

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-528705

(P2014-528705A)

(43) 公表日 平成26年10月30日(2014.10.30)

(51) Int.Cl.

C 12 N 1/13 (2006.01)
C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 N 1/15 (2006.01)
C 12 N 1/19 (2006.01)
C 12 N 1/21 (2006.01)

F 1

C 12 N 1/13
C 12 N 15/00
C 12 N 1/15
C 12 N 1/19
C 12 N 1/21

Z N A

A

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4
4 B 0 6 4
4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-524145 (P2014-524145)
(86) (22) 出願日 平成24年8月3日(2012.8.3)
(85) 翻訳文提出日 平成26年4月1日(2014.4.1)
(86) 國際出願番号 PCT/US2012/049659
(87) 國際公開番号 WO2013/020118
(87) 國際公開日 平成25年2月7日(2013.2.7)
(31) 優先権主張番号 61/515,300
(32) 優先日 平成23年8月4日(2011.8.4)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 509240479
ダニスコ・ユース・インク
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94
304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロ
ード 925
(71) 出願人 513158760
ザ・グッドイヤー・タイヤ・アンド・ラバ
ー・カンパニー
アメリカ合衆国、オハイオ州 44316
、アクロン イノベーション・ウェイ 2
OO
(74) 代理人 100071010
弁理士 山崎 行造
(74) 代理人 100118647
弁理士 赤松 利昭

最終頁に続く

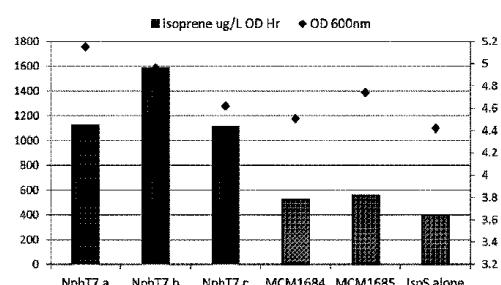
(54) 【発明の名称】アセトアセチルC₀Aシンターゼを用いるイソプレン、イソプレノイド前駆体、及びイソプレノイドの生産

(57) 【要約】

本発明は、イソプレンを生産することのできる組み換え微生物、並びにこのような組み換え微生物を利用して、高効率でイソプレンを生産させることに関する。本発明では、マロニルC₀A及びアセチルC₀AからアセトアセチルC₀Aを合成することのできる酵素をコードしているアセトアセチルC₀Aシンターゼ遺伝子と、アセトアセチルC₀Aからイソプレンを合成させるイソプレン合成に関与する1つ以上の遺伝子と、を宿主微生物に組み込む。

【選択図】 7

Figure 7



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イソプレンを生産することができる組み換え微生物であって、マロニル C o A 及びアセチル C o A からアセトアセチル C o A を合成することができるポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸、並びに

a . イソプレンシンターゼポリペプチドであって、異種核酸によりコードされるイソプレンシンターゼポリペプチド、及び

b . メバロン酸 (M V A) 経路の 1 つ以上のポリペプチド
をコードしている 1 つ以上の核酸を含み、

前記組み換え微生物を適切な培地で培養することで、前記ポリペプチドの生産及びイソプレンの合成が提供される、組み換え微生物。 10

【請求項 2】

マロニル C o A 及びアセチル C o A からアセトアセチル C o A を合成することができるポリペプチドをコードしている前記 1 つ以上の核酸が、アセトアセチル C o A シンターゼ遺伝子である、請求項 1 に記載の組み換え微生物。

【請求項 3】

前記アセトアセチル C o A シンターゼ遺伝子が放線菌由来の遺伝子である、請求項 2 に記載の組み換え微生物。

【請求項 4】

前記アセトアセチル C o A シンターゼ遺伝子がストレプトミセス (*Streptomyces*) 属由来である、請求項 3 に記載の組み換え微生物。 20

【請求項 5】

前記アセトアセチル C o A シンターゼ遺伝子が、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしている、又は配列番号 1 のアミノ酸配列に対して 80 % 以上同一であるアミノ酸配列を有し、かつマロニル C o A 及びアセチル C o A からアセトアセチル C o A を合成する機能を有するタンパク質をコードしている、請求項 4 に記載の組み換え微生物。

【請求項 6】

前記イソプレンシンターゼポリペプチドが、植物のイソプレンシンターゼポリペプチドであるか、又はその変異体である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。 30

【請求項 7】

前記イソプレンシンターゼポリペプチドが、クズ属 (*Pueraria*) 又はハコヤナギ属 (*Populus*) 由来のポリペプチド、又はウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) とヤマナラシ (*Populus tremula*) の交雑種由来のポリペプチド、又はそれらの変異体由来のポリペプチドである、請求項 6 に記載の組み換え微生物。

【請求項 8】

前記イソプレンシンターゼポリペプチドが、プエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*) 又はクズ (*Pueraria lobata*) 、アメリカヤマナラシ (*Populus tremuloides*) 、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) 、セイヨウハコヤナギ (*Populus nigra*) 、及びコットンウッド (*Populus trichocarpa*) 、又はそれらの変異体からなる群から選択される、請求項 7 に記載の組み換え微生物。 40

【請求項 9】

(b) の M V A 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている前記 1 つ以上の核酸が異種核酸である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 10】

(b) の M V A 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている前記 1 つ以上の核酸が、内在性核酸のコピーである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 11】

M V A 経路の前記 1 つ以上のポリペプチドが、(a) アセトアセチル C o A とアセチル

10

20

30

40

50

C o A を縮合させて H M G - C o A を生成する酵素；(b) H M G - C o A をメバロン酸に変換する酵素；(c) メバロン酸を 5 - ホスホメバロン酸へとリン酸化する酵素；(d) 5 - ホスホメバロン酸を 5 - ジホスホメバロン酸に変換する酵素；及び(e) 5 - ジホスホメバロン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する酵素から選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 1 2】

前記メバロン酸を 5 - ホスホメバロン酸へとリン酸化する酵素が、M. マゼイ (M. maz ei) メバロン酸キナーゼ、M. バートニイ (M. burtonii) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス (Lactobacillus) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ (Lactobacillus sakei) メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母・メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス (Streptococcus) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pneumoniae) メバロン酸キナーゼポリペプチド、及びストレプトミセス (Streptomyces) メバロン酸キナーゼポリペプチド、又はストレプトミセス (Streptomyces) C L 1 9 0 メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群から選択される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

10

【請求項 1 3】

前記メバロン酸を 5 - ホスホメバロン酸へとリン酸化する酵素が、M. マゼイ (M. maz ei) メバロン酸キナーゼである、請求項 1 2 に記載の組み換え微生物。

20

【請求項 1 4】

イソペンテニル - ジホスフェート - イソメラーゼ (I D I) のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸を更に含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 1 5】

1 - デオキシ - D - キシルロース - 5 - リン酸 (D X P) 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸を更に含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 1 6】

D X P 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている前記 1 つ以上の核酸が異種核酸である、請求項 1 5 に記載の組み換え微生物。

30

【請求項 1 7】

D X P 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている前記 1 つ以上の核酸が内在性核酸のコピーである、請求項 1 5 に記載の組み換え微生物。

【請求項 1 8】

D X P 経路の前記 1 つ以上のポリペプチドポリペプチドが、(a) 1 - デオキシ - D - キシルロース - 5 - リン酸シンターゼ (D X S) 、(b) 1 - デオキシ - D - キシルロース - 5 - リン酸リダクトイソメラーゼ (D X R) 、(c) 4 - ジホスホシチジル - 2 C - メチル - D - エリスリトールシンターゼ (M C T) 、(d) 4 - ジホスホシチジル - 2 - C - メチル - D - エリスリトールキナーゼ (C M K) 、(e) 2 C - メチル - D - エリスリトール - 2 , 4 - シクロニリン酸シンターゼ (M C S) 、(f) 1 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 2 - (E) - ブテニル - 4 - ニリン酸シンターゼ (H D S) 、及び(g) 1 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 2 - (E) - ブテニル - 4 - ニリン酸レダクターゼ (H D R) から選択される、請求項 1 5 に記載の組み換え微生物。

40

【請求項 1 9】

前記 D X P 経路のポリペプチドが D X S である、請求項 1 8 に記載の組み換え微生物。

【請求項 2 0】

前記 1 つ以上の異種核酸が、誘導型プロモーター又は構成型プロモーター下に配置される、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 2 1】

50

前記 1 つ以上の異種核酸が、1 つ以上のマルチコピープラスミドにクローン化される、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 22】

前記 1 つ以上の異種核酸が、細胞の染色体に組み込まれる、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 23】

前記微生物が、バクテリア細胞、藻類細胞、真菌細胞又は酵母細胞である、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 24】

前記微生物がバクテリア細胞である、請求項 23 に記載の組み換え微生物。

10

【請求項 25】

前記バクテリア細胞がグラム陽性バクテリア細胞、又はグラム陰性バクテリア細胞である、請求項 24 に記載のバクテリア細胞。

【請求項 26】

前記バクテリア細胞が、大腸菌 (*E. coli*)、*L. アシドフィルス* (*L. acidophilus*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium* sp.)、*P. シトレア* (*P. citrea*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、*B. リケニフォルミス* (*B. licheniformis*)、*B. レンタス* (*B. lentus*)、*B. ブレビス* (*B. brevis*)、*B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*)、*B. アルカロフィルス* (*B. alkalophilus*)、*B. アミロリケファシエンス* (*B. amylolyfaciens*)、*B. クラウシイ* (*B. clausii*)、*B. ハロデュランス* (*B. halodurans*)、*B. メガテリウム* (*B. megaterium*)、*B. コアギュランス* (*B. coagulans*)、*B. サーキュランス* (*B. circulans*)、*B. ロータス* (*B. lautus*)、*B. チューリングンシス* (*B. thuringiensis*)、*S. アルバス* (*S. albus*)、*S. リビダンス* (*S. lividans*)、*S. セリカラー* (*S. coelicolor*)、*S. グリセウス* (*S. griseus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.)、及び *P. アルカリゲネス* (*P. alcaligenes*) 細胞からなる群から選択される、請求項 25 に記載のバクテリア細胞。

20

【請求項 27】

前記バクテリア細胞が大腸菌 (*E. coli*) 細胞である、請求項 26 に記載のバクテリア細胞。

30

【請求項 28】

前記バクテリア細胞が *L. アシドフィルス* (*L. acidophilus*) 細胞である、請求項 26 に記載のバクテリア細胞。

40

【請求項 29】

前記バクテリア細胞がコリネバクテリウム属 (*Corynebacterium* sp.) 細胞である、請求項 26 に記載のバクテリア細胞。

【請求項 30】

前記微生物が藻類細胞である、請求項 23 に記載の組み換え微生物。

【請求項 31】

前記藻類細胞が、緑藻類、紅藻類、灰色藻類、クロララクニオン藻類 (*chlorarachniophytes*)、ミドリムシ類 (*euglenids*)、クロミスタ類 (*chromista*)、又は渦鞭毛藻類からなる群から選択される、請求項 30 に記載の藻類細胞。

50

【請求項 32】

前記微生物が真菌細胞である、請求項 23 に記載の組み換え微生物。

【請求項 33】

前記真菌細胞が糸状菌である、請求項 32 に記載の真菌細胞。

【請求項 34】

前記微生物が酵母細胞である、請求項 23 に記載の組み換え微生物。

【請求項 35】

前記酵母細胞が、サッカロミセス属 (*Saccharomyces* sp.)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces* sp.)、ピキア属 (*Pichia* sp.)、又はカンジダ属 (*Candida* sp.)

50

からなる群から選択される、請求項 3 4 に記載の酵母細胞。

【請求項 3 6】

前記酵母細胞が、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 細胞である、請求項 3 5 に記載の酵母細胞。

【請求項 3 7】

イソプレノイドを生産することのできる組み換え微生物であって、マロニル C o A 及びアセチル C o A からアセトアセチル C o A を合成することのできるポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸、並びに

a . ポリブレニルピロリン酸シンターゼ、及び

b . メバロン酸 (MVA) 経路の 1 つ以上のポリペプチド

をコードしている 1 つ以上核酸を含み、

前記組み換え微生物を適切な培地で培養することで、前記ポリペプチドの生産及び回収可能な量のイソプレノイドの合成が提供される、組み換え微生物。

【請求項 3 8】

(b) の MVA 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている前記 1 つ以上の核酸が異種核酸である。請求項 3 7 に記載の組み換え微生物。

【請求項 3 9】

MVA 経路の前記 1 つ以上のポリペプチドが、(a) アセトアセチル C o A とアセチル C o A を縮合させて HMG - C o A を生成する酵素；(b) HMG - C o A をメバロン酸に変換する酵素；(c) メバロン酸を 5 - ホスホメバロン酸へとリン酸化する酵素；(d) 5 - ホスホメバロン酸を 5 - ジホスホメバロン酸に変換する酵素；及び(e) 5 - ジホスホメバロン酸をイソベンテニルピロリン酸に変換する酵素からなる群から選択される、請求項 3 7 又は 3 8 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 4 0】

前記メバロン酸を 5 - ホスホメバロン酸へとリン酸化する酵素が、M. マゼイ (*M. maz ei*) メバロン酸キナーゼ、M. バートニイ (*M. burtonii*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ (*Lactobacillus sakei*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母・メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、及びストレプトミセス (*Streptomyces*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトミセス (*Streptomyces*) CL 190 メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群から選択される、請求項 3 7 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 4 1】

前記メバロン酸を 5 - ホスホメバロン酸へとリン酸化する酵素が、M. マゼイ (*M. maz ei*) メバロン酸キナーゼである、請求項 4 0 に記載の組み換え微生物。

【請求項 4 2】

イソベンテニル - ジホスフェート - イソメラーゼ (IDH) のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸を更に含む、請求項 3 7 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 4 3】

前記 1 つ以上の異種核酸が、誘導型プロモーター又は構成型プロモーター下に配置される、請求項 3 7 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 4 4】

前記 1 つ以上の異種核酸が 1 つ以上のマルチコピープラスミドにクローン化される、請求項 3 7 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 4 5】

前記 1 つ以上の異種核酸が、細胞の染色体に組み込まれる、請求項 3 7 ~ 4 3 のいずれ

10

20

30

40

50

か一項に記載の細胞。

【請求項 4 6】

前記微生物がバクテリア細胞、藻類細胞、真菌細胞又は酵母細胞である、請求項 3 7 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 4 7】

前記微生物がバクテリア細胞である、請求項 4 6 に記載の組み換え微生物。

【請求項 4 8】

前記バクテリア細胞がグラム陽性バクテリア細胞、又はグラム陰性バクテリア細胞である、請求項 4 7 に記載のバクテリア細胞。

【請求項 4 9】

前記バクテリア細胞が、大腸菌 (*E. coli*)、*L. アシドフィルス* (*L. acidophilus*)、*コリネバクテリウム属* (*Corynebacterium* sp.)、*P. シトレア* (*P. citrea*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、*B. リケニフォルミス* (*B. licheniformis*)、*B. レンタス* (*B. lentus*)、*B. ブレビス* (*B. brevis*)、*B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*)、*B. アルカロフィルス* (*B. alkalophilus*)、*B. アミロリケファシエンス* (*B. amyloliquefaciens*)、*B. クラウシイ* (*B. clausii*)、*B. ハロデュランス* (*B. halodurans*)、*B. メガテリウム* (*B. megaterium*)、*B. コアギュランス* (*B. coagulans*)、*B. サーキュランス* (*B. circulans*)、*B. ロータス* (*B. lautus*)、*B. チューリングンシス* (*B. thuringiensis*)、*S. アルバス* (*S. albus*)、*S. リビダンス* (*S. lividans*)、*S. セリカラ* (*S. coelicolor*)、*S. グリセウス* (*S. griseus*)、*シュードモナス属* (*Pseudomonas* sp.)、及び *P. アルカリゲネス* (*P. alcaligenes*) 細胞からなる群から選択される、請求項 4 7 に記載のバクテリア細胞。

【請求項 5 0】

前記バクテリア細胞が大腸菌 (*E. coli*) 細胞である、請求項 4 9 に記載のバクテリア細胞。

【請求項 5 1】

前記バクテリア細胞が *L. アシドフィルス* (*L. acidophilus*) 細胞である、請求項 4 9 に記載のバクテリア細胞。

【請求項 5 2】

前記バクテリア細胞が、*コリネバクテリウム属* (*Corynebacterium* sp.) 細胞である、請求項 4 9 に記載のバクテリア細胞。

【請求項 5 3】

前記微生物が藻類細胞である、請求項 4 6 に記載の組み換え微生物。

【請求項 5 4】

前記藻類細胞が、緑藻類、紅藻類、灰色藻類、クロララクニオン藻類 (*chlorarachniophytes*)、ミドリムシ類 (*euglenids*)、クロミスタ類 (*chromista*)、又は渦鞭毛藻類からなる群から選択される、請求項 5 3 に記載の藻類細胞。

【請求項 5 5】

前記微生物が真菌細胞である、請求項 4 6 に記載の組み換え微生物。

【請求項 5 6】

前記真菌細胞が糸状菌である、請求項 5 5 に記載の真菌細胞。

【請求項 5 7】

前記微生物が酵母細胞である、請求項 4 6 に記載の組み換え微生物。

【請求項 5 8】

前記酵母細胞が、*サッカロミセス属* (*Saccharomyces* sp.)、*シゾサッカロミセス属* (*S. chitosaccharomyces* sp.)、*ピキア属* (*Pichia* sp.)、又は< i>カンジダ属 (*Candida* sp.) からなる群から選択される、請求項 5 7 に記載の酵母細胞。

【請求項 5 9】

前記酵母細胞が、*サッカロミセス・セレビシエ* (*Saccharomyces cerevisiae*) 細胞である、請求項 5 8 に記載の酵母細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 6 0】

前記イソプレノイドが、モノテルペン、ジテルペン、トリテルペン、テトラテルペン、セスキテルペン、及びポリテルペンからなる群から選択される、請求項 3 7 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 6 1】

前記イソプレノイドがセスキテルペンである、請求項 6 0 に記載の組み換え微生物。

【請求項 6 2】

前記イソプレノイドが、アビエタジエン、アモルファジエン、カレン、ファルネセン、
- ファルネセン、- ファルネセン、ファルネソール、グラニオール、グラニルグラニ
オール、リナロール、リモネン、ミルセン、ネロリドール、オシメン、パチョロール、
- ピネン、サビネン、- テルピネン、テルピンデン (terpinidene)、及びバレンセンから
なる群から選択される、請求項 3 7 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。 10

【請求項 6 3】

イソプレンの生産方法であって、

a .

(i) マロニル C o A 及びアセチル C o A からアセトアセチル C o A を合成することができるポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸、並びに

(i i) イソプレンシンターゼポリペプチドであって、異種核酸によりコードされるイソプレンシンターゼポリペプチド、及び (i i i) メバロン酸 (M V A) 経路の 1 つ以上のポリペプチド、をコードしている 1 つ以上の核酸 20

を含む組み換え微生物を培養する工程と、

b . イソプレンを生産させる工程と

を含む方法。

【請求項 6 4】

前記組み換え微生物により生産された前記イソプレンを回収する工程を更に含む、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

マロニル C o A 及びアセチル C o A からアセトアセチル C o A を合成することができるポリペプチドをコードしている前記 1 つ以上の核酸がアセトアセチル C o A シンターゼ遺伝子である、請求項 6 3 に記載の方法。 30

【請求項 6 6】

前記イソプレンシンターゼポリペプチドが、植物のイソプレンシンターゼポリペプチドである、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 7】

M V A 経路の前記 1 つ以上のポリペプチドが、(a) アセトアセチル C o A とアセチル C o A を縮合させて H M G - C o A を生成する酵素；(b) H M G - C o A をメバロン酸に変換する酵素；(c) メバロン酸を 5 - ホスホメバロン酸へとリン酸化する酵素；(d) 5 - ホスホメバロン酸を 5 - ジホスホメバロン酸に変換する酵素；及び(e) 5 - ジホスホメバロン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する酵素からなる群から選択される、請求項 6 3 に記載の方法。 40

【請求項 6 8】

イソペンテニル - ジホスフェート - イソメラーゼ (I D I) のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸を更に含む、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記組み換え微生物が、1 - デオキシ - D - キシリロース - 5 - リン酸 (D X P) 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸を更に含む、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記微生物がバクテリア細胞、藻類細胞、真菌細胞又は酵母細胞である、請求項 6 3 に記載の方法。 50

【請求項 7 1】

前記微生物がバクテリア細胞である、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記バクテリア細胞がグラム陽性バクテリア細胞、又はグラム陰性バクテリア細胞である、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記バクテリア細胞が大腸菌 (E. coli) 細胞である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記バクテリア細胞が L . アシドフィルス (L. acidophilus) 細胞である、請求項 7 2 に記載の方法。

10

【請求項 7 5】

前記バクテリア細胞がコリネバクテリウム属 (Corynebacterium sp.) 細胞である、請求項 7 2 に記載のバクテリア細胞。

【請求項 7 6】

前記微生物が酵母細胞である、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記酵母細胞がサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 細胞である、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

イソプレノイドの生産方法であって、

20

a .

(i) マロニル C o A 及びアセチル C o A からアセトアセチル C o A を合成することができるポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸、並びに

(i i) ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドであって、異種核酸によりコードされるポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチド、及び (i i i) メバロン酸 (MVA) 経路の 1 つ以上のポリペプチド、をコードしている 1 つ以上の核酸を含む組み換え微生物を培養する工程と、

b . 前記イソプレノイドを生産させる工程と
を含む方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願の相互参照)

本出願は、米国仮出願特許第 6 1 / 5 1 5 , 3 0 0 号 (2011 年 8 月 4 日出願) の利益を請求するものであり、該開示は、参照によりその全体が本案件に組み込まれる。

【0 0 0 2】

(発明の分野)

本発明は全体として、培養細胞及びこれらの培養細胞を含む組成物からの、イソプレン、イソプレノイド前駆体、及び / 又はイソプレノイドの生産方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

メバロン酸依存性経路の生成物は、イソペンテニルピロリン酸 (IPP) 及びジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) である。IPP 及び DMAPP は、イソプレン並びにイソプレノイドの前駆体である。

【0 0 0 4】

イソプレン (2 - メチル - 1 , 3 - ブタジエン) は、各種合成ポリマー、中でも注目すべきは合成ゴムの重要な出発物質である。イソプレンは、さまざまな微生物、植物、及び動物種によって天然に生成される。特に、イソプレンの生合成に関しては、メバロン酸 (MVA) 経路と非メバロン酸 (DXP) 経路の 2 つの経路が特定されている。しかしながら、天然に生じる生物からのイソプレンの収率は商業的には魅力的でない。イソプレンは

40

50

石油の分留によって得ることもできるが、この材料の精製には費用及び時間がかかる。石油分解生成物中のC5留分から生成されるイソプレン量はほんの約15%にすぎない。イソプレンの重合により、約800,000トン/年のc i s - ポリイソプレンが生産されており、このポリイソプレンのほとんどがタイヤ及びゴム産業で使用されている。また、履き物、機械製品、医療用品、スポーツ用品、及びラテックスなどのその他の製品では、共重合させたイソプレンが合成エラストマーとして使用されている。

【0005】

イソプレノイドは、イソプレノイド前駆体分子のIPP及びDAPPから誘導される化合物である。これまでに29,000種以上のイソプレノイド化合物が同定されており、かつ毎年新規のイソプレノイドが発見されている。イソプレノイドは、主な構成単位としてイソプレノイド前駆体分子を使用して、より複雑なイソプレノイド構造を形成する、微生物及び植物種などの天然物から単離することができる。イソプレノイドは、細胞膜の流動性及び電子輸送を維持する手だてとなるため、多くの生命体及び細胞にとって非常に重要である。天然では、イソプレノイドは、植物に含まれる天然の駆虫成分として多様な役割を果たし、桂皮、丁子及びショウガには特有の香りをもたらす。更に、製薬及び化学業界では、イソプレノイドを、薬剤、栄養補助剤、矯味矯臭剤、及び病害虫防除剤として使用する。これまでに、生態系における重要性及び広範な用途における有用性が考慮されて、イソプレノイドは、科学者による関心を十分に集めている。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0006】

したがって、イソプレン及び/又はイソプレノイドのより経済的な生産方法が必要とされている。詳細には、安価で再生可能な出発原料から、ロバストな商業プロセスに求められる水準を十分に満たす速度、力価及び純度で、イソプレン及び/又はイソプレノイドを生産する方法が望ましい。

【0007】

組み換え微生物、並びにイソプレン、イソプレノイド前駆体、及び/又はイソプレノイドの生産方法におけるそれらの使用に関する本開示では、このような向上が提供される。

【0008】

30

本明細書を通じ、各種特許、特許出願及び他の種類の刊行物（例えば、学術論文）を参照する。本明細書に引用する、本開示に関係する全ての特許、特許出願及び刊行物は、すべての目的に関し、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、組み換え微生物の組成物、並びにイソプレン、イソプレノイド前駆体、及び/又はイソプレノイドを生産する際のこれらの組み換え微生物の生産及び使用方法を提供する。組み換え微生物は、イソプレン、イソプレノイド前駆体、及び/又はイソプレノイドの生成に使用することのできるアセトアセチルCoAを、マロニルCoA及びアセチルCoAから合成することのできる酵素を含む。これらの組み換え微生物は、2分子のアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成することのできるアセトアセチルCoAチオラーゼ酵素の代わりに、マロニルCoA及びアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成して、アセトアセチルCoAを生産することのできる酵素を含む。

40

【0010】

したがって、一態様では、本発明は、マロニルCoA及びアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成することのできるポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸、並びに：(a)イソプレンシンターゼポリペプチドであって、異種核酸によりコードされるイソプレンシンターゼポリペプチド；及び(b)メバロン酸(MVA)経路の1つ以上のポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸を含む、イソプレンを生産することのできる組み換え微生物であって、前記組み換え微生物を適切な培地で培養することにより、前

