

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5876822号
(P5876822)

(45) 発行日 平成28年3月2日(2016.3.2)

(24) 登録日 平成28年1月29日(2016.1.29)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21
C 12 P 7/18 (2006.01)	C 12 P 7/18
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00 A

請求項の数 9 (全 96 頁)

(21) 出願番号	特願2012-508804 (P2012-508804)	(73) 特許権者	511062818 ゲノマチカ、インク。 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 121 サン デイエゴ 4757 ネク サス センター ドライブ
(86) (22) 出願日	平成22年4月30日(2010.4.30)	(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(65) 公表番号	特表2012-525158 (P2012-525158A)	(72) 発明者	アントホンイ ピー、ブルガルド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 121 サン デイエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ 10520
(43) 公表日	平成24年10月22日(2012.10.22)	(72) 発明者	マルク ジェイ、ブルク アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 121 サン デイエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ 10520
(86) 國際出願番号	PCT/US2010/033300		
(87) 國際公開番号	W02010/127319		
(87) 國際公開日	平成22年11月4日(2010.11.4)		
審査請求日	平成25年4月26日(2013.4.26)		
(31) 優先権主張番号	61/174,473		
(32) 優先日	平成21年4月30日(2009.4.30)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1, 3-ブタンジオールの產生のための生物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

1,3-ブタンジオール(1,3-BDO)経路を有する非天然大腸菌であって、1,3-BDOを產生するのに十分な量で発現する1,3-BDO経路酵素を各々コードする少なくとも3つの外来性核酸を含み、該1,3-BDO経路酵素が、3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)、3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素、及びアセトアセチル-CoA還元酵素(ケトン還元)である、前記非天然大腸菌。

【請求項2】

請求項1に記載の非天然大腸菌であって、

(a) 前記3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)が、acr1、sucD、bphG、bld、adhE、Msed_0709、mcr、asd-2、Saci_2370、Ald、及びeutEからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

(b) 前記3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素が、alrA、ADH2、yqhD、bdh I、bdh II、adhA、4hbd、adhI、P84067、mmsb、dhat、及び3hidhからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、又は

(c) 前記アセトアセチル-CoA還元酵素(ケトン還元)が、thrA、akthr2、hom6、hom1、hom2、fadB、fadJ、Hbd2、Hbd1、hbd、HSD17B10、phbB、phaB、Msed_1423、Msed_0399、Msed_0389、Msed_1993、adh、adhA、adh-A、mdh、ldhA、ldh、及びbdhからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、前記非天然大腸菌。

【請求項3】

10

20

請求項 1 又は 2 記載の非天然大腸菌であって、
前記非天然大腸菌が、培地中にあり、該培地中の酸素の量が、溶存酸素について飽和の 10%未満である、前記非天然大腸菌。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の非天然大腸菌であって、
前記少なくとも3つの外来性核酸のうちの少なくとも1つが、異種性核酸である、前記非天然大腸菌。

【請求項 5】

1,3-BDOを產生する方法であって、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の非天然大腸菌を1,3-ブタンジオールを產生する条件下で十分な時間培養することを含む、前記方法。

10

【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の非天然大腸菌を含む培地。

【請求項 7】

さらに1,3-BDOを含む、請求項 6 記載の培地。

【請求項 8】

1,3-BDOを、化合物、ポリマー又は他の製品に化学的に変換することをさらに含む、請求項 5 記載の方法。

【請求項 9】

前記化合物、ポリマー又は他の製品が、ブタジエン、ゴム、タイヤ、ラテックス、又は樹脂である、請求項 8 記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の記述)

本出願は、2009年4月30日に出願された米国仮出願第61 / 174,473号の優先権の利益を主張し、当該内容は引用によりその全てが本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

本発明は一般に、有機化合物を產生することができる生合成過程及び生物に関する。より具体的には、本発明は、有用化学物質1,3-ブタンジオールを產生することができる非天然生物に関する。

30

【0003】

1,3-ブタンジオール (1,3-BDO) は、その水和を介してアセチレンから伝統的に產生される4炭素ジオールである。次に、結果として生じるアセトアルデヒドを3-ヒドロキシブチルアルデヒドに転換して、これをその後還元して、1,3-BDOを形成する。より近年において、アセチレンは、アセトアルデヒドの源としてあまり高価ではないエチレンによって置き換えてきた。1,3-BDOは、食品調味料のための有機溶媒として普遍的に用いられている。また、1,3-BDOは、ポリウレタン樹脂及びポリエステル樹脂のためのコモノマーとして用いられており、血糖降下薬として広く採用されている。光学的に活性のある1,3-BDOは、生物活性のある化合物及び液晶の合成のための有用な出発材料である。1,3-ブタンジオールの実質的な商業的使用は、その後に1,3-ブタジエンを生じる脱水であり (Ic hikawaらの文献 (J. of Molecular Catalysis A-Chemical, 256:106-112(2006) ; Ichikawaらの文献 (J. of Molecular Catalysis A-Chemical, 231:181-189(2005))) 、250億ボンド / 年の石油化学物質が合成ゴム (例えば、タイヤ) 、ラテックス、及び樹脂を製造するのに用いられる。アセチレン又はエチレンのいずれかについての石油ベースの供給原料に関する信頼は、1,3-ブタンジオールへの及びブタジエンへの再生可能な供給原料ベースのルートの開発を保証する。

40

【0004】

従って、1,3-BDOを產生する微生物及びその使用方法を開発する必要性が存在する。本発明は、この必要性を満たし、その上、関連する利点を提供する。

50

【発明の概要】

【0005】

いくつかの実施態様において、本発明は、1,3-ブタンジオール(1,3-BDO)を產生するのに十分な量で発現する1,3-BDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外来性核酸を有する1,3-BDO経路を有する微生物を含む非天然微生物に関する。1,3-BDO経路には、2-アミノ-4-ケトペンタノアート(AKP)チオラーゼ、AKP脱水素酵素、2-アミノ-4-ヒドロキシペンタノアートアミノトランスフェラーゼ、2-アミノ-4-ヒドロキシペンタノアート酸化還元酵素(脱アミノ化)、2-オキソ-4-ヒドロキシペンタノアートデカルボキシラーゼ、3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素、AKPアミノトランスフェラーゼ、AKP酸化還元酵素(脱アミノ化)、2,4-ジオキソペンタノアートデカルボキシラーゼ、3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(ケトン還元)、3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(アルデヒド還元)、4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素、AKPデカルボキシラーゼ、4-アミノブタン-2-オンアミノトランスフェラーゼ、4-アミノブタン-2-オン酸化還元酵素(脱アミノ化)、4-アミノブタン-2-オンアンモニア-リアーゼ、ブテノンヒドラターゼ、AKPアンモニア-リアーゼ、アセチルアクリラートデカルボキシラーゼ、アセトアセチル-CoA還元酵素(CoA依存性、アルデヒド形成)、アセトアセチル-CoA還元酵素(CoA依存性、アルコール形成)、アセトアセチル-CoA還元酵素(ケトン還元)、3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、及びクロトナーゼからなる群から選択される酵素を含む。

【0006】

いくつかの実施態様において、本発明は、1,3-BDOを產生する条件下及び十分な時間で、このような非天然微生物を培養することを含む、1,3-BDOを產生する方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1は、アラニンから1,3-BDOへの経路を示す。酵素は、A)AKPチオラーゼ、B)AKPアミノトランスフェラーゼ又はAKP酸化還元酵素(脱アミノ化)、C)2,4-ジオキソペンタノアートデカルボキシラーゼ、D)3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(アルデヒド還元)、E)AKPデカルボキシラーゼ、F)4-アミノブタン-2-オンアンモニア-リアーゼ、G)ブテノンヒドラターゼ、H)4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素、I)AKPアンモニア-リアーゼ、J)アセチルアクリラートデカルボキシラーゼ、K)4-アミノブタン-2-オンアミノトランスフェラーゼ又は4-アミノブタン-2-オン酸化還元酵素(脱アミノ化)、L)AKP脱水素酵素、M)2-アミノ-4-ヒドロキシペンタノアートアミノトランスフェラーゼ又は2-アミノ-4-ヒドロキシペンタノアート酸化還元酵素(脱アミノ化)、N)2-オキソ-4-ヒドロキシペンタノアートデカルボキシラーゼ、O)3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(ケトン還元)、及びP)3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素である。

【図2】図2は、アセトアセチル-CoAから1,3-ブタンジオールへの経路を示す。酵素は、A)アセトアセチル-CoA還元酵素(CoA依存性、アルデヒド形成)、B)3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(ケトン還元)、C)3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素、D)アセトアセチル-CoA還元酵素(CoA依存性、アルコール形成)、E)3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(アルデヒド還元)、F)4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素、G)アセトアセチル-CoA還元酵素(ケトン還元)、H)3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)、及びI)3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)である。

【図3】図3は、4-ヒドロキシブチリル-CoAから1,3-ブタンジオールへの経路を示す。酵素は、A)4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、B)クロトナーゼ、C)3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)、D)3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素、及びE)3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)である。

【図4】図4は、3-ヒドロキシブチル-CoAに関して有意な活性を示すアルデヒド脱水素酵素を示す。

【図5】図5は、透析前後の3-ヒドロキシブチリル-CoAに関するクロストリジウム・サッカロバーブチルアセトニカムからのb1dの比活性を示す。

10

20

30

40

50

【図6】図6は、3-ヒドロキシブチルアルデヒドが基質として添加された場合の、及び基質を有さない対照試料における1,3-BDO濃度を示す。アルコール脱水素酵素についてのGI番号を示す。

【図7】図7は、3-ヒドロキシブチリル-CoAが基質として添加された場合の、及び基質を有さない対照試料における1,3-BDO濃度を示す。アルコール脱水素酵素についてのGI番号を示す。ともに試験されたアルデヒド脱水素酵素についてのGI番号は、163762382である。

【発明を実施するための形態】

【0008】

(本発明の詳細な説明)

10

本発明は、1,3-ブタンジオール(1,3-BDO)の產生を触媒する酵素をコードする遺伝子を発現する非天然微生物に一部関する。本明細書に開示された1,3-ブタンジオールの產生のための経路は、3つの前駆体：(i) D-アラニン、(ii) アセトアセチル-CoA、及び(iii) 4-ヒドロキシブチリル-CoAに基づいている。これらの経路を成功裏に操作することは、十分な活性及び特異性を有する適切なセットの酵素を同定すること、該経路の相応する遺伝子を產生宿主へとクローニングすること、発酵条件を最適化すること、及び発酵後の産物形成についてアッセイすることを必要とする。

【0009】

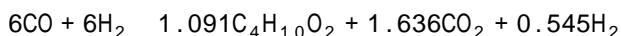
アラニンから1,3-BDOへの転換は、図1に示される約5つの酵素工程におけるいくつかの経路によって達成することができる。すべての経路の第一の工程(工程A)において、アラニン及びアセチル-CoAは、高度に選択的な酵素である2-アミノ-4-ケトペンタノアートチオラーゼによって組み合わされる。この反応産物である2-アミノ-4-オキソペンタノアート(AKP)は次に、図1に示されるように、アミノ基転移、還元、脱炭酸、又は脱アミノ化することができる。1,3-BDOの產生のための更なる合成工程は、下記に詳細に論議される。これらの経路の各々からの1,3-BDOの理論的収量は、約1.09モル/消費されるグルコース1モルであると算出される。

20

【0010】

図2は、アセトアセチル-CoAから1,3-BDOを產生する複数の経路を概略する。アセトアセチル-CoAから1,3-BDOへのこれらの経路の各々は、3つの還元等価物を利用し、消費されるグルコース1モルあたり1モルの1,3-BDOの理論的収量を提供する。また、合成ガスなどの他の炭素基質も、アセトアセチル-CoAの產生のために用いることができる。合成ガスを形成するためのグルコースの気化は、6モルのCO及び6モルのH₂がグルコースから得られると仮定されると、消費されるグルコース1モルあたり1.09モルの1,3-BDOの最大理論的収量を結果として生じるであろう。

30



【0011】

4-ヒドロキシブチリル-CoAは、図3に示される1,3-BDOを含むいくつかの産業的に有用な化合物を製造することのできる重要な出発代謝産物である。4-ヒドロキシブチリル-CoAは、高度に共通した中心代謝産物ではないが、4-ヒドロキシブチリル-CoAを合成する系を操作する方法は、米国特許出願第2009 / 0075351によって既に説明されている。4-ヒドロキシブチリル-CoAから1,3-ブタンジオールへの経路は、1.09モル/炭水化物供給原料としてのグルコースを仮定する産物1モルの理論的収量を有する。

40

【0012】

また、本発明は、これらの非天然微生物の培養を通じて1,3-BDOを產生する方法に一部関する。本明細書に説明された該生物及び方法による1,3-BDOの脱水は、この可燃性かつ反応性の化学物質を輸送する必要性を回避する小さな最終用途施設において再生可能なブタジエンを製造する機会を提供する。

【0013】

本明細書で使用される用語「非天然」は、本発明の微生物(microbial organism)又は微生物(microorganism)に関して使用される場合、該微生物が、基準種の野生型種を含

50

む天然型の基準種において通常認められない少なくとも1つの遺伝的変更を有することを意味することが意図される。遺伝的変更には、例えば、代謝ポリペプチドをコードする発現可能核酸、他の核酸付加、核酸欠失及び／又は当該微生物の遺伝物質の他の機能的な破壊を導入する修飾を含む。このような修飾には、例えば、基準(referenced)種に対し異種性、相同、又は異種性及び相同の両ポリペプチドのコード領域及びその機能的断片を含む。追加的な修飾には、例えば、該修飾が遺伝子又はオペロンの発現を変更する非コード調節領域を含む。典型的な代謝ポリペプチドには、1,3-ブタンジオール生合成経路の内の酵素又はタンパク質を含む。

【0014】

代謝修飾とは、その天然状態から変更された生化学的反応をいう。それゆえ、非天然微生物は、代謝ポリペプチド又はその機能的断片をコードする核酸に対する遺伝的修飾を有することができる。典型的な代謝修飾は、本明細書に開示される。

【0015】

本明細書で使用される用語「単離される」は、微生物に関して使用される場合、該基準微生物が天然に認められるときに少なくとも1つの構成要素を実質的に含まない生物を意味することを意図する。該用語は、その自然環境で認められるいくつか又は全ての構成要素から取り出された微生物を含む。また、該用語には、該微生物が非天然環境で認められるときにいくつか又は全ての成分から取り出された微生物を含む。それゆえ、単離された微生物は、天然に認められる場合のような他の物質、又は非天然環境で増殖し、保存し、若しくは維持される場合のような他の物質から、部分的に若しくは完全に分離される。単離された微生物の具体的な例には、部分的に純粋な微生物、実質的に純粋な微生物、及び非天然の培地で培養された微生物を含む。

【0016】

本明細書で使用される場合、用語「微生物(microbial)」、「微生物(microbial organism)」又は「微生物(microorganism)」は、古細菌、細菌又は真核生物のドメイン内に含まれる微視的細胞として存在する任意の生物を意味することを意図する。それゆえ、該用語は、微視的サイズを有する原核若しくは真核の細胞若しくは生物を包含するよう意図され、全ての種の細菌、古細菌及び真正細菌、並びに酵母及び真菌などの真核微生物を含む。該用語には、生化学的産生のために培養することのできる任意の種の細胞培養物も含む。

【0017】

本明細書で使用する場合、用語「CoA」又は「補酵素A」とは、活性のある酵素系を形成するためにその存在が多くの酵素(アポ酵素)の活性に必要とされる有機的補助因子又は補欠分子族(酵素の非タンパク質部分)を意味することを意図する。特定の縮合酵素における補酵素Aの機能は、アセチル又は他のアシル基転移において、並びに脂肪酸合成及び酸化、ピルビン酸酸化において、及び他のアセチル化において作用する。

【0018】

本明細書で使用される場合、用語「実質的に嫌気性」は、培養又は増殖条件に関して使用される場合、酸素量が液体培地中の溶存酸素について約10%未満飽和していることを意味することを意図する。また、該用語は、約1%未満の酸素の雰囲気で維持される液体又は固体培地の密封チャンバーを含むことも意図する。

【0019】

本明細書において使用される「外来性」は、該基準分子又は該基準活性が宿主微生物に導入されることを意味することを意図する。該分子は、例えば、宿主染色体への組込みなどによる宿主遺伝材料へのコード核酸の導入によって、又はプラスミドなどの非染色体性遺伝材料として、導入できる。それゆえ、該用語は、コード核酸の発現に関して使用される場合、発現可能な形態でのコード核酸の微生物への導入をいう。生合成活性に関して使用される場合、該用語は、宿主基準生物に導入される活性をいう。供給源は、例えば、宿主微生物への導入後に該基準活性を発現する相同若しくは異種性のコード核酸であり得る。それゆえ、用語「内在性」とは、宿主に存在する基準分子又は活性をいう。同様に、該

10

20

30

40

50

用語は、コード核酸の発現に関して使用される場合、微生物内に含まれるコード核酸の発現をいう。用語「異種性」とは基準種以外の供給源に由来する分子又は活性をいうのに対し、「相同」とは宿主微生物に由来する分子又は活性をいう。したがって、本発明のコード核酸の外来性発現は、異種性若しくは相同のいずれか又は両方のコード核酸を利用することができる。

【0020】

本発明の非天然微生物は、安定した遺伝的変更を含むことができ、これは該変更の損失なしに5世代を超えて培養することのできる微生物をいう。一般に、安定した遺伝的変更には、10世代を超えて持続する修飾を含み、特に安定した修飾は約25世代を超えて持続し、より特定には、安定した遺伝的修飾は50世代（無制限を含む）を超える。

10

【0021】

当業者は、本明細書に例証される代謝修飾を含む遺伝的変更が、大腸菌などの好適な宿主生物及びそれらの相応する代謝反応、又は所望の代謝経路のための遺伝子などの所望の遺伝材料に好適な供給源生物に関して説明されることを理解するであろう。しかしながら、多種多様な生物の完全なゲノム配列決定及びゲノム科学領域における高水準の技術を考慮すると、当業者は、本質的に他の全ての生物に対して本明細書に提供される教示及びガイダンスを容易に適用することができるであろう。例えば、本明細書に例証した大腸菌の代謝的変更は、該基準種以外の種からの同じ若しくは類似したコード核酸を組み込むことにより、他の種に容易に適用することができる。このような遺伝的変更には、例えば、一般的には種ホモログの遺伝的変更、特に、オルソログ、パラログ又は非オルソロガス遺伝子置換を含む。

20

【0022】

オルソログは、垂直系統に関連し、かつ異なる生物において実質的に同じ若しくは同一の機能の原因となる遺伝子（gene）又は遺伝子（genes）である。例えば、マウスエポキシド加水分解酵素及びヒトエポキシド加水分解酵素は、エポキシドの加水分解の生物学的機能のためのオルソログとみなすことができる。遺伝子は、例えば該遺伝子が相同であること、又は共通祖先からの進化により関連することを示すのに十分な量の配列類似性を共有する場合、垂直系統によって関連する。また、遺伝子は、該遺伝子が共通祖先から、該一次配列類似性が同定できない程度まで進化したことを示すのに十分な量の三次元構造を共有するが、必ずしも配列類似性を共有しない場合、オルソログとみなすこともできる。オルソロガスである遺伝子は、約25%～100%アミノ酸配列同一性の配列類似性を有するタンパク質をコードすることができる。また、25%未満のアミノ酸類似性を共有するタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質の三次元構造も類似性を示す場合、垂直系統により生じたとみなすこともできる。組織プラスミノーゲン活性化因子及びエラスターーゼを含むセリンプロテアーゼファミリー酵素のメンバーは、共通祖先から垂直系統により生じたものとみなされる。

30

【0023】

オルソログには、例えば進化を通じて、構造又は全体的な活性において分岐した遺伝子又は遺伝子のコードした遺伝子産物を含む。例えば、ある種が2つの機能を呈する遺伝子産物をコードし、かつこののような機能が第二の種において異なる遺伝子へと分離した場合、該3つの遺伝子及びそれらの相応する産物はオルソログであるとみなされる。生化学的産物の産生のために、当業者は、導入又は破壊されるべき代謝活性を有するオルソロガス遺伝子が非天然微生物の構築のために選択されるべきことを理解するであろう。単離可能な活性を呈するオルソログの例は、異なる活性が、2つ以上の種間の、又は單一種内の異なる遺伝子産物に分離される場合である。具体的な例は、エラスターーゼタンパク質分解及びプラスミノーゲンタンパク質分解（2種類のセリンプロテアーゼ活性）の、異なった分子へのプラスミノーゲン活性化因子及びエラスターーゼとしての分離である。第二の例は、マイコプラズマ5'-3'エキソヌクレアーゼ、及びショウジョウバエDNAポリメラーゼIII活性の分離である。第一の種由来のDNAポリメラーゼは、第二の種由来のエキソヌクレアーゼ又はポリメラーゼのいずれか又は両方に対するオルソログとみなすことができ、逆もま

40

50

た真である。

【0024】

対照的に、パラログは、例えば、複製とそれに続く進化的分岐に関連するホモログであり、類似の又は共通した、しかし同一ではない機能を有する。パラログは、例えば、同種から若しくは異種から生じ、又は由来し得る。例えば、ミクロソームのエポキシド加水分解酵素（エポキシド加水分解酵素I）及び可溶性エポキシド加水分解酵素（エポキシド加水分解酵素II）は、これらが、異なった反応を触媒し、該同種において異なる機能を有する共通祖先から共進化した2つの異なる酵素を表すので、パラログとみなすことができる。パラログは、相同であり、又は共通祖先からの共進化を通じて関連していることを示唆する、互いに有意な配列類似性を有する同種由来のタンパク質である。パラログタンパク質ファミリーの群には、HipAホモログ、ルシフェラーゼ遺伝子、ペプチダーゼ、及びその他を含む。

【0025】

非オルソロガス遺伝子置換は、異なる種の基準遺伝子機能と置換することのできる1つの種からの非オルソロガス遺伝子である。置換には、例えば、異なる種の基準機能と比較して、起源の種において実質的に同じ又は類似の機能を果たすことのできるものを含む。一般に、非オルソロガス遺伝子置換は、該基準機能をコードする公知の遺伝子に構造的に関連するものとして同定することができるが、より構造的に関連が低いものの機能的に類似する遺伝子及び該遺伝子の相応する遺伝子産物は、それでもなお本明細書に使用される用語の意味の内に収まる。機能的類似性は、例えば、置換しようとする機能をコードする遺伝子と比較して、非オルソロガス遺伝子産物の活性部位又は結合領域において少なくとも若干の構造類似性を必要とする。それゆえ、非オルソロガス遺伝子には、例えば、パラログ又は関連のない遺伝子を含む。

【0026】

それゆえ、1,3-BDO生合成能力を有する本発明の非天然微生物を同定すること及び構築することにおいて、当業者は、本明細書に提供される教示及びガイダンスを、代謝修飾の同定がオルソログの同定及び封入又は不活性化を含むことのできる特定の種に適用することで理解するであろう。パラログ及び/又は非オルソロガス遺伝子置換が、類似若しくは実質的に類似の代謝反応を触媒する酵素をコードする基準微生物に存在する程度まで、当業者はこれらの進化的に関連する遺伝子を利用することもできる。

【0027】

オルソログ、パラログ及び非オルソロガス遺伝子置換は、当業者に周知の方法により決定することができる。例えば、2つのポリペプチドについての核酸配列又はアミノ酸配列の検査は、比較された配列間の配列同一性及び類似性を明らかにするであろう。このような類似性に基づいて、当業者は、該タンパク質が共通祖先から進化を介して関連することを示すために類似性が十分に高いかどうかを決定することができる。Align、BLAST、Clustal W、及びその他などの当業者に周知のアルゴリズムは、生の配列類似性又は同一性を比較及び決定し、更に、重み又はスコアを割り当てることができる配列の間隙の存在又は有意性を決定する。このようなアルゴリズムも当業者に公知であり、ヌクレオチド配列の類似性又は同一性を決定するのに同様に適用できる。相関性を決定するのに十分な類似性についてのパラメータは、統計的類似性を算出するための周知の方法、又はランダムポリペプチドにおける類似の対応（match）を見出す見込み、及び決定された対応の有意性に基づいて算出される。2以上の配列に関するコンピュータ比較は、所望の場合、当業者によって視覚的に最適化されることもできる。関連する遺伝子産物又はタンパク質は、高い類似性、例えば、25% ~ 100%の配列同一性を有すると予測することができる。関連性のないタンパク質は、十分なサイズのデータベースが走査される（約5%）場合、偶然生じることが予測されるのと本質的に同じである同一性を有することができる。5% ~ 24%の配列は、該比較された配列が関連していると結論づけるのに十分な相同性を表すことができ、又は表すことができない。データセットのサイズを考慮してこのような対応の有意性を決定するための追加的な統計的分析を実行して、これらの配列の関連性を決定すること

10

20

30

40

50

ができる。

【 0 0 2 8 】

BLASTアルゴリズムを使用する2以上の配列の関連性を決定するための典型的なパラメータは、例えば、先に記載したものであることができる。簡潔にいうと、アミノ酸配列整列は、BLASTPバージョン2.0.8(1999年1月5日)及び以下のパラメータを使用して実施することができる:マトリックス:0 BLOSUM62;間隙開口:11;間隙伸長:1;x_ドロップオフ:50;期待値:10.0;文字サイズ:3;フィルター:オン。核酸配列整列は、BLASTNバージョン2.0.6(1998年9月16日)及び以下のパラメータを使用して実施することができる:対応:1;ミスマッチ:-2;間隙開口:5;間隙伸長:2;x_ドロップオフ:50;期待値:10.0;文字サイズ:11;フィルター:オフ。当業者は、どの修飾を上記パラメータに導入して、該比較の厳密性を増加又は減少させることができるか、例えば、2以上の配列の相関性を決定することができるかを知っているであろう。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施態様において、本発明は、1,3-ブタンジオール(1,3-BDO)を産生するのに十分な量で発現する1,3-BDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外来性核酸とともに1,3-BDO経路を有する微生物を含む非天然微生物を提供する。1,3-BDO経路には、2-アミノ-4-ケトペントナート(AKP)チオラーゼ、AKP脱水素酵素、2-アミノ-4-ヒドロキシペントナートアミノトランスフェラーゼ、2-アミノ-4-ヒドロキシペントナート酸化還元酵素(脱アミノ化)、2-オキソ-4-ヒドロキシペントナートデカルボキシラーゼ、3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素、AKPアミノトランスフェラーゼ、AKP酸化還元酵素(脱アミノ化)、2,4-ジオキソペントナートデカルボキシラーゼ、3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(ケトン還元)、3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(アルデヒド還元)、4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素、AKPデカルボキシラーゼ、4-アミノブタン-2-オンアミノトランスフェラーゼ、4-アミノブタン-2-オン酸化還元酵素(脱アミノ化)、4-アミノブタン-2-オンアンモニア-リーゼ、ブテノンヒドラターゼ、AKPアンモニア-リーゼ、アセチルアクリラートデカルボキシラーゼ、アセトアセチル-CoA還元酵素(CoA依存性、アルデヒド形成)、アセトアセチル-CoA還元酵素(CoA依存性、アルコール形成)、アセトアセチル-CoA還元酵素(ケトン還元)、3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)、3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、及びクロトナーゼからなる群から選択される酵素を含む。

【 0 0 3 0 】

上記の酵素の任意の組み合わせ及び任意の数は、図1～3において例証されるように、宿主微生物へと導入されて、1,3-BDO経路を完了することができる。例えば、非天然微生物には、1,3-BDO経路における核酸の1、2、3、4、5、最大すべてを含むことができ、各核酸は1,3-BDO経路酵素をコードする。このような核酸は、異種性核酸、存在する遺伝子の追加的なコピー、及び遺伝子調節エレメントを、下記にさらに説明するように含むことができる。また、本発明の非天然微生物の経路は、実質的に嫌気性培地中で培養するよう好適に操作される。

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施態様において、1,3-BDO経路を有する非天然微生物には、1セットの1,3-BDO経路酵素を含む。1セットの1,3-BDO経路酵素は、図1～3に示すように、アラニン、アセトアセチル-CoA、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAから1,3-BDOへと転換することができる1群の酵素を表す。図1に従った、アラニンを1,3-BDOへと転換するための典型的なセットの1,3-BDO経路酵素には、(a)(1)2-アミノ-4-ケトペントナート(AKP)チオラーゼ；(2)AKP脱水素酵素；(3)2-アミノ-4-ヒドロキシペントナートアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素(脱アミノ化)；(4)2-オキソ-4-ヒドロキシペントナートデカルボキシラーゼ；及び(5)3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素；(b)(1)2-アミノ-4-ケトペントナート(AKP)チオラーゼ；(2)AKPアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素(脱アミノ化)；(3)2,4-ジオキソペントナートデカルボキシラーゼ；及び(4)3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)；(5)2-オキソ-4-ヒドロキシペントナートデカルボキシラーゼ；及び(6)3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)；(7)4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ；及び(8)クロトナーゼからなる群から選択される酵素を含む。

10

20

30

40

50

ゼ；(4)3-オキシブチルアルデヒド還元酵素(ケトン還元)；及び(5)3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素；(c)(1)2-アミノ-4-ケトペントナーアート(AKP)チオラーゼ；(2)AKPアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素(脱アミノ化)；(3)2,4-ジオキソペントナーアートデカルボキシラーゼ；(4)3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(アルデヒド還元)；及び(5)4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素；(d)(1)2-アミノ-4-ケトペントナーアート(AKP)チオラーゼ；(2)AKPデカルボキシラーゼ；(3)4-アミノブタン-2-オンアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素(脱アミノ化)；(4)3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(ケトン還元)；及び(5)3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素；(e)(1)2-アミノ-4-ケトペントナーアート(AKP)チオラーゼ；(2)AKPデカルボキシラーゼ；(3)4-アミノブタン-2-オンアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素(脱アミノ化)；(4)3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(アルデヒド還元)；及び(5)4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素；(f)(1)2-アミノ-4-ケトペントナーアート(AKP)チオラーゼ；(2)AKPデカルボキシラーゼ；(3)4-アミノブタン-2-オンアンモニア-リアーゼ；(4)ブテノンヒドラターゼ；及び(5)4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素；及び(g)(1)2-アミノ-4-ケトペントナーアート(AKP)チオラーゼ；(2)AKPアンモニア-リアーゼ；(3)アセチルアクリラートデカルボキシラーゼ；(4)ブテノンヒドラターゼ；及び(5)4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素を含む；

【0032】

図2に従ったアセトアセチル-CoAを1,3-BDOに転換する典型的なセットの1,3-BDO経路酵素には、(h)(1)アセトアセチル-CoA還元酵素(CoA依存性、アルデヒド形成)；(2)3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(ケトン還元)；及び(3)3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素；(i)(1)アセトアセチル-CoA還元酵素(CoA依存性、アルコール形成)及び(2)4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素；(j)(1)アセトアセチル-CoA還元酵素(CoA依存性、アルデヒド形成)；(2)3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(アルデヒド還元)；及び(3)4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素；(k)(1)アセトアセチル-CoA還元酵素(ケトン還元)及び(2)3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)；並びに(l)(1)アセトアセチル-CoA還元酵素(ケトン還元)；(2)3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)；及び(3)3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素を含む；

【0033】

図3に従った4-ヒドロキシブチリル-CoAから1,3-BDOに転換する典型的なセットの1,3-BDO経路酵素には、(m)(1)4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ；(2)クロトナーゼ；及び(3)3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)；並びに(n)(1)4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ；(2)クロトナーゼ；(3)3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)；及び(4)3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素を含む。

【0034】

アラニンから1,3-BDOへの転換は、図1に示されるような約5の酵素工程を包含するいくつかの経路によって達成することができる。すべての経路の第一の工程(工程A)において、アラニン及びアセチル-CoAは、高度に選択的な酵素である2-アミノ-4-ケトペントナーアートチオラーゼによって組み合わされる。この反応の産物である2-アミノ-4-オキソペントナーアート(AKP)は次に、図1に示されるように、アミノ基転移、還元、脱炭酸、又は脱アミノ化することができる。

【0035】

ある経路において、AKPは、アミノトランスフェラーゼ又は脱アミノ化する酸化還元酵素によって、アルファ-ケトグルタラートと構造上類似の2-ケト酸である2,4-ジオキソペントナーアートに転換した(工程B)。2,4-ジオキソペントナーアートは次に、2-ケト酸デカルボキシラーゼによって3-オキソブチルアルデヒドに転換される(工程C)。ケトン基及びアルデヒド基のそれらの相応するアルコールへの還元は、1,3-ブタンジオールを生じる。これらの還元は、中間体3-ヒドロキシブチルアルデヒド(工程D及びP)又は4-ヒドロキ

10

20

30

40

50

シ,2-ブタノン（工程D及びH）を形成するためにいずれかにおいて生じることができる。

【0036】

別の経路において、まず、AKPの4-オキソ基が、AKP脱水素酵素によって第二級アルコールへと還元される（工程L）。次に、産物である2-アミノ-4-ヒドロキシペンタノアートは、2-オキソ-4-ヒドロキシペンタノアートに転換される（工程M）。結果として生じる2-ケト産は、3-ヒドロキシブチルアルデヒドに脱炭酸される（工程N）。この経路の最終的な工程において、3-ヒドロキシブチルアルデヒドのアルデヒドは、3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素によって第一級アルコールへと還元され、1,3-ブタンジオールを形成する（工程P）。

【0037】

さらに別の経路は、アミノ酸デカルボキシラーゼによるAKPの脱炭酸を包含する（工程E）。脱炭酸産物である4-アミノブタン-2-オンは、3-オキソブチルアルデヒドへとアミノ基転移か若しくは酸化的に脱アミノ化するかのいずれかができる（工程K）か又はブテノンへと脱アミノ化することができる（工程F）。3-オキソブチルアルデヒドが形成される場合、既に説明したとおり、2つのアルコール形成還元工程を用いて1,3-ブタンジオールを形成する（工程O及びP、又は工程D及びH）。次に、脱アミノ化産物であるブテノンを4-ヒドロキシ,2-ブタノンへと加水分解して（工程G）、これを4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素によって1,3-ブタンジオールへと還元する（工程H）。

【0038】

さらに別の経路は、AKPのアセチルアクリラートへの脱アミノ化を包含する（工程I）。アセチルアクリラートをブテノンに脱炭酸し（工程J）、これを次に、ブテノンヒドラターゼ（工程G）及び4-ヒドロキシ,2-ブタノン還元酵素（工程H）によって1,3-ブタンジオールへと転換する。

【0039】

アラニンからの産物1,3-BDOについて先に説明した経路に基づいて、いくつかの実施態様において、非天然微生物は、（1）2-アミノ-4-ケトペントノアート（AKP）チオラーゼ；（2）AKP脱水素酵素；（3）2-アミノ-4-ヒドロキシペントノアートアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素（脱アミノ化）；（4）2-オキソ-4-ヒドロキシペントノアートデカルボキシラーゼ；及び（5）3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素を含む1セットの1,3-BDO経路酵素を有する。これらの酵素をコードする任意の数の核酸は、これらの酵素をコードする1、2、3、4、最大5つすべての核酸を含む宿主微生物へと導入することができる。1、2、3、又は4の外来性核酸が導入される場合、このような核酸は、5つの核酸の任意の並べ替えであることができる。

【0040】

他の実施態様において、非天然微生物は、（1）2-アミノ-4-ケトペントノアート（AKP）チオラーゼ；（2）AKPアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素（脱アミノ化）；（3）2,4-ジオキソペントノアートデカルボキシラーゼ；（4）3-オキソブチルアルデヒド還元酵素（ケトン還元）；及び（5）3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素を含む1セットの1,3-BDO経路酵素を有する。これらの酵素をコードする任意の数の核酸は、これらの酵素をコードする1、2、3、4、最大5つすべての核酸を含む宿主微生物へと導入することができる。1、2、3、又は4の外来性核酸が導入される場合、このような核酸は、5つの核酸の任意の並べ替えであることができる。

【0041】

さらに他の実施態様において、非天然微生物は、（1）2-アミノ-4-ケトペントノアート（AKP）チオラーゼ；（2）AKPアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素（脱アミノ化）；（3）2,4-ジオキソペントノアートデカルボキシラーゼ；（4）3-オキソブチルアルデヒド還元酵素（アルデヒド還元）；及び（5）4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素を含む1セットの1,3-BDO経路酵素を有する。これらの酵素をコードする任意の数の核酸は、これらの酵素をコードする1、2、3、4、最大5つすべての核酸を含む宿主微生物へと導入することができる。1、2、3、又は4の外来性核酸が導入される場合、このような核酸は、5つ

10

20

30

40

50

の核酸の任意の並べ替えであることができる。

【0042】

なおも更なる実施態様において、非天然微生物は、(1)2-アミノ-4-ケトペントノアート(AKP)チオラーゼ；(2)AKPデカルボキシラーゼ；(3)4-アミノブタン-2-オンアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素(脱アミノ化)；(4)3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(ケトン還元)；及び(5)3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素を含む1セットの1,3-BDO経路酵素を有する。これらの酵素をコードする任意の数の核酸は、これらの酵素をコードする1、2、3、4、最大5つすべての核酸を含む宿主微生物へと導入することができる。1、2、3、又は4の外来性核酸が導入される場合、このような核酸は、5つの核酸の任意の並べ替えであることができる。

10

【0043】

なおもさらに更なる実施態様において、非天然微生物は、(1)2-アミノ-4-ケトペントノアート(AKP)チオラーゼ；(2)AKPデカルボキシラーゼ；(3)4-アミノブタン-2-オンアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素(脱アミノ化)；(4)3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(アルデヒド還元)；及び(5)4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素を含む1セットの1,3-BDO経路酵素を有する。これらの酵素をコードする任意の数の核酸は、これらの酵素をコードする1、2、3、4、最大5つすべての核酸を含む宿主微生物へと導入することができる。1、2、3、又は4の外来性核酸が導入される場合、このような核酸は、5つの核酸の任意の並べ替えであることができる。

