

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-519561

(P2011-519561A)

(43) 公表日 平成23年7月14日 (2011.7.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
C 1 2 P 7/40 (2006.01)	C 1 2 P 7/40	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 154 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-507667 (P2011-507667)	(71) 出願人	510199890
(86) (22) 出願日	平成21年4月30日 (2009.4.30)		ジェノマティカ, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成22年12月28日 (2010.12.28)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/042426		21, サン ディエゴ, ウォーターリ
(87) 国際公開番号	W02009/135074		ッジ サークル 10520
(87) 国際公開日	平成21年11月5日 (2009.11.5)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	61/049,730		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成20年5月1日 (2008.5.1)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	バーク, マーク ジェイ.
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
			30, サン ディエゴ, インターメゾ
			ウェイ 12634
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メタクリル酸の産生のための微生物

(57) 【要約】

本発明は、2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸経路を有する、天然に存在しない微生物体を提供する。微生物体は、2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸経路中の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含有する。本発明は、2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸を生成する方法をさらに提供する。この方法は、十分な量で2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を発現する、2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸を生成する微生物体を培養し、2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間培養することを含むことができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む微生物体。

【請求項 2】

前記メタクリル酸経路が、メチルマロニル CoA ムターゼ、メチルマロニル CoA レダクターゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物体。

10

【請求項 3】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 4】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 5】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 6】

前記 4 つの外因性核酸が、メチルマロニル CoA ムターゼ、メチルマロニル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 5 に記載の天然に存在しない微生物体。

20

【請求項 7】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 5 つの外因性核酸を含む、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 8】

前記メタクリル酸経路が、メチルマロニル CoA エピメラーゼをさらに含む、請求項 7 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 9】

前記 5 つの外因性核酸が、メチルマロニル CoA ムターゼ、メチルマロニル CoA エピメラーゼ、メチルマロニル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 8 に記載の天然に存在しない微生物体。

30

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 11】

実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 12】

クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも 1 つの酵素の活性を増加させる遺伝子改変をさらに含み、活性の増加が、前記遺伝子改変が存在しない状態と比べた増加である、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物体。

40

【請求項 13】

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項 1 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項 14】

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 13 に記載の

50

方法。

【請求項 15】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 4 つの外因性核酸が、メチルマロニル C o A ムターゼ、メチルマロニル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼおよび 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 5 つの外因性核酸を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 20】

前記メタクリル酸経路が、メチルマロニル C o A エピメラーゼをさらに含む、請求項 19 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 21】

前記 5 つの外因性核酸が、メチルマロニル C o A ムターゼ、メチルマロニル C o A エピメラーゼ、メチルマロニル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼおよび 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 23】

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、メチルマロニル C o A ムターゼ、アルコール／アルデヒドデヒドロゲナーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む微生物体。

【請求項 24】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 23 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 25】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 23 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 26】

前記 3 つの外因性核酸が、メチルマロニル C o A ムターゼ、アルコール／アルデヒドデヒドロゲナーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 25 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 27】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 23 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 28】

前記メタクリル酸経路が、メチルマロニル C o A エピメラーゼをさらに含む、請求項 27 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 29】

前記 4 つの外因性核酸が、メチルマロニル C o A ムターゼ、メチルマロニル C o A エピメラーゼ、アルコール／アルデヒドデヒドロゲナーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 27 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 30】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 23 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 31】

実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 23 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 32】

クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも 1 つの酵素の活性を増加させる遺伝子改変をさらに含み、活性の増加が、前記遺伝子改変が存在しない状態と比べた増加である、請求項 23 に記載の天然に存在しない微生物体。

10

【請求項 33】

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項 23 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項 34】

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 33 に記載の方法。

20

【請求項 35】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 37】

前記 3 つの外因性核酸が、メチルマロニル C o A ムターゼ、アルコール／アルデヒドデヒドロゲナーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 36 に記載の方法。

30

【請求項 38】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 39】

前記メタクリル酸経路が、メチルマロニル C o A エピメラーゼをさらに含む、請求項 38 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 40】

前記 4 つの外因性核酸が、メチルマロニル C o A ムターゼ、メチルマロニル C o A エピメラーゼ、アルコール／アルデヒドデヒドロゲナーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 39 に記載の方法。

40

【請求項 41】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 42】

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、メチルマロニル C o A ムターゼ、メチルマロニル C o A レダクターゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および 3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アンモニアリアーゼを含む微生物体。

【請求項 43】

50

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、請求項42に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項44】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、請求項42に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項45】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、請求項42に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項46】

前記4つの外因性核酸が、メチルマロニルC o A ムターゼ、メチルマロニルC o A レダクターゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アンモニアリアーゼをコードする、請求項45に記載の天然に存在しない微生物体。

10

【請求項47】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする5つの外因性核酸を含む、請求項42に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項48】

前記メタクリル酸経路が、メチルマロニルC o A エピメラーゼをさらに含む、請求項47に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項49】

前記5つの外因性核酸が、メチルマロニルC o A ムターゼ、メチルマロニルC o A エピメラーゼ、メチルマロニルC o A レダクターゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アンモニアリアーゼをコードする、請求項48に記載の天然に存在しない微生物体。

20

【請求項50】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項42に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項51】

実質的に嫌気性の培地中にある、請求項42に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項52】

クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも1つの酵素の活性を増加させる遺伝子改変をさらに含み、活性の増加が、前記遺伝子改変が存在しない状態と比べた増加である、請求項42に記載の天然に存在しない微生物体。

30

【請求項53】

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項42に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項54】

前記天然に存在しない微生物体の実質的に嫌気性の培地中にある、請求項53に記載の方法。

40

【請求項55】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、請求項53に記載の方法。

【請求項56】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、請求項53に記載の方法。

【請求項57】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、請求項53に記載の方法。

50

【請求項 58】

前記 4 つの外因性核酸が、メチルマロニル C o A ムターゼ、メチルマロニル C o A レダクターゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および 3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アンモニアリアーゼをコードする、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 5 つの外因性核酸を含む、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 60】

前記メタクリル酸経路が、メチルマロニル C o A エピメラーゼをさらに含む、請求項 59 に記載の天然に存在しない微生物体。

10

【請求項 61】

前記 5 つの外因性核酸が、メチルマロニル C o A ムターゼ、メチルマロニル C o A エピメラーゼ、メチルマロニル C o A レダクターゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および 3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アンモニアリアーゼをコードする、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 63】

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、4-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル C o A シンテターゼまたは 3-ヒドロキシイソブチリル C o A ヒドロラーゼまたは 3-ヒドロキシイソブチリル C o A トランスフェラーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む微生物体。

20

【請求項 64】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 63 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 65】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 63 に記載の天然に存在しない微生物体。

30

【請求項 66】

前記 3 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル C o A シンテターゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 63 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 67】

前記 3 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル C o A ヒドロラーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 63 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 68】

前記 3 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル C o A トランスフェラーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 63 に記載の天然に存在しない微生物体。

40

【請求項 69】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 63 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 70】

実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 63 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 71】

クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホス

50

ホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも1つの酵素の活性を増加させる遺伝子改変をさらに含み、活性の増加が、前記遺伝子改変が存在しない状態と比べた増加である、請求項63に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項72】

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項63に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項73】

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、請求項72に記載の方法。

【請求項74】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、請求項72に記載の方法。

【請求項75】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、請求項72に記載の方法。

【請求項76】

前記3つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルCoAターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルCoAシンテターゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項75に記載の方法。

【請求項77】

前記3つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルCoAターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルCoAヒドロラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項75に記載の方法。

【請求項78】

前記3つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルCoAターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルCoAトランスフェラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項75に記載の方法。

【請求項79】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項72に記載の方法。

【請求項80】

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸ターゼ、3-メチルアスパルターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼを含む微生物体。

【請求項81】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、請求項80に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項82】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、請求項80に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項83】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、請求項80に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項84】

前記4つの外因性核酸が、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸ターゼ、3-メチルアスパルターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼをコードする、請求項83に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項85】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項80に記載の天然に存在

10

20

30

40

50

しない微生物体。

【請求項 86】

実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 80 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 87】

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項 80 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項 88】

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 89】

10

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 90】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 91】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 92】

20

前記 4 つの外因性核酸が、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸ムターゼ、3-メチルアスパルターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼをコードする、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 94】

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、アルファーケトグルタル酸レダクターゼ、2-ヒドロキシグルタミン酸ムターゼ、3-メチルリンゴ酸デヒドラターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼを含む微生物体。

30

【請求項 95】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 94 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 96】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 94 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 97】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 94 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 98】

40

前記 4 つの外因性核酸が、アルファーケトグルタル酸レダクターゼ、2-ヒドロキシグルタミン酸ムターゼ、3-メチルリンゴ酸デヒドラターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼをコードする、請求項 97 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 99】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 94 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 100】

実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 94 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 101】

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十

50

分な期間、請求項 9 4 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項 1 0 2】

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

前記 4 つの外因性核酸が、アルファークトグルタル酸レダクターゼ、2-ヒドロキシグルタミン酸ムターゼ、3-メチルリンゴ酸デヒドラターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼをコードする、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ、およびメタクリリル CoA トランスフェラーゼまたはメタクリリル CoA ヒドロラーゼまたはメタクリリル CoA シンテターゼを含む微生物体。

【請求項 1 0 9】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 1 0 8 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 1 1 0】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 1 0 8 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 1 1 1】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 1 0 8 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 1 1 2】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 5 つの外因性核酸を含む、請求項 1 0 8 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 1 1 3】

前記 5 つの外因性核酸が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ、およびメタクリリル CoA トランスフェラーゼをコードする、請求項 1 1 2 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 1 1 4】

前記 5 つの外因性核酸が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ、およびメタクリリル CoA ヒドロラーゼをコードする、請求項 1 1 2 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 1 1 5】

10

20

30

40

50

前記 5 つの外因性核酸が、アセトアセチル C o A チオラーゼ、アセトアセチル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル C o A デヒドラターゼ、およびメタクリリル C o A シンテターゼをコードする、請求項 1 1 2 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 1 1 6】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 1 0 8 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 1 1 7】

実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 1 0 8 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 1 1 8】

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項 1 0 8 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項 1 1 9】

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 5 つの外因性核酸を含む、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記 5 つの外因性核酸が、アセトアセチル C o A チオラーゼ、アセトアセチル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル C o A デヒドラターゼ、およびメタクリリル C o A トランスフェラーゼをコードする、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記 5 つの外因性核酸が、アセトアセチル C o A チオラーゼ、アセトアセチル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル C o A デヒドラターゼ、およびメタクリリル C o A ヒドロラーゼをコードする、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記 5 つの外因性核酸が、アセトアセチル C o A チオラーゼ、アセトアセチル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル C o A デヒドラターゼ、およびメタクリリル C o A シンテターゼをコードする、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、アセトアセチル C o A チオラーゼ、アセトアセチル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル C o A デヒドラターゼ、エノイル C o A ヒドラターゼ、および

10

20

30

40

50

3-ヒドロキシイソブチリル CoA ヒドロラーゼまたは 3-ヒドロキシイソブチリル CoA シンテターゼまたは 3-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む微生物体。

【請求項 129】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 128 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 130】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 128 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 131】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 128 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 132】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 5 つの外因性核酸を含む、請求項 128 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 133】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 6 つの外因性核酸を含む、請求項 128 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 134】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 7 つの外因性核酸を含む、請求項 128 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 135】

前記 7 つの外因性核酸が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ、エノイル CoA ヒドラターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル CoA ヒドロラーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 134 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 136】

前記 7 つの外因性核酸が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ、エノイル CoA ヒドラターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル CoA シンテターゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 134 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 137】

前記 7 つの外因性核酸が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ、エノイル CoA ヒドラターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 134 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 138】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 128 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 139】

実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 128 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 140】

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項 128 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項 141】

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 140 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 4 2】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 1 4 0 に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 1 4 0 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 1 4 0 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 5 つの外因性核酸を含む、請求項 1 4 0 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 6 つの外因性核酸を含む、請求項 1 4 0 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 7 つの外因性核酸を含む、請求項 1 4 0 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

前記 7 つの外因性核酸が、アセトアセチル C o A チオラーゼ、アセトアセチル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル C o A デヒドラターゼ、エノイル C o A ヒドラターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル C o A ヒドロラーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 1 4 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

前記 7 つの外因性核酸が、アセトアセチル C o A チオラーゼ、アセトアセチル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル C o A デヒドラターゼ、エノイル C o A ヒドラターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル C o A シンテターゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 1 4 7 に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

前記 7 つの外因性核酸が、アセトアセチル C o A チオラーゼ、アセトアセチル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル C o A デヒドラターゼ、エノイル C o A ヒドラターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル C o A トランスフェラーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、請求項 1 4 7 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 1 4 0 に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

天然に存在しない微生物体であって、3-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な量で発現される 3-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、3-ヒドロキシイソ酪酸経路を有する微生物体を含み、前記 3-ヒドロキシイソ酪酸経路が、4-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼおよび 3-ヒドロキシイソブチリル C o A シンテターゼまたは 3-ヒドロキシイソブチリル C o A ヒドロラーゼまたは 3-ヒドロキシイソブチリル C o A トランスフェラーゼを含む微生物体。

【請求項 1 5 3】

それぞれ 3-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 1 5 2 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 1 5 4】

前記 2 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼおよび 3-ヒドロキ

10

20

30

40

50

シイソブチリルC o Aシンテターゼをコードする、請求項153に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項155】

前記2つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼおよび3-ヒドロキシイソブチリルC o Aヒドロラーゼをコードする、請求項153に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項156】

前記2つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼおよび3-ヒドロキシイソブチリルC o Aトランスフェラーゼをコードする、請求項153に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項157】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項152に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項158】

実質的に嫌気性の培地中にある、請求項152に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項159】

クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも1つの酵素の活性を増加させる遺伝子改変をさらに含み、活性の増加が、前記遺伝子改変が存在しない状態と比した増加である、請求項152に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項160】

3-ヒドロキシイソ酪酸を生成する方法であって、3-ヒドロキシイソ酪酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項152に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項161】

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、請求項160に記載の方法。

【請求項162】

前記微生物体が、それぞれ3-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、請求項160に記載の方法。

【請求項163】

前記2つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼおよび3-ヒドロキシイソブチリルC o Aシンテターゼをコードする、請求項162に記載の方法。

【請求項164】

前記2つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼおよび3-ヒドロキシイソブチリルC o Aヒドロラーゼをコードする、請求項162に記載の方法。

【請求項165】

前記2つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼおよび3-ヒドロキシイソブチリルC o Aトランスフェラーゼをコードする、請求項162に記載の方法。

【請求項166】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項160に記載の方法。

【請求項167】

天然に存在しない微生物体であって、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な量で発現される2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む、2-ヒドロキシイソ酪酸経路を有する微生物体を含み、前記2-ヒドロキシイソ酪酸経路が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、アセトアセチルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、および2-ヒドロキシイソブチリルC o Aトランスフェラーゼまたは2-ヒドロキシイソブチリルC o Aヒドロラーゼまたは2-ヒドロキシイソブチリルC o Aシンテターゼを含む微生物体。

10

20

30

40

50

【請求項 168】

それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 167 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 169】

それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 167 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 170】

それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 167 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 171】

前記 4 つの外因性核酸が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼをコードする、請求項 170 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 172】

前記 4 つの外因性核酸が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA ヒドロラーゼをコードする、請求項 170 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 173】

前記 4 つの外因性核酸が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA シンテターゼをコードする、請求項 170 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 174】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 167 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 175】

実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 167 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 176】

2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する方法であって、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項 167 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項 177】

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 176 に記載の方法。

【請求項 178】

前記微生物体が、それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 176 に記載の方法。

【請求項 179】

前記微生物体が、それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 176 に記載の方法。

【請求項 180】

前記微生物体が、それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 176 に記載の方法。

【請求項 181】

前記 4 つの外因性核酸が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼをコードする、請求項 180 に記載の方法。

【請求項 182】

前記 4 つの外因性核酸が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリ

10

20

30

40

50

ルC o Aヒドロラーゼをコードする、請求項180に記載の方法。

【請求項183】

前記4つの外因性核酸が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、アセトアセチルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、および2-ヒドロキシイソブチリルC o Aシンテターゼをコードする、請求項180に記載の方法。

【請求項184】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項176に記載の方法。

【請求項185】

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、4-ヒドロキシブチリルC o Aデヒドラターゼ、ビニルアセチルC o A Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ、およびメタクリルC o AヒドロラーゼまたはメタクリルC o AシンテターゼまたはメタクリルC o Aトランスフェラーゼのいずれかを含む微生物体。

10

【請求項186】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、請求項185に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項187】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、請求項185に記載の天然に存在しない微生物体。

20

【請求項188】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、請求項185に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項189】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする5つの外因性核酸を含む、請求項185に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項190】

前記5つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルC o Aデヒドラターゼ、ビニルアセチルC o A Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ、およびメタクリルC o Aヒドロラーゼをコードする、請求項189に記載の天然に存在しない微生物体。

30

【請求項191】

前記5つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルC o Aデヒドラターゼ、ビニルアセチルC o A Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ、およびメタクリルC o Aシンテターゼをコードする、請求項189に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項192】

前記5つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルC o Aデヒドラターゼ、ビニルアセチルC o A Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ、およびメタクリルC o Aトランスフェラーゼをコードする、請求項189に記載の天然に存在しない微生物体。

40

【請求項193】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項185に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項194】

実質的に嫌気性の培地中にある、請求項185に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項195】

クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホス

50

ホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも1つの酵素の活性を増加させる遺伝子改変をさらに含み、活性の増加が、前記遺伝子改変が存在しない状態と比べた増加である、請求項185に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項196】

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項185に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項197】

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、請求項196に記載の方法。

【請求項198】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、請求項196に記載の方法。

【請求項199】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、請求項196に記載の方法。

【請求項200】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、請求項196に記載の方法。

【請求項201】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする5つの外因性核酸を含む、請求項196に記載の方法。

【請求項202】

前記5つの外因性核酸が、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 Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルCoAデヒドラターゼ、およびメタクリリルCoAヒドロラーゼをコードする、請求項201に記載の方法。

【請求項203】

前記5つの外因性核酸が、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 Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルCoAデヒドラターゼ、およびメタクリリルCoAシンテターゼをコードする、請求項201に記載の方法。

【請求項204】

前記5つの外因性核酸が、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 Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルCoAデヒドラターゼ、およびメタクリリルCoAトランスフェラーゼをコードする、請求項201に記載の方法。

【請求項205】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項196に記載の方法。

【請求項206】

天然に存在しない微生物体であって、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な量で発現される2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む、2-ヒドロキシイソ酪酸経路を有する微生物体を含み、前記2-ヒドロキシイソ酪酸経路が、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 Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、および2-ヒドロキシイソブチリルCoAヒドロラーゼまたは2-ヒドロキシイソブチリルCoAシンテターゼまたは2-ヒドロキシイソブチリルCoAトランスフェラーゼのいずれかを含む微生物体。

【請求項207】

それぞれ2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、請求項206に記載の天然に存在しない微生物体。

10

20

30

40

50

【請求項 208】

それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 206 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 209】

それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 206 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 210】

前記 4 つの外因性核酸が、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 Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA ヒドロラーゼをコードする、請求項 209 に記載の天然に存在しない微生物体。

10

【請求項 211】

前記 4 つの外因性核酸が、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 Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA シンテターゼをコードする、請求項 209 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 212】

前記 4 つの外因性核酸が、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 Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼをコードする、請求項 209 に記載の天然に存在しない微生物体。

20

【請求項 213】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 206 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 214】

実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 206 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 215】

2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する方法であって、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項 206 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

30

【請求項 216】

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 215 に記載の方法。

【請求項 217】

前記微生物体が、それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 215 に記載の方法。

【請求項 218】

前記微生物体が、それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 215 に記載の方法。

【請求項 219】

前記微生物体が、それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 215 に記載の方法。

40

【請求項 220】

前記 4 つの外因性核酸が、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 Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA ヒドロラーゼをコードする、請求項 219 に記載の方法。

【請求項 221】

前記 4 つの外因性核酸が、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 Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ

50

、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA シンテターゼをコードする、請求項 219 に記載の方法。

【請求項 222】

前記 4 つの外因性核酸が、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 Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼをコードする、請求項 219 に記載の方法。

【請求項 223】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 215 に記載の方法。

【請求項 224】

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ、およびメタクリル CoA シンテターゼまたはメタクリル CoA ヒドロラーゼまたはメタクリル CoA トランスフェラーゼを含む微生物体。

【請求項 225】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 224 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 226】

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 224 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 227】

前記 3 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、メタクリル CoA シンテターゼ、および 3-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼをコードする、請求項 224 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 228】

前記 3 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、メタクリル CoA ヒドロラーゼ、および 3-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼをコードする、請求項 224 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 229】

前記 3 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、メタクリル CoA トランスフェラーゼ、および 3-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼをコードする、請求項 224 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 230】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 224 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 231】

実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 224 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 232】

クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも 1 つの酵素の活性を増加させる遺伝子改変をさらに含み、活性の増加が、前記遺伝子改変が存在しない状態と比べた増加である、請求項 224 に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項 233】

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項 224 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項 234】

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 233 に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 2 3 5】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 2 3 3 に記載の方法。

【請求項 2 3 6】

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 2 3 3 に記載の方法。

【請求項 2 3 7】

前記 3 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、メタクリリル CoA シンテターゼ、および 3-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼをコードする、請求項 2 3 6 に記載の方法。

10

【請求項 2 3 8】

前記 3 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、メタクリリル CoA ヒドロラーゼ、および 3-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼをコードする、請求項 2 3 6 に記載の方法。

【請求項 2 3 9】

前記 3 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、メタクリリル CoA トランスフェラーゼ、および 3-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼをコードする、請求項 2 3 6 に記載の方法。

【請求項 2 4 0】

20

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 2 3 3 に記載の方法。

【請求項 2 4 1】

天然に存在しない微生物体であって、タンパク質または酵素をコードする遺伝子中に生じている 1 つまたは複数の遺伝子破壊を含み、前記 1 つまたは複数の遺伝子破壊が前記生物体における 3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成の増加を付与する微生物体。

【請求項 2 4 2】

3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成が増殖連結型である、請求項 2 4 1 に記載の天然に存在しない生物体。

【請求項 2 4 3】

30

3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成が増殖連結型でない、請求項 2 4 1 に記載の天然に存在しない生物体。

【請求項 2 4 4】

前記 1 つまたは複数の遺伝子破壊が表 1 0 または 1 1 に列挙したタンパク質または酵素をコードする、請求項 2 4 1 に記載の天然に存在しない生物体。

【請求項 2 4 5】

前記 1 つまたは複数の遺伝子破壊が、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼおよびアセトアルデヒド CoA デヒドロゲナーゼからなる群から選択されるタンパク質または酵素をコードする、請求項 2 4 1 に記載の天然に存在しない生物体。

【請求項 2 4 6】

40

アスパルターゼ、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、NAD (P) トランスヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、ATP シンターゼ、ホスホエノールピルビン酸：ピルビン酸ホスホトランスフェラーゼ系、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホトランスアセチラーゼ、酢酸キナーゼ、6-ホスホグルコノラクトナーゼ、グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼおよび NADH デヒドロゲナーゼからなる群から選択されるタンパク質または酵素をコードする 1 つまたは複数の遺伝子破壊をさらに含む、請求項 2 4 5 に記載の天然に存在しない生物体。

【請求項 2 4 7】

前記 1 つまたは複数の遺伝子破壊が、前記 1 つまたは複数の遺伝子の欠失を含む、請求項 2 4 1 に記載の生物体。

50

【請求項 2 4 8】

前記細胞が実質的に嫌気性の培地中にある、請求項 2 4 1 に記載の生物体。

【請求項 2 4 9】

3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸を生成する方法であって、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項 2 4 1 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項 2 5 0】

3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成が増殖連結型である、請求項 2 4 9 に記載の方法。

【請求項 2 5 1】

3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成が増殖連結型でない、請求項 2 4 9 に記載の方法。

【請求項 2 5 2】

前記 1 つまたは複数の遺伝子破壊が表 1 0 または 1 1 に列挙したタンパク質または酵素をコードする、請求項 2 4 9 に記載の方法。

【請求項 2 5 3】

前記 1 つまたは複数の遺伝子破壊が、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼおよびアセトアルデヒド C o A デヒドロゲナーゼからなる群から選択されるタンパク質または酵素をコードする、請求項 2 4 9 に記載の生物体。

【請求項 2 5 4】

アスパルターゼ、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、N A D (P) トランスヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、A T P シンターゼ、ホスホエノールピルビン酸：ピルビン酸ホスホトランスフェラーゼ系、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホトランスアセチラーゼ、酢酸キナーゼ、6-ホスホグルコノラクトナーゼ、グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼおよび N A D H デヒドロゲナーゼからなる群から選択されるタンパク質または酵素をコードする 1 つまたは複数の遺伝子破壊をさらに含む、請求項 2 5 3 に記載の生物体。

【請求項 2 5 5】

前記培養が実質的に嫌気性の培地中で行われる、請求項 2 4 9 に記載の方法。

【請求項 2 5 6】

前記 1 つまたは複数の遺伝子破壊が、前記 1 つまたは複数の遺伝子の欠失を含む、請求項 2 4 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の背景

本願は、2 0 0 8 年 5 月 1 日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 0 4 9 , 7 3 0 号の利益を主張し、この米国仮特許出願の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。

【0 0 0 2】

本発明は、一般に生合成プロセスに、より具体的にはメタクリル酸、2-ヒドロキシイソブチレートおよび 3-ヒドロキシイソブチレートの生合成能力を有する生物体に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

メチルメタクリレートは、式 $\text{CH}_2 = \text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{CH}_3$ を有する有機化合物である。この無色の液体は、メタクリル酸 (MMA) のメチルエステルであり、透明なプラスチックであるポリメチルメタクリレート (PMMA) を生成するためのモノマーである。メチルメタクリレート (MMA) は、世界的な需要が 1 年当たり 4 5 億ポンドを超える重要な中間化学物質であり、その多くはポリアクリレートに変換される。

10

20

30

40

50

【0004】

ほとんどの商業的生産体は、アセトンシアノヒドリン（ACH）経路を適用してメタクリル酸（MAA）を生成し、アセトンおよびシアン化水素を原料とする。この中間体シアノヒドリンは、硫酸を用いてメタクリルアミドの硫酸エステルに変換され、その加水分解により重硫酸アンモニウムおよびMAAが得られる。一部の生産体は、イソブチレン、または同等のtert-ブタノールから開始し、それは酸化されてメタクロレインになり、さらに酸化されてメタクリル酸になる。次いでMAAはメタノールでエステル化されてMMAになる。

【0005】

アセトンシアノヒドリン経路を使用する従来の生成プロセスでは、シアン化水素（HCN）およびアセトンがアセトンシアノヒドリンに変換され、次いで酸の補助による加水分解を受け、メタノールでのエステル化によりMMAが得られる。潜在的に致死性のあるHCNの取り扱いが難点であるとともに、副産物の廃棄のコストが高い（MMA 1トン当たり1.2トンの重硫酸アンモニウムが形成される）ことが、よりクリーンで経済的なプロセスを目的とする非常に多くの研究の契機となった。いくつかの新たなプロセスが過去20年間に商業化されており、さらに多くのプロセスが商業化に近づいている。イソブチレンを酸化してメタクロレインにし、次いでそれをメタノールと混合し、空気で酸化し、エステル化してMMAにする、Asahiの「Direct Metha」経路が、経済的なプロセスとして記載されている。

【0006】

メチルメタクリレートの主な適用例は、ポリメチルメタクリレートアクリルプラスチックの生産である。また、メチルメタクリレートは、PVCの改質剤として使用されるコポリマーのメチルメタクリレート-ブタジエンスチレン（MBS）の生産にも使用される。メチルメタクリレートポリマーおよびコポリマーは、ラテックス塗料などの水性コーティングに使用される。接着剤においても使用が見出される。現代の適用例には、液晶ディスプレイ（LCD）コンピュータおよびTVスクリーンにわたって光の広がりをも均一に維持するプレートにおける使用がある。メチルメタクリレートは、心臓の冠状動脈などの解剖学的臓器の腐食鑄型にも使用される。

【0007】

メタクリル酸、または2-メチル-2-プロペン酸は、ローマカミツレの油中に少量で天然に存在する低分子量のカルボン酸である。それは、刺激性の不快なおおいを有する腐食性の液体である。それは、温水に溶解性であり、ほとんどの有機溶媒と混和性がある。

【0008】

メタクリル酸は、加熱、または触媒作用のある量のHClなどの強酸での処理後に容易に重合する。得られたポリマーは、セラミックに見えるプラスチックである。メタクリル酸は、上記で論じたメチルメタクリレートなど、まとめてメタクリレートとして公知であるそのエステルの調製において産業上使用される。メタクリレートは、最も顕著にはLucite（商標）およびPlexiglas（商標）などの商品名を有するポリマーの製造において多数の用途を有する。

【0009】

MMAポリマー以外で、この産業の他の主要な製品は、粗製メタクリル酸（粗製MAA、図1）であり、MMAの総生産の約20パーセントを占める。粗製MAAは処理されてブチルメタクリレートおよび／または高度に精製された粗製MAAである「精」MAAとなる。精MAAは、様々なポリマーにおけるモノマーとして直接使用することができ、種々の少量のメタクリレートの作製にも使用される。その一方で、MAAは、メタノールでのエステル化を介してMMAに変換することもできる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって、商業的な量のメタクリル酸、2-ヒドロキシイソブチレートまたは3-ヒ

10

20

30

40

50

ドロキシイソブチレートなどの化合物を有効に生成する代替方法の必要性が存在する。本発明はこの必要性を満たし、関連する利点も提供する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体を提供する。微生物体は、メタクリル酸経路中の酵素をコードする少なくとも1つの外因性の核酸を含有する。本発明は、メタクリル酸を生成する方法をさらに提供する。この方法は、メタクリル酸を生成する微生物体を培養することを含むことができ、微生物体は、メタクリル酸を生成する条件下および十分な期間、メタクリル酸を生成するのに十分な量で、メタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を発現する。本発明はまた、メタクリル酸前駆体の3-ヒドロキシイソブチレートおよび2-ヒドロキシイソブチレートのための生物体および生成方法についても記載する。

10

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、メタクリル酸(MAA)の構造を示す図である。

【図2】図2は、3-ヒドロキシイソブチレートを介するスクシニルCoAからMMAへの例示的な代謝経路を示す図である。

【図3】図3は、公知の酵素触媒脱水と、3-ヒドロキシイソブチレートの脱水について予測される変換との比較を示す図である。図3Aは、2-(ヒドロキシメチル)グルタル酸デヒドラターゼ(EC4.2.1.-)による2-ヒドロキシメチルグルタレートの転換を示す。図3Bは、フマル酸ヒドラターゼ(EC4.2.1.2)によるマレートからフマレートへの脱水を示す。図3Cは、3-ヒドロキシイソブチレートからMAAへの予測される脱水を示す。

20

【図4】図4は、3-アミノ-2-メチルプロピオネートを介するスクシニルCoAからMAAへの例示的な経路を示す図である。「集中反応」(段階2~3)は、1)メチルマロニルCoAエピメラーゼおよび2)メチルマロニルCoAレダクターゼによって触媒される。

【図5】図5は、フマレートを形成するアスパルテートの公知の酵素触媒脱アミノ化(図5A、EC4.3.1.1)と、MAAへの3-アミノ-2-メチルプロピオネートの予測される脱アミノ化(図5B)との比較を示す図である。

30

【図6】図6は、3-ヒドロキシイソブチレートまたはメタクリルCoAを介して進行する4-ヒドロキシブチリルCoAからMAAへの例示的な経路を示す図である。段階2は、3つの代替酵素：3-ヒドロキシイソブチリルCoAシンテターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルCoAヒドロラーゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルCoAトランスフェラーゼによって触媒され得る。同様に、段階5は、3つの代替酵素：メタクリルCoAシンテターゼ、メタクリルCoAヒドロラーゼまたはメタクリルCoAトランスフェラーゼによって触媒され得る。

【図7】図7は、4-ヒドロキシブチリルCoAから3-ヒドロキシイソブチリルCoAへの転換を触媒する酵素の候補の比較を示す図である。候補メチルムターゼによってコードされる経路：図7A、メチルマロニルCoAムターゼ(MCM、EC5.4.99.2)；図7B、イソブチリルCoAムターゼ(ICM、EC5.4.99.13)；図7C、図6の段階1で提唱された予測される変換。

40

【図8】図8は、トレオ-3-メチルアスパルテートを介するアルファ-ケトグルタレートからMAAへの例示的な経路を示す図である。

【図9】図9は、公知の酵素触媒脱カルボキシル化と、メサコネートの予測される脱カルボキシル化との比較を示す図である。図9Aは、アコニット酸デカルボキシラーゼ(EC4.1.1.6)によって触媒される、アコニテートからイコニテートへの変換を示す。図9Bは、4-オキサロクロトン酸デカルボキシラーゼ(EC4.1.1.77)による4-オキサロクロトネートから2-オキソペンテノエートへの脱カルボキシル化を示す。図9Cは、MAAを形成する、メサコネートの予測される脱カルボキシル化を示す。

50

【図10】図10は、2-ヒドロキシグルタレートを経るアルファケトグルタレートからMAAへの例示的な経路を示す図である。

【図11】図11は、3-メチルマレートからメサコネートに転換する酵素の候補を示す図である。図11Aは、2-メチルリンゴ酸デヒドラターゼ（EC 4. 2. 1. 34）によって触媒される、2-メチルマレートからメサコネートへの変換を示す。図11Bは、フマル酸ヒドラターゼ（EC 4. 2. 1. 2）によるマレートからフマレートへの脱水を示す。図11Cは、3-メチルマレートからメサコネートへの予測される脱水を示す。

【図12】図12は、アセチルCoAまたは4-ヒドロキシブチリルCoAからMAAまたは2-ヒドロキシイソブチレートへの転換の例示的な代謝経路を示す図である。

【図13】図13は、アセチルCoAからMAAへの例示的な経路を示す図である。

【図14】図14は、アクリリルCoAからMAAへの例示的な経路を示す図である。

【図15】図15は、2-ケトバレレートからMAAへの例示的な経路を示す図である。2-ケトイソバレレートは、バリンまたはピルベートから生成することができる。ピルベートから2-ケトイソバレレートに転換する酵素の例示的なセットは、アセト乳酸シンターゼ、アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼ、およびジヒドロキシ酸デヒドラターゼからなる。

【図16】図16は、典型的な非増殖連結型生成株と比較した、OptKnock設計株の仮想の生成エンベロップを示す図である。対角線の右側の領域は、典型的な生成株に関連し、対角線の左側は、OptKnock設計株を表す。OptKnock株の潜在的な進化軌跡は、高生産性の表現型につながるという点で根本的に異なる。影付きの領域内にある白丸は、増殖選択前を表す。影付きの領域の頂点にある丸（OptKnockではB、典型的な生成株ではA）は、増殖選択後の表現型を表す。

【図17】図17は、野生型E. coli（黒色）と比較した、優先度の最も高いノックアウト株の設計（灰色）の増殖連結型のMAAおよび3-ヒドロキシイソブチレート生成の特徴を示す図である。10 mmol / g DW / 時間のグルコース取り込み速度が想定される。

【図18】図18は、野生型E. coli（黒色）と比較した、4-ヒドロキシブチリルCoAからMAAへの経路で優先度の最も高いノックアウト株（灰色）の増殖連結型のMAA生成の特徴を示す図である。10 mmol / g DW / 時間のグルコース取り込み速度が想定される。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、メタクリル酸の生合成的生成能力を有する細胞および生物体の設計および生成を対象とする。本明細書に記載の結果は、代謝経路を設計し、組換えにより工学的に操作して、Escherichia coliおよび他の細胞または生物体でメタクリル酸の生合成を行うことができることを示す。メタクリル酸の生合成的生成は、設計された代謝遺伝型を有する株の構築によって確認することができる。理論的な最大増殖に達する条件下でを含めて、代謝について工学的に操作されたこれらの細胞または生物体を適応進化に曝してメタクリル酸生合成をさらに増強することもできる。

【0014】

本明細書で開示されるように、再生可能な糖フィードストックからの発酵を介して2-メタクリル酸を生成する生物体および方法が提供される。スクシニルCoA、アルファケトグルタレート、アセチルCoA、または他の中心的な代謝前駆体からMAAを生成する高収率の代謝経路が本明細書に記載される。発酵的MAA生成を実施する経路、その最大の生成物およびATP収率、ならびに候補遺伝子が本明細書で開示される。

【0015】

3-ヒドロキシイソブチレート中間体を通過する経路を、下流の酵素、すなわちデヒドラターゼを除外した場合に、メタクリレート生成ではなく3-ヒドロキシイソブチレート生成に適用できることが理解される（図2および6を参照）。この場合、天然に存在しない生物体は、メタクリレートの代わりに3-ヒドロキシイソブチレートを生成する。ある

10

20

30

40

50

いは、天然に存在しない生物体は、3-ヒドロキシイソブチレートおよびメタクリレートの混合物を生成し得る。メタクリレートまたは3-ヒドロキシイソブチレートが生成するかどうかにかかわらず、ATPおよび生成物の最大モル収率は変化しない。2-ヒドロキシイソブチリルCoA中間体を通過する経路を、下流の酵素、すなわちデヒドラターゼを除外し、2-ヒドロキシイソブチリルCoAトランスフェラーゼ、シンテターゼ、またはヒドロラーゼを適用した場合に、メタクリレート生成ではなく2-ヒドロキシイソブチレート生成に適用できることも理解される（図12を参照）。この場合、天然に存在しない生物体は、メタクリレートの代わりに2-ヒドロキシイソブチレートを生成する。あるいは、天然に存在しない生物体は、2-ヒドロキシイソブチレートおよびメタクリレートの混合物を生成し得る。メタクリレートまたは2-ヒドロキシイソブチレートが生成するかどうかにかかわらず、ATPおよび生成物の最大モル収率は変化しない。

10

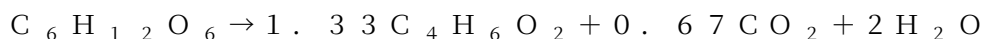
【0016】

所望により、本発明の微生物体によって発現された3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸をメタクリル酸に化学的に転換できることがさらに理解される。例えば米国特許第7,186,856号に記載のように、例えば3-ヒドロキシイソ酪酸またはβ-ヒドロキシイソ酪酸を脱水してメタクリル酸を形成することができる。米国特許第3,666,805号および米国特許第5,225,594号に記載のように、2-ヒドロキシイソ酪酸またはα-ヒドロキシイソ酪酸を脱水してメタクリル酸を形成することもできる。

【0017】

20

実施例IおよびIIIに記載する、スクシニルCoAから始まる2つの経路、ならびに実施例VおよびXIXに記載する、4-ヒドロキシブチリルCoAから始まる2つの経路は、嫌気的条件下での高収率（1.33mol/molグルコース）、好ましいエネルギー特性、および適切な酵素候補の利用可能性をもたらす。原料としてグルコースから開始するメタクリレートの最大理論収率は、下記に示すように1.33mol/molグルコースである：



実施例VII、IXおよびXIに記載する3つのさらなる経路は、好气的条件下で高収率でありエネルギー的に好ましい。これらの経路は、開始材料としてアルファケトグルタレート（実施例VIIおよびIX）またはアセチルCoA（実施例XI）から始まる。

30

【0018】

実施例XIII～XVに記載する3つのさらなる経路のもたらす収率は低い。代替のアセチルCoA経路（実施例XIII）は好气的条件下で高収率であるが冗長であり、最低でも7つの酵素段階が関与する。アクリリルCoA経路（実施例XV）は、嫌気的条件下および好气的条件下で高収率であるが、好ましくないエネルギー特性、毒性のある中間体（アクリリルCoA）の形成、および発酵副産物の分泌に対する高い感受性という不利な点を有する。2-ケトイソバレレート経路は好气的条件下で高収率であるが、潜在的に毒性のある中間体（MAA-CoA）を生成する不利な点も有する（実施例XV）。

【0019】

本明細書で用いるように、本発明の微生物の生物体または微生物に関して用いられる場合、用語「天然に存在しない」は、その微生物の生物体が、その参照種の野生型株を含むその参照種の天然株で通常見られない、少なくとも1つの遺伝的变化を有することを意味するものとする。遺伝的变化には、例えば、代謝ポリペプチドをコードする発現可能な核酸を導入する改変、他の核酸の付加、核酸欠失および／または微生物遺伝物質の他の機能的破壊が含まれる。そのような改変には、例えば、参照種の異種の、同種の、または異種および同種のポリペプチドのコード領域およびその機能的断片が含まれる。追加の改変には、例えば、その改変が遺伝子またはオペロンの発現を変化させる非コード調節領域が含まれる。例示的な代謝ポリペプチドには、メタクリル酸生合成経路内の酵素が含まれる。

40

【0020】

代謝改変は、その天然の状態から変更された生化学反応を指す。したがって、天然に存

50

在しない微生物は、代謝ポリペプチドまたはその機能的断片をコードする核酸に対する遺伝子改変を有することができる。例示的な代謝改変が、本明細書で開示される。

【0021】

本明細書で用いるように、微生物の生物体に関して用いられる場合、用語「単離された」は、参照の微生物の生物体が天然で見られるような少なくとも1つの成分を実質的に含まない生物体を意味するものとする。本用語は、その天然環境で見られるような一部または全ての成分が除去されている微生物の生物体を含む。本用語は、その微生物の生物体が天然に存在しない環境で見られるような一部または全ての成分が除去されている微生物の生物体も含む。したがって、単離された微生物の生物体は、それが天然で見られるか、またはそれが天然に存在しない環境で増殖され、保存されるか生存するような他の物質から一部または完全に分離される。単離された微生物の生物体の具体例には、部分的に純粋な微生物、実質的に純粋な微生物、および天然に存在しない培地で培養された微生物が含まれる。

10

【0022】

本明細書で用いるように、用語「微生物の」、「微生物の生物体」または「微生物」は、古細菌、細菌または真核生物のドメインに含まれる、微視的細胞として存在する任意の生物体を意味するものとする。したがって、本用語は、顕微鏡的大きさを有する原核生物または真核生物の細胞または生物体を包含するものとし、全ての種類の細菌、古細菌および真正細菌、ならびに酵母および真菌類などの真核生物の微生物を含む。本用語は、生化学物質の生成のために培養することができる、任意の種の細胞培養物も含む。

20

【0023】

本明細書で用いるように、化学式 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}_2$ (図1を参照) を有する「メタクリル酸」(IUPAC名 2-メチル-2-プロペン酸) は、メタクリレートの酸の形態であり、メタクリル酸およびメタクリレートは、その任意の塩の形態を含めて、その中性またはイオン化形態のいずれかの化合物を指すのに全体にわたって交換可能な形で使用できることが理解される。特定の形態がpHに依存することが当業者により理解される。

【0024】

同様に、2-ヒドロキシイソブチレートおよび2-ヒドロキシイソ酪酸が、その任意の塩の形態を含めて、その中性またはイオン化形態のいずれかの化合物を指すのに全体にわたって交換可能な形で使用できることが理解される。さらに、3-ヒドロキシイソブチレートおよび3-ヒドロキシイソ酪酸は、その任意の塩の形態を含めて、その中性またはイオン化形態のいずれかの化合物を指すのに全体にわたって交換可能な形で使用することができる。

30

【0025】

本明細書で用いるように、用語「CoA」または「補酵素A」は、活性酵素系を形成するためにその存在が多く酵素(アポ酵素)の活性のために必要とされる、有機コファクターまたは補欠分子族(酵素の非タンパク部分)を意味するものとする。補酵素Aは、特定の縮合酵素で機能し、アセチルまたは他のアシル基転移、ならびに脂肪酸合成および酸化、ピルベート酸化ならびに他のアセチル化で作用する。

40

【0026】

本明細書で用いるように、培養または増殖条件に関して用いられる場合、用語「実質的に嫌気性」は、酸素の量が、液体培地中の溶存酸素の飽和量の約10%未満であることを意味するものとする。本用語は、約1%未満の酸素の雰囲気で維持される、液体または固体培地の密封チャンバー、も含むものとする。

【0027】

本明細書で用いる「外因性」は、参照分子または参照活性が宿主の微生物の生物体に導入されることを意味するものとする。分子は、例えば、宿主染色体への組み込みなどによる宿主遺伝物質へのコード核酸の導入によって、またはプラスミドなどの非染色体遺伝物質として導入することができる。したがって、コード核酸の発現に関して用いられる本用語

50

は、微生物の生物体への発現可能な形でのコード核酸の導入を指す。生合成活性に関して用いられる場合、本用語は、宿主参照生物体に導入される活性を指す。供給源は、例えば、宿主の微生物の生物体への導入の後に参照活性を発現する、同種または異種のコード核酸であってよい。したがって、用語「内因性」は、宿主に存在する参照分子または活性を指す。同様に、コード核酸の発現に関して用いられる場合、本用語は、微生物の生物体に含まれるコード核酸の発現を指す。用語「異種の」は、参照種以外の供給源に由来する分子または活性を指し、「同種の」は、宿主の微生物の生物体に由来する分子または活性を指す。したがって、本発明のコード核酸の外因性の発現は、異種または同種のコード核酸のいずれかまたは両方を利用することができる。

【0028】

本発明の天然に存在しない微生物の生物体は安定した遺伝的变化を含むことができ、それは変化を失わずに5世代を超えて培養することができる微生物を指す。一般に、安定した遺伝的变化には、10世代を超えて存続する改変が含まれ、特に安定した改変は約25世代を超えて存続し、より詳しくは、安定した遺伝子改変は無期限を含めて50世代を超える。

【0029】

当業者は、本明細書で例示される代謝改変を含む遺伝的变化が、*E. coli*などの適切な宿主生物体およびそれらの対応する代謝反応、または所望の遺伝物質、例えば所望の代謝経路の遺伝子に適する供給源生物体に関して記載されることを理解するであろう。しかし、多種多様な生物体の完全なゲノム配列決定およびゲノミクスの領域における高レベルの技術を考慮して、当業者は、本明細書で提供される教示および指針を事実上他の全ての生物体に適用することが容易にできる。例えば、本明細書で例示した*E. coli*の代謝改変は、参照種以外の種からの同じであるか類似したコード核酸を組み込むことによって、他の種に容易に適用することができる。そのような遺伝的变化には、例えば、一般には種のホモログの遺伝的变化、より詳細には、オルソログ、パラログまたは非オルソログな遺伝子置換が含まれる。

【0030】

オルソログは、垂直伝達 (vertical descent) が関係し、異なる生物体での実質的に同じか同一の機能の役割を担う1つまたは複数の遺伝子である。例えば、マウスエポキシドヒドロラーゼおよびヒトエポキシドヒドロラーゼは、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考えることができる。遺伝子は、例えば、それらが同種であるか共通祖先からの進化によって関係していることを示すのに十分な量の配列類似性をそれらが共有する場合、垂直伝達に関係している。それらが、一次配列類似性が識別可能でない程度までそれらが共通祖先から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にも、遺伝子はオルソログと考えることができる。オルソログである遺伝子は、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。それらの三次元構造も類似性を示す場合、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も、垂直伝達によって生じたと考えることができる。組織プラスミノーゲン活性化因子およびエラスターゼを含む、酵素のセリンプロテアーゼファミリーのメンバーは、共通祖先から垂直伝達によって生じたと考えられる。

【0031】

オルソログには、例えば進化を通して構造または全体的活性が異なった、遺伝子またはそれらのコードされた遺伝子生成物が含まれる。例えば、1つの種が2つの機能を示す遺伝子生成物をコードし、そのような機能が第2の種の異なる遺伝子に分離されている場合、3つの遺伝子およびそれらの対応する生成物はオルソログであるとみなされる。生化学生成物の生成については、当業者は、天然に存在しない微生物の構築のために、導入または破壊される代謝活性を抱えているオルソログ遺伝子が選択されるべきであることを理解するであろう。分離できる活性を示すオルソログの例は、異なる活性が2つ以上の種の間で、または単一の種の中で異なる遺伝子生成物に分離されている場合である。具体例は

10

20

30

40

50

、セリンプロテアーゼ活性の2つの型であるエラスターゼタンパク質分解およびプラスミノゲンタンパク質分解の、プラスミノゲン活性化因子およびエラスターゼのような異なる分子への分離である。第2の例は、マイコプラズマ5' - 3' エキソヌクレアーゼおよび *Drosophila* DNAポリメラーゼIII活性の分離である。第1の種からのDNAポリメラーゼは、第2の種からのエキソヌクレアーゼまたはポリメラーゼの一方または両方にオルソログであると、またはその逆とみなすことができる。

【0032】

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よって関係があるホモログであり、類似または共通しているが、同一でない機能を有する。パラログは、例えば、同じ種または異なる種を起源とするかそれに由来することができる。例えば、ミクロソームのエポキシドヒドrolラーゼ（エポキシドヒドrolラーゼI）および可溶性のエポキシドヒドrolラーゼ（エポキシドヒドrolラーゼII）は、同じ種で異なる反応を触媒し、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、パラログと考えることができる。パラログは、かなりの相互配列類似性を有する同じ種からのタンパク質であり、共通祖先からの共進化を通してそれらが相同であるか関係することを示唆している。パラログスのタンパク質ファミリー群には、HspAホモログ、ルシフェラーゼ遺伝子、ペプチダーゼなどが含まれる。

【0033】

非オルソログス遺伝子置換は、異なる種の参照遺伝子機能の代わりになることができる、1つの種からの非オルソログス遺伝子である。置換には、例えば、異なる種での参照機能と比較して、起源種で実質的に同じかまたは類似した機能を発揮することができるものが含まれる。一般に、非オルソログス遺伝子置換は、参照機能をコードする公知の遺伝子に構造的に関係することを確認することが可能であるが、より構造的に関係しないが機能的に類似した遺伝子およびそれらの対応する遺伝子生成物も、本明細書で用いられるような用語の意味の範囲内である。例えば、機能的類似性は、置換しようとする機能をコードする遺伝子と比較して、非オルソログス遺伝子生成物の活性部位または結合性領域において少なくとも多少の構造類似性を要求する。したがって、非オルソログス遺伝子には、例えばパラログまたは無関係な遺伝子が含まれる。

【0034】

したがって、メタクリル酸生合成能力を有する本発明の天然に存在しない微生物の生物体を特定し、構築することにおいて、特定の種に本明細書で提供される教示および指針を適用することで、当業者は、代謝改変の特定にはオルソログの特定および組入れまたは不活化を含めることができることを理解する。パラログおよび／または非オルソログスな遺伝子置換が、類似したか実質的に類似した代謝反応を触媒する酵素をコードする参照微生物に存在する範囲内において、当業者はこれらの進化関係の遺伝子を利用することもできる。

【0035】

オルソログ、パラログおよび非オルソログスな遺伝子置換は、当業者に周知である方法によって決定することができる。例えば、2つのポリペプチドのための核酸またはアミノ酸配列の検査は、比較される配列間の配列の同一性および類似性を明らかにする。そのような類似性に基づいて、タンパク質が共通祖先からの進化を通して関係していることを示すのにその類似性が十分に高いかどうか、当業者は決定することができる。当業者に周知であるアルゴリズム、例えばAlign、BLAST、Clustal Wなどは、生の配列の類似性または同一性を比較、決定し、さらに、重みまたはスコアを割り当てることのできる配列中のギャップの存在または重要性を決定する。そのようなアルゴリズムは当技術分野でも公知であり、ヌクレオチド配列の類似性または同一性を決定することに同様に適用できる。関連性を決定するのに十分な類似性のパラメータは、統計的類似性、またはランダムなポリペプチド中で類似したマッチを見出す可能性、および決定されるマッチの有意性を計算するための周知の方法に基づいて計算される。所望により、2つ以上の配列のコンピュータによる比較を、当業者が視覚的に最適化することもできる。関係する遺

10

20

30

40

50

伝子生成物またはタンパク質は、高い類似性、例えば25%～100%の配列同一性を有すると予想することができる。無関係であるタンパク質は、十分なサイズのデータベースをスキャンする場合に偶然に起こることが予想されるのと事実上同じである同一性を有することができる(約5%)。5%から24%の間の配列は、比較する配列が関係していると結論するのに十分な相同性を表すことができるか、表すことができない。これらの配列の関連性を決定するために、データセットのサイズを前提とするそのようなマッチの有意性を決定する追加の統計分析を実施することができる。