50

記ポリペプチドの生産及びイソブレンの合成が提供される、組み換え微生物を提供する。一態様では、マロニルCoA及びアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成することのできるポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸は、アセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子である。別の態様では、アセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子は放線菌(*actinomycete*)由来のものである。別の態様では、アセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子はストレプトミセス(*Streptomyces*)属由来のものである。別の態様では、アセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子は、アミノ酸配列: M T D V R F R I I G T G A Y V P E R I V S N D E V G A P A G V D D D W I T R K T G I R Q R R W A A D D Q A T S D L A T A A G R A A L K A A G I T P E Q L T V I A V A T S T P D R P Q P P T A A Y V Q H H L G A T G T A A F D V N A V C S G T V F A L S S V A G T L V Y R G G Y A L V I G A D L Y S R I L N P A D R K T V V L F G D G A G A M V L G P T S T G T G P I V R R V A L H T F G G L T D L I R V P A G G S R Q P L D T D G L D A G L Q Y F A M D G R E V R R F V T E H L P Q L I K G F L H E A G V D A A D I S H F V P H Q A N G V M L D E V F G E L H L P R A T M H R T V E T Y G N T G A A S I P I T M D A A V R A G S F R P G E L V L L A G F G G G M A A S F A L I E W (配列番号1)を有するタンパク質をコードする。

10

【0011】

別の態様では、アセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子は、配列番号1のアミノ酸配列に対して80%以上同一であるアミノ酸配列を有し、かつマロニルCoA及びアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する機能を有するタンパク質をコードする。

20

【0012】

本明細書における任意の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、植物イソブレンシンターゼポリペプチドである。本明細書における任意の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、クズ属(*Pueraria*)又はハコヤナギ属(*Populus*)由来のポリペプチド、又はウラジロハコヤナギ(*Populus alba*)とヤマナラシ(*Populus tremula*)交雑種由来のポリペプチドである。本明細書における任意の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、プエラリア・モンタナ(*Pueraria montana*)又はクズ(*Pueraria lobata*)、アメリカヤマナラシ(*Populus tremuloides*)、ウラジロハコヤナギ(*Populus alba*)、セイヨウハコヤナギ(*Populus nigra*)、及びコットンウッド(*Populus trichocarpa*)からなる群から選択される。他の態様では、植物のイソブレンシンターゼポリペプチドは、クズ(kudzu)イソブレンシンターゼポリペプチドである。

30

【0013】

本明細書における任意の態様では、MVA経路の1つ以上のポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸は異種核酸である。本明細書における任意の態様では、MVA経路の1つ以上のポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸は内在性核酸のコピーである。本明細書における任意の態様では、MVA経路の1つ以上のポリペプチドは、(a)アセトアセチルCoAをアセチルCoAと縮合させてHMG-CoAを生成する酵素(例えば、HMGシンターゼ)、(b)HMG-CoAをメバロン酸に変換する酵素、(c)メバロン酸リン酸を5-ホスホメバロン酸に変換する酵素、(d)5-ホスホメバロン酸を5-ジホスホメバロン酸に変換する酵素、並びに(e)5-ジホスホメバロン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する酵素、から選択される。

40

【0014】

本明細書における任意の態様では、メバロン酸をリン酸化して5-ホスホメバロン酸を生成する酵素は、M.マゼイ(*M. mazei*)メバロン酸キナーゼ、ラクトバチルス(*Lactobacillus*)メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ(*Lactobacillus sakei*)メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母・メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス(*Streptococcus*)メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*)メバロン酸キナーゼポリペプチド、及びストレプトミセス(*Streptomyces*)メバロン酸キナーゼポリペプチド、又はストレ

50

プトミセス (*Streptomyces*) C L 1 9 0 メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群から選択できる。本明細書における任意の態様では、メバロン酸を 5 - ホスホメバロン酸にリン酸化する酵素は *M. mazei* (*M. mazei*) メバロン酸キナーゼである。

【 0 0 1 5 】

本明細書における任意の態様では、組み換え微生物は、1 - デオキシ - D - キシリロース 5 - リン酸 (DXP) 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸を更に含み得る。一態様では、DXP 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸は、異種核酸である。他の態様では、DXP 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸は、内在性核酸の複製である。特定の態様では、DXP 経路のポリペプチドは、(a) 1 - デオキシ - D - キシリロース - 5 - リン酸シンターゼ (DXS) 、(b) 1 - デオキシ - D - キシリロース - 5 - リン酸リダクトイソメラーゼ (DXR) 、(c) 4 - ジホスホシチジル - 2 C - メチル - D - エリスリトールシンターゼ (MCT) 、(d) 4 - ジホスホシチジル - 2 - C - メチル - D - エリスリトールキナーゼ (CMK) 、(e) 2 C - メチル - D - エリスリトール - 2 , 4 - シクロニリン酸シンターゼ (MCS) 、(f) 1 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 2 - (E) - プテニル - 4 - ニリン酸シンターゼ (HDS) 、及び (g) 1 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 2 - (E) - プテニル - 4 - ニリン酸レダクターゼ (HDR) からなる群から選択される。他の態様では、DXP 経路のポリペプチドは DXS である。

10

【 0 0 1 6 】

本明細書における任意の態様では、1 つ以上の異種核酸は、誘導型プロモーター又は構成型プロモーター下に配置される。本明細書における任意の態様では、1 つ以上の異種核酸は、1 つ以上のマルチコピープラスミドにクローニングされる。本開示の任意の態様では、1 つ以上の異種核酸は、細胞の染色体に組み込まれる。

20

【 0 0 1 7 】

本明細書における任意の態様では、微生物は、バクテリア細胞、藻類細胞、真菌細胞、酵母細胞、又はシアノバクテリア細胞である。一態様では、微生物はバクテリア細胞である。別の態様では、バクテリア細胞はグラム陽性菌細胞又はグラム陰性菌細胞である。別の態様では、バクテリア細胞は、エシェリキア属 (*Escherichia* spp.) (例えば、大腸菌 (*E. coli*)) 、 *L. acidophilus* 、 *P. citrea* 、 *枯草菌* (*B. subtilis*) 、 *B. licheniformis* 、 *B.レンタス* (*B. lentus*) 、 *B. brevis* 、 *B. stearothermophilus* 、 *B. alkalophilus* 、 *B. amyloliquefaciens* 、 *B. clausii* 、 *B. halodurans* 、 *B. megaterium* 、 *B. coagulans* 、 *B. circulans* 、 *B. lautus* 、 *B. thuringiensis* 、 *コリネバクテリウム属* (*Corynebacterium* spp.) (例えば、 *C. glutamicum*) 、 *S. degradans* 2 ~ 40 、 *アルギノビブリオ・アクアリティカス* (*Alginovibrio aqualiticus*) 、 *アルテノモナス* (*Alteromonas* spp.) 株 K L I A 、 *アステロミセス・クルシアタス* (*Asteromyces cruentatus*) 、 *ベネッケア・ペラギア* (*Beneckea pelagia*) 、 *コリネバクテリウム属* (*Corynebacterium* spp.) 、 *エンテロバクター・クロアカ* (*Enterobacter cloacae*) 、 *ハルモナス・マリーナ* (*Halomonas marina*) 、 *クレブシエラ・ニューモニエ* (*Klebsiella pneumonia*) 、 *フォトバクテリウム属* (*Photobacterium* spp.) (ATCC 433367) 、 *シードアルテロモナス・エルヤコヴィ* (*Pseudoalteromonas elyakovi*) 、 *シードモナス属* (*Pseudomonas* spp.) (例えば、 *シードモナス・アルギノボラ* (*Pseudomonas alginovora*) 、 *シードモナス・エルジノーサ* (*Pseudomonas aeruginosa*) 、 *シードモナス・マルトフィリア* (*Pseudomonas maltophilia*) 、 *シードモナス・プチダ* (*Pseudomonas putida*)) 、 *ビブリオ・アルギノリチカス* (*Vibrio alginolyticus*) 、 *ビブリオ・ハリオチコール* (*Vibrio halioticol*) 、 及び *ビブリオ・ハーベイ* (*Vibrio harveyi*) 、 *S.アルバス* (*S. albus*) 、 *S. リビダンス* (*S. lividans*) 、 *S. セリカラ* (*S. coelicolor*)

30

40

50

)、*S. griseus* (S. griseus)、及び*P. alcaligenes* (P. alcaligenes) 細胞からなる群から選択される。別の態様では、バクテリア細胞は大腸菌 (E. coli) 細胞である。別の態様では、バクテリア細胞は*L. acidophilus* (L. acidophilus) 細胞である。別の態様では、微生物は藻類細胞である。別の態様では、藻類細胞は緑藻類、紅藻類、灰色藻類、クロララクニオン藻類 (chlorarachniophytes)、ミドリムシ類 (euglenids)、クロミスタ類 (chromista)、又は渦鞭毛藻類からなる群から選択される。別の態様では、微生物は真菌細胞である。別の態様では、真菌細胞は糸状菌である。別の態様では、微生物は酵母細胞である。別の態様では、酵母細胞は、サッカロミセス属 (Saccharomyces sp.)、シゾサッカロミセス属 (Schizosaccharomyces sp.)、ピキア属 (Pichia sp.)、又はカンジダ属 (Candida sp.) からなる群から選択される。別の態様では、酵母細胞はサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 細胞である。

10

【0018】

別の態様では、本発明は、マロニルCoA 及びアセチルCoA からアセトアセチルCoA を合成することのできるポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸：並びに (a) ポリプレニルピロリン酸シンターゼ；及び (b) メバロン酸 (MVA) 経路の1つ以上のポリペプチド、をコードしている1つ以上の核酸を含む、イソプレノイドを生産することのできる組み換え微生物であって、前記組み換え微生物を適切な培地で培養することにより、前記ポリペプチドの生産及び1つ以上のイソプレノイド類の合成が提供される、組み換え微生物提供する。一態様では、(b) のMVA 経路の1つ以上のポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸は異種核酸である。本明細書における任意の態様では、MVA 経路の1つ以上のポリペプチドは、(a) アセトアセチルCoA - CoA をアセチルCoA と縮合させてHMG - CoA を生成する酵素、(b) HMG - CoA をメバロン酸に変換する酵素、(c) メバロン酸を5 - ホスホメバロン酸にリン酸化する酵素、(d) 5 - ホスホメバロン酸を5 - ジホスホメバロン酸に変換する酵素、並びに (e) 5 - ジホスホメバロン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する酵素、からなる群から選択される。

20

【0019】

本明細書における任意の態様では、メバロン酸をリン酸化して5 - ホスホメバロン酸を生成する酵素は、*M. mazei* (*M. mazei*) メバロン酸キナーゼ、ラクトバチルス (Lactobacillus) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ (Lactobacillus sakei) メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母・メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス (Streptococcus) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pneumoniae) メバロン酸キナーゼポリペプチド、及びストレプトミセス (Streptomyces) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトミセス (Streptomyces) CL190 メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群から選択される。一態様では、メバロン酸を5 - ホスホメバロン酸にリン酸化する酵素は*M. mazei* (*M. mazei*) メバロン酸キナーゼである。

30

【0020】

本明細書における任意の態様では、1つ以上の異種核酸は、誘導型プロモーター又は構成型プロモーター下に配置される。本開示の任意の態様では、1つ以上の異種核酸は、1つ以上のマルチコピープラスミドにクローン化される。本開示の任意の態様では、1つ以上の異種核酸は、細胞の染色体に組み込まれる。

40

【0021】

一態様では、微生物は、バクテリア細胞、藻類細胞、真菌細胞、酵母細胞、又はシアノバクテリア細胞である。一態様では、微生物はバクテリア細胞である。別の態様では、バクテリア細胞はグラム陽性菌細胞又はグラム陰性菌細胞である。別の態様では、バクテリア細胞は、エシェリキア属 (Escherichia sp.) (例えば、大腸菌 (E. coli))、*L. acidophilus* (*L. acidophilus*)、*P. citrea* (*P. citrea*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、*B. licheniformis* (*B. licheniformis*)、*B. lentus* (*B. lentus*)、*B. brevis* (*B. brevis*)、*B. stearothermophilus* (*B. stearothermophilus*)、*B.アル*

50

カロフィルス (B. alkalophilus) 、 B. アミロリケファシエンス (B. amyloliquefaciens) 、 B. クラウシイ (B. clausii) 、 B. ハロドュランス (B. halodurans) 、 B. メガテリウム (B. megaterium) 、 B. コアギュランス (B. coagulans) 、 B. サーキュランス (B. circulans) 、 B. ロータス (B. lautus) 、 B. チューリングエンシス (B. thuringiensis) 、 コリネバクテリウム属 (Corynebacterium spp.) (例えは、 C. グルタミクム (C. glutamicum)) 、 S. デグラダンス (S. degradans) 2 ~ 40 、 アルギノビブリオ・アクアリティカス (Alginovibrio aqualiticus) 、 アルテノモナス (Alteromonas spp.) 株 K L I A 、 アステロミセス・クルシアタス (Asteromyces cruciatus) 、 ベネッケア・ペラギア (Beneckeia pelagia) 、 コリネバクテリウム属 (Corynebacterium spp.) 、 エンテロバクター・クロアカ (Enterobacter cloacae) 、 ハルモナス・マリーナ (Halmonas marina) 、 クレブシエラ・ニューモニエ (Klebsiella pneumonia) 、 フォトバクテリウム属 (Photobacterium spp.) (ATCC 433367) 、 シュードアルテロモナス・エルヤコヴィ (Pseudoalteromonas elyakovi) 、 シュードモナス属 (Pseudomonas sp.) (例えは、 シュードモナス・アルギノボラ (Pseudomonas alginovora) 、 シュードモナス・エルジノーサ (Pseudomonas aeruginosa) 、 シュードモナス・マルトフィリア (Pseudomonas maltophilia) 、 シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida)) 、 ビブリオ・アルギノリチカス (Vibrio alginolyticus) 、 ビブリオ・ハリオチコール (Vibrio halophilus) 、 及びビブリオ・ハーベイ (Vibrio harveyi) 、 S. アルバス (S. albus) 、 S. リビダンス (S. lividans) 、 S. セリカラ (S. coelicolor) 、 S. グリセウス (S. griseus) 、 及び P. アルカリゲネス (P. alkaligenes) 細胞からなる群から選択される。別の態様では、 バクテリア細胞は大腸菌 (E. coli) 細胞である。別の態様では、 バクテリア細胞は L. アシドフィルス (L. acidophilus) 細胞である。別の態様では、 微生物は藻類細胞である。別の態様では、 藻類細胞は緑藻類、 紅藻類、 灰色藻類、 クロララクニオン藻類 (chlorarachniophyte) 、 ミドリムシ類 (euglenids) 、 クロミスタ類 (chromista) 、 又は渦鞭毛藻類からなる群から選択される。別の態様では、 微生物は真菌細胞である。別の態様では、 真菌細胞は糸状菌である。別の態様では、 微生物は酵母細胞である。別の態様では、 酵母細胞は、 サッカロミセス属 (Saccharomyces sp.) 、 シゾサッカロミセス属 (Schizosaccharomyces sp.) 、 ピキア属 (Pichia sp.) 、 又はカンジダ属 (Candida sp.) からなる群から選択される。別の態様では、 酵母細胞はサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 細胞である。

【 0022 】

本明細書における任意の態様では、 イソプレノイドは、 モノテルペン、 ジテルペン、 トリテルペン、 テトラテルペン、 セスキテルペン、 及びポリテルペンからなる群から選択される。一態様では、 イソプレノイドはセスキテルペンである。別の態様では、 イソプレノイドは、 アビエタジエン、 アモルファジエン、 カレン、 フアルネセン、 - フアルネセン、 - フアルネセン、 フアルネソール、 ゲラニオール、 ゲラニルゲラニオール、 リナロール、 リモネン、 ミルセン、 ネロリドール、 オシメン、 パチョロール、 - ピネン、 サビネン、 - テルピネン、 テルピンデン (terpinene) 、 及びバレンセンからなる群から選択される。

【 0023 】

別の態様では、 本発明は、 イソプレンの生産方法であって、 (a) (i) マロニル Co A 及びアセチル Co A からアセトアセチル Co A を合成することのできるポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸： 並びに (ii) イソプレンシルターゼポリペプチドであって、 異種核酸によりコードされるイソプレンシルターゼポリペプチド及び (iii) メバロン酸 (MVA) 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸、 を含む組み換え微生物を培養する工程と、 (b) イソプレンを生産させる工程と、 を含む、 生産方法を提供する。一態様では、 この方法は、 組み換え微生物により生産されたイソプレンを回収する工程を更に含む。

【 0024 】

別の態様では、 マロニル Co A 及びアセチル Co A からアセトアセチル Co A を合成す

10

20

30

40

50

ることのできるポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸は、アセトアセチルC o Aシンターゼ遺伝子である。他の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドは、植物のイソプレンシンターゼポリペプチドである。別の態様では、M V A経路の1つ以上のポリペプチドは、(a)アセトアセチルC o AをアセチルC o Aと縮合させてH M G - C o A - C o Aを生成する酵素、(b)H M G - C o Aをメバロン酸に変換する酵素、(c)メバロン酸リン酸を5-ホスホメバロン酸に変換する酵素、(d)5-ホスホメバロン酸を5-ジホスホメバロン酸に変換する酵素、並びに(e)5-ジホスホメバロン酸をイソペニテニルピロリン酸に変換する酵素、からなる群から選択される。別の態様では、組み換え微生物は、1-デオキシ-D-キシリロース-5-リン酸(D X P)経路の1つ以上のポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸を更に含む。

10

【0025】

別の態様では、微生物は、バクテリア細胞、藻類細胞、真菌細胞又は酵母細胞である。別の態様では、微生物はバクテリア細胞である。別の態様では、バクテリア細胞はグラム陽性菌細胞又はグラム陰性菌細胞である。別の態様では、バクテリア細胞は大腸菌(E. coli)細胞である。別の態様では、バクテリア細胞はL.アシドフィルス(L. acidophilus)細胞である。別の態様では、微生物は酵母細胞である。別の態様では、酵母細胞はサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)細胞である。

【0026】

本開示の別の態様では、イソプレノイドの生産方法が提供され、この方法は、(i)マロニルC o A及びアセチルC o AからアセトアセチルC o Aを合成することのできるポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸：並びに(ii)ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドであって、異種核酸によってコードされるポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチド及び(iii)メバロン酸(M V A)経路の1つ以上のポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸、を含む組み換え微生物を培養する工程と、前記イソプレノイドを生産させる工程と、を含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】S t r e p C L 1 9 0 U p p e r のプラスミドマップ。

【図2】p M C M 1 1 8 7 のプラスミドマップ。

【図3】株M C M 1 3 2 0 及びM C M 1 3 2 1 から単離されたp C L - P t r c - m v a R - m v a S - n p h T 7 のプラスミドマップ。

30

【図4】アセトアセチルC o A(N p h T 7)をコードするよう遺伝子操作された株により生産されたイソプレン濃度を示すグラフ。ガスクロマトグラフィー-水素炎イオン化検出器を使用して、イソプレン濃度を検出した。アセトアセチルC o Aを介しM V Aを生産する株M C M 1 6 8 4 及びM C M 1 6 8 5 では、D X P経路を介してイソプレンを生産する株M C M 1 6 8 6 と比較してかなり多量のイソプレンが生成された。

【図5】コンストラクトp M C M 1 2 2 1 のベクターマップ。

【図6】S suis H M G R S / p C L を有するコンストラクトn p h T 7 のベクターマップ。図中では上流M V A経路の酵素をコードしている遺伝子に加え、3遺伝子オペロンの発現を支配しているI P T G誘導型T r cプロモーターをハイライトしている。H M G - C o Aレダクターゼ(H M G R)及びH M G - C o Aシンターゼ(H M G S)は、ストレプトコッカス・スイス(Streptococcus suis)由来の遺伝子によりコードされ、N p h T 7アセトアセチルC o Aシンターゼは、ストレプトミセス属(Streptomyces sp.)株C L 1 9 0由来のn p h T 7遺伝子によりコードされる。スペクチノマイシン耐性遺伝子(a a d A 1)、及びプラスミドの複製に必要とされるR e p Aタンパク質(r e p A)をコードしている遺伝子は、p C L 1 9 2 0ベクター骨格に共通するものであり、コンストラクトに含まれるもののが図示しない。

40

【図7】各試験した培養物についての、黒色及び灰色のバーにより表されるイソプレンの比産生性(単位:u g / L O D時間)と、黒色のひし形により表される吸光度(O D 6 0 0 n m)とを示すグラフ。S.スイス(S. suis)H M G R及びH M G Sと、N p h

50

T7アセトアセチルCoAシンターゼとから構成される上流MVA経路の酵素を保有させた株のイソブレンデータを黒色のバーにより表す（表中、NphT7-a～cの表記は、それぞれREM-C8-25、REM-C9-25、及びREM-D1-25を表す）；ストレプトミセス属（*Streptomyces* sp.）株CL190由来のnphT5、nphT6、及びnphT7遺伝子によりコードされる上流MVA経路を保有している株のイソブレンデータは灰色のバーにより表す（MCM1684及びMCM1685と表記）；異種上流MVA経路の系を含まない対照株のイソブレンデータも灰色で示す（IspSとしてのみ表記）。イソブレン比産生性は、左側のy軸により表される。OD値は、関連する遺伝子のIPTGによる発現誘導から3.5時間後に測定したものを右側のy軸に表す。

【図8】連結させたNphT7、HMG-CoAシンターゼ、及びHMG-CoAレダクターゼの触媒活性アッセイから得られたNADP+/時間/ODを示すグラフ。株nphT7試験株1～3は、それぞれREM-C8-25、REM-C9-25、及びREM-D1-25に相当する。対照となる親IspS単独株はREM-F3-25である。これらの結果は、NphT7活性がアセチルCoA及びマロニルCoAの両方の存在に依存することと一致する。

【図9】株nphT7試験株1～3（それぞれREM-C8-25、REM-C9-25、及びREM-D1-25に相当）を使用する触媒アッセイから得られたNADP+/時間/ODを示すグラフ。対照となる親IspS単独株はREM-F3-25である。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明は、特に、イソブレン、イソブレノイド前駆体及び/又はイソブレノイドの生産に取り込まれる炭素量を増加させる第一工程として、マロニルCoA及びアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成することのできる酵素を発現するよう遺伝子操作した組み換え微生物において、イソブレン、イソブレノイド前駆体分子、及び/又はイソブレノイドの生産を向上させる組成物及び方法を提供する。

【0029】

一般的技術

本発明の実施においては、特に断りのない限り、当業者の技能の範囲内に含まれる従来の分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の技術を用いる。このような技術は、「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、第3版（Sambrook et al.、2001年）；「オリゴヌクレオチド合成（Oligonucleotide Synthesis）」（M. J. Gait, ed.、1984年）；「動物細胞培養法：実践的アプローチ（Animal Cell Culture: A practical approach）」、第3版（J. R. Masters, ed.、2000年）；「酵素学的手法（Methods in Enzymology）」（Academic Press, Inc.）；「分子生物学最新プロトコル（Current Protocols in Molecular Biology）」（F. M. Ausubel et al.、編、1987年、周期的に改訂）；「PCR：ポリメラーゼ連鎖反応（PCR: The Polymerase Chain Reaction）」（Mullis et al.、編、1994年）、Singleton et al.、「微生物学及び分子生物学辞典（Dictionary of Microbiology and Molecular Biology）第3版」J. Wiley & Sons（New York, N.Y. 2006年）、並びに「マーチ最新有機化学反応、機序及び構造（March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure）第6版」、John Wiley & Sons（New York, N.Y. 2007年）といった文献中に十分に説明されており、これらの文献は、当業者に対し、本開示に使用される多くの用語について一般的な指針を提供する。

【0030】

用語の定義

用語「イソブレン」は、2-メチル-1,3-ブタジエン（CAS # 78-79-5）を指す。3,3-ジメチルアリルニリン酸（DMAPP）からピロリン酸を除去することで、揮発性のC5炭化水素を、直接的に及び最終的に生成することができる。IPP分

10

20

30

40

50

子を D M A P P 分子に結合又は重合させることは包含しない場合がある。用語「イソプレン」は、概して、本明細書に別途記載のない限り、生産方法を限定されることを意図しない。

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用するとき、用語「ポリペプチド」には、ポリペプチド、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド断片、及び融合ポリペプチドが含まれる。

【 0 0 3 2 】

本明細書で使用するとき、「単離ポリペプチド」は、2、5、10、20、又は50個以上の異なるポリペプチドのライブラリなどといった、ポリペプチドのライブラリの一部を意味するものではなく、天然に生じる少なくとも1つの成分から分離されたポリペプチドを意味する。例えば、ポリペプチドをコードしている組み換え核酸を発現させることで単離ポリペプチドを得ることができる。

10

【 0 0 3 3 】

「異種ポリペプチド」は、宿主細胞と異なる生物、種、又は株由来の核酸配列によりコードされるポリペプチドを意味する。一部の実施形態では、異種ポリペプチドは、同じ宿主細胞に天然に見られる野生型ポリペプチドと同一ではない。

【 0 0 3 4 】

本明細書で使用するとき、「核酸」は、共有結合により単鎖又は二本鎖のいずれかの形態で連結している、2つ以上のデオキシリボヌクレオチド及び／又はリボヌクレオチドを指す。

20

【 0 0 3 5 】

「組換え核酸」とは、対象とする核酸が由来する生物において自然に存在するゲノムにおいて、対象とする核酸に隣接する1つ以上の核酸（例えば遺伝子）を含まない、対象とする核酸のことを意味する。したがって、この用語には、例えば、ベクターに組み込まれた、プラスミド又はウィルスに自己複製的に組み込まれた、原核生物若しくは真核生物のゲノム D N A に組み込まれた、又は他の配列とは独立して別個の分子（例えば、c D N A 、ゲノム D N A 断片、又は P C R により生産された若しくは制限エンドヌクレアーゼによる消化により生産された c D N A 断片）として存在する、組み換え D N A が含まれる。

