5～10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0． 1～2、約1～3、約2～4、約3～5、約4～6、約5～7、約6～8、約7～9、または約8～10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E． ガリナーラム (E． g a l l i n a r u m) からのホスホケトラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0． 1、0． 2、0． 3、0． 4、0． 5、0． 6、0． 7、0． 8、0． 9、1． 0、1． 1、1． 2、1． 3、1． 4、1． 5、1． 6、1． 7、1． 8、1． 9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0326】

本明細書でさらに提供されるのは、ホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、イソプレンを生産するステップとを含んでなる、イソプレンを生産する方法であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトラーゼ活性を有して配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、(i i) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(i i i) イソプレンスインターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなり、(i) のホスホケトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、(a) グルコース上の細胞増殖、(b) キシロース上の細胞増殖、(c) 細胞内アセチルリン酸の生産、または(d) グルコースー6ーリン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1． 0を超える性能指標値を有する。その他の実施形態では、性能指標値パラメータとしては、(e) イソペン収率タンパク質溶解度または(f) イソペン比生産性がさらに挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号32と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号33と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号34と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号35と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号36と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号37と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号38と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号39と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号40と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号41と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号42と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号43と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号44と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号45と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号46と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチド(例えばE． ガリナーラム (E． g a l l i n a r u m) からのホスホケトラーゼ)と比較して、1． 1を超えるなど、1． 2を超えるなど、1． 4を超える、1． 6を超える、1． 8を超える、2を超える、2． 2を超える、2． 4を超える、2． 6を超える、2． 8を超える、3を超える、3． 2を超える、

10

20

30

40

50

3. 4を超える、3. 6を超える、3. 8を超える、4を超える、4. 2を超える、4. 4を超える、4. 6を超える、4. 8を超える、5を超える、5. 2を超える、5. 4を超える、5. 6を超える、5. 8を超える、6を超える、6. 2を超える、6. 4を超える、6. 6を超える、6. 8を超える、7を超える、7. 2を超える、7. 4を超える、7. 6を超える、7. 8を超える、8を超える、8. 2を超える、8. 4を超える、8. 6を超える、8. 8、9を超える、9. 2を超える、9. 4を超える、9. 6を超える、9. 8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1~0. 5、約0. 25~0. 75、約0. 5~1、約0. 75~1. 25、約1~1. 5、約1. 25~1. 75、約1. 5~2、約1. 75~2. 25、約2~2. 5、約2. 25~2. 75、約2. 5~3、約2. 75~3. 25、約3~3. 5、約3. 25~3. 75、約3. 5~4、約3. 75~4. 25、約4~4. 5、約4. 25~4. 75、約4. 5~5、約4. 75~5. 25、約5~5. 5、約5. 25~5. 75、約5. 5~6、約6. 25~6. 75、約6. 5~7、約6. 75~7. 25、約7~7. 5、約7. 75~8. 25、約8~8. 5、約8. 25~8. 75、約8. 5~9、約8. 75~9. 25、約9~9. 5、約9. 25~9. 75、または約9. 5~10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1~2、約1~3、約2~4、約3~5、約4~6、約5~7、約6~8、約7~9、または約8~10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホケトラゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0327】

本明細書で提供されるのは、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、イソプレンを生産するステップとを含んでなる、イソプレンを生産する方法であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトラゼ活性を有して配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、(ii) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(iii) イソプレシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなり、(i) のホスホケトラゼ活性を有する前記ポリペプチドは、(a) タンパク質溶解度、(b) タンパク質発現、または(c) フルクトースー6ーリン酸 (F6P) 比活性のパラメータの1つまたは複数で、1. 0を超える性能指標値を有する。その他の実施形態では、性能指標値パラメータとしては、(d) イソペン収率タンパク質溶解度または(e) イソペン比生産性がさらに挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号32と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号33と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号34と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号35と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号36と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号37と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号38と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号39と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号40と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号41と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。

でなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号42と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号43と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号44と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号45と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号46と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチド（例えばE. ガリナーラム（E. gallinarum）からのホスホケトラゼ）と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3.2を超える、3.4を超える、3.6を超える、3.8を超える、4を超える、4.2を超える、4.4を超える、4.6を超える、4.8を超える、5を超える、5.2を超える、5.4を超える、5.6を超える、5.8を超える、6を超える、6.2を超える、6.4を超える、6.6を超える、6.8を超える、7を超える、7.2を超える、7.4を超える、7.6を超える、7.8を超える、8を超える、8.2を超える、8.4を超える、8.6を超える、8.8、9を超える、9.2を超える、9.4を超える、9.6を超える、9.8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~0.5、約0.25~0.75、約0.5~1、約0.75~1.25、約1~1.5、約1.25~1.75、約1.5~2、約1.75~2.25、約2~2.5、約2.25~2.75、約2.5~3、約2.75~3.25、約3~3.5、約3.25~3.75、約3.5~4、約3.75~4.25、約4~4.5、約4.25~4.75、約4.5~5、約4.75~5.25、約5~5.5、約5.25~5.75、約5.5~6、約6.25~6.75、約6.5~7、約6.75~7.25、約7~7.5、約7.75~8.25、約8~8.5、約8.25~8.75、約8.5~9、約8.75~9.25、約9~9.5、約9.25~9.75、または約9.5~10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~2、約1~3、約2~4、約3~5、約4~6、約5~7、約6~8、約7~9、または約8~10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム（E. gallinarum）からのホスホケトラゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0328】

イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産増大能力がある組換え細胞

イソプレノイドは、多数の生物中で、MVA経路の最終生成物であるイソプレノイド前駆体分子の合成から生成され得る。上述のように、イソプレノイドは、重要なクラスの化合物に相当し、例えば、食品および飼料補給剤、フレーバーおよび臭気化合物、および抗がん、抗マラリア、抗真菌、および抗菌化合物を含む。

【0329】

分子クラスとして、イソプレノイドは、化合物に含まれるイソプレン単位数に基づいて分類される。モノテルペンは、10個の炭素または2個のイソプレン単位を含んでなり、セスキテルペンは、15個の炭素または3個のイソプレン単位を含んでなり、ジテルペンは、20炭素または4個のイソプレン単位を含んでなり、セステルテルペンは、25個の炭素または5個のイソプレン単位を含んでなり、以下同じように続く。ステロイド（一般的に約27個の炭素を含んでなる）は、イソプレノイドの切断または再構成生成物である

。

【0330】

イソプレノイドは、イソプレノイド前駆体分子IPPおよびDMA PPから生成され得る。これらの多様な化合物は、これらの比較的単純な汎用前駆体から誘導され、保存的ポリプレニルピロリン酸シンターゼのグループによって合成される(Hsieh et al., Plant Physiol. 2011年3月; 155(3):1079-90)。それらの特有の生理学的機能を反映する、これらの直鎖プレニルピロリン酸の様々な鎖長は、一般に、アリル性基質(ジメチルアリルニリン酸(C₅-DMA PP)、ピロリン酸ゲラニル(C₁₀-GPP)、ピロリン酸ファルネシル(C₁₅-FPP)、ゲラニルゲラニルピロリン酸(C₂₀-GGPP))と、対応する数のイソペンテニルピロリン酸(C₅-IPP)との縮合反応を通じて、ポリプレニルピロリン酸シンターゼの非常に発達した活性部位によって判定される(Hsieh et al., Plant Physiol. 2011年3月; 155(3):1079-90)。

10

【0331】

イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドは、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド生成増大のための、ホスホクトラゼをコードする異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる、組換え宿主細胞のいずれかを使用して生成し得る。いくつかの態様では、これらの細胞は、上述のMVA経路、IDI、および／またはDXP経路のポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸と、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する異種核酸とをさらに含んでなる。理論により拘束されることなく、上述の組成物および方法のいずれかによって、組換え細胞内で、メバロン酸の細胞産生を増大させることは、同様により大量のイソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイド生成をもたらすと考えられる。グルコースからのメバロン酸生成のモル収率を増大させることは、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、およびイソプレンおよびイソプレノイド生成のためのその他の適切な酵素の適切な酵素活性レベルとグルコースを組み合わせると生成される、イソプレンをはじめとするイソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドのより高いモル収率につながる。本明細書に記載される、メバロン酸生成への炭素流動増大のために操作された様々な酵素経路を有する組換え細胞を使用して、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを生成し得る。いくつかの態様では、組換え細胞をさらに改変して、rpiA、rpe、tktA、talB、ptaおよび／またはeutDからなる群から選択される、遺伝子の1つまたは複数の活性を増大させ得る。別の態様では、これらの株をさらに改変して、zwf、pfkA、fba、gapA、ackA、glcAおよび／またはpts遺伝子をはじめとする、1つまたは複数の遺伝子の活性を低下させ得る。

20

30

【0332】

イソプレノイドのタイプ

本発明の組換え細胞は、イソプレノイドおよびイソプレノイド前駆体分子DMA PPおよびIPPの産生を増大できる。イソプレノイドの例としては、制限なしに、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、より高級なポリテルペノイドが挙げられる。いくつかの態様では、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、またはイソ吉草酸である。いくつかの態様では、モノテルペノイドは、制限なしに、ピロリン酸ゲラニル、ユーカリプトール、リモネン、またはピネンであり得る。いくつかの態様では、セスキテルペノイドは、ピロリン酸ファルネシル、アルテミシニン、またはビサボロールである。いくつかの態様では、ジテルペノイドは、制限なしに、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、またはアフィジコリンであり得る。いくつかの態様では、トリテルペノイドは、制限なしに、スクアレンまたはラノステロールであり得る

40

50

。イソプレノイドはまた、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、パトコウロール、 β -ピネン、サビネン、 γ -テルピネン、テルピンデン、およびバレンセンからなる群から選択し得る。

【0333】

いくつかの態様では、テトラテルペノイドは、リコペンまたはカロテン（カロテノイド）である。本明細書の用法では、「カロテノイド」という用語は、植物の葉緑体および有色体中、藻類などのいくつかのその他の光合成生物の葉緑体および有色体中、ある種の真菌およびいくつかの細菌中に生じる、一群の天然有機色素を指す。カロテノイドとしては、酸素含有キサントフィルおよび酸素非含有カロテンが挙げられる。いくつかの態様では、カロテノイドは、キサントフィルおよびカロテンからなる群から選択される。いくつかの態様では、キサントフィルは、ルテインまたはゼアキササンチンである。いくつかの態様では、カロテノイドは、 α -カロテン、 β -カロテン、 γ -カロテン、 β -クリプトキササンチンまたはリコペンである。

10

【0334】

その他の実施形態では、イソプレノイドは、制限なしに、レチノール、レチニルパルミテート、レチノイン酸、 α -カロテン、 β -カロテン、 γ -カロテン、またはキサントフィル β -クリプトキササンチンなどのビタミンAの形態であり得る。なおも別の実施形態では、イソプレノイドは、制限なしに、トコフェロール（例えば、 α -トコフェロール、 β -トコフェロール、 γ -トコフェロール、または δ -トコフェロール）またはトコトリエノール（例えば、 α -トコトリエノール、 β -トコトリエノール、 γ -トコトリエノール、または δ -トコトリエノール）などのビタミンEの形態であり得る。

20

【0335】

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する異種核酸

本発明のいくつかの態様では、本明細書の組成物または方法のいずれかに記載される細胞は、上述のホスホケトラゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、なら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する、1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる。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り得る。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する内在性核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結し得て、または同様に誘導性プロモーターと作動可能に連結し得る。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する内在性核酸は、強力なプロモーターとさらに作動可能に連結し得る。代案としては、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する内在性核酸は、弱いプロモーターと作動可能に連結し得る。特に、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性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に改変し得る。

30

【0336】

いくつかの態様では、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する異種核酸の2つ以上のコピーを含んでなり得る。いくつかの態様では、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する異種核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、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する異種核酸は、誘導性プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、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する異種核酸は、強力なプロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、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する異種核酸は、弱いプロモーターと作動可能に連結する。

40

【0337】

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する核酸は、宿主細胞ゲノムに組み込み得て、または細胞内で安定して発現させ得る。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する核酸は、さらにベクター上に存在し得る。

【0338】

50

例示的なポリプレニルピロリン酸シンターゼ核酸としては、ポリプレニルピロリン酸シンターゼの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、また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。例示的なシンターゼポリペプチドとしては、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。例示的なポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。さらに、ポリプレニルピロリン酸シンターゼ変異体は、改善された酵素活性などの改善された活性を有し得る。いくつかの態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼ変異体は、改善された安定性（例えば、熱安定性）、および／または改善された溶解度などのその他の改善された特性を有する。例示的なポリプレニルピロリン酸シンターゼ核酸としては、制限なしに、ゲラニルニリン酸（GPP）シンターゼ、ピロリン酸ファルネシル（FPP）シンターゼ、およびゲラニルゲラニルピロリン酸（GGPP）シンターゼ、または任意のその他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の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する核酸が挙げられる。

10

【0339】

本発明のいくつかの態様では、本明細書の組成物または方法のいずれかに記載される細胞は、ピロリン酸ファルネシル（FPP）シンターゼをコードする、1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる。FPPシンターゼポリペプチドは、内在性遺伝子によってコードされる内在性ポリペプチドであり得る。いくつかの態様では、FPPシンターゼポリペプチドは、大腸菌（*E. coli*）中で、内在性 *ispA* 遺伝子によってコードされる。FPPシンターゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結し得て、または同様に誘導性プロモーターと作動可能に連結し得る。FPPシンターゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、強力なプロモーターとさらに作動可能に連結し得る。特に、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性FPPシンターゼポリペプチドを過剰発現するように改変し得る。

20

【0340】

いくつかの態様では、FPP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、FPPシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸の2つ以上のコピーを含んでなり得る。いくつかの態様では、FPPシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、FPPシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、誘導性プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、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する異種核酸は、強力なプロモーターと作動可能に連結する。

30

【0341】

FPPシンターゼポリペプチドをコードする核酸は、宿主細胞ゲノムに組み込み得て、または細胞内で安定して発現させ得る。FPPシンターゼをコードする核酸は、さらにベクター上に存在し得る。

40

【0342】

標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内で、細胞抽出物中で、または生体内で、IPPを高級イソプレノイドに変換する能力を測定することで、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どうかを判定し得る。これらの方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、米国特許第7,915,026号明細書、Hsieh et al., *Plant Physiol.* 2011年3月;155(3):1079-90; Danner et al., *Phytochemistry*. 2011年4月12日 [印刷前のデジタル出版]; Jones et al., *J Biol Chem.* 2011年3月24日 [印刷前のデジタル出版]; Keeling et al., *BMC Plant Biol.* 2011年3月7日;11:43; Mar

50

tin et al., BMC Plant Biol. 2010年11月21日; 10: 226; Kumeta & Ito, Plant Physiol. 2010年12月; 154 (4): 1998-2007; および Kollner & Boland, J Org Chem. 2010年8月20日; 75 (16): 5590-600に記載される。

【0343】

イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産増大能力がある組換え細胞

(本明細書に記載されるような、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大させるように操作されている宿主細胞をはじめとする) 本明細書に記載される組換え細胞 (例えば組換え細菌細胞) は、同一条件下で培養された場合に、ホスホケトラゼをコードする異種核酸の1つまたは複数のコピー、MVA経路ポリペプチドをコードする異種核酸の1つまたは複数のコピー、およびピロリン酸ポリプレニルシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を欠く同一細胞を上回る量および／または濃度で、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを産生する能力を有する。特定の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドはバークホルデルシア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリウム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) に由来する。その他の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シェewanella バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデルシア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothece*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) に由来する。別の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、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*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tet*

10

20

30

40

50

tragenococcus halophilus)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチデス (*Mycoplasma arthritidis*) に由来する。別の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカテラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカテラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングアエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) に由来する。

【0344】

一実施形態では、組換え細胞は、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。別の実施形態では、組換え細胞は、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。なおも別の実施形態では、組換え細胞は、ビフィドバクテリウム・ガリウム (*Bifidobacterium gallium*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。さらに別の実施形態では、組換え細胞は、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。別の実施形態では、組換え細胞は、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。なおも別の実施形態では、組換え細胞は、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。その他の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkhold*

eria xenovorans)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (Mycobacterium intracellulare)、ニトロソモナス属 (Nitrosomonas) 種、シゾサッカロミセス・ボンベ (Schizosaccharomyces pombe)、ロイコノストック・メセンテロイデス (Leuconostoc mesenteroides)、ストレプトミセス属 (Streptomyces) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (Lactobacillus buchneri)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (Streptomyces ghanaensis)、シアノセイス属 (Cyanothecae) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (Neosartorya fischeri) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。なおも別の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、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)、エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (Enterococcus saccharolyticus)、エンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus)、マイコプラズマ・アリガトリス (Mycoplasma alligatoris)、カルノバクテリウム属 (Carnobacterium) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (Melissococcus plutonius)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (Tetragenococcus halophilus)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (Mycoplasma arthritidis) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。一実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (Streptococcus agalactiae)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (Mycoplasma agalactiae)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (Streptococcus gordonii)、キングラ・オラリス (Kingella oralis)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (Mycoplasma fermentans)、グラニュリカタラ・アディアセンス (Granulicatella adiacens)、マイコプラズマ・ホミニス (Mycoplasma hominis)、マイコプラズマ・クロコディリ (Mycoplasma crocodyli)、マイコバクテリウム・ボービス (Mycobacterium bovis)、ナイセリア属 (Neisseria) 種、ストレプトコッカス属 (Streptococcus) 種、エレモコッカス・コレオコラ (Eremococcus coleocola)、グラニュリカタラ・エレガンス (Granulicatella elegans)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (Streptococcus parasanguinis)、アエロコッカス・ウリナエ (Aerococcus urinae)、キングラ・キングアエ (Kingella kingae)、ストレプトコッカス・アウストラリス (Streptococcus australis)、ストレプトコッカス・クリセチ (Streptococcus criceti)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (Mycoplasma colubinum) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。別の実施形態では、組換え細胞は、コリネバクテリウム属 (Corynebacteria) 種 (例えばC. グルタミカム (C. glutamicum)) である。

【0345】

いくつかの態様では、ホスホケトラゼをコードする異種核酸の1つまたは複数のコピー、MVA経路ポリペプチドをコードする異種核酸の1つまたは複数のコピー、および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する1つまたは複数の異種核酸は、宿主細胞の染色体のヌクレオチド配列に組み込まれる異種核酸である。その他の態様では、1つまたは複数の異種核酸は、プラスミドに組み込まれる。なおも別の態様では、1つまたは複数の異種核酸配列の少なくとも1つがプラスミドに組み込まれる一方で、1つ

または複数の異種核酸の少なくとも1つは細胞の染色体のヌクレオチド配列に組み込まれる。組換え細胞は、ホスホケトラゼポリペプチドを含まないイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド生産細胞と比較して、少なくとも5%高いイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド量を産生し得る。代案としては、組換え細胞は、包括的に、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、または15%高い、ならびにこれらの数の間の任意の数値分高いイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを産生し得る。

【0346】

本発明の一態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載されるようなホスホケトラゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、メバロン酸（MVA）経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、DXP経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、および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する1つまたは複数の異種核酸を含んでなる、組換え細胞である。細胞は、IDIポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸をさらに含んでなり得る。1つまたは複数の異種核酸のいずれでも、構成的プロモーターと作動可能に連結し得て、誘導性プロモーターと作動可能に連結し得て、または誘導性および構成的プロモーターの組み合わせと作動可能に連結し得る。1つまたは複数の異種核酸は、さらに、強力なプロモーター、弱いプロモーター、および／または中程度のプロモーターと、作動可能に連結し得る。ホスホケトラゼ、メバロン酸（MVA）経路ポリペプチド、DXP経路ポリペプチド、および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する異種核酸の1つまたは複数、を、宿主細胞のゲノムに組み込み得て、または細胞内で安定して発現させ得る。1つまたは複数の異種核酸は、ベクター上にさらに存在し得る。

【0347】

本明細書に記載される組成物また方法のいずれかに従った細胞によるイソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体の生産は、向上させ得る（例えば、ホスホケトラゼポリペプチド、ピロリン酸ポリプレニルシンターゼポリペプチド、MVA経路ポリペプチド、および／またはDXP経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸の発現によって向上させる）。本明細書の用法では、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産「向上」とは、ホスホケトラゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を有しない細胞と比較した、本明細書に記載される組成物および方法のいずれかによって記載される細胞による、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの細胞生産性指標（CPI）増大、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの力価増大、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの質量収率増大、および／またはイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの比生産性増大を指す。本明細書に記載される特定の実施形態では、宿主細胞は、ホスホケトラゼ経路を通過するE4P、GAP、Ac-P、および／またはアセチルCoA生成に向かう炭素流が増大するようにさらに操作されている。

【0348】

本明細書に記載される組換え細胞によるイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産は、約5%～約1,000,000倍向上させ得る。特定の態様では、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産は、ホスホケトラゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を発現しない細胞によるイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産と比較して、約10%～約1,000,000倍（例えば、約1～約500,000倍、about 1～約50,000倍、about 1～約5,000倍、about 1～約1,000倍、約1～約500倍、約1～約100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、または約50～約200倍）向上させ得る。本明細書に記載される特定の実施形態では、宿主細胞は、ホスホケトラゼ経路を通過するMVA生成に向かう炭素流が増大す

るようにさらに操作されており、それによって、ホスホクトラーゼペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を発現せず、ホスホクトラーゼ経路を通過するメバロン酸生成に向かう炭素流を増大させるように操作されていない細胞によるイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産と比較して、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産向上が提供される。

【0349】

その他の態様では、本明細書に記載される組換え細胞によるイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産は、ホスホクトラーゼペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を発現しない細胞によるイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産と比較して、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、100,000倍、200,000倍、500,000倍、または1,000,000倍のいずれかで、向上させ得る。本明細書に記載される特定の実施形態では、宿主細胞は、ホスホクトラーゼ経路を通過するMVA生成に向かう炭素流が増大するようにさらに操作されており、それによって、ホスホクトラーゼペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を発現せず、ホスホクトラーゼ経路を通過するメバロン酸生成に向かう炭素流を増大させるように操作されていない細胞によるイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産と比較して、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産向上が提供される。

【0350】

本発明の一態様では、ホスホクトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、1つまたは複数の完全MVA経路（すなわち、上流MVA経路および下流MVA経路）ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、ピロリン酸ポリプレニルシンターゼをコードする1つまたは複数の異種核酸および／またはDXP経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなる、組換え細胞が提供される。細胞は、IDIポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸をさらに含んでなり得る。さらにポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドは、FPPシンターゼポリペプチドであり得る。特定の実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドはバークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) に由来する。その他の実施形態では、ホスホクトラーゼポリペプチドは、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクタエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtchensis*)、バークホルデリア・ゼノボランズ (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*)

as) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leucostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) に由来する。別の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、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*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) に由来する。別の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングセラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エremoコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングセラ・キングア (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criqueti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) に由来する。一実施形態では、組換え細胞は、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。

別の実施形態では、組換え細胞は、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。なおも別の実施形態では、組換え細胞は、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。さらに別の実施形態では、組換え細胞は、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。別の実施形態では、組換え細胞は、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。なおも別の実施形態では、組換え細胞は、クロストリジウム・アセト

ブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離された
 ホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。その
 他の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム
 (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、
 エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラク
 チアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデルシア・ゼ
 ノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)
 、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロ
 イデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothece*) 種、および/
 またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から
 単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んで
 なる。なおも別の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、エンテロコッカス
 ・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス
 (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガ
 トリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および/
 またはマイコプラズマ・アル
 スリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離されたホスホ
 ケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。一実施形態
 では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、
 マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、
 グラニュリカテラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、
 マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラ
 ズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウ
 ム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカ
 ス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカテラ・
 エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・
 パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエ
 ロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングエ (

10

20

30

40

50

Kingella kingae)、*Streptococcus australis*)、*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。別の実施形態では、組換え細胞は、*Corynebacteria* 種 (例えば *C. glutamicum*) である。1つまたは複数の異種核酸は、1つまたは複数のベクター上にさらに存在し得る。

【0351】

本明細書で提供されるのは、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産向上を提供し得る組換え細胞である。細胞によるイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産は、ホスホケトラゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、完全MVA経路 (すなわち、上流MVA経路および下流MVA経路) の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、およびピロリン酸ポリプレニルシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸の発現によって、向上させ得る。特定の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドはバークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリカム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) に由来する。その他の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、*Streptomyces* 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothece*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) に由来する。別の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligat*

10

20

30

40

50

oris)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチデイス (*Mycoplasma arthritidis*) に由来する。別の実施形態では、ホスホケトラゼポリペプチドは、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングセラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングセラ・キングアエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) に由来する。

一実施形態では、組換え細胞は、バークホルデルシア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。別の実施形態では、組換え細胞は、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。なおも別の実施形態では、組換え細胞は、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallicum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。さらに別の実施形態では、組換え細胞は、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。別の実施形態では、組換え細胞は、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。なおも別の実施形態では、組換え細胞は、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。その他の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シェewanella・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus*

10

20

30

40

50

s imtechensis)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecaceae*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。なおも別の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、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*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。一実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセン (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。別の実施形態では、組換え細胞は、コリネバクテリウム属 (*Corynebacteria*) 種 (例えば *C. glutamicum*) である。本明細書の用法では、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産「向上」は、ホスホケトラゼ、完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチド、およびピロリン酸ポリプレニルシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸有しない細胞と比較した、本明細書に記載される組成物および方法のいずれかによって記載される細胞による、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド生産細胞生産性指標 (CPI) の増大、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド力価の増大、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド質量収率の増大、およ

10

20

30

40

50

び／またはイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド比生産性の増大を指す。イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産は、約5%～約1,000,000倍向上させ得る。イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産は、ホスホケトラーゼをコードする1つまたは複数の異種核酸の発現がない細胞によるイソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体の生産と比較して、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1～約10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、または約50～約200倍）向上させ得る。本明細書に記載される特定の実施形態では、組換え宿主細胞は、MVA生成に向かう炭素流が増大するようにさらに操作されており、それによって、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を発現せず、メバロン酸生成に向かう炭素流を増大させるように操作されていない、イソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体産生細胞によるイソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体の生産向上が提供される。

【0352】

本明細書に記載される細胞による、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産は、向上させ得る（例えば、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリウム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シェワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothece*) 種、ネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*)、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*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カ

10

20

30

40

50

セリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、マイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングセラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングセラ・キングアエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) からのホスホケトラゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸の発現、下流MVA経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、およびピロリン酸ポリプレニルシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸によって向上させる)。

イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産は、約5%～約1,000,000倍向上させ得る。イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産は、天然細胞 (例えば、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Sch*

10

20

30

40

50

izosaccharomyces pombe)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothece*) 種、ネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、マイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニューリカテラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニューリカテラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングア (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) からのホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸と、1つまたは複数のMVA経路ペプチドを発現する1つまたは複数の異種核酸とを発現せず、メバロン酸生成に向かう炭素流を増大させるように操作されていない細胞による、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産と比較して、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500～約500倍、または約50～約200倍)向上させ得る。

【0353】

その他の実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞はまた、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を発現しないイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド産生組換え細胞による、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産と比較して、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍数、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍、10,

10

20

30

40

50

000倍、20,000倍、50,000倍、100,000倍、200,000倍、500,000倍、または1,000,000倍のいずれかで向上させ得る、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産を提供し得る。

【0354】

本明細書でまた提供されるのは、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できる、イソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体産生組換え細胞であって、組換え細胞は、(i)ホスホケトラゼ活性を有して配列番号8と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、(ii)完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(iii)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する1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i)のホスホケトラゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、(a)グルコース上の細胞増殖、(b)キシロース上の細胞増殖、(c)細胞内アセチルリン酸の産生、または(d)グルコース-6-リン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号23と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号24と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号25と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号27と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号28と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号29と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号30と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号31と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチド(例えばE.ガリナラム(*E. gallinarum*)からのホスホケトラゼ)と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3.2を超える、3.4を超える、3.6を超える、3.8を超える、4を超える、4.2を超える、4.4を超える、4.6を超える、4.8を超える、5を超える、5.2を超える、5.4を超える、5.6を超える、5.8を超える、6を超える、6.2を超える、6.4を超える、6.6を超える、6.8を超える、7を超える、7.2を超える、7.4を超える、7.6を超える、7.8を超える、8を超える、8.2を超える、8.4を超える、8.6を超える、8.8、9を超える、9.2を超える、9.4を超える、9.6を超える、9.8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~0.5、約0.25~0.75、約0.5~1、約0.75~1.25、約1~1.5、約1.25~1.75、約1.5~2、約1.75~2.25、約2~2.5、約2.25~2.75、約2.5~3、約2.75~3.25、約3~3.5、約3.25~3.75、約3.5~4、約3.75~4.25、約4~4.5、約4.25~4.75、約4.5~5、約4.75~5.25、約5~5.5、約5.25~5.75、約5.5~6、約6.25~6.75、約6.5~7、約6.75~7.25、約7~7.5、約7.75~8.25、約8~8.5、約8.25~8.75、約8.5~9、約8.75~9.25、約9~9.5、約9.25~9.75、または約9.5~10以上のいずれかをを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~2、約1~3、約2~4、約3~5、約4~6、約5~7、約6~8、

10

20

30

40

50

約 7～9、または約 8～10 以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホケトラゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10 倍以上増大する。

【0355】

本明細書でまた提供されるのは、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できる、イソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体産生組換え細胞であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトラゼ活性を有して配列番号 8 と少なくとも 65% の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、(ii) 完全 MVA 経路の 1 つまたは複数のポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の核酸、および (iii) 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する 1 つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホケトラゼ活性を有する前記ポリペプチドは、(a) タンパク質溶解度、(b) タンパク質発現、または (c) フルクトース-6-リン酸 (F6P) 比活性のパラメータの 1 つまたは複数で、1.0 を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 23 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 24 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 25 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 26 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 27 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 28 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 29 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 30 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 31 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチド (例えば E. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホケトラゼ) と比較して、1.1 を超えるなど、1.2 を超えるなど、1.4 を超える、1.6 を超える、1.8 を超える、2 を超える、2.2 を超える、2.4 を超える、2.6 を超える、2.8 を超える、3 を超える、3.2 を超える、3.4 を超える、3.6 を超える、3.8 を超える、4 を超える、4.2 を超える、4.4 を超える、4.6 を超える、4.8 を超える、5 を超える、5.2 を超える、5.4 を超える、5.6 を超える、5.8 を超える、6 を超える、6.2 を超える、6.4 を超える、6.6 を超える、6.8 を超える、7 を超える、7.2 を超える、7.4 を超える、7.6 を超える、7.8 を超える、8 を超える、8.2 を超える、8.4 を超える、8.6 を超える、8.8、9 を超える、9.2 を超える、9.4 を超える、9.6 を超える、9.8、または 10 を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5 倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約 0.1～0.5、約 0.25～0.75、約 0.5～1、約 0.75～1.25、約 1～1.5、約 1.25～1.75、約 1.5～2、約 1.75～2.25、約 2～2.5、約 2.25～2.75、約 2.5～3、約 2.75～3.25、約 3～3.5、約 3.25～3.75、約 3.5～4、約 3.75～4.25、約 4～4.5、約 4.25～4.75、約 4.5～5、約 4.75～5.25、約 5～5.5、約 5.25～5.75、約 5.5～6、約 6.25～6.75、約 6.5～7、約 6.75～7.25、約 7～7.5、約 7.75～8.25、約 8～8.5、約 8.25～8.75、約 8.5～9、約 8.75～9.25、約 9～9.5、約 9.25～9.75、ま

10

20

30

40

50

たは約 9.5～10 以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約 0.1～2、約 1～3、約 2～4、約 3～5、約 4～6、約 5～7、約 6～8、約 7～9、または約 8～10 以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホケトラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10 倍以上増大する。

【0356】

本明細書でさらに提供されるのは、ホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる、イソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体産生組換え細胞であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトラーゼ活性を有して配列番号 11 と少なくとも 65% の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、(ii) 完全 MVA 経路の 1 つまたは複数のポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の核酸、および (iii) 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する 1 つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホケトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、(a) グルコース上の細胞増殖、(b) キシロース上の細胞増殖、(c) 細胞内アセチルリン酸の産生、または (d) グルコース-6-リン酸上の細胞増殖のパラメータの 1 つまたは複数で、1.0 を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 32 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 33 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 34 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 35 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 36 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 37 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 38 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 39 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 40 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 41 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 42 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 43 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 44 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 45 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 46 と、少なくとも 90% の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチド（例えば E. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホケトラーゼ）と比較して、1.1 を超えるなど、1.2 を超えるなど、1.4 を超える、1.6 を超える、1.8 を超える、2 を超える、2.2 を超える、2.4 を超える、2.6 を超える、2.8 を超える、3 を超える、3.2 を超える、3.4 を超える、3.6 を超える、3.8 を超える、4 を超える、4.2 を超える、4.4 を超える、4.6 を超える、4.8 を超える、5 を超える、5.2 を超える、5.4 を超える、5.6 を超える、5.8 を超える、6 を超える、6.2 を超える、6.4 を超える、6.6 を超える、6.8 を超える、7 を超える、7.2 を超える、7.4 を超える、7.6 を超える、7.8 を超える、8 を超える、8.2 を超える、8.4 を超える、8.6 を超える、8.8、9 を超える、9.2 を超える、9.4 を超える、9.6 を超える、9.8、または 10 を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.

10

20

30

40

50

5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~0.5、約0.25~0.75、約0.5~1、約0.75~1.25、約1~1.5、約1.25~1.75、約1.5~2、約1.75~2.25、約2~2.5、約2.25~2.75、約2.5~3、約2.75~3.25、約3~3.5、約3.25~3.75、約3.5~4、約3.75~4.25、約4~4.5、約4.25~4.75、約4.5~5、約4.75~5.25、約5~5.5、約5.25~5.75、約5.5~6、約6.25~6.75、約6.5~7、約6.75~7.25、約7~7.5、約7.75~8.25、約8~8.5、約8.25~8.75、約8.5~9、約8.75~9.25、約9~9.5、約9.25~9.75、または約9.5~10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~2、約1~3、約2~4、約3~5、約4~6、約5~7、約6~8、約7~9、または約8~10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホクトラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0357】

本明細書で提供されるのは、ホスホクトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド産生組換え細胞であって、組換え細胞は、(i) ホスホクトラーゼ活性を有して配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、(ii) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(iii) 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する1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホクトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドは、(a) タンパク質溶解度、(b) タンパク質発現、または(c) フルクトースー6ーリン酸 (F6P) 比活性のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号32と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号33と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号34と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号35と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号36と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号37と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号38と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号39と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号40と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号41と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号42と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号43と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号44と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号45と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号46と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホクトラーゼ活性を有するポリペプチド (例えばE. ガリナーラム (E. gallinarum) からのホスホクトラーゼ) と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超え

10

20

30

40

50

る、2. 4を超える、2. 6を超える、2. 8を超える、3を超える、3. 2を超える、3. 4を超える、3. 6を超える、3. 8を超える、4を超える、4. 2を超える、4. 4を超える、4. 6を超える、4. 8を超える、5を超える、5. 2を超える、5. 4を超える、5. 6を超える、5. 8を超える、6を超える、6. 2を超える、6. 4を超える、6. 6を超える、6. 8を超える、7を超える、7. 2を超える、7. 4を超える、7. 6を超える、7. 8を超える、8を超える、8. 2を超える、8. 4を超える、8. 6を超える、8. 8、9を超える、9. 2を超える、9. 4を超える、9. 6を超える、9. 8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1~0. 5、約0. 25~0. 75、約0. 5~1、約0. 75~1. 25、約1~1. 5、約1. 25~1. 75、約1. 5~2、約1. 75~2. 25、約2~2. 5、約2. 25~2. 75、約2. 5~3、約2. 75~3. 25、約3~3. 5、約3. 25~3. 75、約3. 5~4、約3. 75~4. 25、約4~4. 5、約4. 25~4. 75、約4. 5~5、約4. 75~5. 25、約5~5. 5、約5. 25~5. 75、約5. 5~6、約6. 25~6. 75、約6. 5~7、約6. 75~7. 25、約7~7. 5、約7. 75~8. 25、約8~8. 5、約8. 25~8. 75、約8. 5~9、約8. 75~9. 25、約9~9. 5、約9. 25~9. 75、または約9. 5~10以上のいずれかをを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1~2、約1~3、約2~4、約3~5、約4~6、約5~7、約6~8、約7~9、または約8~10以上のいずれかをを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム (*E. gallinarum*) からのホスホケトラゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0358】

組換え細胞を使用してイソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体分子を生産する方法

本明細書でまた提供されるのは、ホスホケトラゼおよびピロリン酸ポリプレニルシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなる、組換え細胞（例えば組換え細菌細胞）を培養するステップを含んでなる、イソプレノイド前駆物質分子および／またはイソプレノイドを生産する方法である。特定の実施形態では、組換え細胞は、上流MVA経路ポリペプチドおよび下流MVA経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の1つまたは複数の異種核酸をさらに含んでなる。イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドは、本明細書に記載される細胞のいずれかから、本明細書に記載される方法のいずれかに従って、生産し得る。グルコースなどの六炭糖をはじめとする炭水化物から、イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産する目的で、細胞のいずれかを使用し得る。

【0359】

特定の態様では、本明細書で提供されるのは、イソプレンを生産するのに適した条件で、バークホルデルシア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリカム (*Bifidobacterium gallicum*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella balt*

ica)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) sp.、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラール (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種、ネオサルトリヤ・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、マイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングセラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニューリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニューリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングセラ・キングア (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) からのホスホケトラーゼポリペプチドと、L. グレイー (*L. grayi*)、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*)、および／または E. ファエカリス (*E. faecalis*) からの mvaE および mvaS ポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の異種核酸を含ん

10

20

30

40

50

でなる、組換え細胞を培養するステップと、(b) イソプレンを生産するステップとを含んでなる、イソプレンを生産する方法である。細胞は、上述の下流MVA経路ポリペプチド（例えば、MVK、PMK、MVD、および／またはIDI）をコードする1つまたは複数の核酸分子、および上述のポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドのいずれかをさらに含んでなり得る。いくつかの態様では、組換え細胞は、本明細書に記載される細胞のいずれかであり得る。本明細書に記載されるポリプレニルピロリン酸シンターゼまたはその変異体のいずれか、本明細書に記載される宿主細胞株のいずれか、本明細書に記載されるプロモーターのいずれか、および／またはベクター本明細書に記載されるのいずれかもまた使用して、本明細書に記載されるエネルギー源（例えば、グルコースまたは任意のその他の六炭糖）のいずれかを使用して、イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産し得る。いくつかの態様では、イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産する方法は、イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを回収するステップをさらに含んでなる。

【0360】

特定の態様では、本明細書で提供されるのは、イソプレンを生産するのに適した条件で、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シェewanella・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) sp.、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Bruceella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種、ネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルtonius (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus*

10

20

30

40

50

us halophilus)、マイコプラズマ・アルスリチデイス (*Mycoplasma arthritidis*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングア (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) からのホスホケトラゼポリペプチドと、*L. グレイ* (*L. grayi*)、*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*)、および／または *E. ファエカリス* (*E. faecalis*) からの *mvaE* および *mvaS* ポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の異種核酸を含んでなる、組換え細胞を培養するステップと、(b) イソプレンを生産するステップとを含んでなる、イソプレンを生産する方法である。細胞は、上述の下流 MVA 経路ポリペプチド (例えば、MVK、PMK、MVD、および／または IDI) をコードする 1 つまたは複数の核酸分子、および上述のポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドのいずれかをさらに含んでなり得る。いくつかの態様では、組換え細胞は、本明細書に記載される細胞のいずれかであり得る。本明細書に記載されるポリプレニルピロリン酸シンターゼまたはその変異体のいずれか、本明細書に記載される宿主細胞株のいずれか、本明細書に記載されるプロモーターのいずれか、および／または本明細書に記載されるベクターのいずれかもまた使用して、本明細書に記載されるエネルギー源 (例えば、グルコースまたは任意のその他の六炭糖) のいずれかを使用して、イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産し得る。いくつかの態様では、イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産する方法は、イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを回収するステップをさらに含んでなる。

【0361】

イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産する方法は、同様に、(a) ホスホケトラゼを内在性に有しない、(大腸菌 (*E. coli*) 細胞をはじめとするが、これに限定されるものではない) 組換え細胞を培養するステップであって、組換え細胞が、ホスホケトラゼポリペプチドをコードする、遺伝子の 1 つまたは複数のコピーを異種性に発現するステップと；(b) イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産するステップとを含んでなり得て、組換え細胞は、ホスホケトラゼポリペプチドを含まないイソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体産生細胞と比較して、より高い量のイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを産生する。

【0362】

イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産する本方法は、ホスホケトラゼポリペプチドを含まない、イソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体産生組換え細胞と比較して、少なくとも 5 % 高い量のイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを生産し得る。代案としては、組換え細胞は、包括的に、約 1 %、2

％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、または１５％高いイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを産生し得る。いくつかの態様では、イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産する方法は、イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを回収するステップをさらに含んでなる。

【０３６３】

本明細書で提供されるのは、上述の細胞のいずれかを使用して、イソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体分子生産を向上させる方法である。細胞によるイソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドの生産は、ホスホケトラーゼをコードしおよび／または *L. グレイー* (*L. grayi*)、*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. casseliiflavus*)、および／または *E. ファエカリス* (*E. faecalis*) からの *mvaE* および *mvaS* ポリペプチドをコードする１つまたは複数の異種核酸、下流 *MVA* 経路ポリペプチドをコードする１つまたは複数の異種核酸、およびピロリン酸ポリプレニルシンターゼポリペプチドをコードする１つまたは複数の異種核酸の発現によって、向上させ得る。本明細書の用法では、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産「向上」は、ホスホケトラーゼ、ピロリン酸ポリプレニルシンターゼポリペプチド、下流 *MVA* 経路ポリペプチド、*L. グレイー* (*L. grayi*)、*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. casseliiflavus*) からの *mvaE* および *mvaS* ポリペプチドをコードする１つまたは複数の異種核酸を有しない細胞と比較した、本明細書に記載される組成物および方法のいずれかによって記載される細胞による、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド生産の細胞生産性指標 (*CPI*) 増大、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの力価増大、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの質量収率増大、および／またはイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの比生産性増大を指す。イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドの生産は、約５％～約１，０００，０００倍向上させ得る。イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドの生産は、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする１つまたは複数の異種核酸の発現がない細胞によるイソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドの生産と比較して、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、または約５０～約２００倍）向上させ得る。本明細書に記載される特定の実施形態では、方法は、*MVA* 生成に向かう炭素流が増大するようにさらに操作されている組換え宿主細胞を含んでなり、それによって、ホスホケトラーゼペプチドをコードする１つまたは複数の異種核酸を発現せず、メバロン酸生成に向かう炭素流を増大させるように操作されていない、イソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体産生細胞によるイソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体の生産と比較して、イソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体の生産向上が提供される。

【０３６４】

イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドの生産もまた、本明細書に記載される方法によって、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする１つまたは複数の異種核酸の発現がないイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド産生細胞によるイソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドの生産と比較して、少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１倍数、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，

10

20

30

40

50

000倍、200,000倍、500,000倍、または1,000,000倍のいずれかで、向上させ得る。本明細書に記載される特定の実施形態では、方法は、MVA生成に向かう炭素流が増大するようにさらに操作されている組換え宿主細胞を含んでなり、それによって、ホスホケトラゼペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を発現せず、メバロン酸生成に向かう炭素流を増大させるように操作されていない、イソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体産生細胞によるイソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体の生産と比較して、イソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体の生産向上が提供される。

【0365】

さらに、より特異的な細胞培養条件を使用して、本明細書に記載される方法で細胞を培養し得る。例えば、いくつかの態様では、イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産する方法は、(a) ホスホケトラゼポリペプチドをコードする異種核酸を含んでなり、*L. グレイー* (*L. grayi*)、*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*)、および／または*E. ファエカリス* (*E. faecalis*)からの*mvaE*遺伝子および*mvaS*遺伝子を内在性に有しない、(大腸菌 (*E. coli*) 細胞をはじめとするが、これに限定されるものではない) 組換え細胞を34℃の最少培地中で培養するステップであって、組換え細胞が、低から中程度のプラスミドコピーで、強力なプロモーター制御下において、*バークホルデリア・フィトフィルマンズ* (*Burkholderia phytofirmans*)、*ラクトバチルス・ブフネリ* (*Lactobacillus buchneri*)、*ビフィドバクテリウム・ガリクム* (*Bifidobacterium gallicum*)、*ビフィドバクテリウム・デンチウム* (*Bifidobacterium dentium*)、*ビフィドバクテリウム・ビフィダム* (*Bifidobacterium bifidum*)、*クロストリジウム・アセトブチリカム* (*Clostridium acetobutylicum*)、*マイコバクテリウム・ギルバム* (*Mycobacterium gilvum*)、*シューワネラ・バルチカ* (*Shewanella baltica*)、*ラクトバチルス・ラムノーサス* (*Lactobacillus rhamnosus*)、*ラクトバチルス・クリスパータス* (*Lactobacillus crispatus*)、*ビフィドバクテリウム・ロングム* (*Bifidobacterium longum*)、*ロイコノストック・シトレウム* (*Leuconostoc citreum*)、*ブラディリゾビウム*属 (*Bradyrhizobium*) 種、*エンテロコッカス・フェシウム* (*Enterococcus faecium*)、*ブルセラ・ミクロチ* (*Brucella microti*)、*ラクトバチルス・サリバリウス* (*Lactobacillus salivarius*)、*ストレプトコッカス・アガラクチアエ* (*Streptococcus agalactiae*)、*ロドコッカス・イムテケンシス* (*Rhodococcus imtechensis*)、*バークホルデリア・ゼノボランス* (*Burkholderia xenovorans*)、*マイコバクテリウム・イントラセルラーレ* (*Mycobacterium intracellulare*)、*ニトロソモナス*属 (*Nitrosomonas*) 種、*シゾサッカロミセス・ポンベ* (*Schizosaccharomyces pombe*)、*ロイコノストック・メセンテロイデス* (*Leuconostoc mesenteroides*)、*ストレプトミセス*属 (*Streptomyces*) 種、*ラクトバチルス・ブフネリ* (*Lactobacillus buchneri*)、*ストレプトミセス・ガーナエンシス* (*Streptomyces ghanaensis*)、*シアノセイス*属 (*Cyanothecae*) 種、*ネオサルトリア・フィスケリ* (*Neosartorya fischeri*)、*エンテロコッカス・フェシウム* (*Enterococcus faecium*)、*リステリア・グレイー* (*Listeria grayi*)、*エンテロコッカス・ガリナルム* (*Enterococcus gallinarum*)、*エンテロコッカス・サッカロリチクス* (*Enterococcus saccharolyticus*)、*エンテロコッカス・カセリフラブス* (*Enterococcus casseliflavus*)、*マイコバ*

10

20

30

40

50

ラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、マイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングセラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングセラ・キングエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) からのホスホケトラゼポリペプチドをコードする、遺伝子の1つまたは複数のコピーを異種性に発現するステップと、(b) イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産するステップとを含んでなり、いくつかの態様では、方法は、イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを回収するステップをさらに含んでなる。

【0366】

本明細書でまた提供されるのは、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを生産するステップとを含んでなる、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを生産する方法であって、組換え細胞は、(i) ホスホケトラゼ活性を有して配列番号8と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、(ii) 完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(iii) 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する1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホケトラゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、(a) グルコース上の細胞増殖、(b) キシロース上の細胞増殖、(c) 細胞内アセチルリン酸の生産、または(d) グルコース-6-リン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号23と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号24と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号25と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号27と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号28と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号29と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号30と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号31と、少なくとも90%の配列同一性を含んで

10

20

30

40

50

なる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチド（例えばE. ガリナーラム（E. gallinarum）からのホスホケトラーゼ）と比較して、1. 1を超えるなど、1. 2を超えるなど、1. 4を超える、1. 6を超える、1. 8を超える、2を超える、2. 2を超える、2. 4を超える、2. 6を超える、2. 8を超える、3を超える、3. 2を超える、3. 4を超える、3. 6を超える、3. 8を超える、4を超える、4. 2を超える、4. 4を超える、4. 6を超える、4. 8を超える、5を超える、5. 2を超える、5. 4を超える、5. 6を超える、5. 8を超える、6を超える、6. 2を超える、6. 4を超える、6. 6を超える、6. 8を超える、7を超える、7. 2を超える、7. 4を超える、7. 6を超える、7. 8を超える、8を超える、8. 2を超える、8. 4を超える、8. 6を超える、8. 8、9を超える、9. 2を超える、9. 4を超える、9. 6を超える、9. 8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1～0. 5、約0. 25～0. 75、約0. 5～1、約0. 75～1. 25、約1～1. 5、約1. 25～1. 75、約1. 5～2、約1. 75～2. 25、約2～2. 5、約2. 25～2. 75、約2. 5～3、約2. 75～3. 25、約3～3. 5、約3. 25～3. 75、約3. 5～4、約3. 75～4. 25、約4～4. 5、約4. 25～4. 75、約4. 5～5、約4. 75～5. 25、約5～5. 5、約5. 25～5. 75、約5. 5～6、約6. 25～6. 75、約6. 5～7、約6. 75～7. 25、約7～7. 5、約7. 75～8. 25、約8～8. 5、約8. 25～8. 75、約8. 5～9、約8. 75～9. 25、約9～9. 5、約9. 25～9. 75、または約9. 5～10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1～2、約1～3、約2～4、約3～5、約4～6、約5～7、約6～8、約7～9、または約8～10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム（E. gallinarum）からのホスホケトラーゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0367】

本明細書でまた提供されるのは、ホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを生産するステップとを含んでなる、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを生産する方法であって、組換え細胞は、（i）ホスホケトラーゼ活性を有して配列番号8と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、（ii）完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および（iii）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する1つまたは複数の核酸を含んでなり、（i）のホスホケトラーゼ活性を有する前記ポリペプチドは、（a）タンパク質溶解度、（b）タンパク質発現、または（c）フルクトース-6-リン酸（F6P）比活性のパラメータの1つまたは複数で、1. 0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号23と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号24と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号25と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号27と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号28と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチド

は、配列番号29と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号30と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号31と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチド（例えばE. ガリナーラム（E. gallinarum）からのホスホクトラゼ）と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3.2を超える、3.4を超える、3.6を超える、3.8を超える、4を超える、4.2を超える、4.4を超える、4.6を超える、4.8を超える、5を超える、5.2を超える、5.4を超える、5.6を超える、5.8を超える、6を超える、6.2を超える、6.4を超える、6.6を超える、6.8を超える、7を超える、7.2を超える、7.4を超える、7.6を超える、7.8を超える、8を超える、8.2を超える、8.4を超える、8.6を超える、8.8、9を超える、9.2を超える、9.4を超える、9.6を超える、9.8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~0.5、約0.25~0.75、約0.5~1、約0.75~1.25、約1~1.5、約1.25~1.75、約1.5~2、約1.75~2.25、約2~2.5、約2.25~2.75、約2.5~3、約2.75~3.25、約3~3.5、約3.25~3.75、約3.5~4、約3.75~4.25、約4~4.5、約4.25~4.75、約4.5~5、約4.75~5.25、約5~5.5、約5.25~5.75、約5.5~6、約6.25~6.75、約6.5~7、約6.75~7.25、約7~7.5、約7.75~8.25、約8~8.5、約8.25~8.75、約8.5~9、約8.75~9.25、約9~9.5、約9.25~9.75、または約9.5~10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~2、約1~3、約2~4、約3~5、約4~6、約5~7、約6~8、約7~9、または約8~10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナーラム（E. gallinarum）からのホスホクトラゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0368】

本明細書でさらに提供されるのは、ホスホクトラゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを生産するステップとを含んでなる、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを生産する方法であって、組換え細胞は、（i）ホスホクトラゼ活性を有して配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、（i i）完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および（i i i）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する1つまたは複数の核酸を含んでなり、（i）のホスホクトラゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞は、（a）グルコース上の細胞増殖、（b）キシロース上の細胞増殖、（c）細胞内アセチルリン酸の生産、または（d）グルコース-6-リン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号32と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号33と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号34と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態

では、ポリペプチドは、配列番号35と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号36と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号37と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号38と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号39と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号40と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号41と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号42と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号43と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号44と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号45と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号46と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチド（例えばE. ガリナラム（*E. gallinarum*）からのホスホケトラゼ）と比較して、1. 1を超えるなど、1. 2を超えるなど、1. 4を超える、1. 6を超える、1. 8を超える、2を超える、2. 2を超える、2. 4を超える、2. 6を超える、2. 8を超える、3を超える、3. 2を超える、3. 4を超える、3. 6を超える、3. 8を超える、4を超える、4. 2を超える、4. 4を超える、4. 6を超える、4. 8を超える、5を超える、5. 2を超える、5. 4を超える、5. 6を超える、5. 8を超える、6を超える、6. 2を超える、6. 4を超える、6. 6を超える、6. 8を超える、7を超える、7. 2を超える、7. 4を超える、7. 6を超える、7. 8を超える、8を超える、8. 2を超える、8. 4を超える、8. 6を超える、8. 8、9を超える、9. 2を超える、9. 4を超える、9. 6を超える、9. 8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1～0. 5、約0. 25～0. 75、約0. 5～1、約0. 75～1. 25、約1～1. 5、約1. 25～1. 75、約1. 5～2、約1. 75～2. 25、約2～2. 5、約2. 25～2. 75、約2. 5～3、約2. 75～3. 25、約3～3. 5、約3. 25～3. 75、約3. 5～4、約3. 75～4. 25、約4～4. 5、約4. 25～4. 75、約4. 5～5、約4. 75～5. 25、約5～5. 5、約5. 25～5. 75、約5. 5～6、約6. 25～6. 75、約6. 5～7、約6. 75～7. 25、約7～7. 5、約7. 75～8. 25、約8～8. 5、約8. 25～8. 75、約8. 5～9、約8. 75～9. 25、約9～9. 5、約9. 25～9. 75、または約9. 5～10以上のいずれかを超える。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0. 1～2、約1～3、約2～4、約3～5、約4～6、約5～7、約6～8、約7～9、または約8～10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、E. ガリナラム（*E. gallinarum*）からのホスホケトラゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 0、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0369】

本明細書で提供されるのは、ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞を培養するステップと、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを生産するステップとを含んでなる、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを生産する方法であって、組換え細胞は、（i）ホスホケトラゼ活性を有して配列番号1

10

20

30

40

50

1と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、(i i)完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、および(i i i)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する1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i)のホスホクトラゼ活性を有する前記ポリペプチドが、(a)タンパク質溶解度、(b)タンパク質発現、または(c)フルクトース-6-リン酸(F6P)比活性のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する、組換え細胞。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号32と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号33と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号34と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号35と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号36と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号37と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号38と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号39と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号40と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号41と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号42と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号43と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号44と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号45と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号46と、少なくとも90%の配列同一性を含んでなる。その他の実施形態では、前記パラメータのいずれかの前記性能指標値は、親ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチド(例えばE. ガリナラム(E. gallinarum)からのホスホクトラゼ)と比較して、1.1を超えるなど、1.2を超えるなど、1.4を超える、1.6を超える、1.8を超える、2を超える、2.2を超える、2.4を超える、2.6を超える、2.8を超える、3を超える、3.2を超える、3.4を超える、3.6を超える、3.8を超える、4を超える、4.2を超える、4.4を超える、4.6を超える、4.8を超える、5を超える、5.2を超える、5.4を超える、5.6を超える、5.8を超える、6を超える、6.2を超える、6.4を超える、6.6を超える、6.8を超える、7を超える、7.2を超える、7.4を超える、7.6を超える、7.8を超える、8を超える、8.2を超える、8.4を超える、8.6を超える、8.8、9を超える、9.2を超える、9.4を超える、9.6を超える、9.8、または10を超えるまたはそれを上回るのいずれかである。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5倍以上増大する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~0.5、約0.25~0.75、約0.5~1、約0.75~1.25、約1~1.5、約1.25~1.75、約1.5~2、約1.75~2.25、約2~2.5、約2.25~2.75、約2.5~3、約2.75~3.25、約3~3.5、約3.25~3.75、約3.5~4、約3.75~4.25、約4~4.5、約4.25~4.75、約4.5~5、約4.75~5.25、約5~5.5、約5.25~5.75、約5.5~6、約6.25~6.75、約6.5~7、約6.75~7.25、約7~7.5、約7.75~8.25、約8~8.5、約8.25~8.75、約8.5~9、約8.75~9.25、約9~9.5、約9.25~9.75、または約9.5~10以上のいずれかを超越する。その他の実施形態では、細胞性能指標は、親分子と比較して、約0.1~2、約1~3、約2~4、約3~5、約4~6、約5~7、約6~8

10

20

30

40

50

、約7～9、または約8～10以上のいずれかを超える。いくつかの実施形態では、親分子は、*E. ガリナーラム* (*E. gallinarum*) からのホスホケトラゼである。別の実施形態では、細胞内活性は、少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上増大する。

【0370】

ベクター

本明細書に記載される組成物および方法のいずれかにおいて、適切なベクターを使用し得る。例えば、適切なベクターを使用して、特定の宿主細胞（例えば、大腸菌 (*E. coli*)）中で、ホスホケトラゼ、*mvaE* および *anmvaS* ポリペプチドをはじめとするがこれに限定されるものではない上流MVA経路ポリペプチド、下流MVA経路ポリペプチド、イソプレニンターゼ、またはポリプレニルピロリン酸シンターゼをコードする、遺伝子の1つまたは複数のコピーの発現を最適化し得る。いくつかの態様では、ベクターは選択マーカーを含有する。選択可能なマーカーの例としては、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、ハイグロマイシン、フレオマイシン、ブレオマイシン、ネオマイシン、またはクロラムフェニコール）および／または宿主細胞に対する栄養上の利点などの代謝上の利点をもたらす核酸が挙げられるが、これに限定されるものではない。いくつかの態様では、ホスホケトラゼ；*mvaE* および *anmvaS* ポリペプチドをはじめとするがこれに限定されるものではない上流MVA経路ポリペプチド；下流MVA経路ポリペプチド；*L. グレイ* (*L. grayi*)、*E. フェシウム* (*E. faecium*)、*E. ガリナーラム* (*E. gallinarum*)、*E. カセリフラブス* (*E. casseliflavus*)、および／または *E. ファエカリス* (*E. faecalis*) からの *mvaE* および *mvaS* 核酸；イソプレニンターゼ；またはポリプレニルピロリン酸シンターゼ核酸の1つまたは複数のコピーが、選択マーカーなしで宿主細胞のゲノムに組み込まれる。

【0371】

本明細書で特性解析され、または本開示の実施例で使用される、ベクターのいずれかを本発明で使用し得る。

【0372】

形質転換方法

ホスホケトラゼ、*mvaE* および *anmvaS* ポリペプチドをはじめとするがこれに限定されるものではない上流MVA経路ポリペプチド、下流MVA経路ポリペプチド、および／または下流MVA経路ポリペプチドをコードする核酸の1つまたは複数のコピーを、適切な技術を使用して細胞中に挿入し得る。さらに、形質転換、電気穿孔、核マイクロインジェクション、形質導入、形質移入（例えば、リポフェクション媒介またはDEAE-デキストリン媒介形質移入または組換えファージウイルスを使用した形質移入）、リン酸カルシウムDNA沈殿によるインキュベーション、DNA被覆マイクロプロジェクトイルでの高速衝撃、およびプロトプラスト融合などの、宿主細胞にDNAコンストラクトまたはベクターを導入するための標準的な技術を使用して、イソプレニンターゼ、IDI、DXP経路、および／またはポリプレニルピロリン酸シンターゼ核酸またはそれらを含有するベクターを、宿主細胞（例えば、本明細書に記載される植物細胞、真菌細胞、酵母細胞、または細菌細胞）中に挿入し得る。一般的形質転換技術は、当該技術分野で公知である（例えば、*Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al. (編.) Chapter 9, 1987; *Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor, 1989; および *Campbell et al., Curr. Genet.* 16:53-56, 1989を参照されたい)。導入された核酸は、染色体DNAに組み込まれ、または染色体外自己複製配列として維持され得る。形質転換体は、当該技術分野で公知の任

10

20

30

40

50

意の方法によって選択し得る。形質転換体を選択する適切な方法は、国際公開第2009/076676号パンフレット、米国特許出願公開第2009/0203102号明細書、国際公開第2010/003007号パンフレット、米国特許出願公開第2010/0048964号明細書、国際公開第2009/132220号パンフレット、および米国特許出願公開第2010/0003716号明細書に記載される。

【0373】

例示的な宿主細胞

当業者は、発現ベクターが、特定の宿主株について遺伝子発現を最適化する特定構成要素を含有するように、デザインされることを認識するであろう。このような最適化構成要素としては、複製起点、プロモーター、およびエンハンサーが挙げられるが、これに限定されるものではない。本明細書で言及されるベクターおよび構成要素は、例示的な目的のために記載され、本発明の範囲を狭めることは意図されない。

【0374】

遺伝子を異種性に発現するのに使用し得る任意の細胞またはそれらの子孫を使用して、1つまたは複数のホスホケトラゼを発現させ得る。特定の実施形態では、細胞（例えば組換え細胞）は、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、および／またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothecae*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、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*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casselifl*

10

20

30

40

50

avus)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカテラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカテラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサングイニス (*Streptococcus parasanguinis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、表1、表2および／または図面3～24に列挙される生物から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。

【0375】

上述のおよび本明細書のホスホケトラゼをコードする異種核酸がある細胞（例えば組換え細胞）はまた、1つまたは複数のMVA経路ペプチド、イソブレンシンターゼ、IDI、DXP経路ポリペプチド(e)、および／またはピロリン酸ポリプレニルシンターゼポリペプチドを発現する、1つまたは複数の異種核酸によって操作し得る。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、グラム陽性細菌である。非限定的例としては、コリネバクテリウム属 (*Corynebacteria*)（例えばC. グルタミカム (*C. glutamicum*)）、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*)（例えば、S. リビダンス (*S. lividans*)、S. コエリカラー (*S. coelicolor*)、またはS. グリセウス (*S. griseus*)）、バチルス属 (*Bacillus*)、リステリア属 (*Listeria*)（例えば、L. モノサイトゲネス (*L. monocytogenes*)）またはラクトバチルス属 (*Lactobacillus*)（例えばラクトバチルス属 (*L.*) 種）の株が挙げられる。いくつかの実施形態では、起源生物は、大腸菌 (*E. coli*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 種、またはH. ピロリ (*H. pylori*) などのグラム陰性細菌である。

【0376】

グラム陽性またはグラム陰性細菌をはじめとする細菌細胞を使用して、上述の異種遺伝子のいずれかを発現させ得る。具体的には、mvaEおよびmvaS遺伝子は、P. シトレア (*P. citrea*)、B. サブチリス (*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. stearoothermophilus*)、B. アルカロフィルス (*B. alkalophilus*)、B. アミ

10

20

30

40

50

ロリケファシエンス (*B. amy lol i que fa ci 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*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 種、および *P. アルカリゲネス* (*P. alcaligenes*) 細胞のいずれか1つの中で発現され得る。

【0377】

本発明の組成物および方法で宿主細胞として使用し得る、多数のタイプの嫌気性細胞がある。本発明の一態様では、本明細書に記載される組成物また方法のいずれかに記載される細胞は、偏性嫌気性細胞およびその子孫である。偏性嫌気性菌は、典型的に、酸素が存在する条件では、たとえ増殖したとしても、十分に増殖しない。少量の酸素は存在してもよいものと理解され、すなわち、低レベルの酸素に対して偏性嫌気性菌が有する、いくらかの耐性レベルがある。一態様では、メバロン酸、イソプレノイド前駆体、イソプレン、およびイソプレノイドを産生するように改変された偏性嫌気性菌は、本明細書に記載される方法および／または組成物のいずれかのための宿主細胞の役割を果たし得て、存在する酸素量が嫌気性菌の増殖、維持、および／または発酵に有害でない実質的酸素非含有条件下で増殖される。

【0378】

本発明の別の態様では、本明細書に記載される組成物また方法のいずれかで記載されおよび／または使用される宿主細胞は、通性嫌気性細胞およびその子孫である。通性嫌気性菌は、酸素が存在すれば、好気性呼吸（例えば、TCA回路の利用）によって細胞ATPを産生し得る。しかし通性嫌気性菌は、酸素不在下でもまた増殖し得る。これは、より多量の酸素の存在下で死滅し、または不十分に増殖する、偏性嫌気性菌とは対照的である。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および／または方法のいずれかのための宿主細胞の役割を果たし得て、メバロン酸、イソプレノイド前駆体、イソプレン、およびイソプレノイドを産生するように改変し得る。通性嫌気性宿主細胞は、存在する酸素量が嫌気性菌の増殖、維持、および／または発酵に有害でない、実質的に酸素非含有の条件下で増殖し得て、または代案としてはより多量の酸素の存在下で増殖し得る。

【0379】

宿主細胞はさらに、糸状菌細胞およびその子孫であり得る。（例えば、Berka & Barnett, *Biotechnology Advances*, (1989), 7 (2) : 127-154を参照されたい）。いくつかの態様では、糸状菌細胞は、トリコデルマ・ロンギブラキアツム (*Trichoderma longibrachiatum*)、*T. ビリデ* (*T. viride*)、*T. コニングイ* (*T. koningii*)、*T. ハルジアヌム* (*T. harzianum*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*) 種、フミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、*H. ラヌギノース* (*H. lanuginosa*)、*H. グリセア* (*H. grisea*)、クリソスポリウム属 (*Chrysosporium*) 種、*C. ルクノウェンス* (*C. lucknowense*)、*グリオクラジウム*属 (*Gliocladium*) 種、*A. オリゼ* (*A. oryzae*)、*A. ニガー* (*A. niger*)、*ショウユコウジカビ* (*A. sojae*)、*A. ジャポニカス* (*A. japonicus*)、*A. ニデュランス* (*A. nidulans*)、または *A. アワモリ* (*A. awamori*) などのアスペルギルス属 (*Aspergillus*) 種、*F. ロゼウム* (*F. roseum*)、*F. グラミヌム* (*F. graminum*)、*F. セレアリス* (*F. cerealis*)、*F. オキシスポラム* (*F. oxysporum*)、または *F. ベネナツム* (*F. venenatum*) などのフザリウム属 (*Fusarium*) 種、*N. クラッサ* (*N. crassa*) などのニューロスポラ属 (*Neurospora*) 種、

rospora) 種、ヒポクレア属 (Hypocrea) 種、M. ミーヘイ (M. miehei) などのケカビ属 (Mucor) 種、クモノスカビ属 (Rhizopus) 種またはエメリセラ属 (Emericella) 種のいずれかであり得る。いくつかの態様では、真菌は、A. ニデュランス (A. nidulans)、A. アワモリ (A. awamori)、A. オリゼ (A. oryzae)、A. アクレアトウス (A. aculeatus)、A. ニガー (A. niger)、A. ジャポニカス (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)、または F. ソラニ (F. solani) である。特定の実施形態では、本明細書において利用するためのプラスミドまたはプラスミド構成要素としては、米国特許公開第 2011/0045563 号明細書に記載されるものが挙げられる。

10

【0380】

宿主細胞はまた、サッカロミセス属 (Saccharomyces) 種、シゾサッカロミセス属 (Schizosaccharomyces) 種、ピチア属 (Pichia) 種、またはカンジダ属 (Candida) 種などの酵母であり得る。いくつかの態様では、サッカロミセス属 (Saccharomyces) 種は、サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) である (例えば、Romanos et al., Yeast, (1992), 8 (6): 423-488 を参照されたい)。特定の実施形態では、本明細書で利用するためのプラスミドまたはプラスミド構成要素としては、米国特許第 7,659,097 号明細書、および米国特許出願公開第 2011/0045563 号明細書に記載されるものが挙げられる。

20

【0381】

宿主細胞は、さらに、緑藻類、紅藻類、灰色藻類、クロララクニオン藻類、ユーグレナ藻類、クロミスタ、または渦鞭毛藻類などの藻類種であり得る。(例えば、Saunders & Warmbrodt, "Gene Expression in Algae and Fungi, Including Yeast," (1993), National Agricultural Library, Beltsville, MD を参照されたい)。特定の実施形態では、本明細書において利用するためのプラスミドまたはプラスミド構成要素としては、米国特許公開第 2011/0045563 号明細書に記載されるものが挙げられる。いくつかの態様では、宿主細胞は、形態学に基づいて、以下の群のいずれかに分類されるラン藻などのラン藻である: クロロコックム目 (Chlorococcales)、プレウロカプサ目 (Pleurocapsales)、ユレモ目 (Oscillatoriales)、ネンジュモ目 (Nostocales)、またはスティゴネマ目 (Stigonematales)。(例えば、Lindberg et al., Metab. Eng., (2010) 12 (1): 70-79 を参照されたい)。特定の実施形態では、本明細書で利用するためのプラスミドまたはプラスミド構成要素としては、米国特許出願公開第 2010/0297749 号明細書; 米国特許出願公開第 2009/0282545 号明細書、および国際公開第 2011/034863 号パンフレットに記載されるものが挙げられる。

30

【0382】

大腸菌 (E. coli) 宿主細胞を使用して、任意の数の生物から 1 つまたは複数のホスホケトラーゼ酵素を発現させ得る。特定の実施形態では、細胞 (例えば組換え細胞) は、バークホルデルシア・フィトフィルマンズ (Burkholderia phytofirmans)、ラクトバチルス・ブフネリ (Lactobacillus buchneri)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (Bifidobacterium gallium)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (Bifidobacterium dentium)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (Bifidobacterium bifidum)、および/またはクロストリジウム・アセトブチリカム (Clostridium acetobutylicum) から単離されたホスホケトラーゼをコードする、異種核酸の 1 つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組

40

50

換え細胞は、マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*)、シューワネラ・バルチカ (*Shewanella baltica*)、ラクトバチ
 ルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチ
 ルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、ビフィド
 バクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ロイコノ
 ストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*)、ブラディリゾビウ
 ム属 (*Bradyrhizobium*) 種、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtchensis*)、バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ストレプトミセス・ガーナエンシス (*Streptomyces ghanaensis*)、シアノセイス属 (*Cyanothece*) 種、および／またはネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、リステリア・グレイー (*Listeria grayi*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・サッカロリチクス (*Enterococcus saccharolyticus*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*)、カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 種、メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*)、および／またはマイコプラズマ・アルスリチディス (*Mycoplasma arthritidis*) から単離されたホスホケトラゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*)、キングラ・オラリス (*Kingella oralis*)、マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、グラニュリカタラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*)、マイコバクテリウム・ボービス (*Mycobacterium bovis*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*)、グラニュリカタラ・エレガンス (*Granulicatella elegans*)、ストレプトコッカス・パラサンギニス (*Streptococcus parasanginis*)、アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*)、キングラ・キングアエ (*Kingella kingae*)、ストレプトコッカス・アウストラリス (*Streptococcus australis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、および／またはマ

10

20

30

40

50

イコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) から単離されたホスホクトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。いくつかの実施形態では、組換え細胞は、表1、表2および／または図面3～24に列挙される生物から単離されたホスホクトラーゼをコードする、異種核酸の1つまたは複数のコピーを含んでなる。

【0383】

これらの細胞はまた、1つまたは複数のMVA経路ポリペプチド、イソプレニシンターゼ、IDI、DXP経路ポリペプチド、および／またはピロリン酸ポリプレニルシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸によって操作し得る。一態様では、宿主細胞は、1つまたは複数のMVA経路ペプチドを発現する1つまたは複数の異種核酸と並んで、上述のおよび本明細書のホスホクトラーゼをコードする1つまたは複数の核酸を発現する、メバロン酸を産生できる大腸菌 (*Escherichia coli*) (大腸菌 (*E. coli*) 株またはその子孫の組換え細胞である。大腸菌 (*E. coli*) 宿主細胞は、1つまたは複数のMVA経路ペプチドを発現する1つまたは複数の異種核酸と並んで、上述のおよび本明細書のホスホクトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸を欠く同一細胞を上回る、量、ピーク力価、および細胞生産性で、メバロン酸を産生し得る。さらに、大腸菌 (*E. coli*) 内で、1つまたは複数のMVA経路ペプチドを発現する1つまたは複数の異種核酸と並んで、上述のおよび本明細書のホスホクトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現する核酸は、染色体コピーであり得る (例えば大腸菌 (*E. coli*) 染色体に組み込まれる)。その他の態様では、大腸菌 (*E. coli*) 細胞は培養中にある。いくつかの態様では、1つまたは複数のホスホクトラーゼ酵素は、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、および／またはエンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) に由来する。任意の態様では、1つまたは複数のホスホクトラーゼ酵素は、本明細書で開示されるような任意のホスホクトラーゼ酵素である。

【0384】

例示的な宿主細胞修飾

クエン酸シンターゼ経路

クエン酸シンターゼは、オキサロ酢酸とアセチルCoAの縮合を触媒して、トリカルボン酸 (TCA) 回路の代謝産物である、クエン酸を形成する (Ner, S. et al. 1983. *Biochemistry*, 22:5243-5249; Bhayana, V. and Duckworth, H. 1984. *Biochemistry* 23:2900-2905)。大腸菌 (*E. coli*) 内では、*glutA*によってコードされるこの酵素は、二量体サブユニットの三量体のように挙動する。六量体形態は、酵素が、NADHによってアロステリックに調節され得るようにする。この酵素は、幅広く試験されている (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な阻害を回避するために、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) NADH非感受性クエン酸シンターゼによる置換またはその添加が考察された (Underwood et al. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1071-1081; Sanchez et al. 2005. *Met. Eng.* 7:229-239)。

【0385】

どちらも基質としてアセチルCoAを有するために、クエン酸シンターゼによって触媒

される反応は、メバロン酸経路の最初のステップを触媒するチオラーゼと直接競合する（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発現を調節して（例えば、酵素活性を低下させる）、より多くの炭素をメバロン酸経路に流動させ得て、それによってメバロン酸、イソプレノおよびイソプレノイドの最終生成量を増大させる。クエン酸シンターゼ活性の低下は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の低下であり得る。場合によっては、酵素活性の低下は、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%または100%低下する。いくつかの態様では、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活性を低下させることで調節される。これは、NADH非感受性クエン酸シンターゼをコードする導入遺伝子による、内在性クエン酸シンターゼ遺伝子の染色体置換によって、またはバチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）に由来する、NADH非感受性クエン酸シンターゼをコードする導入遺伝子を使用することで、達成し得る。クエン酸シンターゼの活性はまた、合成構成的低発現性プロモーターによって内在性クエン酸シンターゼ遺伝子プロモーターを置換することで、調節し得る（例えば、低下させる）。クエン酸シンターゼをコードする遺伝子はまた、欠失し得る。クエン酸シンターゼの活性の低下は、クエン酸シンターゼの発現低下を有しない細胞と比較して、メバロン酸依存性生合成経路へのより多量の炭素流をもたらし得る。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホクトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現された核酸を含んでなり、クエン酸シンターゼ（*gltA*）の活性を低下させるようにさらに改変された、組換え細胞である。クエン酸シンターゼイソ酵素の活性調節（例えば、低下）もまた、本明細書で検討される。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホクトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現された核酸を含んでなり、クエン酸シンターゼイソ酵素の活性を低下させるようにさらに改変された、組換え細胞である。

【0386】

ホスホトランスアセチラーゼおよび／または酢酸キナーゼが関与する経路

ホスホトランスアセチラーゼ（（i）*pta*（Shimizu et al. 1969, *Biochim. Biophys. Acta* 191: 550-558 または（ii）*eutD*（Bologna et al. 2010, *J. of Microbiology*. 48: 629-636）によって大腸菌（*E. coli*）内でコードされるが、アセチルCoAとアセチルリン酸（アセチル-P）の間の可逆的変換を触媒するのに対し、酢酸キナーゼ（*ackA*によって大腸菌（*E. coli*）内でコードされる）（Kakuda, H. et al. 1994, *J. Biochem.* 11: 916-922）は、アセチル-Pを使用して酢酸を形成する。これらの遺伝子は、大腸菌（*E. coli*）内でオペロンとして転写され得る。これらは一緒に、ATPの放出と共に、酢酸の異化を触媒する。したがって、ホスホトランスアセチラーゼの活性を高めることで、アセチルCoAに向かうアセチル-Pの量を増大させることが可能である。特定の実施形態では、強化は、上方制御されたプロモーターを染色体中の遺伝子上流に配置させることで、または遺伝子のコピーをプラスミド上の適切なプロモーターの後に配置させることで、達成される。酢酸に向かうアセチルCoAの量を低下させるために、酢酸キナーゼ遺伝子（例えば、内在性酢酸キナーゼ遺伝子）の活性を低下させまたは弱め得る。特定の実施形態では、減衰は、酢酸キナーゼ（*ackA*）を欠失させることで達成される。これはクロラムフェニコールカセットによって遺伝子を置換し、それに続いてカセットをループアウトすることで実施される。いくつかの態様では、酢酸キナーゼの活性は、内在性酢酸キナーゼの活性を低下させることで調節される。これは合成構成的低発現性プロモーターによって、内在性酢酸キナーゼ遺伝子プロモーターを置換することで、達成し得る。特定の実施形態では