【0044】

20

さらに更なる実施態様において、非天然微生物は、(1)2-アミノ-4-ケトペントノアート(AKP)チオラーゼ；(2)AKPデカルボキシラーゼ；(3)4-アミノブタン-2-オンアンモニア-リアーゼ；(4)ブテノンヒドラターゼ；及び(5)4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素を含む1セットの1,3-BDO経路酵素を有する。これらの酵素をコードする任意の数の核酸は、これらの酵素をコードする1、2、3、4、最大5つすべての核酸を含む宿主微生物へと導入することができる。1、2、3、又は4の外来性核酸が導入される場合、このような核酸は、5つの核酸の任意の並べ替えであることができる。

【0045】

なおもさらに更なる実施態様において、非天然微生物は、(1)2-アミノ-4-ケトペントノアート(AKP)チオラーゼ；(2)AKPアンモニア-リアーゼ；(3)アセチルアクリラートデカルボキシラーゼ；(4)ブテノンヒドラターゼ；及び(5)4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素を含む1セットの1,3-BDO経路酵素を有する。これらの酵素をコードする任意の数の核酸は、これらの酵素をコードする1、2、3、4、最大5つすべての核酸を含む宿主微生物へと導入することができる。1、2、3、又は4の外来性核酸が導入される場合、このような核酸は、5つの核酸の任意の並べ替えであることができる。

30

【0046】

図2は、アセトアセチル-CoAから1,3-ブタンジオールを产生する複数の経路を概略する。工程A、B、及びCを通じたある経路は、(i)アセトアセチル-CoAを3-オキソブチルアルデヒドに転換するCoA依存性、アルデヒド形成アセトアセチル-CoA転換酵素(図2、工程A)、(ii)3-オキソブチルアルデヒドを3-ヒドロキシブチルアルデヒドに還元する3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(図2、工程B)、及び(iii)最後に、1,3-ブタンジオールを形成するための3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素(図2、工程C)を利用する。

40

【0047】

あるいは、アセトアセチル-CoAは、アルデヒド形成アセトアセチル-CoA還元酵素を介して還元され、4-ヒドロキシ,2-ブタノンを形成することができる(図2、工程D)。また、4-ヒドロキシ,2-ブタノンは、アルデヒドを還元する3-オキソブチルアルデヒド還元酵素による3-オキソブチルアルデヒドの還元によって形成することもできる(図2、工程E)。最終的に、4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素によって4-ヒドロキシ,2-ブタノンを還元して、1,3-BDOを形成することができる(図2、工程F)。

50

【0048】

なおも別のセットの1,3-BDO形成経路は、ケトンを還元するアセトアセチル-CoA還元酵素によるアセトアセチル-CoAの3-ヒドロキシブチリル-CoAへの還元による（図2、工程G）。この酵素は、アセトアセチル-CoAにおけるケトン機能をヒドロキシル基へと還元する。3-ヒドロキシブチリル-CoAは、二機能性アルコール形成3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素によって還元され、1,3-ブタンジオールを形成することができる（図2、工程I）。あるいは、3-ヒドロキシブチリル-CoAはまず、アルデヒド形成3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素を介して3-ヒドロキシブチルアルデヒドに還元されることが可能（工程H）、次に、3-ヒドロキシブチルアルデヒドは、工程Cに示されるように還元されることができる。

10

【0049】

アセトアセチル-CoAからの1,3-BDOの產生について先に説明した経路に基づいて、いくつかの実施態様において、非天然微生物は、（1）アセトアセチル-CoA還元酵素（CoA依存性、アルデヒド形成）；（2）3-オキソブチルアルデヒド還元酵素（ケトン還元）；及び（3）3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素を含む1セットの1,3-BDO経路酵素を有する。これらの酵素をコードする任意の数の核酸は、これらの酵素をコードする1、2、最大3つすべての核酸を含む宿主微生物へと導入することができる。1又は2の外来性核酸が導入される場合、このような核酸は、3つの核酸の任意の並べ替えであることができる。

【0050】

他の実施態様において、非天然微生物は、（1）アセトアセチル-CoA還元酵素（CoA依存性、アルコール形成）及び（2）4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素を含む1セットの1,3-BDO経路酵素を有する。これらの酵素をコードする任意の数の核酸は、これらの酵素をコードする1又は両方の核酸を含む宿主微生物へと導入することができる。1つの外来性核酸が導入される場合、このような核酸は、2つの核酸のいずれかであることができる。

20

【0051】

更なる実施態様において、非天然微生物は、（1）アセトアセチル-CoA還元酵素（CoA依存性、アルデヒド形成）；（2）3-オキソブチルアルデヒド還元酵素（アルデヒド還元）；及び（3）4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素を含む1セットの1,3-BDO経路酵素を有する。これらの酵素をコードする任意の数の核酸は、これらの酵素をコードする1、2、最大3つすべての核酸を含む宿主微生物へと導入することができる。1又は2の外来性核酸が導入される場合、このような核酸は、3つの核酸の任意の並べ替えであることができる。

30

【0052】

なおも更なる実施態様において、非天然微生物は、（1）アセトアセチル-CoA還元酵素（ケトン還元）及び（2）3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素（アルコール形成）を含む1セットの1,3-BDO経路酵素を有する。これらの酵素をコードする任意の数の核酸は、これらの酵素をコードする1又は両方の核酸を含む宿主微生物へと導入することができる。1つの外来性核酸が導入される場合、このような核酸は、2つの核酸のいずれかであることができる。

【0053】

さらに更なる実施態様において、非天然微生物は、（1）アセトアセチル-CoA還元酵素（ケトン還元）；（2）3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素（アルデヒド形成）；及び（3）3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素を含む1セットの1,3-BDO経路酵素を有する。これらの酵素をコードする任意の数の核酸は、これらの酵素をコードする1、2、最大3つすべての核酸を含む宿主微生物へと導入することができる。1又は2の外来性核酸が導入される場合、このような核酸は、3つの核酸の任意の並べ替えであることができる。

40

【0054】

4-ヒドロキシブチリル-CoAは、いくつかの産業的に有用な化合物を製造することができる重要な出発代謝産物である。4-ヒドロキシブチリル-CoAは、高度に普遍的な中心代謝産物ではないが、4-ヒドロキシブチリル-CoAを合成する株を操作する方法は、Burkらの文献（US20090075351）に説明されている。典型的な方法は、コハク酸セミアルデヒド脱水素

50

酵素活性 (CoA 依存性)、4-ヒドロキシブチラート脱水素酵素活性、4-ヒドロキシブチラートキナーゼ活性、及びホスホトランスブチリラーゼ活性をコードする遺伝子を採用することによって、スクシニル-CoAから4-ヒドロキシブチリル-CoAを合成することを包含する。

【 0 0 5 5 】

経路における第一の工程は、4-ヒドロキシブチリル-CoAの脱水 (工程A、図3) 後に、クロトノイル-CoAを水和して3-ヒドロキシブチリル-CoAを形成すること (工程B) を包含する。次に、3-ヒドロキシブチリル-CoAは、2つの酵素 (工程C及びD) 又は単一の二重機能酵素 (工程E) のいずれかによって実施される2つの還元工程を経験して、1,3-ブタンジオールを形成する。

10

【 0 0 5 6 】

従って、いくつかの実施態様において、非天然微生物は、(1)4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ；(2)クロトナーゼ；及び(3)3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素 (アルコール形成) を含む1セットの1,3-BDO経路酵素を有する。これらの酵素をコードする任意の数の核酸は、これらの酵素をコードする1、2、最大3つすべての核酸を含む宿主微生物へと導入することができる。1又は2の外来性核酸が導入される場合、このような核酸は、3つの核酸の任意の並べ替えができる。

【 0 0 5 7 】

他の実施態様において、非天然微生物は、(1)4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ；(2)クロトナーゼ；(3)3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素 (アルデヒド形成) ；及び(4)3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素を含む1セットの1,3-BDO経路酵素を有する。これらの酵素をコードする任意の数の核酸は、これらの酵素をコードする1、2、3、最大4つすべての核酸を含む宿主微生物へと導入することができる。1、2又は3の外来性核酸が導入される場合、このような核酸は、4つの核酸の任意の並べ替えができる。

20

【 0 0 5 8 】

追加的な実施態様において、本発明は、1,3-BDO経路を有する非天然微生物を提供し、この中で、非天然微生物は、アラニンから2-アミノ-4-オキソペントナートへ、2-アミノ-4-オキソペントナートから2-アミノ-4-ヒドロキシペントナートへ、2-アミノ-4-ヒドロキシペントナートから2-オキソ-4-ヒドロキシペントナートへ、2-オキソ-4-ヒドロキシペントナートから3-ヒドロキシブチルアルデヒドへ、及び3-ヒドロキシブチルアルデヒドから1,3-BDOへからなる群から選択される基質を産物へ転換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む。

30

【 0 0 5 9 】

追加的な実施態様において、本発明は、1,3-BDO経路を有する非天然微生物を提供し、この中で、非天然微生物は、アラニンから2-アミノ-4-オキソペントナートへ、2-アミノ-4-オキソペントナートから2,4-ジオキソペントナートへ、2,4-ジオキソペントナートから3-オキソブチルアルデヒドへ、3-オキソブチルアルデヒドから3-ヒドロキシブチルアルデヒドへ、及び3-ヒドロキシブチルアルデヒドから1,3-BDOへからなる群から選択される基質から産物へ転換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む。

40

【 0 0 6 0 】

追加的な実施態様において、本発明は、1,3-BDO経路を有する非天然微生物を提供し、この中で、非天然微生物は、アラニンから2-アミノ-4-オキソペントナートへ、2-アミノ-4-オキソペントナートから2,4-ジオキソペントナートへ、2,4-ジオキソペントナートから3-オキソブチルアルデヒドへ、3-オキソブチルアルデヒドから4-ヒドロキシ-2-ブタノンへ、及び4-ヒドロキシ-2-ブタノンから1,3-BDOへからなる群から選択される基質から産物へ転換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む。

【 0 0 6 1 】

50

追加的な実施態様において、本発明は、1,3-BDO経路を有する非天然微生物を提供し、この中で、非天然微生物は、アラニンから2-アミノ-4-オキソペントノアートへ、2-アミノ-4-オキソペントノアートから4-アミノブタン-2-オンへ、4-アミノブタン-2-オンから3-オキソブチルアルデヒドへ、3-オキソブチルアルデヒドから3-ヒドロキシブチルアルデヒドへ、及び3-ヒドロキシブチルアルデヒドから1,3-BDOへからなる群から選択される基質から産物へ転換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む。

【 0 0 6 2 】

追加的な実施態様において、本発明は、1,3-BDO経路を有する非天然微生物を提供し、この中で、非天然微生物は、アラニンから2-アミノ-4-オキソペントノアートへ、2-アミノ-4-オキソペントノアートから4-アミノブタン-2-オンへ、4-アミノブタン-2-オンから3-オキソブチルアルデヒドへ、3-オキソブチルアルデヒドから4-ヒドロキシ-2-ブタノンへ、及び4-ヒドロキシ-2-ブタノンから1,3-BDOへからなる群から選択される基質から産物へ転換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む。

【 0 0 6 3 】

追加的な実施態様において、本発明は、1,3-BDO経路を有する非天然微生物を提供し、この中で、非天然微生物は、アラニンから2-アミノ-4-オキソペントノアートへ、2-アミノ-4-オキソペントノアートから4-アミノブタン-2-オンへ、4-アミノブタン-2-オンからブテノンへ、ブテノンから4-ヒドロキシ-2-ブタノンへ、4-ヒドロキシ-2-ブタノンから1,3-BDOへからなる群から選択される基質から産物へ転換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む。

【 0 0 6 4 】

追加的な実施態様において、本発明は、1,3-BDO経路を有する非天然微生物を提供し、この中で、非天然微生物は、アラニンから2-アミノ-4-オキソペントノアートへ、2-アミノ-4-オキソペントノアートからアセチルアクリラートへ、アセチルアクリラートからブテノンへ、ブテノンから4-ヒドロキシ-2-ブタノンへ、及び4-ヒドロキシ-2-ブタノンから1,3-BDOへからなる群から選択される基質から産物へ転換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む。

【 0 0 6 5 】

このように、本発明は、図1に示される経路によって例証されるように、酵素又はタンパク質がアラニンを転換する1,3-BDO経路の基質及び産物を1,3-BDOへ転換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む非天然微生物を提供する。

【 0 0 6 6 】

追加的な実施態様において、本発明は、1,3-BDO経路を有する非天然微生物を提供し、この中で、非天然微生物は、アセトアセチル-CoAから4-ヒドロキシ-2-ブタノンへ、及び4-ヒドロキシ-2-ブタノンから1,3-BDOへからなる群から選択される基質から産物へ転換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む。

【 0 0 6 7 】

追加的な実施態様において、本発明は、1,3-BDO経路を有する非天然微生物を提供し、この中で、非天然微生物は、アセトアセチル-CoAから3-オキソブチルアルデヒドへ、3-オキシブチルアルデヒドから4-ヒドロキシ-2-ブタノンへ、及び4-ヒドロキシ-2-ブタノンから1,3-BDOへからなる群から選択される基質から産物へ転換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む。

【 0 0 6 8 】

追加的な実施態様において、本発明は、1,3-BDO経路を有する非天然微生物を提供し、この中で、非天然微生物は、アセトアセチル-CoAから3-オキソブチルアルデヒドへ、3-オキシブチルアルデヒドから3-ヒドロキシブチルアルデヒドへ、及び3-ヒドロキシブチルアルデヒドから1,3-BDOへからなる群から選択される基質から産物へ転換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む。

【 0 0 6 9 】

10

20

30

40

50

追加的な実施態様において、本発明は、1,3-BDO経路を有する非天然微生物を提供し、この中で、非天然微生物は、アセトアセチル-CoAから3-ヒドロキシブチリル-CoAへ、3-ヒドロキシブチリル-CoAから3-ヒドロキシブトリルアルデヒド(3-hydroxybutyraldehyde)へ、及び3-ヒドロキシブトリルアルデヒドから1,3-BDOへからなる群から選択される基質から産物へ転換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む。

【0070】

追加的な実施態様において、本発明は、1,3-BDO経路を有する非天然微生物を提供し、この中で、非天然微生物は、アセトアセチル-CoAから3-ヒドロキシブチリル-CoAへ、及び3-ヒドロキシブチリル-CoAから1,3-BDOへからなる群から選択される基質から産物へ転換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む。

10

【0071】

このように、本発明は、酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む非天然微生物を提供し、ここで、酵素又はタンパク質は、図2に示される経路によつて例証されるように、アセトアセチル-CoAから転換する1,3-BDO経路の基質及び産物を1,3-BDOへ転換する。

【0072】

追加的な実施態様において、本発明は、1,3-BDO経路を有する非天然微生物を提供し、この中で、非天然微生物は、4-ヒドロキシブチリル-CoAからクロトノイル-CoAへ、クロトノイルCoAから3-ヒドロキシブチリル-CoAへ、3-ヒドロキシブチリル-CoAから3-ヒドロキシブトリルアルデヒドへ、及び3-ヒドロキシブトリルアルデヒドから1,3-BDOへからなる群から選択される基質から産物へ転換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む。

20

【0073】

追加的な実施態様において、本発明は、1,3-BDO経路を有する非天然微生物を提供し、この中で、非天然微生物は、4-ヒドロキシブチリル-CoAからクロトノイル-CoAへ、クロトノイルCoAから3-ヒドロキシブチリル-CoAへ、3-ヒドロキシブチリル-CoAから1,3-BDOへからなる群から選択される基質から産物へ転換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む。

【0074】

30

このように、本発明は、酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含む非天然微生物を提供し、ここで、酵素又はタンパク質は、図3に示される経路によつて例証されるように、4-ヒドロキシブチリル-CoAから1,3-BDOへ転換する1,3-BDO経路の基質及び産物を転換する。

【0075】

これらの経路の任意を成功裏に操作することは、十分な活性及び特異性を有する適切なセットの酵素を同定すること、該酵素の相応する遺伝子を産生宿主へとクローニングすること、発酵条件を最適化すること、及び発酵後の産物形成についてアッセイすることを必要とする。上記の産物の任意の産生のために産生宿主を操作するために、1つ以上の外来性DNA配列は微生物において発現することができる。加えて、微生物は、機能的に欠失した外来性遺伝子を有することができる。これらの修飾は、再生可能な供給減量を用いた1,3-BDOの産生を可能とするであろう。

40

【0076】

下記に、本発明者らは、図1、2、及び3において示される工程の各々を触媒する酵素をコードすることのできるいくつかの生化学的に特徴づけられた遺伝子を説明する。本発明者らは、大腸菌についての本方法を説明するが、当業者は、本質的に任意の他の生物にこれらの教示を適用することができる。具体的には、遺伝子は、適切にクローニング及び発現した適切な形質転換を触媒するのに適用することのできる他の生物における遺伝子に加えて、大腸菌に対して未変性の遺伝子が列挙される。

【0077】

50

本発明は、一般的に代謝反応、反応物若しくはその産物に関して、又は基準代謝反応、反応物、若しくは産物と会合若しくは触媒する酵素を、又は会合するタンパク質をコードする1つ以上の核酸若しくは遺伝子に特に関じて本明細書に説明される。本明細書で別段の明確な記載がない限り、当業者は、反応に対する引用はまた、反応の反応物及び産物に対する引用も構成することを理解するであろう。同様に、本明細書で別段の明確な記載がない限り、反応物又は産物に対する引用はまた、反応を引用し、これらの代謝構成体の任意に対する引用はまた、基準反応、反応物、又は産物を触媒する酵素又は包含されるタンパク質をコードする遺伝子(gene)又は遺伝子(genes)を引用する。同じく、代謝生化学、酵素学、及びゲノム科学の周知の分野を考慮すると、遺伝子に対する又は核酸をコードする本明細書での引用はまた、相応するコードした酵素、及び該酵素が触媒する反応、又は反応、並びに反応の反応物及び産物を触媒又は会合するタンパク質に対する引用も構成する。

【0078】

図1～3に示されたすべての形質転換は、表1に示される形質転換の8個の一般的なカテゴリーへと収まる。下記に、各カテゴリーにおけるいくつかの生化学的に特徴づけられた遺伝子が説明されている。具体的に列挙されているのは、適切にクローニング及び発現した場合に、図1～3における適切な形質転換を触媒するのに適用することのできる遺伝子である。図1～3における工程の各々について典型的な遺伝子は、下記の表35～37にさらに提供される。

【0079】

表1は、共通の中心代謝中間体を1,3-ブタンジオールへ転換するのに有用な酵素の種類を示す。各標識の最初の3つの数字は、基質特異性とは無関係な形質転換の一般的な種類を示す最初の3つの酵素委員会(Enzyme Commission)番号数字に相応する。

【表1】

表1

標識	機能
1.1.1.a	酸化還元酵素(ケトンからヒドロキシルへ又はアルデヒドからアルコールへ)
1.1.1.c	酸化還元酵素(2工程、アシル-CoAからアルコールへ)
1.2.1.b	酸化還元酵素(アシル-CoAからアルデヒドへ)
1.4.1.a	酸化還元酵素(脱アミノ化)
2.3.1.b	アシルトランスフェラーゼ
2.6.1.a	アミントランスフェラーゼ
4.1.1.a	カルボキシ-リアーゼ
4.2.1.a	ヒドロ-リアーゼ
4.3.1.a	アンモニア-リアーゼ

図1、図2、及び図3における数多くの形質転換は、アルデヒドからアルコールへ還元する酸化還元酵素のカテゴリーに収まる。例えば、3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(アルデヒド還元)及び3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素によってそれぞれ触媒される図1における工程D及び工程Pは、このカテゴリーに収まる。同様に、また、3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素及び3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(アルデヒド還元)によってそれぞれ触媒される図2における工程C及び工程Eも、アルデヒド官能性をアルコールに転換する酸化還元酵素である。図3における経路は、工程Dにおける3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素などの酸化還元酵素を包含する。

【0080】

アルデヒドからアルコールへの転換を触媒する酵素(すなわち、アルコール脱水素酵素又は等価のアルデヒド還元酵素)をコードする典型的な遺伝子には、C2-C14について中鎖アルコール脱水素酵素をコードするalrA(Taniらの文献(*Appl. Environ. Microbiol.*, 6

10

20

30

40

50

6 : 5231-5235 (2000))) 、出芽酵母由来のADH2 (Atsumiらの文献 (Nature, 451 : 86-89 (2008))) 、C3よりも長い分子について優先度を有する大腸菌由来のyqhD (Sulzenbacherらの文献 (J. of Molecular Biology, 342 : 489-502 (2004))) 、並びにブチルアルデヒドをブタノールに転換するクロストリジウム・アセトブチリカム由来のbdhI 及びbdhII (Walterらの文献 (J. of Bacteriology, 174 : 7149-7158 (1992))) を含む。yqhDの遺伝子産物は、NADPHを共因子として用いて、アセトアルデヒド、マロンジアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、及びアクロレインの還元を触媒する (Perezらの文献 (J. Biol. Chem., 283 : 7346-7353 (2008))) 。ザイモモナス・モビリス由来のadhA遺伝子産物は、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、及びアクロレインを含むいくつかのアルデヒドに関する活性を有することが示されている (Kinoshitaらの文献 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 22 : 249-254 (1985))) 。追加的なアルデヒド還元酵素候補物は、クロストリジウム・サッカロパーブチルアセトニカムにおけるbdh並びにクロストリジウム・ベイジエリンキにおけるCbei_1722、Cbei_2181、及びCbei_2421によってコードされる。

【0081】

これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列に関するデータは、表2に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表2】

表2

20

タンパク質	GENBANK ID	GI番号	生物
alrA	BAB12273.1	9967138	アシネットバクター種M-1株
ADH2	NP_014032.1	6323961	出芽酵母
yqhD	NP_417484.1	16130909	大腸菌
bdh I	NP_349892.1	15896543	クロストリジウム・アセトブチリカム
bdh II	NP_349891.1	15896542	クロストリジウム・アセトブチリカム
adhA	YP_162971.1	56552132	ザイモモナス・モビリス
bdh	BAF45463.1	124221917	クロストリジウム・サッカロパーブチルアセトニカム
Cbei_1722	YP_001308850	150016596	クロストリジウム・ベイジエリンキ
Cbei_2181	YP_001309304	150017050	クロストリジウム・ベイジエリンキ
Cbei_2421	YP_001309535	150017281	クロストリジウム・ベイジエリンキ

【0082】

また、3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素活性 (EC1.1.1.61) を呈する酵素もこのカテゴリーに収まる。このような酵素は、ラルストニア・ユートロファ (Bravoらの文献 (J. Forensic Sci., 49 : 379-387 (2004))) 、クロストリジウム・クライベリ (Wolffらの文献 (Protein Expr. Purif., 6 : 206-212 (1995))) 、及びシロイヌナズナ (Breitkreuzらの文献 (J. Biol. Chem., 278 : 41552-41556 (2003))) において特徴づけられている。なおも別の遺伝子は、ゲオバチルス・サーモグルコシダシウス由来のアルコール脱水素酵素adhIである (Jeonらの文献 (J. Biotechnol., 135 : 127-133 (2008))) 。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表3に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

30

【表3】

表3

タンパク質	GENBANK ID	GI番号	生物
4hbd	YP_726053.1	113867564	ラルストニア・ユートロファH16
4hbd	L21902.1	146348486	クロストリジウム・クライベリDSM 555
4hbd	Q94B07	75249805	シロイヌナズナ
adhI	AAR91477.1	40795502	ゲオバチルス・サーモグルコシダシウス (<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>) M10EXG

10

【0083】

別の典型的な酵素は、3-ヒドロキシイソブチラートのメチルマロナートセミアルデヒドへの可逆的酸化を触媒する3-ヒドロキシイソブチラート脱水素酵素である。この酵素は、バリン、ロイシン、及びイソロイシンの分解に関与し、細菌、真核生物、及び哺乳類において同定されている。サーマス・サーモフィラスHB8由来のP84067によってコードされる酵素が構造的に特徴づけられている (Lokanathらの文献 (J. Mol. Biol., 352 : 905-917 (2005)))。ヒト3-ヒドロキシイソブチラート脱水素酵素の可逆性は、同位体標識された基質を用いて示された (Manningらの文献 (Biochem J., 231 : 481-484 (1985)))。この酵素をコードする追加的な遺伝子には、ヒト (Hawesらの文献 (Methods Enzymol, 324 : 218-228 (2000))) 及びウサギ (Hawesらの文献 (上記) ; Chowdhuryらの文献 (Biosci. Biotechnol. Biochem., 60 : 2043-2047 (1996))) における3hidh、緑膿菌及びプチダ菌におけるmmsB (Liaoらの文献 (米国特許第20050221466号)))、並びにプチダ菌におけるdhat (Aberhartらの文献 (J. Chem. Soc., 6 : 1404-1406 (1979) ; Chowdhuryらの文献 (上記) ; Chowdhuryらの文献 (Biosci. Biotechnol. Biochem., 67 : 438-441 (2003)))) を含む。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表4に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表4】

表4

30

タンパク質	GENBANK ID	GI番号	生物
P84067	P84067	75345323	サーマス・サーモフィラス
3hidh	P31937.2	12643395	ヒト
3hidh	P32185.1	416872	ウサギ
mmsB	P28811.1	127211	緑膿菌
mmsB	NP_746775.1	26991350	プチダ菌
dhat	Q59477.1	2842618	プチダ菌

【0084】

40

また、ケトン官能性を相応するヒドロキシル基へ転換する酸化還元酵素は、開示された経路における合成工程である。特に、AKP脱水素酵素、3-オキソブチルアルデヒド還元酵素 (ケトン還元) 、4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素によってそれぞれ触媒される図1における反応L、O、及びHは、このカテゴリーの形質転換である。また、後者2つの形質転換は、図2における工程B及び工程Fにおいてそれぞれ遭遇する。類似の系統において、図2の工程Gにおけるアセトアセチル-CoA還元酵素は、アセトアセチル-CoAを3-ヒドロキシブチリル-CoAへと還元する。

【0085】

脱水素酵素による2-アミノ-4-オキソペントナート (AKP) の4-オキソ基の還元は、2-アミノ-4-ヒドロキシペントナート (図1、工程L) を生じる。この反応は、ホモセリン

50

脱水素酵素 (EC1.1.13) によって触媒されるアスパルタートセミアルデヒドからホモセリンへのNAD(P)H 依存性還元と非常に類似している。大腸菌を含む多くの生物において、ホモセリン脱水素酵素は、アスパラギン酸のアスパルチル-4-ホスファートへのATP 依存性転換も触媒する二機能性酵素である (Starnesらの文献 (Biochemistry, 11 : 677-687 (1973)))。機能的ドメインは、触媒的に独立しており、リンカー領域によって接続され (Sibilliらの文献 (J. Biol. Chem., 256 : 10228-10230 (1981)))、両ドメインは、トレオニンによるアロステリック阻害に供される。thrAによってコードされる大腸菌酵素のホモセリン脱水素酵素ドメインは、アスパラギン酸キナーゼドメインから分離され、特徴づけられ、高い触媒活性及びトレオニンによる低い阻害を呈することが認められた (Jamesらの文献 (Biochemistry, 41 : 3720-3725 (2002)))。このことは、例えば、ラクトバチルス・プランタルムのhom1 (Cahyantoらの文献 (Microbiology, 152 : 205-112 (2006))) 及びシロイヌナズナを含む他の二機能性トレオニンキナーゼに適用することができる。出芽酵母におけるhom6 (Jacquesらの文献 (Biochem. Biophys. Acta, 1544 : 28-41 (2001))) 及びラクトバチルス・プランタルムにおけるhom2 (Cahyantoらの文献 (上述)) によってコードされる一機能性ホモセリン脱水素酵素は、機能的に発現し、大腸菌において特徴づけられている。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表5に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表5】

表5

10

20

タンパク質	GENBANK ID	GI番号	生物
thrA	AAC73113.1	1786183	大腸菌 K12
akthr2	O81852	75100442	シロイヌナズナ
hom6	CAA89671	1015880	出芽酵母
hom1	CAD64819	28271914	ラクトバチルス・プランタルム
hom2	CAD63186	28270285	ラクトバチルス・プランタルム

【0086】

30

アセトアセチル-CoAから3-ヒドロキシブチリル-CoAへの還元を触媒するアセトアセチル-CoA還元酵素 (工程G、図2) は、クロストリジウムのいくつかの種におけるブチラートへのアセチル-CoA発酵経路に関与し、詳細に研究されている (Jonesらの文献 (Microbiol. Rev., 50 : 484-524 (1986)))。hbdによってコードされるクロストリジウム・アセトブチリカム由来の酵素がクローニングされており、大腸菌において機能的に発現する (Younglesonらの文献 (J. Bacteriol., 171 : 6800-6807 (1989)))。加えて、fadB及びfadJによってコードされる大腸菌における2つの脂肪酸酸化複合体のサブユニットは、3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素として機能する (Binstockらの文献 (Methods Enzymol., 71 C : 403-411 (1981)))。アセトアセチル-CoAから3-ヒドロキシブチリル-CoAを還元することが示されたなおも他の遺伝子は、ズーグレア・ラミゲラ (ramigera) 由来のphbB (Plouxらの文献 (Eur. J. Biochem., 174 : 177-182 (1988))) 及びロドバクター・スフェロイデス由来のphaB (Alberらの文献 (Mol. Microbiol., 61 : 297-309 (2006))) である。前者の遺伝子は、NADPH 依存性であり、そのヌクレオチド配列が決定されており (Peoplesらの文献 (Mol. Microbiol. 3 : 349-357 (1989)))、遺伝子は大腸菌において発現している。該遺伝子に関する基質特異性研究は、アセトアセチル-CoAのほかに3-オキソプロピオニル-CoAを基質として受け入れることができるという結論をもたらした (Plouxらの文献、上述)。追加的な遺伝子には、クロストリジウム・クライベリにおけるHbd1 (C 末端ドメイン) 及びHbd2 (N 末端ドメイン) (Hillmer及びGottschalkの文献 (Biochim. Biophys. Acta 3334 : 12-23 (1974))) 並びにウシにおけるHSD17B10 (Wakilらの文献 (J. Biol. Chem., 207 : 631-638 (1954))) を含む。これらの典型的な遺伝子産物の

40

50

各々についての配列と関連したデータは、表6に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表6】

表6

タンパク質	GENBANK ID	GI番号	生物
<i>fadB</i>	P21177.2	119811	大腸菌
<i>fadJ</i>	P77399.1	3334437	大腸菌
<i>Hbd2</i>	EDK34807.1	146348271	クロストリジウム・クライベリ
<i>Hbd1</i>	EDK32512.1	146345976	クロストリジウム・クライベリ
<i>hbd</i>	P52041.2		クロストリジウム・アセトブチリカム
<i>HSD17B10</i>	O02691.3	3183024	ウシ
<i>phbB</i>	P23238.1	130017	ズーグレア・ラミゲラ
<i>phaB</i>	YP_353825.1	77464321	ロドバクター・スフェロイデス

10

【0087】

いくつかの類似の酵素は、表7に示されるように、クロストリジウムの他の種において、及びメタロスファエラ・セデュラ (*Metallosphaera sedula*) (Bergらの文献 (Archaea. Science, 318 : 1782-1786 (2007)))認められている。

20

【表7】

表7

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>Hbd</i>	NP_349314.1	NP_349314.1	クロストリジウム・アセトブチリカム
<i>Hbd</i>	AAM14586.1	AAM14586.1	クロストリジウム・ベイジェリンキ
<i>Msed_1423</i>	YP_001191505	YP_001191505	メタロスファエラ・セデュラ
<i>Msed_0399</i>	YP_001190500	YP_001190500	メタロスファエラ・セデュラ
<i>Msed_0389</i>	YP_001190490	YP_001190490	メタロスファエラ・セデュラ
<i>Msed_1993</i>	YP_001192057	YP_001192057	メタロスファエラ・セデュラ

30

【0088】

ケトンをヒドロキシル基へ転換する典型的なアルコール脱水素酵素は、クロストリジウム・ベイジェリンキ (*Ismaiel*らの文献 (J. Bacteriol., 175 : 5097-5105 (1993))) 及びサーモアナエロバクター・ブロッキー (*T. brockii*) (*Lamed*らの文献 (Biochem. J., 195 : 183-190 (1981) ; *Peretz*らの文献 (Biochemistry, 28 : 6549-6555 (1989))))においてアセトンをイソプロパノールへ転換することが示された第二級アルコール脱水素酵素である。2-ペントノール及びピルプアルデヒドに関して最大活性を呈するパイロコッカス・フリオサス由来の $adhA$ の遺伝子産物は、イソプロパノール及びアセトンを含む非常に広範な特異性を有することが示された (*Van der*らの文献 (Eur. J. Biochem., 268 : 3062-3068 (2001)))。イソプロパノール及びアセトンに関する活性を有するなおも別の第二級アルコール脱水素酵素は、ロドコッカス・ルーバー (*ruber*) 由来の $adhA$ の遺伝子産物によってコードされる (*Edegger*らの文献 (Chem. Commun. (Camb), 2402-2404 (2006) ; *Kosjek*らの文献 (Biotechnol. Bioeng., 86 : 55-62 (2004))))。これらの遺伝子はその他とともに、下記の表8に列挙される。

40

【表8】

表8

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>adh</i>	AAA23199.2	60592974	クロストリジウム・ベイジェリンキ NRRL B593
<i>adh</i>	P14941.1	113443	サーモアナエロバクター・ブロッキー (<i>Thermoanaerobacter brockii</i>) HTD4
<i>adhA</i>	AAC25556	3288810	バイロコッカス・フリオサス
<i>adh-A</i>	CAD36475	21615553	ロドコッカス・ルーバー (<i>ruber</i>)

10

【0089】

あるいは、ケトンをヒドロキシル官能基へ転換するいくつかの典型的なアルコール脱水素酵素が存在する。大腸菌由来の2つのこのような酵素は、リンゴ酸脱水素酵素 (*mdh*) 及び乳酸脱水素酵素 (*ldhA*) によってコードされる。加えて、ラルストニア・ユートロファ由来の乳酸脱水素酵素は、ラクタート、2-オキソブチラート、2-オキソペンタノアート、及び2-オキソグルタラートなどの種々の鎖の長さの基質に関して高い活性を呈することが示された (Steinbuchelらの文献 (Eur. J. Biochem., 130 : 329-334 (1983)))。また、オキソ官能性のヒドロキシル基への転換は、ラットにおいて及びヒト胎盤において認められることが報告されている酵素である2-ケト1,3-ブタンジオール還元酵素によって触媒することもできる (Sudaらの文献 (Arch. Biochem. Biophys., 176 : 610-620 (1976)) ; Sudaらの文献 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 77 : 586-591 (1977)))。これらの酵素はすべて、3-オキソブチルアルデヒド還元酵素及び4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素を提供することができる。これらの工程についての追加的な酵素は、クローニングされ及び特徴づけられたヒト心臓由来のミトコンドリア3-ヒドロキシブチラート脱水素酵素 (*bdh*) である (Marksらの文献 (J. Biol. Chem. 267 : 15459-15463 (1992)))。この酵素は、3-ヒドロキシ酸に関して作動する脱水素酵素である。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列に関するデータは、表9に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表9】

20

30

表9

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>mdh</i>	AAC76268.1	1789632	大腸菌
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	16129341	大腸菌
<i>ldh</i>	YP_725182.1	113866693	ラルストニア・ユートロファ
<i>bdh</i>	AAA58352.1	177198	ヒト

【0090】

40

いくつかの生物は、Matsuyamaらの文献 (1995) によって説明されるように、とりわけバチルス属、ブレビバクテリウム属、カンジダ属、及びクレブシエラ属に属するものを含む、4-ヒドロキシ-2-ブタノンの1,3-ブタンジオールへの還元を触媒することができる。

【0091】

図2及び3におけるいくつかの形質転換は、アシル-CoAの相応するアルコールへの2工程還元による。例えば、アセトアセチル-CoA還元酵素 (CoA 依存性、アルコール形成) 及び3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素 (アルコール形成) を包含する図2における工程D及びI、並びに3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素 (アルコール形成) を包含する図3における工程Eは、このような形質転換を示す。

【0092】

50

アシル-CoAをアルコールへ転換する典型的な2工程の酸化還元酵素には、アセチル-CoAなどの基質をエタノールへ（例えば、大腸菌由来のadhE（Kesslerらの文献（FEBS. Lett., 281: 59-63 (1991)））、及びブチリル-CoAをブタノールへ（例えば、クロストリジウム・アセトブチリカム由来のadhE2（Fontaineらの文献（J. Bacteriol., 184: 821-830 (2002)）））転換するものを含む。アセチル-CoAをエタノールへ還元することに加えて、ロイコノストック・メゼンテロイデスにおけるadhEによってコードされる酵素は、分岐鎖化合物イソブチルアルデヒドをイソブチリル-CoAへ酸化することが示されている（Kazahayaらの文献（J. Gen. Appl. Microbiol., 18: 43-55 (1972)）；Kooらの文献（Biotechnol. Lett., 27: 505-510 (2005)））。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表10に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表10】

10

表10

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
adhE	NP_415757.1	16129202	大腸菌
adhE2	AAK09379.1	12958626	クロストリジウム・アセトブチリカム
adhE	AAV66076.1	55818563	ロイコノストック・メゼンテロイデス

20

【0093】

別の典型的な酵素は、マロニル-CoAを3-HPへ転換することができる。この活性を有するNADPH 依存性酵素は、3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルに関するクロロフレクサス・アウランティアクス（Chloroflexus aurantiacus）において特徴づけられている（Huglerらの文献（J. Bacteriol., 184: 2404-2410 (2002)）；Straussらの文献（Eur. J. Biochem., 215: 633-643 (1993)））。この酵素は、300kDaの質量を有し、高度に基質特異的であり、他の公知の酸化還元酵素とあまり配列類異性を示さない（Huglerらの文献、上述）。他の生物における酵素は、この特異的反応を触媒することができるという生物情報学的証拠がある（Klattらの文献（Environ. Microbiol., 9: 2067-2078 (2007)））。ロゼイフレクサス・カステンホルツィイ（Roseiflexus castenholzii）、エリスロバクター（Erythrobacter）属NAP1、及び海生ガンマプロテオバクテリアHTCC2080を含む他の生物における酵素は、配列類似性によって推測することができる。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表11に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表11】