【 0 0 3 6 】

「異種核酸」は、宿主細胞と異なる生物、種又は株由来の核酸配列を意味する。一部の実施形態では、異種核酸は、同じ宿主細胞に天然に見られる野生型核酸と同一ではない。

30

【 0 0 3 7 】

本明細書において使用するとき、「発現調節配列」は、対象とする核酸の転写を指示する核酸配列のことを意味する。発現調節配列は、構成型若しくは誘導型のプロモーター、又はエンハンサーなどのプロモーターであり得る。発現調節配列は「ネイティブ」な配列又は異種配列であり得る。ネイティブな発現調節配列は、遺伝子を発現させる生物、種又は株と同じ生物、種又は株に由来する配列である。異種の発現調節配列は、遺伝子を発現させる生物、種又は株とは異なる生物、種又は株に由来する配列である。「誘導型プロモーター」は、環境下、又は発育制限下で活性であるプロモーターである。

40

【 0 0 3 8 】

「調節可能なように連結された」は、核酸発現調節配列（プロモーターなど）及び第2の核酸配列間の機能的連結を意味し、発現調節配列は、第2の配列に相当する核酸の転写を指示する。

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用するとき、用語「最少培地（minimal medium又はminimal media）」は、細胞の生育に必要とされる最低限の栄養素を含有し、概してアミノ酸の存在していない増殖培地を指す。最少培地は、典型的には、（1）細胞生育用の炭素源、（2）宿主細胞種及び生育条件間で変更させ得る各種塩類、及び（3）水、を含有する。炭素源は、グルコースなどの単糖から、本明細書で以下により詳細に記載されるような、他のバイオマスのより複雑な加水分解物、例えば、酵母エキスなどといった多様なものであり得る。塩は

50

、概してマグネシウム、窒素、リン及びイオウなどの必須元素を提供し、細胞がタンパク質及び核酸を合成できるようとする。また、最少培地には、特定のプラスミド及び同様物を維持すべく選別するために、抗菌剤などの選択剤を添加することもできる。例えば、微生物が、例えばアンピシリン又はテトラサイクリンなどの特定の抗菌剤に耐性である場合、耐性を欠く細胞の生育を阻害する目的で培地に抗菌剤を添加することができる。培地には、所望される生理学的又は生化学的特性について選別するのに必要とされる、例えば特定のアミノ酸などといった他の化合物を添加することができる。

【0040】

本明細書で使用するとき、用語「イソプレノイド」は、2つ以上の炭化水素単位からなり、各単位は、特定の様式で配置された5つの炭素原子からなる、天然に生じる有機化合物類の、広範にわたるかつ多様な部類を指す。本明細書で使用するとき、「イソプレン」は、明らかに「イソプレノイド」の定義から除外される。

10

【0041】

本明細書で使用するとき、用語「テルペノイド」は、多様な様式で組み立てられ及び修飾され、構成員として使用されたイソプレノイド単位の数に基づき分類される、炭素数5のイソプレノイド単位に由来する有機分子の、広範にわたるかつ多様な部類を指す。ヘミテルペノイドは、イソプレノイド単位を1つ有する。モノテルペノイドは、イソプレノイド単位を2つ有する。セスキテルペノイドは、イソプレノイド単位を3つ有する。ジテルペノイドは、イソプレン単位を4つ有する。セステルテルペノイドは、イソプレノイド単位を5つ有する。トリテルペノイドは、イソプレノイド単位を6つ有する。テトラテルペノイドは、イソプレノイド単位を8つ有する。ポリテルペノイドは、イソプレノイド単位を8つ超有する。

20

【0042】

本明細書で使用するとき、「イソプレノイド前駆体」は、テルペノイド又はイソプレノイドの生合成時に生物により使用される任意の分子を指す。イソプレノイド前駆体分子の非限定例としては、例えば、イソペンテニルピロリン酸(IPP)及びジメチルアリルニリン酸(DMAPP)が挙げられる。

30

【0043】

本明細書で使用するとき、用語「質量収率」は、宿主細胞により生産される生産物の質量を、宿主細胞により消費されたグルコースの質量より除算し、100を乗じたものを指す。

【0044】

「比生産性」は、宿主細胞により生産される生産物の質量を、生産物の生産にかかった時間、宿主細胞の密度及び培養体積により除したものを意味する。

【0045】

「力価」は、宿主細胞により生産される生産物の質量を、培養体積により除したもの意味する。

【0046】

本明細書で使用するとき、用語「細胞生産性指数(cell productivity index: CPI)」は、宿主細胞により生産される生産物の質量を、培養により生産された宿主細胞の質量により除したものを指す。

40

【0047】

本明細書において別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術及び科学用語は、本発明の属する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同様の意味を持つ。

【0048】

本明細書で使用するとき、単数形「a」、「an」、及び「the」には、文脈に明示されない限り、対象物が複数ある場合をも包含する。

【0049】

本明細書を通じて与えられるあらゆる最大数の限定は、あらゆるより小さい数値の限定

50

を、あたかもそのようなより小さい数値の限定が明確に書かれているかのように包含するものと理解されることが意図される。本明細書の全体を通じて与えられるすべての最小の数値的限定には、これよりも大きいすべての数値的限定が、あたかもこうしたより大きい数値的限定が本明細書に明確に記載されているものと同様に含まれる。本明細書の全体を通じて与えられるすべての数値的範囲には、これよりも狭い数値的範囲が、あたかもこうしたより狭い数値的範囲がすべて本明細書に明確に記載されているものと同様に含まれる。

【0050】

イソプレン、イソプレノイド前駆体、又はイソプレノイドを生産することができる組み換え微生物

10

メバロン酸依存性生合成経路（MVA経路）は、全ての高等真核生物及び特定種の細菌に存在する、重要な代謝経路である。メバロン酸経路は、タンパク質のプレニル化、細胞膜の維持、タンパク質の固定及びN-グリコシル化などの、多様な工程において使用される分子の生産に重要であり、並びにテルペン、テルペノイド、イソプレノイド、及びイソプレンの生合成時の主成分として機能するイソプレノイド前駆体分子のDMAPP及びIPPの主要な供給源を提供する。

【0051】

本明細書に記載されるとおり、上流域のMVA経路は、アセトアセチルCoAシンターゼ、HMG-CoAレダクターゼ、及びHMG-CoAシンターゼ活性を有するポリペプチドの作用によりメバロン酸を生産する際、細胞代謝中に生成されたアセチルCoA及びマロニルCoAを開始基質として利用する。始めに、アセトアセチルCoAシンターゼの作用により、アセチルCoA及びマロニルCoAがアセトアセチルCoAに変換される。次に、アセトアセチルCoAは、HMG-CoAシンターゼの酵素作用により、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリルCoA（HMG-CoA）に変換される。このCoA誘導体をHMG-CoAレダクターゼにより還元してメバロン酸を生成する。この反応は、メバロン酸経路によるイソプレノイド生産の律速段階になる。次に、メバロン酸は、メバロン酸キナーゼの作用により5-ホスホメバロン酸に変換され、5-ホスホメバロン酸は、続いてホスホメバロン酸キナーゼの酵素活性により、5-ジホスホメバロン酸に変換される。最後に、酵素の5-ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼの活性により、5-ジホスホメバロン酸からIPPが形成される。

20

【0052】

したがって、本発明の組み換え微生物は、イソプレン、イソプレノイド前駆体、又はイソプレノイド生産能を有する組み換え微生物であり、組み換え微生物は、宿主微生物においてマロニルCoA及びアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成することができる酵素（例えば、アセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子、すなわちnphT7）をコードしている遺伝子と、アセトアセチルCoAからのイソプレン又はイソプレノイドの合成を可能にする、イソプレン生合成又はイソプレノイド生合成に関与する遺伝子群のうちの1つ以上の遺伝子とを含む。

30

【0053】

アセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子

40

アセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子（nphT7としても知られる）は、マロニルCoA及びアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する活性を有し、かつ2分子のアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する活性は最小限である（例えば、非活性である）酵素をコードしている遺伝子である。例えば、Okamura et al. , PNAS Vol 107, No. 25, pp. 11265~11270 (2010)を参照されたい。この文献中のnphT7に関する教示は、本開示に明確に組み込まれる。日本国特許公開第2008-61506(A)号及び米国特許出願公開第2010/0285549号には、放線菌（actinomycete）のストレプトミセス（Streptomyces）属CL190株のアセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子が記載されている。アセトアセチルCoAシンターゼも、アセチルCoA：マロニルCoAアシル基転移酵素として参照さ

50

れ得る。使用することのできる代表的なアセトアセチルCoAシンターゼ（又はアセチルCoA：マロニルCoAアシル基転移酵素）としては、Genbank AB540131.1が挙げられる。

【0054】

一実施形態では、本発明のアセトアセチルCoAシンターゼは、不可逆反応を介し、マロニルCoA及びアセチルCoAから、アセトアセチルCoAを合成する。アセトアセチルCoAシンターゼを使用してアセチルCoAを生成することで、この反応は不可逆的なものであり、かつアセトアセチルCoAチオラーゼ酵素の2分子のアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する作用は可逆的なものであるという、更なる利点が提供される。これらを踏まえると、アセトアセチルCoAシンターゼを使用して、マロニルCoA及びアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成することで、チオラーゼを使用して同様の最終産物を生産した場合と比較して、イソプレン、イソプレノイド前駆体、及び/又はイソプレノイドの生産量において有意な向上が得られる。

10

【0055】

これに加え、アセトアセチルCoAシンターゼを使用してイソプレン、イソプレノイド前駆体、及び/又はイソプレノイドを生成した場合には、アセトアセチルCoAシンターゼが、マロニルCoAの脱炭酸によりマロニルCoAをアセチルCoAに変換し得るという更なる利点も提供する。したがって、開始基質の貯蔵量は、アセチルCoAの初期量により律速されない。アセトアセチルCoAシンターゼによるアセトアセチルCoAの合成は、開始基質がマロニルCoAのみである場合にのみ引き続き生じ得る。一実施形態では、開始時のマロニルCoAのプール量は、よりマロニルCoAを有する宿主株を使用することにより増加する。このようなプール量の増加は、天然に生じ得るものであり又は分子操作により設計され得るものである。例えば、Fowler, et al., Applied and Environmental Microbiology, Vol. 75, No. 18, pp. 5831~5839 (2009)、Zha et al., Metabolic Engineering, 11: 192~198 (2009)、Xu et al., Metabolic Engineering, (2011) doi: 10.1016/j.ymben.2011.06.008、Okamura et al., PNAS 107: 11265~11270 (2010)、並びに米国特許第2010/0285549号を参照されたい。これらの非特許文献及び特許文献の内容は、参照によりその全体が本開示に明示的に組み込まれる。

20

30

【0056】

本開示に記載の任意の態様又は実施例では、マロニルCoA及びアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する能力を有する酵素を使用できる。このような酵素の非限定例を本明細書に記載する。本開示に記載の特定の実施形態では、マロニルCoA及びアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する能力を有するストレプトミセス属(*Streptomyces*)の放線菌(*actinomycete*)から誘導されるアセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子を使用できる。

【0057】

このようなアセトアセチルCoAシンターゼの遺伝子の例としては、配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしている遺伝子が挙げられる。このような、配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質は、マロニルCoA及びアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する活性を有し、2分子のアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する活性は有さないアセトアセチルCoAシンターゼに相当する。

40

【0058】

一実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしている遺伝子は、ストレプトミセス属(*Streptomyces* sp.)の放線菌(*actinomycete*)CL190株からテンプレートとして得られるゲノムDNAと、日本国特許公開第2008-61506(A)号を参照して設計することのできるプライマー対と、を使用して核酸増幅法(例えば、PCR)により得ることができる。

50

【0059】

本明細書に記載するとき、本発明での使用に関し、アセトアセチルC_oAシンターゼ遺伝子は、ストレプトミセス属 (Streptomyces sp.) CL 190 株の放線菌 (actinomycete) に由来する配列番号 1 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしている遺伝子に限定されない。マロニルC_oA 及びアセチルC_oA からアセトアセチルC_oA を合成することができかつ 2 分子のアセチルC_oA からアセトアセチルC_oA を合成することはできないタンパク質をコードしている任意の遺伝子を本発明に記載の方法に使用することができる。特定の実施形態では、アセトアセチルC_oAシンターゼ遺伝子は、配列番号 1 のアミノ酸配列と類似性が高く又は実質的に同一であるアミノ酸配列を有し、かつマロニルC_oA 及びアセチルC_oA からアセトアセチルC_oA を合成する機能を有するタンパク質をコードしている遺伝子であり得る。表現の「類似性の高い」又は「実質的に同一」とは、例えば、少なくとも約 80% 同一性、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、及び少なくとも約 99% 同一であることを意味する。上記で使用したとおり、同一度の値は、異なるアミノ酸配列及び配列番号 1 のアミノ酸配列に含まれるアミノ酸残基間の同一度 (%) に相当するものであり、配列類似性について検索するためのプログラムを使用し、配列番号 1 のアミノ酸配列と、異なるアミノ酸配列とを整列させることで算出される。

10

【0060】

他の実施形態では、アセトアセチルC_oAシンターゼ遺伝子は、1つ以上のアミノ酸の置換、欠失、付加又は挿入により、配列番号 1 のアミノ酸配列由来のアミノ酸配列を有し、かつマロニルC_oA 及びアセチルC_oA からアセトアセチルC_oA を合成する機能を有するタンパク質をコードしている遺伝子であってよい。本明細書において、表現「1つ以上のアミノ酸」は、例えば、2~30 個のアミノ酸、好ましくは 2~20 個のアミノ酸、より好ましくは 2~10 個のアミノ酸及び最も好ましくは 2~5 個のアミノ酸を指す。

20

【0061】

更に他の実施形態では、アセトアセチルC_oAシンターゼ遺伝子は、厳密な条件下で配列番号 1 のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの一部又は全部とハイブリダイズすることのできる、並びにマロニルC_oA 及びアセチルC_oA からアセトアセチルC_oA を合成する機能を有するタンパク質をコードすることのできる、ポリヌクレオチドからなる場合がある。本明細書において、厳密な条件下でのハイブリダイゼーションは、60℃で2回SSCで洗浄する条件下で結合を維持させることに相当する。ハイブリダイゼーションは、J. Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (2001) に記載の手法などの、既知の従来法により実施することができる。

30

【0062】

本明細書に記載されるとおり、配列番号 1 のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有するアセトアセチルC_oAシンターゼをコードしている遺伝子は、任意の生物から単離できる可能性があり、例えば、ストレプトミセス属 (Streptomyces sp.) CL 190 株ではない放線菌 (actinomycete) から得ることもできる。加えて、本明細書で用いるアセトアセチルC_oAシンターゼ遺伝子は、配列番号 1 のアミノ酸配列をコードしているポリヌクレオチドを、当該技術分野において既知の手法により改変することを得ることもできる。ヌクレオチド配列への変異導入は、Kunkel 法又は gapped duplex 法あるいはこれらのいずれかに類似の手法などの既知の手法により実施することができる。例えば、変異導入は、部位特異的変異導入については、変異導入キット (例えば、製品名: Mutant-K 及び Mutant-G (タカラバイオ)) 及び製品名 L A P C R in vitro Mutagenesis シリーズのキット (タカラバイオ) などを使用することで実施できる。

40

【0063】

50

配列番号 1 のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有するアセトアセチル C o A シンターゼの活性は、以下に記載のとおりに評価することができる。具体的には、評価されることになるタンパク質をコードしている遺伝子は、遺伝子を細胞中で発現させ、続いてクロマトグラフィーなどの手法によりタンパク質を精製することができるような様式で、まずは宿主細胞に導入される。得られた評価すべきタンパク質を含有させた緩衝液に、基質としてマロニル C o A 及びアセチル C o A を加え、続いて例えば、所望の温度（例えば、10 ~ 60 ）でインキュベートする。反応の完了後、基質の減少量及び / 又は生成物量（アセトアセチル C o A ）を測定する。したがって、試験したタンパク質がマロニル C o A 及びアセチル C o A からアセトアセチル C o A を合成する機能を有するか評価すること、並びに合成度を評価することができる。このような場合では、このタンパク質が、2 分子のアセチル C o A からアセトアセチル C o A を合成する活性を有しているか否かは、得られた評価すべきタンパク質を含有させた緩衝液に、アセチル C o A のみを基質として加え、基質の減少量及び / 又は同様の方法において生産された生産物量を測定することにより、試験することができる。

10

【 0 0 6 4 】

M V A 経路の核酸及びポリペプチド

アセトアセチル C o A シンターゼと合わせて使用することのできる M V A 経路のポリペプチド例としては、限定するものではないが、3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル C o A シンターゼ（H M G - C o A シンターゼ）ポリペプチド（例えば、m v a S によりコードされる酵素）、3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル C o A レダクターゼ（H M G - C o A レダクターゼ）ポリペプチド（例えば、m v a R によりコードされる酵素又はチオラーゼは欠損しているものの還元酵素活性は保持するよう改変を受けた m v a E によりコードされる酵素）、メバロン酸キナーゼ（M V K ）ポリペプチド、ホスホメバロン酸キナーゼ（P M K ）ポリペプチド、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ（M V D ）ポリペプチド、ホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ（P M D C ）ポリペプチド、イソペンテニルリン酸キナーゼ（I P K ）ポリペプチド、I P P イソメラーゼポリペプチド、I D I ポリペプチド、及び M V A 経路ポリペプチドに関係する 2 つ又はそれ以上の活性を有するポリペプチド（例えば、融合ポリペプチド）、が挙げられる。特に、M V A 経路ポリペプチドとしては、M V A 経路のポリペプチドの活性を少なくとも 1 つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド及び融合ポリペプチドが挙げられる。M V A 経路の核酸例としては、M V A 経路に含まれるポリペプチドの活性を少なくとも 1 つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又は融合ポリペプチドをコードしている核酸が挙げられる。M V A 経路のポリペプチド及び核酸例としては、本明細書に記載されるような任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸が挙げられる。更に、イソブレンの生産を増大させるような、M V A 経路のポリペプチド変異体も、良好に使用することができる。

20

【 0 0 6 5 】

使用することのできる M V A 経路ポリペプチドの非限定例としては、国際公開第 2 0 0 9 / 0 7 6 6 7 6 号、同第 2 0 1 0 / 0 0 3 0 0 7 号、及び同第 2 0 1 0 / 1 4 8 1 5 0 号に記載のものが挙げられ、これらの特許文献の内容は、参照によりその全体が本開示に表される。

30

【 0 0 6 6 】

3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル C o A レダクターゼ（H M G - C o A レダクターゼ）ポリペプチド及び核酸の例

H M G - C o A のメバロン酸ポリペプチドへの変換を触媒する酵素、例えば、3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル C o A レダクターゼ（H M G - C o A レダクターゼ）を使用することができる。チオラーゼを欠損しつつ還元酵素活性は保持するよう改変した m v a E によりコードされる酵素も別の例として挙げられる。m v a E 遺伝子は、チオラーゼ活性及び H M G - C o A レダクターゼ活性を両方保有しているポリペプチドをコードするものと報告されている。m v a E 遺伝子によりコードされているポリペプチドのチオラ-

40

50

ゼ活性は、アセチルC o AをアセトアセチルC o Aに変換するのに対し、H M G - C o Aレダクターゼポリペプチドの酵素活性は、3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタルリルC o Aをメバロン酸に変換する。本発明に使用することのできるm v a Eポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の微生物資源から天然に又は改変により得られ、チオラーゼ活性は有さないもののH M G - C o Aレダクターゼ活性は有するポリペプチド及び核酸が挙げられる。

【0067】

改変m v a Eポリペプチドとしては、1つ以上のアミノ酸残基がアミノ酸置換されているものの、H M G - C o Aレダクターゼ活性は保有しており、かつチオラーゼ活性は最小限に抑えられているか、又は全く有さないものが挙げられる。アミノ酸置換は、保存的なものであっても非保存的なものであってもよく、アミノ酸残基の置換は遺伝子暗号によりコードされていてもコードされていてもよい。標準的な20個のアミノ酸「記号(alphabet)」を、側鎖の類似性に基づき化学的なファミリーに分けた。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、極性無電荷側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を持つアミノ酸が挙げられる。「保存的アミノ酸置換」では、アミノ酸残基は、化学的に類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される（すなわち、塩基性側鎖を有するアミノ酸は、塩基性側鎖を有する別のアミノ酸により置換される）。「非保存的アミノ酸置換」では、アミノ酸残基は、化学的に異なる側鎖を有するアミノ酸残基で置換される（すなわち、塩基性側鎖を有するアミノ酸は、芳香族側鎖を有する別のアミノ酸により置換される）。

10

20

30

40

【0068】

m v a Eポリペプチド中にアミノ酸置換を導入することで、分子の官能性を改良することができる。例えば、チオラーゼ欠損型m v a Eポリペプチドには、3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタルリルC o Aのメバロン酸への変換能を向上させるアミノ酸置換を導入することができる。一部の態様では、チオラーゼ欠損型m v a Eポリペプチド変異体は、1つ以上の保存的なアミノ酸置換を含有する。

【0069】

一態様では、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体及び/又はイソプレノイドを生産させる際には、分解されていない又は分解しにくい、チオラーゼ欠損型m v a Eタンパク質を使用することができる。使用することのできる、分解されていない又は分解しにくいm v a E遺伝子産物の例としては、限定するものではないが、E . フェシウム (E. faecium)、E . ガリナラム (E. gallinarum)、E . カセリフラブス (E. casseliflavus)、E . フェカリス (E. faecalis) 及び L . グレイ (L. grayi) に由来するものが挙げられる。当業者は、大腸菌 (E. coli) B L 2 1 (D E 3) においてm v a Eタンパク質を発現させ、任意の標準的な分子生物学手法により断片が存在していないか調べることができる。例えば、H i s タグを利用して精製した後、S D S - P A G E ゲルをS a f e s t a i nで染色することにより、又はメバロン酸、イソプレン又イソプレノイドを生産する大腸菌 (E. coli) B L 2 1 において発現させる場合には本明細書に記載の検出法を使用することにより、断片が存在していないことを確認することができる。

【0070】

H e d l e t a l . , (J B a c t e r i o l . 2 0 0 2 , A p r i l ; 1 8 4 (8) : 2 1 1 6 ~ 2 1 2 2) に記載されるものなどの標準法を使用して、ポリペプチドがチオラーゼ活性を欠損しH M G C o Aレダクターゼ活性の高いm v a E活性を有するか、アセトアセチルC o Aチオラーゼの非存在下及び/又はH M G - C o Aレダクターゼ活性の存在下で測定することにより決定することができる。代表的なアッセイでは、アセトアセチルC o Aチオラーゼ活性は、アセトアセチルC o Aの形成又はチオール基の開裂

50

に伴う吸光度の変化を分光光度計により 302 nm にて監視することで測定できる。アセトアセチル Co A 合成を判定するための各反応に関する標準的なアッセイ条件は、1 mM のアセチル Co A、10 mM の Mg Cl₂、50 mM のトリス (pH 10.5) というものであり、反応は酵素の添加により開始される。アッセイは最終用量 200 μL で実施できる。アッセイに関し、1 酵素単位 (e.u.) は、1 分間で 1 μmol のアセトアセチル Co A を合成すること又はチオール基を開裂させることを意味する。他の代表的なアッセイでは、HMG-Co A レダクターゼ活性は、分光光度計により、340 nm での NADP (H) の出現又は消失をもとに監視することもできる。HMG-Co A のメバロン酸への還元的脱アシル化について測定した各反応の標準的なアッセイ条件は、0.4 mM の NADPH、1.0 mM の (R, S)-HMG-Co A、100 mM の KCl 及び 100 mM の K₂PO₄ (pH 6.5) というものである。アッセイは最終用量 200 μL で実施する。反応は酵素の添加により開始される。アッセイに関し、1 e.u. は、1 分間で 1 μmol の NADP (H) が代謝回転されることを意味する。これは、0.5 μmol の HMG-Co A 又はメバロン酸が代謝回転することに相当する。

10

20

30

40

50

【0071】

あるいは、宿主細胞におけるメバロン酸の生産量は、限定するものではないが、ガスクロマトグラフィー（米国特許出願公開第 2005/0287655 (A1) 号を参照されたい）又は HPLC（米国特許出願第 12/978,324 号を参照されたい）で測定することができる。代表的なアッセイの際には、1 種以上の抗生物質を添加した LB プロスを含有させた振とうチューブに培養物を接種し、34 にて、250 rpm で 14 時間インキュベートする。次に、1% グルコース、0.1% 酵母エキス及び 200 μM の IPTG を添加した TM3 培地を入れたウェルプレート中で、最終的な OD が 0.2 になるよう培養物を希釈する。次に、プレートを、Breath Easier membrane (Diversified Biotech) でシールし、振とう / 恒温器で、34 にて、600 rpm で 24 時間インキュベートした。次に各培養物 1 mL を 3,000 × g で 5 分遠心分離する。次に、上清に 20% 硫酸を添加し、氷上で 5 分インキュベートする。次に、混合物を 3000 × g で 5 分遠心分離し、HPLC 解析のため上清を回収する。メバロン酸（シグマ）の標準曲線と比較して、試料中のメバロン酸濃度を測定する。更に、当該技術分野において既知の任意の手法によりグルコースオキシダーゼアッセイを実施し、グルコース濃度を測定する。HPLC を使用し、各試料により得られた屈折率を、濃度既知の各種メバロン酸溶液の HPLC をもとに作成した検量線に対し比較して、メバロン酸濃度を定量することができる。

【0072】

HMG-Co A レダクターゼは、宿主細胞においてマルチコピー プラスミドで発現させることができる。プラスミドは高コピー数 プラスミド、低コピー数 プラスミド又は中程度コピー数 プラスミドであってよい。あるいは、HMG-Co A レダクターゼを宿主細胞の染色体に組み込むこともできる。プラスミド上の、あるいは宿主細胞染色体の一部に組み込まれた、HMG-Co A レダクターゼの異種発現に際し、核酸の発現は、誘導型プロモーター又は常時発現型プロモーターのいずれかにより駆動できる。プロモーターは、HMG-Co A レダクターゼの発現を強力に駆動することができ、弱く駆動することができ、あるいは中程度に駆動することができる。