【0036】

例えば、BLASTアルゴリズムを用いて2つ以上の配列の関連性を決定するための例示的なパラメータは、下に示すようなものでよい。簡単に述べると、アミノ酸配列アラインメントは、BLASTPバージョン2.0.8(1999年1月5日)および以下のパラメータを用いて実施することができる:マトリックス:0 BLOSUM62;ギャップオープン:11;ギャップ伸長:1;x_dropoff:50;予想:10.0;ワードサイズ:3;フィルター:オン。核酸配列アラインメントは、BLASTNバージョン2.0.6(1998年9月16日)および以下のパラメータを用いて実施することができる:マッチ:1;ミスマッチ:-2;ギャップオープン:5;ギャップ伸長:2;x_dropoff:50;予想:10.0;ワードサイズ:11;フィルター:オフ。当業者は、例えば、比較のストリンジエンシーを増加または低減させ、2つ以上の配列の関連性を決定するために、どのような改変を上記のパラメータに加えることができるかを知るであろう。

【0037】

本明細書で開示されるように、炭素基質としてグルコース/スクロースを使用して2-メタクリル酸(MAA)を合成する高収率の代謝経路について記載する。これらの経路を分析し順位付ける2つの主な基準は、好氣的条件下および嫌氣的条件下の両方におけるMAAの最大理論収率および関連するエネルギー特性であった。Reedら(Reedら、Genome Biol. 4巻、R54頁(2003年))に記載のものと類似するSimPheny(商標)において問題の経路をE.coliの化学量論ネットワークに加えることによって生成物およびエネルギー収率を計算した。MAAは生理的条件下では荷電分子であるため、生成物の搬出は、プロトン共輸送の機構により媒介されることが想定される。この輸送機構は、酸性の発酵条件下では熱力学的に好ましくない状態となるが、中性近くの発酵条件で熱力学的制限に遭遇することは予想されていない。経路中の反応および必要な酵素活性については実施例中で論じる。

【0038】

本発明は、メタクリル酸を生成することができる天然に存在しない微生物体を提供する。例えば、スクシニルCoAが前駆体であるメタクリル酸経路が提供される(実施例I～IV、図2および4を参照)。一実施形態では、本発明は、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、メチルマロニルCoAムターゼ、メチルマロニルCoAエピメラーゼ、メチルマロニルCoAレダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼおよび3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む微生物体を提供する(実施例IおよびIIならびに図2を参照)。別の実施形態では、本発明は、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、メチルマロニルCoAムターゼ、メチルマロニルCoAエピメラーゼ、アルコール/アルデヒドデヒドロゲナーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む微生物体を提供する(実施例Iを参照)。本発明は、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、メチルマロニルCoAムターゼ、メチルマロニルCoAエピメラーゼ、メチルマロニルCoAレダクターゼ、

3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アンモニアリアーゼを含む微生物体をさらに提供する（実施例 I I I および I V ならびに図 4 を参照）。

【0039】

前駆体として4-ヒドロキシブチリル CoA を有するメタクリル酸経路を含有する天然に存在しない微生物体がさらに提供される。1つのそのような実施形態は、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル CoA シンテターゼまたは3-ヒドロキシイソブチリル CoA ヒドロラーゼまたは3-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む微生物体である（実施例 V および V I ならびに図 6 を参照）。あるいは、この経路は、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ；およびメタクリル CoA シンテターゼまたはメタクリル CoA ヒドロラーゼまたはメタクリル CoA トランスフェラーゼを含み得る。

【0040】

さらに、本発明は、前駆体として4-ヒドロキシブチリル CoA を有する3-ヒドロキシイソ酪酸経路を含有する天然に存在しない微生物体を提供する。1つのそのような実施形態は、3-ヒドロキシイソ酪酸経路を有する天然に存在しない微生物体であって、3-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な量で発現される3-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、3-ヒドロキシイソ酪酸経路が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ；および3-ヒドロキシイソブチリル CoA シンテターゼまたは3-ヒドロキシイソブチリル CoA ヒドロラーゼまたは3-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼを含む微生物体である（実施例 V および図 6 を参照）。

【0041】

本発明は、前駆体としてアルファ-ケトグルタレート有するメタクリル酸経路を含有する天然に存在しない微生物体をさらに提供する。1つのそのような実施形態は、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸ムターゼ、3-メチルアスパルターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼを含む微生物体である（実施例 V I I および V I I I ならびに図 8 を参照）。さらに別の実施形態では、本発明は、天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、メタクリル酸経路が、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ、2-ヒドロキシグルタミン酸ムターゼ、3-メチルリンゴ酸デヒドラターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼを含む微生物体を提供する（実施例 I X および X ならびに図 10 を参照）。

【0042】

さらに別の実施形態では、本発明は、前駆体としてアセチル CoA を有するメタクリル酸経路を含有する天然に存在しない微生物体を提供する。例えば、本発明は、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ、およびメタクリル CoA トランスフェラーゼまたはメタクリル CoA ヒドロラーゼまたはメタクリル CoA シンテターゼを含む微生物体を提供する（実施例 X I および X I I ならびに図 12 を参照）。別の実施形態では、本発明は、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量

で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、アセトアセチルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ、エノイルC o Aヒドラターゼ、および3-ヒドロキシイソブチリルC o Aヒドロラーゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルC o Aシンテターゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルC o Aトランスフェラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む微生物体を提供する（実施例X IおよびX I Iを参照）。

【0043】

さらに別の実施形態では、本発明は、前駆体としてアセチルC o Aを有する2-ヒドロキシイソ酪酸経路を含有する天然に存在しない微生物体を提供する。例えば、本発明は、2-ヒドロキシイソ酪酸経路を有する天然に存在しない微生物体であって、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な量で発現される2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、2-ヒドロキシイソ酪酸経路が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ；アセトアセチルC o Aレダクターゼ；3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ；および2-ヒドロキシイソブチリルC o Aヒドロラーゼまたは2-ヒドロキシイソブチリルC o Aシンテターゼまたは2-ヒドロキシイソブチリルC o Aトランスフェラーゼを含む微生物体を提供する（実施例X Iおよび図12を参照）。

【0044】

さらなる実施形態では、本発明は、前駆体として4-ヒドロキシブチリルC o Aを有するメタクリル酸または2-ヒドロキシイソ酪酸経路を含有する天然に存在しない微生物体を提供する。例えば、本発明は、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、4-ヒドロキシブチリルC o Aデヒドラターゼ；ビニルアセチルC o A Δ-イソメラーゼ；クロトナーゼ；3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ；2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ；およびメタクリルC o AヒドロラーゼまたはメタクリルC o AシンテターゼまたはメタクリルC o Aトランスフェラーゼを含む微生物体を提供する（実施例X V I I Iおよび図12を参照）。さらに、本発明は、2-ヒドロキシイソ酪酸経路を有する天然に存在しない微生物体であって、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な量で発現される2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、2-ヒドロキシイソ酪酸経路が、4-ヒドロキシブチリルC o Aデヒドラターゼ；ビニルアセチルC o A Δ-イソメラーゼ；クロトナーゼ；3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ；および2-ヒドロキシイソブチリルC o Aヒドロラーゼまたは2-ヒドロキシイソブチリルC o Aシンテターゼまたは2-ヒドロキシイソブチリルC o Aトランスフェラーゼを含む微生物体を提供する（実施例X V I I Iおよび図12を参照）。

【0045】

さらに別の実施形態では、本発明は、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、アセトアセチルC o Aレダクターゼ、クロトナーゼ、ブチリルC o Aデヒドロゲナーゼ、イソブチリルC o Aムターゼ、イソブチリルC o Aデヒドロゲナーゼ、およびメタクリルC o AシンテターゼまたはメタクリルC o AヒドロラーゼまたはメタクリルC o Aトランスフェラーゼを含む微生物体を提供する（実施例X I I Iおよび図13を参照）。

【0046】

本発明は、前駆体としてピルベートを有するメタクリル酸経路を含有する天然に存在しない微生物体をさらに提供する。例えば、本発明は、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、乳酸デヒドロゲナーゼ、ラクテートC o Aトランスフェラーゼ、ラクトイルC o Aデヒド

10

20

30

40

50

ラターゼ、アシルC o Aデヒドロゲナーゼ、プロピオニルC o Aカルボキシラーゼ、メチルマロニルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む微生物体を提供する（実施例X I Vおよび図14を参照）。

【0047】

前駆体として2-ケトイソバレレートを含むメタクリル酸経路を含有する天然に存在しない微生物体も本発明によって提供される。例えば、本発明は、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、バリンアミノトランスフェラーゼ、2-ケトイソ吉草酸デヒドロゲナーゼ、
10 イソブチリルC o Aデヒドロゲナーゼ、およびメタクリリルC o AシンテターゼまたはメタクリリルC o AヒドラーゼまたはメタクリリルC o Aトランスフェラーゼを含む微生物体を提供する（実施例X Vおよび図15を参照）。そのようなメタクリル酸経路は、バリンを2-ケトイソバレレートに転換（図15）するバリンアミノトランスフェラーゼをさらに含有し得る。さらに、そのようなメタクリル酸経路は、アセト乳酸シンターゼ、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼおよびジヒドロキシ酸デヒドラターゼなど、ピルベートを2-ケトイソバレレートに転換（図15）する酵素をさらに含有し得る（実施例X Vを参照）。

【0048】

追加の実施形態では、本発明は、2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体であって、基質を生成物に転換するタンパク質または酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む微生物体を提供する。そのような経路は、例えば、スクシニルC o Aから3-ヒドロキシイソブチレートへの経路では、スクシニルC o AからメチルマロニルC o Aへ、メチルマロニルC o Aからメチルマロン酸セミアルデヒドへ、メチルマロン酸セミアルデヒドから3-ヒドロキシイソブチレートへの経路、スクシニルC o Aからメタクリル酸への経路ではさらに3-ヒドロキシイソブチレートからメタクリル酸への経路であり得る（図2を参照）。さらに、そのような経路は、例えば、スクシニルC o Aからメタクリル酸への代替経路では、スクシニルC o AからメチルマロニルC o Aへ、メチルマロニルC o Aからメチルマロン酸セミアルデヒドへ、メチルマロン酸セミアルデヒドから3-アミノ-2-メチルプロピオ
20 ネートへ、3-アミノ-2-メチルプロピオネートからメタクリル酸への経路であり得る（図4を参照）。

【0049】

別の実施形態では、そのような経路は、例えば、4-ヒドロキシブチリルC o Aから3-ヒドロキシイソブチレートへの経路では、4-ヒドロキシブチリルC o Aから3-ヒドロキシイソブチリルC o Aへ、3-ヒドロキシイソブチリルC o Aから3-ヒドロキシイソブチレートへの経路、4-ヒドロキシブチリルC o Aからメタクリル酸への経路ではさらに3-ヒドロキシイソブチレートからメタクリル酸への経路であり得る（図6を参照）。さらに、そのような経路は、例えば、アルファ-ケトグルタレートからメタクリル酸への経路では、アルファ-ケトグルタレートからグルタメートへ、グルタメートからトレオ
40 -3-メチルアスパルテートへ、トレオ-3-メチルアスパルテートからメサコネートへ、メサコネートからメタクリル酸への経路であり得る（図8）。また、そのような経路は、例えば、アルファ-ケトグルタレートからメタクリル酸への経路では、アルファ-ケトグルタレートから2-ヒドロキシグルタレートへ、2-ヒドロキシグルタレートから3-メチルマレートへ、3-メチルマレートからメサコネートへ、メサコネートからメタクリル酸への経路であり得る（図10）。

【0050】

さらに別の実施形態では、そのような経路は、例えば、アセチルC o Aからメタクリル酸への経路では、アセチルC o AからアセトアセチルC o Aへ、アセトアセチルC o Aから3-ヒドロキシブチリルC o Aへ、3-ヒドロキシブチリルC o Aから2-ヒドロキシ
50

イソブチリルC o Aへ、2-ヒドロキシイソブチリルC o AからメタクリリルC o Aへ、メタクリリルC o Aからメタクリル酸への経路であり得る(図12)。また、そのような経路は、例えば、4-ヒドロキシブチリルC o Aからメタクリル酸への経路では、4-ヒドロキシブチリルC o AからビニルアセチルC o Aへ、ビニルアセチルC o AからクロトニルC o Aへ、クロトニルC o Aから3-ヒドロキシブチリルC o Aへ、3-ヒドロキシブチリルC o Aから2-ヒドロキシイソブチリルC o Aへ、2-ヒドロキシイソブチリルC o AからメタクリリルC o Aへ、メタクリリルC o Aからメタクリル酸への経路であり得る(図12)。

【0051】

さらに別の実施形態では、そのような経路は、例えば、アセチルC o Aから2-ヒドロキシイソ酪酸への経路では、アセチルC o AからアセトアセチルC o Aへ、アセトアセチルC o Aから3-ヒドロキシブチリルC o Aへ、3-ヒドロキシブチリルC o Aから2-ヒドロキシイソブチリルC o Aへ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aから2-ヒドロキシイソ酪酸への経路であり得る(図12)。また、そのような経路は、例えば、4-ヒドロキシブチリルC o Aから2-ヒドロキシイソ酪酸への経路では、4-ヒドロキシブチリルC o AからビニルアセチルC o Aへ、ビニルアセチルC o AからクロトニルC o Aへ、クロトニルC o Aから3-ヒドロキシブチリルC o Aへ、3-ヒドロキシブチリルC o Aから2-ヒドロキシイソブチリルC o Aへ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aから2-ヒドロキシイソ酪酸への経路であり得る(図12)。

【0052】

別の実施形態では、そのような経路は、例えば、アセチルC o AからアセトアセチルC o Aへ、アセトアセチルC o Aから3-ヒドロキシブチリルC o Aへ、3-ヒドロキシブチリルC o AからクロトニルC o Aへ、クロトニルC o AからブチリルC o Aへ、ブチリルC o AからイソブチリルC o Aへ、イソブチリルC o AからメタクリリルC o Aへ、メタクリリルC o Aからメタクリル酸への経路であり得る(図13)。さらに、そのような経路は、例えば、ピルベートからラクテートへ、ラクテートからラクトイルC o Aへ、ラクトイルC o AからアクリリルC o Aへ、アクリリルC o AからプロピオニルC o Aへ、プロピオニルC o AからメチルマロニルC o Aへ、メチルマロニルC o Aからメタクリル酸への経路であり得る(図14)。また、そのような経路は、例えば、ピルベートからメタクリル酸への経路では、ピルベートから2-ケトイソバレレートへ、2-ケトイソバレレートからイソブチリルC o Aへ、イソブチリルC o AからメタクリリルC o Aへ、メタクリリルC o Aからメタクリル酸への経路であり得る(図15)。あるいは、そのような経路は、例えば、バリンからメタクリル酸への経路では、バリンから2-ケトイソバレレートへ、2-ケトイソバレレートからイソブチリルC o Aへ、イソブチリルC o AからメタクリリルC o Aへ、メタクリリルC o Aからメタクリル酸への経路であり得る(図15)。したがって、本発明は、図2、4、6、8、10、および12~15に示すものなどの、2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸経路の基質および生成物を転換する酵素またはタンパク質をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含有する天然に存在しない微生物体を提供する。

【0053】

一般に代謝反応、その反応体もしくは生成物に言及しつつ、または特に参照代謝反応、反応体もしくは生成物に関連しまたはそれを触媒する酵素をコードする1つまたは複数の核酸または遺伝子に言及しつつ、本明細書において本発明を説明する。本明細書で明示的に述べられていない限り、当業者は、反応への言及が、反応の反応体および生成物への言及も構成することを理解するであろう。同様に、本明細書で明示的に述べられていない限り、反応体または生成物への言及は反応にも言及し、これらの代謝構成要素のいずれかへの言及は、参照反応、反応体または生成物を触媒する酵素をコードする1つまたは複数の遺伝子にも言及するものである。同様にして、代謝生化学、酵素学およびゲノミクスの周知の分野を考慮すると、本明細書での遺伝子またはコード核酸への言及は、対応するコードされた酵素およびそれが触媒する反応、ならびにその反応の反応体および生成物への言

及も構成する。

【0054】

本発明の天然に存在しない微生物体は、1つまたは複数のメタクリル酸生合成経路に関与する1つまたは複数の酵素をコードする発現可能な核酸を導入することによって生成することができる。同様に、本発明の天然に存在しない微生物体は、1つまたは複数の3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸経路に関与する1つまたは複数の酵素をコードする発現可能な核酸を導入することによって生成することができる。生合成に選択される宿主微生物体に応じて、特定のメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸生合成経路の一部または全部の核酸を発現させることができる。例えば、選択された宿主で所望の生合成経路の1つまたは複数の酵素が欠損している場合、欠損している(1つまたは複数の)酵素の発現可能な核酸を宿主に導入し、その後外因性に発現させる。あるいは、選択された宿主で経路の一部の遺伝子の内因性発現を示すが、他は欠損している場合、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸、または2-ヒドロキシイソ酪酸の生合成を達成するには、欠損している(1つまたは複数の)酵素のコード核酸が必要である。したがって、外因性の酵素活性を導入することにより本発明の天然に存在しない微生物体を生成して所望の生合成経路を得ることができ、または1つもしくは複数の内因性酵素と共に、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸もしくは2-ヒドロキシイソ酪酸などの所望の生成物を生成する1つもしくは複数の外因性の酵素活性を導入することにより所望の生合成経路を得ることができる。

【0055】

選択された宿主微生物体のメタクリル酸生合成経路の構成要素に応じて、本発明の天然に存在しない微生物体は、外因性に発現されるメタクリル酸経路をコードする少なくとも1つの核酸、および1つまたは複数のメタクリル酸生合成経路をコードする最大で全ての核酸を含む。例えば、対応するコード核酸の外因性発現により、経路の酵素が欠損している宿主でメタクリル酸の生合成を確立することができる。メタクリル酸経路の全ての酵素が欠損している宿主では、経路中の全ての酵素の外因性発現を含めることができるが、宿主が経路の少なくとも1つの酵素を含有する場合でも、経路の全ての酵素を発現させることができることが理解される。同様に、選択された宿主微生物体の3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸生合成経路の構成要素に応じて、本発明の天然に存在しない微生物体は、それぞれ、外因性に発現される3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸経路をコードする少なくとも1つの核酸、および1つまたは複数の3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸生合成経路をコードする最大で全ての核酸を含む。

【0056】

例えば、メタクリル酸を生成する経路中の全ての酵素の外因性発現を含めることができる。例えば、メチルマロニルCoAムターゼ、メチルマロニルCoAエピメラーゼ、メチルマロニルCoAレダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼおよび3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼなど、メタクリル酸を生成する経路中の全ての酵素を含めることができる。メタクリル酸経路中の酵素の別の例には、メチルマロニルCoAムターゼ、メチルマロニルCoAエピメラーゼ、アルコール/アルデヒドデヒドロゲナーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼが含まれる。メタクリル酸経路中の酵素のさらなる例には、メチルマロニルCoAムターゼ、メチルマロニルCoAエピメラーゼ、メチルマロニルCoAレダクターゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アンモニアリアーゼが含まれる。メタクリル酸経路中の酵素のさらに別の例には、4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルCoAシンテターゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルCoAヒドロラーゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルCoAトランスフェラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼが含まれる。また、メタクリル酸経路中の酵素の例には、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸ムターゼ、3-メチルアスパルターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼも含まれる。メタクリル酸経路中の

酵素のさらに別の例には、アルファーケトグルタル酸レダクターゼ、2-ヒドロキシグルタミン酸ムターゼ、3-メチルリンゴ酸デヒドラターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼが含まれる。メタクリル酸経路中の酵素のさらなる例には、アセトアセチルCoAチオラーゼ、アセトアセチルCoAレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルCoAデヒドラターゼ、およびメタクリリルCoAトランスフェラーゼまたはメタクリリルCoAヒドロラーゼまたはメタクリリルCoAシンテターゼが含まれる。メタクリル酸経路中の酵素のさらに別の例には、アセトアセチルCoAチオラーゼ、アセトアセチルCoAレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルCoAデヒドラターゼ、エノイルCoAヒドラターゼ、および3-ヒドロキシイソブチリルCoAヒドロラーゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルCoAシンテターゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルCoAトランスフェラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼが含まれる。本明細書で開示されるこれらおよび任意のメタクリル酸経路を微生物体中で利用して、メタクリル酸を生成する微生物体を得ることができることが理解される。

【0057】

本明細書で提供される教示および指針を考慮すると、当業者は、発現可能な形で導入するコード核酸の数が、少なくとも、選択される宿主微生物体のメタクリル酸経路の欠損に対応することを理解するであろう。したがって、本発明の天然に存在しない微生物体は、本明細書で開示されるメタクリル酸生合成経路を構成する上記の酵素をコードする核酸を、1、2、3、4個など、または最大で全て有することができる。一部の実施形態では、天然に存在しない微生物体は、メタクリル酸生合成を促進もしくは最適化するか、または宿主微生物体に他の有用な機能を付与する他の遺伝子改変を含むこともできる。1つのそのような他の機能は、例えば、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸経路の前駆体の1つまたは複数の合成の増強を含むことができる。例示的なメタクリル酸経路の前駆体には、それらに限定されないが、スクシニルCoA、4-ヒドロキシブチリルCoA、アルファーケトグルタレート、アセチルCoA、ピルベート、および2-ケトイソバレレートが含まれる。

【0058】

一般に、宿主微生物体は、天然に生成される分子として、または所望の前駆体のdenovo生成をもたらすか、宿主微生物体によって天然に生成される前駆体の生成の増加をもたらす工学的生成物として、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸経路の前駆体を生成するように選択される。例えば、スクシニルCoA、アルファーケトグルタレート、アセチルCoA、およびピルベートは、E. coliなどの宿主生物体中で、グルコース、脂肪酸およびアミノ酸代謝の間にTCAサイクルの構成成分として天然に生成される。本明細書で開示されるように、宿主生物体は、前駆体の生成を増加させるように工学的に処理することができる。そのような工学的に処理された微生物は以前に記載されている（例えば、米国特許公開第2007/0111294号を参照）。さらに、本明細書で開示されるように、所望の前駆体を生成するように工学的に処理された微生物体、例えば4-ヒドロキシブチリルCoAを生成するように工学的に処理された微生物は、宿主生物体として用いることができる（例えば、2008年3月14日出願の米国特許出願第12/049,256号を参照）。そのような宿主生物体は、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素を発現するようにさらに工学的に処理することができる。

【0059】

一部の実施形態では、本発明の天然に存在しない微生物体は、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸を合成する酵素能力を含有する宿主から生成される。この具体的な実施形態では、例えばメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸経路の反応をメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸生成の方へ誘導するために、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸経路の生成物の合成または蓄積を増加させることが有

用なことがある。合成または蓄積の増加は、例えば、上記に記載のメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素の1つまたは複数をコードする核酸の過剰発現によって達成することができる。メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸経路の1つまたは複数の酵素の過剰発現は、例えば、内因性の1つまたは複数の遺伝子の外因性発現を通して、または異種の1つまたは複数の遺伝子の外因性発現を通して行うことができる。したがって、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸生合成経路の酵素をコードする、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸経路に応じて1、2、3、4、5個などの核酸、すなわち、最大で全てを含む核酸の過剰発現を通して、天然に存在する生物体を容易に、例えばメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する、本発明の天然に存在しない微生物体にすることができる。さらに、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸生合成経路中の酵素の活性の増加をもたらす内因性遺伝子の突然変異誘発によって、天然に存在しない生物体を生成することができる。

10

【0060】

特に有用な実施形態では、コード核酸の外因性発現が使用される。外因性発現は、発現および／または調節エレメントを宿主および用途向けに調整する能力を付与し、使用者によって制御される所望の発現レベルを達成する。しかし、誘導可能なプロモーターまたは他の調節エレメントに連結する場合、負の調節エフェクターの除去または遺伝子のプロモーターの誘導などによって、内因性発現を他の実施形態で利用することもできる。したがって、天然に存在する誘導可能なプロモーターを有する内因性遺伝子は、適当な誘導剤を提供することによって上方制御することができるか、または、内因性遺伝子の調節領域を誘導可能な調節エレメントを組み込むように工学的に処理し、それによって所望の時間における内因性遺伝子の発現の増加の調節を可能にすることができる。同様に、天然に存在しない微生物体に導入される外因性遺伝子のための調節エレメントとして、誘導可能なプロモーターを含めることができる。

20

【0061】

本発明の方法では、1つまたは複数の外因性核酸のいずれかを微生物体に導入して、本発明の天然に存在しない微生物体を生成することができることが理解される。核酸は、例えば、微生物体にメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸生合成経路を付与するように導入することができる。あるいは、コード核酸を導入して、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸生合成能力を付与するために必要とされる反応のいくつかを触媒する生合成能力を有する、中間の微生物体を生成することができる。例えば、メタクリル酸生合成経路を有する天然に存在しない微生物体は、所望の酵素をコードする少なくとも2つの外因性核酸を含むことができる。1つの例示的な組合せには、メチルマロニルCoAムターゼおよびメチルマロニルCoAエピメラーゼ；またはメチルマロニルCoAムターゼおよびメチルマロニルCoAレダクターゼ；3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼおよび3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼなどの組合せが含まれる。別の例示的な経路では、組合せは、4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼおよび3-ヒドロキシイソブチリルCoAトランスフェラーゼ；3-ヒドロキシイソブチリルCoAシンテターゼおよび3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼ；4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼおよび3-ヒドロキシイソブチリルCoAシンテターゼなどを含み得る。したがって、生合成経路の2つ以上の酵素の任意の組合せを、本発明の天然に存在しない微生物体に含めることができることが理解される。

30

40

【0062】

同様に、生合成経路の3つ以上の酵素の任意の組合せ、例えば、メチルマロニルCoAムターゼ、メチルマロニルCoAエピメラーゼ、およびメチルマロニルCoAレダクターゼ；メチルマロニルCoAエピメラーゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アンモニアリアーゼなどを、本発明の天然に存在しない微生物体に含めることができることが理解される。別の例では、

50

組合せは、所望の生合成経路の酵素の組合せが対応する所望の生成物の生成をもたらす限り、所望により、アルファークトグルタル酸レダクターゼ、3-メチルリンゴ酸デヒドラターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼ；2-ヒドロキシグルタミン酸ムターゼ、3-メチルリンゴ酸デヒドラターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼなどであり得る。同様に、所望の生合成経路の酵素の組合せが対応する所望の生成物の生成をもたらす限り、所望により、本明細書で開示される生合成経路の、所望の経路に応じて4つ、5つ、6つまたはそれ以上の酵素の任意の組合せを、本発明の天然に存在しない微生物体を含めることができる。

【0063】

本明細書に記載のメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸の生合成に加えて、本発明の天然に存在しない微生物体および方法を、様々な相互の組合せならびに当技術分野で周知である他の微生物体および方法との組合せで利用して、他の経路による生成物の生合成を達成することもできる。例えば、メタクリル酸生産体の使用以外でメタクリル酸を生成する1つの代替形態は、メタクリル酸経路の中間体をメタクリル酸に転換することができる別の微生物体を追加することによるものである。そのような方法の1つは、例えば、メタクリル酸経路の中間体を生成する微生物体の発酵を含む。次に、メタクリル酸経路の中間体は、メタクリル酸経路の中間体をメタクリル酸に転換する第2の微生物体のための基質として用いることができる。メタクリル酸経路の中間体を、第2の生物体の別の培養物に直接加えることができ、または、メタクリル酸経路中間体の生産体の元の培養物から、例えば細胞分離によってこれらの微生物体を除去することができ、次に、発酵ブロスへの第2の生物体のその後の添加を利用して、中間体の精製ステップなしで最終生成物を生成することができる。

【0064】

他の実施形態では、本発明の天然に存在しない微生物体および方法を多種多様な下位経路で組み立てて、例えばメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸の生合成を達成することができる。これらの実施形態では、本発明の所望の生成物の生合成経路を異なる微生物体に分離することができ、異なる微生物体を共培養して最終生成物を生成することができる。そのような生合成スキームでは、1つの微生物体の生成物は、最終生成物が合成されるまで第2の微生物体のための基質である。例えば、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸の生合成は、1つの経路の中間体を別の経路の中間体または生成物に転換する生合成経路を含有する微生物体を構築することによって達成することができる。あるいは、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸は、同じ容器中で2つの生物体を用いる共培養または共発酵を通して微生物体から生合成的に生成することもでき、その場合、第1の微生物体はメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸経路の中間体を生成し、第2の微生物体は中間体をメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸に変換する。

【0065】

本明細書で提供される教示および指針を考慮すると、当業者は、本発明の天然に存在しない微生物体および方法について、他の微生物体、下位経路を有する他の天然に存在しない微生物体の共培養、ならびにメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸を生成することが当技術分野で周知である他の化学的方法および／または生化学的方法の組合せとの、多種多様な組合せおよび置換が存在することを理解するであろう。例えば、3-ヒドロキシイソ酪酸を形成する発酵を、メチルメタクリレートをもたらす精製スキームと組み合わせることができる（WO 2002/090312を参照）。

【0066】

メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする核酸の供給源は、例えば、コードされる遺伝子産物が参照反応を触媒することができる任意の種を含み得る。そのような種には、それらに限定されないが、古細菌および真正細菌を含む細菌、ならびに酵母、植物、昆虫、動物およびヒトを含む哺乳動物を含む

真核生物を含む、原核生物および真核生物両方の生物体が含まれる。そのような供給源の例示的な種には、例えば、

【 0 0 6 7 】

【 化 1 】

Escherichia coli, *Homo*

sapiens, *Propionibacterium fredenreichii*, *Methylobacterium extorquens*, *Shigella flexneri*,
Salmonella enterica, *Yersinia frederiksenii*, *Propionibacterium acnes*, *Rattus norvegicus*,
Caenorhabditis elegans, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baylyi*,
Acinetobacter sp., *Clostridium kluyveri*, *Pseudomonas* sp., *Thermus thermophilus*, *Pseudomonas*
aeruginosa, *Pseudomonas putida*, *Oryctolagus cuniculus*, *Clostridium acetobutylicum*,
Leuconostoc mesenteroides, *Eubacterium barkeri*, *Bacteroides capillosus*, *Anaerotruncus*
colihominis, *Natrananaerobius thermophilus*, *Campylobacter jejuni*, *Arabidopsis thaliana*,
Corynebacterium glutamicum, *Sus scrofa*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia*
marcescens, *Streptomyces coelicolor*, *Methylibium petroleiphilum*, *Streptomyces cinnamomensis*,
Streptomyces avermitilis, *Archaeoglobus fulgidus*, *Haloarcula marismortui*, *Pyrobaculum*
aerophilum, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium cochlearium*, *Clostridium tetanomorphum*,
Clostridium tetani, *Citrobacter amalonaticus*, *Ralstonia eutropha*, *Mus musculus*, *Bos taurus*,
Fusobacterium nucleatum, *Morganella morganii*, *Clostridium pasteurianum*, *Rhodobacter*
sphaeroides, *Xanthobacter autotrophicus*, *Clostridium propionicum*, *Megasphaera elsdenii*,
Aspergillus terreus, *Candida*, *Sulfolobus tokodaii*, *Metallosphaera sedula*, *Chloroflexus*
aurantiacus, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Acidaminococcus fermentans*,
Helicobacter pylori,

、ならびに本明細書で開示されるか、対応する遺伝子の供給源生物体として利用可能な他の例示的な種が含まれる。しかし、395種の微生物ゲノムおよび様々な酵母、真菌、植物および哺乳動物のゲノムを含む、今では550を超える種（これらの半分を超えるものがNCBIなどの公開データベースで利用可能）について完全なゲノム配列が利用可能であるので、例えば、公知の遺伝子のホモログ、オルソログ、パラログおよび非オルソログス遺伝子の置換物を含む、関係のあるまたは遠戚の種における1つまたは複数の遺伝子に必要なメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸生合成活性をコードする遺伝子の同定、ならびに生物体間の遺伝子変化の交換は、当技術分野で日常的であり周知である。したがって、E. coliなどの特定の生物体に関して本明細書で記載されるメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸の生合成を可能にする代謝変化は、原核生物および真核生物の生物体を同様に含む他の微生物に容易に適用することができる。本明細書で提供される教示および指針を考慮すると、当業者は、1つの生物体で例示される代謝変化を他の生物体に同等に適用することができることを知るであろう。

【 0 0 6 8 】

代替のメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸生合成経路が無関係な種に存在する場合などの一部の例では、例えば、参照反応の代わりに類似するが同一でない代謝反応を触媒する、無関係な種からの1つまたは複数のパラログの外因性発現によって、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸生合成を宿主種に付与することができる。異なる生物体間で代謝ネットワーク間に特定の違いがあるので、当業者は、異なる生物体間で実際の遺伝子の使用が異なる可能性があることを理解するであろう。しかし、本明細書で提供される教示および指針を考慮すると、当業者は、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸を合成

する対象種で微生物体を構築するために、本明細書で例示される微生物体に対するコグネイト代謝変化を用いて本発明の教示および方法を全ての微生物体に適用することができることも理解するであろう。

【0069】

宿主微生物体を、例えば、細菌、酵母、真菌、または発酵プロセスに適用できる様々な他の微生物のいずれかから選択し、天然に存在しない微生物体をそれらで生成することができる。例示的な細菌には、

【0070】

【化2】

Escherichia coli, *Klebsiella oxytoca*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*,
Actinobacillus succinogenes, *Mannheimia succiniciproducens*, *Rhizobium etli*, *Bacillus subtilis*,
Corynebacterium glutamicum, *Gluconobacter oxydans*, *Zymomonas mobilis*, *Lactococcus lactis*,
Lactobacillus plantarum, *Streptomyces coelicolor*, *Clostridium acetobutylicum*, *Pseudomonas fluorescens*, および *Pseudomonas putida*.

10

から選択される種が含まれる。例示的な酵母または真菌には、

【0071】

【化3】

Saccharomyces cerevisiae, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* および *Pichia pastoris*.

20

から選択される種が含まれる。E. coli は、遺伝子工学に適した、十分に特徴付けられている微生物体であるので、特に有用な宿主生物体である。他の特に有用な宿主生物体には、*Saccharomyces cerevisiae* などの酵母が含まれる。

【0072】

天然に存在しないメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸産生宿主を構築しその発現レベルを検査するための方法は、例えば、当技術分野で周知である組換えおよび検出方法によって実施することができる。そのような方法は、例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory、New York (2001年) および Ausubelら、*Current Protocols in Molecular Biology*、John Wiley and Sons、Baltimore、MD (1999年) の記載に認めることができる。

30

【0073】

メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する経路に参与する外因性核酸配列は、それらに限定されないが、コンジュゲーション、エレクトロポレーション、化学的変換、形質導入、トランスフェクションおよび超音波形質転換を含む当技術分野で周知の技術を用いて、宿主細胞に安定してまたは一時的に導入することができる。E. coli または他の原核細胞での外因性発現では、遺伝子のいくつかの核酸配列または真核生物の核酸のcDNAは、N末端ミトコンドリアなどのターゲティングシグナルまたは他のターゲティングシグナルをコードすることができ、それは、所望により、原核生物の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、ミトコンドリアのリーダー配列を除去すると、E. coli での発現が増加した (Hoffmeisterら、*J. Biol. Chem.* 280巻、4329~4338頁 (2005年))。酵母または他の真核細胞での外因性発現では、宿主細胞に適したミトコンドリアのターゲティングまたは分泌シグナルなどの適切なターゲティング配列を加えることによって、遺伝子は、リーダー配列を加えることなしにサイトゾルで発現させることができるか、またはミトコンドリアもしくは他のオルガネラを標的にすることができるか、または

40

50

分泌を標的にすることができる。したがって、核酸配列にターゲティング配列を除去するか含めるための適当な改変を外因性核酸配列に組み込んで、望ましい特性を付与できることが理解される。さらに、当技術分野で周知の技術を用いて遺伝子にコドン最適化を行って、タンパク質の最適化された発現を達成することができる。

【0074】

宿主生物体で機能的である発現調節配列に作動可能に連結されている、本明細書で例示される核酸をコードする1つまたは複数のメタクリル酸生合成経路を含むように、1つまたは複数の発現ベクターを構築することができる。本発明の微生物宿主生物体での使用に適用可能な発現ベクターには、例えば、宿主染色体への安定した組み込みで作動可能なベクターおよび選択配列またはマーカーを含めて、プラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター、エピソームおよび人工染色体が含まれる。さらに、発現ベクターは、1つまたは複数の選択可能なマーカー遺伝子および適当な発現調節配列を含むことができる。例えば、抗生物質もしくは毒素に対する耐性を提供するか、栄養要求性の欠乏を補充するか、または培地中にない重大な栄養素を供給する、選択可能なマーカー遺伝子を含めることもできる。発現調節配列は、当技術分野で周知である、構成的および誘導可能なプロモーター、転写エンハンサー、転写ターミネーターなどを含めることができる。2つ以上の外因性コード核酸を共発現させる場合、両方の核酸を、例えば、単一の発現ベクターまたは別々の発現ベクターに挿入することができる。単一ベクターの発現では、コード核酸を作動的に1つの共通の発現調節配列に連結することもでき、または異なる発現調節配列に、例えば1つの誘導可能なプロモーターおよび1つの構成的プロモーターに連結することもできる。代謝もしくは合成経路に関与する外因性核酸配列の形質転換は、当技術分野で周知である方法を用いて確認することができる。そのような方法には、例えば、mRNAのノーザンブロットもしくはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅などの核酸分析、または遺伝子産物の発現についてのイムノブロッティング、または導入された核酸配列もしくはその対応する遺伝子産物の発現を試験する他の適切な分析法が含まれる。外因性核酸は所望の産物の産生に十分な量で発現されることが当業者によって理解され、また、当技術分野で周知であり本明細書で開示される方法を用いて発現レベルを最適化して十分な発現を得ることができることがさらに理解される。

【0075】

本発明は、メタクリル酸などの所望の生成物を生成する方法をさらに提供する。一実施形態では、本発明は、メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体を培養することを含み、前記経路が、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、メチルマロニルCoAムターゼ、メチルマロニルCoAエピメラーゼ、メチルマロニルCoAレダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼおよび3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む方法を提供する（実施例IおよびIIならびに図2を参照）。別の実施形態では、本発明は、メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体を培養することを含み、前記経路が、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、メチルマロニルCoAムターゼ、メチルマロニルCoAエピメラーゼ、アルコール／アルデヒドデヒドロゲナーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む方法を提供する（実施例Iを参照）。

【0076】

さらに別の実施形態では、本発明は、メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体を培養することを含み、前記経路が、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、メチルマロニルCoAムターゼ、メチルマロニルCoAエピメラー

ぜ、メチルマロニルC o Aレダクターゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アンモニアリアーゼを含む方法を提供する（実施例I I IおよびI Vならびに図4を参照）。メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体を培養することを含み、前記経路が、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、4-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルC o Aシンテターゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルC o Aヒドロラーゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルC o Aトランスフェラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む方法がさらに提供される（実施例VおよびV I 10ならびに図6を参照）。

【0077】

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体を培養することを含み、前記経路が、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸ムターゼ、3-メチルアスパルターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼを含む方法も提供される（実施例V I IおよびV I I I 20ならびに図8を参照）。別の実施形態は、メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体を培養することを含み、前記経路が、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ、2-ヒドロキシグルタミン酸ムターゼ、3-メチルリンゴ酸デヒドラターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼを含む方法を提供する（実施例I XおよびXならびに図10を参照）。

【0078】

なおさらなる実施形態では、本発明は、メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体を培養することを含み、前記経路が、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、アセトアセチルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ、およびメタクリルC o AトランスフェラーゼまたはメタクリルC o AヒドロラーゼまたはメタクリルC o Aシンテターゼを含む方法を提供する（実施例X I 30およびX I Iならびに図12を参照）。なおさらなる実施形態は、メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体を培養することを含み、前記経路が、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、アセトアセチルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ、エノイルC o Aヒドラターゼ、および3-ヒドロキシイソブチリルC o Aヒドロラーゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルC o Aシンテターゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルC o Aトランスフェラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む方法を提供する（実施例X I およびX I I 40を参照）。

【0079】

本発明は、メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体を培養することを含み、前記経路が、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、アセトアセチルC o Aレダクターゼ、クロトナーゼ、ブチ 50

リルC o Aデヒドロゲナーゼ、イソブチリルC o Aムターゼ、イソブチリルC o Aデヒドロゲナーゼ、およびメタクリリルC o AシンテターゼまたはメタクリリルC o AヒドロラーゼまたはメタクリリルC o Aトランスフェラーゼを含む方法をさらに提供する（実施例X I I Iおよび図1 3を参照）。メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体を培養することを含み、前記経路が、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、乳酸デヒドロゲナーゼ、ラクテートC o Aトランスフェラーゼ、ラクトイルC o Aデヒドラターゼ、アシルC o Aデヒドロゲナーゼ、プロピオニルC o Aカルボキシラーゼ、メチルマロニルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む方法も提供される（実施例X I Vおよび図1 4を参照）。なおさらなる実施形態は、メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体を培養することを含み、前記経路が、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、バリンアミノトランスフェラーゼ、2-ケトイソ吉草酸デヒドロゲナーゼ、イソブチリルC o Aデヒドロゲナーゼ、およびメタクリリルC o AシンテターゼまたはメタクリリルC o AヒドロラーゼまたはメタクリリルC o Aトランスフェラーゼを含む方法を提供する（実施例X Vおよび図1 5を参照）。そのような経路は、アセト乳酸シンターゼ、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼおよびジヒドロキシ酸デヒドラターゼをさらに含み得る。

【0080】

本発明は、3-ヒドロキシイソ酪酸を生成する方法であって、3-ヒドロキシイソ酪酸経路を有する天然に存在しない微生物体を培養することを含み、前記経路が、3-ヒドロキシイソ酪酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、3-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な量で発現される3-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、3-ヒドロキシイソ酪酸経路が、4-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ；および3-ヒドロキシイソブチリルC o Aシンテターゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルC o Aヒドロラーゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルC o Aトランスフェラーゼを含む方法をさらに提供する（実施例Vおよび図6を参照）。2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する方法であって、2-ヒドロキシイソ酪酸経路を有する天然に存在しない微生物体を培養することを含み、前記経路が、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な量で発現される2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、2-ヒドロキシイソ酪酸経路が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ；アセトアセチルC o Aレダクターゼ；3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ；および2-ヒドロキシイソブチリルC o Aトランスフェラーゼまたは2-ヒドロキシイソブチリルC o Aヒドロラーゼまたは2-ヒドロキシイソブチリルC o Aシンテターゼを含む方法も提供される（実施例X Iおよび図1 2を参照）。

【0081】

別の実施形態では、本発明は、メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体を培養することを含み、前記経路が、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、メタクリル酸経路が、4-ヒドロキシブチリルC o Aデヒドラターゼ；ビニルアセチルC o A Δ-イソメラーゼ；クロトナーゼ；3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ；2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ；およびメタクリリルC o AヒドロラーゼまたはメタクリリルC o AシンテターゼまたはメタクリリルC o Aトランスフェラーゼを含む方法を提供する（実施例X V I I Iおよび図1 2を参照）。2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する方法であって、2-ヒドロキシイソ酪酸経路を有する天然に存在しない微生物体を培

養することを含み、前記経路が、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な量で発現される2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、2-ヒドロキシイソ酪酸経路が、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 Δ -イソメラーゼ；クロトナーゼ；3-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ；および2-ヒドロキシイソブチリルCoAヒドロラーゼまたは2-ヒドロキシイソブチリルCoAシンテターゼまたは2-ヒドロキシイソブチリルCoAトランスフェラーゼを含む方法も提供される（実施例XVIIおよび図12を参照）。

【0082】

周知の方法を用いて、メタクリル酸の生成を試験するのに適した精製および／またはアッセイを実施することができる。試験する各工学的処理株について、3連の培養物などの適切な複製物を増殖させることができる。例えば、工学的処理された産生宿主における生成物および副産物の形成を観察することができる。最終生成物および中間体、ならびに他の有機化合物を、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）、GC-MS（ガスクロマトグラフィー質量分析）およびLC-MS（液体クロマトグラフィー質量分析）などの方法、または当技術分野で周知である日常的な手順を用いる他の適切な分析法によって分析することができる。発酵プロセス中の生成物の放出を、培養上清で試験することもできる。副産物および残留グルコースは、例えば、グルコースおよびアルコールには示差屈折率検出器を、有機酸には紫外線検出器を用いるHPLCによって（Linら、Biotechnol. Bioeng. 90巻、775～779頁（2005年））、または当技術分野で周知である他の適切なアッセイおよび検出方法によって定量化することができる。外因性DNA配列からの個々の酵素活性を、当技術分野で周知である方法を用いて分析することもできる。

【0083】

メタクリル酸、2-ヒドロキシイソ酪酸または3-ヒドロキシイソ酪酸生成物は、当技術分野で周知である様々な方法を用いて培養物中の他の成分から分離することができる。そのような分離法には、例えば、抽出法、ならびに連続液液抽出、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、サイズ排除クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーおよび限外濾過を含む方法が含まれる。上記の方法は全て、当技術分野において周知である。

【0084】

本明細書で記載される天然に存在しない微生物体のいずれかを培養して、本発明の生合成生成物を生成および／または分泌することができる。例えば、メタクリル酸の生合成的生成のために、メタクリル酸生産体を培養することができる。

【0085】

メタクリル酸、2-ヒドロキシイソ酪酸または3-ヒドロキシイソ酪酸の生成では、炭素源および他の必要不可欠な栄養素を含む培地中で組換え株を培養する。全プロセスのコストを削減するために、発酵槽の嫌气的条件を維持することが非常に望ましい。そのような条件は、例えば、最初に窒素で培地をスパージし、次に隔壁および波形キャップでフラスコを密封することによって得ることができる。嫌气的条件で増殖が観察されない株には、限定的通気のための小さな穴を隔壁に開けることによって、微好气的条件を適用することができる。例示的な嫌气的条件は以前に記載されており、当技術分野において周知である。例示的な好气的条件および嫌气的条件は、例えば、2007年8月10日に出願の米国特許出願第11/891,602号に記載されている。本明細書で開示されるように、発酵は、回分、流加または連続的な形で実施することができる。

【0086】

培地を望ましいpHに維持することが必要なとき、所望により、塩基、例えばNaOHもしくは他の塩基、または酸の添加によって培地のpHを所望のpH、特に中性pH、例えば約7のpHに維持することができる。増殖速度は、分光光度計（600nm）を用いて光学密度を測定することによって決定することができ、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できる。

【0087】

増殖培地は、例えば、天然に存在しない微生物に炭素源を供給することができる任意の炭水化物源であり得る。例えば、そのような供給源には、糖類、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、およびデンプンが含まれる。炭水化物の他の供給源には、例えば再生可能なフィードストックおよびバイオマスが含まれる。本発明の方法でフィードストックとして用いることができる例示的なバイオマスの型には、セルロースのバイオマス、ヘミセルロースのバイオマスおよびリグニンフィードストックまたはフィードストックの部分が含まれる。そのようなバイオマスフィードストックは、例えば炭素源として有用な炭水化物基質、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、フルクトースおよびデンプンを含有する。本明細書で提供される教示および指針を考慮すると、当業者は、上記に例示されるもの以外の再生可能なフィードストックおよびバイオマスを、メタクリル酸の生成のための本発明の微生物体を培養するのに用いることもできることを理解するであろう。

10

【0088】

上記に例示されるものなどの再生可能なフィードストックに加えて、本発明のメタクリル酸微生物体を、炭素源として合成ガスで増殖するように改変することもできる。この具体的な実施形態では、1つまたは複数のタンパク質または酵素をメタクリル酸産生物体中で発現させて、合成ガスまたは他のガス状炭素源を利用する代謝経路を提供する。

【0089】

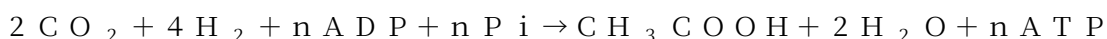
合成ガス (s y n g a s) またはプロデューサーガスとしても公知の合成ガス (s y n t h e s i s g a s) は、石炭、ならびに炭素材、例えば農作物および残渣を含むバイオマス材のガス化の主要な生成物である。合成ガスは主として H_2 および CO の混合物であり、それらに限定されないが、石炭、石油、天然ガス、バイオマスおよび廃棄有機物を含む任意の有機フィードストックのガス化から得ることができる。ガス化は、高い燃料対酸素比の下で一般に実施される。ほとんど H_2 および CO であるが、合成ガスはより少ない量の CO_2 および他のガスをも含み得る。したがって、合成ガスは CO 、さらに CO_2 などのガス状炭素の費用効果の高い供給源を提供する。

20

【0090】

Wood-Ljungdahl 経路は、 CO および H_2 からアセチル CoA およびアセテートなどの他の生成物への転換を触媒する。 CO および合成ガスを利用することができる生物体は一般に、Wood-Ljungdahl 経路に包含される酵素および変換の同じ基本セットを通して、 CO_2 および CO_2/H_2 混合物を利用する能力も有する。同じ生物体が CO を用いることもでき、同じ経路が含まれることが明らかにされるずっと前に、微生物による CO_2 からアセテートへの H_2 依存性転換が認識された。必要な還元当量を供給する水素が存在する限り、多くの酢酸生成菌が CO_2 の存在下で増殖し、アセテートなどの化合物を生成することが示された (例えば、Drake、Acetogenesis、3~60頁、Chapman and Hall、New York、(1994年) 参照)。これは、以下の式に要約することができる：

30



40

したがって、Wood-Ljungdahl 経路を有する天然に存在しない微生物は、アセチル CoA および他の所望の生成物の生成に CO_2 および H_2 混合物も利用することができる。

【0091】

Wood-Ljungdahl 経路は当技術分野で周知であり、12個の反応からなり、それらは2つの分岐：(1) メチル分岐および(2) カルボニル分岐に分けることができる。メチル分岐は合成ガスをメチルテトラヒドロ葉酸 (メチル THF) に転換し、カルボニル分岐はメチル THF をアセチル CoA に転換する。メチル分岐における反応は、以下の酵素によって順番に触媒される：フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンテターゼ、メチルテトラヒドロ葉酸シクロ

50

デヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ。カルボニル分岐における反応は、以下の酵素によって順番に触媒される：コバラミドコリノイド／鉄－硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、アセチルC o Aシンターゼ、アセチルC o Aシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼ。十分な数のコード核酸を導入してメタクリル酸、3－ヒドロキシイソ酪酸または2－ヒドロキシイソ酪酸経路を生成することについて本明細書で提供される教示および指針に従って、当業者は、宿主生物体に存在しないW o o d－L j u n g d a h l 酵素をコードする核酸を少なくとも導入することに関して、同じ工学的設計を実施することもできることを理解するであろう。したがって、改変された生物体が完全なW o o d－L j u n g d a h l 経路を含むように、本発明の微生物体へ1つまたは複数のコード核酸を導入すると、合成ガス利用能が付与される。

10

【0092】

したがって、本明細書で提供される教示および指針を考慮すると、当業者は、炭水化物などの炭素源で増殖させるとき、本発明の生合成された化合物を分泌する、天然に存在しない微生物体を生成することができることを理解するであろう。そのような化合物には、例えば、メタクリル酸およびメタクリル酸経路中の中間代謝産物のいずれかが含まれる。必要なのは、例えば、メタクリル酸生合成経路の一部もしくは全部の組入れを含む、所望の化合物または中間体の生合成を達成するために必要とされる酵素活性の1つまたは複数における工学的導入だけである。したがって、本発明は、炭水化物で増殖させるとメタクリル酸を生成および／または分泌し、炭水化物で増殖させるとメタクリル酸経路で示される中間代謝産物のいずれかを生成および／または分泌する、天然に存在しない微生物体を提供する。生成および／または排出することができる中間代謝産物には、3－ヒドロキシイソ酪酸および2－ヒドロキシイソ酪酸が含まれる。