30

表11

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
mcr	AAS20429.1	42561982	クロロフレクサス・アウランティアクス（Chloroflexus aurantiacus）
Rcas_2929	YP_001433009.1	156742880	ロゼイフレクサス・カステンホルツィイ（Roseiflexus castenholzii）
NAP1_02720	ZP_01039179.1	85708113	エリスロバクター（Erythrobacter）属NAP1
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	119504313	海生ガンマプロテオバクテリア HTCC2080

40

【0094】

より長い鎖のアシル-CoA分子は、アルコールを形成する脂肪アシル-CoA還元酵素をコ-

50

ドするホホバ(シンモンドシア・キネンシス(*Simmondsia chinensis*))FARなどの酵素によって還元することができる。大腸菌におけるその過剰発現は、FAR活性及び脂肪アルコールの蓄積を結果として生じた(Metzらの文献(Plant Physiology, 122: 635-644 (2000))) (FAR、AAD38039.1、5020215.シンモンドシア・キネンシス)

【0095】

本明細書に開示された経路は、アシル-CoAをアルデヒドへ転換する数多くの酸化還元酵素型の転換を包含する。具体的には、図2における工程A及び工程Hは、アセトアセチル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)及び3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)によって触媒され、図3由来の工程Cは、3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素によって触媒される転換を示す。

10

【0096】

いくつかのアシル-CoA脱水素酵素は、アシル-CoAをその相応するアルデヒドへ還元することができる。このような酵素をコードする典型的な遺伝子には、脂肪アシル-CoA還元酵素をコードするアシネットバクター・カルコアセティカス`acr1`(Reiserらの文献(J. of Bacteriology, 179: 2969-2975 (1997)))、アシネットバクター属M 1脂肪アシル-CoA還元酵素(Ishigeらの文献(Appl. Environ. Microbiol., 68: 1192-1195 (2002)))、並びにクロストリジウム・クライベリにおける`sucD`遺伝子によってコードされるCoA 依存性及びNADP 依存性スクシナートセミアルデヒド脱水素酵素(Sohlingらの文献(J. Bacteriol., 178: 871-880 (1996)))を含む。ポルフィロモナス・ジンジバリスの`sucD`は、別のスクシナートセミアルデヒド脱水素酵素である(Takahashiらの文献(J. Bacteriol., 182: 4704-4710 (2000)))。`bphG`によってコードされるシュードモナス属における酵素アシル化アセトアルデヒド脱水素酵素は、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド、及びホルムアルデヒドを酸化及びアシル化することが示されたなおも別の酵素である(Powlowskiらの文献(J. Bacteriol., 175: 377-385 (1993)))。アセチル-CoAをエタノールへ還元することに加えて、ロイコノストック・メセンテロイデスにおける`adhE`によってコードされる酵素は、分岐鎖化合物イソブチルアルデヒドをイソブチリル-CoAへ酸化することが示されている(Kazahayaらの文献(上述); Kooらの文献(上述)))。ブチルアルデヒド脱水素酵素は、クロストリジウム・サッカロバーブチルアセトニカムなどの溶媒原性生物(solventogenic organisms)において、類似の反応であるブチリル-CoAのブチルアルデヒドへの転換を触媒する(Kosakaらの文献(Biosci. Biotechnol. Biochem., 71: 58-61 (2007)))。追加的な酵素アルデヒド脱水素酵素候補物は、デスルファチバシラム・アルケニボランス(*Desulfatibacillum alkenivorans*)、シトロバクター・コセリ、サルモネラ・エンテリカ、ラクトバチルス・ブレビス、及びバチルス・セレニチレデュセンス(*selenitireducens*)において認められる。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表12に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

20

30

【表 1 2】

表 12

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
acrI	YP_047869.1	50086359	アシネトバクター・カルコアセティカス
acrI	AAC45217	1684886	アシネトバクター・バイリリ (<i>baylyi</i>)
acrI	BAB85476.1	18857901	アシネトバクター種M-1株
sucD	P38947.1	172046062	クロストリジウム・クライベリ
sucD	NP_904963.1	34540484	ポルフィロモナス・ジンジバリス
bphG	BAA03892.1	425213	シュードモナス種
adhE	AAV66076.1	55818563	ロイコノストック・メセンテロイデス
bld	AAP42563.1	31075383	クロストリジウム・サッカロパープチルアセトニカム
ald	ACL06658.1	218764192	デスルファチバシラム・アルケニボラス (<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>) AK-01
ald	YP_001452373	157145054	シトロバクター・コセリ ATCC BAA-895
pduP	NP_460996.1	16765381	サルモネラ・エンテリカチフィリウム
pduP	ABJ64680.1	116099531	ラクトバチルス・ブレビス ATCC 367
BselDRAFT_1651	ZP_02169447	163762382	バチルス・セレニチレデュセンス (<i>selenitireducens</i>) MLS10

【0097】

アシル-CoAをその相応するアルデヒドへ転換する追加的な酵素の種類は、マロニル-CoAをマロン酸セミアルデヒドへ転換するマロニル-CoA還元酵素である。マロニル-CoA還元酵素は、好熱酸性古細菌における3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルを介した独立栄養性炭素固定における鍵酵素である (Bergらの文献 (上述) ; Thauer, R.K.の文献 (Science, 318 : 1732-1733 (2007)))。酵素は、NADOHを共因子として利用し、メタロスファエラ菌種及びスルホロブス菌種において特徴づけられている (Alberらの文献 (J. Bacteriol., 188 : 8551-8559 (2006) ; Huglerらの文献 (上述)))。酵素は、メタロスファエラ・セデュラにおけるMsed_0709によってコードされる (Alberらの文献 (上述) ; Bergらの文献 (上述))。スルホロブス・トコダイイ (tokodaii) 由来のマロニル-CoA還元酵素をコードする遺伝子がクローニングされ、大腸菌において異種性に発現した (Alberらの文献 (上述))。また、この酵素は、メチルマロニル-CoAのその相応するアルデヒドへの転換を触媒することが示されている (2007)。これらの酵素のアルデヒド脱水素酵素官能性は、クロロフレクサス・アウランティアクス由来の二機能性脱水素酵素と類似しているが、配列類似性はほとんどない。マロニル-CoA還元酵素の両酵素は、アスパルチル-4-ホスファートのアスパルタートセミアルデヒドへの還元及び同時の脱リン酸化を触媒する酵素であるアスパルタート-セミアルデヒド脱水素酵素と高い配列類似性を有する。追加的な遺伝子は、スルホロブス・ソルファタリカス及びスルホロブス・アシドカルダリウスを含む他の生物におけるタンパク質との配列相同性によって見出すことができ、下記に列挙されている。CoAアシル化アルデヒド脱水素酵素についてのなおも別の酵素は、クロストリジウム・ベイジエリンキ由来のald遺伝子である (Tothらの文献 (Appl. Environ. Microbiol., 65 : 4973-4980 (1999)))。この酵素は、アセチル-CoA及びブチリル-CoAをそれらの相応するアルデヒドへ還元することが報告されている。この遺伝子は、サルモネラ・チフィリウム及び大腸菌のアセトアルデヒド脱水素酵素をコードするeutEと非常に類似している (Tothらの文献 (上述))。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連

10

20

30

40

50

したデータは、表13に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表13】

表13

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>MSED_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	メタロスファエラ・セデュラ
<i>mcr</i>	NP_378167.1	15922498	スフホロブス・トコダイ (<i>tokodaii</i>)
<i>asd-2</i>	NP_343563.1	15898958	スルホロブス・ソルファタリカス
<i>Saci_2370</i>	YP_256941.1	70608071	スルホロブス・アシドカルダリウス
<i>Ald</i>	AAT66436	9473535	クロストリジウム・ベイジェリンキ
<i>eutE</i>	AAA80209	687645	サルモネラ・チフィリウム
<i>eutE</i>	P77445	2498347	大腸菌

【0098】

アミノ基のその相応するオキソ基への酸化的脱アミノ化は、ECクラス1.4.1における脱アミノ化する酸化還元酵素によって触媒される。このような酵素は、NAD⁺、NADP⁺、又はFAD⁺を受容体として利用する。このクラスにおける酵素は、2-アミノ-4-オキソペンタノアートを2,4-ジオキソペンタノアートへ(図1、工程B)、2-アミノ-4-ヒドロキシペンタノアートを2-オキソ-4-ヒドロキシペンタノアートへ(図1、工程M)、及び4-アミノブタン-2-オンを3-オキソブチルアルデヒドへ(図1、工程K)転換することができる。類似の基質に作動する典型的な酸化還元酵素には、gdhAによってコードされるグルタミン酸脱水素酵素(脱アミノ化)、ldhによってコードされるロイシン脱水素酵素(脱アミノ化)、及びnadXによってコードされるアスパラギン酸脱水素酵素(脱アミノ化)を含む。大腸菌由来のgdhA遺伝子産物(McPhersonらの文献(Nucleic Acids Res. 11: 5257-5266 (1983)) ; Korberらの文献(J. Mol. Biol. 234: 1270-1273 (1993)))、サーモトガ・マリティマ由来のgdh(Kortらの文献(Extremophiles 1: 52-60 (1997)) ; Lebbinkらの文献(J. Mol. Biol. 280: 287-296 (1998)) ; Lebbinkらの文献(J. Mol. Biol. 289: 357-369 (1999)))、及びハロバクテリウム・サリナルム由来のgdhA1(Ingoldsbyらの文献(Gene. 349: 237-244 (2005)))は、NADP(H)、NAD(H)、又はその両方をそれぞれ好みながら、グルタミン酸の2-オキソグルタラート及びアンモニアへの可逆的相互転換を触媒する。追加的なグルタミン酸脱水素酵素遺伝子候補物は、バチルス・スブチリス(Khanらの文献(Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 1861-1870 (2005)))、タバコ(Purnellらの文献(Planta 222: 167-180 (2005)))、イネ(Abikoらの文献(Plant Cell Physiol. 46: 1724-1734 (2005)))、ハロフェラックス・メディテラネイ(Diazらの文献(Extremophiles. 10: 105-115 (2006)))、ハロバクテリウム・サリナルム(Haydenらの文献(FEMS Microbiol. Lett. 211: 37-41 (2002)))、及び酵母(Rocaらの文献(Appl. Environ. Microbiol. 69: 4732-4736 (2003)))において認められる。タバコ酵素は、gdh1及びgdh2によってコードされるアルファサブユニット及びベータサブユニットから構成される(Purnellらの文献(Planta 222: 167-180 (2005)))。バチルス・セレウスのldh遺伝子は、ロイシン、イソロイシン、バリン、及び2-アミノブタノアートを含む広範な範囲の基質を受容するLeuDHタンパク質をコードする(Stoyanらの文献(J. Biotechnol. 54: 77-80 (1997)) ; Ansorgeらの文献(Biotechnol. Bioeng. 68: 557-562 (2000)))。アスパラギン酸脱水素酵素についてコードするサーモトガ・マリティマ由来のnadX遺伝子は、NADの生合成に関与する(Yangらの文献(J. Biol. Chem. 278: 8804-8808 (2003)))。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列に関連したデータは、下記の表14に示されるGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

10

20

30

40

【表14】

表14

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
gdhA	P00370	118547	大腸菌
gdh	P96110.4	6226595	サーモトガ・マリティマ
gdhA1	NP_279651.1	15789827	ハロバクテリウム・サリナルム
rocG	NP_391659.1	16080831	バチルス・スブチリス
gdh1	AAR11534.1	38146335	タバコ
gdh2	AAR11535.1	38146337	タバコ
GDH	Q852M0	75243660	イネ
GDH	Q977U6	74499858	ハロフェラックス・メディテラネイ
GDH	P29051	118549	ハロバクテリウム・サリナルム
GDH2	NP_010066.1	6319986	出芽酵母
ldh	P0A393	61222614	バチルス・セレウス
nadX	NP_229443.1	15644391	サーモトガ・マリティマ

【0099】

4-アミノブタン-2-オン酸化還元酵素（脱アミノ化）活性を有する酵素は、4-アミノブタン-2-オンをその相応するアルデヒドへ転換することを必要とする（図1、工程K）。典型的な候補物には、3,5-ジアミノヘキサン酸脱水素酵素（EC1.4.1.11）及びリシン6-脱水素酵素（EC1.4.1.18）を含む。3,5-ジアミノヘキサン酸脱水素酵素は、3-アミノ酸及び3-オキソ酸を相互転換し、リシンを発酵させる生物において特徴づけられている。3,5-ジアミノヘキサン酸脱水素酵素をコードする遺伝子kddが近年、フソバクテリウム・ヌクレアタムにおいて同定された（Kreimeyerらの文献（J Biol. Chem. 282: 7191-7197 (2007)））。該酵素は、他の生物において精製され及び特徴づけられている（Bakerらの文献（J Biol. Chem. 247: 247: 7724-7734 (1972)）；Bakerらの文献（Biochemistry 13: 292-299 (1974)）が、これらの酵素と関連した遺伝子は知られていない。配列決定された他の生物における候補は、配列相同性によって推測され得る。lysDH遺伝子によってコードされるリシン6-脱水素酵素は、第一級アミンのそれらの相応するアルデヒドへの転換を触媒する。この酵素はL-リシンの6-アミノ基の可逆的な酸化的脱アミノ化を天然に触媒し、2-アミノアジパート-6-セミアルデヒドを形成する（Misonoらの文献（J Bacteriol. 150: 398-401 (1982)））。典型的な酵素は、ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス（Hedariらの文献（Appl Environ. Microbiol 70: 937-942 (2004)））、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Hashimotoらの文献（J Biochem. 106: 76-80 (1989)）；Misono及びNagasakiの文献（J Bacteriol. 150: 398-401 (1982)））、及びアクロモバクター・デニトリフィカンス（Ruldeekulthamrongらの文献（BMB. Rep. 41: 790-795 (2008)））において認められる。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表15に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

10

20

30

40

【表15】

表15

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>kdd</i>	AAL93966.1	19713113	フソバクテリウム・ヌクレアタム
<i>lysDH</i>	BAB39707	13429872	ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス
<i>lysDH</i>	NP_353966	15888285	アグロバクテリウム・ツメファシエンス
<i>lysDH</i>	AAZ94428	74026644	アクロモバクター・デニトリフィカヌス

10

【0100】

2-アミノ-4-オキソペンタノアート (AKP) チオラーゼ又はAKPチオラーゼ (AKPT) (工程1、図1) は、クロストリジウム・スティックランディにおいてオルニチン分解に関するピリドキサルホスファート 依存性酵素である (Jengらの文献 (A. Biochemistry, 13 : 2898-2903 (1974)) ; Kenkliésらの文献 (Microbiology, 145 : 819-826 (1999)))。AKPTのアルファサブユニット及びベータサブユニット (or 2 (orta) 及びor 3 (ortB)) をコードする遺伝子クラスターが近年同定されており、該酵素の生化学的特性が特徴づけられた (Fonknechtenらの文献 (J. Bacteriol., 印刷中 (2009)))。該酵素は、両方向で作動することができ、アラニンのD 異性体と反応する。酵素操作は、L-アラニンを基質として用いた機能を最適化するために実施することができる。クロストリジウム・スティックランディ由来のAKPTは、特徴づけられているが、そのタンパク質配列はまだ刊行されていない。高い配列相同性を有する酵素は、クロストリジウム・ディフィシル、アルカリフィラス・メタルリレジゲンス (*Alkaliphilus metallireducens*) QYF、サーモアナエロバクター属X514、及びサーモアナエロバクター・テングコンゲンシス (*tengcongenis*) MB4において認められる (Fonknechtenらの文献 (上述))。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表16において示される以下のGenBank 受入番号を用いて見出すことができる。

【表16】

表16

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>ortA (A)</i>	YP_001086914.1	126698017	クロストリジウム・ディフィシル 630
<i>ortB (β)</i>	YP_001086915.1	126698018	クロストリジウム・ディフィシル 630
<i>Amet_2368 (α)</i>	YP_001320181.1	150390132	アルカリフィラス・メタルリレジゲンス (<i>Alkaliphilus metallireducens</i>) QYF
<i>Amet_2369 (β)</i>	YP_001320182.1	150390133	アルカリフィラス・メタルリレジゲンス QYF
<i>Teth514_1478 (α)</i>	YP_001663101.1	167040116	サーモアナエロバクター種 X514
<i>Teth514_1479 (β)</i>	YP_001663102.1	167040117	サーモアナエロバクター種 X514
<i>TTE1235 (α)</i>	NP_622858.1	20807687	サーモアナエロバクター・テングコンゲンシス (<i>tengcongenis</i>) MB4
<i>thrC (β)</i>	NP_622859.1	20807688	サーモアナエロバクター・テングコンゲンシス MB4

20

30

【0101】

2-アミノ-4-オキソペンタノアート (AKP) の2,4-ジオキソペンタノアートへの転換 (工程B、図1) は、2-アミノ-4-オキソペンタノアートアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素 (脱アミノ化) によって達成される。この形質転換についての適切な酵素の選択は、基質の立体化学による。例えば、基質がD 配置にある場合、D アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (EC2.6.1.21) を利用することができるのに対し、L 立体異性体は、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (EC2.6.1.1) などのL アミノトランスフェラーゼ

40

50

を利用することができる。

【0102】

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼは、アミノ基をアスパラギン酸からアルファ-ケトグルタル酸へ転移し、グルタミン酸およびオキサロ酢酸を形成する。アスパラギン酸は、2-アミノ-4-オキソペンタン酸に構造上類似している。この転換は、例えば、大腸菌由来のaspCの遺伝子産物 (Yagiらの文献 (FEBS Lett, 100 : 81-84 (1979)) ; Yagiらの文献 (Methods Enzymol, 133 : 83-89 (1985))) 、出芽酵母由来のAAT2 (Yagiらの文献 (J. Biochem., 92 : 35-43 (1982))) 、及びシロイヌナズナ由来のASP5 (Kwokらの文献 (J. Exp. Bot., 55 : 595-604 (2004)) ; De laらの文献 (Plant J., 46 : 414-425 (2006)) ; Wilkieらの文献 (Protein Expr. Purif, 12 : 381-389 (1998))) によって触媒される。ラット由来の酵素は、2-アミノヘキサン二酸及び2,4-ジアミノ酪酸などの代替基質をアミノ基転移することが示されている (Recasensらの文献 (Biochemistry, 19 : 4583-4589 (1980)))。また、アミノ酸様基質に作用するアミノトランスフェラーゼは、この形質転換を触媒することができる。バリンアミノトランスフェラーゼは、バリン及びビルビン酸の2-ケトイソ吉草酸及びアラニンへの転換を触媒する。大腸菌遺伝子avtAは、1つのこのような酵素をコードする (Whalenらの文献 (J. Bacteriol., 150 : 739-746 (1982)))。また、この遺伝子産物は、-ケト酪酸のアミノ化を触媒して-アミノ酪酸を生じるが、この反応におけるアミンドナーは同定されていない (Whalenらの文献 (J. Bacteriol., 158 : 571-574 (1984)))。追加的な候補は、いくつかの生物におけるリシン生合成および分解に関する酵素アルファ-アミノアジピン酸トランスマニナーゼ (EC2.6.1.39) である。lysNによってコードされるサーマス・サーモフィラス由来の酵素は、オキサロ酢酸、2-オキソイソカプロン酸、2-オキソイソ吉草酸、及び2-オキソ-3-メチル吉草酸を含むいくつかの代替基質で活性となる (Miyazakiらの文献 (Microbiol. 150 : 2327-2334 (2004)))。ヒト由来の類似の酵素が特徴づけられている (Okunoらの文献 (Enz. Prot. 47 : 136-148 (1993)))。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表17に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表17】

表17

30

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
aspC	NP_415448.1	16128895	大腸菌
AAT2	P23542.3	1703040	出芽酵母
ASP5	P46248.2	20532373	シロイヌナズナ
got2	P00507	112987	ラット
avtA	YP_026231.1	49176374	大腸菌
lysN	BAC76939.1	31096548	サーマス・サーモフィラス
AadAT-II	Q8N5Z0.2	46395904	ヒト

40

【0103】

基質がD 立体異性体として存在する場合、アミノ基転移は、D アミノ酸アミノトランスフェラーゼ及びD アラニンアミノトランスフェラーゼ (DAAT) としても公知のD アミノトランスフェラーゼ (EC2.6.1.21) によって触媒することができる。このクラスの酵素は、種特異的であるその広範な基質特異性について特筆される。datによってコードされる桿菌種YM 1由来のD アミノトランスフェラーゼは、クローニングされており、配列決定されており (Tanizawaらの文献 (J. Biol. Chem., 264 : 2450-2454 (1989)))、結晶構造が解析されている (Peisachらの文献 (Biochemistry, 37 : 4958-4967 (1998)))。また、この酵素は、基質特異性を変化させるタンパク質工学研究の対象である (Gutierrez 50

zらの文献 (Eur. J. Biochem, 267 : 7218-7223 (2000)) ; Gutierrezらの文献 (Protein Eng., 11 : 53- 58 (1998)))。追加的な遺伝子は、バチルス・リケニフォルミスATCC 10716 (Taylorらの文献 (Biochim. Biophys. Acta., 1350 : 38-40 (1997)))、スタフ イロコッカス・ヘモリチカス (Pucciらの文献 (J. Bacteriol., 177 : 336-342 (1995)))、及び枯草菌 (Martinez-Carrionらの文献 (J. Biol. Chem., 240 : 3538-3546 (1965)))において認められる。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表18に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表18】

表18

10

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
dat	P19938	118222	桿菌種 YM-1
dat	P54692	1706292	バチルス・リケニフォルミス ATCC 10716
dat	P54694	1706294	スタフィロコッカス・ヘモリチカス
dat	O07597.1	3121979	枯草菌

【0104】

図1の反応Kにおいて、4-アミノブタン-2-オンはアミノ基転移され、3-オキソブタナルを形成する。この形質転換は、末端アミン及びアルデヒドを相互転換するアミノトランスフェラーゼによって触媒することができそうである。典型的な候補酵素は、ベータ-アラニン / アルファ-ケトグルタル酸アミノトランスフェラーゼ、GABAアミノトランスフェラーゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、リシン-6-アミノトランスフェラーゼ、2,4-ジアミノブタン酸トランスアミナーゼ、ブトレシンアミノトランスフェラーゼ、及びジアミンアミノトランスフェラーゼである。

20

【0105】

Cargill社は、マロニル-セミアルデヒドを介してベータ-アラニンから3-HPを生成するためにベータ-アラニン / アルファ-ケトグルタル酸アミノトランスフェラーゼを開発及び特許化した (Chandraらの文献 (Arch. Microbiol., 176 : 443-451 (2001)))。また、サッカロミセス・クルイベリにおけるSkPYD4の遺伝子産物が、アミノ基ドナーとしてベータ-アラニンを優先的に用いることが示された (Aberhartらの文献 (J. Chem. Soc. 6 : 14 04-1406 (1979)))。SKUGA1は、出芽酵母GABAアミノトランスフェラーゼUGA1のホモログをコードする (Ichikawaらの文献 (J. Mol. Catalysis A-Chem., 256 : 106-112 (2006)))のに対し、SkPYD4は、-アラニン及びGABAアミノ基転移の両方に関与する酵素をコードする (Aberthartらの文献 (上述)))。3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼは、メチルマロナートセミアルデヒドから3-アミノ-2-メチルプロピオン酸への形質転換を触媒する。該酵素は、ラット及びイノシシにおいて特徴づけられており、Abatによってコードされる (Chopraらの文献 (Protein Expr. Purif, 25 : 533-540 (2002)))、Kuznetsovaらの文献 (FEMS Microbiol. Rev., 29 : 263-279 (2005)))。3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼに対する高い配列相同性を有する他の生物における酵素候補には、線虫におけるGta 1及びバチルス・スブチリスにおけるgabTを含む。加えて、遺伝子gabTによってコードされる大腸菌における未変性GABAアミノトランスフェラーゼのうちの1つは、広範な基質特異性を有することが示されている (Fontaineらの文献 (J. Bacteriol, 184 : 821-830 (2002)))、Kanamasaらの文献 (Appl. Microbiol Biotchnol, 80 : 223-229 (2008)))。遺伝子puuEは、大腸菌における他の4-アミノ酪酸トランスアミナーゼをコードする (Drummondらの文献 (J. Biol. Chem., 235 : 318-325 (19 60)))。

30

【0106】

リシン-6-アミノトランスフェラーゼは、リシンをアルファ-アミノアジパートセミアルデヒドへ転換する。候補酵素は、トルラ酵母 (Hammerらの文献 (J Basic Microbiol 32 :

40

50

21-27 (1992))) 、 フラボバクテリウム・ルテセンス (Fujiiらの文献 (J Biochem. 128 : 391-397 (2000))) 、 及びストレプトミセス・クラブリゲルス (Romeroらの文献 (J Ind. Microbiol Biotechnol 18 : 241-246 (1997))) において特徴づけられている。ストレプトミセス・クラブリゲルス由来の組換えリシン-6-アミノトランスフェラーゼは、大腸菌において機能的に発現した (Tobinらの文献 (J Bacteriol. 173:6223-6229 (1991))) 。 フラボバクテリウム・ルテセンス酵素は、アミノ受容体としてアルファ-ケトグルタル酸に特異的である (Sodaらの文献 (Biochemistry 7 : 4110-4119 (1968))) 。 ジアミノブタン酸トランスアミナーゼ活性を有する酵素は、アシネットバクター・バウマンニにおけるdat遺伝子産物によってコードされる (Ikaiらの文献 (J Bacteriol. 179 : 5118-5125 (1997))) 。 その天然基質である2,4-ジアミノブチラートに加えて、DATは、リシン、4-アミノブチラート、及びオルニチンの末端アミノをアミノ基転移する。候補プロテシングアミノトランスフェラーゼ酵素は、大腸菌におけるygiG及び緑膿菌のspuCによってコードされる (Luらの文献 (J Bacteriol. 184 : 3765-3773 (2002))) 。 ygiG遺伝子産物は、代替基質カダベリン、スペルミジン、及び1,7-ジアミノヘプタン酸と反応する (Samsonovaらの文献 (BMC Microbiol 3 : 2 (2003)) ; Kimの文献 (J Biol. Chem. 239 : 783-786 (1964))) 。

【0107】

これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列に関連したデータは、表19において示された以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表19】

10

20

表19

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	98626772	サッカロミセス・クルイベリ
<i>SkUGA1</i>	ABF58894.1	98626792	サッカロミセス・クルイベリ
<i>UGA1</i>	NP_011533.1	6321456	出芽酵母
<i>Abat</i>	P50554.3	122065191	ラット
<i>Abat</i>	P80147.2	120968	イノシシ
<i>Gta-1</i>	Q21217.1	6016091	線虫
<i>gabT</i>	P94427.1	6016090	バチルス・スブチリス
<i>gabT</i>	P22256.1	16130576	大腸菌K12
<i>puuE</i>	NP_415818.1	16129263	大腸菌K12
<i>lat</i>	BAB13756.1	10336502	フラボバクテリウム・ルテセンス
<i>lat</i>	AAA26777.1	153343	ストレプトミセス・クラブリゲルス
<i>dat</i>	P56744.1	6685373	アシネットバクター・バウマンニ
<i>ygiG</i>	NP_417544	145698310	大腸菌
<i>spuC</i>	AAG03688	9946143	緑膿菌

30

【0108】

40

図1、工程Cにおいて、2,4-ジオキソペンタン酸は、2,4-ジオキソペンタン酸デカルボキシラーゼによってデカルボキシル化されて、3-オキソブチルアルデヒドを形成する。2,4-ジオキソペンタン酸は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ (EC4.1.1.1) 及びベンゾイルギ酸デカルボキシラーゼ (EC4.1.1.7) の未変性基質と類似している。ケト-酸デカルボキシラーゼとも呼ばれるピルビン酸デカルボキシラーゼ (PDC) は、ピルビン酸のアセトアルデヒドへのデカルボキシル化を触媒するアルコール発酵における鍵酵素である。出芽酵母由来の酵素は、2-ケト酪酸、2-ケト吉草酸、3-ヒドロキシピルビン酸、及び2-フェニルピルビン酸を含む脂肪族2-ケト酸に対する広範な基質範囲を有する (Liらの文献 (Biochemistry, 38 : 10004-10012 (1999))) 。この酵素は、広範に研究されており、変化した活性について操作されており、大腸菌において機能的に発現する (Killenberg-Jabsらの

50

文献 (Eur. J. Biochem., 268 : 1698-1704 (2001) ; Liらの文献 (上述) ; Schureらの文献 (Appl. Environ. Microbiol., 64 : 1303-1307 (1998)))。また、pdcによってコードされるザイモモナス・モビリス由来のPDCは、広範な基質範囲を有しており、異なる基質に対する親和性を変化させるための指向型工学 (directed engineering) 研究の対象である (Siegertらの文献 (Protein Eng. Des. Sel., 18 : 345-357 (2005)))。この酵素の結晶構造は入手可能である (Killenberg-Jabsの文献 (上述))。他の十分に特徴づけられたPDC酵素には、アセトバクター・パストウリアンス (pasteurians) (Chandraらの文献 (Arch. Microbiol. 176 : 443-451 (2001))) 及びクルイベロミセス・ラクチス (Kriegerらの文献 (Eur. J. Biochem., 269 : 3256-3263 (2002))) 由来の酵素を含む。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表20に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表20】

10

表20

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
pdc	P06672.1	118391	ザイモモナス・モビリス
pdc1	P06169	30923172	出芽酵母
pdc	Q8L388	20385191	アセトバクター・パストウリアンス (pasteurians)
pdc1	Q12629	52788279	クルイベロミセス・ラクチス

20

【0109】

PDCのように、ベンゾイルギ酸デカルボキシラーゼ (EC4.1.1.7) は、広範な基質範囲を有し、酵素工学研究の標的である。プチダ菌由来の酵素は、広範に研究されており、この酵素の結晶構造は入手可能である (Polovnikovaらの文献 (Biochemistry 42 : 1820-1830 (2003)) ; Hassonらの文献 (Biochemistry, 37 : 9918-9930 (1998)))。プチダ菌の酵素の活性部位における2つの残基の部位特異的変異原性は、天然基質及び非天然基質の親和性 (K_m) を変化させた (Siegertらの文献 (上述))。この酵素の特性は、指向型工学によってさらに修飾されている (Lingenらの文献 (Chembiochem, 4 : 721-726 (2003) ; Lingenらの文献 (Protein Eng., 15 : 585-593 (2002)))。mdlCによってコードされる緑膿菌由来の酵素も、実験的に特徴づけられている (Barrowmanらの文献 (FEMS Microbiology Letters, 34 : 57-60 (1986)))。シュードモナス・スツツツエリ、蛍光菌、及び他の生物由来の追加的な遺伝子は、配列相同性によって推測することができ、又はプチダ菌において開発された増殖選択系を用いて同定することができる (Henningらの文献 (Appl. Environ. Microbiol., 72 : 7510-7517 (2006)))。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表21に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表21】

30

表21

40

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
mdlC	P20906.2	3915757	プチダ菌
mdlC	Q9HUR2.1	81539678	緑膿菌
dpgB	ABN80423.1	126202187	シュードモナス・スツツツエリ
ilvB-1	YP_260581.1	70730840	蛍光菌

【0110】

2-オキソ酸をデカルボキシル化することのできる第三の酵素は、アルファ-ケトグルタ

50

ル酸デカルボキシラーゼ (KGD) である。このクラスの酵素の基質範囲は、今まで研究されていない。結核菌由来のKDC (Tianらの文献 (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 102 : 10670-10675 (2005))) は、GenomatiCa社においてクローニングされており、大腸菌において機能的に発現している。KDC酵素活性は、ブラディリゾビウム・ジャポニクム及びメソリゾビウム・ロティを含む根粒菌のいくつかの種において検出されている (Greenらの文献 (J. Bacteriol, 182 : 2838-2844 (2000)))。KDCをコードする遺伝子はこれらの生物で単離されていないが、ゲノム配列は入手可能であり、各ゲノムにおけるいくつかの遺伝子は、推定KDCとして注解されている。また、ユーグレナ・グラシリス由来のKDCも特徴づけられているが、この活性と関連した遺伝子は、今まで同定されていない (Shigeokaらの文献 (Arch. Biochem. Biophys., 288 : 22-28 (1991)))。N 末端から出発する最初の20個のアミノ酸が、

【化1】

MTYKAPVKDVKFLLDKVFKV

と配列決定された (Shigeokaらの文献 (上述))。該遺伝子は、KDC活性についてこのN末端配列を含む遺伝子を試験することによって同定することができる。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表22に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表22】

表22

10

20

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
kgd	O50463.4	160395583	結核菌
kgd	NP_767092.1	27375563	ブラディリゾビウム・ジャポニクムUSDA110
kgd	NP_105204.1	13473636	メソリゾビウム・ロティ

【0111】

この工程を触媒するための第四の酵素は、分岐鎖アルファ-ケト酸デカルボキシラーゼ (BCKA) である。このクラスの酵素は、3~6の炭素鎖長において変動する種々の化合物に作用することが示されている (Okuらの文献 (J. Biol. Chem., 263 : 18386-18396 (1988)) ; Smitらの文献 (Appl. Environ. Microbiol, 71 : 303-311 (2005)))。ラクトコッカス・ラクティスにおける酵素は、2-オキソブタン酸、2-オキソヘキサン酸、2-オキソペニタン酸、3-メチル-2-オキソブタン酸、4-メチル-2-オキソブタン酸、及びイソカプロン酸を含む種々の分岐鎖および直鎖基質に関して特徴づけられている (Smitらの文献 (上述))。この酵素は、構造的に特徴づけられている (Bertholdらの文献, D. Biol. Crystallogr., 63 : 1217-1224 (2007))。ラクトコッカス・ラクティス酵素とザイモモナス・モビリスのピルビン酸デカルボキシラーゼの間の配列アラインメントは、触媒性残基及び基質認識残基がほぼ同一であることを示し (Siegertらの文献 (上述))、それによりこの酵素は、指向型工学に容易に受け入れられる。追加的なBCKA遺伝子は、ラクトコッカス・ラクティスタンパク質配列 (kdcA, AAS49166.1, 44921617、ラクトコッカス・ラクティス) に対する相同性によって同定することができる。この酵素に対する高スコア化BLASTp的中物の多くは、インドールピルビン酸デカルボキシラーゼ (EC4.1.1.74) として注解される。インドールピルビン酸デカルボキシラーゼ (IPDA) は、植物及び植物細菌におけるインドールピルビン酸のインドールアセトアルデヒドへのデカルボキシル化を触媒する酵素である。

【0112】

2-アミノ-4-ケトペニタン酸は、図1の工程EにおいてAKPデカルボキシラーゼによってデカルボキシル化されて、4-アミノブタン-2-オンを形成する。この形質転換は、アミノ酸デカルボキシラーゼによって触媒することができる。適切なデカルボキシラーゼの選択

30

40

50

は、4-アミノ-4-オキソペントン酸の立体化学配置による。この化合物がD配置にある場合、Dアミノ酸デカルボキシラーゼを利用することができる。1つのこのようなDアミノ酸デカルボキシラーゼは、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ (DDC、EC4.1.1.20) である。この酵素は、リシン生合成の最終工程を触媒するメソ-ジアミノピメリン酸のD立体中心をデカルボキシル化する。DDCは、大腸菌 (Momanyらの文献 (D. Biol. Crystallogr., 58 : 549-552 (2002)))、結核菌 (Kefalaらの文献 (Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun., 61 : 782-784 (2005)) ; Gokulanらの文献 (J. Biol. Chem., 278 : 18588-18596 (2003)) ; Andersenらの文献 (Gene, 124 : 105-109 (1993)))、メチロフィルス・メチロトロファス (Tsujimotoらの文献 (J. Biotechnol., 124 : 327-337 (2006)))、及びヘリコバクター・ピロリ (Huらの文献 (J. Biol. Chem., 283 : 21284-21293 (2008)))を含む多くの生物において研究されている。あるいは、ヒト由来のオルニチンデカルボキシラーゼ (EC4.1.1.17) は、オルニチンのD異性体について弱い活性を有し (Quらの文献 (Biochem. J., 375 : 465-470 (2003)) ; Fitzgeraldらの文献 (DNA, 8 : 623-634 (1989)))、工程Eにおけるデカルボキシル化のために用いることができる。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表23に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表23】

表23

20

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
lysA	NP_417315.1	16130742	大腸菌
lysA	AAA25361.1	149964	結核菌
lysA	BAC92756.1	37196770	メチロフィルス・メチロトロファス
lysA	ABW70801.1	158523325	ヘリコバクター・ピロリ
odc1	AA59969.1	386989	ヒト