【0073】

HMG-Co A シンターゼポリペプチド及び核酸の例

アセトアセチル Co A の HMG-Co A (例えば、HMG-Co A シンターゼ又は HMGS) への変換を触媒する酵素を使用することができる。一実施形態では、mvaS 遺伝子によりコードされるポリペプチドを使用することができる。mvaS 遺伝子は、HMG-Co A シンターゼ活性を保有するポリペプチドをコードする。このポリペプチドは、アセトアセチル Co A を、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリル Co A (HMG-Co A) に変換させることができる。mvaS ポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに mvaS ポリペ

チドの活性を少なくとも 1 つ有する、本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。

【 0 0 7 4 】

変異型 m v a S ポリペプチドとしては、1 つ以上のアミノ酸残基がアミノ酸置換を受けており、かつ m v a S ポリペプチド活性（すなわち、アセトアセチル C o A を 3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタルリル C o A に変換する能力）を保持しているものが挙げられる。m v a S ポリペプチド中にアミノ酸置換を導入することで、分子の官能性を改良することができる。例えば、m v a S ポリペプチドの、基質に対する結合親和性を増加させるアミノ酸置換、あるいはアセトアセチル C o A を 3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタルリル C o A に変換する能力を向上させるアミノ酸置換を、m v a S ポリペプチドに導入することができる。一部の態様では、m v a S ポリペプチド変異体は、1 つ以上の保存的なアミノ酸置換を含有する。

10

【 0 0 7 5 】

Quant et al. (Biochem J., 1989, 262: 159 ~ 164) に記載のものなどの標準法を使用して、H M G - C o A シンターゼの活性を測定することにより、ポリペプチドが m v a S 活性を有するか評価することもできる。代表的なアッセイでは、H M G - C o A シンターゼの活性は、303 nm での吸光度の変化を監視し、エノール形態のアセトアセチル C o A の消失を分光光度をもとに評価することで、検定できる。30 下で、50 mM の Tris / H C l (pH 8.0) 、10 mM の M g C l 2 及び 0.2 mM のジチオスレイトールを含有する標準的な 1 mL のアッセイ系に、5 mM のアセチルリン酸、10, M - アセトアセチル C o A 及び 5 u L の抽出試料を加え、続いてアセチル C o A (100 u M) 及び 10 ユニットの P T A を同時に加えることができる。次に、H M G - C o A シンターゼの活性を、アセチル C o A 添加前及び添加後の変換速度の差として測定する。使用した条件下 (pH 8.0 、 10 mM - M g C l 2) での、アセトアセチル C o A の吸収係数は、 $12.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。定義によると、1 ユニットの酵素活性により、1 分あたり 1 u m o l のアセトアセチル C o A が変換されることになる。

20

【 0 0 7 6 】

あるいは、宿主細胞におけるメバロン酸の生産量は、限定するものではないが、ガスクロマトグラフィー（米国特許出願公開第 2005 / 0287655 (A 1) 号を参照されたい）又は H P L C (米国特許出願第 12 / 978, 324 号を参照されたい) で測定することができる。代表的なアッセイの際には、1 種以上の抗生物質を添加した L B プロスを含有させた振とうチューブに培養物を接種し、34 にて、250 rpm で 14 時間インキュベートする。次に、1 % グルコース、0.1 % 酵母エキス及び 200 μ M の I P T G を添加した T M 3 培地を入れたウェルプレート中で、最終的な O D が 0.2 になるよう培養物を希釈する。次に、プレートを、 B r e a t h E a s i e r m e m b r a n e (D i v e r s i f i e d B i o t e c h) でシールし、振とう / 恒温器で、34 にて、600 rpm で 24 時間インキュベートした。次に各培養物 1 mL を 3, 000 \times g で 5 分遠心分離する。次に、上清に 20 % 硫酸を添加し、氷上で 5 分インキュベートする。次に、混合物を 3000 \times g で 5 分遠心分離し、H P L C 解析のため上清を回収する。メバロン酸（シグマ）の標準曲線と比較して、試料中のメバロン酸濃度を測定する。更に、当該技術分野において既知の任意の手法によりグルコースオキシダーゼアッセイを実施し、グルコース濃度を測定する。H P L C を使用し、各試料により得られた屈折率を、濃度既知の各種メバロン酸溶液の H P L C をもとに作成した検量線に対し比較して、メバロン酸濃度を定量することができる。

30

【 0 0 7 7 】

m v a S 核酸は、宿主細胞において、マルチコピー プラスミド上で発現させることができる。プラスミドは高コピー数プラスミド、低コピー数プラスミド又は中程度コピー数プラスミドであってよい。あるいは、m v a S 核酸は、宿主細胞の染色体に組み込むことができる。プラスミド上の、あるいは宿主細胞染色体の一部に組み込まれた、m v a S 核酸

40

50

の異種発現に際し、核酸の発現は、誘導型プロモーター又は常時発現型プロモーターのいずれかにより駆動できる。プロモーターは、mvaS核酸の発現を強力に駆動することができ、弱く駆動することができ、あるいは中程度に駆動することができる。

【0078】

下流MVA経路のポリペプチドをコードしている核酸

本発明の一部の態様では、本明細書に記載の組成物又は方法の任意のものに記載の細胞は、下流メバロン酸(MVA)経路のポリペプチドをコードしている核酸を1つ以上更に含む。一部の態様では、下流MVA経路のポリペプチドは内在性ポリペプチドである。一部の態様では、下流MVA経路のポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように構成型プロモーターに連結される。一部の態様では、下流MVA経路のポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように誘導型プロモーターに連結される。一部の態様では、下流MVA経路のポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように高発現型プロモーターに連結される。特定の態様では、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性下流MVA経路のポリペプチドが過剰発現するよう設計する。一部の態様では、下流MVA経路のポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように低発現型プロモーターに連結される。

10

【0079】

下流メバロン酸生合成経路は、メバロン酸キナーゼ(MVK)、ホスホメバロン酸キナーゼ(PMK)及びジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ(MVD)を含む。一部の態様では、下流MVA経路は、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ(IDI)を更に含む。本明細書に提供される細胞は、イソブレンシンターゼ、上流MVA経路の1つ以上のポリペプチド及び/又は下流MVA経路の1つ以上のポリペプチドをコードしている核酸を含み得る。下流MVA経路のポリペプチドは、(a)メバロン酸を5-ホスホメバロン酸へリン酸化する酵素、(b)5-ホスホメバロン酸を5-ジホスホメバロン酸に変換する酵素、(c)5-ジホスホメバロン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する酵素、のうちの任意の酵素であり得る。より具体的には、メバロン酸を5-ホスホメバロン酸にリン酸化する酵素は、M.マゼイ(*M. mazei*)メバロン酸キナーゼ、ラクトバチルス(*Lactobacillus*)メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ(*Lactobacillus sakei*)メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス(*Streptococcus*)メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*)メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトミセス(*Streptomyces*)メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトミセス(*Streptomyces*)CL190メバロン酸キナーゼポリペプチド、及びM.バートニイ(*M. Burtonii*)メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群であってもよい。別の態様では、メバロン酸を5-ホスホメバロン酸にリン酸化する酵素はM.マゼイ(*M. mazei*)メバロン酸キナーゼである。

20

30

【0080】

一部の態様では、下流MVA経路のポリペプチドは異種ポリペプチドである。一部の態様では、細胞は、下流MVA経路のポリペプチドをコードしている異種核酸のコピーを1つ以上含む。一部の態様では、下流MVA経路のポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように構成型プロモーターに連結される。一部の態様では、下流MVA経路のポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように誘導型プロモーターに連結される。一部の態様では、下流MVA経路のポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように高発現型プロモーターに連結される。一部の態様では、下流MVA経路のポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように低発現型プロモーターに連結される。一部の態様では、異種下流MVA経路のポリペプチドは、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、エンテロコッカス・フェカリス(*Enterococcus faecalis*)又はメタノサルシナ・マゼイ(*Methanosarcina mazei*)由来のポリペプチドである。

40

50

【0081】

下流MVA経路のポリペプチドをコードしている核酸は、細胞のゲノムに組み込むことができ、あるいは細胞で安定的に発現させることができる。下流MVA経路のポリペプチドをコードしている核酸は更に、ベクター上に存在させてもよい。

【0082】

下流MVA経路のポリペプチドの例としては、次の(i)メバロン酸キナーゼ(MVK)；(ii)ホスホメバロン酸キナーゼ(PMK)；(iii)ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ(MVD)；及び(iv)イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ(IDI)も挙げられる。詳細には、下流MVK経路のポリペプチドは、メタノサルシナ属(Methanosa

10

rcina)由来のものであってよく、更に詳細には、下流MVK経路のポリペプチドは、メタノサルシナ・マゼイ(Methanosa

rcina mazae)由来のものであってよい。下流MVA経路のポリペプチドのその他の例は、米国特許出願公開第2010/0086978号に見出すことができ、この内容は、下流MVK経路のポリペプチド及び下流MVK経路のポリペプチド変異体に関し参照によりその全文が明示的に本明細書に組み込まれる。

【0083】

本明細書に記載の細胞のうち任意のものは、IDI核酸(例えば、IDIをコードしている内在性又は異種核酸)を含み得る。イソペンテニルジホスフェートイソメラーゼポリペプチド(イソペンテニル-ジホスフェート-イソメラーゼ又はIDI)は、イソペンテニルジホスフェート(IPP)及びジメチルアリルニリン酸(DMAPP)の相互変換を触媒する(例えば、IPPをDMAPPに変換し及び/又はDMAPPをIPPに変換する)。IDIポリペプチド例としては、IDIポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、及び融合ポリペプチドが挙げられる。標準法(本明細書に記載されるものなど)を用い、生体外で、細胞抽出物中で又は生体内でポリペプチドがIPP及びDMAPPを相互変換する能力を測定することで、ポリペプチドがIDIポリペプチド活性を有するか評価することができる。IDI核酸の例としては、IDIポリペプチド活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又はポリペプチド融合物をコードしている核酸が挙げられる。IDIポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。

20

【0084】

特に、下流MVA経路のポリペプチドとしては、下流MVA経路のポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド及び融合ポリペプチドが挙げられる。下流MVA経路の核酸の例としては、下流MVA経路のポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又は融合ポリペプチドをコードしている核酸が挙げられる。下流MVA経路のポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載されるような任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸が挙げられる。更に、イソブレンの生産量を増加させるような、下流MVA経路のポリペプチド変異体も、良好に使用することができる。

30

【0085】

一部の態様では、下流MVA経路のポリペプチドは、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)、エンテロコッカス・フェカリス(Enterococcus faecalis)又はメタノサルシナ・マゼイ(Methanosa

rcina mazae)由来のポリペプチドである。一部の態様では、MVK経路のポリペプチドは、ラクトバチルス(Lactobacillus)メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ(Lactobacillus sakei)メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母・メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス(Streptococcus)メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニエ(Streptococcus pneumoniae)メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトミセス(Streptomyces)メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトミセス(Streptomyces

40

50

) C L 1 9 0 メバロン酸キナーゼポリペプチド及びメタノサルシナ・マゼイ (Methanosaicina mazei) メバロン酸キナーゼポリペプチド、からなる群から選択される。本開示のプロモーターのうちのいずれか (例えは、本開示に記載され、本開示の実施例において識別される、誘導型プロモーター及び構成型プロモーターなどのプロモーター) を使用して、本開示のいずれかの M V A ポリペプチドの発現を駆動させることができる。

【 0 0 8 6 】

イソブレンシンターゼ - 核酸及びポリペプチド

本発明の一部の態様では、本開示の組成物又は方法のいずれかに記載の組み換え細胞は、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸、又はイソブレンシンターゼ活性を有するポリペプチドを更に含む。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは内在性ポリペプチドである。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、構成型プロモーターに調節可能なように連結される。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、誘導型プロモーターに調節可能なように連結される。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、高発現型プロモーターに調節可能なように連結される。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸を 1 つ以上使用する (例えは、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸の 2 、 3 、又は 4 つ以上のコピーを使用する) 。特定の態様では、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性イソブレンシンターゼ経路のポリペプチドが過剰発現するよう設計する。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、低発現型プロモーターに調節可能なように連結される。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、クズ属 (Pueraria) 又はハコヤナギ属 (Populus) 由来のポリペプチド、又はウラジロハコヤナギ (Populus alba) × ヤマナラシ (Populus tremula) などの交雑種由来のポリペプチドである。

10

20

20

30

【 0 0 8 7 】

一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは異種ポリペプチドである。一部の態様では、細胞は、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸のコピーを 1 つ以上含む。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、構成型プロモーターに調節可能なように連結される。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、誘導型プロモーターに調節可能なように連結される。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、高発現型プロモーターに調節可能なように連結される。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、低発現型プロモーターに調節可能なように連結される。

30

【 0 0 8 8 】

イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、あるいは細胞で安定的に発現させることができる。イソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている核酸は、更にベクターに組み込むこともできる。

【 0 0 8 9 】

代表的なイソブレンシンターゼの核酸としては、イソブレンシンターゼポリペプチドの活性を少なくとも 1 つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又は融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。イソブレンシンターゼポリペプチドは、ジメチルアリールジホスフェート (D M A P P) をイソブレンに変換する。代表的なイソブレンシンターゼポリペプチドとしては、イソブレンシンターゼポリペプチドの活性を少なくとも 1 つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、並びに融合ポリペプチドが挙げられる。イソブレンシンターゼポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載されるような任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸が挙げられる。加えて、イソブレンシンターゼ変異体は、酵素活性が向上しているなどして、活性が向上されていてよい。一部の態様では、イソブレンシンターゼ変異体は、安定性 (例えは、熱安定性) が改良されている、及び / 又は溶解性が改良されているなどして、その他の特性が改良

40

50

されている。

【0090】

生体外で、細胞抽出物中で又は生体内で、ポリペプチドがD M A P Pをイソブレンに変換する能力を測定して、ポリペプチドがイソブレンシンターゼポリペプチド活性を有するか評価する際には、標準法を使用できる。細胞抽出物中のイソブレンシンターゼポリペプチド活性は、例えば、Silver et al. , J. Biol. Chem. 270 : 13010 ~ 13016, 1995に記載のとおりに測定することができる。代表的なアッセイでは、D M A P P(シグマ)は窒素流下で濃縮させ、乾燥させ、100mMリン酸カリウム緩衝液(pH 8.2)を用い100mMに再水和し、-20で保存する。アッセイを実施するために、金属製スクリューキャップと、テフロンコーティングのなされたシリコン製隔壁(Agilent Technologies)とを取り付けた20mLのヘッドスペースバイアル内で、5μLの1M MgCl₂、1mM(250μg/mL)D M A P P、65μLの植物抽出緩衝液(PEB)(50mM Tris-HCl(pH 8.0)、20mM MgCl₂、5%グリセロール、及び2mM DTT)に、25μLの細胞抽出物を加え、振とうさせながら37で15分間培養した。200μLの250mM EDTAを加えて反応をクエンチさせ、G C / M Sにより定量することができる。

10

【0091】

一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、植物のイソブレンシンターゼポリペプチド又はそれらの変異体である。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、クズ属(Pueraria)に由来するイソブレンシンターゼ又はそれらの変異体である。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、ハコヤナギ属(Populus)由来のイソブレンシンターゼ又はそれらの変異体である。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、ポプラ(poplar)のイソブレンシンターゼポリペプチド又はそれらの変異体である。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドはクズ(kudzu)のイソブレンシンターゼポリペプチド又はそれらの変異体である。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、クズ属(Pueraria)又はハコヤナギ属(Populus)由来のポリペプチド、又はウラジロハコヤナギ(Populus alba)とヤマナラシ(Populus tremula)の交雑種由来のポリペプチド、又はそれらの変異体(variant)由来のポリペプチドである。

20

【0092】

一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチド又は核酸は、マメ科(Fabaceae)、例えば、マメ亜科(Faboideae)由来のものである。特定の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチド又は核酸は、ブエラリア・モンタナ(Pueraria montana)(クズ(kudzu))(Sharkey et al. , Plant Physiology 137 : 700 ~ 712, 2005)、クズ(Pueraria lobata)、ポプラ(poplar)(ウラジロハコヤナギ(Populus alba)、セイヨウハコヤナギ(Populus nigra)、コットンウッド(Populus trichocarpa)、又はウラジロハコヤナギ(Populus alba)とヤマナラシ(Populus tremula)の交雑種(CAC35696)Miller et al. , Plant 213 : 483 ~ 487, 2001)、アスペン(aspen)(アメリカヤマナラシ(Populus tremuloides)など)(Silver et al. , JBC 270 (22) : 13010 ~ 1316, 1995)、又はヨーロッパナラ(English oak)(カーカス・ロバー(Quercus robur))(Zimmer et al. , 国際公開第98/02550号)に由来するポリペプチド又は核酸、あるいはそれらの変異体である。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、ブエラリア・モンタナ(Pueraria montana)、クズ(Pueraria lobata)、アメリカヤマナラシ(Populus tremuloides)、ウラジロハコヤナギ(Populus alba)、セイヨウハコヤナギ(Populus nigra)又はコットンウッド(Populus trichocarpa)由来のイソブレンシンターゼであるか、又はこれらの合成酵素の変異体である。一部の態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、ウラジロハコヤナギ(Populus alba)由来のイソブレンシンターゼであるか、又はこれら合成酵素

30

40

50

の変異体である。一部の態様では、イソプレンシンターゼ（例えば、ウラジロハコヤナギ（*Populus alba*）由来のイソプレンシンターゼ又はそれらの変異体）をコードしている核酸は、コドンを最適化されている。

【0093】

一部の態様では、イソプレンシンターゼ核酸又はポリペプチドは、天然に生じるポリペプチド又は核酸である（例えば、ハコヤナギ属（*Populus*）から天然に生じるポリペプチド又は核酸）。一部の態様では、イソプレンシンターゼ核酸又はポリペプチドは、野生型又は天然に生じるポリペプチド又は核酸ではない。一部の態様では、イソプレンシンターゼ核酸又はポリペプチドは、野生型又は天然に生じるポリペプチド又は核酸の変異体である（例えば、ハコヤナギ属（*Populus*）の野生型又は天然に生じるポリペプチド又は核酸の変異体）。

10

【0094】

一部の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドは変異体である。一部の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドは、野生型又は天然型イソプレンシンターゼの変異体である。一部の態様では、変異体は、野生型又は天然型イソプレンシンターゼと比較して触媒活性が向上しているなど、活性が向上している。活性（例えば、触媒活性）の向上は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は95%のうちのいずれかの程度であり得る。一部の態様では、触媒活性などの活性の向上は、少なくとも約1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍、又は100倍のいずれかである。一部の態様では、触媒活性などの活性の向上は、約10%～約100倍である（例えば、約20%～約100倍、約50%～約50倍、約1倍～約25倍、約2倍～約20倍、又は約5倍～約20倍）。一部の態様では、変異体は、野生型又は天然型イソプレンシンターゼと比較して可溶性が向上している。可溶性の向上は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は95%のうちのいずれかの程度であり得る。可溶性の向上は、少なくとも約1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍、又は100倍のうちのいずれかの程度であり得る。一部の態様では、溶解性の向上は、約10%～約100倍のうちのいずれかの程度であり得る（例えば、約20%～約100倍、約50%～約50倍、約1倍～約25倍、約2倍～約20倍、又は約5倍～約20倍）。一部の態様では、イソプレンシンターゼポリペプチドは、天然型イソプレンシンターゼ変異体であり、かつ天然型イソプレンシンターゼと比較して安定性が向上している（熱安定性など）。

20

【0095】

一部の態様では、変異体は、野生型又は天然型イソプレンシンターゼの活性の、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約110%、少なくとも約120%、少なくとも約130%、少なくとも約140%、少なくとも約150%、少なくとも約160%、少なくとも約170%、少なくとも約180%、少なくとも約190%、少なくとも約200%の活性を有する。変異体は、野生型又は天然型イソプレンシンターゼとの配列類似性を保有し得る。一部の態様では、野生型又は天然型イソプレンシンターゼの変異体は、野生型又は天然型イソプレンシンターゼのアミノ酸配列と、少なくとも約40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、又は99.9%のうちのいずれかの程度で配列相同性を有する。一部の態様では、野生型又は天然型イソプレンシンターゼの変異体は、野生型又は天然型イソプレンシンターゼのアミノ酸配列と、約70%～約99.9%、約75%～約99%、約80%～約98%、約85%～約97%、又は約90%～約95%のうちのいずれかの程度で配列相同性を有する。

30

【0096】

一部の態様では、変異体は、野生型又は天然型イソプレンシンターゼ内に変異を持つ。

40

50

一部の態様では、変異体は、少なくとも1箇所にアミノ酸置換、少なくとも1箇所にアミノ酸挿入、及び／又は少なくとも1箇所にアミノ酸欠失を有する。一部の態様では、変異体は、少なくとも1箇所にアミノ酸置換を有する。一部の態様では、変異体と、野生型又は天然型イソブレンシンターゼとの間で異なっているアミノ酸残基の数は、1以上であってよく、例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、又は50以上のアミノ酸残基が異なっていてよい。天然型イソブレンシンターゼとしては、植物由来の任意のイソブレンシンターゼを挙げることができ、例えば、クズ(kudzu)イソブレンシンターゼ、ポプラ(poplar)イソブレンシンターゼ、ヨーロッパナラ(English oak)イソブレンシンターゼ、及びヤナギ(willow)イソブレンシンターゼが挙げられる。一部の態様では、変異体は、ウラジロハコヤナギ(Populus alba)由来のイソブレンシンターゼの変異体である。一部の態様では、ウラジロハコヤナギ(Populus alba)由来のイソブレンシンターゼ変異体は、少なくとも1箇所にアミノ酸置換、少なくとも1箇所にアミノ酸挿入、及び／又は少なくとも1箇所にアミノ酸欠失を有する。一部の態様では、変異体は、切断型のウラジロハコヤナギ(Populus alba)イソブレンシンターゼである。一部の態様では、変異体(例えば、ウラジロハコヤナギ(Populus alba)由来のイソブレンシンターゼの変異体)をコードしている核酸は、コドンを最適化させたものである(例えば、異種イソブレンシンターゼを発現させる宿主細胞に基づきコドンを最適化している)。

10

【0097】

本開示のイソブレンシンターゼポリペプチドは、国際公開第2009/132220号、同第2010/124146号、同第2012/058494号、及び米国特許出願公開第2010/0086978号のいずれかに記載のものであってよい。これらの特許文献に記載される、イソブレンシンターゼ及びイソブレンシンターゼ変異体に関するすべての内容は、参照により本開示に明示的に組み込む。

20

【0098】

本開示のプロモーターのうちのいずれか(例えば、本開示に記載され、本開示の実施例において識別される、誘導型プロモーター及び構成型プロモーターなどのプロモーター)を使用して、本開示のいずれかのイソブレンシンターゼの発現を駆動させることができる。

【0099】

好適なイソブレンシンターゼとしては、限定するものではないが、Genbank受入番号AY341431、AY316691、AY279379、AJ457070、及びAY182241として識別されるものが挙げられる。本開示のイソブレンシンターゼをコードしている微生物の生産法を含む組成物又は方法のうちのいずれか1つに使用するとのできるイソブレンシンターゼの種類は、国際公開第2009/076676号、同第2010/003007号、同第2009/132220号、同第2010/031062号、同第2010/031068号、同第2010/031076号、同第2010/013077号、同第2010/031079号、同第2010/148150同第2010/124146号、同第2010/078457号、同第2010/148256号、及び同第2012/058494号にも記載されている。これらの特許文献に記載される、イソブレンシンターゼ及びイソブレンシンターゼ変異体に関するすべての内容を、参照により、本開示に明示的に援用する。

30

【0100】

DXP経路のポリペプチドをコードしている核酸

本発明の一部の態様では、本明細書に記載の任意の組成物又は方法に記載の組み換え細胞は、DXSポリペプチド又はDXP経路の他のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を更に含む。一部の態様では、細胞は更に、DXSポリペプチド又は他のDXP経路ポリペプチドをコードしている内在性核酸の染色体コピーを含む。一部の態様では、大腸菌(E. coli)細胞は更に、ID1ポリペプチド及びDXSポリペプチド又は他のDXP経路ポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸を含む。一部の態様では、核酸は、イソブレンシンターゼポリペプチド、ID1ポリペプチド及びDXSポリペプチド又

40

50

は他のD X P経路ポリペプチドをコードしている。一部の態様では、1つのプラスミドは、イソプレンシンターゼポリペプチド、ID Iポリペプチド及びD X Sポリペプチド又は他のD X P経路ポリペプチドをコードしている。一部の態様では、複数のプラスミド(mu I tiple plasmids)は、イソプレンシンターゼポリペプチド、ID Iポリペプチド及びD X Sポリペプチド又は他のD X P経路ポリペプチドをコードしている。

【0101】

D X Sポリペプチド例としては、D X Sポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、及び融合ポリペプチドが挙げられる。標準法(本明細書に記載されるものなど)を用い、ポリペプチドが、生体外で、細胞抽出物中で又は生体内でピルビン酸及びD - グリセルアルデヒド - 3 - リン酸を1 - デオキシ - D - キシルロース - 5 - リン酸に変換する能力を測定することで、ポリペプチドがD X Sポリペプチド活性を有するかを評価することができる。D X Sポリペプチド及び核酸の例並びにD X S活性の測定法は、国際公開第2009/076676号、米国特許出願第12/335,071号(米国特許出願公開第2009/0203102号)、国際公開第2010/003007号、米国特許出願公開第2010/0048964号、国際公開第2009/132220号、及び米国特許出願公開第2010/0003716号に、より詳細に記載される。

10

【0102】

D X P経路に含まれるポリペプチドの例としては、限定するものではないが、次の任意のポリペプチド:D X Sポリペプチド、D X Rポリペプチド、M C Tポリペプチド、C M Kポリペプチド、M C Sポリペプチド、H D Sポリペプチド、H D Rポリペプチド、及びD X P経路のポリペプチドの活性を1つ、又は2つ以上有するD X P経路ポリペプチド(例えば、融合ポリペプチド)が挙げられる。特に、D X P経路のポリペプチドとしては、D X P経路のポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド及び融合ポリペプチドが挙げられる。D X P経路の核酸の例としては、D X P経路のポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又は融合ポリペプチドをコードしている核酸が挙げられる。D X P経路のポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。D X P経路のポリペプチド及び核酸の例としては、並びにD X P経路のポリペプチド活性を測定する方法については、国際公開第2010/148150号に、より詳細に記載されている。