20

【0093】

本発明のメタクリル酸を生成する微生物体は、中間体から合成を開始することができる。例えば、前駆体としてスクシニルC o Aから合成を開始することに加えて、(R)－メチルマロニルC o A、(S)－メチルマロニルC o A、メチルマロン酸セミアルデヒドまたは3－ヒドロキシイソブチレートなどの中間体から合成を開始することができる(実施例Iおよび図2を参照)。あるいは、(R)－メチルマロニルC o A、(S)－メチルマロニルC o A、メチルマロン酸セミアルデヒド、または3－アミノ－2－メチルプロピオネートなどの中間体から合成を開始することができる(実施例I I Iおよび図4を参照)。前駆体として4－ヒドロキシブチリルC o Aを有する経路では、3－ヒドロキシイソブチリルC o A、メタクリリルC o Aまたは3－ヒドロキシイソブチレートなどの中間体から合成を開始することができる(実施例Vおよび図6を参照)。

30

【0094】

前駆体としてアルファ－ケトグルタレートを利用するメタクリル酸経路では、例えば、グルタメート、トレオ－3－メチルアスパルテートまたはメサコネートから合成を開始することができる(実施例V I Iおよび図8を参照)。あるいは、2－ヒドロキシグルタレート、3－メチルマレートまたはメサコネートなどの中間体から合成を開始することができる(実施例I Xおよび図10を参照)。前駆体としてアセチルC o Aを利用する経路では、例えば、アセトアセチルC o A、3－ヒドロキシブチリルC o A、2－ヒドロキシイソブチリルC o A、またはメタクリリルC o Aなどの中間体から合成を開始することができる(実施例X Iおよび図12を参照)。あるいは、アセトアセチルC o A、3－ヒドロキシブチリルC o A、クロトニルC o A、ブチリルC o A、イソブチリルC o AおよびメタクリリルC o Aなどの中間体から合成を開始することができる(実施例X I I Iおよび図13を参照)。

40

【0095】

前駆体としてピルベートを利用するメタクリル酸経路では、ラクテート、ラクトイルC o A、アクリリルC o A、プロピオニルC o A、(S)－メチルマロニルC o A、メチルマロン酸セミアルデヒドまたは3－ヒドロキシイソブチレートなどの中間体から合成を開

50

始することができる（実施例XIVおよび図14を参照）。前駆体として2-ケトイソバレレートを利用する経路では、イソブチリルCoAまたはメタクリリルCoAなどの中間体から合成を開始することができる（実施例XVおよび図15を参照）。さらに、ピルベートから2-ケトイソバレレートへの転換における中間体から合成を開始することができる。

【0096】

前駆体として4-ヒドロキシブチリルCoAを利用する3-ヒドロキシイソ酪酸経路では、3-ヒドロキシイソブチリルCoAなどの中間体から合成を開始することができる（実施例Vおよび図6を参照）。前駆体としてアセチルCoAを利用する2-ヒドロキシイソ酪酸経路では、例えば、アセトアセチルCoA、3-ヒドロキシブチリルCoA、または2-ヒドロキシイソブチリルCoAなどの中間体から合成を開始することができる（実施例XIおよび図12を参照）。

【0097】

さらに、本発明の微生物体に対して生成物の収率を増加させるようにさらなる改変が可能であることが理解される。例えば、代謝モデリングを用いて、2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸経路を有する微生物体に対して生成物の収率を増加させるように行うことができる任意のさらなる改変を決定することができる（実施例XXVを参照）。一実施形態では、改変を用いて、2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸経路の前駆体または中間体の生成を増加させることができる。本明細書で開示されるように、中心的な代謝反応およびその対応する酵素の改変を含む代謝経路の改変を用いて、所望の前駆体、中間体または生成物の収率を増加させることができる。例えば、様々な機構によるいくつかの酵素の発現の増加を利用して、MAAまたは3-ヒドロキシイソブチレートの収率を増加させることができることが見い出されている。そのような酵素には、それらに限定されないが、1) クエン酸シンターゼおよびアコニターゼ；2) イソクエン酸リアーゼおよびリンゴ酸シンターゼ；3) ピルビン酸デヒドロゲナーゼおよび／またはピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ；ならびに4) ホスホエノールピルビン酸（PEP）カルボキシキナーゼがある（実施例XXVを参照）。これらの酵素の発現を使用して、サクシニルCoAまたは4-ヒドロキシブチリルCoAからの経路を使用したMAAまたは3-ヒドロキシイソブチレートの収率を増加させることができる。

【0098】

したがって、本発明は、2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸経路を含有していることに加えて、2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸生成物の前駆体または中間体の生成を増加させる少なくとも1つのタンパク質または酵素の活性を増加させるようにさらに遺伝子改変されている天然に存在しない微生物体をさらに提供し、ここで活性の増加は、少なくとも1つのタンパク質または酵素の活性を増加させる遺伝子改変が存在しない状態と比べた増加である。例えば、クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも1つの酵素の活性を増加させるように、天然に存在しない微生物体を遺伝子改変することができる（実施例XXVを参照）。活性の増加は、そのような酵素の活性を増加させるように遺伝子改変されていない微生物体と比べた増加であることが理解される。例えば、酵素の活性を増加させる遺伝子改変を、メタクリル酸経路を有する微生物体に導入する場合、酵素の活性の増加は、メタクリル酸経路を有するが遺伝子改変が存在しない宿主生物体と比べた増加である。そのような遺伝子改変には、それらに限定されないが、染色体組込みにより、またはプラスミドに含有されている、活性を増加させるタンパク質または酵素の同種（天然）または異種配列をコードする外因性核酸を導入することが含まれることが理解される。例えば、タンパク質もしくは酵素の活性を増加させる望ましい特性を有する生物体由来の異種配列を導入することもでき、または増加したコピー数の内因性遺伝子を生物体に導入するこ

ともできる。さらに、内因性遺伝子のプロモーターをより活性なプロモーターで置換することもでき、タンパク質または酵素の発現、したがって活性を増加させる突然変異で天然のプロモーターを遺伝子改変することもできる。プロモーターのそのような置換または他の遺伝子改変は、構成的および誘導可能なプロモーターをもたらすことができる。さらに、例えば遺伝子破壊でリプレッサーをノックアウトするか、または発現を減少させるようにそのプロモーターを遺伝子改変することにより、内因性遺伝子のリプレッサーを減少させることができる。したがって、本明細書で開示され、当技術分野で公知であるこれらおよび他の遺伝子改変を使用して、所望のタンパク質または酵素の活性を増加させることができる。

【0099】

本発明の天然に存在しない微生物体は、本明細書で例示される当技術分野で周知の方法を用いて、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な量でメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの核酸を外因性に発現するように構築される。本発明の微生物体は、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な条件下で培養されることが理解される。本明細書で提供される教示および指針に従って、本発明の天然に存在しない微生物体は、細胞内濃度が約0.1~200mM以上となるメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸の生合成を達成することができる。一般に、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸の細胞内濃度は、約3~150mM、詳細には約5~125mM、より詳細には約8~100mMであり、約10mM、20mM、50mM、80mM、またはそれ以上を含む。これらの例示的な範囲のそれぞれの間の細胞内濃度およびそれを上回る細胞内濃度も、本発明の天然に存在しない微生物体から達成することができる。

【0100】

一部の実施形態では、培養条件は、嫌氣的または実質的に嫌氣的な増殖または維持条件を含む。例示的な嫌氣的条件は以前に記載されており、当技術分野において周知である。発酵プロセスの例示的な嫌氣的条件が本明細書に記載され、例えば、2007年8月10日に出願の米国特許出願第11/891,602号に記載されている。これらの条件のいずれかを、当技術分野で周知である他の嫌氣的条件と同様に、天然に存在しない微生物体で使うことができる。そのような嫌氣的条件の下で、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸生産体は、5~10mM以上の細胞内濃度、ならびに本明細書で例示される他の全ての濃度で、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸をそれぞれ合成することができる。上記の記載が細胞内濃度に言及するものであるとしても、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する微生物体は、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸を細胞内で生成し、かつ/または培地中にその生成物を分泌することができることが理解される。

【0101】

培養条件には、例えば、液体培養法だけでなく発酵および他の大規模培養法を含めることができる。本明細書で記載されるように、本発明の生合成生成物の特に有用な収率は、嫌氣的または実質的に嫌氣的な培養条件下で得ることができる。

【0102】

本明細書で記載されるように、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸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、嫌氣的培養または発酵条件が含まれる。特定の実施形態では、本発明の天然に存在しない微生物体は、嫌氣的または実質的に嫌氣的な条件の下で保持し、培養し、または発酵させることができる。簡単に述べると、嫌氣的条件とは酸素不足の環境を指す。実質的に嫌氣的な条件には、例えば、培地中の溶解酸素濃度が飽和の0~10%の間にとどまるような、培養、回分発酵または連続発酵が含まれる。実質的に嫌氣的な条件には、1%未満の酸素の雰囲気下で維持される密封チャンバー内の液体培地または固体寒天で細胞を増殖または休止させること

も含まれる。酸素の割合は、例えば、培養を N_2 / CO_2 混合物または他の適切な 1 つまたは複数の非酸素ガスでスパージすることによって維持することができる。

【0103】

本明細書で記載される培養条件の規模を拡大し、連続的に増殖させてメタクリル酸を製造することができる。例示的な増殖法には、例えば、流加回分発酵および回分分離；流加回分発酵および連続分離、または連続発酵および連続分離が含まれる。これらのプロセスは全て、当技術分野において周知である。発酵法は、商業的な量のメタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸の生合成による生成に特に有用である。一般に、また非連続的な培養法と同様に、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸の連続的および／またはほとんど連続的な生成には、指数増殖期の増殖を保持および／またはほとんど保持するのに十分な栄養素および培地で、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する本発明の天然に存在しない生物体を培養することが含まれよう。そのような条件下での連続培養は、例えば、1日、2、3、4、5、6または7日、またはそれ以上を含むことができる。さらに、連続培養は、1週間、2、3、4または5週間、またはそれ以上で最高数カ月を含むことができる。あるいは、本発明の生物体は、特定の用途に適する場合は数時間培養することができる。連続的および／またはほとんど連続的な培養条件は、これらの例示的な期間の間の全ての期間を含むこともできることを理解すべきである。本発明の微生物体を培養する時間は、所望の目的に十分な量の生成物を生成するのに十分な期間であることがさらに理解される。

【0104】

発酵法は、当技術分野において周知である。簡単に述べると、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸を生合成により生成するための発酵は、例えば、流加回分発酵および回分分離；流加回分発酵および連続分離、または連続発酵および連続分離で利用することができる。回分および連続発酵法の例は、当技術分野で周知である。

【0105】

かなり大量のメタクリル酸の連続的生成に本発明のメタクリル酸生産体を用いる上記の発酵法に加えて、メタクリル酸生産体を、例えば、化学合成法に同時にかけて生成物を他の化合物に変換することもでき、または生成物を発酵培養物から分離し、続いて、所望により、化学変換にかけて生成物を他の化合物に変換することもできる。さらには、かなり大量の3-ヒドロキシイソブチレートまたは2-ヒドロキシイソブチレートの連続的生成に本発明の3-ヒドロキシイソブチレートまたは2-ヒドロキシイソブチレート生産体をそれぞれ用いる上記の発酵法に加えて、3-ヒドロキシイソブチレートまたは2-ヒドロキシイソブチレート生産体を、例えば、化学合成法に同時にかけて生成物を他の化合物に転換することもでき、あるいは生成物を発酵培養物から分離し、続いて、所望により、化学変換にかけて生成物を他の化合物に変換することもできる。

【0106】

バイオプロセッシングについて考慮すべきことの1つは、回分または連続発酵スキームのどちらを用いるかである。生成される生成物の量に影響を及ぼす、この2つのスキーム間にある相違の1つは、指数関数的増殖期に加えて、回分スキームには準備期、遅滞期、および静止期が存在することである。その一方で、連続プロセスは、一定の指数関数的増殖の状態で維持され、適切に稼働すれば、一度に数カ月もの間実行することができる。増殖関連および混合増殖関連型の生成物形成では、準備期、遅滞期、および静止期がないことにより、連続プロセスははるかに高い生産性（すなわち細胞集団の希釈倍率）をもたらす。

【0107】

生産性に利点があるにもかかわらず、いくつかの理由で連続プロセスより多くの回分プロセスが稼働中である。最初に、非増殖関連型の生成物形成では、連続プロセスは非常に低い希釈率で稼働させなければならないため、回分系の生産性は、連続プロセスの生産性

を大きく上回り得る。次に、生成株は一般に、生化学的またはタンパク質生成能力が改善するようにその遺伝物質に対して改変を受けている。この特殊化した株は、その親の相補体より迅速には増殖しない可能性が高く、一方恒成分培養槽（連続形式で稼働する発酵槽）を使用するものなどの連続プロセスでは、最も速く増殖している細胞に大きな選択圧が加わる。所望の過剰生成の表現型につながる、組換えDNAを含有するまたは点突然変異を有する細胞は、生産性の低い元の親株となる逆突然変異を起こしやすい。単一の遺伝子欠失を有する株に、野生型の増殖表現型を回復する傾向がある代償的な突然変異が生じる可能性もある。より速く増殖している細胞は通常、栄養素の制限についてより生産性の高い対応物に打ち勝ち、大幅に生産性が低下する。その一方で、回分プロセスは、各周期の終わりにある細胞を再利用するのではなく、このように生成株がその野生型の表現型に復帰する確率を減らすことにより、利用可能な世代の数を制限する。最後に、連続プロセスは、設備故障や外来生物体の混入などの潜在的な工学的障害により、長期に稼働させることがより困難である。そのような故障の重大性は、回分培養より連続プロセスではるかに考慮すべきである。

10

【0108】

特殊な化学物質および／またはタンパク質の少量の生成では、連続プロセスの生産性の増加が、株の安定性および信頼性に関連するリスクより勝つことはめったにない。しかし、大量の、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸などの増殖関連型の生成物の生成では、連続プロセスで生産性が増加すると、回分プロセスに比較して著しい経済的利益が生じ得る。連続バイオプロセスの稼働に関連する工学的障害が常に存在するが、株の安定性の懸念は、負の選択圧を低減または回避し、指数関数的増殖期の間標的生成物の生成に有利となるように代謝経路を変更する代謝工学的戦略により克服することができる。

20

【0109】

より良好な生産体を得るために、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。モデリングを用いて、経路の利用をさら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、米国特許公開US2002/0012939、US2003/0224363、US2004/0029149、US2004/0072723、US2003/0059792、US2002/0168654およびUS2004/0009466、ならびに米国特許第7,127,379号を参照）。モデリング解析は、メタクリル酸、3-ヒドロキシイソ酪酸または2-ヒドロキシイソ酪酸のより効率の高い生成の方向に代謝を移動させる細胞増殖に対する影響の信頼性のある予測を可能にする。

30

【0110】

所望の生成物の生合成を有利にする代謝改変を特定し、設計するための1つのコンピュータ方法は、OptKnockコンピュータフレームワークである（Burgardら、Biotechnol. Bioeng. 84巻、647～657頁（2003年））。OptKnockは、標的生成物を過剰に生産する遺伝的に安定した微生物をもたらす遺伝子欠失戦略を示唆する、代謝モデル化およびシミュレーションプログラムである。具体的には、フレームワークは、所望の生化学物質を細胞増殖の必須の副産物になるように強制する遺伝子操作を示唆するために、微生物の完全な代謝ネットワークおよび／または生化学ネットワークを調べる。戦略的に置かれた遺伝子欠失または他の機能的遺伝子破壊を通して生化学的生成を細胞増殖と連結することによって、バイオリアクター内での長期間の後に設計製作された株に加えられる増殖淘汰圧は、強制的な増殖連結型の生化学的生成の結果として、性能の改善をもたらす。最後に、遺伝子欠失が構築されると、OptKnockによって選択された遺伝子はゲノムから完全に除去されるので、設計された株がそれらの野生型状態に戻る可能性はごくわずかである。したがって、このコンピュータ方法は、所望の生成物の生合成をもたらす代替経路を特定するために用いること、または所望の生成物の生合成のさらなる最適化のために、天然に存在しない微生物の生物体と共に用いることができる。

40

【0111】

50

簡単に述べると、OptKnockは細胞代謝のモデル化のためのコンピュータによる方法およびシステムを指すために本明細書で用いられる用語である。OptKnockプログラムは、特定の制約をフラックスバランス分析（FBA）モデルに組み込む、モデルおよ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、定性的動態学情報、定性的調節情報および／またはDNAマイクロアレイ実験データが含まれる。OptKnockは、例えばフラックスバランスモデルを通して誘導されるフラックス境界を締め、その後、遺伝子付加または欠失の存在下で代謝ネットワークの性能限界を調査することによって、様々な代謝問題の解法も計算する。OptKnockコンピュータフレームワークは、代謝ネットワークの性能限界の効果的なクエリーを可能にするモデル式の構築を可能にし、生じる混合整数線形計画法の問題を解決する方法を提供する。OptKnock 10
として本明細書で言及される代謝モデル化およびシミュレーション法は、例えば、2002年1月10日に出願の米国特許公開第2002/0168654号、2002年1月10日に出願の国際特許PCT/US02/00660、および2007年8月10日に出願の米国公開第2009/0047719号に記載されている。

【0112】

生成物の生合成による生成を有利にする代謝変化を特定および設計するための別のコンピュータ方法は、SimPheny（登録商標）と呼ばれる代謝モデリングおよびシミュレーションシステムである。このコンピュータ方法およびシステムは、例えば、2002年6月14日に出願の米国特許公開2003/0233218および2003年6月13日に出願の国際特許出願PCT/US03/18838に記載されている。SimPheny 20
（登録商標）は、コンピュータでネットワークモデルを生成し、生物系の化学反応を通して質量、エネルギーまたは電荷のフラックスをシミュレートして、その系の化学反応のありとあらゆる可能な機能を含む解空間を定義し、それによってその生物系に許容される活性を判定するのに用いることができるコンピュータシステムである。この手法は、含まれる反応の公知の化学量などの制約、ならびに反応を通して最大フラックスに関連する熱力学反応および容量制約によって解空間が定義されるので、制約に基づくモデル化と称される。これらの制約によって定義される空間を調べて、生物系またはその生化学成分の表現型能力および挙動を判定することができる。例えば、Schillingら、J. Theor. Biol.、203巻、229～248頁（2000年）；Schillingら、Biotech. Bioeng.、71巻、286～306頁（2000年） 30
）およびSchillingら、Biotech. Prog.、15巻、288～295頁（1999年）に記載されている凸解析、線形計画法および極端経路の計算などの解析法を用いて、そのような表現型能力を判定することができる。

【0113】

上記に記載のように、本発明に適用可能なコンピュータプログラムで使用される制約に基づく方法の1つはフラックスバランス分析である。フラックスバランス分析は、定常状態の条件におけるフラックスのバランスに基づいており、例えば、VarmaおよびPalsson、Biotech. Bioeng.、12巻、994～998頁（1994年）に記載のように実施することができる。フラックスバランスの手法を反応ネットワークに適用して、例えば、FellおよびSmall、J. Biochem.、138巻、781～786頁（1986年）に記載の脂肪細胞の代謝、MajewskiおよびDomach、Biotech. Bioeng.、35巻、732～738頁（1990年）に記載のATP最大化の条件下でのE. coliのアセテート分泌、またはVanrolleghemら、Biotech. Prog.、12巻、434～448頁（1996年）に記載の酵母によるエタノール分泌がシミュレートされ、その系の特性が予測されている。さらに、EdwardsおよびPalsson、Proc. Natl. Acad. Sci.、97巻、5528～5533頁（2000年）、EdwardsおよびPalsson、J. Bio. Chem.、274巻、17410～17416頁（1999年）ならびにEdwardsら、Nature Biotech.、19巻、125～130頁（2001年）に記載のように、この手法を使用して、様々な単一炭 40
50

素源での *S. cerevisiae* の増殖、ならびに *H. influenzae* の代謝を予測またはシミュレートすることができる。

【0114】

生物系は柔軟であり、多くの異なる方法で同じ結果に到達することができるので、これらのコンピュータ手法は生物的な現実と一貫している。生物系は、全ての生物系が直面しなければならない基本的な制約によって制限されている進化機構を通して設計される。したがって、制約に基づくモデリング戦略は、これらの一般的な現実を包含する。さらに、制約の締め付けを通してさらなる制限をネットワークモデルに連続的に加える能力は、解空間の縮小をもたらし、それによって、生理的性能または表現型を予測できる精度を高める。

10

【0115】

本明細書で提供される教示および指針を考慮すると、当業者は、代謝モデリングおよびシミュレーションのための様々なコンピュータフレームワークを適用して、宿主微生物体における所望の化合物の生合成を設計および実施することができる。そのような代謝モデル化およびシミュレーション方法には、例えば、*SimPheny*（登録商標）および *OptKnock* のような上で例示したコンピュータシステムが含まれる。本発明の説明のために、モデリングおよ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、いくつかの方法を本明細書に記載する。当業者は、*OptKnock* を用いる代謝変化の特定、設計および実行を、当技術分野で周知であるそのような他の代謝モデリングおよびシミュレーションコンピュータフレームワークおよび方法のいずれかに適用する方法を知るであろう。

20

【0116】

細胞または生物体が強制的に増殖と生化学的な生成物の生成を連結する能力は、コンピュータモデルを用いて計算された典型的な代謝ネットワークの生化学的な生成の限界との関連で説明することができる。これらの限界は、制限している（1つまたは複数の）基質の（1つまたは複数の）取り込み速度をその実験的に測定された（1つまたは複数の）値に固定し、増殖のそれぞれ達成可能なレベルで生化学的な生成の最大速度および最低速度を計算することによって得られる。図16に示すように、所望の生化学的な生成は一般に細胞内資源のバイオマス形成と直接競合する。これらの状況下で、生化学的な生成の速度が高まると、必ず増殖速度が最大以下となる。本明細書で開示される、*OptKnock* などの代謝モデリングおよびシミュレーションプログラムによって示唆されるノックアウトは、図16に表すように野生型株から代謝挙動を変化させる許容可能な解の境界を制限するように設計される。所与の株についての現実の解の境界は基質の（1つまたは複数の）取り込み速度が増大または低下するにつれて拡張または収縮するが、各実験点は、その計算された解の境界内にある。これらのようなプロットは、設計された株が、どれくらいの余地が改善に利用可能であるかをも示すその性能限界にどれほど近いかの正確な予測を可能にする。

30

【0117】

図16に示すように、増殖連結型生化学的な生成をもたらす遺伝子欠失を特定する *OptKnock* 数学フレームワークを例示する。この手順は、物理化学的な制約の支配が連続的に課せられることにより細胞系が提示できる可能な表現型の範囲を狭くする、制約に基づく代謝モデリングを基礎とする（*Price* ら、*Nat Rev Microbiol*、2巻、886～97頁（2004年））。上記に記載のように、制約に基づくモデルおよびシミュレーションは当技術分野で周知であり、一般に、ネットワーク化学量論にさらした特定の細胞目的の最適化を引き起こして、可能性の高いフラックス分布を示唆する。

40

【0118】

簡単に述べると、 $N = \{1, \dots, N\}$ の代謝産物のセットおよび $M = \{1, \dots, M\}$ の代謝反応のセットを含む定常状態の代謝ネットワークについて凝集反応フラックスとして定量化される細胞目的の最大化は、以下のように数学的に表される：

【0119】

50

【数 1】

最大化する $v_{\text{細胞目的}}$ 以下にさらす $\sum_{j=1}^M S_{ij} v_j = 0, \quad \forall i \in N$ $v_{\text{基質}} = v_{\text{基質_取り込み}} \text{ mmol/gDW}\cdot\text{hr} \quad \forall i \in \{\text{制限している(1つまたは複数の)基質}\}$ $v_{\text{atp}} \geq v_{\text{atp_主}} \text{ mmol/gDW}\cdot\text{hr}$ $v_j \geq 0, \quad \forall j \in \{\text{不可逆反応}\}$

10

ここで、 S_{ij} は、反応 j における代謝産物 i の化学量論係数であり、 v_j は反応 j のフラックスであり、 $v_{\text{基質_取り込み}}$ は、制限している（1つまたは複数の）基質の想定または測定された（1つまたは複数の）取り込み速度を表し、 $v_{\text{atp_主}}$ は、非増殖関連の ATP 維持の必要量である。ベクトル v は、内部フラックスも外部フラックスも含む。この研究で、細胞目的は、バイオマス形成に必要な比率での生合成前駆体の排出であることがしばしば想定される、Neidhardt, F. C. ら、第 2 版、1996 年、Washington, D. C. : ASM Press. 2v. (xx, 2822, 1xxvi)。フラックスは一般に、 $1 \text{ gDW} \cdot \text{hr}$ （乾燥重量グラム掛ける時間）当たりで報告され、その結果バイオマス形成は、生成されたバイオマスの $\text{g} / \text{gDW} \cdot \text{hr}$ または $1 / \text{hr}$ として表される。

20

【0120】

遺伝子欠失、したがって反応の消失のモデリングは、制約に基づく手法のフレームワークへの 2 値変数の組込みを最初に使用する、Burgard ら、Biotechnol Bioeng、74 巻、364～375 頁（2001 年）、Burgard ら、Biotechnol Prog、17 巻、791～797 頁（2001 年）。これらの 2 値変数

【0121】

【数 2】

$$y_j = \begin{cases} 1, & \text{反応フラックス } v_j \text{ が活性である場合} \\ 0, & \text{反応フラックス } v_j \text{ が活性でない場合} \end{cases}, \forall j \in M$$

30

は、反応 j が活性である場合に 1 の値を、活性でない場合に 0 の値を想定する。以下の制約

【0122】

【数 3】

$$v_j^{\text{最小}} \cdot y_j \leq v_j \leq v_j^{\text{最大}} \cdot y_j, \quad \forall j \in M$$

は、変数 y_j が 0 に等しい場合のみ反応フラックス v_j が 0 に設定されることを確実にする。あるいは、 y_j が 1 に等しいとき、 v_j は下方の $v_j^{\text{最小}}$ と上方の $v_j^{\text{最大}}$ の境界間の任意の値に自由に想定される。ここで、 $v_j^{\text{最小}}$ および $v_j^{\text{最大}}$ は、上記に記載のネットワーク制約にさらしたあらゆる反応フラックスをそれぞれ最小化および最大化することによって同定される、Mahadevan ら、Metab Eng、5 巻、264～276 頁（2003 年）。

40

【0123】

最適な遺伝子／反応ノックアウトは、生じたネットワークについての最適増殖の解法が対象とする化学物質を過剰に生成するように活性反応のセット（ $y_j = 1$ ）を選択する、2 層の最適化問題を解決することによって同定される。図式的に、この 2 層の最適化問題を図 2 に示す。数学的に、この 2 層の最適化問題は、以下の 2 層の混合整数最適化問題として表される：

50

【0124】

【数4】

最大化する $v_{\text{化学物質}}$

(OptKnock)

$$\left(\begin{array}{ll} v_j \text{にさらす} & \text{最大化する} \quad v_{\text{バイオマス}} \\ & \sum_{j=1}^M S_{ij} v_j = 0, \quad \forall i \in N \\ & v_{\text{基質}} = v_{\text{基質_取り込み}} \quad \forall i \in \{\text{制限している(1つまたは複数の)基質}\} \\ & v_{\text{atp}} \geq v_{\text{atp_主}} \\ & v_{\text{バイオマス}} \geq v_{\text{バイオマス}}^{\text{標的}} \end{array} \right)$$

10

$$v_j^{\text{最小}} \cdot y_j \leq v_j \leq v_j^{\text{最大}} \cdot y_j, \quad \forall j \in M$$

$$\sum_{j \in M_{\text{前方}}} (1 - y_j) = K$$

20

$$y_j \in \{0, 1\}, \quad \forall j \in M$$

ここで、 $v_{\text{化学物質}}$ は所望の標的生成物、例えば2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸、メタクリル酸、または他の生化学的生成物の生成であり、 K は許容可能なノックアウトの数である。 K を0とおくと、完全なネットワークの最大のバイオマスの解が返され、一方 K を1とおくと、生じたネットワークが、その最大のバイオマス収率が得られる最大の過剰生成を含むような、単一の遺伝子／反応ノックアウト ($y_j = 0$) が同定されることに留意されたい。最終的な制約は、生じたネットワークが最小のバイオマス収率を満たすことを確実にする。Burgardら、Biotechnol Bioeng、84巻、647～57頁(2003年)はモデル式および解法の手順についてより詳細に説明している。IBM RS6000～270ワークステーションのモデリング環境で、GAMS、Brookeら、GAMS Development Corporation(1998年)を介してアクセスするCPLX8.0、GAMS: The Solver Manuals、2003年、GAMS Development Corporationを用いて、分から時間のオーダーで数百の2値変数を含む問題を解決することができる。OptKnockフレームワークは既に生化学的過剰生成に有望な遺伝子欠失戦略を同定できており、Burgardら、Biotechnol Bioeng、84巻、647～57頁(2003年)、Pharkyaら、Biotechnol Bioeng、84巻、887～899頁(2003年)、また代謝および制御モデリングフレームワークにおける将来の改善を自然に包含する体系的なフレームワークを確立する。

30

40

【0125】

上記の方法は、破壊する1セットの代謝反応を提供する。セット内の各反応の除去または代謝改変は、生物体の増殖期の間の必須の生成物として、所望の生成物をもたらすことができる。反応が知られているので、2層の(bilevel)OptKnock問題の解決は、反応セット内の各反応を触媒する1つまたは複数の酵素をコードする1つまたは複数の関連遺伝子も提供する。反応セットおよび各反応に関与する酵素をコードするそれらの対応遺伝子の同定は、一般に自動化されたプロセスであり、その反応と、酵素およびコード遺伝子の間の関係を有する反応データベースとの相関関係を通して達成される。

【0126】

50

同定されると、標的細胞または生物体において、所望の生成物の生成を達成するために破壊される反応セットが、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破壊によって実施される。反応セットの機能的破壊を達成する1つの特に有用な手段は、各コード遺伝子の欠失によるものである。しかし、一部の例では、例えば、突然変異、プロモーターも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欠失を含む他の遺伝子異常、またはいくつかの場所のいずれかにおけるコード配列の切断によって反応を破壊することが有益となることがある。例えば、生成物の連結の速やかな評価が所望され、または遺伝子復帰突然変異が起こる可能性がより低い場合、遺伝子セットの全体未満の欠失をもたらすこれらの後者の異常が有用なことがある。

【0127】

所望の生成物の増殖連結型の生合成を含む生合成をもたらすことができる破壊すべきさらなる反応セットまたは代謝改変をもたらす上記の2層のOptKnock問題のさらなる生産的解法を特定するために、整数カットと呼ばれる最適化法を実施することができる。この方法は、各反復での整数カットと呼ばれる追加の制約の組み込みで、上に例示されるOptKnock問題を反復して解決することによって進行する。整数カット制約は、解決手法が、生成物生合成を増殖に不可避免的に連結する任意の前の反復で特定されるものと正確に同じ反応セットを選択することを、効果的に防止する。例えば、前に特定された増殖連結型の代謝改変が破壊のための反応1、2および3を特定する場合、以下の制約は、その後の解法で同じ反応が同時に考慮されることを防止する。整数カット法は当技術分野で周知であり、例えば、Burgardら、Biotechnol. Prog. 17巻、791～797頁（2001年）に記載されているのを見ることができる。代謝モデル化およびシミュレーションのためのOptKnockコンピュータフレームワークと組み合わせたそれらの使用に関して本明細書に記載される全ての方法と同様に、反復性コンピュータ分析でのリダンダンシーを減らす整数カット法は、例えばSimPheny（登録商標）を含む当技術分野で周知である他のコンピュータフレームワークとともに適用することもできる。

【0128】

上記の形の制約により、以前に同定されたセットを含む大きな反応セットの同定が除外される。例えば、さらなる反復で上記の整数カット最適化法を使用すると、以前に同定されているため、破壊について反応1、2、および3を特定する四重の反応セットの同定が除外される。生成物の増殖連結型生成をもたらす全ての可能な反応セットの同定を確実にするために、整数カット法の変法が使用された。

【0129】

簡単に述べると、改変型の整数カット手順は、野生型ネットワークについて最適な増殖で所望の生化学物質の最大の生成を計算する「0」の反復から始まる。この計算は、Kを0とおいたOptKnockの解に対応する。次に、単一のロックアウトを考慮し、2つのパラメータのセット $objstore_{iter}$ および $ystore_{iter,j}$ を導入して、各反復、 $iter$ で目的の機能（ $v_{化学物質}$ ）および反応のオンオフの情報（ y_j ）をそれぞれ蓄える。次いで、各反復でOptKnock式に以下の制約を連続的に加える。

【0130】

【数5】

$$v_{化学物質} \geq objstore_{iter} + \epsilon - M \cdot \sum_{j \in ystore_{iter,j}=0} y_j$$

上記の式において、 ϵ およびMはそれぞれ小さな数および大きな数である。一般に、 ϵ は約0.01に設定でき、Mは約1000に設定できる。しかし、これらの数より小さな数および／または大きな数を用いることもできる。Mは、制約が、以前に同定されたロックアウト戦略のみに結合できることを確実にし、一方 ϵ は、以前に同定された戦略にロックアウトを加えると、最適な増殖で生化学的生成が少なくとも ϵ だけ増加しなければならな

いことを確実にする。この手法は、単一欠失戦略で野生型株が改善されない場合にはいつでも二重欠失に移動する。次いで二重欠失戦略で野生型株が改善されない場合には三重欠失を考慮する、などとなる。最終結果は、少なくとも1つのノックアウトによって互いに異なる別々の欠失戦略の、最適な増殖での所望の生化学的生成として表される順位付けリストとなる。破壊した場合に生化学的生成物の増殖連結型生成をもたらすこの最適化手順ならびに多種多様な反応セットの同定について、下記でさらに詳細に例示する。本明細書で提供される教示および指針を考慮すると、当業者は、本明細書で例示される方法および代謝の工学的設計が、細胞または微生物の増殖と任意の生化学的生成物との強制的な連結に適用可能であることを理解するであろう。

【0131】

10

本明細書で例示される方法は、所望の生成物を生合成的に生成する細胞および生物体の構築を可能にし、それには、特定された遺伝子改変を抱えるように設計製作された細胞または生物体の増殖への、標的生化学生成物の生成の必須の連結が含まれる。したがって、本明細書で記載されるコンピュータ方法は、OptKnockまたはSimPheny（登録商標）から選択されるコンピュータ方法によって特定される代謝改変の同定および実行を可能にする。代謝改変のセットには、例えば、1つまたは複数の生合成経路の酵素の付加および／または、例えば遺伝子欠失による破壊を含む1つまたは複数の代謝反応の機能的破壊を含めることができる。

【0132】

20

上記のように、OptKnock方法は、長期の増殖選択に曝した場合、突然変異体微生物ネットワークをコンピュータによって予測されるそれらの最大増殖表現型の方へ進化させることができるという前提で開発された。言い換えると、本手法は、選択圧の下で自己最適化する生物体の能力を導入する。OptKnockフレームワークは、ネットワーク化学量論に基づいて生化学的生成と細胞増殖との間の連結を強制する遺伝子欠失組合せの網羅的な列举を可能にする。最適遺伝子／反応ノックアウトの同定は、生じたネットワークについての最適増殖の解法が対象とする生化学物質を過剰に生産するように活性反応セットを選択する、2層の最適化問題の解決を必要とする（Burgardら、Biotechnol. Bioeng. 84巻、647～657頁（2003年））。

【0133】

30

前に例示され、例えば米国特許公開US2002/0012939、US2003/0224363、US2004/0029149、US2004/0072723、US2003/0059792、US2002/0168654およびUS2004/0009466、ならびに米国特許第7,127,379号に記載されるように、代謝経路に必要な不可欠な遺伝子を同定するために、E.coli代謝のコンピュータ化学量論モデルを使用することができる。本明細書で開示されるように、OptKnock数学フレームワークを、所望の生成物の増殖連結型生成をもたらす正確な遺伝子欠失に適用することができる。さらに、2層のOptKnock問題の解決は、1セットの欠失だけを提供する。全ての意味がある解決、すなわち増殖連結型生成の形成をもたらすノックアウトの全セットを列举するために、整数カットと呼ばれる最適化技術を実施することができる。これは、上記のように、各反復での整数カットと呼ばれる追加の制約の組み込みでOptKnock問題を反復して解決することを必要とする。

40

【0134】

本明細書で開示されるように、OptKnock戦略を用いて、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸などの所望の生成物の生成と増殖を連結する遺伝子ノックアウトを同定した（実施例XXI～XXIIIを参照）。OptKnock戦略を用いて同定する一方、本明細書で開示されるように、SimPheny（商標）などのシステムを含む任意の適切なモデリングシステムを用いて、遺伝子ノックアウトを同定して所望の生成物の生成を増殖と連結できる株を開発することができることが理解される。本明細書で開示される遺伝子欠失戦略のいずれかを、2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸を生成する経路を有する、本明細書で開示される天然に存在しない微生物

50

物体のいずれかと適宜連結して、2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成を増加させることができる。

【0135】

したがって、本発明は、天然に存在しない微生物体であって、タンパク質または酵素をコードする遺伝子中に生じている1つまたは複数の遺伝子破壊を含み、1つまたは複数の遺伝子破壊が前記生物体における3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成の増加を付与する微生物体をさらに提供する。本明細書で開示されるように、遺伝子破壊は、増殖連結型である、または増殖連結型でない3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成を付与することができる。例えば、1つまたは複数の遺伝子破壊は、表10または11に列挙したタンパク質または酵素をコードし得る（実施例XXIIおよびXXIIIを参照）。特定の実施形態では、1つまたは複数の遺伝子破壊は、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼおよびアセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼからなる群から選択されるタンパク質または酵素をコードし得る。さらなる実施形態では、生物体は、アスパルターゼ、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、NAD(P)トランスヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、ATPシンターゼ、ホスホエノールピルビン酸：ピルビン酸ホスホトランスフェラーゼ系、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホトランスアセチラーゼ、酢酸キナーゼ、6-ホスホグルコノラクトナーゼ、グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼおよびNADHデヒドロゲナーゼからなる群から選択されるタンパク質または酵素をコードする1つまたは複数の遺伝子破壊をさらに含み得る。

【0136】

したがって、本発明は、アルコールデヒドロゲナーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、および乳酸デヒドロゲナーゼ（表6および8、設計1）における機能的破壊を含有する、MAAまたは3-HIBの収率が改善された生物体を提供する（実施例XXIIおよびXXIIIを参照）。グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、アスパルターゼ、NAD(P)トランスヒドロゲナーゼまたはNADHデヒドロゲナーゼのいずれか（表6、設計2、7、10、13；表8、設計2、8）におけるさらなる機能的破壊を有する生物体がさらに提供される。アスパルターゼ、およびNAD(P)トランスヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、ATPシンターゼまたはピルビン酸ギ酸リアーゼのいずれか（表6、設計3、5；表8、設計3、5）におけるさらなる機能的破壊を有する生物体がさらに提供される。ピルビン酸ギ酸リアーゼ、およびNAD(P)トランスヒドロゲナーゼまたはグルタミン酸デヒドロゲナーゼのいずれか（表6、設計4；表8、設計4）におけるさらなる機能的破壊を有する生物体も提供される。ATPシンターゼ、およびピルビン酸ギ酸リアーゼ、PEP：Pyruvate PTSを介したD-グルコース輸送、6-ホスホグルコノラクトナーゼまたはグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼのいずれか（表6、設計6；表8、設計6、7）におけるさらなる機能的破壊を有する生物体がさらに提供される。グルタミン酸デヒドロゲナーゼおよびピルビン酸ギ酸リアーゼ（表6、設計8）におけるさらなる機能的破壊を有する生物体も提供される。酢酸キナーゼまたはホスホトランスアセチラーゼのいずれか（表6、設計9）におけるさらなる機能的破壊を有する生物体がさらに提供される。NAD(P)トランスヒドロゲナーゼ、および6-ホスホグルコノラクトナーゼまたはグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼのいずれか（表6、設計11；表8、設計9 w/THD2）におけるさらなる機能的破壊を有する生物体がさらに提供される。グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、および6-ホスホグルコノラクトナーゼまたはグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼのいずれか（表8、設計9 w/GLUDy）におけるさらなる機能的破壊を有する生物体がさらに提供される。ピルビン酸ギ酸リアーゼ（表6、設計12）におけるさらなる機能的破壊を有する生物体も提供される。NADHデヒドロゲナーゼ、および酢酸キナーゼまたはホスホトランスアセチラーゼのいずれか（表6、設計14）におけるさらなる機能的破壊を有する生物体がさらに提供される。

【0137】

本明細書で開示されるように、1つまたは複数の遺伝子破壊は、1つまたは複数の遺伝子の欠失を含み得る。遺伝子欠失を含む遺伝子破壊のそのような方法は、本明細書で開示

されるように、当業者に周知である。所望により、実質的に嫌気性の培地中で細胞を培養することができる。

【0138】

1つまたは複数の遺伝子破壊を有する、本明細書で開示され上記および実施例XXIIおよびXXIIIで論じられる生物体を用いて、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸を生成する方法も提供される。したがって、本発明は、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸を生成する方法であって、タンパク質または酵素をコードする遺伝子中に生じている1つまたは複数の遺伝子破壊を含む天然に存在しない微生物体を培養することを含み、遺伝子破壊がタンパク質または酵素の活性を低下させる場合に、1つまたは複数の遺伝子破壊が、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成と生物体の増殖との強制的な連結を付与し、それによって、前記1つまたは複数の遺伝子破壊が、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の安定した増殖連結型の生成を生物体に付与する方法を提供する。

10

【0139】

本明細書で提供される教示および指針を考慮すると、当業者は、酵素反応を破壊するには、反応に関与する1つまたは複数の酵素の触媒活性を破壊することが必要であることを理解するであろう。破壊は、例えば、コード遺伝子の欠失、またはコード遺伝子配列の1つもしくは複数における遺伝子変化の組み込みを含む様々な手段によって行うことができる。破壊の標的とするコード遺伝子は、触媒活性に関与する酵素をコードする遺伝子の1つでもよく、いくつかでもよく、または全てでもよい。例えば、単一の酵素が標的とする触媒活性に関与する場合、コードされた遺伝子産物の触媒活性を低下させ、または壊す遺伝子変化によって破壊を行うことができる。同様に、単一の酵素がヘテロマーを含む多量体である場合、コードされた遺伝子産物の1つまたは全部のサブユニットの機能を低下させ、または壊す遺伝子変化によって破壊を行うことができる。活性の破壊は、活性な複合体を形成するための1つもしくは複数の結合活性の喪失、多量体の複合体の触媒サブユニットの破壊、または両方によって行うことができる。本発明の代謝反応を破壊するために、多量体タンパク質の結合および活性の他の機能を標的にすることもできる。そのような他の機能は当業者に周知である。さらに、本発明の反応または代謝変化に関与する1つまたは複数の酵素の触媒活性を低下または消失させるために、本発明に従って単一のポリペプチドまたは多量体の複合体の機能の一部または全部を破壊することができる。同様に、標的とする反応が破壊される限り、本発明の反応または代謝変化に関与する酵素の一部または全部を破壊することができる。

20

30

【0140】

本明細書で提供される教示および指針を考慮すると、当業者は、共通遺伝子および／または同様のもしくは実質的に同じ活性を示すその遺伝子の1つもしくは複数のオルソログによってコードされる反応を低下させまたは除去することによって、酵素反応を破壊することができることも理解するであろう。共通遺伝子と全てのオルソログをどちらも低下させると、標的とする反応の任意の触媒活性の完全な消失をもたらす得る。しかし、共通遺伝子と1つまたは複数のオルソログのどちらかを破壊すると、増殖と生成物の生合成との連結を促進するのに十分な、標的とする反応の触媒活性の低下をもたらす得る。様々な代謝変化の触媒活性をコードする共通遺伝子ならびにそのオルソログがどちらも本明細書で例示される。当業者は、本発明の方法において、標的とする代謝反応の酵素をコードする遺伝子の一部または全部の破壊を実施し、増殖連結型の生成物の生成を達成するために本発明の天然に存在しない微生物体にそれを組み込むことができることを理解するであろう。

40

【0141】

一部の実施形態では、遺伝子破壊は、完全な遺伝子欠失を含み得る。一部の実施形態では、遺伝子を破壊する他の手段には、例えば、オリゴヌクレオチドの削除もしくは付加、または遺伝子を作動不能にする突然変異によりフレームシフトさせることが含まれる。しかし、天然に存在しない生物体にその野生型への復帰からの安定性を付与し得るので、当

50

業者は、遺伝子欠失の利点について認識するであろう。特に、遺伝子破壊は、本明細書で詳述する遺伝子を含む遺伝子セットから選択される。

【0142】

予測された株の設計では生成物の形成とバイオマス形成が十分に連結されないことが決定した場合に、提唱された各株にさらなる欠失を補充することができる。あるいは、適応進化またはランダム突然変異誘発により、増殖条件下で著しい活性を有することが知られていないいくつかの他の酵素を活性にすることができ、それをノックアウトすることもできる。しかし、本明細書で提供される遺伝子欠失セットのリストは、高収率の増殖連結型3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸生成株を構築するための開始点となる。

【0143】

当業者は、例えば、非生成的増殖期、その後非増殖的生成期を提供することにより、非増殖連結型の生成によってMAA、2-ヒドロキシイソブチレート、または3-ヒドロキシイソブチレートを生成することもできることを認識するであろう。本明細書に記載の結果は、遺伝子欠失または遺伝子の機能的破壊の組合せが、*E. coli*および他の生物体のMAA、2-ヒドロキシイソブチレート、または3-ヒドロキシイソブチレートの生成能力を著しく改善することを示す。*E. coli*以外の微生物体を産生宿主として選択する場合、生物体が、破壊に選び出した遺伝子産物のサブセットについて天然に活性を欠き、または低い活性を示す場合でも、株設計経路は同等に適用可能である。後者の場合、破壊を導入して、選択した産生宿主に天然に存在する遺伝子産物の酵素活性を消失または減弱させることができる。一部の実施形態では、コンピュータで決定された代謝経路のMAA、2-ヒドロキシイソブチレート、または3-ヒドロキシイソブチレートの増殖連結型生成は、設計された代謝の遺伝子型を有する株の構築によって確認することができる。代謝について工学的に操作されたこれらの細胞または生物体を適応進化に曝して、増殖連結型の生成物の生成をさらに増大させることもできる。一部の実施形態では、工学的に操作された細胞または生物体は、特定の代謝経路を通してフラックスを増加させる有益な遺伝子のさらなるコピーを組み込むこともできる。あるいは、別の生物体からの外因性遺伝子挿入を用いて、宿主生物体に存在しない機能を導入することができる。

【0144】

本明細書に記載の設計戦略は、2-ヒドロキシイソ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成をエネルギー発生および／または酸化還元バランスと連結するので、増殖連結型の生成を増強するのに有用であるだけでなく、非増殖連結型の生成を増強するのにもよく適している。例示的な非増殖連結型の生成方法は、好氣的増殖期、その後嫌氣的生成期を実施することを含む。例えば、Vemuriら(J. Ind. Microbiol. Biotechnol.、28巻(6号)、325～332頁(2002年))は、*E. coli*でスクシネートを生成する二重期のプロセスについて記載している。Okinoら、Appl. Microbiol. Biotechnol.、81巻(3号)、459～464頁(2008年))は、*Corynebacterium glutamicum*株のある株における同様の非増殖連結型の生成プロセスについて記載している。

【0145】

Durnerら、Appl. Environ. Microbiol.、66巻(8号)、3408～3414頁(2000年)に記載のように、別のそのような方法では、増殖した細胞培養物に必須栄養素を与えないでおり、それによって増殖を制限するが、生成は妨げられない。Altamiranoら、Biotechnol. Bioeng.、76巻、351～360頁(2001年)に記載のように、生成から増殖を分離することを目標とするさらに別の戦略では、増殖基質を、よりゆっくりと代謝可能である別の化合物と交換する。Blombachら、Appl. Microbiol. Biotechnol.、79巻、471～479頁(2008年)に記載のように、特定の遺伝子改変によって増殖分離型の生成物形成をもたらすこともできる。

【0146】

本発明の様々な実施形態の働きに実質的に影響を及ぼさない改変も、本明細書で提供される本発明の定義の範囲内で提供されるものと理解される。したがって、以下の実施例は本発明を例示するためのものであり、限定するものではない。

【実施例】

【0147】

(実施例 I)

3-ヒドロキシイソブチレートを紹介したM A AへのスクシニルC o Aの転換の経路

この実施例は、3-ヒドロキシイソブチレートを紹介したスクシニルC o Aからメタクリル酸への例示的なM A Aの合成経路を記載する。

【0148】

M A A合成の1つの例示的な経路はスクシニルC o Aから進行する(図2参照)。この経路は、スクシニルC o AからM A Aを形成するために、少なくとも3つおよび最大5つの酵素ステップを使用する。この経路は酸化還元バランスがとれており、嫌氣的条件下において副産物を形成せずに、それが潜在的にグルコース1mol当たり1.33molの最大M A A収率をもたらすことができることを示す。さらに、この経路はエネルギー効率が良く、ホスホエノールピルビン酸(P E P)カルボキシキナーゼ(P E P C K)活性が不可逆的であると考え(すなわち、オキサロアセテートへのP E PのA T P生成カルボキシル化を触媒することができない)場合、M A Aに代謝されるグルコース1mol当たり0.5のA T P、またはP E P C Kが可逆的であると考え(すなわち、オキサロアセテートへのP E PのA T P生成カルボキシル化を触媒することができる)場合1.72のA T Pを生成することができる。後者のA T P収率は、グルコースからのラクテートまたはエタノールの形成からのA T P収率、すなわち代謝されるグルコース当たり2A T Pに匹敵し、メタクリレート発酵は細胞増殖および維持に十分なエネルギーを生成することができることを示す。

【0149】

この経路中(図2参照)、スクシニルC o Aは最初に(R)-メチルマロニルC o Aに転換され、これはエピメラーゼによって(S)-メチルマロニルC o Aに転換される可能性がある。メチルマロニルC o Aの(R)-または(S)-のいずれかの立体異性体は、(図2中に示すような)一对の酵素、またはアシルC o Aレダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を示す一種の酵素のいずれかによって、次いでそれぞれ(R)-または(S)-3-ヒドロキシイソブチレートに還元される。スクシニルC o Aから3-ヒドロキシイソブチレートへの経路はW O 2 0 0 7 / 1 4 1 2 0 8中にも記載されている。最終ステップ中、3-ヒドロキシイソブチレートが脱水してM A Aが形成される。

【0150】

この経路の首尾良い工学的操作は、十分な活性および特異性を有する適切な酵素のセットの同定を含む。これは、適切な酵素のセットの同定、生成宿主へのそれらの対応する遺伝子のクローニング、発酵条件の最適化、および発酵後の生成物形成に関するアッセイを伴う。メタクリル酸の生成用の生成宿主を工学的に操作するために、1つまたは複数の外因性D N A配列を微生物中で発現させる。さらに、微生物は機能的に欠失した(1つまたは複数の)内因性遺伝子を有することができる。これらの改変は、再生可能なフィードストックを使用したメタクリル酸の生成を可能にする。

【0151】

所望経路のそれぞれのステップを触媒する酵素をコードすることができる、いくつかの生化学的に特徴付けた候補遺伝子を以下に記載する。経路を工学的に操作するための宿主生物体としてのE. coliの使用を記載するが、本質的に任意の適切な宿主生物体を使用することができる。具体的に挙げるのは、E. coliに固有である遺伝子、および適切にクローニングおよび発現したときに適切な形質転換を触媒するために適用することができる他の生物体中の遺伝子である。

【0152】

図2を参照すると、ステップ1はメチルマロニルC o Aムターゼが関与する(E C 5.4.99.2)。最初のステップでは、メチルマロニルC o Aムターゼ(M C M)によっ

てスクシニルC o AがメチルマロニルC o Aに転換される。E. coli 中では、可逆性アデノシルコバラミン依存性ムターゼが3ステップ経路に関与し、プロピオネートへのスクシネートの転換をもたらす(Hallerら、Biochemistry 39巻、4622~4629頁(2000年))。YgfGの欠失と共にMCM遺伝子候補の過剰発現を使用して、プロピオニルC o AへのメチルマロニルC o Aの脱カルボキシル化を妨げること、およびM A A合成に利用可能なメチルマロニルC o Aを最大にすることができる。MCMはEscherichia coli 中では遺伝子scpAによってコードされており(BobikおよびRasche、Anal. Bioanal. Chem.、375巻、344~349頁(2003年);Hallerら、Biochemistry 39巻、4622~4629頁(2000年))、Homo sapiens 中ではmutA 10によってコードされている(PadovaniおよびBanerjee、Biochemistry、45巻、9300~9306頁(2006年))。いくつかの他の生物体中では、MCMは α および β サブユニットを含有し、2つの遺伝子によってコードされている。2つのサブユニットタンパク質をコードする例示的な遺伝子候補は、Propionibacterium fredenreichii shermanii 種のmutAおよびmutB(KorotkovaおよびLidstrom、J. Biol. Chem.、279巻、13652~13658頁(2004年))、ならびにMethylobacterium extorquensのmcmAおよびmcmB(Korotkova 20およびLidstrom、上記、2004年)である。これらの遺伝子のタンパク質配列は、それらの対応するGenBankアクセッション番号によって同定することができる。