、酢酸処理を施したキナーゼ遺伝子の弱力化は、ホスホトランスアセチラーゼ（*pta*）遺伝子の発現を妨害することで、実施されるべきである。酢酸は、様々な理由で大腸菌（*E. coli*）によって産生される（Wolfe, A. 2005. Microb. Mol. Biol. Rev. 69:12-50）。理論により拘束されることなく、*ackA*の欠失は、（*ackA*はアセチルCoAを利用するので）酢酸生成に転用される炭素量の低下をもたらして、したがってメバロン酸、イソプレノイド前駆体、イソプレンおよび／またはイソプレノイドを増大させる。

【0387】

いくつかの態様では、本明細書に記載される組換え細胞は、弱力化された内在性酢酸キナーゼ遺伝子発現、または増大されたホスホトランスアセチラーゼを有しない細胞と比較して、低下した量の酢酸を産生する。生成する酢酸の量の低下は、当業者に知られている既知の日常的アッセイによって測定し得る。酢酸の量は、内在性酢酸キナーゼ遺伝子発現またはホスホトランスアセチラーゼ遺伝子発現に分子操作が実施され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%、または99%低下する。

【0388】

ホスホトランスアセチラーゼ（*pta*および／または*eutD*）の活性は、酵素のその他の分子操作によって増大させ得る。酵素活性の増大は、操作が実施されなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の増大であり得る。場合によっては、酵素活性増大は少なくとも約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%、または99%増大する。一実施形態では、*pta*の活性は、染色体上のプロモーターおよび／または*rbs*を改変することで、またはそれをプラスミドから発現させることで増大される。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトララーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現された核酸を含んでなり、ホスホトランスアセチラーゼ（*pta*および／または*eutD*）の活性を増大させるようにさらに改変された、組換え細胞である。ホスホトランスアセチラーゼイソ酵素の活性調節（例えば、増大）もまた、本明細書で検討される。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトララーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現された核酸を含んでなり、ホスホトランスアセチラーゼ（*pta*および／または*eutD*）イソ酵素の活性を増大させるようにさらに改変された、組換え細胞である。

【0389】

酢酸キナーゼ（*ackA*）の活性はまた、酵素のその他の分子操作によって低下させ得る。酵素活性の低下は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の低下であり得る。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%、または99%低下する。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトララーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現された核酸を含んでなり、酢酸キナーゼ（*ackA*）の活性を低下させるようにさらに改変された、組換え細胞である。酢酸キナーゼイソ酵素の活性調節（例えば、低下）もまた、本明細書で検討される。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトララーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現された核酸を含んでなり、酢酸キナーゼイソ酵素の活性を低下させるようにさらに改変された、組換え細胞である。

10

20

30

40

50

【0390】

場合によっては、内在性酢酸キナーゼ遺伝子の活性の弱力化は、弱力化された内在性酢酸遺伝子発現を有しない細胞と比較して、メバロン酸依存性生合成経路へのより多くの炭素流をもたらす。

【0391】

乳酸デヒドロゲナーゼが関与する経路

大腸菌 (*E. coli*) 内では、D乳酸は、酵素乳酸デヒドロゲナーゼ (*ldhA*によってコードされる — 図1) を通じて、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 $NADH$ の酸化を伴い、したがって酸素が制限されており、全ての還元当量に対応し得ない場合に、乳酸が生成する。したがって、乳酸の生成は、炭素消費の原因になり得る。したがって、メバロン酸生成 (および所望ならば、イソプレン、イソプレノイド前駆体、およびイソプレノイド生成) への炭素流動を改善するために、当業者は、酵素の活性を低下させることなどによって、乳酸デヒドロゲナーゼの活性を調節し得る。

【0392】

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の弱力化によって調節し得る。このような弱力化は、内在性乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の欠失によって達成され得る。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弱力化するその他の方法もまた、使用してもよい。乳酸デヒドロゲナーゼが関与する経路を操作することで、組換え細胞は、弱力化された内在性乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子発現を有しない細胞と比較して、低下した量の乳酸を産生する。生成する乳酸量の低下は、当業者に知られている既知の日常的アッセイによって測定し得る。乳酸の量は、分子操作が実施され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%、または99%低下する。

【0393】

乳酸デヒドロゲナーゼの活性はまた、酵素のその他の分子操作によって低下させ得る。酵素活性の低下は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の低下であり得る。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%、または99%低下する。

【0394】

したがって、場合によっては、内在性乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の活性の弱力化は、弱力化された内在性乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子発現を有しない細胞と比較して、メバロン酸依存性生合成経路へのより多くの炭素流をもたらす。

【0395】

グリセルアルデヒド3-リン酸が関与する経路

グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*gapA* および/または *gapB*) は、グリセルアルデヒド3-リン酸の1, 3-ビスホスホ-D-グリセリン酸塩への変換を触媒する、解糖の重要な酵素である (Branlant G. and Branlant C. 1985. *Eur. J. Biochem.* 150:61-66)。

【0396】

ホスホケトラゼ酵素に向けて炭素を誘導するために、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ発現を調節して (例えば、酵素活性を低下させて)、フルクトース6-リン酸およびキシルロース5-リン酸に向けてより多くの炭素が流動するようにし得て、それによってメバロン酸、イソプレンおよびイソプレノイドの最終生成量を増大させる。グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性の低下は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の低下であり得る。場合によって

は、酵素活性の低下は、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%低下する。または100%。いくつかの態様では、内在性グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼの活性を低下させることで、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼの活性が調節される。これは構成的低発現性プロモーターによって、内在性グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーターを置換することで、達成し得る。グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子はまた、欠失し得る。グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子はまた、同一反応を触媒するが、NADPHでなくNADHを生じる、バチルス属 (*Bacillus*) 酵素によって置換され得る。グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼの活性の低下は、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼの発現低下を有しない細胞と比較して、メバロン酸依存性生合成経路へのより多くの炭素流をもたらし得る。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の発現された核酸を含んでなり、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (gapAおよび/またはgapB) の活性を低下させるようにさらに改変された、組換え細胞である。グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼイソ酵素の活性調節 (例えば、低下) もまた、本明細書で検討される。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現された核酸を含んでなり、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (gapAおよび/またはgapB) イソ酵素の活性を低下させるようにさらに改変された、組換え細胞である。

10

20

【0397】

エントナー・ドウドロフ経路が関与する経路

エントナー・ドウドロフ (ED) 経路は、エンデン・メイヤーホフ・パルナス (EMP-解糖) 経路の代替物である。大腸菌 (*E. coli*) のようないくつかの生物がEDおよびEMP経路の双方を持つ一方で、その他の生物はそのどちらか一方のみを有する。バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) がEMP経路のみを有するのに対し、ザイモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) はED経路のみを有する (Peekhaus and Conway, 1998, J. Bact. 180:3495-3502; Stulke and Hillen, 2000, Annu. Rev. Microbiol. 54, 849-880; Dawes et al., 1966, Biochem. J. 98:795-803)。フルクトース二リン酸アルドラーゼ (fba、fbaA、fbaB、および/またはfbaC) は、エントナー・ドウドロフ経路と相互作用して、フルクトース-1, 6-二リン酸からジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) およびグリセルアルデヒド3-リン酸 (GAP) への変換を可逆的に触媒する (Baldwin S. A., et al., Biochem J. (1978) 169 (3): 633-41)。

30

【0398】

ホスホグルコン酸デヒドラターゼ (edd) が、6-ホスホ-D-グルコン酸塩から1分子のH₂Oを除去して、2-デヒドロ-3-デオキシ-D-グルコン酸塩6-リン酸を形成するのに対し、2-ケト-3-デオキシグルコン酸6-リン酸アルドラーゼ (eda) は、アルドール切断を触媒する (Egan et al., 1992, J. Bact. 174:4638-4646)。2つの遺伝子は、オペロン中にある。

40

【0399】

ホスホケトラーゼ経路に向けられ得る代謝産物はまた、ED経路にも転用され得る。代謝産物が、ED経路に失われるのを回避するために、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) および/または2-ケト-3-デオキシグルコン酸6-リン酸アルドラーゼ遺伝子 (例えば、内在性2-ケト-3

50

ーデオキシグルコン酸 6ーリン酸アルドラーゼ遺伝子) 活性が弱力化される。弱力化を達成する一方法は、ホスホグルコン酸デヒドラターゼ (edd) および／または 2ーケトー3ーデオキシグルコン酸 6ーリン酸アルドラーゼ (eda) を欠失させることである。これはクロラムフェニコールまたはカナマイシンカセットによって片方または双方の遺伝子を置換し、それに続いてカセットをループアウトすることで達成し得る。これらの酵素機能がなければ、より多くの炭素がホスホケトラーゼ酵素に流動し得て、したがってメバロン酸、イソプレンまたはイソプレノイドの収率を増大させる。

【0400】

ホスホグルコン酸デヒドラターゼ (edd) および／または 2ーケトー3ーデオキシグルコン酸 6ーリン酸アルドラーゼ (eda) の活性はまた、酵素のその他の分子操作によって低下させ得る。酵素活性の低下は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の低下であり得る。場合によっては、酵素活性の低下は、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 %、または 99 % 低下される。

【0401】

場合によっては、内在性ホスホグルコン酸デヒドラターゼ遺伝子および／または内在性 2ーケトー3ーデオキシグルコン酸 6ーリン酸アルドラーゼ遺伝子の活性の弱力化は、弱力化された内在性ホスホグルコン酸デヒドラターゼ遺伝子および／または内在性酢酸キナーゼー2ーケトー3ーデオキシグルコン酸 6ーリン酸アルドラーゼ遺伝子発現を有しない細胞と比較して、メバロン酸依存性生合成経路へのより多くの炭素流をもたらす。

【0402】

ホスホケトラーゼ経路に向けられ得る代謝産物はまた、ED経路またはEMP経路にも転用され得る。代謝産物の欠損を回避して、フルクトースー6ーリン酸 (F6P) 濃度を増大させるために、フルクトース二リン酸アルドラーゼ (例えば、内在性フルクトース二リン酸アルドラーゼ) 活性が弱力化される。場合によっては、内在性フルクトース二リン酸アルドラーゼ (fba、fbaA、fbaB、および／または fbaC) 遺伝子の活性の弱力化は、弱力化された内在性フルクトース二リン酸アルドラーゼ (fba、fbaA、fbaB、および／または fbaC) 遺伝子発現を有しない細胞と比較して、メバロン酸依存性生合成経路へのより多くの炭素流をもたらす。いくつかの態様では、弱力化は、フルクトース二リン酸アルドラーゼ (fba、fbaA、fbaB、および／または fbaC) を欠失させることで達成される。欠失は、クロラムフェニコールまたはカナマイシンカセットによって遺伝子を置換し、それに続いてカセットをループアウトすることで達成し得る。いくつかの態様では、フルクトース二リン酸アルドラーゼの活性は、内在性フルクトース二リン酸アルドラーゼの活性を低下させることで調節される。これは合成構成的低発現性プロモーターによって、内在性フルクトース二リン酸アルドラーゼ遺伝子プロモーターを置換することで、達成し得る。これらの酵素機能がなければ、より多くの炭素がホスホケトラーゼ酵素に流動し得て、したがって、メバロン酸、イソプレン、またはイソプレノイドの収率を増大させる。フルクトース二リン酸アルドラーゼの活性はまた、酵素のその他の分子操作によって低下させ得る。酵素活性の低下は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の低下であり得る。場合によっては、酵素活性の低下は、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 %、または 99 % 低下される。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトラーゼポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の異種性に発現された核酸を含んでなり、フルクトース二リン酸アルドラーゼ (fba、fbaA、fbaB、および／または fbaC) の活性を低下させるようにさらに改変された、組換え細胞である。フルクトース二リン酸アルドラーゼイソ酵

10

20

30

40

50

素の活性調節（例えば、低下）もまた、本明細書で検討される。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトラゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現された核酸を含んでなり、フルクトース二リン酸アルドラーゼイソ酵素の活性を低下させるようにさらに改変された、組換え細胞である。

【0403】

ペントースリン酸経路の酸化分岐が関与する経路

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とペントースを分解し、細胞様々な同化経路のための中間体を提供する。それはまた、NADPHの主な産生者でもある。ペントースリン酸経路は、酸化分岐（グルコース6-リン酸-1-デヒドロゲナーゼ（*zwf*）、6-ホスホグルコノラクトナーゼ（*pgl*）または6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ（*gnd*）のような酵素がある）、および非酸化分岐（トランスケトラゼ（*tktA*および／または*tktB*）、トランスアルドラーゼ（*talA*または*talB*）、リブローズ-5-リン酸-エピメラーゼおよび（または）リボース-5-リン酸エピメラーゼ、リボース-5-リン酸イソメラーゼ（*rpiA*および／または*rpiB*）および／またはリブローズ-5-リン酸-3-エピメラーゼ（*rpe*）などの酵素がある）から構成される（*Sprenger, 1995, Arch. Microbiol. 164: 324-330*）。

【0404】

ホスホケトラゼ酵素に向けて炭素を誘導するために、ペントースリン酸経路の非酸化分岐（トランスケトラゼ、トランスアルドラーゼ、リブローズ-5-リン酸-エピメラーゼおよび（または）リボース-5-リン酸エピメラーゼ、リボース-5-リン酸イソメラーゼA、リボース-5-リン酸イソメラーゼB、および／またはリブローズ-5-リン酸-3-エピメラーゼ）の発現を調節し（例えば、酵素活性を増大させ）、フルクトース6-リン酸およびキシルロース5-リン酸に向けてより多くの炭素が流動するようにし得て、それによって、メバロン酸、イソプレンおよびイソプレノイドの最終生成量を増大させる。トランスケトラゼ、トランスアルドラーゼ、リブローズ-5-リン酸-エピメラーゼおよび（または）リボース-5-リン酸エピメラーゼ活性の増大は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の増大であり得る。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%、99%、または100%増大する。いくつかの態様では、トランスケトラゼ、トランスアルドラーゼ、リブローズ-5-リン酸-エピメラーゼおよび（または）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ゼ、トランスアルドラーゼ、リブローズ-5-リン酸-エピメラーゼ、および（または）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で、調節される。これは合成構成的高発現性プロモーターによって、内在性トランスケトラゼ、トランスアルドラーゼ、リブローズ-5-リン酸-エピメラーゼおよび（または）リボース-5-リン酸エピメラーゼ遺伝子プロモーターを置換することで達成し得る。トランスケトラゼ、トランスアルドラーゼ、リブローズ-5-リン酸-エピメラーゼおよび（または）リボース-5-リン酸エピメラーゼをコードする遺伝子はまた、適切なプロモーターの後のプラスミド上にクローン化し得る。トランスケトラゼ、トランスアルドラーゼ、リブローズ-5-リン酸-エピメラーゼおよび（または）リボース-5-リン酸エピメラーゼの活性の増大は、トランスケトラゼ、トランスアルドラーゼ、リブローズ-5-リン酸-エピメラーゼおよび（または）リボース-5-リン酸エピメラーゼの発現増大を有しない細胞と比較して、メバロン酸依存性生合成経路へのより多くの炭素流をもたらし得る。

【0405】

本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトラゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸を含ん

10

20

30

40

50

でなり、トランスケトラーゼ（t k t Aおよび／またはt k t B）の活性が増大するようにさらに操作された、組換え細胞である。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、トランスケトラーゼ（t k t Aおよび／またはt k t B）の活性が低下するようにさらに操作された、組換え細胞である。任意の本発明の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、10
トランスアルドラーゼ（t a l Aまたはt a l B）の活性が増大するようにさらに操作された、組換え細胞である。任意の本発明の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、リボースー5ーリン酸イソメラーゼ（r p i Aおよび／またはr p i B）の活性が増大するようにさらに操作された、組換え細胞である。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、リブローースー5ーリン酸ー3ーエピメラーゼ（r p e）の活性が増大するようにさらに操作された、組換え細胞である。グルコースー6ーリン酸ー1ーデヒドロゲナーゼ（z w f）、6ーホスホグルコノラクトナーゼ（p g l）、6ーホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ（g n d）、トランスケトラーゼ（t k t Aおよび／またはt k t B）、トランスアルドラーゼ（t a l Aまたはt a l B）、リブローースー5ーリン酸ーエピメラーゼ、リボースー5ーリン酸エピメラーゼ、リボースー5ーリン酸イソメラーゼ（r p i Aおよび／またはr p i B）および／またはリブローースー5ーリン酸ー3ーエピメラーゼ（r p e）イソ酵素の活性調節（例えば、低下または増大）もまた、本明細書で検討される。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、グルコースー6ーリン酸ー1ーデヒドロゲナーゼ（z w f）イソ酵素の活性が増大するようにさらに操作された、組換え細胞である。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、トランスケトラーゼ（t k t Aおよび／またはt k t B）イソ酵素の活性が低下するようにさらに操作された、組換え細胞である。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、トランスアルドラーゼ（t a l Aまたはt a l B）イソ酵素の活性が増大するようにさらに操作された、組換え細胞である。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、リボースー5ーリン酸イソメラーゼ（r p i Aおよび／またはr p i B）イソ酵素の活性が増大するようにさらに操作された、組換え細胞である。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、リブローースー5ーリン酸ー3ーエピメラーゼ（r p e）イソ酵素の活性が増大するようにさらに操作された、組換え細胞である。40

【0406】

ホスホケトラーゼ酵素に向けて炭素を誘導するために、グルコースー6ーリン酸ー1ーデヒドロゲナーゼを調節し得る（例えば、酵素活性を低下させる）。いくつかの態様では、グルコースー6ーリン酸ー1ーデヒドロゲナーゼ（z w f）（例えば、内在性グルコースー6ーリン酸ー1ーデヒドロゲナーゼ遺伝子）の活性は、低下または弱力化し得る。特定の実施形態では、グルコースー6ーリン酸ー1ーデヒドロゲナーゼを欠失させることで50

、弱力化が達成される。いくつかの態様では、グルコースー6ーリン酸ー1ーデヒドロゲナーゼの活性は、内在性グルコースー6ーリン酸ー1ーデヒドロゲナーゼの活性を低下させることで調節される。これは構成的低発現性プロモーターによって、内在性グルコースー6ーリン酸ー1ーデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーターを置換することで、達成し得る。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホクトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、グルコースー6ーリン酸ー1ーデヒドロゲナーゼ（zwf）の活性が低下するようにさらに操作された、組換え細胞である。グルコースー6ーリン酸ー1ーデヒドロゲナーゼイソ酵素の活性調節（例えば、低下）もまた、本明細書で検討される。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホクトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、グルコースー6ーリン酸ー1ーデヒドロゲナーゼイソ酵素の活性が低下するようにさらに操作された、組換え細胞である。

10

【0407】

ホスホフルクトキナーゼが関与する経路

ホスホフルクトキナーゼは、フルクトースー6ーリン酸のリン酸化を触媒する、解糖の重要な酵素である。大腸菌（*E. coli*）は、pfkAおよびpfkBによってコードされる2つのイソ酵素を有する。細胞内のホスホフルクトキナーゼ活性の大部分は、pfkAに起因する（Kotlarz et al. 1975 Biochim. Biophys. Acta 381:257-268）。

20

【0408】

ホスホクトラーゼ酵素に向けて炭素を誘導するために、ホスホフルクトキナーゼ発現を調節して（例えば、酵素活性を低下させて）、フルクトースー6ーリン酸およびキシルロースー5ーリン酸に向けてより多くの炭素が流動するようにし得て、それによってメバロン酸、イソプレネン、およびイソプレノイドの最終生産量を増大させる。ホスホフルクトキナーゼ活性の低下は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の低下であり得る。場合によっては、酵素活性の低下は、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%低下される。または100%。いくつかの態様では、ホスホフルクトキナーゼの活性は、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で調節される。これは合成構成的低発現性プロモーターによって、内在性ホスホフルクトキナーゼ遺伝子プロモーターを置換することで、達成し得る。ホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子はまた、欠失し得る。ホスホフルクトキナーゼの活性の低下は、ホスホフルクトキナーゼの発現低下を有しない細胞と比較して、メバロン酸依存性生合成経路へのより多量の炭素流をもたらし得る。

30

【0409】

本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホクトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、フルクトースー6ーリン酸（fructose 6-phosphate）（pfkAおよび／またはpfkB）の活性が低下するようにさらに操作された、組換え細胞である。フルクトースー6ーリン酸イソ酵素の活性調節（例えば低下）もまた、本明細書で検討される。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホクトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、フルクトースー6ーリン酸イソ酵素の活性が低下するようにさらに操作された、組換え細胞である。

40

【0410】

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体が関与する経路

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体は、ピルビン酸からアセチルCoAへの脱炭酸を触媒し、遺伝子aceE、aceF、およびlpdAによってコードされるタンパク質から

50

構成される。これらの遺伝子の転写は、いくつかの調節因子によって調節される。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することで、アセチルC o Aを増大させ得る。変化は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性および／または発現の増大（例えば、持続的発現）であり得る。これは、例えば、P L. 6 (a a t t c a t a t 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 - λ プロモーター、Genbank NC_001416、配列番号14) のような強力な構成的プロモーターを、オペロンの前に配置させる、または1つまたは複数の合成構成的発現プロモーターを使用するなどの異なる方法によって、達成され得る。

10

【0411】

したがって、一態様では、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性は、(a) ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (E1)、(b) ジヒドロリポイルトランスアセチラーゼ、および(c) ジヒドロリポイルデヒドロゲナーゼからなるピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の1つまたは複数の酵素の活性を増大させることで、調節される。ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性増大のために、これらの酵素をコードする遺伝子の任意の1、2または3つを操作し得るものと理解される。別の態様では、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リプレッサーの活性の弱力化によって調節し得る、詳細は下述される。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の欠失によって弱力化し得る。

20

【0412】

場合によっては、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体をコードする1つまたは複数の遺伝子は、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大させる別の方法は、細胞に、(a) ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (E1)、(b) ジヒドロリポイルトランスアセチラーゼ、および(c) ジヒドロリポイルデヒドロゲナーゼからなる群からの1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を導入することである。

【0413】

これらの方法のいずれかを使用することで、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性が調節されていない細胞と比較して、組換え細胞は、増大した量のアセチルC o Aを生じ得る。ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性を調節することは、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの発現調節を有しない細胞と比較して、メバロン酸依存性生合成経路へのより多くの炭素流をもたらし得る。

30

【0414】

ホスホトランスフェラーゼ系が関与する経路

ホスホエノールピルビン酸依存性ホスホトランスフェラーゼシステム (P T S) は、解糖作用中間体ホスホエノールピルビン酸 (P E P) によって提供されるエネルギーに依存するプロセス中で、その炭水化物基質を膜を越えて輸送し、同時にリン酸化する多要素システムである。P T Sを調節する遺伝子は、大部分がオペロン中でクラスター化する。例えば、大腸菌 (*E s c h e r i c h i a c o l i*) の p t s オペロン (p t s H I c r r) は、ホスホエノールピルビン酸依存性ホスホトランスフェラーゼ系 (P T S) の中核を成す3つのタンパク質、H P r (p t s H)、酵素 I (p t s I)、および E I I I G l c (c r r) タンパク質をコードする、p t s H、p t s I、および c r r 遺伝子から構成される。これらの3つの遺伝子は複合オペロンに編成され、その中では、遠位遺伝子 c r r の発現の大部分が、p t s I 内のプロモーター領域から開始される。p t s オペロンの遺伝子に加えて、p t s G は、ホスホトランスフェラーゼ系のグルコース特異的輸送体、p t s G をコードする。このプロモーター領域からの転写は、異化産物活性化タンパク質 (C A P) - 環状 A M P (c A M P) の正の制御下にあり、グルコース (P T S 基質) の存在下における増殖中に増大される。さらに p p s A 遺伝子は、ホスホトランスフェ

40

50

ラーゼシステム (P T S) の活性に必要なホスホエノールピルビン酸 (P E P) を生成するための、ホスホエノールピルビン酸シンセターゼをコードする。炭素流は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ経路または P T S 経路を通じて、ホスホエノールピルビン酸シンセターゼによって誘導される。その内容全体を参照によって本明細書に援用する、Postma, P. W., et al., Microbiol Rev. (1993), 57 (3): 543-94) を参照されたい。

【0415】

本明細書に記載される特定の実施形態では、オペロンの下方制御 (例えば弱力化) は、宿主細胞による酢酸利用を高め得る。P T S オペロンの下方制御は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の低下であり得る。場合によっては、複合体の活性低下は、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 %、または 99 % 低下される。特定の実施形態では、弱力化は、p t s オペロンを欠失させることで達成される。いくつかの態様では、P T S 系の活性は、内在性 p t s オペロンの活性を低下させることで調節される。これは構成的低発現性プロモーターによって、p t s オペロン中の内在性プロモーターを置換することで達成し得る。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホクトラーゼポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、p t s オペロンの活性が低下するようにさらに操作された、組換え細胞である。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホクトラーゼポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、E I (p t s I) の活性が低下するようにさらに操作された、組換え細胞である。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホクトラーゼポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、E I I C B^{G1c} (p t s G) の活性が低下するようにさらに操作された、組換え細胞である。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホクトラーゼポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、E I I A^{G1c} (c r r) の活性が低下するようにさらに操作された、組換え細胞である。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホクトラーゼポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、H P r (p t s H) の活性が低下するようにさらに操作された、組換え細胞である。グルコース取り込みのための P E P プールを増大させながら、ピルビン酸デヒドロゲナーゼを通じて失われる炭素を低下させるために、ホスホエノールピルビン酸シンセターゼ (p p s A) の活性を増大させ得る。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホクトラーゼポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、ホスホエノールピルビン酸シンセターゼ (p p s A) の活性が増大するようにさらに操作された、組換え細胞である。本発明の任意のさらなる態様では、P T S は下方制御され、グルコース輸送経路は上方制御される。グルコース輸送経路としては、ガラクトース (g a l P) およびグルコキナーゼ (g l k) が挙げられるが、これに限定されるものではない。いくつかの実施形態では、p t s オペロンは下方制御され、ガラクトース (g a l P) 遺伝子は上方制御され、グルコキナーゼ (g l k) 遺伝子は上方制御される。P T S のイソ酵素の活性調節 (例えば低下) もまた、本明細書で検討される。本発明の任意の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるようなホスホクトラーゼポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の異種性に発現した核酸を含んでなり、P T S イソ酵素の活性が低下するようにさらに操作された、組換え細胞である。

【0416】

キシロース利用が関与する経路

本明細書に記載される特定の実施形態では、植物バイオマスに由来する糖を、メバロン

10

20

30

40

50

酸など、イソプレノイド前駆体、イソプレンおよび／またはイソプレノイドなどの所望の生成物に変換するのに、キシロースの利用が望ましい。生物によっては、キシロース利用は、代謝のためのフルクトースー6ーリン酸への変換のために、ペントースリン酸経路の利用を必要とする。生物は、グルコースによる異化代謝産物抑制の不活性化、またはその他の生物に見られるキシロースオペロンからの遺伝子の異種性発現のどちらかによる、キシロース利用向上のために、操作し得る。キシロース経路は、ホスホケトラーゼ経路によるメバロン酸、イソプレノイド前駆体、イソプレンおよび／またはイソプレノイドの生産を高めるように、下述されるように操作し得る。

【0417】

キシロース取り込みの強化、そしてキシロースー5ーリン酸への変換と、それに続くホスホケトラーゼ経路への直接流入は、有利である。理論により拘束されることなく、これは炭素流が、ペントースリン酸経路をバイパスできるようにする（が、必要に応じて、いくつかのグリセルアルデヒドー3ーリン酸がPPP中に循環されてもよい）。キシロキナーゼの発現向上を利用して、キシロースー5ーリン酸の総生産量を増大させ得る。キシロキナーゼの発現および活性の最適化を利用して、ホスホケトラーゼ経路のある株中でキシロース利用を高め得る。所望のキシロキナーゼは、宿主の内在性酵素、または宿主に適合性の任意の異種キシロキナーゼのどちらであってもよい。一実施形態では、キシロースオペロンのその他の構成要素（例えば、キシロースイソメラーゼ）を過剰発現させて、便益を増大させ得る。別の実施形態では、その他のキシロース経路酵素（例えば、キシロース還元酵素）を弱力化する（例えば、活性低下または欠失）必要があるかもしれない。

【0418】

したがって本明細書に記載されるようなホスホケトラーゼ酵素を有するように操作された宿主細胞は、内在性形態または異種形態のどちらかのキシロースイソメラーゼおよび／またはキシロキナーゼを過剰発現して、メバロナート、イソプレノイド前駆体、イソプレンおよび／またはイソプレノイドの全収率および生産性が改善するようにさらに操作し得る。

【0419】

ペントースリン酸経路のトランスアルドラーゼおよびトランスケトラーゼ酵素が関与する経路

嫌気性またはヘテロ発酵性増殖できるいくつかの微生物は、解糖経路の代わりに、またはそれに加えて、ホスホケトラーゼ経路を組み入れている。この経路は、ペントースリン酸経路酵素である、トランスアルドラーゼおよびトランスケトラーゼの活性に依存する。したがって、本明細書に記載されるようなホスホケトラーゼ酵素を有するように操作された宿主細胞は、内在性形態または異種形態のどちらかのトランスケトラーゼおよびトランスアルドラーゼを過剰発現して、経路流束を改善し、潜在的に毒性の中間体レベルを低下させ、中間体の非生産的経路への転用を低下させ、メバロナート、イソプレノイド前駆体、イソプレンおよび／またはイソプレノイドの全収率および生産性が改善するように、さらに操作し得る。

【0420】

変異の組み合わせ

本明細書に記載される酵素および／または酵素経路のいずれかについて、本明細書に記載される酵素および／または酵素経路の（2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、もしくは14個の）任意の組み合わせを調節する分子操作が、明示的に検討されるものと理解される。組み合わせの列举を容易にするために、クエン酸シンターゼ（gltA）をAと表し、ホスホトランスアセチラーゼ（pta）をBと表し、酢酸キナーゼ（ackA）をCと表し、乳酸デヒドロゲナーゼ（ldhA）をDと表し、グリセルアルデヒド3ーリン酸デヒドロゲナーゼ（gap）をEと表し、およびピルビン酸デカルボキシラーゼ（aceE、aceF、および／またはlpdA）をFと表し、ホスホグルコン酸デヒドラターゼ（edd）をGと表し、2ーケトー3ーデオキシグルコン酸6ーリ

10

20

30

40

50

ン酸アルドラーゼ (eda) Hをと表し、ホスホフルクトキナーゼをIと表し、トランスアルドラーゼをJと表し、トランスケトラゼをKと表し、リブローースー5ーリン酸エピメラーゼをLと表し、リブローースー5ーリン酸エピメラーゼをMと表し、キシロキナーゼをNと表し、キシロースイソメラーゼをOと表し、およびキシリトール還元酵素をPと表し、リブローースー5ーリン酸イソメラーゼ (rpi) をQと表し、Dーリブローースー5ーリン酸ー3ーエピメラーゼ (rpe) をRと表し、ホスホエノールピルビン酸シンセターゼ (pps) をSと表し、フルクトース二リン酸アルドラーゼ (fba) をTと表し、E I (p t s I) をUと表し、E I I C B^{G 1 c} (p t s G) をVと表し、E I I A^{G 1 c} (c r r) をWと表し、H P r (p t s H) をXと表し、ガラクトース (gal P) をYと表し、グルコキナーゼ (glk) をZと表し、グルコースー6ーリン酸デヒドロゲナーゼ (zwf) をAAと表す。上で考察されるように、ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を増大させるために、ピルビン酸デカルボキシラーゼ複合体のace E、ace F、および／またはlpd A酵素を単独で、3酵素の内2つを、または3酵素の内3つを使用し得る。したがって、本明細書でAーMと称する任意のおよび全ての酵素組み合わせが明示的に検討され、AーAAと称する任意のおよび全ての酵素組み合わせについても同様である。さらに、上述の任意の組み合わせは、本明細書に記載される酵素および／または酵素経路のいずれか（例えば、ホスホケトラゼ、MV A経路ポリペプチド、イソプレニンターゼ、DX P経路ポリペプチド）と組み合わせて使用し得る。

10

【0421】

生成増大のためのその他の制御因子および要素

20

その他の分子操作を使用して、メバロン酸生成に向かう炭素流を増大させ得る。一方法は、メバロン酸経路に供給する経路に対する負の制御因子の効果を削減し、低下させまたは排除することである。例えば、場合によっては、遺伝子ace E Fーlpd Aはオペロン中にあり、4番目の遺伝子はpdh R上流にある。遺伝子pdh Rは、そのオペロンの転写の負の制御因子である。ピルビン酸不在下では、それはその標的プロモーターに結合して、転写を抑制する。それはまた、ndhおよびcyo A B C Dを同様に調節する (Ogasawara, H. et al. 2007. J. Bact. 189: 5534ー5541)。一態様では、pdh R制御因子の欠失は、ピルビン酸の供給を改善し得て、したがって、メバロン酸、イソプレノイド前駆体、イソプレニン、およびイソプレノイドの生成を改善する。

30

【0422】

別の実施形態では、結果として得られた上述の株のいずれかをさらに改変して、エントナー・ドウドロフ経路の活性を調節し得る。ホスホグルコン酸デヒドラターゼまたはアルドラーゼをコードする遺伝子は、弱力化または欠失させ得る。別の実施形態では、結果として生じる上述の株のいずれかもまた、酢酸キナーゼまたはクエン酸シンターゼの活性を低下させまたは除去するように改変してもよい。別の実施形態では、株のいずれか結果として生じる株はまた、ホスホフルクトキナーゼの活性を低下させまたは除去するように改変してもよい。別の実施形態では、上述の結果として生じる株のいずれかはまた、グリセルアルデヒドー3ーリン酸デヒドロゲナーゼの活性を調節するように改変してもよい。グリセルアルデヒドー3ーリン酸デヒドロゲナーゼの活性は、その活性を低下させることで調節し得る。別の実施形態では、トランスケトラゼ、トランスアルドラーゼ、リブローースー5ーリン酸エピメラーゼおよび（または）リブローースー5ーリン酸エピメラーゼなどの、ペントースリン酸経路の非酸化分岐からの酵素を過剰発現させ得る。

40

【0423】

その他の態様では、宿主細胞をさらに改変して、セドヘプツローースー1, 7ービスホスファターゼ／フルクトースー1, 6ー二リン酸アルドラーゼおよびセドヘプツローースー1, 7ービスホスファターゼ／フルクトースー1, 6ー二リン酸ホスファターゼをコードする異種核酸を導入することで、細胞内アセチルーリン酸濃度を増大させ得る。特定の実施形態では、これらの分子操作を有する宿主細胞は、弱力化されまたは欠失しているトランスアルドラーゼ (tal B) およびホスホフルクトキナーゼ (pfk Aおよび／またはp

50

f k B) 遺伝子と組み合わせ得て、それによってエリスロース 4-リン酸、ジヒドロキシアセトンリン酸、およびグリセルアルデヒド 3-リン酸のセドヘプツロース 7-リン酸およびフルクトース 1-リン酸へのより迅速な変換を可能にする (図 5 を参照)。

【0424】

その他の態様では、PGL が欠失している細胞 (様々な大腸菌 (*E. coli*) 株など) 内への 6-ホスホグルコノラクトナーゼ (PGL) の導入を使用して、メバロン酸、イソプレノイド前駆体、イソプレン、およびイソプレノイドの生成を改善し得る。PGL は、染色体への組み込みまたはプラスミドなどの染色体外媒介物を使用した、コード遺伝子導入によって、導入してもよい。

【0425】

本明細書に記載される様々な酵素経路を調節するための宿主細胞 (例えば、細菌宿主細胞) 変異は、メバロン酸生成に向けて炭素流を増大させるが、それに加えて、本明細書に記載される宿主細胞は、ホスホケトラーゼポリペプチド、ならびに mvaE および mvaS 遺伝子産物をはじめとするがこれに限定されない上流および下流 MVA 経路からのその他の酵素をコードする遺伝子を含んでなる。MVA 経路ポリペプチドの非限定的例としては、アセチル CoA アセチルトランスフェラーゼ (Ac-CoA チオラーゼ) ポリペプチド、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA シンターゼ (HMG-CoA シンターゼ) ポリペプチド、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA 還元酵素 (HMG-CoA 還元酵素) ポリペプチド、メバロン酸キナーゼ (MVK) ポリペプチド、ホスホメバロン酸キナーゼ (PMK) ポリペプチド、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (MVD) ポリペプチド、ホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (PMD) ポリペプチド、イソペンテニルリン酸キナーゼ (IPK) ポリペプチド、IDI ポリペプチド、および MVA 経路ポリペプチドの 2 つ以上の活性を有するポリペプチド (例えば、融合ポリペプチド) が挙げられる。MVA 経路ポリペプチドとしては、MVA 経路ポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。例示的な MVA 経路核酸としては、MVA 経路ポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的な MVA 経路ポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する、天然ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。

【0426】

使用し得る MVA 経路ポリペプチドの非限定的例は、国際公開第 2009/07667 号パンフレット; 国際公開第 2010/003007 号パンフレット、および国際公開第 2010/148150 号パンフレットに記載される。

【0427】

例示的な細胞培養液

本明細書の用法では、「最少培地」または「最少培地」という用語は、常時ではないが、通常、1 つまたは複数のアミノ酸 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個以上のアミノ酸) の存在がない、細胞増殖に可能な最少栄養素を含有する増殖培地を指す。最少培地は、典型的に、(1) 細菌増殖のための炭素源; (2) 細菌種および培養条件の間で変動し得る、様々な塩類; および (3) 水を含有する。下でより詳細に考察されるように、炭素源は、グルコースのような単糖類から、酵母抽出物などのその他のバイオマスのより複雑な加水分解物まで、顕著に変動し得る。塩類は、概してマグネシウム、窒素、リン、およびイオウなどの不可欠な構成要素を提供し、細胞がタンパク質と核酸を合成できるようにする。最少培地はまた、抗生物質などの選択的作用因子で補足して、特定のプラスミドの維持などについて選択し得る。例えば、微生物が、アンピシリンまたはテトラサイクリンなどの特定の抗生物質に耐性を示す場合、耐性を欠く細胞が増殖するのを妨ぐために、その抗生物質を培地に添加し得る。培地は、必要に応じてその他の化合物で補足して、特定のアミノ酸などの所望の生理学的または生化学的特性について選択し得る。

【0428】

任意の最少培地調合物を使用して、宿主細胞を培養し得る。例示的な最少培地調合物としては、例えば、M9最少培地およびTM3最少培地が挙げられる。1リットルのM9最少培地あたり、以下を含有する：(1) 200mlの無菌M9塩（1リットルあたり、64gの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、15gの KH_2PO_4 、2.5gの NaCl 、および5.0gの NH_4Cl ）；(2) 2mlの1M MgSO_4 （無菌）；(3) 20mlの20%（w/v）グルコース（またはその他の炭素源）；および(4) 100 μl の1M CaCl_2 （無菌）。1リットルのTM3最少培地あたり、以下を含有する：(1) 13.6gの K_2HPO_4 ；(2) 13.6gの KH_2PO_4 ；(3) 2gの $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；(4) 2gのクエン酸一水和物；(5) 0.3gのクエン酸第二鉄アンモニウム；(6) 3.2gの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ；(7) 0.2gの酵母抽出物；および(8) 1mlの1000 $\times$ 微量成分溶液；pHは約6.8に調節され、溶液は濾過滅菌される。1リットルの1000 $\times$ 微量成分あたり、以下を含有する：(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 ；および(8) 100mgの $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ；pHは約3.0に調節される。

10

【0429】

追加的な例示的な最少培地は、以下を含む：(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) クエン酸第二鉄アンモニウム $\text{NH}_4\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 、(5) 酵母抽出物（bio-springerからの）、(6) 1000 $\times$ 修正微量金属溶液、(7) 硫酸50% w/v、(8) foamblast 882（Emerald Performance Materials）、および(9) マクロ塩類溶液3.36ml。全ての構成要素を脱イオン H_2O に共に添加して溶解し、次に加熱滅菌する。室温への冷却に続いて、pHを水酸化アンモニウム（28%）で7.0に調節して、所定容積にする。滅菌およびpH調節後、ビタミン溶液およびスペクチノマイシンを添加する。

20

【0430】

宿主細胞は、任意の炭素源を使用して培養し得る。「炭素源」という用語は、宿主細胞または生物によって代謝されることができる、1つまたは複数の炭素含有する化合物を指す。例えば、宿主細胞を培養するのに使用される細胞培地としては、宿主細胞の生存率維持または増殖に適した任意の炭素源が挙げられる。いくつかの態様では、炭素源は、炭水化物（単糖、二糖類、オリゴ糖、または多糖類など）、または転化糖（例えば、酵素処理スクロースシロップ）である。

30

【0431】

いくつかの態様では、炭素源は、酵母抽出物、または酵母抽出物の1つまたは複数の構成要素を含む。いくつかの態様では、酵母抽出物の濃度は、0.1%（w/v）、0.09%（w/v）、0.08%（w/v）、0.07%（w/v）、0.06%（w/v）、0.05%（w/v）、0.04%（w/v）、0.03%（w/v）、0.02%（w/v）、または0.01%（w/v）の酵母抽出物である。いくつかの態様では、炭素源は、酵母抽出物（またはその1つまたは複数の構成要素）と、グルコースなどの別の炭素源との双方を含む。

40

【0432】

例示的な単糖類としては、グルコースおよびフルクトースが挙げられ；例示的なオリゴ糖としては、乳糖およびスクロースが挙げられ；および例示的な多糖類としては、デンプンおよびセルロースが挙げられる。例示的な炭水化物としては、C6糖（例えば、フルクトース、マンノース、ガラクトース、またはグルコース）およびC5糖（例えば、キシロースまたはアラビノース）が挙げられる。

【0433】

例示的な細胞培養条件

50

本発明の組換え細胞の維持および増殖に適した材料および方法は、例えば、実施例セクションで後述される。細菌培養の維持および増殖に適したその他の材料および方法もまた、技術分野で周知である。例示的な技術は、国際公開第2009/076676号パンフレット、米国特許出願公開第2009/0203102号明細書、国際公開第2010/003007号パンフレット、米国特許出願公開第2010/0048964号明細書、国際公開第2009/132220号パンフレット、米国特許出願公開第2010/0003716号明細書、Manual of Methods for General Bacteriology Gerhardt et al., 編), 米国微生物学会 (American Society for Microbiology), Washington, D. C. (1994)、またはBrock in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, 第2版(1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. にある。いくつかの態様では、細胞は、ホスホクトラーゼポリペプチド; ならびにmvaEおよびmvaS遺伝子産物をはじめとするがこれに限定されるものではない上流および下流MVA経路からのその他の酵素; 宿主細胞中に挿入された核酸によってコードされるイソプレニンターゼ、DXP経路(例えば、DXS)、IDI、またはPGLポリペプチドの発現ができるようにする条件下で、培地中で培養される。

【0434】

標準的細胞培養条件を使用して、細胞を培養し得る(例えば、国際公開第2004/033646号パンフレットと、その中で引用される参考文献を参照されたい)。いくつかの態様では、細胞は、適切な温度、ガス混合物、およびpH(約20°C~約37°C、約6%~約84%CO₂、およびpH約5~約9など)で、増殖され維持される。いくつかの態様では、細胞は、適切な細胞培地中で35°Cで増殖される。いくつかの態様では、発酵のためのpH範囲は、約pH5.0~約pH9.0(約pH6.0~約pH8.0または約6.5~約7.0など)である。細胞は、宿主細胞の要件に基づいて、好気性、無酸素性、または嫌気性条件下で増殖し得る。さらに、より特異的な細胞培養条件を使用して、細胞を培養し得る。例えば、いくつかの実施形態では、組換え細胞(大腸菌(E. coli)細胞など)は、低コピー数から中程度コピー数プラスミド中で、強力なプロモーターの制御下にある、ホスホクトラーゼポリペプチド; ならびにmvaEおよびmvaS遺伝子産物をはじめとするが、これに限定されるものではない上流からの酵素; L. グレイ (L. grayi)、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) および/またはE. ファエカリス(E. faecalis)からのmvaEおよびmvaSポリペプチドをコードする、1つまたは複数の異種核酸を含んでなり、34°Cで培養される。

【0435】

使用し得る標準的培養条件と、バッチ、流加、または連続発酵などの発酵様式は、国際公開第2009/076676号パンフレット、米国特許出願公開第2009/0203102号明細書、国際公開第2010/003007号パンフレット、米国特許出願公開第2010/0048964号明細書、国際公開第2009/132220号パンフレット、米国特許出願公開第2010/0003716号明細書に記載される。バッチおよび流加発酵は一般的で、当該技術分野で周知であり、例は、Brock, Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, 第2版(1989) Sinauer Associates, Inc. にある。

【0436】

いくつかの態様では、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」とは、添加されるグルコースの量が、細胞によって消費されるグルコース量の約105%以下(約100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、または10%など)であることを意味する。特定の態様では、培地に添加されるグルコースの量は、特定期間中に細胞によって消費されるグルコースの量と、ほぼ同じで

ある。いくつかの態様では、細胞増殖速度は、細胞培地中のグルコースの量が支持し得る速度で、細胞が増殖するように、グルコースの添加量を制限することで制御される。いくつかの態様では、グルコースは、細胞の培養時間中に蓄積されない。様々な態様において、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、または70時間以上培養される。様々な態様において、細胞は、細胞が培養される総時間の5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、95、または100%以上にわたって、グルコース制限条件下で培養される。いかなる特定の理論による拘束も意図されないが、グルコース制限条件は、細胞のより良好な制御を可能にすると考えられる。

【0437】

10

いくつかの態様では、組換え細胞は、バッチ培養中で増殖される。組換え細胞はまた、流加培養または連続培養中で増殖させ得る。さらに、組換え細胞は、上述の最少培地のいずれかをはじめとするが、これに限定されるものではない最少培地中で培養し得る。最少培地は、1.0% (w/v) 以下のグルコースまたは任意のその他の六炭糖で、さらに補足し得る。具体的には、最少培地は、1% (w/v)、0.9% (w/v)、0.8% (w/v)、0.7% (w/v)、0.6% (w/v)、0.5% (w/v)、0.4% (w/v)、0.3% (w/v)、0.2% (w/v)、または0.1% (w/v) のグルコースで補足し得る。さらに、最少培地は、0.1% (w/v) 以下の酵母抽出物で補足し得る。具体的には、最少培地は、0.1% (w/v)、0.09% (w/v)、0.08% (w/v)、0.07% (w/v)、0.06% (w/v)、0.05% (w/v)、0.04% (w/v)、0.03% (w/v)、0.02% (w/v)、または0.01% (w/v) のグルコースで補足し得る。代案としては、最少培地に、1% (w/v)、0.9% (w/v)、0.8% (w/v)、0.7% (w/v)、0.6% (w/v)、0.5% (w/v)、0.4% (w/v)、0.3% (w/v)、0.2% (w/v)、または0.1% (w/v) グルコースおよびwith 0.1% (w/v)、0.09% (w/v)、0.08% (w/v)、0.07% (w/v)、0.06% (w/v)、0.05% (w/v)、0.04% (w/v)、0.03% (w/v)、0.02% (w/v)、または0.01% (w/v) の酵母抽出物を添加し得る。

20

【0438】

例示的な精製法

30

いくつかの態様では、本明細書に記載される方法のいずれかは、生産された化合物を回収するステップをさらに含む。いくつかの態様では、本明細書に記載される方法のいずれかは、イソプレンを回収するステップをさらに含む。いくつかの態様では、イソプレンは、吸収ストリッピングによって回収される（例えば、米国特許公開第2011/0178261号明細書を参照されたい）。いくつかの態様では、本明細書に記載される方法のいずれかは、異種ポリペプチドを回収するステップをさらに含む。いくつかの態様では、本明細書に記載される方法のいずれかは、テルペノイドまたはカロテノイドを回収するステップをさらに含む。

【0439】

適切な精製法は、米国特許出願公開第2010/0196977A1号明細書に、より詳細に記載される。

40

【0440】

本明細書全体を通じて、様々な特許、特許出願およびその他の各種文献（例えば学術誌論文）に言及する。本明細書で引用される全ての特許、特許出願、および文献の開示は、あらゆる目的のために、その内容全体を参照によって本明細書に援用する。

【0441】

本発明は、例証として提供され制限を意図するものではない、以下の実施例を参照してさらに理解される得る。

【実施例】**【0442】**

50

実施例 1：ホスホクトラーゼの同定

組換え細胞内における、アセチル補酵素 A 由来（アセチル CoA 由来）代謝産物、イソプレノ、イソプレノイド前駆体、およびイソプレノイドの改善された生産のために使用し得るホスホクトラーゼを同定するために、NCBI ウェブサイトにある CDART プログラムを使用して、既知のホスホクトラーゼ領域構造に一致する全ての遺伝子産物を選択した。（Geer L et al. (2002), “CDART: protein homology by domain architecture.”, *Genome Res.* 12 (10) 1619–23）。最初の領域構造検索からの refseq 配列を選択することで、配列をさらに精緻化する。次に、配列類似性に基づいて、配列を 22 の別個の群にクラスター化した（Clustering by Passing Messages Between Data Points. Brendan J. Frey and Delbert Dueck, *University of Toronto Science* 315, 972–976, February 2007）。簡単に述べると、アミノ酸配列は、ClustalW を使用して多重アライメントした。ペアワイズパーセント同一性（PID）を計算した。これは、操作上で定義され、この場合には、整列された残基にわたって同一の残基の数であった。式、 $K = -\ln(1 - D - (D \cdot D) / 5)$ によって、PID を距離に変換した（Kimura, M. *The neutral Theory of Molecular Evolution*, Camb. Univ. Press, 1983, page 75）。負の距離は、上のアルゴリズムにおける類似性スコアとして使用された。中程度の類似性は、各データ点の選択性として使用された。この方法を使用して、22 個のクラスターが画定された（図 3～24）。各クラスターからの中心代表的配列のアミノ酸配列をコードする DNA を合成した（図 2 および表 1）。完全ホスホクトラーゼ領域不在のために、クラスターからの中心代表が、活性ホスホクトラーゼを代表しそうにないと判定された場合は、クラスターからの交互の（alternate）ホスホクトラーゼが、DNA 合成のために選択された（表 1）。

【0443】

【表 1】

表 1. 中心代表的配列

クラスター	生物	NCBI 識別子番号	アミノ酸配列番号	核酸配列番号
1	マイコバクテリウム・ギルバム (<i>Mycobacterium gilvum</i>) Spyr1	315444259	1	52
2	シューワネラ・バルチカ (<i>Shewanella baltica</i>) OS185	152999647	2	53
3	ラクトバチルス・ラムノーサス (<i>Lactobacillus rhamnosus</i>) LMS2-1	229550902	3	54
4	ラクトバチルス・クリスパータス (<i>Lactobacillus crispatus</i>) ST1	295692465	4	55
5	ビフィドバクテリウム・ロングム (<i>Bifidobacterium longum</i>) ロングム (longum) 垂株 JDM301	296453922	5	N/D
6	ロイコノストック・シトレウム (<i>Leuconostoc citreum</i>) KM20	170016535	6	56
7	ブラディリゾビウム属 (<i>Bradyrhizobium</i>) S23321 種	383773704	7	57
8	エンテロコッカス・フェシウム (<i>Enterococcus faecium</i>) E1039	293556655	8	N/D
9	ブルセラ・ミクロチ (<i>Brucella microti</i>) CCM 4915	256015169	9	58
10	ラクトバチルス・サリバリウス (<i>Lactobacillus salivarius</i>) ATCC 11741	227891468	10	59
11	ストレプトコッカス・アガラクチアエ (<i>Streptococcus agalactiae</i>) COH1	77409068	11	N/D
12	ロドコッカス・イムテケンシス (<i>Rhodococcus imtechensis</i>) RKJ300	384105306	12	60
13	バークホルデルシア・ゼノボランス (<i>Burkholderia xenovorans</i>) LB400	91778759	13	61
14	マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (<i>Mycobacterium intracellulare</i>) ATCC 13950	254819329	14	62
15	ニトロソモナス属 (<i>Nitrosomonas</i>) Is79A3 種	339481558	15	63
16*	シゾサッカロミセス・ボンベ (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>) 972h-	19112755	16	64
17	ロイコノストック・メセンテロイデス (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>) メセンテロイデス (mesenteroides) 垂株 J18	381336925	17	N/D
18	ストレプトミセス属 (<i>Streptomyces</i>) SA3_actG 種	318056880	18	N/D
19	ラクトバチルス・ブフネリ (<i>Lactobacillus buchneri</i>) ATCC 11577	227512366	19	65
20	ストレプトミセス・ガーナエンシス (<i>Streptomyces ghanaensis</i>) ATCC 14672	291440956	20	66

【 0 4 4 4 】

【表 2】

21	シアノセイス属 (<i>Cyanothece</i>) PCC 8802 種	257059544	21	67
22	ネオサルトリヤ・フィスケリ (<i>Neosartorya fischeri</i>) NRRL 181	119473535	22	68

N/D は実施されていないことを示す

*中心代表的アスペルギルス・フミガーツス(*Aspergillus fumigatus*) Af293(NCBI 番号 70999652)を置換した

【 0 4 4 5 】

エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) ホスホケトラーゼを含有するクラスター 8、およびクラスター 8 と大部分の相同性を共有するクラスター 11 中の Clustal W を使用したペアワイズアラインメントによって、互いに 90% 未満同一であるタンパク質配列をコードする DNA が、タンパク質合成のためにデザインされた (表 2)。

【0446】

【表 3】

表 2. クラスター 8 およびクラスター 11 からの配列

生物	NCBI 識別子番号	アミノ酸 配列番号	核酸配列 番号
クラスター 8			
エンテロコッカス・フェシウム (<i>Enterococcus faecium</i>) TX1330	227551751	23	69
リステリア・グレイ (Listeria grayi) DSM 20601	299821157	24	70
エンテロコッカス・カセリフラプス (<i>Enterococcus casseliflavus</i>) EC30	257866707	25	71
マイコプラズマ・アリガトリス (<i>Mycoplasma alligatoris</i>) A21JP2	293363787	26	72
カルノバクテリウム属 (<i>Carnobacterium</i>) 17-4 種	328958427	27	73
メリッソコッカス・プルトニウス (<i>Melissococcus plutonius</i>) ATCC 35311	332686509	28	74
テトラジェノコッカス・ハロフィルス (<i>Tetragenococcus halophilus</i>) NBRC 12172	352516443	29	75
メリッソコッカス・プルトニウス (<i>Melissococcus plutonius</i>) DAT561	379727960	30	76
マイコプラズマ・アルスリチデス (<i>Mycoplasma arthritidis</i>) 158L3-1	193216764	31	77
クラスター 11			
ストレプトコッカス・アガラクチアエ (<i>Streptococcus agalactiae</i>) NEM316	25011879	32	78

【0447】

【表 4】

マイコプラズマ・アガラクチアエ (<i>Mycoplasma agalactiae</i>) PG2	148377390	33	79
ストレプトコッカス・ゴールドニイ (<i>Streptococcus gordonii</i>) シャリス (Challis)株 CH1 亜系	157150221	34	80
キングセラ・オラリス (<i>Kingella oralis</i>) ATCC 51147	238021480	35	81
マイコプラズマ・フェルメンタンス (<i>Mycoplasma fermentans</i>) M64	319776755	36	82
グラニュリカタセラ・アディアセンス (<i>Granulicatella adiacens</i>) ATCC 49175	259046526	37	83
マイコプラズマ・ホミニス (<i>Mycoplasma hominis</i>) ATCC 23114	269115076	38	84
マイコプラズマ・クロコディリ (<i>Mycoplasma crocodyli</i>) MP145	294155803	39	85
ナイセリア属 (<i>Neisseria</i>)種 014 口腔分類群 F0314 株	298369811	40	86
エレモコッカス・コレオコラ (<i>Eremococcus coleocola</i>) ACS-139-V-Col8	313884493	41	87
アエロコッカス・ウリナエ (<i>Aerococcus urinae</i>) ACS-120-V-Col10a	326803378	42	88
キングセラ・キングアエ (<i>Kingella kingae</i>) ATCC 23330	333376439	43	89
ストレプトコッカス・クリセチ (<i>Streptococcus criceti</i>) HS-6	357236206	44	90
ストレプトコッカス・クリセチ (<i>Streptococcus criceti</i>) HS-6	357235889	45	91
マイコプラズマ・コランピナム (<i>Mycoplasma columbinum</i>) SF7	343491865	46	92

【 0 4 4 8 】

【表 5】

表 3. クラスター8 からの配列-アミノ酸配列同一性百分率

クラスター8 参照 AA	ホスホケトラーゼ AA 配列	アミノ酸%同一性
配列番号 8	配列番号 23	98
配列番号 8	配列番号 24	73
配列番号 8	配列番号 25	74
配列番号 8	配列番号 26	67
配列番号 8	配列番号 27	71
配列番号 8	配列番号 28	72
配列番号 8	配列番号 29	70
配列番号 8	配列番号 30	72
配列番号 8	配列番号 31	70

10

20

【 0 4 4 9 】

30

【表 6】

表 4. クラスタ11 からの配列-アミノ酸配列同一性百分率

クラスタ11 参照 AA	ホスホケトララーゼ AA 配列	アミノ酸%同一性
配列番号 11	配列番号 32	99
配列番号 11	配列番号 33	65
配列番号 11	配列番号 34	89
配列番号 11	配列番号 35	74
配列番号 11	配列番号 36	69
配列番号 11	配列番号 37	79
配列番号 11	配列番号 38	65
配列番号 11	配列番号 39	68
配列番号 11	配列番号 40	77
配列番号 11	配列番号 41	67
配列番号 11	配列番号 42	68
配列番号 11	配列番号 43	74
配列番号 11	配列番号 44	84
配列番号 11	配列番号 45	79
配列番号 11	配列番号 46	66

【0450】

実施例 2：ホスホフルクトキナーゼを欠く細菌ゲノム中のホスホケトララーゼの同定

アノテートされたホスホケトララーゼ (PKL) を有するが、解糖を通過する炭素流にとって重要な酵素であるアノテートされたホスホフルクトキナーゼ (PFK) を有しない、細菌ゲノムの検索を実施した。これらの基準に適合する数種の生物、そしてこの一覧からの 5 つの PKL、具体的には、バークホルデルシア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*) Ps JN (配列番号 47)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) NRRLB-30929 (配列番号 48)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium galli*) DSM20093 (配列番号 49)、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*) Bd1 (配列番号 50)、およびビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifid*

10

20

30

40

50

um) IPLA20015 (配列番号51) からのPKLを、高活性とグルコースからのイソプレンの収率増大研究のために選択した。生物の完全一覧からのPKLの大部分は特徴付けられていないので、選択された5つのPKLは、配列多様性、および文献から得られ得る高活性の最善の状況証拠に基づいた。ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*) からのPKLが7の最適pH値を示す (Sgorbati B., et al., Antonie van Leeuwenhoek 1976 (42), 49-57)、一方で、その他のPKLの至適pHは、典型的に6前後である (Heath EC., et al., J Bio Chem 1957, 1009-1029)。ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) は、燃料エタノール工場から汚染菌として単離され、おそらくは細胞量とエネルギーのためのF6PまたはX5Pのどちらかに対するPKLの活性によって、グルコースおよびキシロースの双方の上で増殖を示した (Liu S., et al., J Ind Microbiol Biotechnol 2008 (35), 75-81)。ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) およびビフィドバクテリウム・ガリカム (*Bifidobacterium gallicum*) の株は、グルコースまたはキシロースのどちらを唯一の炭素源として良好に成長できることから、これらからのPKLが選択された (Palframan RJ., et al., Curr Issues Intest Microbiol 2003 (4), 71-75)。

10

【0451】

20

実施例3：同定されたホスホクトラーゼ酵素のクローニング

ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*) インファンチス (*infantis*) 亜株、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、およびクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) から得られるPKLを酵素活性についてそれぞれアッセイした。ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*) インファンチス (*infantis*) 亜株PKLは、 5.7 ± 1.16 mMのKm、 4.56 ± 0.2 sec⁻¹のkcat、および 0.79 ± 0.2 mM⁻¹ sec⁻¹のkcat/Kmを有し、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) PKLは、 10.4 ± 1.03 mMのKm、 1.35 ± 0.04 sec⁻¹のkcat、および 0.13 ± 0.1 mM⁻¹ sec⁻¹のkcat/Kmを有し、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) PKLは、 10.3 ± 0.67 mMのKm、 2.18 ± 0.05 sec⁻¹のkcat、および 0.21 ± 0.06 mM⁻¹ sec⁻¹のkcat/Kmを有することが分かった。ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*) インファンチス (*infantis*) 亜株、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*)、またはクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) PKLをコードするコンストラクトを対照として使用して、生体外および生体内活性について候補PKL酵素をスクリーニングした。

30

40

【0452】

エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) PKLのアミノ酸配列 (配列番号93) は、GenBankから入手されて、大腸菌 (*E. coli*) 中の最適化発現について、GeneArt最適化ソフトウェアで処理された。PKL遺伝子の前に2つの塩基対を付加してBspHI部位を形成し、SacI部位を停止コドンの直後に挿入した。合成されたPKL遺伝子は、GeneArtカナマイシン耐性クローニングプラスミドにクローン化した。次に、E. ガリナラム (*E. gallinarum*) PKL遺伝子をNcoI/SacI-消化pTrcHis2Bベクター (Life Technologies, Carlsbad, CA) にサブクローニングして、プラスミドpCMP1321を形成した (表5、図25)。

50

【0453】

ATCC15697株、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*) 亜株インファンチス (*infantis*) の染色体DNAは、ATCC (Manassas, VA) から入手された。B. ロングム (*B. longum*) PKLをコードする遺伝子は、製造業者 (Life Technologies, Carlsbad, CA) のプロトコルに従って、プライマーCMP283: 5'-ctgtattTCATGAcgagtcctgttattggcacc-3' およびCMP284: 5'-ctctatGAATTCTCACTCGTTGTCTGCCAGCG-3'、およびポリメラーゼHerculaseを使用した、染色体DNAからのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅した。PCR産物は、精製前にEcoRIおよびBspHI制限酵素で消化した。精製後、GeneArt Seamless Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して、およそ2500bpの断片をEcoRI/NcoI-消化pTrcHis2B (Invitrogen, Carlsbad, CA) にアセンブルし、プラスミドpCMP1090を形成した (表5)。

10

【0454】

クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) PKLをコードする対照プラスミドの構築では、ATCCBAA-98株の染色体DNAがATCC (Manassas, VA) から入手された。クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) PKLをコードする遺伝子は、製造業者 (Life Technologies, Carlsbad, CA) のプロトコルに従って、プライマーCacetpTrcHisBF: 5'-taaggagggaataaaccatgcaaagtataataggaaaacataaggatgaagg-3' およびCacetpTrcHisBR: 5'-ttctagaaagccttcgttatacatgccactgccaattagttatttc-3'、およびtheポリメラーゼHerculaseを使用した、染色体DNAからのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅した。PCR産物を精製し、GeneArt Seamless Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して、EcoRI/NcoI-消化pTrcHis2B (Invitrogen, Carlsbad, CA) に構築しプラスミドpCMP1364を形成した (表3)。

20

30

【0455】

ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、ビフィドバクテリウム・ガリカム (*Bifidobacterium gallicum*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、パークホルデルシア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、およびクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) (配列番号94) のそれぞれに由来するPKLタンパク質をコードする核酸配列は、大腸菌 (*E. coli*) 中の発現についてコドン最適化され、GeneOracle (Mountain View, CA) によって合成された。これらのコドン最適化PKL遺伝子をPCRによって増幅し、製造業者の推奨プロトコルに従ってGeneArt Seamless Cloning Kit (Life Technologies) を使用して、pTrcHis2B発現プラスミド中にサブクローニングした。下の表5は、プラスミド構築のために使用されたプライマーpMCS530~pMCS535を列挙する。PKL酵素をP_{trc}プロモーター下流にクローン化し、IPTGによるホスホケトラーゼ遺伝子の誘導性発現を可能にした (表6、図26~31)。

40

【0456】

【表 7】

表 5. プラスミド構築のために使用されたプライマー

プライマー	配列	説明
ビフィドバクテリウム・デンチウム (<i>Bifidobacterium dentium</i>)		
o430	tgataacgaataagagctcgagatctgcagctggtacc	Dentium PKL から pTrcHis2B、 プラスミド順方向プライマー
o431	gactcgctcatggtttattctctcttatttaacgatacattaatatatacc	Dentium PKL から pTrcHis2B、 プラスミド逆方向プライマー
o432	ggaataaaccatgacgagtcaggtattggaacaccc	Dentium PKL から pTrcHis2B、 PKL 順方向プライマー
o433	tctcgagctcttattcggtatcacccgcagtagcgg	DentiumPKL から pTrcHis2B、 PKL 逆方向プライマー
ビフィドバクテリウム・ビフィダム (<i>Bifidobacterium bifidum</i>)		
o434	cgacaacgagtaagagctcgagatctgcagctggtacc	Bifidum PKL から pTrcHis2B、 プラスミド順方向プライマー
o435	gagaggtcatggtttattctctcttatttaacgatacattaatatatacc	Bifidum PKL から pTrcHis2B、 プラスミド逆方向プライマー
o436	ggaataaaccatgacctctccagtaattggcactcc	Bifidum PKL から pTrcHis2B、 PKL 順方向プライマー
o437	tctcgagctcttactcggttgctgcctgccgtg	Bifidum PKL から pTrcHis2B、 PKL 逆方向プライマー

【 0 4 5 7 】

10

20

【表 8】

ビフィドバクテリウム・ガリクム (<i>Bifidobacterium gallicum</i>)		
o438	cgataatgaataagagctcgagatctgcagctggtacc	Gallicum PKL から pTrcHis2B、 プラスミド順方向プライマー
o439	gagaagtcagtggtttattctccttatttaacgatacattaatatatacc	Gallicum PKL から pTrcHis2B、 プラスミド逆方向プライマー
o440	ggaataaaccatgacttctcccgtagtggtactcc	Gallicum PKL から pTrcHis2B、 PKL 順方向プライマー
o441	tctcgagctcttattcattatcgcccgccgtagc	Gallicum PKL から pTrcHis2B、 PKL 逆方向プライマー
ラクトバチルス・ブフネリ (<i>Lactobacillus buchneri</i>)		
o442	gctgaaaaataagagctcgagatctgcagctggtacc	Buchneri PKL から pTrcHis2B、 プラスミド順方向プライマー
o443	ccactgtcatggtttattctccttatttaacgatacattaatatatacc	Buchneri PKL から pTrcHis2B、 プラスミド逆方向プライマー
o444	ggaataaaccatgacagtggtactatgactcaaaagagtacttagag	Buchneri PKL から pTrcHis2B、 PKL 順方向プライマー
o445	tctcgagctcttatttttcagcccttccatttcc	Buchneri PKL から pTrcHis2B、 PKL 逆方向プライマー
パークホルデリア・フィトフィルマンズ (<i>Burkholderia phytofirmans</i>)		
o446	ctggaaaggttaagagctcgagatctgcagctggtacc	Phytofirmans PKL から pTrcHis2B、プラスミド順方向プライマー
o447	cttcagccatggtttattctccttatttaacgatacattaatatatacc	Phytofirmans PKL から pTrcHis2B、プラスミド逆方向プライマー
o448	ggaataaaccatggctgaagccactgcccatc	Phytofirmans PKL から pTrcHis2B、PKL 順方向プライマー
o449	tctcgagctcttaacctttccaggtecaattccggattt	Phytofirmans PKL から pTrcHis2B、PKL 逆方向プライマー
クロストリジウム・アセトブチリカム (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)		
o450	atggcatgtataagagctcgagatctgcagctggtacc	Acetobutylicum 最適化 PKL から pTrcHis2B、プラスミド順方向プライマー
o451	ttgattgcatggtttattctccttatttaacgatacattaatatatacc	Acetobutylicum 最適化 PKL から pTrcHis2B、プラスミド逆方向プライマー
o452	ggaataaaccatgcaatcaatcatcggaacac	Acetobutylicum 最適化 PKL から pTrcHis2B、PKL 順方向プライマー
o453	tctcgagctcttatacatgccattgccagtttgtgate	Acetobutylicum 最適化 PKL から pTrcHis2B、PKL 逆方向プライマー

【 0 4 5 8 】

【表 9】

表 6. PKL をコードするプラスミド

プラスミド	説明
pCMP1321	pTrcHis2B <i>E.ガリナラム</i> (<i>E. gallinarum</i>) PKL、Carb
pCMP1090	pTrcHis2B <i>B.ロングム</i> (<i>B. longum</i>) PKL、Carb
pCMP1364	pTrcHis2B <i>C.アセトブチリカム</i> (<i>C. acetobutylicum</i>) PKL、Carb
pMCS530	pTrcHis2B <i>B.デンチウム</i> (<i>B. dentium</i>) PKL、Carb
pMCS531	pTrcHis2B <i>B.ビフィダム</i> (<i>B. bifidum</i>) PKL、Carb
pMCS532	pTrcHis2B <i>B.ガリクム</i> (<i>B. gallicum</i>) PKL、Carb
pMCS533	pTrcHis2B <i>L.ブフネリ</i> (<i>L. buchneri</i>) PKL、Carb
pMCS534	pTrcHis2B <i>B.フィトフィルマンズ</i> (<i>B. phytofirmans</i>) PKL、Carb
pMCS535	pTrcHis2B <i>C.アセトブチリカム</i> (<i>C. acetobutylicum</i>) PKL 最適化、Carb

Carb はカルベニシリンを指す

【0459】

表1、表2、およびクラスター1～22（図3～24を参照されたい）に列挙される各生物に由来するPKLタンパク質をコードする核酸配列は、大腸菌（*E. coli*）発現についてコドン最適化され合成される。これらのコドン最適化PKL遺伝子は、Ptrcプロモーター下流でpTrcHis2B発現プラスミドにサブクローニングされて、IPTGによるホスホケトラーゼ遺伝子の誘導性発現を可能にする。

【0460】

実施例4：生体外実験で同定されたPKLを発現する株の構築

表5に列挙されるプラスミドで、CMP1133株（BL21, Δpgl PL. 2mKKDyl, GI1. 2gltA, yhfSFRTPyddVIsPAYhfS, thiFRTtruncIsPA）を形質転換し、20μg/mlのカナマイシンを含有するルリア・ベルターニプレート上でコロニーを選択することで、PKL発現株を構築した。製造業者（Gene Bridges, Heidelberg, Germany）によって推奨されるプロトコルを使用して、カナマイシンマーカを除去し、示される株を形成した（表7）。

【0461】

10

20

30

40

【表 10】

表 7.大腸菌(E.coli)株の説明

株名称	遺伝子型
CMP1183	BL21, Δpgl PL.2mKKDyl, GII.2gltA, yhfSFRTPyddVIspAyhfS, thiFRTtruncIspA, pCMP1090 (pTrcPKL B.ロングム (B. longum))
CMP1328	BL21, Δpgl PL.2mKKDyl, GII.2gltA, yhfSFRTPyddVIspAyhfS, thiFRTtruncIspA, pCMP1321 (pTrcPKL E.ガリナーラム (E. gallinarum))
CMP1366	BL21, Δpgl PL.2mKKDyl, GII.2gltA, yhfSFRTPyddVIspAyhfS, thiFRTtruncIspA, pCMP1364 (pTrcPKL C.アセトブチリカム (C. acetobutylicum))
MCS545	BL21, Δpgl PL.2mKKDyl, GII.2gltA, yhfSFRTPyddVIspAyhfS, thiFRTtruncIspA, pMCS530 (pTrcPKL B.デンチウム (B. dentium))
MCS546	BL21, Δpgl PL.2mKKDyl, GII.2gltA, yhfSFRTPyddVIspAyhfS, thiFRTtruncIspA, pMCS531 (pTrcPKL B.ビフィダム (B. bifidum))
MCS547	BL21, Δpgl PL.2mKKDyl, GII.2gltA, yhfSFRTPyddVIspAyhfS, thiFRTtruncIspA, pMCS532 (pTrcPKL B.ガリウム (B. gallicum))
MCS548	BL21, Δpgl PL.2mKKDyl, GII.2gltA, yhfSFRTPyddVIspAyhfS, thiFRTtruncIspA, pMCS533 (pTrcPKL L.ブフネリ (L. buchneri))
MCS549	BL21, Δpgl PL.2mKKDyl, GII.2gltA, yhfSFRTPyddVIspAyhfS, thiFRTtruncIspA, pMCS534 (pTrcPKL B.フィトフィルマンズ (B. phytofirmans))
MCS550	BL21, Δpgl PL.2mKKDyl, GII.2gltA, yhfSFRTPyddVIspAyhfS, thiFRTtruncIspA, pMCS535 (pTrcPKL C.アセトブチリカム (C. acetobutylicum) 最適化)

【0462】

それぞれ同定されたPKLを発現するPKL発現株は、表1、表2、およびクラスター1～22（図3～24を参照されたい）に列挙されるPKLをコードするプラスミドで、CMP1133株（BL21, Δpgl PL.2mKKDyl, GII.2gltA, yhfSFRTPyddVIspAyhfS, thiFRTtruncIspA）形質転換し、20μg/mlカナマイシンを含有するルリア・ベルターニプレート上で、コロニーを選択することで構築される。製造業者（Gene Bridges, Heidelberg, Germany）によって推奨されるプロトコルを使用して、カナマイシンマーカーが除去される。

【0463】

実施例5：同定されたPKLの発現および溶解度の比較

pTrcHis2BB. ロングム (B. longum) (CMP1183株)、pTrcHis2B E. ガリナーラム (E. gallinarum) (CMP1328株)、pTrcHis2B C. アセトブチリカム (C. acetobutylicum) (C

10

20

30

40

50

MP1366株)、pTrcHis2B B. デンチウム (*B. dentium*) PKL (MCS545株)、pTrcHis2B B. ビフィダム (*B. bifidum*) (MCS546株)、pTrcHis2B B. ガリウム (*B. gallicum*) PKL (MCS547株)、pTrcHis2B L. ブフネリ (*L. buchneri*) PKL (MCS548株)、pTrcHis2B B. フィトフィルマンズ (*B. phytofirmans*) PKL (MCS549株)、またはpTrcHis2B C. アセトブチリカム (*C. acetobutylicum*) PKL最適化 (MCS550株) を発現する株をLB培地中で培養し、約0.5のOD₆₀₀で200μMのIPTGによって誘導し、30℃または34℃の温度で4時間にわたり誘導した。4mlの培養ブロス3000rpmで10分間遠心処理して、細胞を収集した。細胞ペレットを0.1% DNAase および0.5mMAEBSFを添加した2mlの50mM MES、50mM NaCl、pH6.0に再懸濁した。フレンチ圧力セル (American Instrument Company) を14,000psiで使用して、細胞懸濁液を溶解した。次に溶解産物をエッペンドルフ5804R遠心分離機内で、4℃、15,000RPMで10分間遠心分離した。上清およびペレットを分離した。ペレットは、溶解50mM MES、50mM NaCl pH6.0緩衝液に再懸濁した。上清およびペレット化サンプルを4~12% SDS-PAGEゲル電気泳動によって分析した。可溶性一対一ペレット化 (不溶性) ホスホケトラゼ画分を比較することで、溶解度を評価した。

10

【0464】

結果は、最適化C. アセトブチリカム (*C. acetobutylicum*) PKL (図32A、レーン9) が、コドン最適化されていない (図32A、レーン3) C. アセトブチリカム (*C. acetobutylicum*) PKLと比較して、より高いレベルを発現したことを示した。B. デンチウム (*B. dentium*) (図32A、レーン4)、B. ビフィダム (*B. bifidum*) (図32A、レーン5)、およびB. ガリウム (*B. gallicum*) (図32A、レーン6) PKLは全て、C. アセトブチリカム (*C. acetobutylicum*) PKL (図32A、レーン3) と同様のレベルで発現し、大部分が可溶性であった (図32B)。比較すると、L. ブフネリ (*L. buchneri*) (レーン7) およびB. フィトフィルマンズ (*B. phytofirmans*) (レーン8) は、ほぼ完全に不溶性であった (図32B)。

20

【0465】

表1、表2、およびクラスター1~22 (図3~24を参照されたい) で列挙される同定されたPKLを発現する株をLB培地中で培養し、約0.5のOD₆₀₀で、200μM IPTGによって誘導し、30℃または34℃の温度で4時間誘導する。4mlの培養ブロス3000rpmで10分間遠心処理して、細胞を収集する。細胞ペレットを0.1% DNAase および0.5mMAEBSFを添加した2mlの50mM MES、50mM NaCl、pH6.0に再懸濁する。フレンチ圧力セル (American Instrument Company) を14,000psiで使用して、細胞懸濁液を溶解する。次に溶解産物をエッペンドルフ5804R遠心分離機内で、4℃および15,000RPMで10分間遠心分離する。上清およびペレットを分離する。ペレットは、溶解緩衝液 (50mM MES、50mM NaCl pH6.0) に再懸濁する。上清およびペレット化サンプルを4~12% SDS-PAGEゲル電気泳動によって分析する。可溶性一対一ペレット化 (不溶性) ホスホケトラゼ画分を比較することで、溶解度を評価する。

30

40

【0466】

実施例6：同定されたPKLを発現する株中のホスホケトラゼ活性の生体外スクリーニング

pTrcHis2B B. ロングム (*B. longum*) (株CMP1183)、pTrcHis2B E. ガリナーラム (*E. gallinarum*) (株CMP1328)、pTrcHis2B C. アセトブチリカム (*C. acetobutylicum*) (株CMP1366)、pTrcHis2B B. デンチウム (*B. dentium*) PK

