

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5821132号
(P5821132)

(45) 発行日 平成27年11月24日(2015.11.24)

(24) 登録日 平成27年10月16日(2015.10.16)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19 Z N A
C 1 2 N	1/11	(2006.01)	C 1 2 N 1/11
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 P	7/40	(2006.01)	C 1 2 P 7/40
C 1 2 P	13/04	(2006.01)	C 1 2 P 13/04

請求項の数 14 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-543455 (P2011-543455)	(73) 特許権者	503220392
(86) (22) 出願日	平成21年12月24日(2009.12.24)		ディーエスエム アイピー アセツ ビー. ブイ.
(65) 公表番号	特表2012-513753 (P2012-513753A)		オランダ国, 6 4 1 1 ティーイー ヘーレン, ヘット オーバールーン 1
(43) 公表日	平成24年6月21日(2012.6.21)	(74) 代理人	100107456
(86) 国際出願番号	PCT/NL2009/050803		弁理士 池田 成人
(87) 国際公開番号	W02010/074577	(74) 代理人	100128381
(87) 国際公開日	平成22年7月1日(2010.7.1)		弁理士 清水 義憲
審査請求日	平成24年11月28日(2012.11.28)	(74) 代理人	100162352
(31) 優先権主張番号	08172919.6		弁理士 酒巻 順一郎
(32) 優先日	平成20年12月24日(2008.12.24)	(74) 代理人	100140888
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 渡辺 欣乃
(31) 優先権主張番号	61/140,795	(74) 代理人	100139000
(32) 優先日	平成20年12月24日(2008.12.24)		弁理士 城戸 博兒
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キシロース異性化酵素遺伝子及びペントース糖の発酵におけるそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

発現するとキシロースをキシロースに直接異性化する能力を細胞に与えるか、又は増加させるヌクレオチド配列を含む真核微生物細胞であって、ヌクレオチド配列がキシロース異性化酵素活性を備えたポリペプチドをコードし、そのポリペプチドのアミノ酸配列は：

i) 配列番号 1、2 及び 3 5 のアミノ酸配列の少なくとも一つと少なくとも 80% の配列同一性を有し、

ii) 1 8 7 ~ 1 9 5 位のキシロース異性化酵素シグネチャ配列 V X W [G P] G R E G [Y S T A] 及び 2 3 2 ~ 2 3 9 位のキシロース異性化酵素シグネチャ配列 [L I V M] E P K P X [E Q] P を含み、

iii) 保存的触媒アミノ酸残基 H i s - 1 0 2、A s p - 1 0 5 及び A s p - 3 4 0 を含み、

iv) 9 1 位のメチオニン残基を含み；及び、

v) 下記からなる群から選択される 1 つ又は 2 つ以上のアミノ酸配列要素を含み、

(a) 1 3 4 ~ 1 3 9 位のアミノ酸配列 T G I K L L、

(b) 2 3 0 位のフェニルアラニン残基、

(c) 2 6 4 位及び 2 6 5 位それぞれのアミノ酸フェニルアラニン及びリシン、

(d) 2 7 4 ~ 2 7 8 位のアミノ酸配列 T L A G H、

(e) 3 8 7 ~ 3 9 1 位のアミノ酸配列 R Y A S F、

(f) 3 9 4 位のグリシン残基、並びに

(g) 4 3 1 位のアラニン残基、

ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号 3 にアラインするとき、アミノ酸配列中の ii) ~ v) 及び (a) ~ (g) 位は、配列番号 3 の参照アミノ酸配列中の位置に相当し、及び前記ポリペプチドは配列番号 3 ~ 7 の 1 つとの配列同一性が 8 0 % を上回るアミノ酸配列を含まず、ヌクレオチド配列が、クロストリジウム (Clostridium) 属の細菌、フソバクテリウム (Fusobacterium) 属の細菌又はユウレイボヤ (Clostridium) 属の尾索類から得られるアミノ酸配列をコードする、真核微生物細胞。

【請求項 2】

10

細胞が、サッカロミセス (Saccharomyces)、クリベロマイセス (Kluyveromyces)、カンジダ (Candida)、ピキア (Pichia)、シゾサッカロミセス (Schizosaccharomyces)、ハンゼヌラ (Hansenula)、クロエケラ (Klöeckera)、シワニオマイセス (Schwannomyces)、ヤロウイア (Yarrowia)、アスペルギルス (Aspergillus)、トリコデルマ (Trichoderma)、フミコラ (Humicola)、アクレモニウム (Acremonium)、フザリウム (Fusarium) 及びペニシリウム (Penicillium) からなる群から選択される属の酵母又は糸状菌である、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】

20

細胞が、嫌気性アルコール発酵できる酵母である、請求項 2 に記載の細胞。

【請求項 4】

酵母が、S . セレビシエ (S . cerevisiae)、S . イグジグース (S . exiguus)、S . バヤヌス (S . bayanus)、K . ラクティス (K . lactis)、K . マルキシアヌス (K . marxianus) 及びシゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) からなる群から選択される種に属する、請求項 3 に記載の細胞。

【請求項 5】

キシロース異性化酵素活性を備えたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、キシロースをキシルロースに異性化する能力を細胞に与えるために、細胞においてヌクレオチド配列の十分な発現を引き起こすプロモーターに作動可能に連結している、請求項 1 から 4 までのいずれかに記載の細胞。

30

【請求項 6】

細胞がさらに、特異的キシルロースキナーゼ活性を増加させる遺伝子改変を含む、請求項 1 から 5 までのいずれかに記載の細胞。

【請求項 7】

細胞が、ペントースリン酸経路の流量を増加させる遺伝子改変を含む、請求項 1 から 6 までのいずれかに記載の細胞。

【請求項 8】

宿主細胞が、細胞における非特異的アルドース還元酵素活性を減少させる遺伝子改変を含む、請求項 1 から 7 までのいずれかに記載の細胞。

40

【請求項 9】

細胞が、L - アラビノースを D - キシルロース 5 - リン酸に変換する能力を示す、請求項 1 から 8 までのいずれかに記載の細胞。

【請求項 10】

細胞が、以下からなる群から選択される特性を生じる少なくとも 1 つの他の遺伝子改変を含む、請求項 1 から 9 までのいずれかに記載の細胞：

- (a) 宿主細胞へのキシロース及びアラビノースの少なくとも 1 つの輸送の増加、
- (b) 異化代謝産物抑制に対する感受性の減少、
- (c) エタノール、浸透圧又は有機酸に対する耐性の増加、並びに

50

(d) 副産物生成の減少。

【請求項 1 1】

細胞が、エタノール、乳酸、3-ヒドロキシ-プロピオン酸、アクリル酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、アミノ酸、1,3-プロパン-ジオール、エチレン、グリセロール、酪酸、カプロエート、ブタノール、グリオキシレート、 β -ラクタム抗生物質及びセファロスポリンからなる群から選択される少なくとも1種の発酵産物を生成する能力を有する、請求項 1 から 1 0 までのいずれかに記載の細胞。

【請求項 1 2】

エタノール、乳酸、3-ヒドロキシ-プロピオン酸、アクリル酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、アミノ酸、1,3-プロパン-ジオール、エチレン、グリセロール、酪酸、カプロエート、ブタノール、グリオキシレート、 β -ラクタム抗生物質及びセファロスポリンからなる群から選択される発酵産物を生成する方法であって、

キシロース源、及び場合によってアラビノース源を含有する培地を、請求項 1 から 1 1 までのいずれか一項で定義した細胞で発酵し、それによって前記細胞がキシロースを発酵産物に発酵するステップを含む方法。

【請求項 1 3】

さらに発酵産物を回収するステップを含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

培地がグルコース源も含有する、請求項 1 2 又は 1 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、キシロースをキシロースに異性化する能力を真核微生物宿主細胞に与える、宿主細胞の形質転換における、キシロース異性化酵素をコードする核酸配列の使用に関する。形質転換宿主細胞は、ペントース含有培地の発酵によるエタノール及びその他の発酵産物の生産方法で使用される。

【0002】

発明の背景

植物バイオマスのヘミセルロース画分からの経済的に実行可能なエタノール生産には、ペントース及びヘキソースの両方を相互に匹敵する速度及び高収率で同時に変換することが必要である。酵母、特にサッカロミセス属種 (*Saccharomyces* spp.) は、好氣的にも嫌氣的にもヘキソースで迅速に増殖できるので、この方法に最も適切な候補である。さらに、(遺伝子改変された)細菌よりも、リグノセルロース加水分解物の毒性環境に対する耐性がずっと高い。

【0003】

野生型 *S. cerevisiae* 株はペントース糖キシロースをゆっくり代謝することができるが、キシロースを代謝することはできない。1980年代に既に、キシロースを利用するために酵母を代謝操作するには、キシロースをキシロースに変換する異種性のキシロース還元酵素及びキシリトール脱水素酵素を発現させるよりもキシロース異性化酵素 (XI, EC 5.3.1.5) を導入することに基づくべきであることが示唆された。残念ながら、*T. thermophilus* 異性化酵素を注目すべき例外として、細菌性キシロース異性化酵素を *S. cerevisiae* に導入して、機能的に発現したキシロース異性化酵素を生成する試みは全て失敗した。この *T. thermophilus* 異性化酵素は、*S. cerevisiae* で機能的に発現したが、増殖の可能な温度で非常に低い活性しか認められなかった。この状況は、嫌気性真菌ピロミセス属種 (*Piromyces* sp.) E2 から新たに発見されたキシロース異性化酵素の *S. cerevisiae* への導入によって劇的に変化し、高レベルの酵素活性が認められ、この株は嫌氣的に増殖し、キシロースからエタノールを生成できるようになった (WO 03/062340 及び WO 06/009434)。このような酵母株は初めて、商用規模のエタノール生産に適合したキシロース消費及びエタノール生成の比速度を実現した。

【 0 0 0 4 】

酵母におけるピロミセスキシロース異性化酵素の機能的発現が発見されて以来、いくつかの報告で、酵母におけるその他のキシロース異性化酵素の機能的発現が明らかとなり、それらは全てピロミセス酵素と70%を上回るアミノ酸配列同一性を共有していた。例えば、バクテロイド (*Bacteroides*) の細菌性キシロース異性化酵素 (WO 0 4 / 0 9 9 3 8 1、WO 0 6 / 0 0 9 4 3 4、WO 0 9 / 1 0 9 6 3 3) 並びにシラマイセス (*Cylindrocapsa*) (WO 0 4 / 0 9 9 3 8 1) 及びオルピノマイセス (*Orpinomyces*) (Madhavan 他、2008、DOI 10.1007/s00253-008-1794-6) の真菌性キシロース異性化酵素である。

【 0 0 0 5 】

しかし、2008年12月24日より以前には、ピロミセス酵素とのアミノ酸配列同一性が70%未満のキシロース異性化酵素の、酵母における機能的な発現の報告はなかった。ごく最近、2009年2月に、Brat 他 (2009、Appl. Environ. Microbiol. 75: 2304~2311) が、ピロミセス酵素とのアミノ酸配列の同一性が52%しかない嫌気性細菌クロストリジウム・フィトフェルメンタンス (*Clostridium phytofermentans*) のキシロース異性化酵素の酵母 *S. cerevisiae* における機能的発現を公表した。

【 0 0 0 6 】

現在では、ピロミセス、シラマイセス・アベレンシス (*Cylindrocapsa abrensis*)、ニセツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、ヘモフィラス・ソムナス (*Haemophilus somnus*)、カタコウレイボヤ (*Ciona intestinalis*)、クロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*)、サーモトガ・マリティマ (*Thermotoga maritima*)、バクテロイデス・フラギリス (*Bacteroides fragilis*)、パークホルデリア・フィトフィルマンズ (*Burkholderia phytofirmans*)、アルスロバクター・アウレッセンス (*Arthrobacter aurescens*) 及びフソバクテリウム・モルティフェラム (*Fusobacterium mortiferum*) のキシロース異性化酵素配列を含むおよそ450キシロース異性化酵素アミノ酸配列がジェンバンク及びその他の配列データベースで公的に利用可能である。

【 0 0 0 7 】

しかしながら、*S. cerevisiae* のような宿主細胞を形質転換してキシロースをキシロースに異性化する能力を与え、ペントースを含有する供給材料を発酵することによってエタノール又はその他の発酵産物を生産する方法において、このような形質転換宿主細胞の使用を可能にするため使用できるその他のキシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、未だに本技術分野では必要とされている。

【 0 0 0 8 】

本発明の説明定義

本明細書では、酵素「キシロース異性化酵素」(EC 5.3.1.5) とは、D-キシロースからD-キシロースへ、及びその逆の直接異性化を触媒する酵素と定義する。この酵素は、D-キシロースケト異性化酵素としても公知である。いくつかのキシロース異性化酵素は、D-グルコースとD-フルクトースとの間の変換を触媒することもできるので、時にはグルコース異性化酵素と呼ばれる。キシロース異性化酵素は補因子としてマグネシウムを必要とする。本発明のキシロース異性化酵素はさらに、本明細書で後述するようにアミノ酸配列によって定義することができる。同様に、キシロース異性化酵素は、この酵素をコードするヌクレオチド配列並びに本明細書で後述するようにキシロース異性化酵素をコードする参照ヌクレオチド配列にハイブリッド形成するヌクレオチド配列によって定義することができる。本明細書では、キシロース異性化酵素活性の1単位(U)は、リン酸緩衝液50mM (pH 7.0)、キシロース10mM及びMgCl₂ 10mMを

10

20

30

40

50

含有する反応混合物中において、37 で、1分間に1nmolのキシルロースを生成する酵素の量と定義する。生成したキシルロースは、Dische and Borenfreund (1951, J. Biol. Chem. 192: 583~587)の方法又は例において記載したHPLCによって測定した。