【0113】

2-アミノ-4-ケトペントン酸がL立体化学を呈する場合、アスパラギン酸デカルボキシラーゼ (EC4.1.1.11)、オルニチンデカルボキシラーゼ (EC4.1.1.17)、又はリシンデカルボキシラーゼ (EC4.1.1.18)などのアミノ酸デカルボキシラーゼを利用することができる。典型的な酵素は、アスパラギン酸デカルボキシラーゼ (EC4.1.1.11) である。2-アミノ-4-ケトペントン酸は、この酵素の未変性基質であるアスパラギン酸と構造類似性を有する。アスパラギン酸デカルボキシラーゼは、パントテン酸生合成に関与し、大腸菌におけるpanDによってコードされる (Duschらの文献 (Appl. Environ. Microbiol., 65 : 1530-1539 (1999)) ; Ramjeeらの文献 (Biochem. J., 323 : 661-669 (1997)) ; Merkelらの文献 (FEMS Microbiol. Lett., 143 : 247-252 (1996)) ; Schmitzbergerらの文献 (EMBOJ., 22 : 6193-6204 (2003)))。結核菌 (Chopraらの文献 (Protein Expr. Purif. 25 : 533-540 (2002))) 及びコリネバクテリウム・グルタミクム (Duschらの文献 (上述)) 由来の酵素は、大腸菌において発現しており、特徴づけられている。リシンデカルボキシラーゼ酵素は、遺伝子cadA及びldcCによって大腸菌ゲノムにおいてコードされる。CadAと類似のリシンデカルボキシラーゼは近年、腸炎ビブリオ菌において同定された (Tanakaらの文献 (J. Appl. Microbiol. 104 : 1283-1293 (2008)))。ldcによってコードされるセレノモナス・ルミナンチウム由来のリシンデカルボキシラーゼは、真核生物オルニチンデカルボキシラーゼとの配列類似性を有し、Lリシン及びLオルニチンの両方を基質として受け入れる (Takatsukaらの文献 (Biosci. Biotechnol. Biochem. 63 : 1843-1846 (1999)))。オルニチンデカルボキシラーゼ酵素候補は、ニコチアナ・グルチノーザ (Nicotiana glutinosa) (Leeらの文献 (Biochem. J. 360 : 657-665 (2001)))、ラクトバチルス種30a (Guirardらの文献 (J. Biol. Chem. 255 : 5960-5964 (1980)))、及びビブリオ・

30

40

50

バルニフィカス (Leeらの文献 (J Biol. Chem. 282 : 27115-27125 (2007))) において認められる。基質特異性ビブリオ・バルニフィカスに関する残基は解明されている (Leeらの文献 (上述))) 。

【0114】

これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表24において示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表24】

表24

10

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>panD</i>	P0A790	67470411	大腸菌
<i>panD</i>	Q9X4N0	18203593	コリネバクテリウム・グルタミクム
<i>panD</i>	P65660.1	54041701	結核菌
<i>cadA</i>	AAA23536.	145458	大腸菌
<i>ldcC</i>	AAC73297.1	1786384	大腸菌
<i>ldc</i>	O50657.1	13124043	セレノモナス・ルミナンチウム
<i>cadA</i>	AB124819.1	44886078	腸炎ビブリオ菌
<i>AF323910.1:1..1299</i>	AAG45222.1	12007488	ニコチアナ・グルチノーザ
<i>odcI</i>	P43099.2	1169251	ラクトバチルス種 30a
<i>VV2_1235</i>	NP_763142.1	27367615	ビブリオ・バルニフィカス

20

【0115】

反応J (図1)において、アセチルアクリラートは、アセトアクリラートデカルボキシラーゼによって2-オキソブテンにデカルボキシル化される。この形質転換を触媒する酵素は、今日まで同定されていないが、類似の反応は、酵素アコニタートデカルボキシラーゼ、4-オキサロクロトナートデカルボキシラーゼ、及びシナマートデカルボキシラーゼによって触媒される。

【0116】

30

アコニタートデカルボキシラーゼは、カンジダ属の株における、及びまた糸状性真菌アスペルギルス・テレウスにおけるイタコナート生合成における最終工程を触媒する (Bonn armeらの文献 (J. Bacteriol., 177 : 3573-3578 (1995)) ; Willkeらの文献 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 56 : 289-295 (2001))) 。ATEG_09971によってコードされるシス-アコニタートデカルボキシラーゼ (CAD) (EC4.1.16) がアスペルギルス・テレウス及び他の関連真菌において同定されており、広範に研究されている。近年、該遺伝子がクローニングされ、機能的に特徴づけされた (Kanamasaらの文献 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 80 : 223-229 (2008)) 及びWO / 2009 / 014437)) 。

【0117】

40

4-オキサロクロトナートデカルボキシラーゼは、数多くの生物から単離され、特徴づけられている。この酵素をコードする遺伝子には、シュードモナス種 (株600) におけるdmpH 及びdmpE (Shinglerらの文献 (J. Bacteriol., 174 : 711-724 (1992))) 、プチダ菌由来のxyIII及びxyIILI (Katoらの文献 (Arch. Microbiol., 168 : 457-463 (1997)) ; Stanleyらの文献 (Biochemistry, 39:3514 (2000)) ; Lianらの文献 (J. Am. Chem. Soc, 116 : 10403-10411 (1994))) 、並びにラルストニア・ユートロファJMP134由来のReut_B569 1及びReut_B5692 (Hughesらの文献, J. Bacteriol., 158:79-83 (1984)) を含む。シュードモナス種 (株600) 由来の酵素をコードする遺伝子は、大腸菌においてクローニングされ及び発現している (Shinglerらの文献 (上述))) 。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表25において示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

50

【表25】

表25

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>dmpH</i>	CAA43228.1	45685	シユードモナス種 <i>CF600</i>
<i>dmpE</i>	CAA43225.1	45682	シユードモナス種 <i>CF600</i>
<i>xylII</i>	YP_709328.1	111116444	チダ菌
<i>xylIII</i>	YP_709353.1	111116469	チダ菌
<i>Reut_B5691</i>	YP_299880.1	73539513	ラルストニア・ユートロファ <i>JMP134</i>
<i>Reut_B5692</i>	YP_299881.1	73539514	ラルストニア・ユートロファ <i>JMP134</i>
<i>ATEG_09971</i>	EAU29420.1	114187720	アスペルギルス・テレウス

10

【0118】

シナマート(フェニルアクリラート)及び置換シナマート誘導体の相応するスチレン誘導体への転換を触媒する追加的なクラスのデカルボキシラーゼが特徴づけられている。これらの酵素は、種々の生物において普遍的であり、大腸菌においてクローニング及び発現したこれらの酵素をコードする具体的な遺伝子は下記である：出芽酵母由来のpad1 (Clausenらの文献 (Gene, 142 : 107-112 (1994)))、ラクトバチルス・プランタルム由来のpdc (Barthelmebsらの文献 (Appl Environ. Microbiol, 67 : 1063-1069 (2001)) ; Rodriguezらの文献 (J. Agric. Food Chem., 56 : 3068-3072 (2008)) ; Qiらの文献 (Bioc hem. J, 375 : 465-470 (2007)))、クレブシエラ・オキシトカ由来のpofK (pad) (Uchiyamaらの文献 (Biosci. Biotechnol. Biochem., 72 : 116-123 (2008)) ; Hashidokoらの文献 (Biosci. Biotech. Biochem., 58 : 217-218 (1994)))、ペディオコッカス・ペントサセウス (Barthelmebsらの文献 (上述)) 、並びにバチルス・スブチリス及びバチルス・プミルス由来のpad (Cavinらの文献 (Appl. Environ. Microbiol, 64 : 1466-1471 (1998)))。また、蛍光菌由来のフェルラ酸デカルボキシラーゼも精製及び特徴づけられている。(Huangらの文献 (J. Bacteriol., 176 : 5912-5918 (1994)))。重要なことに、このクラスの酵素は、安定であることが示されており、外来性又は内在性のいずれかで結合した共因子を必要とせず、従って、これらの酵素を生物形質転換に対して理想的に好適とさせる (Sariaslani, F.S. の文献 (Annu. Rev. Microbiol., 61 : 51-69 (2007)))。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表26において示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表26】

表26

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>pad1</i>	AAB64980.1	1165293	出芽酵母
<i>pdc</i>	AAC45282.1	1762616	ラクトバチルス・プランタルム
<i>pad</i>	BAF65031.1	149941608	クレブシエラ・オキシトカ
<i>padC</i>	NP_391320.1	16080493	バチルス・スブチリス
<i>pad</i>	YP_804027.1	116492292	ペディオコッカス・ペントサセウス
<i>pad</i>	CAC18719.1	11691810	バチルス・プミルス

20

30

【0119】

デカルボキシル化のために追加的な酵素は、アセトアセタートからアセトンへとデカルボキシル化する酵素であるアセトアセタートデカルボキシラーゼ (EC4.1.1.4) であり、

40

50

それゆえ、細菌のソルベント生成能におけるその役割について研究されている。典型的な細菌酵素は、クロストリジウム・アセトブチリカム (Bennerらの文献 (J. Am. Chem. Soc. 103 : 993-994 (1981)) ; Highbargerらの文献 (Biochemistry 35 : 41-46 (1996)) ; Petersenらの文献 (Appl. Environ. Microbiol. 56 : 3491-3498 (1990)) ; Rozzelらの文献 (J. Am. Chem. Soc. 106 : 4937-4941 (1984))) 、クロストリジウム・サッカロペーブチルアセトニカム (Kosakaらの文献 (Biosci. Biotechnol. Biochem. 71 : 58-68 (2007))) 、及びクロストリジウム・ベイジエリンキ (Ravagnaniらの文献 (Mol. Microbiol. 37 : 1172-1185 (2000))) から特徴づけられている。また、アセトアセタートデカルボキシラーゼ活性は、ブチダ菌及びバチルス・ポリミキサにおいても示されているが、遺伝子は、この活性とは今日まで関連づけられていない (Matiaszekらの文献 (Curr. Microbiol. 42 : 276-281 (2001)))。ボツリヌス菌及びバチルス・アミロリケファシエンスなどの他の生物における細菌遺伝子は、配列相同性によって同定することができる。ヒト及び他の哺乳類において、アセトアセタートデカルボキシラーゼは、ケトン体経路の最終工程を触媒する (Kalaposの文献 (Biochim. Biophys. Acta 1621 : 122-139 (2003))) が、この活性と関連した遺伝子は今日まで同定されていない。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表27に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表27】

表27

20

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
adc	NP_149328.1	15004868	クロストリジウム・アセトブチリカム
adc	AAP42566.1	31075386	クロストリジウム・サッカロペーブチルアセトニカム
cbei_3835	YP_001310906.1	150018652	クロストリジウム・ベイジエリンキ
CLL_A2135	YP_001886324.1	187933144	ボツリヌス菌
RBAM_030030	YP_001422565.1	154687404	バチルス・アミロリケファシエンス

【0120】

30

また、上記の遺伝子候補はすべて、図1の工程Nにおける2-オキソ-4-ヒドロキシペンタノアートから3-ヒドロキシブチルアルデヒドへのデカルボキシル化を触媒するために用いることができる。

【0121】

ブテノンヒドラターゼ (工程G、図1) 、4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ (工程A、図3) 、及びクロトナーゼ (工程A、図3) は、ヒドロラーゼ型形質転換である。具体的には、ブテノンから4-ヒドロキシ-2-ブタノンへの水和 (工程G、図1) は、ヒドラターゼファミリーの酵素における1つの酵素によって達成することができる。この形質転換を実施することのできる酵素には、フマル酸ヒドラターゼ (EC4.2.1.2) 、2-(ヒドロキシメチル)グルタル酸デヒドラターゼ (EC4.2.1.-) 、ジメチルマレイン酸ヒドラターゼ (EC4.2.1.85) 、及びシトラマル酸ヒドロリーゼ (EC4.2.1.34) を含む。

【0122】

フマル酸ヒドラターゼ酵素は天然に、フマル酸のリンゴ酸への可逆的水和を触媒する。基質としてのブタノンと反応するフマル酸ヒドラターゼの能力は、文献において説明されていないが、豊富な構造の情報がこの酵素について入手可能であり、他の研究者は、活性、阻害、及び局在を変化させるために該酵素をうまく操作している (Weaver, T. の文献 (B. Biol. Crystallogr., 61 : 1395-1401 (2005)))。大腸菌は3つのフマラーゼ：増殖条件によって調節されるFumA、FumB、及びFumCを有する。FumBは、酸素感受性であり、嫌気性条件下でのみ活性がある。FumAは、微小嫌気性条件下で活性があり、FumCは、好気性増殖における唯一の活性酵素である (Tsengらの文献 (J. Bacteriol., 183 : 461-467 (20

50

01)) ; Woodsらの文献 (Biochem. Biophys. Acta., 954 : 14-26 (1988)) ; Guestらの文献 (J. Gen. Microbiol, 131 : 2971-2984 (1985)))。追加的な酵素は、カンピロバクター・ジェジュニ (Smithらの文献 (Int. J. Biochem. Cell Biol, 31 : 961-975 (1999)))、サーマス・サーモフィラス (Mizobataらの文献 (Arch. Biochem. Biophys., 355 : 49-55 (1998)))、及びラット (Kobayashiらの文献 (J. Biochem., 89 : 1923-1931 (1981)))において認められる。高い配列相同性を有する類似の酵素には、シロイヌナズナ由来のfum1、及びコリネバクテリウム・グルタミクム由来のfumCを含む。ペロトマクラム・サーモプロピオニカム (*Pelotomaculum thermopropionicum*) 由来のMmcBCフマラーゼは、2つのサブユニットを有する別のクラスのフマラーゼである (Shimoyamaらの文献 (FEBS Microbiol. Lett., 270 : 207-213 (2007)))。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表28に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表28】

表28

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
fumA	NP_416129.1	16129570	大腸菌
fumB	NP_418546.1	16131948	大腸菌
fumC	NP_416128.1	16129569	大腸菌
fumC	O69294	9789756	カンピロバクター・ジェジュニ
fumC	P84127	75427690	サーマス・サーモフィラス
fumH	P14408	120605	ラット
fumI	P93033	39931311	シロイヌナズナ
fumC	Q8NRN8	39931596	コリネバクテリウム・グルタミクム
MmcB	YP_001211906	147677691	ペロトマクラム・サーモプロピオニカム (<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>)
MmcC	YP_001211907	147677692	ペロトマクラム・サーモプロピオニカム

【0123】

2つの追加的なヒドラターゼ酵素は、ユーバクテリウム・バルケリ (旧クロストリジウム・バルケリ) におけるニコチン酸異化作用における役割について研究された酵素2-(ヒドロキシメチル)グルタル酸デヒドラターゼ及びジメチルマレイン酸ヒドラターゼである (Alhapelらの文献 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 : 12341-12346 (2006)))。2-(ヒドロキシメチル)グルタル酸デヒドラターゼは、2-(ヒドロキシメチル)グルタル酸を2-メチレン-グルタル酸に脱水する [4Fe-4S] 含有酵素である。この酵素は、ユーバクテリウム・バルケリにおけるhmdによってコードされる (Alhapelらの文献 (上述))。高い配列相同性を有する類似の酵素は、バクテロイデス・カピロスス、アナエロツルンカス・コリホミニス、及びナトラネロビウス・サーモフィラス (*Natranaerobius thermophilus*) において認められる。これらの酵素は、[4Fe-4S] 含有細菌セリンデヒドラターゼ (例えば、tdcG、sdhB、及びsdaAによってコードされる大腸菌酵素) のアルファサブユニット及びベータサブユニットと相同である。ジメチルマレイン酸ヒドラターゼ (EC4.2.1.85) は、ジメチルマレイン酸を水和して(2R,3S)-2,3-ジメチルリンゴ酸を形成するアコニターゼファミリーにおける可逆的Fe²⁺ 依存性及び酸素感受性酵素である。この酵素は、ユーバクテリウム・バルケリにおけるdmdABによってコードされる (Alhapelらの文献 (上述) ; Kollmann Kochらの文献 (Physiol. Chem., 365 : 847-857 (1984)))。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表29において示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表29】

表29

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>hmd</i>	ABC88407.1	86278275	ユーバクテリウム・バルケリ
<i>BACCAP_02294</i>	ZP_02036683.1	154498305	バクテロイデス・カピロスス ATCC 29799
<i>ANACOL_02527</i>	ZP_02443222.1	167771169	アナエロツルンカス・コリホミニス DSM 17241
<i>NtherDRAFT_2368</i>	ZP_02852366.1	169192667	ナトラネロビウス・サーモフィラス (<i>Natranaerobius thermophilus</i>) JW/NM-WN-LF
<i>dmdA</i>	ABC88408	86278276	ユーバクテリウム・バルケリ
<i>dmdB</i>	ABC88409.1	86278277	ユーバクテリウム・バルケリ

10

【0124】

追加的な酵素は、シトラマラートヒドロリアーゼとも呼ばれ、水のシトラマラートからのアルファ、ベータ除去を触媒してメサコナートを形成する可逆的ヒドロリアーゼである2-メチルリンゴ酸デヒドラターゼである。この酵素は、クロストリジウム・テタノモーファムにおいて精製及び特徴づけられている (Wangらの文献 (J. Biol. Chem., 244: 2516-2526 (1969)))。また、この酵素の活性は、グルタミン酸分解VI経路の文脈で、シトロバクター属及びモルガネラ属におけるいくつかの細菌においても検出されている (Katoらの文献 (上述))。この酵素をコードする遺伝子は、今までどの生物においても同定されていない。

20

【0125】

3-ヒドロキシブチリル-CoA (工程B、図3) を形成するためのクロトニル-CoAの水和は、クロトナーゼ (EC4.2.1.55) によって触媒される。これらの酵素は、いくつかの生物、特にクロストリジアル種におけるn-ブタノール形成に必要とされ、スルホロブス属、アシディアヌス属、及びメタロスファエラ属の好酸好熱性古細菌における3-ヒドロキシプロピオン酸 / 4-ヒドロキシ酪酸サイクルの1工程を含む。クロトナーゼ酵素をコードする典型的な遺伝子は、クロストリジウム・アセトブチリカム (Boynontらの文献 (J. Bacteriol., 178: 3015-3024 (1996)))、クロストリジウム・クルイベリ (Hillmerらの文献 (FEB S Lett., 21: 351-354 (1972)))、及びメタロスファエラ・セデュラ (Bergらの文献 (上述))において見出すことができる。また、種々のアミノ酸の脂肪酸ベータ酸化及び / 又は代謝に関与するエノイル-CoAヒドラターゼは、クロトニル-CoAの水和を触媒して、3-ヒドロキシブチリル-CoAを形成することができる (Robertsらの文献 (Arch. Microbiol., 117: 99-108 (1978)) ; Agnihotriらの文献 (Bioorg. Med. Chem., 11: 9-20 (2003)) ; Conradらの文献 (J. Bacteriol., 118: 103-111 (1974)))。典型的なエノイル-CoAヒドラターゼは、プチダ菌由来のechの遺伝子産物である (Robertsらの文献 (上述))。エノイル-CoAヒドラターゼであるプチダ菌のphaA及びphaBは、フェニル酢酸異化作用の間の二重結合のヒドロキシル化を実施することが示されている (Oliveraらの文献 (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95: 6419-6424 (1998)))。蛍光菌由来のpaaA及びpaaBは、類似の形質転換を触媒する (Oliveraらの文献 (上述))。最後に、いくつかの大腸菌遺伝子は、maoC (Parkらの文献 (J. Bacteriol., 185: 5391-5397 (2003)))、paaF (Ismailらの文献 (Eur. J. Biochem., 270: 3047-3054 (2003))) ; Parkらの文献 (Appl Biochem. Biotechnol., 113-116: 335-346 (2004))) ; Parkらの文献 (Biotechnol Bioeng., 86: 681-686 (2004)))、及びpaaG (Ismailらの文献 (上述)) ; Parkらの文献 (上述)) ; Parkらの文献 (上述)) を含むエノイル-CoAヒドラターゼ官能性を示すことが示されている。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表30に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

30

40

【表30】

表30

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>crt</i>	NP_349318.1	15895969	クロストリジウム・アセトブチリカム
<i>crt1</i>	YP_001393856	153953091	クロストリジウム・クルイベリDSM 555
<i>ech</i>	NP_745498.1	26990073	ブチダ菌
<i>phaA</i>	ABF82233.1	26990002	ブチダ菌
<i>phaB</i>	ABF82234.1	26990001	ブチダ菌
<i>paaA</i>	NP_745427.1	106636093	螢光菌
<i>paaB</i>	NP_745426.1	106636094	螢光菌
<i>maoC</i>	NP_415905.1	16129348	大腸菌
<i>paaF</i>	NP_415911.1	16129354	大腸菌
<i>paaG</i>	NP_415912.1	16129355	大腸菌

【0126】

あるいは、*fadA*及び*fadB*の大腸菌遺伝子産物は、エノイル-CoAヒドラターゼ活性を呈する脂肪酸酸化に関する多酵素複合体をコードする (Hallerらの文献 (Biochemistry 39: 4622-4629 (2000)) ; Martinez-Carrionらの文献 (J. Biol. Chem. 240:3538-3546 (1965)) ; Matthiesらの文献 (Appl Environ. Microbiol. 58:1435-1439 (1992)))。*fadR*によってコードされる負の調節因子をノックアウトすることは、*fadB*遺伝子産物を活性化するために利用することができる (Jengらの文献 (A. Biochemistry 13: 2898-2903 (1974)))。*fadI*遺伝子及び*fadJ*遺伝子は、類似の機能をコードし、嫌気性条件下で天然に発現する (Atsumiらの文献 (Nature 451: 86-89 (2008)))。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表31に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表31】

表31

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>fadA</i>	YP_026272.1	49176430	大腸菌
<i>fadB</i>	NP_418288.1	16131692	大腸菌
<i>fadI</i>	NP_416844.1	16130275	大腸菌
<i>fadJ</i>	NP_416843.1	16130274	大腸菌
<i>fadR</i>	NP_415705.1	16129150	大腸菌

【0127】

4-ヒドロキシブチリル-CoAのクロトニル-CoAへの可逆的縮合 (工程A、図3) は、二機能性酵素4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ / ビニルアセチル-CoA - イソメラーゼによって触媒される。この酵素はまず、4-ヒドロキシブチリル-CoAをビニルアセチル-CoAに脱水し、その後、ビニルアセチル-CoAは再配列して、クロトノイル-CoAを形成する。クロストリジウム・クルイベリ及びクロストリジウム・アミノブチリウム (aminobutyrim) 由来の酵素は、N 末端ドメインにおいて精製、特徴づけ、及び配列決定されている (Scherfらの文献 (Eur. J. Biochem., 215: 421-429 (1993)) ; Scherfらの文献 (Arch. Microbiol., 161: 239- 245 (1994)))。クロストリジウム・アミノブチリウム及びクロストリジウム・クルイベリ由来のabfD遺伝子は、これらのN 末端アミノ酸配列と実際に符合し、4-ヒドロキシブチリル (hydroxybutyryl) -CoAデヒドラターゼ / ビニルアセチル-CoA - イソメラーゼ活性をコードすることが示されている。類似の遺伝子は、ポルフィ

10

20

30

40

50

ロモナス・ジンジバリス由来の $abfD$ 及びメタロスファエラ・セデュラ由来の $Msed_1220$ を含むゲノムプロジェクトからの相同意を通じて同定される。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表32に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表32】

表32

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
$abfD$	YP_001396399.1	153955634	クロストリジウム・クルイベリ
$abfD$	P55792	84028213	クロストリジウム・アミノブチリカム(<i>aminobutyricum</i>)
$abfD$	YP_001928843	188994591	ポルフィロモナス・ジンジバリス
$Msed_1220$	YP_001191305.1	146303989	メタロスファエラ・セデュラ

10

【0128】

2-アミノ-4-ケトペンタン酸の(図1、反応1)及び4-アミノブタン-2-オンの(工程F、図1)脱アミノ化は、AKPアンモニア-リアーゼ及び4-アミノブタン-2-オンアンモニア-リアーゼによってそれぞれ達成することができる。これらの脱アミノ化は、アスパルターゼによるアスパラギン酸のフマル酸への脱アミノ化と非常に類似している。該酵素は、広範に研究されており、いくつかの結晶構造が入手可能である。大腸菌酵素は、アスパラギン酸フェニルメチルエスエル、アスパラギン、ベンジル-アスパラギン酸、及びマレイン酸などの代替基質と反応することが示されている(Maらの文献(Ann. N.Y. Acad. Sci., 672: 60-65 (1992)))。別個の研究において、指向型進化は、この酵素に関して実施されて、基質特異性を変化させている(Asanoらの文献(Biomol. Eng., 22: 95-101 (2005)))。また、アスパルターゼ感応性を有する酵素は、インフルエンザ菌(Sjostromらの文献(Biochem. Biophys. Acta., 1324: 182-190 (1997)))、蛍光菌(Takagiらの文献(J. Biochem., 96: 545-552 (1984)))、バチルス・スブチルス(*subtilis*)(Sjostromらの文献(上述))、及び霊菌(Takagiらの文献(J. Bacteriol., 161: 1-6 (1985)))において特徴づけられている。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表33に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

20

【表33】

表33

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>aspA</i>	NP_418562	90111690	大腸菌
<i>aspA</i>	P44324.1	1168534	インフルエンザ菌
<i>aspA</i>	P07346.1	114273	蛍光菌
<i>ansB</i>	P26899.1	251757243	バチルス・スブチリス
<i>aspA</i>	P33109.1	416661	霊菌

30

40

【0129】

類似のアンモニアリアーゼ反応は、メサコン酸を介するグルタミン酸発酵経路に関与する酵素であるメチルアスパルターゼ(EC4.3.1.2)によって触媒される(Katoらの文献(上述))。ベータ-メチルアスパルターゼ及び3-メチルアスパラギン酸アンモニア-リアーゼとしても公知のこの酵素は、トレオ-3-メチルアスパラギン酸のメサコン酸への脱アミノ化を天然に触媒する。クロストリジウム・テタノモーファム由来の3-メチルアスパルターゼは、大腸菌においてクローニングされ、機能的に発現し、結晶化されている(Asuncionらの文献(57: 731-733 (2001)))；Asuncionらの文献(J Biol Chem. 277: 8306-8311

50

(2002) ; Bottingらの文献 (27: 2953-2955 (1988)) ; Godaらの文献 (31: 10747-10756 (1992))。シトロバクター・アマロナティカスにおいて、この酵素は、BAA28709によってコードされる (Katoらの文献 (Arch. Microbiol. 168: 457-463 (1997)))。また、3-メチルアスパルターゼも、大腸菌YG1002から結晶化されている (Asanoらの文献 (FEMS Microbiol. Lett. 118: 255-258 (1994))) が、タンパク質配列は、GenBankなどの公共のデータベースにおいて列挙されていない。これらの典型的な遺伝子産物の各々についての配列と関連したデータは、表34に示される以下のGenBank受入番号を用いて見出すことができる。

【表3-4】

表 34

10

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
mal	AAB24070.1	259429	クロストリジウム・テタノモーファム
BAA28709	BAA28709.1	3184397	シトロバクター・アマロナティカス

【 0 1 3 0 】

いくつかの実施態様において、2-アミノ-4-ケト pentan酸 (AKP) チオラーゼは、*ortA* ()、*ortB* ()、*Amet_2368* ()、*Amet_2369* ()、*Teth514_1478* ()、*Teth514_1479* ()、*TTE1235* ()、及び*thrC* () からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

20

【 0 1 3 1 】

いくつかの実施態様において、AKP脱水素酵素は、thrA、akthr2、hom6、hom1、hom2、fadB、fadJ、Hbd2、Hbd1、hbd、HSD17B10、phbB、phaB、Msed_1423、Msed_0399、Msed_0389、Msed_1993、adh、adhA、adhA、mdh、ldhA、ldh、及びbdhからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

20

【 0 1 3 2 】

いくつかの実施態様において、2-アミノ-4-ヒドロキシペンタン酸アミノトランスフェラーゼは、aspC、AAT2、ASP5、got2、avtA、lysN、AadAT II、dat、lat、ygjG、spuC、SkyPYD4、SKUGA1、UGA1、Abat、Abat、Gta 1、gabT、及びpuuEからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

30

[0 1 3 3]

いくつかの実施態様において、2-アミノ-4-ヒドロキシペンタン酸酸化還元酵素（脱アミノ化）は、*gdhA*、*gdh*、*gdhAI*、*rocG*、*gdh1*、*gdh2*、*GDH*、*GDH2*、*Idh*、及び*nadX*からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

30

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施態様において、2-オキソ-4-ヒドロキシペンタン酸デカルボキシラーゼは、pdc、pdc1、mdIC、dpgB、ilvB_1、kgd、kdcA、lysA、panD、cadA、ldc、ldcC、AF323910.1:1...1299、odc1、VV2_1235、dmpH、dmpE、xyIII、xyIIII、Reut_B5691、Reut_B5692、CAD、pad1、pofK(pad)、padC、pad、adc、cbei_3835、CLL_A2135、RBAM_030030からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

40

[0 1 3 5]

いくつかの実施態様において、3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素は、alrA、ADH2、yqhD、bdh1、bdh11、adhA、4hbd、adh1、P84067、mmsb、dhat、及び3hidhからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

【 0 1 3 6 】

いくつかの実施態様において、AKPアミノトランスフェラーゼは、aspC、AAT2、ASP5、gat2、avtA、lysN、AadAT II、dat、lat、Ut、ygjG、spuC、SkyPYD4、SkUGA1、UGA1、AbaT、Gta 1、gabT、及びpuuEからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

50

【0137】

いくつかの実施態様において、AKP酸化還元酵素（脱アミノ化）は、gdhA、gdh、gdhAI、rocG、gdh1、gdh2、GDH、GDH2、Idh、及びnadXからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。いくつかの実施態様において、2,4-ジオキソペンタン酸デカルボキシラーゼは、pdc、pdc1、mdIC、dpgB、ilvB_1、kgd、kdcA、lysA、panD、cadA、Idc、IdcC、AF323910.1:1...1299、odc1、VV2_1235、dmpH、dmpE、xyIII、xyIIII、Reut_B5691、Reut_B5692、CAD、pad1、padC、及びpad、adc、cbei_3835、CLL_A2135、RBAM_030030からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

【0138】

いくつかの実施態様において、3-オキソブチルアルデヒド還元酵素（ケトン還元）は、thrA、akthr2、hom6、hom1、hom2、fadB、fadJ、Hbd2、Hbd1、hbd、HSD17B10、phbB、phaB、Msed_1423、Msed_0399、Msed_0389、Msed_1993、adh、adhA、adh_A、mdh、IdhA、Idh、及びbdhからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。 10

【0139】

いくつかの実施態様において3-オキソブチルアルデヒド還元酵素（アルデヒド還元）は、alrA、ADH2、yqhD、bdhI、bdhII、adhA、4hbd、adhI、P84067、mmsb、dhat、及び3hidhからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

【0140】

いくつかの実施態様において、4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素は、thrA、akthr2、hom6、hom1、hom2、fadB、fadJ、Hbd2、Hbd1、hbd、HSD17B10、phbB、phaB、Msed_1423、Msed_0399、Msed_0389、Msed_1993、adh、adhA、adh_A、mdh、IdhA、Idh、及びbdhからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。 20

【0141】

いくつかの実施態様において、AKPデカルボキシラーゼは、pdc、pdc1、mdIC、dpgB、ilvB_1、kgd、kdcA、lysA、panD、cadA、Idc、IdcC、AF323910.1:1...1299、odc1、VV2_1235、dmpH、dmpE、xyIII、xyIIII、Reut_B5691、Reut_B5692、CAD、pad1、pofK(pad)、padC、padからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

【0142】

いくつかの実施態様において、4-アミノブタン-2-オンアミノトランスフェラーゼは、aspC、AAT2、ASP5、got2、avtA、lysN、AadAT_II、dat、lat、ygjG、spuC、SkyPYD4、SKU_GA1、UGA1、Abat、Gta_1、gabT、及びpuuEからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。 30

【0143】

いくつかの実施態様において、4-アミノブタン-2-オン酸化還元酵素（脱アミノ化）は、gdhA、gdh、gdhAI、rocG、gdh1、gdh2、GDH、GDH2、Idh、nadX、kdd、及びlysDHからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

【0144】

いくつかの実施態様において、4-アミノブタン-2-オンアンモニア-リアーゼは、aspA、ansB、mal、及びBAA28709からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。 40

【0145】

いくつかの実施態様において、ブテノンヒドラターゼは、fumA、fumB、fumC、fumH、fumI、MmcB、MmcC、hmd、BACCAP_02294、ANACOL_02527、NtherDRAFT_2368、dmdA、dmdB、crt、crtl、ech paaA、paaB、phaA、phaB、maoC、paaF、paaG、abfD、Msed_1220、fadA、fadB、fadI、fadJ、及びfadRからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

【0146】

いくつかの実施態様において、AKPアンモニア-リアーゼは、aspA、ansB、mal、及びBAA28709からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

【0147】

50

いくつかの実施態様において、アセチルアクリラートデカルボキシラーゼは、pdc、pdc 1、mdIC、dpgB、ilvB 1、kgd、kdCA、lysA、panD、cadA、ldc、ldcC、AF323910.1 : 1...1 299、odc1、VV2_1235、dmpH、dmpE、xyIII、xyIIII、Reut_B5691、Reut_B5692、CAD、pad 1、pofK (pad)、padC、pad、adc、cbei_3835、CLL_A2135、RBAM_030030,)からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

【 0 1 4 8 】

いくつかの実施態様において、アセトアセチル-CoA還元酵素 (CoA 依存性、アルデヒド形成) は、acr1、sucD、bphG、bld、adhE、Msed_0709、mcr、asd 2、Saci_2370、Ald、及びeutEからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

【 0 1 4 9 】

いくつかの実施態様において、アセトアセチル-CoA還元酵素 (CoA 依存性、アルコール形成) は、adhE、adhE2、mcr、Rcas_2929、NAP1_02720、MGP2080_00535、及びFARからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

【 0 1 5 0 】

いくつかの実施態様において、アセトアセチル-CoA還元酵素 (ケトン還元) は、thrA、akthr2、hom6、hom1、hom2、fadB、fadJ、Hbd2、Hbd1、hbd、HSD17B10、phbB、phaB、Mse d_1423、Msed_0399、Msed_0389、Msed_1993、adh、adhA、adh A、mdh、ldhA、ldh、及びbdhからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

【 0 1 5 1 】

いくつかの実施態様において、3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素 (アルデヒド形成) は、acr1、sucD、bphG、bld、adhE、Msed_0709、mcr、asd 2、Saci_2370、Ald、及びeut Eからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

【 0 1 5 2 】

いくつかの実施態様において、3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素 (アルコール形成) は、adhE、adhE2、mcr、Rcas_2929、NAP1_02720、MGP2080_00535、及びFARからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

【 0 1 5 3 】

いくつかの実施態様において、4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼは、fumA、fumB、fumC、fumH、fum1、MmcB、MmcC、hmd、BACCAP_02294、ANACOL_02527、NtherDRAFT_23 68、dmdA、dmdB、crt、crt1、ech、paaA、paaB、phaA、phaB、maoC、paaF、paaG、abfD、Msed_1220、fadA、fadB、fadI、fadJ、及びfadRからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

【 0 1 5 4 】

いくつかの実施態様において、クロトナーゼは、fumA、fumB、fumC、fumH、fumI、MmcB、MmcC、hmd、BACCAP_02294、ANACOL_02527、NtherDRAFT_2368、dmdA、dmdB、crt、crt1、ech paaA、paaB、phaA、phaB、maoC、paaF、paaG、abfD、Msed_1220、fadA、fadB、fad I、fadJ、及びfadRからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる。

【 0 1 5 5 】

本発明の非天然微生物は、1以上の1,3-ブタンジオール生合成経路に関する1以上の酵素又はタンパク質をコードする発現可能な核酸を導入することによって産生することができる。生合成のために選択された宿主微生物に応じて、特定の1,3-ブタンジオール生合成経路のいくつか若しくは全部のための核酸を発現することができる。例えば、選択された宿主が所望の生合成経路の1以上の酵素又はタンパク質を欠損する場合、該欠損した酵素又はタンパク質のための発現可能な核酸が次の外来性発現のための宿主に導入される。あるいは、選択された宿主がいくつかの経路遺伝子の内在性発現を呈するものの他の遺伝子を欠損する場合、コード核酸は、欠損酵素又はタンパク質について、1,3-ブタンジオール生合成を達成するために必要である。従って、本発明の非天然微生物は、所望の生合成経路を得るために外来性の酵素若しくはタンパク質の活性を導入することにより作出することができ、又は所望の生合成経路は、1以上の内在性酵素若しくはタンパク質と共に、1,3-ブタンジオールなどの所望の生成物を産生する1以上の外来性の酵素若しくはタンパク質

10

20

30

40

50

の活性を導入することにより得ることができる。

【0156】

選択された宿主微生物の1,3-ブタンジオール生合成経路構成要素に応じて、本発明の非天然微生物は、少なくとも1つの外的に発現した1,3-ブタンジオール経路コード核酸を含み、かつ、1以上の1,3-ブタンジオール生合成経路のための最大で全てのコード核酸を含む。例えば、1,3-ブタンジオール生合成は、経路酵素又はタンパク質を欠損した宿主において、該相応コード核酸の外性発現を介して確立することができる。1,3-ブタンジオール経路の全ての酵素又はタンパク質を欠損する宿主において、該経路の全ての酵素又はタンパク質の外性発現は含まれ得るが、該宿主が該経路酵素又はタンパク質のうちの少なくとも1つを含む場合であってさえも、経路の全ての酵素又はタンパク質が発現できることは理解される。例えば、1,3-ブタンジオールの産生のための経路における全ての酵素又はタンパク質の外性発現が含まれ得る。

10

【0157】

本明細書に提供される教示及びガイダンスを考慮すると、当業者は、発現可能な形態で導入するコード核酸の数が、少なくとも、選択された宿主微生物の1,3-ブタンジオール経路欠損に対応することを理解するであろう。それゆえ、本発明の非天然微生物は、本明細書に開示される1,3-ブタンジオール生合成経路を構成する酵素又はタンパク質をコードする、1、2、3、4、5、最大で全ての核酸までを有することができる。いくつかの実施態様において、非天然微生物は、1,3-ブタンジオール生合成を促進若しくは最適化する、又は該宿主微生物へ他の有用な機能を与える他の遺伝的修飾も含むことができる。このような他の官能性の1つには、例えば、アセチル-CoAなどの1以上の1,3-ブタンジオール経路前駆体の合成の増強を含むことができる。