50

L (株MCS545)、pTrcHis2B B. ビフィダム (*B. bifidum*) (株MCS546)、pTrcHis2B B. ガリウム (*B. gallicum*) PKL (株MCS547)、pTrcHis2B L. ブフネリ (*L. buchneri*) PKL (株MCS548)、pTrcHis2B B. フィトフィルマンズ (*B. phytofirmans*) PKL (株MCS549)、またはpTrcHis2B C. アセトブチリカム (*C. acetobutylicum*) PKL最適化 (株MCS550) 発現する株を、誘導前に37℃で50 µg/mlカルベニシリン添加LB培地中で培養した。10 µM、25 µM、50 µM、または100 µMのIPTGによる誘導に続いて、培養物を34℃の振盪機の30分間移した。細胞を4℃および10,000 rpmで10分間遠心分離して収集した。精製に先だって、細胞ペレットを-80℃で保存した。精製のために、PKL細胞ペレットを50mM MES pH6.0、50mM NaCl、0.5mM AEBSF、0.1mg/ml DNase Iに再懸濁した。フレンチプレスを繰り返し通過させることで細胞を溶解し、50,000 rpmで60分間の超遠心によって清澄化した。*B. longum*、*E. gallinarum*、*C. acetobutylicum*、*B. dentium*、*B. bifidum*、*B. gallicum*、*L. buchneri*、*B. phytofirmans*、または*C. acetobutylicum*からのPKLを含有する清澄化溶解産物を50mM MES、50mM NaCl、pH6で平衡化したDEAE HiTrapFFカラムに装入し、50mM MES、1M NaCl、pH6への勾配で溶出した。得られた画分をSDS-PAGEによって分析した。PKLを含有する画分を貯留し、G25脱塩カラムを使用して、50mM MES、50mM NaCl pH6.0中に脱塩した。さらに50mM MES、50mM NaCl、pH6で平衡化したMonoQ 10/100GLカラムを使用して、1M NaClの塩勾配で、精製を達成した。その内容全体を参照によって本明細書に援用する、L. Meile et al., *Bacteriol.*, 2001, 183:2929-2936 and Frey et al., *Bioorganic Chem.*, 2008, 36:121-127に記載されるヒドロキサム酸アッセイの規模縮小バージョンを使用して、各PKLによって形成されるAcPの量を測定した。アッセイは、37℃で96ウェルプレート (Costarカタログ番号9017) 構成で実施した。各300 µlの反応物は、1mM TPP、10mMリン酸カリウムpH6.0、50mM MES pH6、10mM MgCl₂、5mM F6P、および濃度250 nMのPKLを含有した。タイムポイントは、様々な間隔で測定した。反応を停止させるために、60 µlの反応混合物pH6.5で60 µlの2Mヒドロキシルアミンと混合し、室温で10分間インキュベートした。0.1M HCl中の40 µlの15% TCA、40 µlの4MHCl、および40 µlの5% FeCl₃の添加を使用して、タンパク質を沈殿させ、AcPの検出を可能にした。次にサンプルを3000 rpmで10分間遠心分離した。上清の200 µlのサンプルをマイクロタイタープレートおよびプレートリーダーに移し、形成されるAcP量に伴う吸光度の変化を505 nmでモニターした。

【0467】

結果は、最適化*C. acetobutylicum* PKLが、F6P活性を有し、コドン最適化されていない*C. acetobutylicum* PKLと比較して、より高い量のAcPを生産したことを示した (図33)。*B. dentium*は、コドン最適化されていない*C. acetobutylicum* PKLと同様のPKLF6P活性を有した。*B. dentium*および*B. gallicum* PKLは、顕著なF6P活性を有し、*E. gallinarum* PKLのF6P活性と同等であった。比較すると、*L. buchneri* PKL (図33) および*B. phytofirmans* PKLはF6P活性を示さず、これは、これらのPKLがほぼ完全に不溶性であると

いう発見によって支持された。

【0468】

表1、表2、およびクラスター1～22（図3～24を参照されたい）中に列挙される同定されたPKLを発現する株を誘発前に、37℃で50μg/mlカルベニシリン添加LB培地中で培養する。10μM、25μM、50μM、または100μMのIPTGによる誘導に続いて、培養物を34℃で振盪機に30分間移した。細胞を4℃および10,000rpmで10分間遠心分離して収集する。精製のために、PKL細胞ペレットを50mM MES pH6.0、50mM NaCl、0.5mM AEB SF、0.1mg/ml DNase Iに再懸濁する。フレンチプレスを繰り返し通過させることで細胞を溶解し、50,000rpmで60分間の超遠心によって清澄化する。PKLを含有する清澄化溶解産物を50mM MES、50mM NaCl、pH6で平衡化したDEAE HiTrap FFカラムに装入し、50mM MES、1M NaCl、pH6への勾配で溶出する。得られた画分をSDS-PAGEによって分析する。PKLを含有する画分を貯留し、G25脱塩カラムを使用して、50mM MES、50mM NaCl pH6.0中に脱塩する。さらに50mM MES、50mM NaCl、pH6で平衡化したMono Q 10/100GLカラムを使用して、1M NaClの塩勾配で、精製を達成する。L. Meile et. al., Bacteriol., 2001, 183:2929-2936、およびFrey et. al., Bioorganic Chem., 2008, 36:121-127に記載されるヒドロキサム酸アッセイの規模縮小バージョンを使用して、各PKLによって形成されるAcPの量を測定する。アッセイは、37℃で96ウェルプレート（Costarカタログ番号9017）構成で実施される。各300μl反応物は、1mM TPP、10mMリン酸カリウムpH6.0、50mM MES pH6、10mM MgCl₂、5mM F6P、およびPKL濃度250nMを含有する。タイムポイントは、様々な間隔で測定される。反応を停止させるために、60μlの反応混合物pH6.5で60μlの2Mヒドロキシルアミンと混合し、室温で10分間インキュベートする。0.1M HCl中の40μlの15%TCA、40μlの4MHCl、および40μlの5%FeCl₃の添加を使用して、タンパク質を沈殿させ、AcPの検出を可能にする。次にサンプルを3000rpmで10分間遠心分離する。上清の200μlのサンプルをマイクロタイタープレートおよびプレートリーダーに移し、形成されるAcP量に伴う吸光度の変化を505nmでモニターする。

【0469】

実施例7：同定されたホスホケトラゼ（PKL）を発現する株中のホスホケトラゼ活性の生体内スクリーニング

トランスケトラゼ（tkt）活性がない変異株中で、ホスホケトラゼ（PKL）酵素の生体内活性を評価した。トランスケトラゼは、大腸菌（E. coli）中の全ての芳香族ビタミンおよびアミノ酸の基材である、エリスロース-4-リン酸（E4P）生産に関与する。したがってトランスケトラゼ活性不在下における、グルコースを炭素源とする最少培地上の大腸菌（E. coli）の増殖は、芳香族栄養要求性のために可能でない（Zhao and Winkler 1994）。トランスケトラゼはまた、キシロース-5-リン酸（X5P）と、セドヘプツロース-7-リン酸（S7P）およびグリセルアルデヒド-3-リン酸（GAP）との相互変換にも関与し、tkt活性は、ペントースリン酸経路から解糖に戻る唯一の出口であることから、キシロースを炭素源とする最少培地上のtkt変異体の増殖もまた可能でない。ホスホケトラゼは、F6PからE4Pを生成し、X5PからGAPを生成するので、機能酵素は、グルコース（F6P活性を示す）またはキシロース（X5PおよびF6P活性の双方を示す）上での培養に際して、tkt変異体の増殖欠陥をレスキューし得る。したがって補足変異体の増殖を利用して、ホスホケトラゼ酵素の異なる生体内機能を試験し得る。

【0470】

株構築

PCRによるKeioコレクションからの変異体を増幅し、P1形質導入を実施し、G

10

20

30

40

50

eneBridges挿入（製造業者のプロトコル）、PCR増幅（Pfu TurboまたはHerculase、製造業者のプロトコル）を実施し、プラスミドを形質転換し、株を成長および増殖させるための標準分子生物学的技術が使用された。簡単に述べると、大腸菌（E. coli）には2つのトランスケトララーゼ酵素ゲノムがあるので、トランスケトララーゼヌル変異体を作成するためには、どちらもノックアウトしなくてはならなかった。tktB中のカナマイシン挿入断片をKeioコレクションからのPCRによって増幅し、BL21へのリコンビニアリングによって導入した。tktBの中抗生物質耐性カセットをPCRによって確認し、次にpCP20プラスミドを使用してループアウトさせた（表5）。次に、同一方法によってtktA変異をL21に導入し、引き続いてP1形質導入によってtktB変異体に導入して、トランスケトララーゼヌル変異株を作成した（表6）。このDW809株は、芳香族アミノ酸供給に実質的に寄与しないカザミノ酸と、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、p-アミノ安息香酸、2-3-ジヒドロキシ安息香酸、p-ヒドロキシベンゾエート、およびピリドキシンを含む全ての芳香族化合物の追加的補給剤とを添加したM9グルコース最少培地上でのみ増殖した（Zhao and Winkler, 1994で示される）。この6つの芳香族化合物とピリドキシンとの組み合わせは、本明細書で引き続いて「芳香族補給剤」と称される。次に異なるホスホケトララーゼ酵素を保有するプラスミドをトランスケトララーゼ変異株に形質転換して、芳香族補給剤およびカルベニシリンを添加したM9グルコースカザミノ酸上の増殖について選択した（表6）。次に、芳香族補給剤なしで、M9グルコースまたはキシロースのどちらかの上で、EnzyScreen Growth Profiler（EnzyScreen, BV）上の増殖について株をアッセイし、ホスホケトララーゼ酵素を発現しない対照株と比較した。ホスホケトララーゼ酵素は、20 μMおよび60 μMの2つの異なる濃度のIPTGによって、トランスケトララーゼヌル変異体中で誘導された。

【0471】

トランスケトララーゼヌル変異体株を表1、表2、またはクラスター1～22（図3～24を参照されたい）に列挙される同定されたPKLで形質転換して、芳香族補給剤およびカルベニシリンを添加したM9グルコースカザミノ酸上の増殖について選択する。次に、芳香族補給剤なしで、M9グルコースまたはキシロースのどちらかの上で、EnzyScreen Growth Profiler（EnzyScreen, BV）上の増殖について株をアッセイし、ホスホケトララーゼ酵素を発現しない対照株と比較する。ホスホケトララーゼ酵素は、20 μMおよび60 μMの2つの異なる濃度のIPTGによって、トランスケトララーゼヌル変異体中で誘導される。

【0472】

【表11】

表 8.tktA および tktB 変異の存在について試験されたプライマー

プライマー名称	配列
tktA test for	catgcgagcatgatccagagatttctga
tktA test rev	gcttgctcgcaaacggacatatcaaggt
tktB test for	cagctcccatgagcgaagcggagt
tktB test rev	gacgcgtcagcgtcgcacccggca
tktB B test for	gctgcgatcgactgactatcgaccga
tktB B test rev	cagacgcctggccccacgttggtgga
tktA B test for	gcagcggacggggcgagtagattgcgca
tktA B test rev	gtgatctacaacacgccttatctat

【0473】

【表 1 2】

表 9. PKL を発現する改変株

株	説明
DW809	BL21 Δ tktA Δ tktB, Kan (Keio からの tktA 中の抗生物質マーカー)
DW816	BL21 Δ tktA Δ tktB, pCMP1321, Kan Carb
DW830	BL21 Δ tktA Δ tktB, pMCS530, Kan Carb
DW831	BL21 Δ tktA Δ tktB, pMCS531, Kan Carb
DW832	BL21 Δ tktA Δ tktB, pMCS532, Kan Carb
DW833	BL21 Δ tktA Δ tktB, pMCS533, Kan Carb
DW834	BL21 Δ tktA Δ tktB, pMCS534, Kan Carb
DW835	BL21 Δ tktA Δ tktB, pMCS535, Kan Carb

10

【0 4 7 4】

結果

このアッセイでは、トランスケトラーゼ変異体は、補給剤を添加した場合のみグルコース上で増殖し（図 3 4）、補給剤添加または無添加のキシロース上では増殖しなかった（図 3 6）。異なるホスホケトラーゼを発現するトランスケトラーゼヌル変異体の増殖は、これらの酵素の生体内示差挙動を強調した。E. ガリナラム（E. gallinarum）PKL は、グルコースおよびキシロースのどちらの上でも最良の能力を示し、補給剤不在下でトランスケトラーゼ変異体の増殖を維持するのに十分な F 6 P および X 5 P 活性を示した（図 3 5 および 3 7 を参照されたい）。C. アセトブチリカム（C. acetobutylicum）PKL もまた、グルコースおよびキシロースのどちらの上でも芳香族補給剤不在下におけるトランスケトラーゼ変異体の増殖を可能にしたが（図 3 5 および 3 7）、グルコース上での培養に際して、60 μ M の IPTG 濃度で細胞増殖に対する有害効果を有すると思われた（図 3 5）。

20

【0 4 7 5】

実施例 8：PKL 発現株の細胞内アセチルリン酸測定

イソブレン産生大腸菌（E. coli）株を構築して、バークホルデリア・フィトフィルマンス（Burkholderia phytofirmans）Ps JN、ラクトバチルス・ブフネリ（Lactobacillus buchneri）NRRL B-30929、ビフィドバクテリウム・ガリカム（Bifidobacterium galliicum）DSM 20093、ビフィドバクテリウム・デンチウム（Bifidobacterium dentium）Bd1、またはビフィドバクテリウム・ビフィダム（Bifidobacterium bifidum）IPLA 20015 からのホスホケトラーゼ、または表 1、表 2、またはクラスター 1～22 からの PKL を発現させる（図面 3～24 を参照されたい）。ホスホケトラーゼを発現しなかった株を対照として使用する。

30

【0 4 7 6】

(i) 材料

TM3 培地レシピ（1 リットルの発酵培地あたり）：

13.6 g の K_2HPO_4 、13.6 g の KH_2PO_4 、2 g の $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2 g のクエン酸一水和物、0.3 g のクエン酸第二鉄アンモニウム、3.2 g の $(NH_4)_2SO_4$ 、0.2 g の酵母抽出物、1 ml の 1000 $\times$ 微量金属溶液。全ての成分を合わせて、 dH_2O に溶解する。水酸化アンモニウム（30%）によって pH を 6.8 に調節し、所定容積にする。培地を 0.22 ミクロンのフィルターで濾過滅菌する。pH 調節および滅菌後、グルコース 10.0 g および抗生物質を添加する。

40

【0 4 7 7】

1000 $\times$ 微量金属溶液（1 リットルの発酵培地あたり）

40 g のクエン酸 $\cdot H_2O$ 、30 g の $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、10 g の NaCl、1 g の

50

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1gの $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1gの $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100mgの $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、100mgの H_3BO_3 、100mgの $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。各成分を1つずつ、 dH_2O に溶解する。pHを HCl/NaOH で約3.0に調節し、次に溶液を所定容積にして、0.22ミクロンフィルターで濾過滅菌する。

【0478】

(ii) 実験手順

完全MVA経路と、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*) PsJN、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) NRRLB-30929、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallium*) DSM20093、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*) Bd1、またはビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) IPLA20015からのPKL、または表1、表2、またはクラスター1～22 (図3～24を参照されたい) からのPKLを発現する細胞をルリア・ベルターニブロス+抗生物質中で一晩培養する。翌日、(250mL調節板付きエルレンマイヤーフラスコ内の) $50\mu\text{g}/\text{mL}$ のカルベニシリンを含有する20mLのTM3培地中で0.05のOD600に希釈して、 34°C および200rpmで培養する。2時間の増殖後、OD600を測定して、 $200\mu\text{M}$ のIPTGを添加する。さらに3.5時間後、1.5mLのサンプルを遠心分離して、上清を廃棄し、ペレットを100 μL の乾燥氷冷メタノールに再懸濁する。

【0479】

(iii) 細胞内アセチルリン酸測定

アセチルリン酸を抽出するために、1.5mLの大腸菌 (*E. coli*) 細胞を0.57～2.26のODに培養して、遠心分離によって遠心沈殿させて、100 μL の乾燥氷冷メタノールをペレットに添加する。メタノールでクエンチしたサンプルを -20°C で数日間保存する。さらなるサンプル処理は、穏やかな細胞再懸濁、 -9°C で5分間の遠心分離、および清浄なバイアルへの上清の吸引を含む。ペレットを75 μL の含水の2%酢酸で、再度2回抽出する。各抽出後、細胞破片を -9°C における遠心分離によってペレット化し、全ての3回の抽出からの上清を合わせて貯留し、1 μL のトリブチルアミンを添加する。Thermo Finnigan TSQシステム (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA) を使用してLCMSによって、アセチルリン酸の質量分光分析を実施する。XCaliburおよびLCQuanソフトウェア (Thermo Electron Corp) を使用して、システム制御、データ取得、および質量スペクトルデータ評価を実施する。流速0.4mL/分のSynergi MAX-RP 5 μM HPLCカラム (150 $\times$ 2mm、Phenomenex) に移動相勾配を適用する。適用される勾配プロファイルは、 $t=0\sim1$ 分に99%Aおよび1%B; $t=11$ 分に80%Aおよび20%B; $t=12\sim14$ 分に75%Bおよび25%C; $t=15\sim16$ 分に99%Aおよび1%Bであり、ここで溶剤Aは水中の15mMトリブチルアミン/10mM酢酸、溶剤Bはメタノール、溶剤Cは水である。アセチルリン酸の質量検出は、前駆体イオンの m/z 値138.9で、負イオンモードのエレクトロスプレーイオン化 (ESI-MS/MS) (ESIスプレー電圧2.5～3.0kV、オン移送管温度 390°C) を使用して実施する。アセチルリン酸の濃度は、 PO_3^- 生成イオンによって生成されるピークの積分強度に基づいて判定される ($m/z=79.0$ 、衝突エネルギー20V、衝突ガス圧力1.7mTorr、 $R_t=13.2$ 分)。アセチルリン酸標準物質 (Sigma-Aldrich) の注入によって得られる検量線を使用して、細胞抽出物中の代謝産物濃度を計算する。アセチルリン酸の細胞内濃度は、OD=200の培養物の1mL中にある全細胞の積算容積は50mLである、という仮定に基づいて判定される。生成したアセチルリン酸は、ホスホクエトラゼを発現しない対照株と比較して、PKLを発現する株中で評価される。

【0480】

実施例9：小規模でのホスホケトラゼを発現する組換え宿主細胞内のイソプレレン生産

イソプレレン産生大腸菌 (*E. coli*) 株を構築して、バークホルデリア・フィトフィルマンス (*Burkholderia phytofirmans*) Ps JN、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) NRRL B-30929、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium gallicum*) DSM 20093、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*) Bd1、またはビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) IPLA 20015からのホスホケトラゼ、または表1、表2、またはクラスター1～22からのPKL (図面3～24を参照されたい)、完全MVA経路およびイソプレレンシンターゼを発現させる。ホスホケトラゼを発現しなかったイソプレレン産生株を対照として使用する。

10

【0481】

TM3培地レシピ (1リットルの発酵培地あたり) :

13.6 gの K_2HPO_4 、13.6 gの KH_2PO_4 、2 gの $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2 gのクエン酸一水和物、0.3 gのクエン酸第二鉄アンモニウム、3.2 gの $(NH_4)_2SO_4$ 、0.2 gの酵母抽出物、1 mlの1000×微量金属溶液。全ての成分を合わせて dH_2O に溶解する。水酸化アンモニウム (30%) によってpHを6.8に調節し、所定容積にする。培地を0.22ミクロンのフィルターで濾過滅菌する。pH調節および滅菌後、グルコース10.0 gおよび抗生物質を添加する。

20

【0482】

1000×微量金属溶液 (1リットルの発酵培地あたり)

40 gのクエン酸 $\cdot H_2O$ 、30 gの $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、10 gの $NaCl$ 、1 gの $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1 gの $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、1 gの $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、100 mgの $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、100 mgの H_3BO_3 、100 mgの $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 。各成分を1つずつ、 dH_2O に溶解する。pHをHCl/NaOHで約3.0に調節し、次に溶液を所定容積にして、0.22ミクロンフィルターで濾過滅菌する。

【0483】

(ii) 実験手順

30

ルリア・ベルターニブロス+抗生物質中で、細胞を一晩培養する。翌日、(250 mL調節板付きエルレンマイアースコ内の) $50 \mu g/ml$ のスペクチノマイシン、 $25 \mu g/ml$ のクロラムフェニコール、および $50 \mu g/ml$ のカルベニシリンを含有する20 mLのTM3培地中で、これらを0.1のOD600に希釈して、 $34^\circ C$ および200 rpmで培養する。2時間の増殖後、OD600を測定して、200 μM のIPTGを添加する。発酵経過中に、サンプルを定期的に採取する。各時点で、OD600を測定をする。また、ガスクロマトグラフ質量分光計 (GC-MS) (Agilent) ヘッドスペースアッセイを使用して、イソプレレン発生気体分析も実施される。全ブロスの100 μl のサンプルを96ウェルガラスブロックに入れる。ガラスブロックをアルミホイルで密封し、Thermomixerを使用して、450 rpmで振盪しながら $34^\circ C$ で30分間培養する。30分後に、ブロックを $70^\circ C$ の水浴内に2分間保持し、ガスクロマトグラフ質量分析法を使用して、ヘッドスペース測定中のイソプレレンレベルを判定する。報告された比生産性は、培養時間 (30分間) および測定されたOD600で除した、 $\mu g/L$ 単位のイソプレレン量のGCによる読み取りである。

40

【0484】

実施例10：15 L規模でのホスホケトラゼを発現する組換え宿主細胞内のイソプレレン生産

イソプレレン産生大腸菌 (*E. coli*) 株を構築して、バークホルデリア・フィトフィルマンス (*Burkholderia phytofirmans*) Ps JN、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) NRRL B-3

50

0929、ビフィドバクテリウム・ガリウム (*Bifidobacterium gallicum*) DSM 20093、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*) Bd1、またはビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) IPLA 20015からのホスホケトラーゼ、または表1、表2、またはクラスター1～22からのPKL (図面3～24を参照されたい)、完全MVA経路およびイソプレニンターゼを発現させる。イソプレニン生産のための15リットル規模の実験において、ホスホケトラーゼを発現しなかったイソプレニン産生株を対照として使用する。

【0485】

(i) 材料

培地レシピ (発酵培地1リットルあたり) :

7.5 gの K_2HPO_4 、2 gの $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2 gのクエン酸一水和物、0.3 gのクエン酸第二鉄アンモニウム、0.5 gの酵母抽出物、1.6 mLの50%硫酸、1 mLの1000×修正微量金属溶液。全ての成分を合わせて DiH_2O に溶解する。この溶液を加熱滅菌する (123℃で20分間)。水酸化アンモニウム (28%) によってpHを7.0に調節し、所定容積にする。滅菌およびpH調節後に、10 gのグルコース、8 mLのビタミン溶液、および抗生物質を添加する。

【0486】

1000×修正微量金属溶液 (1リットルあたり) :

40 gのクエン酸 $\cdot H_2O$ 、30 gの $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、10 gの $NaCl$ 、1 gの $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1 gの $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、1 gの $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、100 mgの $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、100 mgの H_3BO_3 、100 mgの $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 。各成分を DiH_2O に1つずつ溶解して、 $HCl/NaOH$ でpHを3.0に調節し、次に溶液を所定容積にして、0.22ミクロンフィルターで濾過滅菌した。

【0487】

ビタミン溶液 (1リットルあたり) :

1.0 gの塩酸チアミン、1.0 gのD-(+)-ビオチン、1.0 gのニコチン酸、4.0 gの塩酸ピリドキシン。各成分を DiH_2O に1つずつ溶解して、 $HCl/NaOH$ でpHを3.0に調節し、次に溶液を所定容積にして、0.22ミクロンフィルターで濾過滅菌した。

【0488】

マクロ塩溶液 (1リットルあたり) :

296 gの $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、296 gのクエン酸一水和物、49.6 gのクエン酸第二鉄アンモニウム。全ての成分を水に溶解して所定容積にし、0.22ミクロンフィルターによって濾過滅菌した。

【0489】

供給液 (1キログラムあたり) :

0.590 kgのグルコース、0.393 kgの DiH_2O 、7.4 gの K_2HPO_4 、および8.9 gの100%Foamblast 882。全ての成分を混ぜ合わせて、高圧蒸気滅菌した。供給液の高圧蒸気滅菌後、クリーンベンチ内で栄養素補給剤を供給ボトルに入れる。供給物への滅菌後添加物は (供給液1キログラムあたり)、5.54 mLのマクロ塩溶液、6.55 mLのビタミン溶液、0.82 mLの1000×修正微量金属溶液である。

【0490】

(ii) 分析

発生気体中のイソプレニン、酸素、窒素、および二酸化炭素レベルは、iSCAN (Hamilton Sundstrand)、およびHidden HPR20 (Hidden Analytical) 質量分光計の2つの質量分光計によって、独立して測定される。発酵ブロス中の溶存酸素は、Hamilton Companyによって提供される光学センサー付きの清潔な滅菌適性プローブによって測定される。発酵槽ブロス中のクエン酸

10

20

30

40

50

、グルコース、酢酸、およびメバロン酸濃度は、4時間間隔で収集されるブロスサンプル中で、HPLC分析によって判定される。ブロスサンプル中の濃度は、既知濃度の標準物質を使用してあらかじめ作成された検量線に対する、屈折率応答の比較によって判定される。

【0491】

実施例11：同定されたホスホケトラーゼを発現する株中のアモルファジエンまたはファルネセンの生産

イソプレノイド産生大腸菌 (*E. coli*) 株を構築して、バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*) PsJN、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) NRRL B-30929、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium galli*) DSM 20093、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*) Bd1、またはビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) IPLA 20015からのホスホケトラーゼ、または表1、表2、またはクラスター1～22からのPKL (図面3～24を参照されたい)、完全MVA経路、およびファルネセンシンターゼまたはアモルファジエンシンターゼをコードするコドン最適化遺伝子を発現させる。アモルファジエンまたはファルネセンの生産実験において、イソプレノイド産生ホスホケトラーゼを発現しなかった株を対照として使用する。

【0492】

(i) 材料

TM3培地レシピ (1リットルの発酵培地あたり) :

13.6 gの K_2HPO_4 、13.6 gの KH_2PO_4 、2 gの $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2 gのクエン酸一水和物、0.3 gのクエン酸第二鉄アンモニウム、3.2 gの $(NH_4)_2SO_4$ 、0.2 gの酵母抽出物、1 mlの1000×微量金属溶液。全ての成分を合わせて、 dH_2O に溶解する。水酸化アンモニウム (30%) によってpHを6.8に調節し、所定容積にする。次に培地を0.22ミクロンのフィルターで濾過滅菌する。滅菌およびpH調節後、10.0 gのグルコースおよび抗生物質を添加する。

【0493】

1000×微量金属溶液 (1リットルの発酵培地あたり) :

40 gのクエン酸 $\cdot H_2O$ 、30 gの $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、10 gの $NaCl$ 、1 gの $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1 gの $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、1 gの $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、100 mgの $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、100 mgの H_3BO_3 、100 mgの $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 。各成分を1つずつ、 dH_2O に溶解する。pHをHCl/NaOHで約3.0に調節し、次に溶液を所定容積にして、0.22ミクロンフィルターで濾過滅菌する。

【0494】

(ii) 実験手順

ルリア・ベルターニブロス+抗生物質中で、細胞を一晩培養する。翌日、(250 mL調節板付きエルレンマイヤーフラスコ内の) 50 $\mu g/ml$ のスペクチノマイシン、25 $\mu g/ml$ のクロラムフェニコール、および50 $\mu g/ml$ のカルベニシリンを含有する20 mLのTM3培地中で、これらを0.05のOD600に希釈して、34℃および200 rpmで培養する。接種前に、先に記載されたようにして、各培養物フラスコに20% (v/v) ドデカン (Sigma-Aldrich) のオーバーレイを添加して、揮発性セスキテルペン生成物を捕捉する (Newman et al., 2006)。

【0495】

2時間の増殖後、OD600を測定して、0.05～0.40 mMのイソプロピル β -D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加する。発酵経過中に、サンプルを定期的に採取する。各時点で、OD600を測定をする。また、ドデカンオーバーレイを酢酸エチル中で希釈することで、有機層内のアモルファジエンまたはファルネセン濃度もア

ッセイされる。ドデカン／酢酸エチル抽出物は、以前記載されたようにして (Martin et al., Nat. Biotechnol. 2003, 21: 96-802)、アモルファジエンのための分子イオン (204 m/z) および 189 m/z 断片イオンまたはファルネセンのための分子イオン (204 m/z) をモニタリングすることで、GC-MS 方法によって分析される。既知濃度のアモルファジエンまたはファルネセンサンプルを注入して、アモルファジエンまたはファルネセンの標準曲線をそれぞれ作成する。アモルファジエンまたはファルネセン標準曲線をそれぞれ使用して、サンプル中のアモルファジエンまたはファルネセンの量を計算する。

【0496】

実施例 12: イソプレン生産のための宿主変異を保有するホスホケトラーゼ発現株の構築

バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*) Ps JN、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) NRRL B-30929、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*Bifidobacterium galli*) DSM 20093、ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*) Bd1、またはビフィドバクテリウム・ピフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) IPLA 20015 からの PKL、または表 1、表 2、またはクラスター 1~22 からの PKL を含んでなるイソプレン産生株 (図面 3~24 を参照されたい) は、リボース-5-リン酸イソメラーゼ (rpiA および/または rpiB)、D-リブローズ-5-リン酸-3-エピメラーゼ (rpe)、トランスケトラーゼ (tktA および/または tktB)、トランスアルドラーゼ B (talB)、ホスホエノールピルビン酸シンセターゼ (ppsA)、リン酸アセチルトランスフェラーゼ (pta および/または eutD) をはじめとする遺伝子の 1 つまたは複数の活性が増大して、ホスホケトラーゼ経路を通過する炭素流が改善するように、さらに操作し得る (図 38)。特定の態様では、遺伝子 rpiA、rpiB、rpe、tktA、tktB、talB、ppsA、eutD、および/または pta の活性は、染色体上のプロモーターおよび/または rbs を改変することで、またはそれをプラスミドから発現させることで増大させ得る。一実施形態では、リボース-5-リン酸イソメラーゼ (rpiA および/または rpiB) の活性は、染色体上のプロモーターおよび/または rbs を改変することで、またはそれをプラスミドから発現させることで増大される。別の実施形態では、D-リブローズ-5-リン酸-3-エピメラーゼ (rpe) の活性は、染色体上のプロモーターおよび/または rbs を改変することで、またはそれをプラスミドから発現させることで増大される。別の実施形態では、トランスケトラーゼ (tktA および/または tktB) の活性は、染色体上のプロモーターおよび/または rbs を改変することで、またはそれをプラスミドから発現させることで増大される。さらに別の実施形態では、トランスアルドラーゼ B (talB) の活性は、染色体上のプロモーターおよび/または rbs を改変することで、またはそれをプラスミドから発現させることで増大される。別の実施形態では、ホスホエノールピルビン酸シンセターゼ (ppsA) の活性は、染色体上のプロモーターおよび/または rbs を改変することで、またはそれをプラスミドから発現させることで増大される。なおも別の実施形態では、リン酸アセチルトランスフェラーゼ (pta および/または eutD) の活性は、染色体上のプロモーターおよび/または rbs を改変することで、またはそれをプラスミドから発現させることで増大される。特定の態様では、遺伝子 rpiA、rpiB、rpe、tktA、tktB、talB、ppsA、eutD、および/または pta のイソ酵素は、染色体上のプロモーターおよび/または rbs を改変することで、またはそれをプラスミドから発現させることで増大させ得る。

【0497】

これらの株は、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (zwf)、6-ホスホフルクトキナーゼ-1 (pfkA および/または pfkB)、フルクトース二リン酸アルドラーゼ (fba、fbaA、fbaB、および/または fbaC)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (gapA および/または gapB)、酢酸キナーゼ (ac

10

20

30

40

50

kA)、クエン酸シンターゼ (gltA)、トランスケトラーゼ (tktAおよび/または tktB)、EI (ptsI)、EIICB^{Glc} (ptsG)、EIIA^{Glc} (crr)、および/または HPr (ptsH)をはじめとする遺伝子の活性の1つまたは複数を低下させて、ホスホケトラーゼ経路に向かう炭素流を増大させるように、さらに操作し得る (図39)。一実施形態では、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする zwf 遺伝子が下方制御される。別の実施形態では、6-ホスホフルクトキナーゼ-1Aをコードする pfkA 遺伝子が下方制御される。別の実施形態では、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼAをコードする gapA 遺伝子が下方制御される。別の実施形態では、フルクトース二リン酸アルドラーゼをコードする fba 遺伝子が下方制御される。さらに別の実施形態では、クエン酸シンターゼをコードする gltA 遺伝子が下方制御される。一実施形態では、酢酸キナーゼをコードする ackA 遺伝子が下方制御される。別の実施形態では、EIをコードする ptsI 遺伝子が下方制御される。一実施形態では、HPrをコードする ptsH 遺伝子が下方制御される。別の実施形態では、EIICB^{Glc}をコードする ptsG 遺伝子が下方制御される。さらに別の実施形態では、EIIA^{Glc}をコードする crr 遺伝子が下方制御される。ptsオペロンは、ホストランスフェラーゼ系の遺伝子をコードする。いくつかの実施形態では、株は、ホストランスフェラーゼ系 (PTS)の活性を低下させ、ホスホケトラーゼ経路に向かう炭素流を増大させるように操作し得る。いくつかの実施形態では、PTSは、ptsオペロンの下方制御によって、下方制御される。特定の態様では、PTSは下方制御されて、グルコース輸送経路は上方制御される。グルコース輸送経路としては、ガラクトース (galP) およびグルコキナーゼ (glk) 遺伝子が挙げられるが、これに限定されるものではない。いくつかの実施形態では、ptsオペロンは下方制御され、ガラクトース (galP) 遺伝子は上方制御され、グルコキナーゼ (glk) 遺伝子は上方制御される。特定の態様では、遺伝子 zwf、pfkA、fba、gapA、ackA、gltA、tktA、ptsG、ptsH、ptsI、および/または crrによってコードされるタンパク質のイソ酵素を下方制御して、ホスホケトラーゼ経路に向かう炭素流を増大させ得る。いくつかの実施形態では、pfkB 遺伝子は下方制御される。いくつかの実施形態では、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼB (gapB) 遺伝子は下方制御される。いくつかの実施形態では、トランスケトラーゼB (tktB) 遺伝子は下方制御される。

【0498】

実施例13：小規模での宿主変異を保有するホスホケトラーゼ発現株によるイソプレンの生産

実施例12に記載されるイソペン生産株を小規模でのイソペン生産について評価する。

【0499】

(i) 材料

TM3培地レシピ (1リットルの発酵培地あたり) :

13.6gのK₂HPO₄、13.6gのKH₂PO₄、2gのMgSO₄・7H₂O、2gのクエン酸一水和物、0.3gのクエン酸第二鉄アンモニウム、3.2gの(NH₄)₂SO₄、0.2gの酵母抽出物、1mlの1000×微量金属溶液。全ての成分を合わせて、dH₂Oに溶解する。水酸化アンモニウム (30%)によってpHを6.8に調節し、所定容積にする。培地を0.22ミクロンのフィルターで濾過滅菌する。pH調節および滅菌後、グルコース10.0gおよび抗生物質を添加する。

【0500】

1000×微量金属溶液 (1リットルの発酵培地あたり)

40gのクエン酸・H₂O、30gのMnSO₄・H₂O、10gのNaCl、1gのFeSO₄・7H₂O、1gのCoCl₂・6H₂O、1gのZnSO₄・7H₂O、100mgのCuSO₄・5H₂O、100mgのH₃BO₃、100mgのNaMoO₄・2H₂O。各成分を1つずつ、dH₂Oに溶解する。pHをHCl/NaOHで約3

． 0 に調節し、次に溶液を所定容積にして、0． 2 2 ミクロンフィルターで濾過滅菌する。

【0501】

(i i) 実験手順

ルリア・ベルターニブロス+抗生物質中で、細胞を一晩培養する。翌日、(250 mL 調節板付きエルレンマイアースコ内の) 50 μ g/mL のスペクチノマイシン、25 μ g/mL のクロラムフェニコール、および 50 μ g/mL のカルベニシリンを含有する 20 mL の T M 3 培地中で、これらを 0． 1 の O D 6 0 0 に希釈して、34℃および 200 r p m で培養する。2 時間の増殖後、O D 6 0 0 を測定して、200 μ M の I P T G を添加する。発酵経過中に、サンプルを定期的に採取する。各時点で、O D 6 0 0 を測定をする。また、ガスクロマトグラフ質量分光計 (G C - M S) (A g i l e n t) ヘッドスペースアッセイを使用して、イソプレン発生気体分析も実施される。100 マイクロリットルの全ブロスを密封 G C バイアルに入れて、34℃および 200 r p m で、30 分間の所定時間にわたり培養する。70℃で 7 分間のインキュベーションからなる熱殺菌ステップに続いて、サンプルを G C に装入する。報告された比生産性は、培養時間 (30 分間) および測定された O D 6 0 0 で除した、 μ g/L 単位のイソプレン量の G C による読み取りである。

10

【0502】

実施例 14：15 L 規模での宿主変異を保有するホスホケトラゼー発現株によるイソプレンの生産

20

実施例 12 に記載されるイソプレン産生株を 15 L 規模でのイソプレン生産について評価する。

【0503】

(i) 材料

培地レシピ (発酵培地 1 リットルあたり)：

7． 5 g の K 2 H P O 4、2 g の M g S O 4 * 7 H 2 O、2 g のクエン酸一水和物、0． 3 g のクエン酸第二鉄アンモニウム、0． 5 g の酵母抽出物、1． 6 mL の 50 % 硫酸、1 mL の 1000 $\times$ 修正微量元素溶液。全ての成分を合わせて D i H 2 O に溶解した。この溶液を加熱滅菌した (123℃で 20 分間)。水酸化アンモニウム (28%) によって p H を 7． 0 に調節し、所定容積にした。滅菌および p H 調節後に、10 g のグルコース、8 mL のビタミン溶液、および抗生物質を添加した。

30

【0504】

1000 $\times$ 修正微量元素溶液 (1 リットルあたり)：

40 g のクエン酸 * H 2 O、30 g の M n S O 4 * H 2 O、10 g の N a C l、1 g の F e S O 4 * 7 H 2 O、1 g の C o C l 2 * 6 H 2 O、1 g の Z n S O * 7 H 2 O、100 mg の C u S O 4 * 5 H 2 O、100 mg の H 3 B O 3、100 mg の N a M o O 4 * 2 H 2 O。各成分を D i H 2 O に 1 つずつ溶解して、H C l / N a O H で p H を 3． 0 に調節し、次に溶液を所定容積にして、0． 2 2 ミクロンフィルターで濾過滅菌した。

【0505】

ビタミン溶液 (1 リットルあたり)：

40

1． 0 g の塩酸チアミン、1． 0 g の D - (+) - ビオチン、1． 0 g のニコチン酸、4． 0 g の塩酸ピリドキシン。各成分を D i H 2 O に 1 つずつ溶解して、H C l / N a O H で p H を 3． 0 に調節し、次に溶液を所定容積にして、0． 2 2 ミクロンフィルターで濾過滅菌した。

【0506】

マクロ塩溶液 (1 リットルあたり)：

296 g の M g S O 4 * 7 H 2 O、296 g のクエン酸一水和物、49． 6 g のクエン酸第二鉄アンモニウム。全ての成分を水に溶解して所定容積にし、0． 2 2 ミクロンフィルターによって濾過滅菌した。

【0507】

50

供給液（１キログラムあたり）：

０．５９０ｋｇのグルコース、０．３９３ｋｇのＤｉ H₂O、７．４ｇのＫ₂HPO₄、および８．９ｇの１００％Foamblast 882。全ての成分を混ぜ合わせて、高圧蒸気滅菌した。供給液の高圧蒸気滅菌後、クリーンベンチ内で栄養素補給剤を供給ボトルに入れる。供給物への滅菌後添加物は（供給液１キログラムあたり）、５．５４ｍｌのマクロ塩溶液、６．５５ｍｌのビタミン溶液、０．８２ｍｌの１０００×修正微量金属溶液である。

【０５０８】

（ｉｉ）分析

発生気体中のイソプレン、酸素、窒素、および二酸化炭素レベルは、iSCAN（Hamilton Sundstrand）、およびHidden HPR20（Hidden Analytical）質量分光計の２つの質量分光計によって、独立して測定される。発酵プロセス中の溶存酸素は、Hamilton Companyによって提供される光学センサー付きの清潔な滅菌適性プローブによって測定される。発酵槽プロセス中のクエン酸、グルコース、酢酸、およびメバロン酸濃度は、４時間間隔で収集されるプロセスサンプル中で、HPLC分析によって判定される。プロセスサンプル中の濃度は、既知濃度の標準物質を使用してあらかじめ作成された検量線に対する、屈折率応答の比較によって判定される。

【０５０９】

実施例１５：ホスホケトラゼ小規模評価のために使用された株

ホスホケトラゼ発現株は、標準分子生物学的技術を使用して作成され、その中ではMCM-1225（pMCM1225--pCL P_{trc}-E. gallinarum Upper MVA）と共に、特定のPKLがMD-891（BL2+G11.2 g1t A_{yh}fSFRTPydddVIs pA_{yh}fS_{thi}FRTtruncIspA PGL ML+FRT-PL. 2-3 cis-RBS10000-mvk（burtonii）ackA::FRT）に形質転換される。株を表１０に列挙する。

【０５１０】

【表１３】

表 10.ホスホケトラゼ小規模評価のために使用された株

起源	PKL#	アミノ酸 配列番号	pTrc_IspS_IDI プラスミド	MD891 株	(MCM1225)
E. フェシウム (E. faecium)	1	23	MCS811	MCS865	MCS932
L. グレイ (L. grayi)	2	24	MCS812	MCS866	MCS933
E. カセリフラブス (E. casseliflavus)	3	25	MCS813	MCS867	MCS934
M. アリガトリス (M. alligatoris)	4	26	MCS814	MCS868	MCS935
カルノバクテリウム属 (Carnobacterium)	5	27	MCS815	MCS869	MCS936
M. プルトニウス (M. plutonius) ATCC	6	28	MCS816	MCS870	MCS937
T. ハロフィルス (T. halophilus)	7	29	MCS817	MCS871	MCS938
M. プルトニウス (M. plutonius) DAT	8	30	MCS818	MCS872	MCS939
M. アルスリチディス (M. arthritidis)	9	31	MCS819	MCS873	MCS940
S. アガラクチアエ (S. agalactiae)	10	32	MCS820	MCS874	MCS941

【０５１１】

【表 1 4】

M. アガラクチアエ (<i>M. agalactiae</i>)	11	33	MCS821	MCS875	MCS942
S. ゴルドニイ (<i>S. gordonii</i>)	12	34	MCS822	MCS876	MCS943
K. オラリス (<i>K. oralis</i>)	13	35	MCS823	MCS877	MCS944
M. フェルメンタンス (<i>M. fermentans</i>)	14	36	MCS824	MCS878	MCS945
G. アディアセンス (<i>G. adiacens</i>)	15	37	MCS825	MCS879	MCS946
M. ホミニス (<i>M. hominis</i>)	16	38	MCS826	MCS880	MCS947
M. クロコディリ (<i>M. crocodyli</i>)	17	39	MCS827	MCS881	MCS948
ナイセリア属 (<i>Neisseria</i>)	18	40	MCS828	MCS882	MCS949
E. コレオコラ (<i>E. coleocola</i>)	19	41	MCS829	MCS883	MCS950
A. ウリナエ (<i>A. urinae</i>)	20	42	MCS830	MCS884	MCS951
K. キングエ (<i>K. kingae</i>)	21	43	MCS831	MCS885	MCS952
S. クリセチ (<i>S. criceti</i>) (#1)	22	44	MCS832	MCS886	MCS953
S. クリセチ (<i>S. criceti</i>) (#2)	23	45	MCS833	MCS887	MCS954
M. コランビナム (<i>M. columbinum</i>)	24	46	MCS834	MCS888	MCS955
M. ギルバム (<i>M. gilvum</i>)	25	1	MCS835	MCS889	MCS956
S. バルチカ (<i>S. baltica</i>)	26	2	MCS836	MCS890	MCS957
L. ラムノーサス (<i>L. rhamnosus</i>)	27	3	MCS837	MCS891	MCS958
L. クリスパータス (<i>L. crispatus</i>)	28	4	MCS838	MCS892	MCS959
L. シトレウム (<i>L. citreum</i>)	29	6	MCS839	MCS893	MCS960
ブラディリゾビウム属 (<i>Bradyrhizobium</i>)種	30	7	MCS840	MCS894	MCS961
B. ミクロチ (<i>B. microti</i>)	31	9	MCS841	MCS895	MCS962
L. サリバリウス (<i>L. salivarius</i>)	32	10	MCS842	MCS896	MCS963
R. イムテケンシス (<i>R. imtechensis</i>)	33	12	MCS843	MCS897	MCS964
B. ゼノボランス (<i>B. xenovorans</i>)	34	13	MCS844	MCS898	MCS965
M. イントラセルラーレ (<i>M. intracellulare</i>)	35	14	MCS845	MCS899	MCS966
ニトロソモナス属 (<i>Nitrosomonas</i>)種	36	15	MCS846	MCS900	MCS967
S. ボンベ (<i>S. pombe</i>)	37	16	MCS847	MCS901	MCS968
L. ブフネリ (<i>L. buchneri</i>)	38	19	MCS848	MCS902	MCS969
S. ガーナエンシス (<i>S. ghanaensis</i>)	39	20	MCS849	MCS903	MCS970
シアノセイス属 (<i>Cyanothece</i>)種	40	21	MCS850	MCS904	MCS971
N. フィスケリ (<i>N. fischeri</i>)	41	22	MCS851	MCS905	MCS972
L. ラクチス (<i>L. lactis</i>)	42	105	MCS852	MCS906	MCS973
E. ガリナーラム (<i>E. gallinarum</i>) (CON)		93	EWL1421	MCS908	MCS975

【0 5 1 2】

実施例 1 6：同定されたホスホクトラーゼ（PKL）の発現におけるホスホクトラーゼ活性の生体内スクリーニング

実施例 7で上述したように、ホスホクトラーゼ活性について生体内スクリーニングを実施した。宿主細胞のバックグラウンドは、プラスミド pMCS811-pMCS852がある DW-809 であり、特徴的なホスホクトラーゼを含有する。

10

20

30

40

50

【0513】

このホスホクトラーゼ（PKL）酵素セットの生体内増殖を評価するために、IPTG-誘導性プロモーターからPKLおよびイソプレンスインターゼの双方を発現するプラスミドで、実施例7に記載されるトランスクトラーゼ二重変異体株であるDW809株を形質転換した（完全な一覧は、表11を参照されたい）。芳香族補給剤を添加したM9グルコース最少培地プレート上の増殖によって個々の形質転換体を同定し、一晚培養して、次に実施例7に記載されるようにして、芳香族補給剤なしのグルコースまたはキシロースのどちらかの上での増殖能力について、EnzyScreen Growth Profilerの上でアッセイした。誘導のために使用したIPTGの濃度範囲は、0、20、40、60、80、100、200、および400 μ Mであった。グルコースまたはキシロース上の増殖について性能指標（PI）を計算するために、成長曲線の特定時点（典型的に30～40時間目）における対照のODについて、各実験株のODを正規化した。このアッセイでは、増殖について最大PIを示す実験株が、最も好ましい生体内活性のあるPKL酵素を発現した一方で、PIの低い株は、同様に良好には機能しないPKLを発現した。0、100、および400 μ MにおけるPIが計算され、異なる誘導レベルにおける総合的増殖能力を代表するものであった。これらは、表11で例証される。

10

【0514】

【表 15】

表 11. グルコースまたはキシロース上における増殖の性能指標(PI)

起源	PKL#	DW-809 株	PI 0 グル コース	PI 100 グル コース	PI 400 グル コース	PI 0 キシ ロース	PI 100 キシ ロース	PI 400 キシ ロース
E. フェシウム (E. faecium)	1	MCS811	0.55	0.69	0.93	0.84	0.67	0.77
L. グレイー (L. grayi)	2	MCS812	0.76	0.84	0.67	1.14	0.50	0.45
E. カセリフラブス (E. casseliflavus)	3	MCS813	4.73	0.50	0.47	2.27	0.77	0.36
M. アリガトリ (M. alligatoris)	4	MCS814	4.54	0.66	0.99	1.10	1.11	1.20
カルノバクテリウム属 (Carnobacterium)	5	MCS815	0.72	0.06	0.06	0.49	0.09	0.17
M. プルトニウス (M. plutonius) ATCC	6	MCS816	0.13	0.30	0.11	0.47	0.16	0.30
T. ハロフィルス (T. halophilus)	7	MCS817	0.06	0.02	0.03	0.39	0.07	0.05
M. プルトニウス (M. plutonius) DAT	8	MCS818	0.17	0.11	0.08	0.85	0.18	0.15
M. アルスリチディス (M. arthritidis)	9	MCS819	2.26	0.43	0.66	9.52	1.33	0.95
S. アガラクチアエ (S. agalactiae)	10	MCS820	3.23	0.96	0.79	0.64	0.61	0.59
M. アガラクチアエ (M. agalactiae)	11	MCS821	1.26	0.94	1.19	11.47	0.88	0.38
S. ゴルドニイ (S. gordonii)	12	MCS822	3.46	0.55	0.54	2.66	1.08	0.65
K. オラリス (K. oralis)	13	MCS823	4.39	0.67	0.59	2.49	0.82	0.57
M. フェルメンタンス (M. fermentans)	14	MCS824	1.48	0.34	0.32	5.70	0.12	0.15
G. アディアセンス (G. adiacens)	15	MCS825	3.87	0.63	0.65	2.48	0.59	0.49
M. ホミニス (M. hominis)	16	MCS826	1.83	0.92	0.83	18.42	2.79	0.54
M. クロコディリ (M. crocodyli)	17	MCS827	0.08	0.05	0.06	0.54	0.08	0.07
ナイセリア属 (Neisseria)	18	MCS828	1.30	0.60	0.84	11.47	0.54	0.24
E. コレオコラ (E. coleocola)	19	MCS829	0.10	0.08	0.13	1.18	0.09	0.05
A. ウリナエ (A. urinae)	20	MCS830	3.79	0.81	0.84	2.75	0.53	1.10

【0515】

【表 16】

K. キングエ (<i>K. kingae</i>)	21	MCS831	5.09	0.81	1.06	2.36	0.98	1.28
S. クリセチ (<i>S. criceti</i>) #1	22	MCS832	1.22	0.50	0.52	7.44	0.28	0.61
S. クリセチ (<i>S. criceti</i>) #2	23	MCS833	1.46	1.52	1.44	16.23	0.64	0.30
M. コランビナム (<i>M. columbinum</i>)	24	MCS834	1.47	0.13	0.30	2.96	0.30	0.46
M. ギルバム (<i>M. gilvum</i>)	25	MCS835	0.34	0.08	0.09	1.38	0.10	0.16
S. バルチカ (<i>S. baltica</i>)	26	MCs836	0.11	0.04	0.08	1.17	0.07	0.03
L. ラムノーサス (<i>L. rhamnosus</i>)	27	MCS837	0.43	0.11	0.13	0.58	0.39	0.70
L. クリスパータス (<i>L. crispatus</i>)	28	MCS838	1.02	0.19	0.25	0.37	0.05	0.12
L. シトレウム (<i>L. citreum</i>)	29	MCS839	1.34	0.84	0.67	1.43	0.36	0.75
ブラディリゾビウム属 (<i>Bradyrhizobium</i>)種	30	MCS840	0.38	0.09	0.10	0.39	0.11	0.17
B. ミクロチ (<i>B. microti</i>)	31	MCS841	0.38	0.12	0.10	0.64	0.13	0.22
L. サリバリウス (<i>L. salivarius</i>)	32	MCS842	0.48	1.33	2.39	1.92	2.20	0.99
R. イムテケンシス (<i>R. imtechensis</i>)	33	MCS843	0.22	1.36	0.06	0.38	0.01	0.01
B. ゼノボランス (<i>B. xenovorans</i>)	34	MCS844	0.72	0.25	0.25	0.37	0.07	0.15
M. イントラセルラーレ (<i>M. intracellulare</i>)	35	MCS845	0.12	0.03	0.07	0.74	0.11	0.13
ニトロソモナス属 (<i>Nitrosomonas</i>)種	36	MCS846	0.08	0.04	0.07	0.71	0.13	0.12
S. ポンベ (<i>S. pombe</i>)	37	MCS847	0.83	0.27	0.23	0.43	0.07	0.12
L. ブフネリ (<i>L. buchneri</i>)	38	MCS848	0.75	0.23	0.26	1.63	0.07	0.15
S. ガーナエンシス (<i>S. ghanaensis</i>)	39	MCs849	0.70	0.28	0.00	0.33	0.10	0.12
N. フィスケリ (<i>N. fischeri</i>)	41	MCS851	0.32	0.07	0.06	0.54	0.01	0.01
L. ラクチス (<i>L. lactis</i>)	42	MCS852	0.82	0.37	0.06	0.33	0.13	0.14
E. ガリナールム (<i>E. gallinarum</i>) (CON)		EWL1421	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

【0516】

実施例 17：ホスホケトラーゼ発現株中のイソプレレン収率およびイソプレレン比生産性の小規模評価

実施例 15 に記載されるイソプレレン産生株を小規模でのイソプレレン生産について評価した。

【0517】

(i) 材料と方法

酵母抽出物、 $MgSO_4$ 、グルコース、IPTG、スペクチノマイシン、およびカルベニシリンは、Sigma から購入された。アルミホイルシール、48 ウェル無菌 5 mL ブロック、Breathe Easier シールメンブレン、96 ウェルマイクロ力価プレート、および 96 ウェル円錐底プレートは、VWR から購入された。96 ウェルガラスブ

ロックは、Z i n s s e r A n a l y t i cから購入された。装置：5 9 7 3 N質量分光計を装着したA g i l e n t 6 8 9 0 G C、エッペンドルフ遠心分離機5 4 1 7 R、S o r v a l l L e g e n d R T。

【0518】

成長速度測定

適切な抗生物質と共に3 m l L Bの培地を含有する振盪管に、グリセロール培養物原液を接種した。培養物を3 0 °C、2 2 0 r p mで、およそ1 5時間培養した。

【0519】

T M 3培地(M g S O₄および酵母抽出物なし)、1 %グルコース、8 m MのM g S O₄、0 . 0 2 %酵母抽出物、および適切な抗生物質を組み合わせることで、補足T M 3培地を調製した。2 m Lの補足T M 3に、4 8ウェル無菌ブロックの各ウェル内で、一晚培養物を0 . 2の最終O D₆₀₀で接種した。ブロックをB r e a t h e E a s i e rメンブレンで密封し、6 0 0 r p mおよび3 4 °Cで、2時間培養した。2時間の増殖後、マイクロタイタープレート内でO D₆₀₀を測定し、様々な濃度のI P T Gによって細胞を誘導した。I P T G誘導後4時間にわたり、O D₆₀₀の読み取りを毎時行った。S p e c t r a M a x P l u s 1 9 0 (M o l e c u l a r D e v i c e s)を使用して、O D₆₀₀測定値を判定した。

【0520】

イソブレン収率アッセイ：

T M 3培地(M g S O₄および酵母抽出物なし)、1 %グルコース、8 m MのM g S O₄、0 . 0 2 %酵母抽出物、および適切な抗生物質を組み合わせることで、補足T M 3培地を調製した。2 m Lの補足T M 3培地に、4 8ウェル無菌ブロックの各ウェル内で、0 . 2の最終O D₆₀₀で接種した。9 6ウェルガラスブロック(Z i n s s e r)内で、グルコースまたは酵母抽出物を含まない9 0 μ LのT M 3培地に、1 0 μ Lの接種培養物を移してアルミホイルで密封し、3 4 °Cおよび4 5 0 r p mで2 4時間培養した。2 4時間後、ヘッドスペース内のイソブレンの量と培地に残留するグルコースの量をG C / M Sによって測定し、イソブレン収率を計算した。

【0521】

イソブレン比生産性測定：

1 0 0 μ lの培養物を9 6ウェルガラスブロック内に収集した。ガラスブロックをアルミホイルで密封し、T h e r m o m i x e r (E p p e n d o r f)を使用して、4 5 0 r p mで振盪しながら3 4 °Cで3 0分間培養した。3 0分後、ブロックを7 0 °Cの水浴中で2分間インキュベートした。ガラスブロックを室温に放冷し、次にウェルのヘッドスペース内のイソブレンをG C / M Sによって測定した。

【0522】

グルコース測定：

9 6ウェル円錐底プレート内の3 0 0 μ lの細胞培養物を4 °C、3 0 0 0 r p mで1 0分間遠心処理することで、グルコースサンプルを収集した。上清をD I水で1 0倍に希釈し、記載されるグルコースオキシダーゼアッセイを使用して、グルコース濃度を測定した。

【0523】

グルコースオキシダーゼアッセイ：

A B T Sを5 0 m M酢酸ナトリウム、p H 5の中で可溶化した。グルコースオキシダーゼ(G O X)および西洋ワサビペルオキシダーゼ(H R P)を以下の濃度で添加した：2 . 7 4 m g / m l A B T S (粉末)、0 . 1 U / m l H R P、1 U / m l G O X。容器をホイルで包んで遮光し、4 °Cで最長7日間保存した。所望の濃度範囲にかけて(すなわち、1 m g / m lからの連続2倍希釈)グルコースをミリQ水に溶解して、グルコース標準物質を調製した。1 0 μ lの試験サンプル(希釈反応物上清)および/またはグルコース標準物質をマイクロタイタープレートのウェルに入れた。9 0 μ lのA B T S試薬を添加して、プレートミキサー上で迅速に混合した。アッセイプレートをプレートリーダ

10

20

30

40

50

ーに移し、吸光度を420nmで3～5分間モニターした。データファイルをExcelにエクスポートした。グルコース検量線を使用して、各ウェル内のグルコースの量を計算した。

【0524】

【表17】

表12.GC/MSによるイソプレン検出のためのパラメータ

GCMSパラメータ:		
カラム:		
ZB-5ms 15m x 0.25mm x 0.25μm		
オープン:		
勾配(°C/分)	温度(°C)	保持時間(分間)
0	37	0.6
全操作時間:		
前部入口温度:		0.6分間
分割比:		110°C
流速:		50:1
注入容積:		2 ml/分
MSモード:		100 μL
MSソース:		EI
MS四極子:		230°C
MSD移送ラインヒータ(Aux2):		150°C
SIMモード:		280°C
		67 amu

【0525】

(i i) 結果

(i) 2時間目のイソプレン比生産性；(i i) 4時間目のイソプレン比生産性；(i i i) 増殖速度；および(i v) イソプレン収率のそれぞれの性能指標(P I)を計算するために、成長曲線の特定点(典型的に15～24時間)における対照の特定のパラメータについて、各実験株を正規化した。このイソプレン生産アッセイでは、これらの評価パラメータについて1.0をg P I値を示した実験株は、評価されたPKLのより良い能力を示した。

【0526】

【表 18】

表 13.(i)2 時間目のイソブレン比生産性;(ii)4 時間目のイソブレン比生産性;(iii)増殖速度;および(iv)イソブレン収率の各 PI

起源	PKL#	MD891 株	PI S. 生成物 2h (mg/L/h/OD) -MTP	PI S. 生成物 4h (mg/L/h/OD) -MTP	PI 増殖速度 (5 時間目の OD) -MTP	PI 収率 (24 h) -MTP
E. フェシウム (<i>E. faecium</i>)	1	MCS865	1.29	1.02	1.01	1.07
L. グレイ (<i>L. grayi</i>)	2	MCS866	1.24	0.75	0.99	0.73
E. カセリフラブス (<i>E. casseliflavus</i>)	3	MCS867	0.84	0.62	0.88	0.87
M. アリガトリス (<i>M. alligatoris</i>)	4	MCS868	1.21	0.99	0.90	1.09
カルノバクテリウム属 (<i>Carnobacterium</i>)	5	MCS869	0.82	0.68	1.14	0.50
T. ハロフィルス (<i>T. halophilus</i>)	7	MCS871	1.21	1.17	1.10	0.99
M. プルトニウス (<i>M. plutonius</i>) DAT	8	MCS872	0.00	0.00	0.00	0.00
M. アルスリチデリス (<i>M. arthritidis</i>)	9	MCS873	0.61	0.34	0.72	0.64
S. アガラクチアエ (<i>S. agalactiae</i>)	10	MCS874	1.06	0.93	0.95	1.13
K. オラリス (<i>K. oralis</i>)	13	MCS877	0.92	0.71	0.86	0.99
M. フェルメンタンス (<i>M. fermentans</i>)	14	MCS878	0.25	0.17	0.48	0.03
G. アディアセンス (<i>G. adiacens</i>)	15	MCS879	1.02	0.85	0.86	0.96
M. クロコディリ (<i>M. crocodyli</i>)	17	MCS881	0.67	0.42	0.68	1.03
E. コレオコラ (<i>E. coleocola</i>)	19	MCS883	0.60	0.51	0.61	0.90
A. ウリナエ (<i>A. urinae</i>)	20	MCS884	1.07	1.02	0.89	1.05
S. クリセチ (<i>S. criceti</i>) #1	22	MCS886	1.06	0.83	0.85	0.85
M. コランビナム (<i>M. columbinum</i>)	24	MCS888	0.66	0.31	0.63	0.08
M. ギルバム (<i>M. gilvum</i>)	25	MCS889	1.00	1.02	1.00	0.95
L. ラムノーサス (<i>L. rhamnosus</i>)	27	MCS891	0.66	0.64	1.00	0.70
L. シトレウム (<i>L. citreum</i>)	29	MCS893	1.17	0.84	1.02	0.86
ブラディリゾビウム属 (<i>Bradyrhizobium</i>)種	30	MCS894	1.10	1.15	1.06	0.98
B. ミクロチ (<i>B. microti</i>)	31	MCS895	0.94	0.83	1.04	0.89
R. イムテケンシス (<i>R. imtechensis</i>)	33	MCS897	0.98	0.90	1.05	0.99
B. ゼノボランス (<i>B. xenovorans</i>)	34	MCS898	1.09	0.92	1.15	0.87
M. イントラセルラーレ (<i>M. intracellulare</i>)	35	MCS899	1.12	0.77	1.05	0.82

【表 19】

ニトロソモナス属 (Nitrosomonas)種	36	MCS900	0.64	0.55	1.22	0.63
S. ポンベ (S. pombe)	37	MCS901	0.64	0.63	0.78	0.78
L. ブフネリ (L. buchneri)	38	MCS902	0.92	0.74	1.17	0.65
S. ガーナエンシス (S. ghanaensis)	39	MCS903	0.92	0.86	1.05	0.90
シアノセイス属 (Cyanothecae)種	40	MCS904	0.79	0.55	1.06	0.69
N. フィスケリ (N. fischeri)	41	MCS905	0.79	0.58	1.19	0.58
L. ラクチス (L. lactis)	42	MCS906	1.02	0.85	1.17	0.72
E. ガリナラム (E. gallinarum) (CON)		MCS908	1.00	1.00	1.00	1.00

10

【0528】

実施例 18：PKL 発現株中の細胞内代謝産物の測定

(i) 材料と方法

20

代謝産物抽出：

代謝産物分析のために使用した株は、実施例 17 に記載されるのと同じ株であった。したがって、これらの株を実施例 17 に記載される成長条件下で培養し、4 時間の増殖後にサンプルを採取して、選択された細胞代謝産物の相対濃度を測定した。500 μ L の細胞培養物を遠心分離して収集し、上清を廃棄して 100 μ L の乾燥氷冷メタノールをペレットに添加し、ペレットの入った試験管をドライアイス中で即座に冷凍して、保存のために -80 $^{\circ}$ C の冷蔵庫に入れた。代謝産物を抽出するために、細胞ペレットをメタノールで覆い、ガラス棒を用いて再懸濁し、微量遠心機内で試験管を 5 分間遠心分離して、得られた上清を取り出して清浄な管に入れた。第 1 の抽出ステップ後に得られた細胞ペレットを 40 μ L の 50% メタノール / 10 mM 酢酸アンモニウム混合物に再懸濁し、細胞破片を遠心分離して上清を収集し、第 1 の抽出後に得られた上清と合わせて貯留した。この抽出処理をもう 1 度繰り返して、細胞破片からの代謝産物のより完全な除去を確実にした。

30

【0529】

抽出および遠心分離中に、細胞含有サンプルを 4 $^{\circ}$ C 未満に保ち、代謝産物分解を最小化した。最終貯留抽出物を混合し、次に遠心分離によって透明にした。

【0530】

代謝産物測定：

代謝産物の分析は、TSQ Quantim 三連四重極装置 (Thermo Scientific) 上の LCMS によって実施した。システム制御、データ取得、およびデータ解析は、XCalibur および LCQuan ソフトウェア (Thermo Scientific) によって実行された。製造会社推奨保護カートリッジを装着した C18 Synergi MAX-RP HPLC カラム (150 $\times$ 2 mm、4 μ M、80 A、Phenomenex) に、10 μ L のサンプルを装入した。MilliQ 等級水中の 15 mM の酢酸 + 10 mM のトリブチラミン (溶媒 A) と、Honeywell, Burdick & Jackson からの LCMS 等級メタノール (溶媒 B) との勾配で、カラムを溶出した。22.5 分間の勾配は、次のとおりであった：t = 0 分間、5% B；t = 2 分間、5% B；t = 6 分間、10% B；t = 12 分間、20% B；t = 18 分間、67% B；t = 19 分間、99% B；t = 21 分間、99% B；；t = 21.5 分間、5% B；t = 22.5 分間、5% B；流速 0.4 mL / 分、カラム温度 35 $^{\circ}$ C。質量検出は、3.0 ~ 3.5 kV の ESI スプレー電圧およびイオン移動管の温度 350 $^{\circ}$ C で、負イオンモ

40

50

ードのエレクトロスプレーイオン化を使用して実施された。関心のある代謝産物のために、以下のSRM遷移を選択した：グルコース－6－リン酸（G6P）では259→79、フルクトース－1，6－ニリン酸では339→79、ホスホエノールピルビン酸では167→79、6－ホスホグリセリン酸では275→79、リボース－5－リン酸では259→79 eV、アセチルリン酸では139→79、およびエリスロース－4－リン酸では199→79。各SRM遷移のスキャン時間は、0.7 m/zに設定したスキャン幅で0.1 sであった。1.7 mTorrの衝突ガスとしてアルゴンを使用し、衝突エネルギーを最適化して、Sigma-Aldrichから購入された対応する標準物質を使用して最大シグナル強度を得た。同一標準物質を使用して、測定された代謝産物の滞留時間を確認した。SRM遷移369→79があるピークは、七炭糖－ニリン酸に起因した。測定された代謝産物の濃度は、試料採取中に培養物の光学濃度について正規化されたシグナル強度として表される。

10

【0531】

(ii) 結果

アセチルリン酸（AcP）の生産について性能指標（PI）を計算するために、成長曲線の特定時点（典型的に30～40時間）における対照の特定のパラメータについて、それぞれの実験株からの各代謝産物の量を正規化した。このアッセイでは、これらの評価パラメータについて1.0を超えるPI値を示した実験株は、評価されたPKLのより良い能力を示した。

20

【0532】

【表20】

表 14. 以下の産生の PI:(i)アセチルリン酸(AcP)

起源	PKL #	MD891 株	PI AcP (AU/OD) - MTP
E. フェシウム (E. faecium)	1	MCS865	2.49
L. グレイー (L. grayi)	2	MCS866	0.94

30

【0533】

【表 2 1】

E. カセリフラブス (<i>E. casseliflavus</i>)	3	MCS867	2.12	
M. アリガトリス (<i>M. alligatoris</i>)	4	MCS868	1.75	
カルノバクテリウム属 (<i>Carnobacterium</i>)	5	MCS869	0.35	
M. プルトニウス (<i>M. plutonius</i>) ATCC	6	MCS870	0.00	
T. ハロフィルス (<i>T. halophilus</i>)	7	MCS871	0.48	
M. プルトニウス (<i>M. plutonius</i>) DAT	8	MCS872	0.00	
M. アルスリチデイス (<i>M. arthritidis</i>)	9	MCS873	1.51	
S. アガラクチアエ (<i>S. agalactiae</i>)	10	MCS874	1.06	
M. アガラクチアエ (<i>M. agalactiae</i>)	11	MCS875	0.00	10
S. ゴルドニイ (<i>S. gordonii</i>)	12	MCS876	0.00	
K. オラリス (<i>K. oralis</i>)	13	MCS877	2.26	
M. フェルメンタンス (<i>M. fermentans</i>)	14	MCS878	0.54	
G. アディアセンス (<i>G. adiacens</i>)	15	MCS879	1.47	
M. ホミニス (<i>M. hominis</i>)	16	MCS880	0.00	
M. クロコディリ (<i>M. crocodyli</i>)	17	MCS881	1.71	
ナイセリア属 (<i>Neisseria</i>)	18	MCS882	0.00	
E. コレオコラ (<i>E. coleocola</i>)	19	MCS883	2.93	
A. ウリナエ (<i>A. urinae</i>)	20	MCS884	0.98	
K. キンガエ (<i>K. kingae</i>)	21	MCS885	0.00	20
S. クリセチ (<i>S. criceti</i>) #1	22	MCS886	1.31	
S. クリセチ (<i>S. criceti</i>) #2	23	MCS887	0.00	
M. コランビナム (<i>M. columbinum</i>)	24	MCS888	0.73	
M. ギルバム (<i>M. gilvum</i>)	25	MCS889	0.52	
S. バルチカ (<i>S. baltica</i>)	26	MCS890	0.00	
L. ラムノーサス (<i>L. rhamnosus</i>)	27	MCS891	2.35	
L. クリスパータス (<i>L. crispatus</i>)	28	MCS892	0.00	
L. シトレウム (<i>L. citreum</i>)	29	MCS893	0.76	
ブラディリゾビウム属 (<i>Bradyrhizobium</i>)種	30	MCS894	0.19	
B. ミクロチ (<i>B. microti</i>)	31	MCS895	0.31	30
L. サリバリウス (<i>L. salivarius</i>)	32	MCS896	0.00	
R. イムテケンシス (<i>R. imtechensis</i>)	33	MCS897	0.19	
B. ゼノボランス (<i>B. xenovorans</i>)	34	MCS898	0.16	
M. イントラセルラーレ (<i>M. intracellulare</i>)	35	MCS899	0.40	
ニトロソモナス属 (<i>Nitrosomonas</i>)種	36	MCS900	0.33	
S. ポンベ (<i>S. pombe</i>)	37	MCS901	0.19	
L. ブフネリ (<i>L. buchneri</i>)	38	MCS902	0.19	
S. ガーナエンシス (<i>S. ghanaensis</i>)	39	MCS903	0.76	
シアノセイス属 (<i>Cyanothece</i>)種	40	MCS904	0.15	
N. フィスケリ (<i>N. fischeri</i>)	41	MCS905	0.15	40
L. ラクチス (<i>L. lactis</i>)	42	MCS906	0.19	
E. ガリナールム (<i>E. gallinarum</i>) (CON)		MCS908	1.00	

【0 5 3 4】

実施例 19：ホスホケトラゼのタンパク質発現および溶解度の判定

(i) 材料と方法

評価されたホスホケトラゼのタンパク質発現および溶解度を判定するのに使用された株は、実施例 17 に記載されるのと同じ株であった。株は、適切な抗生物質を含有する LB ブロス中で、34℃で一晩培養した。翌日、100 μL の一晩培養物を適切な抗生物質を含有する 5 mL の LB に添加して、OD (600) が約 0.5 になるまで 34℃で培養

した。次に培養物を200 μ MのIPTGによって誘導し、34℃でさらに6時間培養した。次に細胞を遠心分離して収集し、ペレットを-80℃で保存した。

【0535】

翌日ペレットを解凍し、0.2 mg/ml DNase Iおよび0.5 mM AEBSFを添加した100 mM Tris、100 mM NaCl、pH 7.6の中で、それらを4のOD(600)に再懸濁した。次に細胞をフレンチプレスによって個別に溶解し、細胞破片を遠心分離によって除去した。可溶性留分の平均全タンパク質濃度は、標準Bradfordアッセイによる判定で、0.56 $\pm$ 0.22 mg/mlであった。遠心分離からのペレットは、100 mM Tris、100 mM NaCl、pH 7.6の緩衝液に再懸濁し、各ホスホクテラーゼのパーセント溶解度を判定するために取っておいた。

10

【0536】

次に溶解産物を使用して、総タンパク質単位当たりのフルクトース-6-リン酸(F6P)に対するホスホクテラーゼ(PKL)活性量を判定した(μ mol/分/mg)。F6Pに対するPKL活性は、生成したアセチルリン酸(AcP)の量を追跡することで判定した。反応混合物(200 μ L)は、100 μ Lの溶解産物と共に、100 mM Tris、100 mM NaCl、pH 7.6中の10 mM MgCl₂、10 mM リン酸カリウム(pH 7.6)、1 mM チアミンニリン酸、10 mM F6P、20 mM NaF、8 mM ヨードアセトアミド、1 mM ジチオスレイトールを含有する。これらを34℃で30分間培養し、60 μ Lの反応混合物を60 μ Lの2 M ヒドロキシルアミン、pH 6.5に添加することで、クエンチした。このクエンチ混合物を室温で10分間培養し、次に0.1 M HCl中の40 μ Lの15% TCA、40 μ Lの4 M HCl、および40 μ Lの5% FeCl₃を添加した。次にこの最終混合物を3000 rpmで5分間遠心分離した。上清(200 μ L)を取り出して、505 nmで吸光度を測定した。AcPの検量線を使用して、AcPがどのくらい生産されたかを計算した。

20

【0537】

濃度測定によって、E. ガリナーラム(E. gallinarum) MCS908対照と比較した、各PKL変異体の相対的発現および溶解度を判定した。各サンプルの可溶性溶解産物をゲルローディング色素と1:1で混合し、SDS-PAGEゲル上で泳動した。フレンチプレスによる溶解後にサンプルの遠心分離から得られた各ペレット(上記を参照されたい)は、ゲルローディング色素で1:1に希釈して、SDS-PAGEゲルに装入した。対照として、E. ガリナーラム(E. gallinarum) MCS908可溶性溶解産物のサンプルを各ゲルに含めた。クーマシーブリリアントブルー染色を使用してゲルを発色させ、ImageQuant v2005(GE Healthcare Sciences)濃度測定ソフトウェアを使用して分析した。対照株(E. ガリナーラム(E. gallinarum) MCS908)と比較して、発現した可溶性タンパク質パーセントおよび可溶性対不溶性パーセントを判定した。

30

【0538】

(i) 結果

(i) 総タンパク質量単位当たり(F6P)比活性(μ mol/分/mg)；(ii) 発現レベル；および(iii) 溶解度のそれぞれの性能指標(PI)を計算するために、各実験株を対照の特定のパラメータについて正規化した。(i)のPI値を(ii)のPI値で除算することで、F6P比活性(活性/発現レベル)のPIを判定した。このアッセイでは、これらの評価パラメータについて1.0を超えるPIを示した実験株は、評価されたPKLのより良い能力を示した。

40

【0539】

【表 2 2】

表 15.各 PKL の溶解度および発現

起源	MD891 株	PI F6P S.A. ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 総タンパク質)	PI 発現 レベル (対照に 対する%)	PI 溶解度 (%溶解度)	PI F6P 比活性 (活性/発現 レベル)
L. グレイー (L. grayi)	MCS866	1.22	0.33	0.30	3.69
E. カセリフラブス (E. casseliflavus)	MCS867	2.41	2.35	0.97	1.02
M. アリガトリス (M. alligatoris)	MCS868	0.79	0.26	0.77	3.05
カルノバクテリウム属 (Carnobacterium)	MCS869	0.10	0.09	0.07	1.14
T. ハロフィルス (T. halophilus)	MCS871	0.15	0.05	0.16	3.06
M. アルスリチディス (M. arthritidis)	MCS873	2.52	1.78	0.87	1.41
S. アガラクチアエ (S. agalactiae)	MCS874	1.25	0.49	0.82	2.56
K. オラリス (K. oralis)	MCS877	2.29	1.81	0.96	1.26
M. フェルメンタンス (M. fermentans)	MCS878	0.29	0.21	0.79	1.38
G. アディアセンス (G. adiacens)	MCS879	1.87	1.04	0.99	1.79
M. クロコディリ (M. crocodyli)	MCS881	2.21	1.16	0.61	1.90
E. コレオコラ (E. coleocola)	MCS883	3.18	1.67	0.95	1.90
A. ウリナエ (A. urinae)	MCS884	1.96	1.40	0.98	1.40
M. コランピナム (M. columbinum)	MCS888	1.77	1.75	1.06	1.01
M. ギルバム (M. gilvum)	MCS889	0.65	0.33	0.40	1.96
L. シトレウム (L. citreum)	MCS893	0.90	1.13	1.03	0.80
ブラディリゾビウム属 (Bradyrhizobium)種	MCS894	0.11	0.10	0.29	1.10
B. ミクロチ (B. microti)	MCS895	0.42	0.25	0.90	1.69
R. イムテケンシス (R. imtechensis)	MCS897	0.14	0.06	0.29	2.28
B. ゼノボランス (B. xenovorans)	MCS898	0.23	0.33	0.22	0.69
M. イントラセルラーレ (M. intracellulare)	MCS899	0.14	0.32	0.45	0.43
ニトロソモナス属 (Nitrosomonas)種	MCS900	0.22	0.10	0.13	2.23
S. ボンベ (S. pombe)	MCS901	0.16	0.49	0.18	0.32
L. ブフネリ (L. buchneri)	MCS902	0.06	0.06	0.08	0.97
S. ガーナエンシス (S. ghanaensis)	MCS903	0.67	0.46	0.23	1.45
シアノセイス属 (Cyanothecae)種	MCS904	1.23	0.48	0.77	2.56
N. フィスケリ (N. fischeri)	MCS905	0.07	0.44	0.27	0.15
L. ラクチス (L. lactis)	MCS906	0.23	0.07	0.07	3.24
E. ガリナーラム (E. gallinarum) (CON)	MCS908	1.00	1.00	1.00	1.00