【0009】

本明細書では、配列同一性とは、配列比較により決定される、2つ以上のアミノ酸（ポリペプチド若しくはタンパク質）配列又は2つ以上の核酸（ポリヌクレオチド）配列の関係と定義する。当業界では、「同一性」はまた、場合によって、アミノ酸配列又は核酸配列の文字列間の一致によって決定されるアミノ酸配列又は核酸配列の間の配列関連性の程度を意味している。2つのアミノ酸配列の間の「類似性」は、1つのポリペプチドのアミノ酸配列及びその保存的アミノ酸置換を第2のポリペプチドの配列と比較することによって決定する。「同一性」及び「類似性」は、公知の方法によって容易に計算することができる。「配列同一性」又は「配列類似性」という用語は、2つの（ポリ）ペプチド又は2つのヌクレオチド配列が好ましくは（比較する少なくとも最短の配列の）全体の長さについて最適に整列され、例えば、プログラムClustalW(1.83)、GAP又はBESTFITなどによって初期設定のパラメータを使用して、一致の数を最大限にし、ギャップの数を最小限にしたとき、本明細書の他のところで定義した配列同一性の少なくとも一定の割合を共有することを意味する。GAPは、Needleman and Wunschグローバルアラインメントアルゴリズムを使用して、2つの配列を全体の長さについて整列し、一致の数を最大限にし、ギャップの数を最小限にする。一般的に、GAP初期設定パラメータは、ギャップクリエーションペナルティ=50（ヌクレオチド）/8（タンパク質）及びギャップエクステンションペナルティ=3（ヌクレオチド）/2（タンパク質）を用いて使用した。ヌクレオチドでは、使用した初期設定のスコアリングマトリクスはnws gap dnaで、タンパク質では、初期設定のスコアリングマトリクスはBlosum62である（Henikoff & Henikoff、1992、PNAS 89、915~919）。本発明のタンパク質配列を整列させるために好ましいマルチプルアラインメントプログラムは、ClustalW(1.83)で、blosumマトリクス及び初期設定（ギャップオープンペナルティ：10、ギャップエクステンションペナルティ：0.05）を使用する。RNA配列がDNA配列と本質的に類似であるか、又はDNA配列と一定程度の配列同一性を有するというとき、DNA配列のチミン（T）がRNA配列のウラシル（U）と等しいと見なされることは明らかである。配列の整列及びパーセント配列同一性のスコアは、コンピュータプログラム、例えば、Accelrys Inc.、9685 Scranton Road、San Diego、CA 92121-3752 USAから入手可能なGCGウィスコンシンパッケージ、バージョン10.3又はウィンドウズ用オープンソースソフトウェアEmboss（最新バージョン2.7.1-07）を使用して決定することができる。或いは、パーセント類似性又は同一性は、FASTA、BLASTなどのデータベースに対して検索することによって決定することができる。

【0010】

同一性を決定するために好ましい方法は、試験配列間に最大の一一致が得られるように設計される。同一性及び類似性を決定する方法は、公的に利用可能なコンピュータプログラムに体系化される。2つの配列間の同一性及び類似性を決定するための好ましいコンピュータプログラム法には、例えば、GCGプログラムパッケージ（Devereux, J. 他、Nucleic Acids Research 12(1):387(1984)）、BestFit、BLASTP、BLASTN及びFASTA（Altschul, S.F. 他、J. Mol. Biol. 215:403~410(1990)）が含まれる。BLAST XプログラムはNCBI及びその他の情報源から公的に入手できる（BLAST Manual、Altschul, S. 他、NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S. 他、J. Mol. Biol. 215:403~410(1990)）。よく知られたSmith Watermanアル

10

20

30

40

50

ゴリズムも同一性決定に使用することができる。

【0011】

ポリペプチド配列比較のための好ましいパラメータには以下の、アルゴリズム：Needleman and Wunsch、J. Mol. Biol. 48：443～453（1970）；比較マトリクス：Hentikoff and HentikoffのBLOSSUM62、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89：10915～10919（1992）；ギャップペナルティ：12；及びギャップ長ペナルティ：4が含まれる。これらのパラメータを使用して有用なプログラムはMadison, WIにあるGenetics Computer Groupの「Ogap」プログラムとして公的に利用可能である。前述のパラメータはアミノ酸比較（エンドギャップに対するペナルティ無し）のための初期設定パラメータである。

10

【0012】

核酸配列比較のための好ましいパラメータには以下の、アルゴリズム：Needleman and Wunsch、J. Mol. Biol. 48：443～453（1970）；比較マトリクス：一致 = +10、不一致 = 0；ギャップペナルティ：50；ギャップ長ペナルティ：3が含まれる。Madison, WisにあるGenetics Computer GroupのGapプログラムとして利用可能である。前記したものは核酸比較のための初期設定パラメータである。

【0013】

場合によって、アミノ酸類似性の程度の決定において、当業者には明らかなように、いわゆる「保存的」アミノ酸置換を考慮に入れることもできる。保存的アミノ酸置換とは、類似の側鎖を有する残基の互換性を意味する。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群はセリン及びトレオニン；アミドを含有する側鎖を有するアミノ酸の群はアスパラギン及びグルタミン；芳香族側鎖を有するアミノ酸の群はフェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン；塩基性側鎖を有するアミノ酸の群はリシン、アルギニン及びヒスチジン；硫黄を含有する側鎖を有するアミノ酸の群はシステイン及びメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換群は、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リシン - アルギニン、アラニン - バリン、及びアスパラギン - グルタミンである。本明細書において開示したアミノ酸配列の置換変種は、開示した配列の少なくとも1つの残基が除去され、その場所に異なる残基が挿入されたものである。好ましくは、アミノ酸の変化は保存的である。天然に生じるアミノ酸それぞれの好ましい保存的置換は以下の通りである：Alaからserへ；Argからlysへ；Asnからgln又はhisへ；Aspからgluへ；Cysからser又はalaへ；Glnからasnへ；Gluからaspへ；Glyからproへ；Hisからasn又はglnへ；Ileからleu又はvalへ；Leuからile又はvalへ；Lysからargへ；gln又はglu；Metからleu又はileへ；Pheからmet、leu又はtyrへ；Serからthrへ；Thrからserへ；Trpからtyrへ；Tyrからtrp又はpheへ；及びValからile又はleuへ。

20

30

【0014】

本発明のキシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列はまた、中等度の、又は好ましくは厳密なハイブリッド形成条件下において、それぞれ配列番号2のヌクレオチド配列とハイブリッド形成する能力によって定義することができる。本明細書では、厳密なハイブリッド形成条件とは、少なくとも約25、好ましくは約50ヌクレオチド、75又は100及び最も好ましくは約200以上のヌクレオチドの核酸配列を、約65の温度で、塩1Mを含む溶液中、好ましくは6×SSC又は同程度のイオン強度を有する任意のその他の溶液中でハイブリッド形成させ、65で、塩約0.1M以下を含む溶液中、好ましくは0.2×SSC又は同程度のイオン強度を有する任意のその他の溶液中で洗浄する条件と定義する。好ましくは、ハイブリッド形成は一晚、すなわち少なくとも10時間行い、好ましくは、洗浄は洗浄液を少なくとも2回交換して少なくとも1時間行う。これ

40

50

らの条件により、約90%以上の配列同一性を有する配列の特異的ハイブリッド形成が通常可能であろう。

【0015】

本明細書では、中等度の条件とは、少なくとも50ヌクレオチド、好ましくは約200以上のヌクレオチドの核酸配列を、約45℃の温度で、塩約1Mを含む溶液中、好ましくは6×SSC又は同程度のイオン強度を有する任意のその他の溶液中でハイブリッド形成させ、室温で、約1Mの塩を含む溶液中、好ましくは6×SSC又は同程度のイオン強度を有する任意のその他の溶液中で洗浄する条件と定義する。好ましくは、ハイブリッド形成は一晚、すなわち少なくとも10時間行い、好ましくは、洗浄は洗浄液を少なくとも2回交換して少なくとも1時間行う。これらの条件により、最大50%の配列同一性を有する配列の特異的ハイブリッド形成が通常可能であろう。当業者であれば、同一性が50%と90%の間で変動する配列を特異的に同定するためにこれらのハイブリッド形成条件を変更できるであろう。

10

【0016】

本明細書では、「核酸構築物」又は「核酸ベクター」とは、組換えDNA技術の使用によって生じた人工の核酸分子を意味するものと理解される。したがって、「核酸構築物」という用語は、天然に生じる核酸分子を含まないが、核酸構築物は天然に生じる核酸分子(の一部)を含んでいてもよい。「発現ベクター」又は「発現構築物」という用語は、宿主細胞又はこのような配列に適合した宿主生物における遺伝子の発現に影響を及ぼすことができるヌクレオチド配列を意味する。これらの発現ベクターは一般的に、少なくとも適切な転写制御配列及び場合により3'転写終結シグナルを含む。発現に影響を及ぼすのに必要であるか、又は役立つ他の因子、例えば発現エンハンサー配列も存在することができる。発現ベクターは適切な宿主細胞に導入されると、宿主細胞のインビトロ細胞培養においてコーディング配列の発現に影響を及ぼすことができる。発現ベクターは、本発明の宿主細胞又は生物における複製に適している。

20

【0017】

本明細書では、「プロモーター」又は「転写制御配列」という用語は、1つ又は複数のコーディング配列の転写を制御するように機能し、転写方向に関してコーディング配列の転写開始部位の上流に位置する核酸断片を意味しており、DNA依存性RNAポリメラーゼのための結合部位、転写開始部位並びに限定はしないが、転写因子結合部位、抑制因子及び活性化タンパク質結合部位を含む任意のその他のDNA配列並びにプロモーターからの転写量を直接的若しくは間接的に調節するように作用することが当業者には公知の任意のその他のヌクレオチド配列の存在によって構造的に同定される。「構成的」プロモーターとは、ほとんどの生理学的及び発生的条件においてほとんどの組織で活性であるプロモーターである。「誘導的」プロモーターとは、生理学的又は発生的に、例えば化学誘発剤の適用によって調節されるプロモーターである。

30

【0018】

「選択的マーカー」という用語は、当業者によく知られた用語で、本明細書では任意の遺伝子実体を記載するために使用されており、発現したときこの選択的マーカーを含有する細胞(単数又は複数)を選択するように使用できる。「リポーター」という用語は、マーカーと同義に使用することができるが、目に見えるマーカー、例えば、緑色蛍光蛋白質(GFP)を意味するために主に使用される。選択的マーカーは、優性又は劣性又は双方向性であってもよい。

40

【0019】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結した」という用語は、機能的に関連するポリヌクレオチド要素の連結を意味する。ある核酸が別の核酸配列と機能的関連に配置されている場合に、その核酸は「作動可能に連結している」。例えば、転写制御配列が、コーディング配列の転写に影響を及ぼすならば、転写制御配列はコーディング配列に作動可能に連結している。作動可能に連結したとは、連結されているDNA配列が一般的に隣接しており、2つのタンパク質コード領域を結合する必要がある場合には、連続して、リー

50

ディングフレーム内にあることを意味する。

【0020】

「タンパク質」又は「ポリペプチド」という用語は同義に使用され、特異的な作用様式、大きさ、3次元構造又は起源に関係なく、アミノ酸鎖からなる分子を意味する。

【0021】

本明細書では、「真菌 (fungi) (単数 fungus)」とは、外部の食物を消化し、栄養分子を細胞内に吸収する従属栄養真核微生物と理解される。真菌は、真核生物の独立した界であり、酵母、カビ及びキノコを含む。本明細書で使用した真菌 (単数及び複数) (fungi and fungus) 及び真菌の (fungal) という用語は、したがって明確に酵母並びに糸状菌を含む。

10

【0022】

「遺伝子」という用語は、細胞内でRNA分子 (例えば、mRNA) に転写される領域 (転写された領域) を含み、適切な制御領域 (例えば、プロモーター) に作動可能に連結したDNA断片を意味する。遺伝子は通常、いくつかの作動可能に連結した断片、例えば、プロモーター、5'リーダー配列、コーディング領域及びポリアデニル化部位を含む3'非翻訳配列 (3'末端) を含む。「遺伝子の発現」とは、適切な制御領域、特にプロモーターに作動可能に連結したDNA領域がRNAに転写され、RNAが生物学的に活性である、すなわち、生物学的に活性のあるタンパク質又はペプチドに翻訳され得るプロセスを意味する。

【0023】

「同種」という用語は、所与の (組換え) 核酸又はポリペプチド分子と所与の宿主生物又は宿主細胞との間の関係を示すために使用するとき、天然ではその核酸又はポリペプチド分子が、同種、好ましくは同変種若しくは同株の宿主細胞又は生物によって生成されることを意味するものと理解される。もし宿主細胞と同種ならば、ポリペプチドをコードする核酸配列は通常 (必須ではないが)、自然な環境におけるものとは別の (異種の) プロモーター配列、並びに、もし適切ならば、別の (異種の) 分泌シグナル配列及び/又はターミネーター配列に作動可能に連結されるであろう。制御配列、シグナル配列、ターミネーター配列などはまた、宿主細胞と同種であってもよいと理解される。この場合、「同種の」配列要素のみを使用することが「自己クローニングした」遺伝子改変生物 (GMO) の構築を可能にする (自己クローニングは、本明細書では European Directive 98/81/EC Annex II のように定義する)。2つの核酸配列の関連性を示すために使用するとき、「同種」という用語は、1つの1本鎖核酸配列が相補的な1本鎖核酸配列にハイブリッド形成できることを意味する。ハイブリッド形成の程度は、配列間の同一性の量並びに後に論じるような温度及び塩濃度などのハイブリッド形成条件を含むいくつかの因子に左右され得る。

20

【0024】

「異種」という用語は、核酸 (DNA若しくはRNA) 又はタンパク質に関して使用するとき、その核酸 (DNA若しくはRNA) 又はタンパク質が存在する生物、細胞、ゲノム又はDNA若しくはRNA配列の一部として天然では生じない核酸又はタンパク質、或いは天然に見出されるものとは異なる細胞或いはゲノム又はDNA若しくはRNA配列における位置 (単数又は複数) に見出される核酸又はタンパク質を意味する。異種核酸又はタンパク質は、導入された細胞には内在していないが、別の細胞から得られたか、又は合成によって、若しくは組換えによって生成された。一般的に、必須ではないが、このような核酸は、DNAが転写又は発現する細胞によって通常生成されないタンパク質をコードする。同様に、外来性RNAは、外来性RNAが存在する細胞では通常発現しないタンパク質をコードする。異種核酸及びタンパク質はまた、外来性核酸又はタンパク質を意味することができる。当業者が、発現する細胞にとって異種又は外来性であると認識する任意の核酸又はタンパク質は、本明細書では、異種核酸又はタンパク質という用語によって包含される。異種という用語は、核酸又はアミノ酸配列の非天然の組合せ、すなわち、一緒にした配列の少なくとも2つが互いに関して外来性である組合せにも適用される。