20

【0158】

一般的に、宿主微生物は、天然産生分子として、又は所望の前駆体の新規産生、若しくは該宿主微生物により天然に産生される前駆体の高い産生のいずれかを提供する操作された生成物としてのいずれかで、1,3-ブタンジオール経路の前駆体を産生するように選択される。例えば、アセチル-CoAは、大腸菌などの宿主生物において天然に産生される。宿主微生物は、本明細書に開示されるように、前駆体の産生を高めるように操作することができる。加えて、所望の前駆体を産生するように操作された微生物は、宿主微生物として使用することができ、更に1,3-ブタンジオール経路の酵素又はタンパク質を発現するように操作することができる。

30

【0159】

いくつかの実施態様において、本発明の非天然微生物は、1,3-ブタンジオールを合成する酵素能力を含む宿主から作出される。この具体的な実施態様において、1,3-ブタンジオール経路生成物の合成又は蓄積を増加させて、例えば1,3-ブタンジオール産生の方にイソプロパ1,3-ブタンジオール経路反応を駆動することは有用であり得る。高い合成又は蓄積は、例えば、上記の1,3-ブタンジオール経路の酵素又はタンパク質の1以上をコードする核酸の過剰発現により達成することができる。1,3-ブタンジオール経路の酵素（enzyme）若しくは酵素（enzymes）及び／又はタンパク質（protein）若しくはタンパク質（proteins）の過剰発現は、例えば、内在性の遺伝子（gene）若しくは遺伝子（genes）の外性発現により、又は異種性の遺伝子（gene）若しくは遺伝子（genes）の外性発現により、起こすことができる。それゆえ、天然生物は、例えば、1,3-ブタンジオール生合成経路の酵素又はタンパク質をコードする1、2、3、4、5、すなわち最大で全ての核酸の過剰発現を通じて、1,3-ブタンジオールを産生する本発明の非天然微生物であるように容易に作出することができる。加えて、非天然生物は、1,3-ブタンジオール生合成経路の酵素の活性の増加を結果的に生じる内在性遺伝子の突然変異誘発により作出することができる。

40

【0160】

特に有用な実施態様において、コード核酸の外性発現が採用される。外性発現は、宿主及び応用に対する発現エレメント及び／又は調節エレメントをカスタマイズして仕立てる能力を与えて、使用者により制御される所望の発現レベルを達成する。しかしながら

50

また、内在性発現は、誘導性プロモーター又は他の調節エレメントに連関された場合、遺伝子のプロモーターの負の調節性のエフェクター又は誘導を取り除くことなどによって、他の実施態様において利用することができる。従って、天然の誘導性プロモーターを有する内在性遺伝子は、適切な誘導剤を提供することにより上方制御することができ、又は、内在性遺伝子の調節領域は、誘導性の調節エレメントを組み込むように操作することができ、これにより所望の時に一度に、内在性遺伝子の高い発現の調節が可能となる。同様に、誘導性プロモーターは、非天然微生物に導入される外来性遺伝子のための調節エレメントとして含まれ得る。

【0161】

本発明の方法において、任意の1以上の外来性核酸は本発明の非天然微生物を作出するために微生物に導入することができることは理解される。核酸は、例えば、該微生物への1,3-ブタンジオール生合成経路を与えるように導入することができる。あるいは、コード核酸は、1,3-ブタンジオール生合成能力を与えるいくつかの必要な反応を触媒する生合成能力を有する中間微生物を作出するために導入することができる。例えば、1,3-ブタンジオール生合成経路を有する非天然微生物は、所望の酵素又はタンパク質をコードする少なくとも2つの外来性核酸を含むことができる。従って、生合成経路の2以上の酵素又はタンパク質の任意の組み合わせは、本発明の非天然微生物に含まれ得ることは理解される。同様に、所望の生合成経路の酵素及び/又はタンパク質の組み合わせがその相応する所望の生成物の生成を生じる限り、生合成経路の3以上酵素又はタンパク質の任意の組み合わせが、所望のとおり本発明の非天然微生物などに含まれ得ることは理解される。同様に、所望の生合成経路の酵素及び/又はタンパク質の組み合わせがその相応する所望の生成物の生成を生じる限り、本明細書に開示される生合成経路の4以上酵素又はタンパク質の任意の組み合わせは、所望のとおり、本発明の非天然微生物に含まれ得ることは理解される。

【0162】

本明細書に記載される1,3-ブタンジオールの生合成に加えて、本発明の非天然微生物及び方法はまた、他の経路により生成物の生合成を達成するための当該技術分野において周知の互いとの並びに他の微生物及び方法との種々の組み合わせにおいても利用することができる。例えば、1,3-ブタンジオール産生体の使用以外で1,3-ブタンジオールを産生するための1つの選択肢は、1,3-ブタンジオール経路中間体を1,3-ブタンジオールに転換することのできる別の微生物の添加を介することである。このような手順の1つには、例えば、1,3-ブタンジオール経路中間体を産生する微生物の発酵を含む。次に、1,3-ブタンジオール経路中間体は、1,3-ブタンジオール経路中間体を1,3-ブタンジオールに転換する第2の微生物のための基質として使用することができる。1,3-ブタンジオール経路中間体は、第2の微生物の別の培養液に直接添加することができ、又は1,3-ブタンジオール経路中間体産生体の元の培養液は、例えば細胞分離によりこれらの微生物から枯渇させることができ、次に、その後の第2の微生物の該発酵プロセスへの添加は、中間体の精製工程なしで最終生成物を産生するために利用できることができる。

【0163】

他の実施態様において、本発明の非天然微生物及び方法は、例えば、1,3-ブタンジオールの生合成を達成するための幅広い種々の下位経路において組み立てることができる。これらの実施態様において、本発明の所望の生成物のための生合成経路は、異なる微生物へと分離することができ、該異なる微生物は、最終生成物を産生させるために共培養することができる。このような生合成スキームにおいて、1つの微生物の生成物は、最終生成物が合成されるまでの第2の微生物のための基質である。例えば、1,3-ブタンジオールの生合成は、1つの経路中間体の別の経路中間体又は生成物への転換のための生合成経路を含む微生物を構築することにより達成することができる。あるいは、1,3-ブタンジオールは、同じ容器内の2つの微生物を使用する共培養又は共発酵を通じて、微生物から生合成で産生でき、ここで、該第1の微生物は、1,3-ブタンジオール中間体を産生し、該第2の微生物は該中間体を1,3-ブタンジオールに転換する。

【0164】

10

20

30

40

50

本明細書に提供される教示及びガイダンスを考慮すると、当業者は、幅広い種々の組み合わせ及び順列が、本発明の非天然微生物及び方法にとって、他の微生物とともに、下位経路を有する他の非天然微生物の共培養物とともに、並びに1,3-ブタンジオールを产生するための周知の他の化学的及び/又は生化学的手順の組み合わせとともに、存在することを理解するであろう。

【0165】

1,3-ブタンジオール経路酵素又はタンパク質のためのコード核酸の供給源には、例えば、該コードされた遺伝子産物が当該反応を触媒することのできる任意の種を含むことができる。このような種には、古細菌及び真正細菌を含む細菌、並びに酵母、植物、昆虫、動物、及びヒトを含む哺乳動物を含む真核生物を含むがこれらに限定されない、原核生物及び真核生物の両方を含む。このような供給源のための例示的な種には、例えば、大腸菌、並びに本明細書に開示されるか、又は相応の遺伝子のための供給源生物として利用可能な、他の例示的な種を含む。しかしながら、395種の微生物ゲノム並びに種々の酵母、真菌、植物、及び哺乳動物のゲノムを含む、現在550超の種に利用可能な完全ゲノム配列（これらのうち半分超は、NCBIなどの公共データベースで利用可能である。）を用いて、例えば、公知の遺伝子のホモログ、オルソログ、パラログ及び非オルソロガス遺伝子置換、及び生物間での遺伝的変更の相互交換を含む、関連する種又は離れた種における1以上の遺伝子についての必要な1,3-ブタンジオール生合成活性をコードする遺伝子の同定は常用的であり、かつ当該技術分野において周知である。従って、大腸菌などの特定の生物に関して本明細書で説明される1,3-ブタンジオールの生合成を可能にする代謝的変更は、原核生物及び真核生物などを含む他の微生物に容易に適用することができる。本明細書に提供される教示及びガイダンスを考慮すると、当業者は、1つの生物において例証される代謝的変更が他の生物に同様に等しく適用することができるということを知っているであろう。

10

20

【0166】

代替的な1,3-ブタンジオール生合成経路が、関連性のない種において存在する場合など、いくつかの場合において、1,3-ブタンジオール生合成は、例えば、同様の、しかし同一ではない代謝反応を触媒して、当該反応を置き換える、関連性のない種から、パラログ（paralog）又はパラログ（paralogs）の外来性発現により宿主種に付与することができる。代謝ネットワーク中の特定の差異が、異なる生物間に存在するので、当業者は、異なる生物間の実際の遺伝子使用が異なり得ることを理解するであろう。しかしながら、本明細書に提供される教示及びガイダンスを考慮すると、当業者はまた、本発明の教示及び方法を全ての微生物に、本明細書に例証されたものと同様の代謝的変更を用いることで適用して、1,3-ブタンジオールを合成するであろう関心対象の種において微生物を構築することができることも理解するであろう。

30

【0167】

宿主微生物は、例えば、細菌、酵母、真菌又は発酵プロセスに適用できる任意の他の種々の微生物、及びこれらから作出された非天然微生物から選択することができる。例示的な細菌には、大腸菌、クレブシエラ・オキシトカ、アナエロビオスピリルム・スクシニシプロデュセンス（*succiniciproducens*）、アクチノバチルス・スクシノゲネス（*succinogenes*）、マンヘミア・スクシニシプロデュセンス（*succiniciproducens*）、リゾビウム・エトリ、枯草菌、コリネバクテリウム・グルタミクム、グルコノバクター・オキシダンス、ザイモモナス・モビリス、ラクトコッカス・ラクティス、ラクトバチルス・プランタルム、ストレプトマイセス・セリカラー、クロストリジウム・アセトブチリカム、蛍光菌、及びプチダ菌から選択される種を含む。例示的な酵母又は真菌には、出芽酵母、分裂酵母、クルイベロミセス・ラクチス、クルイベロミセス・マルキシアヌス（*marxianus*）、アスペルギルス・テレウス、クロコウジカビ、及びピキア・パストリスから選択される種を含む。大腸菌は、遺伝子工学に好適な十分に特徴づけられた微生物であるので、特に有用な宿主生物である。他の特に有用な宿主生物には、出芽酵母などの酵母を含む。

40

【0168】

非天然1,3-ブタンジオール産生宿主の発現レベルを構築及び試験する方法は、例えば、

50

当該技術分野において周知の組換え法及び検出法により実施することができる。このような方法は、例えば、Sambrookらの文献「分子クローニング：実験室マニュアル第3版 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Ed.)」(Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001))；及びAusubelらの文献「分子生物学の最新プロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」(John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999))において説明されているのを認めることができる。

【0169】

1,3-ブタンジオールの产生のための経路に関する外因性核酸配列は、抱合、電気穿孔法、化学的形質転換、形質導入、トランスフェクション及び超音波形質転換を含むがこれらに限定されない当該技術分野において周知の技術を使用して、安定して又は一過的に宿主細胞へと導入することができる。大腸菌又は他の原核細胞における外因性発現のために、真核生物核酸の遺伝子又はcDNAにおけるいくつかの核酸配列は、N末端ミトコンドリアシグナル若しくは他のターゲッティングシグナルなどのターゲッティングシグナルをコードすることができ、該ターゲッティングシグナルは、所望の場合、原核宿主細胞への形質転換の前に除去することができる。例えば、ミトコンドリアリーダー配列の除去は、大腸菌における高い発現をもたらした (Hoffmeisterらの文献 (J. Biol. Chem. 280 : 4329-4338 (2005)))。酵母又は他の真核細胞の外因性発現のために、遺伝子は、リーダー配列を付加せずに細胞質において発現することができ、又は宿主細胞に適するミトコンドリアターゲッティング又は分泌シグナルなどの好適なターゲッティング配列の付加により、ミトコンドリア若しくは他の細胞小器官を標的にすることができ、若しくは分泌のために標的とすることができる。従って、ターゲッティング配列を取り除くか又は含むための核酸配列への適切な修飾は、望ましい特性を与えるために外因性核酸配列に組み込むことができることは理解される。さらに、遺伝子は、タンパク質の最適化された発現を達成するために、当該技術分野において周知の技術を用いるコドン最適化に供することができる。

【0170】

発現ベクター (vector) 又は発現ベクター (vectors) は、宿主生物において機能的な発現制御配列に作用可能に連結された本明細書に例証されるような核酸をコードする1以上の1,3-ブタンジオール生合成経路を含むように構築することができる。本発明の微生物宿主生物での使用に適用できる発現ベクターには、例えば、宿主染色体への安定した組込みのために作用可能なベクター及び選択配列又は標識を含む、プラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター、エピソーム及び人工染色体を含む。加えて、発現ベクターには、1以上の選択可能な標識遺伝子及び適切な発現制御配列を含むことができる。また、例えば、抗生物質若しくは毒素に対する耐性を提供し、栄養要求性欠損を補完し、又は培地にはない必須栄養素を供給する、選択可能な標識遺伝子も含まれ得る。発現制御配列には、当該技術分野において周知である、構成的プロモーター及び誘導性プロモーター、転写エンハンサ、転写ターミネーター、及びこれらに類するものを含むことができる。2以上の外因性コード核酸が同時発現すべきである場合、両方の核酸は、例えば、単一の発現ベクターへと、又は別々の発現ベクターの中に、挿入できる。単一ベクター発現のために、コード核酸は、1つの共通発現制御配列に操作的に連結することができ、又は1つの誘導性プロモーター及び1つの構成的プロモーターなどの異なる発現制御配列に操作的に連結することができる。代謝経路若しくは合成経路に関する外因性核酸配列の形質転換は、当該技術分野において周知の方法を使用して確認することができる。このような方法には、例えば、mRNAのノーザンプロット法若しくはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅などの核酸分析、又は遺伝子産物の発現についての免疫プロット法、又は導入される核酸配列若しくはその相応の遺伝子産物の発現を試験するのに好適な他の分析法を含む。外因性核酸が所望の生成物を产生するように十分な量で発現することは当業者に理解され、発現レベルが当該技術分野において周知のかつ本明細書に開示される方法を使用して十分な発現を得るように最適化することは更に理解される。

【0171】

本発明は、1,3-BDO経路を完了させる酵素をコードする1、2、3、4、5、最大すべての外

10

20

30

40

50

来性核酸を組み込む生物を含む、1,3-BDOを產生する条件下及び十分な時間で、本明細書に開示された非天然微生物を培養することを含む、1,3-BDOを產生する方法を提供する。1,3-BDO経路には、1セットの1,3-BDO経路酵素を含み、ここで、該セットの1,3-BDO経路酵素は、先の通り同定され、すなわち：(a) (1) 2-アミノ-4-ケトペントノアート (AKP) チオラーゼ；(2) AKP脱水素酵素；(3) 2-アミノ-4-ヒドロキシペントノアートアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素(脱アミノ化)；(4) 2-オキソ-4-ヒドロキシペントノアートデカルボキシラーゼ；及び(5) 3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素；(b) (1) 2-アミノ-4-ケトペントノアート (AKP) チオラーゼ；(2) AKPアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素(脱アミノ化)；(3) 2,4-ジオキソペントノアートデカルボキシラーゼ；(4) 3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(ケトン還元)；及び(5) 3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素；(c) (1) 2-アミノ-4-ケトペントノアート (AKP) チオラーゼ；(2) AKPアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素(脱アミノ化)；(3) 2,4-ジオキソペントノアートデカルボキシラーゼ；(4) 3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(アルデヒド還元)；及び(5) 4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素；(d) (1) 2-アミノ-4-ケトペントノアート (AKP) チオラーゼ；(2) AKPデカルボキシラーゼ；(3) 4-アミノブタン-2-オンアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素(脱アミノ化)；(4) 3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(ケトン還元)；及び(5) 3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素；(e) (1) 2-アミノ-4-ケトペントノアート (AKP) チオラーゼ；(2) AKPデカルボキシラーゼ；(3) 4-アミノブタン-2-オンアミノトランスフェラーゼ又は酸化還元酵素(脱アミノ化)；(4) 3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(アルデヒド還元)；及び(5) 4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素；(f) (1) 2-アミノ-4-ケトペントノアート (AKP) チオラーゼ；(2) AKPデカルボキシラーゼ；(3) 4-アミノブタン-2-オンアンモニア-リアーゼ；(4) ブタノンヒドラターゼ；及び(5) 4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素；(g) (1) 2-アミノ-4-ケトペントノアート (AKP) チオラーゼ；(2) AKPアンモニア-リアーゼ；(3) アセチルアクリラートデカルボキシラーゼ；(4) ブタノンヒドラターゼ；及び(5) 4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素；(h) (1) アセトアセチル-CoA還元酵素 (CoA 依存性、アルデヒド形成)；(2) 3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(ケトン還元)；及び(3) 3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素；(i) (1) アセトアセチル-CoA還元酵素 (CoA 依存性、アルコール形成) 及び(2) 4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素；(j) (1) アセトアセチル-CoA還元酵素 (CoA 依存性、アルデヒド形成)；(2) 3-オキソブチルアルデヒド還元酵素(アルデヒド還元)；及び(3) 4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素；(k) (1) アセトアセチル-CoA還元酵素(ケトン還元) 及び(2) 3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)；(l) アセトアセチル-CoA還元酵素(ケトン還元)；(2) 3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)；及び(3) 3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素；(m) (1) 4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ；(2) クロトナーゼ；及び(3) 3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)；並びに(n) (1) 4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ；(2) クロトナーゼ；(3) 3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)；及び(4) 3-ヒドロキシブチルアルデヒド還元酵素である。

【0172】

1,3-ブタンジオールの產生について試験するのに好適な精製及び/又はアッセイは、周知の方法を使用して実施することができる。三つ組の培養物などの好適な複製物は、試験されるべき操作された株ごとについて増殖させることができる。例えば、操作された産生宿主の生成物及び副産物の形成をモニターすることができる。最終生成物及び中間体、及び他の有機化合物は、HPLC(高性能液体クロマトグラフィー)、GC MS(ガスクロマトグラフィー 質量分析)、LC MS(液体クロマトグラフィー 質量分析)又は当該技術分野において周知の常用手順を使用する他の好適な分析法などの方法により分析することができる。また、発酵プロセスにおける生成物の放出は、培養上清を用いても試験することができる。副産物及び残余のグルコースは、例えば、グルコース及びアルコールのための屈折率検出器、並びに有機酸のための紫外線検出器を使用するHPLC (Linらの文献 (Biotechno

10

20

30

40

50

I. Bioeng. 90 : 775-779 (2005)))、又は当該技術分野において周知の他の好適なアッセイ及び検出法により定量化することができる。また、外来性DNA配列由来の個々の酵素活性又はタンパク質活性は、当該技術分野において周知の方法を使用してアッセイすることもできる（例えば、WO / 2008 / 115840、及びHanaiらの文献（Appl Environ Microbiol 73 : 7814-7818 (2007)）を参照されたい）。

【0173】

1,3-ブタンジオールは、当該技術分野において周知の種々の方法を使用して、培養物中の他の成分から分離することができる。このような分離法には、例えば、抽出手順、並びに連続液体 液体抽出、浸透気化法、膜濾過、膜分離、逆浸透、電気透析、蒸留、結晶化、遠心分離、抽出濾過、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、及び限外濾過を含む方法を含む。上記の方法の全ては、当該技術分野において周知である。10

【0174】

本明細書に説明される任意の非天然微生物を培養して、本発明の生合成生成物を產生及び／又は分泌させることができる。例えば、1,3-ブタンジオール產生体は、1,3-ブタンジオールの生合成產生のために培養することができる。

【0175】

1,3-ブタンジオールの產生のために、組換え株は、炭素源及び他の必須栄養素を有する培地において培養される。全体のプロセスの経費を削減するために、発酵槽における嫌気的条件を維持することは大変望ましい。このような条件は、例えば、最初に窒素を培地に散布 (sparging) して、それから中隔及び圧着キャップでフラスコを封止することで得ることができる。増殖が嫌気的に観察されない株について、微好気性状態は、限られた通気のための小開口を用いて中隔を穿孔することにより適用することができる。例示的な嫌気的条件は先に説明されており、かつ当該技術分野において周知である。例示的な好気性状態及び嫌気性状態は、例えば、2007年8月10日に出願の米国公報第US 2009 0047719号に説明されている。本明細書に開示されるように、発酵は、バッチ、供給バッチ又は連続様式で実施することができる。20

【0176】

所望の場合、培地のpHは、所望のpH、特に、所望のpHに培地を維持するために必要なNaOH若しくは他の塩基などの塩基又は酸の添加によるほぼ7のpHなどの中性のpHに維持することができる。増殖速度は、分光光度計 (600nm) を使用する光学密度を、及び経時的に炭素源枯渇をモニターすることによるグルコース取り込み速度を測定することにより決定することができる。30

【0177】

先に例証されたものなどの再生可能原料に加え、本発明の1,3-ブタンジオール微生物は、その炭素源として合成ガスにおける増殖のために修飾することもできる。この具体的な実施態様において、1以上のタンパク質又は酵素は、1,3-ブタンジオール產生生物において発現し、合成ガス又は他の気体の炭素源の利用のための代謝経路を提供する。

【0178】

本発明の生物は、例えば、非天然微生物に炭素源を供給することのできる任意の炭水化物源を利用することができます。このような供給源には、例えば、グルコース、キシロース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、フルクトース及びデンプンなどの糖類を含む。炭水化物の他の供給源には、例えば、再生可能原料及びバイオマスを含む。本発明の方法の原料として使用することのできる例示的な種類のバイオマスは、セルロースバイオマス、ヘミセルロースバイオマス及びリグニン原料又は原料部分を含む。このようなバイオマス原料は、例えば、グルコース、キシロース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、フルクトース及びデンプンなどの炭素源として有用な炭水化物基質を含む。本明細書に提供される教示及びガイドanceを考慮すると、当業者は、先に例証されたもの以外の再生可能原料及びバイオマスも、1,3-ブタンジオールの產生のための本発明の微生物を培養するために使用することを理解するであろう。40

【0179】

従って、本明細書に提供される教示及びガイダンスを考慮すると、当業者は、合成ガス、CO及び／又はCO₂などの炭素源において増殖する場合に本発明の生合成された化合物を分泌する非天然微生物を作出することができることを理解するであろう。このような化合物には、例えば、1,3-ブタンジオール、及び1,3-ブタンジオール経路の任意の中間代謝物を含む。必要とされることの全ては、1以上の必要とされる酵素活性又はタンパク質活性を操作して、例えば、1,3-ブタンジオール生合成経路の一部若しくは全部の包含を含む、所望の化合物又は中間体の生合成を達成することである。従って、本発明は、炭水化物又は他の炭素源において増殖する場合に1,3-ブタンジオールを産生及び／又は分泌する非天然微生物を、並びに炭水化物又は他の炭素源において増殖する場合に1,3-ブタンジオール経路に示される任意の中間代謝物を産生及び／又は分泌する非天然微生物を提供する。本発明の1,3-ブタンジオール産生微生物は、中間体、例えば、アセチル-CoAから合成を開始することができる。10

【0180】

本発明の非天然微生物は、本明細書に例証される当該技術分野において周知の方法を使用して、1,3-ブタンジオールを産生するのに十分な量の1,3-ブタンジオール経路酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸を外的に発現するよう構築される。本発明の微生物は、1,3-ブタンジオールを産生するのに十分な条件下で培養されることが理解される。本明細書に提供される教示及びガイダンスに従い、本発明の非天然微生物は、約0.1～2000mM以上の細胞内濃度を結果として生じる1,3-ブタンジオールの生合成を達成することができる。一般的に、1,3-ブタンジオールの細胞内濃度は、約3～1800mM、特定には約5～1700mM、及びより特定には約100mM、200mM、500mM、800mM、又はそれより多くを含む約8～1600mMである。これらの例示的な範囲の各々の間の及び該各々を上回る細胞内濃度も、本発明の非天然微生物から達成することができる。20

【0181】

いくつかの実施態様において、培養条件には、嫌気性の又は実質的に嫌気性の増殖条件又は維持条件を含む。例示的な嫌気的条件は既に説明されており、当該技術分野において周知である。発酵プロセスのための例示的な嫌気的条件は本明細書に説明されており、例えば、2007年8月10日に出願の米国特許出願第US2009 / 0047719号に説明されている。任意のこれらの条件は、非天然微生物と共に、並びに当該技術分野において周知の他の嫌気的条件と共に、採用することができる。このような嫌気的条件の下で、1,3-ブタンジオール產生体は、5～10mM以上の細胞内濃度で、並びに本明細書に例証される他の全ての濃度で、1,3-ブタンジオールを合成することができる。先の説明が細胞内濃度に関する場合であっても、1,3-ブタンジオール產生性微生物は、細胞内に1,3-ブタンジオールを産生することができ、及び／又は培地中に生成物を分泌することは理解される。30

【0182】

培養条件には、例えば、液体培養手順並びに発酵手順及び他の大量培養手順を含むことができる。本明細書に説明されるように、本発明の生合成生成物の特に有用な収量は、嫌気性の若しくは実質的に嫌気性の培養条件の下で得ることができる。

【0183】

本明細書に説明されるように、1,3-ブタンジオールの生合成を達成するための1つの例示的な増殖条件には、嫌気培養条件又は発酵条件を含む。ある種の実施態様において、本発明の非天然微生物は、嫌気性の若しくは実質的に嫌気性の条件下で持続することができ、培養することができ、又は発酵することができる。簡潔にいうと、嫌気性条件とは、酸素のない環境をいう。実質的に嫌気性の条件には、例えば、培地中の溶存酸素濃度が飽和の0～10%にとどまるような培養、バッチ発酵又は連続発酵を含む。また、実質的に嫌気性の条件には、1%未満の酸素の雰囲気で維持される密封チャンバーでの液体培地中での又は固体寒天での増殖細胞若しくは静止細胞も含む。酸素のパーセントは、例えば、N₂ / CO₂混合物又は他の好適な非酸素ガス(gas)又は非酸素ガス(gases)を該培養物に散布することにより維持することができる。4050

【0184】

本明細書に説明される培養条件は、1,3-ブタンジオールの製造のために規模拡大することができ、連続増殖することができる。例示的な増殖手順には、例えば、流加バッチ発酵及びバッチ分離；流加バッチ発酵及び連続分離、又は連続発酵及び連続分離を含む。これらのプロセスの全ては、当該技術分野において周知である。発酵手順は、1,3-ブタンジオールの商業的な量の生合成産生に特に有用である。一般的に、及び非連続培養手順を用いるものとして、1,3-ブタンジオールの連続産生及び／又はほぼ連続した産生は、対数期の増殖を維持及び／又はほぼ維持するのに十分な栄養素及び培地における本発明の非天然1,3-ブタンジオール産生性生物を培養することを含む。このような条件下での連続培養には、例えば、1、2、3、4、5、6若しくは7日又はそれより長い日数を含むことができる。加えて、連続培養には、1、2、3、4若しくは5週又は長い週数でかつ最長数カ月を含むことができる。あるいは、本発明の生物は、特定の適用に好適な場合、何時間も培養することができる。連続培養条件及び／又はほぼ連続した培養の条件には、これらの例示的な期間の間の時間的間隔をすべて含むこともできることは理解されるべきである。本発明の微生物を培養する時間は、所望の目的のために十分な量の生成物を産生するのに十分な期間に關することが更に理解される。

10

【0185】

発酵手順は、当該技術分野において周知である。簡潔にいうと、1,3-ブタンジオールの生合成産生のための発酵は、例えば、流加バッチ発酵及びバッチ分離；流加バッチ発酵及び連続分離、又は連続発酵及び連続分離において利用することができる。バッチ発酵手順及び連続発酵手順の例は、当該技術分野において周知である。

20

【0186】

相当量の1,3-ブタンジオールの連続産生のための本発明の1,3-ブタンジオール産生体を使用する先の発酵手順に加え、該1,3-ブタンジオール産生体は、例えば、所望の場合、化学合成手順に同時に供して、該生成物を他の化合物へと転換することもできるか、又は該生成物を該発酵培養物から分離し、順次化学的転換に供して該生成物を他の化合物へと転換することもできる。

【0187】

いくつかの実施態様において、合成ガスは、炭素原料として使用することができる。合成ガス発酵のための重要なプロセスの考慮は、高いバイオマス濃度及び良好な気液物質移動である (Bredwellらの文献 (Biotechnol Prog. 15 : 834-844 (1999)))。水中のCOの溶解度は、酸素の溶解度よりもやや低い。連続的に気体を散布された発酵は、質量分析及び周期的液体サンプリングによる定常オフガス分析、並びにGC及びHPLCによる分析を用いて制御された発酵槽において実施することができる。液相は、バッチモードで機能することができる。アルコール、有機酸、及び残留メタノールを伴う残留グルコースなどの発酵産物は、HPLC (Shimadzu, Columbia MD) により、例えば、Aminex (登録商標) シリーズのHPLCカラム (例えば、HPX 87シリーズ) (BioRad, Hercules CA) を使用して、グルコース及びアルコールのための屈折率検出器を使用して、及び有機酸のための紫外線検出器を使用して、定量化される。増殖速度は、分光光度計 (600nm) を使用する光学密度を測定することにより決定される。これらのシステムの全ての配管は、嫌気的条件を維持するガラス又は金属である。ガス散布は、泡サイズを減少させ、物質移動を向上させるガラスフリットを用いて実施される。種々の散布速度が試験され、それは約0.1~1vvm (1分当たりの蒸気量) の範囲である。ガス取り込み速度の正確な測定結果を得るために、気流が一時的に停止する周期的なチャレンジが実施され、該気相組成物は時間の関数としてモニタ-される。

30

【0188】

全体の目標産生性を達成するために、細胞保持又はリサイクルの方法が採用される。微生物濃度を上昇させる1つの方法は、側流から接線流膜を介して細胞をリサイクルすることである。ムーレラによる酢酸の産生について先に説明されたように (Sakaiらの文献 (J Biosci. Bioeng. 99 : 252-258 (2005)))、反復バッチ培養を使用することもできる。種

40

50

々の他の方法も使用することができる (Bredwellらの文献 (Biotechnol Prog. 15 : 834-844 (1999)) ; Datarらの文献 (Biotechnol Bioeng 86 : 587-594 (2004)))。物質移動を改良するための1.5気圧における超過圧力などの追加的な最適化を試験することができる (Najafpourらの文献 (Enzyme and Microbial Technology 38[1-2], 223-228 (2006)))。

【0189】

供給物として純粋なH₂/COを使用して満足な性能が一旦達成されると、商業的な合成ガスに存在しそうな阻害剤を含む合成ガス混合物を生産する。例えば、典型的な不純物特性は、4.5%のCH₄、0.1%のC₂H₂、0.35%のC₂H₆、1.4%のC₂H₄及び150ppmの一酸化窒素である (Datarらの文献 (Biotechnol Bioeng 86 : 587-594 (2004)))。ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、p-キシレン、o-キシレン、及びナフタレンなどの化合物により表されるタールをppmレベルで添加し、產生における任意の効果について試験する。例えば、40ppmのNOがクロストリジウム・カルボキシジボランス (carboxidivorans) に対して阻害的であることが示された (Ahmedらの文献 (Biotechnol Bioeng 97 : 1080-1086 (2007)))。培養物は、発酵槽へ移動する前に、振盪フラスコ培地において試験される。また、これらの異なるレベルの潜在的阻害性化合物は、該化合物が細胞増殖に関して有する効果を定量化するために試験される。この知識を使用して合成ガス純度についての明細書を展開し、これは規模拡大研究及び產生のために利用される。任意の特定の成分が規模拡大のために使用する合成ガスから減少又は除去するのが困難であるとわかった場合、適応進化手順を利用して、1以上の不純物を許容せしめるように細胞を適応させる。

【0190】

タンパク質工学の分野における進展によって、本明細書に開示された任意の酵素を変化させて該酵素にとって天然であることが公知ではない基質に効率的に作用することがありがちとなる。下記は、関心対象の異なるクラス由来の広範な特異性の酵素のいくつかの例、及び非天然基質に作用するようこのような酵素を進化させるために用いられた方法である。

【0191】

本明細書に開示された経路における1つのクラスの酵素は、ケトン又はアルデヒドをアルコールに相互転換する酸化還元酵素である (1.1.1)。このクラスにおける酵素は、広範な範囲の基質に関して作動することができる。ダイズ細菌ブレビバクテリウム種KU1309から精製されたアルコール脱水素酵素 (1.1.1.1) (Hiranoらの文献 (J. Biosci. Bioeng. 100 : 318-322 (2005)))は、高い活性で脂肪族アルコール及び芳香族アルコールの多血症に関して作動することが示された。表33は、異なるアルコールに関する酵素活性及びそのK_mを示す。該酵素は、可逆的であり、また表34において示されるようにいくつかのアルデヒドに関して非常に高い活性を有する。

10

20

30

【表35】

表33

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

10

【0192】

20

この表において、19.2U/mgに相応する2-フェニルエタノールの活性を100%とする。

【表36】

表34

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

30

【0193】

ラルストニア・ユートロファ由来の乳酸脱水素酵素(1.1.1.27)は、2-オキソブチラート、2-オキソペンタノアート、及び2-オキソグルタラート(2-オキソアジパートに類似したC5化合物)などのいくつかの2-オキソ酸に関して高い活性を有することが示された別の酵素である(Steinbuchelらの文献(上述))。表35における第2列は、ラルストニア・ユートロファ(旧アルカリゲネス・ユートロフス)由来のIdhAの異なる基質に対する活性を示す(Steinbuchelらの文献(上述))。

【表37】

表35

基質	活性		
	L(+)-	L(+)-	D(-)-
	アルカリグネス・ ユートロフス由来の 乳酸脱水素酵素	ウサギ筋肉由来の 乳酸脱水素酵素	ラクトバチルス・レイシ ュマニ (<i>L. leischmanii</i>) 由来の乳酸脱水素酵素
	%		
グリオキシル酸	8.7	23.9	5.0
ピルビン酸	100.0	100.0	100.0
2-オキソ酪酸	107.0	18.6	1.1
2-オキソ吉草酸	125.0	0.7	0.0
3-メチル-2- オキソ酪酸	28.5	0.0	0.0
3-メチル-2- オキソ吉草酸	5.3	0.0	0.0
4-メチル-2- オキソペンタン酸	39.0	1.4	1.1
オキサロ酢酸	0.0	33.1	23.1
2-オキソグルタル酸	79.6	0.0	0.0
3-フルオロピルビン酸	33.6	74.3	40.0

【0194】

2-オキソ酸をそのアシル-CoA対応物 (1.2.1) に転換することのできる酸化還元酵素は、複数の基質を同様に受け入れることが示されている。例えば、2-オキソイソ吉草酸脱水素酵素 (1.2.1.25) としても公知の分岐鎖2-ケト-酸脱水素酵素複合体 (BCKAD) は、分岐鎖アミノ酸分解経路に関与し、バリン、ロイシン、及びイソロイシンの2-ケト酸誘導体をそれらのアシル-CoA誘導体及びCO₂に転換する。ラット (Paxtonらの文献 (Biochem. J. 2 34 : 295-303 (1986)) 及び出芽酵母 (Sinclairらの文献 (Biochem. Mol. Int. 31 : 91 1-922 (1993))) を含むいくつかの生物において、この複合体は、分岐鎖アミノ酸前駆体に加えて、2-オキソブタン酸及びアルファ-ケトグルタル酸などの直鎖オキソ酸を含む広範な基質範囲を有することが示されている。

【0195】

なおも別のクラスの酵素のメンバー、すなわちアミノトランスフェラーゼ (2.6.1) は、複数の基質に作用することが報告されている。パイロコッカス・フリオサス (*furious*) 由来のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (*aspAT*) が同定されており、大腸菌で発現し、組換えタンパク質は、該酵素がアスパラギン酸及びアルファ-ケトグルタル酸に対する最大活性を有するが、アラニン、グルタミン酸、及び芳香族アミノ酸に対してより低いなおも有意な活性を有することを示すよう特徴づけられている (Wardらの文献 (Archaea. 1 : 133-141 (2002)))。別の場合において、メキシコリーシュマニアから同定されかつ大腸菌において発現するアミノトランスフェラーゼ (Vernalらの文献 (FEMS Microbiol. Lett. 229 : 217-222 (2003))) は、チロシン (チロシンに関して100%と考えられる活性)、フェニルアラニン (90%)、トリプトファン (85%)、アスパラギン酸 (30%)、ロイシン (25%)、及びメチオニン (25%) に対する広範な基質特異性をそれぞれ有することが報告された (Vernalらの文献 (Mol. Biochem. Parasitol. 96 : 83-92 (1998)))。同様の広範な特異性は、トリパノソーマ・クルージ由来のチロシンアミノトランスフェラーゼについて報告されてはいるが、これらの酵素は両方とも、6%の配列相同性しか有しない。後者の酵素は、ロイシン、メチオニン、並びにチロシン、フェニルアラ

10

20

30

40

50

ニン、トリプトファン、及びアラニンを効率的なアミノドナーとして受け入れることができることに留意されたい (Nowickiらの文献 (Biochim. Biophys. Acta 1546 : 268-281 (2001)))。

【 0 1 9 6 】

酵素が広範な基質特異性を天然に有するこれらの例とは対照的に、数多くの酵素は、それらの非天然基質に対する特異性を広げるよう、定向進化を用いて修飾されている。あるいはまた、酵素の基質優先性は、定向進化を用いて変化している。例えば、緑膿菌由来のリバーゼのエナンチオ選択性が有意に改良されたことが報告されている。この酵素は、(S)-酸に有利に、2%のみ鏡像異性体が過剰な (ee) p-ニトロフェニル2-メチルデカノアートを加水分解した。しかしながら、エラープローン突然変異誘発及びスクリーニングの4回の成功したラウンドの後、81%eeで必要な反応を触媒するバリアントを作製した (Reetzらの文献 (Angew. Chem. Int. Ed Engl. 36 : 2830-2832 (1997)))。