【0 5 4 0】

実施例 20：フルクトースー 6ーリン酸およびキシロロースー 5ーリン酸に対するホスホ
ケトラーゼ活性

10

20

30

40

50

本実施例は、フルクトースー6ーリン酸（F6P）またはキシロースー5ーリン酸（X5P）上で株を培養した際のPKL活性を判定した。

【0541】

（i）材料と方法

株は、適切な抗生物質を含有するLBブロス中で、34℃で一晩培養した。翌日、200μLの一晩培養物を適切な抗生物質を含有する5mLのTM3に添加して、34℃で2.5時間培養した。次に培養物を200μMのIPTGによって誘導し、34℃でさらに4時間培養した。次に細胞を遠心分離して収集し、ペレットを-80℃で保存した。

【0542】

翌日ペレットを解凍し、それらを0.2mg/ml DNase Iおよび0.5mM AEBSFを添加した2mLの100mM HEPES、pH7.8に再懸濁した。次に細胞をフレンチプレスによって個別に溶解し、細胞破片を遠心分離によって除去した。

【0543】

溶解産物調製および酵素活性測定：

次に溶解産物を使用して、フルクトースー6ーリン酸（F6P）およびキシロースー5ーリン酸（X5P）上のホスホクエナールピルビン酸（PKL）活性の量を判定した。F6PおよびX5Pに対するPKL活性は、生成したアセチルリン酸（AcP）の量を追跡することで判定した。F6P反応混合物（200μL）は、100μLの溶解産物と共に、100mM HEPES、pH7.8中の10mM MgCl₂、10mMリン酸カリウム（pH7.6）、1mMチアミンニリン酸、10mM F6P、20mM NaF、8mMヨードアセトアミド、1mMジチオスレイトールを含有した。これらを34℃で30分間培養し、60μLの反応混合物を60μLの2Mヒドロキシルアミン、pH6.5に添加することで、クエンチした。このクエンチ混合物を室温で10分間培養し、次に0.1M HCl中の40μLの15%TCA、40μLの4M HCl、および40μLの5%FeCl₃を添加した。次にこの最終混合物を3000rpmで5分間遠心分離した。上清（200μL）を取り出して、505nmで吸光度を測定した。AcPの検量線を使用して、AcPがどのくらい生産されたかを計算した。同様の方法によってX5P活性を測定した。X5P反応混合物（200μL）は、20μLの溶解産物と共に、100mM HEPES、pH7.8中の10mM MgCl₂、10mMリン酸カリウム（pH7.6）、1mMチアミンニリン酸、10mMリボースー5ーリン酸、60μg/mLのリボースー5ーリン酸ー3ーエピメラーゼ、200μg/mLのリボースー5ーリン酸イソメラーゼA、20mM NaF、8mMヨードアセトアミド、1mMジチオスレイトールを含有した。幅広い活性X5Pに対するのために、活性は未希釈と、100mM HEPES、pH7.8中の5倍希釈との2つの溶解産物濃度で評価した。

【0544】

10

20

30

【表 2 3】

表 16.F6P または X5P に対する PKL 活性

株の説明 (MD-891 株)	F6P		X5P (未希釈)		X5P (5×希釈)		未希釈物 比率 (X/F)	希釈物 比率 (X/F)
	AcP (mM)	比活性	AcP (mM)	比活性	AcP (mM)	比活性		
pMCS842, pMCM1225	0.51	0.19	1.75	3.21	0.41	3.79	17.03	20.16
pMCS836, pMCM1225	0.04	0.04	0.11	0.54	0.085	2.10	15.19	59.62
pEWL1421, pMCM1225	1.19	0.65	3.59	9.74	0.76	10.37	15.06	16.04
pMCS813, pMCM1225	1.99	1.06	4.97	13.19	1.26	16.76	12.49	15.88
pMCS821, pMCM1225	1.98	1.20	4.82	14.59	1.27	19.16	12.20	16.022
pMCS833, pMCM1225	2.02	1.14	4.70	13.28	1.12	15.83	11.68	13.91
pMCS830, pMCM1225	1.45	0.63	3.10	6.73	0.81	8.77	10.67	13.90
pMCS822, pMCM1225	1.52	1.27	3.23	13.48	0.67	13.86	10.61	10.91
pMCS839, pMCM1225	0.37	0.37	0.77	3.85	0.19	4.88	10.45	13.25
pMCS825, pMCM1225	2.02	1.26	4.14	12.92	1.16	18.08	10.22	14.30
pMCS823, pMCM1225	2.51	1.02	4.65	9.48	1.25	12.70	9.28	12.43
pMCS826, pMCM1225	2.43	1.81	4.36	16.19	0.94	17.50	8.95	9.68
pMCS824, pMCM1225	0.37	6.81	0.64	59.24	0.19	89.62	8.69	13.15
pMCS834, pMCM1225	2.04	1.16	3.39	9.61	0.87	12.30	8.32	10.64
pMCS811, pMCM1225	0.87	0.33	1.45	2.80	0.39	3.79	8.31	11.24
pMCS819, pMCM1225	3.53	1.85	5.13	13.45	1.34	17.65	7.26	9.52
pMCS820, pMCM1225	0.81	0.32	1.16	2.26	0.32	3.12	7.18	9.91
pMCS838, pMCM1225	0.24	0.15	0.34	1.06	0.16	2.49	7.05	16.62
pMCS829, pMCM1225	3.30	2.15	4.45	14.46	1.16	18.93	6.73	8.81
pMCS832, pMCM1225	2.10	1.78	2.76	11.73	0.69	14.62	6.59	8.21
pMCS827, pMCM1225	1.33	2.28	1.73	14.84	0.36	15.45	6.51	6.78
pMCS831, pMCM1225	0.78	0.64	0.99	4.08	0.23	4.63	6.41	7.282
pMCS828, pMCM1225	2.62	2.32	3.30	14.62	0.87	19.25	6.31	8.31
pMCS845, pMCM1225	0.19	0.12	0.17	0.53	0.09	1.40	4.36	11.52
pMCS814, pMCM1225	0.54	0.30	0.37	1.01	0.17	2.37	3.36	7.87
pMCS844, pMCM1225	0.21	0.16	0.12	0.47	0.09	1.79	2.89	11.07
pMCS816, pMCM1225	0.19	0.11	0.11	0.33	0.12	1.74	2.87	15.25
pMCS849, pMCM1225	0.82	0.38	0.47	1.08	0.14	1.62	2.83	4.23
pMCS645, pMCM1225	0.22	0.20	0.13	0.56	0.10	2.31	2.81	11.57
pMCS818, pMCM1225	0.18	0.19	0.09	0.48	0.10	2.67	2.54	13.99
pMCS841, pMCM1225	0.78	0.45	0.37	1.09	0.11	1.66	2.42	3.69
pMCS837, pMCM1225	-0.07	-0.03	0.61	1.17	0.10	1.01	-43.14	-37.25

【0 5 4 5】

実施例 2 1：ホスホケトラゼ発現株中のイソプレレン生産の 1 4 L 評価

この実験は、様々なホスホケトラゼ酵素発現のイソプレレン生産に対する影響を評価するために実施した。この実験中の全ての株では、メバロン酸経路由来導入遺伝子、イソプレレンシンターゼ、およびホスホケトラゼ (PKL) を発現する改変大腸菌 (E. coli) 宿主 (BL 2 1 誘導産生宿主 MD 8 9 1) が使用され、株の詳細については表 1 7 を参照されたい。これらのイソプレレン産生株は全て、1 5 L 規模の流加培養中で培養した。

【0 5 4 6】

妥当な能力測定基準は、グルコース、およびイソプレレン力価に対する累積イソプレレン収率である。生産性測定基準は、表 1 8 に要約される。

【0 5 4 7】

10

20

30

40

【表 2 4】

表 17.株一覧

株名称	宿主	IPTG 誘導性上流経路 プラスミド	IPTG 誘導性イソプレニンシターゼ / ホ スホケトララーゼプラスミド	
MD13-896	MD-891	pMCM1225	pEWL1418 (PTrc IspS-PKL_B. longum)	10
MD13-898	MD-891	pMCM1225	pEWL1436 (PTrc IspS-PKL_C. Acetobutylicum)	
MCS674	MD-891	pMCM1225	(PTrc IspS-PKL_Bifidobacterium bifidum)	
MCS675	MD-891	pMCM1225	(PTrc IspS-PKL_Bifidobacterium dentium)	
MCS676	MD-891	pMCM1225	(PTrc IspS-PKL_Bifidobacterium gallicum)	20
MCS703	MD-891	pMCM1225	pMCS668 (PTrc IspS-PKL_E. gallinarum-RBS 2300)	
MCS704	MD-891	pMCM1225	pMCS669 (PTrc IspS-PKL_E. gallinarum-RBS 7700)	
MCS706	MD-891	pMCM1225	pMCS671 (PTrc IspS-PKL_E. gallinarum-RBS 73300)	
DW891-2	MD-891	pMCM1225	pMCS822 (PTrc IspS-PKL_S. gordonii)	30
DW892-1	MD-891	pMCM1225	pMCS831 (PTrc IspS-PKL_K. kingae)	
MCS935	MD-891	pMCM1225	pMCS814 (PTrc IspS-PKL4[M. ア リガトリス (M. alligatoris)])	
MCS941	MD-891	pMCM1225	pMCS820 (PTrc IspS-PKL10[S. ア ガラクチアエ (S. agalactiae)])	
MCS946	MD-891	pMCM1225	pMCS825 (PTrc IspS-PKL15 [G. ア ディアセンス (G. adiacens)])	40
MCS699	MD-891	pMCM1225	pMCS666 (PTrc IspS-PKL_E. gallinarum_RBS2600)	
MCS951	MD-891	pMCM1225	pMCS830 (PTrc IspS-PKL_A. urinae)	
MCS944	MD-891	pMCM1225	pMCS823 (PTrc IspS-PKL_K. oralis)	
MCS932	MD-891	pMCM1225	pMCS811 (PTrc IspS-PKL_E. faecium)	50
MCS934	MD-891	pMCM1225	pMCS813 (PTrc IspS-PKL3[E. カセ リフラプス (E. casseliflavus)])	
MCS963	MD-891	pMCM1225	pMCS842 (PTrc IspS-PKL_L. salivarius)	
MCS947	MD-891	pMCM1225	pMCS826 (PTrc IspS-PKL_M. hominis)	

【0 5 4 8】

(i) 材料と方法

培地レシピ（発酵培地 1 リットルあたり）：

7. 5 g の K_2HPO_4 、2 g の $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2 g のクエン酸一水和物、0
 . 3 g のクエン酸第二鉄アンモニウム、0. 5 g の酵母抽出物、1. 6 mL の 50 % 硫酸

、1 ml の 1000×修正微量金属溶液。全ての成分を合わせて $\text{Di H}_2\text{O}$ に溶解した。この溶液を加熱滅菌した（123℃で20分間）。水酸化アンモニウム（28%）によって pH を 7.0 に調節し、所定容積にした。滅菌および pH 調節後に、10 g のグルコース、8 mL のビタミン溶液、および抗生物質（スペクチノマイシンおよびカルベニシリン）を添加して、50 mg/L の標的濃度にした。

【0549】

1000×修正微量金属溶液（1リットルあたり）：

40 g のクエン酸 $\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、30 g の $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、10 g の NaCl 、1 g の $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 g の $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1 g の $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100 mg の $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、100 mg の H_3BO_3 、100 mg の $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。各成分を $\text{Di H}_2\text{O}$ に1つずつ溶解して、 HCl/NaOH で pH を 3.0 に調節し、次に溶液を所定容積にして、0.22 ミクロンフィルターで濾過滅菌した。

10

【0550】

ビタミン溶液（1リットルあたり）：

1.0 g の塩酸チアミン、1.0 g の D-（+）-ビオチン、1.0 g のニコチン酸、4.0 g の塩酸ピリドキシン。各成分を $\text{Di H}_2\text{O}$ に1つずつ溶解して、 HCl/NaOH で pH を 3.0 に調節し、次に溶液を所定容積にして、0.22 ミクロンフィルターで濾過滅菌した。

【0551】

マクロ塩溶液（1リットルあたり）：

20

296 g の $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、296 g のクエン酸一水和物、49.6 g のクエン酸第二鉄アンモニウム。全ての成分を水に溶解して所定容積にし、0.22 ミクロンフィルターによって濾過滅菌した。

【0552】

供給液（1キログラムあたり）：

0.590 kg のグルコース、0.393 kg の $\text{Di H}_2\text{O}$ 、7.4 g の K_2HPO_4 、および 8.9 g の 100% Foamblast 882 。全ての成分を混ぜ合わせて、高圧蒸気滅菌した。供給液の高圧蒸気滅菌後、クリーンベンチ内で栄養素補給剤を供給ボトルに入れる。供給物への滅菌後添加物は（供給液1キログラムあたり）、5.54 mL のマクロ塩溶液、6.55 mL のビタミン溶液、0.82 mL の 1000×修正微量金属溶液である。目標とする 100 μM IPTG のために：供給物1キログラムあたり 1.87 mL の無菌 10 mg/mL 溶液を添加する。

30

【0553】

この実験は、所望の発酵 pH（7.0）および温度（34℃）における、グルコースからのイソプレノ生産をモニターするために実施した。各実験を開始するために、大腸菌（*E. coli*）産生株の適切な冷凍バイアルを解凍して、トリプトン酵母抽出物（LB）培地と適切な抗生物質とを含有するフラスコに接種した。550 nm（ OD_{550} ）における測定で、種菌がほぼ 1.0 の光学濃度に増殖した後に、500 mL を使用して 15 L バイオリアクターに接種し、初期タンク容積を 5 L にした。

【0554】

40

バイオリアクター背圧を 0.7 バールゲージに維持し、生産生物に酸素を提供するのに使用される入口ガスは、入口ガスを既知の濃度（7.3～8.3 容積%の酸素）に希釈する、工場内設備によって提供される。

【0555】

バッチ添加される培地には、グルコースが 9.7 g/L でバッチ添加された。誘導は、イソプロピルーβ-D-1-チオガラクトピラノシド（ IPTG ）を添加することで達成される。細胞の OD_{550} が 6 になったら、 IPTG の無菌溶液を含有するシリンジを添加して、 IPTG 濃度を 100 μM にした。pH 上昇によってシグナルされるように、ひとたびグルコースが培養物によって消費されたら、グルコース供給液を 10 g/分以下の速度で供給して代謝要求を満たした。溶存酸素制限が確立された後、固定時点において、

50

温度を 34℃ から 37℃ に 1 時間かけて上昇させた。グルコース上の最大累積イソプレン質量収率を判定するのに十分長い時間、典型的に、合計 64 時間の経過発酵時間 (EFT) にわたり、発酵を実行した。

【0556】

(ii) 結果と分析

発生気体中のイソプレン、酸素、窒素、および二酸化炭素レベルは、Hiden HP R20 (Hiden Analytical) 質量分光計によって独立して判定された。

【0557】

発酵プロセス中の溶存酸素は、Hamilton Company によって提供される光学センサー付きの清潔な滅菌適性プローブによって測定される。

10

【0558】

発酵槽プロセス中のクエン酸、グルコース、酢酸、およびメバロン酸濃度は、4 時間間隔で収集されるプロセスサンプル中で、HPLC 分析によって判定された。プロセスサンプル中の濃度は、既知濃度の標準物質を使用してあらかじめ作成された検量線に対する、屈折率応答の比較によって判定された。

【0559】

HPLC 情報

システム: Waters Alliance 2695

カラム: BioRad-Aminex HPLC-87H Ion Exclusion Column 300mm×7.8mm カタログ番号 125-0140

20

カラム温度: 50℃

ガードカラム: BioRad-Microguard Cation H refill 30mm×4.6mm カタログ番号 125-0129

ランニング緩衝液: 0.01N H₂SO₄

ランニング緩衝液流速: 0.6ml/分

近似ランニング圧力: 約 1100~1200 psi

注入容積: 20 マイクロリットル

検出器: 屈折率 (Knauer K-2301)

実行時間: 26 分間

【0560】

グルコース上の累積イソプレン収率は、イソプレン総重量 (t) / [(供給重量 (0) - 供給重量 (t) + 83.5) * 0.5826] に等しく、式中、0.5826 は、グルコース供給液中のグルコースの重量%であり、83.5 は、t = 0 で発酵槽にバッチ添加されたこの供給物のグラム数である。単位は、g isoprene / g glucose * 100 で、百分率として表される。

30

【0561】

IspER は、(mmol / L / hr) 単位のイソプレン放出速度である。

【0562】

比生産性 (mg / L / hr / OD) = IspER * 68.117 g / mol / OD。

【0563】

OD = 光学濃度 = 550 nm における吸光度 * 水中希釈係数。

40

【0564】

平滑化比生産性 (mg / L / hr / OD) = イソプレン毎時生成ミリグラム (8 時間間隔で平均化した) の勾配 / プロセス容積 * OD。

【0565】

イソプレン力価 (g isoprene / L average broth) は、平均プロセス容積あたりの全発生イソプレンである。これは、IspER を積分して、イソプレン単位を mmol から グラム に変換することで計算される。

【0566】

結果は、図 40 および 41 のグラフで描写され、表 15 で例証される。

50

【0567】

【表25】

表 18. イソプレレン生産性計量

株名称	PKL (MD891ackA-宿主中)	平均 EOF イソプレレン力価 (g/L)	平均累積 収率 (g/g*100)
DW891-2	S. ゴルドニイ (S. gordonii)	104.36	18.20
DW892-1	K. キンガエ (K. kingae)	110.32	17.73
MCS944	K. オラリス (K. oralis)	96.11	17.57
MCS932	E. フェシウム (E. faecium)	84.76	16.92
MCS946	G. アディアセンス (G. adiacens)	99.20	16.86
MCS941	S. アガラクチアエ (S. agalactiae)	108.37	16.83
MCS674	B. ビフィズス (B. bifidus)	66.12	16.46
MCS951	A. ウリナエ (A. urinae)	81.77	16.41
MD13-898	C. アセトブチリカム (C. acetobutylicum)	85.13	15.90
MCS935	M. アリガトリス (M. alligatoris)	68.48	15.67
MCS675	B. デンチウム (B. dentium)	70.15	15.66
MCS963	L. サリバリウス (L. salivarius)	83.91	15.32
MCS934	E. カセリフラブス (E. casseliflavus)	80.17	15.07
MD13-896	B. ロングム (B. longum)	85.09	14.74
MCS947	M. ホミニス (M. hominis) (IPTG 低下)	59.42	12.04
MCS947	M. ホミニス (M. hominis)	17.69	10.84
MCS676	B. ガリクム (B. gallicum)	2.12	8.17

【0568】

実施例 22：解糖およびペントースリン酸経路がブロックされた PKL 発現株の増殖の生体内評価

解糖およびペントースリン酸経路についてブロックされた株中の PKL 酵素活性の分析では、標準分子生物学的技術を使用して、発現プラスミドのサブセットを MD1041 株 (HMB G11. 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 P G L M L, F R T - P L. 2 - 2 c i s - R B S 1 0 0 0 0 - M V K (b u r t o n i i), t z w f : : F R T, t p f k A : : F r t + t a c k A : : F R T, t p f k B : : F r t) に形質転換した。個々の形質転換体を LB 中で一晚培養し、炭素源として 1% グルコース-6-リン酸 (Sigma) が添加された TM3 培地中で希釈して、0、20、40、60、80、100、200、または 400 μ M IPTG によって誘導した。任意の PKL を発現せず (したがって増殖しない)、E. ガリナラム (E. gallinarum) からの PKL 酵素を発現する (そしてベースライン性能を代表する) MD1041 対照株と比較して、または解糖またはペントースリン酸経路中で代謝ブロックされていない WT 株 (最適増殖のための対照として) と、比較して、EnzyScreen Growth Profiler 上の増殖能力について株をアッセイした。

【0569】

増殖の性能指標 (PI) を計算するために、実験的 PKL 酵素を発現した MD1041 誘導体株を E. ガリナラム (E. gallinarum) からの PKL を発現する株である MCS1148 と比較した (株の一覧については表 1 を参照されたい)。35 時間目

の時点および100 μ MのIPTG誘導レベルは、成長曲線全体にわたる一般的性能の代表として選択された。アッセイプレート間で値を正規化するために、WT株の最大OD値間の差である1.279に基づく修正係数が、E. ガリナーラム (E. gallinarum) PKLを発現する対照株を含有しないプレート内の全ての値に適用された。次に、35時間めの時点で、補正実験的OD値をMCS1148のOD値で除算してPIを計算した。したがってMCS1148のPIは1.0であって、これよりも高い任意の値は、このアッセイにおける増殖のX倍の改善を示唆した。PI値は、表19に示される。

【0570】

【表26】

表19. 解糖およびペントースリン酸経路をブロックされたPKL発現株のPI値

株	PKL	35時間目のPI増殖
MD1059	PKLなし	0.167
MCS1106	pMCS811 (pTrc_IspS_PKL1[E. フェシウム (E. faecium)])	0.606
MCS1108	pMCS813 (pTrc_IspS_PKL3[E. カセリフラブス (E. casseliflavus)])	0.328
MCS1109	pMCS814 (pTrc_IspS_PKL4[M. アリガトリス (M. alligatoris)])	0.740
MCS1116	pMCS821 (pTrc_IspS_PKL11[M. アガラクチアエ (M. agalactiae)])	0.579
MCS1118	pMCS823 (pTrc_IspS_PKL13[K. オラリス (K. oralis)])	1.761
MCS1120	pMCS825 (pTrc_IspS_PKL15[G. アディアセンス (G. adiacens)])	0.560
MCS1121	pMCS826 (pTrc_IspS_PKL16[M. ホミニス (M. hominis)])	0.824
MCS1123	pMCS828 (pTrc_IspS_PKL18[ナイセリア属 (Neisseria)])	0.262
MCS1124	pMCS829 (pTrc_IspS_PKL19[E. コレオコラ (E. coleocola)])	0.164
MCS1125	pMCS830 (pTrc_IspS_PKL20[A. ウリナエ (A. urinae)])	1.090
MCS1126	pMCS831 (pTrc_IspS_PKL21[K. キンガエ (K. kingae)])	0.607
MCS1127	pMCS832 (pTrc_IspS_PKL22[S. クリセチ (S. criceti) #1])	0.099
MCS1128	pMCS833 (pTrc_IspS_PKL23[S. クリセチ (S. criceti) #2])	0.587
MCS1137	pMCS842 (pTrc_IspS_PKL32[L. サリバリウス (L. salivarius)])	0.125
MCS1148	pMCS625 (pEWL1421= pTrc_IspS_gallinarumPKL)	1.000
MCS1150	pMCS644 (pTrc_IspS_dentiumPKL)	0.116
MCS1152	pMCS646 (pTrc_IspS_acetobutylicum最適化PKL)	0.163
MCS1153	pMCS647 (pTrc_IspS_truncatedmMVK; gil. 6_acetobutylicum最適化PKL)	1.727
MCS1162	pMCS1008 (pTrc_IspS_PKL-ANC110)	0.239
MCS1168	pMCS1019 (pTrc_IspS_RBS3_PKL16[M. ホミニス (M. hominis)])	0.120

【0571】

配列

マイコバクテリウム・ギルバム (Mycobacterium gilvum) Spyr 1からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 1】

MTTATTAERRPLSDQDVDRLLDRWWRAANYLSVGQIYLLDNPLLRTPLTREDVKPRLLG
 HWGTTPLNFLY AHLNRAIAQRQQSTIYVTGPGHGGPGLVANAYLDGTYSEIYSDITQD
 DEGLRRLFRQFSFPGGIPSHVAPETPGSIHEGGELGYALSHAYGAAFDNPDLLVA AVVG
 DGEAETGPLATSWHSNKFVNAAKDGAVLPILHLNGYKIANPTLLARIPTDELRALMVG
 YGHHYPFFEVDPDDEGGPGVDHADAHRRFARLLDDVLDEIADIKTRAREGDESRAWPM
 IVFRTPKGWTGPDYIDGKKTGWSRAHQVPLSNARDTKEHLAVLSDWLSSYRPDELFD
 ADGRLLPEIAELAPSGQLRMSDNAHANGLLKDLRLPDFREYAVDVPAPGATVAEAT
 RVLGQWLTEVIRLNPDPNFRIFGPDETASNRLQAVYDATDKQWNAEFFGAEVDEHLARA
 GRVVEMLSEHQCGWLEGYLLTGRHGLFNCYEAFIHIVDSMLNQHAKWLKVTNHPW
 RRPIASLNYLLSSHVWRQDHNGFSHQDPGFIDHVVNKSAKVVRVYLPPDANTLLSTYD
 HCLRSRQYVNVVSGKQPSPNFLTMEQAVAHCTRGLGIWEWAGSEELGTDPDVVLAS
 AGDIPTLEALAAADILRQHLPDLKVRFNVDLMLRQDSTEHPHGLPDRDFDMIFTDR
 PIIFAYHGYPWLIHRLTYRRAGHDNLHVRGYKEEGTTTTPFDMVMLNDLDRYHLVMD
 VIDRVPSLGSTCAALRQQMADKRIAAREYTRAHGEDIPEVKDWVWPAARESFGGTAGA
 DGASSTGGDNE (配列番号1)

10

シューワネラ・バルチカ (Shewanella baltica) OS185からのホ
 スホケトラゼ酵素のアミノ酸配列

【化 2】

MTQIHEINALKKYVRATNFLATSQIYLKQNVLHKRPLAHTDIKPRLLGHWGTCPGINFV
 YANINRLIVKHNRSEIYLVGPGHGFPAVQANLFMEGSLSHFYPTIPYNETGIEDICKKFS
 AAYGYPSHANPEAPGQILEGGELGYSLSVGWGA VLDNPDLIATVLIGDGEAETGPLAAS
 WYANRLVSPATSGAVLPIVHINGYKISGPTRMGRMSHEELDLEFRGLGYFPIIVDNELEE
 DIYVQMTNAMDTAYAMINDIQRRARSGEDVVKPKWPVILMRTAKGWTGVSEYKGGK
 LEGNCESHQVIVNKCATDKGHLDA LDNWLASYHFQELYQMNDKGELIFDADICSLIPPK
 QLACGRQHLYTGGEVVRALTNPDLKLSYGPEVPRGHRGYSMKMGWEMRDAFKLN
 RDQRNLRIFSPDETYSNQLQAVFEETDRAWQWPIESWDEDMSREGRVIELLSENLLFGM
 LHGYTVTGRHGMFTYESFSQVISSMADQYCKYVYASQGVHFRKPLPSCNVVLSSLLER
 QDHNGYSHQNPSFLGAMLEKHPKIISAYLPADANSTLVYTERAYADRDKNILVAGKK
 ELPQWLSLEEARKQAKDGVMVWDFASDENPDIVLAGCGDYVTQECMASLVLIPELLPR
 VKIRFVSVTELSSDGLGSRKFKEKPWLMDEIFTQDKGVVFNYHGYPNITIKKLIFDYKGS
 RRFRIKGYEEEGSTTTPFDMGVRNGTSRYHLVIDMAYKLFQQGVIDE TMHVSITTDMLQ
 RLVDHRNYIKANGVDPIEIENWIWTR (配列番号2)

20

30

ラクトバチルス・ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus) L
 MS2-1からのホスホケトラゼ酵素のアミノ酸配列

【化 3】

MSMDTKVKTVDYSSKEYFDKMTAYWRAANYVSVGQLYLKDNPLLERPLKSEVDKPH
 PIGHWGTIAGQNFYIYTHLNRVINKYDLNMFYIEGPGHGGQVMVSNSYLDGSYSEIYPRV
 SQDKEGMKNLFTQFSWPGGVASHASAQTPGSIHEGGELGYALSHATGAILDNPDVIAA
 VVTGDGETETGPLAASWFSNTFINPISDGAILPIVHMNGFKISNPTILSRKSDLDLTKYFE
 GMGWKPYFVEGDDPTKLNPEMAKVM DAAIEEIKAIQKHARETGDTTMPHWPVIFRSP
 KGWTGPKSWNGEPIEGSFRAHQIPIPVDAEDMEHADSLAGWLKSYHPEELFDENGKLIP
 ELAALPPKGDKRMAANPITNGGLDPKPLVLPDYRKYALDNKEHGKQIKQDMIVWSDY
 LRDLIKLNPHNFRIFGPDETMSNRLYSLFEVTNRQWLEPIKEPADQYLAPAGRIIDSQSE
 HQSEGFNEGTYLTGRHGLFTSYEAFLRVVDSMLTQHFKWIRKAHEEPWHKAYPSLNVV
 STSTSFQQDHNGYTHQDPGILTHMAEKKA EYIREYLPADANSLAISPKLFSSQNTVNVL
 ITSKQPRPQFYSIDEATVLANAGLKRIDWASNDGVEPDVVIAAAGTEPNMESLAINLL
 HDAFPDLKIRFINVLDLLKLSPEIDPRGLSDAEFNSYFTTDKPILFAYHGFEGLRIDIFFTR
 QNRNVLIHGYREEGDITTPFDMRVLNELDRFHLAKDVIQHPAYAEKAAAFVQKMDDT
 LQYHHDFIRANGEDIPEVQEWTKSIK (配列番号3)

40

50

ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)
S T 1 からのホスホケトララーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 4】

MAVDYDSKDYLSVDAIWRAANYLSVGQLFLMKNPLLKTPLVAEDVKPKPIGHWGTI
APQNFIYAHNLNRVLKKYDLNMFYIEGSGHGGQVMVSNSYLDGSYTERYPEITQDEKGM
AKLFKRFSFPGGVASHAAPETPGSIHEGGELGYSLSHGTGAVLDNPDVIAAVEIGDGEAE
TGPLAASWFSDKFINPIKDGA VLPILQINGFKISNPTIVSRMSDQELTEYFRGMGWDPHF
VSVFKGGRFDGEKDPMQVHEEMAKTMDEVIEEIKAIQKHARENNDATLPHWPMIIFQC
PKGWTGPKKDL DGNPIENSFRAHQIPIVAQGDMEHADMLTDWLESYKPEELFNEDGSP
KEIVTENTAKGDHRMAMNPITNGGIDPKRLNLPDYRK FALKFDKPGSVEAQDMVEWA
KYLDEVAKLNPTTFRGFGPDESKSNRLFQLLDDQKRQWEPEVHEPNDENLAPSGRVIDS
QLSEHQDEGFLEGYVLTGRHGGFFATYEA FGRVVD SMLTQHMKWLRKAKEQYWRHDY
PSLNFVATSTVFQQDHNGYTHQDPGILTHLYEKNRPDLVHEYLPSDTNTLLAVGDKAL
QDRECINVLVTSKQPRPQWFSIEEAKKLVDKGLGYIDWASTDKGAKPDVVFAS TETEPT
IETLAAIDILHKKFPDLKIRYINVVDVMKLM DPKDNKNGLSTEEFDRLF PKDVPVIFAWH
GYKSMMESIWFARKRYNVHIHCYEENG DITTPFDMRVLNHLDRFDLAKDAVESIDKLK
GKNADFISHMDDLLEKHHQYIRDNGKDMPEVTEWQWSGLK (配列番号4)

10

ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*) ロ
ングム (*longum*) 垂株 J D M 3 0 1 からのホスホケトララーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 5】

MTSPVIGTPWKKLNAPVSEEALEGV D KYWRVANYLSIGQIYLR SNPLMKEPFTREDVK
HRLVGHWGTT PGLNFLIGHINRFIADHGQNTVIIMGPGHGGPAGTSQS YLDGTYTETFPK
ITKDEAGLQKFFRQFSYPGGIPSHFAPETPGSIHEGGELGYALSHAYGA IMDNPSL FVPAI
VG DGEAETG PLATGWQSNKLVNPRTDGIVLPILHLNGYKIANPTILSRISDEELHEFFHG
MGYEPYEFVAGFDDEDHMSIHRRAELWETIWDEICDIAAAQTDNVHRPFY PMLIFRT
PKGWTCPKYIDGKKTEG SWRAHQVPLASARDTEAHFEVLKNWLESYKPEELFDANGA
VKDDVLA FMPKGELRIGANPNANGGVIRDDLKLPNLEDYEVKEVAEYGHGWGQLEAT
RRLGVYTRDIIKNNPRDFRIFGPDETASNRLQASYEVTNKQWDAGYISDEVDEHMHVSG
QVVEQLSEHQMEGFLEAYLLTGRHGIWSSYESFVHVIDSMLNQHAKWLEATVREIPWR
KPIASMNLLVSSHVWRQDHNGFSHQDPGVTSVLLNKCFHNDH VIGIYFATDANMLLAI
AEKCYKSTN KINAI IAGKQPAATWLTLD EARA ELEKGAAAWDWASTAKNNDEAEVVL
AAAGDVPTQEIMAA SDKLKELGVKFKVNVADLLSLQSAKENDEALTDEEFADIFTAD
KPVLFAYHSYAHDVRGLIYDRPNHDNFNVHGYEEEGSTTTPYDMVRVNRIDRYELTAE
ALRMIDADKYADKIDELEKFRDEAFQFAVDKGYDHPDYTDWVYSGVNTDKKGAVTAT
AATAGDNE (配列番号5)

20

30

ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*) KM 2 0 か
らのホスホケトララーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 6】

MADFDSKEYLELVDKWWRATNYLSAGMIFLKSNNPLFSVTNTPIQAEDVKVKPIGHWGT
 ISGQTFLYAHANRLINKYDLNMFYIGGPGHGGQVMVTNAYLDGEYTEDYPEITQDLEG
 MSRLFKRFSFPGGIGSHMTAQTPGSLHEGGELGYSLSHAFGAVLDNPDQIAFAVVGDE
 AETGPSMTSWHSTKFLNAKNDGAVLPILDLNGFKISNPTIFSRMSDEEITKFFEGLGYSPR
 FIENDDIHDYAAHYELAANKVLDQAIEDIQAIQKDARENGKYEDGTIPAWPVIIARLPKG
 WGGPTHDEDGNPIENSFRAHQVPLPLAQNKLETLSQFEDWMNSYKPEELFNADGSLKD
 ELKAIAPKGDKRMSANPIANGGRRRGEEATDLTLPDWRQFTNDITNENRGHELPKVTQ
 NMDMTTSLNYLEEVAKLNPTSFRVFGPDETMSNRLWSLFNTTNRQWMEEVKEPNQY
 VGPEGRIIDSQSEHQAEGWLEGYTLTGRVGFASYESFLRVVDTMTVQHFKWLRHASE
 QAWRNDYPSLNLIATSTAFQQDHNGYTHQDPGMLTHLAEKKSNFIREYLPADGNSLLA
 VQDRAFSEHVKVNLIIASKQPRQQWFTADEADELANEGLKIIDWASTAPSGDVDTIFASS
 GTEPTIETLAALWLNQAFPEVKFRYVNVVELLRLQKKSESHMNDERELSDAEFNKFFQ
 ADKPVIFGFHAYEDLIESFFFERKFKGDVYVHGYREDGDITTTYDMRVYSKLDRFHQAK
 EAAEILSANSTIDQAAADTFIEKMDATLAKHFEVTRNEGRDIEEFTDWNWSALK (配列
 番号6)

10

ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) S23321種からのホスホケ
 トラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 7】

MNNQQQSALSRSDDLDDRYWRAANYLSVGQIYLLDNPLLREPLRPEHIKPRLLGHWG
 TTPGLNFIYAHNRVIRALDLSVLYVCGPGNGGPGMVANTYLEGSYSEIYPNIARDTDG
 LRKLFRQFSFPGGIPSHAAPETPGSIHEGGELGYALVHAYGAADFNDPDLIVACVVGDE
 AETGPLAASWHSNKFLNPVHDGAVLPILHLNGYKIANPTVLGRMRDEEIRDIFRGFGHE
 PLFVEGDDPTLMHQAMADAFDVAFARIRSIQQHARDGRKEIERPRWPMIVLRSPKGWT
 GPKEVDGLKVEGFWRHAHQVPVAGCRENPAHLKILEDWMRSYEPEKLFDAAGALPELQ
 ALAPEGNRRMGANPHANGLLKKELKLPDFRSFALEVPQPGGVGTGEATRELKFLRDV
 IRLNAAERNFRIMGPDETASNRLDAVFEETERVWMEPIEPYDVHLAQDGRVMEVLSEH
 LCQGWLEGYLLTGRHGFFSCYEAFIHIVDSMFNQHAKWLKVTRHLPWRRPIASLNLYLL
 TSHVWRQDHNGFSHQDPGFVDLVANKKADIVRIYFPPDANTLLWIADHCLRTYNRINVI
 VAGKQPAPQWLSMQDAATHCDAGIGIWSWAGNEDATGEPHVVMACAGDVPTLETLA
 AVDLLRKALPDLKIRVVNVVDLMTLQPKEQHPHGLSDRDFDSLFTSDKPVIFAYHGYPH
 LIHRLTYNRTNHAGLHVIRGFIEEGTTTTPFDMVVLNELDRYHLAIEAIERVPGLAARAA
 AVKQQFRDALIEHSHYIREHGEDMPEIRDWVWPGKTG (配列番号7)

20

30

エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) E103
 9からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 8】

MDYSSKEYFDKMTAWWRAANYLSVGQLYLKDNPLLRRTLKPEDVKKHPIGHWGTPG
 QNFIYVHLNRVINKYDLNMFYIEGPGHGGQVMVSNAYLDGSYTEIYPEVTEDETGMQK
 LFKRFSFPGGIASHAAPETPGSIHEGGELGYSLSHAVGAVLDNPEVISAVVIGDGEAETGP
 LAGSWFSNVFINPVIDGAVLPILHLNGAKIANPTILARKSDGELANYFNGLGWEPFFIEG
 NDPEKLNPMVMAEKMDQAIEKIKSIQKEARLKTATDVVMPKWPVLIVRTPKGWTGEP
 GTFRAHQVPIPDQEHMDHADALLRWLKSYPEKLFDAQGRILEEIREIAPTGDQRMAL
 NPITNGGIDPKPLIMPDWKKYTLQFEKPGSIKAEDMTELKGFVREIIEKNPENFRIFGPDE
 TKSNNLNQVFKTTNRQWMEKIEPENDEWLSPSGRVIDSQLSEHQDEGFLEGYVLTGRH
 GFFASYESFLRVVDSMLTQHFKWMRKSHDLWRNDYPSLNLIASSTVFQQDHNGYSHQ
 DPGILTHLAEKKAFFIREYLPADANTLLAVMDKAFRSSEKINLISSKHPRAQFYSAEEAA
 VLVNEGLKIIDWASTAKEEEPELVIAAAGTESNLEALAAVTLLEFPKLRFINVVDLL
 KLRHPSQDPRGLSDEEFDQYFTKDKPILFAFHGYETLVRTIFFDRHNHHLMIHGYKENG
 DITTPFDMRVVNELDRYHLAKDAALKIKGSAEDFAEKMDQKLQEHQNYIRENGIDLP
 EVLDWKWKNLQDQ (配列番号8)

40

50

ブルセラ・ミクロチ (*B r u c e l l a m i c r o t i*) C C M 4 9 1 5からのホスホ
ケトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 9】

MPAKGPLTPQQSLINRYWRAANYLSVGQIYLMKNPLLREPLQPEHIKPRLLGHWGTTTP
GLNFIY AHLNR IIQQRNANVIYICGPGHGGPGMVANTYLEGTYSEIYPAISEDEAGMERL
FRQFSFPGGIPSHAAPETPGSIHEGGELGYALVHAYGA AFDNPD LVVACVVG DGEAETG
ALATSWHSNKFLNPARDGAVLPILHLNGYKIANPTVLARLSDDDLNLF RGYGYEPFFV
EGSEPADMHQKMAATLDTIFQRIQDIKKNADVHSPERPRWPMIILRSPKGW TGPKTV DG
LVVENY WRAHQVPVANCRENDAHRKILEDWMKSYDPSDLFDEK GALKPELRALAPKG
EARMGANPHANGGLLRKELHMPDFRQYAVNVTEPGAIEAQSTKILGDFLRDVMKLN ET
EKNFRIFGPDETASNRLGSVLEATNRVWMAETLDMDDHLAADGRVMEVLSEHLCQGW
LEGYLLSGRHGFFSCYEAFIHIIDSMFNQHAKWLQVARELEWRKPISSLNYLLTSHVWR
QDHNGFSHQDPGFVDLVANKSADIVRVYFPPDANTLLWVG DHCLKTWNRVNVIVAGK
QPEPQWLTMAEAEKHCEAGLGIWEWAGTEDGLEPDIVMACAGDVPTMETLA AVDLLR
QSLPHLRIRVVNVVDLMVLQSPHQHPHGISDEEFDRMFTTNRPVIFAYHGYPYLIHRLV
YKRTNHSNFHVRGFIEQGT TTTTPFDMTVLNE LDRFHLAMEAVERLPLGESVAKPLIDNF
TEKLALHKDYIRQHGEDMPEIRDWKWTWPR (配列番号9)

10

ラクトバチルス・サリバリウス (*L a c t o b a c i l l u s s a l i v a r i u s*)
A T C C 1 1 7 4 1からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 1 0】

MTDYSSQEYLDKLDAYWRAANYVSVGQLYLKDNPLLRRPLKAEDVKVKPIGHWGTIA
GQNFIY AHLNRVINKYDLNMFYVEGPGHGGQVMVSN SYLDGSYSEIYPEISQDEQGMK
RLFKRFSFPGGVASHAAPETPGSIHEGGELGYSISHSVGAVLDNPD LIVA AVVGDGEAET
GPLAASWQSNKFINPIHDGAVLPILDNLNGFKISNPTILSRESDET LT KYFEGMGWHPFVE
GDDPKLMHPAMAKAMDEAIEEIKAIQKNARENNDPSLPAPWPVIIFRAPKGW TGPK EWD
GEPIEKS FRAHQIPIVDQNDMQHADALVDWLESYKPEELFDENGKLKAEIAEITPKGDK
RMAANPHTNPGKLIREVIKPDFRDFAVDTSVPGKEVAQDMTVLGKYLEKVLSDN RHNY
RVFGPDETMSNRLAPIFDVTKRQWLAEIKEPNDQYLAPSGQVIDSQLSEHQAE GFLEGY
VLTGRHGFFASYESFLRVVDSMLTQHFKWLRKATEQPWRTSIPSLNVIATSTVFQ QDHN
GYTHQDPGILGHLADKKPEYIREYLPADANSLLAVFDKTINDRDKINLIVASKHPRQQFY
SAAEAKELVDKGLKIIDWASTDKNAEPDVVIAAAGTEPNLEALAAISILHEKL PDLKIRFI
NVVDILKLRSPKVDPRGLSDDEFDAYFTKDKPVIFAFHGYEGLLRDIFYRHNHNVAFH
GYRENGDITTPFDMRVLSQMDRFDLVKSVALSLPDADKYGQLVAEMDAKVAKHHQYI
RDEGTDLPEVENWEWKPLD (配列番号10)

20

30

ストレプトコッカス・アガラクタエ (*S t r e p t o c o c c u s a g a l a c t i*
a e) C O H 1からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 1 1】

MSEFDTKSYLEKLD AWWRAANYISAAQMYLKDNPLLRRREL VENDLKVHPIGHWGTVP
GQNFIY AHLNR AINKYDLDMFYIEGPGHGGQVMVSN SYLDGSYTELNP NIEQTEDGFK
QLCKIFSFPGGIASHAAPETPGSIHEGGELGYALSHATGAILDNPDVIAATVIGDGEGETG
PLMAGWLSNTFINPVNDGAVLPIFYLNGGKIHNPTIFERKTDEELSQFFEG LGWKPIFAD
VVELSEDHAAAHALFAEKLDQAIQEIKTIQSEARQKPAEEAIQAKFPVLVARIPKGW TG
KAWEGTPIEGGFRAHQVPIPVDAHMEHVDSLLSWLQSYRPEELFDENGKIVDEIAAISP
KGDRRMSMN PITNAGIVKAMDTADWKKFALDINVPGQIMAQDMIEFGKYAADLVDAN
PDNFRIFGPDET KSNRLQEVFTRTSRQWLGRRKPDYDEALSPAGRVIDSQLSEHQAE GF
EGYVLTGRHGFFASYESFLRVVDSMVTQHFKWLRKSKTHTTWRKNYPALNLIAASTVF
QQDHNGYTHQDPGILTHLAEKTPEYIREYLPADTNSLLAVMDKAFKAEDKINLIVTSKH
PRPQFY SIAEAEELVAEGYKVIDWASNVS LNQEPDVVFAAAGTEPNLEALAAISILHKAF
PELKIRFVNVL DILKLRHPSQDARGLSDEEFNKVFTTDKPVIFAFHGYEDMIRDIFFSRHN
HNLHTHGYRENGDITTPFDMRVMS ELD R FHLAQDAALASLG I KH (配列番号11)

40

50

ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*) R
K J 3 0 0 からのホスホケトラゼ酵素のアミノ酸配列
【化 1 2】

MTDGRQVGSQDSGDGHYSDDLDDLRLWWAAANYLTVAQIYLQDNALLRAPLRPEHIK
PRLLGHWGTSPGLSMIYALLNRLIRRTDCLYVTGPGHGGPALVAATYLEGTYSEVYP
GVS RDAAGIHRLCRQFSTPGGIPSHVSVQTPGSIHEGGELGYALAHAAAGAFDHPNLLV
ACVIGDGEAETGPLSGSWKLPAFLNPERDGAVLPILHVNGAKIAGPTVYGRSSDADVEA
FLGGQGWAPT VVSGDDPRHVFPALHRA L T D A H A A I S D L Q R E A R A G R R S A A K W P A I V L R
TPKGWGTGPRTV D G V L V E G T H R A H Q V P L S G V R T D E A H L R Q L E E W M R S Y G P G E L F D S S G
ALVPDLERLAPQGD K R M G S S P Y A N G G R L R A D L P V P P L E K Y A L A I E K P G T T L H E T T R V L G
ELLRDLYAATATPDGGGYFRLFCPDETASNRLGAVFEVTDRCWQLPVTDYDDGLSARG
RVMEVLSEHLCEGWLEGYLLSGRHGLFASYEAFAMVSVSMLVQH TKWLQH AVDLPW
RAPVASLNVLLTSTCWRNDHNGFSHQGPGMIDAVIPLAPDVVRIWLPPDSNTLLSIADH
CLRSTDHVNLI V D K Q P H L Q Y L T L A E A H A H C A A G A S V W E W A G T E G A V G A D P D V V L A
AAGDVPTQEILAAAQLLREHTPD LVTRVVNVVDLMGLLTPTEHPHGFDARMFLDLFTA
DTDVVFAFHGYSRAVHELHGRPA P D R F H V R G F S E Q G T T T T P F D M V V L N R M S R Y H L V L
EALRRTRREPAGAGELADFCLRQLERHGEYVVAHLEDMP E V R D W T W S (配列番号12)

10

バークホルデリア・ゼノボランス (*Burkholderia xenovorans*)
L B 4 0 0 からのホスホケトラゼ酵素のアミノ酸配列
【化 1 3】

20

MAEASSRPTPPQVLDADTLRNMDRYWRACNYLSAGMIYLRDNPLLREPLKPEHIKNRL
LGHWGSDPGQSFLLVHLNRLIRKLDLNVIIYVAGPGHGAPATLAHCYLEGHYSEIYPDRS
EDEAGMQRFFRQFSFPGGIGSHCTPETPGSIHEGGELGYSLSHGYGA AFDNPDLIVTVM I
GDGEAETGPLATSWHSNKFLNPVRDGAVLPVLHLNGYKIANPTILARIPREELEALLTG
YGHKPYFVEGDDPAVMHQQMAATLEQCIG E I R A I Q Q H A R A N N D A T R P R W P M I V L R S P K
GWTGPKEVDG HK V E G S W R A H Q V P V L D P V T N G K S L K L V E N W M R S Y E P E S L F D E A G R L
VEELRELAPKGARRISANPHANGLLCKTLDMPAFGDYAVAVKKPGGTYTSPTEVLGK
FLCDVMRRNMTNFRVFGPDETASNKLTAIYEASEKTWLAQT E P S D A D G G D L A V D G R V
MEMLSEHTLEGWFEGYVLTGRHGLFATYEA F V H V I D S M F N Q H A K W L E K A K R D L G W R
QPVP SINLLITSLVWRQDHNGFTHQDPGFLDVVTNKSPDVVRIYLPPDANCLLSVADHC
LRSRDYVNVIVADKQPHLQYLDMDAAVIHCTKGIGIWDWASTDQGV E P D V V I A S A G D I
ATMEALAAVQILKERFADLKIRFVNVDLFR LMPEHAH PHGLSNRDFDSLFTATKPVIF
NFHSYASLVHKLTYNRTNHDNLHVHGYHEKGNINTPLELAIINQVDRFSLAIDVIDRVPK
LRGVGDHAK E W L R G Q V I E H L A Y A H A E G I D R E E I R N W T W K G (配列番号13)

30

マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracel
lulare*) A T C C 1 3 9 5 0 からのホスホケトラゼ酵素のアミノ酸配列

【化 1 4】

MTHATALSDDELALIDKYWRAANYLSVGQIYLLDNPLLTEPLTIDHVKPRLLGHWGTT
 GLNLVYAHNLRVIRHRDADVIYVTGPGHGGPGLVANAYLEGTYSEVYTGIEEDTEGLR
 KLFRQFSFPGGIPSHVAAQTPGSIHEGGELGYALVHAYGAALDNPYLVVACVVGDEA
 ETGPLAASWHSNKFLNPVTDGAVLPILALNGYKIANPTVLARIPHAELSLRGYGYRPI
 TVAGDDPADVHRQLAAALDDAFDDIAAIQSAARGGNGVERPVWPMIVLRTPKGWTGP
 KMVDGKKVEGTWRSHQVPLAATRDNPEHRAQLEEWLRSYGPGEFDENGRLRPELRA
 LAPSGDRRMSANPHANGGLLLHDLDPDFRDYAVAVERPAAVTHEATRVLGGFLRDVI
 ARNKDRFRLMGPDETASNRLDAVYGSTDKVWLSEIEPDDEHLAPDGRVMEVLSEHLCQ
 GWLEGYLLTGRHGLFNCYEAHVHIVDSMLNQHAKWLATSRELPWRRPIASLNYLLSSH
 VWRQDHNGASHQDPGFIDLANKRPELTRVYLPDPGNTLLSVADHCLRSRDYINVIVA
 GKQPALAYLDMDEAVAHCTRGLGIWEWASTATDDPDVVLACAGDIPTLETLAAADILR
 SELPELAVRVVNVVDLMRLQPDTEHPHGLPDREFDALFTPDRPVIFAYHGYPWLIHRLT
 YSRTNHAHMHVRGFKERGTTTTPFDMVMLNDLDRFHLVMDVIDRVDGLASRAAMLR
 QRMVDARLAARMYTREHGEDDPKISGWTWGPSD (配列番号14)

10

ニトロソモナス属 (Nitrosomonas) Is79A3種からのホスホケトラーゼ
 酵素のアミノ酸配列

【化 1 5】

MKKNTKLLSPELLHKMDAYWRAANYLSVGQIYLYDNPLLKQPLKLAHIKPRLLGHWG
 TTPGLNFIYVHLNRIIKEHDLNVIYITGPGHGGPGLVANTYLEGTYSEVYPNISQDEDGM
 QRLFKQFSFPGGIPSHVAPETPGSIHEGGELGYSLSHAFGAAFDNPGLLVACVVGDEAE
 TGPLATSWHSNKFLNPVHDGAVLPILHLNGYKIAGPTVLARIPCDELEALFRGYGYTPYF
 IEGDDPLEMHQRMAATLDAVIANIQSIQRDARTHGFTKRPHWPMIILRSPKGWTGPKVV
 DGKPTGEGTFRSHQVPMGDMSQPGHVKILEKWLKSYRPQELFDETGKLLAELAEAPQG
 ARRMGANPHANGGMILLRDLRLPDFRDYAVKVANPGTVSAEATRTQGEFIRDVVKLNA
 TNFRVFSPDETASNRWGAVFEVTNRCSTAEIVPGDDHVAPDGRVMEMLSEHQCEGWLE
 GYLLTGRHGGFFSCYEAFFIIDSFMFNQHAKWLKVANEIPWRRPIASLNYLLSSHVWRQD
 HNGFSHQDPGFIDHVINKKAEIIRIYLPPDANTLLSVTDHCLRSRNYVNVIVAGKQPQPQ
 WLDMDAAIKHCTAGIGIWEWASNDQGEEDVVMACAGDAPTITLAAVELLWKHFPE
 LKIRVINVDLMSLQPQSEHPHGLSDKDFDGLFTKDKPIIFAYHGYPWLIHRLTYRRTNH
 DNLHVRGYKEEGTTSTPFDMVVMNDLDRFHLVADVIDRVPQLGSRAAYVKQAIRDKLI
 EHKQYINQYGEDMPEIRNWKWKGSV (配列番号15)

20

30

シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)
 972h-からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 1 6】

MATQNDIPNSTPEDLAKQVEIAEKHPDPPAMPSRLPDSLKTLEAKIDTSKITDEEVANVH
 RFQRACDYLAASLIFLSNGLYTGGDLEEKDIKTRLLGHWGTCPLSIVYSHCNRIINKYD
 LNMLFVVGPGHGAPAILSALFLEDLSLGPFPYPRYQFTKEGLNNLINTFSLPGGFPSHVNAE
 VPGAIHEGGELGYALSVSYGAVLDRPDLIVTCVVGDEAETGPTATSWHAHKFLDPAE
 SGAVIPVLELNGYKISERTIYGCMDDSELLSLFSGFGYEVAIVNDTPDQNRVMAATMDW
 AVERIHDIQHRARVNRREEIKPRWPMIILRTPKGKGCCKYLNGKFLEGTFRAHQVPLKLA
 RTDTNQRNLLKDWLNSYNQDQDFLDEHGLPTKGITEHLPPREKRMGQRHETYSYLPLK
 VPDWKKYGVKKGETTSATSVVGQYLDLDELVTNDSTLRIFSPDELESNKLDGALKHSYR
 TMQTDPELMAKRGRVTEVLSEHLCQGFMQGYTLTGRTAIFPSYEAFTIVVSMLVQYS
 KFLKMGLTGWHGKFGSLNYVTSSTWARQEHNGFSHQSPRFITMMLSLKPGVSRVYFPP
 DANCFLATVARCMKSENTINLMVSSKNPQPAYLSVEEAHHCKAGASVWKFASTDNG
 ENPDVVIAGVGNEIMFEVVKAAEMLQNDIPELVRVINVTDLMLVSSLHPHGMNPAEF
 DSLFTKDRHVHFNYHGYVMDLKALLFDRIQGTRVTMEGYREEGTTTTPFNMMMCNNT
 SRYHVARMALQHALHNPTVAVNCNMLCAKYAWKLEEIENYIMENKDDPPEIYAAPVF
 KNKTSTL (配列番号16)

40

50

ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) メセンテロイデス (*mesenteroides*) 垂株 J18 からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化17】

MNIDSTDYLNLDAYWRATNYLSVGQLYLLDNPLLKEKLTAEQVKIHPIGHWGTIPSQ
NFIYAHLNRAINKNFNLNMFYIEGPGHGGQVMISNAYLDGSYTEAFPEITQDEAGMQKMF
KRFSFPGGVASHADPKVPGSIHEGGALGYLSILHGAGAVLDNPDLIAAVVVGDEAETAP
LATSWHVNKFLNPKNDGTVLPILNLNGFKIANPTVLSRESDETLTEYFHSLSGWHYPYFVSS
FDKPIMQVHEEMAKTMDTVFTEIKDIREKAVQQTNEEITRPLWPMIVLRSPKGTGPKT
WDDNPIENSFRAHQIIPADQNHPEYIPQLVDWLQSYKPDELFDENGQLTQSIQEVLPKK
ELRMANNSTNAGKIKPLILPDIDNYLVENNQPGNNLAQDAILLGDYLRDIIKLNPTNFR
GFGPDETASNRFQDIFETTNRQWLLPIKEPNDQFMAPEGRIIDSMLSEHYDEGMLEAYTL
TGRHGFFASYEVFIREVDDMIVQHFKWLNHSHDVSWRKDVPALENIADSTVFQDHNH
YSHQDPGVTTMLYEKQPDFIREFFPADANSLVATFEHAAQATQQINYIVASKHPRQLWF
SPTEAKQLVTQGLRVIDWASTDKGEKPDIISSAGSEPTTESLAAIQILHEHPSLKIRYINV
LDLFLKLADASYGLSDDEFDAYFTTDTPLVFAFHGYEPMIESIFFKRHNHHLAVHGYRE
VGDITTPFDMRVLNKKIDRFNLVKAAILLPENIRTKQAALVQEMTDKLDLHVAYTRSKG
TDLPEVEDWRWQPLK (配列番号17)

10

ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) SA3__actG 種からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化18】

MSDASVSAVADALDYLCLAQLYLRENPLLARPLTSAHVKWRPAGHWGVCPPVNRML
AALGPVQASVPDGYELRVLHGAGHAGPSALAHAYLTGRLGRVYPDLIQSPAGLLELVS
GFRPETGGEITPMIPGHLHTGGQLGAALAIGQGTVLDA PRRLTVALLGDGECETGTTA
ASWLASRALRGTDHGTVPVLLNGMRMGPSVLSTLSRDELTAFTGLGHQPVYS
DGLDIAQLRQAIAEAVADARPLGVPGPSSVLVLTLEKGYGAPAGLAATPAVHKTP LHDP
ASVPSEFDLLSEWLASYRPAQLLTPGGRPRPHLLPALPRPRPEPGGLSAPRGCI AASTQV
ADHASGRAFAQVVPDVL RARAAQGPF RVFSPDELASNRIDLT DGQGRTPVWAVEVLSE
ELCHAWAQGYTETGRHALVATYEAFAPI TSLVQQQLKHRSARRHAGLAPLPSLVYLL
TSLGWHNTFTTHQNPSLATALLAGGDPSVHVLT PADPARAAAALTFALRKLD RCTLVIA
DKHATVQHPLETLDEELRHGM AIWPHLSAPGPEEPDLILASAGDLP AEVLTTLARRLRD
DRRELRLRYVHIHDLTALAEEDTRSLALGPAAFTHHFGTTAPLVLATSGHPADIHALFG
RRHPGPRLTVLGYRDPGRPV SQTHLRQLCGLDDTSLWHLATTLIDASKEIPAP (配列番号
18)

30

ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) ATCC 11577 からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 1 9】

MTVDYDSKEYLDLLDKYWRAANYLSVGQLYLRDNPLLKRPLKSDDVKIKPIGHWGTIV
 SQNFIYAQLNRAINKEYDLNMFYIEGSGHGGQVMVSNYSYLDGSYSDIYPNISQDEKGMQ
 KLFKQFSFPGGVASHAAPETPGSIHEGGELGYSLSHGTGAILDNPDVIAAVEIGDGESET
 GPLAASWFSDFINPITDGAVLPIINMNGFKISNPTILSRMSDADLTDYFKGMGWEAHFV
 EATADTDHAKVEAEFAKTLDTVIEKIKSIQKNARENETPDNVKLPVWPMIIFRSPKGWT
 GPKKDLDGNPIEGSFRAHQVPIVDANDMEHADELVDWLKSYKPEELFDENGTLKPEL
 RALAPKGEQRMVSNPITNGGIKPEPLKLPNVRDFEVKFDKRGTEQKQDMIEWSKWLDA
 VAKLNPTTFRGFGPDETKSNRLYSLLDDGKRQWMEDIHEPYDEDLANHGRVIDSQLSE
 HQAEGWLEGYVLTGRHGFFATYESFGRVVDSSMLTQHFKWLRKASEQYWRKQYPSLNF
 VDTSTVFQQDHNGYTHQDPGLLTHLAEKKPEFIREYLPADANELLA VGDSAFRTYEKIN
 LIVTSKHPRRQWYSMDEAQNLVKNGLGYIDWASTDQGQEPDVVFAAAGSEPNEALA
 AISILNKEFPELKIRFINVVDILKLNSPKKDPGRGLSDEEFDNLFTTDKPVIFAWHGFEDMIK
 DIFFDRHNHNLVYHGYRENGDITTPFDMRVLNELDRFHLAADAIRHIPAYAVKGGYFIQ
 RMNNIVDKHNRVIREVGTDLPEVTSWNWEPLNK (配列番号19)

10

ストレプトミセス・ガーナエンス (*Streptomyces ghanaensis*)
) ATCC 14672 からのホスホクトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 2 0】

MPEAPDTRTVLSDEELRTLDAHWRAANYLAAGQIYLLANPLLTEPLRPEHIKPRLLGHW
 GTSPGLNLVYTHLNRVIAGRGLDALCIWGPGHGGPSVLANSWLEGSYGETYPDVGRDA
 AGMERLFRQFSFPGGVPSHV APEVPGSVHEGGELGYSLAHAYGAALDHPGLLVACVIG
 DGEAETGPLAASWHSNKFLDPVHDGAVLPILHLNGYKIANPTVLARLPEDELDLSLRGY
 GHEPIHVS GDDPAAVHRAMAHAMDTALDRIA EVQRAAREDGVTERARTPVIVLRTPKG
 WTGPAEVDGKPV EGTWRAHQVPLAGVRDNPEHLRQLEAWLRSYRPEELFDDAGRPA
 DVLACLPEGDRRLGSTPYANGGLLVRELPMALDDFAVPVDKPGTTLHEPTRILGGLLE
 RIMRDTADRRDFRLVGPDETASNRL EAVYDASGKAWQAGTLDVDEHLDRHGRVMEV
 LSEHLCQGWLEGYLLTGRHGLFSCYEA FVHIVDSMVNQHIKWLKTSREL PWRAPIASLN
 YLLTSHVWRQDHNGFSHQDPGFVDHVLNKSPEVVRVYLPPDANTLLSVADHALRSRD
 YVNVVVAGKQPCFDWLSIDEARVHCARGAGIWEWAGTENG GAPDVVLACAGDVPTQ
 EVLAAAQLLRRHLPELAVRVVNVVDIARLMPREEHPHGM TDFEYDGLFTADKPVIFAY
 HGYPWLIHRLAYRRNGHPNLHVRGYKESGTTTTPFDMVVRNDLDRYRLVMDVIDRVP
 GLAVRAAAVRQRMADARTRHHAWIREHGTDLPEVAEWSNA (配列番号20)

20

30

シアノセイス属 (*Cyanothecae*) PCC 8802 種からのホスホクトラーゼ酵素
 のアミノ酸配列

【化 2 1】

MVATPERPTLEQTPLSAEELRQIQAYWRACNYLAVGMIYLRDNPLLKDPLTEDHVKNR
 LLGHWGSSPGLSFIYIHLNRLIKKYGLDVIY MAGPGHGAPGILGPVYLEGTYSETYPDKS
 EDEEGMKKFFKQFSFPGGIGSHCTPETPGSIHEGGELGYSLSHAYGAALDNPDLIVA AVV
 GDGEAETGPLATAWHSNKFINPIRDGAVLPILHLNGYKIANPTILARISHEELEYLFKGYG
 YKPYFVEGSDPEVMHQKMAATLETAIAEIKHIQQEARTSGVAKRPIWPMIVLRSPKGWT
 GPASVDGKKTEDFWRSHQVPLSGMHGNPAHIKVLEDWLKSYTPEELFDENGTLIPELKE
 LAPTGHHRMSANPHANGGLLRKDLKMPDFRNYGVEVAKPGTVEVGNTALLGNFLRDV
 MANNMTNFRVFGPDETASNRLNAIYEISKKVWMGEILPEDADGTEITTDGRVMEMLSE
 HTLQGWLEGYLLTGRHGFFHTYEAFAHVVDSSMFNQHAKWLDICKNEVPWRASVSSLN
 ILLSSTVWRQDHNGFSHQDPGYVDLVTNKSADVVRVYFPDANCLLSVANHCLKSTDY
 VNVIVSDKQIHLQYLNMDQAIKHCTKGIGIWDWASND DCGTEPDHPDVIMASCGDVAT
 KEALAATAILREEFPDLKVRFINVVDLFLQSEIEHPHGLSDRDFDNLFTKDKPIIFNFHG
 YPWLIHKLTYRRTNHHNLHVRGYKEKGNINTPLELAINNQIDRFNLVIDVINRVPKLGSA
 AAYVYERMKNAIIEHRA YAYEHGIDKPEINNWKWPH (配列番号21)

40

ネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) NRRL 1

50

81からのホスホクトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化22】

MTSKGEIESLSAYGVARSTIQGTPLSQDELRKMDAYFRASMYLCLGMLYLRLDNPLLKEP
LKVEHLKARLLGHWGSDAGQSFTWIHMNRLLIKKYDLDFISGPGHGAPGILSQSYLEG
VYTEVYPEKTQDEKGLQRFKKQFSFPGGIGSHATPETPGSIHEGGELGYSISHAFGTVFD
HPNLITLTMVGDEAETGPLATSWHSNKFLNPITDGAVLPVLHLNGYKINNPTILARISH
EELEMILLKGYGWTPYFVEGSDRESMHQAMAATLEHCVLEIKKIQQKQARESNAFRPL
WPMIVLRSPKGWSAPREIDGKYLEGFWRHAHQIPITDVQSKPEHLKVLENWMAKYKPEE
VFDKNGTLPELKEAPTGTSRMSANPVGNGGLLRPMDLPDFRDYALTDIEPGVTIRPS
MSNMSKYLRDVVARNMFTFRVFGPDETESNKLAEIYKAGKKVWMAEYFKEDGDN
LDMQGRVMEILSEHTCEGWLEGYILSGRHGMLNSYEPFIHVIDSMVNQHCKWIEKCLA
VEWRAKVSSLNILLTATVWRQDHNGFTHQDPGFLLDVVANKSPEVVRIYLPDGNLTLLS
TMNHCFRSVNYVNVIVADKQEHVQFLNMEEAIEHCTKGVGIWDWASNDQGCPEPDVV
MASCODVATHEALAATALLREHLPQLKVRVNVVDLFRLLISDINHPHGMPDRQWGAIF
TTDKPIIFNFHSYPWLIHRLTYKRPGQHNHVRGYKEKGNIDTPFELAVRNQTDRLSLAI
DAIDRISLGNLTASGVRERLINLQLAAKNKAFDDGIDPDYIRNWTWDYPRKKC (配列番号
22)

10

エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) TX13
30からのホスホクトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化23】

MDYSSKEYFDKMTAWWRAANYLSVGQIYLKDNPLLRRRTLKPEDVKKHPIGHWGTIPG
QNFIYVHLNRVINKYDLNMFYIEGPGHGQQVMVSNAYLDGSYTEIYPEVTEDETGMQK
LFKRFSFPGGIASHAAPETPGSIHEGGELGYSLSHGVGAVLDNPEVISAVVIGDGEAETGP
LAGSWFSNVFINPVTGAVLPILHLNGAKIANPTILARKSDGELANYFNGLGWEPFFIEG
NDPEKLNPMVMAEKMDQAIEKIKSIQKEARLKTAAADAMMPKWVPLIVRTPKGWTGPEE
WDGEPIEGTFAHQVPIVDQEHMDHADALLRWLKSYPEKLFDQAQRILEEIREIAPTG
DHRMAKNPITNGGMDPKPLIMPDWKRYTLQFEKPGSVTAEDMTELGKFVREIEKNPEN
FRIFGPDETKSNRLNQVFKTNRQWMEKIEPENDEWLSPSGRVIDSQLSEHQDEGFLEG
YVLTGRHGFFASYESFLRVVDSMLTQHFKWMRKSRDLNWRNNYPSLNLIASSTVFQQD
HNGYSHQDPGILTHLAEKKAFFIREYLPADANTLLAVMDKAFRSSEKINLISSKHPRQA
FYSAEEAAVLVNEGLKIIDWASTAKEEEPELVIAAAGTESNLEALAAVTLLLEEFPKLKI
RFINVVDLLKLRHPSQDPRGLSDEEFDKYFTKDKPILFAFHGYETLIRTIFFDRHNHHLMI
HGYKENGDITTPFDMRVVNELDRYHLAKDAALKIKGSQAEDFAKKMDQKLQEHQNYI
RENGIDLPEVLDWKWKNLDQ (配列番号23)

20

30

リステリア・グレイ (*Listeria grayi*) DSM20601からのホスホ
クトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 2 4】

MTDYSSPNYLAKVDAWWRAADFISVGQLYLKGNPLLRPLEKEDLKVHPIGHWGTISG
 QNFIY AHLNRVINKYDLNMFYIEGPGHGGQVMVSNSYLDGSYTDYPTITQDEVGLTKL
 YKQFSFPGGIASHAAPETPGSLHEGGELGYALSHATGSILDNDPDVIAATVIGDGEAETGP
 LSAGWFSNTFINPVNDGAVLPILYLNAGAKISNPTILSRKTDKELTSFFQGLGWDPIFVEGE
 DPAKVHPLMAEKLDQAIEKIKAIQTEARKEAADKATMPTWPVILFRTPKGWTGPKAWN
 NEPIEGSFRAHQVPIVDQHHFDHVDALENWLQSYRPEELFTEEGSLKEEIKSLAPKNRM
 ATNPITNGGIDPQPLRLPSWKDYAVETANKDVITQDMIELGGFVRDIVKENPDNFRIFGP
 DETKSNRLNKVFEVTNRQWMSKAEFPRDEWLAPAGRIIDGQLSEHQAEGLFEGYVLTG
 RHGFFASYESFLRVVDSMLTQHFKWLRKAKEQWTRNSYPSLNVIATSTVFQQDHNGYT
 HQDPGVLTHLAEKKPEFIREYLPADTNSLLAVMNEAFRSEELINLIVSSKHPRPQFYSAEE
 AEILVKDGLKIIDWASTVSEAEEDPVVIASAGTEPNLEALAAVTLLNEAFPSLKIRFINIVD
 ILKLRHPDIDPRGLTDEEFDRYFTTDKPIIFAFHSYEGMVRDIFFRHNNHNLFIHGYRENG
 DITTPFDMRVLSEMDRFHLAKDAAEAVYGEIATSFAAEMDAVLSKHHHFIENGEDLPE
 VENWKWQALKTDLLEV (配列番号24)

10

エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) EC 30 からのホスホケトラゼ酵素のアミノ酸配列

【化 2 5】

MKTTYDTPEYYQKMNAWWRAANYLSVGQIYLLKDNPLLRPIEEKDLKVNPIGHWGTI
 AGQNFIYTHLNRVINKYDLNMFYIEGPGHGGQVMVANAYLDGSYSEIYPKATQDEAG
 MKHLFKTFSFPGGIASHAAPETPGSIHEGGELGYSLAHATGAILDNDPDVIAAVVVGDEA
 ETGPLAGSWFSNTFINPVNDGAILPILHLNAGAKIANPTILARKSDQDLTKYFEGMGWTPY
 FVEGDDPEAVHPQLAQKMDQAIEQIHAIQAEARKGSAEEAAMPHPVPLIVRTPKGWTG
 PKVWDGEPIEGGFRAHQVPIPVNAKHMEHVDALTDWLQSYRPEELFDENGRIKAEIQEL
 APKGEQRMVNPITNGGIDPQPLRLPDWQAHAIETPGETTAQDMMVFGKFARDIIE
 NPDNFRIFGPDEAKSNRLNHVFEVTDQRQWLEPKHPDYDEWLSSVGRVIDSQLSEHQAE
 FLEGYVLTGRHGFFASYESFLRVVDSMITQHFKWLRKAHDLDRNPYPYPSLNLIASSTVF
 QQDHNGYTHQDPGIMTHIAEKKADFVRVYLPADANSLMAVMAETLASEEKINLVSSK
 HPRPQFYSADEAKVLVKDGLKVIDWASTDEGQEPDIVIAAAGTEPNLEALAAVSLLEIA
 FPELKVRFINVVDLLKLRPEVDPRGLSDEAFEAYFTKDKPIVFAFHGYEGLRDIFFGRR
 NQQLHIHGYRENGDITTPFDMRILSELDRFHLAKDAAEWVYGEKATDFAQKMADTVA
 YHHDFIRENGYDIAEEVEEWKPLR (配列番号25)

20

30

マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*) A2
 1JP2 からのホスホケトラゼ酵素のアミノ酸配列

【化 2 6】

MKKNTFDTQDYLDKVDWAFRAANYLSVGQMYLRNNPLLRSKITSDDVKVYPIGHWGT
 IPGQNFAY AHLNRVINKYNLNMFYIEGPGHGGQVMVSNSYLDGSYTELFPHVTQDVAG
 MKHLFKYFSFPGGTASHAAPETPGSIHEGGELGYSLSHATGAILDNDPNVIAATIVGDGEA
 ETGPLAASWFSNSFINPVNDGAVLPILHLNNGGKISNPTILCRKSNKELTDYFAGMGWEA
 VFVEGSDEKEMHKVMAQKLDYVIEKIQSIQNEARKKPANQATRIWPMMVLRTPKGW
 TGPDSWNKDKIVGSFRAHQVPIPVNSANMEHIDALLDWLKS YKVDNLFDKNGKLVDEI
 AQIAPKGDQRMGMNPITNGGLNPKKLVMPRWQDFALKFSKPGELVNQDMVELGTYFA
 KMMELNKDNFRLFGPDETKSNRLYNVFKVTKRQWLEPISPILDEALSPEGRVIDSQLSEH
 QAEGLFEGYVLTGRHGVFASYESFLRVVDSMLTQHLKWLKKAADVHWRNDYPSLNVI
 ATSTAFQQDHNGYTHQDPGLIGHLADKTPEIIRQYLPADTNTLLAVMDKSLKERNVINH
 IASKQPREQFYSEQEAELVEKGLKVIDWASTTKGNEEPELVVVAAGTEPNLEALAAV
 TILNKEYPSLKIRFVNVDLMKLRHPSLDPRGLSDKEFDAIFTSNKPIVFAFHGYEGILRD
 MFFKRNNHNLITHGYRENGDITTSFDIRQLSHMDRFHISASAAKAVYGNKAQEFEDKMI
 QTIDFHTKYIREYGTDIPEVKWKWADLTRK (配列番号26)

40

カルノバクテリウム属 (*Carnobacterium*) 17-4 種からのホスホケトラ

50

ーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 2 7】

MKNYDSKDYLLKKVDAFWRAANYLSVGQLYLKRDNPILLQRPLKSTDVKAHPIGHWGTIS
GQNFIYAHNLRVINKYDLNMFYIEGPGHGGQVMISNAYLDGSYTEIYPDITENKEGMKK
LFKQFSSPGGVASHAAPETPGSIHEGGELGYSLSHATGAILDNPDVIAATVIGDGEAETG
PLAAGWFSNNFINPVNDGAVLPILYLNGGKISNPTILARKSNEDLKKYFEGMGWKPYFV
EGTDPEKVHPVMANTLDVVIEEIRSIQNEARKGKAEDVEMPHWPVMIIRTPKGWTGPKE
WDNKKIEGTFRAHQVPIPVDAEHMEYVNKLVDWLKSYRPEELFTENGKLIDDLKELTP
KGNKRMATNPITNGGINAKALIIPNWKQHAIDTTIPGAVIAQDMDFGEQARDLIVKNP
NNFRIFGPDETCKSNRLDKIFEVTNRQWLESKELTDEWQSSAGRVIDGQLSEHQAEGLFLE
GYVLTGRHGGFFASYESFLRVVDSMLTQHFKWLRKATDQKWRNNYPSLNVIATSTVFQQ
DHNGYTHQDPGILTHLAEKKPEFIREYLPADANSLMAVMDKTLQEEQLINLISSKHPRP
QFYSVEEAELVKDGLKIIDWASTDNDSEPDLVIAAAGTEPNLEALAAMSILHKAFFELKI
RFINIVDILKLRHPDIDSRGLTDEKFDSTYFTKEQPIIFAFHGFEGFLIRDIFFNRHNNHNLRIHG
YRENGDITTPFDMRVLNEMDRFHLAKDAKAVYGLKANKFMQEMENTVNFHHQYIRE
NGIDIPEVINWKWEKI (配列番号27)

10

メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)

A T C C 3 5 3 1 1 からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 2 8】

MEKDKYSSTEYLDKIDKWWRAANYLSIGQLYLKDNPLLKRKIRSEDVKYHPIGHWGTI
AGQNFIYAHNLRINKYDLNMFYIEGPGHGGQVMVSNSYLDGSYTEIYPVTEDEAGM
QKLFKRFSFPGGVSSHAAPETPGSIHEGGELGYSLSHGVGAILDNPEVISAVVIGDGESET
GPLATSWFSNTFINPVTDGAVLPILHLNGAKIANPTILGRKSDKELEQYFRGMGWIPYFV
EGNDPNQMHPLMAKTLDQVIEKIHSIQETARKQTAETASIQKWPLIVLRTPKGWTGPKE
WDGKPIEVTFAHQVPIPIDQDHMEHVDQLVNWLSYKPEELFDETGRNLSEIRAIAPM
NDKRMAMNPITNGGINPKPLQMPDWREFDLHISKPGELVAQDMLEFGKMAAIIKKNP
QNFLIFGPDETCKSNLLNDAFSVTSRQWLEPIYEPQDEWLAPSGRIIDSQLEHQDEGILEG
YVLTGRHGGFFASYEAFIRIVDSMIAQHKKWMRKAMDLPWRNGYSSNLIASSTAFQQDH
NGYTHQDPGILSHLAEKEADFIHEYVPADTNSLLAVMDKVLKSQGVNLVISSKHPRPQ
FYSPEEAQELVNRGLMEIDWASTVAENGTEPIVIVAAGTEPNMEALAAINLINQSFPKLQ
FRFINVVDLLKLRHPAVDSRGISEVEYNHLFTVDSPIIFVCQGYSSLIRSLFYDRKNRPVSI
HSYQENGAITTPFDMRVLNKIDRYHLAKDIALTAYGSRGEDFARAMDTILEKHNQYIRE
TGKDLPEVLNWKWAPLHIYNENIEQD (配列番号28)