【0153】

【化4】

遺伝子	GenBank ID	生物体
scpA	NP_417392.1	Escherichia coli K12
mutA	P22033.3	Homo sapiens
mutA	P11652.3	Propionibacterium fredenreichii shermanii 種
mutB	P11653.3	Propionibacterium fredenreichii shermanii 種
mcmA	Q84FZ1	Methylobacterium extorquens
mcmB	Q6TMA2	Methylobacterium extorquens

30

これらの配列を使用して、配列類似性検索(例えば、BLASTp)によりGenBankまたは他のデータベース中のホモログタンパク質を同定することができる。得られたホモログタンパク質およびそれらの対応する遺伝子配列は、生成宿主を作製するためのE. coli または他の適切な宿主微生物への形質転換用の追加的な外因性DNA配列をもたらす。追加的な遺伝子候補には、E. coli のspcA遺伝子産物との高い相同性に基づいて同定した以下のものがある。

40

【0154】

【化5】

遺伝子	GenBank ID	生物体
sbm	NP_838397.1	Shigella flexneri
SARI_04585	ABX24358.1	Salmonella enterica
YfreA_01000861	ZP_00830776.1	Yersinia frederiksenii

メチルマロニルC o Aムターゼ触媒遺伝子と隣接する遺伝子は、最大活性に寄与する証拠が存在する。例えば、M. extorquens 由来のmeaB遺伝子はメチルマロニ

50

ルCoAムターゼと複合体を形成し、*in vitro*でムターゼ活性を刺激し、かつ不可逆的失活からおそらくそれを保護することが実証されている（KorotkovaおよびLidstrom、J. Biol. Chem. 279巻、13652～13658頁（2004年））。M. extorquensのmeaB遺伝子産物は、染色体上でscpAと隣接するE. coliのargK遺伝子（BLASTp：45%同一、e値：4e-67）の生成物と非常に類似している。P. freudenreichii中のmeaBホモログに関する配列はGenBankに載っていない。しかしながら、Propionibacterium acnesのKPA171202遺伝子産物、YP_055310.1はM. extorquensのmeaBタンパク質と51%同一であり、かつその遺伝子も染色体上でメチルマロニルCoAムターゼ遺伝子と隣接する。

10

【0155】

【化6】

遺伝子	GenBank ID	生物体
argK	AAC75955.1	Escherichia coli K12
	YP_055310.1	Propionibacterium acnes KPA171202
meaB	2QM8_B	Methylobacterium extorquens

E. coliはアデノシルコバラミン、中間体コピナミドまたはコバラミンと供給される時だけこの反応に必要な補因子を合成することができる（LawrenceおよびRoth、J. Bacteriol. 177巻、6371～6380頁（1995年）；LawrenceおよびRoth、Genetics 142巻、11～24頁（1996年））。あるいは、de novoでコバラミンを合成する能力が、異種遺伝子の発現後にE. coliにおいて付与されている（Rauxら、J. Bacteriol.、178巻、753～767頁（1996年））。

20

【0156】

図2を参照すると、ステップ2はメチルマロニルCoAエピメラーゼが関与する（EC 5.1.99.1）。経路中の第2の酵素、メチルマロニルCoAエピメラーゼ（MMC E）は、（R）-メチルマロニルCoAを（S）-メチルマロニルCoAに転換する。MMC Eは、奇数炭素の脂肪酸、およびアミノ酸バリン、イソロイシン、およびメチオニンの分解において必要な酵素である。メチルマロニルCoAエピメラーゼ活性はE. coliのゲノム中にコードされるとは考えられないが（Boyntonら、J. Bacteriol.、178巻、3015～3024頁（1996年））、Homo sapiens（YqjC）（FullerおよびLeadlay、Biochem. J.、213巻、643～650頁（1983年））、Rattus norvegicus（Mcee）（BobikおよびRasche、J. Biol. Chem.、276巻、37194～37198頁（2001年））、Propionibacterium shermanii（AF454511）（Fuller、およびLeadlay、Biochem. J.、213巻、643～650頁（1983年）；Hallerら、Biochemistry、39巻、4622～4629頁（2000年）；McCarthyら、Structure、9巻、637～646頁、2001年）およびCaenorhabditis elegans（mmce）（Kuhnら、FEBS J.、272巻、1465～1477頁（2005年））などの他の生物体中には存在する。この酵素ステップは、3-ヒドロキシイソ酪酸へのメチルマロニルCoAの転換に使用される1つまたは複数の酵素の立体特異性に応じて必要とされる、または必要とされない可能性がある（ステップ3～4、図2中）。Bacillus cereus中のAE016877などの微生物中の追加的な遺伝子候補は高い配列相同性を有するが、実験によって確認されていない。

30

40

【0157】

【化 7】

<u>遺伝子</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>MCEE</i>	Q96PE7.1	<i>Homo sapiens</i>
<i>Mcee_predicted</i>	NP_001099811.1	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>AF454511</i>	AAL57846.1	<i>Propionibacterium fredenreichii</i> 種 <i>shermanii</i>
<i>mmce</i>	AAT92095.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>AE016877</i>	AAP08811.1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579

10

図 2 を参照すると、ステップ 3 はメチルマロニル CoA レダクターゼが関与する (EC 1. 2. 1. -)。図 2 中に示すように、その対応するアルコール、3-ヒドロキシイソブチレートへのメチルマロニル CoA の還元は、2 つの酵素ステップによって進行し得る。最初のステップ、メチルマロン酸セミアルデヒドへのメチルマロニル CoA の転換は、CoA 依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼによって実施される。*Sulfolobus tokodaii* 由来のマロニル CoA レダクターゼ遺伝子によってコードされる酵素 (Alber ら、J. Bacteriol.、188 巻、24 号、8551~8559 頁 (2006 年)) は、その対応するアルデヒドへのメチルマロニル CoA の転換を触媒することが示されている (WO2007141208)。同様の酵素が *Metallosphaera sedula* 中に存在する (Alber ら、J. Bacteriol.、188 巻、24 号、8551~8559 頁 (2006 年))。いくつかの追加的な CoA デヒドロゲナーゼは、その対応するアルデヒドにアシル CoA を還元することもできる。このような酵素をコードする例示的な遺伝子には、脂肪酸アシル CoA レダクターゼをコードする *Acinetobacter calcoaceticus* の *acr1* (Reise および Somerville、J. Bacteriol.、179 巻、2969~2975 頁 (1997 年))、*Acinetobacter* 種 M-1 脂肪酸アシル CoA レダクターゼ (Ishige ら、Appl. Environ. Microbiol.、68 巻、1192~1195 頁 (2002 年))、および *Clostridium kluyveri* 中の *sucD* 遺伝子によってコードされる CoA- および NADP- 依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (Sohling および Gottschalk、J. Bacteriol.、178 巻、871~880 頁 (1996 年) ; Sohling および Gottschalk、J. Bacteriol.、178 巻、871~880 頁 (1996 年)) がある。*Pseudomonas* 種中で *bphG* によってコードされるアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼをアシル化する酵素も良い候補である。分岐鎖状化合物イソブチルアルデヒドを酸化およびアシル化することが実証されているからである (Powlowski ら、J. Bacteriol.、175 巻、377~385 頁 (1993 年))。

20

30

【0158】

【化 8】

<u>遺伝子</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>mcr</i>	NP_378167	<i>Sulfolobus tokodaii</i>
<i>mcr</i>	YP_001190808.1	<i>Metallosphaera sedula</i>
<i>acr1</i>	YP_047869.1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<i>acr1</i>	AAC45217	<i>Acinetobacter baylyi</i>
<i>acr1</i>	BAB85476.1	<i>Acinetobacter</i> 種 M-1 株
<i>sucD</i>	P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>bphG</i>	BAA03892.1	<i>Pseudomonas</i> 種

40

50

図2を参照すると、ステップ4は3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼが関与する (EC 1. 1. 1. 31)。3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼは、メチルマロン酸セミアルデヒドへの3-ヒドロキシイソブチレートの可逆的酸化を触媒する。この酵素はバリン、ロイシンおよびイソロイシンの分解と関係があり、細菌、真核生物、および哺乳動物中で同定されている。Thermus thermophilus HB8由来のP84067によってコードされる酵素は、構造的に特徴付けられている (Lokanathら、J. Mol. Biol.、352巻、905～917頁 (2005年))。ヒト3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼの可逆性は、同位体標識した基質を使用して実証された (ManningおよびPollitt、Biochem. J.、231巻、481～484頁 (1985年))。この酵素をコードする追加的な遺伝子には、Homo sapiens (Hawesら、Methods Enzymol.、324巻、218～228頁 (2000年)) およびOryctolagus cuniculus (Chowdhuryら、Biosci. Biotechnol. Biochem.、60巻、2043～2047頁 (1996年)) ; Hawesら、Methods Enzymol.、324巻、218～228頁 (2000年)) における3hidh、Pseudomonas aeruginosaにおけるmmsb、およびPseudomonas putidaにおけるdhat (AberhartおよびHsu. J. Chem. Soc. [Perkin] 6巻、1404～1406頁 (1979年)) ; Chowdhuryら、Biosci. Biotechnol. Biochem.、67巻、438～441頁 (2003年)) ; Chowdhuryら、Biosci. Biotechnol. Biochem.、60巻、2043～2047頁 (1996年)) がある。

【0159】

【化9】

遺伝子	GenBank ID	生物体
P84067	P84067	Thermus thermophilus
mmsb	P28811.1	Pseudomonas aeruginosa
dhat	Q59477.1	Pseudomonas putida
3hidh	P31937.2	Homo sapiens
3hidh	P32185.1	Oryctolagus cuniculus

図2を参照すると、代替として、ステップ3および4は、組合せアルコール／アルデヒドデヒドロゲナーゼを含むことができる (EC 1. 2. 1. -)。デュアルアシルCoAレダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有する多機能酵素による1ステップ中で、メチルマロニルCoAを3-ヒドロキシイソブチレートに還元することができる。3-ヒドロキシイソブチレートへのメチルマロニルCoAの直接転換に関する証拠は報告されていない。しかしながら、この反応は、アルコールとアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の両方を有するCoA依存性酵素によって触媒される、アセチルCoAからエタノールおよびブチリルCoAからブタノールなどの一般的な転換と類似する。遺伝子候補には、E. coliのadhE (Kesslerら、FEBS Lett.、281巻、59～63頁 (1991年))、およびそれぞれアセチルCoAおよびブチリルCoAをエタノールおよびブタノールに還元することができる、C. acetobutylicumのbdhIおよびbdhII (Walterら、J. Bacteriol.、174巻、7149～7158頁 (1992年)) がある。アセチルCoAをエタノールに還元する以外に、Leuconostoc mesenteroides中でadhEによってコードされる酵素は、分岐鎖状化合物イソブチルアルデヒドをイソブチリルCoAに酸化することが示されている (Kazahayaら、J. Gen. Appl. Microbiol.、18巻、43～55頁 (1972年)) ; Kooら、Biotechnol. Lett.、27巻、505～510頁 (2005年))。メチルマロニルCoAを直接3-ヒドロキシイソブチレートに転換するための追加的候補酵素は、Chloroflexus

aurantiacus由来のマロニルCoAレダクターゼによってコードされる (Huglerら、J. Bacteriol. 184巻、9号、2404～2410頁 (2002年))。

【0160】

【化10】

遺伝子	GenBank ID	生物体
<i>mcr</i>	YP_001636209.1	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
<i>adhE</i>	NP_415757.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>bdh II</i>	NP_349891.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>adhE</i>	AAV66076.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

10

図2を参照すると、ステップ5は3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼが関与する (EC 4. 2. 1. -)。最終ステップはメタクリル酸への3-ヒドロキシイソブチレートの脱水が関与する。この特異的な酵素の変換に関する直接の証拠は確認されていない。しかしながら、大部分のデヒドラターゼは水の α 、 β 除去を触媒し、これは電子求引性カルボニル、カルボキシレート、またはCoA-チオールエステル基による α -水素の活性化、および β -位置からのヒドロキシル基の除去を含む (BuckelおよびBarker、J. Bacteriol. 117巻、1248～1260頁 (1974年)) ; Martinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101巻、15645～15649頁 (2004年))。これはメタクリレート経路中の最終ステップに関して提唱されたまさにその型の変換である。さらに、この提唱された変換は、*Eubacterium barkeri*の2- (ヒドロキシメチル) グルタル酸デヒドラターゼと非常に類似している (図3A)。この酵素はニコチネート異化との関連で研究されており、hmdによってコードされる (Alhapelら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103巻、12341～12346頁 (2006年))。高い配列相同性を有する類似の酵素は、*Bacteroides capillosus*、*Anaerotruncus colihominis*、および*Natranaerobius thermophilus* 中で見られる。これらの酵素は、[4Fe-4S] を含有する細菌のセリンデヒドラターゼ、例えばtdcG、sdhB、およびsdaA) によってコードされる *E. coli* の酵素の α -および β -サブユニットとも相同である。

20

30

【0161】

【化11】

遺伝子	GenBank ID	生物体
<i>hmd</i>	ABC88407.1	<i>Eubacterium barkeri</i>
BACCAP_02294	ZP_02036683.1	<i>Bacteroides capillosus</i> ATCC 29799
ANACOL_02527	ZP_02443222.1	<i>Anaerotruncus colihominis</i> DSM 17241
NtherDRAFT_2368Z	P_02852366.1	<i>Natranaerobius thermophilus</i> JW/NM-WN-LF

40

フマレートへのマレートの脱水を天然に触媒するフマル酸ヒドラターゼ酵素は、追加的な候補セットとなる (図3B)。分岐鎖状基質に反応するフマル酸ヒドラターゼの能力は記載されていないが、この酵素に関する大量の構造情報が入手可能であり、他の研究者達はこの酵素を首尾良く工学的に操作して、活性、阻害および局在を変えている (Weaver、Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.、61巻、1395～1401頁 (2005年))。例示的な酵素候補には、*Escherichia coli* (Estevezら、Protein Sci.、11巻、1552～1557頁 (2002年)) ; HongおよびLee、Biotechnol. Bioprocess Eng.、9巻、252～255頁 (2004年)) ; RoseおよびW

50

eaver, Proc. Natl. Acad. Sci. USA、101巻、3393～3397頁(2004年)、Campylobacter jejuni (Smithら、Int. J. Biochem. Cell Biol.、31巻、961～975頁(1999年))およびThermus thermophilus (Mizobataら、Arch. Biochem. Biophys.、355巻、49～55頁(1998年))由来のfumC、およびRattus norvegicus由来のfumH (Kobayashiら、J. Biochem.、89巻、1923～1931頁(1981年))によってコードされる酵素候補がある。高い配列相同性を有する類似の酵素には、Arabidopsis thaliana由来のfumIおよびCorynebacterium glutamicum由来のfumCがある。

10

【0162】

【化12】

遺伝子	GenBank ID	生物体
<i>fumC</i>	P05042.1	<i>Escherichia coli K12</i>
<i>fumC</i>	O69294.1	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>fumC</i>	P84127	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>fumH</i>	P14408.1	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>fumI</i>	P93033.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>fumC</i>	Q8NRN8.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i>

20

この実施例は、スクシニルCoAからMMAを生成する生合成経路を記載する。

【0163】

(実施例 I I)

3-ヒドロキシイソブチレートを紹介したMAAへのスクシニルCoAの転換のための経路を有するMAA生成微生物体の調製

この実施例は、3-ヒドロキシイソブチレートを介してスクシニルCoAからMAAを生成することができる微生物体の作製を記載する。

【0164】

30

*Escherichia coli*は、図2中に示すMAA経路を工学的に操作するための標的生物体として使用する。*E. coli*は、MAAを生成することができる天然に存在しない微生物を作製するのに良い宿主を提供する。*E. coli*は遺伝子操作の影響を受けやすく、嫌氣的または微好氣的条件下で効率良く、エタノール、酢酸、ギ酸、乳酸、およびコハク酸のような、様々な生成物を生成することができることは公知である。

【0165】

MAAを生成するように工学的に操作された*E. coli*株を作製するために、経路中で利用する酵素をコードする核酸を、周知の分子生物学の技術を使用して*E. coli*において発現させる(例えば、Sambrook、上記、2001年; Ausubel、上記、1999年を参照)。特に、それぞれメチルマロニルCoAムターゼ、その安定剤タンパク質、およびメチルマロニルCoAエピメラーゼ活性をコードするscpA (NP_417392.1)、argK (AAC75955.1)、およびAF454511 (AAL57846.1) 遺伝子を、PA1/lacOプロモーターの下でpZE13ベクター(Expressys、Ruelzheim、ドイツ)にクローニングする。さらに、それぞれメチルマロニルCoAレダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼ活性をコードするmcr (NP_378167)、dhat (Q59477.1)、およびhmd (ABC88407.1) 遺伝子を、PA1/lacOプロモーターの下でpZA33ベクター(Expressys、Ruelzheim、ドイツ)にクローニングする。2組のプラスミドを*E. coli*株MG1655に形質転換して、スクシニルCoAから3-ヒドロキシイソブチレートの経

40

50

路を介したM A A合成に必要なタンパク質および酵素を発現させる。

【0166】

得られた遺伝子操作生物体は、当技術分野で周知の手順後、グルコース含有培地において培養する（例えば、S a m b r o o kら、上記、2001年を参照）。E. c o l i iの宿主株をd e n o v oでコバラミンを合成するように操作しない限り、コバラミンをさらに培地に供給してムターゼ酵素の活性を確実にする（例えば、R a u xら、J. B a c t e r i o l. 178巻、753～767頁（1996年）を参照）。M A A合成遺伝子の発現は、例えば、ノーザンブロット、m R N AのP C R増幅、イムノブロッティングなどを含めた、ポリペプチド発現または酵素活性を決定するための当技術分野で周知の方法を使用して裏付ける。発現される酵素の酵素活性は、個々の活性に特異的なアッセイを使用して確認する。M A Aを生成する工学的に操作されたE. c o l i i株の能力は、H P L C、ガスクロマトグラフィー質量分析法（G C M S）および／または液体クロマトグラフィー質量分析法（L C M S）を使用して確認する。

10

【0167】

機能的M A A合成経路を有するように操作した微生物株は、経路の有効利用のための最適化によってさらに増強する。簡単に述べると、工学的に操作された株を評価して、いずれの外因性遺伝子が律速レベルで発現されるかどうか決定する。例えば追加的遺伝子コピー数の導入によって、経路中の流れを制限し得る低レベルで発現する任意の酵素に関して発現は増大する。

【0168】

より良い生産体を作製するために、代謝モデリングを利用して増殖条件を最適化する。モデリングをさらに使用して、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計する（例えば、米国特許公開U S 2 0 0 2 / 0 0 1 2 9 3 9、U S 2 0 0 3 / 0 2 2 4 3 6 3、U S 2 0 0 4 / 0 0 2 9 1 4 9、U S 2 0 0 4 / 0 0 7 2 7 2 3、U S 2 0 0 3 / 0 0 5 9 7 9 2、U S 2 0 0 2 / 0 1 6 8 6 5 4およびU S 2 0 0 4 / 0 0 0 9 4 6 6、および米国特許第7, 127, 379号を参照）。モデリング解析によって、M A Aのより良好な生成への代謝の移行の、細胞増殖に対する影響の信頼できる予測を与える。1つのモデリング法は、M A Aのより良好な生成を一括してもたらず遺伝子ノックアウトを選択するために適用される2層最適化法O p t K n o c k（B u r g a r dら、B i o t e c h n o l. B i o e n g i n e e r. 84巻、647～657頁（2003年））である。適応進化を使用して、例えばM A A生成物のスクシニルC o A中間体の、より良い生産体を作製することもできる。適応進化を実施して増殖特性と生産特性の両方を改善する（F o n gおよびP a l s s o n、N a t. G e n e t. 36巻、1056～1058頁（2004年）；A l p e rら、S c i e n c e 314巻、1565～1568頁（2006年））。結果に基づいて、後の数ラウンドのモデリング、遺伝子操作および適応進化をM A A生産体に施して、生産をさらに増大することができる。

20

30

【0169】

M A Aの大規模な生産用に、前述の生物体を当技術分野で公知の培地を使用して発酵槽中で培養して、嫌氣的条件下での生物体の増殖を促進する。発酵は回分、流加または連続的な形で実施する。嫌氣的条件は最初に窒素で培地をスパージし、次いで培養容器を密閉することによって維持し、例えば、フラスコは隔膜および圧着キャップで密閉することができる。限られた通気で隔膜中に小さな穴を与えることによって、微好氣的条件を利用することもできる。培地のp Hは、H₂ S O₄などの酸を加えることによって約7のp Hに保つ。増殖速度は分光光度計を使用して光学濃度を測定することによって決定し（600 nm）、グルコースの取り込み速度は経時的な炭素源の枯渇をモニターすることによって決定する。望ましくないアルコール、有機酸、および残留グルコースなどの副産物は、例えば、A m i n e x（登録商標）シリーズのH P L Cカラム（例えば、H P X-87シリーズ）（B i o R a d、H e r c u l e s C A）を使用して、グルコースおよびアルコールに屈折率検出器、有機酸にU V検出器を使用して、H P L C（S h i m a d z u、C o l u m b i a M D）によって定量化することができる（L i nら、B i o t e c h n

40

50

ol. Bioeng. 775～779頁(2005年))。

【0170】

この実施例は、3-ヒドロキシイソブチレートを紹介してスクシニルCoAからMAAを生成することができる微生物体の調製を記載する。

【0171】

(実施例III)

3-アミノ-2-メチルプロパノエートを介したMAAへのスクシニルCoAの転換のための経路

この実施例は、3-アミノ-メチルプロパノエートを介したスクシニルCoAからMAAへの例示的なMAA合成経路を記載する。

【0172】

MAA生合成の別の例示的な経路は、3-アミノ-2-メチルプロパノエートを介してスクシニルCoAから進行する(図4参照)。この経路は嫌氣的条件下において高収率であり、最大理論収率はグルコース1mol当たりMAA1.33molである。この経路はエネルギー効率も良く、PEPカルボキシキナーゼが可逆的に作用することができるという想定下で、最大生成物収率でグルコース1mol当たり1.55molのATPを生成することができる。

【0173】

メチルマロン酸セミアルデヒドへのスクシニルCoAの転換を含む、この経路の最初の3ステップは、実施例I中に記載したスクシニルCoAからMAAへの経路と同一である(図2参照)。この経路はステップ4で分岐し、そこでメチルマロン酸セミアルデヒドはトランスアミナーゼによって3-アミノ-2-メチルプロピオネートに変換される。最終経路のステップは、メタクリル酸への3-アミノ-2-メチルプロピオネートの脱アミノ化を伴う。

【0174】

最初の3経路ステップを触媒するための酵素および遺伝子候補は、実施例I中に記載する。ステップ4および5の遺伝子候補は以下で論じる。

【0175】

図4を参照すると、ステップ4は3-アミノ-2-プロピオン酸メチルトランスアミナーゼに関与する(EC2.6.1.22)。3-アミノ-2-プロピオン酸メチルトランスアミナーゼは、メチルマロン酸セミアルデヒドから3-アミノ-2-メチルプロピオネートへの変換を触媒する。Rattus norvegicusおよびSus scrofaにおいて特徴付けられAbatによってコードされる酵素は、経路中の対象とする方向にこの変換を触媒することが示されている(Kakimotoら、Biochim. Biophys. Acta、156巻、374～380頁(1968年); Tamakiら、Methods Enzymol.、324巻、376～389頁(2000年))。3-アミノ-2-プロピオン酸メチルトランスアミナーゼと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、C. elegans中のGta-1およびBacillus subtilus中のgabTがある。さらに、遺伝子gabTによってコードされるE. coli中の天然GABAアミノトランスフェラーゼの1つは、広範囲の基質特異性を有することが示されており、基質として3-アミノ-2-メチルプロピオネートを利用することができる(Liuら、Biochemistry、43巻、10896～10905頁(2004年); Schulzら、Appl. Environ. Microbiol.、56巻、1～6頁(1990年))。

【0176】

【化 1 3】

遺伝子	GenBank ID	生物体
<i>Abat</i>	P50554.3	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Abat</i>	P80147.2	<i>Sus scrofa</i>
<i>Gta-1</i>	Q21217.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>gabT</i>	P94427.1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>gabT</i>	P22256.1	<i>Escherichia coli K12</i>

図 4 を参照すると、ステップ 5 は 3-アミノ-2-プロピオン酸メチルアンモニアリアーゼが関与する (EC 4. 3. 1. -)。この経路の最終ステップ中、3-アミノ-2-メチルプロピオネートはメタクリル酸に脱アミノ化される。この正確な変換を触媒する酵素は実験によって実証されていないが、しかしながら、天然 *E. coli* 酵素、アスパラギン酸アンモニアリアーゼ (EC 4. 3. 1. 1) は、この反応を触媒することができる可能性がある (図 5 A 参照)。 *E. coli* 中で *aspA* によってコードされるアスパラギン酸アンモニアリアーゼは、アスパルテートを脱アミノ化してフマレートを形成するが、別の基質アスパラギン酸フェニルメチルエステル、アスパラギン、ベンジルアスパルテートおよびマレートと反応することもできる (Ma ら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 672 巻、60~65 頁 (1992 年))。別の研究では、定方向進化をこの酵素に利用して基質特異性を変えていた (Asano ら、Biomol. Eng. 22 巻、95~101 頁 (2005 年))。他の生物体中のアスパルターゼをコードする遺伝子には、*Bacillus subtilis* 中の *ansB* (Sjostrom ら、Biochim. Biophys. Acta、1324 巻、182~190 頁 (1997 年))、ならびに *Pseudomonas fluorescens* (Takagi ら、J. Biochem.、96 巻、545~552 頁 (1984 年)) ; Takagi ら、J. Biochem.、100 巻、697~705 頁 (1986 年)) および *Serratia marcescens* (Takagi ら、J. Bacteriol.、161 巻、1~6 頁 (1985 年)) 中の *aspA* がある。

10

20

【0177】

【化 1 4】

30

遺伝子	GenBank ID	生物体
<i>aspA</i>	P0AC38.1	<i>Escherichia coli K12</i>
<i>ansB</i>	P26899.1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>aspA</i>	P07346.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>aspA</i>	P33109.1	<i>Serratia marcescens</i>

この実施例は、スクシニル CoA から MAA 生合成経路を記載する。

【0178】

(実施例 I V)

40

3-アミノ-2-メチルプロパノエートを介した MAA へのスクシニル CoA の転換のための経路を有する MAA 生成微生物体の調製

この実施例は、3-アミノ-2-メチルプロパノエートを介してスクシニル CoA から MAA を生成することができる微生物体の作製を記載する。

【0179】

Escherichia coli は、図 4 中に示す MAA 経路を工学的に操作するための標的生物体として使用する。 *E. coli* は、MAA を生成することができる天然に存在しない微生物を作製するのに良い宿主を提供する。 *E. coli* は遺伝子操作の影響を受けやすく、嫌氣的または微好氣的条件下で効率良く、エタノール、酢酸、ギ酸、乳酸、およびコハク酸のような、様々な生成物を生成することができることは公知である。

50

【0180】

MAAを生成するように操作されたE. coli株を作製するために、経路中で利用する酵素をコードする核酸を、周知の分子生物学の技術を使用してE. coliにおいて発現させる（例えば、Sambrook、上記、2001年；Ausubel、上記、1999年を参照）。特に、それぞれメチルマロニルCoAターゼ、その安定剤タンパク質、およびメチルマロニルCoAエピメラーゼ活性をコードするscpA（NP_417392.1）、argK（AAC75955.1）、およびAF454511（AAL57846.1）遺伝子を、PA1/lacOプロモーターの下でpZE13ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）にクローニングする。さらに、それぞれメチルマロニルCoAレダクターゼ、3-アミノ-2-プロピオン酸メチルトランスアミナーゼ、および3-アミノ-2-プロピオン酸メチルアンモニアリアーゼ活性をコードするbphG（BAA03892.1）、gabT（P22256.1）、およびaspA（P0AC38.1）遺伝子を、PA1/lacOプロモーターの下でpZA33ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）にクローニングする。2組のプラスミドをE. coli株MG1655に形質転換して、スクシニルCoAから3-アミノ-2-メチルプロパノエートの経路を介したMAA合成に必要なタンパク質および酵素を発現させる。

10

【0181】

得られた遺伝子操作生物体は、当技術分野で周知の手順後、グルコース含有培地において培養する（例えば、Sambrookら、上記、2001年を参照）。E. coliの宿主株をde novoでコバラミンを合成するように操作しない限り、コバラミンをさらに培地に供給してターゼ酵素の活性を確実にする（例えば、Rauxら、J. Bacteriol.、178巻、753～767頁（1996年）を参照）。MAA合成遺伝子の発現は、例えば、ノーザンブロット、mRNAのPCR増幅、イムノブロッティングなどを含めた、ポリペプチド発現または酵素活性を決定するための当技術分野で周知の方法を使用して裏付ける。発現される酵素の酵素活性は、個々の活性に特異的なアッセイを使用して確認する。MAAを生成する工学的に操作されたE. coli株の能力は、HPLC、ガスクロマトグラフィー質量分析法（GCMS）および／または液体クロマトグラフィー質量分析法（LCMS）を使用して確認する。

20

【0182】

機能的MAA合成経路を有するように操作した微生物株は、経路の有効利用のための最適化によってさらに増強する。簡単に述べると、工学的に操作された株を評価して、いずれの外因性遺伝子が律速レベルで発現されるかどうか決定する。例えば追加的遺伝子コピー数の導入によって、経路中の流れを制限し得る低レベルで発現する任意の酵素に関して発現は増大する。

30

【0183】

より良い生産体を作製するために、代謝モデリングを利用して増殖条件を最適化する。モデリングをさらに使用して、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計する（例えば、米国特許公開US2002/0012939、US2003/0224363、US2004/0029149、US2004/0072723、US2003/0059792、US2002/0168654およびUS2004/0009466、および米国特許第7,127,379号を参照）。モデリング解析によって、MAAのより有効な生成への代謝の移行の、細胞増殖に対する影響の信頼できる予測を与える。1つのモデリング法は、MAAのより良好な生成を一括してもたらし遺伝子ノックアウトを選択するために適用される2層最適化法OptKnock（Burgardら、Biotechnol. Bioengineer. 84巻、647～657頁（2003年））である。適応進化を使用して、例えばMAA生成物のスクシニルCoA中間体の、より良い生産体を作製することもできる。適応進化を実施して増殖特性と生産特性の両方を改善する（FongおよびPalsson、Nat. Genet. 36巻、1056～1058頁（2004年）；Alperら、Science 314巻、1565～1568頁（2005年））。

40

50

06年))。結果に基づいて、後の数ラウンドのモデリング、遺伝子操作および適応進化をM A A生産体に施して、生産をさらに増大することができる。

【0184】

M A Aの大規模な生産用に、前述の生物体を当技術分野で公知の培地を使用して発酵槽中で培養して、嫌気的条件下での生物体の増殖を促進する。発酵は回分、流加または連続的な形で実施する。嫌気的条件は最初に窒素で培地をスパージし、次いで培養容器を密閉することによって維持し、例えば、フラスコは隔膜および圧着キャップで密閉することができる。限られた通気で隔膜中に小さな穴を与えることによって、微好気的条件を利用することもできる。培地のpHは、 H_2SO_4 などの酸を加えることによって約7のpHに保つ。増殖速度は分光光度計を使用して光学濃度を測定することによって決定し(600nm)、グルコースの取り込み速度は経時的な炭素源の枯渇をモニターすることによって決定する。望ましくないアルコール、有機酸、および残留グルコースなどの副産物は、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、グルコースおよびアルコールに屈折率検出器、有機酸にUV検出器を使用して、HPLC(Shimadzu、Columbia MD)によって定量化することができる(Linら、Biotechnol. Bioeng. 775~779頁(2005年))。

10

【0185】

この実施例は、3-アミノ-2-メチルプロパノエートを介してスクシニルCoAからM A Aを生成することができる微生物体の調製を記載する。

20

【0186】

(実施例V)

3-ヒドロキシイソ酪酸またはM A Aへの4-ヒドロキシブチリルCoAの転換のための経路

この実施例は、4-ヒドロキシブチリルCoAからの例示的な3-ヒドロキシイソ酪酸またはM A A合成経路を記載する。

【0187】

別の例示的な経路はM A Aへの4HB-CoAの転換を伴う(図6参照)。最初のステップ中、4HB-CoAはメチルムターゼによって3-ヒドロキシイソブチリルCoA(3-Hib-CoA)に転換される。次いで3-Hib-CoAは、CoAヒドロラーゼ、シンターゼまたはトランスフェラーゼによって3-ヒドロキシイソブチレートに転換され得る。3-ヒドロキシイソブチレートが分泌され、生成物として、またはメタクリル酸の生成における最終ステップとして回収される可能性がある。3-ヒドロキシブチレートを脱水させてメタクリル酸を形成することが可能である。あるいは、3-Hib-CoAをメタクリルCoAに脱水させて、次いでヒドロラーゼ、シンターゼ、またはトランスフェラーゼによってM A Aに転換することが可能である。トリカルボン酸回路中間体、アルファケトグルタレート、スクシネート、またはスクシニルCoAを4HB-CoAに転換するのに必要な酵素は十分文書化されている(2008年3月14日出願のBurkら、米国出願第12/049,256号; Lutke-EverslohおよびSteinbuechel, FEMS Microbiol. Lett., 181巻、63~71頁(1999年); SohlingおよびGottschalk, Eur. J. Biochem., 212巻、121~127頁(1993年); SohlingおよびGottschalk, J. Bacteriol., 178巻、871~880頁(1996年); Valentiniら、Eur. J. Biochem., 227巻、43~60頁(1995年); WolffおよびKenealy, Protein Expr. Purif., 6巻、206~212頁(1995年))。

30

40

【0188】

嫌気的条件下では、経路のステップ2中(表1)でCoA-トランスフェラーゼまたはシンターゼを利用して3-ヒドロキシイソブチリルCoAを3-ヒドロキシブチレートに転換する場合、最大理論生成物収率はグルコース1mol当たりM A A 1.33molで

50

ある。ヒドロラーゼを利用する場合、PEPカルボキシキナーゼがオキサロアセテートへのATP生成方向に可逆的に作用すると想定しない限り、最大理論収率は1.13mol/molに低下する。同様に、エネルギー収率は経路のステップ2中で利用する酵素の型に依存する。CoAシンテターゼをステップ2中で利用しPEPカルボキシキナーゼが可逆的であると想定するとき、最高ATP収率を得る。好氣的条件下での生成物およびエネルギー収率は、3-ヒドロキシブチレートへの3-ヒドロキシイソブチリルCoAの転換中で利用する酵素の型にも依存する。ATPおよび生成物の最大モル収率は、メタクリレートまたは3-ヒドロキシイソブチレートが生成されるかどうかと無関係に不変であろうことが理解される。さらに、ATPおよびMAAの最大モル収率は、経路が図6中に示すようにメタクリルCoAを介して進行する場合、不変であろうことが理解される。

10

【0189】

【表1】

表1. 4-ヒドロキシブチリルCoA(4HB-CoA)を介した生合成経路を使用するMAAの最大理論収率。

全ての収率はモル/モルグルコースとして表す。

	4HB-CoAを介したMAAの生合成経路	
	嫌氣的	好氣的
MAAの収率(ステップ2および/または5のヒドロラーゼ)	1.13	1.28
MAAの収率(PEPCK可逆的)	1.33	1.33
最大MAA収率での最大ATP収率(PEPCK可逆的、ステップ2および/または5のヒドロラーゼ)	0.39	0.43
最大MAA収率での最大ATP収率(PEPCK可逆的、ステップ2および/または5のトランスフェラーゼ)	1.39	1.43
最大MAA収率での最大ATP収率(PEPCK可逆的、ステップ2および/または5のシンテターゼ)	1.72	1.76

20

図6を参照すると、ステップ1は4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼが関与する(EC 5.4.99.-)。3-ヒドロキシイソブチリルCoAへの4HB-CoAの転換は未だ実験によって実証されていない。しかしながら、2つのメチルムターゼ、すなわち類似の反応を触媒するイソブチリルCoAムターゼ(ICM)およびメチルマロニルCoAムターゼ(MCM)は、それらの対応する基質の構造類似性を考慮すると優れた候補である(図7)。メチルマロニルCoAムターゼは、スクシニルCoAをメチルマロニルCoAに転換するコバラミン依存性酵素である(図7A)。この酵素および適切な遺伝子候補はスクシニルCoAからMAAの経路中で論じた(実施例I参照)。

30

【0190】

あるいは、ICMは提唱された変換を触媒することができた。ICMは、ブチリルCoAの炭素骨格をイソブチリルCoAに可逆的に再編成する、MCMファミリーにおけるコバラミン依存性メチルムターゼである(図7B)(Ratnatillekeら、J. Biol. Chem.、274巻、31679~31685頁(1999年))。Methylobium petroleiphilumにおける新規なICMの近年の研究は、以前の実験と共に、活性部位近辺の1つのアミノ酸の変化は酵素の基質特異性を変える証拠を与える(Ratnatillekeら、J. Biol. Chem.、274巻、31679~31685頁(1999年); Rohwerderら、Appl. Environ. Microbiol.、72巻、4128~4135頁(2006年))。これは、天然酵素が3HIB-CoAへの4HB-CoAの転換を触媒することができない場合、その酵素は合理的な工学的操作を受けた可能性があることを示す。ホモ二量体酵素をコードする例示的なICM遺伝子には、Streptomyces coelicolor

40

50

A3中の *icmA* (Alhapelら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、103巻、12341～12346頁(2006年)) および *Methylibium petroleiphilum* PM1中の *Mpe_B0541* がある (Ratnatillekeら、J. Biol. Chem.、274巻、31679～31685頁(1999年); Rohwerderら、Appl. Environ. Microbiol.、72巻、4128～4135頁(2006年))。ヘテロ二量体酵素をコードする遺伝子には、*Streptomyces cinnamonensis* 中の *icm* および *icmB* (Ratnatillekeら、J. Biol. Chem.、274巻、31679～31685頁(1999年); Vrijbloedら、J. Bacteriol.、181巻、5600～5605頁(1999年); Zerbe-Burkhardtら、J. Biol. Chem.、273巻、6508～6517頁(1998年)) がある。*Streptomyces avermitilis* MA-4680中の遺伝子 *icmA* および *icmB* は、公知の ICM と高い配列類似性を示す。

10

【0191】

【化15】

遺伝子	GenBank ID	生物体
<i>icmA</i>	CAB40912.1	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)
<i>Mpe_B0541</i>	YP_001023546.1	<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1
<i>icm</i>	AAC08713.1	<i>Streptomyces cinnamonensis</i>
<i>icmB</i>	CAB59633.1	<i>Streptomyces cinnamonensis</i>
<i>icmA</i>	NP_824008.1	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680
<i>icmB</i>	NP_824637.1	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680

20

図6を参照すると、ステップ2は3-ヒドロキシイソブチリルCoAヒドロラーゼ (EC 3. 1. 2. 4)、シンテターゼ (EC 6. 2. 1. -) または3-ヒドロキシイソブチリルCoAトランスフェラーゼ (EC 2. 8. 3. -) が関与する。ステップ5は、メタクリリルCoAヒドロラーゼ、シンテターゼ、またはトランスフェラーゼが関与する。これらの変換は、CoAヒドロラーゼ (EC 3. 1. 2. -)、CoAトランスフェラーゼ (EC 2. 8. 3. -)、およびCoAシンテターゼ (EC 6. 1. 2. -) を含めた異なるクラスの酵素によって実施することができる。初期に論じたように、CoAトランスフェラーゼまたはCoAシンテターゼを利用してこの変換を実施する場合 (表1)、経路のエネルギー特性は最も好ましい。

30

【0192】

CoAトランスフェラーゼファミリー中、アセテートCoAトランスフェラーゼ (EC 2. 8. 3. 8) としても公知である、*E. coli* の酵素アシルCoA:アセテートCoAトランスフェラーゼは、イソブチレート (MatthiesおよびSchink、Appl. Environ. Microbiol. 58巻、1435～1439頁(1992年))、バレレート (Vanderwinkelら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 33巻、902～908頁(1968年)) およびブタノエート (Vanderwinkelら、上記、1968年) を含めた、様々な分岐状および直鎖状アシルCoA基質由来のアセテートにCoA成分を移動させることが示されている。この酵素は、*E. coli* 種K12中の *atoA* (α サブユニット) および *atoD* (β サブユニット) (Korolevら、Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 58巻、2116～2121頁(2002年); Vanderwinkelら、上記、1968年)、ならびに *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032中の *actA* および *cg0592* (Duncanら、Appl. Environ. Microbiol. 68巻、5186～5190頁(2002年)) によってコードされ、図6、ステップ2および5中に示す、望

40

50

ましい 3-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼまたはメタクリリル CoA トランスフェラーゼ生体内変化を触媒するための理想的な候補となる。配列相同性による候補遺伝子には *Escherichia coli* UT189 中の *atoD* および *atoA* がある。類似した酵素は *Clostridium acetobutylicum* および *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* 中にも存在する。

【0193】

【化16】

遺伝子	GenBank ID	生物体
<i>atoA</i>	P76459.1	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>atoD</i>	P76458.1	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>actA</i>	YP_226809.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032
<i>cg0592</i>	YP_224801.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032
<i>atoA</i>	ABE07971.1	<i>Escherichia coli</i> UT189
<i>atoD</i>	ABE07970.1	<i>Escherichia coli</i> UT189
<i>ctfA</i>	NP_149326.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>ctfB</i>	NP_149327.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>ctfA</i>	AAP42564.1	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>ctfB</i>	AAP42565.1	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>

10

20

別の例示的なトランスフェラーゼの変換は、スクシニル CoA、4-ヒドロキシブチリル CoA、およびブチリル CoA アセチルトランスフェラーゼ活性をそれぞれ示すことが示されている *Clostridium kluyveri* の *cat1*、*cat2*、および *cat3* の遺伝子産物によって触媒される (Sohling および Gottschalk、J. Bacteriol.、178 巻、3 号、871~880 頁 (1996 年) ; Seedorf ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、105 巻、6 号、2128~2133 頁 (2008 年))。

【0194】

【化17】

遺伝子	GenBank ID	生物体
<i>cat1</i>	P38946.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>cat2</i>	P38942.2	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>cat3</i>	EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

40

嫌気性細菌 *Acidaminococcus fermentans* 由来のグルタコネート CoA トランスフェラーゼ (EC 2.8.3.12) 酵素は、二酸グルタコニル CoA および 3-ブテノイル CoA と反応する (Mack および Buckel、FEBS Lett. 405 巻、209~212 頁 (1997 年))。この酵素をコードする遺伝子は *gctA* および *gctB* である。この酵素は、グルタリル CoA、2-ヒドロキシグルタリル CoA、アジピル CoA およびアクリリル CoA を含めた他の CoA 誘導体と共に、低減しているが検出可能な活性を有する (Buckel ら、Eur. J. Bioche

50

m.、118巻、315～321頁（1981年）。この酵素はクローニングされE. coliにおいて発現された（Mackら、Eur. J. Biochem.、226巻、41～51頁（1994年））。

【0195】

【化18】

<u>遺伝子</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>gctA</i>	CAA57199.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>gctB</i>	CAA57200.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>

10

別の酵素候補は、CoAアクセプターとしてスクネシートを利用するスクシニルCoA：3-ケト酸CoAトランスフェラーゼを含む。例示的なスクシニルCoA：3-ケト酸CoAトランスフェラーゼは、*Helicobacter pylori*（Corthesy-Theulazら、J. Biol. Chem.、272巻、25659～25667頁（1997年））および*Bacillus subtilis*（Stolsら、Protein Expr. Purif.、53巻、396～403頁（2007年））中に存在する。

【0196】

【化19】

<u>遺伝子</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>HPAG1_0676</i>	YP_627417	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>HPAG1_0677</i>	YP_627418	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>ScoA</i>	NP_391778	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>ScoB</i>	NP_391777	<i>Bacillus subtilis</i>

20

候補ATPシンテターゼは、ADP形成アセチルCoAシンテターゼ（ACD、EC 6.2.1.13）、それらの対応する酸へのアシルCoAエステルの転換とATPの同時合成を連結する酵素である。この酵素が基質としての3-ヒドロキシイソブチリルCoAまたはメタクリリルCoAと反応することは示されていないが、広範囲の基質特異性を有するいくつかの酵素は文献中に記載されている。AF1211によってコードされる*Archaeoglobus fulgidus*由来のACDIは、イソブチレート、イソペンタノエート、およびフマレートを含めた、様々な直鎖状および分岐鎖状基質に作用することが示された（MusfeldtおよびSchonheit、J. Bacteriol. 184巻、636～644頁（2002年））。*Haloarcula marismortui*由来の酵素（スクシニルCoAシンテターゼとして注釈をつける）は基質としてのプリオピオネート、ブチレート、分岐鎖状の酸（イソバレレートおよびイソブチレート）を受け入れ、正方向および逆方向に作用することが示された（BrasenおよびSchonheit、Arch. Microbiol. 182巻、277～287頁（2004年））。超好熱性クレン古細菌*Pyrobaculum aerophilum*由来のPAE3250によってコードされるACDは全ての特徴付けられたACDの最も広い基質範囲を示し、アセチルCoA、イソブチリルCoA（好ましい基質）およびフェニルアセチルCoAと反応した（BrasenおよびSchonheit、上記、2004年）。しかしながら、定方向進化または工学的操作を使用してこの酵素を改変し、生理的温度において宿主生物体を働かせることができる。*A. fulgidus*、*H. marismortui*および*P. aerophilum*由来の酵素はいずれもクローニングされ、機能的に発現され、E. coliにおいて特徴付けされた（BrasenおよびSchonheit、上記、2004年；MusfeldtおよびSchonheit、J. Bacteriol. 184巻、636～644頁（2002年））。

30

40

【0197】

50

【化 2 0】

<u>遺伝子</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>AF1211</i>	NP_070039.1	<i>Archaeoglobus fulgidus DSM 4304</i>
<i>scs</i>	YP_135572.1	<i>Haloarcula marismortui ATCC 43049</i>
<i>PAE3250</i>	NP_560604.1	<i>Pyrobaculum aerophilum str. IM2</i>

C o A ヒドロラーゼファミリー中、酵素 3-ヒドロキシイソブチリル C o A ヒドロラーゼは 3-H I B C o A に特異的であり、バリン分解中の所望の変換を効率よく触媒することが記載されている (Shimomura ら、J. Biol. Chem.、269 巻、14248~14253 頁 (1994 年))。この酵素をコードする遺伝子には、*Rattus norvegicus* (Shimomura ら、J. Biol. Chem.、269 巻、14248~14253 頁 (1994 年)) ; Shimomura ら、*Methods Enzymol.*、324 巻、229~240 頁 (2000 年)) および *Homo sapiens* (Shimomura ら、上記、2000 年) の *hibch* がある。配列相同性による候補遺伝子には *Saccharomyces cerevisiae* の *hibch* および *Bacillus cereus* の BC_2292 がある。

【0198】

【化 2 1】

<u>遺伝子</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>hibch</i>	Q5XIE6.2	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	<i>Homo sapiens</i>
<i>hibch</i>	P28817.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BC_2292	Q81DR3	<i>Bacillus cereus</i>

図 6 を参照すると、ステップ 3 は 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼ (EC 4. 2. 1. -) が関与する。これは、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼによる M A A への 3-ヒドロキシイソブチレートの脱水を伴う。この酵素の遺伝子候補はスクシニル C o A から M A A の経路中に記載する (実施例 I 参照)。さらに図 6 を参照すると、ステップ 4 は 3-ヒドロキシイソブチリル C o A デヒドラターゼ (EC 4. 2. 1. -) が関与する。メタクリリル C o A への 3-ヒドロキシイソブチリル C o A の脱水は、クロトナーゼなどの可逆的 3-ヒドロキシアシル C o A デヒドラターゼ (3-ヒドロキシブチリル C o A デヒドラターゼ、EC 4. 2. 1. 55 と呼ばれる) または エノイル C o A ヒドラターゼ (3-ヒドロキシアシル C o A デヒドラターゼ、EC 4. 2. 1. 17 と呼ばれる) によって実施することができる。これらの酵素は一般に可逆的である (Moskowitz および Merrick、*Biochemistry*、8 巻、2748~2755 頁 (1969 年)) ; Durre ら、*FEMS Microbiol. Rev.*、17 巻、251~262 頁 (1995 年))。クロトナーゼ酵素をコードする例示的な遺伝子は、*C. acetobutylicum* (Boynton ら、*J. Bacteriol.* 178 巻、11 号、3015~3024 頁 (1996 年))、*C. kluyveri* (Hillmer および Gottschalk、*FEBS Lett.*、21 巻、3 号、351~354 頁 (1972 年))、および *Metallosphaera sedula* (Berg ら、*Science*、318 巻、5857 号、1782~1786 頁 (2007 年)) 中で見ることはできるが、後者の遺伝子の配列は公知ではない。脂肪酸 β の酸化および/または様々なアミノ酸の代謝と関係があるエノイル C o A ヒドラターゼも、3-ヒドロキシブチリル C o A を形成するためのクロトニル C o A の水和を触媒することができる (Agnihotri および Liu、*Bioorg. Med. Chem.*、11 巻、1 号、9~20 頁 (2003 年)) ; Roberts ら、*Arch. Microbiol.*、117 巻、1 号、99~108 頁 (1978 年)) ; Conrad ら、*J. Bacteriol.*、

118巻、1号、103～111頁（1974年）。P. putidaのエノイルCoAヒドラーゼ、phaAおよびphaBは、フェニル酢酸の異化中に二重結合のヒドロキシル化を実施すると考えられる（Oliveraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、95巻、6419～6424頁（1998年）。P. fluorescens由来のpaaAおよびpaaBは類似した変換を触媒する（Oliveraら、上記、1998年）。最後に、maoC（ParkおよびLee、J. Bacteriol.、185巻、5391～5397頁（2003年））、paaF（Ismailら、Eur. J. Biochem.、270巻、3047～3054頁（2003年）；ParkおよびLee、Appl. Biochem. Biotechnol.、113～116頁：335～346頁（2004年）；ParkおよびYup、Biotechnol. Bioeng.、86巻、681～686頁（2004年））、およびpaaG（Ismailら、Eur. J. Biochem.、270巻、3047～3054頁（2003年）；ParkおよびLee、Appl. Biochem. Biotechnol.、113～116頁：335～346頁（2004年）；ParkおよびYup、Biotechnol. Bioeng.、86巻、681～686頁（2004年））を含めた、いくつかのEscherichia coliの遺伝子は、エノイルCoAヒドラーゼの官能性を示すことが示されている。

10

【0199】

【化22】

遺伝子	GenBank ID	生物体
crt	NP_349318.1	Clostridium acetobutylicum
crtI	YP_001393856	Clostridium kluyveri DSM 555
paaA	NP_745427.1	Pseudomonas fluorescens
paaB	NP_745426.1	Pseudomonas fluorescens
phaA	ABF82233.1	Pseudomonas putida
phaB	ABF82234.1	Pseudomonas putida
maoC	NP_415905.1	Escherichia coli
paaF	NP_415911.1	Escherichia coli
paaG	NP_415912.1	Escherichia coli

20

30

この実施例は、4-ヒドロキシブチリルCoAから3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸を生成する生合成経路を記載する。

【0200】

（実施例VI）

MAAへの4-ヒドロキシブチリルCoAの転換のための経路を有するMAA生成微生物体の調製

この実施例は、4-ヒドロキシブチリルCoAからMAAを生成することができる微生物体の作製を記載する。

40

【0201】

Escherichia coliは、図6中に示すMAA経路を工学的に操作するための標的生物体として使用する。E. coliは、MAAを生成することができる天然に存在しない微生物を作製するのに良い宿主を提供する。E. coliは遺伝子操作の影響を受けやすく、嫌氣的または微好氣的条件下で効率良く、エタノール、酢酸、ギ酸、乳酸、およびコハク酸のような、様々な生成物を生成することができることは公知である。