20

【0103】

D X Sポリペプチドの例としては、D X Sポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、及び融合ポリペプチドが挙げられる。標準法(本明細書に記載されるものなど)を用い、ポリペプチドが、生体外で、細胞抽出物中で又は生体内でピルビン酸及びD - グリセルアルデヒド - 3 - リン酸を1 - デオキシ - D - キシルロース - 5 - リン酸に変換する能力を測定することで、ポリペプチドがD X Sポリペプチド活性を有するか評価することができる。D X Sポリペプチド及び核酸の例並びにD X S活性の測定法は、国際公開第2009/076676号、米国特許出願第12/335,071号(米国特許出願公開第2009/0203102号)、国際公開第2010/003007号、米国特許出願公開第2010/0048964号、国際公開第2009/132220号、及び米国特許出願公開第2010/0003716号に、より詳細に記載される。

30

【0104】

特に、D X Sポリペプチドは、ピルビン酸及びD - グリセルアルデヒド3 - リン酸を1 - デオキシ - d - キシルロース5 - リン酸(D X P)に変換する。標準法を用い、生体外で、細胞抽出物中で又は生体内でポリペプチドがピルビン酸及びD - グリセルアルデヒド - 3 - リン酸を変換する能力を測定し、ポリペプチドがD X Sポリペプチド活性を有するか評価することができる。

40

50

【0105】

D X R ポリペプチドは、1 - デオキシ - d - キシリロース 5 - リン酸 (D X P) を 2 - C - メチル - D - エリスリトール 4 - リン酸 (M E P) に変換する。標準法を用い、生体外で、細胞抽出物中で又は生体内でポリペプチドが D X P を変換する能力を測定し、ポリペプチドが D X R ポリペプチド活性を有するか評価することができる。

【0106】

M C T ポリペプチドは、2 - C - メチル - D - エリスリトール 4 - リン酸 (M E P) を 4 - (シチジン 5' - ジホスホ) - 2 - メチル - D - エリスリトール (C D P - M E) に変換する。標準法を用い、生体外で、細胞抽出物中で又は生体内でポリペプチドが M E P を変換する能力を測定し、ポリペプチドが M C T ポリペプチド活性を有するか評価することができる。10

【0107】

C M K ポリペプチドは、4 - (シチジン 5' - ジホスホ) - 2 - C - メチル - D - エリスリトール (C D P - M E) を 2 - ホスホ - 4 - (シチジン 5' - ジホスホ) - 2 - C - メチル - D - エリスリトール (C D P - M E P) に変換する。標準法を用い、生体外で、細胞抽出物中で又は生体内でポリペプチドが C D P - M E を変換する能力を測定し、ポリペプチドが C M K ポリペプチド活性を有するか評価することができる。

【0108】

M C S ポリペプチドは、2 - ホスホ - 4 - (シチジン 5' - ジホスホ) - 2 - C - メチル - D - エリスリトール (C D P - M E P) を 2 - C - メチル - D - エリスリトール 2 , 4 - シクロジホスフェート (M E - C P P 又は c M E P P) に変換する。標準法を用い、生体外で、細胞抽出物中で又は生体内でポリペプチドが C D P - M E P を変換する能力を測定し、ポリペプチドが M C S ポリペプチド活性を有するか評価することができる。20

【0109】

H D S ポリペプチドは、2 - C - メチル - D - エリスリトール 2 , 4 - シクロジホスフェートを (E) - 4 - ヒドロキシ - 3 - メチルブタ - 2 - エン - 1 - イルジホスフェート (H M B P P 又は H D M A P P) に変換する。標準法を用い、生体外で、細胞抽出物中で又は生体内でポリペプチドが M E - C P P を変換する能力を測定し、ポリペプチドが H D S ポリペプチド活性を有するか評価することができる。

【0110】

H D R ポリペプチドは、(E) - 4 - ヒドロキシ - 3 - メチルブタ - 2 - エン - 1 - イルジホスフェートをイソペンテニルジホスフェート (I P P) 及びジメチルアリールジホスフェート (D M A P P) に変換する。標準法を用い、生体外で、細胞抽出物中で又は生体内でポリペプチドが H M B P P を変換する能力を測定し、ポリペプチドが H D R ポリペプチド活性を有するか評価することができる。30

【0111】

M V A 経路、イソプレンシンターゼ、I D I 及び D X P 経路のポリペプチドに関する生物資源

イソプレンシンターゼ、I D I 、 D X P 経路、及び / 又は M V A 経路核酸 (分子のアセトアセチル C o A をアセチル C o A に縮合する、アセトアセチル C o A チオラーゼ、すなわち A A C T などの酵素は除く) 、 M V A 経路ポリペプチド (2 分子のアセトアセチル C o A をアセチル C o A に縮合する、A A C T などの酵素は除く) は、イソプレンシンターゼ、I D I 、 D X P 経路、及び / 又は M V A 経路核酸を天然に含有する任意の微生物から得ることができる。イソプレンは、バクテリア、酵母、植物及び動物などの様々な生物により天然に生成される。一部の生物は、イソプレンの生産に関係する M V A 経路を含有する。イソプレンシンターゼの核酸は、例えば、イソプレンシンターゼを含有する任意の生物から得ることができる。したがって M V A 経路の核酸は、例えば、M V A 経路を含有する任意の生物から得ることができる。I D I 及び D X P 経路の核酸は、例えば、I D I 及び D X P 経路を含有する任意の生物から得ることができる。40

【0112】

10

20

30

40

50

イソプレンシンターゼ、DXP経路、IDI、及び/又はMVA経路の核酸の核酸配列は、細菌、真菌、植物、藻類、又はシアノバクテリアから単離することができる。生物資源の例としては、例えば、酵母、例えばサッカロミセス属(*Saccharomyces*) (例えば、*S. cerevisiae*)、バクテリア、例えば、エシェリキア属(*Escherichia*) (例えば、大腸菌(*E. coli*))、又はメタノサルシナ属(*Methanosarcina*) (例えば、メタノサルシナ・マゼイ(*Methanosarcina mazei*))、植物、例えばクズ(*kudzu*)又はポプラ(*poplar*) (例えば、ウラジロハコヤナギ(*Populus alba*)又はウラジロハコヤナギ(*Populus alba*)とヤマナラシ(*Populus tremula*)の交雑種CAC35696 (*Populus alba* x *tremula* CAC35696))又はアスペン(*aspen*) (例えば、アメリカヤマナラシ(*Populus tremuloides*))が挙げられる。イソプレンシンターゼ、IDI及び/又はMVA経路ポリペプチドに関係し、使用することのできる資源例は、同様に、国際公開第2009/076676号、同第2010/003007号、同第2009/132220号、同第2010/031062号、同第2010/031068号、同第2010/031076号、同第2010/031076号、同第2010/013077号、同第2010/031079号、同第2010/148150号、同第2010/078457号、及び同第2010/148256号に記載されている。
10

【0113】

一部の態様では、生物資源はサッカロミセス属(*Saccharomyces* sp.)であり、例えば、サッカロミセス属(*Saccharomyces* sp.)、シゾサッカロミセス属(*Schizosaccharomyces* sp.)、ピキア属(*Pichia* sp.)又はカンジダ属(*Candida* sp.)である。
20

【0114】

一部の態様では、宿主生物は、B.リケノフォルミス(*B. licheniformis*)又は枯草菌(*B. subtilis*)などのバチルス株、P.シトリア(*P. citrea*)などのパンテア(*Pantoea*)株、P.アルカリゲネス(*P. alcaligenes*)などのシュードモナス属(*Pseudomonas*)株、S.リビダンス(*S. lividans*)又はS.ルビギノーサス(*S. rubiginosus*)などのストレプトミセス(*Streptomyces*)株、大腸菌(*E. coli*)などのエシェリキア(*Escherichia*)株、エンテロバクター(*Enterobacter*)株、ストレプトコッカス(*Streptococcus*)株、又はメタノサルシナ・マゼイ(*Methanosarcina mazei*)などの古細菌(*archaea*)株である。
30

【0115】

本明細書で使用するとき、「バチルス(*Bacillus*)」属としては、当業者に既知の「バチルス(*Bacillus*)属」のすべての種を包含し、限定するものではないが、例えば、枯草菌(*B. subtilis*)、B.リケニフォルミス(*B. licheniformis*)、B.レンタス(*B. lentus*)、B.ブレビス(*B. brevis*)、B.ステアロサーモフィルス(*B. stearothermophilus*)、B.アルカロフィルス(*B. alkalophilus*)、B.アミロリケファシエンス(*B. amyloliquefaciens*)、B.クラウシイ(*B. clausii*)、B.ハロドュランス(*B. halodurans*)、B.メガテリウム(*B. megaterium*)、B.コアギュランス(*B. coagulans*)、B.サーキュランス(*B. circulans*)、B.ロータス(*B. lautus*)、及びB.チューリングエンシス(*B. thuringiensis*)が挙げられる。バチルス属は分類上の再編成を受け続けるものと認識される。したがって、この属は、再分類された種を包含することを意図し、例えば、限定するものではないが、現在は「ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス(*Geobacillus stearothermophilus*)」と命名されたB.ステアロサーモフィルス(*B. stearothermophilus*)のような生物を包含する。酸素存在下での耐性内生胞子の生成はバチルス属の決定的特徴と考えられるが、この特徴は最近命名されたアリシクロバチルス(*Alicyclobacillus*)、アムピバチルス(*Amphibacillus*)、アネウリニバチルス(*Aneurinibacillus*)、アノキシバチルス(*Anoxybacillus*)、ブレビバチルス(*Brevibacillus*)、フィロバチルス(*Filobacillus*)、グラシリバチルス(*Gracilibacillus*)、ハロバチルス(*Halobacillus*)、パエニバチルス(*Paenibacillus*)、サリバチルス(*Salibacillus*)、サーモバチルス(*Thermobacillus*)、ウレイバチルス(*Ureibacillus*)、及びビルジバチルス(*Virgibacillus*)にも当てはまる。
40
50

【0116】

一部の態様では、生物資源はグラム陽性細菌である。非限定的な例としては、ストレプトミセス (*Streptomyces*) 株 (例えば、*S.リビダンス* (*S. lividans*)、*S.セリカラ* (*S. coelicolor*)、又は*S.グリセウス* (*S. griseus*)) 及びバチルス (*Bacillus*) 株が挙げられる。一部の態様では、生物資源は、大腸菌 (*E. coli*) 又はシュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.) などのグラム陰性細菌である。一部の態様では、生物資源は*L.アシドフィルス* (*L. acidophilus*) である。

【0117】

一部の態様では、生物源は植物であり、例えば、マメ科 (*Fabaceae*)、例えばマメ亜科 (*Faboideae*) などの植物である。一部の態様では、生物資源はクズ (*kudzu*)、ポプラ (*poplar*) (例えば、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) とヤマナラシ (*Populus tremula*) の交雑種 C A C 3 5 6 9 6 など)、アスペン (*aspen*) (例えば、アメリカヤマナラシ (*Populus tremuloides*))、又はカーカス・ロバー (*Quercus robur*)) である。

10

【0118】

一部の態様では、微生物源は、藻類、例えば緑藻、紅藻、灰色藻、クロララクニオン藻 (*chlorarachniophytes*)、ミドリムシ類 (*euglenids*)、クロミスタ類 (*chromista*)、又は渦鞭毛藻類である。

【0119】

一部の態様では、生物資源は、形態に基づき次の群：クロオコッカス目 (*Chlorococcales*)、プレウロカプサ目 (*Pleurocapsales*)、ユレモ目 (*Oscillatoriaceae*)、ネンジュモ目 (*Nostocales*)、又はスティゴネマ目 (*Stigonematales*) のいずれかに分類される、ラン藻である。

20

【0120】

例示的な宿主細胞

当業者であれば、具体的な宿主株における遺伝子発現を最適化する特定の配列を含有するよう、発現ベクターが設計されることを認識するであろう。このような最適化配列としては、限定するものではないが、複製起点、プロモーター、及びエンハンサーが挙げられる。本明細書で参照するベクター及び配列は例示目的で記載され、本発明の範囲を狭めることを意味するものではない。

【0121】

30

任意の微生物又はそれらの子孫微生物を使用して、本明細書に記載のいずれかの遺伝子 (異種又は同種) を発現させすることができる。グラム陽性又はグラム陰性細菌などの細菌細胞を使用して、本開示に記載の遺伝子のうち任意のものを発現させることができる。詳細には、本開示に記載の遺伝子は、エシェリキア属 (*Escherichia* sp.) (例えば、大腸菌 (*E. coli*))、*L.アシドフィルス* (*L. acidophilus*)、*P.シトレア* (*P. citrea*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、*B.リケニフォルミス* (*B. licheniformis*)、*B.レンタス* (*B. lentus*)、*B.ブレビス* (*B. brevis*)、*B.ステアロサー*モフィルス (*B. stearothermophilus*)、*B.アルカロフィルス* (*B. alkalophilus*)、*B.アミロリケファシエンス* (*B. amyloliquefaciens*)、*B.クラウシィ* (*B. clausii*)、*B.ハロドュランス* (*B. halodurans*)、*B.メガテリウム* (*B. megaterium*)、*B.コアギュランス* (*B. coagulans*)、*B.サーキュランス* (*B. circulans*)、*B.ロータス* (*B. lautus*)、*B.チューリングエンシス* (*B. thuringiensis*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium* spp.) (例えば、*C.グルタミクム* (*C. glutamicum*))、*S.デグラダンス* (*S. degradans*) 2 ~ 40、アルギノビブリオ・アクアリティカス (*Alginovibrio aqualiticus*)、アルテノモナス (*Alteromonas* sr.) 株 K L I A、アステロミセス・クルシアタス (*Asteromyces cruciatus*)、ベネッケア・ペラギア (*Beneckea pelagia*)、エンテロバクター・クロアカ (*Enterobacter cloacae*)、ハルモナス・マリーナ (*Halomonas marina*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumonia*)、フォトバクテリウム属 (*Photobacterium* spp.) (ATCC 433367)、シュードアルテロモナス・エルヤコヴィ (*Pseudoalteromonas elyakovii*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.) (例えば、シュードモナ

40

50

ス・アルギノボラ (*Pseudomonas alginovora*)、シュードモナス・エルジノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス・マルトフィリア (*Pseudomonas maltophilia*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、ビブリオ・アルギノリチカス (*Vibrio alginolyticus*)、ビブリオ・ハリオチコール (*Vibrio halioticol*)、及びビブリオ・ハーベイ (*Vibrio harveyi*)、*S. albus*、*S. lividans*、*S. coelicolor*、*S. griseus*、及び *P. alcaligenes* 細胞からなる群から選択される任意のもので発現させることができる。一態様では、バクテリア細胞は大腸菌 (*E. coli*) 細胞である。別の態様では、バクテリア細胞は *L. acidophilus* (*L. acidophilus*) 細胞である。本発明の組成物及び方法には、数多くの種類の嫌気性細胞を宿主細胞として使用することができる。本発明の一態様では、本明細書に記載の任意の組成物又は方法に關し記載される細胞は、絶対嫌気性細胞及びその子孫細胞である。絶対嫌気性菌は、典型的には、条件下に酸素が存在する場合には良好に増殖しない。絶対嫌気性菌が低濃度の酸素に対しある程度の耐性を示す場合には、少量の酸素が存在してもよいことは理解されるであろう。一態様では、メバロン酸、イソブレン、イソブレノイド前駆体及びイソブレノイドを生産する遺伝子操作を行った絶対嫌気性菌を、本明細書に記載のいずれかの方法及び／又は組成物用の宿主細胞として提供し、実質的に無酸素条件下で増殖させることができる。この場合、存在する酸素量は嫌気性菌の増殖、維持、及び／又は発酵に有害なものではない。

10

【0122】

本発明の他の態様では、本明細書に記載の組成物又は方法のいずれかにおいて記載され及び／又は使用される宿主細胞は、通性嫌気性細胞及びその子孫細胞である。酸素が存在する場合、通性嫌気性菌は、好気呼吸により（例えば、TCAサイクルを利用するなどして）細胞ATPを生成し得る。しかしながら、通性嫌気性菌も、酸素の非存在下で増殖させることができる。絶対嫌気性菌とは対照的に、通性嫌気性菌はより多量の酸素の存在下で死滅し、又は増殖性が乏しくなる。したがって、一態様では、通性嫌気性菌は、本明細書で提供される組成物及び／又は方法のいずれかにおいて、宿主細胞として使用でき、メバロン酸、イソブレン、イソブレノイド前駆体及びイソブレノイドを生成する遺伝子操作を行うことができる。通性嫌気性の宿主細胞は、実質的に無酸素（存在する酸素量が、増殖、嫌気性菌の維持、及び／又は発酵に有害なものではないことを意味する）条件下で増殖させることができ、あるいは酸素がより多量に存在している場合にも増殖することができる。

20

【0123】

宿主細胞は、糸状真菌細胞及びその子孫細胞であってもよい。（例えば、Berka & Barnett, *Biotechnology Advances*, (1989), 7(2): 127~154を参照されたい）。一部の態様では、糸状菌細胞はトリコデルマ・ロンギブラキアタム (*Trichoderma longibrachiatum*)、*T. viride* (*T. viride*)、*T. koningii* (*T. koningii*)、*T. harzianum* (*T. harzianum*)、ペニシリウム属 (*Penicillium* sp.)、ヒュミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、ヒュミコラ・ラヌギノス (*H. lanuginose*)、*H. grisea* (*H. grisea*)、クリソスボリウム属 (*Chrysosporium* sp.)、*C. lucknowense* (*C. lucknowense*)、グリオクラジウム属 (*Gliocladium* sp.)、アスペルギルス属 (*Aspergillus* sp.)、例えば、*A. oryzae* (*A. oryzae*)、*A. niger* (*A. niger*)、ショウユコウジカビ (*A. sojae*)、*A. japonicus* (*A. japonicus*)、*A. nidulans* (*A. nidulans*)、又はアワモリコウジカビ (*A. awamori*)、フザリウム属 (*Fusarium* sp.)、例えば *F. roseum* (*F. roseum*)、*F. graminum* (*F. graminum*)、*F. cerealis* (*F. cerealis*)、*F. oxysporum* (*F. oxysporum*)、又は *F. venenatum* (*F. venenatum*)、ニューロスボラ属 (*Neurospora* sp.)、例えば、*N. crassa* (*N. crassa*)、ヒポクレア属 (*Hypocreales* sp.)、ムコール属 (*Mucor* sp.)、例えば、*M. miehei* (*M. miehei*)、リゾプス属 (*Rhizopus* sp.) 又はエメリセラ属 (*Emericella* sp.) のいずれか由来のものであってよい。一部の態様では、真菌は、*A. nidulans* (*A. nidulans*)、アワモリコウジカビ (*A. awamori*)、*A. oryzae* (*A. oryzae*)、*A. sojae* (*A. sojae*)、*A. japonicus* (*A. japonicus*)、*A. niger* (*A. niger*)、*F. graminum* (*F. graminum*)、*F. cerealis* (*F. cerealis*)、*F. oxysporum* (*F. oxysporum*)、又は *F. venenatum* (*F. venenatum*)、*N. crassa* (*N. crassa*)、*H. lanuginose* (*H. lanuginose*)、*H. grisea* (*H. grisea*)、*C. lucknowense* (*C. lucknowense*)、*Gliocladium* sp.、*Aspergillus* sp.、*Fusarium* sp.、*Hypocreales* sp.、*Mucor* sp.、*Emericella* sp.、*Rhizopus* sp. のいずれか由来のものであってよい。

30

40

50

リゼ (A. oryzae) 、 A. アクレタス (A. aculeatus) 、 A. ニガー (A. niger) 、 A. ジャポニクス (A. japonicus) 、 T. リーゼイ (T. reesei) 、 T. ビリデ (T. viride) 、 F. オキシスポラム (F. oxysporum) 又は F. ソラニ (F. solani) である。特定の実施形態では、本明細書で使用するためのプラスミド又はプラスミド配列には、米国特許出願公開第 2011/0045563 号に記載のものが包含される。

【 0124 】

宿主細胞は、サッカロミセス属 (Saccharomyces sp.) 、シゾサッカロミセス属 (Schizosaccharomyces sp.) 、ピキア属 (Pichia sp.) 、又はカンジダ属 (Candida sp.) などの酵母であってもよい。一部の態様では、サッカロミセス属 (Saccharomyces sp.) は、出芽酵母である (例えば、Romanos et al. , Yeast, (1992), 8 (6) : 423 ~ 488 を参照されたい)。特定の実施形態では、本明細書で使用するプラスミド又はプラスミド配列には、米国特許第 7,659,097 号、及び米国特許出願公開第 2011/0045563 号に記載のものが包含される。

【 0125 】

宿主細胞は、緑藻類、紅藻類、灰色藻類、クロララクニオン藻類 (chlorarachniophytes) 、ミドリムシ類 (euglenids) 、クロミスタ類 (chromista) 、又は渦鞭毛藻類などの藻類であってもよい。(例えば、Saunders 及び Warmbrodt, 「藻類及び酵母などの菌類における遺伝子発現 (Gene Expression in Algae and Fungi, Including Yeast) 」(1993年) , National Agricultural Library, Beltsville, MD を参照されたい)。特定の実施形態では、本明細書で使用するためのプラスミド又はプラスミド配列には、米国特許出願公開第 2011/0045563 号に記載のものが包含される。一部の態様では、宿主細胞は、形態学に基づき次の群：クロオコッカス目 (Chlorococcales) 、プレウロカプサ目 (Pleurocapsales) 、ユレモ目 (Oscillatoriaceae) 、ネンジュモ目 (Nostocales) 、又はスティゴネマ目 (Stigonematales) (例えば、Lindberg et al. , Metab. Eng., (2010) 12 (1) : 70 ~ 79 を参照されたい) のいずれかに分類されるラン藻などのラン藻である。特定の実施形態では、本明細書で使用するプラスミド又はプラスミド配列には、米国特許出願公開第 2010/0297749 号、同第 2009/0282545 号、及び国際公開第 2011/034863 号に記載のものが包含される。

【 0126 】

特定の実施形態では、大腸菌 (E. coli) 宿主細胞を使用して、本明細書に記載のいずれかの遺伝子を発現させることができる。一態様では、宿主細胞は、メバロン酸を生産することができ、アセトアセチル CoA シンターゼをコードしている 1 つ以上の核酸を発現する大腸菌 (E. coli) 株組み換え細胞又はそれらの子孫細胞である。大腸菌 (E. coli) 宿主細胞は、アセトアセチル CoA シンターゼをコードしている 1 つ以上の核酸の異種発現を行わない同一の細胞を上回る量、最大力価、及び細胞生産性で、イソプレン、イソプレノイド前駆体 (例えば、メバロン酸) 、及び / 又はイソプレノイドを生産することができる。加えて、大腸菌 (E. coli) において異種発現させる、アセトアセチル CoA シンターゼをコードしている 1 つ以上の核酸は、染色体のコピーであってよい (例えば、大腸菌 (E. coli) 染色体に組み込まれる)。他の態様では、大腸菌 (E. coli) 細胞は培養物である。

【 0127 】

形質転換法

当業界で知られる任意の技術により、アセトアセチル CoA シンターゼをコードしている核酸、マロニル CoA 及びアセチル CoA からアセトアセチル CoA シンターゼを生産する酵素、チオラーゼ以外の MVA 経路ポリペプチド、DXP 経路ポリペプチド、イソプレンシンターゼ、IDI、ポリプレニルピロリン酸シンターゼ、及びイソプレン、イソプレノイド前駆体、及び / 又はイソプレノイドの生産に必要とされる任意の酵素を宿主細胞 (例えば、植物細胞、真菌細胞、酵母細胞、又はバクテリア細胞) に導入することができる。

10

20

20

30

40

50

【0128】

宿主細胞へのDNAコンストラクト又はベクターの導入に一般的な手法、例えば、形質転換、電気穿孔法、核酸のマイクロインジェクション、形質導入、形質移入（例えば、リポフェクションを利用した又はDEAE-デキストリンを利用した形質移入、あるいは組み換えファージウイルスを用いた形質移入）、リン酸カルシウムDNA沈殿法を用いるインキュベーション、DNAコートした微粒子銃による高速導入、及びプロトプラストの融合などの手法を使用することができる。一般的な形質転換法は、当該技術分野で既知である（例えば、分子生物学領域の現行のプロトコル（F. M. Ausubel et al.（編）Chapter 9, 1987; Sambrook et al., 「分子クローニング：実験室マニュアル第3版（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed.）」, Cold Spring Harbor, 2001; 及びCampbell et al., Curr. Genet. 16: 53~56, 1989を参照されたい）。導入された核酸は、染色体DNAに組み込むことができ、又は染色体外の複製配列として維持することができる。形質転換体は、当該技術分野において既知の任意の方法により選別することができる。形質転換体の選別に好適な方法は、国際公開第2009/076676号、米国特許出願第12/335,071号（米国特許出願公開第2009/0203102号）、国際公開第2010/003007号、米国特許出願公開第2010/0048964号、国際公開第2009/132220号、及び米国特許出願公開第2010/0003716に記載される。10

【0129】

一実施形態では、大腸菌（*E. coli*）などのバクテリアを宿主として使用する。この実施形態では、発現ベクターは、このようなバクテリアにおいて自己複製させることができるように選択及び／又は遺伝子操作することができる。本開示に掲載する遺伝子に加え、プロモーター、リボソーム結合配列、転写終結配列も発現ベクターに含有させることができる。所望により、発現ベクターには、プロモーター活性を調節する遺伝子を含有させることもできる。20

【0130】

大腸菌（*E. coli*）などの宿主で発現させることができるものであれば、任意のプロモーターを使用することができる。使用することのできるこのようなプロモーターの例としては、大腸菌（*E. coli*）由来のtrpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、及びPRプロモーター、並びにファージ由来のT7プロモーターなどが挙げられる。更に、tacプロモーターなどの人工的に設計又は改変したプロモーターを使用することもできる。30