20

30

テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*) N B R C 1 2 1 7 2 からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 2 9】

MSVNIDSKEYLERMNAWWRAANYISVAQIFLRDNPLLRRPLEKEDIKINPIGHWGTISG
QNFIYVHLNRVINKYGLNMFYIEGPGHGGQVMVSNSYIDGSYSEIYPDVTQDEAGLKKL
FKQFSFPGGMGSHAAPETPGSIHEGGELGYSMASHAVGAVLDNPDVIAATVIGDGEAETG
PLAASWMSNNFINPVNDGAVLPILNLNGAKIANPTVLARKSDKDLQKYFEGLGWKPYF
VEGDNPEKMHPLMAETLDAVINEIQSIQKEARKGSAEDVTMPHWPVIVFRTPKGWEGP
EKWDNEQIAGTFRAHQVPIPIDASHMEYANDLAKWLKSYRPEELFDENGTHIDAIELSP
KGDNRMSVNPITNGGLDPKALNMPDWHTHAVDTSKRGTDKAQDMSVLGGFIADIMEN
NPKNFRIFGPDETCKSNRLNKVFDVTNRQWVEPRELSDEWQSAVGRVIDGQLSEHQAEGL
FLEGYTLTGRHGGFFASYEAFIRIVDSMLTQHFKWIRKANEKSWRKKYPSLNVISSSTAF
QQDHNGYTHQDPGVITHLAEKKPEYIREYFPADANSLMAVMDKALKDENVINLITSSK
HPRPQFYSVEEAQELVDYGVKKIDWASNDQDSEPDIVFAAAGSEPNLEALAAISILHEQF
PEMKIRFINVVDLLKLRHPDVPDPRGLSDEAFDELFTTDKPVIFNFHGYEGLIRDIFFTRHN
RNLSIHGYREDGDITTPFDMRVKNELDRFHLAKDAANTIYAEKAADFIQEMDKTLQYH
HDYIRENGDDISEVQNWEEKDLK (配列番号29)

40

50

メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)
D A T 5 6 1 からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列
【化 3 0】

MTKYDSKEYLAKVDAFWRAANYISVGQLYLKDNPLLDRIETTDVKVHPIGHWGTISG
QNFIY AHLNRVINKYDLNMFYVEGPGHGGQVMVSN SYLDGSYTEIYPEITEDKEGLKKL
FKQFSFPGGIASHAAPETPGSIHEGGELGYSISHATGAILDNPDVIAATVVG DGEAETGPL
SAGWFANTFINPVNDGAILPILYLNGGKISNPTILERKSDEELTKYFEGMGWKPYFVEGT
VPDKVHPLMAKILDHIIIEIKDIQKEARKDKAENAKMPHWPVLIMRTPKGWTGPKIWD
DEKIEGTFRAHQVPIPVDAEHMEHIDALVDWLKSYHPEELFDKNGTLKPELKELV PKGD
RRMAKNPITNGGLDPKPLKMNGWEQHAIDTSTPGMVTAQDMIVFGNYVEDLIKANPTN
FRIFGPDETKSNRLNKVFDSTDRQWMEPISNADEWQSSVGRVIDGQLSEHQAEGFLEGY
ILTGRHGFFASYESFLRVVDSMLTQHFKWLRKAKEQSWRKEYPALNIIATSTVFQQDHN
GYTHQDPGILTHLAEKKA EYIREYLPADANCLMAVMDKAFQENEVINLIVSSKHPRPQF
YSVTEAKELVDKGVKVIDWASNDEGQTPDIVIAASGTEPNLEALAAITLLNKEFIDLKIR
FVNVVDILKLRHPSIDPRGLTDEEFDAIFTKDKPIVFAFHGFEGLRDIFFSRSNHQLFVHG
YREKGDITTPFDMRVLSEMDRFHLAKDVADKVYNEQAADFMNRMDEILAFHHQYIRK
NGIDIPEVVNWKWEDLRKKTICFN (配列番号30)

10

マイコプラズマ・アルスリチデイス (*Mycoplasma arthritidis*)
1 5 8 L 3 - 1 からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列
【化 3 1】

20

MKKTNYDSNEYFNLDKWFR AANYLSVGQIYLRNNPLLKTKLVADDVKIYPIGHWGTI
PGQNFIY AHLNRVINKYDLEMFIYIEGPGHGGQVMISNSYLDGSYTEIYPEITEDEAGLKT
MFKRFSFPGGTASHAAPETPGSIHEGGELGYALSHATGAILDNPVNIAATVIGDGEAETG
PLAAGWFSNSFINPVNDGAVLP IHLNGAKISNPTILSRKSNQELENYFSGLGWEPLFVEG
DDPKLMHPLMAKKLDEAIEKIQMIQASARKHKASEATRPVWPMLIVRTPKGWTGPKD
WNGEVVEGSFRAHQVPIPVNALNMTHIDKLEAWLTSYHPEELFDKNGKILEEIRALAPK
GLKRMAVHPITNGGINPRTLKLSWEKFATKFETPGQIKGQDMIELGKYFAEITLNKDN
FRIFGPDETKSNRMNAVFNVT KRQWLEKIAPTYDEWMSPEGRVIDSQLSEHQAEGFLEG
YVITGRHG VFASYEAFLRVVDSMLTQHMKWMKKSLELPWRKDFPSLNVIATSTAFQQD
HNGYTHQDPGLLGHLADKRPELIREYLPADTNCLLATMEKALKDRNVINLIVASKQPRE
QFYSVEEASELVQKGYKIINWASNVS KNEEPDVVFAAAGVEPNLEALAAISILNKEFPNL
KIRFVNVLDLLKLKSPKHDPRGISDEEFDQIFTKNKPIIFAFHGYEGLLRDIFFDRHNHNLI
THGYRENGDITTSFDIRQLSHMDRFHIAKDAAIAALGKDGEMFAKKMDSKLQEHTSYV
REYGYDLPEVVNWKWWTNLKPIK (配列番号31)

30

ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)
N E M 3 1 6 からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 3 2】

MSEFDTKSYLEKLDWWRAANYISAAQMYLKDNPLLRLVENDLKVHPIGHWGTVP
 GQNFYIY AHLNRAIN KYDLD MFYIEGPGHGGQVMVSN SYLDG SYTELNP NIEQTEDGFK
 QLCKIFSFPGGIASHAAPETPGSIHEGGELGYALSHATGAILDNP DVIAATVIGDGEGETG
 PLMAGWLSNTFINPVNDGAVLPIFYLNGGKIHNPTIFERKTDEELSQFFEGLGWKPIFAD
 VVELSEDHAAAHALFAEKLDQAIQEIKTIQSEARQKPAEEAIQAKFPVLVARIPKGWTGP
 KAWEGTPIEGGFRAHQVPIPVDAHHMEHVD SLLSWLQSYRPEELFDESGKIVDEIAAISP
 KGDRRMSMNPITNAGIVKAMDTADWKKFALDINVPQGQIMAQDMIEFGKYAADLVDAN
 PDNFRIFGPDET KSNRLQEVFTRTSRQWLGRRKPDYDEALSPAGRVIDSQLSEHQAEGL
 EGYVLTGRHGFFASYESFLRVVDSMVTQHFKWLRKSKTHTTTWRKNYPALNLIAASTVF
 QQDHNGYTHQDPGILTHLAEKTPEYIREYLPADTNSLLAVMDKAFKAEDKINLIVTSKH
 PRPQFY SIAEAEELVAEGYKVIDWASN VSLNQEPDVVFAAAGTEPNLEALAAISILHKAF
 PELKIRFVNVDILKLRHPSQDARGLSDEEFDKVFTTDKPVIFAFHSYEDMIRDIFFSRHN
 HNLHTHGYRENGDITTPFDMRVMSELDRFH LAQDAALASLGNEAQA FSDENMQMVAY
 HKDYIREHGDDIPEVQNWKWENIK (配列番号32)

10

マイコプラズマ・アガラクチアエ (*Mycoplasma agalactiae*) PG
 2 からのホスホクトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 3 3】

MKKSHDFDSKEYLNLVDAWWRAANYLSVGQMYLRNNPLLKIPLTSNDVKIYPIGHWG
 TVPGQNFYIY AHLNRIINKYDLNMFFISGPGHGGQVIASNTYLDG SYTELFPHVTKDIKGM
 THLFKYFSFPGGTASHAAPECPSIHEGGELGYSLSHAAGAVLDNP DVIAATVIGDGESE
 TGPLSAGWFINSFINPANDGAVLPILHVNGGKISNPTIWSRRSNEELVSYFTGAGWKPIFV
 EGNEPEYMHHEMAKALDASVELIKYQAEARKNGANKAKRPQWPMIVLKS PKGWTG
 PKEWNHEAIEG SFRAHQVVPVSAEKMQHIDALENWLRSYRPEELFDENAQLKPEIAAI
 APKGDRRMGKNPIANGGINPRAINVDWTKFALDIKQPGKVINQDMVTLG SYLGELS
 LNKDNFRVWGPDEHKSNRLYEMFKVTDRQWLDRIDEKYDEFLSSVGRIDSQ LSEHQAE
 EGMLEGYVLTGRHGVFASYESFLRVVDSMLTQHMKWVKKALDIPWRNDYPSLNVIA
 TSNFQQDHNGYTHQDPGLIGHLADKRPELIREYLPADTNTLLATMAKALQDRNVINLIH
 SKQPRHQFFSIEEATELVEKGIKIDWASNIPNEEPDLVVAASGTESTIESLATITYLRAH
 FPPELKIRFVNVDLLKLRHPSIDPRGLSDSEFDSIFTKDKPILFAFHGYEAILRDIFFLRSNH
 NIITHGYRENGDITTA FDIRLLSEMDRFHMTANVAKKLAPVVGESKANELVKLMEDKIK
 EHRAYIKEYGTDLP EVKEWEWTPYK (配列番号33)

20

30

ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*) シ
 ャリス (*Challis*) 株CH1 垂系からのホスホクトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 3 4】

MTTDYNSKAYLEKVDWWRAANYISAAQMYLKDNPLLKR DVVANDLKAHPIGHWG
 TVPGQNFYIY AHLNRTINKYDLD MFYIEGPGHGGQVMVSN SYLDG SYTELNP NIPQNEEG
 FKHLCKIFSFPGGIASHAAPETPGSIHEGGELGYALSHAAGAILDNP DVIAATVIGDGESE
 TGPLMAGWLSNTFINPVNDGAILPIFYLNGGKIHNPTIFERKTDEELTLFFEGLGWKPIFA
 DVTAISENHEAAHALFAAKLDEAIEEIKKVQAEARKGSAAEATQAIFPVLVARIPKGWT
 GPKSWEGTPIEGGFRAHQVPIPVDAHHMEHVDALLNWLKSYRPEELFDESGKVLPEIAA
 IGPKGDRRMAMNPITNAGVIKPMDTADWKKHALKFGTPGEIVAQDMIEFGKYATDLVD
 ANPDNFRIFGPDET KSNRLQEVFTRTSRQWLGRMRPEYDEALSPAGRVIDSQLSEHQAE
 GMLEGYVLTGRHGFFASYESFLRVVDSMVTQHFKWLRKCKTHTTTWRKNYPALNLIAT
 STVFQQDHNGYTHQDPGILTHLAEKTPEFIREYLPADTNSLLAVMDKAFKAEDKVNLI
 VTSKHPRPQFYSAEAEELVREGYKVIDWASTVSNNEEPDVVFAAAGTEPNLEALAAVSI
 LHKAFPELKIRFVNVDILKLRHPSVDARGLSDEEFDQVFTTDKPVIFAFHGYEGMIRDI
 FNRHNHNLRVHGYRENGDITTPFDMRVMSELDRFH LAQDAANAALGEDAAVFS AKMD
 ETVAYHNAYIRENGDDIPEVQNWKWENINK (配列番号34)

40

キングラ・オラリス (*Kingella oralis*) ATCC51147 からのホス

50

ホケトラゼ酵素のアミノ酸配列

【化35】

MQNTQFDTPEYLAKVDAWWRAANYISAAQMYLKDNPLLKKPLTANDVKAHPIGHWG
TVPGQNFIY AHLNRAIN KYD VDMFYIEGPGHGGQVMVSN SYLDHSYTDIYPEITQDEAG
LKKLCKIFSFPGGIASHAAPETPGSIHEGGELGYALSHAFGAVLDNPNIIAAVIGDGEAE
TGPLCAGWFGNTFINPVNDGAVLPILYLNGGKIHNPTILARKTDAELTQYFNGMGWEPI
FVEVSDPAHSHAIMAQKLDEAVERILAIWQDARSRSANDATMPRWPVLVARIPKGWTG
PKTWNGEPIEGGFRAHQVPIPTNSHDMSTADALEAWLRSYRPEELFDDNGRFLDKWREI
SPKGAKRMSVHPITNGGVAPKALVMPDWT KHALKIGTPGSQDAQDMI ECGRLMADVIT
ANPDNFRIFGPDET KSNRLNEVFKVTNRQWLGV RDAAYDEWIAPVGRVIDSQLSEHQA
EGFLEGYVLTGRHGFFASYESFLRVVDSMITQHFKWLRKCKTHAPWRKDYP SLNLIATS
TVFQQDHNGYTHQDPGLLTHLAEKKPEFVREYLPADANTLLAVMSEALT SRDRINLIVS
SKHLRPQFYSADEAKELVREGYKII EWASTCHDGE PDVVIAAAGTEPNMEALAAINVLH
KHYP EKMIRFINVVDILKLRHPSIDPRGLSDEAFDALFTRDKPVVFCFHGYENMVRDIFF
PRHNRNVRIHGYRENGDITTPFDMRVLSEMDRFHVAKDAAQAVYGEKAADFANKMDE
TIQFHRSYIREH GKDIPEVAEWKWQPLAK (配列番号35)

10

マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*) M
64からのホスホケトラゼ酵素のアミノ酸配列

【化36】

MNKKEFDSKEYLEKVD AWWRAANYLSVGQIYLRNNPLLKHPLTSDDVKVYPIGHWGT
ISGQNFAY AHLNRVINKYDLNMFYIEGPGHGGQVM TSNSYLDGSYTELFPHVTQDEAG
MQHLFKYFSFPGGTASHAAPETPGSIHEGGELGYSISHATGAILDNPDVIAATIVGDGEA
ETGPLATSWFSNSFINPVNDGAVLPILHLNNGGKISNPTILSRKSNEELQQYFRGMGWEPH
FVEGDKPEVMHELM AKTLD SVIEEIQSIQTKARKKPADKAKRPVWPMIVLRTPKGWTG
PKSWNKEAIEG SFRAHQVPLPINAENMEHADALEKW LRSYRPEELFDKKGKLVKEIAAI
APKGKRRMGMNPITNGGINPKVMKLGDWRKFALHFDRPGSVVAQDMVELGTYFADL
VKRNPENFRIFGPDET KSNRLYNLFKVTNRQWMERIDSKLDEALSPVGRIIDSQ LSEHQA
QGFLEGYVLTGRHGIFASYESFLRVVDSMVTQHMKWLRKAKEINWRKDYP SLNIMATS
TAFQQDHNGYTHQDPGIIGHMADKRPELIREYLPADTNTLLAVMDKAFTERNVINLIVS
SKQPRHQFY SVEEAETLVEKGLDIIDWASTCSRNETPDLVVVASGTEPNLEALATISILN
KEYPSMKIRFVNVDLLKLRHPKIDPRGLSDEEFDEIFTKDKPVLFAFHGFEGILRDIFD
RHNHNLI AHGYRENGDITTSFDIRQLSHMDRFHMASDAAA VFGSSKAKEFMDKMEET
IQFH NKYIREVGTDIPEVKNWKWEGLIK (配列番号36)

20

30

グラニュリカテラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*)
ATCC 49175からのホスホケトラゼ酵素のアミノ酸配列

【化 3 7】

MTQFDTPEYLAKVDAWWRAANYISVAQMYLKDNPLLRPIQKEDVKLHPIGHWGTIA
 GQNFIY AHLNRANKYDLDMFYIEGPGHGGQVMVSN SYLDGSYTELYPQITQDEAGFK
 QLCKIFSFPGGIASHAAPETPGSIHEGGELGYSLSHATGAVLDNPNVIAAAVIGDGEAET
 GPLAAGWFSNTFINPVNDGAVLPILYLNGGKIHNPTILARRTDEELTQFFNGLGWDPIFV
 EGTDPKVVHPLMAAKLDEAIEKIQAIQKEARAKSAEEATMPHWPVLVVRTPKGWGTGPK
 EWNHEPIEGGFRAHQVPIPVSGEAMEHVDALVDWLKSYRPEELFDENGKLVVEIAAISP
 KGPRRMSMNPITNAGVVKPMEITDWTKHAI DT SKPGAIQKQDMIEFGKFAADLVKANP
 DNFRIFGPDET KSNRLNEVFKATNRQWVGRRDESYDEWISPVGRVIDSQLSEHQAEGL
 EGYVLTGRHGGFFASYESFLRVVDSMITQHFKWLRKAKTHAPWRKNYPSLNLIATSTVF
 QQDHNGYTHQDPGLLTHLAEKKPEFVREYLPADTNSLMVMAEALSSSEDKINLIVSSK
 HPRPQFYSVEEAKELVSEGYKVIDWASTVKEGEEP DVVIAAAGTEPNLEALAGISILHKQ
 FPELKIRFINVVDILKLRSPKVDPRGLSDEEFDKLF TTDKPVVFCFHGYEGMIRDLFFDRN
 NHNVHIHGYRENGDITTPFDMRVLSEMDRFHVAKDAAVAVYGEKASEFAAKMDETVE
 FHHSYIREHGEDIPEVVSQWENVNK (配列番号37)

10

マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*) ATCC 23114
 4 からのホスホクトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 3 8】

MISKIYDDKKYLEKMDKWFRANYLGVCQMYLRDNPLLKPLTSNDIKLYPIGHWGT
 VPGQNFIYTHLNRVIKKYDLNMFYIEGPGHGGQVMISNSYLDGSYSEIYPEISQDEAGLA
 KMFKRFSFPGGTASHAAPETPGSIHEGGELGYSISHGTGAILDNPDVICA AVVG DGEAET
 GPLATSWFSNAFINPVNDGAILPILHLNGGKISNPTLLSRKPKEEIKKYFEGLGWNPIFVE
 WSEDKSNLDMHELMASLDKAIESIKEIQAEARKKPAEEATRPTWPMIVLRTPKGWGTG
 PKQWNNEAIEGSFRAHQVPIPVSAFKMEKIADLEKWLKSYKPEELFDENGTHIKEIRDLA
 PEGLKRMVNPITNGGIDSKPLKLQDWKKYALKIDYPGEIKAQDMAEMAKFAADIMK
 DNPSSFRVFGPDET KSNRMFALFNVTNRQWLEPVSKKYDEWISPAGRIIDSQLEHQCE
 GFLEGYVLTGRHGGFFASYEAFLRVVDSMLTQHMKWIKKASELSWRKTYP SLNIIATSNA
 FQQDHNGYTHQDPGLLGH LADKRPEIIREYLPADTNSLLAVMNKALTERNVINLIVASK
 QPREQFFTVEDAEELLEKGYKVVPWASNISENEEPDIVFASSGVEPNIESLAAISLINQEY
 PHLKIRYVYVLDLLKLR SRKIDPRGISDEEFDKVFTKNKPIIFAFHGFEGLLRDIFFTSRNH
 NLIAHGYRENGDITTSFDIRQLSEMDRYHIAKDAAEAVYGKDAKAFMNKLDQKLEYHR
 NYIDEYGYDMPEVVEWKWNINKEN (配列番号38)

20

30

マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*) MP 14
 5 からのホスホクトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 3 9】

MKKT VYDTELYIEKLD AWFRAANYLSVGQMYLRNNPLLRNKITKDDVKVYPIGHWGT
 IPGQNFAY AHLNRVINKYDLNMFYIEGPGHGGQVM TSNSYLDGSYTELFPHVTQDL DG
 MKHLFKYFSFPGGTASHAAPETPGSIHEGGELGYSLSHATGAILDNP NVIAAATIVGDGES
 ETGPLAAGWFSNSFINPVNDGAVLPILHLNGGKISNPTILCRKSNEELTNYFLGMGWEAI
 FVEGEDVQKMHKLMATKLDYAIERILSIQKEARKGKAEEATRPLWPMIVLRTPKGWGTG
 PQKWNSDQIVGSFRAHQVPIPVNSENMT HIDLALVDWLKSYNVDNLFDKKGKLVPEIAEI
 APVGDRRMGMNPVTNGGLNPRNLALPNWQDFALNLEKPGAKIAQDMVELGSYFAKV
 MEMNKDNFRLFGPDET KSNRLFN VFKVTSRQWLEPINPLFDEALSPAGRVIDSQLSEHQ
 AEGFLEGYVLTGRHGVFASYESFLRVVDSMLTQHMKWLKKANDVSWRNDYPSLN VIA
 TSTAFQQDHNGYTHQDPGLIGH LADKTPELIRQYLPADTNTLLAVMDKSLTERNVINHII
 ASKQPREQFYSAKEAAELVEKGLKVIKWASTVEGNDEPDLVVAAGTEPNLEALAAITI
 LNKEFPKLKIRFVNVDLMKLRHPSIDPRGITDKEFDKIFTKDKPVLF AFHGYEGILRDIF
 FKRNNHNLIAHGYRENGDITTSFDIRQLSHMDRFHMAASAAVAALGKKANAFETKMLE
 TIDFHTKYIREYGTDIPEVKWKWNPLVRK (配列番号39)

40

ナイセリア属 (*Neisseria*) 種 014 口腔分類群 F 0314 株からのホスホクト

50

ラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化40】

MSAQYDSADYLNKVDAAWWRAANYISVAQMYLKDNPLLMRPIQASDVKAHPIGHWGT
IAGQNFIYAHLNRAINKEYDLNMFYIEGPGHGGQVMVNSYLDGSYSEIYPNITQDEAGL
KQLCKIFSFPGGIASHAAPETPGSIHEGGELGYALSHAVGAVLDNPDVIAATVIGDGEAE
TGPLSAGWFSNVFINPVNDGAVLPILYLNGGKIHNPILARKSDESLRLYFEGLGWDPIF
VEATDYATTHKVMQAQKLDEAIEKIKAIQTKARAGKAEAVMPKWVPLVARLPKGWTG
PKVWNGEPIEGGFRAHQVPIPASSHDMATVDSLVEWLKSYRPEELFDANGTFKAELREI
SPKGDRRMSTNPITNGGINPRPLNTADWKKFALDNSDRGSIMAQDMIEFGKYAAELVK
ANPDNFRIFGPDETKSNRMNEVFKVTNRQWLEPIDKAYDEWMSPAGRVIDSQLSEHQA
EGFLEGYVLTGRHGFFASYESFLRVVDSMATQHFKWLRKCKTHAPWRKSYPSLNLIAT
STVFQQDHNGYTHQDPGMLTHLAEKKPEFIREYLPADANSLLAVMSEVLSSKDKVNLI
VSSKHPRPQFYSAEAEELVREGYKVIDWASTDKGGEPDVVIAAAATEPNLEALAAITIL
NKQFPELKIRFINVVDILKLRHPKVDPRGLTDEQFDALFTKDKPVIKCFHGYEGMVRDIF
FDRHNHNLRIHGYRENGDITTPFDMRVLSEMDRFHVAKDAALAVYGDKAQDFAKKMD
DTLAFHHSYIRENGEDIPEVRNWKWEALK (配列番号40)

10

エレモコッカス・コレオコラ (*Eremococcus coleocola*) ACS-139-V-C018からのホスホケトララーゼ酵素のアミノ酸配列

【化41】

MTVDYNSKEYLTLVDKWWRAANYLSVGQMFLRDNPQLLQEEVTADHVKLNPIGHWGT
IGGQNFLYAHLNRIINKYNVNMFYIEGPGHGGQVMVNTSYLDGSYTERYPEFTQDIAG
MKKLKFTFSFPGGIGSHAAPETPGSMHEGGELGYALSHATGAILDNPVIAATVVGDE
AETGPLAAGWFSNVFINPVSDGAVLPILYLNGGKIANPTILARKSNEDLTKEYFEGMGWK
PYIVEGTDPEQVHPIMAKVLDEVIEEIQAIQAEARKGKAEDAKMPHWPMLYRTPKGWT
GPEEVEGKTIQGSFRAHQVPIPVSGRNMEDIDLLINWLKSYGPEELFTENGELVDELKEF
APKGDHRMAMNPLTNGGNPKPLNMPNWKDYALEIGTPGSKDAQDMIEFGGFARDIVK
ENPENFRIFGPDETKSNRLNKVFEVTNRQWLEPISEKFDENMSASGRVIDSQLSEHQNGQ
FLEAYVLTGRHGFFASYESSFRTVDSMITQHFKWIRKSAKHSWRKPYQSLNLISASTVFQ
QDHNGYTHQDPGLLTHIGEKHGEYMRAYLPADTNSLLAVMDKAFRSENVINYVVTSK
HPRPQFFTADAEELVNEGLKVIDWASTVKDNEEPDVVIAAAGTEPNFEAIAAISYLVK
AFPELKIRFVNVDLFRRLRSPEIDPRGLSDDEFDAIFTKDKPVFFAFHSYEGMLKDIFFTR
HNHNLYAHGYRENGEITTPFDMRVLNELDRFHLSAHVADVYGDKARDYVAEMKGGK
VQEHRDYVEEYGADMPEVEDWKWEDIK (配列番号41)

20

30

アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*) ACS-120-V-C0110aからのホスホケトララーゼ酵素のアミノ酸配列

【化42】

MTDFDSKAYLDKVDAAWWRAANYLSVGQMYLRDNPLLDREVTADDIKITPIGHWGTTIA
GQNFVYAHLNRVINKYDLNMFYIEGPGHGGQVMQANAYLDGTWTEHYPEYPQNKEG
MQKFFKYFSFPGGTGSHTAEIPGSIHEGGELGYSLSHATGAILDNPVIAATVIGDGESE
TGPLAASWLSNSFINPVTGAVLPILYLNGGKIANPTILERSNEDLIKYFQGLGWDPMV
VEGNDPEKVHPLMAKTLTDAIEKIKSIQGEARKGSADATMGHWPMILYRTPKGWTGP
KAWEGNDIEGSFRAHQVPIPVNAENMEHVDALIDWLKSYRPEELFTEEGQLRPEIAEIA
KGDQRMASNPITDGGIDPKPLDLPDWRDYALDFETPGERDAQDMIEMGGYAAGVIEKN
PDNFRIFGPDETKSNRLNKVFNVTKRQWLEPIKDNIDEWMSPSGRVIDSQLSEHQMEGF
LEAYTLTGRHGFFASYEAFIRTVDSMITQHFKWMREASEYKWHKPYQSLNLISSTAFQ
QDHNGYTHQDPGLLTHLAEKKGEFVRAYLPADTNSLLAVMDKALSSENVINYIVTSKH
PRPQFFSVEEAEFVDKGYKVIDWASTVEEGEEDVIAASGTEPTVETIATISYLHEAFP
ELKIRYVNVDLYRLRHPNIDPRGLSDEEFDAVFTKDKPVFFGFHSFEGLLKDIFFDRHN
HNLYPHGYREEGAITTPFDMRVLNELDRFHFAAHVAEVVYGDKAQDFIDQMNAKVEE
HRAIIVEYGTDMPEVKWKWQPLEK (配列番号42)

40

50

キングラ・キングエ (Kingella kingae) ATCC 23330 からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化43】

MTNKTQFDTPEYLGKVDAAWRAANYISVAQMYLKDNPLLKTPLVANDVKAHPIGHW
GTVPGQNFIYAHNLRAIN KYD VDMFYIEGPGHGGQVMVSNSYLDGSYTEIYPDITQDTA
GLKKLCKIFSFPGGIASHAAPETPGSIHEGGELGYALSHAFGAVLDNPNVIAAAVIGDGE
AETGPLCAGWFGNTFINPVNDGAVLPILYLNGGKIHNPTILARKTDEELKQYFNGMGWE
PIFVDVNNVDNYHEIMSQKVDEAVEHILSIWQTARTQKAEDATMPHWPVLVARIPKGW
TGPKTWHGEPGEGFRAHQVPIPASSHDMETAGELEKWLSYRPEELFDDNGCFLDKW
RDISPKGAKRMSVHPITNGGINPKALVMPDWTQHAEIGVPGSQDAQDMVECGRLMA
DVVTANPNNFRIFGPDET KSNRLNQVFQVTKRQWLGRRDEAYDEWIA PVGRVIDSQLS
EHQAEGFLEGYVLTGRHGFFASYESFFRVVDSMITQHFKWLRKCKTHAAWRNDYPSLN
LIATSTVFQQDHNGYTHQDPGLLTHLAEKKPEFVREYLPADSNTLMAMVSEALTSRDRI
NLIVSSKHLRPQFFNAEEAKELVREGYKVIDWASTCHDGE PDVIAAAGTEPNMEALA
AISILHKQFPELKIRFINVVDILKLRHPSIDPRGLSDEQFDALFTQEKPVVFCFHGYEGMIR
DLFFPRANHNVRHGYRENGDITTPFDMRVLSEMDRFHVAKDAAQAVYGD KASEFAK
KMGETVAFHRSYIREHGTDIPEVAEWKWQPLAK (配列番号43)

10

ストレプトコッカス・クリセチ (Streptococcus criceti) HS-6 からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化44】

MNTNFDSSDYLNKVDAAWRAANYISAAQMYLKDNPLLRRREVAEEDLKSHPIGHWGT
VPGQNFIYAHLLRSINKYDLDMFYIEGPGHGGQVMVSNSYLDGSYTELN PQISQTEEGL
KQLCKIFSFPGGIASHAAPETPGSIHEGGELGYALSHATGAVLDNPDVIAATVIGDGESET
GPLMAGWLSNTFINPVNDGAVLPILHFLNGGKIHNPTIFERKSDELKAFFTGLGWKPIFA
DVTAFASDHAAAHKLFAAKLDEAIEEIRNIQAKARKGSADEATMPAWPVIVARIPKGW
TGPKSWKGTPIEGGWRAHQVPIPVDSHHMEHVDALLDWLKSYPPEELFDAEGHLKSEV
AALSPKGNRRMSMNPITNAGVIKPMDTADWKKRAFDIQTPEIVAQDMIEFGKYAADL
VEANPDNFRIFGPDES KSNRLNEVFTKTNRQWMGRRDPSYDEWLSPAGRVIDSQLSEHQ
AEGFLEGYVLTGRHGFFASYESFLRVVDTMITQHFKWLRKSKTHTTWRKNYPSLNLIAT
STVFQQDHNGYTHQDPGVLTHLSEKTPEYIREYLPADTNSLLAVMDKAFKDEDKINLIV
TSKHPRPQFYVSVEEASELVEKGYKVIDWASTVQANEEDVVF AAAGTEPNLEALAAISIL
HKTFPSLKIRFVNVDILKLRHPDLDPRLSDEEFDKVFTKDKPVIFAFHAYEGMIRDIFF
RRHNHNLHVHGYRENGDITTPFDMRVMSELDRFHLAQDAALTTLGEKAQAFSAKMDE
TVAYHKDYIREHGDDIPEVQNWQWENLDE (配列番号44)

20

30

ストレプトコッカス・クリセチ (Streptococcus criceti) HS-6 からのホスホケトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 4 5】

MTEFDSKDYLAKVDAWWRAANYISVAQMYLKDNPLLRRREVSKEDVKVHPIGHWG
TIA GQNFIY AHLNRVINKFDLNMFYIEGPGHGGQVMVSN SYIDGSYTERYPNITQDE
DGLKQ LCKIFSFPGGIASHAAPETPGSIHEGGELGYALSHATGAILDNPDVIAATVIGD
GEAETGP LNAGWFSNTFINPVNDGAVLPILYLNGGKIHNPTILSRKTDEELTHLFQGLG
WEPYFVEG NDPEVIHSQMAETLDKVIEKIKTIQTQARQKPAEEAQQAQWPVLIVRTPK
GWTGPKKEW NGEPIEGGFRAHQVPIVEAGHMEHIDALTDWLKSYRPEELFDEKGYVKEE
IRVISPKGN RRMSMN PITNAGIVKKLDLADWRKHAIDTSKPGSIMKQDMIEFGKYAADL
VKANPDNFRIFGPDET KSNRLNNVFTATNRQWLAPRDKSYDEWISPVGRVIDSQLSEH
QAEGFLEGY VLTGRHGFFASYESFLRVVDSMITQHFKWLRKSKTHTDWRKNYPSLN
LIATSTVFQQD HNGYTHQDPGLLTHLAEKTPEYVREYLPADSNSLFAVMEYALADE
DKVNVIVTSKHPR PQFYSVAEAQELVKEGYKVIDWASNDHDGEPDIVFAAAGTEPN
LEVLAGISLLHKAFPE VKIRFINVVDILKLRSPKVDPRGLSDEAFNKLFTTDKPIVFA
YHGYEGQIRDLFFNRDNH KVIYHGYRENGDITTPFDMRVMSEMDRFHIAKEAAQAVL
GDKAQGFAQEMADKLAYH TAYIREHGDDIPEVQNWQWETID (配列番号45)

10

マイコプラズマ・コランビナム (*Mycoplasma columbinum*) SF7
からのホスホケトラゼ酵素のアミノ酸配列

【化 4 6】

MSKTNFDSKKYLDKIHAWWRAANYLSVGQMYLKNNPLLQEPLKDEDIKIYPIGHWGTI
PGQNLIY AHLNRVINKYDLNMFYIEGPGHGGQVMISNSYLDGSYTELFPEITQDLA
GLN KMFKRFSFPGGTASHAAPETPGSIHEGGELGYALSHATGAILDNPDVIAATVIGD
GEAETGPLMAGWYSSSFINPVNDGTVPILHNGGKISNPTILARKTDKEIKQLLAGFGWEA
IFVE ADVFRPEAHL SMAKAFDKAIEKIQRIQREARANSANHA KRPIWPALVVRTPKG
WTCPH KIDDKVYEGSFRSHQVPLAVSSENTTKKVDLVNWLESYKPRELFNQDGSFKA
HYAEIAP KGNKRMAMNPITNCGINPKNLDPNWEQFAIDFDKPGA IKAQDMVSAGTWF
ADVIRK NPTNFRIFGPDET KSNRLFDVLKTTNRQWLERVDYDLDENIGPAGRVIDS
SQLSEHQAEG FLEGYVLTGRHGMFASYESFLRVVDSMLTQHMKWVAKAKKVHWRNDY
PSLNVIATST AFQQDHNGYTHQDPGILGHLADKKPELIREYLPADSNTLLAVLDKAF
KERDVINLIVAS KQPREQWFSPREANILVKNGLKVISWASTCTLEEPDLVVAAGTEPT
LEALAAISYLNE KFTPLKIRFVNVDLLKLRHPSIDPRGLSNYEFDSIFTKDKPILFA
FHGYEALIRDIFFLRN NHNLHIHGYRENGDITTSFDIRLMSEMDRFHMAQTA
AKAVLGYDKAKSFVDKMQDKI DQHNAYIKEHGIDMDEVRYWTWKGLNK (配列番号46)

20

30

バークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*) PsJN
からのホスホケトラゼ酵素のアミノ酸配列

【化 4 7】

MAEATAHPTPPQTLADTLRNMDRYWRACNYLSAGMIYLRDNPLLREPLKPEHIKNRL
LGHWGSDPGQSFLVHLNRLIKKLDLNVIVAGPGHGAPATLANCYLEGHYSEIYPDRS
QDVAGMERFFRQFSFPGGIGSHCTPETPGSIHEGGELGYSLSHGYGA AFDNPDLIVAVMI
GDGEAETGPLATSWHSNKFLNPIRDGAVLPVLHLNGYKIANPTILARIPREELEALLTG
Y GHKPYFVEGEDPAVMHQQMAATLEQCIGEIRAIQQHARESNDASRP RPWPMIVLRSPKG
WTGPKEVDG HKVEGSWRAHQVPVLDPATNSKSLKLVENWLRSYEPETL FDEAGRLVK
ELRELAPEGARRISANPHANGGV LCKTLAMPFRDYAVAVKKPAGSYTSPTEVLGKFLR
DVMRNNMTNFRVFGPDETSSNKLTAIYEASEKTWLAQTVPSDADGGELAVDGRV MEM
LSEHTLEGWFEGYVLTGRHGLFATYEA FVHVIDSMFNQHA KWLEKAKRDLGWRQPVP
SINLLITSLVWRQDHNGFTHQDPGFLDVVTNKSPDVVRIYLPDANCLLSVADHCLRSR
DYVNVIVADKQPHLQYLDMDAAVTHCTKGIGIWDWASTDQGV EPDVMACAGDIPT
MEALAAVQILKEQFADLKIRFVNVDL FRLMPEHAHPHGLSSRD FDSLFTTDKPIVFN
FHSYASLVHKLTYNRTNHDNLHVHGYHEKGNINTPLELAIINQVDRFSLAIDVIDRV
PRLRG VGDHAKEWLRGQIIEHLAYAHAEGIDKEEIRNWTWKG (配列番号47)

40

ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) NRRL

50

B-30929からのホスホクトラーゼ酵素のアミノ酸配列
【化48】

MTVDYDSKEYLELVDKYWRAANYLSVGQLFLRDNPLLKRPLEAKDVKVKPIGHWGTI
VSQNLIYAELNRVINKYDLNMFYIEGSGHGGQVMVSN SYLDGSYSIDIYPNISQDEKGMMA
KLKQFSFPGGVASHAAPETPGSIHEGGELGYSLSHGTGAILDNPDVIAAVEIGDGESET
GPLAASWFSDFINPITDGAVLPIINMNGFKISNPTILSRMSDEDLTSYFKGMGWDYPYFV
EATADTDHAKVEEEFAKTLDHVIEEIKSIQKNARENETPDNVKLPNWPMIIFRSPKGWT
GPKKDLGDNPIEGSFRAHQVPIPVAAAGSMEHKDLLNDWLKSYKPEELFDENGTVKPEIR
AVAPKGDKRMSVNPITNGGIKPEPLKLPDVRNFEVKFDRGVTQKQDMIEWSNWLEKVA
ELNPTSFRGFGPDETCKSNRLYSLLDDSKRQWMEDIHEPFDEDLSNHGRVIDSQLSEHQA
EGWLEGYVLTGRHGFFATYESFGRVVDSMLTQHFKWLRKASEQYWRKQYPSLNFVDT
STVFQQDHNGYTHQDPGMLTHLAEEKPEFIREYLPADANELLAVGDVAFRTYEKINLIV
TSKHPRRQWYTMDEAQNLVKNGLG YIDWASTDQGQEPDVVFAAAGSEPNEALAAISI
LNKEFPKIRFINVVDLLKLRSKVPDPRGLSDEEFDNLFTTDKPVIFAFHGFEDLIKDIFF
DRHNHNLHVHGYRENGDITTPFDMRVNLNQLDRFDLAKEAVQDIPAYTVKGGYFIQRM
NDMVDKHNAYIRQEGTDLPEVVDWKWEGLKK (配列番号48)

10

ビフィドバクテリウム・ガリウム (*Bifidobacterium gallicum*)
DSM20093からのホスホクトラーゼ酵素のアミノ酸配列
【化49】

MTSPVIGTPWQKLNRPVSEEAIEGMDKYWRASNYMSIGQIYLRSNPLMKPFTRDDVK
YRLVGHWGTTPLNLLAHINRLIADHQQNTVFIMGPGHGGPAGTAQSYLDGTYTEYY
PNITKDEEGLQKFFRQFSYPGGIPSHFAPETPGSIHEGGELGYALSHAYGAVMNNPSLFV
PCIVGDGEAETGPLATGWQSNKLVNPRTDGIVLPILHLNGYKIANPTILARVSDEELHDF
FRGLGYHPYEFVAGFDNEDHLSIHRRAELFETIFDEICDIKAAANTDDMTRPFYPMLIFR
TPKGWTCPKFIDGKKTEGSWRAHQVPLASARDTEAHFEVLKNWMASYKPEELFDDKG
AIKDDVVDMPKGDRLRIGANPNANGGVIREELDPALENYEVKEVKEFGHGWGQLEAT
RKLGEYTRDIKNNPDSFRIFGPDETASNRLQASYEVTNKQWDNGYLSKDLVDEHMAV
TGQVTEQLSEHQCEGFLEAYLLTGRHGIWSSYESFVHVIDSMLNQHAKWLEATVREIP
WRKPISSMNLLVSSHVWRQDHNGFSHQDPGVTSVLLNKTFFNNDHVIGLYFATDANVLL
AIAEKCYKSTNMINAIVAGKQPAATWTTLDEARELVAKGAGEFEWASNVKTNDIAEIV
LASAGDVPTQELMAAADRLNKLGVKFKVNVVDLIKLSAKENDQALSDAEFAELFTE
DKPVLFAHYHSYAHDVRGLIFDRPNHDNFNVVGYKEQGSTTTPYDMVRVNDIDRYELTA
TALRMIDADKYADEIKKLEDFRIEAYQFAVDNGYDIPDYTDWVWPGVKTDLPGAVSAT
AATAGDNE (配列番号49)

20

30

ビフィドバクテリウム・デンチウム (*Bifidobacterium dentium*)
Bd1からのホスホクトラーゼ酵素のアミノ酸配列

【化 5 0】

MTSPVIGTPWKKLNAPVSEEAEIGVDKYWRAANYLSIGQIYLRNPLMKEPFTREDVKH
RLVGHWGTTPLNFLIGHINRLIADHQNTVIIMGPGHGGPAGTAQSYLDGTYTEYFPNI
TKDEAGLQKFFRQFSYPGGIPSHYAPETPGSIHEGGELGYALSHAYGAVMNNPSLFVPAI
VGDGEAETGPLATGWQSNKLVNPRTDGIVLPILHLNGYKIANPTILSRISDEELHEFFHG
MGYEPYEFVAGFDNEDHLSIHRRAELFETVFDEICDIAAAQTDDMTRPFYPMIIFRT
KGWTCPKFIDGKKTEGWSRSHQVPLASARDTEAHFEVLKNWLESYKPEELFDANGAV
KPEVTAFMPTGELRIGENPNANGGRIEELNLPALDYEVKEVAEYGHGWGQLEATR
LG VYTRDIIKNNPDSFRIFGPDETASNRLQAA YDVTNKQWDAGYLSAQVDEHMAVTGQ
VTEQLSEHQMEGFLEAYLLTGRHGIWSSYESFVHVIDSMLNQHAKWLEATVREIPWRK
PISSMNLVSSHVWRQDHNGFSHQDPGVTSVLLNKCFNNDHVIGIYFPVDSNMLLAVAE
KCYKSTDMINAIIAGKQPAATWTLDEARAELEKGAAEWEWASTAKSNDEAQIVLASA
GDVPAQEIMAAADKLDAMGIKFKVVNVVDLVKLQSTKENDEAISDAFADLFTEDKPV
LFAYHSYARDVRGLIYDRPNHDNFNVHGYEEQGSTTTPYDMVRVNNIDRYELVAEALR
MIDADKYADKIDELEAFRKEAFQFAVDNGYDHPDYTDWVYSGVNTNKQGAVSATAAT
AGDNE (配列番号50)

10

ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)
IPLA20015からのホスホクトラーゼ酵素のアミノ酸配列
【化 5 1】

20

MTSPVIGTPWKKLNAPVSEEAEIGVDKYWRVANYLSIGQIYLRNPLMKEPFTREDVK
HRLVGHWGTTPLNFLIGHINRFIADHGQNTVFIMGPGHGGPAGTSQS YLDGTYTETYP
NITKDEAGLQKFFRQFSYPGGIPSHFAPETPGSIHEGGELGYALSHAYGAIMDNPSLFVPC
IVGDGEAETGPLATGWQSNKLVNPRTDGIVLPILHLNGYKIANPTILSRISDEELHEFFHG
MGYEPYEFVAGFDDEDHMSIHRRAELFESVWDEICDIAAANTDNMHRPFYPMIIFRT
PKGWTCPKYIDGKKTEGWSRAHQVPLASARDTEAHFEVLKNWLESYKPEELFDANGA
VKDDVLA FM PKGELRIGANPNANGGVIRKDLVLPALDYEVKEVKEFGHGWGQLEAT
RRLGVYTRDIIKNNMHDFRIFGPDETASNRLQASYEVTNKQWDAGYISDEVDEHMHVS
GQVVEQLSEHQMEGFLEAYLLTGRHGIWSSYESFVHVIDSMLNQHAKWLEATVREIPW
RKPIASMNLVSSHVWRQDHNGFSHQDPGVTSVLLNKCFHNDHVIGIYFATDANMLLA
IAEKCYKSTNKINAIAGKQPAATWTLDEARAEAKGAAAWDWASTAKTNDEAQVV
LAAAGDVPTQEIMAASDKLKALGIKFKVVNVADLLSLQSAKENDEALTDEEFADIFTAD
KPVLFAYHSYAHDVRGLIYDRPNHDNFNVHGYEEEGSTTTPYDMVRVNELDRYELTAE
ALRMIDADKYADEIQKLEDFRQEAFQFAVDKGYDHPDYTDWVYSGVKTDKKGAVTAT
AATAGDNE (配列番号51)

30

マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*) S p y r
1からのホスホクトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 5 2】

atgaccaccgccaccaccgcagaacgtcgtccgctgagcgcacgatggtgatcgtctggatcgttggtggcgtgcagcaaattatctga
gcgttggtcagatttatctgctgataatccgctgctgctgacaccgctgaccgctgaagatgttaaacgcgctctgctgggtcattggggca
ccacaccgggtctgaattttctgtatgcacatctgaatcgtgcaattgccagcgtcagcagagcaccatttatgttaccggtccgggtcatgg
tggtcctggtctggttgcaaatgcatacttgatggcacctatagcgaatttacagcgatattaccaggatgatgaaggctcgcgtcgtctg
ttcgtcagtttagctttccgggtggtattccgagccatgttgaccggaaactccgggtagcattcatgaagggtggtgaactgggttatgcac
tgagccatgcataatggtgcagcatttgataaaccggacctgctggtgccgcagttgttggtgatggtgaagcagaacagggtccgctggca
accagctggcatagcaacaaattgtgaatgcagccaaagatggtgccgttctgccgattctgcacatgaacggctataaaatcgcaaatcc
gacctgctggcacgcattccgaccgatgaactgcgtgcactgatggttggttatggtcatcaccgtatttttcgaagttccggatgacgaa
ggcgggtccagggtggtgatcatgcagatgcccatcgtcgtttgcacgtctgttagatgatgttctggatgaaattgccgatatcaaaaccgtg
cacgcgaagggtgatgaaagccgtccggcatggccgatgattgttttcgtaccccgaaagggtggacgggtccggattatattgatggcaaa
aaaaccaccggtagctggcgtgcccatcaggttccgctgtcaaatgcacgtgataccaaagaacatctggcagttctgagtattggctga
gcagctatcgtcctgatgagctgtttgatgccgatggtgcctgctgccggaaattgcagaactggcaccgagcggtagctgcgtatgag
cgataatgcacatgcaaatggcgggtctgctgctgaaagatctgcgtctgccggattttcgtgaatatgcagttgatgttccggcaccgggtgc
aaccgttgccgaagcaaccgtgttctgggtcagtggtgaccgaagttattcgtctgaatccggataactttcgcatttttggtccagatgaa
accgcaagcaatcgtctgcaggcagtttatgatgcaaccgataaacagtggaaacgccgaatttttggtgcggaagtgtgaacacctggc
acgtgcagggtcgtgttggtgaaatgctgagtgaaatcagtgatcagggttggtggaagggttacctgctgaccggtcgtcatggtctgtttaat
tgttatgaagccctttatccatcgtggatagcatgctgaaccagcacgcaaaatggctgaaagttaccaatcataattccgtggcgtcgtccta
ttgcaagcctgaattatcttctgagcagtcagtttggcgtcaggatcataatggttttagtcacaggatccgggtttattgatcacgttgtaaat
aaaagcgccaaagtgtgctgtgtatctgcctccggatgccaatatactgctgagtaacctatgatcattgtctgcgtagccgtcagtatgta
atgttgtttagcggtaaacagccgagccccgaactttctgaccatggaacaggccgttgacattgtaccggtggcctgggtatttgggaat
gggcaggtagcgaaactgggcacagatccggatgtggttctggcaagtggcgtgatattcctaccctggaagcactggcagcagca
gatattctgcgccagcatctgcctgatctgaaagtgcgtttgttaacgttggtgatctgatgcctgcaggatagcaccgaacatccgcatg
gcctgccagatcgtgatttgatatgattttaccaccgatcgtccgatcatctttgcctatcatggtatccgtggctgattcatcgtctgacctat
cgtcgtgccgggtcatgataatctgcatttctggttataaagaagaagggtacaaccaccacccgttcgatatggttatgctgaatgatttag
atcgtatcacctggcatggtgatgtgattgatcgtgtgccgagcctgggttaacctgtgcagccttacgccagcagatggcagataaacgt
attgcagctcgcgaatataccgtgcgcattggcgaagatattccggaagttaagattgggtttggcctgcagcacgtgaaagcgggtttgg
tacagccgggtgcggatggtgcgagcagcaccggtggtgataatgaa (配列番号52)

10

20

シューワネラ・バルチカ (Shewanella baltica) OS185からのホ
スホケトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 5 3】

atgaccagatccatgaaattaatgccctgaaaaaacgtgctgccaccaattttctggcaaccagccagatttatctgaaacagaatgttc
 tgcacaaacgtccgctggcacataccgatatcaaacgcgtctgctgggtcattggggcacctgtccgggtattaaactttgtttatgcaaacat
 taaccgcctgatcgtgaaacataatcgagctttatctatctggttggtccgggtcatggttttccggcagttcaggcaaacctgtttatggaag
 gtagcctgagccattttatccggaaaccattccgtataatgaaaccggcattgaagatatttgcaaaaaattcagcgcagcctatggttatcc
 gagccatgcaaatccggaagcaccgggtcagattctggaagggtggtgaactgggttatagcctgtcagttggttgggtgcagttctggata
 atccggatctgattgcaaccgttctgattggtgatggtgaagcagaaaccggctctggtcagcaagctggtatgccaatcgtctggttcac
 cggcaacctcaggtgccgttctgccgattgttcataatggtatataaacagcgggtccgacctgtatgggtcgtatgagccatgaagaac
 tggatctggaatttcgtggtctgggtcttttccgattattgtggataatgaactggaagaggatatttacgtgcagatgaccaatgcaatggat
 accgcatatgccatgattaacgataatcagcgtcgtgcacgtagcgggtgaagatgttgttaaaccgaaatggcctgttattctgatgcgtaccg
 caaaagggttgaccgggtgttagcgatacaaaaggcaaaaaacttgaaggcaattgcgaagccatcaggtgattgtgaataaatgtgcaac
 cgataaaggctcatctggatgactggataactggctggcaagctatcatttcaagaactgtatcagatgaacgacaaaggcgaactgatttt
 gatgccgatctgcagcctgattccgctaaccagctggcatgtggtcgtcagcatctgacctatggtggcgaagtgttcgtgactgacc
 aatccggacctggaaaaactgagctatgtccggaaagtccgcgtggtcatcgtggttatagatgctgaaaatgggtgaatggatgcgtga
 tgcctttaaaactgaatcgtgatcagcgaatctgcgcatttttctccggatgaaacctatagcaatcagctgcaggcagttttgagaaaccg
 atcgtgcatggcagtggtccgattgaaagctgggatgaggatagatcgtgaaggctcgtgttattgaactgctgagcgaataatctgctgtttg
 gtatgctgcatggttataccggttaccggtcgtcatggtatgtttccgacctatgaaagctttagccaggttattagcagcatggccgatcagatt
 gcaaatatgtgtatgcaagccagggtgtgcattttcgtaaaccgctgccgagctgtaattgttctgagcagcctgctggaacgtcaggatc
 ataatggttattcacatcagaatccgagctttctgggtgccatgttagaaaaacatccgaaaattatcagcgcataatctgctgcagatgcaaat
 agcacctggtttataccgaacgtgcctatgcagatcgtgataagctgaatattctggttgcggaaaaaaagaactgccgcagtggtgag
 cctggaagaagcacgtaaacaggcaaaagatggtgttatggttgggttttccagtgatgaaaacccggatattgtgctggcaggttgtg
 gtgattatgttaccgaagaatgtatggccagcctggtgctgattcgtgaactgttaccgcgtgttaaaattcgtttgttagcgttaccgaactga
 gcagtgatggcctgggtagccgtaaatcaaaagaaaaaccgtggctgatggatgaaattttaccaggaataaaggcgtggtgtttaaactat
 catggctatccgaataccatcaaaaagctgatcttcgactataaaggcagccgtcgttttcgattaaaggctatgaagaagaaggtagtacc
 accaccccggttgatatgggtgttcgtaatggcaccagccgtatcatctggtgatcgaatggcataaaactgtttcagcagggcgtgattg
 atgaaacaatgcatgtgagcattaccaccgacatgctgcagcgtctggtggatcatcgaattacattaaagccaatggtgtggtatccgatcg
 aaatcgaataatggatttgaccggt (配列番号53)

10

20

ラクトバチルス・ラムノーサス (L a c t o b a c i l l u s r h a m n o s u s) L
 M S 2 - 1 からのホスホケトラゼ酵素をコードする核酸配列

【化 5 4】

atgagcatggacaccaaagtgaaccgttgattatagcagcaaagaatatttgacaaaatgaccgcatattggcgtgcagcaaattatgtt
 agcgttggtcagctgtatctgaaagataatccgctgctggaacgtccgctgaaaagcgaagatgttaaacgcacccgattggtcattgggg
 caccattgcaggtcagaattttatctatacccatctgaatcgcgtgatcaacaaatatgatctgaatatgttctacatcgaagggtccgggtcatg
 gtggtcaggttatggttagcaatagctatctggatggtagctatagcgaaatttaccgctgttagccaggataaagaagggtatgaaaaacct
 gttfaccagtttagctggcctgggtgttgcaagccatgcaagcgcacagacaccgggtagcattcatgaagggtggtgaactgggttatg
 cactgagccatgccaccgggtgcaattctggataacccggatgttattgcagcagttgttaccgggtgatggtgaaaccgaaaccgggtccgctg
 gcagcaagctggttttagtaataacctttattaacccgattagcgacgggtgccatcctgccgattgttcatatgaatggctttaaatacagcaacc
 gaccattctgagccgtaaaagtgatgaagatctgaccaaatatttcgaaggcatgggttgaaaccgtattttgttgaagggtgatgatccgac
 caaactgaatccggaaatggcaaaagttagtgatgcagccattgaagaaattaaagccatccagaacatgcccggtgaacagggtgatacc
 accatgccgcatggcctgttattatcttctgtagccgaaagggttgacagggtccgaaaagctgggaatggcgaaccgattgaaggtagcttt
 cgtgcacatcagattccgattccggtgatgccgaagatatggaacatgcagatagcctggcaggttggtgaaatcatacatccggaaga
 actgtttgatgagaacggtaaaactgatccctgaactggcagccctgcctccgaaaggcgataaacgtatggcagccaatccgattaccaat
 ggtggcctggatccgaaacctctggttctccggattatcgtaaatatgccctggataataaagaacacggcaagcagattaaacaggacat
 gattgtttggagcagattatctgcgtgatctgattaaactgaaccgcataactttcgtattttcgtccggatgaaaccatgagcaatcgtctgta
 tagcctgtttgaagttaccaatcgtcagtggtggaaccgatcaagaacctgcagatcagtatctggcaccggcaggtcgtattattgatag
 ccagctgagcgaacatcagagcgaagggttttaataaggttataccctgaccgggtcgtcatggtctgtttacaagctatgaagcatttctgcgt
 gttgttgatagcatgctgaccagcactttaaatggattcgtaaagcacatgaagaaccgtggcataaagcatatccgagcctgaatgttgta
 gcaccagcaccagttttcagcaggatcataatggtatacacatcaggatccgggtattctgacccatatggcagaaaaaaaggcggaatat
 attcgcgagtatctgccagcagatgccaatagcctgctggcaattagtcgaaactgtttagcagccagaataaccgttaattgttctgatcacca
 gcaaacagcctcgtccgagttttatagtattgatgaagccaccgttctggcaaatgcaggtctgaaacgtattgattgggcaagcaatgatg
 atggtgtgaaccggatgtggtgattgcagccgcaggcaccgaaccgaatatggaaagtctggctgcaatfaatctgctgcatgatgcatttc
 cggatctgaaaattcgtttatcaatgtgctggatctgctgaaactgcgttaccggaaattgatcctcgtggtctgagtgatgcagaatttaac
 agctatttcaccaccgataaaccgatcctgtttgcctatcatggtttgaagggtctgattcgcgatattttcttaccggtcagaatcgtaacgtgct
 gattcatggttatcgtgaagagggtgatattaccacccggttgatatgcgtgttctgaatgaactggatcgtttcatctggccaaagatgtgat
 tcagcatgttccggcatatcggaaaaagcagcagcattgttcagaaaatggatgataccctgcagtatcccatgattttattcgtgcaaat
 ggtgaggatattccggaagttaagaatggacctggaaaagcattaaa (配列番号54)

10

20

ラクトバチルス・クリスパータス (Lactobacillus crispatus)
 ST1からのホスホケトラゼ酵素をコードする核酸配列

【化 5 5】

atggccgtggattatgatagcaagactatctgaaaaagcgtggatgcatattggcgtgcagcaaattatctgagcgttggcagctgtttctga
tgaaaaaaccgctgctgaaaacaccgctggttcagagaagatgttaaaccgaaaccgattggcattggggcaccattgcaccgcagaatftt
atctatgcacatctgaatcgtgttctgaaaaagtacgatctgaatatgttctatatacgaaggtagcggcatggtggcaggttatggttagcaat
agttatctggatggttagctataccgaacgctatccggaaattaccaggatgagaaaggtagggcaaaactgtttaaacgctttagctttccgg
gtggtgttgaagccatgcagcaccggaaacaccgggtagcattcatgaagggtggtgaactgggttatagcctgagccatggcaccgggtg
cagttctggataatccggatgttattgcagcagttgaaattggtgatggtgaagcagaaccgggtccgctggcagcaagctggttagcgtat
aaattcattaacccgattaaagatgggtccgttctgccgattctgcagatcaatggctttaaaatcagcaatccgaccattgttagccgtatgag
cgatcaagaactgaccgaatatttctgtggtatgggtgggacccgattttgttagcgtttttaagggtggtcgtttcgtatggcgaaaaagatc
cgatgcaggttcacgaagaatggccaaaaccatggatgaagtgatcgaagagattaaggccattcagaacatgcgcgtgaaaataatg
atgcaaccctgccgattggccgatgattatctttcagtgctccgaaagggttgacaggtccgaaaaaagatttagatggtaatccgatcga
acagctttcgtgcacatcagattccgattccgggtgcacaggggtgatatggaacatgcagatatgctgacagattggctggaaagctataaac
cgggaagaactgttcaatgaagatggcagcccgaagaaattgtaccgaaaataaccgaaaaagggtgatcatcgatggccatgaatccgat
taccaatgggtggtattgatccgaaacgtctgaatctgccggattatcgtaaatttgcctgaaatttgataaacctggtagcgttgaagcacag
gatatggttgaatgggcaaaatcttgacgaagttgccaaactgaaccgaccacctttcgcggttttgggtccggatgaaagcaaaagcaa
tcgtctgtttcagctgctggatgatcagaacgccagtggggaacctgaagttcatgaaccgaacgatgaaatctggcaccgagcggctcgt
gttattgatagccagctgagcgaacatcaggatgaagggtttctggaagggtatgttctgaccggctcgtcatggttttttgaacctatgaagc
atttggtcgtgtggtggatagcatgctgaccagcatatgaaatggctgcgtaaaagccaaagaacagtactggcgtcacgattatccgagcc
tgaattttgttgcgaccagcaccgtttttcagcaggatcataatggttataccaccaggatccgggtattctgaccacactgtatgaaaaaat
cgtccggatctgggtcatgaatatctgccgagcgataccaataccctgctggcagttggtgataaagcactgcaggatcgtgaatgtattaat
gttctggttaccagcaaacagcctcgtccgcagtggtttagtattgaagaagcaaaaaaactggctgataaaggcctgggctatattgattgg
gcaagcacagataaagggtgcaaaaccggatgtggttttgcagtagccgaaacagaaccgacaattgaaaccctggcagccattgatattct
gcataagaaattccggacctgaagatccggttatcaatgttgttgacgtgatgaaactgatggatccgaaggataacaaaaatggtctgag
cacggaagaatttgatcgctgttccgaaagatgttccgggttattttgcctggcatggctataaaagcatgatggaaagtattggttggccg
taaagctataacgtgcatattcactgctatgaagaaaacgggtgatattaccaccccgtttgatatgcgtgtgctgaatcatctggatcgtttga
tctggcaaaagatgccgttgaaagcatcgataaactgaaggcaaaacgccgattttatcagccatattggtgatcctgctgaaaaacatc
atcagtatattcgcgataacggcaagataatgccggaagttacagaatggcaatggtcaggcctgaaa (配列番号55)

10

20

ロイコノストック・シトレウム (*Leuconostoc citreum*) KM20 からのホスホケトラゼ酵素をコードする核酸配列

【化 5 6】

atggccgatttcgacagcaaagagtatctggaactggttgataaatggtggcgtgcaaccaattatctgagcgcaggtatgattttctgaaaa
 gcaatccgctgttttagcgttaccatatacccgattcaggcagaagatgttaaagttaaaccgattggtcattggggcaccattagcggcagaga
 cttttctgtatgcacatgcaaatcgtctgatcaacaatacgcgtctgaatatgttctatattggcgggtccgggtcatgggtgaggttatggtga
 ccaatgcatactggatggtgaatataccgaagattatccggaaattaccaggtatctggaaggtatgagccgtctgtttaaacgttttagcttt
 ccgggtggtattggttagccatatgaccgcacagacaccgggtagcctgcatgaaggtggtgaactgggttatagcctgagccatgcatttg
 gtgcagttctggataatccggatcagattgcattgcagttgttgggtgatggcgaaagcagaaaccgggtccgagcatgaccagctggcatagc
 accaaatttctgaatgcaaaaaatgatggtgccgtgctgccgattctggatctgaacggctttaaatacagtaaccggaccatttttagccgtat
 gtccgatgaagaaatcaccaagtttttgaaggcttgggtatagtcgcgttttattgaaaacgatgatccatgattacgcagcctatcatg
 aactggcagcaaaagtgtggtatcaggcaattgaagatattcaggccattcagaagatgccgtgaaaatggtaaatatgaagatggtac
 aattccggcatggcctgttattattgcacgtctgccgaaagggtgggtggtccgacctatgataggatggtaatccgattgaaaatagcttt
 cgtgcacatcaggttccgctgccgtggcacagaataaactggaaccctgagtcagtttgaagattggtgaatagctacaaaccggaag
 aactgtttaatgcagatggcagcctgaaagatgaactgaaagcaattgcaccgaaaggcgataaacgatgagcgcgaaccggattgcaa
 atggcggctcgtcgtcgtggtgaagaagcaaccgatctgacctgccggattggcgtcagtttaccatgataaaccatgaaaaccgtggt
 caggaactgcctaaagtaccagaatatggatgatgaccacctgagcaattacctggaagaagttgcaaaactgaatccgaccagtttctgt
 gttttggtccggatgaaccatgagcaatcgctgtggtcactgttcaataccaccaatcgtcagtggtatggaagaggtgaaagaaccgaa
 tgatcagtatgtgggtccggaaggctgtattattgatagccagctgagcgaacatcaggcgggaagggtggctggaaggctataccctgacc
 ggtcgtgttggtatttttgaagctatgaaagctttctgcgtgttggatgataccatggtgacacagcactttaaaggctgcgtcatgcaagcga
 acaggcatggcgtaatgattatcctagcctgaatctgattgcaaccagcaccgcatttcagcaggatcataatggtatacccatcaggatcc
 gggtatgctgacctatctggcagagaaaaaagcaactttatccgtgaatatctgcctgccgatggcaatagcctgctggcagttcaggatc
 gtgcatttagcgaacgtcataaagtgaacctgattatcgcaagcaaacagcctcgtcagcagtggtttaccgcagatgaagcagatgagctg
 gcaaatgaaggcctgaaaattatcgattgggcaagtaccgcaccgagcgggtgatgttgatattacctttgccagcagcggcaccgaaccga
 caattgaaacgctggcagccctgtggctgattaatcaagcatttccggaagtgaattccgctatgttaattgttgggaactgctgcgcctgca
 gaaaaatcagaaagtcatatgaatgatgagcgcgaactgagtgatgcagagtttaacaaattttccaggccgataaaccgggtgatcttgg
 tttcatgcatatgaggatctgatcagagcttttttcgagcgtaaattcaaagggtgatgtgtatgtcatggttatcggaagatggcgatatt
 acaaccacatgatatgcgtgtttacagcaaaactggatcggtttcatcaggccaaagaagcagcagaaattctgtcagcaaatagcacat
 gaccaggcagcagccgatacctttatcgaaaaaatggatgcaacctggccaaacattttgaagtgacctgtaataaggtcgcgatattg
 agaatttacggattggaattggagcgactgaaa (配列番号56)

10

20

ブラディリゾビウム属 (Bradyrhizobium) S23321 種からのホスホケ
トラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 5 7】

atgaacaatcagcagcagagcgactgagccgtagcgatctggatctgctggatcggtattggcgtgcagcaaattatctgagcgttggtca
 gatttacctgctggacaatccgctgctgcgtgaaccgctgcgtccggaaacacattaaaccgcgtctgctgggcattggggcaccacaccg
 ggtctgaattttatctatgcacatctgaatcgtgttatccgtgactggacctgagcgtgctgtatgtttgtggtccgggtaatggtggtcctggc
 atggttgcaaatatctatctggaaggtagctatagcgaaatctatccgaatattgcacgtgataccgatggctgcgtaaaactgtttcgtcagttt
 agctttccgggtggtattccgagccatgcagcaccggaaactccgggtagcattcatgaagggtggtgaactgggttatgcactgggtcatgc
 atatggtgcagcatttgataatccggatctgattgttgcattgtgttgggtgatggtgaagcagaaccggctccgctggcagcaagctggca
 tagcaacaaatttctgaatccggttcatgatggtgccgttctgccgattctgcatctgaacggctataaaatcgcaaatccgaccgttctgggtc
 gtatgcgtgatgaagaaattcgtgatttattcgcgggttgggtcatgaacctctgtttgtgaagggtgatgatccgacctgatgcaccaggca
 atggcagatgcctttagtgcatttgcacgtattcgtagcatccagcagcatcccgtgatggtcgtaaagaaattgaacgtccgcgttggc
 cgatgattgttctgcgtagcccgaagggttgacagggtccgaagaagggtgacgggtctgaaagtggagggttctggcgtgcccatcaggtt
 ccggttgcagggtgtcgtgaaaatcctgccatctgaaaattctggaagattggatgcgtagctatgaaccggaaaaactgttcgatgaagc
 ggtgcactgattccggaactgcagggccctggctccggaaggtaatcgtcgtatgggtgccaatccgcatgcaaatggcgtctgctgaaaa
 aagaactgaaactccgggatttctgtagctttgccctggaagttccgcagcctggtggtgttaccgggtgaagccacacgcgaactgggcaa
 attcctgcgtgacgttattcgtgtaatgcagcagaacgaatttgcattatgggtccggatgaaaccgcaagcaatcgtctggtgccgttt
 ttgaagaaccggaacgtgtttggtatggaaccgattgaaccgtatgatgttcatctggcacaggatggtcgcgttatggaagtgcgtgagcga
 catctgtgtcagggttggctggaaggctatctgctgaccggctgcattgttttttagctgttatgaagcctttatccacatcgtggatagcatg
 tttaatcagcacgcaaaatggctgaaagttaccctgcattctgccgtggcgtcgtccgattgcaagcctgaattatcttctgaccagccatgtttg
 gcgtcaggatcataatggttttagtcacaggatcctggtttgttgatctggttccaacaaaaagcggatattgtgcgtatctatttccgct
 gatgccaataccctgctgtggttgcagatcattgcctgcgtacctataatgcattaatgttattgtggcaggtaaacagcctgcaccgcagt
 ggctgagcatgcaggatgcagcaaccattgtgatgcaggattgttattggagctgggtgtaataagatgcaacaggcgaaccgc
 atgttgttatggcatgtccgggtgatgtccgacactggaaccctggcagccgttgacctgctgcgcaagcactgcctgatctgaagatt
 cgtgttgaatgtttagatctgatgacactgcagccataagaacagcatcctcatggtctgagcgtatcgcgattttgatgtctgttaccag
 cgataaaccgggtgattttgcctatcatggttatccgcacctgattcatcgtctgacatataatcgtaccaatcatgcaggctcgtatgtcgtgg
 tttattgaagaagggtacaaccaccacccggtttagatggttgttctgaatgaactggatcgctatcacctggcaattgaagccattgaacgcg
 ttccaggctcggcagcgcgtccgcagcgggttaaacagcagtttcgtgatgccctgattgaacatagccattatattcgtgaacacgggtgaa
 gatatgccggaaatccgcgattgggttggcctggtaaaaccggt (配列番号57)

10

20

ブルセラ・ミクロチ (*Brucella microti*) CCM4915からのホスホ
 ケトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 5 8】

atgcctgcaaaaggctccgctgacaccgcagcagctgagcctgattaatcgttattggcgtgcagcaaatatctgagcgttggtcagattfac
 ctgatgaaaaatccgctgctgcgtgaaccgctgcagccggaacacattaaccgctgctgctgggtcattggggcaccacaccgggtctg
 aattttatctatgcacatctgaatcgattatccagcagcgtaatgccaatgtgatttatatctgtggtccgggtcatggtggccctggtatggt
 gcaaatacctatctggaaggcacctatagcgaaatttatccggcaattagcggaagatgaagcaggtatggaacgtctgtttcgtcagtttagct
 ttccgggtggtattccgagccatgcagcacccggaactccgggtagcattcatgaaggtggtgaactgggttatgcactggttcagtcacat
 ggtgcagcatttgataatccggatctggttggtgcatgtgttggtggtggtgaagcagaaaccggtgcactggcaaccagctggcatagc
 acaaaattctgaatccggcacgtgatggcgagttctgccgattctgcacatgaacggctataaaatcgcaaatccgaccgttctggcacgt
 ctgagtgatgatgatctggataacctgttccggttatggttatgaaccgtttttgtggaaggtagcgaaccggcagatatgcacagaaaat
 ggcagcaacctggataaccattttcagcgtattcaggacatcaaaaaaacgccgatgttcatagtccggaacgtccggttggccgatga
 ttattctgcgtagcccgaagggtggaccggtccgaaaaccgttgatggtctggtggtgaaaattactggcgtgcccatcaggttccggtg
 ccaattgtcgtgaaaatgatgccatcgtaaaatcctggaagattggtgaaaagctatgatccgagcgacctgtttgatgagaaaggtgcc
 ctgaaaccgggaactgcgtgccctggcacccgaaaaggcgaaagccgatatgggtgccaatccgcacatgcgaatggtggtctgctgcgcaaaga
 actgcacatgccggattttccagtatgcagttaatgttaccgaaccgggtgcaattgaagcacagagcaccaaaattctgggtgatttct
 gcgtgatgtgatgaaactgaatgaaaccgaaaaaacctccgcatttttggtccggatgaacagcaagcaatcgtcgtggttagcgttctgg
 aagcgaccaatcgtgtttgatggccgaaacactggatatggtgatcacctggcagcagatggtcgtgttatggaagtctgagcgaaat
 ctgtgtcagggttggctggaaggttatctgctgagcggctgcacatggttttttagctgttatgaagccttcacacatcatgatagcatgttta
 atcagcatgcaaaatggctgcaggtgcacgcgaactggaatggcgtaaacccgattagcagcctgaattacctgctgaccagccatgtttg
 gcgtcaggatcataatggttttagtcacaggtatcctggtttgtagatctggtggcaataaaagcgagatattgtcgtgtttattttccgcct
 gatgccaatacctgctgtgggtgggtgatcattgcctgaaaacctggaatcgtgtgaatgttattgttcaggtaaacagccagaaccgca
 gtggctgaccatggcggaagccgaaaaacattgtgaagccggtctgggcatttgggaatggcgaggtacagaagatggcctggaaccg
 gatattgttatggcatgtgccggtgatgttccgaccatggaacgctggcagccgtggaattactgcgtcagagcctgccgcacatgcgtatt
 cgtgttgaatgtggtgatctgatggtctgcagagtcgcacatcctcatggtattagtatgaagaatttgatcgtatgttcaccaca
 aatcgtccggtgattttgcctatcatggttatccgtatctgattcacctgtggtttataaacgtaccaatcacagcaatttcacgtgcgtggttt
 attgaacagggtacaaccaccacccggtttgatatgaccgtgctgaatgagctggatcgtttcatctggcaatggaagcagttgaacgcctg
 ccactgggtgaaagcgttgcaaaaccgctgattgataacttacagaaaaactggcactgcacaaagattatattcgtcagcatggcggaaga
 tatccgggaaattcgtgattggaaatggacctggcctcgt (配列番号58)

10

20

ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)
 ATCC 11741 からのホスホクトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 5 9】

atgaccgattatagcagccaagaatacctggataaactggatgcataattggcgtgcagcaaattatgtagcgttggcagctgtatctgaaa
 gataatccgctgctgcgtcgtccgctgaaagcagaagatgttaaagttaaaccgattggcattggggcaccattgcaggtcagaattttatct
 atgcacatctgaatcgcgtgatcaacaaatatgatctgaacatgttctatgttgaaaggctccgggtcatggtggcaggttatggttagcaatag
 ctatctggatggtagctatagcgaatctatccggaaattagccaggatgaacagggtatgaaacgtctgtttaaacgttttagctttccgggt
 ggtgttgaagccatgcagcaccggaacaccgggttagcattcatgaagggtggaactgggttatagcattagccatagcgtgggtgca
 gttctggataaaccggatctgattgttcagcagttgttgggtgatggtgaagcagaaaccgggtccgctggcagcaagctggcagagcaata
 aattcattaatccgattcatgatggcgcagtgctgccgattctggatctgaatggctttaaaatcagcaatccgaccattctgagccgtgaaagt
 gatgaaacctgaccaaataatttcgaaggatgggtggcatccgatcttggtaagggtgatgatccgaaattaatgcacccggcaatggca
 aaagcaatggatgaagcaattgaagagattaaagcgattcagaaaaacgcacgcgaaaaataacgatccgagcctgcctgcatggcctgtt
 attatcttctgtgcaccgaaagggttgacagggtccgaaagaatgggatggcgaaccgatcgaaaaaagctttcgcgcacatcagattccgat
 tccggttgatcagaatgatatgcagcatgcagatgcactggttgattggctggaaagctataaaccgggaagaactgtttgatgaaacggca
 aactgaaagccgaaattgcagaaattacccgaaaggcgataaacgtatggcagccaatccgcataaccaatccgggtaaactgattcgcg
 aagtatatcaaacggattttcgtgattttgcagttgataaccgcgttctcgtaaagaagttgcacaggatatgaccgttctgggtaaaatctg
 gaaaaagtgcctgagcgataaccgccataattatcgtgttttgggtccggatgaacgatgagcaatcgtctggcaccgatttttgatgttacca
 aacgtcagtggtggcgaatcaaagaaccgaatgatcagttatgaccaggcgggtcaggtgattgatagccagctgagtgaaatca
 ggcagaagggtttctggaagggtatgttctgaccggtcgtcatggtttttgcaagctatgaaagttttctgcgtgtggtgatagcatgctgac
 ccagcactttaaatggctgcgtaaagcaaccgaacagccgtggcgtaccagcattccgagctgaatgttattgcaaccagcaccgtttttca
 gcaggatcataatggttataccatcaggatcctggtattctgggtcatctggcagataaaaaacctaataatccgcgaatatctgcctgcc
 gatgcaaatagcctgctggcagttttgataaaaccattaatgaccgcgacaaaataaacctgattgtggcaagcaaacatccgcgtcagca
 gttttatagcgcagcagaagcaaaagaactggtagataaaggcctgaaaattatcgattggcgagcaccgataaaaatgccgaaccgga
 tgtgttattgccgcagcaggcaccgaaccgaacctggaagcactggcagcgattagcattctgcatgaaaaactgccgatcttaaaatc
 cgctttattaacgttgttgacattctgaaactgcgtagcccgaagttgatccgcgtggtctgagtgatgatgaatttgatccatttcaccaa
 agacaaaccgggtgattttgcctttcatggttatgaaggctcgtgcgcgataattttctattatcgccataaccataacgtggcctttcacggctat
 cgtgaaaatggtgatattaccacccggttgatagcgtgttctgtcacagatggatcgttttgatctggttaaaagcgttgactgagctgcct
 gatgccgataaataatggccagctggttgccgaaatggatgcaaaagttgcaaaacatcatcagtatatccgtgatgaaggtagagatctgcc
 ggaagttgaaaattgggaatggaaccgctggat (配列番号59)