【0202】

MAAを生成するように操作されたE. coli株を作製するために、経路中で利用する酵素をコードする核酸を、周知の分子生物学の技術を使用してE. coliにおいて発

50

現させる（例えば、Sambrook、上記、2001年；Ausubel、上記、1999年を参照）。特に、それぞれコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ（CoA依存性）、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、およびホストランスブチリラーゼ活性をコードするsucD（YP_001396394）、4hbd（YP_001396393）、buk1（Q45829）、およびptb（NP_349676）遺伝子を、PA1/lacOプロモーターの下でpZE13ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）にクローニングする。Burkら（2008年3月14日出願の米国出願第12/049,256号）中に記載されたように、この構築体はスクシニルCoAからの4HB-CoAの生成を可能にする。さらに、それぞれ4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルCoAヒドロラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼ活性をコードするicmA（CAB40912.1）、hibch（Q5XIE6.2）およびhmd（ABC88407.1）遺伝子を、PA1/lacOプロモーターの下でpZA33ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）にクローニングする。2組のプラスミドをE.coli株MG1655に形質転換して、4-ヒドロキシブチリルCoAの経路を介したMAA合成に必要なタンパク質および酵素を発現させる。

【0203】

得られた遺伝子操作生物体は、当技術分野で周知の手順後、グルコース含有培地において培養する（例えば、Sambrookら、上記、2001年を参照）。E.coliの宿主株をde novoでコバラミンを合成するように操作しない限り、コバラミンをさらに培地に供給してムターゼ酵素の活性を確実にする（例えば、Rauxら、J. Bacteriol. 178巻、753～767頁（1996年）を参照）。MAA合成遺伝子の発現は、例えば、ノーザンブロット、mRNAのPCR増幅、イムノブロッティングなどを含めた、ポリペプチド発現または酵素活性を決定するための当技術分野で周知の方法を使用して裏付ける。発現される酵素の酵素活性は、個々の活性に特異的なアッセイを使用して確認する。MAAを生成する工学的に操作されたE.coli株の能力は、HPLC、ガスクロマトグラフィー質量分析法（GCMS）および／または液体クロマトグラフィー質量分析法（LCMS）を使用して確認する。

【0204】

機能的MAA合成経路を有するように操作した微生物株は、経路の有効利用のための最適化によってさらに増強する。簡単に述べると、工学的に操作された株を評価して、いずれの外因性遺伝子が律速レベルで発現されるかどうか決定する。例えば追加的遺伝子コピー数の導入によって、経路中の流れを制限し得る低レベルで発現する任意の酵素に関して発現は増大する。

【0205】

より良い生産体を作製するために、代謝モデリングを利用して増殖条件を最適化する。モデリングをさらに使用して、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計する（例えば、米国特許公開US2002/0012939、US2003/0224363、US2004/0029149、US2004/0072723、US2003/0059792、US2002/0168654およびUS2004/0009466、および米国特許第7,127,379号を参照）。モデリング解析によって、MAAのより良好な生成への代謝の移行の、細胞増殖に対する影響の信頼できる予測を与える。1つのモデリング法は、MAAのより良好な生成を一括してもたらす遺伝子ノックアウトを選択するために適用される2層最適化法OptKnock（Burgardら、Biotechnol. Bioengineer.、84巻、647～657頁（2003年））である。適応進化を使用して、例えばMAA生成物のスクシニルCoAまたは4-ヒドロキシブチリルCoA中間体の、より良い生産体を作製することもできる。適応進化を実施して増殖特性と生産特性の両方を改善する（FongおよびPalsson、Nat. Genet.、36巻、1056～1058頁（2004年）；Alperら、Science、314巻、1565～1568頁（2006年））。結果に基づいて、後の数ラウン

ドのモデリング、遺伝子操作および適応進化をM A A生産体に施して、生産をさらに増大することができる。

【0206】

M A Aの大規模な生産用に、前述の生物体を当技術分野で公知の培地を使用して発酵槽中で培養して、嫌氣的条件下での生物体の増殖を促進する。発酵は回分、流加または連続的な形で実施する。嫌氣的条件は最初に窒素で培地をスパージし、次いで培養容器を密閉することによって維持し、例えば、フラスコは隔膜および圧着キャップで密閉することができる。限られた通気で隔膜中に小さな穴を与えることによって、微好氣的条件を利用することもできる。培地のpHは、 H_2SO_4 などの酸を加えることによって約7のpHに保つ。増殖速度は分光光度計を使用して光学濃度を測定することによって決定し（600 nm）、グルコースの取り込み速度は経時的な炭素源の枯渇をモニターすることによって決定する。望ましくないアルコール、有機酸、および残留グルコースなどの副産物は、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、グルコースおよびアルコールに屈折率検出器、有機酸にUV検出器を使用して、HPLC（Shimadzu、Columbia MD）によって定量化することができる（Linら、Biotechnol. Bioeng.、775～779頁（2005年））。

10

【0207】

この実施例は、4-ヒドロキシブチリルCoAからM A Aを生成することができる微生物体の調製を記載する。

20

【0208】

（実施例V I I）

トレオ-3-メチルアスパルテートを介したM A Aへのアルファ-ケトグルタレートの転換のための経路

この実施例は、アルファ-ケトグルタレートからトレオ-3-メチルアスパルテートへの例示的なM A Aの合成経路を記載する。

【0209】

M A Aの生合成に関する別の例示的な経路は、アルファ-ケトグルタレート、TCA回路中で生成されるE. coliにおける代謝産物を介して進行する（図8参照）。この経路は好氣的条件下において高収率であり、最大理論収率はグルコース1mol当たりM A A 1.2molである（表2）。この経路は酸化還元バランスがとれておらず、M A A合成はギ酸およびエタノールなどの発酵副産物の形成を必要とするので、嫌氣的条件下での収率は低い。

30

【0210】

【表2】

表2. アルファ-ケトグルタレートの生合成経路を使用するM A Aの最大理論収率。全ての収率はモル/モルグルコースとして表す。

	アルファ-ケトグルタレートを介したM A Aの生合成経路	
	嫌氣的	好氣的
M A Aの収率	0.69	1.2
M A Aの収率(PEPCK可逆的)	0.82	1.2
最大M A A収率でのATP収率(PEPCK可逆的)	0	0.95

40

酵素アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼによって触媒されるこの経路の最初のステップは、アミノ基をアスパラギン酸からアルファ-ケトグルタレートに移動させ、グルタミン酸およびオキサロ酢酸を形成する。その後の2ステップは、炭素骨格の再編成およびメサコン酸形成のためのその後の脱アミノ化を含む。これらの転換を触媒する酵素は、アミノ酸の発酵が可能である土壌中のClostridiaおよび他の生物体中でのグル

50

タミン酸のエネルギー生成発酵において見られる (Buckel および Barker, J. Bacteriol., 117 巻、1248~1260 頁 (1974 年))。これらの生物体中の経路の方向性は、生合成経路中の MA A 合成に必要な方向と一致する。最終経路のステップは、メタクリル酸を生成するためのメサコン酸の脱カルボキシル化を伴う。

【0211】

図 8 を参照すると、ステップ 1 はアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (EC 2. 6. 1. 1) が関与する。経路の最初のステップは、アミノ基をアスパラギン酸からアルファケートグルタレートに移動させ、グルタミン酸およびオキサロ酢酸を形成する。Escherichia coli 由来の遺伝子 aspC (Yagi ら、FEBS Lett., 100 巻、81~84 頁 (1979 年); Yagi ら、Methods Enzymol., 113 巻、83~89 頁 (1985 年))、Saccharomyces cerevisiae 由来の AAT2 (Yagi ら、J. Biochem., 92 巻、35~43 頁 (1982 年))、および Arabidopsis thaliana 由来の ASP5 (de la Torre ら、Plant J., 46 巻、414~425 頁 (2006 年); Kwok および Hanson, J. Exp. Bot., 55 巻、595~604 頁 (2004 年); Wilkie および Warren, Protein Expr. Purif., 12 巻、381~389 巻 (1998 年)) は、この転換を触媒する酵素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼをコードする。

【0212】

【化 23】

遺伝子	GenBank ID	生物体
aspC	NP_415448.1	Escherichia coli
AAT2	P23542.3	Saccharomyces cerevisiae
ASP5	P46248.2	Arabidopsis thaliana

図 8 を参照すると、ステップ 2 はグルタミン酸ムターゼ (EC 5. 4. 99. 1) が関与する。ステップ 2 中、グルタミン酸の炭素直鎖をトレオー 3-メチルアスパルテートの分岐状構造に再編成する。この変換は、グルタミン酸ムターゼ、2 つのサブユニットで構成されるコバラミン依存性酵素によって触媒される。Clostridium cochlearium および Clostridium tetanomorphum 由来の 2 つのグルタミン酸ムターゼは、E. coli においてクローニングされ機能的に発現されている (Holloway および Marsh, J. Biol. Chem., 269 巻、20425~20430 頁 (1994 年); Reitzer ら、Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 54 巻、1039~1042 頁 (1998 年))。この 2 つのサブユニットタンパク質をコードする遺伝子は、Clostridium cochlearium 由来の glmE および glmS、Clostridium tetanomorphum 由来の mamA および glmE、ならびに Clostridium tetani 由来の mutE および mutS である (Switzer, Glutamate mutase, 289~305 頁、Wiley, New York (1982 年))。

【0213】

【化 2 4】

<u>遺伝子</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>glmE</i>	P80077.2	<i>Clostridium cochlearium</i>
<i>glmS</i>	P80078.2	<i>Clostridium cochlearium</i>
<i>mamA</i>	Q05488.1	<i>Clostridium tetanomorphum</i>
<i>glmE</i>	Q05509.1	<i>Clostridium tetanomorphum</i>
<i>mutE</i>	NP_783086.1	<i>Clostridium tetani</i> E88
<i>mutS</i>	NP_783088.1	<i>Clostridium tetani</i> E88

10

図 8 を参照すると、ステップ 3 は 3-メチルアスパルターゼ (EC 4. 3. 1. 2) が関与する。β-メチルアスパルターゼまたは 3-メチルアスパラギン酸アンモニアリアーゼとも呼ばれる 3-メチルアスパルターゼは、メサコン酸へのトレオ-3-メチルアスパルテートの脱アミノ化を触媒する。*Clostridium tetanomorphum* 由来の 3-メチルアスパルターゼが、*E. coli* においてクローニングされ機能的に発現され、結晶化されている (Asuncion ら、*Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*、57 巻、731~733 頁 (2001 年) ; Asuncion ら、*J. Biol. Chem.*、277 巻、8306~8311 頁 (2002 年) ; Bottling ら、*Biochemistry*、27 巻、2953~2955 頁 (1988 年) ; Goda ら、*Biochemistry*、31 巻、10747~10756 頁 (1992 年))。*Citrobacter amalonaticus* では、この酵素は BAA28709 によってコードされる (Kato および Asano、*Arch. Microbiol.*、168 巻、457~463 頁 (1997 年))。*E. coli* YG1002 由来の 3-メチルアスパルターゼも結晶化されているが (Asano および Kato、*FEMS Microbiol. Lett.*、118 巻、255~258 頁 (1994 年))、そのタンパク質配列は GenBank などの公のデータベース中には挙げられていない。配列相同性を使用して、*C. tetani* 中の CTC_02563 および *Escherichia coli* O157:H7 中の ECs0761 を含めた追加的候補遺伝子を同定することができる。

20

30

【0 2 1 4】

【化 2 5】

<u>遺伝子</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>MAL</i>	AAB24070.1	<i>Clostridium tetanomorphum</i>
<i>BAA28709</i>	BAA28709.1	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
<i>CTC_02563</i>	NP_783085.1	<i>Clostridium tetani</i>
<i>ECs0761</i>	BAB34184.1	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai

図 8 を参照すると、ステップ 4 はメサコン酸デカルボキシラーゼ (EC 4. 1. 1. -) が関与する。経路の最終ステップはメタクリル酸へのメサコネートの脱カルボキシル化を伴う。この正確な反応を触媒する酵素は実験によって実証されていない。しかしながら、非常に類似した反応を触媒するいくつかの酵素が存在する (図 9)。密接に関連した機能を有する 1 つの酵素はアコニット酸デカルボキシラーゼである (図 9A)。この酵素は、*Candida* および糸状真菌 *Aspergillus terreus* の株における、イタコネートの生合成中の最終ステップを触媒する (Bonnarme ら、*J. Bacteriol.*、177 巻、3573~3578 頁 (1995 年) ; Willke および Vorlop、*Appl. Microbiol. Biotechnol.*、56 巻、289~295 頁 (2001 年))。イタコネートはバイオテクノロジーの対象とする化合物であるが、アコニット酸デカルボキシラーゼ遺伝子を同定またはクローニングするための

40

50

努力はこれまでなされていない。

【0215】

類似した機能を有する第2の酵素は4-オキサロクロトンデカルボキシラーゼである。(図9B)。この酵素は様々な生物体において一般的であり、*Pseudomonas* 種(株600)由来の酵素をコードする遺伝子は*E. coli*においてクローニングされ発現されている(Shinglerら、*J. Bacteriol.*、174巻、711~724頁(1992年))。メサコネート中のメチル基は立体障害を引き起こす可能性があるが、この問題は定方向進化またはタンパク質工学によって克服される可能性がある。4-オキサロクロトン酸デカルボキシラーゼは2つのサブユニットから構成される。この酵素をコードする遺伝子には、*Pseudomonas* 種(株600)中の*dmpH*および*dmpE*(Shinglerら、*J. Bacteriol.*、174巻、711~724頁(1992年))、*Pseudomonas putida*由来の*xylII*および*xylIII*(KatoおよびAsano、*Arch. Microbiol.*、168巻、457~463頁(1997年))；Stanleyら、*Biochemistry*、39巻、718~726頁(2000年))、ならびに*Ralstonia eutropha JMP134*由来の*Reut_B5691*および*Reut_B5692*がある(Hughesら、*J. Bacteriol.*、158巻、79~83頁(1984年))。

【0216】

【化26】

遺伝子	GenBank ID	生物体
<i>dmpH</i>	CAA43228.1	<i>Pseudomonas</i> 種 CF600
<i>dmpE</i>	CAA43225.1	<i>Pseudomonas</i> 種 CF600
<i>xylII</i>	YP_709328.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>xylIII</i>	YP_709353.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Reut_B5691</i>	YP_299880.1	<i>Ralstonia eutropha JMP134</i>
<i>Reut_B5692</i>	YP_299881.1	<i>Ralstonia eutropha JMP134</i>

この実施例は、アルファークトグルタレートからMMAを生成する生合成経路を記載する。

【0217】

(実施例VII)

トレオー3-メチルアスパルテートを介したMAAへのアルファークトグルタレートの転換のための経路を有するMAA生成微生物体の調製

この実施例は、トレオー3-メチルアスパルテートを介してアルファークトグルタレートからMAAを生成することができる微生物体の作製を記載する。

【0218】

*Escherichia coli*は、図8中に示すMAA経路を工学的に操作するための標的生物体として使用する。*E. coli*は、MAAを生成することができる天然に存在しない微生物を作製するのによい宿主を提供する。*E. coli*は遺伝子操作の影響を受けやすく、嫌氣的または微好氣的条件下で効率良く、エタノール、酢酸、ギ酸、乳酸、およびコハク酸のような、様々な生成物を生成することができることは公知である。

【0219】

MAAを生成するように操作された*E. coli*株を作製するために、経路中で利用する酵素をコードする核酸を、周知の分子生物学の技術を使用して*E. coli*において発現させる(例えば、Sambrook、上記、2001年；Ausubel、上記、1999年を参照)。特に、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼおよびグルタミン酸ムターゼ活性をコードする*aspC*(NP_415448.1)、*glmE*(P80077.2)、および*glmS*(P80078.2)遺伝子を、*PAL/lacO*プロモーター

の下で pZ E 1 3 ベクター (Expressys、Ruelzheim、ドイツ) にクローニングする。さらに、3-メチルアスパラギン酸およびメサコン酸デカルボキシラーゼ活性をコードする MAL (AAB24070.1)、dmpH (CAA43228.1)、および dmpE (CAA43225.1) 遺伝子を、PA1/lacO プロモーターの下で pZ A 3 3 ベクター (Expressys、Ruelzheim、ドイツ) にクローニングする。2組のプラスミドを E. coli 株 MG1655 に形質転換して、アルファ-ケトグルタレートからトレオ-3-メチルアスパルテートの経路を介した MAA 合成に必要なタンパク質および酵素を発現させる。

【0220】

得られた遺伝子操作生物体は、当技術分野で周知の手順後、グルコース含有培地において培養する (例えば、Sambrookら、上記、2001年を参照)。E. coli の宿主株を de novo でコバラミンを合成するように操作しない限り、コバラミンをさらに培地に供給してムターゼ酵素の活性を確実にする (例えば、Rauxら、J. Bacteriol.、178巻、753~767頁 (1996年) を参照)。MAA 合成遺伝子の発現は、例えば、ノーザンブロット、mRNA の PCR 増幅、イムノブロットティングなどを含めた、ポリペプチド発現または酵素活性を決定するための当技術分野で周知の方法を使用して裏付ける。発現される酵素の酵素活性は、個々の活性に特異的なアッセイを使用して確認する。MAA を生成する工学的に操作された E. coli 株の能力は、HPLC、ガスクロマトグラフィー-質量分析法 (GCMS) および/または液体クロマトグラフィー-質量分析法 (LCMS) を使用して確認する。

【0221】

機能的 MAA 合成経路を有するように操作した微生物株は、経路の有効利用のための最適化によってさらに増強する。簡単に述べると、工学的に操作された株を評価して、いずれの外因性遺伝子が律速レベルで発現されるかどうか決定する。例えば追加的遺伝子コピー数の導入によって、経路中の流れを制限し得る低レベルで発現する任意の酵素に関して発現は増大する。

【0222】

より良い生産体を作製するために、代謝モデリングを利用して増殖条件を最適化する。モデリングをさらに使用して、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計する (例えば、米国特許公開 US 2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US 2003/0059792、US 2002/0168654 および US 2004/0009466、および米国特許第 7,127,379 号を参照)。モデリング解析によって、MAA のより良好な生成への代謝の移行の、細胞増殖に対する影響の信頼できる予測を与える。1つのモデリング法は、MAA のより有効な生成を一括してもたらす遺伝子ノックアウトを選択するために適用される 2 層最適化法 Opt Knock (Burgardら、Biotechnol. Bioengineer.、84巻、647~657頁 (2003年)) である。適応進化を使用して、例えば MAA 生成物のアルファ-ケトグルタレート中間体の、より良い生産体を作製することもできる。適応進化を実施して増殖特性と生産特性の両方を改善する (Fong および Palsson、Nat. Genet.、36巻、1056~1058頁 (2004年); Alperら、Science、314巻、1565~1568頁 (2006年))。結果に基づいて、後の数ラウンドのモデリング、遺伝子操作および適応進化を MAA 生産体に施して、生産をさらに増大することができる。

【0223】

MAA の大規模な生産用に、前述の生物体を当技術分野で公知の培地を使用して発酵槽中で培養して、嫌氣的条件下での生物体の増殖を促進する。発酵は回分、流加または連続的な形で実施する。嫌氣的条件は最初に窒素で培地をスパージし、次いで培養容器を密閉することによって維持し、例えば、フラスコは隔膜および圧着キャップで密閉することができる。限られた通気で隔膜中に小さな穴を与えることによって、微好氣的条件を利用することもできる。培地の pH は、 H_2SO_4 などの酸を加えることによって約 7 の pH に

保つ。増殖速度は分光光度計を使用して光学濃度を測定することによって決定し（600 nm）、グルコースの取り込み速度は経時的な炭素源の枯渇をモニターすることによって決定する。望ましくないアルコール、有機酸、および残留グルコースなどの副産物は、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、グルコースおよびアルコールに屈折率検出器、有機酸にUV検出器を使用して、HPLC（Shimadzu、Columbia MD）によって定量化することができる（Linら、Biotechnol. Bioeng.、775～779頁（2005年））。

【0224】

この実施例は、トレオ-3-メチルアスパルテートを介してアルファ-ケトグルタレートからMAAを生成することができる微生物体の調製を記載する。

【0225】

（実施例IX）

2-ヒドロキシグルタレートを介したMAAへのアルファ-ケトグルタレートの転換のための経路

この実施例は、2-ヒドロキシグルタレートを介したMAAへのアルファ-ケトグルタレートからの例示的なMAAの合成経路を記載する。

【0226】

MAAの生合成に関する別の例示的な経路は実施例VII中に記載した経路と類似したスキームを有するが、ただしそれは、アミン置換中間体（図8参照）ではなく、ヒドロキシ化中間体2-ヒドロキシグルタレートおよび3-メチルマレート（図10参照）を通過する。実施例VII中に記載した経路と同様に、この経路は好氣的条件下において高収率であり、最大理論収率がグルコース1mol当たりMAA1.2molである（表3）。嫌氣的条件下では、この経路は酸化還元バランスがとれておらず、MAA合成はエタノール、ホルメートおよびスクシネートなどの発酵副産物の形成を必要とする。

【0227】

【表3】

表3. 2-ヒドロキシグルタレートを介したアルファ-ケトグルタレートの生合成経路を使用するMAAの最大理論収率。全ての収率はモル/モルグルコースとして表す。

	アルファ-ケトグルタレートを介したMAAの生合成経路 (alt)	
	嫌氣的	好氣的
MAAの収率	0.74	1.20
MAAの収率(PEPCK可逆的)	0.87	1.20
最大MAA収率でのATP収率(PEPCK可逆的)	0	1.55

図10を参照すると、ステップ1は α -ケトグルタル酸レダクターゼ（EC1.1.9.2）が関与する。この経路の最初のステップは、天然酵素 α -ケトグルタル酸レダクターゼによる、2-ヒドロキシグルタレートへのアルファ-ケトグルタレートの還元を伴う。この酵素は、serA、中心代謝中の3-ホスホグリセリン酸の還元も触媒する多機能酵素によってコードされる（ZhaoおよびWinkler、J. Bacteriol.、178巻、232～239頁（1996年））。Homo sapiens中の遺伝子L2HGDH（JansenおよびWanders、Biochim. Biophys. Acta、1225巻、53～56頁（1993年））、Fusobacterium nucleatum中のFN0487 in L2hgdh（Hayashiraら、J. Nihon Univ. Sch. Dent.、28巻、12～21頁（1986年））、Rattus norvegicus中の予想L2hgdh（JansenおよびWanders、Biochim. Biophys. Acta、1225巻、53～56頁（1993年））はこの酵素をコードする。高い配列相同性を有する遺伝子候補には、Mus

musculus 中の *L2hgdh* および *Bos taurus* 中の *L2HGDH* がある。高濃度で、2-ヒドロキシグルタレートは、競合阻害により α -ケトグルタル酸レダクターゼ活性をフィードバックすることが示されている (Zha o および Winkler、*J. Bacteriol.*、178 巻、232~239 頁 (1996))。

【0228】

【化27】

遺伝子	GenBank ID	生物体
<i>serA</i>	CAA01762.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>L2HGDH</i>	Q9H9P8.2	<i>Homo sapiens</i>
<i>L2hgdh</i>	NP_663418.1	<i>Mus musculus</i>
<i>L2hgdh_predicted</i>	NP_001101498.1	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>L2HGDH</i>	NP_001094560.1	<i>Bos taurus</i>
<i>FN0487</i>	Q8RG31	<i>Fusobacterium nucleatum</i> 亜種 <i>Nucleatum</i>

10

図10を参照すると、ステップ2は2-ヒドロキシグルタミン酸ムターゼ (EC 5. 4. 99. -) が関与する。経路の第2ステップ中、炭素骨格はグルタミン酸ムターゼ酵素による再編成を経る。このような酵素により触媒される最も一般的な反応は、図8のステップ2中に示す、トレオ-3-メチルアスパルテートへのグルタミン酸の転換である。*Clostridium cochlearium* 由来のアデノシルコバラミン依存性グルタミン酸ムターゼも、別の基質として2-ヒドロキシグルタレートと反応することが示されているが (Roymoulikら、*Biochemistry*、39巻、10340~10346頁 (2000年))、天然基質グルタミン酸を用いた速度と比較して、この反応の速度は2-ヒドロキシグルタレートを用いると2桁低い。酵素の定方向進化を使用して、2-ヒドロキシグルタレートに対するグルタミン酸ムターゼの親和性を増大することができる。グルタミン酸ムターゼをコードするタンパク質配列のGenBankアクセッション番号は、実施例VII、経路のステップ2中で見られる。

20

【0229】

30

図10を参照すると、ステップ3は3-メチルリンゴ酸デヒドラターゼ (EC 4. 2. 1. -) が関与する。第3ステップ中、3-メチルマレートを脱水してメサコネートを形成する。この正確な変換を触媒する酵素は文献中に記載されていないが、いくつかの酵素は類似の反応を触媒することができる (図11)。1つのこのような酵素は、2-メチルマレートをメサコネートに転換する、シトラリンゴ酸ヒドロリアーゼとも呼ばれる2-メチルリンゴ酸デヒドラターゼである (図11A)。2-メチルマレートと3-メチルマレートは密接に関連があり、構造の唯一の違いはヒドロキシル基の位置である。2-メチルリンゴ酸デヒドラターゼの活性は、グルタミン酸分解VI経路の状況で*Clostridium tetanomorphum*、*Morganel la morgani i*、*Citrobacter amal onaticus* において検出されたが (KatoおよびAsano、*Arch. Microbiol.* 168巻、457~463頁 (1997年))、しかしながら、この酵素をコードする遺伝子は今日まで配列決定されていない。

40

【0230】

第2の候補酵素は、フマレートへのマレートの脱水を触媒するフマル酸ヒドラターゼである (図11B)。実施例I (ステップ5) 中に記載したように、この酵素に関する大量の構造情報が入手可能であり、他の研究ではこの酵素を首尾良く工学的に操作して、活性、阻害および局在を変えている (Weaver、*Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*、61巻、1395~1401頁 (2005年))。遺伝子候補は実施例I、経路のステップ5中に論じる。

【0231】

50

図10を参照すると、ステップ4はメサコン酸デカルボキシラーゼ（EC 4. 1. 1. -）が関与する。最終経路のステップは、メタクリル酸へのメサコネートの脱カルボキシル化が関与する。この反応は、実施例VII中に記載した経路の最終ステップと同一である。

【0232】

この実施例は、アルファークトグルタレートからMMAを生成する生合成経路を記載する。

【0233】

（実施例X）

2-ヒドロキシグルタレートを介してアルファークトグルタレートをMAAに転換するための経路を有するMAA生成微生物体の調製

この実施例は、2-ヒドロキシグルタレートを介してアルファークトグルタレートからMAAを生成することができる微生物体の作製を記載する。

【0234】

*Escherichia coli*は、図10中に示すMAA経路を工学的に操作するための標的生物体として使用する。*E. coli*は、MAAを生成することができる天然に存在しない微生物を作製するのに良い宿主を提供する。*E. coli*は遺伝子操作の影響を受けやすく、嫌氣的または微好氣的条件下で効率良く、エタノール、酢酸、ギ酸、乳酸、およびコハク酸のような、様々な生成物を生成することができることは公知である。

【0235】

MAAを生成するように操作された*E. coli*株を作製するために、経路中で利用する酵素をコードする核酸を、周知の分子生物学の技術を使用して*E. coli*において発現させる（例えば、Sambrook、上記、2001年；Ausubel、上記、1999年を参照）。特に、 α -クトグルタル酸レダクターゼおよび2-ヒドロキシグルタミン酸ムターゼ活性をコードする*serA*（CAA01762. 1）、*glmE*（P80077. 2）、および*glmS*（P80078. 2）遺伝子を、*PAL/lacO*プロモーターの下で*pZE13*ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）にクローニングする。さらに、3-メチルリンゴ酸デヒドラターゼおよびメサコン酸デカルボキシラーゼ活性をコードする*fumC*（P05042. 1）、*dmpH*（CAA43228. 1）、および*dmpE*（CAA43225. 1）遺伝子を、*PAL/lacO*プロモーターの下で*pZA33*ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）にクローニングする。2組のプラスミドを*E. coli*株MG1655に形質転換して、アルファークトグルタレートから2-ヒドロキシグルタレートの経路を介したMAA合成に必要なタンパク質および酵素を発現させる。

【0236】

得られた遺伝子操作生物体は、当技術分野で周知の手順後、グルコース含有培地において培養する（例えば、Sambrookら、上記、2001年を参照）。*E. coli*の宿主株を*de novo*でコバラミンを合成するように操作しない限り、コバラミンをさらに培地に供給してムターゼ酵素の活性を確実にする（例えば、Rauxら、*J. Bacteriol.*、178巻、753～767頁（1996年）を参照）。MAA合成遺伝子の発現は、例えば、ノーザンブロット、mRNAのPCR増幅、イムノブロットティングなどを含めた、ポリペプチド発現または酵素活性を決定するための当技術分野で周知の方法を使用して裏付ける。発現される酵素の酵素活性は、個々の活性に特異的なアッセイを使用して確認する。MAAを生成する工学的に操作された*E. coli*株の能力は、HPLC、ガスクロマトグラフィー質量分析法（GCMS）および／または液体クロマトグラフィー質量分析法（LCMS）を使用して確認する。

【0237】

機能的MAA合成経路を有するように操作した微生物株は、経路の有効利用のための最適化によってさらに増強する。簡単に述べると、工学的に操作された株を評価して、いずれの外因性遺伝子が律速レベルで発現されるかどうか決定する。例えば追加的遺伝子コピ

10

20

30

40

50

一数の導入によって、経路中の流れを制限し得る低レベルで発現する任意の酵素に関して発現は増大する。

【0238】

より良い生産体を作製するために、代謝モデリングを利用して増殖条件を最適化する。モデリングをさらに使用して、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計する（例えば、米国特許公開US2002/0012939、US2003/0224363、US2004/0029149、US2004/0072723、US2003/0059792、US2002/0168654およびUS2004/0009466、および米国特許第7,127,379号を参照）。モデリング解析によって、MAAのより良好な生成への代謝の移行の、細胞増殖に対する影響の信頼できる予測を与える。1つのモデリング法は、MAAのより良好な生成を一括してもたらず遺伝子ノックアウトを選択するために適用される2層最適化法OptKnock（Burgardら、Biotechnol. Bioengineer.、84巻、647～657頁（2003年））である。適応進化を使用して、例えばMAA生成物のアルファケートグルタレート中間体の、より良い生産体を作製することもできる。適応進化を実施して増殖特性と生産特性の両方を改善する（FongおよびPalsson、Nat. Genet.、36巻、1056～1058頁（2004年）；Alperら、Science、314巻、1565～1568頁（2006年））。結果に基づいて、後の数ラウンドのモデリング、遺伝子操作および適応進化をMAA生産体に施して、生産をさらに増大することができる。

【0239】

MAAの大規模な生産用に、前述の生物体を当技術分野で公知の培地を使用して発酵槽中で培養して、嫌気的条件下での生物体の増殖を促進する。発酵は回分、流加または連続的な形で実施する。嫌気的条件は最初に窒素で培地をスパージし、次いで培養容器を密閉することによって維持し、例えば、フラスコは隔膜および圧着キャップで密閉することができる。限られた通気で隔膜中に小さな穴を与えることによって、微好気的条件を利用することもできる。培地のpHは、H₂SO₄などの酸を加えることによって約7のpHに保つ。増殖速度は分光光度計を使用して光学濃度を測定することによって決定し（600nm）、グルコースの取り込み速度は経時的な炭素源の枯渇をモニターすることによって決定する。望ましくないアルコール、有機酸、および残留グルコースなどの副産物は、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、グルコースおよびアルコールに屈折率検出器、有機酸にUV検出器を使用して、HPLC（Shimadzu、Columbia MD）によって定量化することができる（Linら、Biotechnol. Bioeng. 775～779頁（2005年））。

【0240】

この実施例は、2-ヒドロキシグルタレートを紹介してアルファケートグルタレートからMAAを生成することができる微生物体の調製を記載する。

【0241】

（実施例XI）

2-ヒドロキシイソ酪酸またはMAAへのアセチルCoAの転換のための経路

この実施例は、アセチルCoAからの例示的な2-ヒドロキシイソ酪酸またはMAAの合成経路を記載する。

【0242】

MAAの生合成は、少なくとも5つの酵素ステップでアセチルCoAから進行し得る（図12参照）。この経路では、2分子のアセチルCoAが組み合わさってアセトアセチル-CoAを形成し、次いでこれが3-ヒドロキシブチリルCoAに還元される。あるいは、4-ヒドロキシブチリルCoAデヒドラターゼおよびクロトナーゼによって、4-ヒドロキシブチリルCoAを3-ヒドロキシブチリルCoAに転換することができる（Martinsら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、101巻、44号、15645～15649頁（2004年）；JonesおよびWoods、Microbiol

Rev.、50巻、484～524頁（1986年）；Bergら、Science、318巻、5857号、1782～1786頁（2007年）。次いでメチルムターゼが3-ヒドロキシブチリルCoAの炭素骨格を2-ヒドロキシイソブチリルCoAに再編成して、次いでそれを脱水してメタクリリルCoAを形成する。あるいは、2-ヒドロキシイソブチリルCoAを2-ヒドロキシイソブチレートに転換し、分泌させ、生成物として回収することが可能である。メタクリリルCoAをMAAに転換する最終ステップは、1つの酵素（図12中に示す）または一連の酵素によって実施することができる。

【0243】

図12中に示す経路は、好氣的条件下において1.25mol/グルコース1molの最大理論生成収率を有し、0.4モルの酸素の利用をさらに必要とする（表4）。酸素取り込みの不在下で、最大理論収率は1.01mol/グルコース1molに低下し、酸化還元バランスを維持するために、エタノールおよびホルメートなどの発酵副産物が必ず形成される。PEPカルボキシキナーゼ（PEPCK）はATP生成方向に作用することができると考えることによって、嫌氣的条件下でMAA収率は1.09mol/molに増大するが、副産物の形成を妨げるわけではない。経路のステップ5中でCoAトランスフェラーゼまたはシンテターゼを利用する場合、MAA形成のエネルギー特性は好ましい。本明細書に記載する経路を介してメタクリル酸ではなく2-ヒドロキシイソ酪酸が生成する場合、生成物およびATPの同等の最大収率を得る。

【0244】

【表4】

表4. アセチルCoA経路に関するMAAおよびATPの収率

	アセチルCoAを介した MAAの生合成経路	
	嫌氣的	好氣的
MAAの収率	1.01	1.25
MAAの収率(PEPCK可逆的)	1.09	1.25
最大MAA収率での最大ATP収率(PEPCK可逆的、ステップ5のヒドロラーゼ)	0	0.03
最大MAA収率での最大ATP収率(PEPCK可逆的、ステップ5のトランスフェラーゼまたはシンテターゼ)	1.09	1.28

図12を参照すると、ステップ1はアセトアセチルCoAチオラーゼ（EC2.3.1.9）が関与する。2つのアセチルCoA単位からのアセトアセチルCoAの形成は、アセチルCoAチオラーゼによって触媒される。この酵素はE. coliに固有であり、遺伝子atoBによってコードされ、典型的には脂肪酸酸化中にアセトアセテート分解方向に作用する（DuncombeおよびFrerman、Arch. Biochem. Biophys. 176巻、159～170頁（1976年）；FrermanおよびDuncombe、Biochim. Biophys. Acta 580巻、289～297（1979年））。Clostridium acetobutylicum由来の遺伝子thlAをE. coliのイソプロパノール生成株に工学的に導入し、それがアセトアセテート合成の方向に機能することが示された（Hanaiら、Appl. Environ. Microbiol.、73巻、7814～7818頁（2007年）；Stim-Herndonら、Gene、154巻、81～85頁（1995年））。別の遺伝子候補はClostridium pasteurianum由来のthlである（MengおよびLi、Cloning, Biotechnol. Lett.、28巻、1227～1232頁（2006年））。

【0245】

【化 2 8】

<u>遺伝子</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>atoB</i>	P76461.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>thlA</i>	P45359.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>thl</i>	ABA18857.1	<i>Clostridium pasteurianum</i>

図 1 2 を参照すると、ステップ 2 はアセトアセチル CoA レダクターゼ (EC # : 1. 1. 1. 35) が関与する。第 2 ステップは、アセトアセチル CoA レダクターゼによる 3-ヒドロキシブチリル CoA へのアセトアセチル CoA の還元を伴う。この酵素は数種の *Clostridia* において酪酸へのアセチル CoA の発酵経路に関与し、詳細に研究されている (Jones および Woods、*Microbiol. Rev.*、50 巻、484~524 頁 (1986 年))。hbd によってコードされる *Clostridium acetobutylicum* 由来の酵素が、*E. coli* においてクローニングされ機能的に発現されている (Youngleson ら、*J. Bacteriol.*、171 巻、6800~6807 頁 (1989 年))。さらに、fadB および fadJ によってコードされる *E. coli* 中の 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 デヒドロゲナーゼとして機能する (Binstock および Schulz、*Methods Enzymol.*、71 Pt C 巻、403~411 頁 (1981 年))。追加的遺伝子候補には、*Clostridium kluyveri* 中の Hbd1 (C 末端ドメイン) および Hbd2 (N 末端ドメイン) (Hillmer および Gottschalk、*Biochim. Biophys. Acta*、333 4 巻、12~23 頁 (1974 年)) および *Bos taurus* 中の HSD17B10 (Wakil ら、*J. Biol. Chem.*、207 巻、631~638 頁 (1954 年)) がある。

【0 2 4 6】

【化 2 9】

<u>遺伝子</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>fadB</i>	P21177.2	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadJ</i>	P77399.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>Hbd2</i>	EDK34807.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>Hbd1</i>	EDK32512.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>hbd</i>	P52041.2	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>HSD17B10</i>	O02691.3	<i>Bos taurus</i>

図 1 2 を参照すると、ステップ 3 は 3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ (EC 5. 4. 99. -) が関与する。次のステップは、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼにより、3-ヒドロキシブチリル CoA を再編成して 2-HIBC CoA を形成する。この酵素は近年発見された新規の ICM 様メチルムターゼであり、*Methylibium petroleiphilum* において特徴付けられている (Ratnatilleke ら、*J. Biol. Chem.*、274 巻、31679~31685 頁 (1999 年)) ; Rohwerder ら、*Appl. Environ. Microbiol.*、72 巻、4128~4135 頁 (2006 年))。 *Methylibium petroleiphilum* PM1 中で Mpe__B0541 によってコードされるこの酵素は、*Rhodobacter sphaeroides* 中の Rsph17029__3657 および *Xanthobacter autotrophicus* 中の Xaut__5021 を含めた他の生物体中のメチルマロニル CoA ムターゼの大サブユニットと高い配列相同性を有する。実施例 V (ステップ 1) 中で論じたように、活性部位近辺の 1 アミノ酸に対する変更は酵素の基質特異性を変えるので (Ratnatilleke ら、上記、1999 年 ; Rohwer

derら、上記、2006年)、したがって、この酵素の別の遺伝子候補をこの部位で工学的に操作して、適切な反応性を得ることができる。

【0247】

【化30】

<u>遺伝子</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>Mpe_B0541</i>	YP_001023546.1	<i>Methylibium petroleiphilum PM1</i>
<i>Rsph17029_3657</i>	YP_001045519.1	<i>Rhodobacter sphaeroides ATCC 17029</i>
<i>Xaut_5021</i>	YP_001409455.1	<i>Xanthobacter autotrophicus Py2</i>

10

図12を参照すると、ステップ4は2-ヒドロキシイソブチリルCoAデヒドラターゼが関与する。2-ヒドロキシアシルCoAの脱水は、ラジカル機構によって働く特定クラスの酸素感受性酵素によって触媒することができる(BuckelおよびGolding、Annu. Rev. Microbiol.、60巻、27~49頁(2006年); Buckelら、Curr. Opin. Chem. Biol.、8巻、462~467頁(2004年); Buckelら、Biol. Chem.、386巻、951~959頁(2005年); Kimら、FEBS J.、272巻、550~561頁(2005年); Kimら、FEMS Microbiol. Rev.、28巻、455~468頁(2004年); Zhangら、Microbiology、145巻、Pt 9号、2323~2334頁(1999年))。このような酵素の一例は、ラクチルCoAの脱水を触媒してアクリルCoAを形成する、Clostridium propionicum由来のラクチルCoAデヒドラターゼである(KuchtaおよびAbelles、J. Biol. Chem.、260巻、13181~13189頁(1985年); HofmeisterおよびBuckel、Eur. J. Biochem. 206巻、547~552頁(1992年))。他の例は、Acidaminococcus fermentans由来のhgdABCによってコードされる2-ヒドロキシグルタリルCoAデヒドラターゼである(MuellerおよびBuckel、Eur. J. Biochem.、230巻、698~704頁(1995年); Schweigerら、Eur. J. Biochem.、169巻、441~448頁(1987年))。さらに別の例は、hadBCによって触媒されhadIによって活性化されるClostridium difficile由来の2-ヒドロキシイソカプロイルCoAデヒドラターゼである(Darleyら、FEBS J.、272巻、550~61頁(2005年))。A. fermentansおよびC. difficileの対応する配列は以下のGenBank IDを使用して発見することができるが、一方C. propionicumの配列は公に利用可能なデータベース中に依然挙げられていない。

20

30

【0248】

【化31】

<u>遺伝子</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>hgdA</i>	P11569	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>hgdB</i>	P11570	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>hgdC</i>	P11568	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>hadB</i>	YP_001086863	<i>Clostridium difficile</i>
<i>hadC</i>	YP_001086864	<i>Clostridium difficile</i>
<i>hadI</i>	YP_001086862	<i>Clostridium difficile</i>

40

図12を参照すると、ステップ5または6は、それぞれメタクリル酸または2-ヒドロキシイソ酪酸に対する活性を有する、トランスフェラーゼ(EC2.8.3.-)、ヒドロラーゼ(EC3.1.2.-)、またはシンテターゼ(EC6.2.1.-)が関与する。メタクリルCoAからMAAへの直接転換、または2-ヒドロキシイソブチリルC

50

CoAから2-ヒドロキシイソブチレートへの直接転換は、CoAトランスフェラーゼ、シンテターゼまたはヒドロラーゼによって実施することができる。実施例V中で論じたように、CoAトランスフェラーゼまたはCoAシンテターゼを利用してこの変換を実施する場合、経路のエネルギー特性は最も好ましい。トランスフェラーゼファミリー中、アセテート-CoAトランスフェラーゼとしても公知である酵素アシルCoA：アセテート-CoAトランスフェラーゼは、分岐状アシルCoA基質を含めたその広範囲の基質特異性のため、望ましい2-ヒドロキシイソブチリルCoAまたはメタクリルCoAトランスフェラーゼ活性を触媒するのに適した候補である（MatthiesおよびSchink、*Appl. Environ. Microbiol.*、58巻、1435～1439頁（1992年）；Vanderwinkelら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.*、33巻、902～908頁（1968年））。ADP形成アセチルCoAシンテターゼ（ACD）は、構造上類似した分岐鎖状化合物に作用するCoAシンテターゼファミリー中の有望な酵素である（BrasenおよびSchonheit、*Arch. Microbiol.*、182巻、277～287頁（2004年）；MusfeldtおよびSchonheit、*J. Bacteriol.*、184巻、636～644頁（2002年））。CoA-ヒドロラーゼファミリー中、酵素3-ヒドロキシイソブチリルCoAヒドロラーゼは、3-ヒドロキシイソブチリルCoA、メチルマロニルCoA、および3-ヒドロキシ-2-メチルブタノイルCoAを含めた、様々な分岐鎖状アシルCoA基質に作用することが示されている（Hawesら、*Methods Enzymol.*、324巻、218～228頁（2000年）；Hawesら、*J. Biol. Chem.*、271巻、26430～26434頁（1996年）；Shimomuraら、*J. Biol. Chem.*、269巻、14248～14253頁（1994年））。CoAトランスフェラーゼ、シンテターゼおよびヒドロラーゼが関与する他の例示的な遺伝子候補は、実施例V（ステップ2および5）中に論じる。

【0249】

図12を参照すると、別のステップ5はMAAへの間接的転換が関与する。MAAへのMAA-CoAの直接転換の代替として、メタクリルCoAをMAAに転換するための別の戦略は、3-ヒドロキシイソブチレートを介してMAA-CoAをMAAに転換する多段階プロセスを伴う。このプロセスによって、MAA-CoAは最初に3-ヒドロキシイソブチリルCoAに転換され、それは後に実施例V中に記載したようにMAAに転換され得る。

【0250】

この間接的経路の最初のステップは、エノイルCoAヒドラターゼ（EC4.2.1.17および4.2.1.74）による、3-ヒドロキシイソブチリルCoA（3HIB-CoA）へのMAA-CoAの転換を伴う。*E. coli*では、*fadA*および*fadB*の遺伝子産物は、エノイルCoAヒドラターゼ活性を示す脂肪酸酸化に関与する多酵素複合体をコードする（NakahigashiおよびInokuchi、*Nucleic Acids Research*、18巻、4937頁（1990年）；Yang、*J. Bacteriol.*、173巻、7405～7406頁（1991年）；Yangら、*J. Biol. Chem.*、265巻、10424～10429頁（1990年）；Yangら、*Biochemistry*、30巻、6788～6795頁（1991年））。*fadR*によってコードされる負のレギュレーターのノックアウトを利用して、*fadB*遺伝子産物を活性化することができる（Satoら、*J. Biosci. Bioengineering*、103巻、38～44頁（2007年））。*fadI*遺伝子と*fadJ*遺伝子は類似した機能をコードし、嫌気的条件下で天然に発現される（Campbellら、*Mol. Microbiol.*、47巻、793～805頁（2003年））。

【0251】

【化 3 2】

<u>遺伝子</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>fadA</i>	YP_026272.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadB</i>	NP_418288.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadI</i>	NP_416844.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadJ</i>	NP_416843.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadR</i>	NP_415705.1	<i>Escherichia coli</i>

エノイルC o Aヒドラターゼをコードする追加的な天然遺伝子候補には、maoC (P
arkおよびLee、J. Bacteriol.、185巻、5391～5397頁(2
003年))、paaF (Ismailら、Eur. J. Biochem.、270巻、
3047～3054頁(2003年); ParkおよびLee、Appl. Bioche
m. Biotechnol.、113～116巻、335～346頁(2004年); P
arkおよびYup、Biotechnol. Bioeng.、86巻、681～686
頁(2004年))、およびpaaG (Ismailら、Eur. J. Biochem.
、270巻、3047～3054頁(2003年); ParkおよびLee、Appl.
Biochem. Biotechnol.、113～116頁:335～346頁(20
04年); ParkおよびYup、Biotechnol. Bioeng.、86巻、6
81～686頁(2004年))がある。非天然の候補には、P. putida (Oli
veraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、95巻、6419～64
24頁(1998年))およびP. fluorescens (Di Gennaroら、
Arch. Microbiol.、188巻、117～125頁(2007年))由来の
paaA、paaB、およびpaaNがある。C. acetobutylicum由来の
crtの遺伝子産物は別の候補である(Atsumiら、Metab. Eng.、200
7年9月14日電子出版; Boyntonら、J. Bacteriol.、178巻、3
015～3024頁(1996年))。

【0252】

【化 3 3】

<u>遺伝子</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>maoC</i>	NP_415905.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaF</i>	NP_415911.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaG</i>	NP_415912.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaA</i>	NP_745427.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaA</i>	ABF82233.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>paaB</i>	NP_745426.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaB</i>	ABF82234.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>paaN</i>	NP_745413.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaN</i>	ABF82246.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>crt</i>	NP_349318.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>

この実施例は、アセチルC o Aから2-ヒドロキシイソブチレートまたはMAAを生成
する生合成経路を記載する。

【0253】

(実施例XII)

MAAへのアセチルC o Aの転換のための経路を有するMAA生成微生物体の調製

この実施例は、アセチルC o AからMAAを生成することができる微生物体の作製を記

載する。

【0254】

Escherichia coli は、図12中に示すMAA経路を工学的に操作するための標的生物体として使用する。*E. coli* は、MAAを生成することができる天然に存在しない微生物を作製するのに良い宿主を提供する。*E. coli* は遺伝子操作の影響を受けやすく、嫌氣的または微好氣的条件下で効率良く、エタノール、酢酸、ギ酸、乳酸、およびコハク酸のような、様々な生成物を生成することができることは公知である。

【0255】

MAAを生成するように操作された*E. coli* 株を作製するために、経路中で利用する酵素をコードする核酸を、周知の分子生物学の技術を使用して*E. coli* において発現させる（例えば、Sambrook、上記、2001年；Ausubel、上記、1999年を参照）。特に、それぞれアセトアセチルCoAチオラーゼ、アセトアセチルCoAレダクターゼ、および3-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ活性をコードするatoB（P76461.1）、hbd（P52041.2）、およびMpe__B0541（YP__001023546.1）遺伝子を、PA1/lacOプロモーターの下でpZE13ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）にクローニングする。さらに、2-ヒドロキシイソブチリルCoAデヒドラターゼおよびメタクリリルCoAヒドロラーゼ活性をコードするhgdA（P11569）、hgdB（P11570）、hgdC（P11568）、およびhibch（Q5XIE6.2）遺伝子を、PA1/lacOプロモーターの下でpZA33ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）にクローニングする。2組のプラスミドを*E. coli* 株MG1655に形質転換して、アセチルCoAの経路を介したMAA合成に必要なタンパク質および酵素を発現させる。

【0256】

得られた遺伝子操作生物体は、当技術分野で周知の手順後、グルコース含有培地において培養する（例えば、Sambrookら、上記、2001年を参照）。*E. coli* の宿主株をde novoでコバラミンを合成するように操作しない限り、コバラミンをさらに培地に供給してムターゼ酵素の活性を確実にする（例えば、Rauxら、J. Bacteriol.、178巻、753～767頁（1996年）を参照）。MAA合成遺伝子の発現は、例えば、ノーザンブロット、mRNAのPCR増幅、イムノブロッティングなどを含めた、ポリペプチド発現または酵素活性を決定するための当技術分野で周知の方法を使用して裏付ける。発現される酵素の酵素活性は、個々の活性に特異的なアッセイを使用して確認する。MAAを生成する工学的に操作された*E. coli* 株の能力は、HPLC、ガスクロマトグラフィー質量分析法（GCMS）および／または液体クロマトグラフィー質量分析法（LCMS）を使用して確認する。

【0257】

機能的MAA合成経路を有するように操作した微生物株は、経路の有効利用のための最適化によってさらに増強する。簡単に述べると、工学的に操作された株を評価して、いずれの外因性遺伝子が律速レベルで発現されるかどうか決定する。例えば追加的遺伝子コピー数の導入によって、経路中の流れを制限し得る低レベルで発現する任意の酵素に関して発現は増大する。

【0258】

より良い生産体を作製するために、代謝モデリングを利用して増殖条件を最適化する。モデリングをさらに使用して、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計する（例えば、米国特許公開US2002/0012939、US2003/0224363、US2004/0029149、US2004/0072723、US2003/0059792、US2002/0168654およびUS2004/0009466、および米国特許第7,127,379号を参照）。モデリング解析によって、MAAのより有効な生成への代謝の移行の、細胞増殖に対する影響の信頼できる予測を与える。1つのモデリング法は、MAAのより良好な生成を一括してもたらす遺伝子ノックアウトを選

択するために適用される2層最適化法OptKnock (Burgardら、Biotechnol. Bioengineer.、84巻、647～657頁(2003年))である。適応進化を使用して、例えばMAA生成物のアセチルCoA中間体の、より良い生産体を作製することもできる。適応進化を実施して増殖特性と生産特性の両方を改善する(FongおよびPalsson、Nat. Genet.、36巻、1056～1058頁(2004年); Alperら、Science、314巻、1565～1568頁(2006年))。結果に基づいて、後の数ラウンドのモデリング、遺伝子操作および適応進化をMAA生産体に施して、生産をさらに増大することができる。