【0131】

その方法によりDNAがバクテリアに導入されるのであれば、発現ベクターの導入方法は特に限定はされない。このような手法の例としては、カルシウムイオンを使用する方法（Cohen, S. N., et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69: 2110~2114 (1972)）、及び電気穿孔法が挙げられる。

【0132】

酵母を宿主として使用する場合、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、又はピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）を使用することができる。この場合、酵母で発現させることができるものであればプロモーターは特に限定はされない。このようなプロモーターの例としては、gal1プロモーター、gal10プロモーター、熱ショックタンパク質プロモーター、MF.alph.a.1プロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、及びAOX1プロモーターが挙げられる。40

【0133】

その方法により酵母にDNAが導入されるものであれば酵母への組み換えベクターの導入法は特に限定はされない。このような導入法の例としては、電気穿孔法（Becker

10

20

30

40

50

, D. M. , et al. *Methods. Enzymol.* , 194 : 182 ~ 187 (1990) ）、スフェロプラスト法 (Hinzen, A. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci.* , USA , 75 : 1929 ~ 1933 (1978)) 、及び酢酸リチウム法 (Ittoh, H. : *J. Bacteriol.* , 153 : 163 ~ 168 (1983)) が挙げられる。

【0134】

詳細には、宿主微生物としては、マロニルCoA含量が比較的高い微生物を使用することが好ましい。マロニルCoAは、脂肪酸の生合成に使用される物質であり、あらゆる微生物に存在する。上記アセトアセチルCoAシンターゼは、マロニルCoA及びアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する。したがって、イソプレン/イソプレノイドの生産性は、マロニルCoA含量の高い宿主微生物を使用することによって向上させることができる。

10

【0135】

ベクター

本明細書に記載の任意の組成物及び方法には好適なベクターを使用することができる。例えば、適切なベクターを使用して、HMG-CoAレダクターゼ、イソプレンシンターゼ、ポリプレニルピロリン酸シンターゼ、及び/又はチオラーゼ以外の1つ以上のMVA経路ポリペプチドをコードしている遺伝子の1つ以上のコピーの発現を最適化することができる。一部の態様では、ベクターには選択マーカーを含有させる。選択可能なマーカーの例としては、これらに限定されるものではないが、抗生物質耐性核酸（例えば、カナマイシン、アンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、ヒグロマイシン、フェロマイシン、ブレオマイシン、ネオマイシン又はクロラムフェニコール）、及び/又はホスト細胞に栄養的な利点などの代謝に関係する利点を与える核酸が挙げられる。一部の態様では、選択マーカーは使用せずに、HMG-CoAレダクターゼ、イソプレンシンターゼ、ポリプレニルピロリン酸シンターゼ並びに/又はチオラーゼ以外のMVA経路ポリペプチドの核酸の1つ以上のコピーを宿主細胞のゲノムに組み込む。本開示の実施例において特徴づけられ又は使用される任意の1つのベクターを使用することができる。

20

【0136】

宿主細胞変異

本発明は、更に、経路を開始させるマロニルCoAの細胞内含量を増加させる変異を有する宿主微生物の使用を目的とする。これらの改変を行った宿主細胞では、アセトアセチルCoAシンターゼによる基質（例えば、マロニルCoA）利用能が向上していることから、アセトアセチルCoAの生産が増大することになり、イソプレン及び/又はイソプレノイドなどの下流の生成物の生産も増大する。特定の実施形態では、宿主微生物には、クエン酸サイクルの遺伝子のsdhCDAB及びcitE、アミノ酸輸送体brnQ、並びにピルビン酸を消費するadhEの活性を、減弱させるか又は欠失させる遺伝子操作を行うことができる。他の実施形態では、宿主微生物には、限定するものではないが、アセチルCoAカルボキシラーゼ (ACC) 、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) 、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPD) 及び/又はピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 (PDH) などの1つ以上の遺伝子を過剰発現させることにより、細胞内マロニルCoA濃度を上昇させる遺伝子操作を行うことができる。例えば、Fowler, et al. , *Applied and Environmental Microbiology* , Vol. 75 , No. 18 , pp. 5831 ~ 5839 (2009) 、Zha et al. , *Metabolic Engineering* , 11 : 192 ~ 198 (2009) 、Xu et al. , *Metabolic Engineering* , (2011) doi : 10.1016/j.ymben.2011.06.008 、Okamura et al. , *PNAS* 107 : 11265 ~ 11270 (2010) 、並びに米国特許出願公開第2010/0285549号を参照されたい。これらの非特許文献及び特許文献の内容は、参照によりその全体が本開示に明示的に組み込まれる。

30

【0137】

40

50

本発明は、MVA経路に取り込まれる炭素量を増大させる追加の宿主細胞変異も企図する。炭素の取り込み量を増大させることで、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、及び/又はイソプレノイドをより多量に生産できるようになる。本開示に記載する、アセトアセチルCoAシンターゼを含む組み換え細胞には、メバロン酸生産に取り込まれる炭素量を増加させるよう遺伝子操作を行うこともでき、その際、(a)クエン酸シンターゼ、(b)ホスホトランスアセチラーゼ、(c)酢酸キナーゼ、(d)乳酸脱水素酵素、(e)NADP依存性リンゴ酸酵素、及び(f)ピルビン酸脱水素酵素からなる群から選択される1つ以上の酵素活性が調節される。

【0138】

クエン酸シンターゼによる経路

クエン酸シンターゼは、オキサロ酢酸とアセチルCoAを縮合させることによるクエン酸(トリカルボン酸(TCA)回路の代謝生成物)の生成を触媒する(Ner, S. et al. 1983. *Biochemistry* 22: 5243~5249; Bhayana, V. and Duckworth, H. 1984. *Biochemistry* 23: 2900~2905)(図5)。大腸菌(*E. coli*)では、gltAによりコードされたこの酵素は、二量体サブユニットからなる三量体様の挙動を示す。六量体の形成により、酵素はNADHによりアロステリックに制御されるようになる。この酵素は、これまでに広く研究されている(Wiegand, G., and Remington, S. 1986. *Annual Rev. Biophysics Biophys. Chem.* 15: 97~117; Duckworth et al. 1987. *Biochem Soc Symp.* 54: 83~92; Stockell, D. et al. 2003. *J. Biol. Chem.* 278: 35435~43; Maurus, R. et al. 2003. *Biochemistry* 42: 5555~5565)。NADHによるアロステリック阻害を回避するにあたって、これまでに、枯草菌(*Bacillus subtilis*)NADH感受性クエン酸シンターゼによる置き換え、又はこの酵素の添加が検討されている(Underwood et al. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1071~1081; Sanchez et al. 2005. *Met. Eng.* 7: 229~239)。

10

20

30

40

【0139】

クエン酸シンターゼによる触媒反応は、メバロン酸経路の第一工程を触媒し、同様にアセチルCoAを基質として使用するチオラーゼと直接的に競合する(Hedl et al. 2002. *J. Bact.* 184: 2116~2122)。したがって、当業者は、クエン酸シンターゼの発現を調節して(例えば、酵素活性を減少させて)、より多量の炭素がメバロン酸経路に取り込まれるようにすることで、メバロン酸、イソプレン及びイソプレノイドの最終的な生産量を増加させることができる。クエン酸シンターゼ活性を低下させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して任意の量で低下させることができる。一部の例では、酵素活性を、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%低下させる。一部の態様では、内在性クエン酸シンターゼの遺伝子の活性を減少させることにより、クエン酸シンターゼの活性を調節する。この調節は、NADH非感受性クエン酸シンターゼをコードしている導入遺伝子により、あるいは枯草菌(*Bacillus subtilis*)から誘導したNADH非感受性クエン酸シンターゼをコードしている導入遺伝子により、内在性クエン酸シンターゼ遺伝子の染色体を置換することで実施できる。クエン酸シンターゼの活性は、内在性クエン酸シンターゼ遺伝子のプロモーターを、常時低発現型の合成プロモーターと置き換えることによっても調節(例えば、低下させる)できる。クエン酸シンターゼの活性を低下させることで、メバロン酸依存性の生合成経路への炭素の取り込みを、クエン酸シンターゼの発現を低下させていない微生物と比較して増加させることができる。

【0140】

50

ホスホトランスアセチラーゼ及び／又は酢酸キナーゼの関与する経路

ホスホトランスアセチラーゼ (p t a) (Shimizu et al. 1969. Biochim. Biophys. Acta 191: 550 ~ 558) は、アセチルCoAとアセチルリン酸 (アセチル-P) の可逆性の変換を触媒するのに対し、酢酸キナーゼ (ackA) (Kakuda, H. et al. 1994. J. Biochem. 111: 916 ~ 922) は、アセチル-Pと酢酸の可逆性の変換を触媒する。これらの遺伝子は、大腸菌 (E. coli) においてオペロンとして転写され得る。これらの遺伝子は共に、ATPの放出により酢酸の異化を触媒する。したがって、当業者は、ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子 (例えば、内在性ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子) 及び／又は酢酸キナーゼ遺伝子 (例えば、内在性酢酸キナーゼ遺伝子) の活性を減弱させて、利用可能なアセチルCoAを増加させることができる。減弱させる手法の1つとしては、ホスホトランスアセチラーゼ (p t a) 及び／又は酢酸キナーゼ (ackA) の欠失が挙げられる。この欠失は、クロラムフェニコールカセットにより片方又はいずれもの遺伝子を置き換え、その後カセットを除去することで導入される。酢酸は多様な理由により大腸菌 (E. coli) により生成される (Wolfe, A. 2005. Microb. Mol. Biol. Rev. 69: 12 ~ 50)。理論に束縛されるものではないが、ackA-p t aはアセチルCoAを消費することから、これらの遺伝子を欠失させると、炭素は酢酸に変換されなくなり、メバロン酸、イソブレン又はイソブレノイドの収率が増加することになる。

10

20

30

40

50

【0141】

一部の態様では、組み換え微生物は、内在性ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子及び／又は内在性酢酸キナーゼ遺伝子の発現を減弱させていない微生物と比較して、酢酸の生成量が減少している。酢酸生成量の減少は、当業者に既知の所定のアッセイ法により測定できる。酢酸の生成量は、分子的な操作を行なっていない場合と比較して、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%減少する。

【0142】

ホスホトランスアセチラーゼ (p t a) 及び／又は酢酸キナーゼ (ackA) の活性は、酵素に関係する他の分子的操作によっても低下させることができる。酵素活性を低下させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して任意の量で低下させることができる。一部の例では、酵素活性を、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%低下させる。

【0143】

一部の場合では、内在性ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子及び／又は内在性酢酸キナーゼ遺伝子の活性を減弱させることで、内在性ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子及び／又は内在性酢酸キナーゼ遺伝子発現を減弱させていない微生物と比較して、メバロン酸依存性生合成経路への炭素原子の取り込みが増加する。

【0144】

乳酸脱水素酵素の関与する経路

大腸菌 (E. coli) では、D-乳酸は、乳酸デヒドロゲナーゼ (ldhA - 図5) により、ピルビン酸から生成される (Bunach, P. et al. 1997. Microbiology 143: 187 ~ 195)。乳酸の生成はNADHの酸化によりなされるため、乳酸は、酸素制限下で、かつ還元当量のすべてを収容できない場合に生成されることになる。したがって、乳酸の生成は、炭素消費の原因となり得る。そのため、メバロン酸生産 (並びに必要に応じてイソブレン、イソブレノイド前駆体及びイソブレノイドの生産) への炭素の取り込みを向上させるため、当業者は、酵素活性を低下させるなどして乳酸デヒドロゲナーゼの活性を調節することができる。

【0145】

したがって、一態様では、乳酸脱水素酵素の活性は、内在性乳酸脱水素酵素遺伝子の活性を減弱させることで調節できる。このような減弱は、内在性乳酸脱水素酵素遺伝子の欠失により実施できる。当業者に知られている、乳酸脱水素酵素遺伝子の活性を減弱させる他の手法も使用できる。乳酸脱水素酵素の関与する経路を操作することで、組み換え微生物の生成する乳酸量は、内在性乳酸脱水素酵素遺伝子の発現を減弱させていない微生物と比較して、減少することになる。乳酸の生成量の減少は、当業者に知られている所定のアッセイ法により測定できる。乳酸の生成量は、分子的な操作を行なっていない場合と比較して、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%減少する。

10

【0146】

乳酸脱水素酵素の活性は、酵素に関するその他の分子操作により低下させることもできる。酵素活性を低下させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して任意の量で低下させることができる。一部の例では、酵素活性を、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%低下させる。

20

【0147】

したがって、一部の場合では、内在性乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の活性を減弱させることで、内在性乳酸デヒドロゲナーゼの遺伝子発現を減弱させていない微生物と比較して、メバロン酸依存性の生合成経路への炭素の取り込みが増加する。

【0148】

リンゴ酸酵素の関与する経路

リンゴ酸酵素（大腸菌（*E. coli*）では^s *f* *c* *A* 及び^m *a* *e* *B*）は、次式に従いリンゴ酸のピルビン酸への変換を触媒する（NAD⁺又はNADP⁺を用いる）アナブレロティックな酵素である：

30

【0149】

【数1】



【0150】

したがって、この酵素の2種の基質は（S）-リンゴ酸及びNAD（P）⁺であり、これらにより3種の生成物、すなわち、ピルビン酸、CO₂、及びNADPHが生成される。

35

【0151】

NADP依存性リンゴ酸酵素（*m* *a* *e* *B* - 図5）（Iwakura, M. et al. 1979. J. Biochem. 85: 1355~1365）を発現させることで、1) TCAサイクル由来の炭素から、アセチルCoAの直接的な前駆体であり、それ自体がメバロン酸経路の直接的な前駆体となるピルビン酸を再生成し、及び2) HMG-CoAレダクターゼ反応に使用することのできる過剰なNADPHを生産して、メバロン酸、イソブレン、イソブレノイド前駆体及びイソブレノイドの収率を増加させる助けることができる（Oh, MK et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 13175~13183; Bolognani, F. et al. (2007) J. Bact. 189: 5937~5946）。

40

【0152】

そのため、リンゴ酸酵素の活性及び/又は発現を増加させることで調節することにより下流でのメバロン酸、イソブレン、イソブレノイド前駆体及びイソブレノイド生産に関する開始基質（ピルビン酸又はアセチルCoA）がより多く得られる。NADP依存性

50

のリンゴ酸酵素遺伝子は、内在性遺伝子であってよい。非限定的な手法の1つとしては、NADP依存性のリンゴ酸酵素の内在性遺伝子プロモーターを、常時発現型の合成発現プロモーターにより置き換えるというものが挙げられる。酵素活性を増加させる手法のその他の非限定例としては、NADP依存性のリンゴ酸酵素ポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を用いるものが挙げられる。当業者は、容易に利用可能な分子生物学手技を行い、発酵又は培養する際に、m a e B RNAの発現をモニターすることができる。

【0153】

したがって、一部の実施形態では、組み換え微生物は、NADP依存性のリンゴ酸酵素遺伝子の発現を増加させていない微生物と比較して、ピルビン酸の生産量が増加する。一部の態様では、NADP依存性のリンゴ酸酵素遺伝子の活性を増加させることで、NADP依存性のリンゴ酸酵素遺伝子の発現を増加させていない微生物と比較して、メバロン酸依存性の生合成経路への炭素原子の取り込みが増加する。

10

【0154】

ピルビン酸生成量の増加は、当業者に既知の所定のアッセイ法により測定できる。ピルビン酸の生産量は、分子的な操作を行なっていない場合と比較して、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%増加する。

20

【0155】

リンゴ酸酵素の活性は、酵素に関係するその他の分子操作により増加させることもできる。酵素活性を増加させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して任意の量で増加させることができる。一部の例では、酵素活性を、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%増加させる。

【0156】

ピルビン酸脱水素酵素複合体の関与する経路

30

ピルビン酸のアセチルCoAへの脱炭酸を触媒するピルビン酸脱水素酵素複合体は、遺伝子aceE、aceF、及びlpdAによりコードされるタンパク質から構成される。これらの遺伝子の転写は、複数の制御因子により制御される。したがって、当業者は、ピルビン酸脱水素酵素複合体の活性を調節して、アセチルCoAを増加することができる。調節により、ピルビン酸脱水素酵素複合体の活性及び/又は発現(例えば、常時発現)を増加させることができる。このような調節は、異なる手法により、例えば、PL.6(a
a t t c a t a a a a a a c a t a c a g a t a a a c c a t c t g c g g t g a t a a a t t a t c t c t g g c g g t g t t g a c a t a a a t a c c a c t g g c g g t g a t a c t g a g c a c a t c a g c a g g a c g c a c t g a c c a c c a t g a a g g t g - ラムダプロモーター、GenBank NC_001416(配列番号2))などの強力な常時発現型プロモーターをオペロンの前に配置することにより、あるいは常時発現型合成プロモーターを1種以上用いることにより行うことができる。

40

【0157】

したがって、一態様では、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性は、(a)ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(E1)、(b)ジヒドロリポイルトランスアセチラーゼ、及び(c)ジヒドロリポイルデヒドロゲナーゼから構成されるピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体に関係する、1種以上の遺伝子の活性を増加させることで調節される。これらの遺伝子のうちの任意の1つ、2つ、又は3つを操作して、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性を増加させることは理解される。別の態様では、以降に更に説明するように、ピルビン酸脱水素酵素複合体の活性は、内在性ピルビン酸脱水素酵素複合体のリプレッサー遺伝

50

子の活性を減弱させることで調節できる。内在性ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のリプレッサーの活性は、内在性ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体リプレッサー遺伝子を欠失させることにより減弱させることができる。

【0158】

一部の場合では、ピルビン酸脱水素酵素複合体に関する遺伝子の1つ以上は内在性遺伝子である。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性を増加させるその他の方法としては、微生物に、(a)ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(E1)、(b)ジヒドロリポイルトランスアセチラーゼ、及び(c)ジヒドロリポイルデヒドロゲナーゼからなる群に由来するポリペプチを1つ以上コードしている異種核酸を1つ以上導入することによるものが挙げられる。

10

【0159】

これらの方法のうち任意のものを用いることで、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性の調節されていない微生物と比較して、組み換え微生物によるアセチルCoAの生産量を増加させることができる。ピルビン酸脱水素酵素の活性を調節することで、ピルビン酸脱水素酵素の発現を調節していない微生物と比較して、メバロン酸依存性の生合成経路への炭素原子の取り込みを増加させることができる。

【0160】

変異の組み合わせ

本開示の酵素及び/又は酵素経路のいずれかに関し、本開示の酵素及び/又は酵素経路の任意の組み合わせ(これらのうち2、3、4、5、又は6の組み合わせ)を調節する分子的操作は、明確に企図されることは理解される。組み合わせて詳細説明することを容易にする目的で、クエン酸シンターゼ(gltA)はAと表記し、ホスホトランスアセチラーゼ(ptaB)はBと表記し、酢酸キナーゼ(ackA)はCと表記し、乳酸デヒドロゲナーゼ(ldhA)はDと表記し、リンゴ酸酵素(sfcA又はmaeB)はEと表記し、ピルビン酸デカルボキシラーゼ(aceE、aceF及び/又はlpdA)はFと表記する。上記のとおり、ピルビン酸脱炭酸酵素複合体のaceE、aceF、及び/又はlpdA酵素を単独で使用して、又は3つの酵素のうち2つを、又は3つ酵素のうち3つを使用して、ピルビン酸脱炭酸酵素の活性を増加させることができる。

20

【0161】

したがって、酵素A~Fのうちの任意の2種の組み合わせとしては、限定するものではないが、AB、AC、AD、AE、AF、BC、BD、BE、BF、CD、CE、CF、DE、DF及びEFを使用できる。酵素A~Fのうちの任意の3種の組み合わせとしては、限定するものではないが、ABC、ABD、ABE、ABF、BCD、BCE、BCF、CDE、CDF、DEF、ACD、ACE、ACF、ADE、ADF、AEF、BDE、BDF、BEF及びCEFを使用できる。酵素A~Fのうちの任意の4種の組み合わせとしては、限定するものではないが、ABCD、ABCE、ABCf、ABDE、ABDf、ABEF、BCDE、BCDF、CDEF、ACDE、ACDF、ACEF、BCEF、BDEF及びADEFを使用できる。酵素A~Fのうちの任意の5種の組み合わせとしては、限定するものではないが、ABCDE、ABCDF、ABDEF、BCDEF、ACDEF及びABCDEFを使用できる。別の態様では、6種の全ての酵素:ABCDEFを使用する。

30

【0162】

したがって、本開示に記載するとおりの組み換え微生物は、トリカルボン酸(TCA)サイクルの活性条件下で増殖しない微生物と比較して、メバロン酸生産を増加させることができ、(a)クエン酸シンターゼ、(b)ホスホトランスアセチラーゼ及び/又は酢酸キナーゼ、(c)乳酸脱水素酵素、(d)リンゴ酸酵素、並びに(E)ピルビン酸脱炭酸酵素複合体からなる群の1つ以上の酵素の活性を調節することで、組み換え微生物において代謝される炭素が、メバロン酸の生産に取り込まれるようになる。

40

【0163】

生産量の増加に関する他の制御因子及び要素

50

他の分子的操作を使用して、メバロン酸生産に取り込まれる炭素量を増加させることができる。このような方法のうちの1つは、メバロン酸経路に合流する経路に対する負の制御効果を減少させ、低下させるか、又は除去するものである。例えば、一部の場合では、遺伝子 *a c e E F - 1 p d A* はオペロンであり、*p d h R* の上流に遺伝子を4つ有する。*p d h R* は、このオペロンの転写に対する負の制御因子である。*p d h R* は、ピルビン酸の非存在下で標的プロモーターに結合し、転写を抑制する。この制御因子は同様の手法で *n d h* 及び *c y o A B C D* も制御する (Ogasawara, H. et al. 2007. J. Bact. 189: 5534 ~ 5541)。一態様では、*p d h R* 制御因子を欠失することにより、ピルビン酸の供給及びそれに伴うメバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体、及びイソプレノイドの生産を向上させることができる。

10

【0164】

他の態様では、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド及びイソプレノイド前駆体の生産を改良させるために、*P G L* を欠損している微生物（各種大腸菌 (*E. coli*) 株など）に 6 - ホスホグルコノラクトナーゼ (*P G L*) を導入し、使用することができる。*P G L* は、染色体への組み込み、又はプラスミドなどの染色体外のビヒクルを用い、導入することができる。特定の実施形態では、*P G L* を発現している微生物（各種大腸菌 (*E. coli*) 株など）のゲノムから、内在性 *P G L* を欠失させて、メバロン酸及び / 又はイソプレンの生産を増大させることもできる。

20

【0165】

本発明の一部の態様では、本開示の組成物又は方法のいずれかに記載の組み換え細胞は、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸、又はホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドを更に含む。一部の態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドは内在性ポリペプチドである。一部の態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように構成的プロモーターに連結される。一部の態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように誘導型プロモーターに連結される。一部の態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように高発現型プロモーターに連結される。一部の態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている内在性核酸を1つ以上（例えば、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている内在性核酸の2、3、又は4つ以上のコピー）を使用する。特定の態様では、細胞は、野生型細胞と比べ、内在性ホスホケトラーゼポリペプチドが過剰発現するよう遺伝子操作される。一部の態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように低発現型プロモーターに連結される。

30

【0166】

ホスホケトラーゼ酵素は、キシリロース5 - リン酸のグリセルアルデヒド3 - リン酸及びアセチルリン酸への変換、並びに / 又はフルクトース6 - リン酸のエリトロース4 - リン酸及びアセチルリン酸への変換を触媒する。特定の実施形態では、ホスホケトラーゼ酵素は、キシリロース5 - リン酸のグリセルアルデヒド3 - リン酸及びアセチルリン酸への変換を触媒する。他の実施形態では、ホスホケトラーゼ酵素は、フルクトース6 - リン酸のエリトロース4 - リン酸及びアセチルリン酸への変換を触媒する。したがって、理論に束縛されるものではないが、本明細書で説明されるとおりホスホケトラーゼを発現させることにより、炭水化物資源から生成されるアセチルリン酸量を増加させることができる。このアセチルリン酸をアセチルCoAに変換させ、更にこれをを利用して、MVA経路に関係する酵素活性により、メバロン酸、イソプレノイド前駆体分子、イソプレン及び / 又はイソプレノイドを生成させることができる。したがって、炭水化物基質より生成されるこれらの化合物量を増加させることができる。あるいは、細胞内濃度の上昇という形式で生産量の増加が反映されずとも、アセチル - P 及び A c C o A の生成量を増加させることができる。特定の実施形態では、細胞内アセチル - P 又はアセチルCoA濃度は、ホスホケトラーゼによる反応が生じた場合でさえ変化せず一定であり、又は減少する場合すらある。

40

50

【0167】

ホスホケトラーゼの核酸の例としては、ホスホケトラーゼポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又はポリペプチド融合物をコードしている核酸が挙げられる。ホスホケトラーゼのポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。一部の態様では、ホスホケトラーゼ核酸は、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードしている異種核酸である。

【0168】

標準法を使用し、ペプチドがD-フルクトース6-リン酸又はD-キシリロース5-リン酸をアセチル-Pに変換する能力を測定することで、ポリペプチドがホスホケトラーゼペプチド活性を有するかを判断できる。次に、アセチル-Pはフェリルアセチルヒドロキサム酸(ferryl acetyl hydroxamate)に変換され得る。この変換は、分光測定により検出可能である(Meille et al., J. Bact. 183: 2929~2936, 2001)。本発明での使用には、本明細書に記載されるとおりホスホケトラーゼペプチド活性を有するとして判定された任意のポリペプチドが好適である。

【0169】

他の態様では、ホスホケトラーゼの核酸の例としては、限定するものではないが、ラクトバチルス・ロイテリ(*Lactobacillus reuteri*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*)、フェリモナス・バレアリカ(*Ferrimonas balearica*)、ペドバクター・サルタンス(*Pedobacter saltans*)、ストレプトミセス・グリセウス(*Streptomyces griseus*)、及び/又はノカルディオプシス・ダッソンビレイ(*Nocardiopsis dassonvillei*)から単離したホスホケトラーゼが挙げられる。本明細書において使用することのできるホスホケトラーゼ酵素のその他の例は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,785,858号に記載されている。