10

20

ロドコッカス・イムテケンシス (*Rhodococcus imtechensis*) R
 K J 3 0 0 からのホスホケトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 6 0】

atgaccgatggtcgtcaggttgtagccaggatagtgatggtcattatagcgatagcgatctggatctggacctgcgttggtgggcagcagc
 aaattatctgaccgttgacagatttatctgcaggataatgcactgctgctgctccgctgcgtccggaacacattaaaccgcgtctgctgggt
 cattggggcaccagtcgggtctgagcatgatttatgccctgctgaatcgtctgattcgtcgtaccgataccgattgctgtatgttaccgggtcc
 tggatcatggtgggtccggcactggtgcagcaacctatctggaaggcacctatagcgaagttatccgggtgtagccgtgatgcagcaggta
 ttcacgtctgtgctgcagtttagcacaccgggtggtattccgagccatgttagcgttcagactccgggtagcattcatgaaggtggtgaact
 ggggtatgcactggcacatgcagccgggtgcagcatttgatcatccgaatctgctggtgcctgtgttattggtgatggtgaagcagaaccgg
 tccgtgagcggtagctggaaactgcctgcatttctgaatccggaacgtgatggcgagttctgccgattctgcatgttaatgggtgcaaaaatt
 gcaggtccgaccgtttatggtcgtagctcagatgcagatgttgaaagccttctgggtggtcaggggtgggcaccgaccgtggtgagcgggtg
 atgatccgctcatgttttccagcactgcacgtgcactgacagatgcacatgccgaattagtgatctgcagcgtgaagcacgtgcaggtc
 gtcgtagcgcagcaaaatggcctgcaattgttctgctacccgaaaaggttgacaggtccgctaccgttgatgggtgttctggtgaaggt
 acacatcgtgccatcaggttccgctgacaggtgttcgcaccgatgaagcacatctgcgtcagctggaagaatggatgcgtagctatggtcc
 ggggtgagctgtttgatagcagcgggtgccctgggtcctgatctggaacgtctggcaccgcagggtgataaacgtatgggtagcagccgtat
 gcaaatggtggcgtctgcgtgcagatctgccgggtccgctctggaanaatatgcgtggcaattgaaaaaccgggtacaacctgcacgt
 aaaccaccgtgtgctgggtgaattactgctgatctgtatgcagccaccgcaacaccggatggtggtggttatttctgtctgtttgtccggat
 gaaaccgcaagcaatgcctgggtgcagttttgaaagttaccgatcgttgttgccagctccggtgaccgattatgatgatgctgagtgc
 cgtggtcgtgttatggaagttctgagcgaacatctgtgtgaaggttgctggaaggttatctgctgagtggtgccatggtctgtttgcaagct
 atgaagcatttgcaatggttagcgtgagcatgctggttcagcatacacaatggctgcagcatgcagttgatctgccttggcgtgcaccggtg
 caagcctgaatgtgctgctgaccagcacctgttgccgtaatgateataatggttttagtcatcagggtccgggaatgattgatgcagttattcc
 gctggctccggatgttctgtatttggtgccaccggatagcaataacctgctgtcaattgcagatcattgcctgcgtagcaccgatcatgtg
 aatctgattgttgataaacagccgcatctgcagtatctgacactggccgaagcccatgcacattgtgcagcgggtgccagcgtgtggga
 atgggcaggcaccgaaggtgcgggtggtgcggatcctgatgtgtgctggcagcggctggtgatgttcgaccaagaatacctggcagc
 cgcacagctgctgcgcgaacatactccgcatctggttaccgtgttgaatgtgtggaatctgatgggtctgctgacgccgaccgaacatcc
 gcatgggtttgatgcacgtatgttctggattgtttaccgcagatacggatgtggttttgcctttcatggttatagccgtgccgttcatgaactga
 ttcattggtcgcctgcaccggatcgtttcatgttcgcgggttttagcgaacagggtacgaccaccaccggttgatatggttgttctgaaccgt
 atgagccgttatcatctggtgctggaagcactgcgtgcaccgctcgtgaacctgcgggtgcaggcgaactggcagattttgtctgcgcca
 gttagaacgccatggcgaatatgttgtgcacacctggaagatatgccggaagttcgtgattggacctggtca (配列番号60)

10

20

バークホルデリア・ゼノボランス (Burkholderia xenovorans)
 LB400からのホスホケトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 6 1】

atggcagaagcaagcagccgtccgacccctccgcaggttctggatgcagataccctgcgtaatatggatcgttattggcgtgcatgtaattat
 ctgagcgcaggtatgatttatctgcgtgataatccgctgctgcgtgaaccgctgaaaccggaaacacattaaaaaccgtctgctgggtcattgg
 ggtagcgatccgggtcagagctttctgctgggtgcatctgaatcgtctgattcgtaaactggatctgaacgtgattatgttgcaggtcctggta
 tggtagcaccggcaaccctggcacattgttatctggaaggctattatagcgaatttatccggatcgtagcgaagatgaagccggtagtcagc
 gttttttcgtcagtttagctttccgggtggtattggtagccattgtacaccggaaacaccggtagcattcatgaagggtggtgaactgggtata
 gcctgagccatgggttatgggtccgcatttgataacccggatctgattgttaccgtgatgttgggtgatggtaggaagcagaaccgggtccgctgg
 caaccagctggcatagcaacaaatttctgaatccgggttcgtgatggcgagttctgccggttctgcacctgaatggctataaaatcgcaaatc
 cgaccattctggcacgtattccgcgtgaagaactggagcactgctgaccggctatggtcataaaccgtatttctgtgaagggtgatgccg
 gcagttatgcatcagcagatggcagccaccctggaaacagtgtattggtgaaattcgtgcaattcagcagcatgcacgtgcaataatgatgc
 aaccgctccgcgttggccgatgattgttctgcgtagcccgaagggtggacaggtccgaaagaagttagccataaagtggaggttag
 ctggcgtgcccatcaggttccgggtgctggatccggttaccatggtaaaagcctgaaactggtgaaaattggatgcgtagctatgaaccgg
 aaagcctgtttgatgaagcaggtcgtctggttaggaactgcgcgaactggcaccgaaaggcgcacgtcgtatttagcccaatccgcagt
 caaatggtggctcgtctgtgtaaaacccctggatagcctgcatttgggtgattatgcagttgcagttaaaaaaccgggtggcaccctataaccagcc
 cgaccgaagtctgggtaaattcctgtgtgatgttatgctgcgaatatgaccaatttctgtttttgggtccggatgaaaccgcaagcaataaa
 ctgaccgcaatttatgaagccagcgaaaaaacccctggctggcccagaccgaaccgagtgtgccgatgggtgcgatctggcagttgatgt
 cgtgttatggaaatgctgagcgaacatacactggaaggctggtttgaagggttatgttctgaccggctcgtcatggtctgtttgcaacctatgaag
 catfttgcatgtgatcgaatgcatgtttaatcagcagcgaataatggctggaaaaagcaaaacgtgatctgggttggcgtcagccggttccg
 agcattaatctgctgattaccagcctgggtggcgtcaagatcataatgggtttacacatcaggatcctggttttctggacgttgtgaccaataaa
 tcaccggatgttgtgcgtatctatctgcctccggatgccaattgtctgctgagtggtgcagatcattgcctgcgtagtcgcgattatgttaattgta
 ttgttggcgataaacagccgcatctgcagtatctggacatggatgccgcagttattcattgtaccaaagggtattggcatctgggattgggcaag
 caccgatcagggtgttgaaacctgatgttattgcaagtccgggtgatattgccaccatggaagccctggcagcagttcagattctgaaaga
 acgttttccgatctgaaaaatccgtttgtgaatgttgggtgacctgttccgctgatccggaacatgcacatccgcacggctgagcaatcgtg
 attttgatagtctgtttaccgcaaccaaacgggtgatctttaaactttcatagctatgcaagcctggttcacaaactgacataataatcgtaccaacc
 atgataacctgcatgtgcatggctatcatgaaaaaggcaatftaacacaccgctggaactggccattattaaccaggttgatcgttttagcct
 ggcgattgatgtgattgatcgtgttccgaaactgcgtggtgtgggtgatcatgcaaaagaatggctgcgtggccaggttattgaacatctggc
 atatgcacatgccgaaggcattgatcgcgaagaaattcgcaattggacctggaaaggt (配列番号61)

10

20

マイコバクテリウム・イントラセルラーレ (Mycobacterium intracellulare) ATCC 13950 からのホスホクトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 6 2】

atgacccatgcaaccgactgagtgatgaactggcactgattgataaactggcgtgcagcaaattatctgagcgttggtcagatttacc
 tgctggataatccgctgctgaccgaaccgctgaccattgatcatgttaaacgcgtctgctgggtcattggggcaccacaccgggtctgaat
 ctggtttatgcacatctgaatcgtgttattcgtcatcgtgatgccgatgttatttatgttaccgggtccgggtcatggtggtcctggtctggttgcaa
 atgcatatctggaaggcacctatagcgaagtttataccgggtattgaagaagataaccgaaggctcgcgtaaactgttctgtagtttagctttccg
 ggtggtattccgagccatgttgcagcacagactccgggtagcattcatgaagggtggtgaactgggttatgccctggttcatgcatatggtgca
 gactggataaaccgtatctggttgttgcgtgtgttgggtgatggtgaagcagaacaggtccgctggcagcaagctggcatagcaacaa
 atttctgaatccgggtgaccgatggtgccgttctgccgattctggccctgaatggctataaaatcgcaaatccgaccgttctggcacgtattccg
 catgcagaactggaaagcctgctgctggttatggttatcgtccgattaccgttccggtgatgatccggcagatgttcatgtaactggca
 gctgccctggatgatgcctttgatgataatgcagcaattcagagcgcagcacgtgggtggtgaatggtgtgaacgtccggttggccgatgatt
 gttctgcgtaccccgaaagggttgacgggtccgaaaatggttgatggcaaaaaagtgaagggtacatggcgtagccatcaggttccgttag
 cagcaaccctgtgataatcctgaacatcgtgcacagctggaaagaatggctgcgtagctatggtccagggcgaactgtttgatgaaaatggccg
 tctgcgtccggaaactgcgtgcactggcaccgagcgggtgatcgtcgtatgagcgcgaaccgcgatgccaatggtggactgctgctgcacga
 tctggtatcgtccggatttctgattatgcagttgcagtggaacgtcctgcagcagttaccatgaagccaccctgttctgggtggttttctgc
 gtgatgtgattgcacgtaataaagatcgttttgcctgatgggtccggatgaaccgcgaagcaatcgtctggtgagtttatggtagcaccg
 ataaagtgttgctgagcgaaattgaaccggatgatgagcatctgggtccggatgggtcgtgtgatggaagtctgagtgaacatctgtgtcagg
 gttggctggaagggttatctactgaccggctgcatggtctgtttaattgttatgaagccttgtgcacatcgtggtatagcatgctgaaccagcatg
 caaatggctggcaaccagccgtgaactgccgtggcgtcgtcctattgcaagcctgaattacctgctgagcagccatgtgtggcgtcagga
 tcataatggtgcaagtcacagcatccgggttttattgatcgtgtggccaataaacgtccagaactgaccgtgtgtatctgccaccggatgg
 caataccctgctgtctgttgcagatcattgtctgcgttcacgcgattacaftaatgttattgttgcaggtaaacagccagccctggcctatctgga
 tatggtatgaagccgttgacattgtaccgtggcctgggttattgggaatgggcaagcaccgcaaccgatgatcctgatgttgtgctggcat
 gtgcaggcgatattccgaccctggaaaccctggcagccgcagatattctgcgcagcgaaactgcccgaactggccgttctgttgttaatgtt
 gttgatctgatgcgtctgcagccggatacagaacatccgcgtgacctgcctgatcgtgaatttgatgcactgtttacaccggatcgtccgggtg
 attttgcataatcatggctatccgtggctgatccatcgtctgacctatagtcgtaccaatcatgcacatatcatgtgcgtggctttaagaacgt
 ggtacaaccaccacccggttgataggtaatgctgaatgatctggaccgttttacttagttatggatgttatcgtatcgtgttgatggtctggca
 agccgtgccgaatgctgcgtcagcgcatggtggatgcagctctggcagcgcgatgtatacccgtaacatggcgaagatgatccaaaa
 attagcgggttgacctgggtccgagcgat (配列番号62)

10

20

ニトロソモナス属 (Nitrosomonas) Is79A3 種からのホスホクトラゼ
 酵素をコードする核酸配列

【化 6 3】

atgaaaaagaataccaagctgctgagtcggaactgctgcacaaaatggatgcatattggcgtgcagcaaattatctgagcgttggtcagat
 ttatctgtatgataatccgctgctgaaacagccgctgaaactggcacatatcaaaccgctctgctgggtcattggggcaccacaccgggtc
 tgaattttatctatgttcatctgaaccgcattatcaaagagcagatctgaacgttatctatattaccgggtccgggtcatgggtgctctggtt
 tgcaaatacatcttgggaaggcacctatagcggaagtgtatccgaatattagccaggatgaagatggatgcagcgtctgttcaaacagtttag
 cttccgggtggtattccgagccatgttgcaccggaaactccgggtgagcattcatgaagggtggtgaactgggttatagcctgagccatgcatt
 tgggtgcagcatttgataaccctggcctgctggttgcctgtgttgggtgatgggtgaagcagaaacaggtccgctggcaaccagctggcata
 gcaacaaatttctgaatccgggttcatgatgggtgcagttctgccgattctgcattctgaatggctataaaatcgcaggtccgaccgttctggcacg
 tattccgtgtgatgaactggaagcactgttctggttatggttataccccgtattttatcgaagggtgatgcctctggaaatgcatcagcgtat
 ggcagcaaccctggatgcagtatttgccaatattcagagcattcagcgtgatgcacgtaccatggttttaccaaacgtccgattggccgat
 gattattctgctgtagccgaaagggttgacgggtccgaaagggttgatggttaaaccgaccgaagggtacatttctgtagccatcaggttccgat
 ggggtgatagagccagcctggtcatgttaaaattctgaaaaatggctgaaaagctatctccgcaagaactgttgatgaaaccggtaaact
 gctggcagaactggccgagctggcaccgcagggtgcacgtcgtatgggtgcaaatccgcatgcaaatggtggtatgctgctgctgatct
 gcgtctccgggatttctgcgattatgccgttaaagggtgccaatccgggtacagttagcgcagaagcaaccgtaccagggtgaatttattc
 tgatgttgtaaaactgaacgccaccaacttctgttttttagtccggatgaacggcgaagcaatcgttgggggtccggttttgaagttaccaatc
 gctgtatgaccgcagaaattgttctggtgatgaccatgtggctccggatggtcgtgttatggaaatgttaagcgaacatcagtggaagggt
 ggctggaagggttatctgctgaccggctgcatggcttttttagctgttatgaagcctttatccacattattgatagcatgtttaaccagcatgcca
 gtggttaaaagtggcaaatgaaattccgtggcgtcgtccgattgcaagcctgaattacctgctgagcagccatgtgtggcgtcaggatcata
 atggtttttcacatcaggatccgggttttattgatcatgtgatcaacaaaaagccgaaattattcgcattctatctgccaccggatgccaatacc
 ctgctgtcagttaccgatcattgtctgcgttcacgtaattatgtgaatgttattgttgcgggtaaacagcctcagccgcagtggtggtatggga
 tccgcgaattaaacattgtacagccggtattggtattgggaatgggccagcaatgatcaggggcgaagaaccggatgttgtgatggcatgtg
 ccggtgatgctccgaccattgaaacactggcagcagttgagctgctgtggaacattttctgaactgaaatcgcgtgattaatgtggttga
 tctgatgagcctgcagccacagagtgaacatcctcatggtctgagcgataaagattttgatggctgtttaccaaggacaagccgattatctt
 gcctatcatggttatccgtggctgattcatcgtctgacctatcgtctgaccaatcatgataacctgcatgttcgcggttataaagaagaaggtac
 gaccagcaccctgttgatggttgaatgaatgatctggatcgtttcatctggtggcagatgtgattgatcgtgttccgcagctgggttagc
 cgtgcagcctatgttaaacaggcaattcgcgataaactgatcgaacacaaacagtacattaaccagtatggcgaagatagccggaaattcg
 taattggaaatggaaaggtagcagcgtg (配列番号63)

10

20

シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)
 972h-からのホスホケトラゼ酵素をコードする核酸配列

【化 6 4】

atggccaccagaatgatattccgaatagcacaccggaagatctggcaaacaggttgaaattgcagaaaaacatccggatccgcctgca
 atgccgagccgtctgccggatagcctgaaaaccctggaagcaaaaattgataccagcaaaattaccgatgaagaggttgcaaatgtgcatc
 gttttcagcgtgcatgtgattatctggcagcaagcctgattttctgagcaatggtctgtataccgggtggtgatctggaagagaaagatatcaaa
 acccgtctgctgggtcattggggcacctgtccgggtctgagcattgtttatagccattgcaatcgcacatcaacaatacgcattgaacatgc
 tgtttgtgttgctcctggtcatggtgcaccggcaattctgagcgcactgttctggagatagctgggtccgtttatccgcgttatcagtttac
 caaagaaggcctgaataacctgattaacacctttagcctgctggtgtttccgagccatgttaatgccgaagttccgggtgcaattcatgaa
 ggtggcgaactgggttatgactgagcgttagctatggtgcagttctggatcgtccggatctgattgttacctgtgtgtgggtgatggtgaag
 cagaaccgggtccgaccgcaaccagctggcatgcacataaatttctgacccggcagaaagcgggtgccgttattccggttctggaactgaat
 ggttacaaaattagcgaacgcaccatttatggtgcatggatgtagcgaactgctgagcctgtttagcgggtttggtatgaagtggccattgt
 gaatgatacaccggatcagaatcgtgttatggcagccaccatggattgggcagttgaacgtattcatgataccagcatcgtgcacgtgttaa
 tcgcgaagaaattaaaccgcgttggccgatgattattctgcgtacccgaaaggtaaggtgtccgaaatatctgaatggcaaatcttctgga
 aggcacctttctgacatcaggttccgctgaaactggcaggtaccgataaccaatcagcgtaatctgctgaaagattggctgaatagctataa
 ctgtcaggattttctggatgaacatggtctccgaccaaaaggatattaccgaacatctgctccgcgtgaaaaacgtatgggtcagcgtcatga
 aacctataatagttatctgccactgaaagtggcggactggagaaatattggtgttaaaaaagggtgaaaccaccagtgccgaccagcgtggttg
 gccagtatctggacgagctgctggttaccatgatagcaccctgcgcatttttagtccggatgaactggaaagcaataaactggatggtgcc
 ctgaaacatagctatcgtaccatgcagaccgatccggaactgatggccaaacgtgtcgtgttaccgaagtgtgagtgaaacacctgtgtca
 gggttttatgcagggttataccctgaccggctgaccgccattttccgtcatatgaagcatttatgaccatcgttgttagcatgctggttcagtat
 agcaaatctctgaaaaatgggtctggaacgggttgcatggtaaatttggtagtctgaattatgttaccagcagcacctgggcacgtcaaga
 acataatgggttttagccatcagagtcgcgttttattaccaccatgctgagctctgaaaccgggtgttagccgtgtttatttccgcctgatgcaaa
 ttgtttctggaaccgttgacgttgtatgaaaagcgaacacacattatctgatggtcagcagtaaaaatccgcagcctgcatactgagc
 gtggaagaagcgggaacatcattgtaaagccgggtgcaagcgtttgaaatttgcaagcaccgataatggtgaaaatccggatgttattgc
 cgtgttggcaatgaaatcatgtttgaagttgttaaagcagccgaaatgctgcagaacgatatccctgaactgcgtgttcgtgtgattaatgtg
 accgacctgatggtgctgagcagctctgcacccgatggtatgaatcctgcagaatttgattcactgtttacgaaagatgccacgtgcacttta
 actatcatggttatgttatggtatgaaggcactgctgttcgacgtattcagggcaccctgtgacctggaagggtatcgtgaagaaggtag
 aaccaccacccgtttaatatgatgatgtgtaataataaccagccgtatcatgttgcctgatggcactgcagcatgccctgcataatccgacc
 gttgcgggttaattgtaatatgctgtgtgcaaaatatgcctggaaacttgaagagatcgagaactacatcatggaaaacaaagatgatcctccg
 gaaatttatgccgcaccggtgtttaaaaacaaaaccagtacccctg (配列番号64)

10

20

ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*) ATCC
 11577からのホスホケトラゼ酵素をコードする核酸配列

【化 6 5】

atgaccgtggattacgatagcaaaagagtatctggatctgctggataaatactggcgtgcagcaaatatctgagcgttggcagctgtatctgc
 gtgataatccgctgctgaaacgtccgctgaaaagtatgatgtttaaatacaaccgattggcattggggcaccattgttagccagaattttat
 ctatgcacagctgaatcgtgccatcaacaatatgatctgaatatgttctatattgaaggcagcgggtcatgggtgcaggttatggttagcaata
 gctatctggacggtagctatagcgatatttatccgaatattagccaggacgaaaaaggcatgcagaaactgttcaaacagtttagctttccgg
 gtggtgttgaagccatgcagcaccggaaacaccgggtagcattcatgaaggtggtgaactgggttatagcctgagccatggcaccgggtg
 caattctggataaccggatgttattgcagcagttgaaattggtgatgggtgaaagcgaaccgggtccgctggcagcaagctgggttagcgat
 aaattcattaatccgattaccgatgggtgcagttctgccgattattaacatgaacgggttcaaaattagcaatccgaccattctgagccgatgagt
 gatgcagatctgacggattatttcaaaggtatgggttgggaagcccattttgttgaagcaaccgcagataccgatcatgcaaaagttgaagcc
 gaatttgcaaaaaccctggataccgtgattgagaaaattaagagcatccagaaaaacgcacgcgaaaaatgaaactccggataatgttaact
 gccggttggccgatgattatcttctagcccgaaggttggacaggtccgaaaaaagatctggatggtaaccgattgaaggtagctttcg
 tgcacatcaggttccgattccggttgatgcaaatgatattggaacatgcagatgaactgggtgactggctgaaatcatataaaccggaagaact
 gtttgatgaaaacggcaccctgaaacctgaactgcgtgcactggcaccgaaagcgcgaacagcgtatgagcgtgaatccgatcacaaatgg
 tggattaaaccagaacctctgaaactgcctaattgtcgtgattttgaagtgaatttgataaacgtgggaccgagcagaacaggatattgatt
 gagtggctaaaaatggctggatgcagttgcaaaactgaacccgaccaccttctggttttggctccggatgaacacaaagcaatcgtctgtat
 tctactgctggacgatggtaaacgtcagtggtatggaagatatccatgaaccgtatgatgaggatctggcaaatcatggctgtgttattgatagc
 cagctgagcgaacatcaggcagaaaggttggctggaaggttatgttctgaccggctgcctatgggtttttgcaacctatgaaagctttgtcgcg
 ttgtggatagcatgctgaccagcattttaagtggctgcgtaagcaagcgaacagatttggcgtaaacagtatccgagcctgaactttgttg
 ataccagcaccgtttttcagcaggatcataatggttataccatcaggatccgggtctgctgacacatctggcggaaaaaaagccgggaattta
 ttcgtgaatatctgcctgcagatgccaatgaactgctggcagttggtgatagcgcatttcgtacatatgaaaagattaacctgatcgtgaccag
 caaacatccgcgtcgcagtggtatagtatggatgaagcacagaatctggtgaaaaatggtctgggctatctgattgggcaagcaccgat
 cagggtcaagaaccggatgtgtttttgcagccgcaggtagcgaaccgaaatctggaagccctggcagccattagtattctgaataaagaatt
 cccggaactgaagatccgctttattaacgtggttgatactctgaagctgaacagccctaaaaaggatccgcgtggctgtcagatgaagaatt
 cgataacctgtttaccaccgacaaaccgggtgatttttgcattggcatggctttgaggacatgatcaagacatctttttgatcgcataaccaca
 acctgtatgtgcattgttatcgtgaaaatggcgatattaccaccccggttgatatgcgtgttctgaacgaactggatcgtttcatctggcagcg
 gatgccattcgtcatattccggcatatgcagttaaaggtggctattttatccagcgcgatgaacaacatcgtggataaacataatcgttatattcg
 cgaagttggtacggatctgccggaagttaccagctggaattgggaaccgctgaacaaa (配列番号65)

10

20

ストレプトミセス・ガーナエンス (*Streptomyces ghanaensis*)
) ATCC 14672 からのホスホクトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 6 6】

atgccggaagcaccggataccgtaccgttctgagtgatgaagaactgcgtaccctggatgcacattggcgtgcagcaaatatctggcag
caggtcagatttatctgctggcaaatccgctgctgaccgaaccgctgcgtccggaacacattaaaccgcgtctgctgggtcattggggcac
cagtcgggtctgaatctggtttatacccatctgaatcgtgttattgcaggctcgtggtctggatgccctgtgtatttgggtcctggtcatggtg
gtccgagcgttctggccaatagctggctggaaggtagctatggtgaaacctatccggatgttggctgtgatgcagccggtatggaacgtctg
ttcgtcagtttagcttccgggtggtgtccgagccatgttgaccgggaagtccgggtagcgttcattgaaggtggtgaactgggttatagcc
tggcacatgcatatggtgcagcactggatcatccgggactgctggttgcattcgttattggtgatggtgaagcagaaccgggtccgctggc
agccagctggcatagcaacaaatttctggatccgggttcattgatggcgagttctgccgattctgcatctgaacggctataaaatcgccaatcc
gaccgtgctggcacgtctgcctgaagatgaactggatagcctgctgcgtggttatggtcatgaaccgattcatgttagcgggtgatccgg
cagcagttcatctgcaatggcccatgcaatggatactgccctggtatgctattgccgaagttcagcgtgccgcacgtgaagatggtgttacc
gaacgtgcacgtacaccggttattgttctgcgcacccgaaagggttgaccgggtcctgcgggaagttgatggtaaaccgggtgaaggcacct
ggcgtgcccatcaggttctctggcaggcgttcgtgataaccgggaacatctgcgtcagctggaagcatggctgcgtagctatcgtcctga
ggaactgtttgatgatgccggctgcctgggttcagatgttctggcgtgctgccagaaggtgatcgtcgtctgggttagcaccctgatgcaaa
tgggtggcctgctggtgcgcgaactgccgatccctgcgtggtgatgtttgcagttccgggttgataaaccgggtacaacctgcatgaaccta
cccgtattctgggtggtctgttagaacgtattatgcgtgataccgcagatcgtcgcgatttctgctggttggtccggatgaaaccgcaagcaa
tcgtctggaagccgtttatgatgcaagcgtgaaagcgtggcaggcaggtagactggatgttgatgagcatctggatgccatggtcgtgtga
tgggaagttctgagcgaacacctgtgtcagggttggttagaagggttatttactgacaggtcgtcatggcctgtttagctgttatgaagcattgtg
catatcgtggatagcatggttaaccagcatataaatggctgaaaaccagccgtgaactgccatggcgtgctccgattgcaagcctgaatta
cctgctgacaagccatgtgtggcgtcaggatcataatggttttagccatcaggatccgggtttgttgatcatgttctgaataaaagtcggaa
gtggttcgtgtgtatctgcctccggatgcaaataccctgctgtcagttgccgatcatgactgcgtagtcgtgattatgttaattgttgttggc
ggtaaacagccgtgttttgattggctgagcattgatgaagcacgtgttcattgtgcacgtggtgcaggcatttgggaatgggcaggcacccga
aaatggcgggtgcacctgatgtgttctggcatgtgcgggtgatgttccgacccaagaagtactggcagcggcacagctgttacgtcgtcatc
tgccggaaactggcagttcgtgttgatgttgatattgccgtctgatgctcgtgaagaacatccgcatggtatgacagatttgaatat
gatggactgttcaccgcagacaaaccgggtgattttgcctatcatggtatccgtggtgattcaccgtctggcctatcgtcgtaatggtcatcc
gaatctgcatgttcgtggttacaagaagcgggtacgaccaccaccctgtttgatattggtgttcgaatgatctggaccgttatccctggtga
atggatgttattgatcgtgttctggtctggccgttcgcgcagcagccgttcgtcagcgtatggcagatgcccgtaaccgtcatcatgcatgg
attcgtgaacatggcaccgatttacctgaagttgcagaatggtcttggaatgca (配列番号66)

10

20

シアノセイス属 (Cyanothecae) PCC 8802 種からのホスホクトラーゼ酵素
をコードする核酸配列

【化 6 7】

atggttgcaacaccggaacgtccgaccctggaacagacaccgctgagcgcagaagaactgcgtcagattcaggcatattggcgtgcatgt
aattatctggcagtggtgatgattatctgcgtgataatccgctgctgaaagatccgctgaccgaagatcatgttaaaatcgtctgctgggtca
ttgggtagcagtcgggtctgagctttatctatattcatctgaatgcctgatcaaaaatacggcctggatgtgatttataggcaggtcctg
gtcatgtgacccgggtattctgggtcgggtttatctggaaggcacctatagcgaacctatccggataaaagcgaagatgaagagggtcat
gaaaaaattcttcaaacagtttagctttccgggtggtattggtagccattgtactcggaaacaccgggttcaattcatgaagggtggaactg
gggtatagcctgagccatgcatatggtgcagcactggataacccggatctgattgttgacaggtgttggtgatggtgaagcagaaccgg
tccgctggcaaccgcatggcatagcaataaattcattaatccgattcgtgatggcgagttctgccgattctgcatctgaacggctataaaatc
gcaaatccgaccattctggcacgtattagccatgaggaaactggaatacctgtttaaagggtatggctacaaaccgtattttgtcgaaggtagcg
atccggaaagttagcatcagaaaatggcagcaacactggaaccgcaattgccgaaattaacatattcagcaagaggcacgtaccagcg
gtgttgcaaaacgtcctatttggccgatgattgtctgcgtagcccgaagggttgacaggtccggcaagcgttgatggcaaaaaacgga
agatttttggcgtagccatcaggttccgctgagtggtatgcatggtaatccggcacataftaaagtctggaagattggctgaaaagctatacc
cctgaagaactttttagtgaaaacggcacccgtattccggaaactgaagaactggcaccgaccggctcatcatctgatgagcgccaatccgc
atgccaatgggtgtctgctgcgtaaagatctgaaaatgccggatttctgtaattatggtgttgaaagtgccaaaccgggtacagttgaagtggg
taataccgcactgctgggcaattttctcgggatgttatggccaataatgaccaatttctgtgtttgtccggatgaaccgccagcaac
cgtctgaatgcaatttatgaaatcagcaaaaaagtgtggatggcgaaattctgccggaagatgcagatggtacagaaatcaccaccgatg
gtcgtgttatggaaatgctgagcgaacataccctgcagggtggtggaagggtatctgctgaccggtcggcatggtttttcatacctatga
agcatttggccatgtggtgtagcatgtttaatcagcatgcaaaatggctggacatctgcaaaaatgaagttccgtggcgtgccagcgtag
cagcctgaatattctgctgagcagcaccgtttggcgtcaggatcataatggttttagtcatcaggatcctggttatgttgatctggttaccataa
atcagcggatgtgtgcgtgtttatttctccggatgcgaattgtctgctgtcagttgcaaatcattgtctgaaatcaaccgattacgtgaacgtt
attgttagcgataagcagatccatctgcagtatctgaatatggtcagggccatcaaacattgcaccaaagggtattggcatttgggttggtgcaa
gcaatgatgattgcgttacggaaccggatcatcctgatgttattatggcaagctgtgtgatgttgcaaccaaagaagcactggcagccacc
gccattctgcgcgaagaatttccggattttaaagtgcgtttatcaacgtgggtgacctgttcaaaactgcagagtgaaattgaacatcctcatgg
tctgagtgatcgcatgttttgataaccttttaccaaaagacaaaccgatctttaaactttcatggttatccgtggctgatccaaaactgacctat
cgtcgtaccaatcatcacaatctgcatgttcgtgtgtataaagagaaaggcaatftaacactccgctggaactggccattaacaatcagattg
atcgtttaacctggtgatcgtatgttatcaatcgtgttcgaaactgggtagcgcagcagcatatgttatgaacgtatgaaaaacgccatcatc
gaacatcgtgcatatgcctatgaacatggtattgataagcccagattaacaactggaatggcctcat (配列番号67)

ネオサルトリア・フィスケリ (*Neosartorya fischeri*) NRRL 181 からのホスホケトラゼ酵素をコードする核酸配列

【化 6 8】

atgaccagcaaaggcgaaattgaaagcctgagcgcataatggtgtgacgtagcaccattcagggtagaccgctgagccaggatgaactg
 cgtaaaatggatgcataatcttctgcaagcatgtatctgtgtctgggtatgctgtatctgcgtgataatccgctgctgaaagaaccgctgaaagt
 tgaacatctgaaagcacgtctgtctgggtcattggggtagtgatgccggctcagagccttacctggattcatatgaaccgtctgatcaaaaaata
 cgatctggatgtgtgtttattagcgggtccgggtcatggtgcaccgggtattctgtcacagagctatctggaaggtgtttataccgaagtttacc
 cggaaaaaaccaggacgaaaaaggctgtgcagcggttttcaaacagtttagctttccgggtgtgtattggtagccatgcaacaccggaaaca
 ccgggttcaattcatgaaggtggtgaactgggttatagcattagtcattggcaccgttttgcacatccgaatctgattaccctgaccatg
 gttggtgatggtgaagcagaaaccgggtccgtggcaaccagctggcatagcaaaaattctgaatccgattacagatggtgcagttctgcc
 ggttctgcactggaatggctataaaatcaataaccgaccattctggcagcattagccatgaagaactggaaatgctgtttaaagggttatggt
 tggaccccgattttgtgaaggtagcgtatgaaagtatgcatcaggcaatggcagcaaccctggaaacattgtgtctggaattaagaag
 atccagaacaggcacgcgaaagcaataaagcatttctccgtgtggccgatgattgttctgcgtagcccgaagggttgagcgcaccg
 cgtgaaattgatgtaataacctggaaaggcttttggcgtgcacatcagattccgatcaccgatgttcagagcaaacgggaacacttaaaagt
 gctggaataatggatgaaagcgtataagccggaagaggtgttgataaaaatggcaccctgattccggaactgaaagagctggcaccgac
 cggcaccagccgtatgagcgcgaatccgggtggtaaatggtgtctgtcgtcgtccgatggatctgccggattttcgcgattatgcactga
 ccgatattgaaccgggtgttaccattctccgagcatgagcaatatgagcaaatatctcggggatgttgttcccgtaatatgaccacctttcg
 tgttttgcctggatgaaaccgaatcaataaactggccgaaatctacaaagccggtaaaaagggttggatggccgaatatttcaagaaga
 tgaggacggaggtaatctggatatgcagggtcgtgtgatggaattctgagcgaacatacatgtgaaggttgctggaaggatatattctga
 gtgtcgtcatggcatgctgaatggtatgagccgtttattcatgtatcgacagcatggttaatcagcattgcaaatggattgaaaaatgcctg
 gcagttgaatggcgtgccaaagttagcagcctgaatattctgtgaccgcaaccgtttggcgtcaggatcataatggttttaccatcaggat
 ccgggttttctggacgttgtgcaataaaagtccggaagttgtgcgtatttatctgcctccggatggcaataccctgtgagcaccatgaatc
 attgtttcgtagcgtgaattacgtgaatgtgattgtggcagataaacaagaacatgtgcagtttctgaacatggaagaagcaattgaacattgc
 accaaagggtgttggtatttgggtattgggaagcaatgatcagggttgcaaccggatgtggttatggcaagctgtggtgatgttgaaccca
 tgaagccctggcagccaccgcactgctgcgcgaacattaccgcagttaaaagttcgtttgttaatgtggttgacctgttctgtctgattagcg
 atattaatcatccgcatggtatccggatcgtcagtggtgcaattttaccaccgataaaccgatcatctttaactttcatagctatccgtggc
 tgattcatcgtctgacctataaacgtctgtgcagcataatctgcatgtgcgtgttataaagaaaaaggcaatatcgaatcccggttgaactg
 gcggttcgaatcagaccgatggtatagcctggccattgatgaattgatcgtattccgagcctgggtaataccgcaagcggtgttcgtgaa
 cgcctgattaacctgcaactggcagcgaaaaacaaagcctttgatgatggtattgatccggattatattcgcaattggacctgggattatccgc
 gtaaaaaatgc (配列番号68)

10

20

エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) TX13
 30からのホスホケトラゼ酵素をコードする核酸配列

atggattatagcagcaaaagaatatgttgaataaaatgaccgcattggtggcgtgcagcaaaattatctgagcgttggtcagatttatcgaagata
atccgctgctgcgtcgtacacctgaaccggaagatgttaaaaaaaccccgattggtcattggggcaccattccgggtcagaaatfttatctgt
tcactgaaatcgctgatcaacaatacgtatgaacatgttttatcgaaggtcctggtcattggtggtcaggttatggttagcaatgcatact
ggatggtagctataccgaaatftatccggaagtftaccgaagatgaaacgggtatgcagaaactgtttaaactgttttagcttccgggtggtatt
gcaagccatgcagcaccggaacaccgggtagcattcatgaagggtggtgaactgggttatagcctgagccatggtgttggtgcagttctgg
ataactctgaagttattagcgcagttgttattggtgatggtgaagcagaaaccgggtccgctggcaggtagctgttttagtaattgttttatcaatc
cggttaccgatggtgcgggtgctgccgattctgcatctgaacggtgcaaaaaattgcaaatccgaccattctggcacgtaaaagtgtatggcgaa
ctggccaattattcaatggtctggtgtgggaaccgttttcattgaaggtaattgatccggaaaaactgaatccggtgatggcagaaaaatgg
atcaggccattgagaaaaatcaaaagcattcagaagaagcccgctctgaaaaccgcagcagatgcaatgatccgaaatggcctgttctgat
tgtgcgtacccgaaaggttgacaggtccgggaagaatgggatggtgagccgattgaaggcaccttctggtcacatcaggttccgattccg
gttgatcaagaacatattgatatgcagatgccctgctgcgtggtggtgaaaagctatgaaccagaaaagctgttgatgcacagggtcgtatt
ctggaagaaattcgtgaaattgcaccgaccggtgatcatcgtatggcaaaaaatccgattacaatatggtggtatggtatccgaaaccgctgat
tatccgggattggaaacgttataccctgcagtttgaaaaaccgggttcagttaccgcagagaagatatgaccgaaactgggcaaatftgttcgga
aatcattgaaaaaaaaccgggaaaacttgcacatcttggtcggatgaaccaaaaagcaatcgtctgaatcaggtgtttaaaaccaccaatcg
tcagtggatggaaaaaattgaaccgaaaaatgatgaatggctgagcccgagcggctgtgttattgatagccagctgagcgaacatcaggtat
gaaggttttttagaaggttatgttctgaccggtcgccatggttttttgcaggttatgaaagcttctgcgtgtggttgatagcatgctgaccagc
actttaaatggatgcgtaaaaagccgtgatctgagctggcgtaataactatccgagcctgaatctgattgcaagtgcaccgtgtttcagcagg
atcataatggttatagtcaccaggatccgggtattctgacccatctggccgaaaaaaaagcagaatftattcgtgagtatctgcctgccgatgc
aaatacactgctggccgttatggataaaacatttctagcagcgaaaaagatcaacctgattatcagcagtaaacatccgcgtgcacagtttat
agtgcagaagaagcagccgttctggttaatgaaggcctgaaaattatcgattgggcaagcaccgcgaaaaagaagaagaacctgaactggta
attgcagcagcagcagcaccgaaagttaactctggaagcactggcagcagttactctgctgctggaagagttccgaaactgaaaaatccgcttat
taacgttgtgacctgctgaaactgcgtcatccgagtcaggatcctcgtggtctgagtgtatgaagaatttgacaataactttaccaaaagataaa
ccgatcctgtttgcccttcatggctatgaaacactgattcgcaccatctttttgatcgccataatcatcatctgatgattcacggctataaagaga
atggcgatattaccacccgtttgatatgcgtgtgtgaatgaactggatcgttatcatctggcaaaagatgcagccctgaagattaaggtgag
ccaggccgaagattttgccaaaaagatggacaaaaactgcaagaacaccagaactatatccgcgaaaaatggtattgatctgccggaagt
gctggactggaaatggaagaatctggatcag (配列番号69)

リステリア・グレイ (*Listeria grayi*) D S M 2 0 6 0 1 からのホスホ
ケトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 7 0】

atgaccgattatagcagcccgaactatctggcaaaagttagatgcatgggtggcgtgcagcagattttatcagcgttggtcagctgtatctgaaa
 ggtaatccgctgctgcgtcgtccgctggaaaaagagatttaaaagttcatccgattggcattggggcaccattagcggcagaattttatct
 atgcacatctgaatcgctgatacaaaatgatctgaatatgttctacatcgaaaggtccgggtcatggtggtcaggttatggttagcaatag
 ctatctggatggtagctataccgatacctatccgaccattaccaggatgaagttggtctgacaaactgtataaacagtttagctttccgggtg
 gtattgcaagccatgcagcaccggaaacaccgggtagcctgcatgaaggtggtgaactgggttatgactgagccatgccaccggtagca
 ttctggataatccggatgttattgcagcaaccgttattggtgatggtgaagcagaaaccggccgctgagcgcaggttggtttagtaataccttt
 attaacccgggttaatgatggtgcagttctgccgattctgtacctgaatggtgcaaaaattagcaatccgacaattctgagccgcaaaaccgata
 aagaactgaccagctttttcaggggtctgggttgggatccgattttgtgaaggtgaagatcctgccaaagtgcattccgctgatggcagaaa
 aactggatcaggcaattgaaaaatcaaagccattcagaccgaagcacgtaagaagccgcagataaagcaaccatgccgacctggcct
 gttattctgttctgaccccgaaaggttggacaggtccgaaagaatggaataatgaaccgattgaaggtagctttctgacacatcaggttccg
 attccggtgatcagcatctttgatcatgttgatgccctggaattggtctgcagagctatcgtccggaagaactgtttaccgaagaaggtg
 gtctgaaagaagaatcaaagcctggcaccgaaaaatcgatggcaaccaatccgattaccaatggtggcattgatccgcagccgctgc
 gtctgccgagctggaaagattatgcagttgaaccgcaacaaagatgtgattacgcaggatatgattgagctgggtggtttgttcgtgat
 cgtaagaagaaccggataactttcgcattttgtccggatgaaacaaaaagcaatcgctgaataaagtgtttgaagtgaacatcgta
 gtggatgagcaaaagcagaatttccgctgatgaatggctggctccggcaggtcgtattattgatggccagctgagcgaacatcaggcaga
 aggtttctggaaggttatgttctgaccggtcgtcatggtttttgcaagctatgaaagctttctgctgttggtagatgctgaccagcac
 tttaaatggctgcgtaaagcaaaagaacagacctggcgtaatagttatccgagcctgaatgtgattgcaaccagcaccgttttcagcaggat
 cataatggttataccatcaggatccgggtgtgctgacacatctggccgaaaaaaaccggaatttatccgtgaatatctgcctgcagatacc
 aatagcctgctggcagttatgaatgaagcatttcgtagcaggaactgattaatctgattgtgagcagcaaacatccgcgtccgagttttata
 ggcgagaagaagctgaaattctggttaagatggcctgaaatcattgattgggcaagcaccgtgagcgaagccgaagaaccggatgtg
 gttattgccagtgacggtacagaaccgaatctggaagcactggcagcagttaccctgctgaacgaagcctttccgctgctgaaaatcgttt
 atcaacattgtggacattctgaaactgcgccatccggatcgcacccgctggcctgaccgatgaagaatttgatcgttatttcaccacggac
 aaaccgatcattttgcctttcattcatatgaaggtatggtgcgcgatatcttttaaccgccataatcacaacctgttcacatggttatcgcga
 aaatggtgatattaccacccggttgatagcgtgttctgagtgaaatggatcgttttcacctggccaaagatgcagccgaagcagtttatggt
 gaaattgcgaccagttttgccgcagaaatggacgccgttctgtcaaaacatcatcattttattcgtgaaaacggcgaagatctgccggaagtt
 gagaattggaaatggcaggcactgaaaactgacctgctggaagtg (配列番号70)

10

20

エンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus) EC 30 からのホスホケトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 7 1】

atgaaaaccacctacgataccccctgagatfaccagaaaatgaatgcatggtggcgtgcagcaaattatctgagcgttggtcagatttatctg
aaagataatccgctgctgcgtcgtccgattgaagaaaaagacctgaaagtgaatccgattggcattggggcaccattgcaggtcagaatttt
atctataccatctgaatcgcgtgatcaacaatatgatctgaatatgttctacatcgaaggtccgggtcatggtggcaggttatggtgcaaa
tgcatatctggatggtagctatagcgaaatctatccgaaagcaaccaggatgaagcaggtatgaaacacctgtttaaaacctttagctttccg
ggtggtattgcaagccatgcagcaccggaaacaccgggtgacattcatgaaggtggtgaactgggttatagcattgcacatgcaaccgggtg
caattctggataaaccggatgttattgcagcagttgttgggtgatggtgaagcagaaaccgggtccgctggcaggtagctggttttagcaata
cctttattaaccgggttaacgatggtgccattctgccgattctgcatctgaacgggtgcaaaaattgcaaatccgaccattctggcacgtaaaag
cgatcaggatctgaccaaataatcgaaggtatgggtggaccccgattttgttgaaggtgatgatccggaagcagttcatccgcagctggc
acaaaaatggatcaggcaattgagcagattcatgcaattcaggcagaagcccgtaaagggttcagccgaagaggcagcaatgccgattg
gcctgttctgattgttcgtaccccgaaagggttgacaggtccgaaaggttgggatggcgaaccgatcgaaggcggttttcgtgcacatcagg
ttccgattccgggttaatgcaaaacatatggaacatgttgatgactgaccgattggctgcagagctatcgtccggaagaactgtttgatgaaa
tggtcgtatgaaggccgaaatccaagaactggcaccgaaaggcgaacagcgtatggcagtttaaccggattaccaatggcggtattgatcct
cagccgctgcgtctgccggattggcaggcacatgccattgcaattgaaactccgggtgaaaccaccgcacaggatgatggttttggtaa
atttccccgtgatattatcaagagaaccgggacaattttgcatttttggctctgatgaagccaaaagcaatcgtctgaatcatgtgttgaaagt
taccgatcgtcagtggtggaaccgaaacatccggattatgatgaatggctgagcagcgtgggtcgtgttattgatagccagctgagcgaa
catcaggccgaagggtttctggaagggttatgttctgaccggtcgccatggctttttgcaagctatgaaagctttctgcgtgttggtgatagcatg
attaccagcacctttaaatggctgcgtaaaacacatgatctggattggcgtaatccgtatccgagcctgaatctgattgcaagtagcaccgttt
tcagcaggatcataatggttataccaccaggatccgggtattatgaccataattgcagaaaaaaagccgattttgtgcgtgtttatctgcctg
cagatgcaaatagcctgatggcgttatggcgaaccctggcaagcgaagaaaaagattaatctggttggttagcagcaaacatcctcgtcc
gcagttttatagcgcatgaagcgaaagttctggtgaaagatggtctgaaagttatcattgggcaagcaccgatgaaggtaagaaccg
gatattgtgattgcagccgcaggtacagaaccgaatctggaagcactggcagccgttagcctgctgattgaagcatttccggaactgaaagt
ccgttttatcaatgttgtgacctgctgaaactgcgtcgcctgaagttgatccgcgtggtctgagcgacgaagcctttgaagcctattttacca
aagataagccgatcgtgtttgcccttcatggttatgaaggcctgattcgcgatactttttggcgtcgtaatcagcagctgcatattcatggcta
tcgcgaaaaacggcgatattaccacccggttgatattgctgattctgtcagaactggatcgttttcatctggcaaaagatgcagcagaatgggtt
tatggtgaaaaagccacagattttgcacagaagatggcagataccgttgcatatcatcatgattttatccgcgagaacgggttatgatattgccg
aagttgaagaatgggaatggaaaccgctgcgc (配列番号71)

10

20

マイコプラズマ・アリガトリス (*Mycoplasma alligatoris*) A2
1JP2からのホスホケトラゼ酵素をコードする核酸配列

【化 7 2】

atgaaaaagaataaccttcgataccaggactatctggataaagttgatgcatggttctgagcagcaaatatctgagcgttggtcagatgtatct
gcgtaataatccgctgctgctgtagcaaaattaccagtgatgatgttaaagtgatccgattggtcattggggcaccattccgggtcagaatttt
gcatatgcacatctgaatcgctgtagcaacaatacaatctgaatatgttctacatcgaaaggtcctgggtcatggtggtcaggttatgaccagca
atagctacctggatggttagctataccgaactgttccgcatgtgaccaggatgttgaggtatgaaacacctgttaagtattttagctttccg
ggtggcaccgcaagccatgcagcaccggaaacaccgggtagcattcatgaaggtggtgaactgggttatagcctgagccatgccaccgg
tgcaatcctggataatccgaatgttatgtagcaaacattgttgggtgatggtgaagcagaaaccgggtccgctggcagcaagctggtttagca
atagttttatcaatccggttaatgatggtgccgttctgccgattctgcatctgaacgggtgtaaaattagcaatccgaccattctgtgtcgcaaaa
gcaataaagaactgaccgattattttgccgggtatgggttgggaagcagttttgttgaaggtagtgtgagaagaatgcacaaagtatgg
cccagaaactggattatgtgatcgaaaaattcagagcattcagaacgaggcacgtaaaaaaccggcaaatcaggcaaccggtccgatttg
gccgatgatggttctgcgtaccccgaaagggttgacaggtccggatagctggaataaagataaaattgtgggtagctttctgtcccatcagg
ttccgattccgggtgaatagcgcaaatatggacatattgatgactgctggattggctgaaatcctataaagtggataacctgttcgacaaaaa
tgcaaaactggttgatgaaattgcacagattgcaccgaaaggcgatcagcgatgggtatgaatccgattaccaatggtggcctgaacccg
aaaaaactggtaatgcctcgttggcaggatgttgcactgaaattttcaaaaccgggtgagctggttaatcaggatatggttgagctgggcacct
attttgcaaaaatgatggaactgaacaaggacaactttctgtctgttgggtcctgatgaacccaaaagtaatcgctgtataactgttcaaatg
accaaacgtcagtggttggaaccgattagccctattctggatgaagcactgagtcgggaaggtcgtgttattgatagccagctgagcgaac
atcaggcagaaggtttctggaaggttatgttctgaccggtcgccatggtgttttgcaagctatgaaagctttctgctgttggatagtatgc
tgaccagcacctgaaatggctgaagaaagcaaaagatgttcattggcgtaatgattatccgagcctgaatgtgattgcgaccagcaccgc
atttcagcaggatcataatggttatcacatcaggatccgggtctgattggccatctggcagataaaactccggaaattattcgtcagtatctgc
ctgcagataccaataacctgctggcagttatggataaaagcctgaaagaacgcaacgtgattaacctatcattgcaagcaaacagcctcgc
gaacagttttatagcgaacaagaagcagcagaactggtagaaaaaggctgaaagtaattgattgggcaagcaccacaaaggtaatgaa
gaaccggaactggtggttggtagcagcagcaccgaaccgaatctggaagccctggcagccgtgacgattctgaacaaagagtatccgtca
ctgaaaatccgtttgtgaatgtggtgatctgatgaagctgcgtatccgagctctggtctgagcgataaagaatttgatgcaat
ttcaccagcaacaagccgattgtgttgcctttcatggttatgaaggtattctgcgcgacatgttttcaaacgcaataaccataatctgacacc
catggctatcgcaaaaatggtgatcacacaccagctttgatattgccagctgtcacatatggatcgctttcatattagcgcaagcgagcaa
aagcgggtgatggttaataaagcacaagagttcgaggacaaaatgatccagaccattgattccacaccaaataatccgtgaatatggcacc
gatattcccgaaagttaaagaatggaaatgggcagatctgaccgtaaa (配列番号72)

カルノバクテリウム属 (Carnobacterium) 17-4 種からのホスホケトラ
ーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 7 3】

atgaaaaactatgatagcaaagattatctgaaaaagtggacgcattttggcgtgcagcaaattatctgtcagttggcagctgtatctgcgtg
 ataatccgctgctgcagcgtccgctgaaaagcaccgatgttaagcacatccgattggtcattggggcaccattagcggtcagaattttatct
 atgcacatctgaatcgcgtgatcaacaatatgatctgaatatgttctacatcgaaggtccgggtcatggtggtcaggttatgattagcaatgc
 atatctggatggttagctataccgaaatctatccggatcacccgaaaacaagaaggcatgaagaaactgttcaagcagtttagcagtcggg
 gtggtgttgcaagccatgcagcaccggaaacaccgggtagcattcatgaaggtggtgaactgggttatagcctgagccatgccaccgggtg
 caattctggataaccgggatgttattgcagcaaccgttattggtgatggtgaagcagaaccgggtccgctggcagcaggttggttagcaata
 atttcattaatccgggtgaatgatggtgccgttctgccgattctgtacctgaatggtggtgaaaattagtaaccggaccattctggcacgtaaaagc
 aatgaagatctgaagaaatatttcgaggggtatgggttggaaccgtattttgttgaaggcaccgatccggaaaaagttcatccgggttatggca
 aataccctggatgttggtatcgaagaaattcgagcattcagaatgaagcccgtaaaggtaaagccgaagatgttgaaatccgcattggcc
 tgtgatgattattctgacccgaaagggttgacaggtccgaaagaatgggataacaaaaaatcgaaggcacgtttctgtcacatcaggttc
 cgattccgggtgatgcagaacatatggaatatgtgaataaactggtggactggctgaaatcatatcgtccggaagaactgtttaccgaaaatg
 gcaactgatcgaatgacctgaagaactgacaccgaaaggcaataaacgtatggcaaccaatccgattaccaatggtggcattaatgcaaa
 agcactgattatcccgaattggaacagcatgcaattgataccaccattccgggtgcagttattgccagggatatggtgtttttggtgaacag
 gcacgtgatctgattgttaaaatccgaacaacttctgcattctcgggtccgatgaaacaaaagtaatcgctggataaaatctttgaagtga
 ccaatcgtcagtggtggaagcaagaattaaccgatgaatggcagagcagcgcaggtcgtgttattgatggccagctgagcgaacatc
 aggcagaagggtttctggaagggtatgttctgaccggctcgtcatggttttttgcagctatgaaagctttctgctgtgttgatagcatgctgac
 ccagcactttaaatggctgcgttaaagcaaccgatcagaatggcgttaataactatccgagcctgaatgtgattgcaaccagcaccgtttttca
 gcaggatcataatggttataccatcaggatccgggtattctgacccatctggcagaaaaaaaaccgggaatttatccgtgaatatctgcctgc
 agatgcaaatagtctgatggcagttatggacaaaacactgcaagaagaacagctgattaacctgatcattagcagcaaacatccgcgtccg
 cagttttatagcgttgagaagccgaaattctggttaagatggcctgaaaattatcgattgggccagtaccgataatgatagcgaaccggat
 ctggttatcgcagcagccggtacagaaccgaacctggaagcactggcagccatgagcattctgcacaaagcatttccggaactgaaaatc
 cgctttatcaacattgtggacattctgaaactgcgtcaccgggatattgatagccgtggtctgacagatgaaaaattcgatagctatttcaccaa
 agagcagccgattatctttgcctttcatggctttgaaggctctgattcgcgataatcttttaaccgccataaccataatctgcgcattcacggttatc
 gtgaaaatggtgatattaccaccccggttgatatgcgtgttctgaatgaaatggatcgttttcatctggccaaagatgccgaaaagccggttat
 ggtctgaaagccaacaaatcatgcaagagatggaaaacaccgtgaactttcatcatcagtatattcgcgaaaacggcattgatattccggaa
 gtgattaactggaaatgggaaaaaatc (配列番号73)

10

20

メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)
 ATCC 35311 からのホスホケトラゼ酵素をコードする核酸配列

【化 7 4】

atggaaaaagataatacagcagcaccgagtagctggacaaaattgataaatggtggcgtgcagcaaaactatctgagcattggcagctgt
 atctgaaagataatccgctgctgaaacgtaaaattcgtagcaggatgttaaatacatccgattggcattggggcaccattgcaggcaga
 attttatctatgcacatctgaaccgattatcaacaaatagatctgaatatgtttatctgagggtccgggtcatggtggcaggttatggttag
 caatagctatctggatggtagctataccgaaattatccggcagttaccgaagatgaagcagggtatgcagaaactgtttaaacttttagctttc
 cgggtggtgtagcagccatgccgcaccggaacaccgggtagcattcatgaaggtggtgaactgggttatagcctgagccatggtgttg
 gtgcaattctggataaccgggaagttattagcgcagttgttattggtgatggtgaaagcgaaccgggtccgctggcgaccagctggttagta
 atacctttattaaccgggttaccgatggtgccgttctgccgattctgcatctgaatggtgcaaaaattgcaaatccgaccattctgggtcgtaaa
 agcgataaagaactggaacagtattttcgtggtatgggttgattccgtattttgtggaaggtaatgatccgaatcagatgcattccgctgatgg
 caaaaaccctggatcaggtgattgaaaaatccacagcattcaagaaccgcacgtaaacagaccgcagaacagcaagtattcagaat
 ggctctctgattgttctgcgtacccgaaagggttgacagggtccgaaagaatgggtggttaaaccgattgaagttaccttctgacatcag
 gttccgattccgattgatcaggatcatatggaacatgttgatcagctggtgaattggctgaaaagctataaaccgggaagaactgtttgatgaa
 caggtcgtctgaatagcgaattcgtgccattgcaccgatgaatgataaacgtatggcaatgaatccgattaccaatggtggttataatccga
 aaccgctgcagatccgggattggcgtgaatttgatctgcatattagcaaacggggtgagctggttcacaggatattgctggaatttgtaaaa
 tgggtgcagccatcatcaaaaaaacccgcagaactttctgatctttgggtccggatgaaaccaaaagcaatctgctgaatgatcatttagcgt
 taccagccgtcagtggtggaaccgatttatgaacctcaggatgaatggctggcaccgtcaggtcgtattattgatagccagctgagcgaac
 atcaggacgaaggatttctggaaggttatgttctgaccggctcgtcatggttttttgaagctatgaagcctttatcgcacgtggtatagcatga
 ttgccagcatatcaaatggatgctgaagcaatggatctccgtggcgtaatggttatagtagcctgaatctgattgcaagcagtagccgat
 ttcagcaggatcacaatggctataccaccaggatccgggtatcctgagtcattctggcagaaaaagaagcagattttatccacgaatatgtg
 cctgcagataccaatagcctgctggcagttatggataaagtctgaaaagtcaggggcaagtgaatctggtgattagctcaaacatccgcg
 tccgcagttttatagccctgaagaagcacaagaattagttaatcgtggcctgatggaaattgattgggcaagcaccgttcagaaaaatggca
 ctccggaaattgtgattgtgccgcaggcaccgaaccgaatatggaagcactggcagcaattaatctgatcaatcagagtttccgaaactgc
 agttccgctttatcaatgttggtgatttactgaaactgcgtcactcctgcagttgattcaagaggatttagcgaaagggaatataaccacctgttta
 ccgttgattccccgattatctttgttgcagggttattcaagcctgattcgcagcctgttctatgatcgtaaaaatcgccgggttagcatccatag
 ctaccaagaaaacgggtgccattaccacccgtttgatatcggtgttctgaataaaatcgatcgttatcacctggccaaagatattgcactgacc
 gcatatggtagccgtggtgaagattttgcacgtgccatggataccatcctggaaaaacacaatcagtatatccggaacgggtaaatgatct
 gcctgaagtgtgaattggaatggggtccgctgcatactataacgaaaacattgaacaggat (配列番号74)

10

20

テトラジェノコッカス・ハロフィルス (Tetragenococcus halophilus) NBRC 12172 からのホスホケトララーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 7 5】

atgagcgtgaacatcgacagcaaagaatatctggaacgtatgaatgcatggtggcgtgcagcaaaactatattagcgttgacagattttctg
 cgtgataatccgctgctgcgtccgctggaagaaagagatacaaaattaacccgattggtcattggggcaccattagcggcagaatttt
 atctatgttcatctgaaccgctgatcaacaaatattggtctgaacatgttttatatcgaagggtccgggtcatggtggcaggttatggttagcaat
 agctatattgatggcagctatagcgaatctatccggtattaccaggtgaagcaggtctgaaaaactgttcaaacagtttagctttccgg
 gtggtatgggtagccatgcagcaccggaaacaccgggtagcattcatgaagggtggaactgggttatagcatgagccatgccgttggtgc
 agttctggataatcctgatgttattgcagcaaccgttattggtgatggtgaagcagaaaccggctctctggcagcaagctggatgagcaataa
 ttccattaatccgggtgaatgatggcgagctgctgccgattctgaatctgaatggtgcaaaaattgcaaatccgaccgttctggcacgtaaaagc
 gataaagatctgcagaaatactttgaaggctggttggaaaccgtatfttgggaagggtgataaccggaaaaaatgcaccgctgatggc
 cgaaaccctggatgcagttattaacgaaatcagagcattcagaaagaagcccgtaaagggttcagccgaagatgtgaccatgccgcatgg
 cctgttattgttttctaccccgaaagggttgggaagggtccagaaaaatgggataatgagcagattgcaggcacctttctgacacatcaggttc
 cgattccgattgatgcaagccatattggaatatgcaaatgatctggcaaaatggctgaaaagctatcgtccggaagaactgtttgatgaaatg
 gcacaattattgatgcgattaaagaactgagtcgaaaggcgataatgcgatgagtgtaaatccgattaccaatggtggcctggatccgaaa
 gcactgaatatccctgattggcatacccatgcagttgataccagcaaacgtggcaccgataaagcacaggatatgagcgttctgggtggtttt
 attgccgatattatgaaaaacaaccggaagaactttcgatttttgggtccggatgaaaccaaaagcaatcgctgaataaagtgtttgatgtga
 caaatcgtcagtggttgaacctcgtgaactgtcagatgaatggcagagcgcagttggtcgtgtgatcgatggcagctgagcgaaacatca
 ggacagaagggttttctggaaggctataccctgaccggctgcatggttttttgaagctatgaagcatttctgcgcattgttgatagcatgctga
 cccagcactttaaatggattcgtaagccaatgaaaaagctggcgcaaaaaatacccgagcctgaatgtgattagcagcagtagccgattt
 cagcaggatcataatggttataccatcaggatccgggtgtgattaccatctggcagaaaaaaaaccggaaatatatccggaatattttccg
 gcagatgcaaatagcctgatggcggttatggataaagccctgaaagatgaaaacgtcattaacctgattacctcgagcaaacatccgcgtcc
 gcagttttatagcgttgaagaagcacagaactggctgattatggcgtgaaaaaaatcgattgggcaagcaatgatcaggatagcgaaaccg
 gatattgtgttgagcagcaggtagtgaaccgaatctggaagcactggcagcgattagcatttctcatgaacagttccggaaatgaaaatc
 cgctttatcaatgttggacctgctgaaactgcgtcatccagatgttgatccgcgtggtctgagtgatgaagcctttagagctgtttaccac
 agataaaccgggtgatctttaactttcatggttatgaaggcctgattcgcgatactttttaccggtcataatcgtaacttgagcatccatggctatc
 gtgaagatggtgatattaccacccgtttgatatgcgtgttaaaaaatgaactggatcgctttcatctggccaaagatgcagccaataaccattat
 gccgaaaaagcagccgatttcatccaagaatggacaaaaccctgcagtatccatgattatattcgcgaaaaacgggtgatgatcagcg
 aagttcagaattgggaatggaaagacctgaaa (配列番号75)

10

20

メリッソコッカス・プルトニウス (*Melissococcus plutonius*)
 DAT561からのホスホケトラゼ酵素をコードする核酸配列

【化 7 6】

atgaccaaataatgatagcaaagaatatctggccaaagtggatgcattttggcgtgcagcaaactatattagcgttggtcagctgtatctgaaag
 ataatccgctgctggatcgtccgattgaaaccaccgatgttaaagttcatccgattgggtcattggggcaccattagcgggtcagaattttatctat
 gcacatctgaatcgcgtgatcaacaaatcacgatctgaacatgtttatgtggaagggtccgggtcatgggtggtcaggttatggttagcaatagct
 atctggatggtagctataccgaaatctatccggaaatcaccgaagataaaggagggtctgaaaaaactgttcaaacagtttagctttccgggtg
 gtattgcaagccatgcagcaccggaaactccgggtagcattcatgaaggtggtgaactgggttatagcattagccatgccaccggtgcaatt
 ctggataaaccggatgttattgcagcaaccgtgttggtgatggtgaagcagaaccgggtccgctgagcgcaggttggttgcaaatacctt
 attaacccgggttaacgatggtgccattctgccgattctgtacctgaatggtggtgtaaattagcaatccgaccattctggaacgcaaaagtgatg
 aagaactgaccaagtattttgaaggtatgggttggaaccgtattttgtgaaggcaccgtccggataaagtgcacccctctgatggcaaaaat
 cctggatcataatcgcgaagaatcaagatattcagaagaagcccgtaaagacaaagccgaaaatgcaaaaatgccgattggcctgtt
 ctgattatgcgtaccccgaaagggttgacagggtccgaaaatttggtgatgaaaaaattgagggcacctttctgcacatcaggttccgatt
 ccggttgatgcagaacatattggaacatattgatgcactggttgattggctgaaaagctatcatccggaaagaacttttgataaaaacggcacc
 ctgaaaccggaaactgaaagaactggttccgaaaggcgtatcgtgatggccaaaaacccgattaccaatggtggcctggatccgaaaccg
 ctgaaaaatgaatggttggaacagcatgcaattgataccagcacaccgggtatggttaccgcacaggatattgattgttttgcaattatgtcg
 aagatctgatcaagcaaacccgaccaattttctgatttttggtccggatgaaacaaaagcaatgcctgaataaagtgtttgatagcaccg
 atcgtcagtggtatggaaccgattagtaatgcagatgaatggcagagcagcgtgggtcgtgttattgatggccagctgagcgaacatcaggc
 agaagggtttctggaagggttatattctgaccggtcgtcatggttttttgcaagctatgaaagctttctgcgtgttggtgatagcatgctgacca
 gcactttaaatggctgcgtaaagcaaaagaacagagctggcgtaaagagtatccggcactgaacattattgcaaccagcaccgttttccagc
 aggatcataatggttataccatcaggatccgggtatcctgaccatctggcagaaaaaaaagcagaatatatccgtgaataacctgctgca
 gatgcaaatgctgatggcgttatggataaagcctttcaagaaaacgaagtattaacctgattgtgagcagtaaacatccgcgtccgca
 gttttatagcgttaccgaagccaaagaattggttgataaaggcgtgaaagtattgattgggcaagcaatgatgaaggtcagacaccggata
 ttgtgattgcagcgagcggcaccgaaccgaatctggaagcactggcagcaattaccctgctgaacaaagagtttattgatctgaaaaatccgc
 ttcgtgaacgtggtggataatcctgaaactgcgtcatccgagcattgatccgcgtggtctgaccgatgaagagtttgatgcaattttaccaagg
 acaaaccgattgtgttgcctttcatggcttgaaaggcctgattcgcgatatcttttttagccgtagcaatcatcagctgtttgtcatggttatcgt
 gaaaaaggatgattaccacccggttgatagcgtgttctgagtgaatggatcgttttcacctggcaaaaagatgttgcgacaaagtgtata
 atgaacaggcagccgattttatgaatcgcattggtgaaattctggcctttcaccatcagtatatattcgcaaaaacggatcgatatccggaagt
 ggttaactggaaatgggaggatctgcgcaaaaaaacgatttgctttaat (配列番号76)

10

20

マイコプラズマ・アルスリチデイス (*Mycoplasma arthritidis*)
 158L3-1からのホスホクトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 77】

atgaaaaaaaccaattatgatagcaatgaatatttcaatctgattgataaatggttcgcgcagccaattatctgagcgttggtcagatttatctg
 cgtataaatccgctgctgaaaacaaaactggttcagatgatgttaaaatctatccgattggtcattggggcaccattccgggtcagaattttat
 ctatgcacatctgaatcgctggtgattaacaaatcagatctggaatgttctatctgaaggtcctggtcatggtggtcaggtgatgattagcaata
 gctatctggatggtagctataccgaaattatccggaaatcaccgaagatgaagcaggtctgaaaacgatgtttaaacgttttagctttccggg
 tggcaccgcaagccatgcagcaccggaactccgggtagcattcatgaaggtggtgaactgggttatgcactgagccatgccaccggtgc
 aattctggataatccgaatgttattgcagcaaccgttattggtgatggtgaagcagaaccgggtccgctggcagcaggttggttagcaattct
 ttatcaatccgggttaatgatggtgcccgttctccgattattcatctgaacggtgcaaaaatttcaaccggaccattctgagccgtaaaagcaa
 tcaagaactggaactattttagcgtctgggttgggaaccgctgtttgtgaaggtgacgatccgaaactgatgcacccgctgatggcaaa
 aaaaactggatgaagccattgagaagattcagatgattcaggcaagcgcacgtaaacataaagcaagcgaagcaaccggctccggtttggcc
 gatgctgattgttcgtaccccgaaggttgacaggtcctaaagattggaatggcgaagttgtggaaggtagctttcgtgcacatcaggttcc
 gattccggtgaatgccctgaatatgacctatctgataaactggaagcatggctgaccagctatcatccggaagaactgtttgataaaaacg
 gcaaaatcctggaagaaattcgtgccctggcaccgaaaggcctgaaacgtatggcagttcatccgattaccaatgggtggtattaatccgct
 accctgaaactgagcagctgggaaaaatttgcaccaaatttgaaccctggccagattaaaggtcaggatgatgcgaactgggcaaat
 atttgcagaaattatcacctgaacaaggataactttgcatttttggccggatgaaccaaataatcgtatgaatgccgtgtttaatgtga
 caaacgtcagtggtggaaaaaatgcaccgacctatgatgaatggatgagtcgggaaggtcgtgttattgatagccagctgagcgaaca
 tcaggcagaaggttttctggaagggttatgttattaccgggtcgcctatggtgttttgaagctatgaagcatttctgcgtgttggatagtatgct
 gaccagcatatgaaatggatgaagaaaagcctggaactgccgtggcgtaaagattttccgagcctgaatgtgattgcgaccagcaccgc
 attcagcaggatcataatggttatacccatcaggatccgggtctgctgggtcatctggcagataaacgtccggaactgattcgtgaatatctg
 cctgcagataccaattgctgctggcaaccatgaaaaagcactgaaagatcgtaatgtgatcaacctgattgtggcaagcaaacagcctc
 gtgaacagttttatagcgttgaagaagccagcgaactggtacagaaaaggctataaaatcattaattgggccagcaacgtgagcaaaaatga
 agaaccggatgttgtttgcagcagccggtgttgaaccgaatctggaagctctggcagccattagttattctgaacaaagaattcccgaacct
 gaaaatccgtttgtgaatgttctggatctgctgaagctgaaaagcccgaacatgatccgcgtggcattagcgaagaatttgatcagat
 cttcacaaaaaacaaccgatcatctttgcccttcatgttatgaaggcctgctgcgtgatatctttttgatcgcataaccataacctgatcacc
 catggctatcgtgaaaatggcgatatcaccaccagttttgatattcgtcagctgagtcatatggatcgtttcatattgcaaaagatgcagcaat
 tgcagccctgggtaagatggcgaatgtttgcgaaaaaatggacagcaactgcaagaacataaccagttatgttcgcgagtatggctat
 gatctgccggaagttgttaattggaatggaccaatctgaaacggattaaa (配列番号77)

10

20

ストレプトコッカス・アガラクチアエ (Streptococcus agalactiae) NEM316からのホスホクトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 7 8】

atgagcgagttcgacacaaaaagctatctggaaaaactggatgcatgggtggcgtgcagcaaaactatattagcgcagcacagatgtatctga
aagataatccgctgctgcgtcgtgaactgggtgaaaaatgacctgaaagttcatccgattgggtcattggggcaccgtccgggtcagaattttat
ctatgcacatctgaatcgtgccatcaacaaatgatctggacatgttttatatcgaaaggtcctgggtcatgggtggtcaggttatggttagcaata
gttatctggatggtagctataccgaactgaatccgaatattgaacagaccgaagatgggttttaaacagctgtgcaaaatcttttagctttccgggt
ggfattgcaagccatgcagcaccgggaaacaccgggtagcattcatgaaggtggcgaactgggttatgactgagccatgccaccgggtgca
attctggataaaccggatgttattgcagcaaccgttattgggtgatgggtgaaggcgaaaccgggtccgctgatggcaggttggctgagcaatac
ctttattaacccgggttaatgatgggtgcagttctgccgatcttttatctgaatggcggtaaaattcataatccgaccttttgaaacgcaaaaccga
tgaagaactgtcccagtttttgaaggctgggttgaaaccgatttttgagatgttggtaactgagtgaagatcatgcagccgcacatgca
ctgtttgcagaaaaattagatcagccatccaagagattaaaaccattcagagcgagacgctcagaaaccggcagaagaagcaattcag
gcaaaatttccggttctggttgacgtattccgaaagggttgacaggtccgaaagcatgggaaggcaccgggttgaaggcgggttttcgtgc
acatcaggttccgattccggttgatgccatcatatggaacatgttgatagcctgctgagctggctgcagagctatcgtccgggaagaattattt
gatgaaagcggcaaaatcgtggatgaaattgcagccattagcccgaaggcgatcgctgatgagcatgaaccgattaccaatgcaggt
attgttaaagcaatggataccgcagattgaaaaaattcgccctggatattaatgtgccaggccagattatggcacaggatattgattgaattg
gcaaatatgcagcggatctggtggatgcaaatccggataatttctgatttttgggtccggatgaacgaaaagcaatcgtctgcaagaagtttt
accggtaccagccgtcagtggtgggtcgtcgtgtaaacggattatgatgaagcactgagtcgggcaggtcgtgttattgattcacagctgag
cgaacatcaggcagaagggttttctggaagggttatgttctgaccgggtcgtcatggttttttgaagctatgaaagcttttgcgtgttgtgtag
tatggttaccagcacitaaatgggtcgtgtaaaagcaaaaccataaccctggcgtaaaaactatccggcactgaatctgattgccgcaa
gcaccgttttgcagcaggatcataatggttataccatcaggatccgggtattctgacctatcggcgaaaaaactccgggaatatattcgtga
atatctgcctgcagataccaatagtctgctggcagttatggataaagcatttaaagccgaggacaagattaacctgattgtgaccagcaaca
tccgctccgcagttttatgacattgcagaagccgaagaactgttgcgaaggctataaagtattgattgggcaagcaatgttagcctgaa
tcaagaaccggatgtggttttgcgcagcagggcacagaaccgaatctggaagccctggcagcaattgacattctgcacaaagcctttccg
gaactgaaaattcgttttgaatgtgctggacattctgaaactcgctcatccgagccaggatgcacgtggtctgagcgacgaagaatttgat
aaagtgttaccaccgataagccggtgatctttgcatttcattcctacgaagatatgatccgcgatatcttttttagccgtcataatcacaatctgc
ataccatggttatcgcgaaaaatgggtatattaccaccgggttgatgcgtgttatgtcagaactggatcgttttcattctggcgaggtatgcc
gcactggcaagcctgggtaatgaagcccaggcatttagtgatgaaatgaatcagatgggtggcctatcacaagattatatccgtgaacatgg
tgatgatattccggaagttcagaattggaatgggaaaacattaaa (配列番号78)

10

20

マイコプラズマ・アガラクチアエ (Mycoplasma agalactiae) PG
2 からのホスホクトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 7 9】

atgaaaaaaagccatgattttgatagcaaagaatatctgaatctgggtgatgcatgggtggcgtgcagcaaattatctgagcgttggtcagatgt
atctgcgtaataatccgctgctgaaaattccgctgaccagcaatgatgttaaatctatccgattgggtcattggggcaccgttccgggtcagaa
ttttatctatgcacatctgaaccgcattatcaacaaatacgatctgaatatgtttttatcagcggctcctggtcaggtggtcaggttattgcaagc
aatacctatctggatggtagctataccgaactgtttccgcatgttaccaaagatattaaagggtatgaccacctgttcaaatacttttagctttccg
ggtggcaccgcaagccatgcagcaccgggaatgtccgggtagcattcatgaaggtgggtgaactgggttatagcctgagtcagtcagccgggt
gcagttctggataatccggtgattattgccgcaaccgttattgggtgatgggtgaaagcgaaaccggctccgctgagcgcaggttggtttattaac
agctttatcaatccggcaaatgatgggtgccgttctgccgattctgcagttaatgggtgtaaaattagcaaccgaccatttgagccgtcgtgta
gcaatgaagaactggtagctattttaccgggtgccggttggaaccgtttattgttgaaagtaatgagccggaatatatgcacatgaatggc
aaaagcactggatgcaagcgttgaactgattaaacagtatcagccgaagcacgtaaaaatgggtgcaataaagcaaaacgtccgcagt
gccgatgattgttctgaaaagcccgaaggttgacaggtccgaaaagaatggaatcatgaagcaattgaaggttcttctgacacatcagg
ttccggttccagttagcgcagaaaaatgcagcatattgatgcactggaaaattggctgcgtagctatcgtccggaagaactttttgatgaaaa
tgcccagctgaaaccggaaattgcagcaattgcaccgaaagggcgtatcgtatgggtaaaaaccgattgcaaatgggtgcatatccg
cgtgcaattaatgttggtgattggaccaaaattgccctggatatcaaacagcctggcaagttattaatcaggatatggttaccctgggcagct
atctgggcgaactgagcctgctgaataaagataatttcgtgtttgggggtccggatgaacataaaagcaatcgtctgtatgagatgttcaaagt
taccgatcgtcagtggtcgtgatcgtatcgtatgaaaaatatgatgaatttctgagcagcgtgggtcgcattattgatagccagctgagcgaaca
tcaggcagaaggtatgctggaaggttatgttctgaccgggtcccatgggtgtttttgcaagctatgaaagctttctgctgttggtgtagcatgc
tgacceaacatatgaagtgggttaaaaaagcgtggacattccgtggcgtaatgattatccgagcctgaatgtgattgcaaccagtaatgcat
ttcagcaggtacataatggttataccatcaggatcctggtctgattggccatctggcagataaacgtccagaactgatccgtgaatatttacc
ggcagataccaataacctgctggcaaccatggccaaagccctgcaggatcgtaacgtgattaatctgattatcagcagtaaacagccacgc
catcagtttttagttattgaaagaagcaaccgagctgggtgaaaaaggcattaaaatcattgattggccagcaacattaagccgaacgaaga
accggatctgggtggttcagccagcgggtacagaaagcaccattgaaagcctggccaccattacctgctgcccattttccggaactg
aaaaatccgtttgttaatgtgctggatctgctgaagctgcgtcatccgagtattgacctcgtgggtctgagcgatagcgaaattgatagtatctc
acgaaagacaaaccgatcctgtttgcctttcatggttatgaagccattctgcgcgatatcttttctcgttcaaaccataacattatcccat
ggctatcgtgaaaatggcgatattaccaccgcaattgatattcgtctgctgagtgaatggatcgtttcatatgaccgcaaatgttgcaaaaaa
actggcaccgggttggtggcgaaagcaaatgaactggtgaaactgatggaagataaaatcaaagaacaccgtgcctatatcaaga
gtatggcaccgatctgccggaagttaaagaatgggaatggacccgtataaa (配列番号79)