【0259】

MAAの大規模な生産用に、前述の生物体を当技術分野で公知の培地を使用して発酵槽中で培養して、嫌気的条件下での生物体の増殖を促進する。発酵は回分、流加または連続的な形で実施する。嫌気的条件は最初に窒素で培地をスパージし、次いで培養容器を密閉することによって維持し、例えば、フラスコは隔膜および圧着キャップで密閉することができる。限られた通気で隔膜中に小さな穴を与えることによって、微好気的条件を利用することもできる。培地のpHは、 H_2SO_4 などの酸を加えることによって約7のpHに保つ。増殖速度は分光光度計を使用して光学濃度を測定することによって決定し(600nm)、グルコースの取り込み速度は経時的な炭素源の枯渇をモニターすることによって決定する。望ましくないアルコール、有機酸、および残留グルコースなどの副産物は、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、グルコースおよびアルコールに屈折率検出器、有機酸にUV検出器を使用して、HPLC (Shimadzu、Columbia MD) によって定量化することができる (Linら、Biotechnol. Bioeng.、775～779頁(2005年))。

【0260】

この実施例は、アセチルCoAからMAAを生成することができる微生物体の調製を記載する。

【0261】

(実施例XIII)

クロトノイルCoAを介したMAAへのアセチルCoAの転換のための経路

この実施例は、クロトノイルCoAを介したアセチルCoAからの例示的なMAAの合成経路を記載する。

【0262】

少なくとも7つの酵素ステップでMAAにアセチルCoAを転換するための別の経路を記載する(図13参照)。好気的および嫌気的条件下でのこの経路の収率は、実施例XI中に記載した経路と類似している。

【0263】

経路の最初の2ステップは、実施例XI中に記載した経路中のステップ1および2と同一である。第3ステップでは、クロトナーゼ(EC#: 4. 2. 1. 55)によって3-HBCoAを脱水してクロトニルCoAを形成する。クロトニルCoA中の二重結合はブチリルCoAデヒドロゲナーゼ(EC#: 1. 3. 99. 2)によって還元される。これらの酵素の両方が、アセトアセチルCoAレダクターゼと全く同様に、Clostridia種における酪酸へのアセチルCoAの発酵経路の一部である(JonesおよびWoods、Microbiol. Rev.、50巻、484～524頁(1986年))。後のステップ中、イソブチリルCoAムターゼ(5. 4. 99. 12)、イソブチリルCoAにブチリルCoAを可逆的に転換することができる酵素によって、ブチリルCoAをイソブチリルCoAに転換する。この酵素はStreptomyces cinnamomensisからクローニングおよび配列決定されており、組換え酵素がE. coliにおいて特徴付けられている(Ratnatillekeら、J. Biol. Chem.、274巻、31679～31685頁(1999年))。経路中の次のステップは、2-メチルーアシルCoAデヒドロゲナーゼ(EC#: 1. 3. 99. 12)によるメタクリ

リルCoAへのイソブチリルCoAの転換を伴う。メタクリリルCoAへのこの変換は*Streptomyces*種において観察されており、関連酵素は*E. coli*において単離および発現されている(Younglesonら、*J. Bacteriol.*、171巻、6800～6807頁(1989年))。最終ステップでは、実施例XI(ステップ5)中に記載したように、1つの酵素または一連の酵素のいずれかによって、メタクリリルCoAをMAAに転換する。

【0264】

この実施例は、アセチルCoAからMAAを生成する生合成経路を記載する。

【0265】

(実施例XIV)

MAAへのアクリリルCoAの転換のための経路

この実施例は、アクリリルCoAからの例示的なMAAの合成経路を記載する。

【0266】

高収率のMAAはアクリリルCoA経路によって得ることができる(図14参照)。この経路は、ラクティルCoAへのラクテートの活性化、次にこの活性化CoA分子をMAAに転換するための5、または場合によっては6、それより多くのステップを必要とする。この経路を使用したグルコースからのMAA収率はグルコース1mol当たり1.28molであり、酸素の取り込みがこれらの収率を得るのに必要とされる。酸素の不在下では、予想収率は消費するグルコース1mol当たり1.28molから1.09molに低下する。好氣的経路と嫌氣的経路は両方共に最大MAA収率でエネルギーが制限され、いかなるATPも生成しない。

【0267】

アクリリルCoA経路を介したMAAの生合成は、乳酸デヒドロゲナーゼ(EC1.1.1.28)、*E. coli*および多くの他の生物体に固有の酵素によるラクテートへのピルベートの転換を最初に必要とする。ラクテートをプロピオニルCoAに転換する3つの後のステップは、*Clostridium propionicum*および*Megasphaera elsdenii*などのいくつかの無関係な細菌中のピルビン酸発酵経路における酵素によって触媒される(MetaCyc)。プロピネートCoAトランスフェラーゼとしても公知されているラクテートCoAトランスフェラーゼ(EC2.8.3.1)はラクテートをラクティルCoAに転換し、基質としてプロピオネートとラクテートの両方を使用することができる。この酵素は精製および特徴付けられている(Schweigerら、*Eur. J. Biochem.*、169巻、441～448頁(1987年))。ラクティルCoAデヒドラターゼ(EC4.2.1.54)、多数の研究の対象となっている酵素を使用して、ラクティルCoAをアクリリルCoAに脱水する(HofmeisterおよびBuckel、*Eur. J. Biochem.*、206巻、547～552頁(1992年)；KuchtaおよびAbelès、*J. Biol. Chem.*、260巻、13181～13189頁(1985年))。その後アクリリルCoAは、アクリロイルCoAレダクターゼ(EC1.3.2.2、以前は1.3.99.3)を使用してプロピオニルCoAに還元する(Hetzlerら、*Eur. J. Biochem.*、270巻、902～910頁(2003年)；KuchtaおよびAbelès、上記、1985年)。

【0268】

図14を参照すると、ステップ5中、プロピオニルCoAカルボキシラーゼ(6.4.1.3)によってプロピオニルCoAがS-メチルマロニルCoAに転換される。プロピオニルCoAカルボキシラーゼはラット肝臓から精製されており(Brownerら、*J. Biol. Chem.*、264巻、12680～12685頁(1989年)；Krausら、*J. Biol. Chem.*、258巻、7245～7248頁(1983年))、ヒト肝臓からも単離され特徴付けられている(Kalousekら、*J. Biol. Chem.*、255巻、60～65頁(1980年))。この酵素によるスクシニルCoAへのプロピオニルCoAのカルボキシル化は、*E. coli*におけるプロピネート代謝

10

20

30

40

50

の機構の1つとして確認されているが（E v a n s ら、B i o c h e m . J . 、291巻、Pt 3号、927～932頁（1993年））、この経路の遺伝的性質に関してはほとんど公知でない。

【0269】

この経路の最終ステップは、M A A へのメチルマロニルC o A の転換を伴う（図14中の集中反応）。これらの反応を触媒する酵素は実施例I中に記載する。

【0270】

この実施例は、ピルベートからM A A を生成する生合成経路を記載する。

【0271】

（実施例X V）

M A A への2-ケトイソバレレート転換のための経路

この実施例は、2-ケトイソバレレートからの例示的なM A A の合成経路を記載する。

【0272】

この経路では、2-ケトイソバレレート、バリン生合成の前駆体を介してM M A の生合成が起こる（図15参照）。具体的には、3つの酵素、アセト乳酸シンターゼ、アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼ、およびジヒドロキシ酸デヒドラターゼの作用後、ピルベートから2-ケトイソバレレートを形成することができる。M A A への2-ケトイソバレレートの転換は4つの酵素ステップを必要とし、好氣的条件下においてグルコース1 m o l 当たり1 m o l のM A A 収率、および嫌氣的条件下ではグルコース1 m o l 当たり0 . 4 m o l の収率をもたらす（表5）。この経路は酸化還元バランスがとれておらず、エタノールおよびギ酸などの発酵生成物の分泌が嫌氣的条件下で起こり得る。酸素不在下でのこの経路中のM A A の比較的低い収率にもかかわらず、エネルギー特性は非常に好ましく、消費するグルコース1モル当たり最大2 . 2モルのA T P が生成する。

【0273】

【表5】

表5. 2-ケトイソバレレートの経路に関する生成物およびATP収率。

	2-ケトイソバレレートを介したMAAの生合成経路	
	嫌氣的	好氣的
MAAの収率	0.4	1.0
最大MAA収率での最大ATP収率	2.2	7.0

この経路は、B a c i l l u s s u b t i l i s、A r a b i d o p s i s t h a l i a n a、および数種のP s e u d o m o n a sを含めたいくつかの生物体において記載されるが、E . c o l i 中またはS . c e r e v i s i a e中に存在することは公知でない、バリン分解経路の多数のステップを利用する。バリン分解経路の最初のステップ中、分岐鎖状アミノ酸アミノトランスフェラーゼ（E C 2 . 6 . 1 . 24）、E . c o l i にも固有である酵素によって、バリンは2-ケトイソバレレートに転換される（M a t t h i e s および S c h i n k、A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l . 、58巻、1435～1439頁（1992年）；R u d m a n および M e i s t e r、J . B i o l . C h e m . 、200巻、591～604頁（1953年））。分岐鎖状ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体（E C 1 . 2 . 1 . 25）によって触媒される、イソブチリルC o A への2-ケトイソバレレートのその後の転換は、この経路によるM A A 生合成の実行ステップである。次に、イソブチリルC o A デヒドロゲナーゼ（E C 1 . 3 . 99 . 12）によって、イソブチリルC o A をメタクリリルC o A に転換する。このステップに関する詳細は実施例X I I I 中に記載する。最終ステップ、M A A へのM A A - C o A の転換は実施例I中に記載する。

【0274】

この実施例は、2-ケトイソバレレートからM M A を生成する生合成経路を記載する。

【0275】

(実施例XVI)

3-ヒドロキシイソ酪酸への4-ヒドロキシブチリルCoAの転換のための経路を有する3-ヒドロキシイソ酪酸生成微生物体の調製

この実施例は、4-ヒドロキシブチリルCoAから3-ヒドロキシイソ酪酸を生成することができる微生物体の作製を記載する。

【0276】

*Escherichia coli*は、図6中に示す3-ヒドロキシイソ酪酸経路を工学的に操作するための標的生物体として使用する。*E. coli*は、3-ヒドロキシイソ酪酸を生成することができる天然に存在する微生物を作製するのに良い宿主を提供する。*E. coli*は遺伝子操作の影響を受けやすく、嫌氣的または微好氣的条件下で効率良く、エタノール、酢酸、ギ酸、乳酸、およびコハク酸のような、様々な生成物を生成することができることは公知である。

【0277】

3-ヒドロキシイソ酪酸を生成するように操作された*E. coli*株を作製するために、経路中で利用する酵素をコードする核酸を、周知の分子生物学の技術を使用して*E. coli*において発現させる（例えば、Sambrook、上記、2001年；Ausubel、上記、1999年を参照）。特に、それぞれコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ（CoA依存性）、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、およびホスホトランスブチリラーゼ活性をコードするsucD（YP_001396394）、4hbd（YP_001396393）、buk1（Q45829）、およびptb（NP_349676）遺伝子を、PA1/lacOプロモーターの下でpZE13ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）にクローニングする。Burkら（米国公開2009/0075351）中に記載されたように、この構築体はスクシニルCoAからの4HB-CoAの生成を可能にする。さらに、それぞれ4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼおよび3-ヒドロキシブチリルCoAヒドロラーゼをコードするicmA（CAB40912.1）およびhibch（Q5XIE6.2）遺伝子を、PA1/lacOプロモーターの下でpZA33ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）にクローニングする。2組のプラスミドを*E. coli*株MG1655に形質転換して、4-ヒドロキシブチリルCoAの経路を介した3-ヒドロキシイソ酪酸の合成に必要なタンパク質および酵素を発現させる。

【0278】

得られた遺伝子操作生物体は、当技術分野で周知の手順後、グルコース含有培地において培養する（例えば、Sambrookら、上記、2001年を参照）。*E. coli*の宿主株をde novoでコバラミンを合成するように操作しない限り、コバラミンをさらに培地に供給してムターゼ酵素の活性を確実にする（例えば、Rauxら、J. Bacteriol. 178巻、753～767頁（1996年）を参照）。3-ヒドロキシイソ酪酸合成遺伝子の発現は、例えば、ノーザンブロット、mRNAのPCR増幅、イムノブロットイングなどを含めた、ポリペプチド発現または酵素活性を決定するための当技術分野で周知の方法を使用して裏付ける。発現される酵素の酵素活性は、個々の活性に特異的なアッセイを使用して確認する。3-ヒドロキシイソ酪酸を生成する工学的に操作された*E. coli*株の能力は、HPLC、ガスクロマトグラフィー質量分析法（GCMS）および／または液体クロマトグラフィー質量分析法（LCMS）を使用して確認する。

【0279】

機能的3-ヒドロキシイソ酪酸合成経路を有するように操作した微生物株は、経路の有効利用のための最適化によってさらに増強する。簡単に述べると、工学的に操作された株を評価して、いずれの外因性遺伝子が律速レベルで発現されるかどうか決定する。例えば追加的遺伝子コピー数の導入によって、経路中の流れを制限し得る低レベルで発現する任意の酵素に関して発現は増大する。

【0280】

より良い生産体を作製するために、代謝モデリングを利用して増殖条件を最適化する。モデリングをさらに使用して、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計する（例えば、米国特許公開US2002/0012939、US2003/0224363、US2004/0029149、US2004/0072723、US2003/0059792、US2002/0168654およびUS2004/0009466、および米国特許第7,127,379号を参照）。モデリング解析によって、3-ヒドロキシイソ酪酸のより有効な生成への代謝の移行の、細胞増殖に対する影響の信頼できる予測を与える。1つのモデリング法は、3-ヒドロキシイソ酪酸のより良好な生成を一括してもたらし遺伝子ノックアウトを選択するために適用される2層最適化法OptKnock (Burgardら、Biotechnol. Bioengineer.、84巻、647～657頁(2003年))である。適応進化を使用して、例えば3-ヒドロキシイソ酪酸生成物のスクシニルCoAまたは4-ヒドロキシブチリルCoA中間体の、より良い生産体を作製することもできる。適応進化を実施して増殖特性と生産特性の両方を改善する(FongおよびPalsson、Nat. Genet.、36巻、1056～1058頁(2004年); Alperら、Science、314巻、1565～1568頁(2006年))。結果に基づいて、後の数ラウンドのモデリング、遺伝子操作および適応進化を3-ヒドロキシイソ酪酸生産体に施して、生産をさらに増大することができる。

10

【0281】

3-ヒドロキシイソ酪酸の大規模な生産用に、前述の生物体を当技術分野で公知の培地を使用して発酵槽中で培養して、嫌気的条件下での生物体の増殖を促進する。発酵は回分、流加または連続的な形で実施する。嫌気的条件は最初に窒素で培地をスパージし、次いで培養容器を密閉することによって維持し、例えば、フラスコは隔膜および圧着キャップで密閉することができる。限られた通気で隔膜中に小さな穴を与えることによって、微好気的条件を利用することもできる。培地のpHは、H₂SO₄などの酸を加えることによって約7のpHに保つ。増殖速度は分光光度計を使用して光学濃度を測定することによって決定し(600nm)、グルコースの取り込み速度は経時的な炭素源の枯渇をモニターすることによって決定する。望ましくないアルコール、有機酸、および残留グルコースなどの副産物は、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、グルコースおよびアルコールに屈折率検出器、有機酸にUV検出器を使用して、HPLC (Shimadzu、Columbia MD) によって定量化することができる(Linら、Biotechnol. Bioeng.、775～779頁(2005年))。

20

30

【0282】

この実施例は、4-ヒドロキシブチリルCoAから3-ヒドロキシイソ酪酸を生成することができる微生物体の調製を記載する。

【0283】

(実施例XVII)

2-ヒドロキシイソ酪酸へのアセチルCoAの転換のための経路を有する2-ヒドロキシイソ酪酸生成微生物体の調製

この実施例は、アセチルCoAから2-ヒドロキシイソ酪酸を生成することができる微生物体の作製を記載する。

40

【0284】

Escherichia coli は、図12中に示す2-ヒドロキシイソ酪酸経路を工学的に操作するための標的生物体として使用する。*E. coli* は、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成することができる天然に存在しない微生物を作製するのに良い宿主を提供する。*E. coli* は遺伝子操作の影響を受けやすく、嫌気的または微好気的条件下で効率良く、エタノール、酢酸、ギ酸、乳酸、およびコハク酸のような、様々な生成物を生成することができることは公知である。

50

【0285】

2-ヒドロキシイソ酪酸を生成するように操作されたE. coli株を作製するために、経路中で利用する酵素をコードする核酸を、周知の分子生物学の技術を使用してE. coliにおいて発現させる（例えば、Sambrook、上記、2001年；Ausubel、上記、1999年を参照）。特に、それぞれアセトアセチルCoAチオラーゼ、アセトアセチルCoAレダクターゼ、および3-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ活性をコードするatob（P76461.1）、hbd（P52041.2）、およびMpe__B0541（YP__001023546.1）遺伝子を、PA1/lacOプロモーターの下でpZE13ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）にクローニングする。さらに、2-ヒドロキシイソブチリルCoAヒドロラーゼ活性をコードするhibch（Q5XIE6.2）を、PA1/lacOプロモーターの下でpZA33ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）にクローニングする。2組のプラスミドをE. coli株MG1655に形質転換して、アセチルCoAの経路を介した2-ヒドロキシイソ酪酸の合成に必要なタンパク質および酵素を発現させる。

10

【0286】

得られた遺伝子操作生物体は、当技術分野で周知の手順後、グルコース含有培地において培養する（例えば、Sambrookら、上記、2001年を参照）。E. coliの宿主株をde novoでコバラミンを合成するように操作しない限り、コバラミンをさらに培地に供給してムターゼ酵素の活性を確実にする（例えば、Rauxら、J. Bacteriol.、178巻、753～767頁（1996年）を参照）。2-ヒドロキシイソ酪酸合成遺伝子の発現は、例えば、ノーザンブロット、mRNAのPCR増幅、イムノブロットングなどを含めた、ポリペプチド発現または酵素活性を決定するための当技術分野で周知の方法を使用して裏付ける。発現される酵素の酵素活性は、個々の活性に特異的なアッセイを使用して確認する。2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する工学的に操作されたE. coli株の能力は、HPLC、ガスクロマトグラフィー質量分析法（GCMS）および／または液体クロマトグラフィー質量分析法（LCMS）を使用して確認する。

20

【0287】

機能的2-ヒドロキシイソ酪酸合成経路を有するように操作した微生物株は、経路の有効利用のための最適化によってさらに増強する。簡単に述べると、工学的に操作された株を評価して、いずれの外因性遺伝子が律速レベルで発現されるかどうか決定する。例えば追加的遺伝子コピー数の導入によって、経路中の流れを制限し得る低レベルで発現する任意の酵素に関して発現は増大する。

30

【0288】

より良い生産体を作製するために、代謝モデリングを利用して増殖条件を最適化する。モデリングをさらに使用して、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計する（例えば、米国特許公開US2002/0012939、US2003/0224363、US2004/0029149、US2004/0072723、US2003/0059792、US2002/0168654およびUS2004/0009466、および米国特許第7,127,379号を参照）。モデリング解析によって、2-ヒドロキシイソ酪酸のより有効な生成への代謝の移行の、細胞増殖に対する影響の信頼できる予測を与える。1つのモデリング法は、2-ヒドロキシイソ酪酸のより良好な生成を一括してもたらし遺伝子ノックアウトを選択するために適用される2層最適化法OptKnock（Burgardら、Biotechnol. Bioengineer.、84巻、647～657頁（2003年））である。適応進化を使用して、例えば2-ヒドロキシイソ酪酸生成物のアセチルCoA中間体の、より良い生産体を作製することもできる。適応進化を実施して増殖特性と生産特性の両方を改善する（FongおよびPalsson、Nat. Genet.、36巻、1056～1058頁（2004年）；Alperら、Science314巻、1565～1568頁（2006年））。結果に基づいて、後の数ラウンドのモデリング、遺伝子操作および適応進化を2-ヒドロキシイソ酪酸生産体

40

50

に施して、生産をさらに増大することができる。

【0289】

2-ヒドロキシイソ酪酸の大規模な生産用に、前述の生物体を当技術分野で公知の培地を使用して発酵槽中で培養して、嫌気的条件下での生物体の増殖を促進する。発酵は回分、流加または連続的な形で実施する。嫌気的条件は最初に窒素で培地をスパージし、次いで培養容器を密閉することによって維持し、例えば、フラスコは隔膜および圧着キャップで密閉することができる。限られた通気で隔膜中に小さな穴を与えることによって、微好気的条件下を利用することもできる。培地のpHは、 H_2SO_4 などの酸を加えることによって約7のpHに保つ。増殖速度は分光光度計を使用して光学濃度を測定することによって決定し(600nm)、グルコースの取り込み速度は経時的な炭素源の枯渇をモニターすることによって決定する。望ましくないアルコール、有機酸、および残留グルコースなどの副産物は、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、グルコースおよびアルコールに屈折率検出器、有機酸にUV検出器を使用して、HPLC(Shimadzu、Columbia MD)によって定量化することができる(Linら、Biotechnol. Bioeng.、775~779頁(2005年))。

10

【0290】

この実施例は、アセチルCoAから2-ヒドロキシイソ酪酸を生成することができる微生物体の調製を記載する。

【0291】

20

(実施例XVII)

2-ヒドロキシイソブチリルCoAを介した2-ヒドロキシイソブチレートまたはMAAへの4-ヒドロキシブチリルCoAの転換のための経路

この実施例は、2-ヒドロキシイソブチリルCoAを介して進行する4-ヒドロキシブチリルCoAから始まる、例示的な2-ヒドロキシイソ酪酸またはMAAの合成経路を記載する。図12中に示す経路は嫌気的条件下でも高収率であり、2-ヒドロキシイソ酪酸またはMAAの最大理論収率はグルコース1モル当たり1.33モルである。これは、グルコース1mol当たり1モルの生成物の最大理論収率に制限される、実施例XI中に記載したアセチルCoAから始まる経路とは対照的である。

【0292】

30

この経路は最初にビニルアセチルCoAへの4-ヒドロキシブチリルCoAの脱水を伴い、それは後にクロトノイルCoAに異性体化される。クロトニルCoAを水和して3-ヒドロキシブチリルCoAを形成し、それは2-ヒドロキシイソブチリルCoAに再編成される。2-ヒドロキシイソブチレート経路の最終ステップは、2-ヒドロキシイソブチリルCoAからのCoA官能基の除去が関与する。MAA合成中の最終ステップは、2-ヒドロキシイソブチリルCoAの脱水、次にメタクリリルCoAからのCoA官能基の除去が関与する。図12の最初の3経路のステップ、ステップ7、8、および9の遺伝子候補は以下に記載する。図12のステップ3、4、5、および6の遺伝子候補は実施例XI中に論じる。

【0293】

40

図12を参照すると、ステップ8および9は4-ヒドロキシブチリルCoAデヒドラターゼ酵素によって実施する。Clostridium aminobutyriumとC. kluyveriの両方由来の酵素は、クロトニルCoAへの4-ヒドロキシブチリルCoAの可逆的転換を触媒し、さらに固有のビニルアセチルCoAΔ-イソメラーゼ活性を有する(ScherfおよびBuckel、Eur. J. Biochem.、215巻、421~429頁(1993年); Scherfら、Arch. Microbiol.、161巻、239~245頁(1994年))。N末端アミノ酸配列を含めて両方の天然酵素が精製および特徴付けられている(ScherfおよびBuckel、上記、1993年; Scherfら、上記、1994年)。C. aminobutyriumおよびC. kluyveri由来のabfD遺伝子はこれらのN末端アミノ酸配列が正確に一致

50

し、したがって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 Δ-イソメラーゼをコードする。さらに、*Porphyromonas gingivalis* 由来の *abfD* ATCC 33277 は、相同性によって同定することができる別の例示的な4-ヒドロキシブチリルCoAデヒドラターゼである。

【0294】

【化34】

abfD YP_001396399.1 *Clostridium kluyveri* DSM 555

abfD P55792 *Clostridium aminobutyricum*

abfD YP_001928843 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

10

図12のステップ10はクロトナーゼ酵素によって実施する。このような酵素はいくつかの生物体、特にClostridial種中のn-ブタノール形成に必要とされ、*Sulfolobus*、*Acidianus*、および*Metallosphaera*属の好熱好酸性古細菌中の3-ヒドロキシプロピオン酸／4-ヒドロキシ酪酸回路の1ステップをさらに含む。クロトナーゼ酵素をコードする例示的な遺伝子は、*C. acetobutylicum* (Boyntonら、*J. Bacteriol.*、178巻、11号、3015～3024頁(1996年))、*C. kluyveri* (HillmerおよびGottschalk、*FEBS Lett.*、21巻、3号、351～354頁(1972年))、および*Metallosphaera sedula* (Bergら、*Science*、318巻、5857号、1782～1786頁(2007年))中で見ることができるが、後者の遺伝子の配列は公知ではない。脂肪酸β酸化および／または様々なアミノ酸の代謝に関与するエノイルCoAヒドラターゼは、3-ヒドロキシブチリルCoAを形成するためのクロトニルCoAの水和も触媒することができる(*Agni-hotri*およびLiu、*Bioorg. Med. Chem.* 11巻、1号、9～20頁(2003年)；Robertsら、*Arch. Microbiol.*、117巻、1号、99～108頁(1978年)；Conradら、*J. Bacteriol.*、118巻、1号、103～111頁(1974年))。*P. putida*のエノイルCoAヒドラターゼ、*phaA*および*phaB*は、フェニル酢酸異化中に二重結合のヒドロキシル化を実施すると考えられる(Oliveraら、*Proc Natl Acad Sci USA*、95巻、11号、6419～6424頁(1998年))。*P. fluorescens*由来の*paaA*および*paaB*は同様の変換を触媒する(Oliveraら、上記、1998年)。最後に、*maoC* (ParkおよびLee、*J. Bacteriol.*、185巻、18号、5391～5397頁(2003年))、*paaF* (ParkおよびLee、*Biotechnol. Bioeng.*、86巻、6号、681～686頁(2004年a))；ParkおよびLee、*Appl. Biochem. Biotechnol.*、113～116頁：335～346頁(2004年b))；Ismailら、*Eur. J. Biochem.*、270巻、14号、3047～3054頁(2003年)、および*paaG* (ParkおよびLee、上記、2004年；ParkおよびLee、上記、2004年b；Ismailら、上記、2003年)を含めた、いくつかの*Escherichia coli*の遺伝子はエノイルCoAヒドラターゼの官能性を示すことが示されている。

20

30

40

【0295】

【化 3 5】

<i>crt</i>	NP_349318.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>crtI</i>	YP_001393856	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555
<i>paaA</i>	NP_745427.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaB</i>	NP_745426.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>phaA</i>	ABF82233.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>phaB</i>	ABF82234.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>maoC</i>	NP_415905.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaF</i>	NP_415911.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaG</i>	NP_415912.1	<i>Escherichia coli</i>

10

この実施例は、4-ヒドロキシブチリル CoA からの 2-ヒドロキシイソブチレートまたはメタクリル酸の生合成経路を記載する。

【0 2 9 6】

(実施例 X I X)

2-ヒドロキシイソブチリル CoA を介した M A A への 4-ヒドロキシブチリル CoA の転換のための経路を有する M A A 生成微生物体の調製

この実施例は、2-ヒドロキシイソブチリル CoA を介して 4-ヒドロキシブチリル CoA から M A A を生成することができる微生物体の作製を記載する。

20

【0 2 9 7】

Escherichia coli は、4-ヒドロキシブチリル CoA から始まる、図 1 2 中に示す M A A 経路を工学的に操作するための標的生物体として使用する。*E. coli* は、M A A を生成することができる天然に存在しない微生物を作製するのに良い宿主を提供する。*E. coli* は遺伝子操作の影響を受けやすく、嫌氣的または微好氣的条件下で効率良く、エタノール、酢酸、ギ酸、乳酸、およびコハク酸のような、様々な生成物を生成することができることは公知である。

【0 2 9 8】

M A A を生成するように操作された *E. coli* 株を作製するために、経路中で利用する酵素をコードする核酸を、周知の分子生物学の技術を使用して *E. coli* において発現させる（例えば、Sambrook、上記、2001年；Ausubel、上記、1999年を参照）。最初に、それぞれコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ（CoA 依存性）、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、およびホスホトランスブチラーゼ活性をコードする *sucD* (YP_001396394)、*hbd* (YP_001396393)、*buk1* (Q45829)、および *ptb* (NP_349676) 遺伝子を、*PAL/lacO* プロモーターの下で *pZE13* ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）にクローニングする。Burk（米国公開 2009/0075351）中に記載されたように、この構築体はスクシニル CoA からの 4HB-CoA の生成を可能にする。それぞれ 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 Δ-イソメラーゼ、およびエノイル CoA ヒドラターゼ活性をコードする *abfD* (YP_001396399.1) および *crt1* (YP_001393856) を、*PAL/lacO* プロモーターの下で *pZS23* ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）にクローニングする。さらに、2-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼおよびメタクリル CoA ヒドラターゼ活性をコードする *hgdA* (P11569)、*hgdB* (P11570)、*hgdC* (P11568)、および *hibch* (Q5XIE6.2) 遺伝子を、*PAL/lacO* プロモーターの下で *pZS13* ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）にクローニングする。*pZS23* は、周知の分子生物学の技術によって、*pZS13* ベクター（Expressys、Ruelzheim、ドイツ）のアンピシリン耐性モジュ

30

40

50

ールとカナマイシン耐性モジュールを交換することによって得る。3組のプラスミドをE. coli株MG1655に形質転換して、2-ヒドロキシイソブチリルCoAを介した4-ヒドロキシブチリルCoAからのMAA合成に必要な、タンパク質および酵素を発現させる。

【0299】

得られた遺伝子操作生物体は、当技術分野で周知の手順後、グルコース含有培地において培養する（例えば、Sambrookら、上記、2001年を参照）。E. coliの宿主株をde novoでコバラミンを合成するように操作しない限り、コバラミンをさらに培地に供給してムターゼ酵素の活性を確実にする（例えば、Rauxら、J. Bacteriol. 178巻、753～767頁（1996年）を参照）。MAA合成遺伝子の発現は、例えば、ノーザンブロット、mRNAのPCR増幅、イムノブロッティングなどを含めた、ポリペプチド発現または酵素活性を決定するための当技術分野で周知の方法を使用して裏付ける。発現される酵素の酵素活性は、個々の活性に特異的なアッセイを使用して確認する。MAAを生成する工学的に操作されたE. coli株の能力は、HPLC、ガスクロマトグラフィー質量分析法（GCMS）および／または液体クロマトグラフィー質量分析法（LCMS）を使用して確認する。

【0300】

機能的MAA合成経路を有するように操作した微生物株は、経路の有効利用のための最適化によってさらに増強する。簡単に述べると、工学的に操作された株を評価して、いずれの外因性遺伝子が律速レベルで発現されるかどうか決定する。例えば追加的遺伝子コピー数の導入によって、経路中の流れを制限し得る低レベルで発現する任意の酵素に関して発現は増大する。

【0301】

より良い生産体を作製するために、代謝モデリングを利用して増殖条件を最適化する。モデリングをさらに使用して、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計する（例えば、米国特許公開US2002/0012939、US2003/0224363、US2004/0029149、US2004/0072723、US2003/0059792、US2002/0168654およびUS2004/0009466、および米国特許第7,127,379号を参照）。モデリング解析によって、MAAのより有効な生成への代謝の移行の、細胞増殖に対する影響の信頼できる予測を与える。1つのモデリング法は、MAAのより良好な生成を一括してもたらず遺伝子ノックアウトを選択するために適用される2層最適化法OptKnock（Burgardら、Biotechnol. Bioengineer. 84巻、647～657頁（2003年））である。適応進化を使用して、例えばMAA生成物の4-ヒドロキシブチリルCoA中間体のより良い生産体を作製することもできる。適応進化を実施して増殖特性と生産特性の両方を改善する（FongおよびPalsson、Nat. Genet. 36巻、1056～1058頁（2004年）；Alperら、Science314巻、1565～1568頁（2006年））。結果に基づいて、後の数ラウンドのモデリング、遺伝子操作および適応進化をMAA生産体に施して、生産をさらに増大することができる。

【0302】

MAAの大規模な生産用に、前述の生物体を当技術分野で公知の培地を使用して発酵槽中で培養して、嫌氣的条件下での生物体の増殖を促進する。発酵は回分、流加または連続的な形で実施する。嫌氣的条件は最初に窒素で培地をスパージし、次いで培養容器を密閉することによって維持し、例えば、フラスコは隔膜および圧着キャップで密閉することができる。限られた通気で隔膜中に小さな穴を与えることによって、微好氣的条件を利用することもできる。培地のpHは、H₂SO₄などの酸を加えることによって約7のpHに保つ。増殖速度は分光光度計を使用して光学濃度を測定することによって決定し（600nm）、グルコースの取り込み速度は経時的な炭素源の枯渇をモニターすることによって決定する。望ましくないアルコール、有機酸、および残留グルコースなどの副産物は、例えば、Aminex（登録商標）シリーズのHPLCカラム（例えば、HPX-87シリ

10

20

30

40

50

ーズ) (BioRad、Hercules CA) を使用して、グルコースおよびアルコールに屈折率検出器、有機酸にUV検出器を使用して、HPLC (Shimadzu、Columbia MD) によって定量化することができる (Linら、Biotechnol. Bioeng.、775~779頁(2005年))。

【0303】

この実施例は、2-ヒドロキシイソブチリルCoAを介して4-ヒドロキシブチリルCoAからMAAを生成することができる微生物体の調製を記載する。

【0304】

(実施例XX)

2-ヒドロキシイソブチリルCoAを介した2-ヒドロキシイソ酪酸への4-ヒドロキシブチリルCoAの転換のための経路を有する2-ヒドロキシイソ酪酸生成微生物体の調製

10

この実施例は、2-ヒドロキシイソブチリルCoAを介して4-ヒドロキシブチリルCoAから2-ヒドロキシイソ酪酸を生成することができる微生物体の作製を記載する。

【0305】

Escherichia coli は、4-ヒドロキシブチリルCoAから始まる、図12中に示す2-ヒドロキシイソブチレート経路を工学的に操作するための標的生物体として使用する。*E. coli* は、2-ヒドロキシイソブチレートを生成することができる天然に存在しない微生物を作製するのに良い宿主を提供する。*E. coli* は遺伝子操作の影響を受けやすく、嫌氣的または微好氣的条件下で効率良く、エタノール、酢酸、ギ酸、乳酸、およびコハク酸のような、様々な生成物を生成することができることは公知である。

20

【0306】

2-ヒドロキシイソブチレートを生成するように操作された*E. coli* 株を作製するために、経路中で利用する酵素をコードする核酸を、周知の分子生物学の技術を使用して*E. coli* において発現させる (例えば、Sambrook、上記、2001年; Ausubel、上記、1999年を参照)。最初に、それぞれコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (CoA依存性)、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、およびホスホトランスブチリラーゼ活性をコードする *sucD* (YP_001396394)、*4hbd* (YP_001396393)、*buk1* (Q45829)、および *ptb* (NP_349676) 遺伝子を、*PAL/lacO* プロモーターの下で *pZE13* ベクター (Expressys、Ruelzheim、ドイツ) にクローニングする。Burkら (米国公開2009/0075351) 中に記載されたように、この構築体はスクシニルCoAからの4HB-CoAの生成を可能にする。それぞれ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CoAΔ-イソメラーゼ、エノイルCoAヒドラターゼ、および2-ヒドロキシイソブチリルCoAヒドロラーゼ活性をコードする *abfD* (YP_001396399.1)、*crt1* (YP_001393856)、および *hibch* (Q5XIE6.2) 遺伝子を、*PAL/lacO* プロモーターの下で *pZS23* ベクター (Expressys、Ruelzheim、ドイツ) にクローニングする。2組のプラスミドを*E. coli* 株MG1655に形質転換して、2-ヒドロキシイソブチリルCoAを介した4-ヒドロキシブチリルCoAからの2-ヒドロキシイソブチレートの合成に必要な、タンパク質および酵素を発現させる。

30

40

【0307】

得られた遺伝子操作生物体は、当技術分野で周知の手順後、グルコース含有培地において培養する (例えば、Sambrookら、上記、2001年を参照)。*E. coli* の宿主株を *de novo* でコバラミンを合成するように操作しない限り、コバラミンをさらに培地に供給してムターゼ酵素の活性を確実にする (例えば、Rauxら、J. Bacteriol. 178巻、753~767頁(1996年)を参照)。2-ヒドロキシイソ酪酸合成遺伝子の発現は、例えば、ノーザンブロット、mRNAのPCR増幅、イムノブロットティングなどを含めた、ポリペプチド発現または酵素活性を決定するための当技術

50

分野で周知の方法を使用して裏付ける。発現される酵素の酵素活性は、個々の活性に特異的なアッセイを使用して確認する。2-ヒドロキシイソブチレートを生成する工学的に操作された *E. coli* 株の能力は、HPLC、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GCMS) および／または液体クロマトグラフィー質量分析法 (LCMS) を使用して確認する。

【0308】

機能的2-ヒドロキシイソブチレート合成経路を有するように操作した微生物株は、経路の有効利用のための最適化によってさらに増強する。簡単に述べると、工学的に操作された株を評価して、いずれの外因性遺伝子が律速レベルで発現されるかどうか決定する。例えば追加的遺伝子コピー数の導入によって、経路中の流れを制限し得る低レベルで発現する任意の酵素に関して発現は増大する。

10

【0309】

より良い生産体を作製するために、代謝モデリングを利用して増殖条件を最適化する。モデリングをさらに使用して、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計する (例えば、米国特許公開US2002/0012939、US2003/0224363、US2004/0029149、US2004/0072723、US2003/0059792、US2002/0168654およびUS2004/0009466、および米国特許第7,127,379号を参照)。モデリング解析によって、2-ヒドロキシイソブチレートのより有効な生成への代謝の移行の、細胞増殖に対する影響の信頼できる予測を与える。1つのモデリング法は、2-ヒドロキシイソブチレートのより良好な生成を一括してもたらず遺伝子ノックアウトを選択するために適用される2層最適化法 OptKnock (Burgardら、Biotechnol. Bioengineer.、84巻、647~657頁(2003年))である。適応進化を使用して、例えば2-ヒドロキシイソ酪酸生成物の4-ヒドロキシブチリルCoA中間体のより良い生産体を作製することもできる。適応進化を実施して増殖特性と生産特性の両方を改善する (FongおよびPalsson、Nat. Genet.、36巻、1056~1058頁(2004年)；Alperら、Science、314巻、1565~1568頁(2006年))。結果に基づいて、後の数ラウンドのモデリング、遺伝子操作および適応進化を2-ヒドロキシイソブチレート生産体に施して、生産をさらに増大することができる。

20

【0310】

2-ヒドロキシイソブチレートの大規模な生産用に、前述の生物体を当技術分野で公知の培地を使用して発酵槽中で培養して、嫌気的条件下での生物体の増殖を促進する。発酵は回分、流加または連続的な形で実施する。嫌気的条件は最初に窒素で培地をスパージし、次いで培養容器を密閉することによって維持し、例えば、フラスコは隔膜および圧着キャップで密閉することができる。限られた通気で隔膜中に小さな穴を与えることによって、微好気的条件を利用することもできる。培地のpHは、H₂SO₄などの酸を加えることによって約7のpHに保つ。増殖速度は分光光度計を使用して光学濃度を測定することによって決定し(600nm)、グルコースの取り込み速度は経時的な炭素源の枯渇をモニターすることによって決定する。望ましくないアルコール、有機酸、および残留グルコースなどの副産物は、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、グルコースおよびアルコールに屈折率検出器、有機酸にUV検出器を使用して、HPLC (Shimadzu、Columbia MD) によって定量化することができる (Linら、Biotechnol. Bioeng. 775~779頁(2005年))。

30

40

【0311】

この実施例は、2-ヒドロキシイソブチリルCoAを介して4-ヒドロキシブチリルCoAから2-ヒドロキシイソブチレートを生成することができる微生物体の調製を記載する。

【0312】

(実施例XXI)

50

メタクリル酸または 3-ヒドロキシイソ酪酸の生産増大用の遺伝子ノックアウト株の設計

この実施例は、メタクリル酸または 3-ヒドロキシイソ酪酸の生産増大用の遺伝子ノックアウトした株の設計を記載する。

【0313】

Opt Knock は、遺伝的に安定した過剰生成微生物を開発する全体的な目的で考案された、2 層の計算フレームワークである。具体的には、このフレームワークは微生物の完全なネットワークを調べて、望ましい生化学的物質を細胞増殖の絶対副産物の状態にする遺伝的操作を提唱する。戦略的に配置した遺伝子欠失によって生化学的生成と細胞増殖を連結することによって、バイオリアクター中での長期間後に工学的操作株に課した増殖選択圧は、強制的な増殖連結型の生化学的物質の生成の結果として性能の改善をもたらす。最後に、設計した株がそれらの野生型状態に復帰する、ごくわずかな可能性がある。Opt Knock によって選択した遺伝子は、挿入ではなく完全な欠失を使用した適切な遺伝的操作によって、ゲノムから完全に除去しなければならないからである。

【0314】

増殖連結型の生化学的物質の生成の概念は、コンピュータモデルを用いて計算された典型的な代謝ネットワークの生化学的生成エンベロープとの関連で視覚化することができる。これらの限界は、制限している（1 つまたは複数の）基質の（1 つまたは複数の）取り込み速度をその実験的に測定された（1 つまたは複数の）値に固定し、それぞれの増殖到達可能なレベルで生化学的生成の最大および最低速度を計算することによって得られる。例外は存在するが、典型的には望ましい生化学的物質の生成は、細胞内資源のバイオマス形成と直接競合する（図 16 参照）。したがって、生化学的生成の速度が高まると、必ず増殖速度が最大以下となる。野生型株から代謝挙動を変化させる許容可能な解の境界を制限するように、Opt Knock によって示唆されるノックアウトが設計される。所与の株についての現実の解の境界は、（1 つまたは複数の）基質の取り込み速度が増大または低下するにつれて増大または収縮し得るが、それぞれの実験点はその計算した解の境界内に存在するはずである。これらのようなプロットによって、株が性能限界にどの程度近いか、または言い換えると、改善にどれくらいの余地が利用可能であるかの視覚化が可能である。Opt Knock のフレームワークは、生化学的過剰生成に有望な遺伝子欠失戦略の確認を既に可能にしており（Burgard ら、Biotechnol. Bioeng.、84 巻、6 号、647～657 頁（2003 年）；Pharkya ら、Biotechnol. Bioeng.、84 巻、7 号、887～899 頁（2003 年）；Pharkya ら、Genome Res.、14 巻、11 号、2367～2376 頁（2004 年））、代謝および制御モデルフレームワークの将来的改善を当然ながら含むシステムフレームワークを確立する。

【0315】

実施例 XXII および XXIII 中でより詳細に記載するのは、MAA または 3-ヒドロキシイソ酪酸生合成経路の添加によって増殖連結型 MAA または 3-ヒドロキシイソ酪酸生成を実施する宿主生物体を作製するために存在しないか、減弱しているか、または消失しているべきである酵素活性のセットである。全ての考えられる戦略を列挙するために、各反復時に整数カットと呼ばれる追加の制約の組込みによる Opt Knock 問題の反復的解決を伴う、整数カットと呼ばれる最適化技術が実施されている。

【0316】

Opt Knock アルゴリズムは、Escherichia coli の代謝の化学量論モデルに基づいて、MAA、または望む場合は前駆体 3-ヒドロキシイソブチレート（3-HIB）の過剰生成用の増殖連結型株設計を確認した。想定は（i）10 mmol/g dw/時間のグルコース取り込み速度、（ii）嫌氣的または微好氣的条件、および（iii）4 mmol/g DCW/時間の最小非増殖連結型維持要件を含む。増殖基質はグルコースであったと想定したが、これらの戦略はグルコース、スクロース、キシロース、アラビノース、またはグリセロールを含めた任意の基質に適用可能であることが理解され

よう。スクシニルC o A : M A A経路 (図2) および4-H B - C o A : M A A経路 (図6) に関する増殖連結型生成設計の完全なセットは、それぞれ表10および11中に列挙する。表10および11は、スクシニルC o A (表10) または4-ヒドロキシブチリルC o A (表11) 中間体を介したM A Aまたは3-ヒドロキシイソ酪酸の生成を高めるために、O p t K n o c kによる除去の標的となる反応の組合せを示す。最大または全ての反応を含めた、反応の少なくとも1つ、または任意の組合せの減弱を利用して、望ましい効果を得ることができる。酵素名、それらの略称、および対応する反応化学量論は表12中に列挙する。最後に、反応式中の略称に対応する代謝産物の名称は表13中に列挙する。

【0317】

これらの設計はE. c o l i代謝の代謝モデルを使用して確認し、表12中に列挙する遺伝子名はE. c o l iに特異的であるが、代謝工学的戦略およびさらに設計自体の選択法は、任意のM A Aまたは3-ヒドロキシイソブチレート生成生物体に適用可能である。したがって、これらの設計は本質的に、増殖連結型生成を可能にするために、その活性が消失しているか、減弱しているか、または最初から微生物に存在しないかのいずれかでなければならない酵素的変換のリストである。

【0318】

設計の最終選択を優先するための重要な基準は、3-ヒドロキシイソブチレートおよび/またはメタクリル酸の増殖連結型収率であった。これを調べるために、前に記載したように異なる速度のバイオマス形成での生成物収率を最初に最大化し後に最小化することによって、それぞれの戦略用に生成コーンを構築した。一地点での突然変異体ネットワークの考えられる全ての表現型の右端境界への収束は、最大バイオマス形成速度で独自の最適生成物収率が存在することを示す。他の場合、考えられる表現型の右端境界は垂直線であり、最大バイオマスの地点において、ネットワークは計算範囲で、垂直線の最低地点における最小量を含めた任意の量のM A Aを生成することができることを示す。このような設計は優先順位が低かった。それぞれの経路に関する最優先のO p t K n o c k設計の簡単なリストは、それぞれ実施例X X I IおよびX X I I I中の表6および8中に示す。

【0319】

以下の実施例中の株設計は、バイオマス形成と連結してM A Aを生成するそれらの能力によって特徴付けるが、これらの株をさらに利用して、M A A経路中間体3-ヒドロキシイソブチレートを過剰生成することができることが理解される。両方の経路中、M A Aを形成するための最終酵素ステップは、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼによる3-ヒドロキシイソブチレートの脱水を伴う (図2中のステップ5、図6中のステップ3)。この反応は還元当量、プロトン、またはエネルギーを消費または生成しないので、それが株設計のエネルギー特性を変えることはない。したがって、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼ活性を欠く株では、本明細書に記載する全ての設計は3-H I Bの増殖連結型生成を可能にする。

【0320】

この実施例は、M A Aおよび/または3-H I Bの増殖連結型生成用の株を作製するための遺伝子ノックアウトの設計を記載する。

【0321】

(実施例X X I I)

スクシニルC o Aのノックアウト設計：M A A経路

この実施例は、M A A経路のためのスクシニルC o Aのノックアウト設計を記載する。前に論じたように、同様のノックアウト設計を、スクシニルC o Aから3-ヒドロキシイソブチレートの経路にも使用することができることが理解される。

【0322】

表6は、実施例X X I中に記載したのと同様に設計した、スクシニルC o AからM A Aの経路に関する増殖連結型設計を示す。表7は、表6中に示す増殖連結型設計のM A Aの最大理論収率およびバイオマス形成率を示す。

【 0 3 2 3 】

【表 6 - 1】

表 6. メタクリル酸および／または 3-ヒドロキシイソブチレートの増殖連結型生成を可能にするために、その活性が消失しているか、減弱しているか、または最初から微生物に存在しないかのいずれかであるべきである酵素的変換のセット。

設計	酵素活性	略称	注釈
1	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
2	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計1 + ASPT
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	L-アスパルターゼ	ASPT	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
3	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計2 + PFLi
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	L-アスパルターゼ	ASPT	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	ピルビン酸ギ酸リアーゼ	PFLi	
4	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計3 + THD2および／またはGLUDy
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	L-アスパルターゼ	ASPT	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	ピルビン酸ギ酸リアーゼ	PFLi	
	NAD (P) トランスヒドロゲナーゼおよび／またはグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (NADP)	THD2 および／またはGLUDy	
5	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計2 + ATPS4r
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	L-アスパルターゼ	ASPT	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	ATPシンターゼ	ATPS4r	
6	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計5 + GLCpts
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	L-アスパルターゼ	ASPT	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	ATPシンターゼ	ATPS4r	
	PEP:PyPTSを介したD-グルコース輸送	GLCpts	
7	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計1 + GLUDy
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (NADP)	GLUDy	

【 0 3 2 4 】

【表 6 - 2】

設計	酵素活性	略称	注釈
8	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計7 + PFLi
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (NADP)	GLUDy	
	ピルビン酸ギ酸リアーゼ	PFLi	
9	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計8 + ACKrおよび／またはPTAr
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	ピルビン酸ギ酸リアーゼ	PFLi	
	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (NADP)	GLUDy	
	ホスホトランスアセチラーゼおよび／または酢酸キナーゼ	ACKrおよび／またはPTAr	
10	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計1 + THD2
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	NAD (P) トランスヒドロゲナーゼ	THD2	
11	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計10 + PGL および／または G6PDHy
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	NAD (P) トランスヒドロゲナーゼ	THD2	
	6-ホスホグルコノラクトナーゼおよび／またはグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ	PGLおよび／または G6PDHy	
12	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計11 + PFLi
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	NAD (P) トランスヒドロゲナーゼ	THD2	
	6-ホスホグルコノラクトナーゼおよび／またはグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ	PGLおよび／または G6PDHy	
	ピルビン酸ギ酸リアーゼ	PFLi	
13	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計1 + NADH6
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	NADHデヒドロゲナーゼ	NADH6	
14	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計13 + ACKr/PTAr
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	NADHデヒドロゲナーゼ	NADH6	

【 0 3 2 5 】

【表 6 - 3】

設計	酵素活性	略称	注釈
	ホスホトランスアセチラーゼおよび／または酢酸キナーゼ	ACKr および お／または PTAr	

MAA 経路のためのスクシニル CoA に関する全ての最優先の増殖連結型設計（表 6 および図 17）は設計 1 を構築し、これは発酵副産物の形成を妨げるために、アセチルアルデヒド-CoA デヒドロゲナーゼ（ADHER）、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（MDH）、および乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH__D）活性の不在を必要とする。設計 2 は、L-アスパルターゼ（ASPT）の官能性をさらに除去した、このベース設計を構築する。この設計は、最大バイオマス収率で 54 % の理論最大 MAA 収率（0.35 g / g）に到達することができる（表 7）。

【0326】

【表 7】

表 7. 表 6 中の増殖連結型設計の最大理論 MAA 収率およびバイオマス形成率。野生型バックグラウンドでの MAA の最大理論収率は 0.64 g / g（利用するグルコース 1 グラム当たりで生成される MAA のグラム数）である。

設計	MAA (g/g)	理論収率 %	バイオマス (1 / 時間)
2	0.35	54%	0.148
3	0.60	94%	0.076
4	0.60	95%	0.07
5	0.42	66%	0.123
6	0.54	84%	0.07
7	0.21	32%	0.162
8	0.35	55%	0.123
9	0.60	95%	0.07
10	0.29	46%	0.202
11	0.37	59%	0.158
12	0.52	82%	0.131
13	0.27	42%	0.195
14	0.56	88%	0.118

設計 3 および 4 はベース設計としての設計 2 を構築する。設計 3 は、副産物としてのギ酸の分泌を妨げるために、ピルビン酸ギ酸リアーゼ（PFLi）活性の除去を伴う。この設計は、94 % の理論最大 MAA 収率をもたらす。設計 4 中の NAD（P）トランスヒドロゲナーゼ（THD2）および／またはグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GLUDy）のさらなる欠失は、95 % の理論最大収率を得ながら細胞増殖と MAA 生成を強く連結するのに役立つ。この設計は、バイオマス形成に関して少なくとも 0.24 g / MAA 1 g の形成をさらに必要とする。

【0327】

設計 5 および 6 もベース設計としての設計 2 を構築する。設計 5 中、ATPシンターゼ（ATPS4r）の除去は、0.123 l / 時間の最大バイオマス形成率で 0.42 g / MAA 1 g の収率をもたらす。この設計は増殖と生成物形成を強く連結するが、発酵副産物としての酢酸およびギ酸の分泌を必要とする。ホスホエノールピルビン酸：ピルビン酸 PTS 系を介したグルコース輸送の除去は副産物の形成を減らし、0.54 g / g（84 % の最大理論収率）まで MAA 生成を増大する。