【 0 1 9 7 】

定向進化法は、非天然基質のアレイに関して機能するよう酵素の修飾を可能にした。緑膿菌におけるリバーゼの基質特異性は、活性部位近くのアミノ酸残基のランダム化によって広がった。このことは、この酵素によるアルファ置換カルボン酸エステルの受け入れを可能にした (Reetzらの文献 (Angew. Chem. Int. Ed Engl. 44 : 4192-4196 (2005)))。別の成功した試行において、DNAシャッフリングを採用して、野生型酵素によってほとんど受け入れられない - 分岐鎖基質を受け入れる大腸菌アミノトランスフェラーゼを作製した (Yanoらの文献 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 95 : 5511-5515 (1998)))。具体的には、4回のシャッフリングの終了時に、バリン及び2-オキソバリンについてのアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの活性は、最大5オーダーの程度ほど増大したのに対し、天然基質であるアスパラギン酸に対する活性を最大30倍ほど低下させた。近年、アルゴリズムを使用して、非天然かつ非生物学的基質である4-ヒドロキシ-4-(6-メトキシ-2-ナフチル)-2-ブタノンにおける炭素間結合の切断を触媒するために使用することができるレトロ-アルドラーーゼを設計した。これらのアルゴリズムは、4つの異なる触媒モチーフの異なる組み合わせを使用して、新たな酵素を設計し、実験的特徴について選択された20の設計は、触媒されていない反応よりも4倍改良された割合を有した (Jiangらの文献 (Science 319 : 1387-1391 (2008)))。このように、酵素が作用することのできる基質のアレイを拡張することのできるこれらの工学アプローチがあるだけでなく、非常に効率的な酵素の設計及び構築も可能となる。例えば、DNAシャッフリング (一過性テンプレート又はRACHITTに関するランダムキメラ形成) の方法は、複合体基質に関する脱硫の改良された速度及び非天然基質の20倍迅速な転換を有する操作されたモノオキシゲナーゼをもたらすことが報告された (Cocoらの文献 (Nat. Biotechnol. 19 : 354-359 (2001)))。同様に、遅鈍な突然変異体トリオースホスファターゼイソメラーゼ酵素の比活性は、1.3倍から最大19倍改良された (Hermesらの文献 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 87 : 696-700 (1990)))。比活性におけるこの亢進は、タンパク質の全長にわたるランダム突然変異誘発を用いることによって達成され、該改良は、6個のアミノ酸残基における突然変異であることを突き止めることができた。

【 0 1 9 8 】

また、所望の基質についての酵素の基質特異性を変化させるためのタンパク質工学の有効性も示されている。サーマス・サーモフィラス由来のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素は、活性部位に近い残基を変化させることによって修飾され、それにより基質としてのリンゴ酸及びD-乳酸にいまや作用することができた (Fujitaらの文献 (Biosci. Biotechnol. Biochem. 65 : 2695-2700 (2001)))。本研究において及び他の研究において、1つまたは少数の残基を修飾して基質特異性を変更させることができることが指摘された。適例は、単一のアミノ酸が、ジヒドロケンフェロールを優先的に還元することのできる推定基質結合領域において変化した、ジヒドロフラボノール4-還元酵素である (Johnsonらの文献, Plant J. 25:325-333 (2001))。大腸菌由来の非常に特異的なイソクエン酸脱水素酵素の基質特異性は、活性部位における1つの残基を変化させることによって、イソクエン

10

20

30

40

50

酸からイソプロピルリンゴ酸へと変化した (Doyleらの文献 (Biochemistry 40 : 4234-4241 (2001)))。類似の静脈において、NAD⁺ 依存性1,5-ヒドロキシプロスタグランジン脱水素酵素の共因子特異性は、N 末端近くの少数の残基を変化させることによって、NAD⁺ に変更した (Choらの文献 (Arch. Biochem. Biophys. 419 : 139-146 (2003)))。配列分析及び分子モデリング分析を使用して、修飾のための鍵残基を同定し、該残基はさらに、位置指定突然変異誘発によって研究した。

【0199】

フコシダーゼは、DNAシャッフリング及びスクリーニングによって、大腸菌におけるガラクトシダーゼから進化した。 (Zhangらの文献 (Proc Natl Acad Sci U S. A 94 : 4504-4509 (1997)))。同様に、大腸菌由来のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼは、相同性モデリング及び位置指定突然変異誘発を用いてチロシンアミノトランスフェラーゼへと転換した (Onufferらの文献 (Protein Sci. 4 : 1750-1757 (1995)))。プチダ菌由来のベンゾイルギ酸デカルボキシラーゼの活性部位における2つの残基の位置指定突然変異誘発は報告によると、天然基質及び非天然基質に対する親和性 (K_m) を変更させた (Siegerらの文献 (Protein Eng Des Sel 18 : 345-357 (2005)))。出芽酵母由来のチトクロムcペルオキシダーゼ (CCP) を定向分子進化に供し、古典的なペルオキシダーゼ基質であるグアヤコールに対する高い活性を有する突然変異体を作製し、従って、タンパク質チトクロムcから有機小分子へとCCPの基質特異性を変化させた。3回のDNAシャッフリング及びスクリーニングの後、突然変異体を単離し、該突然変異体は、グアヤコールに対して300倍高い活性を、及び天然基質に対する特異性と比較してこの基質に対する最大で1000倍高い特異性を有していた (Ifflandらの文献 (Biochemistry 39 : 10790-10798 (2000)))。

【0200】

いくつかの場合、両方の親酵素とは異なる基質優先性を有する酵素が得られている。例えば、ポリ塩化ビフェニルのビフェニル-ジオキシゲナーゼ仲介性分解は、2つの細菌シードモナス・シードアルカリゲネス及びセバシア菌由来の遺伝子をシャッフリングすることによって改良された (Kumamaruらの文献 (Nat. Biotechnol 16, 663-666 (1998)))。結果として生じるキメラビフェニルオキシゲナーゼは、両方の親酵素とは異なる基質優先性を示し、関連したビフェニル化合物に対する分解活性と、該酵素についての元来乏しい基質であるトルエン及びベンゼンなどの単一の芳香環炭化水素とを亢進させた。

【0201】

酵素特異性を変化させることが可能であるだけでなく、酵素が低い活性を天然に有する基質に関する活性を亢進することも可能である。1つの研究は、広範な基質特異性を有する(とりわけ、リシン、アルギニン、アラニン、セリン、メチオニン、システイン、ロイシン、及びヒスチジンに対して)ものの、トリプトファンに対する低い活性を有するプチダ菌由来のアミノ酸ラセマーゼが、ランダム突然変異誘発によって有意に改良することができることを示した (Kinoらの文献 (Appl. Microbiol. Biotechnol. 73 : 1299-1305 (2007)))。同様に、ウシBCKADの活性部位を操作して、代替的な基質アセチル-CoAに有利にした (Mengらの文献 (Biochemistry 33 : 12879-12885 (1994)))。これらのアプローチに関する関心対象の態様は、ランダム法が、効果的な活性を有するこれらの突然変異した酵素を作製するために適用された場合でさえ、活性に改良を与える実際の突然変異または構造変化が同定することができる。例えば、上記の研究において、トリプトファンに関する改良された活性を容易にした突然変異は、2つの異なる位置を突き止めることができた。

【0202】

また、定向進化は、発現することが困難なタンパク質を発現するために使用されている。例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼをランダム突然変異誘発及び遺伝子組換えに供することによって、野生型よりも14倍活性の大きな突然変異体を抽出することができた (Linらの文献 (Biotechnol. Prog. 15 : 467-471 (1999)))。

【0203】

10

20

30

40

50

定向進化の最終的な例は、酵素がある範囲の所望の機能を達成するよう供することのできる広範な修飾を示す。バチルス・ステアロサーモフィルス由来の酵素である乳酸脱水素酵素を位置指定突然変異誘発に供し、3つのアミノ酸置換を、異なるヒドロキシ酸に対する特異性を決定するために示される部位で実施した (Clarkeらの文献 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 148 : 15-23 (1987)))。これらの突然変異の後、ピルビン酸を上回るオキサロ酢酸に対する特異性は、1000のオキサロ酢酸を上回るピルビン酸に対する触媒特異性を有する野生型酵素とは対照的に500まで増大した。この酵素をさらに、分岐鎖置換ピルビン酸に対する活性を有するよう、位置指定突然変異誘発を使用して操作した (Wilksらの文献 (Biochemistry 29 : 8587-8591 (1990)))。具体的には、該酵素は、アルファ-ケトイソカプロン酸について K_{cat} における55倍の改良を有した。3つの構造的修飾を同じ酵素において実施して、その基質特異性を乳酸からリンゴ酸に変化させた。該酵素は、リンゴ酸に対して非常に活性がありかつ特異的であった (Wilksらの文献 (Science 242 : 1541-1544 (1988)))。バチルス・ステアロサーモフィルス由来の同じ酵素を、アンモニウム基を含むアルファ-ケト酸など、正に帶電した側鎖を有するアルファ-ケト酸に対する高い触媒活性を有するよう操作した (Hoganらの文献 (Biochemistry 34 : 4225-4230 (1995)))。酵素の位置102に導入された酸性アミノ酸を有する突然変異体は、このような側鎖アンモニウム基の結合に有利であった。得られた結果は、突然変異体が、オメガ-アミノ-アルファ-ケト酸基質について k_{cat} / K_m 値における最大25倍の改良を示すことを立証した。また、この酵素は、乳酸脱水素酵素の替わりにフェニル乳酸脱水素酵素として機能するよう構造的に修飾された (Wilksらの文献 (Biochemistry 31 : 7802-7806 (1992)))。制限部位を、遺伝子の一領域を切除することのできる酵素についての遺伝子へと導入した。この領域は、バルクの溶媒から活性部位の空胞を正常に封止しかつ基質特異性の主要な決定因子であるポリペプチドの可動性表面ループをコードした (残基98~110)。可変長及び配列ループを、切断した遺伝子へと挿入し、基質特異性の変化したヒドロキシ酸脱水素酵素を合成するのに使用した。1つのより長いループ構築を用いて、ピルビン酸による活性は、100万倍低下したが、フェニルピルビン酸による活性は大きく変化しなかった。390,000倍の特異性 (k_{cat} / K_m) の切り替えを達成した。この酵素のピルビン酸を上回るフェニルピルビン酸に対する1700:1の選択性は、フェニル乳酸脱水素酵素において必要とされるものである。

【0204】

30

先に示したように、定向進化は、酵素の特性を改良及び/又は変化させるために具体的な遺伝子を標的とした突然変異の導入を包含する強力なアプローチである。改良及び/又は変化した酵素は、多くの酵素バリエント (たとえば、 $> 10^4$) の自動スクリーニングを可能にする高感度高処理量スクリーニングアッセイの開発及び実施を通じて同定することができる。典型的に、反復ラウンドの突然変異誘発及びスクリーニングを実施して、最適化した特性を有する酵素を生じる。また、突然変異誘発のための遺伝子の領域を同定するのに役立つことのできる計算アルゴリズムも開発されており、作製及びスクリーニングするのに必要な酵素バリエントの数を有意に減少させることができる。

【0205】

40

分岐バリエントライブラリーを作製するのに有効であるよう数多くの定向進化技術が開発されており (総説については、Hibbert, E. G.、F. Baganz、H. C. Hailes、J. M. Ward、G. J. Lye、J. M. Woodley、及びP. A. Dalbyの文献「生物触媒プロセスの定向進化 (Directed evolution of biocatalytic processes)」(Biomol. Eng 22:11-19, 2005) ; Huisman, G. W. 及びJ. J. Lalondeの文献「化学プロセス適用のための酵素進化 (Enzyme evolution for chemical process applications)」(p. 717-742, 2007. R. N. Patel (編) 医薬産業及びバイオテクノロジー産業における生物触媒現象 (Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries) CRC Press) ; Otten, L. G. 及びW. J. Quaxの文献「定向進化：現代の生物触媒現象の選択 (Directed evolution: selecting today's biocatalysts)」(Biomol. Eng 22:1-9, 2005) ; 並びに Sen, S.、D. Venkata, V. 及びB. Mandalの文献「酵素機能を改良するための定向進化の開発 (Developments in

50

directed evolution for improving enzyme functions)」(Appl Biochem Biotechnol 143:212-223, 2007)を参照されたい。)、これらの方は、多くの酵素クラスを通じて幅広い範囲の特性の改良に成功裏に適用している。

【0206】

定向進化技術によって改良及び／又は変化した酵素特徴には、例えば、選択性／特異性(非天然基質の転換のため)；温度安定性(頑強な高温処理のため)；pH安定性(より低いpH条件又はより高いpH条件下でのバイオプロセシングのため)；基質又は生成物の耐性(それにより高い生成物力値を達成することができる。)；結合(K_m)(非天然基質を含むよう基質結合を拡張する。)；阻害(K_i)(生成物、基質、又は鍵となる中間体による阻害を除去する。)；活性(k_{cat})(所望の流れを達成するよう酵素反応速度を増大させる。)；発現レベル(タンパク質収量及び全体的な経路の流れを増大させる。)；酸素安定性(好気性条件下での空気感受性酵素の操作のため)；並びに好気性活性(酸素の不在下での好気性酵素の操作のため)を含む。

10

【0207】

以下の例示的な方法は、具体的な酵素の所望の特性を標的とするための遺伝子の突然変異誘発及び多様化のために開発されている。任意のこれらを使用して、デカルボキシラーゼ酵素の活性／最適化することができる。

【0208】

EpPCR (Pritchard, L.、D. Corne、D. Kell、J. Rowland、及びM. Winson「エラープローンPCRの一般的なモデル(A general model of error-prone PCR)」(J Theor. Biol. 234: 497-509, 2005)は、 Mn^{2+} イオンの付加による、dNTP濃度を偏向させることによる、又は他の条件的変動による、PCR反応におけるDNAポリメラーゼの忠実度を低下させることによって、ランダム点突然変異を導入する。関心対象の標的遺伝子に突然変異誘発を限局するための5工程クローニングプロセスは、下記を包含する：1) 関心対象の遺伝子のエラープローンPCR増幅；2) 制限酵素消化；3) 所望のDNA断片のゲル精製；4) ベクターへの連結反応；5) 好適な宿主への遺伝子バリエントの形質転換及び改良された性能のためのライプラリーのスクリーニング。本方法は、単一の遺伝子における複数の突然変異を同時に作製することができ、該方法は有用であり得る。多数の突然変異体をEpPCRによって作製することができ、それにより高処理量スクリーニングアッセイ又は選択法(特にロボット工学を使用する。)は、望ましい特徴を有する突然変異体を同定するのに有用である。

20

【0209】

エラープローンローリングサークル増幅(Rolling Circle Amplification)(epRCA)(Fujii, R.、M. Kitaoka、及びK. Hayashiの文献「エラープローンローリングサークル増幅による1工程ランダム突然変異誘発(One-step random mutagenesis by error-prone rolling circle amplification)」(Nucleic Acids Res 32: e145 (2004))；並びにFujii, R.、M. Kitaoka、及びK. Hayashiの文献「エラープローンローリングサークル増幅：最も単純なランダム突然変異誘発プロトコール(Error-prone rolling circle amplification: the simplest random mutagenesis protocol)」(Nat. Protoc. 1: 2493-2497 (2006))は、epPCRと同じ要素の多くを有するが、例外として、環状プラスミド全体をテンプレートとして使用し、最後の2ヌクレオチドにおけるエキソヌクレアーゼ耐性チオリン酸連鎖を有するランダムな6マーを使用してプラスミドを増幅した後に細胞への形質転換を実施して、細胞の中でプラスミドを縦列反復配列で再環状化させる。 Mn^{2+} 濃度を調整することは、突然変異率を幾分変動させることができる。この技術は、単純なエラープローン单一工程法を使用して、3~4突然変異/kbpでプラスミドの完全なコピーを作製する。制限酵素消化又は特異的プライマーは必要とされない。加えて、本方法は典型的には、キットとして入手可能である。

30

【0210】

DNA又はファミリーシャッフリング(Stemmer, W. P.の文献「ランダム断片化及び再構築によるDNAシャッフリング：分子進化のためのインビトロでの組換え(DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evol

40

50

ution)」(Proc Natl Acad Sci USA 91:10747-10751 (1994))；及びStemmer, W. P. の文献「DNAシャッフリングによるインビトロでのタンパク質の急速な進化 (Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling)」(Nature 370:389-391 (1994)))は典型的には、DNAポリメラーゼの存在下でアニーリング及び伸長の周期によって再構築されるランダム断片のプールを生じて、キメラ遺伝子のライブラリーを作製するために、Dnase I又はEndo Vなどのヌクレアーゼを用いた2以上のバリエント遺伝子の消化を包含する。断片は互いに刺激し、かつ、組換えは、1つのコピーが別のコピーを刺激する場合に生じる(テンプレートスイッチ)。本方法は、1kbp超のDNA配列を用いて使用することができる。断片の再構築によって作製される突然変異性の組換え体に加え、本方法は、エラープローンPCRと類似の速度で伸長工程において点突然変異を導入する。該方法を使用して、抗原性を与え得る有害なランダム中立突然変異を除去することができる。10

【0211】

付着伸長 (StEP) (Zhao, H.、L. Giver, Z. Shao, J. A. Affholter、及びF. H. Arnoldの文献「インビトロでの組換えにおける付着伸長プロセス (StEP) による分子進化 (Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination)」(Nat. Biotechnol 16:258-261 (1998)))は、テンプレート刺激後に、変性及び非常に短い時間のアニーリング / 伸長 (5秒程度短い。)を用いる反復した周期の2工程PCRを必要とする。増殖する断片は、異なるテンプレートとアニーリングし、かつさらに伸長し、全長の配列を作製するまで反復される。テンプレート切り替えとは、結果として生じるほとんどの断片が複数の親を有することを意味する。低忠実度のポリメラーゼの組み合わせ (Taq及びMutazyme) は、反対の変異性のスペクトルのため、エラープローン偏向を低下させる。20

【0212】

ランダム刺激組換え (RPR) において、ランダム配列プライマーを使用して、テンプレートの異なるセグメントと相補的な多くの短いDNA断片を作製する (Shao, Z.、H. Zhao、L. Giver、及びF.H. Arnoldの文献「ランダム刺激のインビトロ組換え：定向進化のための有効なツール (Random-priming in vitro recombination: an effective tool for directed evolution)」(Nucleic Acids Res 26:681-683 (1998)))。epPCRを介する塩基誤組換え及び誤刺激は、点突然変異を与える。短いDNA断片は、相同性に基づいて互いに刺激し、反復した温度周期によって組換えられ、全長へと再構築される。この工程の前のテンプレートの除去は、低い親組換え体を保証する。本方法は、ほとんどの他の方法と同様に、複数の反復にわたって実施され、異なる特性を進化させることができる。本技術は、配列の偏りを回避し、遺伝子の長さとは無関係であり、適用にとって親DNAを極めてほとんど必要としない。30

【0213】

ヘテロ二本鎖組換えにおいて、直鎖状プラスミドDNAを使用して、ミスマッチ修復によって修復されるヘテロ二本鎖を形成する (Volkov, A. A.、Z. Shao、及びF. H. Arnoldの文献「インビトロでのヘテロ二本鎖形成及びインビボでの修復による組換え及びキメラ形成 (Recombination and chimeragenesis by in vitro heteroduplex formation and in vivo repair)」(Nucleic Acids Res 27:e18 (1999)) ；並びにVolkov, A. A.、Z. Shao、及びF. H. Arnoldの文献「ヘテロ二本鎖組換えによるランダムキメラ形成 (Random chimeragenesis by heteroduplex recombination)」(Methods Enzymol. 328:456-463 (2000)))。ミスマッチ修復工程は、少なくとも幾分突然変異誘発性である。ヘテロ二本鎖は、直鎖状ホモ二本鎖よりも効率的に形質転換する。本方法は、大きな遺伝子及び、オペロン全体にとって好適である。40

【0214】

一過性テンプレートにおけるランダムキメラ形成 (RACHITT) (Coco, W.M.、W.E. Levinson、M.J. Crist、H.J. Hektor、A. Darzins、P.T. Pienkos、C.H. Squires、及びD.J. Monticelloの文献「高度に組換えられた遺伝子及び進化した酵素を作製するDNAシャッフリング法 (DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved

enzymes)」(Nat. Biotechnol 19: 354-359 (2001))は、Dnase I断片化と一本鎖DNAのサイズ分画とを採用する。相同的断片は、ポリメラーゼの不在下で、相補的一本鎖DNA足場とハイブリッド形成する。任意の重複するハイブリッド形成していない断片の末端はエキソヌクレアーゼによって刈り込まれる。断片間の間隙は充填された後、連結して、(Uを含んで増幅を妨げる)足場とハイブリッド形成した全長の多様な鎖のプールを与える。次に、足場を破壊し、PCR増幅によって、多様な鎖と相補的な新たな鎖によって置き換える。該方法は、唯一の親に由来する1つの鎖(足場)を包含するのに対し、刺激する断片は、他の遺伝子に由来し；親足場はこれに対して選択される。従って、親断面との再アーニーリングは生じない。重複する断片は、エキソヌクレアーゼを用いて刈り込まれる。さもなくば、これは、DNAシャッフリング及びStEPと概念的に類似している。それゆえ、同胞がなく、不活性物が数個で、かつシャッフリングされていない親がないべきである。本技術は、数個又は0の親遺伝子が作製され、かつはるかに多い乗換えが、標準的なDNAシャッフリングに対して結果として生じることができるという利点を有する。

【0215】

切断型テンプレート(RET)に関する組換え伸長は、テンプレートのプールとして使用される一方向性一本鎖DNA断片の存在下でプライマーから一方向性に増殖する鎖のテンプレート切り替えを必要とする(Lee, S. H.、E. J. Ryu、M. J. Kang、E.-S. Wang、Z. C. Y. Piao、K. J. J. Jung、及びY. Shinの文献「切断型テンプレート(RET)に関する組換え伸長による定向遺伝子進化への新たなアプローチ(A new approach to directed gene evolution by recombinant extension on truncated templates (RET))」(J. Molec. Catalysis 26: 119-129 (2003)))。DNAエンドヌクレアーゼは使用しない。一方向性一本鎖DNAは、ランダムプライマーを有するDNAポリメラーゼによって、又はエンドヌクレアーゼを用いる連続欠失によって製造される。一方向性一本鎖DNAは、唯一のテンプレートであり、プライマーではない。ランダムプライミング及びエキソヌクレアーゼは、DNAシャッフリング/RACHITTの酵素切断に当てはまるものとして配列の偏りを導入しない。RETは、非常に短い伸長の替わりに通常のPCR条件を使用するので、StEPよりも最適化するのが容易であることができる。組換えは、PCR工程の構成要素として生じ、直接的なシャッフリングはない。本方法はまた、休止の欠如により、StEPよりもランダムであることができる。

【0216】

縮重オリゴヌクレオチド遺伝子シャッフリング(DOGS)において、縮重プライマーを使用して、分子間の組換え(Bergquist, P.L.及びM.D.Gibbsの文献「縮重オリゴヌクレオチド遺伝子シャッフリング(Degenerate oligonucleotide gene shuffling)」(Methods Mol. Biol 352: 191-204 (2007)))；Bergquist, P.L.、R.A. Reeves、及びM.D.Gibbsの文献「縮重オリゴヌクレオチド遺伝子シャッフリング(DOGS)及びランダムドリフト突然変異誘発(RNDM)：酵素進化のための2つの相補的な技術(Degenerate oligo nucleotide gene shuffling (DOGS) and random drift mutagenesis (RNDM): two complementary techniques for enzyme evolution)」(Biomol. Eng 22: 63-72 (2005))；Gibbs, M.D.、K.M.Nevalainen、及びP.L. Bergquistの文献「縮重オリゴヌクレオチド遺伝子シャッフリング(DOGS)：ファミリーシャッフリングによる組換えの頻度を亢進する方法(Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling)」(Gene 271: 13-20 (2001))を制御し；これを使用して、DNAシャッフリングなどの他の方法の傾向を制御して、親遺伝子を再生することができる。本方法は、選択された遺伝子セグメントのランダム突然変異誘発(epPCR)と組み合わせることができる。該方法は、親配列の再編成を遮断する良好な方法であり得る。エンドヌクレアーゼは必要ではない。作製されたセグメントの入力された濃度を調整することによって、所望の骨格に対して偏向させることができる。本方法によって、制限酵素消化なしで関連性のない親からのDNAシャッフリングが可能となり、ランダム突然変異誘発法の選択が可能となる。

【0217】

10

20

30

40

50

ハイブリッド酵素の作製のための増加性切断 (ITCHY) は、関心対象の遺伝子又は遺伝子断片の1塩基対の欠失をともなうコンビナトリアルライブラリーを作製する (Ostermeierらの文献 (Proc Natl Acad Sci U S.A. 96 : 3562-3567 (1999)) ; Ostermeierらの文献 (Nat. Biotechnol. 17 : 1205-1209 (1999)))。切断は、2つの異なる遺伝子のピースに関して反対方向で導入される。これらを互いに連結し、融合をクローニングする。本技術は、2つの親遺伝子間の相同性を必要としない。ITCHYがDNAシャッフリングと組み合わされる場合、システムはSCRATCHYと呼ばれる (下記参照)。両方の主要な利点は、親遺伝子間の相同性についての必要性がなく; 例えば、大腸菌とヒト遺伝子の間の機能的融合をITCHYを介して作製する。ITCHYライブラリーを作製する場合、すべての起こり得る乗換えを捕捉する。

10

【0218】

ハイブリッド酵素の作製のためのチオ 増加性切断 (THIO ITCHY) は、ITCHYとほぼ同じであるが、例外は、ホスホチオアートdNTPを使用して切断を生じることである (Lutz, S.、M. Ostermeier、及びS.J. Benkovicの文献「(Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using alpha-phosphothioate nucleotides)」(Nucleic Acids Res 29 : E16 (2001)))。ITCHYに対して、THIO ITCHYは、最適化するのがより簡単であり得、より高い再現性及び調整性を提供する。

【0219】

DNAシャッフリングと組み合わせたSCRATCHY ITCHYは、DNAシャッフリング及びITCHYの組み合わせであり; それゆえ、複数の乗換えを可能にする (Lutzらの文献 (Proc Natl Acad Sci U S.A. 98 : 11248-11253 (2001)))。SCRATCHYは、ITCHY及びDNAシャッフリングの最良の特色を組み合わせる。計算推定は、最適化において使用することができる。SCRATCHYは、配列同一性が80%を下回る場合、DNAシャッフリングよりも有効である。

20

【0220】

ランダム浮動突然変異誘発 (RNDM) において、突然変異は、epPCR後の、使用可能な活性を保持するものについてのスクリーニング / 選択を介して実施される (Bergquistらの文献 (Biomol. Eng 22 : 63-72 (2005)))。次に、これらをDOGSにおいて使用して、複数の活性のある突然変異体間の、又は活性のある突然変異といくつかの他の望ましい親の間の融合を有する組換え体を作製する。中立変異の単離を促進するよう設計され; その目的は、この活性が元の遺伝子におけるよりも高いか又は低いかどうかを、保持された触媒活性についてスクリーニングすることである。RNDMは、スクリーニングが、背景を上回る活性を検出することができる場合、高処理量アッセイにおいて使用可能である。RNDMは、多様性を生じる上で、DOGSに対するフロントエンドとして使用してきた。該技術は、シャッフリング又は他のその後の工程の前に活性についての必要条件を課し; 中立浮動ライブラリーは、より小さなライブラリーから活性におけるより高い / より迅速な改良を結果として生じることが示されている。epPCRを用いて刊行されているが、このことは他の大規模突然変異誘発法に適用され得る。

30

【0221】

配列飽和突然変異誘発 (SeSaM) は、1) ホスホチオアートヌクレオチドのランダム組み込み及び切断を用いてランダム長断片のプールを生じ; このプールをテンプレートとして使用して、2) イノシンなどの「普編的な」塩基の存在下で伸長し; 3) イノシン含有相補物 (complement) の複製は、ランダムな塩基組み込み及び結果として突然変異誘発を与える、ランダム突然変異誘発法である (Wongらの文献 (Biotechnol J. 3 : 74-82 (2008)) ; Wongの文献 (Nucleic Acids Res 32 : e26; Wongらの文献 (Anal. Biochem. 341 : 187-189 (2005)))。本技術を用いて、単純な方法を使用して2~3日以内で突然変異体の大きなライブラリーを作製することが可能であり得る。このことは、DNAポリメラーゼの突然変異性の偏りと比較して非常に非定向性である。このアプローチの差は、本技術をepPCRと相補的 (又は代替的) にする。

40

【0222】

合成シャッフリングにおいて、重複するオリゴヌクレオチドを設計して、「標的における

50

るすべての遺伝的多様性」をコードし、シャッフリングされた後代について非常に高い多様性を可能にする (Nessらの文献 (Nat. Biotechnol 20 : 1251-1255 (2002)))。本技術において、シャッフリングされるべき断片を設計することができる。このことは、結果として生じる後代の多様性を増大させることを助ける。配列 / コドンの偏りを設計して、より密接に関連する配列にアプローチする速度でより離れて関連する配列を作製することができ、テンプレート遺伝子を物理的に有する必要がない。

【0223】

ヌクレオチド交換及び切除技術NexTは、dUTPの組み込みに次ぐウラシルDNAグリコシラーゼ及びその後のピペリジンによる処理の組み合わせを活用して、エンドポイントDNA断片化を実施する (Mullerらの文献 (Nucleic Acids Res 33 : e117 (2005)))。遺伝子は、ブルーフリーディングポリメラーゼによる内部PCRプライマー伸長を用いて再構築する。シャッフリングのための大きさは、変動するdUTP : dTTP比を用いて直接的に制御可能である。このことは、ウラシルの組み込み及び切断のための単純な方法を用いたエンドポイント反応である。本方法を用いて、8-オキソ-グアニンなどの他のヌクレオチドアナログを使用することができる。加えて、該技術は、非常に短い断片 (86bp) を用いて十分作用し、低いエラー率を有する。DNAの化学的切断は、非常に少数のシャッフリングされていないクローンを生じさせる。

【0224】

配列相同意非依存性タンパク質組換え (SHIPREC) において、リンカーを使用して、2つの遠隔に / 関連していない遺伝子間の融合を促進させ；ヌクレアーゼ処理を使用して、2つの間のある範囲のキメラを生じる。結果は、これらの融合の単一の乗換えライブラリーである (Sieber, V.、C.A. Martinez、及びF.H. Arnold「遠隔に関連した配列由来のハイブリッドタンパク質のライブラリー (Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences)」(Nat. Biotechnol 19 : 456-460 (2001)))。このことは、限定された種類のシャッフリングを生じ；突然変異誘発は別個のプロセスである。本技術は、2つの関連していない親遺伝子の各々の画分を変動させながら、キメラのライブラリーを作製することができる。相同意は必要ではない。SHIPRECを、哺乳類CP450のN-末端領域と融合した細菌CP450のヘム結合ドメインを用いて試験し；このことは、より可溶性の酵素における哺乳類活性を生じた。

【0225】

遺伝子部位飽和突然変異誘発 (GSSM) において、出発材料は、インサートを有するスーパーコイル二本鎖DNAプラスミドであり、2つのプライマーは、突然変異に所望の部位で縮重する (Krez, K. A.、T. H. Richardson、K. A. Gray、D. E. Robertson、X. Tan、及びJ. M. Shortの文献「遺伝子部位飽和突然変異誘発：包括的突然変異誘発アプローチ (Gene site saturation mutagenesis: a comprehensive mutagenesis approach)」(Method Enzymol. 388 : 3-11 (2004)))。プライマーは、関心対象の突然変異を招来し、DNAの反対鎖において同じ配列とアニーリングし；プライマーの中間部における突然変異及び各側に隣接する~20ヌクレオチドの正確な配列を生じる。プライマーの配列は、NNN又はNNK (コード化) 及びMNN (非コード化) である (N = すべて4、K = G、T、M = A、C)。伸長後、DpnIを使用して、ダム メチル化した (dam-methylated) DNAを消化し、野生型テンプレートを除去する。本技術は、所与の座 (すなわち1つのコドン) におけるすべての起こり得るアミノ酸置換を探索する。該技術は、ノンセンスコドンを有さない1つの部位におけるすべての起こり得る置換の発生を容易にし、たいていの起こり得る対立遺伝子の等しい又はほぼ等しい提示を容易にする。標的酵素の構造、機序、又はドメインに関する先行知識を必要としない。シャッフリング又は遺伝子再構築が続く場合、本技術は、単一部位の上方突然変異のすべての起こり得る組み合わせを含む組換え体の多様なライブラリーを作製する。本技術の組み合わせの有用性は、50超の異なる酵素の成功裏の進化について示されており、また、所与の酵素における2つ以上の特性についても示されている。

【0226】

コンビナトリアルカセット突然変異誘発 (Combinatorial Cassette Mutagenesis) (CC

10

20

30

40

50

M) は、限定された領域を多数の起こり得るアミノ酸配列変更と置き換えるための短いオリゴヌクレオチドカセットの使用を包含する (Reidhaar Olson, J. F., J. U. Bowie, R. M. Breyer, J. C. Hu, K. L. Knight, W. A. Lim, M. C. Mossing, D. A. Parsell, K. R. Shoemaker、及びR. T. Sauerの文献「オリゴヌクレオチドカセットを使用するタンパク質配列のランダム突然変異誘発 (Random mutagenesis of protein sequences using oligonucleotide cassettes)」(Methods Enzymol. 208 : 564-586 (1991)) ; 並びにRedhaar Olson, J. F. 及びR. T. Sauer「タンパク質配列の情報内容のプローブとしてのコンビナトリアルカセット突然変異誘発 (Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the informational content of protein sequences)」(Science 241 : 53-57 (1998)))。2つの部位又は3つの部位での同時置換は、本技術を用いて可能である。加えて、該方法は、限定された範囲の部位で起こり得る配列変化の大きな多重度を試験する。該方法は、ラムダリプレッサーDNA結合ドメインの情報内容を探索するために使用されてきた。

【0227】

コンビナトリアル多重カセット突然変異誘発 (Combinatorial Multiple Cassette Mutagenesis) (CMCM) は、CCMと本質的に同様であるが、例外は、より大きなプログラムの一部として採用されることである：1) 高い突然変異率でのepPCRの使用により、2) ホットスポット及びホット領域を同定した後、3) CMCMによる伸長で、タンパク質配列空間の規定された領域をカバーする (Reetz, M. T., S. Wilensek, D. Zha、及びK. E. Jaeger「コンビナトリアル多重カセット突然変異誘発を通じてのエナンチオ選択性酵素の定向進化 (Directed Evolution of an Enantioselective Enzyme through Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis)」(Angew. Chem. Int. Ed Engl. 40 : 3589-3591 (2001)))。CCMを使用するので、本方法は、標的領域にわたるすべての起こり得る変更を実質的に試験することができる。ランダム突然変異及びシャッフリングされた遺伝子を作製するための方法とともに使用する場合、多様なシャッフリングされたタンパク質を作製する優れた手段を提供する。本アプローチは、該酵素のエナンチオ選択性を51倍増大させる点で成功していた。

【0228】

ミューテーター株技術において、条件的tsミューテータープラスミドは、ランダムな20 ~ 4000倍の増加と選択の間の天然の突然変異頻度とを可能にし、選択が必要とされない場合、有害な突然変異の蓄積を遮断させる (Selifanova, O., F. Valle、及びV. Schellenberger「微生物における新規の形質に関する迅速な進化 (Rapid evolution of novel traits in microorganisms)」(Appl Environ Microbiol 67 : 3645-3649 (2001)))。本技術は、DNAポリメラーゼIIIの突然変異体サブユニットをコードする、プラスミド由来のmtD5遺伝子に基づいている。本サブユニットは、内在性DNAポリメラーゼIIIに結合し、該プラスミドを有する任意の株におけるポリメラーゼIIIのプルーフリーディング能を損なう。広範な範囲の塩基置換及びフレームシフト突然変異が生じる。有効な使用のために、ミューテータープラスミドは、所望の表現型に一旦達成すると、除去されるべきであり；このことは、41 でのプラスミド治療を可能にする複製の温度感受性起源を通じて達成される。ミューテーター株が、かなりの時間探索されたことは留意すべきである (例えば、Winter及び共同研究者 (J. Mol. Biol, 260, 359-3680 (1996)) を参照されたい。)。本技術において、非常に高い自発性の突然変異率が観察される。条件的特性は、所望されていない背景突然変異を最小化する。本技術は、突然変異誘発率を亢進し、かつ所望の表現型をより迅速に達成するために、適応進化と組み合わされ得る。

【0229】

「探索型突然変異誘発 (Look-Through Mutagenesis) (LTM) は、選択されたアミノ酸の組み合わせ突然変異を評価及び最適化する多次元突然変異誘発法である」 (Rajpal, A.、N. Beyaz、L. Haber、G. Cappuccilli、H. Yee、R. R. Bhatt、T. Takeuchi、R. A. Lerner、及びR. Creaの文献「組み合わせライブラリーを使用することによって抗体の親和性を著しく改良する一般的な方法 (A general method for greatly improving the affin

10

20

30

40

50

ity of antibodies by using combinatorial libraries)」(Proc Natl Acad Sci U S. A 102: 8466-8471 (2005))。起こり得るすべてのアミノ酸変化を有する各部位を飽和させるよりもむしろ、9の1セットを選択して、アミノ酸R基化学の範囲をカバーする。1部位あたりより少数の変化は、複数の部位をこの種類の突然変異誘発に供する。低いナノモル濃度からピコモル濃度までの抗体に対する結合親和性における800倍超の増加が、本方法を通じて達成された。これは、ランダムな組み合わせの数を最小化する合理的なアプローチであり、スクリーニングされるべきクローニングの数を著しく減少させることによって、改良された形質を見出す能力を高めるべきである。このことは、抗体工学に適用され、具体的には、結合親和性を増大させ及び/又は解離を低下させる。該技術は、スクリーニング又は選択のいずれかと組み合わせることができる。