10

20

ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*) シ
ャリス (*Challis*) 株CH1亜系からのホスホケトラーゼ酵素をコードする核酸配
列

【化 8 0】

atgaccaccgactataacagcaaaagcctatctggaaaaagtgtgatgcatggtggcgtgcagcaaaactatattagcgcagcacagatgtatct
gaaagataatccgctgctgaaacgtgatgttgtgcaaatgacctgaaagcacatccgatttggtcattggggcaccgttccgggtcagaattt
tatctatgcacatctgaatcgcaccatcaacaaatgatctggacatgttttatatcgaaggtcctgggtcatggtggcaggttatggttagcaa
tagttatctggatggtagctataccgaactgaatccgaatattccgcagaatgaagagggttttaaacacctgtgtaaaatctttagctttccgg
gtggtattgcaagccatgcagcaccggaaacaccgggtagcattcatgaaggtggtgaactgggttatgactgagtcagcagccgggtg
caattctggataaccggatgttattgcagcaaccgttattggtgatggtgaaggcgaaaccgggtccgctgatggcaggttggctgagcaat
acctttattaaccgggttaatgatggtgccattctgccgatctttatctgaatggcggtaaaattcataatccgacctcttgaacgcaaaacc
gatgaagaactgacctgtttttgaaggtctgggttgaaaccgattttgcagatgttaccgcaattagcgaatacatgaagcagcacatg
cactgtttgcagccaaactggatgaagcaattgaagagatcaaaaaagttcaggcgagaagcacgtaaggtagcgcagaagaagcaacc
caggcaattttccggttctggttgacgtattccgaaagggttgacagggtccgaaaagctgggaaggcacccccgattgaaggcgggttttcg
tgacatcaggttccgattccggtgatgccatcatatggaacatgttgacgcactgctgaattggctgaaaagctatcgtccggaagaactt
tttgatgaaagcggtaagttctgccggaattgccgaattggtcctaaagggtatcgtcgtatggcaatgaaccggattaccaatgccggt
gttattaacctaattgataccgcagattggaaaaaacacgcactgaatttggcactccgggtgaaattgttcacaggatgatgatcgaattc
ggtaaatatgcaaccgatctggtggtgatgcaaatccggataatttctgatttttggtccggacgaaacaaaagtaatcgtctgcaagaagttt
taccggtaccagccgtcagtggtggtcgtatgcgtcctgaatatgatgaagccctgagtcgggcaggtcgtgttattgatagccagctga
gcgaacatcaggccgaagggtatgctggaagggttatgttctgaccgggtcgtcatggttttttgaagctatgaaagctttctgcgtgttggat
agcatggttaccagcactttaaatggctgcgtaaatgtaaaaccataaccacctggcgtaaaaactatccggcactgaatctgattgcaacc
agcaccgtttttcagcaggatcataatggttataccatcaggatccgggtattctgacctatctggcagaaaaaactccggaatttatccgtg
aatatctgcctgcagataaccaatagcctgctggcagttatggataaagcatttaagccgaggataagggtgaacctgattgtgaccagtaaac
atccgcgtccgcagttttatagtccgaagaagcggagggaactggttcgtgaaggctataaagtattgattgggcaagcaccgtgagcaa
caacgaagaaccggatgtggttttgcgcagcaggcacagaaccgaatctggaagcactggcagcagttagcattctgcacaaagccttt
ccggaactgaaaattcgtttgtgaatgtggtggacattctgaaactgcgtcatccgagcgttgatgcgcgtggtctgagcgacgaagaattt
gatcaggtgttaccaccgataaaccgggttatctttgctttcatggttatgaaggcatgatccgcgatatcttttaaccgccataaccataatc
tgccggttcattggtatcgtgaaaatggtgatattaccacccggttgatgatcgtgttatgcagaactggatcgttttcatctgcccaggatg
ccgcaaatgcagccctgggtgaagatgcagcgggttttagcgcaaaaatggatgaaccgttgcatatcataacgcctatattcgcaaaat
ggggatgatattccggaagttcagaattggaatgggaaaacattaacaaa (配列番号80)

10

20

キングラ・オラリス (Kingella oralis) ATCC 51147 からのホス
ホケトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 8 1】

atgcagaacaccagtttgacacaccggaatatctggcaaaagttagcatgggtggcgtgcagcaactatattagcgcagcacagatgt
 atctgaaagataatccgctgctgaaaaaccgctgaccgcaaagtatgttaaagcacatccgaltggtcattggggcaccgttccgggtcag
 aattttatctatgcacatctgaatcgtgcatcaacaaatatgatgtggacatgttttatcgaagggtcctggcatgggtggtcaggttatggtta
 gcaatagctatctggatcatagctataccgatactatccggaaattaccaggatgaagcaggtctgaaaaagctgtgtaaaatctttagcttt
 ccgggtggtattgcaagccatgcagcaccggaacaccgggtagcattcatgaagggtggtgaactgggttatgcactgagccatgcctttg
 gtgcagttctggataaaccgaacattattgcagcagcagttattggtgatggtgaagcagaaaccgggtccgctgtgtgcaggttggttggtta
 atacctttattaacccgggttaatatggtgccgtgctgccgattctgtacctgaatggtggtaaaattcataatccgaccattctggcacgtaaa
 accgatgccgaactgaccagttatttaacggtatgggtgggaaccgattttgtgaagttagcgcagccggcacatagccatgcgattatgg
 cacagaaactggatgaggcagttgaacgtattctggccatttggcaggatgcacgtagccgtagcgccaatgatgcaacctgcctcgttg
 gcctgttctggttggcccgtattccgaaaggttgacaggtccgaaaacctggaatggcgaaccgatcgaagcgggtttctgacacatcag
 gttccgattccgaccaatagtcataatgagcaccgcagatgcactggaagcatggctgcgtagctatcgtccggaagaactgtttgatgat
 aatggtcgtttctggataaatggcgtgaaattagcccgaaaggcgcgaaaacgtatgagcgttcacccgatcacaatggcgggtgttgacc
 gaaagcactggttatgccggttggaccaaacatgccctgaaaattggcaccctggttagccaggatgccaggatattgaaatgtggt
 cgtctgatggcagatgttattaccgccaatccggataacttctgtattttgtgccggatgaaacccaaagcaatcgtctgaatgaagtgttcaa
 agtgaccaatcgtcagtggtggtgttctgtgatgcagcctatgatgaatggattgcaccggttggtcgtgttattgatagccagctgagcga
 acatcaggcagaaggtttctggaaggttatgttctgaccggctgctcatgttttttgcagctatgaaagctttctgctgtgttggtatagcat
 gattacacagcacitaaagtggctgcgcaaatgcaaaacccatgcaccgtggcgtaaagattatccgagcctgaatctgattgcaaccagca
 ccgttttccagcaggatcataatggttatacccatcaggatccgggtctgtgacctatctggcagaaaaaaacctgaattgtgcgcgaat
 atttaccggcagatgccaataccctgctggcagttatgagcgaagcactgaccagccgtatcgtattaacctgattgttagcagtaaacatc
 tgcgtccgcagttttatagcgcagatgaagccaaagaactggttctgtgaaggctataaaatcattgaatgggcaagcacctgtcatgacggt
 gaaccggatgttgtgatcgcagcggcaggcaccgaaccgaatatggaagccctggcagcaattaatgttctgcacaaacattaccggaa
 atgaaaatccgctttatcaacgtggtggatattctgaaactgcgtcatccgagcattgatccgcgtggtctgagtgaagcgtttgatgcc
 tgtttaccggtgataaaccggtgttttttcttcatggtatgagaatatggtgcgcgatatcttttccgctcataatcgtaatgtgcgcaccc
 atggttatcgtgaaaatggtgatattaccacccggttgatgcgtgttctgtcagaaatggatcgttttcatgttgcaaaagatgccgcacag
 gcagtttatggtgagaaagcagcagattttgccaacaaatggacgaaaccattcagtttcacgtagctacattcgcgaacatggtaaagat
 attccggaagttgcagaatggaaatggcagccgctggccaaa (配列番号81)

10

20

マイコプラズマ・フェルメンタンス (*Mycoplasma fermentans*) M
 64 からのホスホケトラゼ酵素をコードする核酸配列

atgaacaaaaagaatttgatagcaaaagaatatctggaaaaaggttgatgcattggtggcgtgcagcaaaattatcgagcgttggtgcagattat
ctgcgtaataatccgctgctgaaacatccgctgaccagtgatgatgttaaagttatccgattggtcattggggcaccattagcgggtcagaattt
tgcataatgcacatctgaatccgctgatcaacaatatgatctgaatatgttctacatcgaaaggtccgggtcatggtgtgcaggttatgaccagc
aatagctatctggatggtagctataccgaactgtttccgcatgttaccaggatgaagcaggatgcagcacctgtttaatacttttagctttcc
gggtggcaccgcaagccatgccgcaccgggaacaccgggtgacattcatgaaggtggtgaactgggttatagcattagccatgcaaccg
gtgcaattctggataatccggatgttatgacagcaaccattgttggatggtgaagcagaaaccgggtccgctggcgaccagctggtttagca
atagttttatcaatccgggttaatgatggtgccgttctgccgattctgcacatgaacggttggtataaattagcaatccgaccattctgagccgtaaa
agcaatgaagaactgcagcagatatttctgtggtatgggttgggaaccgcattttgttgaaggtgataaacccggaagtaatgcatgaactgatg
gcaaaaaccctggatagcgtgattgaagaaatfcagagcattcagaccaaaagcccgtaaaaaacccggcagataaagcaaaacgtccgggtt
tggccgatgattgttctgcgtaccccgaaaggttggacaggctccgaaaagctggataaagaagcaattgaaggtagctttctgtgcacatca
ggttccgctgccgatcaatgcagaaaatatggaacatgcagatgccctggaaaaatggctgcgtagctatcgtccggaagaacttttgata
aaaaagggcaaaactggtgaaagagattgcagccattgcacctaaggtaaacgtctatgggtatgaatccgattaccaatggtggcattaat
ccgaaagttatgaaactgggtgattggcgtaaaattgccctgcattttgatcgtcttggtagcgtgttgacagggatatggttgagctgggca
cctattttgcagatctggttaaacgcaatccggaaaatttctgatttttggtccggacgaaacccaaaagtaatcgtctgtataacctgttcaaag
tgaccaatcgtcagtggtatggaacgcattgatagtaaaactggatgaggcactgagtcgggttggtcgtattattgatagccagctgagcgaa
catcagggcacaggggttttctggaaggttatgttctgaccggctgcacatggcattttgcaagctatgaaagctttctgcgtgttggtgatagcatg
gtgaccagcatatgaaatggttacgtaaagccaagaaatcaactggcgcaagattatccgtccctgaaattatggcaaccagcaccg
cctttcagcaggatcataatggttatcccatcaggatccgggtattatcgggtcatatggcggataaacgtccagaactgattcgtgaatacct
gcctgcagataccaataacctgctggcagttatggataaaagcctttaccgaacgaatgtgattaatctgattgtgagcagcaaacagcctcg
ccatcagttttatagcgttgaaagaagccgaaacgctggttgaaaaaggtctggatattatcgtattgggcaagtacctgtagccgtaatgaaac
tcgggatctggtgtgtgtgccagcggcaccgaaccgaatctggaagcactggccaccatttctattctgaacaagaatacccgagcatga
aaatccgttttgtaatgttgtgatctgctgaagctgcgtcatccgaaaattgatccgcgtggtctgagtgatgaagaattcgtatgaatcttta
ccaaagataagccgggtgctgtttgcccttcattggtttgaaggcaattctgcgcgataattttcttgatgccataaccataacctgattgcacatg
gttatcgcgaaaatggtgatatacaaccagctttgatattcgtcagctgtcacatatggatcgttttcacatggcaagtgtatgcagcagcagc
cgtttttggtagctcaaaagcgaaagaattcatggacaaaatggaagaaccattcagtttcacaacaagtataatcgcggaagtgggcaccg
atattccggaagtgaaaaattggaaatgggaaggcctgattaaa (配列番号82)

グラニュリカテラ・アディアセンス (*Granulicatella adiacens*) ATCC 49175 からのホスホケトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 8 3】

atgaccagtttgacacaccggaatatctggcaaaagttagatgcatggtggcgtgcagcaaacatattagcgttgacagatgtatctgaaa
 gataatccgctgctgcgtcgtccgattcagaagaagatgttaaactgcatccgattggcattggggcaccattgcaggtcagaattttatct
 atgcacatctgaatcgtgccatcaacaatatgatctggacatgtttatatcgaagggtccgggtcatggtggtcaggttatggttagcaatagc
 tatctggatggtagctataccgaactgtatccgcagattaccaggtgaagcaggttttaaacagctgtgcaaaatcttagctttccgggtg
 gtattgcaagccatgcagcaccggaaacaccgggtagcattcatgaagggtgtgaactgggttatagcctgagccatgccaccggtgcag
 ttctggataaccggaatgttattgcagcagcaggtattggtgatggtgaagcagaaccgggtccgctggcagcaggttggttagtaatacctt
 tattaaccgggttaatgatggtgcccgtctgccgattctgtacctgaatggcggtaaaatfcataatccgaccattctggcacgtcgtaccgatg
 aagaactgacacagtttttaacgggtctgggtgggtatccgattttgttgaaaggcaccgatccggaaaaagttcatccgctgatggcagcaa
 aactggatgaggcaattgaaaaatfcagccatccagaagagggcacgcgcaaaatcagccgaagaggcaaccatgccgattggcct
 gttctgggtgttcgtaccccgaaagggtggacaggtccgaaagaatggaatcatgaaccgattgaaggcgggtttctgtcacatcaggttccg
 attccggttagcgggtgaagccatggaacatgttgatccctggttgattggctgaaaagctatcgtccggaagaacttttggatgaaaatggc
 aaactggtggaagaaatfcagccattagccctaaagggtccgcgtcgtatgagtatgaatccgattaccaatgccgggtgtgttaaacctgatg
 gaaattaccgattggaccaaactgcaatcgtataccagcaaacgggtgcaattcaaaaacaggatgatcgaattcggcaaaattgcag
 ccgatctggttaagcaaatccggataatttcgattttcgggtccggatgaaacaaaagtaatcgtctgaacgaagtgtttaagccacca
 tcgtcagtggttggtcgtcgtgatgaaagctatgatgaatggattagtcgggtgggtcgtgttattgatagccagctgagcgaacatcaggc
 agaagggtttctggaagggttatgttctgaccggtcgtcatggttttttccagctatgaaagtttctgcgtgttggtgatagcatgattacacag
 cactttaaatggctgcgtaaagccaaaacccatgcaccgtggcgttaaaaactatccgagcctgaatctgattgcaaccagcaccgttttcag
 caggatcataatggtfatacccatcaggatccgggtcgtcgtgacctatcggcagaaaaaaaaccgggaatttgcgtgaatattaccggca
 gataccaatagtctgatggccgttatggcagaagcactgagcagcgaagataaaatcaacctgattgtgagcagtaaacatccgcgtccgc
 agttttatagcgttgaaagcaaaagaactggtcagcgaaggctataaagtattgattgggcaagcaccgtgaaagaagggtgaagaac
 cggacgttgatgcagcagccgttacagaaccgaatctggaagccctggcaggtattagcattctgcacaaacagttccggaactgaa
 aatccgtttatcaacgtgggtgatatctgaaactgcgttcaccgaaagtggatccgcgtggtctgagcgacgaagaatttgataaactgttta
 ccaccgataaacgggtggtgttttgtttcatggttatgaaggtatgatccgcgacctgtttttgatcgcaataaccataaacgtcatatccatg
 gctatcgcgaaaatggtgatattaccacccgtttgatatgcgtgttctgagtgaatggatcgctttcatgttgcaaaagatgcagccgttgca
 gtgtatggtgaaaaagcaagcgaatttccgctaaaaatggacgaaccgttgaaattcatcacagctatattcgtgaacatggtgaggatattc
 cggaagttgttagctggcagtgaggaaaatgtgaacaaa (配列番号83)

10

20

マイコプラズマ・ホミニス (Mycoplasma hominis) ATCC 23114
 4からのホスホクトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 8 4】

atgattagcaaaatctatgatgataaaaagtatctggaaaaaatggataaatggttcgcgcagcaaatatctgggtgttgcagatgtatctg
 cgtgataatccgctgctgaaaaaacgctgaccagcaatgatatcaaacgtatccgattgggtcattggggcaccgtccgggtcagaatttt
 atctatacccatctgaatcgcgtgatcaagaaatgatctgaatatgttctacatcgaaggctcctgggtcatggtggtcaggttatgattagtaat
 agctatctggatggcagctatagcgaaatttatccggaaattatgccaggtgaagcaggtctggccaaaatgtttaaacgttttagctttccgg
 gtggcaccgcaagccatgcagcaccggaaacaccgggtgagcattcatgaagggtggtgaactgggttatagcattagccatggcaccggt
 gcaattctggataaccggatgttattgtgcagcagttgttggtgatgggtgaagcagaaaccgggtccgctggcgaccagctggttagcaat
 gcctttattaaccgggttaatgatggtgccattctgccgattctgcatctgaacgggtggtaaaattagcaatccgacctgctgagccgtaaac
 cgaaagaagaaatcaaaaaatactttgaaggcctgggctggaatccgattttgttgatggtcagaagataagagcaacctggatagcat
 gaactgatggcaaaaagcctggataaagccattgaaagcatcaaaagaaattcaggcagaagcacgtaaaaaacctgcagaagaagcaac
 ccgtccgacctggccgatgattgttctgcgtaccccgaaagggttgacaggtccgaaacagtggataatgaagcaattgaaggtagctttc
 gtgcacatcaggttccgattccggttagcgcccttaaaatggaaaagattgccgatcttgagaatggctgaaaagctacaaaccggaagaa
 ctgtttgatgaaaatggcacgatcataaaagaaatccgtgatctggtccggaaaggctgaaacgtatggcagttaaccggattaccaatggt
 ggtattgatgcaaacctctgaaactgcaggattggaaaaagtacgcactgaaaattgattatccgggtgaaattaaagcacaggatatggc
 cgaaatggccaaatttgcagcagatcatgaagataaaccttagcagcttttcgctttttggtccggatgaaccaaagcaatcgtatgtt
 gccctgtttaatgtgaccaatcgtcagtggtggaaccgggttagtaagaaatagcatgaatggattagtcggcaggtgcattattgattcac
 agctgagcgaaacatcagtgtaagggtttctggaagggttatgttctgaccggctgcatggttttttgaagctatgaagcatttctgcgtgtgt
 ggatagcatgctgacccaacatatgaaatggatcaaaaaggcaagcgaactgagctggcgtaaaacctatccgagcctgaacattattgca
 accagtaatgcatttcagcaggatcataatggtatagcatcaggatccgggtctgctgggtcatctggcagataaacgtccagaaattatc
 cgtgaatatctgcctgcagataccaatagcctgctggcggttatgaataaagcactgaccgaacgtaatgtgattaatctgattgttgaagca
 aacagcctgcgaacagtttttaccgttgaagatgcagaggaaactgctggaagggttataaagtgttccgtgggcaagcaatattagc
 gaaaatgaagaaccggatattgtgttgcagcagcgtgttgaaccgaatatcgaaagtctggcagcaattagcctgatcaatcaagaata
 tcctcatctgaaaatccgctatgtgtatgtgctggatctgctgaagctgcgtagctgtaaaatcgatccgctgggtattagtgatgaagagttg
 ataaagtgtttacaaaaaacaaccgattatctttgcctttcatggctttgagggtgctgctgcgcatattttctttaccctgtagcaaccataacct
 gattgcacatggttatcgtgaaaacggtgatatacacaaccagctttgatattcgtcagctgagtgagatggatcggtatcatattgcaaaagatg
 ctgccgaagccgtgtatggtaaagatgcaaaagcatttatgaacaaactggatcagaactggaataaccaccgcaactatatcgtatgagtat
 ggctatgatatgccggaagttgtggaatggaaatggaagaacatcaataaagaaaat (配列番号84)

10

20

マイコプラズマ・クロコディリ (*Mycoplasma crocodyli*) MP14
 5からのホスホクトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 8 5】

atgaaaaaaaccgtgtatgataccgaactgtatattgagaaactggatgcatggtttcgtgcagcaaattatctgagcgttggtcagatgtatct
gcgtataaatccgctgctgcgtatacaaaattaccaaaagatgatgtgaaagtgtatccgattggcattggggcaccattccgggtcagaatttt
gcatatgcacatctgaatcgctgtatcaacaatatgatctgaatatgttctacatcgaaaggtcctggctatggtggcaggttatgaccagca
atagctatctggatggtagctatacagaactgtttccgcatgttaccaggtatctggacggatgaaacacctgtttaatacttttagctttccgg
gtggcaccgcaagccatgcagcaccggaacaccgggtgacattcatgaaggtggtgaaactgggttatagcctgagccatgccaccggt
gcaattctggataatccgaatgttattgcagcaaccattgttgggtgatggtgaaagcgaaaccggtccgctggcagcaggttggttagcaat
agttttatcaatccgggttaatgatggtgccgttctgccgattctgcatctgaacgggtggtgaaattagcaatccgaccattctgtgtcgcaaaag
caatgaagaactgaccaactattttctgggtatgggttgggaagccattttgttgaaggtgaagatgtgcagaaaatgcataaactgatggca
accaaactggactatgccattgaacgtattctgagcattcagaagaagcccgtaaaggtaagcagaagaggccaccgctccgctgtgg
ccgatgattgttctgcgtacccgaaagggttgacaggtccgcagaaatggaatagcgatcagattgtggtagctttcgtgccatcaggtt
ccgattccgggtgaatagtgaataatgacctatattgatccctggttgattggctgaaaagctataatgttgataacctgttcgataaaaagg
gcaactggttccggaaattgccgaaatcgaccgggtgggtgatcgtcgtatgggtatgaatccggtgaccaatggtggcctgaatccgctg
taatctggcactgccgaattggcaggattttgactgaatctgaaaaacctggtgcaaaaattgcacaggatattggttagctgggttcctat
tttgcaaaagtgtgaaatgaataagataatttgcctgttcggtccggatgaaacaaaagttaactgttcaaaagttaac
cagccgtcagtggtggaaccgattaaccgctgtttgatgaagcactgagtcggcaggtcgtgttattgatagccagctgagcgaacatc
aggcagaaggttttctggaaggttatgttctgaccggctgccatggtgttttgcagctatgaaagctttctgcgtgttggtgatagcatgctg
accagcatatgaaatggctgaagaaagcaaatgatgttagctggcgtaattattatccgagcctgaatgtgattcgaccagcaccgcatt
tcagcaggatcataatggttatacacatcaggatccgggtctgattggccatctggcagataaaaactccggaactgattcgtcagtatctgcct
gcagataccaataccctgctggcagttatggataaaagcctgaccgaacgtaacgtgattaaccaatattgcaagcaaacagccctcgcg
aacagttttatagcgcaaaagaagcagcagaactggttgaaaaaggctgaaagtgaataatgggcaagcaccgtggaaggtaatgatga
accggatctggttgttcagcagcagcaccgaaccgaacctggaagccctggcagccattacgattctgaacaaagaatttccgaaactg
aaaatcgttctgtgaatgtggtgacctgatgaaactcgctcatccgagcattgatccgcgtggtattaccgataaagaattcgacaaaatctt
tacgaaagacaagccggttctgtttgcccttcatggttatgaaggtatcctgcgcgataatcttttcaaacgcaataaccataacctgatcgac
atggctatcgtgaaaatggtgatatacaaccagctttgatattgccagctgtcacatatggatcgttttcatatggcagcaagcgcagcagt
tgcagcgtctgggcaaaaaagccaatgcatttgaacaaaaatgctgaaaccatcgattttcacaccaaatatatccgcgaatacggcacc
gatattccggaaggttaagaatggaagtgaatcctctggttcgcaa (配列番号85)

10

20

ナイセリア属 (Neisseria) 種 014 口腔分類群 F0314 株からのホスホケト
ラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 8 6】

atgagcgcacagtatgatagcgcagattatctgaataaagtgtgatgcatgggtggcgtgcagcaactatattagcgttgacagatgtacctg
aaagataatccgctgctgatgcgtccgattcaggcaagtgtgttaaagcacatccgattggtcattggggcaccattgcaggtcagaatttt
atctatgcacatctgaatcgtgccatcaacaaatgatctgaacatgttctatatcgaagggtccgggtcatggtggtcaggttatggttagcaa
tagctatctggttagctatagcgaaatctatccgaatattaccaggatgaagcaggtctgaaacagctgtgtaaatctttagctttccg
ggtggtattgcaagccatgcagcaccggaaacaccgggtgagcattcatgaagggtggtgaactgggttatgacctgagccatgccgttggtg
cagttctggataaccggatgttattgcagcaaccgttattggtgatggtgaagcagaaccgggtccgctgagcgcaggttggttagcaat
gtttttatcaatccggttaattgatggtgccgtgctgccgattctgtatctgaacgggtgtgtaaaattcataaccgaccattctggcacgtaaaagt
gatgaaagcctgcgtctgtatttgaaggctgggttggatccgattttgtgaaagccaccgattatgcaaccaccataaagttaggcaca
gaaactggatgaggccatcgaaaaaatcaaagccattcagaccaaagcacgtgcaggtgaaagccgaagagcagttatgccgaaatggc
ctgttctggttgacgtctgccgaaagggttgacaggtccgaaagtgtggaatggtgaaccgattgaaggcgggtttctgacatcaggttc
ctattccggcgaagcagccatgatattgccaccgttgatagcctggttgatggctgaaaagctatcgtccggaagaactgtttgatgcaaatg
gcacctttaagcagaactgcgtgaaattagcccgaaggcgatcgtctgtatgagcaccaatccgattaccaatggtggcattaatccgcgt
cctctgaataccgcagattggaaaaattcgcactggataatagcgtcgtggtagtattatggccaggatattgaatttggcaaatatg
cagccgaactggttaaagcgaatccggataatttctgttttccggatgaaacaaaagcaatcgtatgaacgaagtgttcaaagtga
ccaatcgtcagtggtggaaccgatcgaataagcatatgatgaatggatgagtcggcaggtcgtgttattgatagtcagctgagcgaacat
caggcagaagggttttctggaagggttatgttctgaccggctcgtcatggttttttgaagctatgaaagctttctgctgttggtgtagcatggca
accagcactttaaatggctgcgtaaatgtaaaacccatgcaccgtggcgtaaatcatatccgtcactgaatctgattgcaaccagcaccgttt
ttcagcaggatcataatggttataccatcaggatccgggtatgctgacctatctggcagaaaaaaaccggaaatttatccgtgaatatctgc
ctgcagatgccaatagcctgctggccgttatgagcgaagttctgagcagcaaaagataaagtgaacctgacgttagcagtaaacatcctcgt
ccgcagttttatagtcagcagaagcgggaagaattagttcgtgaagggttacaagttatcgattgggcaagcaccgataaagggtggcgaac
cggatgtggttattgccgcagccgcaacagaaccgaatctggaagcactggcagcaattacaattctgaacaaacagtttccggaactgaa
aatccgctttattaacgtggtggatattctgaaactgcgtatccctaaagtggatccgcgtggtctgaccgatgaacagttcgtgactgttta
ccaaagacaaaccgggtgatttttgccttcatggctatgaaggtatggtgcgcgatatttttgcgcataaccataatctgcgcattcatg
gttatcgtgaaaatggtgatattaccacccggttgatatgcgtgttctgagtgaaatggatcgtttcatgttgcaaaagatgcagccctggca
gtttatggtgacaaagcacaggattttgcaaaaaaatggacgataccctggcatttcatcacagctatattcgcgaaaatggcgaagatattc
cggaagttcgtaatggaaatgggaagccctgaaa (配列番号86)

10

20

エレモコッカス・コレオコラ (Eremococcus coleocola) ACS-
139-V-Col8からのホスホケトラゼ酵素をコードする核酸配列

【化 8 7】

atgaccgtggactacaacagcaaagaatatctgaccctggttgataaatggtggcgtgcagcaaattatctgagcgttggtcagatgtttctg
 cgtgataatccgctgctgcaagaagaggttaccgcagatcatgttaactgaatccgattggtcattggggcaccattggtggccagaatttt
 ctgtatgcacatctgaatcgattatcaacaagtataatgtgaatatgttttatatcgaaggccctggtcatggtggtcaggttatggttaccaat
 agctatctggatggttagctataccgaacggttatccggaatttaccaggtatgtccggtatgaaaaactgtttaaaaccttcagctttccggg
 tggattggttagccatgcagcaccggaaacaccgggttagcatgcatgaaggtggtgaactgggttatgcactgagccatgccaccggtgc
 aattctggataaaccggatgttattgcagcaaccgttggtggtgaggtgaagcagaaccgggtccgctggcagcaggttggttagcaatgt
 tttatcaatccggtttcagatggtgcagttctgccgattctgtatctgaatggtggtgaaaattgcaaaccggaccattctggcacgtaaaagca
 atgaggatctgaccaaataattcgaaggtatgggttgaaaccgtatattgtgaaggcaccgatccggaacaggttcatccgattatggcaa
 aagttctggatgaagtgattgaagaaattcaggccattcaggcagaagcccgtaaaggtaagccgaagatgcaaaaaatgccgcattggc
 cgatgatcctgtatctgaccccgaaggttgacaggtccggaaagaggtgaaggtaaaacaattcagggttagctttctgcacatcaggtt
 ccgattccgggttagcggctgtaatatggaagatattgatctgctgataactggctgaaaagctatggtcctgaagaactgttcaccgaaaat
 ggcgaactggttagatgaactgaaagaatttgaccgaaaggcgtatcgtatggcaatgaaccgctgaccaatggcggtaatccgaaa
 ccgctgaatatgccgaattggaagattatgccctggaaattggcaccctggtagcaaatgacagagatattgattgaatttggtggtttg
 cgtgataatctgaaagaaaatccggaacctttcgcatttttggtccggtgaaacaaaagttaatgcctgaataaagtgttggaagtga
 ccaatcgtcagtggtggaaccgattagcgaaaaattgatgaaaacatgtcagcaagcggctgcgttattgatagccagctgagcgaacat
 cagaatcaggggtttctggaagcatatgttctgaccggctgctatggttttttgaagctatgaaagctttttcgtacgggtgtagcatgatta
 ccagcactttaaatggattcgcaaaagcgcaaaacatagctggcgtaaaccttatcagagcctgaatctgattagcgcaagcaccgttttc
 agcaggatcataatggttataccatcaggatccgggtctgctgaccatattggtgaaaacacgggtgaatatatgcgtgcataatctgcctg
 cagataccaattcactgctggcagttatggataaagcatttcgcagcgaaaacgtgattaactatgttgtagccagcaaacatccgcgtccgc
 agtttttacagcagatgaagccgagggaactggttaatgaaggtctgaaagtatcgattggccagtagccgttaaagataatgaagaaccg
 gatgtggttattccgcagccggtacagaaccgaattttgaagcaattgcagcgaatttcctatctggttaaagcctttccggaactgaagattc
 gttttgtaatgtggtgacctgttcgtctgcgtagtcgggaattgatccgcgtggtctgagtgatgatgaattcgatgcaatcttcaccaaag
 ataaaccgggtgtttttgccttcatagtctacgaaggcatgctgaaagacatctttttaccggtcataaccataatctgtacgcccattggtatcg
 tgagaatggtgaaattaccacccggttgatagcgcgttctgaatgaactggatcgtttcatctgagtgcacatgttgagatgttgatgg
 tgataaagcccgtgattatgttccgaaatgaaagggaagttaagaacatcgtgattacgtggaagaatatggtgccgatatgccggaag
 tagaagattggaatgggaggtatcaaa (配列番号87)

10

20

アエロコッカス・ウリナエ (*Aerococcus urinae*) ACS-120-V
 -C0110aからのホスホケトラゼ酵素をコードする核酸配列

【化 8 8】

atgaccgactttgacagcaaagcctatctggataaagttgatgcattggtggcgtgcagcaaattatctgagcgttggtcagatgtatctgcgt
 gataatccgctgctggatcgtgaagttaccgcagatgatatcaaaattaccccgattgggtcattggggcaccattgcaggtcagaattttgtta
 tgcacatctgaatcgcgtgatcaacaatatgatctgaatatgtttacatcgaaggtccgggtcatggtggcaggttatgcaggcaaatgc
 atacctggatggcacctggaccgaacattatccggaatatccgcagaataaagaaggcatgcagaagtcttcaaatatttcagctttccggg
 tggcaccggtgacatgcaaccgcagaaattccgggtgacattcatgaaggtgggtgaactgggttatagcctgagtcacccgggtgca
 attctggacaatccggatgttattgcagcaaccgttattggtgatggtgaaagcgaaccgggtccgctggcagcaagctggctgagcaata
 gctttattaacccggttaccgatggtgcagttctccgattctgtatctgaatggtggtgtaaattgcaaaccgaccattctggaacgtaaaag
 caatgaagatctgattaaactttcagggtctgggttgggatccgatggttggtaaggaatgatccggaaaaagtccatccgctgatggca
 aaaaccctggatcaggcaattgaaaaatcaaaagcattcagggtgaagcccgtaaaggtagtgcagatgaagcaaccatgggccattgg
 ccgatgatcctgtatcgtacccgaaagggttgacaggtccgaaagcatgggaaggcaatgatattgaaggttcatttcgtcacatcaggt
 tccgattccggttaatgcagaaaatatggaacatgtggatgccctgattgattggctgaaaagctatcgtccggaagaactgtttaccgaaga
 aggtcagctgcgtcctgaaattgccgaaattgcaccgaaagcgcacagcgtatggcaagcaatccgattacagatggtggcattgatccg
 aaaccgctggacctgccggattggcgtgattatgcactggattttgaaacaccgggtgaacgtgatgcacaggatatgattgaaatgggtgg
 ttatgccgcaggcgttatcgaaaaaatcctgataactttcgcattctccggtccgatgaaacaaaaagtaatcgtctgaacaaagtgttcaat
 gtgacaaaacgtcagtggtggtggaaccgattaaagataactatgatgaatggatgagcccagcgggtcgtgttattgatagccagctgagcg
 aacatcagatggaaagggtttctggaagcatataccctgaccggctgcacatggttttttgaagctatgaagcattattcgtaccgtggatagc
 atgattaccagcactttaaatggatgcgcgaagcaagcagagataaatggcataaaccgtatcagagcctgaacctgattagcagcagca
 ccgcatttcagcagatcataatggttataccatcaggatccgggtctgctgacctctggcagaaaaaaagggtgaatttgcgtgcat
 atctgcctgcagataccaatagcctgctggcagttatggacaagcactgagcagcgaatatgtattaactatattgtgaccagcaaacat
 ccgcgtccgcagttttttagcgttgaagaagcagaagagttcgtcgataaaggctataaagttatcgattgggcaagcaccgtggaagagg
 gcgaagaaccggatgtggtgattgcagccagcggcaccgaaccgaccgttgaaccattgccaccattagctatctgcatgaagcctttcc
 ggaactgaaaattcgttatgtaattgtggtggatctgtatgcctgcgtcatccgaatatcgatccgcgtggtctgagtgatgaagaatttgatg
 ccgttttcacaaagataaaccggtgtttttgctttcatagcttgaaggcctgctgaaagatatcttcttgatgccataaccataacctgat
 ccgcattggtatcgtgaggaaggtgccattaccacccgtttgatatcgtgttctgaatgaactggatcgtttcattttgcagcacatgttgc
 cgaagttgtgtatggtgataaagcccaggattttatcgatcagatgaatgccaaagtgaagaacatcgtgcgtatattgtgaatatggcacc
 gatatgccggaagtgaagaatggaaatggcagccgctggaaaaa (配列番号88)

10

20

キンゲラ・キングエ (Kingella kingae) ATCC 23330 からのホス
 ホケトラゼ酵素をコードする核酸配列

【化 8 9】

atgaccaacaaaaccagttcgacacaccggaatatctgggtaaagttgatgcatgggtggcgtgcagcaaaactatattagcgttcacagat
 gtatctgaaagataatccgtgctgaaaacaccgctggttgcaaatgatgttaaagcacatccgattgggtcattggggcaccgttccgggtca
 gaattttatctatgcacatctgaatcgtgccatcaacaaatatgatgtggacatgttttatatcgaaggtcctgggtcatgggtggtcaggttatggt
 agcaatagctatctggatggttagctataccgaaatctatccggatattaccaggataccgcaggctgtaaaaaactgtgtaaaaatctttagct
 tccgggtggtattgcaagccatgcagcaccggaacaccgggtagcattcatgaaggtggtgaactgggttatgactgagccatgccttt
 ggtgcagttctggataaaccgaatgttattgcagcagcagttattggtgatggtgaagcagaaccgggtccgctgtgtgcaggttggtttggt
 aatacctttattaaccgggttaatatggtggtgctgctgctgattctgtacctgaatggtggtgtaaaattcataatccgaccattctggcacgtaa
 aaccgatgaagaactgaaacagtattttaacgggtatgggttgggaaccgatttttgggtatgtaacaacgtggataactatcacgaaattatg
 agccagaaagtggatgaagccgttgaacataattctgagcatttggcagaccgcacgtaccagaaagccgaagatgcaaccatgccgcat
 tggcctgttctggttgcccgtattecgaaggttggacaggtccgaaaacctggcatggcgaaaccgatcgaagggcgttttctgtgcacatca
 ggttccgattccggcaagcagccatgatattggaaccgcaggcgaactggaaaaatggctgcgttagctatgctccggaagaaacttttggat
 gataatggttgcttctctggataagtggcgtgatattagcccgaagggcgcaaacgtatgagcgttcacccgatcaccaatggtggcattaat
 ccgaaagcactggttatgccggattggaccagcatgactggaaattggtgttccaggttagccaggatgcacaggatattggtgaatgtg
 gtcgtctgatggcagatgttgttaccgcaaatccgaataacttctgatttttgggtccggacgaaacaaaagcaatcgtctgaatcaggttttc
 aggttacaaacgtcagtggtggtggtcgtgatgaagcatatgatgaatggattgcaccggttggtcgtgttattgatagccagctgagc
 gaacatcaggcagaaggttttctggaaggttatgttctgaccggtcgtcatggtttttgcaagctatgaaagctttttcgtgtgtggtgatagc
 atgattacgcagcactttaaatggcttcgcaaatgtaaaaccacgcagcatggcgtaatgattatccgagcctgaatctgattgcaaccagc
 accgtgtttcagcaggatcataatggctatacccatcaggatccgggtctgctgacccatctggcagaaaaaaaaccggaatttgcgtga
 atatttaccggcagatagcaataacctgatggccgttatgagcgaagcactgaccagccgtgacgtattaacctgattgttagcagtaaac
 tctgcgtccgcagttttcaatgcagaagaagcaaaagaactggttcgcgaaggctataaagtattgattgggcaagcacctgtcatgacg
 gtgaaccggatgttgtgatgcagccgcaggcaccgaaccgaatatggaagccctggcagcaattagcattctgcacaaacagtttccgg
 aactgaagattcgtttatcaacgttgtggatactgaaactgcgtcatccgagcattgatccgctggtctgagtgaacagtttgatgca
 ctgtttacccaagaaaaacctgtgtgtgttttctttcatggttatgaaggtatgattcgcgacctgtttttccgctgcaaacataatgttcgtat
 tcatggctatcgcaaaatggcgatattacaaccccgtttgatatgcgtgttctgtcagaaatggatcgttttcatgttgccaaagatgccgcac
 aggcagtttatggtgataaagcaagcgaattcgccaaaaaatgggtgaaaccgttgcatctcatcttctatattcgtgaacatggcaccg
 atattccggaagttgcagaatggaaatggcagccgctggccaaa (配列番号89)

10

20

ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*) HS-
 6 からのホスホクトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 9 0】

atgaataccaacttcgatagcagcgattacctgaataaagttgatgcatgggtggcgtgcagcaactatattagcgcagcacagatgtatctg
 aaagataatccgctgctgcgtcgtgaagttgcagcagaagatctgaaaagccatccgattgggtcattggggcaccgttccgggtcagaattt
 tatctatgcacatctgctgcgtccatcaacaatatgatctggatattgtctatcgaaggctcctggatgggtcaggttatggttagcaa
 tagctatctggatggtagctataccgaactgaatccgcagattagccagaccgaagagggtctgaaacagctgtgtaaaatctttagctttcc
 ggggtggtattgcaagccatgcagcaccggaaacaccgggttagcattcatgaaggtggtgaactgggttatgcactgagccatgccaccgg
 tgcagttctggataaccggatggtattgcagcaaccgttattggtgatgggtgaaagcgaaccgggtccgctgatggcaggttggctgagca
 atacctttattaaccgggttaatatggtggtccgttctccgattcattttctgaatgggtggcaaaatcataatccgaccatctttgaacgtaaaag
 cgacgatgaactgaaagcctttttaccgggtctgggttggaaaccgattttgcagatgttaccgcatttgaagcgcgatgcagccgcacat
 aaactgtttgcagccaaactggatgaagccattgaagaaatcgtaacattcaggcaaaagcccgtaaaggtagcgcagatgaagcaacc
 atgcctgcatggcctgttattgttcacgtattccgaaagggttggacaggtccgaaaagctggaaaggcaccctgattgaaggcgggttggc
 gtgcccacaggttccgattccgggtgatagccatcatatggaacatgttgatgccctgctggattgggtgaaaagttatcagccggaagaac
 tgttcgatgcagaaggctcatctgaaatcagaagtggtgcagccctgagcccgaaaaggcaatcgtcgtatgagcatgaatccgattaccaatgc
 cgggtgttattaaccgatggatacagccgattggaaaaaacgtgcatttgatattcagaccctgggtgaaattgttgcccaggatattgaa
 tttggcaaatatgccgcagatctggttgaaagcaaatccggataatttctgatttttgggtccgatgaaagcaaaagcaatcgccctgaatgaag
 tgtttacaaaaccaatcgtcagtggtggtcgtcgtgatccgagctatgatgaatggctgagtcggcaggtcgtgttattgatagtcagct
 gagcgaacatcagggccgaagggtttctggaagggttatgttctgaccggctcgtcatggttttttccagctatgaaagctttctgcgtgttgg
 ataccatgattaccagcacitfaaatggctgcgtaaaagtaaaaccataaccacctggcgtaaaactatccgagcctgaatctgattgcaa
 ccagcaccgtttttcagcaggatcataatggttatacacatcaggatccgggtgtgctgacctctgagtgaaaaaactccggaatatatcc
 gtgaatatctgcctgcagataccaatagcctgctggcgggttatggataaagcatttaagatgaggacaaaattaacctgatcgtgaccagca
 aacatccgcgtccgcagttttatagcgttgaagaagcaagcgaactggctgaaaaaggctataaagtattgattgggcaagcaccgtgca
 ggcaaatgaagaaccggatgtggttttccgcagcaggcacagaaccgaatctggaagcactggcagcaattagcattctgcacaaaac
 ctttccgagctgaaaattcgttttgaacgtggtggatattctgaaactgcgtcatccggacctggatccgcgtggtctgtctgatgaagaat
 ttgataaagtgttcacgaaagacaagccgggtgatctttgcatttcatgcatatgaaggtatgatccgcgatatcttttctgcgcataaccata
 atctgcatgtgcatggttatgcgaaaaatgggtgatattaccaccccggttgatatgcgtgttatgtcagaactggatcgttttcatctggcacagg
 atcccgactgaccacctgggtgaaaaagcacaggcatttagcgcaaaaatggatgaaccgttgccctatcacaagattatattcgtgaa
 catgggggatgatattccggaagtgcagaattggcagtgggaaaatctggacgaa (配列番号90)

10

20

ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*) HS-
 6 からのホスホケトラゼ酵素をコードする核酸配列

【化 9 1】

atgaccgagttcgacagcaaaagattatctggcaaaagtgtgatgcattggtggcgtgcagcaaaactatattagcgttgacagatgtatctgaaa
gataatccgctgctgcgtcgtgaagtttagcaaaagatgttaaagttcatccgattggtcattggggcaccattgcaggtcagaattttatcta
tgcacatctgaatcgctgatcaacaaattcgatctgaacatgttttatatcgaagggtccgggtcatggtggtcaggttatggttagcaatagct
atattgatggcagctataccgaacgtatccgaatattaccaggatgaagatggtctgaaacagctgtgtaaaatcttagctttccgggtgg
tattgcaagccatgcagcaccggaacaccgggtagcattcatgaagggtggtgaactgggttatgcactgagccatgccaccgggtgcaatt
ctggataaccggatgttattgcagcaaccgttattggtgatggtgaagcagaaaccgggtccgctgaatgcaggttggttagtaataaccttta
ttaaccgggttaatgatggtgcagttctgccgattctgtacctgaatggcggtaaaattcataatccgaccattctgagccgtaaaaccgatga
agaactgaccacctgtttcagggctctgggttgggaaccgtatttgtgaaggtaatgatccgggaagttatccatagccagatggccgaaac
cctggataaaagtattcgaaaaaatcaagaccattcagaccaggcacgtcagaaacctgcagaagaggcacagcaggcacagtggcctg
ttctgattgttcgtacccgaaaggttggacaggtccgaaagaatggaatggtgaaccgattgaaggcgggttttcgtgcacatcaggttccga
ttccgggtgaagcaggtcatatggaacatcgtatgccctgaccgattggctgaaaagctatcgtccggaagaactttttagagaaggtct
atgtgaaagaagagattcgcgttatttcaccgaaaggcaatcgtctatgagcatgaatccgattaccaatgccggtattgtgaaaaaactgg
atctggcagattggcgtaaacatgcaattgataccagcaaacgggttcattatgaaacaggatgatgcgaattcggcaaatatgcagca
gatctggttaaagcaaatccggataacttctgtatttccgggtcggatgaacaaaaagcaatcgcctgaataatgttttaccgcaaccaatcg
tcagtggctggcaccgctgataaaagtattgatgaatggattagtcgggtgggtcgtgttattgatagtcagctgagcgaacatcaggcag
aagggttttctggaaggttatgttctgaccggtcgtcatggttttttgcagctatgaaagcttctgcgtgttgtgtagcatgattacacagca
ctttaaattggctgcgtaaaaagcaaaacccatacggattggcgcaaaaactatccgagcctgaatctgattgcaaccagcaccgttttcagca
ggatcataatggttataccatcaggatccgggtctgctgacctatggcggaaaaaacccagaatatgttctgtaatatctgcctgcaga
ttccaatagcctgtttgcagttatggaatatgccctggcagacgaagataaaagtgaatgtgattgtgaccagtaaacatccgcgtccgcagttt
tatagcgtggcagaagcacaagaactggtaaaagaaggctacaaagtaattgattggccagcaatgatcatgatggcgaaccggatattg
ttttgcagccgcaggcaccgaaccgaatctggaagttctggcaggtattagcctgctgcacaaagcatttcagaagtgaatttcgctttat
caacgtggtggtatattctgaaactgcgcagcccgaagtggatccgcgtggtctgagtgaagcatttaacaaactgttcaccaccgata
aaccgatcgtttttgcctatcatggttatgaaggtcagattcgtgacctgttttfaaccgcgataaccacaaagtgtatatccatggctatcgcg
aaaaatggtgatattaccacccggtttgatatgcgtgttatgagcgaatggatcgtttcatattgaaaaagaagcagcacaggccgttctgg
gtgataaagcacagggttttgcgaagaatggcagataaactggcatatcataccgcctataatcgtgaacatggtgatgatatccggaa
gtgcagaattggcagtgggaaaccattgat (配列番号91)

マイコプラズマ・コランビナム (Mycoplasma columbinum) SF7
からのホスホクトラーゼ酵素をコードする核酸配列

【化 9 2】

atgagcaaaaccaattttgatagcaaaaaatcacctggataagatccatgcatgggtggcgtgcagcaaatatctgagcgttggtcagatgtat
 ctgaaaaataacccgctgctgcaagaaccgctgaaagatgaagatatcaaaatctatccgattgggtcattggggcaccattccgggtcagaa
 tctgatttatgcacatctgaatcgctgcatcaacaatatgatctgaatatgtttacatcgaaaggtcctgggtcatgggtgcaggttatgattag
 caatagctatctggatggtagctataccgaactgtttccggaaattaccaggatctggcagggtctgaataaaatgtttaaacgctttagcttfc
 cgggtggcaccgcaagccatgcagcaccggaacaccgggtagcattcatgaaggtgggtgaactgggttatgcactgagccatgccacc
 ggtgcaattctggataatccggatgttattgcagcaaccgttattgggtgatgggaagcagaaccgggtccgctgatggcaggttggtatagc
 agcagctttattaacccggttaatgatggcaccgttctgccgattctgcatattaatgggtgtaaaattagcaaccggaccattctggcacgtaa
 aaccgataaagaaattaacagctgctggcaggctttggtgggaagcaattttgtgaagccgatgttttctccggaagccattcatctga
 gcatggcaaaagcatttgataaagccatcgaaaaaattcagcgtattcagcgcgaagcagctgcaaatagcgaaatcatgcaaaacgtcc
 gatttggcctgcactggtgttcgtaccccgaaaggttgacctgtccgcataaaattgatgataaagtgtatgaaggtagctttcgtagccat
 caggttccgctggcaggttagcagcgaaaaataccaccaaaaaagttgatctggtgaattggctggaaagctataaaccgctgaactgttcaa
 tcaggatggttcatttaagcccattatgccgaattgcaccgaaaggaataaacgatggcaatgaatccgattaccaacggtggtattaat
 ccgaaaaatctggatctgccgaattgggaacagtttgcattgatttcgataaaccgggtgccattaagcacaggatggttagcgcagg
 cacctggtttgcagatgtgattaacgtaatccgaccaacttctgatcttgggtccggatgaaacaaaagcaatcgctgtttgatgtgctga
 aaaccaccaatcgctcagtggttagaacgtgttgattatgacctggatgaaaacatcggtccggcagggtcgtgttattgatagccagctgagc
 gaacatcaggcagaaggttttctggaaggttatgttctgaccggctgcatatggtatgtttgcaagctatgaaagctttctgctgtgtggtatag
 catgctgaccagcatatgaaatgggttgcaaaagcgaaaaaagtgcattggcgtaatgattatccgagcctgaatgtgattgcaaccagca
 ccgcatctcagcaggtatcataatggttatcacatcaggatccgggtattctgggtcatctggccgataaaaaaccgggaactgattctggaat
 atctgctcagatagcaataacctgctggccgtgctggataaagcttttaagaacgtgatgtcatcaacctgattgtggcaagcaaacagc
 ctctgaacagtgggttagcccacgtgaagcaaatattctggttaaaatgggctgaaagttattagctgggcaagcacctgtacctggaag
 aagaaccggatctggttggtgcagcagcaggtacagaaccgacactggaagcactggcagcaattagttatctgaatgaaaaattccgga
 ccctgaaaaatccgtttgttaatgtttagacctgctgaaactcgctcatccgagcattgatccgcgtggtctgagcaattatgaattcgatagc
 atctttaccaaggacaaaccgatcctgtttgcctttcatggttatgaagccctgattcgcatatcttctcctgcgcaataaccataatctgcaca
 ttcattggtatcgcgaaaaatgggtgatattaccacgagctttgatattcgtctgatgagcgaaatggatcgttttcatatggcacagaccgcagc
 aaaaagccgttctgggttacgataaagcaaaaagcttcgtcgataaaatgcaggacaaaatcgatcagcataatgcctacatcaaaagaacatg
 gcatcgatattggatgaagttcgtattggacatggaaaggcctgaacaaa (配列番号92)

10

20

エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum) P
 K L のアミノ酸配列

【化 9 3】

METTFDTQEYFDKMNAWWRAANYLSVGQIYLKDNPLLRPIEEKDLKVNPIGHWGTIA
 GQNFIYTHLNRVINKYDLNMFYIEGPGHGGQVMVSNAYLDGSYTEIYPEVTQDEAGMQ
 HLFKIFSFPGGIASHAAPETPGSIHEGGELGYSIAHGTGAVLDNPDVIAAVVVGDEAET
 GPLAGSWFSNTFINPVNDGAVLPILHLNGAKISNPTILARKSDEDLTKYFEGMGWTPYFV
 EGDDPATVHPQMARALDRAVEQIKAIQTKARQGKADEAVMPHWPVLIVRTPKGWTGP
 KIWEGEPIEGGFRAHQVPIPVNAHQMEHVDALIDWLKSYKPEELFDESGRIKAEIQELAP
 KGQORMAMNPITNGGIDPQPLKITDWRQHAIDIGVPGSTTAQDMMFEFGKFARDLIVENP
 TNFRIFGPDEAKSNRLNHVFEVTNRQWLEPKQPNYDEWLSATGRVIDSQLSEHQAEGFL
 EGYVLTGRHGGFFASYESFLRVVDSMITQHFKWTRKSKELPWRHAYPSLNLIASSTVFQQ
 DHNGYTHQDPGIMTHIAEKKAEFVRVYLPADANSLMAVMAETFQTEEQINLIVSSKHPR
 PQFYTAEEAEILVKDGLKIIDWASTDQGEPLVIAAAGTEPNLEALAAVSLLEAFPELK
 IRFINVVDLLKIRHPDVPDPRGLTDEEFEEAYFTKDKPIIFAFHGYEGLIRDIFFGRKNQRLHI
 HGYRENGDITTPFDMRILSELDRLFHLAKDGAEWVYGEQAADFAQRMTETVAYHYDFIR
 ENGYDIAEVQDWQWKPLK (配列番号93)

30

40

コドン最適化されたクロストリジウム・アセトブチリカム (Clostridium acetobutylicum) P K L のアミノ酸配列

【化 9 4】

MQSIIGKHKDEGKITPEYLKKIDAYWRAANFISVGQLYLLDNPLLREPLKPEHLKRKVV
GHWGTIPGQNFIY AHLNRVIKKYDLDMIYVSGPGHGGQVMVSN SYLDGTYSEVYPNVS
RDLNGLKKLCKQFSFPGGISSHMAPETPGSINEGGELGYSLAHSFGAVFDNPDLITACVV
GDGEAETGPLATSWQANKFLNPVTDGAVLPILHLNGYKISNPTVLSRIPKDELEKFFEGN
GWKPYFVEGEDPETMHKLMAETLDIVTEEILNIQKNARENNDCSRPKWPMIVLRTPKG
WTGPKFVDGVPNEGSFRAHQVPLAVDRYHTENLDQLEEWLKSYPKEELFDENYRLIPE
LEELTPKG NKRMAANLHANGGLLRELRTPDFRDYAVDVPTPGSTVKQDMIELGKYVR
DVVKLNEDTRNFRIFGPDETMSNRLWAVFEGTKRQWLSEIKEPNDEFLSNDGRIVDSML
SEHLCEGWLEGYLLTGRHGFFASYEAFLRIVDSMITQHGWLKVTSQLPWRKDIASLNL
IATSNVWQQDHNGYTHQDPGLLGHI VDKKPEIVRAYLPADANTLLAVFDKCLHTKHKI
NLLVTSKHPRQQWLTMDQAVKHVEQGISIWDWASNDKGQEPDVVIASCGDTP TLEAL
AAVTILHEHLP ELKVR FVNVDMMKLLPENEHPHGLSDKDYNALFTTDKPVIFAFHGF
AHLINQLTYHRENRLHVHGYMEEGTITTPFDMRVQNKLD RFNLVKDVVENLPQLGNR
GAHLVQLMNDKLVEHNQYIREVGEDLPEITNWQWHV (配列番号94)

10

L. グレイー (L. grayi) mva E 核酸配列

【化 9 5】

ATGGTTAAAGACATTGTAATAATTGATGCCCTCCGTA CTCCCATCGGTAAGTACCGC
 GGTCAAGCTCTCAAAGATGACGGCGGTGGAATTGGGAACCGCAGTTACAAAGGCTCT
 GTTCGAGAAGAACGACCAGGTCAAAGACCATGTAGAACAAAGTCATTTTTGGCAACG
 TTTTACAGGCAGGGAACGGCCAGAATCCCGCCCGTCAGATCGCCCTTAATTCTGGCC
 TGTCCGCAGAGATACCGGCTTCGACTATTAACCAGGTGTGTGGTTCTGGCCTGAAAG
 CAATAAGCATGGCGCGCCAACAGATCCTACTCGGAGAAGCGGAAGTAATAGTAGCA
 GGAGGTATCGAATCCATGACGAATGCGCCGAGTATTACATATTATAATAAAGAAGA
 AGACACCCTCTCAAAGCCTGTTCCCTACGATGACCTTCGATGGTCTGACCGACGCGTT
 TAGCGGAAAGATTATGGGTTTAACAGCCGAAAATGTTGCCGAACAGTACGGCGTAT
 CACGTGAGGCCCAGGACGCCTTTGCGTATGGATCGCAGATGAAAGCAGCAAAGGCC
 CAAGAACAGGGCATTTCGCGAGCTGAAATACTGCCTCTTGAAATAGGGGACGAAGT
 TATTACTCAGGACGAGGGGGTTCGTCAAGAGACCACCCTCGAAAAATTAAGTCTGC
 TTCGGACCATTTCCTTAAAGAAGATGGTACTGTTACAGCGGGCAACGCCTCAACGATC
 AATGATGGCGCCTCAGCCGTGATCATTGCATCAAAGGAGTTTGCTGAGACAAACCA
 GATTCCCTACCTTGCGATCGTACATGATATTACAGAGATAGGCATTGATCCATCAAT
 AATGGGCATTGCTCCCGTGAGTGCGATCAATAAACTGATCGATCGTAACCAAATTA
 GCATGGAAGAAATCGATCTCTTTGAAATTAATGAGGCATTTCGAGCATCCTCGGTGG
 TAGTTCAAAAAGAGTTAAGCATTCCCGATGAAAAGATCAATATTGGCGGTTCCGGT
 ATTGCACTAGGCCATCCTCTTGGCGCCACAGGAGCGCGCATTGTAACCAACCCTAGCG
 CACCAGTTGAAACGTACACACGGACGCTATGGTATTGCCTCCCTGTGCATTGGCGGT
 GGCCTTGGCCTAGCAATATTAATAGAAGTGCCTCAGGAAGATCAGCCGGTTAAAAA
 ATTTTATCAATTGGCCCGTGAGGACCGTCTGGCTAGACTTCAGGAGCAAGCCGTGAT
 CAGCCCAGCTACAAAACATGTACTGGCAGAAATGACACTTCCTGAAGATATTGCCG
 ACAATCTGATCGAAAATCAAATATCTGAAATGGAAATCCCTCTTGGTGTGGCTTTGA
 ATCTGAGGGTCAATGATAAGAGTTATACCATCCCCTAGCAACTGAGGAACCGAGT
 GTAATCGCTGCCTGTAATAATGGTGCAAAAATGGCAAACCACTGGGCGGTTTTCA
 GTCAGAATTAAAAGATGGTTTCCTGCGTGGGCAAATTGTAATTATGAACGTCAAAG
 AACCCGCAACTATCGAGCATACGATCACGGCAGAGAAAGCGGCAATTTTTCTGTGCC
 GCAGCGCAGTCACATCCATCGATTGTGAAACGAGGTGGGGGTCTAAAAGAGATAGT
 AGTGCGTACGTTTCGATGATGATCCGACGTTCTGTCTATTGATCTGATAGTTGATAC
 TAAAGACGCAATGGGCGCTAACATCATTAACACCAATTCTCGAGGGTGTAGCCGGCT
 TTCTGAGGGAAATCCTTACCGAAGAAATTCTGTTCTCTATTTTATCTAATTACGCAA
 CCGAATCAATTGTGACCGCCAGCTGTGCGATACCTTACGAAGCACTGAGTAAAAAA
 GGTGATGGTAAACGAATCGCTGAAAAAGTGGCTGCTGCATCTAAATTTGCCAGTT
 AGATCCTTATCGAGCTGCAACCCACAACAAAGGTATTATGAATGGTATTGAGGCCG
 TCGTTTTGGCCTCAGGAAATGACACACGGGCGGTTCGCGGCAGCCGCACATGCGTAT
 GCTTCACGCGATCAGCACTATCGGGGCTTAAGCCAGTGGCAGGTTGCAGAAGGCGC
 GTTACACGGGGAGATCAGTCTACCACTTGCACTCGGCAGCGTTGGCGGTGCAATTG
 AGGTCTTGCCCTAAAGCGAAGGCGGCATTCGAAATCATGGGGATCACAGAGGCGAAG
 GAGCTGGCAGAAGTCACAGCTGCGGTAGGGCTGGCGCAAAACCTGGCGGCGTTAAG
 AGCGCTTGTTAGTGAAGGAATACAGCAAGGTCACATGTCGCTCCAGGCTCGCTCTCT
 TGCATTATCGGTAGGTGCTACAGGCAAGGAAGTTGAAATCCTGGCCGAAAAATTAC
 AGGGCTCTCGTATGAATCAGGCGAACGCTCAGACCATACTCGCAGAGATCAGATCG
 CAAAAAGTTGAATTGTGA (配列番号95)

E. フェシウム (E. faecium) mv a E 核酸配列

【化 9 6】

ATGAAAGAAGTGGTTATGATTGATGCGGCTCGCACACCCATTGGGAAATACAGAGG
 TAGTCTTAGTCCTTTTACAGCGGTGGAGCTGGGGACACTGGTCACGAAAGGGCTGCT
 GGATAAAACAAAGCTTAAGAAAGACAAGATAGACCAAGTGATATTCGGCAATGTG
 CTTACAGGCAGGAAACGGACAAAACGTTGCAAGACAAATAGCCCTGAACAGTGGCTT
 ACCAGTTGACGTGCCGGCGATGACTATTAACGAAGTTTGCGGGTCCGGAATGAAAG
 CGGTGATTTTAGCCCCGCCAGTTAATACAGTTAGGGGAGGCAGAGTTGGTCATTGCA
 GGGGGTACGGAGTCAATGTCACAAGCACCCATGCTGAAACCTTACCAGTCAGAGAC
 CAACGAATACGGAGAGCCGATATCATCAATGGTTAATGACGGGCTGACGGATGCGT
 TTTCCAATGCTCACATGGGTCTTACTGCCGAAAAGGTGGCGACCCAGTTTTCAGTGT
 CGCGCGAGGAACAAGACCGGTACGCATTGTCCAGCCAATTGAAAGCAGCGCACGCG
 GTTGAAGCCGGGGTGTTCTCAGAAGAGATTATTCGGTTAAGATTAGCGACGAGGA
 TGTCTTGAGTGAAGACGAGGCAGTAAGAGGCAACAGCACTTTGGAAAACTGGGCA
 CCTTGCGGACGGTGTTTTCTGAAGAGGGCACGGTTACCGCTGGCAATGCTTCACCGC
 TGAATGACGGCGCTAGTGTCGTGATTCTTGCATCAAAAAGAATACGCGGAAAAACAAT
 AATCTGCCTTACCTGGCGACGATAAAGGAGGTTGCGGAAGTTGGTATCGATCCTTCT
 ATCATGGGTATTGCCCAATAAAGGCCATTCAAAAGTTAACAGATCGGTCCGGGCAT
 GAACCTGTCCACGATTGATCTGTTTCGAAATTAATGAAGCATTTCGCGGCATCTAGCAT
 TGTGTGTTTCTCAAGAGCTGCAATTGGACGAAGAAAAAGTGAATATCTATGGCGGGG
 CGATAGCTTTAGGCCATCCAATCGGCGCAAGCGGAGCCCGGATACTGACAACCTTA
 GCATACGGCCTCCTGCGTGAGCAAAAGCGTTATGGTATTGCGTCATTATGTATCGGC
 GGTGGTCTTGGTCTGGCCGTGCTGTTAGAAGCTAATATGGAGCAGACCCACAAAGA
 CGTTCAGAAGAAAAAGTTTTACCAGCTTACCCCTCCGAGCGGAGATCGCAGCTTAT
 CGAGAAGAACGTTCTGACTCAAGAAACGGCACTTATTTTCCAGGAGCAGACGTTGT
 CCGAAGAACTGTCCGATCACATGATTGAGAATCAGGTCTCCGAAGTGGAATTC
 ATGGGAATTGCACAAAATTTTCAGATTAATGGCAAGAAAAAATGGATTCTATGGC
 GACTGAAGAACCTTCAGTAATAGCGGCAGCATCGAACGGCGCCAAAATCTGCGGGA
 ACATTTGCGCGGAAACGCCTCAGCGGCTTATGCGCGGGCAGATTGTCCTGTCTGGCA
 AATCAGAATATCAAGCCGTGATAAATGCCGTGAATCATCGCAAAGAAGAACTGATT
 CTTTGCGCAAACGAGTCGTACCCGAGTATTGTTAAACGCGGGGGAGGTGTTTCAGGA
 TATTTCTACGCGGGAGTTTATGGGTTCTTTTCACGCGTATTTATCAATCGACTTTCTG
 GTGGACGTCAAGGACGCAATGGGGGCAAACATGATCAACTCTATTCTCGAAAGCGT
 TGCAAATAAACTGCGTGAATGGTTCCCGGAAGAGGAAATACTGTTCTCCATCCTGTC
 AAACCTTCGCTACGGAGTCCCTGGCATCTGCATGTTGCGAGATTCCTTTTGAAAGACT
 TGGTCGTAACAAAGAAATTGGTGAACAGATCGCCAAGAAAATTCAACAGGCAGGG
 GAATATGCTAAGCTTGACCCTTACCGCGCGGCAACCCATAACAAGGGGATTATGAA
 CGGTATCGAAGCCGTCGTTGCCGCAACGGGAAACGACACACGGGCTGTTTCCGCTT
 CTATTCACGCATACGCCGCCCGTAATGGCTTGTACCAAGGTTTAACGGATTGGCAGA
 TCAAGGGCGATAAACTGGTTGGTAAATTAACAGTCCCACTGGCTGTGGCGACTGTC
 GGTGGCGCGTCGAACATATTACCAAAAAGCCAAAGCTTCCCTCGCCATGCTGGATATT
 GATTCCGCAAAAAGAACTGGCCCAAGTGATCGCCGCGGTAGGTTTAGCACAGAATCT
 GGCGGCGTTACGTGCATTAGTGACAGAAGGCATTTCAGAAAGGACACATGGGCTTGC
 AAGCACGTTCTTTAGCGATTTTCGATAGGTGCCATCGGTGAGGAGATAGAGCAAGTC
 GCGAAAAAACTGCGTGAAGCTGAAAAAATGAATCAGCAAACGGCAATACAGATTTT
 AGAAAAAATTCGCGAGAAATGA (配列番号96)

E. ガリナラム (E. g a l l i n a r u m) m v a E 核酸配列

【化 97】

ATGGAAGAAGTGGTAATTATAGATGCACGTCGGACTCCGATTGGTAAATATCACGG
 GTCGTTGAAGAAGTTTTTCAGCGGTGGCGCTGGGGACGGCCGTGGCTAAAGACATGT
 TCGAACGCAACCAGAAAAATCAAAGAGGAGATCGCGCAGGTCATAATTGGTAATGTC
 TTGCAGGCAGGAAATGGCCAGAACCCCGCGCGGCAAGTTGCTCTTCAATCAGGGTT
 GTCCGTTGACATTCCCGCTTCTACAATTAACGAGGTTTGTGGGTCTGGTTTAAAAGC
 TATCTTGATGGGCATGGAACAAATCCAACCTCGGCAAAGCGCAAGTAGTGCTGGCAG
 GCGGCATTGAATCAATGACAAATGCGCCAAGCCTGTCCCACTATAACAAGGCGGAG
 GATACGTATAGTGTCCAGTGTGCGAGCATGACACTGGATGGTCTGACAGACGCATTT
 TCTAGTAAACCTATGGGATTAACAGCGGAAAAACGTGCGCACAGCGCTACGGTATCTC
 CCGTGAGGCGCAAGATCAATTCGCATATCAATCTCAGATGAAAGCAGCAAAAAGCGC
 AGGCAGAAAAACAAATTCGCTAAGGAAATTGTGCCACTGGCGGGTGAACTAAAACC
 ATCACAGCTGACGAAGGGATCAGATCCCAAACAACGATGGAGAACTGGCAAGTCT
 CAAACCTGTTTTTAAAACCGATGGCACTGTAACCGCAGGGAATGCTAGCACCATTA
 ATGACGGGGCCGCCCTTGTGCTGCTTGCTAGCAAACTTACTGCGAACTAATGAC
 ATACCGTACCTTGCGACAATCAAAGAAATTGTTGAAGTTGGAATCGATCCGGAGAT
 TATGGGCATCTCTCCGATAAAAAGCGATACAAACATTGTTACAAAATCAAAAAGTTA
 GCCTCGAAGATATTGGAGTTTTTGAAATAAATGAAGCCTTTGCCGCAAGTAGCATA
 GTGGTTGAATCTGAGTTGGGATTAGATCCGGCTAAAGTTAACCCTTATGGGGGTGGT
 ATATCCTTAGGTCATGCAATTGGGGCAACCGGCGCTCGCCTGGCCACTTCACTGGTG
 TATCAAATGCAGGAGATACAAGCACGTTATGGTATTGCGAGCCTGTGCGTTGGTGG
 TGGACTTGGACTGGCAATGCTTTTAGAACGTCCAACCTATTGAGAAGGCTAAACCGA
 CAGACAAAAAGTTCTATGAATTGTCACCAGCTGAACGGTTGCAAGAGCTGGAAAAT
 CAACAGAAAATCAGTTCTGAACTAAACAGCAGTTATCTCAGATGATGCTTGCCGA
 GGACACTGCAAACCATTTGATAGAAAATCAAATATCAGAGATTGAACTCCCAATGG
 GCGTCGGGATGAACCTGAAGGTTGATGGGAAAGCCTATGTTGTGCCAATGGCGACG
 GAAGAGCCGTCCGTCATCGCGGCCATGTCTAATGGTGCCAAAATGGCCGGCGAAAT
 TCACACTCAGTCGAAAGAACGGCTGCTCAGAGGTCAGATTGTTTTTCAGCGCGAAGA
 ATCCGAATGAAATCGAACAGAGAATAGCTGAGAACCAAGCTTTGATTTTCGAACGT
 GCCGAACAGTCCTATCCTTCCATTGTGAAAAGAGAGGGAGGTCTCCGCCGCATTGC
 ACTTCGTCATTTTTCTGCCGATTCTCAGCAGGAGTCTGCGGACCAGTCCACATTTTTTA
 TCAGTGGACCTTTTTGTAGATGTGAAAGACGCGATGGGGGCAAATATCATAAATGC
 AATACTTGAGGGCGTCGCAGCCCTGTTTCGCGAATGGTTCCCCAATGAGGAAATTCT
 TTTTTCTATTCTCTCGAACTTGGCTACGGAGAGCTTAGTCACGGCTGTTTGTGAAGTC
 CCATTTAGTGCACCTTAGCAAGAGAGGTGGTGCAACGGTGGCCCAGAAAATTGTGCA
 GGCGTCGCTCTTCGCAAAGACAGACCCATAACCGCGCAGTGACCCACAACAAAGGGA
 TTATGAACGGTGTAGAGGCTGTTATGCTTGCCACAGGCAACGACACGCGCGCAGTC
 TCAGCCGCTTGTGATGGATACGCAGCGCGCACCGGTAGCTATCAGGGTCTGACTAA
 CTGGACGATTGAGTCGGATCGCCTGGTAGGCGAGATAAAGCTGCCGCTGGCCATCG
 CTACAGTTGGAGGCGCTACCAAAGTGTTGCCCAAAGCTCAAGCGGCACTGGAGATT
 AGTGATGTTCACTCTTCTCAAGAGCTTGACAGCCTTAGCGGCGTCAGTAGGTTTAGTA
 CAAAATCTCGCGGCCCTGCGCGCACTGGTTTCCGAAGGTATACAAAAAGGGCACAT
 GTCCATGCAAGCCCGGTCTCTCGCAATCGCGGTGCTGAAAAAGCCGAGATCG
 AGCAGGTCGCCGAAAAGTTGCGGCAGAACCCGCCAATGAATCAGCAGCAGGCGCTC
 CGTTTTCTTGCGGAGATCCGCGAACAATGA (配列番号97)

E. カセリフラブス (E. casseliflavus) mvaE 核酸配列

【化 9 8】

ATGGAAGAAGTTGTCATCATTGACGCACTGCGTACTCCAATAGGAAAGTACCACGG
TTCGCTGAAAGATTACACAGCTGTTGAACTGGGGACAGTAGCAGCAAAGGCGTTGC
TGGCACGAAATCAGCAAGCAAAAGAACACATAGCGCAAGTTATTATTGGCAACGTC
CTGCAAGCCGGAAGTGGGCAGAATCCAGGCCGACAAGTCAGTTTACAGTCAGGATT
GTCTTCTGATATCCCCGCTAGCACGATCAATGAAGTGTGTGGCTCGGGTATGAAAGC
GATTCTGATGGGTATGGAGCAAATTCAGCTGAACAAAGCCTCTGTGGTCTTAACAG
GCGGAATTGAAAGCATGACCAACGCGCCGCTGTTTAGTTATTACAACAAGGCTGAG
GATCAATATTCGGCGCCGGTTAGCACAATGATGCACGATGGTCTAACAGATGCTTTC
AGTTCCAAACCAATGGGCTTAACCCGAGAGACCGTTCGCTGAGAGATATGGAATTAC
GCGTAAGGAACAAGATGAATTTGCTTATCACTCTCAAATGAAGGCGGCCAAAGCCC
AGGCGGCGAAAAAGTTTGATCAGGAAATTGTACCCCTGACGGAAAAATCCGGAACG
GTTCTCCAGGACGAAGGCATCAGAGCCGCGACAACAGTCGAGAAGCTAGCTGAGCT
TAAAACGGTGTTCAAAAAAGACGGAACAGTTACAGCGGGTAACGCCTCTACGATAA
ATGATGGCGCTGCTATGGTATTAATAGCATCAAAATCTTATTGCGAAGAACACCAG
ATTCCTTATCTGGCCGTTATAAAGGAGATCGTTGAGGTGGGTTTTGCCCCCGAAATA
ATGGGTATTTCCCCCATTAAGGCTATAGACACCCTGCTGAAAAATCAAGCACTGACC
ATAGAGGATATAGGAATATTTGAGATTAATGAAGCCTTTGCTGCGAGTTTCGATTGTG
GTAGAACGCGAGTTGGGCCTGGACCCCAAAAAAGTTAATCGCTATGGCGGTGGTAT
ATCACTCGGCCACGCAATTGGGGCGACGGGAGCTCGCATTGCGACGACCGTTGCTT
ATCAGCTGAAAGATACCCAGGAGCGCTACGGTATAGCTTCCTTATGCGTTGGTGGG
GGTCTTGATTGGCGATGCTTCTGGAAAACCCATCGGCCACTGCCTCACAACTAAT
TTTGATGAGGAATCTGCTTCCGAAAAAACTGAGAAGAAGAAGTTTTATCGCTAGC
TCCTAACGAACGCTTAGCGTTTTTGGAAGCCCAAGGCGCTATTACCGCTGCTGAAAC
CCTGGTCTTCCAGGAGATGACCTTAAACAAAGAGACAGCCAATCACTTAATCGAAA
ACCAAATCAGCGAAGTTGAAATTCCTTTAGGCGTGGGCCTGAACTTACAGGTGAAT
GGGAAAGCGTATAATGTTCTCTGGCCACGGAGGAACCGTCCGTTATCGCTGCGAT
GTCGAATGGCGCCAAAATGGCTGGTCCTATTACAACAACAAGTCAGGAGAGGCTGT
TACGGGGTTCAGATTGTCTTCATGGACGTACAGGACCCAGAAGCAATATTAGCGAAA
GTTGAATCCGAGCAAGCTACCATTTTCGCGGTGGCAAATGAAACATACCCGTCTATC
GTGAAAAGAGGAGGAGGTCTGCGTAGAGTCATTGGCAGGAATTTAGTCCGCGCCA
AAGTGACTTAGCCACGGCGTATGTATCAATTGACCTGATGGTAGATGTTAAGGATG
CAATGGGTGCTAATATCATCAATAGTATCCTAGAAGGTGTTGCGGAATTGTTTAGAA
AATGGTTCCAGAGAAGAAGAAATCCTGTTCTCAATTCTCTCCAATCTCGCGACAGAAA
GTCTGGTAACGGCGACGTGCTCAGTTCCGTTTGATAAATTGTCCAAAACCTGGGAATG
GTCGACAAGTAGCTGGTAAAATAGTGCACGCGGCGGACTTTGCTAAGATAGATCCA
TACAGAGCTGCCACACACAATAAAGGTATTATGAATGGCGTTGAAGCGTTAATCTT
AGCCACCGGTAATGACACCCGTGCGGTGTCGGCTGCATGCCACGGTTACGCGGCAC
GCAATGGGCGAATGCAAGGGCTTACCTCTTGGACGATTATCGAAGATCGGCTGATA
GGCTCTATCACATTACCTTTGGCTATTGCGACAGTGGGGGGTGGCCAAAAAATCTTG
CCAAAAGCACAGGCCCGCCCTGGCGCTAACTGGCGTTGAGACGGCGTTCGGAACCTGGC
CAGCCTGGCGGCGAGTGTGGGATTAGTTCAAAATTTGGCCGCTTTACGAGCACTAGT
GAGCGAGGGCATTAGCAAGGGCACATGAGTATGCAAGCTAGATCCCTGGCCATTA
GCGTAGGTGCGAAAGGTACTGAAATAGAGCAACTAGCTGCGAAGCTGAGGGCAGC
GACGCAAATGAATCAGGAGCAGGCTCGTAAATTTCTGACCGAAATAAGAAATTAA
(配列番号98)