40

50

【 0 0 2 5 】

本発明の詳細な説明

現在では、およそ450キシロース異性化酵素アミノ酸配列がジェンバンク及びその他の配列データベースで公的に利用可能である。それらの中でも、例えば、ピロミセス、シラマイセス及びオルピノマイセスなどの嫌気性真菌のキシロース異性化酵素並びにバクテロイドの細菌性キシロース異性化酵素を含む、酵母で機能的に発現する能力が知られているキシロース異性化酵素のアミノ酸配列がいくつかあり、それらは全てピロミセス酵素と70%を上回るアミノ酸配列同一性を共有している。本発明者らは今や驚くべきことに、ピロミセス酵素のアミノ酸配列とのアミノ酸配列同一性が70%未満であるという意味でピロミセス酵素と関連はないが、それにも関わらず酵母で機能的に(すなわち、活性)発現する能力を有するキシロース異性化酵素のアミノ酸配列を発見した。さらに、本発明者らは、酵母で機能的に発現する能力を備えたキシロース異性化酵素全てにおいて共通のいくつかのアミノ酸配列要素を同定した。本明細書では、酵母におけるキシロース異性化酵素の機能的発現とは、S・セレピシエの2μベースプラスミド上の解糖系プロモーターからのキシロース異性化酵素のコドン最適化コーディング配列の発現と理解される。これによって、好ましくはキシロースを消費してエタノールを生成する嫌気性条件下で、より好ましくは増殖率、バイオマス及びエタノール収率の少なくとも1つがコドンを最適化したピロミセスキシロース異性化酵素コーディング配列によって実現されるものの少なくとも10、20、50又は80%で、それ以外は同一の条件下で、単一炭素源としてキシロースによって酵母の検出可能な増殖が可能である。好ましくは、機能的発現とは、35、33、30又は28を下回り、20、22又は25を上回る温度で、単一炭素源としてキシロースで、酵母の検出可能な増殖を可能にする発現である。

10

20

【 0 0 2 6 】

第1の側面では、本発明はキシロースをキシルロースに異性化する能力を有する形質転換宿主細胞に関する。キシロースをキシルロースに異性化する能力は、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物で宿主細胞を形質転換することによって宿主細胞に与えられる。形質転換宿主細胞の、キシロースをキシルロースに異性化する能力は、キシロース還元酵素及びキシリトール脱水素酵素それぞれによって触媒されてキシリトール中間体を介してキシロースをキシルロースにする2段階変換とは対照的に、キシロース異性化酵素によって触媒された単一の反応においてキシロースをキシルロースに直接異性化することを意味するものと理解される。

30

【 0 0 2 7 】

一態様では、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、

(a) キシロース異性化酵素活性を備えたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ポリペプチドが配列番号1(C・ディフィシレ)のアミノ酸配列と少なくとも45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、95、96、97、98又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むヌクレオチド配列、

40

(b) キシロース異性化酵素活性を備えたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ポリペプチドが配列番号2(ユウレイボヤ)のアミノ酸配列と少なくとも45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、95、96、97、98又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むヌクレオチド配列、

(c) キシロース異性化酵素活性を備えたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ポリペプチドが配列番号35(F・モルティフェラム)のアミノ酸配列と少なくとも45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、5

50

7、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、95、96、97、98又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むヌクレオチド配列、

(d)(a)、(b)又は(c)のヌクレオチド配列とハイブリッド形成する相補鎖のヌクレオチド配列、及び

(e)遺伝子コードの縮重のため、(d)のヌクレオチド配列の配列とは異なる配列のヌクレオチド配列からなる群から選択される。

【0028】

一態様では、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、酵母で機能的に発現する能力を備えたキシロース異性化酵素において共通の1つ又は2つ以上のアミノ酸配列要素を含むアミノ酸配列をコードする。この態様では、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、

- (a) 91位のメチオニン残基、
- (b) 134～139位のアミノ酸配列TGIKLL、
- (c) 230位のフェニルアラニン残基、
- (d) 264位及び265位それぞれのアミノ酸フェニルアラニン及びリシン、
- (e) 274～278位のアミノ酸配列TLAGH、
- (f) 387～391位のアミノ酸配列RYASF、
- (g) 394位のグリシン残基、並びに

(h) 431位のアラニン残基からなる群から選択される1つ又は2つ以上のアミノ酸配列要素を含むアミノ酸配列をコードする。

【0029】

この態様では、コードされたキシロース異性化酵素は、要素(a)～(h)の少なくとも1、2、3、4、5、6、7又は8つ全てを、可能性のある全組合せで含んでもよい。したがって、この態様では、コードされたキシロース異性化酵素は、以下の要素又は要素の組合せを含んでもよい。

- (a) ; (b) ; (c) ; (d) ; (e) ; (f) ; (g) ; (h) ; (a) 及び (b)
- ; (a) 及び (c) ; (a) 及び (d) ; (a) 及び (e) ; (a) 及び (f) ; (a)
- 及び (g) ; (a) 及び (h) ; (b) 及び (c) ; (b) 及び (d) ; (b) 及び (e)
- ; (b) 及び (f) ; (b) 及び (g) ; (b) 及び (h) ; (c) 及び (d) ; (c)
- 及び (e) ; (c) 及び (f) ; (c) 及び (g) ; (c) 及び (h) ; (d) 及び (e)
- ; (d) 及び (f) ; (d) 及び (g) ; (d) 及び (h) ; (e) 及び (f) ; (e)
- 及び (g) ; (e) 及び (h) ; (f) 及び (g) ; (f) 及び (h) ; (g) 及び (h)
- ; (a)、(b) 及び (c) ; (a)、(b) 及び (d) ; (a)、(b) 及び (e)
- ; (a)、(b) 及び (f) ; (a)、(b) 及び (g) ; (a)、(b) 及び (h)
- ; (a)、(c) 及び (d) ; (a)、(c) 及び (e) ; (a)、(c) 及び (f)
- ; (a)、(c) 及び (g) ; (a)、(c) 及び (h) ; (a)、(d) 及び (e) ;
- (a)、(d) 及び (f) ; (a)、(d) 及び (g) ; (a)、(d) 及び (h) ; (a)
- 、(e) 及び (f) ; (a)、(e) 及び (g) ; (a)、(e) 及び (h) ; (a)
- 、(f) 及び (g) ; (a)、(f) 及び (h) ; (a)、(g) 及び (h) ; (b)
- 、(c) 及び (d) ; (b)、(c) 及び (e) ; (b)、(c) 及び (f) ; (b)、(c)
- 、(c) 及び (g) ; (b)、(c) 及び (h) ; (b)、(d) 及び (e) ; (b)、(d)
- 、(d) 及び (f) ; (b)、(d) 及び (g) ; (b)、(d) 及び (h) ; (b)、(e)
- 、(e) 及び (f) ; (b)、(e) 及び (g) ; (b)、(e) 及び (h) ; (b)、(f) 及び (g)
- ; (b)、(f) 及び (h) ; (b)、(g) 及び (h) ; (c)、(d) 及び (e)
- ; (c)、(d) 及び (f) ; (c)、(d) 及び (g) ; (c)、(d) 及び (h)
- ; (c)、(e) 及び (f) ; (c)、(e) 及び (g) ; (c)、(e) 及び (h)
- ; (c)、(f) 及び (g) ; (c)、(f) 及び (h) ; (c)、(g) 及び (h)
- ; (d)、(e) 及び (f) ; (d)、(e) 及び (g) ; (d)、(e) 及び (h) ;

10

20

30

40

50

e)、(f)、(g)及び(h);(b)、(c)、(d)、(e)及び(f);(b)、(c)、(d)、(e)及び(g);(b)、(c)、(d)、(e)及び(h);(b)、(c)、(d)、(f)及び(g);(b)、(c)、(d)、(f)及び(h);(b)、(c)、(d)、(g)及び(h);(b)、(c)、(e)、(f)及び(g);(b)、(c)、(e)、(f)及び(h);(b)、(c)、(e)、(g)及び(h);(b)、(c)、(f)、(g)及び(h);(b)、(d)、(e)、(f)及び(g);(b)、(d)、(e)、(f)及び(h);(b)、(d)、(e)、(g)及び(h);(b)、(d)、(f)、(g)及び(h);(b)、(e)、(f)、(g)及び(h);(c)、(d)、(e)、(f)及び(g);(c)、(d)、(e)、(f)及び(h);(c)、(d)、(e)、(g)及び(h);(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(h);(c)、(e)、(f)、(g)及び(h);(d)、(e)、(f)、(g)及び(h);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)及び(f);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)及び(g);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)及び(h);(a)、(b)、(c)、(d)、(f)及び(g);(a)、(b)、(c)、(d)、(f)及び(h);(a)、(b)、(c)、(e)、(f)及び(g);(a)、(b)、(c)、(e)、(f)及び(h);(a)、(b)、(c)、(f)、(g)及び(h);(a)、(b)、(d)、(e)、(f)及び(g);(a)、(b)、(d)、(e)、(f)及び(h);(a)、(b)、(d)、(e)、(g)及び(h);(a)、(b)、(d)、(f)、(g)及び(h);(a)、(b)、(e)、(f)、(g)及び(h);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(g);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(h);(a)、(c)、(d)、(e)、(g)及び(h);(a)、(c)、(d)、(f)、(g)及び(h);(a)、(c)、(e)、(f)、(g)及び(h);(a)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(h);(b)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(g);(b)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(h);(b)、(c)、(d)、(f)、(g)及び(h);(b)、(c)、(e)、(f)、(g)及び(h);(b)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(h);(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(h);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(g);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(h);(a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)及び(h);(a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)及び(h);(a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(h);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(h);並びに最後に、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(h)。

さらに、(b)、(d)、(e)及び(f)のアミノ酸配列の位置に対応する位置のアミノ酸配列は好ましくは、(b)、(d)、(e)及び(f)のアミノ酸配列と1、2又は3つしかアミノ酸が異なっていなくてもよい。好ましくは、要素(b)は少なくとも136位のIからなり、要素(d)は少なくとも264位のFからなり、要素(f)は少なくとも391位のF又はYからなる。好ましい一態様では、コードされたキシロース異性化酵素は要素(a)、(f)、(g)及び(h)の少なくとも1つを含む。より好ましくは、コードされたキシロース異性化酵素はさらに、要素(b)及び(c)の少なくとも1つを含み、最も好ましくはコードされたキシロース異性化酵素はさらに、要素(d)及び(e)の少なくとも1つを含む。好ましい一態様では、コードされたキシロース異性化酵素は少なくとも要素(a)を含み、より好ましくはさらに異性化酵素は少なくとも要素(b)、(c)及び/又は(g)を含み、さらにより好ましくはさらに異性化酵素は少なくとも要素(d)、(f)及び/又は(h)を含み、最も好ましくは異性化酵素はさらに要素(e)を含む。

【0030】

前記配列要素(a)~(h)のアミノ酸の位置は、配列番号3のピロミセスキシロース

10

20

30

40

50

異性化酵素の参照アミノ酸配列における位置を意味する。配列番号3以外の本発明のアミノ酸配列では、好ましくは、配列要素(a)~(h)のアミノ酸の位置は、配列番号3における、好ましくは初期設定を使用したClustalW(1.83)配列アラインメントにおける配列要素(a)~(h)の位置に対応するアミノ酸の位置に存在する。当業者は、前記において定義したようなアミノ酸配列アラインメントアルゴリズムを使用して、配列番号3以外のキシロース異性化酵素アミノ酸配列において対応するアミノ酸の位置を同定する方法を理解している。このようなアラインメントの一例を表4に表し、左に示した生物のキシロース異性化酵素アミノ酸配列のClustalW(1.83)多重配列アラインメントを示している。表4の網掛けしたアミノ酸ピロミセス配列(配列番号3)は、酵母で機能的に発現する能力を有するキシロース異性化酵素において共有される配列要素を示している。

10

【0031】

一態様では、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、配列番号3~7の1つ又は複数ではないアミノ酸配列をコードする。好ましくは、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、配列番号3~7からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列との配列同一性が99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、89、88、87、86、85、84、83、82、81、80、79、78、77、76、75、74、73、72、71若しくは70%を上回るアミノ酸配列を有さない(又は未満のアミノ酸配列を有する)。

【0032】

一態様では、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、配列番号35の1つ又は複数ではないアミノ酸配列をコードする。好ましくは、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、配列番号35からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列との配列同一性が99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、89、88、87、86、85、84、83、82、81、80、79、78、77、76、75、74、73、72、71若しくは70%を上回るアミノ酸配列を有さない(又は未満のアミノ酸配列を有する)。

20

【0033】

一態様では、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、
 (a) WO03/062340で開示されたピロミセスキシロース異性化酵素、
 (b) WO04/099381及びWO06/009434で開示されたバクテロイデス・タイオタオミクロン(Bacteroides thetaiotaomicron)キシロース異性化酵素、
 (c) WO04/099381で開示されたシラマイセスキシロース異性化酵素、及び
 (d) Madhavan他(2008、前述)で開示されたオルピノマイセスキシロース異性化酵素からなる群から選択されるアミノ酸配列ではないアミノ酸配列をコードする。

30

【0034】

好ましくは、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、
 (a) WO03/062340で開示されたピロミセスキシロース異性化酵素、
 (b) WO04/099381及びWO06/009434で開示されたバクテロイデス・タイオタオミクロンキシロース異性化酵素、
 (c) WO04/099381で開示されたシラマイセスキシロース異性化酵素、
 (d) Madhavan他(2008、前述)で開示されたオルピノマイセスキシロース異性化酵素からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列との配列同一性が99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、89、88、87、86、85、84、83、82、81、80、79、78、77、76、75、74、73、72、71若しくは70%を上回るアミノ酸配列を有さない(又は未満のアミノ酸配列を有する)。

40

【0035】

50

一態様では、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、ネオカリマステイクス (*Neocallimastigaceae*) 科の嫌気性真菌、例えば、アナエロマイセス (*Anaeromyces*)、カエコマイセス (*Caecomyces*)、シラマイセス、ネオカリマステイクス (*Neocallimastix*)、オルピノマイセス、ピロミセス及びルミノマイセス (*Ruminomyces*) からなる群から選択される属の真菌のキシロース異性化酵素のアミノ酸ではないアミノ酸配列をコードする。

【0036】

一態様では、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、バクテロイド属又はパラバクテロイド (*Parabacteroides*) 属の細菌のキシロース異性化酵素のアミノ酸ではないアミノ酸配列をコードする。