【0328】

設計 7 ~ 14 は設計 1 を構築し、その中では ADHER、MDH および LDH__D 官能性を除去する。設計 7 中、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GLUDy）官能性の除去は、0.162 l / 時間で 0.21 g / MAA 1 g を生成する突然変異体をもたらす。設計

8中のピルビン酸ギ酸リアーゼ (PFLi) のさらなる欠失は0.35 g/M A A 1 gをもたらす。設計9中のホスホトランスアセチラーゼ (PTAr) および/または酢酸キナーゼ (ACKr) のさらなる欠失は酢酸の形成を妨げ、0.60 g/g、95%の理論最大値まで生成物収率を増大する。トランスヒドロゲナーゼ (THD2) 官能性のさらなる除去はこの設計の増殖-カップリングを改善する。

【0329】

設計10は、MDH、LDH、およびADHERに加えてNAD(P)トランスヒドロゲナーゼ (THD2) をノックアウトする。この株は0.20 l/時間の最大増殖速度で0.29 g/gのM A A収率を得ると予想する。6-ホスホグルコノラクトナーゼ (PGL) および/またはグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDHy) のさらなる欠失は解糖を介した流れを増大するのに役立ち、したがってバイオマス形成と強く連結しながら0.37 g/gまで予想M A A収率を改善する。ピルビン酸ギ酸リアーゼ (PFLi) のさらなる欠失はPDHを介した流れを促進し、副産物の形成を減らし、0.52 g/g、82%の理論最大値まで予想M A A収率を増大する。ACKrおよびASPTのさらなる欠失も、副産物の形成を減らすことによって、この設計の生成物収率を改善する。

10

【0330】

設計13は、NADHデヒドロゲナーゼ (NADH6) をさらにノックアウトして設計1を構築する。これは、最大バイオマス形成率で0.27 g/gのM A A収率を有する株をもたらす。設計14中のホスホトランスアセチラーゼ (PTAr) および/または酢酸キナーゼ (ACKr) のさらなる欠失は、0.56 g/g、88%の理論最大値まで収率を改善する。この設計は、唯一の発酵副産物としてM A Aを生成する利点を有する。

20

【0331】

全ての高収率株設計は、以下の反応：アルコールデヒドロゲナーゼ (ADHER)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH__D)、ホスホグルコノラクトナーゼ (PGL)、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDHy)、ピルビン酸ギ酸リアーゼ (PFLi)、NAD(P)トランスヒドロゲナーゼ (THD2)、ATPシンテターゼ (ATPS4r)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GLUDy)、アスパルターゼ (ASPT)、酢酸キナーゼ (ACKr)、ホスホトランスアセチラーゼ (PTAr) およびNADHデヒドロゲナーゼ (NADH6) の少なくとも1つの欠失を含む。表6中の株設計にこれらのノックアウトのいずれかを加えることによって、M A Aまたは3-ヒドロキシイソブチレートの収率をさらに改善し得る。

30

【0332】

これらの結果は、M A Aまたは3-H I Bの増殖連結型生成を有する株を作製するためのノックアウト設計戦略を記載する。

【0333】

(実施例X X I I I)

4-ヒドロキシブチリルC o Aのノックアウト設計：M A A経路

この実施例は、M A A経路のための4-ヒドロキシブチリルC o Aのノックアウト設計を記載する。前に論じたように、同様のノックアウト設計を、4-ヒドロキシブチリルC o Aから3-ヒドロキシイソブチレートの経路にも使用することができることが理解される。

40

【0334】

4-ヒドロキシブチリルC o Aの経路に関して、3-ヒドロキシイソブチレートまたはM A Aを生成するためにヒドラーゼまたはトランスフェラーゼのいずれかを利用する株用のOptKnock設計を作製した(図6、ステップ2)。2つの条件に関して作製した設計は類似していたが、生成物収率および増殖-カップリングはトランスフェラーゼを利用したとき有意に高かった。全ての設計は表11中に挙げる。表8は、実施例X X I中に記載したのと同様に設計した、4-ヒドロキシブチリルC o AからM A Aの経路に関する増殖連結型設計を示す。表9は、表8中に示す増殖連結型設計のM A Aの最大理論収率およびバイオマス形成率を示す。

50

【 0 3 3 5 】

【 表 8 - 1 】

表 8. メタクリル酸および／または 3-ヒドロキシイソ酪酸の増殖連結型生成を可能にするために、その活性が消失しているか、減弱しているか、または最初から微生物に存在しないかのいずれかであるべきである酵素的変換のセット。

設計	酵素活性	略称	注釈
1	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
2	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計1 + ASPT
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	L-アスパルターゼ	ASPT	
3	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計2 + THD2/GLUDy
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	L-アスパルターゼ	ASPT	
	NAD (P) トランスヒドロゲナーゼおよび／またはグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (NADP)	THD2 および／またはGLUDy	
4	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計3 + PFLi
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	L-アスパルターゼ	ASPT	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	NAD (P) トランスヒドロゲナーゼおよび／またはグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (NADP)	THD2 および／またはGLUDy	
	ピルビン酸ギ酸リアーゼ	PFLi	
5	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計2 + ATPS4r
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	L-アスパルターゼ	ASPT	
	ATPシンターゼ	ATPS4r	
6	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計5 + PGLおよび／またはG6PDHy
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	L-アスパルターゼ	ASPT	
	ATPシンターゼ	ATPS4r	
7	6-ホスホグルコノラクトナーゼおよび／またはグルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ	PGLおよび／またはG6PDHy	設計5 + PFLi
	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	

【 0 3 3 6 】

【表 8 - 2】

	L-アスパルターゼ	ASPT	
	ATPシンターゼ	ATPS4r	
	ピルビン酸ギ酸リアーゼ	PFLi	
8	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計1 + THD2
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	NAD (P) トランスヒドロゲナーゼおよび／またはグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (NADP)	THD2および／またはGLUDy	
9	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	ADHEr	設計8 + PGLおよび／またはG6PDHy
	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	MDH	
	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	LDH_D	
	NAD (P) トランスヒドロゲナーゼおよび／またはグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (NADP)	THD2および／またはGLUDy	
	6-ホスホグルコノラクトナーゼおよび／またはグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ	PGLおよび／またはG6PDHy	

10

20

最優先の増殖連結型株設計（表 8、図 18）は、設計 1、除去、低下または減弱アルコールデヒドロゲナーゼ（ADHEr）、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（MDH）および乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH_D）官能性を有するベース株を構築する。コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ官能性のさらなる除去は、スクシニルCoAを介した流れの有効なチャネリングに利点がある可能性がある。

【0337】

【表 9】

表 9. 表 8 中の増殖連結型設計の最大理論MAA収率およびバイオマス形成率。MAA収率は、トランスフェラーゼを利用して3-ヒドロキシイソブチリルCoAを3-ヒドロキシイソブチレートに転換するという想定で計算する。3-ヒドロキシイソブチリルCoAを最初にメタクリルCoAに転換し、次いでそれをトランスフェラーゼによってMAAに転換する場合、同一の収率が予想される。さらなる想定：ATP維持エネルギー = 4 mmol / g DCW / 時間、SSALx、SSALyノックアウト。

30

設計	MAA収率(g/g)	最大理論収率%	バイオマス(1/時間)
2	0.33	52%	0.13
3	0.34	54%	0.12
4	0.62	97%	0.039
5	0.31	48%	0.073
6	0.57	90%	0.056
7	0.56	88%	0.044
8	0.29	46%	0.19
9	0.52	81%	0.112

40

設計 2～7 は、L-アスパルターゼ（ASPT）活性がさらに除去、低下または減弱した設計 1 を構築する。設計 2 は、0.131 / 時間の最大増殖速度で 0.33 g / g の MAA 収率をもたらす。この株の主な発酵副産物はアセテートおよびホルメートである。ホルメート生成およびエネルギー発生と関係がある遺伝子のさらなる欠失は、これらの副産物の形成を減らすことができる。設計 3 は NAD (P) トランスヒドロゲナーゼ（THD2）および／またはグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GLUDy）のさらなる欠失で設計 2 を構築し、0.121 / 時間の最大増殖速度で 0.34 g / g の MAA 収率をもたらす。この株は副産物の形成を消失しないが、強く増殖に連結し、エネルギー発生に利用されるグルコース 1 グラム当たり少なくとも 0.07 g の MAA を生成することが必要とされ

50

る。設計4中のピルビン酸ギ酸リアーゼ (PFLi) のさらなる欠失はギ酸の分泌をなくし、 0.62 g/g (97%の理論最大値) までMAA収率を増大させ、さらにエネルギー発生のために少なくとも 0.24 g/g のMAAの生成を必要とする。

【0338】

設計5はATPシンテターゼ (ATPS4r) がさらに欠失した設計4を構築する。この株は 0.0731 /時間の最大増殖速度で 0.31 g/g のMAAを得る。設計6中の6-ホスホグルコノラクトナーゼ (PGL) および/またはグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDHy) 官能性のさらなる欠失によって、最大バイオマスで生成物収率が増大する (0.0561 /時間の最大増殖速度で 0.57 g/g)。あるいは、ピルビン酸ギ酸リアーゼの欠失も強い増殖連結型の高収率設計をもたらす (設計7)。

10

【0339】

設計8はNAD(P) トランスヒドロゲナーゼの官能性が除去された設計1ベース株 (ADHEr、LDH__D、MDH) を構築する。この株設計はバイオマス 0.191 /時間で 0.29 g/g のMAAを得る。設計9中のホスホグルコノラクトナーゼ (PGL) および/またはグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDHy) のさらなる欠失によって、最大バイオマス 0.1121 /時間で 0.52 g/g までMAA生成が増大する。

【0340】

全ての高収率株設計は、以下の反応：アルコールデヒドロゲナーゼ (ADHEr)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH__D)、ホスホグルコノラクトナーゼ (PGL)、グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDHy)、ピルビン酸ギ酸リアーゼ (PFLi)、NAD(P) トランスヒドロゲナーゼ (THD2)、ATPシンテターゼ (ATPS4r)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GLUDy)、およびアスパルターゼ (ASPT) の少なくとも1つの欠失を含む。表8中の株設計にこれらのノックアウトのいずれかを加えることによって、MAAまたは3-ヒドロキシイソブチレートの収率をさらに改善し得る。

20

【0341】

これらの結果は、MAAまたは3-HIBの増殖連結型生成を有する株を作製するためのノックアウト設計戦略を記載する。

【0342】

30

(実施例XXIV)

工学的操作株の特徴付け

この実施例は、工学的操作株の特徴付けを記載する。

【0343】

株の構築：3-ヒドロキシイソブチレートおよび/またはMAA経路を有する *Escherichia coli* K-12 MG1655 を、欠失を導入する株として使用する。Datsenko and Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 巻、12 号、6640~6645 頁、2000 年) の λ Red リコンビナーゼシステムによって相同組換えを使用して、インフレーション欠失を取り込ませることによって株を構築する。この手法は、染色体配列、すなわち除去標的の遺伝子と、それ自体は後に除去される選択可能な抗生物体質耐性遺伝子の交換を含む。ノックアウトはレシピエント株に1つずつ組み込む。抗生物体質耐性マーカーはそれぞれの欠失後に存在せず、それぞれの標的株中に多数の突然変異の蓄積を可能にする。欠失技術は除去標的の遺伝子を完全に除去し、したがって構築した突然変異体が野生型に戻る可能性を実質的に低減する。

40

【0344】

振とうフラスコの特徴付け：中間体株を構築し、振とうフラスコ発酵を実施することによって株の性能を定量化する。嫌気的条件は、フラスコをゴム隔膜で密閉し、次いで窒素で培地をスパージすることによって得る。厳密な嫌気的条件下で増殖が観察されない株用に、フラスコをホイルで覆い限られた通気で小さな穴を与えることによって、微好気的条

50

件を適用する。個々の適用例に関して他に望まない限り、グルコースを補充したM9最小培地を使用して実験を実施した。前培養物を一晚増殖し、指数関数的増殖中の測定値を得るための新たなバッチ培養用の接種材料として使用する。増殖速度は分光光度計を使用して光学濃度を測定することによって決定し（600nm）、グルコースの取り込み速度は経時的な炭素源の枯渇をモニターすることによって決定する。エタノール、MAA、3-ヒドロキシイソ酪酸および有機酸を、通常の手順を使用してGC-MSまたはHPLCによって分析する。それぞれの株に関して三連の培養物を増殖する。

【0345】

回分発酵槽試験：選択した株の性能は、嫌氣的な、pH調節した回分発酵において試験する。これによって、増殖、グルコースの取り込み、および全生成物の形成速度の信頼できる定量化が可能であり、かつ酸性発酵生成物の蓄積が細胞増殖を制限しないことを確実にする。さらに、それは、3-ヒドロキシイソ酪酸および／またはMAAの容積測定生産性および収率、株の性能を標準化する際の最も重要なパラメーターの2つの正確な決定を可能にする。温度およびpH制御を備えた、600mLの作業体積を有する1Lのバイオリアクター中で発酵を実施する。リアクターは約0.5L/分でN₂を用いて連続的にスパージし、溶存酸素（DO）レベルが検出レベル未満に留まることを確実にする。発酵容器中で達成可能な高い細胞密度に従いグルコース濃度が増大したこと以外、培養培地は前に記載したものと同一である。

【0346】

ケモスタット試験：ケモスタット実験を実施して、バッチ形式から連続形式への発酵形式の変更が、3-ヒドロキシイソ酪酸および／またはMAAの収率および容積測定生産性にどのように影響を与えるかの直接的指標を得る。回分形式を使用する前に記載したバイオリアクターは、培地の連続供給によってケモスタット形式で作用させ、使用済み培養物は除去する。流入速度を設定して、バッチ中の各株に関して観察した最大増殖速度の80%の一定希釈率を維持し、流出は維持レベルに調節する。グルコースは培地中の限られた栄養素であり、容器中で望ましい光学濃度を得るように設定する。

【0347】

適応進化：ロックアウト株は、それらの代謝ネットワークがそれらの失われた機能に適應するまで、準最適増殖速度を最初に示すと予想される。この適応を容易にするため、これらの株を適応進化させる。これらの株に適応進化を施すことによって、細胞増殖速度は一次選択圧状態になり、突然変異細胞はそれらの代謝の流れに強制的に再分配されてそれらの増殖速度は高まる。この代謝の再プログラミングは、様々な基質で適応進化させてコンピュータモデルによって推測的に予想した増殖率に到達させた、いくつかのE. coli突然変異体に関して近年実証されている（FongおよびPalsson、Nat. Genet.、36巻、10号、1056～1058頁（2004年））。OptKnock作製株は、他者より優れた品質を有する一株をおそらくもたらし得るE. coliにおいて以前に確認された進化パターンの違いによって（FongおよびPalsson、Nat. Genet.、36巻、10号、1056～1058頁（2004年）；Fongら、J. Bacteriol. 185巻、21号、6400～6408頁（2003年）；Ibarraら、Nature、420巻、6912号、186～189頁（2002年））、三連で適応進化させる（平行して実施する）。得られる増殖改善の速度に応じて、進化は2～6週間の間実施する。一般に、安定した表現型を得た後に進化を停止させる。OptKnock手法の根底にある増殖連結型の生化学的生産概念は、遺伝的に安定した過剰生産体の生成をもたらす。

【0348】

上記および前の実施例中に記載したように、メタクリル酸（MAA）および3-ヒドロキシイソブチレート（3-HIB）生成と細胞増殖を連結するための株の工学的操作戦略は、OptKnock法を使用して計算した。2つの経路を調べた。第1の経路は中間体としてメチルマロニルCoAを介して進行する。第2の経路は4-ヒドロキシブチリルCoAを介して進行し、CoAトランスフェラーゼ、ヒドローゼまたはシンテターゼのい

10

20

30

40

50

ずれかを利用して、3-ヒドロキシイソブチリルCoAを3-HIBに転換することができる。あるいは、3-ヒドロキシイソブチリルCoAを最初にメタクリリルCoAに転換する場合、この経路によってMAAを直接生成することができる。経路の選択、宿主のバックグラウンド、およびそれぞれ個々のステップ用の酵素の選択は、最終生成株の生成物収率および増殖特性に影響を与える。

【0349】

3-ヒドロキシイソ酪酸が前駆体として生成されると想定して、両経路の最終ステップは、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼによるMAAへの3-HIBの脱水を伴う。この転換はエネルギーまたは酸化還元当量を必要としないので、MAAに関して記載する株設計戦略は、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼ活性が生成生物体中に存在しない場合、3-HIB生成の増殖連結型生成に適用することもできることが理解される。この場合、天然に存在しない生物体はMAAの代わりに3-HIBを生成し得る。最大理論生成物およびエネルギー収率は、MAAまたは3-HIBが生成するかどうかとは無関係に不変である。

【0350】

全ての最優先の株設計は3つの主要な欠失：MDH、LDH__DおよびADHERに基づいて構築する。この分析は、宿主株設計戦略は顕著に類似しており、宿主生物体中の少数の酵素活性の欠失を含むことを明らかにした。MAA（または3-HIB）の生成に影響を与える主な酵素活性は、アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ（ADHER）、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（MDH）、乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH__D）、ホスホグルコノラクトナーゼ（PGL）、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PDHY）、ピルビン酸ギ酸リアーゼ（PFLi）、NAD（P）トランスヒドロゲナーゼ（THD2）、ATPシンテターゼ（ATPS4r）、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GLUDY）、アスパルターゼ（ASPT）、酢酸キナーゼ（ACKr）、ホスホトランスアセチラーゼ（PTAr）およびNADHデヒドロゲナーゼ（NADH6）である。表6および8中の株設計にこれらのノックアウトのいずれか、または本明細書で開示する天然に存在しない微生物体のいずれかを加えることによって、MAAまたは3-ヒドロキシイソブチレートの収率をさらに改善し得る。

【0351】

（実施例XXV）

スクシニルCoAまたは4-ヒドロキシブチリルCoA前駆体経路を介してMAAおよび／または3-ヒドロキシイソブチレートの増大した理論収率をもたらす主要代謝酵素

この実施例は、前駆体としてスクシニルCoAまたは4-ヒドロキシブチリルCoAを利用してMAAおよび／または3-ヒドロキシイソブチレート経路で工学的に操作された生物体の理論収率を増大するために調節することができる主要代謝反応の酵素を記載する。

【0352】

この実施例中、本発明者らは、スクシニルCoAからMAAの経路または4-ヒドロキシブチリルCoAからMAAの経路により工学的に操作された微生物において高収率のMAAを与える、いくつかの主要代謝反応の重要性を実証する。MAAによってまたはMAA以外で工学的に操作された微生物によって3-ヒドロキシイソ酪酸が生成する場合、この実施例中に記載する分析は同様に当てはまる。具体的には、主要代謝中のそれぞれの反応が個別に除去されると想定して、MAA生成経路の片方または両方を補ったE. coliの代謝ネットワークに関するグルコースからのMAA、または3-ヒドロキシイソ酪酸の収率を最大にした一連の線形計画法（LP）の問題を解決した。前に論じたように、いずれかの経路を介したグルコースからの最大MAA収率は1.33mol/molである。主要代謝は、解糖、ペントースリン酸経路、トリカルボン酸回路、グリオキシレートシヤント、および様々な補充反応中の全ての反応を含む。他に記さない限り、PEPカルボキシキナーゼは、糖新生、ホスホエノールピルビン酸へのATP消費方向においてのみ作用することができたと想定した。例示的な微生物としてE. coliを選択したが、本明

細書に示す分析はほぼ任意の原核または真核生物体に適用可能である。さらに、本明細書に記載する結論は例示的な炭水化物フィードストックとは無関係に有効であり、この実施例中で任意に選択するのはグルコースである。

【0353】

外部電子アクセプター（例えば、酸素、硝酸塩）の存在下でその欠失が最大MAA収率に悪影響を与える反応を、3つのネットワーク想定：1）非欠失型野生型ネットワーク（すなわち、全ての反応が存在する）；2）リンゴ酸デヒドロゲナーゼを差し引いた野生型ネットワーク（すなわち、いくつかのOptKnock設計において減弱を標的とする1つの反応）；および3）リンゴ酸デヒドロゲナーゼとピルビン酸ギ酸リアーゼの両方を差し引いたネットワーク（すなわち、いくつかのOptKnock設計において減弱を標的とする2つの反応）で表14中に示す。外部電子アクセプターが存在しないと想定した同様の結果は表15中に示す。この分析は、以下でより詳細に論じる3つの重要な観察結果をもたらした。

【0354】

【表14】

表14．様々な主要代謝反応はそれぞれ個別に不活性化されると想定して、グルコースにおける最大理論MAAモル収率を示す。この分析は、酸素などの外部電子アクセプターが存在すること、およびオキサロ酢酸を生成するためにPEPカルボキシキナーゼを使用しないことを想定する。3つの例を調べる：1）WT—全てのE. coliの主要代謝反応を含む野生型ネットワーク；2）ΔMDH—リンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性を差し引いた野生型ネットワーク；3）ΔMDH、ΔPFL—リンゴ酸デヒドロゲナーゼおよびピルビン酸ギ酸リアーゼ活性を差し引いた野生型ネットワーク。

略称	反応名	WT		ΔMDH		ΔMDH, ΔPFL	
		MAA の収率	MAA 収率 の%	MAA の収 率	MAA 収率 の%	MAA の収率	MAA 収率 の%
ACONT	アコニターゼ	1.067	80.0%	0.954	71.6%	0.954	71.6%
CS	クエン酸シンターゼ	1.067	80.0%	0.954	71.6%	0.954	71.6%
ENO	エノラーゼ	1.132	84.9%	1.097	82.3%	1.097	82.3%
FUM	フマラーゼ	1.297	97.3%	1.297	97.3%	1.297	97.3%
GAPD	グリセルアルデヒド- 3-リン酸デヒドロゲ ナーゼ	1.132	84.9%	1.097	82.3%	1.097	82.3%
ICL	イソクエン酸リアーゼ	1.333	100%	1.284	96.3%	1.284	96.3%
MALS	リンゴ酸シンターゼ	1.333	100%	1.297	97.3%	1.297	97.3%
PDH	ピルビン酸デヒドロゲ ナーゼ	1.333	100%	1.306	97.9%	1.231	92.3%
PGI	ホスホグルコイソメラ ーゼ	1.330	99.8%	1.296	97.2%	1.296	97.2%
PGK	ホスホグリセリン酸キ ナーゼ	1.132	84.9%	1.097	82.3%	1.097	82.3%
PGM	ホスホグリセリン酸ム ターゼ	1.132	84.9%	1.097	82.3%	1.097	82.3%
PPC	PEPカルボキシラーゼ	1.200	90.0%	1.163	87.2%	1.163	87.2%
TPI	トリオースリン酸イソ メラーゼ	1.288	96.6%	1.286	96.5%	1.286	96.5%

【0355】

【表 15】

表 15. 様々な主要代謝反応はそれぞれ個別に不活性化されると想定して、グルコースにおける最大理論 MAA モル収率を示す。この分析は、酸素などの外部電子アクセプターが存在しないこと、およびオキサロ酢酸を生成するために PEP カルボキシキナーゼを使用しないことを想定する。3 つの例を調べる：1) WT-全ての *E. coli* の主要代謝反応を含む野生型ネットワーク；2) Δ MDH-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性を差し引いた野生型ネットワーク；3) Δ MDH、 Δ PFL-リンゴ酸デヒドロゲナーゼおよびピルビン酸ギ酸リアーゼ活性を差し引いた野生型ネットワーク。

略称	反応名	WT		Δ MDH		Δ MDH, Δ PFL	
		MAA の収率	MAA 収率 の%	MAA の収率	MA A収 率 の%	MAA の収率	MAA 収率 の%
ACONT	アコニターゼ	1.067	80.0%	0.845	63.4 %	0.845	63.4%
CS	クエン酸シンターゼ	1.067	80.0%	0.845	63.4 %	0.845	63.4%
ENO	エノラーゼ	0.000	0.0%	0.000	0.0%	0.000	0.0%
FUM	フマラーゼ	1.091	81.8%	1.091	81.8 %	1.053	78.9%
GAPD	グリセルアルデヒド- 3-リン酸デヒドロゲ ナーゼ	0.000	0.0%	0.000	0.0%	0.000	0.0%
ICL	イソクエン酸リアーゼ	1.333	100%	1.033	77.5 %	0.990	74.3%
MALS	リンゴ酸シンターゼ	1.333	100%	1.091	81.8 %	1.053	78.9%
PDH	ピルビン酸デヒドロゲ ナーゼ	1.333	100%	1.277	95.7 %	0.770	57.8%
PGI	ホスホグルコイソメラ ーゼ	1.317	98.8%	1.014	76.1 %	0.909	68.2%
PGK	ホスホグリセリン酸キ ナーゼ	0.000	0.0%	0.000	0.0%	0.000	0.0%
PGM	ホスホグリセリン酸ム ターゼ	0.000	0.0%	0.000	0.0%	0.000	0.0%
PPC	PEPカルボキシラーゼ	0.839	62.9%	0.000	0.0%	0.000	0.0%
TPI	トリオースリン酸イソ メラーゼ	1.108	83.1%	0.988	74.1 %	0.909	68.2%

観察 1. クエン酸シンターゼおよびアコニターゼを介した十分な流れが、全ての場合 80% を超える MAA の理論収率を得るために必要とされる。好氣的条件下では非常に活性があるが、トリカルボン酸回路の酸化部分は、酸素または硝酸塩などの外部電子アクセプターの不在下では非常に活性があるわけではない。例えば *E. coli* では、クエン酸シンターゼは NADH によって阻害され、その濃度は外部電子アクセプターの不在下で高い。さらに、酸素制限条件下では、トリカルボン酸回路の酵素の発現は *arcA* 遺伝子の生成物によって抑制される (Alexeeva ら、J. Bacteriol.、185 巻、1 号、204~209 頁 (2003 年))。酸素制限条件下で *E. coli* においてクエン酸シンターゼおよびアコニターゼ活性を増大するための 1 つの例示的な方法は、レギュレーター *arcA* の欠失および/または天然クエン酸シンターゼと NADH 無反応酵素の交換を含む (Stokell ら、J. Biol. Chem.、278 巻、35435~35443 頁 (2003 年)；Jin および Sonenshein、J. Bacteriol.、178 巻、12 号、3658~3660 頁 (1996 年))。

【0356】

観察 2. グリオキシレートシャント酵素、イソクエン酸リアーゼ、およびリンゴ酸シン

ターゼは、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性が減弱するとき、M A Aの最大理論収率を得るために必要とされる。イソクエン酸リアーゼまたはリンゴ酸シンターゼ活性なしでM A Aの最大収率が約20%低下すると、グリオキシレートシャントに関する要件は酸素制限条件下で悪影響を受ける。E. coliにおいてグリオキシレートシャント活性を増大するための1つの例示的な方法は、S a n c h e zら、(Metab. Eng.、7巻、3号、229~239頁(2005年)中に記載されたような転写リプレッサー、iclRの欠失を含む。

【0357】

観察3. リンゴ酸デヒドロゲナーゼおよびピルビン酸ギ酸リアーゼ欠損バックグラウンドでは、ピルビン酸デヒドロゲナーゼは、外部電子アクセプターの存在下で93%の最大理論M A A収率、または外部電子アクセプターの不在下で58%の最大理論収率に達することが必要とされる。ピルビン酸デヒドロゲナーゼは、高いN A D H / N A D、A T P / A D P、およびアセチルC o A / C o A比によって阻害される。したがってこの酵素は、大部分はl p d AによってコードされるサブユニットE 3のN A D H感度が原因で、E. coliなどの生物体において酸素制限または嫌氣的条件下で非常に低い活性を本来示す。酸素制限条件下でE. coliにおいてピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性を得るための例示的な方法は、天然プロモーターと嫌氣的誘導型プロモーターの交換(Zhouら、Biotechnol. Lett.、30巻、2号、335~342頁(2008年))、N A D H感度を軽減するためのl p d Aへの点突然変異の導入(Kimら、J. Bacteriol.、190巻、11号、3851~3858頁(2008年)、またはリプレッサー、p d h Rの不活性化(QuailおよびGuest、Mol. Microbiol.、15巻、3号、519~529頁(1995年))を含む。正味のピルビン酸デヒドロゲナーゼ様活性は、あるいはピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼから得ることができる。そうするために、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ(PFOR)酵素を使用して、フェレドキシンタンパク質を同時に還元しながらピルビン酸をアセチルC o Aに転換する。還元フェレドキシンは、次いでN A D (P) H / フェレドキシンオキシドレダクターゼによってその電子をN A D + またはN A D P + に移す。異種および天然PFOR遺伝子は、E. coliにおいて水素生成を改善することが近年実証されている(AkhtarおよびJones、Metab. Eng. 11巻、139~147頁(2009年); Doら、Appl. Biochem. Biotechnol. 153巻、21~33頁(2009年))。

【0358】

最後に、P E PカルボキシキナーゼがA T P形成、オキサロ酢酸へのC O₂固定方向において作用できると想定して、この分析を繰り返した。E. coliなどの生物体中では、ホスホエノールピルビン酸からオキサロ酢酸への代謝の流れは、P E Pカルボキシラーゼ、A T P当量を生成しない酵素によって実施される。しかしながら、C O₂固定P E Pカルボキシキナーゼ活性は、適切な条件下で天然P E Pカルボキシキナーゼを過剰発現させること(Deokら、J. Microbiol. Biotechnol. 16巻、9号、1448~1452頁(2006年))、またはより好ましい力学的特性を有するP E Pカルボキシキナーゼ酵素をコードする外来遺伝子を発現させることによって、E. coliにおいて高めることができる。観察されるP E Pカルボキシキナーゼ活性は、減弱したP E Pカルボキシラーゼ活性を有する宿主生物体中でさらに優勢である可能性がある(Kimら、Appl. Env. Microbiol. 70巻、2号、1238~1241頁(2004年))。P E Pカルボキシキナーゼがオキサロ酢酸への有意で実質的な流れを有し得るという想定によって、イソクエン酸リアーゼおよびリンゴ酸シンターゼ活性に関する絶対条件を除外して、全ての場合においてM A Aの最大収率を得る。さらに、ピルビン酸デヒドロゲナーゼに関する要件も、野生型およびリンゴ酸デヒドロゲナーゼ陰性バックグラウンドで除外する。それにもかかわらず、M A A生成用を選択した宿主生物体へのP E Pカルボキシキナーゼ活性の工学的操作は、0.47 mol / mol から1.71 mol / mol にM A A経路の最大A T P収率を改善するその役割のため有用

10

20

30

40

50

であり得る。

【0359】

この実施例は、3-ヒドロキシイソブチレートまたはM A A生成微生物体に導入して生成物収率を増大することができる、追加的改変を記載する。

【0360】

【表 10 - 1】

表 10. スクシニル CoA:MAA 経路に関する増殖連結型生成の設計(図 2)。

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
1	FUM	1.31393
2	HEX1	0.81503
3	MDH	0.7159
4	PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	0.32284
5	MDH,THD2および/またはGLUDy	6.09185
6	FUM,PFLi	5.98191
7	HEX1,PFLi	5.24339
8	MDH,PFLi	5.21195
9	PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	4.87678
10	ADHEr,PPCK	4.25091
11	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4	4.17475
12	HEX1,THD2および/またはGLUDy	3.09819
13	FUM,HEX1	1.81756
14	MDH,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	1.36009
15	FRDおよび/またはSUCD4,PFLi	1.07808
16	PFLi,PPCK	0.94993
17	PPCK,PYK	0.57249
18	ADHEr,PFLi,PPCK	6.93528
19	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PFLi	6.8792
20	HEX1,PFLi,THD2および/またはGLUDy	6.71657
21	MDH,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	6.3322
22	MDH,PFLi,THD2および/またはGLUDy	6.21103
23	FUM,ME2,THD2および/またはGLUDy	6.09185
24	PFLi,PPCK,PYK	5.16721
25	ADHEr,PPCK,THD2および/またはGLUDy	4.91251
26	ADHEr,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PPCK	4.61324
27	ADHEr,HEX1,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	4.5815
28	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	4.57316
29	ADHEr,MDH,THD2および/またはGLUDy	4.35906
30	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,MDH	4.3526
31	ADHEr,GLCpts,PPCK	4.33751
32	ADHEr,HEX1,THD2および/またはGLUDy	4.32305
33	ADHEr,MDH,PPCK	4.3218
34	ADHEr,FUM,PPCK	4.3218
35	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,ME2	4.27691
36	ADHEr,FUM,THD2および/またはGLUDy	4.26872
37	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,THD2および/またはGLUDy	4.26122
38	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLCpts	4.23155
39	ADHEr,FUM,HEX1	4.07963
40	GLUDy,HEX1,THD2および/またはGLUDy	3.74821
41	ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	3.74546
42	HEX1,ME2,THD2および/またはGLUDy	3.17934

【 0 3 6 1 】

【表 10 - 2】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
43	MDH,PYK,THD2および/またはGLUDy	3.01298
44	MDH,PPCK,PYK	2.88966
45	FUM,PPCK,PYK	2.88966
46	PPCK,PYK,THD2および/またはGLUDy	2.28488
47	PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	1.92036
48	ACKrおよび/またはPTAr,FRDおよび/またはSUCD4,PFLi	1.19121
49	ADHEr,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.50357
50	ADHEr,MDH,PFLi,THD2および/またはGLUDy	8.26017
51	ADHEr,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi,PPCK	7.5749
52	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	7.49524
53	ADHEr,HEX1,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	7.47549
54	ADHEr,PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	7.32448
55	HEX1,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	7.30328
56	ADHEr,GLCpts,PFLi,PPCK	7.07538
57	ADHEr,HEX1,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.04634
58	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,ME2,PFLi	7.04349
59	GLUDy,HEX1,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.02387
60	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PFLi,THD2および/またはGLUDy	6.99958
61	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH	6.91371
62	PFLi,PPCK,PYK,THD2および/またはGLUDy	6.78153
63	ADHEr,FUM,HEX1,PFLi	6.65795
64	FUM,ME2,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	6.3322
65	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,ME2,THD2および/またはGLUDy	6.21914
66	FUM,ME2,PFLi,THD2および/またはGLUDy	6.21103
67	ADHEr,GLUDy,MDH,THD2および/またはGLUDy	6.18117
68	ADHEr,MDH,PPCK,THD2および/またはGLUDy	6.17362
69	ADHEr,FUM,PPCK,THD2および/またはGLUDy	6.17362
70	ME2,PFLi,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	6.01239
71	ADHEr,ASPT,MDH,PYK	5.92643
72	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PPCK	4.76879
73	ADHEr,HEX1,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PPCK	4.76303
74	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,HEX1,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	4.73051
75	ADHEr,FUM,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,THD2および/またはGLUDy	4.63551
76	ADHEr,MDH,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,THD2および/またはGLUDy	4.63551
77	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PPCK,PYK	4.53921
78	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PPCK	4.4635
79	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLCpts,MDH	4.44642
80	ADHEr,GLCpts,MDH,THD2および/またはGLUDy	4.44284
81	ADHEr,MDH,PYK,THD2および/またはGLUDy	4.42534
82	ADHEr,FUM,GLCpts,PPCK	4.41046
83	ADHEr,GLCpts,MDH,PPCK	4.41046
84	ADHEr,GLCpts,PPCK,THD2および/またはGLUDy	4.40279
85	ASPT,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,PYK	4.3931

【表 10 - 3】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
86	ADHEr,MDH,PPCK,PYK	4.39083
87	ADHEr,FUM,PPCK,PYK	4.39083
88	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLCpts,ME2	4.36844
89	ADHEr,FUM,ME2,THD2および/またはGLUDy	4.35906
90	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,FUM,ME2	4.3526
91	ADHEr,FUM,GLCpts,THD2および/またはGLUDy	4.32647
92	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLCpts,THD2および/またはGLUDy	4.31559
93	FRDおよび/またはSUCD4,FUM,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,THD5	4.08513
94	FRDおよび/またはSUCD4,MDH,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,THD5	4.08513
95	ACKrおよび/またはPTAr,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	3.89111
96	PGLおよび/またはG6PDHy,PPCK,PYK,THD2および/またはGLUDy	3.46752
97	FUM,HEX1,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,THD5	3.35722
98	HEX1,MDH,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,THD5	3.35722
99	FRDおよび/またはSUCD4,ME2,PFLi,THD2および/またはGLUDy	2.78398
100	FRDおよび/またはSUCD4,ME1x,ME2,PYK	2.6437
101	ACKrおよび/またはPTAr,PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	2.01602
102	FRDおよび/またはSUCD4,FUM,MDH,PYK	1.89207
103	ACKrおよび/またはPTAr,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,SUCOAS	1.83792
104	FUM,GLYCL,ME2,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	1.36495
105	ACKrおよび/またはPTAr,FRDおよび/またはSUCD4,GLU5K,PFLi	1.24122
106	ACKrおよび/またはPTAr,FRDおよび/またはSUCD4,G5SD,PFLi	1.24122
107	ACKrおよび/またはPTAr,GLU5K,PFLi,PPCK	1.09336
108	ACKrおよび/またはPTAr,G5SD,PFLi,PPCK	1.09336
109	ACKrおよび/またはPTAr,AKGD,PFLi,PPCK	1.04907
110	ACKrおよび/またはPTAr,ME2,PFLi,PPCK	1.04907
111	ACKrおよび/またはPTAr,LDH_D,PFLi,PPCK	1.04907
112	ACKrおよび/またはPTAr,PFLi,PGLおよび/またはG6PDHy,PPCK	1.04907
113	ACKrおよび/またはPTAr,ASPT,PFLi,PPCK	1.04907
114	ACKrおよび/またはPTAr,PFLi,PPCK	1.04907
115	ACKrおよび/またはPTAr,ACS,PFLi,PPCK	1.04907
116	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ASPT,MDH	0.91363
117	FRDおよび/またはSUCD4,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,THD2および/またはGLUDy,THD5	0.79247
118	ADHEr,AKGD,ASPT,MDH	0.7853
119	ADHEr,ASPT,MDH,P5CD	0.7853
120	ADHEr,ASPT,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy	0.7853
121	ADHEr,ASPT,MDH,PDH	0.7853
122	ADHEr,ASPT,MDH,VALTA	0.7853
123	ADHEr,ASPT,MDH,ME2	0.7853
124	ADHEr,ASPT,MDH,PPS	0.7853
125	ADHEr,ASPT,MDH,NACODA	0.7853
126	ADHEr,ASPT,MDH	0.7853
127	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi	11.64516
128	ACKr および / または PTAr,ADHEr,FRD および / または SUCD4,LDH_D,ME2	10.90737

10

20

30

40

【表 10 - 4】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
129	ADHEr,FUM,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.88038
130	ADHEr,ICL,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.88038
131	ADHEr,MALS,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.88038
132	ASPT,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,PYK,SERD_L	10.86679
133	ADHEr,GLCpts,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.79871
134	ADHEr,ASPT,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,PYK	10.7622
135	ADHEr,FRD および / または SUCD4,ME2,PGL および / または G6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.51703
136	ASPT,MDH,PGL および / または G6PDHy,PYK,THD2 および / または GLUDy	10.0408
137	ACKr および / または PTAr,ADHEr,FRD および / または SUCD4,LDH_D,MDH	9.09361
138	MDH,ME2,PGL および / または G6PDHy,PYK,THD2 および / または GLUDy	8.70446
139	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH	8.58714
140	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,THD2および/またはGLUDy	8.35695
141	FUM,MDH,PGL および / または G6PDHy,PYK,THD2 および / または GLUDy	8.28079
142	ADHEr,FUM,ME2,PFLi,THD2および/またはGLUDy	8.26017
143	HEX1,ME2,PFLi,PGL および / または G6PDHy,THD2 および / または GLUDy	7.86496
144	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,THD2および/またはGLUDy	7.77845
145	ADHEr,FUM,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.59996
146	ADHEr,MDH,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.59996
147	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.55146
148	ADHEr,HEX1,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.5299
149	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PFLi,PPCK	7.51427
150	ADHEr,GLCpts,PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	7.41336
151	ADHEr,GLUDy,PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	7.39109
152	ADHEr,ASPT,MDH,PYK,THD2および/またはGLUDy	7.30613
153	ADHEr,ASPT,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,MDH	7.2706
154	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,MDH,PFLi	7.25565
155	ADHEr,MDH,PFLi,PYK,THD2および/またはGLUDy	7.21719
156	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK	7.20783
157	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLCpts,ME2,PFLi	7.19295
158	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.17902
159	ADHEr,FUM,PFLi,PPCK,PYK	7.16927
160	ADHEr,MDH,PFLi,PPCK,PYK	7.16927
161	ADHEr,FRD および / または SUCD4,ME2,PFLi,THD2 および / または GLUDy	7.14501
162	ADHEr,GLUDy,HEX1,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.13398
163	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK	7.12989

10

20

30

40

【表 10 - 5】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
164	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK	7.12989
165	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH	7.08892
166	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,FUM,LDH_D,PFLi	7.06106
167	ADHEr,FUM,GLCpts,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.05969
168	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.03327
169	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,HEX1,LDH_D,PFLi	7.00666
170	ADHEr,NADH6	5.44845
171	ADHEr,ATPS4r	2.36532
172	ADHEr,PGI	1.80553
173	ADHEr,FUM	1.31393
174	ADHEr,HEX1	0.81503
175	ADHEr,MDH	0.7159
176	ADHEr,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	0.32284
177	ADHEr,HEX1,PGI	8.63121
178	ADHEr,NADH6,PFLi	6.77656
179	ADHEr,NADH6,PGI	6.11877
180	ADHEr,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	6.01968
181	ADHEr,FUM,PFLi	5.98191
182	ADHEr,NADH6,PPCK	5.82769
183	ADHEr,MDH,NADH6	5.64458
184	ADHEr,NADH6,THD2および/またはGLUDy	5.57367
185	ADHEr,FUM,NADH6	5.51162
186	ADHEr,HEX1,PFLi	5.24339
187	ADHEr,MDH,PFLi	5.21195
188	ADHEr,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	4.87678
189	ADHEr,ATPS4r,PPCK	4.69887
190	ADHEr,PGI,PPCK	4.67315
191	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PGI	4.63924
192	ADHEr,ATPS4r,MDH	3.93602
193	ADHEr,ATPS4r,THD2および/またはGLUDy	3.20207
194	ADHEr,ATPS4r,FUM	2.70933
195	ADHEr,PFLi,PGI	2.48299
196	ADHEr,MDH,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	1.36009
197	ADHEr,HEX1,PFLi,PGI	9.89317
198	ADHEr,HEX1,PGI,THD2および/またはGLUDy	8.685
199	ADHEr,MDH,NADH6,THD2および/またはGLUDy	8.42455
200	ADHEr,PFLi,PGI,PPCK	7.60434
201	ADHEr,NADH6,PFLi,PGI	7.53021
202	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PFLi,PGI	7.53021
203	ADHEr,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	7.49524
204	ADHEr,ATPS4r,MDH,NADH6	7.09625
205	ADHEr,MDH,NADH6,PFLi	7.03739
206	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,NADH6,PGI	7.02293
207	ADHEr,NADH6,PFLi,THD2および/またはGLUDy	6.90622
208	ADHEr,GLCpts,NADH6,PFLi	6.89924
209	ADHEr,NADH12,NADH6,PFLi	6.8792

10

20

30

40

【表 10 - 6】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
210	ADHEr,FUM,NADH6,PFLi	6.87559
211	ADHEr,ME2,NADH6,PFLi	6.83907
212	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PGI	6.83058
213	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PGI	6.62593
214	ADHEr,NADH6,PPCK,THD2および/またはGLUDy	6.57106
215	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	6.48882
216	ADHEr,NADH6,PGI,PPCK	6.4075
217	ADHEr,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PPCK	6.35839
218	ADHEr,MDH,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	6.3322
219	ADHEr,ATPS4r,FUM,NADH6	6.33033
220	ADHEr,ME2,NADH6,THD2および/またはGLUDy	6.30041
221	ADHEr,HEX1,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	6.28787
222	ADHEr,NADH6,PGI,THD2および/またはGLUDy	6.17721
223	ADHEr,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,THD2および/またはGLUDy	6.08946
224	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PPCK	5.95899
225	ADHEr,GLCpts,NADH6,PPCK	5.94641
226	ADHEr,NADH6,PPCK,PYK	5.88622
227	ADHEr,GLCpts,MDH,NADH6	5.76626
228	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,PPCK	5.74112
229	ADHEr,FUM,ME2,NADH6	5.64458
230	ADHEr,FUM,HEX1,NADH6	5.59255
231	ADHEr,ATPS4r,HEX1,NADH6	5.58729
232	ADHEr,HEX1,NADH6,THD2および/またはGLUDy	5.50758
233	ADHEr,ATPS4r,MDH,THD2および/またはGLUDy	5.42607
234	ADHEr,ATPS4r,FUM,PPCK	5.41736
235	ADHEr,ATPS4r,MDH,PPCK	5.41736
236	ADHEr,ATPS4r,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy	5.3991
237	ADHEr,ATPS4r,PGI,PPCK	5.39847
238	ADHEr,ATPS4r,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PPCK	5.2252
239	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1	5.09544
240	ADHEr,ATPS4r,PGLおよび/またはG6PDHy,PPCK	5.02209
241	ADHEr,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi,PGI	5.01176
242	ADHEr,ATPS4r,PFLi,PGI	5.00885
243	ADHEr,ATPS4r,ME2,THD2および/またはGLUDy	4.89177
244	ADHEr,ATPS4r,FUM,THD2および/またはGLUDy	4.82795
245	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PGI,PPCK	4.80562
246	ADHEr,FUM,PGI,THD2および/またはGLUDy	4.69172
247	ADHEr,MDH,PGI,THD2および/またはGLUDy	4.69172
248	ADHEr,ATPS4r,FUM,ME2	3.93602
249	ADHEr,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	3.74546
250	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ATPS4r,SUCOAS	3.23462
251	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,GLU5K	2.42406
252	ADHEr,ASNS2,ATPS4r,G5SD	2.42406
253	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6	11.12044
254	ADHEr,ATPS4r,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.65458

【 0 3 6 6 】

【表 10 - 7】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
255	ADHEr,HEX1,PFLi,PGI,THD2および/またはGLUDy	9.97214
256	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy	9.83354
257	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PFLi	9.61783
258	ADHEr,ME2,NADH6,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	8.74922
259	ADHEr,GLCpts,MDH,NADH6,THD2および/またはGLUDy	8.51047
260	ADHEr,FUM,ME2,NADH6,THD2および/またはGLUDy	8.42455
261	ADHEr,ATPS4r,MDH,NADH6,PGLおよび/またはG6PDHy	8.35879
262	ADHEr,ATPS4r,MDH,PDH,PGLおよび/またはG6PDHy	8.19203
263	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,NADH6	8.11809
264	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH	8.05129
265	ADHEr,ASPT,ATPS4r,MDH,PYK	7.89307
266	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,MDH	7.76592
267	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi	7.66468
268	ADHEr,FUM,PFLi,PGI,THD2および/またはGLUDy	7.62739
269	ADHEr,MDH,PFLi,PGI,THD2および/またはGLUDy	7.62739
270	ADHEr,NADH6,PFLi,PGI,THD2および/またはGLUDy	7.58195
271	ADHEr,FRD および / または SUCD4,PFLi,PGI,THD2 および / または GLUDy	7.58195
272	ADHEr,NADH6,PFK および / または FBA および / または TPI,PFLi,THD2 および / または GLUDy	7.55146
273	ADHEr,ATPS4r,ME2,PGL および / または G6PDHy,THD2 および / または GLUDy	7.45944
274	ACKr および / または PTAr,ADHEr,ATPS4r,NADH6,PGI	7.37787
275	ADHEr,NADH6,PFLi,PPCK,PYK	7.33669
276	ADHEr,HEX1,ME2,PGL および / または G6PDHy,THD2 および / または GLUDy	7.30328
277	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK	7.29288
278	ADHEr,ME2,NADH6,PFLi,THD2 および / または GLUDy	7.26202
279	ADHEr,GLCpts,MDH,NADH6,PFLi	7.1878
280	ADHEr,ATPS4r,ME2,NADH6,PFLi	7.18544
281	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6	7.1375
282	ADHEr,ATPS4r,FUM,ME2,NADH6	7.09625
283	ADHEr,ME2,NADH12,NADH6,PFLi	7.04349
284	ADHEr,FUM,ME2,NADH6,PFLi	7.03739
285	ADHEr,GLCpts,NADH6,PFLi,THD2 および / または GLUDy	7.02149
286	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PPCK	7.00602
287	ADHEr,ASPT,MDH,PFLi,PGL および / または G6PDHy,PYK	12.62367
288	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,NADH6,PGL および / または G6PDHy	12.58702
289	ACKr および / または PTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 および / または GLUDy	12.17542
290	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi	12.14168
291	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,THD2 および / または GLUDy	11.92294
292	ADHEr,ASPT,MDH,NADH6,PGL および / または G6PDHy,PYK	11.86695
293	ACKr および / または PTAr,ADHEr,FRD および / または SUCD4,LDH_D,MDH,THD2 および / または GLUDy	11.81945
294	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi,PYK	11.70177
295	ADHEr,ASPT,FRD および / または SUCD4,MDH,PGL および / または G6PDHy,PYK	11.69597

【表 10 - 8】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
296	ACKr および / または PTAr,ADHEr,FRD および / または SUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH	11.67923
297	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,THD2および/ またはGLUDy	11.60977
298	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6	11.4429
299	ADHEr,ASPT,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,PYK,THD2および/ またはGLUDy	11.34596
300	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2およ び/またはGLUDy	11.31505
301	ADHEr,ATPS4r,MDH,NADH6,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2およ び/またはGLUDy	11.27165
302	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,NADH6	11.21212
303	ADHEr,LDH_D,NADH6	5.44845
304	ADHEr,LDH_D,PPCK	4.25091
305	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D	4.17475
306	ADHEr,ATPS4r,LDH_D	2.36532
307	ADHEr,LDH_D,PGI	1.80553
308	ADHEr,FUM,LDH_D	1.31393
309	ADHEr,HEX1,LDH_D	0.81503
310	ADHEr,LDH_D,MDH	0.7159
311	ADHEr,LDH_D,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	0.32284
312	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGI	8.63121
313	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK	6.93528
314	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PFLi	6.8792
315	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi	6.77656
316	ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI	6.11877
317	ADHEr,LDH_D,MDH,THD2および/またはGLUDy	6.11538
318	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	6.01968
319	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi	5.98191
320	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK	5.82769
321	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6	5.64458
322	ADHEr,LDH_D,NADH6,THD2および/またはGLUDy	5.57367
323	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6	5.51162
324	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi	5.24339
325	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi	5.21195
326	ADHEr,LDH_D,PPCK,THD2および/またはGLUDy	4.91251
327	ADHEr,LDH_D,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	4.87678
328	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PPCK	4.69887
329	ADHEr,LDH_D,PGI,PPCK	4.67315
330	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PGI	4.63924
331	ADHEr,LDH_D,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PPCK	4.61324
332	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	4.5815
333	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PFKおよび/またはFBAおよ び/またはTPI	4.57316
334	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,MDH	4.3526
335	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PPCK	4.33751
336	ADHEr,HEX1,LDH_D,THD2および/またはGLUDy	4.32305
337	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK	4.3218

【表 10 - 9】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
338	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK	4.3218
339	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,ME2	4.27691
340	ADHEr,FUM,LDH_D,THD2および/またはGLUDy	4.26872
341	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,THD2および/またはGLUDy	4.26122
342	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLCpts,LDH_D	4.23155
343	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D	4.07963
344	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH	3.93602
345	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,THD2および/またはGLUDy	3.20207
346	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D	2.70933
347	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGI	2.48299
348	ADHEr,LDH_D,MDH,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	1.36009
349	ADHEr,LDH_D,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.50357
350	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI	9.89317
351	ADHEr,HEX1,LDH_D,PGL,THD2および/またはGLUDy	8.685
352	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,THD2および/またはGLUDy	8.42455
353	ADHEr,LDH_D,PFLi,PGL,PPCK	7.60434
354	ADHEr,LDH_D,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi,PPCK	7.5749
355	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI	7.53021
356	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PFLi,PGI	7.53021
357	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	7.49524
358	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	7.49524
359	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	7.47549
360	ADHEr,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	7.32448
361	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6	7.09625
362	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK	7.07538
363	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.04634
364	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,ME2,PFLi	7.04349
365	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi	7.03739
366	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,LDH_D,NADH6,PGI	7.02293
367	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,NADH6	11.12044
368	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.92104
369	ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.88038
370	ADHEr,ICL,LDH_D,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.88038
371	ADHEr,LDH_D,MALS,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.88038
372	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.79871
373	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.79806
374	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,PYK	10.7622
375	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.65458
376	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,LDH_D,MALS,MDH,THD2および/またはGLUDy	10.65175