【0170】

イソプレンの生産性を向上させることのできる組み換え細胞

イソプレン(2-メチル-1,3-ブタジエン)は、多様な用途で使用される重要な有機化合物である。例えば、イソプレンは、合成ゴムの製造時など、数多くの化学組成物及びポリマーの合成時に、中間体又は出発物質として使用される。イソプレンはまた、多くの植物及び動物により天然に合成される重要な生体物質である。

【0171】

イソプレンは、イソプレンシンターゼの触媒作用によりD M A P Pから製造される。したがって、理論に束縛されるものではないが、上記の任意の組成物及び方法により、宿主細胞(細菌細胞など)においてメバロン酸生産量を増加させることは、より多量のイソプレンを生産させるのと同様であると考えられる。グルコースからのメバロン酸生産量のモル収率を上昇させ、適切な酵素活性濃度で、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ並びにイソプレン及びイソプレノイド生産に好適な他の酵素と組み合わせると、イソプレノイド前駆体及びイソプレノイド(イソプレンを含む)のモル収率の上昇につながる。

【0172】

イソプレンの生産は、本開示に記載の任意の組み換え宿主細胞により実施することができ、この際、M V A経路の下流において使用されるアセトアセチルC o Aの生成には、アセトアセチルC o Aシンターゼを使用する。アセトアセチルC o Aシンターゼの使用により、メバロン酸生産量が増加し、次のこのメバロン酸をイソプレン生産に使用することができる。上記の、メバロン酸の生産量を増加させることのできる、上流M V A経路のポリペプチド(限定するものではないが、H M G - C o Aレダクターゼ及びH M G - C o Aシンターゼ(例えば、*L. grayi*(*L. grayi*)、*E. faecium*(*E. faecium*)、*E. gallinarum*(*E. gallinarum*)、*E. casseliflavus*(*E. casseliflavus*)及び/又は*E. faecalis*(*E. faecalis*)由来のm v a Sポリペプチド)をコードしている異種核酸

10

20

30

40

50

の1つ以上のコピーを発現している任意の組み換え宿主細胞は、イソプレンの生産量を増加させることもできる。一部の様では、これらの細胞は、下流MVA経路のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、及びイソプレンシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸を更に含む。

【0173】

本開示に記載されるとおりの組み換え細胞の組成は、同様に本発明の範囲内で企図される。組み換え細胞には、同様に後代細胞も包含されることは理解される。

【0174】

例示的な細胞培養培地

本明細書で使用するとき、用語「最少培地 (minimal medium又はminimal media) 」10 は、概して細胞の生育に必要とされる最低限の栄養素を含有している増殖培地を指すが、常に1種以上のアミノ酸 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10種以上のアミノ酸) が存在していないわけではない。最少培地は、典型的には、(1)宿主細胞生育用の炭素源、(2)宿主細胞種及び生育条件間で変更させ得る各種塩類、及び(3)水、を含有する。炭素源は、グルコースなどの単糖から、本明細書で以下により詳細に記載されるような、他のバイオマスのより複雑な加水分解物、例えば、酵母エキスなどといった多様なものであり得る。塩は、概してマグネシウム、窒素、リン及びイオウなどの必須元素を提供し、細胞がタンパク質及び核酸を合成できるようにする。また、最少培地には、特定のプラスミド及び同様物を維持すべく選別するために、抗菌剤などの選択剤を添加することもできる。例えば、微生物が、例えばアンピシリン又はテトラサイクリンなどの特定の抗菌剤に耐性である場合、耐性を欠く細胞の増殖を阻害する目的で培地に抗菌剤を添加することができる。培地には、所望される生理学的又は生化学的特性について選別するのに必要とされる、例えば特定のアミノ酸などといった他の化合物を添加することができる。

【0175】

宿主細胞を培養するにあたり、任意の最少培地処方を使用することができる。最少培地の処方例としては、例えば、M9最少培地及びTM3最少培地が挙げられる。M9最少培地は、1Lにつき(1)200mLの滅菌M9塩類(1Lあたり6.4gのNa₂HPO₄·7H₂O、1.5gのKH₂PO₄、2.5gのNaCl及び5.0gのNH₄Cl)；(2)2mLの1MのMgSO₄(滅菌)；(3)20mLの20%(重量/体積)グルコース(又は他の炭素源)；及び(4)100μLの1MのCaCl₂(滅菌)を含有する。30 TM3最少培地は、1L中に(1)K₂HPO₄(13.6g)；(2)KH₂PO₄(13.6g)；(3)MgSO₄·7H₂O(2g)；(4)クエン酸一水和物(2g)；(5)クエン酸鉄アンモニウム(0.3g)；(6)(NH₄)₂SO₄(3.2g)；(7)酵母エキス(0.2g)；及び(8)1000X微量元素溶液(1mL)を含有する。pHは約6.8に調整し、溶液は濾過滅菌する。1000X微量元素は、1L中に(1)クエン酸一水和物(40g)；(2)MnSO₄·H₂O(30g)；(3)NaCl(10g)；(4)FeSO₄·7H₂O(1g)；(4)CoCl₂·6H₂O(1g)；(5)ZnSO₄·7H₂O(1g)；(6)CuSO₄·5H₂O(100mg)；(7)H₃BO₃(100mg)；及び(8)NaMOO₄·2H₂O(100mg)を含有する。pHは約3.0に調節する。40

【0176】

その他の最少培地の例は、(1)リン酸カリウムK₂HPO₄、(2)硫酸マグネシウムMgSO₄·7H₂O、(3)クエン酸一水和物C₆H₈O₇·H₂O、(4)クエン酸鉄アンモニウムNH₄FeC₆H₅O₇、(5)酵母エキス(biospringer)、(6)1000X改变微量元素溶液、(7)硫酸50%(重量/体積)、(8)formblast 882(Emerald Performance Materials)及び(9)微量元素溶液を3.36mL含有する。成分のすべてを一緒に加え、脱イオン水に溶解させ、次に加熱滅菌する。続いて室温に冷却し、水酸化アンモニウム(28%)によりpHを7.0に調節し、用量に調整する。滅菌後にビタミン溶液及びスペクチノ

10

20

30

40

50

マイシンを加え、pHを調整する。

【0177】

宿主細胞を培養するにあたり任意の炭素源を使用することができる。用語「炭素源」は、宿主細胞又は微生物により代謝させることのできる、1つ以上の炭素を含有している化合物を指す。例えば、宿主細胞を培養するにあたり使用される細胞培地には、宿主細胞の生存能を維持させる又は宿主細胞を増殖させるのに好適な任意の炭素源を包含させることができる。一部の態様では、炭素源は炭水化物（例えば、単糖、二糖、オリゴ糖、又は多糖など）、又は転化糖（例えば、酵素により処理したスクロースシロップ）である。

【0178】

一部の態様では、炭素源としては、酵母エキス又は酵母エキスの1つ以上の成分が挙げられる。一部の態様では、酵母エキスの濃度は、酵母エキスの0.1%（重量/体積）、0.09%（重量/体積）、0.08%（重量/体積）、0.07%（重量/体積）、0.06%（重量/体積）、0.05%（重量/体積）、0.04%（重量/体積）、0.03%（重量/体積）、0.02%（重量/体積）、又は0.01%（重量/体積）である。一部の態様では、炭素源には、酵母エキス（又は酵母エキスの1つ以上の成分）及び他の炭素源、例えばグルコースの両方を含む。

【0179】

単糖の例としては、グルコース及びフルクトースが挙げられ、オリゴ糖の一例としては、ラクトース及びスクロースが挙げられ、並びに多糖の例としては、デンプン及びセルロースが挙げられる。炭水化物例としては、C6糖（例えば、フルクトース、マンノース、ガラクトース、又はグルコース）及びC5糖（例えば、キシロース又はアラビノース）が挙げられる。

【0180】

例示的な細胞培養条件

本発明の組み換え細胞を維持し及び増殖させるのに好適な材料及び方法は、以下、例えば、実施例の節に記載される。細胞培養物の維持及び増殖に好適な他の材料及び方法は当該技術分野において周知である。例示的な手法としては、国際公開第2009/076676号、米国特許出願第12/335,071号（同第2009/0203102号）、国際公開第2010/003007号、米国特許出願公開第2010/0048964号、国際公開第2009/132220号、米国特許出願公開第2010/0003716号、Gerhardt et al.（編）の一般細菌学に関する手法についてのマニュアル）、American Society for Microbiology, Washington, D.C.（1994）又はBrock in Biotechnology: テキスト「工業微生物学（Industrial Microbiology）」第2版（1989）Sinauer Associates, Inc.（Sunderland, MA）が挙げられる。一部の態様では、細胞は、宿主細胞に挿入する核酸にコードされた、HMG-CoAレダクターゼ、HMG-CoAシンターゼ、イソブレンシンターゼ、DXP経路（例えば、DXS）、IDI、下流MVA経路ポリペプチド又はPGK、のポリペプチドのうちの、1種以上を発現させる条件下で、培地中で培養される。

【0181】

細胞を培養するにあたり、標準的な細胞培養条件を使用することができる（例えば、国際公開第2004/033646号及び該当特許中に引用される参考文献を参照されたい）。一部の態様では、細胞は適切な温度、気体混合物、及びpH（例えば、約20～約37、約6%～約84%のCO₂、及び約5～約9のpH）で生育及び維持される。一部の態様では、細胞は適切な細胞培地中で35で生育させる。一部の態様では、発酵の際のpH範囲は約pH 5.0～約pH 9.0（例えば、約pH 6.0～約pH 8.0、又は約6.5～約7.0）である。細胞は、宿主細胞に必要とされる条件に基づき、好気性、無酸素性、又は嫌気性条件下で生育させることができる。加えて、細胞を培養するにあたり、より特異的な細胞培養条件を使用することができる。例えば一部の実施形態では、高発現型プロモーターの調節下の低～中間コピー数のプラスミドにおいてHMG

10

20

30

40

50

- CoA レダクターゼをコードしている 1 つ以上の異種核酸を発現するバクテリア細胞 (例えは、大腸菌 (*E. coli*) 細胞など) を 3 4 で培養する。

【 0 1 8 2 】

使用することのできる標準的な培養条件、並びに回分式、流加式、又は連続式発酵などの発酵様式は、国際公開第 2009/076676 号、米国特許出願第 12/335,071 号 (米国特許出願公開第 2009/0203102 号) 、国際公開第 2010/003007 号、米国特許出願公開第 2010/0048964 号、国際公開第 2009/132220 号、米国特許出願公開第 2010/0003716 号に記載されている。回分式発酵及び流加式発酵は一般的かつ当該技術分野では周知のものであり、その例は、 Brock, Biotechnology : A Textbook of Industrial Microbiology , Second Edition (1989) Sinauer Associates, Inc. に見ることができる。

【 0 1 8 3 】

一部の態様では、細胞はグルコース制限条件下で培養される。「グルコース制限条件」は、添加されるグルコースの量が、細胞により消費されるグルコース量の約 105% 以下 (例えは、約 100% 、 90% 、 80% 、 70% 、 60% 、 50% 、 40% 、 30% 、 20% 、又は 10%) であることを意味する。特定の態様では、培養培地に添加されるグルコース量は、特定の期間中に細胞により消費されるグルコース量とほぼ同様である。一部の態様では、細胞の増殖速度は、細胞培地中のグルコースの量により維持することのできる速度で細胞が増殖するよう、添加するグルコース量を制限することで制御される。一部の態様では、グルコースは細胞培養時に蓄積しない。様々な態様で、細胞はグルコース制限条件下で、約 1 、 2 、 3 、 5 、 10 、 15 、 20 、 25 、 30 、 35 、 40 、 50 、 60 、又は 70 時間以上培養される。様々な態様で、細胞は、細胞を培養する合計時間の長さの約 5 、 10 、 15 、 20 、 25 、 30 、 35 、 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 95 又は 100% 以上の時間にわたって、グルコース制限条件下で培養される。任意の特定の理論に束縛されることを意図するものではないが、グルコース制限条件は、細胞をより都合よく制御し得るものであると考えられる。

【 0 1 8 4 】

一部の態様では、宿主細胞は回分式培養で増殖させる。宿主細胞は、流加式培養又は連続式培養により生育させることもできる。加えて、宿主細胞は、限定するものではないが、上記のいずれかの最少培地などの最少培地で培養することができる。最少培地には、更に 1.0% (重量 / 体積) グルコース又は任意の他の 6 单糖以下の糖などを添加してもよい。具体的には、最少培地には 1% (重量 / 体積) 、 0.9% (重量 / 体積) 、 0.8% (重量 / 体積) 、 0.7% (重量 / 体積) 、 0.6% (重量 / 体積) 、 0.5% (重量 / 体積) 、 0.4% (重量 / 体積) 、 0.3% (重量 / 体積) 、 0.2% (重量 / 体積) 、又は 0.1% (重量 / 体積) のグルコースが添加される。加えて、最少培地には 0.1% (重量 / 体積) 以下の酵母エキスを添加してもよい。具体的には、最少培地には 0.1% (重量 / 体積) 、 0.09% (重量 / 体積) 、 0.08% (重量 / 体積) 、 0.07% (重量 / 体積) 、 0.06% (重量 / 体積) 、 0.05% (重量 / 体積) 、 0.04% (重量 / 体積) 、 0.03% (重量 / 体積) 、 0.02% (重量 / 体積) 又は 0.01% (重量 / 体積) の酵母エキスを添加してもよい。あるいは、最少培地には 1% (重量 / 体積) 、 0.9% (重量 / 体積) 、 0.8% (重量 / 体積) 、 0.7% (重量 / 体積) 、 0.6% (重量 / 体積) 、 0.5% (重量 / 体積) 、 0.4% (重量 / 体積) 、 0.3% (重量 / 体積) 、 0.2% (重量 / 体積) 又は 0.1% (重量 / 体積) のグルコース及び 0.1% (重量 / 体積) 、 0.09% (重量 / 体積) 、 0.08% (重量 / 体積) 、 0.07% (重量 / 体積) 、 0.06% (重量 / 体積) 、 0.05% (重量 / 体積) 、 0.04% (重量 / 体積) 、 0.03% (重量 / 体積) 、 0.02% (重量 / 体積) 又は 0.01% (重量 / 体積) の酵母エキスを添加してもよい。

【 0 1 8 5 】

組み換え細胞を使用してイソプレンを生産する方法

10

20

30

40

50

本開示では、本開示に記載の任意の組み換え微生物を培養する工程を含む、イソブレンの生産方法も提供される。一態様では、イソブレンは、マロニルCoA及びアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成（例えば、アセトアセチルCoAシンターゼ）するとのできるポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸：並びに（a）イソブレンシンターゼポリペプチド；及び（b）メバロン酸（MVA）経路の1つ以上のポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸を含む組み換え宿主細胞（例えば、バクテリア細胞）を培養することにより生産することができ、イソブレンシンターゼポリペプチドは、異種核酸によりコードされる。一態様では、HMG-CoAレダクターゼ、下流MVA経路のポリペプチド、及びイソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を使用することができる。別の態様では、HMG-CoAレダクターゼ及びHMG-CoAシンターゼ、下流MVA経路のポリペプチド、並びにイソブレンシンターゼポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸を含む組み換え宿主細胞（例えば、バクテリア細胞）を培養することによりイソブレンを生産することができる。イソブレンは、本開示の任意の方法に従い、本明細書に記載の任意の細胞から生産することができる。六炭糖（グルコースなど）などの炭水化物からイソブレンを生産する目的に際し、任意の細胞を使用することができる。

10

【0186】

細胞には、更に、上記の、下流MVA経路のポリペプチド（例えば、MVK、PMK、MVD、及び／又はIDI）及び上記のイソブレンシンターゼポリペプチド（例えば、ウラジロハコヤナギ（*P. alba*）イソブレンシンターゼ）をコードしている1つ以上の核酸分子を含ませることができる。一部の態様では、宿主細胞は、本明細書に記載の任意の細胞であってよい。本明細書に記載の任意のイソブレンシンターゼ又はそれらの変異体、本明細書に記載の任意の宿主細胞（例えば、細菌株）、本明細書に記載の任意のプロモーター及び／又は本明細書に記載の任意のベクターも、本明細書に記載の任意のエネルギー源（例えば、グルコース又は任意のその他の六炭糖）を使用するイソブレンの生産に使用することができる。一部の態様では、イソブレンの生産方法は、イソブレンを回収する工程を更に含む。

20

【0187】

一部の態様では、生産されるイソブレン量は、各生産時点で測定されたものである。一部の態様では、細胞に関し生産量は、本開示の任意のおよそのイソブレン量を指しているものである。一部の態様では、生産されたイソブレンの総量は累積値として測定される。一部の態様では、細胞の累積生産量は、本明細書で開示される任意のおよそのイソブレン量を指しているものである。

30

【0188】

一部の態様では、本明細書に記載の、任意の細胞（例えば、培養物中の細胞）は、約1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000又は5,000以上のうちのいずれかのイソブレン（nmole）/細胞湿潤重量（g）/時間（nmole/g_{wcm}/hr）値でイソブレンを生産する。一部の態様では、イソブレンの量は約2～約5,000nmole/g_{wcm}/hrであり、例えば、約2～約100nmole/g_{wcm}/hr、約100～約500nmole/g_{wcm}/hr、約150～約500nmole/g_{wcm}/hr、約500～約1,000nmole/g_{wcm}/hr、約1,000～約2,000nmole/g_{wcm}/hr又は約2,000～約5,000nmole/g_{wcm}/hrである。一部の態様では、イソブレンの量は約20～約5,000nmole/g_{wcm}/hr、約100～約5,000nmole/g_{wcm}/hr、約200～約1,000nmole/g_{wcm}/hr、約300～約1,000nmole/g_{wcm}/hr又は約400～約1,000nmole/g_{wcm}/hrである。

40

【0189】

50

一部の態様では、細胞は、培養時に、約1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000又は100,000以上のうちのいずれかのイソプレン(nmole) / 細胞湿潤重量(g) / 時間($\text{ng/g}_{\text{wcm}}/\text{hr}$)値でイソプレンを生産する。一部の態様では、イソプレンの量は、約2～約5,000ng/ $\text{g}_{\text{wcm}}/\text{h}$ であり、例えば、約2～約100ng/ $\text{g}_{\text{wcm}}/\text{h}$ 、約100～約500ng/ $\text{g}_{\text{wcm}}/\text{h}$ 、約500～約1,000ng/ $\text{g}_{\text{wcm}}/\text{h}$ 、約1,000～約2,000ng/ $\text{g}_{\text{wcm}}/\text{h}$ 又は約2,000～約5,000ng/ $\text{g}_{\text{wcm}}/\text{h}$ である。一部の態様では、イソプレンの量は、約20～約5,000ng/ $\text{g}_{\text{wcm}}/\text{h}$ 、約100～約5,000ng/ $\text{g}_{\text{wcm}}/\text{h}$ 、約200～約2,000ng/ $\text{g}_{\text{wcm}}/\text{h}$ 、約200～約1,000ng/ $\text{g}_{\text{wcm}}/\text{h}$ 、約300～約1,000ng/ $\text{g}_{\text{wcm}}/\text{h}$ 又は約400～約1,000ng/ $\text{g}_{\text{wcm}}/\text{h}$ である。
10

【0190】

一部の態様では、細胞は、培養時に、約1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、50,000、100,000以上のうちのいずれかのイソプレン(mg) / プロス(L) ($\text{mg/L}_{\text{プロス}}$ 、プロス体積には、細胞及び細胞培地の体積を含む) 値の累積力価(総量)でイソプレンを生産する。一部の態様では、イソプレンの量は、約2～約5,000mg/L_{プロス}であり、例えば、約2～約100mg/L_{プロス}、約100～約500mg/L_{プロス}、約500～約1,000mg/L_{プロス}、約1,000～約2,000mg/L_{プロス}、又は約2,000～約5,000mg/L_{プロス}などである。一部の態様では、イソプレンの量は、約20～約5,000mg/L_{プロス}、約100～約5,000mg/L_{プロス}、約200～約2,000mg/L_{プロス}、約300～約1,000mg/L_{プロス}、又は約400～約1,000mg/L_{プロス}である。
20

【0191】

一部の態様では、細胞により、培養時に生産されるイソプレンは、発酵時排出気体(*fermentation offgas*)の体積の少なくとも約1、2、5、10、15、20又は25%を構成する。一部の態様では、イソプレンは、排出気体の体積の約1～約25%を構成し、例えば、約5～約15%、約15～約25%、約10～約20%又は約1～約10%を構成する。
30

【0192】

イソプレノイド前駆体及び/又はイソプレノイドの生産量を増加させることのできる組み換え細胞

イソプレノイドは、多くの生物において、MVA経路の最終産物であるイソプレノイド前駆体分子の合成をもとに生産させることができる。上記のように、イソプレノイドは、重要な部類の化合物として存在し、例えば、食品及び飼料用サプリメント、風味及び臭気化合物、並びに抗癌、抗マラリア、抗真菌及び抗菌化合物を含む。
40

【0193】

分子の分類としては、イソプレノイドは、化合物を構成しているイソプレン単位の数に基づき分類される。モノテルペンは10個の炭素原子又は2個のイソプレン単位を含み、セスキテルペンは15個の炭素原子又は3個のイソプレン単位を含み、ジテルペンは20個の炭素原子又は4個のイソプレン単位を含み、セステルテルペンは25個の炭素原子又は5個のイソプレン単位を含む。ステロイド(一般的に、炭素原子を約27個含む)は、イソプレノイドを分解又は再構成した生成物である。

【0194】

イソプレノイドは、イソプレノイド前駆体分子のIPP及びDMAPPから生成することができる。これらの多様な化合物は、これらのより単純で一般的な前駆体から誘導され
50

、及び保存されているポリプレニルピロリン酸シンターゼにより合成される (Hsieh et al., Plant Physiol. 2011 Mar; 155 (3): 1079~90)。多様な鎖長を有するこれらの直鎖プレニルピロリン酸はそれぞれに特有の生理機能を示し、及びポリプレニルピロリン酸シンターゼの非常に発達した活性部位により、一般的にアリル基 (ジメチルアリルニリン酸 (C₅-DMAPP)、ゲラニルピロリン酸 (C₁₀-GPP)、ファルネシルピロリン酸 (C₁₅-FPP)、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (C₂₀-GGPP)) と、相当する数のイソペンテニルピロリン酸との縮合反応を介し、認識される (C₅-IPP) (Hsieh et al., Plant Physiol. 2011 Mar; 155 (3): 1079~90)。

【0195】

10

イソプレノイド前駆体及び/又はイソプレノイドの生産は、アセトアセチルCoAシンターゼを含む任意の組み換え宿主細胞を使用して行うことができる。加えて、これらの細胞には、メバロン酸、イソブレン、イソプレノイド前駆体及び/又はイソプレノイドの生産性を向上させるために、HMG-CoAレダクターゼ及びHMG-CoAシンターゼをコードしている異種核酸の1つ以上のコピーを発現させることができる。HMG-CoAレダクターゼ及びHMG-CoAシンターゼをコードしている異種核酸の1つ以上のコピーを発現しており、メバロン酸又は上記のイソブレンの生産量を増大させることのできる任意の組み換え宿主細胞では、イソプレノイド前駆体及び/又はイソプレノイドの生産量を増大させることもできる。一部の態様では、これらの細胞は、上記のように、下流MVA経路、IDI及び/又はDXP経路のポリペプチドをコードしている1つ以上の異種核酸、並びにポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸を更に含む。理論に束縛されるものではないが、上記の任意の組成物及び方法により、宿主細胞（細菌細胞など）におけるメバロン酸の生産量を増加させることで、同様に、イソプレノイド前駆体分子及び/又はイソプレノイドなどのより高分子量の生成物の生産量も増加するものと考えられる。グルコースからのメバロン酸生産量のモル収率を上昇させ、適切な酵素活性濃度で、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ並びにイソブレン及びイソプレノイド生産に好適な他の酵素を組み合わせると、イソプレノイド前駆体分子及び/又はイソプレノイド（イソブレンを含む）のモル収率の上昇につながる。

20

【0196】

30

イソプレノイドの種類

本発明の組み換え微生物は、イソプレノイド及びイソプレノイド前駆体分子DMAPP及びIPPの生産量を増加させる能力がある。イソプレノイドの例としては、限定するものではないが、ヘミテルペノイド、モノテルペノイド、セスキテルペノイド、ジテルペノイド、セステルテルペノイド、トリテルペノイド、テトラテルペノイド、及びより高分子量のポリテルペノイドが挙げられる。一部の態様では、ヘミテルペノイドは、プレノール（すなわち、3-メチル-2-ブテン-1-オール）、イソプレノール（すなわち、3-メチル-3-ブテン-1-オール）、2-メチル-3-ブテン-2-オール、又はイソ吉草酸である。一部の態様では、モノテルペノイドは、限定するものではないが、ゲラニルピロリン酸、オイカリプトール、リモネン、又はピネンであってよい。一部の態様では、セスキテルペノイドはファルネシルピロリン酸、アルテミシニン、又はビサボロールである。一部の態様では、ジテルペノイドは、限定するものではないが、ゲラニルゲラニルピロリン酸、レチノール、レチナール、フィトール、タキソール、フォルスコリン、又はアフィジコリンであってよい。一部の態様では、トリテルペノイドは、スクアレン又はラノステロールであってよい。イソプレノイドは、アビエタジエン、アモルファジエン、カレン、ファルネセン、-ファルネセン、-ファルネセン、ファルネソール、ゲラニオール、ゲラニルゲラニオール、リナロール、リモネン、ミルセン、ネロリドール、オシメン、パチョロール、-ピネン、サビネン、-テルピネン、テルピンデン (Terpinene)、及びバレンセンからなる群から選択することができる。