10

【0037】

本発明のヌクレオチド配列は、以下に定義したような本発明の真核微生物宿主細胞で機能的に発現することができる新たなクラスのキシロース異性化酵素をコードする。本発明のヌクレオチド配列は、ある種の真菌、細菌及び尾索類で天然に生じるキシロース異性化酵素をコードすることが好ましい。

【0038】

したがって、本発明の好ましいヌクレオチド配列は、クロストリジウム (*Clostridiaceae*) 科の細菌、より好ましくはクロストリジウム属の細菌から得られる (又は、天然に生じる) キシロース異性化酵素、最も好ましくは *C. ディフィシレ* のキシロース異性化酵素のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有するキシロース異性化酵素をコードする。

20

【0039】

したがって、本発明の好ましいヌクレオチド配列は、フソバクテリア (*Fusobacteriaceae*) 科の細菌、より好ましくはフソバクテリア属の細菌から得られる (又は、天然に生じる) キシロース異性化酵素、最も好ましくは *F. モルティフェラム* のキシロース異性化酵素のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有するキシロース異性化酵素をコードする。

【0040】

したがって、本発明の好ましいヌクレオチド配列は、尾索類、好ましくはキオナ (*Cionieae*) 科の尾索類、より好ましくはユウレイボヤ (*Ciona*) 属の尾索類から得られる (又は、天然に生じる) キシロース異性化酵素、最も好ましくはカタユウレイボヤ (*C. intestinalis*) のキシロース異性化酵素アミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有するキシロース異性化酵素をコードする。

30

【0041】

他の態様では、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、

(a) キシロース異性化酵素活性を備えたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ポリペプチドが配列番号 8、9、11 又は 13 の少なくとも 1 種のアミノ酸配列と少なくとも 45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、95、96、97、98 又は 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むヌクレオチド配列、

40

(b) (a) 又は (b) のヌクレオチド配列にハイブリッド形成する相補鎖のヌクレオチド配列、及び

(c) 遺伝子コードの縮重のため (b) のヌクレオチド配列の配列とは異なる配列のヌクレオチド配列からなる群から選択される。

【0042】

しかし、前記において定義したキシロース異性化酵素のいずれかの遺伝子操作された形態をコードし、対応する天然に生じるキシロース異性化酵素と比較して 1 つ又は複数のア

50

ミノ酸置換、挿入及びノ又は欠失を含むが、本明細書で定義したような同一性又は類似性の範囲内であるヌクレオチド配列は、本発明に明白に含まれると理解される。したがって、一態様では、本発明のヌクレオチド配列は、Meaden他(1994、Gene、141:97~101)によって定義されたキシロース異性化酵素シグネチャ配列: V X W [G P] G R E G [Y S T A] (187~195位に存在する)及び[L I V M] E P K P X [E Q] P (232~239位に存在する)(配列中、「X」は任意のアミノ酸であることができ、括弧内のアミノ酸は、括弧付きアミノ酸の1つがシグネチャ配列のその位置に存在し得ることを示す)を含むキシロース異性化酵素アミノ酸配列をコードする。本発明のキシロース異性化酵素アミノ酸配列はさらに、触媒に直接関与する3連構造を構成する保存的アミノ酸残基His-102、Asp-105及びAsp-340、構造的及び機能的に触媒の役割を担うLys-235、並びにマグネシウムの結合に関与するGlu-233を含むことが好ましい(Vangrysterre他、1990、Biochem. J. 265:699~705; Henrick他、J. Mol. Biol. 208:129~157; Bhosale他、1996 Microbiol. Rev. 60:280~300)。前記シグネチャ配列及び保存された残基のアミノ酸の位置は、配列番号3のピロミセスキシロース異性化酵素の参照アミノ酸配列における位置を意味する。配列番号3以外の本発明のアミノ酸配列では、好ましくは、前記シグネチャ配列及び保存された残基のアミノ酸の位置は、好ましくは初期設定を使用したClustalW(1.83又は1.81)配列アラインメントにおける配列番号3のシグネチャ配列及び保存された残基の位置に対応するアミノ酸の位置に存在する。当業者は、前記において定義したようなアミノ酸配列アラインメントアルゴリズムを使用して、配列番号3以外のキシロース異性化酵素アミノ酸配列において対応するアミノ酸の位置を同定する方法を理解している。このようなアラインメントの一例を表4に表す。さらに、現在では、キシロース異性化酵素のおよそ450アミノ酸は当業界では公知で、新たなものが続々と追加されている。配列番号3とこれら公知のキシロース異性化酵素アミノ酸配列及び新たなキシロース異性化酵素アミノ酸配列を備えた本発明のキシロース異性化酵素との配列アラインメントはさらに、保存された領域及びアミノ酸の位置を示し、それらの保存が構造及び酵素活性に重要であることを示すだろう。これらの領域及び位置は、保存的アミノ酸置換を許容しないか、又はそれのみを許容する。これらの領域及び位置の外側のアミノ酸置換が、キシロース異性化酵素活性に大きな影響を及ぼす可能性はない。

【0043】

ヌクレオチド配列は、形質転換宿主細胞において活性型で発現することが好ましいキシロース異性化酵素をコードする。したがって、宿主細胞においてヌクレオチド配列が発現すると、25 でタンパク質1mg当たり比活性が少なくとも10Uのキシロース異性化酵素活性、好ましくは25 で1mg当たり少なくとも20、25、30、50、100、200又は300Uのキシロース異性化酵素活性を備えたキシロース異性化酵素が生じる。本明細書では、形質転換宿主細胞において発現したキシロース異性化酵素の比活性は、宿主細胞の無細胞溶解物、例えば、酵母無細胞溶解物のタンパク質1mg当たりのキシロース異性化酵素活性単位の量と定義する。キシロース異性化酵素活性、無細胞溶解物のタンパク質及び調製物の量の測定は、例で記載した通りである。好ましくは、宿主細胞においてヌクレオチド配列が発現すると、キシロースに対する K_m が50、40、30又は25mM未満、より好ましくは、キシロースに対する K_m が約20mM以下のキシロース異性化酵素が生じる。

【0044】

キシロース異性化酵素活性を備えたポリペプチドをコードする本発明のヌクレオチド配列は、前述の門、綱又は属に属する真菌、酵母又は細菌のゲノムDNA及びノ若しくはcDNAから、当業界でそれ自体周知のヌクレオチド配列単離のための方法を使用して得ることができる(例えば、Sambrook and Russell(2001)「Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition)」、Cold Spring Harbor Laboratory

10

20

30

40

50

、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York参照)。本発明のヌクレオチド配列は、例えば、a)縮重PCRプライマー(例えば、配列番号14及び15におけるプライマー)を適切な生物(例えば、前記したような真菌、細菌又は尾索類)のゲノムDNA及び/若しくはcDNAに使用し、キシロース異性化酵素活性を備えたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の一部を含むPCR断片を作製し、b)a)で得られたPCR断片をこの生物のcDNA及び/又はゲノムライブラリーのスクリーニングのためのプローブとして使用し、且つc)キシロース異性化酵素活性を備えたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むcDNA又はゲノムDNAを生成するプロセスで得ることができる。

【0045】

キシロース異性化酵素が本発明の形質転換宿主細胞において十分なレベルで、活性型で発現する可能性を高めるために、これらの酵素並びに本発明のその他の酵素(以下参照)をコードするヌクレオチド配列は、関心のある宿主細胞のコドン使用頻度にそれらのコドン使用頻度が最適化するように適合させることが好ましい。宿主細胞のコドン使用頻度への酵素をコードするヌクレオチド配列の適合性は、コドン適合係数(CAI)として表すことができる。本明細書では、コドン適合係数は、特定の宿主細胞又は生物において高度に発現した遺伝子のコドン使用頻度に対するある遺伝子のコドン使用頻度の相対的適合性の尺度と定義する。各コドンの相対的適合性(w)は、同じアミノ酸の最も大量にあるコドンの使用頻度に対する各コドンの使用頻度の比である。CAI係数は、これらの相対的適合性の値の相乗平均と定義する。非同義コドン及び終止コドン(遺伝子コードに左右される)は除外する。CAI値は、0~1の範囲で、値が高いほど最も多いコドンの割合が高いことを示している(Sharp and Li、1987、Nucleic Acids Research 15:1281~1295参照; Jansen他、2003、Nucleic Acids Res. 31(8):2242~51も参照)。好ましくは、適合したヌクレオチド配列のCAIは少なくとも0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8又は0.9である。最も好ましいのは、S.セレビシエ細胞での発現に最適化されたコドンであった配列番号16、17及び38に挙げた配列である。

【0046】

本発明のキシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物で形質転換する宿主細胞は、好ましくは真核微生物宿主、より好ましくは真菌宿主細胞、例えば、酵母又は糸状菌宿主細胞である。好ましくは宿主細胞は培養細胞である。本発明の宿主細胞は好ましくは、細胞内に能動的又は受動的にペントース(キシロース及び、好ましくはアラビノースもまた)輸送できる宿主である。宿主細胞は活性解糖系を含有することが好ましい。宿主細胞は内在性ペントースリン酸経路を含有することができることがさらに好ましく、キシロースから異性化したキシルロースがピルビン酸に代謝され得るように内在性キシルロースキナーゼ活性を含有することができる。宿主は、ペントースを(好ましくはピルビン酸を介して)所望する発酵産物、例えば、エタノール、乳酸、3-ヒドロキシ-プロピオン酸、アクリル酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、アミノ酸、1,3-プロパン-ジオール、エチレン、グリセロール、 β -ラクタム抗生物質及びセファロsporinに変換するための酵素を含有することがさらに好ましい。特に好ましい宿主細胞は、天然にアルコール発酵、好ましくは嫌気性アルコール発酵できる宿主細胞である。宿主細胞は、エタノールに対して高い耐性を有し、低pHに高い耐性を有し(すなわち、5、4又は3を下回るpHで増殖することができる)、有機酸、例えば乳酸、酢酸又はギ酸、並びに糖分解産物、例えばフルフラール及びヒドロキシ-メチルフルフラールに高い耐性を有し、且つ高温に高い耐性を有することがさらに好ましい。宿主細胞のこれらの特性又は活性のいずれも宿主細胞に天然に存在していてもよく、或いは遺伝子改変、好ましくは自己クローニング若しくは以下に説明した本発明の方法によって導入又は改変されていてもよい。適切な細胞は培養細胞、すなわち、発酵プロセスにおいて、例えば、深部発酵又は固形状態の発酵において培養することができる細胞である。特に適切な細胞は、例えば、真菌のような真核微生物であるが、本発明での使用に最も適切なのは酵母又は糸状菌である。

10

20

30

40

50

【0047】

本明細書では、酵母とは真核微生物と定義し、単細胞型で主に増殖するユーミコチナ (*Eumycotina*) 亜門の全種を含む (*Yeasts: characteristics and identification*, J. A. Barnett, R. W. Payne, D. Yarrow, 2000, 3版, Cambridge University Press, Cambridge UK; 及び *The yeasts, a taxonomic study*, C. P. Kurtzman and J. W. Fell (編) 1998, 4版, Elsevier Science Publ. B. V., Amsterdam, The Netherlands)。酵母は単細胞葉状体の出芽によって増殖するか、又は生物の分裂によって増殖することができる。宿主細胞として好ましい酵母は、

10 サッカロミセス属、クリベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、カンジダ (*Candida*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、クロエケラ (*Kloeckera*) 属、シワニオマイセス (*Schwanniomyces*) 属及びヤロウイア (*Yarrowia*) 属に属する。好ましくは、酵母は嫌気性発酵、より好ましくは嫌気性アルコール発酵ができる。何年も、穀物糖からバイオエタノールを生産するために様々な生物の導入が示唆されてきた。しかし、実際には、主要なバイオエタノール生産プロセスは全て、エタノール産生株としてサッカロミセス属の酵母が使用され続けてきた。これは、サッカロミセス種の産業プロセスに魅力的な多くの特性、すなわち、酸、エタノール及び浸透圧に対する高い耐性、嫌氣的増殖の可能性、及びもちろんその高いアルコール発酵能力のためである。真菌宿主細胞として好ましい酵母種には、*S. セレピシエ*、*S. イグジグース* (*S. exiguus*)、*S. バヤヌス* (*S. bayanus*)、*K. ラクティス* (*K. lactis*)、*K. マルキシアヌス* (*K. marxianus*) 及びシゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) が含まれる。

20

【0048】

本明細書では、糸状菌はユーミコチナ亜門の糸状型全てを含む真核微生物と定義する。これらの真菌の特徴は、キチン、セルロース及びその他の複合多糖類から構成される栄養菌糸体である。本発明の糸状菌は、酵母とは形態学的、生理学的及び遺伝子的に異なる。糸状菌は菌糸の伸長によって栄養成長し、ほとんどの糸状菌の炭素代謝は偏性嫌気性である。宿主細胞として好ましい糸状菌は、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属、フミコラ (*Humicola*) 属、アクレモニウム (*Acremonium*) 属、フザリウム (*Fusarium*) 属及びペニシリウム (*Penicillium*) 属に属する。

30

【0049】

本発明の形質転換宿主細胞では、前記において定義したキシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、キシロースをキシルロースに変換する能力を細胞に与えるために、細胞においてヌクレオチド配列の十分な発現を引き起こすプロモーターに作動可能に連結していることが好ましい。より好ましくは、このプロモーターは、最も好ましくは嫌気性条件下で、単一炭素源及び/又はエネルギー源としてキシロースで増殖する能力を細胞に与えるために、ヌクレオチド配列の十分な発現を引き起こす。前記において定義したヌクレオチド配列の発現に適したプロモーターには、異化代謝産物 (グルコース) 抑制に非感受性であり、及び/又は誘導にキシロースを必要とするプロモーターが含まれる。これらの特性を有するプロモーターは広く入手可能であり、当業者には公知である。このようなプロモーターの適切な例には、例えば、解糖系遺伝子、例えば、ホスホフルクトキナーゼ (*PFK*)、トリオースリン酸異性化酵素 (*TPI*)、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸脱水素酵素 (*GPD*, *TDH3* 又は *GAPDH*)、ピルビン酸キナーゼ (*PK*)、ホスホグリセリン酸キナーゼ (*PGK*) のプロモーター、グルコース - 6 - リン酸異性化酵素プロモーター (*PGII*)、酵母又は糸状菌のプロモーターが含まれ、酵母のこのようなプロモーターに関する詳細は (*WO93/03159*) に見出すことができる。その