【 0 3 6 9 】

10

20

30

40

【表 10 - 10】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
377	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,THD2および/またはGLUDy	10.65175
378	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ICL,LDH_D,MDH,THD2および/またはGLUDy	10.65175
379	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,MDH,THD2および/またはGLUDy	10.65175
380	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,MDH,PFLi,THD2および/またはGLUDy	10.5877
381	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH	10.28675
382	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,MDH,PFLi,PGI	10.27254
383	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,FUM,LDH_D,PFLi,PGI	10.24846
384	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI,THD2および/またはGLUDy	9.97214
385	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy	9.83354
386	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6	9.76182
387	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi	9.61783
388	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGLおよび/またはG6PDHy	9.57049
389	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,PYK,THD2および/またはGLUDy	9.52381
390	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,CITL,LDH_D,NADH12,NADH6	9.3809
391	ACKr および / または PTAr,ADHEr,FRD および / または SUCD4,LDH_D,MDH,PFLi	9.27557
392	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PDH,PGLおよび/またはG6PDHy	9.21865
393	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6	9.04167
394	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	9.01487
395	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi	8.9614
396	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi	8.93851
397	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,HEX1,LDH_D,MDH,THD2および/またはGLUDy	8.89295
398	ADHEr,LDH_D,ME2,NADH6,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	8.74922
399	ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,PFLi,THD2および/またはGLUDy	8.69116
400	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6	8.68896
401	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy	8.68776
402	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	8.66
403	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	8.66
404	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,ME2,PFLi,THD2および/またはGLUDy	8.6194
405	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,THD2および/またはGLUDy	8.58651
406	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,THD2および/またはGLUDy	8.54512
407	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,THD2および/またはGLUDy	8.51047
408	ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,NADH6,THD2および/またはGLUDy	8.42455
409	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,CITL,HEX1,LDH_D,NADH6	8.38082
410	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi,THD2および/またはGLUDy	8.33314
411	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2および/またはGLUDy	8.33314
412	ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,PFLi,THD2および/またはGLUDy	8.26017
413	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6	8.20955
414	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK	8.16498
415	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6	8.11809

10

20

30

40

【表 10 - 11】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
416	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK	7.80331
417	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi,PPS	7.78081
418	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PGI,THD2および/またはGLUDy	7.70411
419	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFkおよび/またはFBAおよび/または TPI,THD2および/またはGLUDy	7.69846
420	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,MDH,PFkおよび/または FBAおよび/またはTPI,PFLi	7.69078
421	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK	7.66606
422	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,FUM,LDH_D,PFkおよび/または FBAおよび/またはTPI,PFLi	7.66287
423	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PGI,THD2および/またはGLUDy	7.62739
424	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PGI,THD2および/またはGLUDy	7.62739
425	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,LDH_D,ME2,NADH12,NADH6	7.61395
426	ADHEr,FUM,LDH_D,PFkおよび/またはFBAおよび/または TPI,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.59996
427	ADHEr,LDH_D,MDH,PFkおよび/またはFBAおよび/または TPI,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.59996
428	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PFLi,PGI,THD2および/また はGLUDy	7.58195
429	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PGI,THD2および/またはGLUDy	7.58195
430	ADHEr,ASPT,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,MDH,PPCK	7.57014
431	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PFLi,PPCK,PYK	7.56477
432	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	7.55966
433	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PFkおよび/またはFBAおよ び/またはTPI,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.55146
434	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFkおよび/またはFBAおよび/または TPI,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.55146
435	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	7.5467
436	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFkおよび/またはFBAおよび/または TPI,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.5299
437	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi,PPCK	7.51427
438	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2および/ またはGLUDy	7.51308
439	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi,PPCK	7.51113
440	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK	7.51113
441	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および /またはGLUDy	7.45944
442	ADHEr,ASPT,FRDおよび/またはSUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH	7.45295
443	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK	7.44019
444	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK	7.43508
445	ADHEr,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	7.41336
446	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi	7.41073
447	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PFLi,PRO1z,THD2および/ またはGLUDy	7.39974
448	ADHEr,GLUDy,LDH_D,PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	7.39109
449	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.3905
450	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,PPCK	7.38004
451	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PGI	7.37787
452	ADHEr,ASPT,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,MDH,THD2および/ま	7.35321

【0371】

【表 10 - 12】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
	またはGLUDy	
453	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6	7.31719
454	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.31585
455	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PYK,THD2および/またはGLUDy	7.30613
456	ADHEr,HEX1,LDH_D,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/ またはGLUDy	7.30328
457	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK,THD2および/またはGLUDy	7.2931
458	ADHEr,FUM,GLCpts,LDH_D,PFLi,PPCK	7.27491
459	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK	7.27491
460	ADHEr,LDH_D,ME2,NADH6,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.26202
461	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,FUM,LDH_D,ME2,PFLi	7.25565
462	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PFLi	7.25565
463	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2および/ またはGLUDy	7.23622
464	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6,THD2および/またはGLUDy	7.23393
465	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.21989
466	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi	7.2125
467	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,FUM,LDH_D,PFLi,THD2および/ またはGLUDy	7.21135
468	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.20895
469	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,THD2および/またはGLUDy	7.19914
470	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLCpts,LDH_D,ME2,PFLi	7.19295
471	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK	7.19078
472	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK	7.19078
473	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2および/またはGLUDy	7.18851
474	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi	7.1878
475	ADHEr,GLUDy,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.13398
476	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,ME2,NADH6	7.09625
477	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6	7.09284
478	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi	7.06106
479	ADHEr,LDH_D,ME2,NADH12,NADH6,PFLi	7.04349
480	ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,NADH6,PFLi	7.03739
481	ADHEr,GLCpts,LDH_D,NADH6,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.02149
482	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi	7.00666
483	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,NADH6,PPCK	7.00602
484	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6,PFLi	7.00047

【0372】

10

20

30

【表 1 1 - 1】

表11. 4-HB-CoA:MAA経路に関する増殖連結型生成の設計(図6)。

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
1	ATPS4r	1.41919
2	ADHEr,NADH6	5.51519
3	ADHEr,PPCK	4.28804
4	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4	4.21382
5	PFLi,PGI	2.45706
6	ATPS4r,THD2および/またはGLUDy	1.92124
7	ADHEr,PGI	1.8023
8	ADHEr,FUM	1.29828
9	FRDおよび/またはSUCD4,PFLi	1.06442
10	NADH6,PFLi	1.06442
11	PFLi,PPCK	0.93931
12	ADHEr,HEX1	0.80948
13	ADHEr,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	0.32133
14	ADHEr,HEX1,PGI	8.71082
15	HEX1,PFLi,PGI	7.22213
16	ADHEr,NADH6,PFLi	6.8792
17	ADHEr,NADH6,PGI	6.18566
18	ADHEr,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	6.09754
19	ADHEr,MDH,THD2および/またはGLUDy	6.05682
20	ADHEr,NADH6,PPCK	5.89771
21	ADHEr,MDH,NADH6	5.71411
22	ADHEr,NADH6,THD2および/またはGLUDy	5.63485
23	ADHEr,FUM,NADH6	5.58019
24	ATPS4r,HEX1,PFLi	5.2123
25	ADHEr,PFLi,PPCK	5.15556
26	ATPS4r,PFLi,PGI	5.00885
27	ADHEr,PPCK,THD2および/またはGLUDy	4.91748
28	ATPS4r,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	4.90696
29	ADHEr,PGI,PPCK	4.71025
30	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PGI	4.67759
31	ADHEr,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PPCK	4.65664
32	ADHEr,HEX1,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	4.62311
33	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	4.61796
34	ATPS4r,ME2,THD2および/またはGLUDy	4.44391
35	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,MDH	4.39382
36	ADHEr,GLCpts,PPCK	4.3754
37	ADHEr,FUM,PPCK	4.36046
38	ADHEr,MDH,PPCK	4.36046
39	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,ME2	4.31642
40	ADHEr,FUM,THD2および/またはGLUDy	4.30511
41	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,THD2および/またはGLUDy	4.29689
42	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLCpts	4.27312
43	ADHEr,FUM,HEX1	4.11519

【 0 3 7 3 】

10

20

30

40

【表 1 1 - 2】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
44	ACKrおよび/またはPTAr,AKGD,ATPS4r	3.45333
45	ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	3.397
46	ACKrおよび/またはPTAr,ATPS4r,SUCOAS	3.23462
47	ADHEr,HEX1,THD2および/またはGLUDy	3.09661
48	MDH,PFLi,THD2および/またはGLUDy	3.00855
49	ATPS4r,PPCK,PYK	2.7407
50	PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	1.87744
51	ACKrおよび/またはPTAr,FRDおよび/またはSUCD4,PFLi	1.17455
52	ACKrおよび/またはPTAr,NADH6,PFLi	1.17455
53	MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	1.07056
54	ACKrおよび/またはPTAr,PFLi,PPCK	1.03613
55	FUM,PFLi,THD2および/またはGLUDy	0.95467
56	ADHEr,ASPT,MDH	0.77578
57	FUM,HEX1,PFLi	0.70584
58	HEX1,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	0.51097
59	HEX1,PFLi,THD2および/またはGLUDy	0.43064
60	ASPT,FUM,PFLi	0.26432
61	ASPT,MDH,PFLi	0.22676
62	ADHEr,MDH,PGL および/または G6PDHy,THD2 および/または GLUDy	9.4382
63	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6	8.91415
64	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PGI	7.77864
65	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PFLi,PGI	7.64241
66	ADHEr,NADH6,PFLi,PGI	7.64241
67	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PFKおよび/またはFBAおよび/ またはTPI,PFLi	7.61537
68	ADHEr,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	7.61537
69	ACKrおよび/またはPTAr,HEX1,PFLi,PGI	7.28181
70	ADHEr,ATPS4r,MDH,NADH6	7.05818
71	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH	7.03701
72	ADHEr,NADH6,PFLi,THD2および/またはGLUDy	6.99958
73	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PFLi	6.98499
74	ADHEr,MDH,NADH6,THD2および/またはGLUDy	6.81498
75	ADHEr,PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	6.6221
76	ADHEr,NADH6,PPCK,THD2および/またはGLUDy	6.57996
77	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PPCK	6.53047
78	ADHEr,HEX1,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	6.36651
79	ADHEr,ATPS4r,HEX1,NADH6	6.24352
80	ADHEr,NADH6,PGI,THD2および/またはGLUDy	6.23747
81	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,ME2,THD2および/またはGLUDy	6.22745
82	ADHEr,ME2,NADH6,THD2および/またはGLUDy	6.21872
83	ADHEr,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,THD2およ び/またはGLUDy	6.15963
84	ADHEr,ATPS4r,MDH,THD2および/またはGLUDy	6.13586
85	ADHEr,FUM,ME2,THD2および/またはGLUDy	6.05682
86	ADHEr,GLCpts,NADH6,PPCK	6.01786
87	ADHEr,FUM,PFLi,THD2および/またはGLUDy	5.92596

【 0 3 7 4 】

【表 1 1 - 3】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
88	ADHEr,ATPS4r,MDH,PPCK	5.89299
89	ADHEr,ATPS4r,FUM,PPCK	5.89299
90	ADHEr,ASPT,MDH,PYK	5.87822
91	ATPS4r,FUM,PFLi,THD2および/またはGLUDy	5.87538
92	ADHEr,GLCpts,MDH,NADH6	5.83728
93	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLCpts,PFLi	5.82636
94	ATPS4r,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	5.77678
95	ADHEr,FUM,ME2,NADH6	5.71411
96	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1	5.67609
97	ADHEr,FUM,HEX1,NADH6	5.6596
98	ADHEr,HEX1,NADH6,THD2および/またはGLUDy	5.56588
99	ME2,PFLi,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	5.37063
100	ADHEr,HEX1,PFLi,PPS	5.23221
101	ADHEr,FUM,HEX1,PFLi	5.20022
102	ADHEr,HEX1,MDH,PFLi	5.20022
103	ATPS4r,PFLi,PPCK,PYK	5.11897
104	ADHEr,ATPS4r,HEX1,MDH	4.91648
105	ADHEr,FUM,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	4.88964
106	ADHEr,MDH,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	4.88964
107	ADHEr,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi,PPS	4.88619
108	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,HEX1,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	4.77488
109	ADHEr,FUM,PGI,THD2および/またはGLUDy	4.72683
110	ADHEr,MDH,PGI,THD2および/またはGLUDy	4.72683
111	ADHEr,FUM,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,THD2および/またはGLUDy	4.67659
112	ADHEr,MDH,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,THD2および/またはGLUDy	4.67659
113	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PPCK,PYK	4.5823
114	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PPCK	4.50446
115	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLCpts,MDH	4.48854
116	ADHEr,GLCpts,MDH,THD2および/またはGLUDy	4.48038
117	ADHEr,MDH,PYK,THD2および/またはGLUDy	4.46392
118	ADHEr,GLCpts,MDH,PPCK	4.44991
119	ADHEr,FUM,GLCpts,PPCK	4.44991
120	ADHEr,GLCpts,PPCK,THD2および/またはGLUDy	4.43743
121	ADHEr,MDH,PPCK,PYK	4.43142
122	ADHEr,FUM,PPCK,PYK	4.43142
123	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLCpts,ME2	4.40879
124	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,FUM,ME2	4.39382
125	ADHEr,FUM,GLCpts,THD2および/またはGLUDy	4.3649
126	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLCpts,THD2および/またはGLUDy	4.3533
127	ME2,NADH6,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	4.08146
128	ADHEr,HEX1,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	4.06156

【 0 3 7 5】

【表 1 1 - 4】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
129	ADHEr,ATPS4r,FUM,PGLおよび/またはG6PDHy	3.76615
130	ADHEr,ATPS4r,HEX1,THD2および/またはGLUDy	3.73541
131	ACKrおよび/またはPTAr,AKGD,ATPS4r,THD2および/またはGLUDy	3.65142
132	ACKrおよび/またはPTAr,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	3.52563
133	ADHEr,ASPT,ATPS4r,MDH	3.50899
134	ACKrおよび/またはPTAr,ATPS4r,SUCOAS,THD2および/またはGLUDy	3.4624
135	ACKrおよび/またはPTAr,ATPS4r,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,SUCOAS	3.3813
136	ATPS4r,PPCK,PYK,THD2および/またはGLUDy	3.23342
137	ACKrおよび/またはPTAr,MDH,PFLi,THD2および/またはGLUDy	3.16308
138	ATPS4r,NADH6,PDH,PFLi	3.01078
139	FUM,ME2,PFLi,THD2および/またはGLUDy	3.00855
140	AKGD,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	2.70882
141	MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,SUCOAS,THD2および/またはGLUDy	2.58524
142	ACKrおよび/またはPTAr,GLU5K,PFLi,PGI	2.51808
143	ACKrおよび/またはPTAr,G5SD,PFLi,PGI	2.51808
144	ATPS4r,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	2.13925
145	ME2,NADH6,PFLi,THD2および/またはGLUDy	1.97605
146	ACKrおよび/またはPTAr,PFLi,PPCK,THD2および/またはGLUDy	1.96877
147	FUM,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	1.58766
148	ADHEr,ATPS4r,HEX1,PPS	1.57755
149	ACKrおよび/またはPTAr,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	1.20253
150	ACKrおよび/またはPTAr,FUM,PFLi,THD2および/またはGLUDy	1.05304
151	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ASPT,MDH	0.90077
152	ACKrおよび/またはPTAr,FUM,HEX1,PFLi	0.88292
153	ACKrおよび/またはPTAr,HEX1,PFLi,THD2および/またはGLUDy	0.61521
154	ACKrおよび/またはPTAr,HEX1,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	0.56359
155	ASPT,FUM,PDH,PFLi	0.43285
156	ASPT,MDH,PDH,PFLi	0.39171
157	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,MDH	13.10515
158	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6	11.66583
159	ADHEr,ATPS4r,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	11.54962
160	ATPS4r,MDH,PDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	11.18163
161	ADHEr,LDH_D,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.87211
162	ADHEr,ASPT,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,PYK	10.85118
163	ADHEr,FUM,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.79537
164	ADHEr,MALS,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.79537

10

20

30

40

【表 1 1 - 5】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
165	ADHEr,ICL,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.79537
166	ADHEr,ASPT,ATPS4r,LDH_D,MDH	10.36931
167	ATPS4r,GLCpts,NADH6,PDH,PFLi	10.18817
168	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PFLi	10.10757
169	ACKr および / または PTAr,ADHEr,MDH,PGL および / または G6PDHy,THD2および/またはGLUDy	9.4975
170	ADHEr,FRD および / または SUCD4,ME2,PGL および / または G6PDHy,THD2および/またはGLUDy	9.20833
171	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH6,PFLi	9.04248
172	ADHEr,GLCpts,MDH,NADH6,THD2および/またはGLUDy	8.60394
173	ADHEr,ME2,NADH6,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	8.57189
174	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6	8.07655
175	FUM,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,PYK,THD2および/またはGLUDy	8.03861
176	MDH,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,PYK,THD2および/またはGLUDy	8.03861
177	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PFLi,PPCK	7.63009
178	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6	7.6151
179	ADHEr,ASPT,MDH,PYK,THD2および/またはGLUDy	7.44202
180	ADHEr,ASPT,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,MDH	7.40564
181	ADHEr,LDH_D,NADH6,PFLi,PPCK	7.40192
182	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,MDH,PFLi	7.36994
183	ADHEr,ASPT,ATPS4r,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy	7.36609
184	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PPCK	7.33413
185	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.27861
186	ADHEr,NADH6,PFLi,PPCK,PYK	7.27816
187	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,NADH6	7.2681
188	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,PPCK	7.23481
189	ADHEr,LDH_D,MDH,PFLi,PPCK	7.23481
190	ADHEr,ASPT,GLCpts,LDH_D,MDH	7.21534
191	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,FUM,LDH_D,PFLi	7.16964
192	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,ME2,PFLi	7.15036
193	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi	7.14486
194	ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,THD2および/またはGLUDy	7.14394
195	ADHEr,FUM,LDH_D,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.13176
196	ASPT,ATPS4r,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,PYK	7.127
197	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,HEX1,LDH_D,PFLi	7.11053
198	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.09551
199	ADHEr,ATPS4r,FUM,ME2,NADH6	7.05818
200	ATPS4r,HEX1,ME2,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.02076
201	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PGLおよび/またはG6PDHy,PPCK	6.9884
202	ADHEr,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi	6.98499
203	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6,PFLi	6.98167
204	ATPS4r,PFLi,PPCK,PYK,THD2および/またはGLUDy	6.96842
205	ADHEr,HEX1,PFLi,PPS,THD2および/またはGLUDy	6.92886

10

20

30

40

【表 1 1 - 6】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
206	ADHEr,HEX1,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	6.88098
207	ADHEr,FUM,ME2,NADH6,THD2および/またはGLUDy	6.81498
208	ADHEr,ATPS4r,HEX1,NADH6,PGLおよび/またはG6PDHy	6.72128
209	ATPS4r,FUM,NADH12,PFLi,THD2および/またはGLUDy	6.67745
210	ADHEr,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,PPCK,THD2および/またはGLUDy	6.67685
211	ADHEr,ATPS4r,HEX1,MDH,PFLi	6.56359
212	ADHEr,ATPS4r,HEX1,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	6.49377
213	ADHEr,HEX1,MDH,PFLi,THD2および/またはGLUDy	6.48868
214	ADHEr,GLCpts,NADH6,PGL,PPCK	6.48565
215	ADHEr,GLCpts,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PPCK	6.48238
216	ADHEr,ATPS4r	1.41919
217	ADHEr,PFLi,PGI	2.45706
218	ADHEr,ATPS4r,THD2および/またはGLUDy	1.92124
219	ADHEr,ATPS4r,HEX1,PFLi	5.2123
220	ADHEr,ATPS4r,PFLi,PGI	5.00885
221	ADHEr,ATPS4r,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	4.90696
222	ADHEr,ATPS4r,ME2,THD2および/またはGLUDy	4.44391
223	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,AKGD,ATPS4r	3.45333
224	ADHEr,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	3.397
225	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ATPS4r,SUCOAS	3.23462
226	ADHEr,ATPS4r,PPCK,PYK	2.7407
227	ADHEr,ATPS4r,HEX1,PFLi,PGI	6.94738
228	ADHEr,ATPS4r,FUM,PFLi,THD2および/またはGLUDy	5.87538
229	ADHEr,ATPS4r,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	5.77678
230	ADHEr,ME2,PFLi,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	5.37063
231	ADHEr,ATPS4r,PFLi,PPCK,PYK	5.11897
232	ADHEr,ATPS4r,MDH,PDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	11.18163
233	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PDH,PFLi	10.18817
234	ADHEr,ATPS4r,HEX1,ME2,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.02076
235	ADHEr,ATPS4r,PFLi,PPCK,PYK,THD2および/またはGLUDy	6.96842
236	ADHEr,ATPS4r,FUM,NADH12,PFLi,THD2および/またはGLUDy	6.67745
237	ADHEr,ATPS4r,MDH,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi,THD2および/またはGLUDy	6.00293
238	ADHEr,LDH_D,MDH,THD2および/またはGLUDy	6.05682
239	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6	5.71411
240	ADHEr,LDH_D,MDH,PPCK	4.36046
241	ADHEr,LDH_D,MDH,PGI	1.8023
242	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH	0.71076
243	ADHEr,HEX1,LDH_D,MDH,PGI	8.71082
244	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,THD2および/またはGLUDy	6.81498
245	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,LDH_D,MDH,THD2および/または	6.26208

【 0 3 7 8 】

10

20

30

40

【表 1 1 - 7】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
	GLUDy	
246	ADHEr, GLUDy, LDH_D, MDH, THD2および/またはGLUDy	6.1932
247	ADHEr, LDH_D, MDH, PPCK, THD2および/またはGLUDy	6.18632
248	ADHEr, LDH_D, MDH, NADH6, PGI	6.18566
249	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, MDH, THD2および/またはGLUDy	6.13586
250	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, MDH, PPCK	5.89299
251	ADHEr, GLCpts, LDH_D, MDH, NADH6	5.83728
252	ADHEr, HEX1, LDH_D, MDH, PFLi	5.20022
253	ADHEr, ASPT, ATPS4r, GLCpts, LDH_D, MDH	13.10515
254	ADHEr, ASPT, ATPS4r, LDH_D, MDH, NADH6	13.09985
255	ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, PFLi, THD2および/またはGLUDy	12.43893
256	ACKrおよび/またはPTAr, ADHEr, LDH_D, MDH, NADH6, THD2および/またはGLUDy	12.0485
257	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, MDH, PGLおよび/またはG6PDHy, THD2および/またはGLUDy	11.54962
258	ADHEr, ASPT, ATPS4r, LDH_D, MDH, PFLi	10.9713
259	ADHEr, ASPT, ATPS4r, LDH_D, MDH, PGLおよび/またはG6PDHy	10.87514
260	ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, PGLおよび/またはG6PDHy, PYK	10.85118
261	ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, PFLi, PYK	10.69852
262	ADHEr, ASPT, ATPS4r, LDH_D, MDH, PPCK	10.54348
263	ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, NADH12, NADH6	9.24298
264	ADHEr, ATPS4r, GLCpts, LDH_D, MDH, NADH6	8.89824
265	ADHEr, GLUDy, LDH_D, MDH, PFLi, THD2および/またはGLUDy	8.78148
266	ADHEr, LDH_D, MDH, PFLi, PPCK, THD2および/またはGLUDy	8.75525
267	ADHEr, LDH_D, MDH, NADH6, PFLi, THD2および/またはGLUDy	8.68453
268	ADHEr, GLCpts, LDH_D, MDH, NADH6, THD2および/またはGLUDy	8.60394
269	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, MDH, PFLi, THD2および/またはGLUDy	8.54512
270	ADHEr, HEX1, LDH_D, MDH, PFLi, THD2および/またはGLUDy	8.41994
271	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, MDH, NADH6, THD2および/またはGLUDy	8.22075
272	ADHEr, LDH_D, MDH, NADH12, NADH6, THD2および/またはGLUDy	8.20953
273	ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, PGI, THD2および/またはGLUDy	7.83287
274	ACKrおよび/またはPTAr, ADHEr, LDH_D, MDH, PPCK, THD2および/またはGLUDy	7.76113
275	ADHEr, LDH_D, MDH, PFLi, PGI, THD2および/またはGLUDy	7.73026
276	ADHEr, LDH_D, MDH, NADH6, PFLi, PGI	7.64241
277	ADHEr, LDH_D, MDH, NADH6, PFLi, PPCK	7.62766
278	ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, NADH6, PPCK	7.5687
279	ADHEr, ASPT, GLCpts, LDH_D, MDH, PPCK	7.50936
280	ADHEr, ASPT, GLCpts, LDH_D, MDH, NADH6	7.45108
281	ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, PYK, THD2および/またはGLUDy	7.44202
282	ADHEr, GLCpts, LDH_D, MDH, PFLi, THD2および/またはGLUDy	7.41734
283	ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, PPCK, THD2および/またはGLUDy	7.40692
284	ADHEr, GLCpts, LDH_D, MDH, PFLi, PPCK	7.38196
285	ADHEr, LDH_D, MDH, NADH12, NADH6, PFLi	7.36994
286	ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, NADH6, THD2および/またはGLUDy	7.35125
287	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, MDH, PFLi, PPCK	7.34743
288	ADHEr, ASPT, GLCpts, LDH_D, MDH, THD2および/またはGLUDy	7.30247

【表 1 1 - 8】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
289	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi	7.29756
290	ADHEr,ASPT,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2および/またはGLUDy	7.20317
291	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,GLUDy,LDH_D,MDH,THD2および/またはGLUDy	6.86403
292	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,MDH,PFLi	6.56359
293	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,THD2および/またはGLUDy	6.38107
294	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,PPS	6.33965
295	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PYK,THD2および/またはGLUDy	6.13919
296	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK,PYK	6.10615
297	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PPCK	6.03902
298	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PPCK,THD2および/またはGLUDy	5.95979
299	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,PFLi,PGI	5.00885
300	NA	0.40409
301	FRDおよび/またはSUCD4	0.34622
302	ADHEr,ATPS4r,NADH6	0.29582
303	ADHEr,ATPS4r,PPCK	0.24649
304	ADHEr,NADH12,NADH6	0.28919
305	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D	0.26599
306	MDH,NADH6,PFLi	0.27181
307	FRDおよび/またはSUCD4,ME2,PFLi	0.27027
308	FRDおよび/またはSUCD4,MDH,PFLi	0.26589
309	FUM,PFLi,PPCK	0.25998
310	MDH,PFLi,PPCK	0.25998
311	NADH6,PFLi,PPCK	0.25452
312	FRDおよび/またはSUCD4,PFLi,PPCK	0.24933
313	ATPS4r,PFLi,PPCK	0.2281
314	FRDおよび/またはSUCD4,FUM,PFLi	0.30093
315	PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi,PPCK	0.14537
316	PFLi,PGI,PPCK	0.14284
317	ADHEr,ATPS4r,PGI	0.23063
318	NADH12,NADH6,PFLi	0.30419
319	FUM,NADH6,PFLi	0.30486
320	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PPCK	0.21424
321	ADHEr,ATPS4r,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	0.23674
322	ADHEr,ATPS4r,HEX1	0.37576
323	ADHEr,MDH,PGI	0.24821
324	ADHEr,FUM,PGI	0.24821
325	FUM,HEX1,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	0.18252
326	ADHEr,ATPS4r,HEX1,PGI	0.08649
327	ADHEr,ATPS4r,HEX1,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	0.08878
328	ADHEr,LDH_D,NADH6,PPCK	0.17351
329	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,LDH_D,MDH	0.18263
330	ATPS4r,MDH,PDH,PGLおよび/またはG6PDHy	0.19729
331	ADHEr,ATPS4r,PPCK,THD2および/またはGLUDy	0.21063
332	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,FUM,LDH_D	0.23871
333	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,HEX1,LDH_D	0.24228

【 0 3 8 0 】

10

20

30

40

【表 1 1 - 9】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
334	ADHEr,ME2,NADH12,NADH6	0.27452
335	ADHEr,ATPS4r,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy	0.26541
336	ADHEr,ATPS4r,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	0.11424
337	ADHEr,ATPS4r,ME2,NADH6	0.28029
338	ADHEr,ATPS4r,NADH12,NADH6	0.28705
339	ACKrおよび/またはPTAr,AKGD,ATPS4r,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI	0.10833
340	ADHEr,ATPS4r,FUM,THD2および/またはGLUDy	0.23122
341	ADHEr,HEX1,NADH12,NADH6	0.2788
342	ATPS4r,FDH2,NADH6,PDH	0.16467
343	ATPS4r,GLCpts,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy	0.23908
344	ADHEr,FUM,LDH_D,THD2および/またはGLUDy	0.35439
345	ADHEr,FUM,LDH_D,NADH6	0.26726
346	FUM,ME2,NADH6,PFLi	0.27181
347	ME2,NADH12,NADH6,PFLi	0.27027
348	FRDおよび/またはSUCD4,FUM,PFLi,THD2および/またはGLUDy	0.2584
349	FUM,NADH6,PFLi,THD2および/またはGLUDy	0.2584
350	FRDおよび/またはSUCD4,PFLi,PRO1z,THD2および/またはGLUDy	0.25563
351	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPS	0.37122
352	FUM,NADH12,NADH6,PFLi	0.30093
353	ADHEr,FUM,PFLi,PGI	0.2381
354	ADHEr,MDH,PFLi,PGI	0.2381
355	ASPT,ATPS4r,FUM,PDH	0.19443
356	ASPT,ATPS4r,MDH,PDH	0.18797
357	ADHEr,ASPT,MDH,THD2および/またはGLUDy	0.20167
358	FUM,HEX1,PFLi,THD2および/またはGLUDy	0.32948
359	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,MDH	0.22488
360	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6	0.28496
361	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,NADH6,PPCK	0.21426
362	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PPCK	0.2103
363	FBP,PFLi,PGI,PPCK	0.14228
364	PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi,PGI,PPCK	0.14228
365	ADHEr,HEX1,LDH_D,PPCK	0.26035
366	MDH,PDH,PFLi,PGI	0.21218
367	FUM,PDH,PFLi,PGI	0.21218
368	ADHEr,ASPT,ATPS4r,FUM	0.22058
369	HEX1,NADH6,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	0.1381
370	FUM,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi,THD2および/またはGLUDy	0.13758
371	FUM,PFLi,PGI,THD2および/またはGLUDy	0.1353
372	HEX1,NADH6,PFLi,PGI	0.13506
373	ADHEr,FUM,LDH_D,PPCK	0.20562
374	ATPS4r,GLCpts,NADH6,PFLi	0.26825
375	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,FUM,THD2および/またはGLUDy	0.2204
376	ADHEr,FUM,NADH6,THD2および/またはGLUDy	0.2204
377	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,PRO1z,THD2および/またはGLUDy	0.21775

【表 1 1 - 1 0】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
378	ATPS4r,HEX1,PFLi,PGI	0.08042
379	ATPS4r,HEX1,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PFLi	0.0824
380	ASPT,ATPS4r,GLCpts,MDH	0.25562
381	ATPS4r,GLCpts,MDH,PPCK	0.24489
382	ATPS4r,FUM,GLCpts,PPCK	0.24489
383	ADHEr,ASPT,FUM,ME2	0.22754
384	ADHEr,ASPT,FUM,THD2および/またはGLUDy	0.22026
385	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,HEX1,PGI	0.08245
386	ADHEr,HEX1,NADH6,PGI	0.08245
387	ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D	0.2051
388	ATPS4r,GLCpts,MDH,THD2および/またはGLUDy	0.23421
389	ADHEr,HEX1,PFKおよび/またはFBAおよび/またはTPI,PPCK	0.08078
390	ADHEr,MDH,ME2,NADH6	0.23176
391	ADHEr,MDH,PFLi,THD2および/またはGLUDy	2.6304
392	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,FUM,PFLi	0.37735
393	ADHEr,HEX1,PGI,PPCK	0.13376
394	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,HEX1,PFLi	0.03691
395	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,PDH,PGLおよび/またはG6PDHy	9.03958
396	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,NADH12,NADH6,PFLi	9.0297
397	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PGLおよび/またはG6PDHy	8.92362
398	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ATPS4r,MDH,NADH6,PGLおよび/またはG6PDHy	8.83429
399	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy	8.62906
400	ADHEr,MDH,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,PYK,THD2および/またはGLUDy	8.50911
401	ADHEr,FUM,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,PYK,THD2および/またはGLUDy	8.50911
402	ACKr および / または PTAr,ADHEr,FRD および / または SUCD4,LDH_D,MDH,THD2および/またはGLUDy	8.37268
403	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	8.32112
404	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,PPCK	7.82056
405	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2および/またはGLUDy	7.65378
406	ACKr および / または PTAr,ADHEr,FRD および / または SUCD4,LDH_D,MDH,PGI	7.4765
407	ADHEr,ME2,NADH12,NADH6,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	7.16841
408	ADHEr,HEX1,LDH_D,PFLi,PPS,THD2および/またはGLUDy	6.91902
409	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PGI	6.85613
410	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,PPCK	6.78808
411	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,ME2,NADH6	6.71695
412	ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy	6.67975
413	ACKr および / または PTAr,ADHEr,FRD および / または SUCD4,LDH_D,PPCK,THD2および/またはGLUDy	6.31121
414	ADHEr,ATPS4r,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,PPCK,THD2および/またはGLUDy	6.23672
415	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,NADH6	6.19739

【 0 3 8 2】

【表 1 1 - 1 1】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
416	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,NADH6,THD2および/またはGLUDy	6.15859
417	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6	6.06031
418	ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1,LDH_D,NADH6	5.95481
419	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH6,THD2および/またはGLUDy	5.89694
420	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PPS,THD2および/またはGLUDy	5.87873
421	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6	5.87075
422	ADHEr,ATPS4r,NADH12,NADH6,PRO1z,THD2 および / または GLUDy	5.87047
423	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,ME2,THD2および/またはGLUDy	5.85008
424	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,LDH_D,ME2,NADH12,NADH6	5.77866
425	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,THD2および/またはGLUDy	5.77062
426	ADHEr,HEX1,LDH_D,NADH12,NADH6,THD2および/またはGLUDy	5.74841
427	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,HEX1,LDH_D,PPS,THD2および/またはGLUDy	5.74605
428	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,CITL,LDH_D,NADH12,NADH6	5.71072
429	ADHEr,ATPS4r,MDH,NADH6,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	5.70312
430	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ATPS4r,GLCpts,ME2,NADH6	5.68643
431	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PFLi,THD2および/またはGLUDy	5.64027
432	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,CITL,HEX1,LDH_D,NADH6	5.63442
433	ADHEr,FUM,LDH_D,ME2,NADH6,THD2および/またはGLUDy	5.58306
434	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy	5.57201
435	ADHEr,ATPS4r,HEX1,ME2,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	5.55702
436	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,GLUDy,LDH_D,PFLi,THD2および/またはGLUDy	5.54389
437	ADHEr,FUM,GLUDy,LDH_D,ME2,THD2および/またはGLUDy	5.50066
438	ADHEr,ATPS4r,HEX1,LDH_D,NADH6,THD2および/またはGLUDy	5.47201
439	ADHEr,FUM,GLUDy,LDH_D,PFLi,THD2および/またはGLUDy	5.4078
440	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PPCK	5.36087
441	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,HEX1,LDH_D,PPCK,THD2および/またはGLUDy	5.34992
442	ADHEr,ATPS4r,FUM,GLCpts,NADH6,PPCK	5.25122
443	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ATPS4r,CITL,GLCpts,NADH6	5.24209
444	ADHEr,ATPS4r,FUM,LDH_D,PGLおよび/またはG6PDHy,PPCK	5.21165
445	ADHEr,ASPT,ATPS4r,MDH,PDH,PGLおよび/またはG6PDHy	5.10503
446	ADHEr,FUM,HEX1,LDH_D,PFLi,THD2および/またはGLUDy	5.07597
447	ADHEr,FRDおよび/またはSUCD4,HEX1,LDH_D,PFLi,PGI	5.0175
448	ADHEr,ICL,LDH_D,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.42846
449	ADHEr,LDH_D,MALS,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.42846
450	ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy,THD2および/またはGLUDy	10.30271
451	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PFLi	8.05255
452	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6	6.92399
453	ADHEr,ATPS4r,LDH_D,MDH,NADH6,PPCK	6.78808

【表 1 1 - 1 2】

設計ID	除去の標的となる代謝的変換	予想MAA 収率
454	ACKrおよび/またはPTAr,ADHEr,GLCpts,LDH_D,MDH,NADH6	6.43185
455	ADHEr,ATPS4r,GLCpts,LDH_D,MDH,PGLおよび/またはG6PDHy	5.57201
456	ADHEr,LDH_D,MDH,NADH12,NADH6,PGI	5.02702

【 0 3 8 4 】

【表 1 2 - 1】

表 12. 表 10 および 11 中の設計の酵素名、略称、および対応する反応化学量論

略称	酵素名	式
ABTA	4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ	[c] : 4abut + akc --> glu-L + succal
ACKr	酢酸キナーゼ	[c] : ac + atp <=> actp + adp
ACS	アセチルCoAシンテターゼ	[c] : ac + atp + coa --> accoa + amp + ppi
ACT6	プロトン共輸送を介した内/外酢酸輸送	ac[e] + h[e] <=> ac[c] + h[c]
ADHER	アセトアルデヒドCoAデヒドロゲナーゼ	[c] : accoa + (2) h + (2) nadh <=> coa + etoh + (2) nad
AKGD	2-オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ	[c] : akc + coa + nad --> co2 + nadh + succoa
ASNN	L-アスパラギナーゼ	[c] : asn-L + h2o --> asp-L + nh4
ASNS1	アスパラギンシンテターゼ(グルタミン加水分解)	[c] : asp-L + atp + gln-L + h2o --> amp + asn-L + glu-L + h + ppi
ASNS2	アスパラギンシンテターゼ	[c] : asp-L + atp + nh4 --> amp + asn-L + h + ppi
ASPT	L-アスパルターゼ	[c] : asp-L --> fum + nh4
ATPS4r	ATPシンテターゼ(1ATPに4プロトン)	adp[c] + (4) h[e] + pi[c] <=> atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]
CBMK2	カルバミン酸キナーゼ	[c] : atp + co2 + nh4 --> adp + cbp + (2) h
CITL	クエン酸リアーゼ	[c] : cit --> ac + oaa
DAAD	D-アミノ酸デヒドロゲナーゼ	[c] : ala-D + fad + h2o --> fadh2 + nh4 + pyr
EDA	2-デヒドロ-3-デオキシ-ホスホグルコネートアルドラーゼ	[c] : 2ddg6p --> g3p + pyr
FADH4	FADIIデヒドロゲナーゼ	[c] : fadh2 + mqn8 --> fad + mql8
FBA	フルクトース-ビスホスフェートアルドラーゼ	[c] : fdp <=> dhap + g3p
FBP	フルクトース-ビスホスファターゼ	[c] : fdp + h2o --> f6p + pi
FRD	フマル酸レダクターゼ	[c] : fum + [電子ドナー] --> [電子アクセプター] + succ
FUM	フマラーゼ	[c] : fum + h2o <=> mal-L
G5SD	グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ	[c] : glu5p + h + nadph --> glu5sa + nadp + pi
G6PDHy	グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ	[c] : g6p + nadp <=> 6pgl + h + nadph
G6PDHy	グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ	[c] : g6p + nadp <=> 6pgl + h + nadph
GLCpts	PEP:PyrPTSを介したD-グルコース輸送	glc-D[e] + pep[c] --> g6p[c] + pyr[c]
GLU5K	グルタミン酸5-キナーゼ	[c] : atp + glu-L --> adp + glu5p
GLUDC	グルタミン酸デカルボキシラーゼ	[c] : glu-L + h --> 4abut + co2
GLUDy	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(NADP)	[c] : glu-L + h2o + nadp <=> akc + h + nadph + nh4

【 0 3 8 5 】

【表 1 2 - 2】

略称	酵素名	式
GLUDy	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(NADP)	[c] : glu-L + h2o + nadp <==> akg + h + nadph + nh4
GLUSy	グルタミン酸シンターゼ(NADPH)	[c] : akg + gln-L + h + nadph --> (2) glu-L + nadp
GLYCL	グリシン切断系	[c] : gly + nad + thf --> co2 + mlthf + nadh + nh4
HEX1	ヘキソキナーゼ(D-グルコース:ATP)	[c] : atp + glc-D --> adp + g6p + h
ICL	イソクエン酸リアーゼ	[c] : icit --> glx + succ
LDH_D	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	[c] : lac-D + nad <==> h + nadh + pyr
MALS	リンゴ酸シンターゼ	[c] : accoa + glx + h2o --> coa + h + mal-L
MDH	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	[c] : mal-L + nad <==> h + nadh + oaa
ME1x	リンゴ酸酵素(NAD)	[c] : mal-L + nad --> co2 + nadh + pyr
ME2	リンゴ酸酵素(NADP)	[c] : mal-L + nadp --> co2 + nadph + pyr
NACODA	N-アセチルオルニチンデアセチラーゼ	[c] : acg5sa + h2o --> ac + glu5sa
NADH12	NADHデヒドロゲナーゼ	[c] : h + nadh + ubq8 --> nad + ubq8h2
NADH6	NADHデヒドロゲナーゼ	(4.5) h[c] + nadh[c] + ubq8[c] --> (3.5) h[e] + nad[c] + ubq8h2[c]
ORNTA	オルニチントランスアミナーゼ	[c] : akg + orn-L --> glu-L + glu5sa
P5CD	1-ピロリン-5-カルボン酸デヒドロゲナーゼ	[c] : 1pyr5c + (2) h2o + nad --> glu-L + h + nadh
PDH	ピルビン酸デヒドロゲナーゼ	[c] : coa + nad + pyr --> accoa + co2 + nadh
PFK	ホスホフルクトキナーゼ	[c] : atp + f6p --> adp + fdp + h
PFLi	ピルビン酸ギ酸リアーゼ	[c] : coa + pyr --> accoa + for
PGDH	ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ	[c] : 6pgc + nadp --> co2 + nadph + ru5p-D
PGDHY	ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ	[c] : 6pgc --> 2ddg6p + h2o
PGI	グルコース-6-リン酸イソメラーゼ	[c] : g6p <==> f6p
PGL	6-ホスホグルコノラクトナーゼ	[c] : 6pgl + h2o --> 6pgc + h
PGL	6-ホスホグルコノラクトナーゼ	[c] : 6pgl + h2o --> 6pgc + h
PGM	ホスホグリセリン酸ムターゼ	[c] : 3pg <==> 2pg
PPCK	ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ	[c] : atp + oaa --> adp + co2 + pep
PPS	ホスホエノールピルビン酸シンターゼ	[c] : atp + h2o + pyr --> amp + (2) h + pep + pi
PRO1z	プロリンオキシダーゼ	[c] : fad + pro-L --> 1pyr5c + fadh2 + h
PTAr	ホスホトランスアセチラーゼ	[c] : accoa + pi <==> actp + coa
PYK	ピルビン酸キナーゼ	[c] : adp + h + pep --> atp + pyr
RPE	リブロース5-リン酸3-エ	[c] : ru5p-D <==> xu5p-D

10

20

30

40

【表 1 2 - 3】

略称	酵素名	式
	ピメラーゼ	
SERD_L	L-セリンデアミナーゼ	[c] : ser-L --> nh4 + pyr
SUCD4	コハク酸デヒドロゲナーゼ	[c] : fadh2 + ubq8 <==> fad + ubq8h2
SUCD4	コハク酸デヒドロゲナーゼ	[c] : fadh2 + ubq8 <==> fad + ubq8h2
SUCOAS	スクシニルCoAシンテターゼ(ADP形成)	[c] : atp + coa + succ <==> adp + pi + succoa
TAL	トランスアルドラーゼ	[c] : g3p + s7p <==> e4p + f6p
THD2	NAD(P)トランスヒドロゲナーゼ	(2) h[e] + nadh[c] + nadp[c] --> (2) h[c] + nad[c] + nadph[c]
THD2	NAD(P)トランスヒドロゲナーゼ	(2) h[e] + nadh[c] + nadp[c] --> (2) h[c] + nad[c] + nadph[c]
THD5	NADトランスヒドロゲナーゼ	[c] : nad + nadph --> nadh + nadp
TKT1	トランスケトラーゼ	[c] : r5p + xu5p-D <==> g3p + s7p
TKT2	トランスケトラーゼ	[c] : e4p + xu5p-D <==> f6p + g3p
TPI	トリオースリン酸イソメラーゼ	[c] : dhap <==> g3p
VALTA	バリントランスアミナーゼ	[c] : akc + val-L <==> 3mob + glu-L
VPAMT	バリン-ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ	[c] : 3mob + ala-L --> pyr + val-L

10

20

【 0 3 8 7 】

【表 1 3】

表13. 反応式中の略称に対応する代謝産物の名称。

略称	名称
1pyr5c	1-ピロリン-5-カルボキシレート
2ddg6p	2-デヒドロ-3-デオキシ-D-グルコネート6-ホスフェート
2pg	D-グリセレート2-ホスフェート
3mob	3-メチル-2-オキソブタノエート
3pg	3-ホスホ-D-グリセレート
4abut	4-アミノブタノエート
6pgc	6-ホスホ-D-グルコネート
6pgl	6-ホスホ-D-グルコノ-1,5-ラクトン
ac	アセテート
accoa	アセチルCoA
acg5sa	N-アセチル-L-グルタミメート5-セミアルデヒド
adp	ADP
akg	2-オキソグルタレート
ala-D	D-アラニン
ala-L	L-アラニン
amp	AMP
asn-L	L-アスパラギン
asp-L	L-アスパルテート
atp	ATP
cbp	カルバモイルホスフェート
cit	シトレート
co2	CO2
coa	補酵素A
dhap	ジヒドロキシアセトンホスフェート
e4p	D-エリスロース4-ホスフェート
etoh	エタノール
f6p	D-フルクトース6-ホスフェート
fad	FAD
fadh2	FADH2
fdp	D-フルクトース1,6-ビスホスフェート
for	ホルメート
fum	フマレート
g3p	グリセルアルデヒド3-ホスフェート
g6p	D-グルコース6-ホスフェート
glc-D	D-グルコース

10

20

30

本出願を通じて、様々な刊行物に言及してきた。これらの刊行物の開示は、本出願において本発明が属する現況技術をより完全に記載するために、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。前に示した実施例を参照しながら本発明を記載してきたが、本発明の精神から逸脱せずに、様々な改変を加えることができることは理解されたい。

40

【図 1】

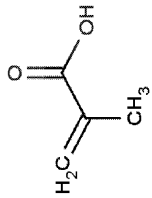


Figure 1

【図 2】

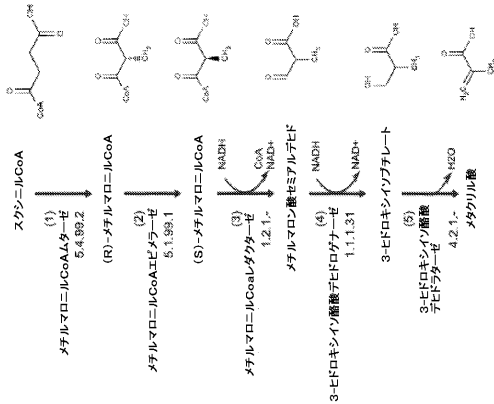
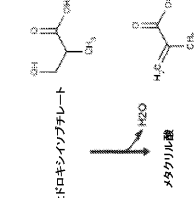
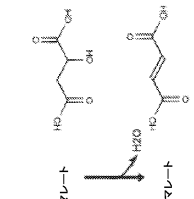


Figure 2

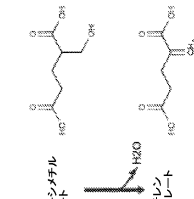
【図 3】



C.



B.



A.

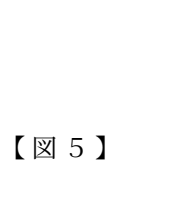
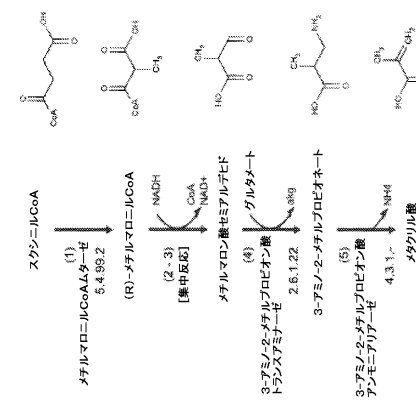
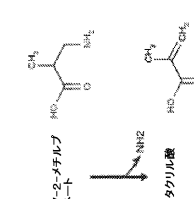


Figure 4

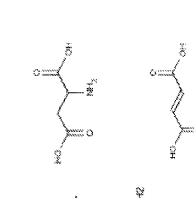
【図 4】



【図 5】



B.



A.



Figure 5

Figure 3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/42426

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12N 1/20; C12P 7/42 (2009.01)

USPC - 435/252.3; 435/146

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC- 435/252.3; 435/146

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Patent/Scholar: hydroxyisobutyrate, methacrylic, optknock, fermentation, microorganism, hmd, dehydratase, serine dehydratase, fumarate hydratase, bakeri

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/141208 A2 (Marx et al.) 13 Dec 2007 (13.12.2007) abstract, pg 13, para 2, pg 14, para 6 and 7, pg 20, para 2, pg 52, para 2, Figs. 1, 2, 5, 17	1-2, 10-11, 13-14, 22-23, 30-31, 33-34, 41, 63, 69-70, 72-73, 79, 128, 138-141, 151
A	US 2007/0111294 A1 (Burgard et al.) 17 May 2007 (17.05.2007) para [0008], [0091], [0105], [0107]	10-11, 13-14, 22, 30-31, 33-34, 41, 69-70, 72-73, 79, 138-141 and 151

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 August 2009 (03.08.2009)

Date of mailing of the international search report

01 SEP 2009

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/42426

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I:- claims 1-256, drawn to a non-naturally occurring microbial organism, comprising a microbial organism having a methacrylic acid pathway comprising at least one exogenous nucleic acid. The first invention encompasses a recombinant organism comprising at least one exogenous nucleic acid encoding 3-hydroxyisobutyrate dehydratase. Additional recombinant microorganism comprising DNA molecules will be searched for an additional fee. Should Applicant have additional recombinant microorganism comprising DNA molecules searched, Applicant must specify the DNA molecule to be searched.

[NOTE: claims 3-9, 12, 15-21, 24-29, 32, 35-40, 42-62, 64-68, 71, 74-78, 80-127, 129-137, 142-150, 152-256 are beyond the scope of the first invention and, therefore, were not searched.]

- Please see extra sheet for continuation -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-2, 10-11, 13-14, 22-23, 30-31, 33-34, 41, 63, 69-70, 72-73, 79, 128, 138-141 and 151

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/42426

***** SUPPLEMENTAL BOX *****

Continuation of:

Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the invention listed as Groups I+ is the recombinant microorganism comprising the specific nucleic acid sequence recited therein. In the instant case, no significant structural similarities can readily be ascertained among the nucleic acid. Without significant structural similarities, the inventions do not share a special technical feature. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Inventions of Group I+ therefore lacks unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 1 0 1

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),
 EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,S
 K,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,
 BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,K
 E,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL
 ,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 バーガード, アンソニー ピー.
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 6 8 2 3, ベルフォンテ, ウォーカー クロッシング
 2 3 7

(72)発明者 オステラウト, ロビン イー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 0 7, サン ディエゴ, オーチャード アベニュー
 4 9 1 0

(72)発明者 ファルクヤ, プリティ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 6, サン ディエゴ, カミニート アルバレス
 1 1 1 2 5

F ターム(参考) 4B024 AA03 CA02 CA20 GA11 HA01
 4B064 AD13 CA19 DA16 DA20
 4B065 AB01 AC14 BA01 BC05 CA28 CA60