L. グレイー (L. grayi) mvaS 核酸配列

【化 9 9】

ATGACCATGAACGTTGGAATCGATAAAATGTCATTCTTTGTTCCACCTTACTTTGTG
 GACATGACTGATCTGGCAGTAGCACGGGATGTTCGATCCCAATAAGTTTCTGATTGGT
 ATTGGCCAGGACCAGATGGCAGTTAATCCGAAAACGCAGGATATTGTGACATTTGC
 CACAAATGCTGCCAAAAACATACTGTCAGCTGAGGACCTTGATAAAATTGATATGG
 TCATAGTCGGCACCAGAGAGTGGAATCGATGAATCCAAAGCGAGTGCCGTAGTGCTT
 CACAGGTTGCTCGGTATCCAGAAGTTTGCTCGCTCCTTTGAAATCAAAGAAGCCTGT
 TATGGGGGTACCGCGGCTTTACAGTTCGCTGTAAACCACATTAGGAATCATCCTGAA
 TCAAAGGTTCTTGTAGTTGCATCAGATATCGCGAAATACGGCCTGGCTTCTGGAGGT
 GAACCAACGCAAGGTGCAGGCGCTGTGGCTATGCTCGTCTCAACTGACCCTAAGAT
 CATTGCTTTCAACGACGATAGCCTCGCGCTTACACAAGATATCTATGACTTCTGGCG
 ACCAGTTGGACATGACTATCCTATGGTCGACGGGCCTCTTAGTACAGAGACCTACAT
 CCAGTCATTTAGACCGTATGGCAGGAATACACAAAACGGTCGCAGCATGCACTGG
 CAGACTTTGCTGCCCTTAGCTTTTCATATCCCGTATACTAAAATGGGCAAAAAGGCGC
 TGCTTGCAATCCTTGAAGGCGAATCAGAGGAGGCTCAGAACCGTATACTAGCAAAA
 TATGAAAAGAGTATAGCCTACTCCAGAAAGGCGGGTAACCTGTATACCGGTAGCCT
 GTATCTAGGACTTATTTCACTTCTGGAAAATGCAGAAGACCTTAAAGCTGGTGATTT
 AATAGGCCTCTTTTCTTACGGTTCCGGTGCTGTTGCGGAGTTTTTCTCAGGAAGGCT
 GGTGAGGACTATCAGGAACAGCTACTTAAACAAAACATGCCGAACAGCTGGCCC
 ATAGAAAGCAACTGACAATCGAGGAGTACGAAACGATGTTCTCCGATCGCTTGGAC
 GTGGACAAAGACGCCGAATACGAAGACACATTAGCTTATAGCATTTCGTCAGTCCG
 AACACCGTACGTGAGTACAGGAGTTGA (配列番号99)

10

20

E. フェシウム (E. faecium) mv a S 核酸配列

【化 1 0 0】

ATGAAAATCGGTATTGACCGTCTGTCCTTCTTCATCCCGAATTTGTATTTGGACATG
 ACTGAGCTGGCAGAATCACGCGGGGATGATCCAGCTAAATATCATATTGGAATCGG
 ACAAGATCAGATGGCAGTGAATCGCGCAAACGAGGACATCATAAACTGGGTGCA
 AACGCTGCGAGTAAGATCGTGACAGAGAAAGACCGCGAGTTGATTGATATGGTAAT
 CGTTGGCACGGAATCAGGAATTGACCACTCCAAAGCAAGCGCCGTGATTATTCACC
 ATCTCCTTAAAATTCAGTCGTTCCGCCGTTCTTTCGAGGTAAGAAAGCTTGCTATG
 GCGGAACTGCTGCCCTGCACATGGCGAAGGAGTATGTCAAAAATCATCCGGAGCGT
 AAGGTCTTGGTAATTGCGTCAGACATCGCGCGTTATGGTTTGGCCAGCGGAGGAGA
 AGTTACTCAAGGCGTGCGGGGCCGTAGCCATGATGATTACACAAAACCCCGGATTCT
 TTTCGATTGAAGACGATAGTGTTTTTCTCACAGAGGATATCTATGATTTCTGGCGGC
 CTGATTACTCCGAGTTCCCTGTAGTGGACGGGGCCCTTTCAAACCTCAACGTATATAG
 AGAGTTTTTCAGAAAGTTTGAACCGGCACAAGGAATTGTCCGGAAGAGGGCTGGAA
 GATTATCAAGCTATTGCTTTTCACATACCCTATACGAAGATGGGTAAGAAAGCGCTC
 CAGAGTGTTTTAGACCAAACCGATGAAGATAACCAGGAGCGCTTAATGGCTAGATA
 TGAGGAGTCTATTCGCTATAGCCGGAGAATTGGTAACCTGTACACAGGCAGCTTGT
 ACCTTGGTCTTACAAGCTTGTGGAAGTCTTAAAGTTTACAACCGGGGAGATCGG
 ATCGGCCTCTTTTCTATGGCAGTGGTGCGGTGTCCGAGTTCTTTACCGGGTATTTAG
 AAGAAAATTACCAAGAGTACCTGTTTCGCTCAAAGCCATCAAGAAATGCTGGATAGC
 CGGACTCGGATTACGGTCGATGAATACGAGACCATCTTTTCAGAGACTCTGCCAGA
 ACATGGTGAATGCGCCGAATATACGAGCGACGTCCCTTTTCTATAACCAAGATTGA
 GAACGACATTCGTTATTATAAAATCTGA (配列番号100)

30

40

E. ガリナーラム (E. gallinarum) mv a S 核酸配列

【化 1 0 1】

ATGAACGTCGGCATTGACAAAATTAATTTTTTCGTTCCACCGTATTATCTGGATATG
 GTCGACCTGGCCACGCACGCGAAGTGGACCCGAACAAATTTACAATTGGAATTGG
 ACAGGATCAGATGGCTGTGAGCAAAAAGACGCACGATATCGTAACATTCGCGGCTA
 GTGCCGCGAAGGAAATTTTAGAACCTGAGGACTTGCAAGCTATAGACATGGTTATA
 GTTGGTACCGAATCGGGCATTGACGAGAGCAAAGCATCCGCGGTCGTTTTACATCG
 TTTGTTGGGCGTACAACCTTTCGCTCGCAGTTTTTGAAATTAAGAAGCCTGTTACGG
 GGCAACCGCAGGCATTGAGTTTGCCAAGACTCATATACAAGCGAACCCGGAGAGCA
 AGGTCCTGGTAATTGCAAGCGATATAGCTCGGTATGGTCTTCGGTCAGGTGGAGAG
 CCCACACAAGGCGCAGGGGCAGTTGCTATGCTTCTCACGGCAAATCCCAGAATCCT
 GACCTTCGAAAACGACAATCTGATGTTAACGCAGGATATTTATGACTTCTGGAGACC
 ACTTGGTCACGCTTACCCTATGGTAGATGGCCACCTTTCCAATCAAGTCTATATTGA
 CAGTTTTAAGAAGGTCTGGCAAGCACATTGCGAACGCAATCAAGCTTCTATATCCG
 ACTATGCCGCGATTAGTTTTTCATATTCGGTATACAAAAATGGGTAAAGAAAGCCCTGC
 TCGCTGTTTTTGCAGATGAAGTGGAAACTGAACAGGAACGCGTTATGGCACGGTAT
 GAAGAGTCTATCGTATATTCACGCCGGATCGGCCAACTTGTATACGGGATCATTGTAC
 CTGGGGCTGATATCCTTATTGGAAAACAGTTCTCACCTGTCCGGCGGGCGACCCGATA
 GGATTGTTTAGTTATGGGAGTGGCGCTGTCAGCGAATTTTTCTCCGGTCGTTTAGTG
 GCAGGCTATGAAAATCAATTGAACAAAGAGGCGCATACCCAGCTCCTGGATCAGCG
 TCAGAAGCTTTCCATCGAAGAGTATGAGGCGATTTTTACAGATTCTTAGAAATTGA
 TCAGGATGCAGCGTTCTCGGATGACCTGCCATATTCATCCGCGAGATAAAAAACA
 CGATTCCGGTACTATAAGGAGAGCTGA (配列番号101)

10

20

E. カセリフラブス (*E. casseliflavus*) mva S 核酸配列

【化 1 0 2】

ATGAACGTTGGAATTGATAAAAATCAATTTTTTCGTTCCGCCCTATTTTCATTGATATGG
 TGGATCTCGCTCATGCAAGAGAAGTTGACCCCAACAAGTTCCTATAGGAATAGGC
 CAAGATCAGATGGCAGTAAACAAGAAAACGCAAGATATCGTAACGTTCCGCGATGCA
 CGCCGCGAAGGATATTCTGACTAAGGAAGATTTACAGGCCATAGATATGGTAATAG
 TGGGGACTGAGTCTGGGATCGACGAGAGCAAGGCAAGTGCTGTCGTATTGCATCGG
 CTTTTAGGTATTCAGCCTTTTTCGCGCTCCTTTGAAATTAAGGAGGCATGCTATGGG
 GCCACTGCCGGCCTTCAGTTTGCAAAAGCTCATGTGCAGGCTAATCCCCAGAGCAA
 GGTCTTGGTGGTAGCTTCCGATATAGCACGCTACGGACTGGCATCCGGAGGAGAAC
 CGACTCAAGGTGTAGGTGCTGTGGCAATGTTGATTTCCGCTGATCCAGCTATCTTGC
 AGTTAGAAAATGATAATCTCATGTTGACCCAAGATATATACGATTTTTGGCGCCCGG
 TCGGGCATCAATATCCTATGGTAGACGGCCATCTGTCTAATGCCGTCTATATAGACA
 GCTTTAAACAAGTCTGGCAAGCACATTGCGAGAAAAACCAACGGACTGCTAAAGAT
 TATGCTGCATTGTCGTTCCATATTCCGTACACGAAAATGGGTAAAGAAAGCTCTGTTA
 GCGGTTTTTTCGGAGGAAGATGAGACAGAACAAAAGCGGTTAATGGCACGTTATGA
 AGAATCAATTGTATACAGTCGTCGACTGGAAATCTGTATACTGGCTCACTCTATCT
 GGGCCTGATTTCTTACTGGAGAATAGTAGCAGTTTACAGGCGAACGATCGCATAG
 GTCTGTTTAGCTATGGTTCAGGGGCCGTTGCGGAATTTTTCACTGGCCTCTTGGTAC
 CGGGTTACGAGAAACAATTAGCGCAAGCTGCCCATCAAGCTCTTCTGGACGACCGG
 CAAAACTGACTATCGCAGAGTACGAAGCCATGTTTAATGAAACCATTGATATTGA
 TCAGGACCAGTCATTTGAGGATGACTTACTGTACTCCATCAGAGAGATCAAAAACA
 CTATTTCGCTACTATAACGAGGAGAATGAATAA (配列番号102)

30

40

アセトアセチル CoA シンターゼのアミノ酸配列

【化 1 0 3】

MTDVRFRIIGTGAYVPERIVSNDEVGAPAGVDDDDWITRKTGIRQRRWAADDQATSDLA
TAAGRAALKAAGITPEQLTVIAVATSTPDRPQPPTAAYVQHHLGATGTAADFVNAVCS
GTVFALSSVAGTLVYRGGYALVIGADLYSRILNPADRKT VVLFGDGAGAMVLGPTSTG
TGPIVRRVALHTFGGLTDLIRVPAGGSRQPLD TDGLDAGLQYFAMDGREVRRFVTEHLP
QLIKGFLHEAGVDAADISHFVPHQANGVMLDEVFGEHLHPRATMHRTVETYGNTGAAS
IPITMDAAVRAGSFRPGELVLLAGFGGMAASFALIEW (配列番号103)

L. ラクチス (L. l a c t i s) P K L 核酸配列

【化 1 0 4】

atgaccgagtataacacgcgaggcctatctgaaaaaactggataaatggtggcgtgcagcaacctatctgggtgcaggatgattttctgaaa
gaaaatccgctgttttagcgttacggcaccgccgattaaagcagaaaatctgaaagccaatccgattggtcattggggcaccgttagcggta
gacctttctgtatgcacatgcacaatcgtctgatcaacaaatgatcagaaaatgttttatatgggtggcgggcatgggtgcaggcaatg
gttgtccgagctatctggatggtagctataccgaagcatatccggaaattaccaggaatctggaaggtatgagccgtctgttaaacgttta
gctttccgggtggtattggtagccatagaccgcacagacaccgggtagcctgcatgaaggtggtgaactgggtatgtctgagccatgca
accggtgcaattctggatcagccggaacaaattgcatttcagttgttggatggtgaagccgaaaccggtccgctgatgaccagctggc
atagcatcaaatctcaaccgaaaaacgatgggtccattctgccatcctggatctgaatggcttaaaatcagcaatccgaccctgtttgc
acgtaccagtgtgtgatattcgaaaattttcgaaggcctgggctatagtcgcgttatattgaaaatgatgatattcacgactatatggccta
ccataaactggcagcagaagtgtttgataaagccatcgaagatatccatcagatccagaaaagatgcccggaagataatcggtatcagaatg
gtgaaatccggcatggccgattgttattgcacgtctgccgaaaggttgggtggccctcgttataatgattggagcgggtccgaaattgatg
gtaaaggtatgccgattgaacatagctttcgtgcacatcaggttccgctgccgctgagcagcaaaaatagggcaccctgccggaaattgtta
aatggatgacctcatatcagcctgaaacactgtttaatgcagatggttcactgaaagaggaaactgcgcgattttgcaccgaaaggcgaatg
cgtatggcaagtaatccggttaccaatggtggtgttgatagcagcaatctggttctgccggattggcaagaatttgcaaacccgattagcgaa
aataatcgtggtaaactgctccggacaccaatgataatatggaatgaatgtgctgagcaagtattttgccgaaatcgtaaactgaatccga
cacgttttcgctgtttggtccggatgaaaccatgagcaatcgtttttgggaaatgttcaaaagtaccaatcgtcagtggtgaggttatcaaa
aatccgaacgatgaattcattagtcgggaaggtcgtattattgatagccagctgagcgaacatcaggcagaaggttggctggaaaggctatac
cctgaccggctgtagccgtgctttgcaagctatgaaagctttctgcgtgttggatagcatgctgaccagcatttcaaatggattcgtcag
gcagccgaccgaaatggcgtcatgattatccgagcctgaatgttattagcaccagcaccgttttcagcaggatcataatggtataccatc
aggatccgggtatgctgacacatctggcagagaaaaaagcgattttatccgtcagtatctgctgccgatggtaataccctgctggcagtg
ttgatcgtgcatttcaggatcgtagcaaaatcaatcatattgtggaagcaaacagcctcgtcagcagtggtttacaaagaagaagccgag
aaactggccaccgatggcattgcaaccattgattggcgagcaccgcaaaagatggcgaaagcagttgatctggttttgaagtggcggtg
cagaaccgaccattgaaacctggcagccctgcatctggttaatgaagtgttccgagggcaaaatttcgctatgtaatgttgtgagctggg
tcgtctgcagaaaaagaaagggtgactgaatcaagaacgtgaactgtccgatgaagaattcgagaaatatttcggtccgagcggtaacccg
gttatttttggtttcatggttatgaggatctgattgaaagcatctttatcagcgtggtcatgatggcctgatcgttcatggctatcgcaagatgg
tgatattaccaccacctatgatatgcgtgtttatagcgaactggatcgttttcacaggccattgatgcaatgcagggtactgtatgtgaatcgaa
agttaatcagggtctggccaaagcatttatcgatcgtatgaaacgtaccctggtgaaacatttgaagtgaccgtaatgaaggcgtggatatt
ccggattttaccgaatgggttggagcgatctgaagaaa (配列番号104)

L. ラクチス (L. l a c t i s) P K L アミノ酸配列

【化 1 0 5】

MTEYNSEAYL KKLDKWWRAA TYLGAGMIFL KENPLFSVTG TPIKAENLKA
 NPIGHWGTVS GQTFLYAHAN RLINKYDQKM FYMGGPGHGG QAMVVPSYLD
 GSYTEAYPEI TQDLEGMSRL FKRFSFPGGI GSHMTAQTPG SLHEGGELGY
 VLSHATGAIL DQPEQIAFAV VGDGEAETGP LMTSWHSIKF INPKNDGAIL
 PILDLNGFKI SNPTLFARTS DVDIRKFFEG LGYSPRYIEN DDIHDY MAYH
 KLAAEVFDKA IEDIHQIQKD AREDNRYQNG EIPAWPIVIA RLPKGWGGPR
 YNDWSGPKFD GKGMPIEHSF RAHQVPLPLS SKNMGTLP EF VKWMTSYQPE
 TLFNADGSLK EELRDFAPKG EMRMASNPVT NGGVDSSNLV LPDWQEFANP
 ISENNRGKLL PDTNDNMDMN VLSKYFAEIV KLNPTFRFLF GPDETMSNRF
 WEMFKVTNRQ WMQVIKNPND EFISPEGRII DSQLESHQAE GWLEGYTLTG
 RTGAFASYES FLRVVDSMLT QHFKWIRQAA DQKWRHDYPS LNVISTSTVF
 QQDHNGYTHQ DPGMLTHLAE KKSDFIRQYL PADGNTLLAV FDRAFQDRSK
 INHIVASKQP RQQWFTKEEA EKLATDGIAT IDWASTAKDG EAVDLVFASA
 GAETIETLA ALHLVNEVFP QAKFRYVNVV ELGRLQKKKG ALNQERELSD
 EEFKEYFGPS GTPVIFGFHG YEDLIESIFY QRGHDGLIVH GYREDGDITT
 TYDMRVYSEL DRFHQAIDAM QVLYVNRKVN QGLAKAFIDR MKRTL VKHFE
 VTRNEGVDIP DFTEWWSDL KK (配列番号105)

10

【図 1】

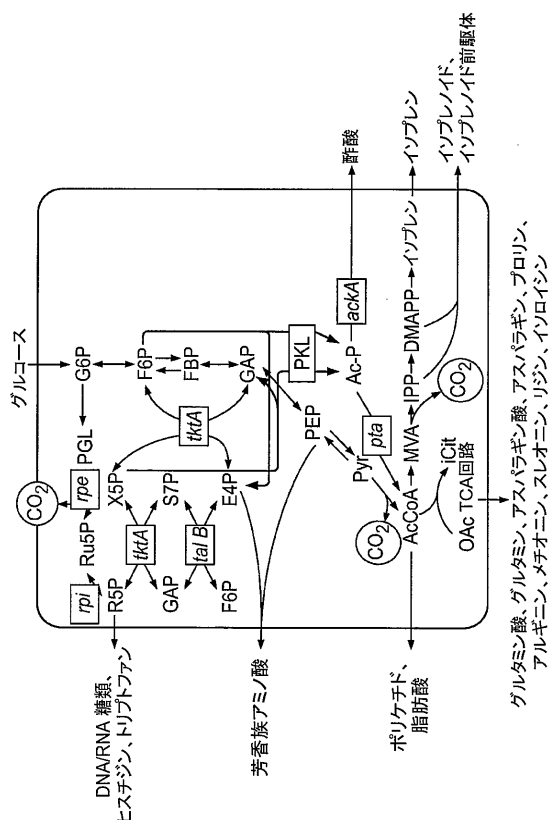


FIG. 1

【図 2】

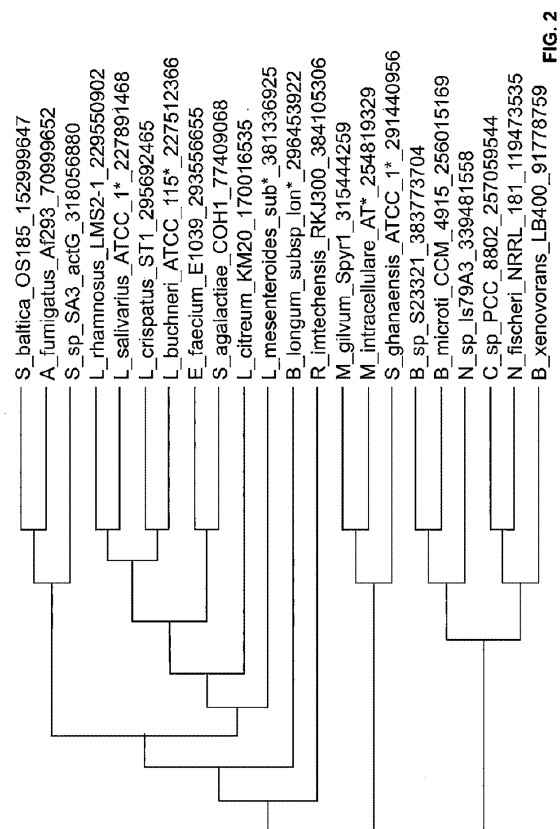


FIG. 2

【図 3】

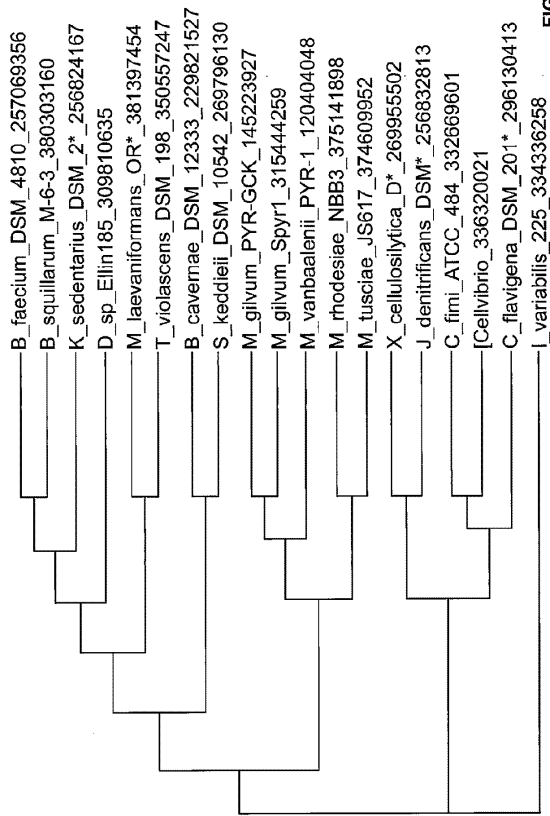


FIG. 3

【図 4】

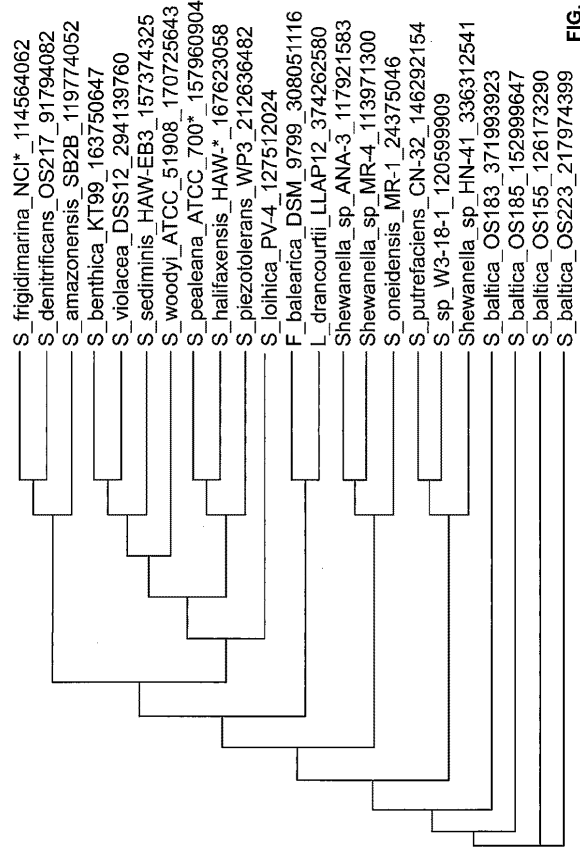


FIG. 4

【図 5】

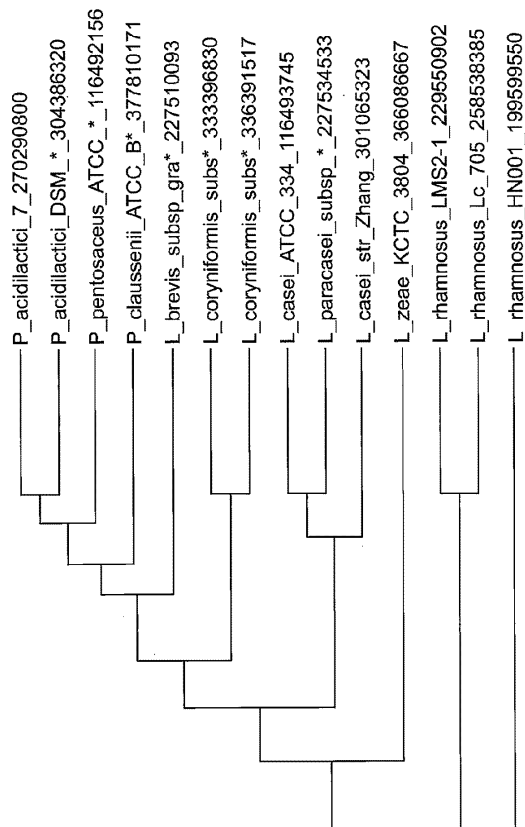


FIG. 5

【図 6】

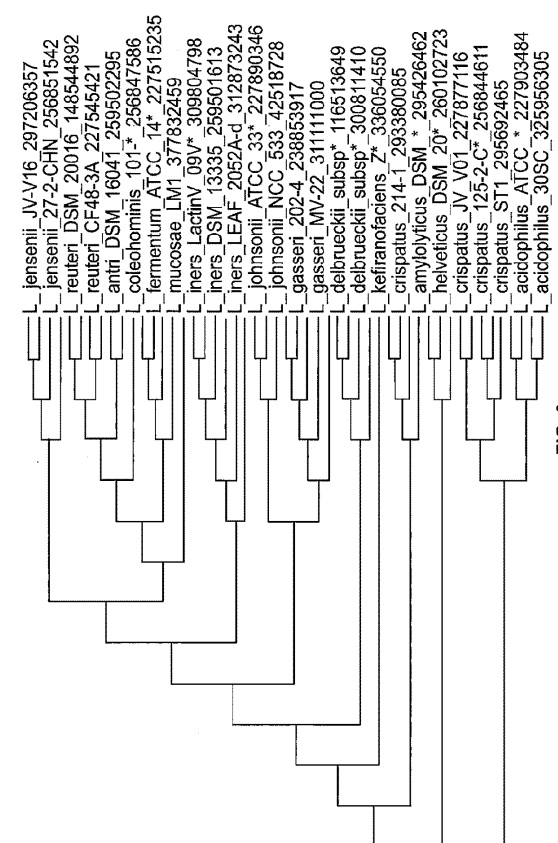


FIG. 6

【図 7】

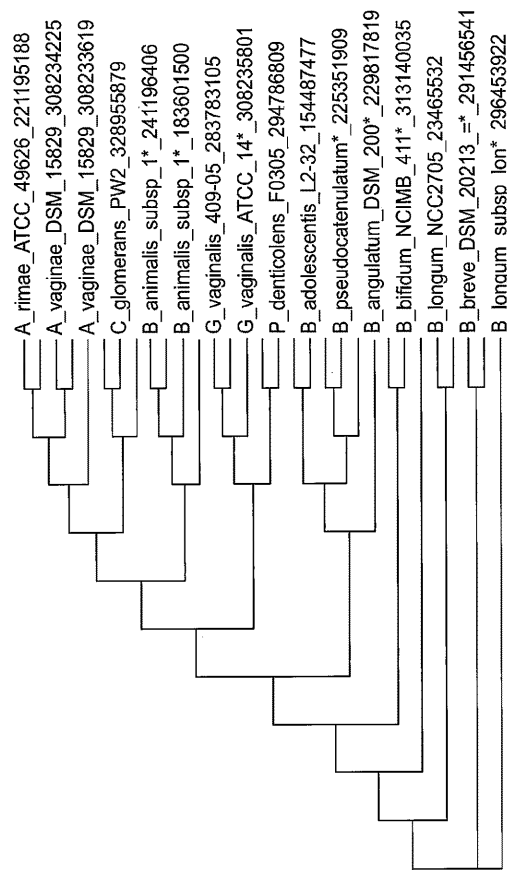


FIG. 7

【図 8】

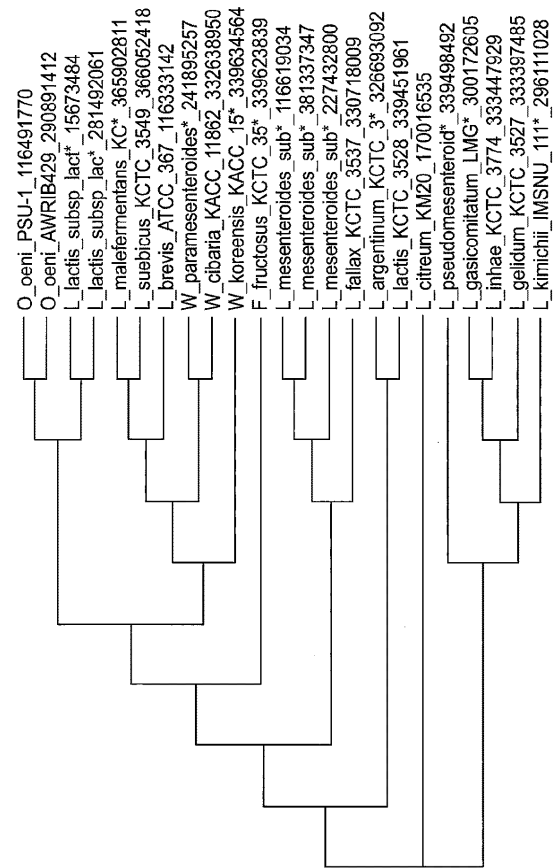


FIG. 8

【図 9】

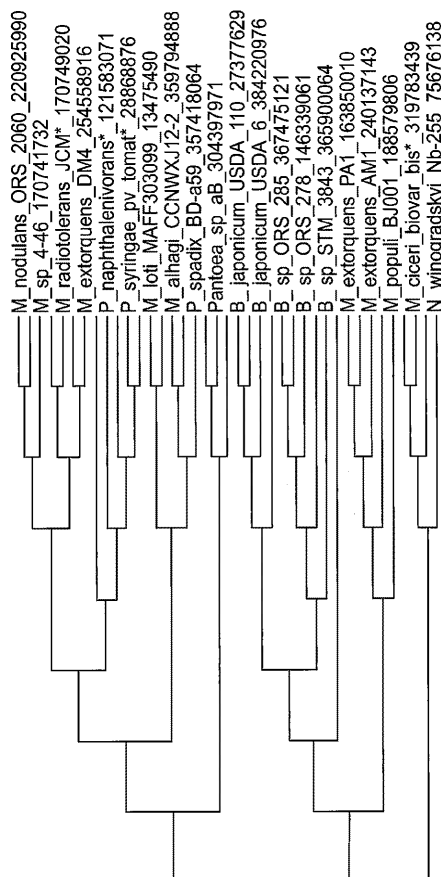


FIG. 9

【図 10】

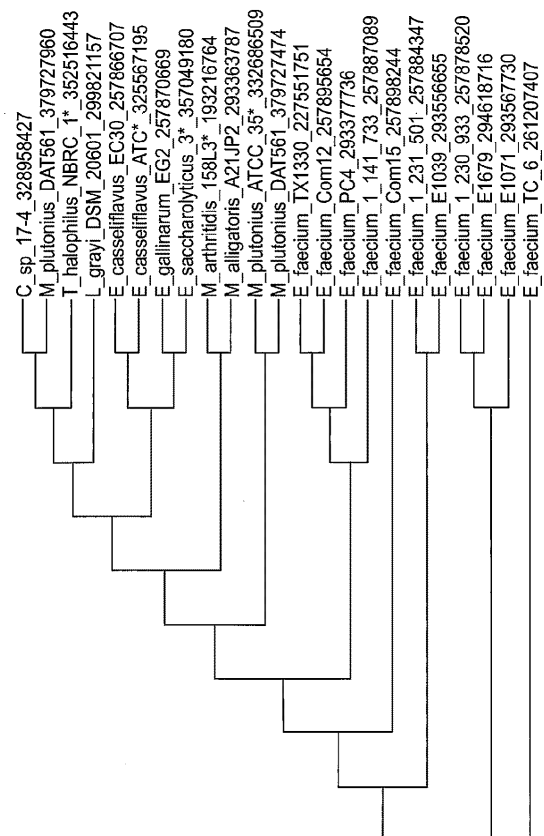


FIG. 10

【図 1 1】

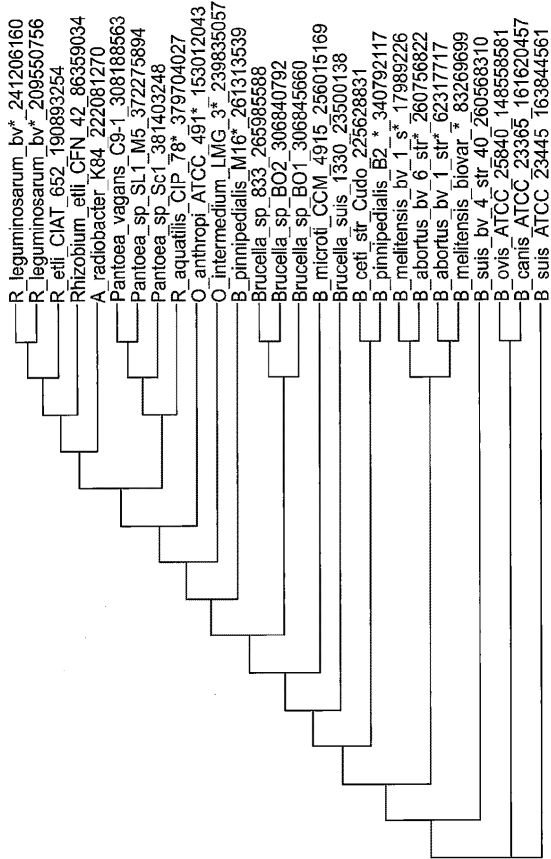


FIG. 11

【図 1 2】

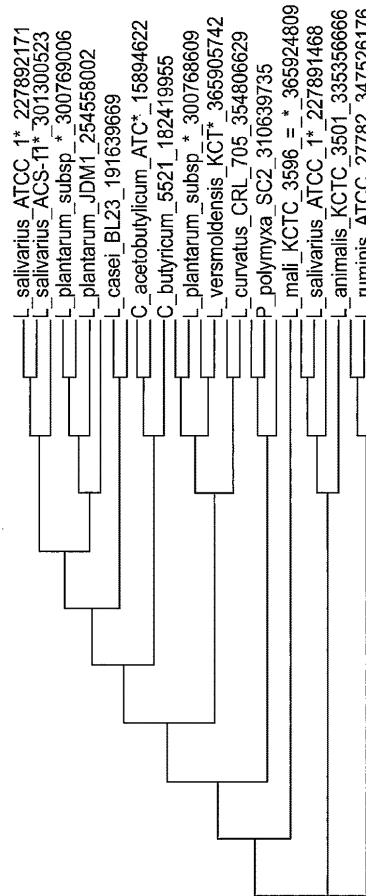


FIG. 12

【図 1 3】

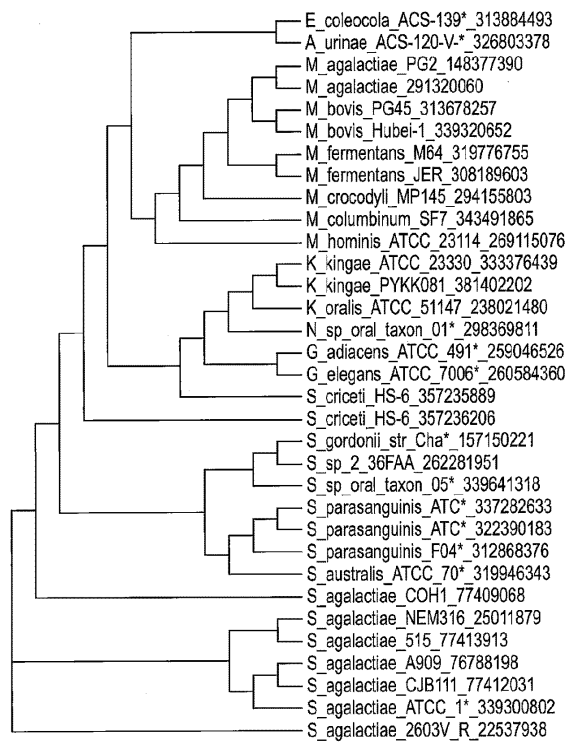


FIG. 13

【図 1 4】

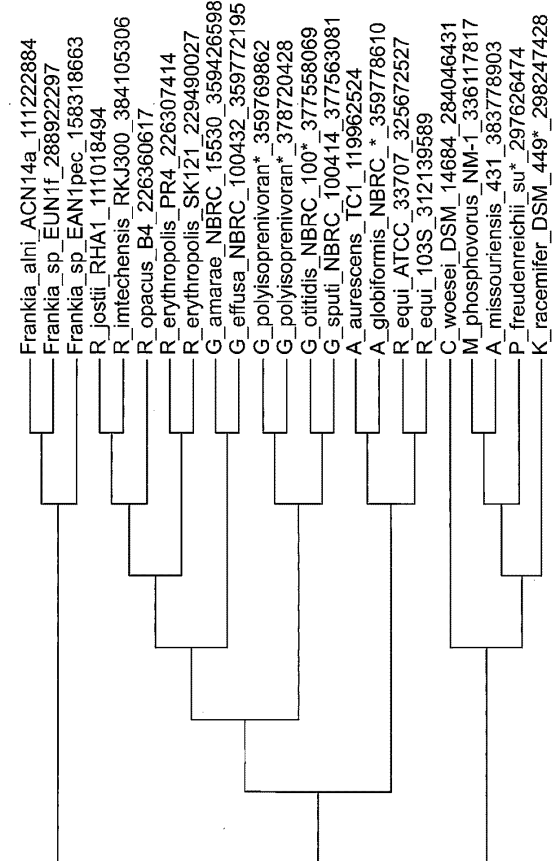


FIG. 14

【図 15】

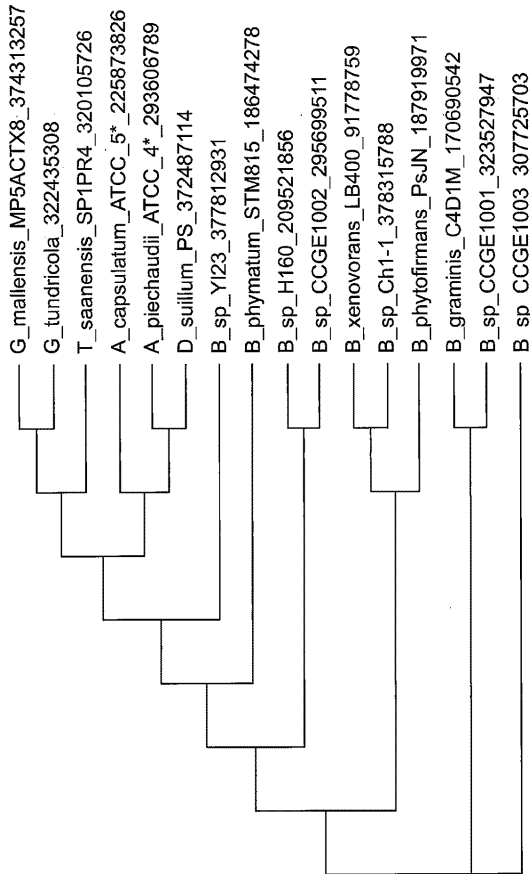


FIG. 15

【図 16】

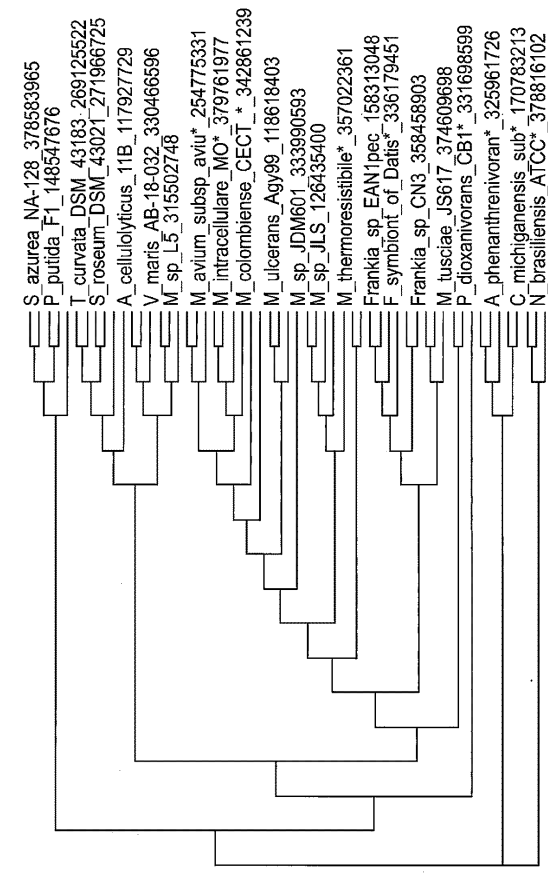


FIG. 16

【図 17】

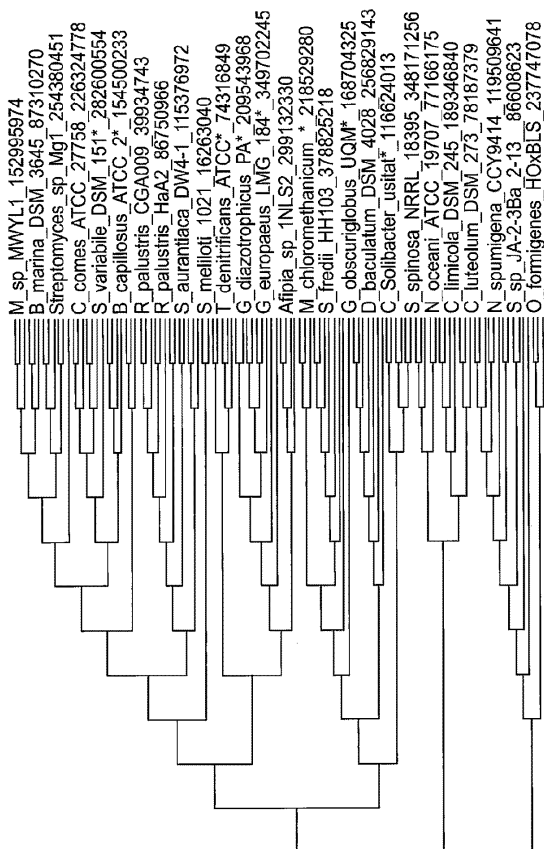


FIG. 17

【図 18】

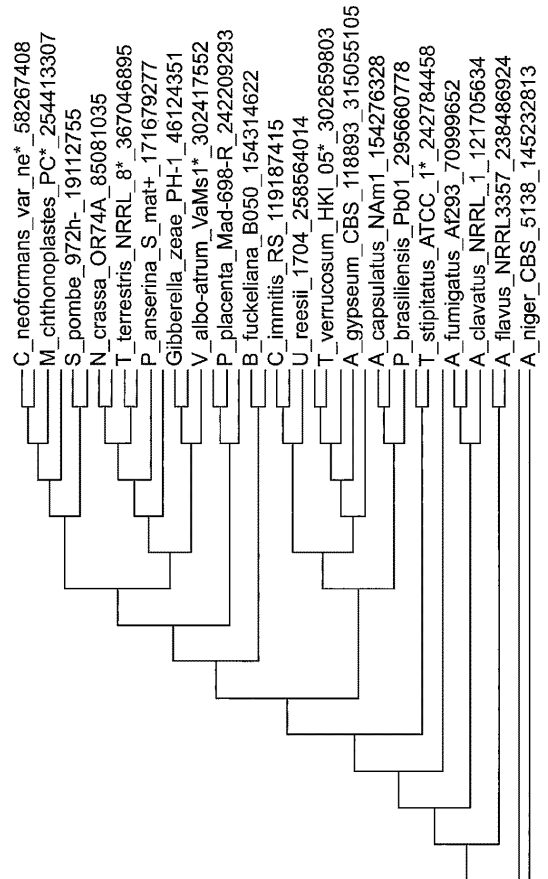


FIG. 18

【図 19】

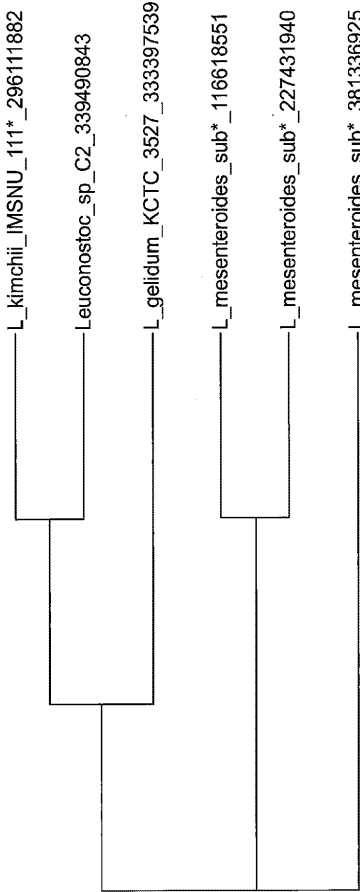


FIG. 19

【図 20】

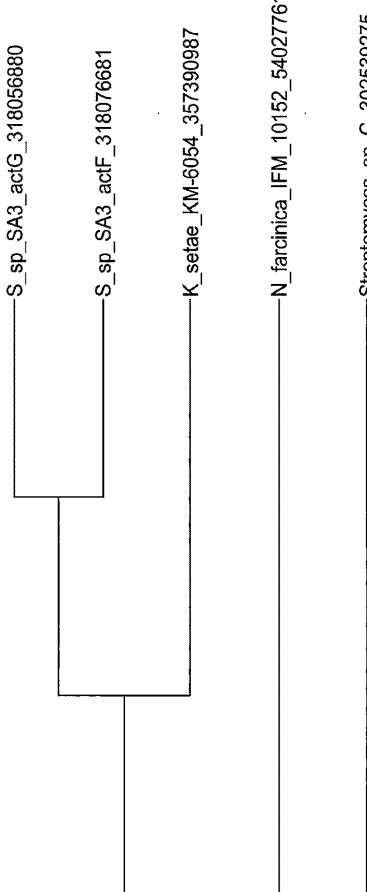


FIG. 20

【図 21】

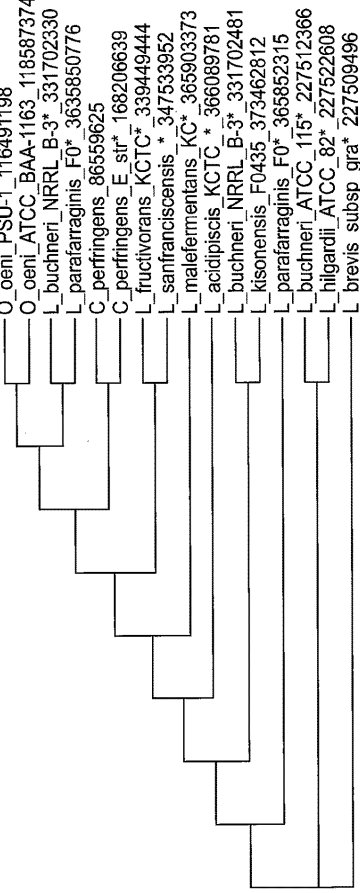


FIG. 21

【図 22】

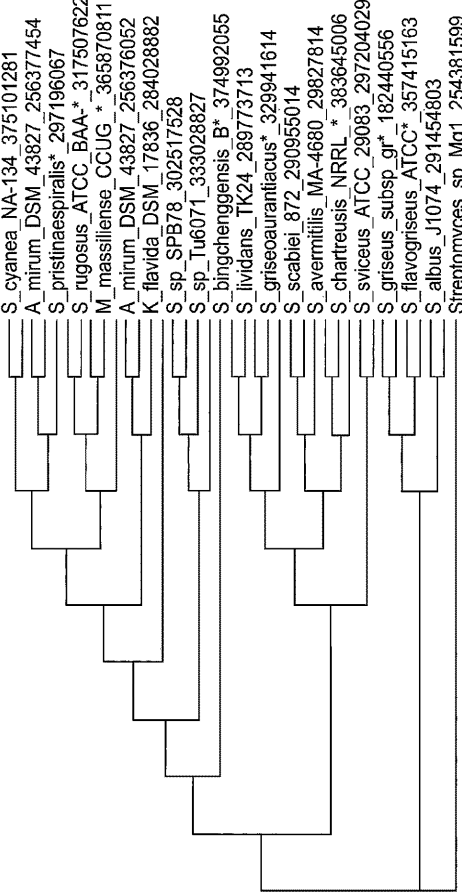
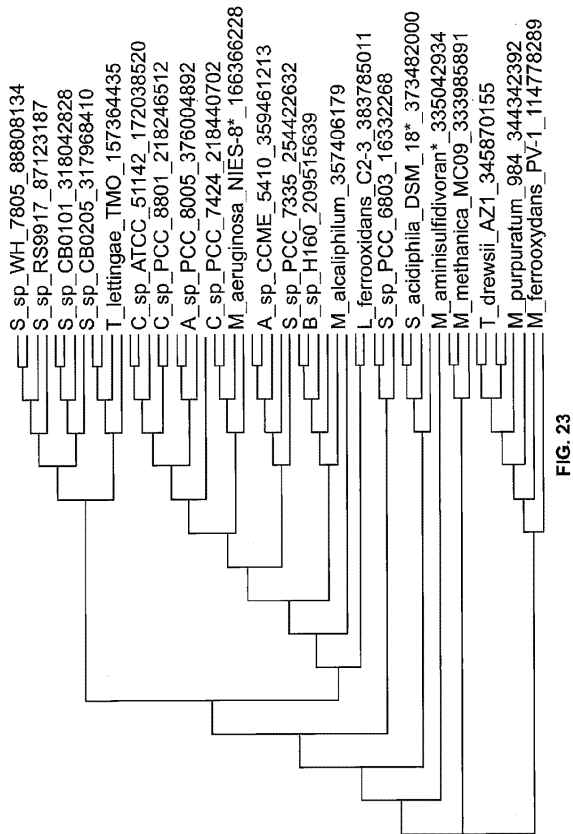
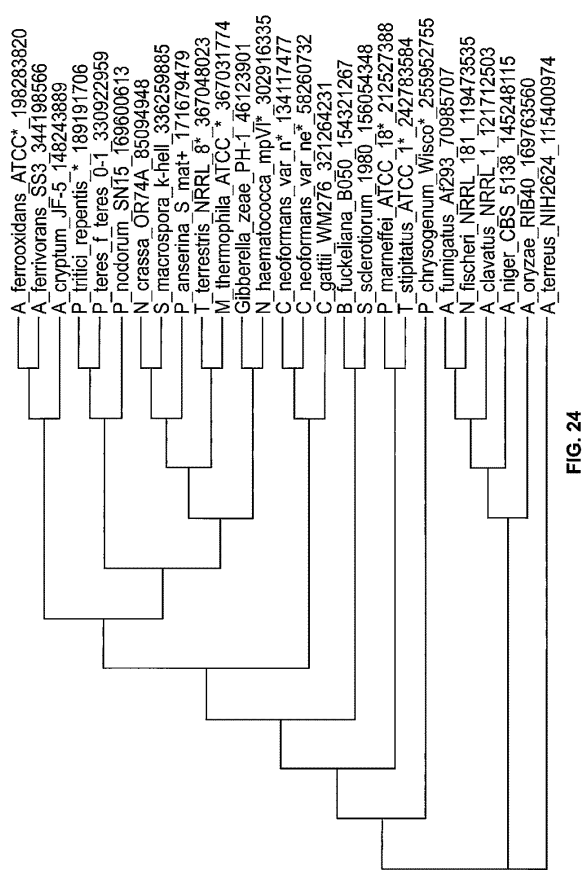


FIG. 22

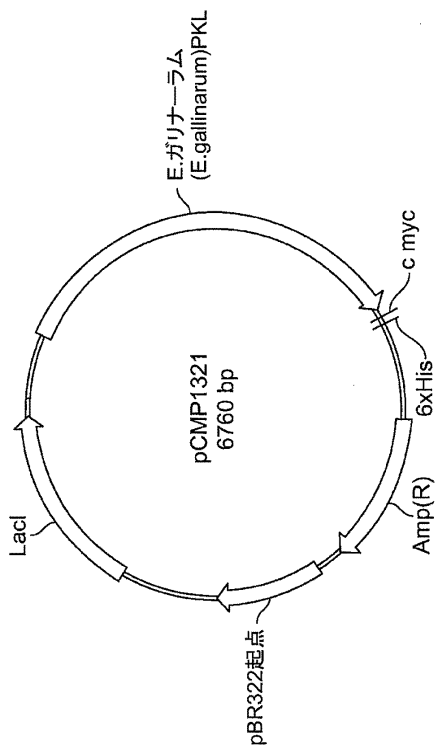
【図 23】



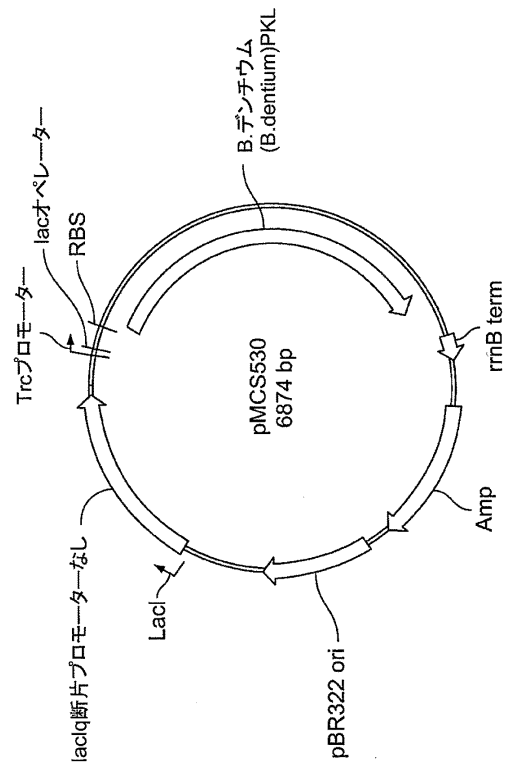
【図 24】



【図 25】



【図 26】



【図 27】

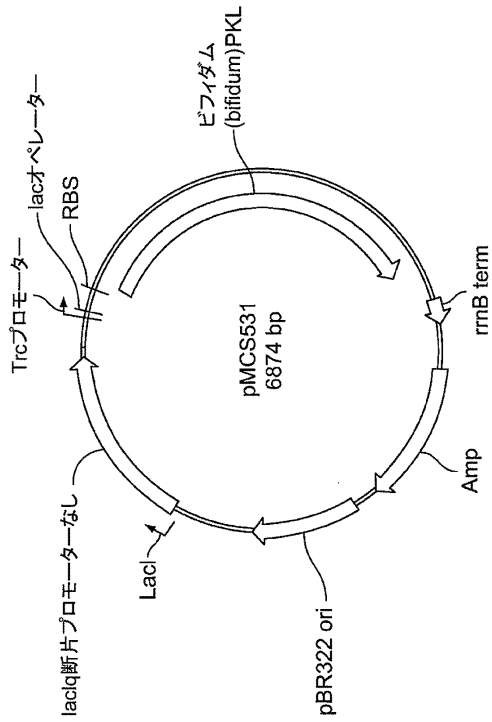


FIG. 27

【図 28】

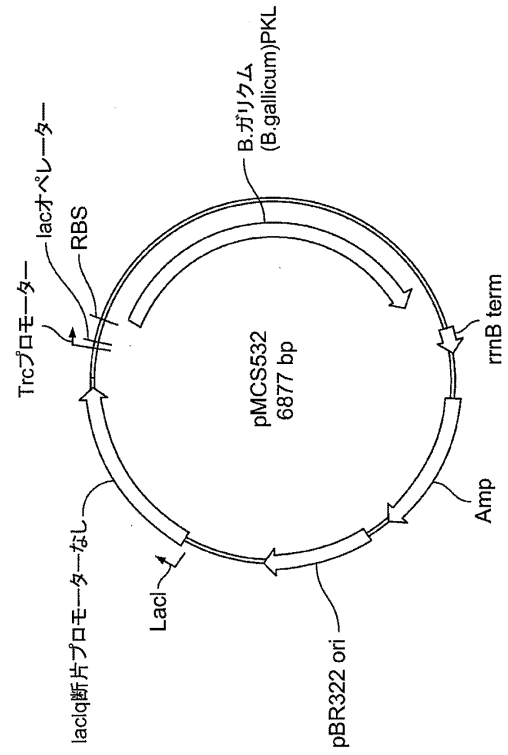


FIG. 28

【図 29】

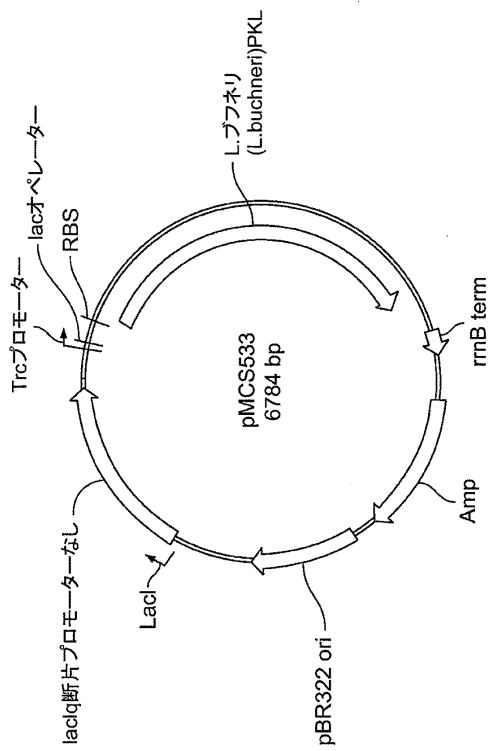


FIG. 29

【図 30】

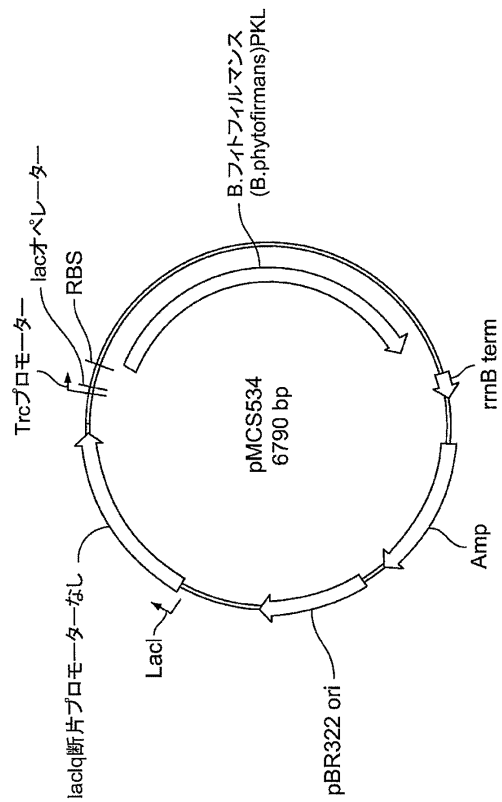


FIG. 30

【図 3 1】

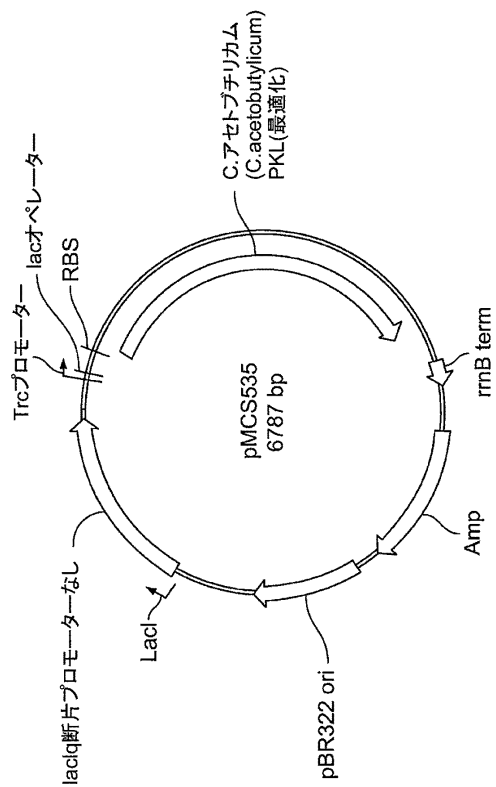


FIG. 31

【図 3 2】

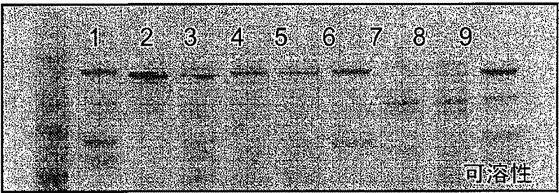


FIG. 32A

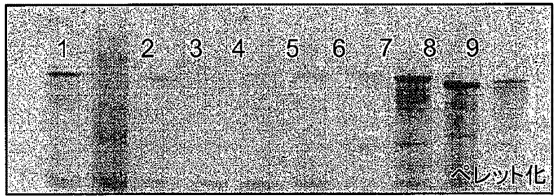


FIG. 32B

【図 3 3】

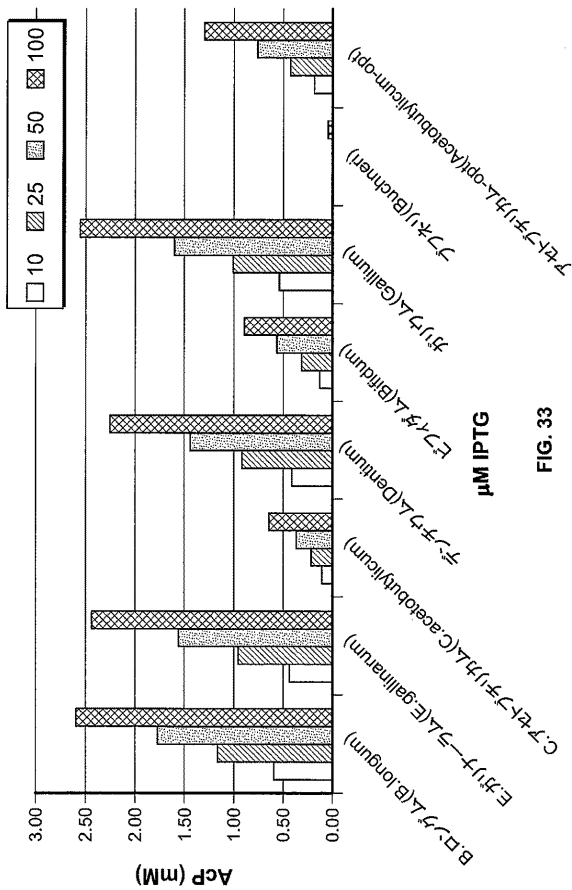


FIG. 33

【図 3 4】

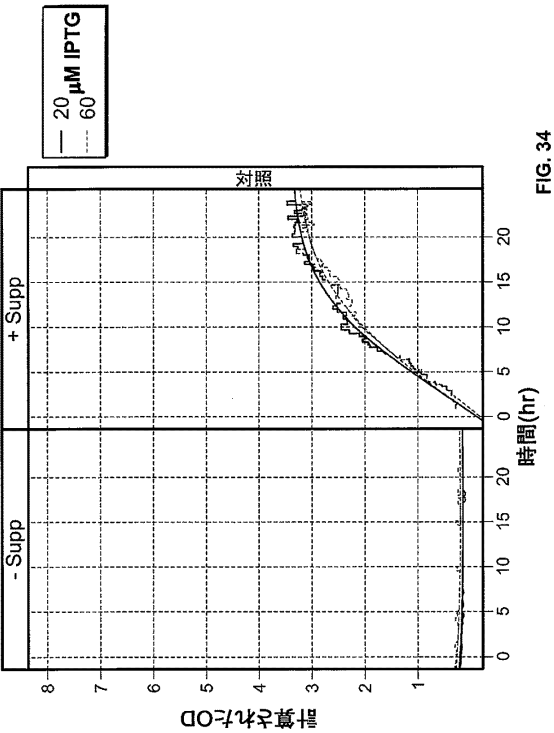


FIG. 34

【図 35】

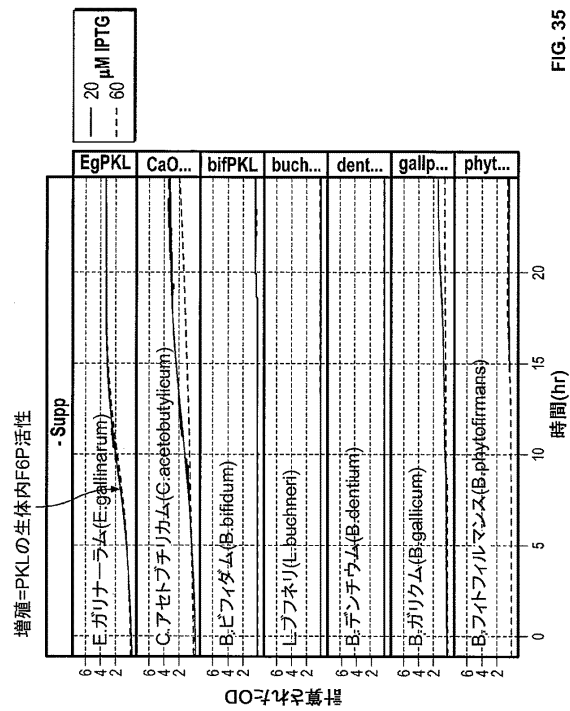


FIG. 35

【図 36】

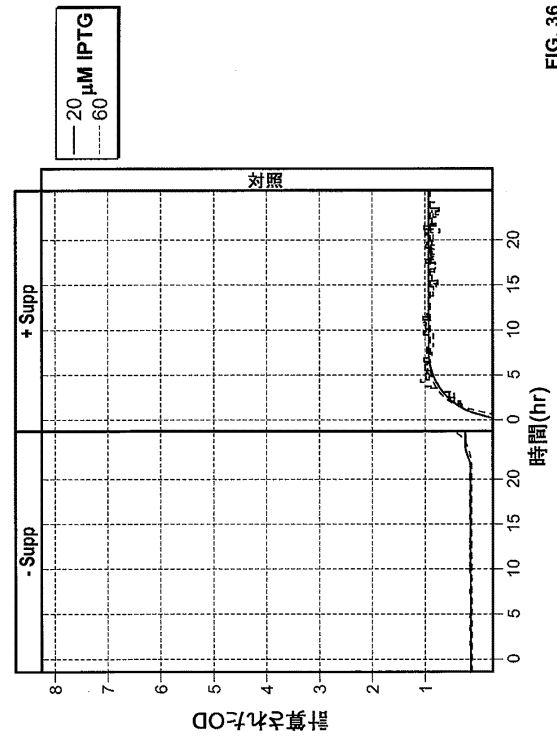


FIG. 36

【図 37】

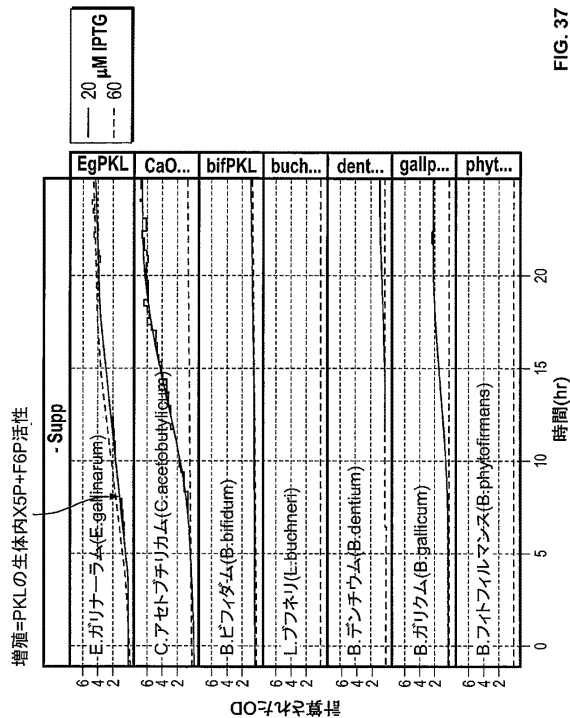


FIG. 37

【図 38】

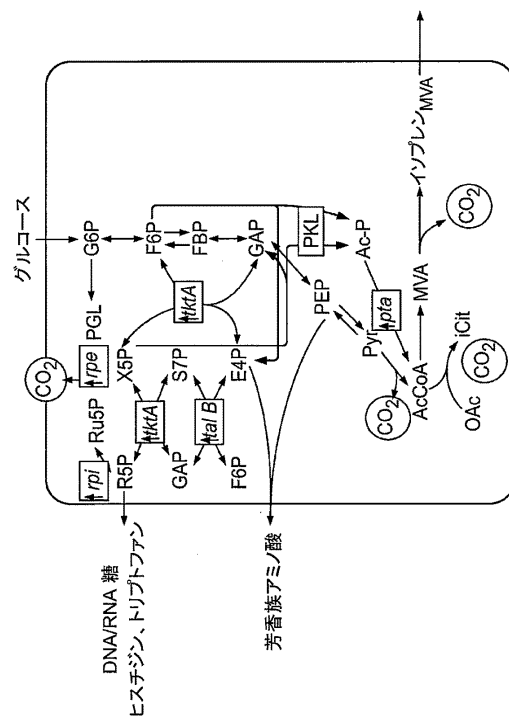


FIG. 38

【図 39】

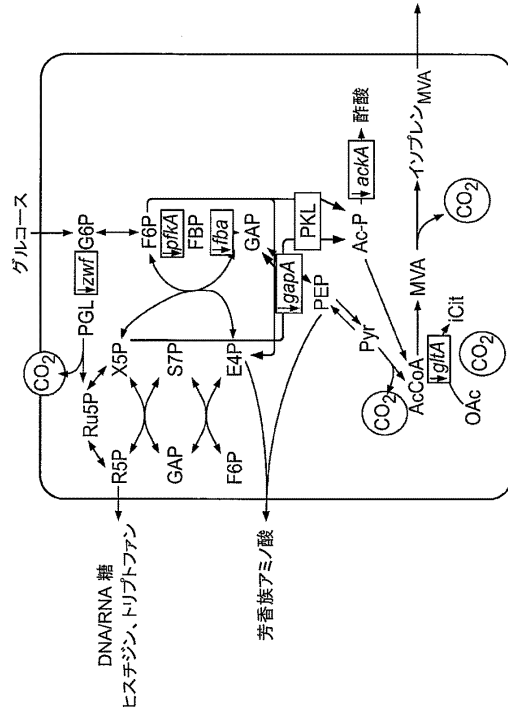


FIG. 39

【図 40】

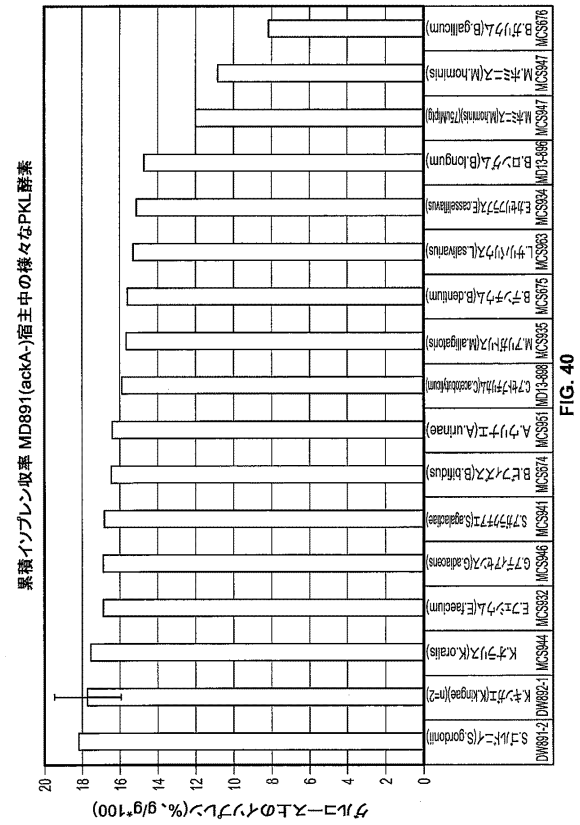


FIG. 40

【図 41】

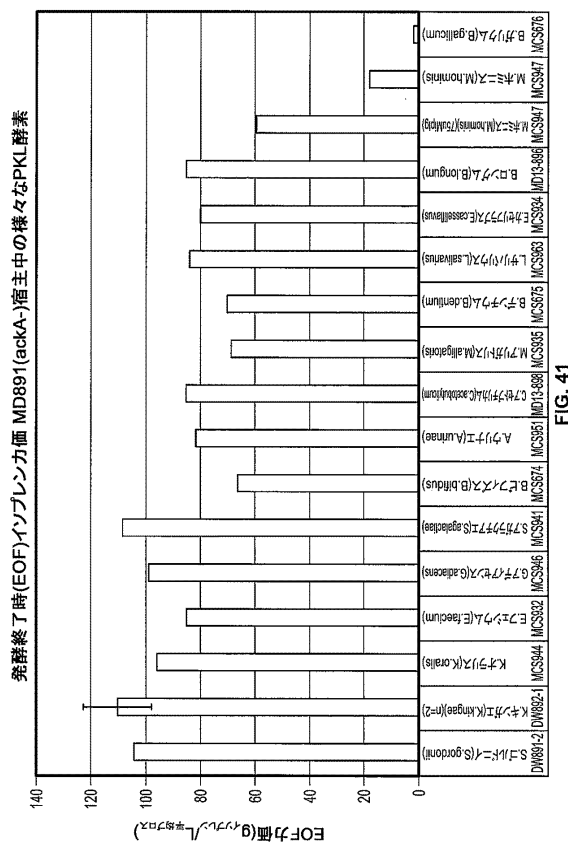


FIG. 41

【図 42】

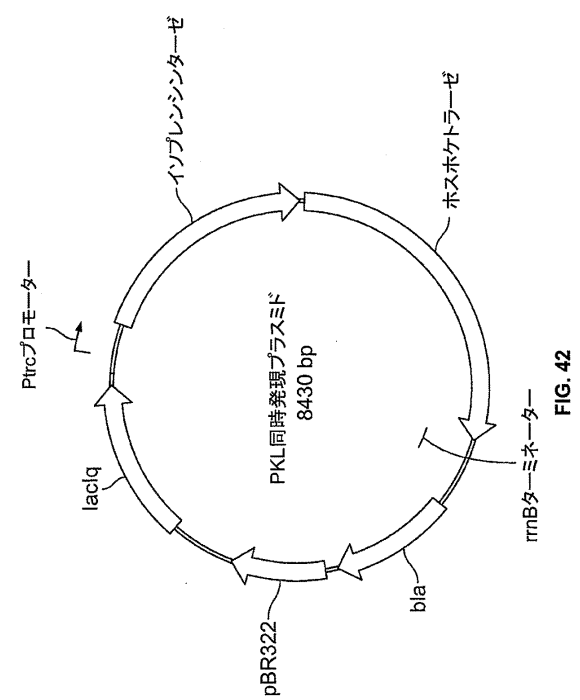


FIG. 42

【配列表】

0006530375000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 5/02 (2006.01) C 1 2 P 5/02

(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 100131082

弁理士 小原 正信

(74)代理人 100185535

弁理士 逢坂 敦

(72)発明者 ベック、ザカリー・キュー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925 ダニスコ・ユーエス・インク

(72)発明者 ムニョス、ジェフリー・ダブリュー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925 ダニスコ・ユーエス・インク

(72)発明者 ウェルス、デレク・エイチ

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925 ダニスコ・ユーエス・インク

(72)発明者 ヤオ、ジエン

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925 ダニスコ・ユーエス・インク

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 国際公開第2012/149491 (WO, A2)

xylulose-5-phosphate phosphoketolase [Enterococcus faecium Com12]., 2012年11月27日, accession no. ZP_05675307, URL, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/257895654?sat=4&satkey=87017062>

xylulose-5-phosphate phosphoketolase [Streptococcus agalactiae ATCC13813]., 2011年1月20日, accession no. EFV98011, URL, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/319745714?sat=17&satkey=6270800>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 9/00-9/99

C 1 2 N 15/00-15/90

UniProt/GeneSeq

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/

WPIDS (STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

PubMed