40

50

他の有用なプロモーターは、リボソームタンパク質をコードする遺伝子プロモーター、ラクターゼ遺伝子プロモーター（LAC4）、アルコール脱水素酵素プロモーター（ADH1、ADH4など）、エノラーゼプロモーター（ENO）、ヘキソース（グルコース）輸送体プロモーター（HXT7）及びチトクロームc1プロモーター（CYC1）である。その他の保存性及び誘導性の両方のプロモーター、並びにエンハンサー又は上流の活性化配列は当業者には公知である。好ましくは、前記において定義したヌクレオチド配列に作動可能に連結したプロモーターは宿主細胞と同種である。

【0050】

本発明の形質転換宿主細胞は、キシロースから異性化したキシロースがピルビン酸に代謝され得るようにキシロースキナーゼ活性を含むことがさらに好ましい。好ましくは、細胞は内在性キシロースキナーゼ活性を含有する。より好ましくは、本発明の細胞は、特異的キシロースキナーゼ活性を増大させる遺伝子改変を含む。好ましくは、この遺伝子改変は、例えば、キシロースキナーゼをコードするヌクレオチド配列を過剰発現することによって、キシロースキナーゼの過剰発現を引き起こす。キシロースキナーゼをコードする遺伝子は、細胞にとって内在性であってもよく、又は細胞にとって異種のキシロースキナーゼであってもよい。本発明の細胞においてキシロースキナーゼの過剰発現に使用できるヌクレオチド配列は、例えば、Deng及びHoによって記載されたS・セレピシエのキシロースキナーゼ遺伝子（XKS1）である（1990、Appl. Biochem. Biotechnol. 24~25:193~199）。他の好ましいキシロースキナーゼは、ピロミセスのキシロースキナーゼに関連するキシロースキナーゼ（xy1B; WO03/0624430参照）である。このピロミセスのキシロースキナーゼは、実際には、酵母のキナーゼなどの公知の真核生物キナーゼのいずれよりも原核生物キナーゼに関連が深い。真核生物キシロースキナーゼは、キシロースを含む広い基質範囲を有する非特異的糖キナーゼとして示唆されてきた。対照的に、ピロミセスキナーゼが最も密接に関連する原核生物キシロースキナーゼは、キシロースにより特異的キナーゼで、すなわち、より狭い基質範囲を有するものと示唆されてきた。本発明の細胞では、過剰発現すべきキシロースキナーゼは、過剰発現を引き起こす遺伝子改変以外は遺伝子的に同一である株と比較して少なくとも1.1、1.2、1.5、2、5、10又は20倍過剰発現する。過剰発現のこれらのレベルは、酵素活性の定常状態レベル、酵素タンパク質の定常状態レベル並びに酵素をコードする転写物の定常状態レベルに適用することができるものと理解されるべきである。

【0051】

本発明の細胞は、WO06/009434で記載されたようなペントースリン酸経路の流量を増加させる遺伝子改変を含むことがさらに好ましい。特に、この遺伝子改変は、ペントースリン酸経路非酸化的部分の流量の増加を引き起こす。ペントースリン酸経路の非酸化的部分の流量の増加を引き起こす遺伝子改変は、本明細書では、流量増加を引き起こす遺伝子改変以外は遺伝子的に同一である株の流量と比較して少なくとも1.1、1.2、1.5、2、5、10又は20倍流量を増加させる改変を意味するものと理解される。ペントースリン酸経路の非酸化的部分の流量は、WO06/009434で記載されたように測定することができる。

【0052】

ペントースリン酸経路の流量を増加させる遺伝子改変は、様々な方法で本発明の細胞に導入することができる。これらには、例えば、キシロースキナーゼ及び/又はペントースリン酸経路の非酸化的部分の酵素の1種若しくは複数のより高い定常状態活性レベルの実現並びに/或いは非特異的アルドース還元酵素活性の定常状態レベルの減少の実現が含まれる。定常状態活性レベルのこれらの変化は、変異体（自然発生、又は化学物質若しくは照射による誘導）の選択によって、及び/或いは組換えDNA技術、例えば、酵素をコードする遺伝子若しくはこれらの遺伝子を調節する因子の過剰発現又は不活性化のそれぞれによって、達成することができる。

【0053】

本発明の好ましい細胞では、遺伝子改変は、（非酸化的部分の）ペントースリン酸経路の少なくとも1種の酵素の過剰発現を含む。好ましくは、この酵素は、リブロース-5-リン酸異性化酵素、リブロース-5-リン酸3-エピメラーゼ、トランスケトラーゼ及びトランスアルドラーゼをコードする酵素からなる群から選択される。（非酸化的部分の）ペントースリン酸経路の酵素の様々な組合せを過剰発現することができる。例えば、過剰発現する酵素は、少なくとも酵素リブロース-5-リン酸異性化酵素及びリブロース-5-リン酸3-エピメラーゼ、又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸異性化酵素及びトランスケトラーゼ、又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸異性化酵素及びトランスアルドラーゼ、又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸3-エピメラーゼ及びトランスケトラーゼ、又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸3-エピメラーゼ及びトランスアルドラーゼ、又は酵素トランスケトラーゼ及びトランスアルドラーゼ、又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸3-エピメラーゼ、トランスケトラーゼ及びトランスアルドラーゼ、又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸異性化酵素、トランスケトラーゼ及びトランスアルドラーゼ、又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸異性化酵素、リブロース-5-リン酸3-エピメラーゼ及びトランスアルドラーゼ、又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸異性化酵素、リブロース-5-リン酸3-エピメラーゼ及びトランスケトラーゼであってもよい。本発明の一態様では、酵素リブロース-5-リン酸異性化酵素、リブロース-5-リン酸3-エピメラーゼ、トランスケトラーゼ及びトランスアルドラーゼのそれぞれは、本発明の細胞で過剰発現する。好ましいのは、遺伝子改変が少なくとも酵素トランスアルドラーゼの過剰発現を含む細胞である。より好ましいのは、遺伝子改変が少なくとも酵素トランスアルドラーゼ及びトランスアルドラーゼの両方の過剰発現を含む細胞で、このような宿主細胞は既にキシロースで嫌氣的に増殖できるからである。実際に、いくつかの条件下で、トランスケトラーゼ及びトランスアルドラーゼのみを過剰発現する細胞は既に、4種の酵素全て、すなわちリブロース-5-リン酸異性化酵素、リブロース-5-リン酸3-エピメラーゼ、トランスケトラーゼ及びトランスアルドラーゼを過剰発現する細胞のように、キシロースに対して同じ嫌氣的増殖速度を有することを発見した。さらに、酵素リブロース-5-リン酸異性化酵素及びリブロース-5-リン酸3-エピメラーゼの両方を過剰発現する本発明の細胞は、これらの酵素の1つのみの過剰発現は代謝の不均衡をもたらすので、異性化酵素のみ又は3-エピメラーゼのみを過剰発現する細胞よりも好ましい。

【0054】

本発明の細胞における酵素の過剰発現については、様々な手段が当業界では利用可能である。特に、細胞内における酵素をコードする遺伝子のコピー数を増加させることによって、例えば、細胞ゲノムに遺伝子のコピー数をさらに統合することによって、エピゾームのマルチコピー発現ベクターから遺伝子を発現することによって、又は遺伝子の複数のコピーを含むエピゾームの発現ベクターを導入することによって、酵素を過剰発現することができる。酵素の過剰発現に使用されるコーディング配列は、本発明の宿主細胞と同種であることが好ましい。しかし、本発明の宿主細胞とは異種のコーディング配列も、同様に適用することができる。

【0055】

或いは、本発明の細胞における酵素の過剰発現は、過剰発現すべき酵素をコードする配列にとって天然ではないプロモーター、すなわち、作動可能に連結したコーディング配列に異種であるプロモーターを使用することによって実現することができる。このプロモーターは、作動可能に連結したコーディング配列に異種であることが好ましいが、このプロモーターは本発明の細胞にとって同種、すなわち内在性であることも好ましい。好ましくは、異種プロモーターは、好ましくはキシロース又はキシロース及びグルコースが炭素源として、より好ましくは主要な炭素源として（すなわち、利用可能な炭素源の50%超がキシロース又はキシロース及びグルコースからなる）、最も好ましくは単一の炭素源として利用可能である条件下で、コーディング配列にとって天然であるプロモーターよりもコーディング配列を含む転写物のより高い定常状態レベルを生じることができる（又は時間

単位当たりより多くの転写物分子、すなわち mRNA 分子を生じることができる)。この場合に適切なプロモーターには、前記において定義したようなキシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列の発現について前述したプロモーターが含まれる。

【0056】

本発明のさらに好ましい細胞は、細胞における非特異的アルドース還元酵素活性を減少させる遺伝子改変を含む。好ましくは、非特異的アルドース還元酵素活性は、非特異的アルドース還元酵素をコードする遺伝子の発現を減少させるか、又は遺伝子を不活性化する1つ又は複数の遺伝子改変によって、宿主細胞において減少する。好ましくは、遺伝子改変は、細胞のゲノムにおける、キシロース、キシルロース及びアラビノースを含むアルドペントースを減少させることができる非特異的アルドース還元酵素をコードする遺伝子の内在的コピーそれぞれの発現を減少させるか、又は不活性化する。所与の細胞は、2倍性、倍数性若しくは異数性の結果として、非特異的アルドース還元酵素をコードする遺伝子の複数のコピーを含むことができ、及び/又は細胞は、アミノ酸配列が異なり、それぞれ異なる遺伝子によってコードされたアルドース還元酵素活性を備えたいくつかの異なる(イソ)酵素を含有してもよい。また、このような場合、非特異的アルドース還元酵素をコードする遺伝子それぞれの発現は減少しているか、又は不活性化していることが好ましい。好ましくは、遺伝子は、遺伝子の少なくとも一部を欠失することによって、又は遺伝子を破壊することによって不活性化し、この場合、遺伝子という用語はまた、コーディング配列の上流又は下流の非コーディング配列を含み、その(部分的)欠失又は不活性化によって宿主細胞における非特異的アルドース還元酵素活性の発現の減少がもたらされる。活性が本発明の細胞において減少しているべきアルドース還元酵素をコードするヌクレオチド配列及びこのようなアルドース還元酵素のアミノ酸配列は、WO 06/009434に記載されており、例えば、S.セレピシエGRE3遺伝子の(非特異的)アルドース還元酵素遺伝子(Traff他、2001、Appl. Environm. Microbiol. 67:5668~5674)及びその他の種のそれらの相同分子種が含まれる。

【0057】

さらに好ましい態様では、前述のようなキシロースをキシルロースに異性化する能力を有する本発明の形質転換細胞はさらに、例えば、Wisselink他(2007、AEM Accepts、2007年6月1日に出版に先駆けてオンラインで公表された; Appl. Environ. Microbiol. doi:10.1128/AEM.00177~07)及びEP1499708に記載されたように、L-アラビノースをD-キシルロース5-リン酸に変換する能力を備えている。L-アラビノースをD-キシルロース5-リン酸に変換する能力は、a)アラビノース異性化酵素、b)リブロキナーゼ、好ましくはL-リブロキナーゼキシロース異性化酵素、及びc)リブロース-5-P-4-エピメラーゼ、好ましくはL-リブロース-5-P-4-エピメラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物(単数又は複数)で形質転換することによって、細胞に与えられることが好ましい。好ましくは、本発明の細胞では、L-アラビノースをD-キシルロース5-リン酸に変換する能力は、その後の1)アラビノースのリブロースへの異性化、2)リブロースのリブロース5-リン酸へのリン酸化、及び3)リブロース5-リン酸のD-キシルロース5-リン酸へのエピマー化の反応によってL-アラビノースをD-キシルロース5-リン酸に変換する能力である。アラビノース異性化酵素、リブロキナーゼ及びリブロース-5-P-4-エピメラーゼをコードする適切なヌクレオチド配列は、枯草菌(Bacillus subtilis)、大腸菌(Escherichia coli)(例えば、EP1499708参照)、乳酸菌(Lactobacilli)、例えば、ラクトバチルス・プランタルム(Lactobacillus plantarum)(例えば、Wisselink他、前述参照)又はクラビバクター(Clavibacter)属種、アルスロバクター(Arthrobacter)属種及びグラメラ(Gramella)属種、好ましくは、クラビバクター・ミシガネンシス(Clavibacter michiganensis)、アルスロバクター・アウレッセンス(Arthrobacter aureus)及びグラメラ・フォルセッティ(Gram

10

20

30

40

50

e l l a f o r s e t i i) から得ることができる。

【 0 0 5 8 】

本発明によるさらに好ましい形質転換宿主細胞は、(a) 細胞へのキシロース及び/又はアラビノースの輸送の増加、(b) 異化代謝産物抑制に対する感受性の減少、(c) エタノール、浸透圧又は有機酸に対する耐性の増加、及び(d) 副産物生成の減少からなる群から選択される特性の1つ又は複数を生じるさらなる遺伝子改変を含むことができる。副産物は、所望する発酵産物以外の炭素含有分子を意味するものと理解され、例えば、キシリトール、アラビニトール、グリセロール及び/又は酢酸が含まれる。本明細書に記載した任意の遺伝子改変は、古典的な突然変異誘発及び所望する変異体のスクリーニング及び/若しくは選択、又は単純に、所望する特性を備えた自然突然変異体のスクリーニング及び/若しくは選択によって導入することができる。或いは、遺伝子改変は、内在性遺伝子の過剰発現及び/又は内在性遺伝子の不活性化からなることができる。過剰発現することが細胞へのアラビノース及び/又はキシロースの輸送増加に望ましい遺伝子は、ヘキソース又はペントース輸送体をコードする遺伝子から選択することが好ましい。S . セレビスエ及びその他の酵母では、これらの遺伝子には、H X T 1、H X T 2、H X T 4、H X T 5、H X T 7及びG A L 2が含まれるが、H X T 7、H X T 5及びG A L 2が最も好ましい(S e d l a c k a n d H o、Y e a s t 2 0 0 4 ; 2 1 : 6 7 1 ~ 6 8 4 参照)。酵母における発現に好ましい他の輸送体は、P . スティピティス(P . s t i p i t i s) S U T 1 遺伝子によってコードされたグルコース輸送体である(K a t a h i r a 他、2 0 0 8、E n z y m e M i c r o b . T e c h n o l . 4 3 : 1 1 5 ~ 1 1 9)。同様にして、その他の種においてこれらの輸送体遺伝子の相同分子種を過剰発現させてもよい。本発明の細胞において過剰発現してもよいその他の遺伝子には、解糖系酵素及び/又はエタノール生成酵素、例えば、アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子が含まれる。不活性化に好ましい内在性遺伝子には、ヘキソースキナーゼ遺伝子、例えば、S . セレビスエH X K 2 遺伝子(D i d e r i c h 他、2 0 0 1、A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l . 6 7 : 1 5 8 7 ~ 1 5 9 3 参照)、S . セレビスエM I G 1 若しくはM I G 2 遺伝子、グリセロール代謝に関与する酵素をコードする遺伝子、例えば、S . セレビスエグリセロール-リン酸脱水素酵素1 及び/若しくは2 遺伝子、又は(ハイブリッド形成する)その他の種のこれらの遺伝子の相同分子種が含まれる。キシロース発酵のための宿主細胞のその他の好ましいさらなる改変は、v a n M a r i s 他(2 0 0 6、A n t o n i e v a n L e e u w e n h o e k 9 0 : 3 9 1 ~ 4 1 8)、W O 2 0 0 6 / 0 0 9 4 3 4、W O 2 0 0 5 / 0 2 3 9 9 8、W O 2 0 0 5 / 1 1 1 2 1 4 及びW O 2 0 0 5 / 0 9 1 7 3 3 に記載されている。本明細書に記載した本発明の細胞の遺伝子改変のいずれも、可能な限り、自己クローニング遺伝子改変によって導入されるか、又は改変されることが好ましい。