10

【0230】

遺伝子再構築は、複数の遺伝子に一度に、又は単一の遺伝子のキメラ（複数の突然変異）の大きなライブラリーを作製することに適用することのできるDNAシャッフリング法である（www.verenium.com/Pages/Technology/EnzymeTech/TechEnzyTGR.htmlにおけるワールドワイドウェブ）。典型的には本技術を、所望の改良のために表される配列空間を質問するために、超高処理量スクリーニングとの併用で使用する。本技術は、相同性とは無関係の複数の遺伝子組換えを可能にする。乗換え事象の実際の数及び位置は、生物情報学的分析を介して設計された断片を使用してあらかじめ決定することができる。本技術は、非常に高レベルの多様性をもたらし、親遺伝子の再形成を本質的に有さず、低レベルの不活性遺伝子を有する。GSSMと組み合わせると、大きな範囲の突然変異を、改良された活性について試験することができる。該方法は、DNAシャッフリングの「配合」及び「微調整」を可能にし、例えば、コドンの使用は最適化することができる。

20

【0231】

インシリコタンパク質設計自動化PDAは、特定の倍数を有する構造的に規定されたタンパク質骨格を固定し、かつ倍数及び全体的なタンパク質エネルギー性を安定化させることのできるアミノ酸置換のための配列空間を検索する、最適化アルゴリズムである（Hayes, R. J.、J. Bentzien、M. L. Ary、M. Y. Hwang、J. M. Jacinto、J. Vielmetter、A. Kundu、及びB. I. Dahiyatの文献「タンパク質特性の迅速な最適化のための計算的及び実験的スクリーニングの併用（Combining computational and experimental screening for rapid optimization of protein properties）」(Proc Natl Acad Sci U S. A 99: 15926-15931 (2002))）。本技術は、タンパク質アミノ酸変動に対する構造的耐性を検索するために、インシリコでの構造ベースのエントロピー予測を可能にする。統計的メカニクスを適用して、各位置におけるカップリング相互作用を算出し、アミノ酸置換に対する構造的耐性は、カップリングの尺度である。究極的には、本技術は、構造特徴の統合性を維持しながら、タンパク質特性の所望の修飾を生じるよう設計される。該方法は、非常に多数の起こり得る配列バリエント（ 10^{50} ）のフィルタリングを計算上評価し可能にする。試験するための配列バリエントの選択は、最も好ましい熱力学に基づいた予測と関連しており、安定性と連関した表面上は唯一の安定性又は特性を、本技術を用いて効果的に扱うことができる。該方法は、いくつかの治療用タンパク質において、特に免疫グロブリンを操作する上で、成功裏に使用してきた。インシリコの予測は、極端に多数の潜在的なバリエントを試験するのを回避する。既存の3次元構造に基づいた予測は、仮説上の構造に基づいた予測よりも成功しそうである。本技術は、複数の同時突然変異の標的指向化（targeted）スクリーニングを容易に予測及び可能にすることことができ、数の指數関数的増加により、純粹に実験的な技術を用いて可能ではないこともある。

30

【0232】

反復性飽和突然変異誘発（ISM）は、1) 構造 / 機能の知識を使用して、酵素の改良にありがちな部位を選択すること、2) Stratagene QuikChange（又は他の好適な手段）を使用して選択された部位における飽和突然変異誘発、3) 所望の特性についてのスクリーニング / 選択、4) 改良されたクローニングを用いて、別の部位及び持続した反復でやり直すことを含む（Reetz, M. T. 及び J. D. Carballalの文献「機能的酵素の迅速な定向進化

40

50

のための反復性飽和突然変異誘発 (ISM) (Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes)」(Nat. Protoc. 2: 891-903 (2007)) ; 並びにReetz, M. T.、J. D. Carballeira、及びA. Vogelの文献「タンパク質の熱安定性を増大させるための戦略としてのB因子の基礎の反復性飽和突然変異誘発 (Iterative saturation mutagenesis of the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability)」(Angew. Chem. Int. Ed Engl. 45: 7745-7751 (2006))。これは、所与の位置における起こり得るすべての置き換えが、スクリーニング / 選択についてなされることを保証する立証された方法論である。

【0233】

突然変異誘発のための上記の任意の方法は、単独で又は任意の組み合わせで使用することができる。加えて、定向の進化方法の任意の1つ又は組み合わせは、適応進化の技術とともに使用することができる。

10

【0234】

より良好な產生体を作出するために、代謝モデリングを利用して、増殖条件を最適化することができる。また、モデリングを使用して、経路の利用を追加的に最適化する遺伝子ノックアウトを設計することができる(例えば、米国特許公報US 2002 / 0012939、US 2003 / 0224363、US 2004 / 0029149、US 2004 / 0072723、US 2003 / 0059792、US 2002 / 0168654、及びUS 2004 / 0009466、並びに米国特許第7,127,379号を参照されたい。)。モデリング分析は、1,3-ブタンジオールのより効率的な產生の方へ代謝を移行させることが細胞増殖に及ぼす効果に関して、信頼性のある予測を可能にする。

20

【0235】

所望の生成物の生合成を助力する代謝的変更を同定及び設計するための1つの計算方法は、OptKnock計算フレームワークである(Burgardらの文献(Biotechnol. Bioeng. 84: 647-657 (2003)))。OptKnockは、標的生成物を過剰產生する遺伝的に安定した微生物を結果として生じる遺伝子欠失戦略を示唆する代謝モデリング及びシミュレーションプログラムである。具体的には、該フレームワークは、所望の生化学物質を細胞増殖の絶対的な副産物となることを余儀なくさせる遺伝的操作を示唆するために、微生物の完全な代謝的及び / 又は生化学的ネットワークを検討する。戦略的に配置された遺伝子欠失又は他の機能的遺伝子破壊を通じて、生化学的產生を細胞増殖と連関させることによって、バイオリアクターでの長期間後の該操作された株に課される増殖淘汰圧は、増殖と連関した強制的な生化学的產生の結果として、性能の向上をもたらす。最後に、遺伝子欠失が構築される場合、OptKnockにより選択される遺伝子がゲノムから完全に除去されるはずなので、該設計された株はその野生型状態に復帰するごくわずかな可能性がある。それゆえ、この計算方法論を使用して所望の生成物の生合成をもたらす代替経路を同定することができるか、又は所望の生成物の生合成の更なる最適化のために非天然微生物との関連で使用することができるかのいずれかである。

30

【0236】

簡潔にいうと、OptKnockは、細胞代謝をモデル化するための計算方法及びシステムを指すために本明細書において使用される用語である。OptKnockプログラムは、特定の制約を流動バランス分析 (FBA) モデルに組み込むモデル及び方法のフレームワークに関する。これらの制約には、例えば、質的な動力学的情報、質的な調節情報、及び / 又はDNAマイクロアレイ実験データを含む。また、OptKnockは、例えば、遺伝子の付加又は欠失の存在下で、流動バランスモデルに由来する流動境界を厳しくすること、及びその後代謝ネットワークの性能限界を探査することにより、種々の代謝的課題に対する解も計算する。OptKnock計算フレームワークは、代謝ネットワークの性能限界の有効な問い合わせを可能にするモデル考案の構築を可能にし、その結果としての混合整数線形プログラム課題を解決するための方法を提供する。本明細書においてOptKnockと称される代謝的なモデリング方法及びシミュレーション方法は、例えば、U.S. 2002 / 0168654、WO 2002 / 055995、及びU.S. 2009 / 0047719に説明されている。

40

【0237】

50

生成物の生合成産生を助力する代謝的変更を同定及び設計する別の計算方法は、SimPheny（登録商標）と称される代謝モデリング及びシミュレーションシステムである。この計算方法及びシステムは、2002年6月14日に出願のU.S. 2003 / 0233218、及びWO / 2003 / 106998に説明されている。SimPheny（登録商標）は、インシリコでネットワークモデルを作成し、かつ生物系の化学反応を介する質量、エネルギー又は電荷の流れを模倣して、計算システムにおける化学反応の任意の及び全ての起こり得る機能性を含む解空間を規定し、それにより該生物系に許容されるある範囲の活性を測定するために使用することのできるシステムである。本アプローチは、該解空間が、該包含される反応の公知の化学量論などの制約、並びに反応による最大流と関連する反応熱力学制約及び容量制約により規定されるので、制約系モデリングと呼ばれる。これらの制約により規定される空間は、該生物系の、又はその生化学成分の表現型の能力及び挙動を決定するために調べることができる。10

【0238】

生物系は柔軟で、かつ多くの異なる経路で同じ結果に到達することができるので、これらの計算的アプローチは生物学的実体と整合する。生物系は、全ての生体系が対面しなければならない根本的制約により制限された進化的機構により設計される。それゆえ、制約系モデリング戦略は、これら全般的実体を包含する。更に、制約の厳しさを介して更なる制限をネットワークモデルに連続的に課す能力は結果的に、該解空間のサイズの減少を生じ、これにより生理学的性能又は表現型を予測することのできる精度を高める。

【0239】

本明細書に提供される教示及びガイダンスを考慮すると、当業者は、種々の計算フレームワークを代謝モデリング及びシミュレーションに適用して、宿主微生物の所望の化合物の生合成を設計及び実施することができる。このような代謝モデリング方法及びシミュレーション方法には、例えば、SimPheny（登録商標）及びOptKnockとして先に例証される計算システムを含む。本発明の引例のために、いくつかの方法は、モデリング及びシミュレーションのためのOptKnock計算フレームワークに関して本明細書に説明される。当業者は、OptKnockを当該技術分野において周知の任意のそのような他の代謝モデリング及びシミュレーション計算フレームワークに対して使用する、代謝的変更の同定、設計及び実施の適用法を知っているであろう。

【0240】

先に説明した方法は、破壊するための1セットの代謝反応を提供する。該セットの範囲内の各反応の除去又は代謝的修飾は結果的に、該生物の増殖相の間の必須生成物として、所望の生成物を生じることができる。該反応は公知であるので、二層性のOptKnock課題への解はまた、該セットの反応内の各反応を触媒する1以上の酵素をコードする関連した遺伝子（gene）又は遺伝子（genes）も提供する。1セットの反応及び各反応に関与する酵素をコードする相応する該反応の遺伝子の同定は、一般的に、自動化されたプロセスであり、該反応と、酵素とコード遺伝子の関係を有する反応データベースとの相関を介して達成される。30

【0241】

一旦同定されると、所望の生成物の産生を達成するために破壊されるはずの該セットの反応は、該セット内の各代謝反応をコードする少なくとも1つの遺伝子の機能的な破壊により標的の細胞又は生物において行う。該反応セットの機能的な破壊を達成する1つの特に有用な手段は、各コード遺伝子の削除によるものである。しかしながら、いくつかの場合において、例えば、プロモーター若しくは調節因子のためのシス結合部位などの調節領域の突然変異、欠失を含む他の遺伝的異常により、又は任意のいくつかの位置でのコード配列の切り詰めにより該反応を破壊することは、有益であり得る。これらの後者の異常は、該遺伝子セットの決して全部ではない欠失を生じ、例えば、生成物の連関の迅速な評価が望まれる場合、又は遺伝的復帰があまり起こりそうにない場合に有用であり得る。40

【0242】

破壊するためのさらなるセットの反応をもたらす、又は所望の生成物の増殖と連関した生合成を含む生合成を結果的に生じることのできる代謝修飾をもたらす先に説明した二層

10

20

30

40

50

性のOptKnock課題に対する追加的な生産的解を同定するために、整数カットと称される最適化方法を行うことができる。本方法は、先に例証したOptKnock課題を、各反復での整数カットと称される追加的な制約の組み込みで反復して解くことにより進められる。整数カット制約は、解決手順が、生成物の生合成を増殖に強制的に連関させる任意の先行反復において同定される正確な同一セットの反応を選択することを効果的に防止する。例えば、既に同定された増殖連関代謝修飾が破壊のための反応1、2及び3を条件として指定する場合、以下の制約は、同じ反応が、その後の解において同時に考慮されるのを防止する。整数カット方法は、当該技術分野において周知であり、例えばBurgardらの文献 (Biotechnol. Prog. 17 : 791-797 (2001)) において説明されているのが認められ得る。代謝モデリング及びシミュレーションのためのOptKnock計算フレームワークと組み合わせた、本明細書に説明されるすべての方法の使用に関して、該方法と同様に、反復的な計算分析の冗長性を低減する整数カット法はまた、例えばSimPheny (登録商標) を含む当該技術分野において周知の他の計算フレームワークと共に適用することもできる。10

【0243】

本明細書に例証される方法は、標的生化学的生成物の产生と、同定された遺伝的変更を有するように操作された細胞又は生物の増殖との必須の連関を含む、所望の生成物を生合成的に产生する細胞及び生物の構築を可能にする。それゆえ、本明細書に説明される計算方法は、OptKnock又はSimPheny (登録商標) から選択されるインシリコ法により同定される代謝修飾の同定及び実施を可能にする。代謝修飾のセットには、例えば、1以上の生合成経路酵素の添加及び／又は例えば遺伝子欠失による破壊を含む1以上の代謝反応の機能的な破壊を含むことができる。20

【0244】

先に論議したように、OptKnock方法論は、長期の増殖選択に供する場合、変異体微生物ネットワークがそれらの計算的に予測された最高増殖の表現型の方へ進化することができるという前提で開発された。換言すれば、該アプローチは、選択圧の下で自己最適化する生物の能力を強化する。OptKnockフレームワークは、ネットワーク化学量論に基づく生化学的产生と細胞増殖の間の連関を余儀なくする遺伝子欠失の組み合わせの網羅的な列挙を可能にする。最適な遺伝子／反応ノックアウトの同定は、結果として生じるネットワークのための最適な増殖の解が、関心対象の生化学物質を過剰产生するように、活性のある反応のセットを選択する二層性の最適化課題の解を必要とする (Burgardらの文献 (Biotechnol. Bioeng. 84 : 647-657 (2003)))。30

【0245】

大腸菌代謝のインシリコ化学量論的モデルを採用して、既に例証されたように、並びに例えば、米国特許公報US 2002/0012939、US 2003 / 0224363、US 2004 / 0029149、US 2004 / 0072723、US 2003 / 0059792、US 2002 / 0168654及びUS 2004 / 0009466並びに米国特許第7,127,379号において説明されているように、代謝経路のための必須遺伝子を同定することができる。本明細書に開示するように、OptKnock数学的フレームワークは、所望の生成物の増殖連関产生をもたらすピンポイントでの遺伝子欠失に適用することができる。更に、二層性のOptKnock課題の解は、1セットの欠失のみを提供する。意味のあるすべての解、すなわち、増殖連関产生形成をもたらすノックアウトの全セットを列挙するために、整数カットと称される最適化技術を行うことができる。これは、先に論議したように、各反復における整数カットと称される追加的な制約の組み込みを用いてOptKnock課題を反復的に解くことを必要とする。40

【0246】

本発明の種々の実施態様の活性に実質的には影響を及ぼさない修飾も本明細書に提供される本発明の定義内に含まれることが理解される。したがって、以下の実施例は、本発明を説明するよう意図されており、限定するよう意図するものではない。

【実施例】

【0247】

(実施例1)

(アラニンを介した1,3-ブタンジオール合成)

本実施例は、工程A、B、C、D、及びHを介した図1におけるアラニン経路を用いた1,3-ブタンジオールを产生することのできる微生物の作出を説明する。

【0248】

大腸菌を標的生物として用い、図1に示される1,3-ブタンジオール产生経路を操作する。大腸菌は、1,3-ブタンジオールを产生することのできる非天然微生物を作出するための良好な宿主を提供する。大腸菌は、遺伝子操作に敏感に反応し、嫌気性条件又は微好気性条件の下で効果的に、エタノール、酢酸、ギ酸、乳酸、及びコハク酸のような種々の生成物を产生することができることが公知である。

【0249】

1,3-ブタンジオールを产生するよう操作された大腸菌株を作出するために、既に説明したようにアラニン経路において利用される該酵素をコードする核酸を、周知の分子生物学技術を用いて大腸菌において発現させる（例えば、Sambrookの文献（上述、2001）；Ausubelの文献（上述、1999）；Robertsらの文献（上述、1989））。

【0250】

特に、AKPチオラーゼ、AKPアミノトランスフェラーゼ、及び2,4-ジオキソペンタノアートデカルボキシラーゼの活性をそれぞれコードする`ortA`遺伝子（YP_001086914.1）、`ortB`遺伝子（YP_001086915.1）、`dat`遺伝子（P19938）、及び`pdc`遺伝子（P06672）を、PA1 / lacOプロモーターの下でpZE13ベクター（Expressys, Ruelzheim, Germany）へとクローニングする。加えて、3-オキソブチルアルデヒド還元酵素（アルデヒド還元）及び4-ヒドロキシ,2-ブタノン還元酵素をそれぞれコードする`yqhD`遺伝子（NP_417484.1）及び`adh`遺伝子（AAA23199.2）を、PA1 / lacOプロモーターの下でpZA33ベクター（Expressys, Ruelzheim, Germany）へとクローニングする。2セットのプラスミドを大腸菌株MG1655へと形質転換し、アラニン経路を介して1,3-ブタンジオール合成に必要なタンパク質及び酵素を発現させる。大腸菌が、D-アラニンを形成する能力を有することに留意されたい。

【0251】

結果として生じる遺伝子操作された生物を、当該技術分野で周知の手順に従って、グルコース含有培地において培養する（例えば、Sambrookらの文献（上述、2001）を参照されたい。）。アラニン経路遺伝子の発現は、例えば、ノーザンプロット法、mRNAのPCR増幅、免疫プロット法を含む、ポリペプチド発現又は酵素活性を決定するための当該技術分野で周知の方法を用いて確認される。発現した酵素の酵素活性は、個々の活性に特異的なアッセイを用いて確認される。1,3-ブタンジオールを产生するよう操作された大腸菌株の能力は、HPLC、ガスクロマトグラフィー・質量分析（GCMS）又は液体クロマトグラフィー・質量分析（LCMS）を用いて確認される。

【0252】

機能的な1,3-ブタンジオール合成経路を有するよう操作された微生物株は、該経路の効率的な利用のための最適化によってさらに増加する。簡潔には、操作された株を評価して、任意の外来性遺伝子が律速レベルで発現するかどうかを決定する。発現は、例えば追加的な遺伝子コピー数の導入によって経路を通じて流れを制限することのできる低レベルで発現した任意の酵素について増大する。

【0253】

より良好な產生体を作出するために、代謝モデリングを利用して、増殖条件を最適化する。また、モデリングを使用して、経路の利用を追加的に最適化する遺伝子ノックアウトを設計する（例えば、米国特許公報US 2002 / 0012939、US 2003 / 0224363、US 2004 / 0029149、US 2004 / 0072723、US 2003 / 0059792、US 2002 / 0168654、及びUS 2004 / 0009466、並びに米国特許第7,127,379号を参照されたい。）。モデリング分析は、1,3-ブタンジオールのより効率的な產生の方へ代謝を移行させることができ細胞増殖に及ぼす効果について、信頼性のある予測を可能にする。1つのモデリング法は、二層性最適化アプローチであるOptKnockであり（Burgardらの文献（Biotechnol. Bioengineer. 84 : 647-657 (2003)））、1,3-ブタンジオールのより良好な產生を集約的に結果として生じる遺伝子ノックア

10

20

30

40

50

ウトを選択するために適用される。また、適応進化を使用して、例えば、アラニン又は2-アミノ-4-オキソペンタノアート中間体又は1,3-ブタンジオール生成物のより良好な產生体を作出することができる。適応進化を実施して、増殖特徴及び產生特徴の両方を改良する (Fong及びPalssonの文献 (Nat. Genet. 36 : 1056-1058 (2004)) ; Alperらの文献 (Science 314 : 1565-1568 (2006)))。結果に基づいて、モデリング、遺伝子操作、及び適応進化のその後のラウンドを1,3-ブタンジオール產生体に適用して、產生をさらに増大させることができる。

【0254】

1,3-ブタンジオールの大規模產生のために、先のアラニン経路含有生物を、当該技術分野で公知の培地を用いて発酵槽において培養し、嫌気性条件下で該生物の増殖を支持する。発酵は、バッチ、供給バッチ、又は連續様式のいずれかで実施する。嫌気性条件は、まず培地に窒素を散布し、次に培養容器を封止することによって維持される (例えば、フラスコは、中隔及び圧着キャップを用いて封止することができる。)。また、微好気性条件は、限られた通気のための小開口を提供することによって利用することができる。培地のpHは、H₂SO₄などの酸の添加によって、7のpHに維持される。増殖速度は、分光光度計 (600nm) を用いて光学密度を測定することによって決定され、グルコース取り込み速度は、炭素源枯渇を経時的にモニターすることによって決定される。望ましくないアルコール、有機酸、及び残余のグルコースなどの副産物は、HPX 087カラム (BioRad) を備え、グルコース及びアルコールのために屈折率検出器を、有機酸のために紫外線検出器を用いるHPLC (Shimadzu) によって定量化することができる (Linらの文献 (Biotechnol. Bioeng., 775-779 (2005)))。

【0255】

(実施例11)

(アセトアセチル-CoAを中間体として使用する1,3-BDO合成)

本実施例は、アセトアセチル-CoAを前駆体として使用する1,3-ブタンジオールを產生することができる微生物の作出を説明する (図2における工程G、H、及びI)。

【0256】

大腸菌を標的生物として使用して、図2における工程G (アセトアセチル-CoAの3-ヒドロキシブチリル-CoAへの転換)、工程H (3-ヒドロキシブチリル-CoAの3-ヒドロキシブチルアルデヒドへの転換)、及び工程I (3-ヒドロキシブチルアルデヒドの1,3-ブタンジオールへの転換) を通じた経路を操作する。大腸菌は、1,3-ブタンジオールを產生することができる非天然微生物を作出するための良好な宿主を提供する。大腸菌は、遺伝子操作に敏感に反応し、嫌気性条件又は微好気性条件の下で効果的に、エタノール、酢酸、ギ酸、乳酸、及びコハク酸のような種々の生成物を提供することができるが公知である。

【0257】

1,3-ブタンジオールを產生するよう操作された大腸菌株を作出するために、既に説明したように、開示された経路 (工程G、工程H、及び工程I)において利用される酵素をコードする核酸を大腸菌において、周知の分子生物学技術を用いて発現させる (例えば、Sambrookの文献 (上述、2001) ; Ausubelの文献 (上述、1999) ; Robertsらの文献 (上述、1989) を参照されたい)。大腸菌が、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atoB (受入番号 : NP_416728.1) によってコードされる未変性チオラーゼを有することに留意されたい。

【0258】

さらに、アセトアセチル-CoA還元酵素 (ケトン還元) をコードするhbd (NP_349314.1) をPA1 / lacOプロモーターの下でpZE13ベクター (Expressys, Ruelzheim, Germany) へとクローニングする。プラスミドを、大腸菌株MG1655へと形質転換して、アセトアセチル-CoAを介した3-ヒドロキシブチリル-CoAの形成に必要とされる酵素を発現させる。また、3-ヒドロキシブチリル-CoAを3-ヒドロキシブチルアルデヒドへと転換するアルデヒド脱水素酵素 (下記の表Aから選択される。)、及び3-ヒドロキシブチルアルデヒドを1,3-BDOへとさらに還元するアルコール脱水素酵素 (下記の表Bから選択される。) は、PA1 / lacOプロ

10

20

30

40

50

モーターの下でpZE13ベクターへとクローニングされる。

【0259】

結果として遺伝子操作された生物を、当該技術分野で周知の手順に従って、グルコース含有培地において培養する（例えば、Sambrookらの文献（上述、2001）を参照されたい。）。該経路の遺伝子の発現は、例えば、ノーザンプロット法、mRNAのPCR増幅、免疫プロット法を含む、ポリペプチド発現又は酵素活性を決定するための当該技術分野で周知の方法を用いて確認される。発現した酵素の酵素活性は、個々の活性に特異的なアッセイを用いて確認される。操作された大腸菌株が1,3-ブタンジオールを産生する能力は、HPLC、ガスクロマトグラフィー 質量分析 (GCMS)、又は液体クロマトグラフィー 質量分析 (LC MS) を用いて確認される。

10

【0260】

機能的1,3-ブタンジオール合成経路を有するよう操作された微生物株は、該経路の効率的な利用のための最適化によってさらに増加する。簡潔には、操作された株を評価して、任意の外来性遺伝子が律速レベルで発現するかどうかを決定する。発現は、例えば追加的な遺伝子コピー数の導入によって該経路を通じた流れを制限することのできる低レベルで発現した任意の酵素について増大する。

【0261】

より良好な産生体を作出するために、代謝モデリングを利用して、増殖条件を最適化する。また、モデリングを使用して、前記経路の利用を追加的に最適化する遺伝子ノックアウトを設計する（例えば、米国特許公報US 2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US 2003/0059792、US 2002/0168654、及びUS 2004/0009466、並びに米国特許第7,127,379号を参照されたい。）。モデリング分析は、1,3-ブタンジオールのより効率的な産生の方へ代謝を移行させることが細胞増殖に及ぼす効果に関して、信頼性の高い予測を可能にする。1つのモデリング法は、二層性最適化アプローチである0 ptKnockであり（Burgardらの文献（Biotechnol. Bioengineer. 84 : 647-657 (2003)））、1,3-ブタンジオールのより良好な産生を集約的に結果として生じる遺伝子ノックアウトを選択するよう適用される。また、適応進化を使用して、例えばアセチル-CoA中間体又は1,3-ブタンジオール生成物のより良好な産生体を作出することができる。適応進化を実施して、増殖特徴及び産生特徴の両方を改良する（Fong及びPalssonの文献（Nat. Genet. 36 : 1056-1058 (2004)）；Alperらの文献（Science 314 : 1565-1568 (2006)））。本結果に基づいて、モデリング、遺伝子操作、及び適応進化のその後のラウンドを1,3-ブタンジオール産生体に適用して、産生をさらに増大させることができる。

20

【0262】

1,3-ブタンジオールの大規模な産生のために、組換え生物を、当該技術分野で公知の培地を用いて発酵槽において培養し、嫌気性条件下で生物の増殖を支持する。発酵は、バッチ、供給バッチ、又は連続様式のいずれかで実施される。嫌気性条件は、まず培地に窒素を散布した後、培養容器を封止することによって維持される（例えば、フラスコは、中隔又は圧着キャップを用いて封止することができる。）。また、微好気性条件は、限られた通気のための小開口を提供することによって利用することができる。培地のpHは、H₂SO₄などの酸の添加によって、7のpHに維持される。増殖速度は、分光光度計 (600nm) を用いて光学密度を測定することによって決定され、グルコース取り込み速度は、炭素源枯渇を経時にモニターすることによって決定される。望ましくないアルコール、有機酸、及び残余のグルコースなどの副産物は、HPX 087カラム (BioRad) を備え、グルコース及びアルコールのために屈折率検出器を、有機酸のために紫外線検出器を用いるHPLC (Shimadzu) によって定量化することができる（Linらの文献（Biotechnol. Bioeng., 90 : 775-779 (2005)））。

30

【0263】

いくつかのアルデヒド脱水素酵素を、3-ヒドロキシブチリル-CoAに関する活性について試験した。アルデヒド脱水素酵素をコードする下記の表Aに列挙された6つの遺伝子のうちの1つを各株が保有する細菌の粗溶解液を、3-ヒドロキシブチリル-CoAに関する活性につ

40

50

いて、CoA部分の放出を測定することによって試験した。試験しあつ3-HBCoAに関して有意な活性を有することが認められた遺伝子は、以下の受入番号及びGI番号を有するタンパク質をコードする：

【表38】

表A

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>bld</i>	AAP42563.1	31075383	クロストリジウム・ サッカロペーブチルアセトニカム
<i>ald</i>	ACL06658.1	218764192	デスルファチバシラム・ アルケニボランスAK-01
<i>ald</i>	YP_001452373	157145054	シトロバクター・コセリ ATCC BAA-895
<i>pduP</i>	NP_460996.1	16765381	サルモネラ・エンテリカチフィリウム
<i>pduP</i>	ABJ64680.1	116099531	ラクトバチルス・プレビス ATCC 367
BselDRAFT_1651	ZP_02169447	163762382	バチルス・ セレニチレデュセンス MLS10

【0264】

可溶化液における背景活性を補正するために、測定された活性をALD遺伝子を有さないネガティブコントロール（ベクターのみ、「Vo」）と比較した。図4は、3-ヒドロキシブチリル-CoAに関する試験した各遺伝子の比活性を示す。遺伝子IDをx軸上に示す。

【0265】

さらに、*bld* (GenBank ID : AAP42563.1、GI番号 : 31075383) も、3-HBCoAに関する活性について試験した。以下の図5は、透析前後の3-ヒドロキシブチリル-CoAに関する遺伝子の活性を示す。

【0266】

3-ヒドロキシブチルアルデヒドに関する活性について試験し、有意な活性を有することが示されたアルコール脱水素酵素を以下に列挙する。

【表39】

表B

タンパク質	GenBank ID	GI番号	生物
<i>Bdh (Cbei_2181)</i>	YP_001309304	150017050	クロストリジウム・ベイジェリンキ
<i>Bdh (Cbei_1722)</i>	YP_001309535.1	150016596	クロストリジウム・ベイジェリンキ
<i>Bdh (Cbei_2421)</i>	YP_001309535.1	150017281	クロストリジウム・ベイジェリンキ

【0267】

以下のプロトコールを使用して、アルコール脱水素酵素活性（すなわち、3-ヒドロキシブチルアルデヒドの1,3-BDOへの転換）、並びに組み合わされたアルデヒド及びアルコール脱水素酵素活性（すなわち、3-ヒドロキシブチリル-CoAの1,3-BDOへの転換）を示した

10

20

30

40

50

。

【0268】

化学的に形質転換受容性のある細胞をアルデヒド脱水素酵素又はアルコール脱水素酵素のいずれかを含むプラスミドを用いて形質転換した（先の表A及び表Bに列挙されている。）。プレートからコロニーをつつき、LB + 100 μ g / mLのカルベネシリンにおいて一晩増殖させた後、0.6mLを用いて、各アルコール脱水素酵素の60mL培養物に接種し、又は1.5mLを用いて、各アルデヒド脱水素酵素の500mL培養物に接種した。細胞を～0.7の光学密度まで37℃で増殖させ、IPTGを用いて誘導した。培養物を30℃で4時間のタンパク質発現の間、インキュベートした。細胞培養物を30mLの一定分量に分け、遠心分離し、細胞ペレットを-80℃で保存した。細胞培養物の試料を用いて、最終細胞密度を概算した。

10

【0269】

アルコール脱水素酵素及びアルデヒド脱水素酵素の組み合わせを、3-ヒドロキシブチリル-CoAを基質+対照（基質なし）として用いる96ウェルプレートフォーマットにおいてスクリーニングした。あるいは、アルコール脱水素酵素活性を試験するために、アルコール脱水素酵素のみを基質3-ヒドロキシブチルアルデヒドとともに及びなしで添加した。細胞可溶化液の調製を、冷温室（4℃）において氷上で実施した。最終的な細胞密度を使用して、各細胞ペレットについてBug Buster細胞溶解試薬の量を算出した。リゾチーム（10 μ L）及びベンゾナーゼ（benzonase）（10 μ L）を35mLのバグバスター（bugbuster）へと加え、穏やかに転倒混和した。まず、50 μ Lのジチオトレイイトール（100mMストック）をペレットに添加し、次に、0.5mL / (600nmにおける) 1.0の光学密度のBug Buster + 酵素混合物を細胞ペレットに添加し、穏やかに混合して再懸濁した。

20

【0270】

各ウェルに、50 μ Lの1M MOPS（pH = 7.5）及び25 μ Lの共因子混合物（4mM NADH及び4mM NADPH）、100 μ Lアルデヒド脱水素酵素細胞可溶化液、150 μ Lのアルコール脱水素酵素細胞可溶化液の両方、又は150 μ Lのアルコール脱水素酵素細胞可溶化液のみを添加し、穏やかに混合した。次に、関連する基質をウェルに添加した。25mgの3-ヒドロキシブチリルCoAを250 μ Lの水に再懸濁し、5 μ Lを、終濃度1.8mMについてのアルコール及びアルデヒド脱水素酵素活性について試験する各ウェルに添加した。アルコール脱水素酵素活性のみを試験するために、50 μ Lの3-ヒドロキシブチルアルデヒド（0.6mLアセトアルデヒド含有5mL水を触媒塩基（1ペレットのNaOH）と混合することによって調製した。）（Guthrie, J. P. -（引用文献添付））を各ウェルに添加した。各ウェルにおける3-ヒドロキシブチルアルデヒドの終濃度はおよそ50mMであった。96深底ウェルプレートをプラスチックPCRシールで封止し、30℃での振盪で一晩インキュベートした（合計18時間）。インキュベーション時間中にタンパク質及び細胞片が形成するので、プレートを4500 × gで10分間遠心分離し、上清をWhatman96ウェルフィルタープレート（0.45 μ m）で濾過した後、LC-MS分析した。試料を1,3-ブタンジオール形成のために分析した。

30

【0271】

図6は、3-ヒドロキシブチルアルデヒドを基質として添加し、対照試料において基質を有さない場合の1,3-BDO濃度を示す。アルコール脱水素酵素についてのGI番号を示す。

40

【0272】

図7は、3-ヒドロキシブチリル-CoAを基質として添加し、対照試料において基質を有さない場合の1,3-BDO濃度を示す。アルコール脱水素酵素についてのGI番号を示す。関連して試験したアルデヒド脱水素酵素についてのGI番号は、163762382である。

【0273】

（実施例III）

（4-ヒドロキシブチリル-CoAを中間体として使用する1,3-BDO合成）

本実施例は、4-ヒドロキシブチリル-CoAを前駆体として使用して1,3-ブタンジオールを产生することのできる微生物の作出を説明する（図3における工程A、工程B、及び工程E）。

【0274】

50

大腸菌を標的生物として使用し、図3における工程A、工程B、及び工程Eを通じた経路を操作する。大腸菌は、1,3-ブタンジオールを産生することのできる非天然微生物を作出するための良好な宿主を提供する。大腸菌は、遺伝子操作に敏感に反応し、嫌気性条件又は微好気性条件の下で効果的に、エタノール、酢酸、ギ酸、乳酸、及びコハク酸のような種々の生成物を産生することができる事が公知である。

【0275】

1,3-ブタンジオールを産生するよう操作された大腸菌株を作出するために、既に説明したように開示された経路（工程A、工程B、及び工程E）において利用される該酵素をコードする核酸を、周知の分子生物学技術を用いて大腸菌において発現させる（例えば、Sambrookの文献（上述、2001）；Ausubelの文献（上述、1999）；Robertsらの文献（上述、1989））。有意な量の4-ヒドロキシブチリル-CoAを産生するよう操作された組換え株は、出願者によって既に説明されており（Burkらの文献（US20090075351））、提案された経路を1,3-ブタンジオールに挿入するために使用されるであろう。

10

【0276】

さらに、4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロターゼ、クロトナーゼ、及び3-ヒドロキシブチリル-CoA還元酵素（アルコール形成）の活性をそれぞれコードするabfD遺伝子（YP_3001396399.1）、crt遺伝子（NP_349318.1）、及びadhE2（AAK09379.1）を、PA1 / lacOプロモーターの下でpZE13ベクター（Expressys, Ruelzheim, Germany）へとクローニングする。プラスミドを、4-ヒドロキシブチリル-CoAを産生する組換え大腸菌株へと形質転換し、この代謝産物からの1,3-ブタンジオール合成に必要なタンパク質及び酵素を発現させる。

20

【0277】

結果として生じる遺伝子操作された生物を、当該技術分野で周知の手順に従ってグルコース含有培地において培養する（例えば、Sambrookらの文献（上述、2001）を参照されたい。）。該経路遺伝子の発現は、例えば、ノーザンプロット法、mRNAのPCR増幅、免疫プロッティングを含む、ポリペプチド発現又は酵素活性を決定するための当該技術分野で周知の方法を用いて確認される。発現した酵素の酵素活性を、個々の活性に特異的なアッセイを用いて確認する。操作された大腸菌株が1,3-ブタンジオールを産生する能力は、HPLC、ガスクロマトグラフィー 質量分析（GCMS）、又は液体クロマトグラフィー 質量分析（LCMS）を用いて確認される。

30

【0278】

機能的1,3-ブタンジオール合成経路を有するよう操作された微生物株はさらに、該経路の効率的な利用のための最適化によって増加する。簡潔には、操作された株を評価して、任意の外来性遺伝子を律速レベルで発現するかどうかを決定する。発現は、例えば、追加的な遺伝子コピー数の導入によって該経路を通じて流れを制限することのできる低レベルで発現した任意の酵素について増大する。

【0279】

より良好な産生体を作出するために、代謝モデリングを利用して、増殖条件を最適化する。また、モデリングを使用して、経路の利用を追加的に最適化する遺伝子ノックアウトを設計する（例えば、米国特許公報US 2002 / 0012939、US 2003 / 0224363、US 2004 / 0029149、US 2004 / 0072723、US 2003 / 0059792、US 2002 / 0168654、及びUS 2004 / 0009466、並びに米国特許第7,127,379号を参照されたい。）。モデリング分析は、1,3-ブタンジオールのより効率的な産生の方へ代謝を移行させることが細胞増殖に及ぼす効果に関して、信頼性のある予測を可能にする。1つのモデリング法は、二層性最適化アプローチであるOptKnockであり（Burgardらの文献（Biotechnol. Bioengineer. 84 : 647-657 (2003)））、1,3-ブタンジオールのより良好な産生を集約的に結果として生じる遺伝子ノックアウトを選択するために適用される。また、適応進化を使用して、例えば、アセチル-CoA中間体又は1,3-ブタンジオール生成物のより良好な産生体を作出することができる。適応進化を実施して、増殖特徴及び産生特徴の両方を改良する（Fong及びPalssonの文献（Nat. Genet. 36 : 1056-1058 (2004)）；Alperらの文献（Science 314 : 1565-1568 (2006)））。