【 0 0 5 9 】

本発明による好ましい形質転換宿主細胞では、核酸構築物は宿主細胞に、好ましくは嫌気性条件下で、すなわち、嫌気性発酵プロセスのために本明細書で以下に定義した条件下で、炭素源/エネルギー源として、好ましくは単一の炭素源/エネルギー源としてキシロースで増殖する能力を与える。好ましくは、炭素源/エネルギー源としてキシロースで増殖するとき、形質転換宿主は本質的にキシリトールを生成せず、例えば、生成したキシリトールは検出限界未満、又は、例えば、モルをベースにして消費される炭素の5、2、1、0 . 5 若しくは0 . 3 % 未満である。好ましくは、炭素源/エネルギー源がまたアラビノースを含む場合、細胞は本質的にアラビニトールを生成せず、例えば、生成したアラビニトールは検出限界未満、又は、例えば、モルをベースにして消費される炭素の5、2、1、0 . 5 若しくは0 . 3 % 未満である。

【 0 0 6 0 】

本発明の形質転換宿主細胞は、嫌気性条件下で少なくとも0 . 0 1、0 . 0 2、0 . 0 5、0 . 1、0 . 2、0 . 2 5 若しくは0 . 3 h⁻¹の速度で、又は、より好ましくは嫌気性条件下で少なくとも0 . 0 0 5、0 . 0 1、0 . 0 2、0 . 0 5、0 . 0 8、0 . 1

、0.12、0.15若しくは 0.2 h^{-1} の速度で、単一の炭素源/エネルギー源としてキシロースで増殖する能力を有することが好ましい。本発明の細胞は、嫌気性条件下で少なくとも0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.25若しくは 0.3 h^{-1} の速度で、又は、より好ましくは、嫌気性条件下で少なくとも0.005、0.01、0.02、0.05、0.08、0.1、0.12、0.15若しくは 0.2 h^{-1} の速度で、単一の炭素源/エネルギー源として(重量比1:1の)グルコース及びキシロースの混合物で増殖する能力を有することが好ましい。したがって、本発明による好ましい形質転換宿主細胞では、核酸構築物は、最終的にピルビン酸を電子(及び水素受容体)として使用し、発酵産物、例えば、エタノール、乳酸、3-ヒドロキシ-プロピオン酸、アクリル酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、アミノ酸、1,3-プロパン-ジオール、エチレン、グリセロール、 β -ラクタム抗生物質及びセファロsporinに還元するプロセスで、単一炭素源としてキシロースを嫌氣的に発酵する能力を宿主細胞に与える。

10

【0061】

好ましくは、本発明の細胞の特異的キシロース消費速度は、少なくとも200、300、400、600、700、800、900又は 1000 mg h^{-1} (g乾燥重量) $^{-1}$ である。好ましくは、本発明の細胞のキシロースに対する発酵産物(例えば、エタノール)の収率は、細胞のグルコースに対する発酵産物(例えば、エタノール)の収率の少なくとも20、40、50、60、80、90、95又は98%である。より好ましくは、改変宿主細胞のキシロースに対する発酵産物(例えば、エタノール)の収率は、宿主細胞のグルコースに対する発酵産物(例えば、エタノール)の収率と等しい。同様に、改変宿主細胞のキシロースに対するバイオマス収率は、好ましくは宿主細胞のグルコースに対するバイオマス収率の少なくとも55、60、70、80、85、90、95又は98%である。より好ましくは、改変宿主細胞のキシロースに対するバイオマス収率は、宿主細胞のグルコースに対するバイオマス収率と等しい。グルコース及びキシロースに対する収率の比較において、いずれの収率も好気性条件下で比較するか、又は両方とも嫌気性条件下で比較するものと理解される。

20

【0062】

他の側面では、本発明は、エタノール、乳酸、3-ヒドロキシ-プロピオン酸、アクリル酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、アミノ酸、1,3-プロパン-ジオール、エチレン、グリセロール、 β -ラクタム抗生物質及びセファロsporinからなる群から選択される発酵産物を生成するための方法に関する。この方法は好ましくは、a)キシロース源、場合によってはアラビノース源を含有する培地を前記において定義した細胞で発酵し、細胞がキシロース及び場合によってアラビノースを発酵産物に発酵するステップと、場合によってb)発酵産物を回収するステップとを含む。

30

【0063】

キシロース源に加えて、発酵培地中の炭素源はまた、グルコース源を含んでいてもよい。当業者であればさらに、発酵培地はさらにまた、例えば、特にアラビノース源などのその他の種類の炭水化物を含むことができることを理解するだろう。キシロース、グルコース及びアラビノース源は、キシロース、グルコース及びアラビノース自体(すなわち、単糖)であってもよく、又はキシロース、グルコース及び/若しくはアラビノース単位を含む任意の炭水化物オリゴマー若しくはポリマーの形態、例えば、リグノセルロース、アラビナン、キシラン、セルロース、澱粉などであってもよい。このような炭水化物からのキシロース、グルコース及び/若しくはアラビノース単位を遊離するために、適切なカルボヒドラーゼ(例えば、アラビナーゼ、キシラナーゼ、グルカナーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、グルカナーゼなど)を発酵培地に添加してもよく、又は改変された宿主細胞によって生成されてもよい。後者の場合、改変された宿主細胞は、このようなカルボヒドラーゼを生成し、排出するように遺伝子操作されていてもよい。グルコースのオリゴマー若しくはポリマー源を使用する他の利点は、例えば、好ましくは発酵中にカルボヒドラーゼの律速段階量を使用することによって、発酵中に遊離グルコースの濃度を(より)低く維持することができることである。これによって、次に、非グルコース糖、例えば、キシロース

40

50

及びアラビノースなどの代謝及び輸送に必要な系の抑制が阻止される。好ましい方法では、改変された宿主細胞はキシロースとグルコースの両方、及び場合によってアラビノースを好ましくは同時に発酵し、この場合、ジオーキシー増殖を防ぐためにグルコース抑制に非感受性である改変された宿主細胞を使用することが好ましい。炭素源としてのキシロース（及びグルコース）源に加えて、発酵培地はさらに、改変された宿主細胞の増殖に必要な適切な成分を含んでいてもよい。酵母及び糸状菌などの真核微生物の増殖のための発酵培地の組成物は、当業界では周知である。

【0064】

発酵方法は、好氣的又は嫌氣的発酵方法であってもよい。本明細書では、嫌氣的発酵方法とは、酸素無しで、又は実質的に酸素の消費無しで、好ましくは消費が5、2.5若しくは1 mmol/L/h未満、より好ましくは0 mmol/L/h（すなわち、酸素消費が検出できない）で実行され、有機分子が電子供与体及び電子受容体の両方として役立つ発酵方法と定義する。酸素無しで、解糖系及びバイオマス生成で生成するNADHは、酸化的リン酸化によって酸化することができない。この問題を解決するために、多くの微生物は電子及び水素受容体としてピルビン酸又はその誘導体の1つを利用し、それによってNAD⁺を再生する。したがって、好ましい嫌氣的発酵方法において、ピルビン酸は、電子（及び水素受容体）として使用され、エタノールなどの発酵産物、並びに非エタノール発酵産物、例えば、乳酸、3-ヒドロキシ-プロピオン酸、アクリル酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、アミノ酸、1,3-プロパン-ジオール、エチレン、グリセロール、酪酸、カプロエート、ブタノール、グリオキシレート、 γ -ラクタム抗生物質及びセファロsporinに還元される。嫌氣的方法は通気のための投資及びエネルギーを必要とせず、さらに、嫌氣的方法では好氣的方法よりも高い産物収率が得られるので、本発明の嫌氣的方法は好氣的方法よりも好ましい。或いは、本発明の発酵方法は、好氣的酸素を制限した条件下で実行することができる。好ましくは、酸素を制限した条件下での好氣的方法では、酸素消費速度は、少なくとも5.5、より好ましくは少なくとも6、さらにより好ましくは少なくとも7 mmol/L/hである。

【0065】

発酵方法は、本発明の改変された細胞に最適な温度で実行することが好ましい。したがって、ほとんどの酵母又は真菌細胞の場合、発酵方法は42 未満、好ましくは38 未満の温度で実施する。酵母又は糸状菌細胞の場合、発酵方法は、35、33、30又は28 を下回り、且つ20、22又は25 を上回る温度で実施することが好ましい。

【0066】

好ましくは、本発明の発酵方法では、細胞は、キシロースをキシルロースに異性化し、場合によってアラビノースをD-キシルロース5-リン酸に変換する能力を細胞に与える核酸構築物を安定的に保持する。好ましくは、この方法では、好ましくは産業的発酵条件下で、50世代増殖後も細胞の少なくとも10、20、50又は75%が、キシロースをキシルロースに異性化し、場合によってアラビノースをD-キシルロース5-リン酸に変換する能力を保持する。

【0067】

本発明による好ましい発酵方法は、エタノールを生成するための方法で、この方法は、a) キシロース源、場合によってはアラビノース源を含有する培地を前記において定義した細胞で発酵し、細胞がキシロース及び場合によってアラビノースをエタノールに発酵するステップと、場合によってb) エタノールを回収するステップとを含む。発酵培地はさらに、前述のように実施することができる。この方法では、容積エタノール生産性は、好ましくは1時間当たり1リットル当たり少なくとも0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、5.0又は10.0 gエタノールである。この方法におけるキシロース及び/又はグルコース及び/又はアラビノースに対するエタノール収率は、好ましくは少なくとも50、60、70、80、90、95又は98%である。本明細書では、エタノール収率とは、キシロース、グルコース及びアラビノースではキシロース、グルコース又はアラビノースのg当たり0.51 gエタノールである理論的最大収率のパーセントと定義

10

20

30

40

50

する。

【0068】

本発明によるさらに好ましい発酵方法は、キシロース源及びアラビノース源を含有する培地を発酵することを含む方法であるが、2種類の異なる株の細胞を使用する。第一の株の細胞はアラビノースをD-キシロース5-リン酸に変換する能力を有さないこと以外は前記において定義した通りの細胞の第一の株であり、この第一の株の細胞がキシロースを発酵産物に発酵する。そして、第2の株の細胞はキシロースをキシロースに(直接)異性化する能力を有さないこと以外は前記において定義した通りの細胞の第2の株であり、この第2の株の細胞がアラビノースを発酵産物に発酵する。この方法は、場合によって発酵産物を回収するステップを含む。第1及び第2の細胞はさらに、それ以外は前述した通りである。

10

【0069】

この文書及びその特許請求の範囲では、「含む(comprise)」という動詞及びその活用型は、この語に続く事項は含まれるが、特に言及しなかった事項も排除されないことを意味するために非限定的意味で使用される。さらに、不定冠詞「a」又は「an」によって要素を示す場合、文脈が明確に1つ及び1つだけの要素があることを必要としないければ、その要素の複数が存在する可能性は排除されない。不定冠詞「a」又は「an」は、したがって通常「少なくとも1つ」を意味する。

【0070】

本明細書で引用した全特許及び参照文献は、全体が参考として本明細書に組み込まれる。

20

【0071】

以下の例は、例示の目的のためのみに提供されており、本発明の範囲を決して制限するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1】酵母での発現について試験したキシロース異性化酵素の系統樹である。

【0073】

例

1. 酵母における本発明のキシロース異性化酵素の機能的発現

30

1.1 宿主生物

酵母宿主株はRN1000であった。この株は、RWB218株(Kuyper他、FEMS Yeast Research 5、2005、399~409)の派生体である。ピロミセスXylAをコードするプラスミドpAKX002はRN1000にはない。宿主株の遺伝子型は、MatA、ura3-52、leu2-112、gre3::hphMX、loxP-Ptpi::TAL1、loxP-Ptpi::RKI1、pUGPtpi-TKL1、pUGPtpi-RPE1、{p415 Padh1XKS1Tcy1-LEU2}である。

【0074】

1.2 合成XI遺伝子による発現構築物

40

(サッカロミセス・セレビスエ(Saccharomyces cerevisiae)に)最適化された合成コドンXI遺伝子は、XbaI(合成遺伝子の5'末端)及びBamHI(合成遺伝子の3'末端)制限部位を使用して、サッカロミセス・セレビスエのTPI1プロモーター(899bp)及びCYC1ターミネーター(288bp)配列を含むpRS306(Sikorski R.S., Hieter P., 1989、「A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae」Genetics 122:19~27)の派生体にクローニングした。ATGの前の最初の3つのヌクレオチドは、発現を最適化するためにAAAに改変した。表1は、試験

50

したX I配列及び合成配列を示す対応配列番号のリストである。遺伝子は、GenScript Corporation (zie www.genscript.com) によって合成され、輸送されて、pUC57:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=2440162>にクローニングされた。TPIプロモーターは、PCRにおいて鋳型として酵母ゲノムDNAを使用し、プライマー:

フォワード: AAACCGGTTTCTTCTTCAGATTCCCTC
リバー: TTAGATCTCTAGATTTATGTATGTGTTTTTTGTAGTを用いて得られた。

CYC1ターミネーターは、PCRにおいて鋳型として酵母ゲノムDNAを使用し、プライマー: フォワード: AAGAATTCGGATCCCTTTTCCTTTGTCTGA
リバー: AACTCGAGCCTAGGAAGCCTTCGAGCGTCを用いて得られた。

【0075】

1.3 宿主生物の形質転換及び形質転換体の選択

RN1000は、「Gietz法」(Gietz他、1992、Nucleic Acids Res. 1992 Mar 25; 20(6): 1425)を使用してプラスミドで形質転換した。形質転換体の1次選択は、無機質培地(YNB+2%グルコース)上でウラシルを補足して実施した。

【0076】

1.4 酵素測定法

キシロース異性化酵素活性は、37°Cで、リン酸緩衝液50mM(pH7.0)、キシロース10mM、MgCl₂ 10mM及び適量の無細胞抽出物を含む反応混合液中で測定する。活性1単位は、測定条件下で1分当たりキシロース1nmolを生成する酵素量と定義する。生成したキシロースは、Dische and Borenfreundの方法(Dische and Borenfreund、1951、J. Biol. Chem. 192: 583~587)又は80°Cで操作したBiorad HPX-87Nカラムを使用し、溶出液としてNa₂HPO₄ 0.01Mを使用して0.6ml/分で溶出したHPLCにより測定する。キシロース及びキシロースは、屈折率検出器によって60°Cの内部温度で検出する。

【0077】

比活性はタンパク質mg当たりの単位で表す。タンパク質は、Bio-Radタンパク質試薬(Bio-Rad Laboratories、Richmond、CA、USA)で標準としてウシγ-グロブリンを用いて測定する。

【0078】

1.5 形質転換細胞の生理学的特性

形質転換細胞は、単一炭素源としてグルコースを用いた無機質培地で数回コロニー精製した。その後、コロニー精製した形質転換細胞は、炭素源/エネルギー源として2%(w/v)キシロースを含む合成培地で酸素存在下で振盪フラスコ内で増殖させる。結果は、表2に示しており、「+」は細胞が顕著に増殖していることを示す。「-」の印は、顕著な増殖が生じなかったことを示す。

【0079】

キシロースを消費して増殖する株はその後、キシロースを消費してエタノールを付随生成しながら嫌氣的に増殖する能力について試験した。シラマイセス・アベレンシス、カタユレイボヤ、クロストリジウム・ディフィシレ、バクテロイデス・フラギリス及びフソバクテリウム・モルティフェラムのキシロース異性化酵素で形質転換した株は、従来技術のピロミセス酵素と同程度、例えば、Kuyper他によって以前に記載されたRWB218(2005、FEMS Yeast Res. 5: 925~934)と同程度の増殖率、バイオマス及びエタノール収率で、嫌氣的にキシロースで増殖することができた。しかし、C.ディフィシレX Iで形質転換した細胞は、増殖率に関してはキシロース発酵で

10

20

30

40

50

最良の能力を示した。

【 0 0 8 0 】

同様に、本発明の形質転換細胞はまた、混合基質を利用することができる。形質転換細胞がグルコース及びキシロースの混合物（各 20 g l^{-1} ）で増殖するとき、両糖は完全に消費されるが、グルコースが好ましい基質であった。キシロース消費は、グルコースの約 80% が消費された後でのみ開始する。シラマイセス・アベレンシス、カタユウレイボヤ、クロストリジウム・ディフィシレ、バクテロイデス・フラギリス及びフソバクテリウム・モルティフェラムのキシロース異性化酵素で形質転換した株それぞれの場合において、生成したエタノールは、グルコース及びキシロース全体が消費されたことを明らかにする。

10

【 0 0 8 1 】

【表 1】

表 1

名称	長さ	CAI 最初の 遺伝子	CAI 最適化 遺伝子	ヌクレオチド 配列番号	アミノ酸 配列番 号
ピロミセス種 E2	1314	0.547	0.996	18	3
シラマイセス・アベレンシス	1314	0.569	0.989	19	4
クロストリジウム・ディフィシレ	1338	0.107	0.987	16	1
バクテロイデス・フラギリス	1320	0.104	0.976	20	7
カタユウレイボヤ	1371	0.119	0.993	17	2
サーモトガ・マリティマ	1335	0.097	0.983	23	10
ヘモフィラス・ソムナス	1320	0.145	1.000	24	11
ニセツリガネゴケ	1440	0.090	0.988	26	13
シロイヌナズナ	1434	0.154	1.000	25	12
アルスロバクター・アウレッセンス	1188	0.082	0.988	22	9
バークホルデルリア・フィトフィルマンズ	1323	0.065	0.982	21	8
オルピノマイセス種 Ukk1	1314	0.515	試験せず	試験せず	5
フソバクテリウム・モルティフェラム	1311	0.106	0.989	38	35

20

30

【 0 0 8 2 】

【表 2】

表 2

XI 源生物	合成培地中における 2% キシロースによる増殖	ピロミセス XI との% アミノ酸同一性
ピロミセス	+	100
シラマイセス・アベレンシス	+	91
ニセツリガネゴケ	-	52
シロイヌナズナ	-	51
ヘモフィラス・ソムナス	-	49
カタユウレイボヤ	+	47
クロストリジウム・ディフィシレ	+	54
サーモトガ・マリティマ	-	51
バクテロイデス・フラギリス	+	78
バークホルデリア・フィトフィルマンズ	-	50
アルスロバクター・アウレッセンス	-	17
フソバクテリウム・モルティフェラム	+	51

10

20

【 0 0 8 3 】

【 表 3 】

表3 示した様々な生物のキシロース異性化酵素間の対比較アミノ酸同一性

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	ピロミセス種 E2														
2	バクテロイデス・フラギリス	78,71													
3	シラマイセス・アパレンシス	91,30	77,57												
4	クロストリジウム・ディオイシル	54,00	52,61	53,78											
5	カタユウレイボヤ	47,83	45,10	45,30	52,36										
6	フソバクテリウム・モルティフェラ	50,92	50,45	51,15	71,79	50,46									
7	オルピノマイセス種 ukk1	94,51	78,03	91,07	55,38	47,14	50,23								
8	クロストリジウム・フイトフェルメン タンズ	53,55	53,88	54,92	62,56	46,80	64,68	54,23							
9	バクテロイデス・ユニフォルミス (Bacteroides_uniformis)	81,24	90,41	80,55	55,03	47,49	52,75	80,55	54,79						
10	サーモトガ・マリテイマ	51,26	51,02	51,72	65,99	50,67	64,91	50,11	59,82	52,28					
11	ヘモフィラス・ソムナス	48,74	49,43	49,20	49,89	45,10	52,06	48,74	53,42	50,68	51,03				
12	シロイヌナズナ	51,49	51,71	52,40	53,03	51,10	53,90	51,26	49,77	52,97	55,41	48,75			
13	ニセツリガネゴケ バークホルデルリア・フイトフィルマ	51,72	52,39	52,17	52,81	51,31	52,75	51,03	50,68	53,42	55,86	48,29	70,23		
14	シロイヌ	49,43	48,74	48,74	48,18	44,77	49,09	48,98	50,23	50,23	49,09	64,69	46,36	47,05	
15	アルスロバクター・アウレツセンス	20,76	20,76	20,76	19,75	20,51	20,25	20,76	21,52	20,25	20,51	19,49	19,24	20,25	20,76

【 0 0 8 4 】

10

20

30

40

【 表 4 - 1 】

表 4 CLUSTAL W (1.83) 多重配列アラインメント 1/5

```

シロイヌナズナ
ニセツリガネゴケ
カタユウレイボヤ
ピロミセス種 E2
オルピノマイセス種 ukk1
シラマイセス・アペレンシス
バクテロイデス・フラギリス
バクテロイデス・ユニフォルミス
クロストリジウム・デファイシレ
フソバクテリウム・モルティイフェラム
サーモトガ・マリテイマ
クロストリジウム・フトフェルメンタンス
ヘモフィラス・ソムナス
パークホルデリア・フトフィルマンズ
アルスロバクター・アウレッセンズ

```

```

MKKVEFFVLLLCFIAASSLVSAADPTCPADLGGKCSDDSDWQGDFFPPEIP
MKALLFSVLLVAVLSCSGQRVADITCGVDG-SLGSDFQEWEGEFFPNIS
-----MSSFAPASGKSDLAEAGSLLTKEYPLEVK
-----MAKEYFPQIQ
-----MTKEYFPTIG
-----MVKEYFPAIQ
-----MATKEYFPGIG
-----MATKEYFPGIG
-----MNEIFKGIG
-----MEFFKIGID
-----MAEFFPEIP
-----MKNYFPNVP
-----MSNYFDKIA
-----MSYFEHIP
-----

```

```

シロイヌナズナ
ニセツリガネゴケ
カタユウレイボヤ
ピロミセス種 E2
オルピノマイセス種 ukk1
シラマイセス・アペレンシス
バクテロイデス・フラギリス
バクテロイデス・ユニフォルミス
クロストリジウム・デファイシレ
フソバクテリウム・モルティイフェラム
サーモトガ・マリテイマ
クロストリジウム・フトフェルメンタンス
ヘモフィラス・ソムナス
パークホルデリア・フトフィルマンズ
アルスロバクター・アウレッセンズ

```

```

KIKYE-GPSSKNPLAYRWYNAEELILGKKMKDWRFSVAFWHTFRGTGGD
YIKYE-GPASHNPLAYKYNAEELIFGKKMKDWRFSVAFWHTFRGDGGD
KIPYKPKDAKVDVLCFRHYNESEVMGKPMSDWLRFSVCYWHTFRGTGAD
KIKFE-GKDSKNPLAFHYDAEKEVMGKMKDWRFAMAWWHTLCAEGAD
KIRFE-GKDSKNPMAFHYDAEKEVMGKMKDWRFAMAWWHTLCAEGAD
KIKFE-GKDSKNPMAFHYDAEKEIMGKMKDWRFAMAWWHTLCAEGSD
KIKFE-GKDSKNPMAFRYDAEKMINGRSMKDWLKFAMAWWHTLCAEGGD
KIKFE-GKESKNPMAFRYDADKVIIMGKVMSEWLKFAMAWWHTLCAEGGD
QIKFE-GVKSNNELAFRYNPEEQVVGNKTMKEHLRFAMS YWHTLTCGEND
KVKYE-GVKTNNLLAFHYNPEEVLGKKMKDHLKFAMS YWHTLTCGEND
KIQFE-GKESTNPLAFRYDPNEVIDGKPLKDHLKFSAFWHTFVNEGRD
EVKYE-GPNSTNPEAFKYDYANKVWAGKTMKEHCRFALSWMHTLCAEGAD
KVNYE-GANSTNPEAFKHYNPEVILGKTVEEHLRLAVCYWHTFCWTGND
EIRYE-GPOSNPLAYRHYDKSKVLGKTLLEEHLRLAVCYWHTFVWPQVD
-----MTPQPTPQDRFTFGLWTVG-WTGAD
-----

```

10

20

30

表 4 続き 3/5

シロイヌナズナ	EVGVYAAAQVKKAMEVTHYLGGENVVFWGGREGYQTLTNTDMGRGLDH
ニセツリガネゴケ	DVRVYAAAQVKKAI E VTKLGGENVVFWGGREGYQTLTNTDLKKELDH
カタユウレイボヤ	DAHVYAAAQVKKSL E GKLGAE N VFWGGREGYHTLLNTINVEELDN
ピロミセス種 E2	DFDVARAI VQI KNAI DAGIELGAEN VFWGGREGYMSLLNTDQKREKEH
オルピノマイセス種 ukk1	DFDVARAI VQI KNAMDAGIELGAEN VFWGGREGYMSLLNTDQKREKEH
シラマイセス・アペレンシス	DFDVARAI VQI KNAMDAGIELGAEN VFWGGREGYMSLLNTDQKREKEH
バクテロイデス・フラギリス	DFDVARAAVQI KNAI DAT IELGGTNNVFWGGREGYMSLLNTDQKREKEH
バクテロイデス・ユニフォルミス	DFDVARAAVQI KNAI DAT IELGGSNNVFWGGREGYMSLLNTDQKREKEH
クロストリジウム・デファイシレ	NADVYAAAQVKKAMEITKYLGGENVFWGGREGYETLLNTTELEMDN
フノバクテリウム・モルティアエラム	NADVFAAAAQTKKALEITKRLNGTGYVFWGGREGYETLLNTDGLGLDN
サーモトガ・マリテイマ	SADVFAAAAQVKKALEITKELGGEYVFWGGREGYETLLNTDGLGLEEN
クロストリジウム・フトフェルメンタンス	NADVFAAAAQVKKALDAT IKLGGKGYVFWGGREGYETLLNTDGLGLDN
ヘモフィラス・ソムナス	NPEVFAAAAQVFTAMNATQRLGGENVVIMGGREGYETLLNTDLKREREQ
バークホルデリア・フトフィルマンズ	DPEVFAAAQTQVRHALDATQRLGGDNVIMGGREGYDITLLNTDLVREDDQ
アルスロバクター・アウレッセンス	DRSIRFALSILRNIDLAELGALTFVMWGGREGSEYDGSKDL SAAALDR
	. . . * : : : * . . . : * : * * * * * . . . : :
シロイヌナズナ	LARFEAAVAYKKKI GFKGTLLEPKQEP TKHQYDWDAA TAANFLRKY -
ニセツリガネゴケ	MATFLSAAEYKKKI GFEGTLLEPKQEP TKHQYDWDAA TTMGFLKNYG
カタユウレイボヤ	LANFFKMVVAYKKKI GFTGQFLIEPKKPKESKHQYDYDAMTVLAFIKTY -
ピロミセス種 E2	MATVLTNARDYARSKGFKGTFLIEPKPMEPTKHQYDVDTE TAIGFLKAHN
オルピノマイセス種 ukk1	MATVLTNARDYARSKGFKGTFLIEPKPMEPTKHQYDVDTE TVIGFLRAHN
シラマイセス・アペレンシス	MAMMLGLARDYARSKGFKGTFLIEPKPMEPTKHQYDVDTE TVIGFLRAHG
バクテロイデス・フラギリス	LAQMLTIARDYGRARGFKGTFLIEPKPMEPTKHQYDVDTE TVIGFLKAHG
バクテロイデス・ユニフォルミス	LAQMLTIARDYARARGFKGTFLIEPKPMEPTKHQYDVDTE TVIGFLKAHN
クロストリジウム・デファイシレ	FARFLQMAVDYAKKI GFTGQFLIEPKKPKETKHQYDFDTATVIGFLRKYN
フノバクテリウム・モルティアエラム	LARFLQMAVDYAKKI GFEGQFFIEPKKPKETKHQYDFDTATVIGFLRKYN
サーモトガ・マリテイマ	LARFLRMAVEYAKKI GFTGQFLIEPKKPKETKHQYDFDVA TA YAF LKNHG
クロストリジウム・フトフェルメンタンス	MARLMKMAVEYGRANGFDGFY IEPKPKETKHQYDFDTATVLAFLRKYG
ヘモフィラス・ソムナス	IGRFMQLVVEHKYKI GFQGTLLIEPKQEP TKHQYDYDVATVYGF LKQFG
バークホルデリア・フトフィルマンズ	LARFLHMVVDHAKKI GFKGSLLEPKQEP TKHQYDYDVATVHGFLLQHG
アルスロバクター・アウレッセンス	MKEGVDTAAGYI KEKGYGLRIALEPKNEPRGDI FLPTVGHGLAFIAQLE
	: . . . : * : : * * * * * . . . : : * :

【表 4 - 4】

表 4 続き 4/5

【 0 0 8 8 】

シロイヌナズナ	--GLIDFKLNI ECNHATLSGHTCHHELEETARINGLLGNIDANTGDAQTG
ニセツリガネゴケ	LSGHNNDYKLNLECNHATLSGHSCHHELEETARIYGM LGSVDANTGDAQTG
カタユウレイボヤ	--DLDDFKLNI EPNHTTLAGHCHCHHDVVMASAYNMLGSVDSNTGSPDLG
ピロミセズ種 E2	---LDKDFK VNI EVNHA TLAGHT FEHELACAVDAGMLGSIDANRGDYQNG
オルピノマイセズ種 ukk1	---LDKDFK VNI EVNHTLAGHTFEHELACAVDAGMLGSIDANRGDYQNG
シラマイセス・アペレンシス	---LDKDFKINI EVNHTLAGHTFEHELACAVDAGMLGSIDANRGDYQNG
バクテロイデス・フラギリス	---LNQDFK VNI EVNHTLAGHTFEHELAVAVDNGMLGSIDANRGDYQNG
バクテロイデス・ユニオホルミス	---LDKDFK VNI EVNHTLAGHTFEHELAVAVDNGMLGSIDANRGDYQNG
クロストリジウム・デファイシレ	---LDKYFK VNI EANHATLAGHTFQHELNIARINNVLSIDANQGDLG
フノクテリウム・モルティイアエラム	---LDKYFKMNI EANHATLAGHTFQHELCTARINGVFGSIDANQGDLG
サーモトガ・マリテイマ	---LDEYFKFNI EANHATLAGHTFQHELRMARILGKLSIDANQGDLG
クロストリジウム・フトフェルメンタンス	---LEKDFK MNI EANHATLAGHTFEHELAMARVNGAFGSVDANQGPNLG
ヘモフィラス・ソムナス	---LENEIKVNI EANHATLAGHTFQHEIATATSLGIFGSI DANRGPDLG
バークホルデリア・フトファイルマンズ	---LDKEIRVNI EANHATLAGHSFHHEIATAYALGIFGSVDANRGPQNG
アルスロバクター・アウレツセンズ	HG---DIVGLNPE TGHEQ MAGLNFTHGLAQALWAGKLFHIDLN-GQRGIK
シロイヌナズナ	WDTDQFLTDVGEATMVMMSVIKNGGIAPGGFNFDAKLRRES---TDVEDLF
ニセツリガネゴケ	WDTDQFLTDVSEATLIMLSVIKNGGLAPGGFNFDAKLRRES---VDVEDLF
カタユウレイボヤ	WDTDQFPMDVKNA TMIMQ TVLEQQGLAPGGLNFDCKVRRS---TDV IDMM
ピロミセズ種 E2	WDTDQFP IDQYELVQAWMEIIRGGGFVTGGTNFDAKTRRNS---TDLEDII
オルピノマイセズ種 ukk1	WDTDQFP IDQYELVQAWMEIIRGGGFVTGGTNFDAKTRRNS---TDLEDII
シラマイセス・アペレンシス	WDTDQFP IDQYELVQAWMEIIRGGGFVTGGTNFDAKTRRNS---TDLEDII
バクテロイデス・フラギリス	WDTDQFP IDNFELTQAMMQ IIRNDGLNGGTFNFDAKTRRNS---TDPEDIF
バクテロイデス・ユニオホルミス	WDTDQFP IDNFELTQAMMQ IIRNGGFGNGGTFNFDAKTRRNS---TDLEDIF
クロストリジウム・デファイシレ	WDTDQFP TNY DATLAMYEV LKQGGIAPGGFNFDCKVRRAS---FEVEDLF
フノクテリウム・モルティイアエラム	WDTDQFP TNVYDAVLAMYETLLAGGFKEGGLNFDKAVRRGS---FEPKDLF
サーモトガ・マリテイマ	WDTDQFP TNY YDTLAMYEVIKAGGFTKGLNFDKAVRRAS---YKVEDLF
クロストリジウム・フトフェルメンタンス	WDTDQFP TDVHSA TLAMLEVLKAGGFTNGGLNFDKAVRRGS---FEFDDIA
ヘモフィラス・ソムナス	WDTDQFP NSVEENTLAMYEILKAGGFTTGGFNFDKAVRRQ---TDPYDLF
バークホルデリア・フトファイルマンズ	WDTDQFP NSVEELTLAFYEILKHGGFTTGMNFDCKVRRQ---VDFEDLF
アルスロバクター・アウレツセンズ	YDQDLVFGHGDLTSAFFTVDLLENGFNGGPKYDGRHFHDYKFSRTDGYD
	: * * . : * * . : * * . : * * . : * * . : * * . : * * . : * * .

【表 4 - 5】

表 4 続き 5/5

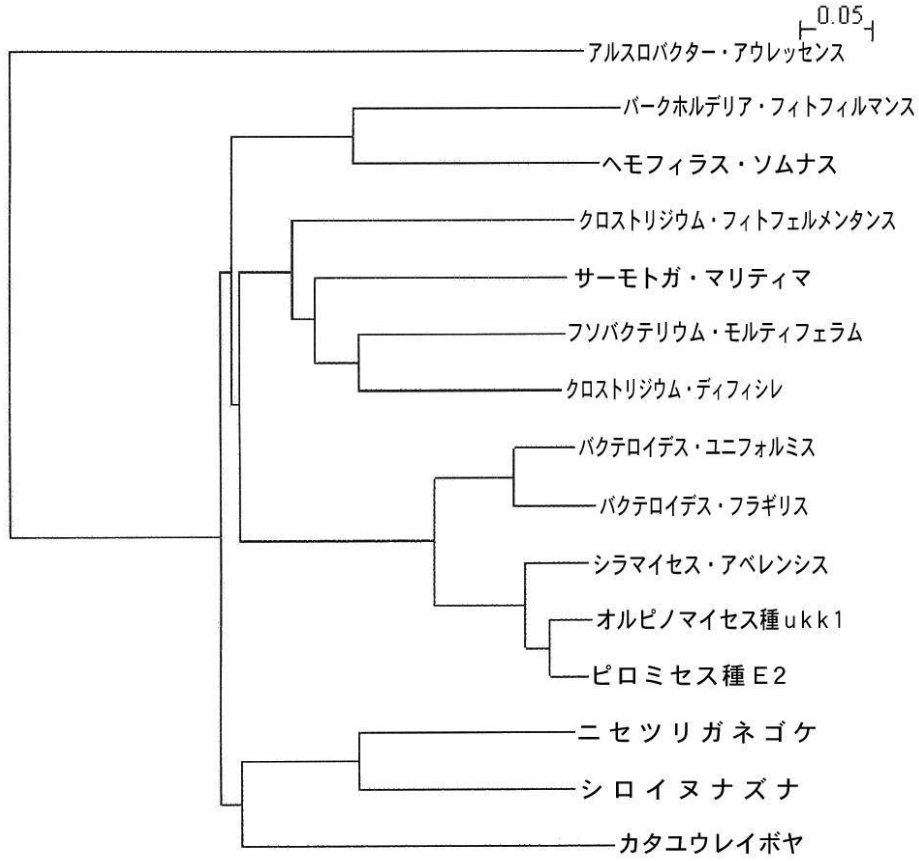
シロイヌナズナ	IAHISGMDTMARGLRNAVKILIEEGSLSELVVRKRYATWDSLELGGQIEEGKA
ニセツリガネゴケ	IAHISGMDTIARGLRNAAKLLIEEGLTKLIVEDRYSSFNSPGKTIIEGKV
カタユウレイボヤ	IAHVGMDCFAKALKIAAKIREDGVLGKMKKERYASFSSGLGLKTKGTGA
ピロミセス種 E2	IAHVSGMDAMARALENAAKLLQESPYTKMKKE[RYASFDSC]IGKDFEDGKL
オルピノマイセス種 ukk1	IAHISGMDAMARALENAAKLLQESPICNMKKERYASFDSGIGKDFEDGKL
シラマイセス・アペレンシス	IAHISGMDAMARALENAAKLLTESP YKKMKADRYASFDSGMGKDFEDGKL
バクテロイデス・フラギリス	IAHIAGMDAMARALESAANLLNESP YQKMLSDRYASFDAGKGFEEGKL
バクテロイデス・ユニフォルミス	IAHIAGMDVAMARALESAAKLLEESP YKKMLADRYASFDSGKGFEDGKL
クロストリジウム・デブイシレ	LAYIAGMDTFAKGLLIAHKLLEDEVEFENFTKERYASFSEGI GKDIVEGKV
フソバクテリウム・モルティイフェラム	YAYISGMDTFAKGLKVAAKLIEDGTFEKIKVERYSSTTGTIGKQIVNGEV
サーモトガ・マリテイマ	IGHIAGMDTFALGFKIAAYKLAKDGVFDK FIEEKYRSFKEGIGKEIVEGKT
クロストリジウム・フィットフェルメンタンス	YGYIAGMDTFALGLIKAAEIIDDGRIFAKFVDDRYASYKTIGKALVDGTT
ヘモフィラス・ソムナス	HAHIGAMDVLALS LKRAAKMIEDQTLQKVVV DNRVAGWDQELGQKILNGKA
バークホルデリア・フィットフィルマンシス	YGHIGALDNLALAVERRAAVLIENDRLDQFKRQRYSGWDAEFGRKTISSGDY
アルスロバクター・アウレツセンシス	GVWESAKNSMMSMYILLKERALAFRADPEVQELATSGVFELGEPILNAGE
 *
シロイヌナズナ	DFEYLEKKAKEF-GEPKVSSAKQELAE MIFQSAM-----
ニセツリガネゴケ	GFEELKISLEA-EEPPITSGKQELAE MIFYSV-----
カタユウレイボヤ	TLEECDSFIQEN-GEPAKLSGKQEMFEAVLNRYF-----
ピロミセス種 E2	TLEQVVEYGGKN-GEPKQTSKGQELYE[IVAMYQ]-----
オルピノマイセス種 ukk1	TLEQVVEYGGKN-GEPKVTSKGQELYEAVAMYQ-----
シラマイセス・アペレンシス	TFEQVVEYGGKV-NEPKQTSKGQELYEAVAMYM-----
バクテロイデス・フラギリス	SLEELVAYAKAN-GEPKQTSGQQLYEALVNIYSL-----
バクテロイデス・ユニフォルミス	TLEDLVAYAKAN-GEPKQTSKGQELYEAVINMYC-----
クロストリジウム・デブイシレ	GFKELESYALQM-PV IKNKSGRQEMLEALINRYIYEVDTISNK
フソバクテリウム・モルティイフェラム	GFEELSKYALTN-GVKKNSSGRQEMLENILNRYIYE-----
サーモトガ・マリテイマ	DFEKLEBYIIDK-EDIELPSGKQELYE LLSINSYIVKTI AELR-
クロストリジウム・フィットフェルメンタンス	SLEELQVILTH-SEPMQSGRQEVLETVNNILFR-----
ヘモフィラス・ソムナス	SLEDLAKIVETQGLAPKPVSGQELYENLVNSIYLR-----
バークホルデリア・フィットフィルマンシス	SLSALAEAMARGLNPQHASGHQELMENVNQA IYSGR-----
アルスロバクター・アウレツセンシス	TTADLLADASAFDTFNADQAAERSFAFVRLNQLAIEHLLGAR-

10

20

30

【 図 1 】



【 配列表 】

0005821132000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 P	7/04 (2006.01)	C 1 2 P	7/04
C 1 2 P	5/02 (2006.01)	C 1 2 P	5/02
C 1 2 P	19/00 (2006.01)	C 1 2 P	19/00
C 1 2 P	35/00 (2006.01)	C 1 2 P	35/00
C 1 2 P	37/00 (2006.01)	C 1 2 P	37/00
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 A

(74)代理人 100152191

弁理士 池田 正人

(72)発明者 テュウニッセン、アロイシウス ヴィルヘルムス ロドルファス フーベルトゥス
オランダ国、ロッテルダム、チャスケルラン 28(72)発明者 ドゥ ボン、ヨハネス アドリアヌス マリア
オランダ国、ワーゲニンゲン、ラウィックス アレ 68

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 特表2006-525029(JP,A)
特表2008-506383(JP,A)
国際公開第03/095627(WO,A1)
Sebahia,M.et al., "Accession:AM180355 REGION: 3558609..3559946,Definition:Clostridium
difficile 630 complete genome.", NCBI Entrez Nucleotide[online];23-OCT-2008 uploaded,
NCBI,[retrieved on 20 May 2014], Retrieved from the Internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.
nih.gov/nuccore/115249003?sat=43&satkey=7521019>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 00 - 15 / 90

UniProt / GeneSeq

PubMed

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

CAplus / BIOSIS (STN)

DWPI (Thomson Innovation)