40

50

)。結果に基づいて、モデリング、遺伝子操作、及び適応進化のその後のラウンドを1,3-ブタンジオール産生体に適用して、産生をさらに増大させることができる。

【0280】

1,3-ブタンジオールの大規模産生のために、組換え生物を、当該技術分野で公知の培地を用いて発酵槽において培養し、嫌気性条件下で該生物の増殖を支持する。発酵は、バッチ、供給バッチ、又は連続様式のいずれかで実施する。嫌気性条件は、まず培地に窒素を散布し、次に培養容器を封止することによって維持される(例えば、フラスコは、中隔及び圧着キャップを用いて封止することができる。)。また、微好気性条件は、限られた通気のための小開口を提供することによって利用することができる。培地のpHは、 H_2SO_4 などの酸の添加によって、7のpHに維持される。増殖速度は、分光光度計(600nm)を用いて光学密度を測定することによって決定され、グルコース取り込み速度は、炭素源枯渇を経時にモニターすることによって決定される。望ましくないアルコール、有機酸、及び残余のグルコースなどの副産物は、HPX 087カラム(BioRad)を備え、グルコース及びアルコールのために屈折率検出器を、有機酸のために紫外線検出器を用いるHPLC(Shimadzu)によって定量化することができる(Linらの文献(Biotechnol. Bioeng., 775-779(2005))。

【表40】

工程	EC クラス	所望の基質 生成物	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名 (入手可能な場合)	GenBank ID	生物	公知の基質
A	2.3.1.b	D-アラニン	2-アミノ-4- オキソペントナノアート	AKPチオラーゼ	<i>ortA</i>	YP_001086914.1	クロストリジクム・ ディフィシル630	D-アラニン
					<i>ortB</i>	YP_001086915.1	クロストリジクム・ ディフィシル630	D-アラニン
					<i>Amet_2368</i>	YP_001320181.1	アルカリフィラス・ メタルリジデンス <i>QOF</i>	D-アラニン
					<i>Amet_2369</i>	YP_001320182.1	アルカリフィラス・ メタルリジデンス <i>QOF</i>	D-アラニン
					<i>Teth514_1478</i>	YP_001663101.1	サモアナエロ バクター種X514	D-アラニン
					<i>Teth514_1479</i>	YP_001663102.1	サモアナエロ バクター種X514	D-アラニン
B	2.6.1.a	2-アミノ-4- オキソペントナノアート	2,4-オキソペントナノア- ート 2-アミノ-4- オキソペントナノアート アミノトランスクエラ ーゼ又は酸化還元酵素 (脱アミノ化)	<i>aspC</i>	NP_415448.1	大腸菌	L-アスパラギン酸	
					<i>avtA</i>	YP_026231.1	大腸菌	L-アラニン、L-バリン
					<i>AAT2</i>	P23542.3	H ₄ 芽酵母	L-アスパラギン酸
					<i>dat</i>	P19938	バチルス種YM-1	D-アラニン、D-2- アミノブタノアート、 D-アスパラギン酸
					<i>dat</i>	Q07597	バチルス・スブチリス	D-アラニン、D-2- アミノブタノアート、 D-アスパラギン酸
					<i>ldh</i>	P0A393	バチルス・セレウス	L-ロイシン、L-バリン、 2-アミノブタノアート、 L-イソロイシン
					<i>nadX</i>	NP_229443.1	サーモトガ・ マリティマ	L-アスパラギン酸

表36 (引用:図1)

工程	EC クラス	所望の基質	生成物	所望の 酵素名	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
C	4.1.1.a	2,4-ジオキソベンタノ アート	3-オキソブタナル (3-oxobutanal)	2,4-ジオキソベンタノア ートデカルボキシラーゼ	<i>pdc</i>	P06672.1	ザイモモナス・ モビリス	2-ケトブチラート	
				<i>pdcI</i>	P06169	出芽酵母	2-ケトブチラート、3- ヒドロキシビルビン酸		
				<i>mdlC</i>	P20906.2	チダ菌	2-ケトブチラート		
D	1.1.1.a	3-オキソブチルアルデ ヒド	4-ヒドロキシ-2- ブタノン (アルデヒド還元)	3-オキソブチルアルデ ヒド還元酵素	<i>alrA</i>	BAB12273.1	糸核菌 M-1株	アルファ-ケトグルタル酸	C2-C14アルデヒド
				<i>ADH2</i>	NP_014032.1	出芽酵母	プロピオンアルデヒド、 イソブチルアルデヒド、 ブチルアルデヒド、2- メチルブチルアルデヒド、 3-メチルブチルアルデヒ ド、2-フェニルアルゼト アルデヒド		
				<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大腸菌	アセトアルデヒド、 マロンジアルデヒド、 プロパンジアルデヒド、 ブタジアルデヒド、及び アクロレイン		
				<i>bdh I</i>	NP_349892.1	クロストリジクム・ アセトブチリカム	ブチルアルデヒド		
				<i>bdh II</i>	NP_349891.1	クロストリジクム・ アセトブチリカム	ブチルアルデヒド		
				<i>4hbd</i>	YP_726053.1	ラルストニア・ユートロ ファHI6	コハク酸 セミアルデヒド		
				<i>ADHII</i>	AAR91477.1	ゲオバチルス・ サーモ- グルコシダシウス <i>M10EXG</i>	エタノール、1-ブタノール、 1-ベンゾタノール、1- ヘプタノール、1-オクタノール、 2-ブロペノール		

工程	EC クラス	所望の基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
				<i>mmsb</i>	P28811.1	縫膜菌		3-ヒドロキシブチルアルデヒド、マロン酸セミアルデヒド、メチルマロン酸セミアルデヒド

工程	EC クラス	所望の基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
E	4.1.1.a	2-アミノ-4-オキソペンタノアート	4-アミノブタン-2-オン	<i>lysA</i>	NP_417315.1	大腸菌		メゾ-ジアミノピメリン酸
			2-アミノブタン-2-オキソペンタノアート	<i>lysA</i>	AAA25361.1	結核菌		メゾ-ジアミノピメリン酸
				<i>lysA</i>	BAC92756.1	メチロフィルス・メチロトロファス		メゾ-ジアミノピメリン酸
				<i>odcI</i>	AA59967.1	ヒト	D-オルニチン	
				<i>panD</i>	P0A790	大腸菌	L-アスパラギン酸	
				<i>panD</i>	Q9X4N0	コリネバクテリウム・グルタミクム (<i>glutamicum</i>)	L-アスパラギン酸	
				<i>panD</i>	P65660	結核菌	L-アスパラギン酸	
F	4.3.1.a	4アミノブタン-2-オン	ブテノン	<i>aspA</i>	NP_418562	大腸菌 K12 重解 MG1655	L-アスパラギン酸	
		4-アミノブタン-2-オン アンモニアリーゼ		<i>aspA</i>	P44324.1	インフルエンザ菌	L-アスパラギン酸	

表36 (引用:図1)

工程	EC クラス	所望の基質 生成物	所望の 酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
				<i>aspA</i>	P07346.1	蛍光菌	L-アスパラギン酸
				<i>ansB</i>	P26889.1	バチルス・スピリス	L-アスパラギン酸
				<i>aspA</i>	P33109.1	蠶青	L-アスパラギン酸
G 4.2.1.a	ブテノン 4-ヒドロキシ-2-ブタノン	ブテノンヒドロラーゼ	<i>fumA</i>	P0AC33	大腸菌 K12	フマル酸	
			<i>fumC</i>	P05042	大腸菌 K12	フマル酸	
			<i>fumC</i>	O69294	カンピロバクター・ ジエジュニ	フマル酸	
			<i>fumC</i>	P84127	サーマス・ サーモフィラス	フマル酸	
			<i>fumH</i>	P14408	ラット	フマル酸	
			<i>hmd</i>	ABC88407.1	ユーバクテリウム・ バルケリ	2-メチレン- グルタル酸	
			<i>dmdA</i>	ABC88408	ユーバクテリウム・ バルケリ	ジメチルマレイン酸	
			<i>dmdB</i>	ABC88409.1	ユーバクテリウム・ バルケリ	ジメチルマレイン酸	
H 1.1.1.a	4-ヒドロキシ-2-ブタノン 1,3-ブタンジオール	4-ヒドロキシ-2-ブタノン還元酵素	<i>bdh</i>	AAA38352.1	ヒト	3-オキソブチラート	
			<i>adh</i>	AAA23199.2	クロストリジウム・ ベイジエリンキNRRL B593	アセトン	
			<i>adhA</i>	AAC25556	バイロコッカス・ ブリオサス	2-ペンタナオール、 ビルアルデヒド	
			<i>ldh</i>	YP_725182.1	ラルストニア・ ユートロファ	乳酸、2- オキソブチラート、 2-オキソペントノアート 、2-オキソグルタート	
			<i>adh</i>	P14941.1	サーモアナエロバクタ ー・プロッキーHTD4	アセトン	

表36 (引用:図1)

工程	EC クラス	所望の基質 生成物	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
I	4.3.1.a	2-アミノ-4-オキソベンタノアート	アセチルアクリラート	2-アミノ-4-オキソベンタノアート アンモニアアーゼ	<i>aspA</i>	NP_418562 KJ12 重複 MG1655	大腸菌	L-アスパラギン酸
					<i>aspA</i>	P44324.1	インフルエンザ菌	L-アスパラギン酸
					<i>aspA</i>	P07346.1	萤光菌	L-アスパラギン酸
					<i>ansB</i>	P26899.1	バチルス・スピチリス	L-アスパラギン酸
					<i>aspA</i>	P33109.1	靈芝菌	L-アスパラギン酸
J	4.1.1.a	アセチルアクリラート デカルボキシラーゼ	アセチルアクリラート ブチノン	アセチルアクリラート デカルボキシラーゼ	<i>xyII</i>	YP_709328.1	ブチダ菌	4-オキサロクロトナート
					<i>xyIII</i>	YP_709353.1	ブチダ菌	4-オキサロクロトナート
					<i>dmpH</i>	CAA43228.1 CF600	ショードモナス種	4-オキサロクロトナート
					<i>dmpE</i>	CAA43225.1 CF600	ショードモナス種	4-オキサロクロトナート
					<i>pdc</i>	U63827	ラクトバチルス・ ブランタルム	シナマート及び 誘導体
					<i>pad</i>	AB330293	クレブジエラ・ オキシトカ	シナマート及び 誘導体
K	2.6.1.a	4-アミノブタン-2-オノ (β -oxobutanal)	3-オキソブタナル	4-アミノブタン-2-オノ アミノトランスフェラー セ又は酸化還元酵素 (脱アミノ化)	<i>SkyPYD4</i>	ABF58893	サツカロミセス・ クライベリ	ベータ-アラニン
					<i>gabT</i>	P22256	大腸菌	4-アミノブチラート
					<i>Abat</i>	P5054	ラット	3-アミノ-2- メチルプロピオナート
					<i>UGA1</i>	NP_011533	出游解母	4-アミノブチラート
					<i>kdd</i>	AAL93966.1	フソバクテリウム・	3,5-

表36 (引用:図1)

工程	EC クラス	所望の基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
							ヌクレアタム	ジアミノヘキサノアート
L	1.1.1.a	2-アミノ-4-オキソペニタノアート	2-アミノ-4-ヒドロキシペニタノアート 脱水素酵素	<i>lysDH</i>	<i>BAB39707</i>	ゲオバチルス・ステアロサモフィルス	L-リシン	
				<i>thrA</i>	<i>AAC73113</i>	大腸菌	アスパラギン酸 セミアルデヒド	
				<i>hom6</i>	<i>CAA89671</i>	出芽酵母	アスパラギン酸 セミアルデヒド	
				<i>hom2</i>	<i>CAD63186</i>	ラクトバチルス・ プランタルム	アスパラギン酸 セミアルデヒド	
				<i>akthr2</i>	<i>O81852</i>	シロイヌナズナ	アスパラギン酸 セミアルデヒド	
				<i>hom1</i>	<i>CAD64819</i>	ラクトバチルス・ プランタルム	アスパラギン酸 セミアルデヒド	
M	2.6.1.a	2-アミノ-4-ヒドロキシペニタノアート	2-オキソ-4-ヒドロキシペニタノアートアミノトランスクエラーゼ又は (脱アミノ化)	<i>aspC</i>	<i>NP_415448.1</i>	大腸菌	L-アスパラギン酸	
				<i>avtA</i>	<i>YP_026231.1</i>	大腸菌	L-アラニン、L-バリン	
				<i>AAT2</i>	<i>P23542.3</i>	出芽酵母	L-アスパラギン酸	
				<i>dat</i>	<i>P19938</i>	バチルス種 YM-1	D-アラニン、 D-2-アミノブタノアート、 D-アスパラギン酸	
				<i>dat</i>	<i>Q07597</i>	バチルス・スブチリス	D-アラニン、 D-2-アミノブタノアート、 D-アスパラギン酸	
				<i>ldh</i>	<i>P0A393</i>	バチルス・セレウス	L-ロイシン、L-バリン、 2-アミノブタノアート、 L-イソロイシン	
				<i>nadX</i>	<i>NP_229443.1</i>	サーモトガ・ マリティマ	L-アスパラギン酸	

表36(引用:図1)

工程	EC クラス	所望の基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
N	4.1.1.a	2-オキソ-4-ヒドロキシ ベンタノアート	3-ヒドロキシブタナル	2-オキソ-4-ヒドロキシ ベンタノアート	<i>pdc</i>	P06672.1	ザイモモナス・ モビリス	2-ケトブチラート
					<i>pdcI</i>	P06169	出芽酵母	2-ケトブチラート、 3-ヒドロキシビルビン酸
					<i>mdlC</i>	P20906.2	ブチダ菌	2-ケトブチラート
O	1.1.1.a	3-オキソブチアルデヒド	3-ヒドロキシブチアルデヒド還元酵素(ケトン還元)	3-オキソブチアルデヒド	<i>bdh</i>	O50463.4	結核菌	アルファ-ケトグルタル酸
					<i>adh</i>	AAA58352.1	ヒト	3-オキソブチラート
					<i>adh</i>	AAA23199.2	クロストリジウム・ ベイジエリシキ NRRL B593	アセトン
					<i>adhA</i>	AAC25556	ペイロコッカス・ フリオサス	2-ペンタナオール、 ビルアルデヒド
					<i>ldh</i>	YP_725182.1	ラルストニア・ ユートロファ	乳酸、2-オキソペンタノア ート、2-オキソグルタル 酸
					<i>adh</i>	P14941.1	サーモアナエロバクタ ー・ブロッキー HTD4	アセトン
P	1.1.1.a	3-ヒドロキシブチアルデヒド	1,3-ブタンジオール	3-ヒドロキシブチアルデヒド還元酵素	<i>alrA</i>	BAB12273.1	アシネットバクター種 M-1株	C2-C14アルデヒド
					<i>ADH2</i>	NP_014032.1	出芽酵母	プロピオンアルデヒド、 イソブチルアルデヒド、 ブチアルデヒド、2- メチルブチルアルデヒド、 3-メチルブチルアルデヒ ド、2-フェニルアルセト アルデヒド

表36(引用:図1)

工程	EC クラス	所望の基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
				<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大腸菌		
							アセトアルデヒド、 マロンジアルデヒド、 プロパンアルデヒド、 ブタンアルデヒド、及び アクロレイン	
				<i>bdh I</i>	NP_349892.1	クロストリジウム・ アセトアクリカム	ブチルアルデヒド	
				<i>bdh II</i>	NP_349891.1	クロストリジウム・ アセトアクリカム	ブチルアルデヒド	
				<i>4hbd</i>	YP_726053.1	ラルストニア・ ユートロファ <i>H16</i>	コハク酸	セミアルデヒド
				<i>ADHII</i>	AAR91477.1	ゲオバチルス・サーム グルコシダシウス <i>M10EXG</i>	エタノール、1-ブタノール、 1-ペントノール、 1-ヘキサノール、1-オクタノール、 2-ブロバノール	
				<i>mmsb</i>	P28811.1	緑膿菌	3-ヒドロキシブチルアル デヒド、マロン酸セミア ルデヒド、メチルマロン 酸セミアルデヒド	
					P84067	サーマス・ サーモフィラス	メチルマロン酸 セミアルデヒド	

【表41】

工程	EC クラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
A	1.2.1.b	アセトアセチル-CoA	3-オキソアチルアルデヒド	アセトアセチル-CoA還元酵素 (アルデヒド形成)	<i>Ald</i>	AAT66436	クロストリジウム・ ベイジエリニキ	ブチリル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ポルフィロモナス・ ジンジバリス	スクシニル-CoA
					<i>bphG</i>	BAA03892.1	シェードモナス種	アセトアルデヒド、 プロピオンアルデヒド、 ブチルアルデヒド、 イソブチルアルデヒド、 及びホルムアルデヒド
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ・ セデュラ	マロニル-CoA
					<i>mcr</i>	NP_378167	スルホブス・ トコダイ	マロニルマロニル- CoA
B	1.1.1.a	3-オキソアチル- アルデヒド	3- ヒドロキシアチルアルデヒド	3-オキソアチル- アルデヒド 還元酵素 (ケトン 還元)	<i>bdh</i>	AAA58352.1	ヒト	3-オキソブチラート
					<i>adh</i>	AAA23199.2	クロストリジウム・ ベイジエリニキ	アセトン
					<i>adhA</i>	AAC25556	ハイロコッカス・ ブリオサス	2-ペンタナオール、 ビルファルデヒド
					<i>ldh</i>	YP_725182.1	ラルストニア・ エートロファ	乳酸、2- オキソブチラート、2- オキソベンタノアート、 2-オキソグルタル酸
					<i>adh</i>	P14941.1	サーモアエロ- バクター・ブロッキー	アセトン
						HTD4		

表37 (引用:図2)

工程	EC クラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
C	1.1.1.a	3-ヒドロキシフルカルデヒド	1,3-ブタンジオール 還元酵素	3-ヒドロキシ- フルカルデヒド 還元酵素	<i>alrA</i>	BAB12273.1	アシネットバクター種 M-1株	C2-C14アルデヒド
					<i>ADH2</i>	NP_014032.1	出芽酵母	プロピオンアルデヒド、 イソブチルアルデヒド、 ブチルアルデヒド、 2-メチルブチル- アルデヒド、3-メチル ブチルアルデヒド、 2-フェニルアセト- アルデヒド
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大腸菌	アセトアルデヒド、 マロンジアルデヒド、 プロパンアルデヒド、 ブタンアルデヒド、 及びアクロレイン
					<i>bdh I</i>	NP_349892.1	クロストリジウム・ アセトアクリカム	ブチルアルデヒド
					<i>bdh II</i>	NP_349891.1	クロストリジウム・ アセトアクリカム	ブチルアルデヒド
					<i>4hbd</i>	YP_726053.1	ラルストニア・ ユートロファ <i>H16</i>	コハク酸 セミアルデヒド
					<i>ADHII</i>	AAR91477.1	デオバチルス・ サーモケルコシダシ ウス <i>M10EXG</i>	エタノール、1-ブタノール、 1-ペンタノール、 1-ヘキサノール、 1-キサノール、 1-オクタノール、 2-ブロバノール
					<i>mnsb</i>	P28811.1	緑膿菌	3-ヒドロキシフルカルデヒド、マロン酸 セミアルデヒド、 メチルマロン酸 セミアルデヒド

表37(引用:図2)

工程	EC クラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
D	1.1.1.c	アセトアセチル-CoA	4-ヒドロキシ-2-ブタノン CoA還元酵素 (アルコール 形成)	アセトアセチル- CoA還元酵素 (アルコール 形成)	<i>adhE2</i>	P84067	サーマス・ サーモフィラス	メチルマロン酸 セミアルデヒド
						AAK09379.1	クロストリジウム・ アセトアセチルカム	ブタノイル-CoA
				<i>mcr</i>		AAAS20429.1	クロロフレクサス・ アウランティアクス	マロニル-CoA
				<i>FAR</i>		AAD38039.1	ホホバ	長鎖アルケン CoA
E	1.1.1.a	3-オキソブチル- アルデヒド	4-ヒドロキシ-2-ブタノン アルデヒド 還元酵素 (アルデヒド 還元)	3-オキソブチル アルデヒド 還元酵素 (アルデヒド 還元)	<i>alrA</i>	BAB12273.1	アシネトバクタ-種 <i>M-1</i> 株	C2-C14アルデヒド
				<i>ADH2</i>		NP_014032.1	<i>Hf</i> 芽孢母	プロピオンアルデヒド、 イソブチルアルデヒド、 ブチルアルデヒド、2- メチルブチルアルデヒ ド、3-メチルブチル アルデヒド、2- フェニルアセト アルデヒド
				<i>yqhD</i>		NP_417484.1	大腸菌	アセトアルデヒド、 マロニジアルデヒド、 プロパンアルデヒド、 ブタシンアルデヒド、 及びアクロレイン
				<i>bdh I</i>		NP_349892.1	クロストリジウム・ アセトアセチルカム	ブチルアルデヒド
				<i>bdh II</i>		NP_349891.1	クロストリジウム・ アセトアセチルカム	ブチルアルデヒド

表37 (引用:図2)

工程	EC クラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
				<i>4hbd</i>	YP_726053.1	ラルストニア・ ユートロファ <i>H16</i>	コハク酸 セミアルデヒド	
				<i>ADH</i>	AAR91477.1	ゲオバチルス・ サーモグルコシダニ ウス <i>MI0EXG</i>	エタノール、1-ブタノ ール、1-ベンタノール、 1-ヘキサノール、1-オクタ ノール、2-ブロバノール	
				<i>mmsb</i>	P28811.1	緑膿菌	3-ヒドロキシブチル アルデヒド、 マロン酸 セミアルデヒド、 メチルマロン酸 セミアルデヒド	
				<i>P84067</i>	P84067	サーマス・ サーモフィラス	メチルマロン酸 セミアルデヒド	
F	1.1.1.a	4-ヒドロキシ、 2-ブタノン	1,3-ブタジオール	<i>bdh</i>	AAA58352.1	ヒト	3-オキソアシテート	
			4-ヒドロキシ,2- ブタノン 還元酵素	<i>adh</i>	AAA23199.2	クロストリジウム・ ベイジエリソキ NRRL B593	アセトン	
				<i>adhA</i>	AAC25556	ペイロコッカス・ ブリオサス	2-ベンタナオール、 ビルアルデヒド	
				<i>ldh</i>	YP_725182.1	ラルストニア・ ユートロファ	乳酸、2-オキソ フチラート、2-オキソ ベンタノニアート、 2-オキソグルタル酸	
				<i>adh</i>	P14941.1	サーモアナエロバク ター・ブロッキー HTD4	アセトン	
G	1.1.1.a	アセトアセチル-CoA	3-ヒドロキシブチル-CoA	<i>hbd</i>	NP_349314.1	クロストリジウム・ アセトブチリカム	アセトアセチル-CoA	

表37 (引用:図2)

工程	EC クラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
				<i>hbd</i>		AAM14586.1	クロストリジウム・ ベイジエリンキ	アセトアセチル-CoA
				<i>Hbd2</i>		EDK34807.1	クロストリジウム・ クレイベリ	アセトアセチル-CoA
				<i>Hbd1</i>		EDK32512.1	クロストリジウム・ クレイベリ	アセトアセチル-CoA
				<i>Msed_1423</i>	YP_001191505	メタロスファエラ・ セデュラ	3-ヒドロキシブチリル- CoA (疑い)	
				<i>Msed_0399</i>	YP_001190500	メタロスファエラ・ セデュラ	3-ヒドロキシブチリル- CoA (疑い)	
				<i>Msed_0389</i>	YP_001190490	メタロスファエラ・ セデュラ	3-ヒドロキシブチリル- CoA (疑い)	
				<i>Msed_1993</i>	YP_001192057	メタロスファエラ・ セデュラ	3-ヒドロキシブチリル- CoA (疑い)	
				<i>fadB</i>	P211177.2	大腸菌	3-オキソアシル-CoA	
				<i>fadJ</i>	P77399.1	大腸菌	3-オキソアシル-CoA	
H	1.2.1.b	3-ヒドロキシブチリル- CoA	3-ヒドロキシブチル- アルデヒド	<i>Ald</i>	AAT66436	クロストリジウム・ ベイジエリンキ	ブチリル-CoA	
			還元酵素 (アルデヒド 形成)					
				<i>sucD</i>	NP_904963.1	ポルフィロモナス・ ジンジバリズ	スクシニル-CoA	
				<i>bphG</i>	BAA03892.1	ショードモナス種	アセトアルデヒド、 プロピオノンアルデヒド、 ブチルアルデヒド、 イソブチルアルデヒド、 及びホルムアルデヒド	
				<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ・ セデュラ	マロニル-CoA	
				<i>mcr</i>	NP_378167	マルボロブス・ トコダイ	マロニル-CoA、 メチルマロニル- CoA	

表37 (引用:図2)

工程	EC クラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
I	1.1.1.c	3-ヒドロキシブチリル-CoA	1,3-ブタンジオール	3-ヒドロキシ-ブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)	<i>alhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム・アセトブチリカム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロロフレクサス・アウランティアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	ホホバ	長鎖アシル-CoA

【表42】

工程	ECクラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
A	4.2.1.a	4-ヒドロキシブチリル-CoA	クロトニル-CoA	4-ヒドロキシ-ブチリル-CoA デヒドロターゼ	<i>abD</i>	YP_001396399.1 イベリ DSM 555	クロストリジウム・クル イベリ DSM 555	4-ヒドロキシブチリル-CoA
					<i>abD</i>	P55792	クロストリジウム・アミノ ブチリカム	4-ヒドロキシブチリル-CoA
					<i>abD</i>	YP_001928843	ポルフィロモナス・ ジンジバリス ATCC 33277	4-ヒドロキシブチリル-CoA
B	4.2.1.a	クロトニル-CoA	3-ヒドロキシブチリル-CoA	<i>ctr</i>	NP_349318.1	クロストリジウム・ アセトブチリカム	3-ヒドロキシブチリル-CoA	
				<i>ctrI</i>	YP_001393856	クロストリジウム・クル イベリ DSM 555	3-ヒドロキシブチリル-CoA	
				<i>ctr</i>	YP_001929291.1 33277	ポルフィロモナス・ ジンジバリス ATCC 33277	配列類似性に基づいた 例	
				<i>paaA</i>	NP_745427.1	ブチダ菌	エノイル-CoA、フェニル アセチル-CoAのシス- ジヒドロジオール誘導体	
				<i>paaB</i>	NP_745426.1	ブチダ菌	エノイル-CoA、フェニル アセチル-CoAのシス- ジヒドロジオール誘導体	
				<i>phaA</i>	ABF8223.1	蛍光菌	エノイル-CoA、フェニル アセチル-CoAのシス- ジヒドロジオール誘導体	
				<i>phaB</i>	ABF82234.1	蛍光菌	エノイル-CoA、フェニル アセチル-CoAのシス- ジヒドロジオール誘導体	
				<i>maoC</i>	NP_415905.1	大腸菌	エノイル-CoA、フェニル アセチル-CoAのシス- ジヒドロジオール誘導体	

工程	ECクラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
				<i>paaF</i>	NP_415911.1	大腸菌	エノイル-CoA、フェニルアセチル-CoAのシス-ジヒドロジオール誘導体	
				<i>paaG</i>	NP_415912.1	大腸菌	エノイル-CoA、フェニルアセチル-CoAのシス-ジヒドロジオール誘導体	
C	1.2.1.b CoA	3-ヒドロキシブチリル- ブチルアルデヒド	3-ヒドロキシ- ブチリル-CoA 還元酵素 (アルデヒド 形成)	<i>ald</i>	AAT66436	クロストリジウム・ ベイジェリンキ	ブチリル-CoA	
				<i>sucD</i>	NP_904963.1	ポルフィロモナス・ シンジバリス	スクシニル-CoA	
				<i>bphG</i>	BAA03892.1	シュードモナス種	アセトアルデヒド、 プロピオナルデヒド、 ブチルアルデヒド、 イソブチルアルデヒド、 及びホルムアルデヒド	
				<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ・ セデュラ	マロニル-CoA	
				<i>mcr</i>	NP_378167	スルホプロアス・トコダイ	マロニルマロニル-CoA、 メチルマロニル-CoA	

D	1.1.1.a	3-ヒドロキシ-ブチルアルデヒド	1,3-アタンジオール	3-ヒドロキシ-ブチルアルデヒド 還元酵素	<i>alrA</i>	BAB12273.1	アシネットバクター M-1株	C2-C14アルデヒド
					<i>ADH2</i>	NP_014032.1	<i>adh</i>	プロピオンアルデヒド、 イソブチルアルデヒド、 ブチルアルデヒド、 2-メチルブチル- アルデヒド、3-メチル ブチル-アルデヒド、 2-フェニルアセト- アルデヒド

表38(引用:図3)

工程	ECクラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (入手可能な場合)	生物	公知の基質
				<i>qhd</i>	NP_417484.1	大腸菌		アセトアルデヒド、 マロンジアルデヒド、 プロパンアルデヒド、 ブタンアルデヒド、 及びアクロレイン
				<i>bdh I</i>	NP_349892.1	クロストリジウム・ アセトブチリカム	アセトアルデヒド	
				<i>bdh II</i>	NP_349891.1	クロストリジウム・ アセトブチリカム	アセトアルデヒド	
				<i>4hbd</i>	YP_726053.1	ラルストニア・ エトロファ <i>H16</i>	コハク酸	セミアルデヒド
				<i>ADHII</i>	AAR91477.1	グオバチルス・ サーモグルコシダシシウス <i>M10EXG</i>	エタノール、1-ブタノール、 1-ベンタノール、 1-ヘキサノール、 1-オクタノール、 2-ブロバノール	
				<i>mmsb</i>	P28811.1	緑膿菌	3-ヒドロキシ- ブチルアルデヒド、 マロン酸セミアルデヒド、	

					メチルマロン酸セミアルデヒド
E	1.1.1.c	3-ヒドロキシブチリル-CoA	P84067	サーマス・サーモフィラス	メチルマロン酸セミアルデヒド
		1,3-ブタンジオール	adhE2	AAK09379.1	アセトブチリカム・クロストリジウム・ブタノイル-CoA
		3-ヒドロキシ-ブチリル-CoA 還元酵素 (アルコール形成)			
			mcr	AAS20429.1	クロロフレクサス・マロニル-CoA
			FAR	AAD38039.1	ホホバ 長鎖アシル-CoA

【 0 2 8 1 】

本発明は開示された実施態様に関して説明されているが、当業者は、先に詳述した具体的な実施例及び研究が本発明の単なる実例となるにすぎないことを容易に認めるであろう。種々の修飾が本発明の精神を逸脱せずに実施することができることを理解すべきである。したがって、本発明は、以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。

10

20

30

40

50

【図1】

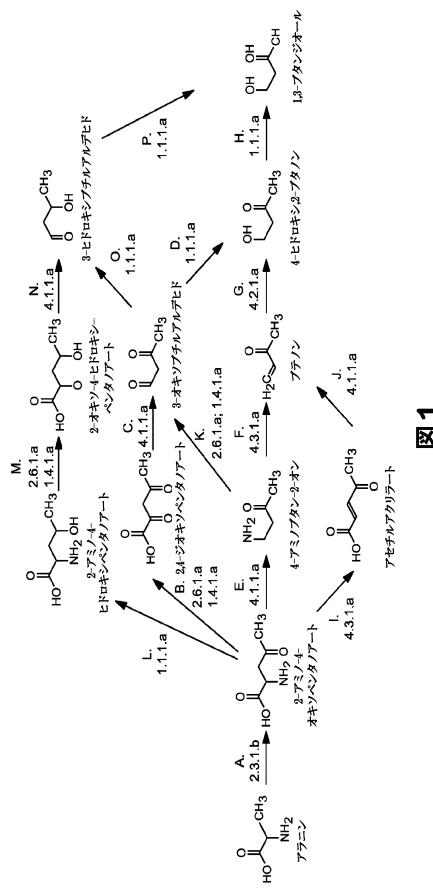


図1

【図2】

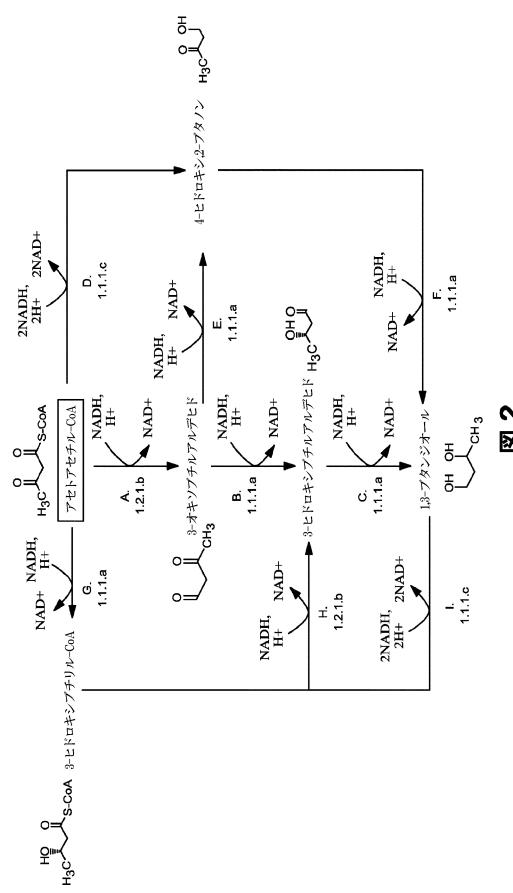


図2

【図3】

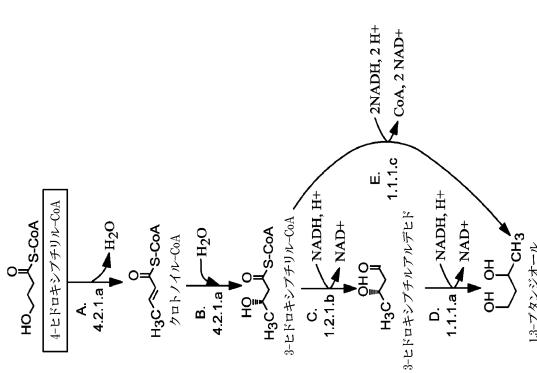


図3

【図4】

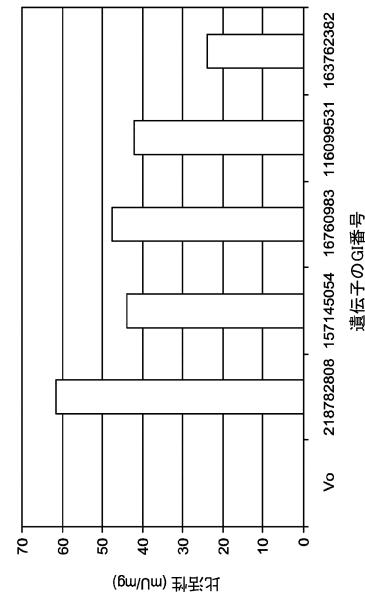


図4

【図5】

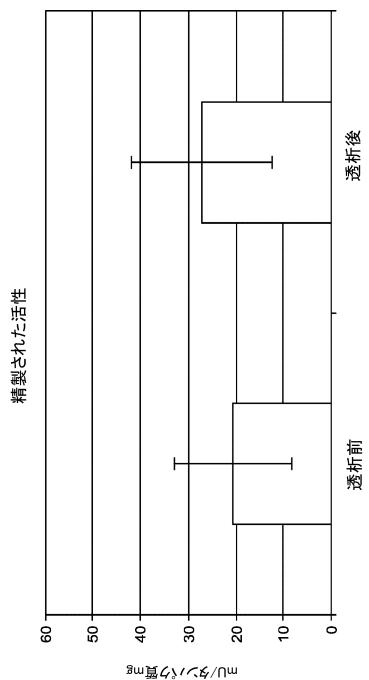


図5

【図6】

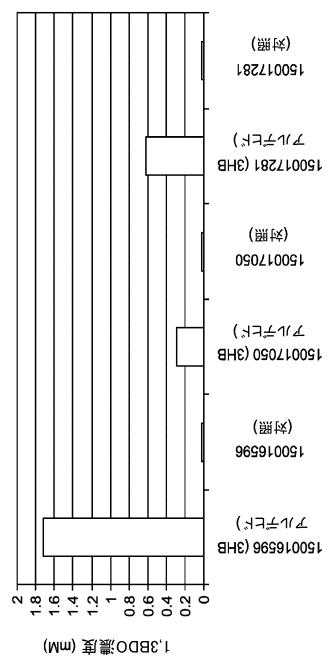


図6

【図7】

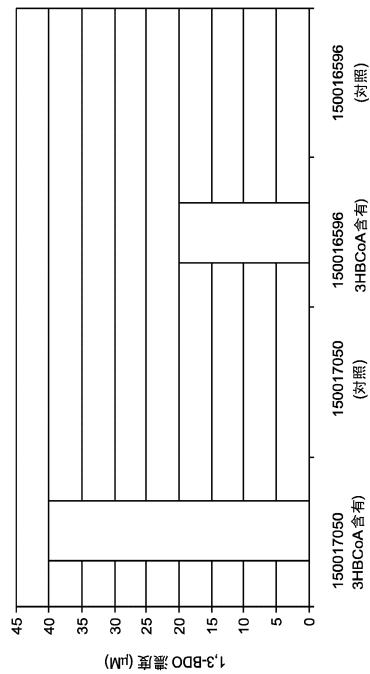


図7

【配列表】

0005876822000001.app

0005876822000002.xml

フロントページの続き

(72)発明者 ロビン イー. オステルホウト

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121 サン デイエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ
10520

(72)発明者 ブリトイ プハルクヤ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121 サン デイエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ
10520

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001, Vol.11, p.513-521

Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007, Vol.71, No.1, p.58-68

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 1/38

C12N 15/00 - 15/90

C12P 7/00 - 7/66

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

WPI DS / WPI X (STN)