40

【0197】

50

一部の態様では、テトラテルペノイドは、リコピン又はカロチン（カロチノイド）である。本明細書で使用するとき、用語「カロテノイド」は、クロロプラスト中で、並びに植物、何らかの他の光合成生物、例えば藻類、ある種の真菌、ある種のバクテリア、のクロロプラスト中で生産される、天然に生じる有機色素群を指す。カロテノイドとしては、酸素を含有しているキサントフィル及び酸素を含有していないカロテンが挙げられる。一部の態様では、カロテノイドはキサントフィル及びカロテンからなる群から選択される。一部の態様では、キサントフィルはルテイン又はゼアキサンチンである。一部の態様では、カロチノイドは、-カロチン、-カロチン、-カロチン、-クリプトキサンチン又はリコピンである。

【0198】

10

ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸

本発明の一部の態様では、本明細書において任意の組成物又は方法に記載されるように、アセトアセチルCoAシンターゼを含む組み換え細胞は、更に、上記のとおりにチオラーゼ以外のMVA経路のポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸、並びにポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸を更に含む。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドは、内在性ポリペプチドであってよい。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、構成型プロモーターに調節可能なように連結させてよく、あるいは同様に、調節可能なように誘導型プロモーターに連結させてもよい。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、更に、調節可能なように高発現型プロモーターと連結させてもよい。あるいは、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように低発現型プロモーターと連結させてもよい。詳細には、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドを過剰発現するよう遺伝子操作することができる。

20

【0199】

一部の態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドは、異種ポリペプチドである。本発明の細胞は、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸の1つ以上のコピーを含む。一部の態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように構成型プロモーターに連結されている。一部の態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように誘導型プロモーターに連結されている。一部の態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように高発現型プロモーターに連結されている。一部の態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように低発現型プロモーターに連結されている。

30

【0200】

ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、あるいは細胞で安定的に発現させることができる。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている核酸は、更にベクター上に存在させてもよい。

40

【0201】

ポリプレニルピロリン酸シンターゼの核酸の例としては、ポリプレニルピロリン酸シンターゼの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又は融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドは、イソプレノイド前駆体分子をより複雑なイソプレノイド化合物に変換する。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドの例としては、イソプレンシンターゼポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、並びに融合ポリペプチドが挙げられる。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載されるような任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸が挙げられる。加えて、ポリプレニルピロリン酸シンターゼ変異体

50

は、酵素活性が向上しているなどして、活性が向上されていてよい。一部の態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼ変異体は、安定性（例えば、熱安定性）が改良されている、及び／又は溶解性が改良されているなどして、その他の特性が改良されている。ポリプレニルピロリン酸シンターゼの核酸の例としては、限定するものではないが、ゲラニルジホスフェート (geranyl diphosphosphate) (GPP) シンターゼ、ファルネシリルピロリン酸 (FPP) シンターゼ、及びゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) シンターゼ、又はその他の任意の既知のポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドなど、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている核酸を挙げることができる。

【0202】

本発明の一部の態様では、本明細書において任意の組成物又は方法に記載されるように、細胞は、ファルネシリルピロリン酸 (FPP) シンターゼをコードしている1つ以上の核酸を更に含む。FPPシンターゼポリペプチドは、内在性遺伝子によりコードされている内在性ポリペプチドであってもよい。一部の態様では、FPPシンターゼポリペプチドは、大腸菌 (*E. coli*) において内在性 *ispa* 遺伝子によりコードされている。FPPシンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、調節可能なように構成型プロモーターに連結させることができ、あるいは同様に調節可能なように誘導型プロモーターに連結させることができる。FPPシンターゼポリペプチドをコードしている内在性核酸は、更に、調節可能なように高発現型プロモーターに連結させることができる。特に、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性 FPPシンターゼポリペプチドを過剰発現するよう遺伝子操作することができる。

10

20

【0203】

一部の態様では、FPPシンターゼポリペプチドは異種ポリペプチドである。本発明の細胞は、FPPシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸の1つ以上のコピーを含み得る。一部の態様では、FPPシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、構成型プロモーターに調節可能なように連結される。一部の態様では、FPPシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、誘導型プロモーターに調節可能なように連結される。一部の態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸は、調節可能なように高発現型プロモーターに連結されている。

【0204】

FPPシンターゼポリペプチドをコードしている核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、あるいは細胞で安定的に発現させることができる。FPPシンターゼポリペプチドをコードしている核酸は、更にベクターに組み込むこともできる。

30

【0205】

生体外で、細胞抽出物中で又は生体内で、ポリペプチドがIPPをイソプレノイドに変換する能力を測定して、ポリペプチドがポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチド活性を有するか評価する際には、標準法を使用できる。これらの手法は当該技術分野において周知であり、例えば、米国特許第7,915,026号；Hsieh et al. , Plant Physiol. 2011 Mar ; 155 (3) : 1079~90 ; Danner et al. , Phytochemistry. 2011 Apr 12 [印刷物に先駆けたオンライン出版] ; Jones et al. , J Biol Chem. 2011 Mar 24 [印刷物に先駆けたオンライン出版] ; Keeling et al. , BMC Plant Biol. 2011 Mar 7 ; 11 : 43 ; Martin et al. , BMC Plant Biol. 2010 Oct 21 ; 10 : 226 ; Kumeta & Ito , Plant Physiol. 2010 Dec ; 154 (4) : 1998~2007 ; and Kollner & Boland , J Org Chem. 2010 Aug 20 ; 75 (16) : 5590~600 に記載されている。

40

【0206】

組み換え細胞を使用してイソプレノイド及び／又はイソプレノイド前駆体分子を生産する方法

50

本開示では、イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドの生産方法であって、アセトアセチルC_oAシンターゼ、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチド、並びにMVA経路のポリペプチド、例えば限定するものではないが、HMG-C_oAレダクターゼ、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリルC_oAシンターゼ(HMG-C_oAシンターゼ)ポリペプチド、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリルC_oAレダクターゼ(HMG-C_oAレダクターゼ)ポリペプチド、メバロン酸キナーゼ(MVK)ポリペプチド、ホスホメバロン酸キナーゼ(PMK)ポリペプチド、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ(MVD)ポリペプチド、ホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ(PMDC)ポリペプチド、イソペンテニルリン酸キナーゼ(IPK)ポリペプチド、IPPイソメラーゼポリペプチド、IDIポリペプチド、及びMVA経路ポリペプチドのうち2つ又はそれ以上の活性を有するポリペプチド(例えば、融合ポリペプチド)などをコードしている1つ以上の核酸を含む組み換え微生物(例えば、組み換えバクテリア細胞)を培養する工程を含む方法も提供する。

10

【0207】

イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドは、本明細書に記載の任意の細胞から、及び本開示の任意の方法に従って、生産することができる。グルコースなどの六炭糖といった炭水化物から、イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドを生産する目的で、任意の細胞を使用することができる。

20

【0208】

したがって、本明細書では、イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドの生産方法であって、アセトアセチルC_oAシンターゼ、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチド、並びにHMG-C_oAレダクターゼ及びHMG-C_oAシンターゼをコードしている1つ以上の異種核酸を含む組み換え宿主細胞を、イソプレン及びイソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドを生産させるのに好適な条件下で培養する工程を含む、生産方法が提供される。細胞には、上記の下流MVA経路のポリペプチド(例えば、MVK、PMK、MVD及び／又はIDI)及び上記の任意のポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸分子を更に含ませることができる。一部の態様では、宿主細胞は、本明細書に記載の任意の細胞であってよい。本明細書に記載の任意のポリプレニルピロリン酸シンターゼ又はそれらの変異体、本明細書に記載の任意の宿主細胞株、本明細書に記載の任意のプロモーター及び／又は本明細書に記載の任意のベクターを使用し、本明細書に記載の任意のエネルギー源(例えば、グルコース又は任意の他の六炭糖)を利用して、イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドを生産することもできる。一部の態様では、イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドの生産方法は、イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドを回収する工程を更に含む。

30

【0209】

イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドの生産方法であって、同様に、(a)内在的にHMG-C_oAレダクターゼ及びHMG-C_oAシンターゼを有さない宿主細胞(例えば、限定するものではないが、大腸菌(*E. coli*)細胞などのバクテリア細胞)を培養する工程であって、前記宿主細胞がHMG-C_oAレダクターゼ及びHMG-C_oAシンターゼをコードしている遺伝子の1つ以上のコピーを異種発現する宿主細胞を培養する工程と、(b)イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドを生産させる工程とを含み、前記宿主細胞が、HMG-C_oAレダクターゼ及びHMG-C_oAシンターゼを含まないイソプレノイド及び／又はイソプレノイド前駆体産性宿主細胞と比較して、多量にイソプレノイド前駆体及び／又はイソプレノイドを生産する、方法を提供することができる。特定の実施形態では、宿主細胞は、バクテリア細胞、藻類細胞、真菌細胞(糸状菌を含む)、又は酵母細胞である。

40

【0210】

HMG-C_oAレダクターゼ及びHMG-C_oAシンターゼを含まず、メバロン酸の生産に取り込まれる炭素量が増加するよう遺伝子操作されていないイソプレノイド及び／又

50

はイソプレノイド前駆体産性宿主細胞と比較して、イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドの生産に関する本発明の方法は、少なくとも5%超の量でイソプレノイド前駆体及び／又はイソプレノイドを生産することができる。あるいは、宿主細胞は、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%又は15%超、並びに包括的にこれらの数値の間の任意の数値だけイソプレノイド前駆体及び／又はイソプレノイドを生産することができる。一部の態様では、イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドの生産方法は、イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドを回収する工程を更に含む。

【 0 2 1 1 】

【 0 2 1 2 】

イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドの生産量は、HMG-CoAレダクターゼ及びHMG-CoAシンターゼの1つ以上の異種核酸を発現せず、メバロン酸生産に取り込まれる炭素量が増加するよう遺伝子操作を受けていない細胞によるイソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイド生産量と比較して、少なくとも、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍、10,000倍、20,000倍、50,000倍、又は1,000,000倍のうちの任意の割合だけ向上させることもできる。

【 0 2 1 3 】

加えて、より具体的な細胞培養条件を使用して、本明細書に記載の方法により細胞を培養する。

養することができる。例えば、一部の態様では、イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドの生産方法には、(a) HMG-CoAレダクターゼ及びHMG-CoAシンターゼを内在的に有していない宿主細胞(限定するものではないが、大腸菌(E. coli)細胞などのバクテリア細胞)を34で培養する工程であって、前記宿主細胞が、HMG-CoAレダクターゼ及びHMG-CoAシンターゼをコードしている遺伝子の1つ以上のコピーを低～通常コピー数のプラスミドにおいて高発現型プロモーターの調節下で異種発現する宿主細胞を培養する工程と、(b)メバロン酸を生産させる工程とを含む。一部の態様では、メバロン酸の生産方法は、イソプレノイド前駆体分子及び／又はイソプレノイドを回収する工程を更に含む。特定の実施形態では、宿主細胞は、バクテリア細胞、藻類細胞、真菌細胞(糸状菌を含む)、又は酵母細胞である。

10

【0214】

例示的な精製方法

一部の態様では、本明細書に記載の任意の方法は更に、生産された化合物を回収する工程を包含する。一部の態様では、本明細書に記載の任意の方法は更に、イソブレンを回収する工程を包含する。一部の態様では、イソブレンは吸着ストリッピングにより回収される(例えば、米国特許第12/969,440号を参照されたい)。一部の態様では、本明細書に記載の任意の方法は更に異種ポリペプチドを回収する工程を包含する。一部の態様では、本明細書に記載の任意の方法は更に、テルペノイド又はカロテノイドを回収する工程を含む。

20

【0215】

好適な精製方法は、米国特許出願公開第2010/0196977(A1)号により詳細に記載されている。

【0216】

本発明は、実例として提供され、制限することを意味するものではない以降の実施例を参照することにより更に理解することができる。

【実施例】

【0217】

実施例1：アセトアセチルCoAシンターゼ(NphT7)によりMVAを生産するため上流MVA経路をコードしているプラスミドの作成

それぞれアセトアセチルCoAシンターゼ、HMG-CoAシンターゼ、及びHMG-CoAレダクターゼを発現するnphT7遺伝子、mvaS遺伝子、及びmvaR遺伝子をコードする発現プラスミドを生成した。簡潔に述べると、順行プライマー及び逆行プライマーを合成して、ストレプトミセスタンパク質をコードしている合成遺伝子から、mvaS遺伝子(MCM489及びMCM490)、mvaR遺伝子(MCM491及びMCM492)、及びnphT7遺伝子(MCM495及びMCM496)を増幅させた(表1)。MCM485順行プライマー及びMCM486逆行プライマーを使用して、発現ベクターを増幅させた。ベクターを増幅させるためのDNAテンプレートはpMCM1225である(表2)。ストレプトミセス(Streptomyces)のmvaS及びmvaRを増幅させるためのDNAテンプレートは、mvaS及びmvaRをコードしている合成オペロンを含有し、アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ(atoB)もコードしているStrepCL190(DNA2.0)である。Hisタグを付加したNphT7をコードしている合成遺伝子を含むpMCM1187テンプレートを使用して、NphT7をコードしている遺伝子を増幅する(Genbank BAJ10048)。

30

40

【0218】

【表1】

表1. pMCM1320及びpMCM1321の作成に使用したプライマー

| プライマー名 | 説明 | プライマー配列 |
|--------|----------------------------------|--|
| MCM485 | pMCM82 USER 2(for) | AGCTGG/IDEOXYU/ACCATA/ideoxyU/ GGGAAT/IDEOXYU/C(配列番号3) |
| MCM486 | pMCM82 USER 1(rev) | ATTTAA/ideoxyU/CGATACA/ideoxyU/ TAATA/ideoxyU/ATACCTC(配列番号4) |
| MCM489 | StrepCL190_mvaS USER 3 (for) | ATGAGCA/ideoxyU/TTCTA/ideoxyU/ CGGTA/ideoxyU/CCATGATCTT(配列番号5) |
| MCM490 | StrepCL190_mvaS USER 4 (rev) | AACGTGC/ideoxyU/TCATAGA/ideoxyU/ ACGT/ideoxyU/TATGGTCGTT(配列番号6) |
| MCM491 | StrepCL190_mvaR USER 1 (for) | ATAT/ideoxyU/AATGTA/ideoxyU/CGATT AAA/ideoxyU/AAGGAGGAATAAACCATGAC CGAAACTCATGCAATTGCTG(配列番号7) |
| MCM492 | StrepCL190_mvaR USER 3 (rev) | ATACCGA/ideoxyU/AGAAA/ideoxyU/GCT CA/ideoxyU/TGGTATATCCTCTAGTGCCT CTAGATTACGCACCAACTTCGCGGGTTTGTT ATCACGTT(配列番号8) |
| MCM495 | StrepCL190_nphT7 USER 4 (for) | AACG/ideoxyU/ATCTA/ideoxyU/GAAGCA CGT/ideoxyU/AAAGATCTCGCACTAGGAGG ATATAACCAATGACCGACGTGCGTTTCGGAT (配列番号9) |
| MCM496 | StrepCL190_nphT7 USER 2 (rev) | AATTCCCA/ideoxyU/ATGG/ideoxyU/ACC AGC/ideoxyU/GCAGTCACCATTCAATCAAC GCGAAGG(配列番号10) |

注意書き：/ideoxyU/は、プライマー中に存在するデオキシリジンヌクレオチドを意味する(Bitinaite Jet al., Curr. Protoc. Mol. Biol. 86:3.21.1~3.21.16, 2009)。

【0219】

【表2】

表2. pMCM1320及びpMCM1321の作成に使用したDNAテンプレート

| プラスミド名 | 説明 | 対象とする遺伝子 |
|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| pMCM1225 | pCL-Ptrc-Upper_E. gallinarum | ベクター |
| ストレプトミセス(Streptomyces) CL190 Upper | Strep CL190 Upper MVA pTrcHis2A | ストレプトミセス(Streptomyces) mvaS, mvaR |
| pMCM1187 | pET15b-NphT7(GeneOracle GcMM134) | ストレプトミセス(Streptomyces) nphT7 |

【0220】

製造元によるDNAポリメラーゼ(カタログ番号600410)用のプロトコルに従い、テンプレートを増幅させた。反応溶液には、緩衝液5μL、10μMプライマー各1μL、テンプレートプラスミド1μL(50~200μg/uL)、10mM dNTPs 1μL、ddH₂O 40μL、PfuCx 1μL(表3)を含有させた。続いて、反応液は次のようなサイクルで反応させた：95℃で2分×1サイクル、加熱及び冷却サイクル×30サイクル(95℃で30秒、55℃で30秒、72℃で5分30秒)、並びに72℃で10分×1サイクル。反応物を4℃で一晩置いた。

【0221】

10

20

30

40

【表3】

表3. ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）反応液

| 単位複製配列 | プライマー | テンプレート |
|--------|---------------|-----------------------------------|
| ベクター | MCM485/MCM486 | pMCM1225 |
| mvaS | MCM489/MCM490 | ストレプトミセス(Streptomyces)CL190 Upper |
| mvaR | MCM491/MCM492 | ストレプトミセス(Streptomyces)CL190 Upper |
| nphT7 | MCM495/MCM496 | pMCM1187 |

【0222】

P C Rにより増幅させた後、10 μLのP C R反応液を1 μLのU S E R E n z y m e (New England Biolabs # M5505S)及び1 μLのD p n I (Roche)と混合し、次に37℃で2時間インキュベートした。mvaR、mvaS、及びNphT7遺伝子を含む上流MVA経路をコードしている発現プラスミドを作成するために、2 μLの各試験反応物(USER reaction)と、Roche Rapid Ligationキット(11635379001)の8 μLのBuffer 1と、1 μLのリガーゼとによりライゲーション反応を行った。室温で1時間半能を行い、-20℃で一晩保管した。連結させたプラスミドを回収し、3 μLのライゲーション生成物を使用して、製造元の指示に従いケミカルコンピテントセルのTOP10 (Invitrogen # C404003)に形質移入させた。250 μLのLBで37℃で1時間回復させた後、形質転換体をLB/spec50プレートで37℃で一晩選別した。単一のコロニーを5 mL LB/spec50で培養し、-80℃で保管した。単離したコロニーからDNAを抽出し、mvaR、mvaS、及びNphT7を含む上流MVA経路をコードしているコンストラクトを首尾よく生成し、DNA塩基配列決定法により確認した(表4)。これらの株からプラスミドpMCM1320及びpMCM1321を単離した。

【0223】

【表4】

表4. 上流MVA経路をコードしているプラスミドを含む単離株

| 株 | プラスミド詳細 | プラスミド名 |
|---------|--|----------|
| MCM1320 | pCL-Ptrc-mvaR-mvaS-nphT7_StrepCL190_clone3-1 | pMCM1310 |
| MCM1321 | pCL-Ptrc-mvaR-mvaS-nphT7_StrepCL190_clone3-2 | pMCM1321 |

10

20

30

【0224】

実施例2：イソプレンシンターゼ及びイソプレンの生産に関するMVKをコードしているプラスミドの作成

- ラクタマーゼをコードしているb1a遺伝子を用い、イソプレンシンターゼ及びメバロン酸キナーゼ(MVK)発現プラスミドを生成した。簡潔に述べると、pUC19 DNA(Invitrogen)から、プライマーMCM694及びMCM695によりb1a遺伝子を増幅させた(表5)。cmRマーカー遺伝子を含まない発現プラスミドpDU65を、プライマーMCM696及びMCM697により増幅させた。GENEART(登録商標)Seamless Cloning and Assemblyキット(#A13288)を使用し、製造元のプロトコルに従い増幅産物を融合させ、続いて生成物によりケミカルコンピテントなMD09-314細胞を形質転換させた。融合させたプラスミドを、LB/carb50プレートで37℃で一晩選別した。単一のコロニーを採取し、5 mL LB/carb50で37℃で生育させた後、-80℃で保管した。

40

【0225】

【表5】

表5. pMCM1623作成用プライマー

| プライマー名 | 説明 | プライマー配列 |
|--------|----------------------|--|
| MCM694 | bla-pDu65-assembly 1 | CGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGCATGAGATTATCA AAAAGGATCTTCACC(配列番号11) |
| MCM695 | bla-pDu65-assembly 2 | GGGACAGCTGATAGAACAGAAGCCAAATATGTAT CCGCTCATGAGACAA(配列番号12) |
| MCM696 | bla-pDu65-assembly 3 | TTGTCTCATGAGCGGATACATATTGGCTTCTGTTT CTATCAGCTGTCCC(配列番号13) |
| MCM697 | bla-pDu65-assembly 4 | GGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGCTACTCAG GAGAGCGTTCACCG(配列番号14) |

10

【0226】

実施例3：チオラーゼ欠損型大腸菌（*E. coli*）株C M P 8 6 1の作成

アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ（a t o B）欠損株を作成した。簡潔に述べると、カナマイシンマーカーにより破壊されたa t o B遺伝子を含有しているDNA断片を、Keio collection（Baba et al. 2006. Mol. Syst. Biol. 2: 2006. 0008）の株J W 2 2 1 8をテンプレートとして用い、プライマー-a t o B r e c F（5' - G C A A T T C C C C T T C T A C G C T G G G - 3'（配列番号15））及びa t o B r e c R（5' - C T C G A C C T T C A C G T T G T T A C G C C - 3'（配列番号16））を使用して、PCRにより増幅させた。20 製造元からの取扱説明書に従ってポリメラーゼHerculease II Fusion（Agilent, Santa Clara, CA）を使用した。得られたPCR産物を、製造元（Gene Bridges, Heidelberg, Germany）の推奨するとおりに組み換え反応に使用し、C M P 4 5 1株の1 a t o B座に組み入れた。C M P 4 5 1は、C M P 2 5 8（米国特許出願第12/978, 324号を参照されたい）に2つ改変を加えたものである。簡潔に述べると、C M P 2 5 8においてクエン酸シンターゼ遺伝子（g l t A）の前にあるプロモーターをG I 1 . 2と置き換えた（米国特許第7, 371, 558号）。g l t A（W i l d e , R , and J . G u e s t . 1 9 8 6 . J . G e n . M i c r o b i o l . 1 3 2 : 3 2 3 9 ~ 3 2 5 1 ）に関しては2つの野生型プロモーターが報告されており、遠位プロモーターの-35領域の直後に合成プロモーターを挿入した。プライマー-U p g l t A C m - F（5' - T A T T T A A T T T T T A A T C A T C T A A T T T G A C A A T C A T T C A A C A A A G T T G T T A C A A T T A A C C C T C A C T A A A G G G C G G - 3'（配列番号17））及びD n g l t A 1 . x g i C m - R（5' - T C A A C A G C T G T A T C C C C G T T G A G G G T G A G T T T T G C T T T G T A T C A G C C A T A T A T T C C A C C A G C T A T T T G T T A G T G A A T A A A A G T G G T T G A A T T A T T T G C T C A G G A T G T G G C A T H G T C A A G G G C T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G C T C G - 3'（配列番号18））、並びにテンプレートとしてGene Bridges（Heidelberg, Germany）のF R T - g b 2 - C m - F R Tテンプレートを使用し、PCR産物を得た。PCR産物を精製し、redを用いる組み換えに製造元（Gene Bridges, Heidelberg, Germany）による記載のとおりに使用した。更なる評価にあたって、複数種のコロニーを選別した。プロモーター領域は、プライマー-g l t A P r o m S e q F: 5' - G G C A G T A T A G G C T G T T C A C A A A A T C - 3'（配列番号19）及びg l t A P r o m S e q R（5' - C T T G A C C C A G C G T G C C T T C A G C - 3'（配列番号20））と、テンプレートとしてコロニーから抽出したDNA（コロニーを30 μLのH2Oに再懸濁し、95度4分加熱し、スピンドウンしたもの。50 μLのPCR反応には、この溶液のうち2 μLをテンプレートとして使用する）とを使用しPCR増幅させた。得られたPCR産物の配列決定結果を観察した後、プロモーターG I 1 . 2（米国特許第7, 371, 558号）を保有しているコロニーを、更なる使用のため保存し、C M P 1 4 1と名づけた。C M 30 40 50

P 2 5 8 (米国特許出願第12/978, 324号を参照されたい)にM C M 5 2 1株(米国特許出願第12/978, 324号を参照されたい)のP 1可溶化液を形質導入し、M D 0 9 - 3 1 3株を構築し、20 μg / mLのカナマイシンを含有させたルリア・ベルターニ培地のプレートにてコロニーを選択した。Ausubel, et al.の「Current Protocols」(Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc)に記載の方法に従ってP 1可溶化液を調製した。製造元により推奨されるプロトコルを用い(Gene Bridges, Heidelberg, Germany)カナマイシンマーカーを除去し、M D 0 9 - 3 1 4株を作製した。株C M P 1 4 1からP 1可溶化液を作製し、株M D 0 9 - 3 1 4に形質導入してC M P 4 4 0を作成するのに使用した。製造元により推奨されるプロトコルを用い(Gene Bridges, Heidelberg, Germany)クロラムフェニコールマーカーを除去して株C M P 4 5 1を作製した。

10

【0227】

C M P 8 6 1株を作製するために、C M P 4 5 1には、a t o B : F R T - K a n - F R T P C R産物により遺伝子組み換えを行い、コロニーをL B + 20 μg / mLカナマイシンで選別した。単一のコロニーを採取し、この株をC M P 8 5 6と名づけた。続いて、プラスミドp C P 2 0を用い、F R T組み換え(D a t s e n k o and W a n n e r. 2 0 0 0. P N A S 9 7 : 6 6 4 0 ~ 5)により、C M P 8 5 6からカナマイシンマーカーを除去した。30 下、L A + 5 0 μg / mLカルベニシリンで形質転換体を選別した後、2つのコロニーをL Bプレートに再画線し、42でインキュベートした。これらのプレートからカナマイシン感受性のコロニーを選択し、C M P 8 6 1と名づけた。プライマーa t o B r e c R及びa t o B c h e c k F (5' - G C T T A T A T G C G T G C T A T C A G C G - 3' (配列番号21)を用い、変異を確認した。

20

【0228】

実施例4:アセトアセチルC o Aシンターゼ(N p h T 7)によるM V A生産のための経路をコードしている株の作成

記載のプラスミドを記載の親株に電気穿孔により導入し株M C M 1 3 3 1、M C M 1 6 8 1、M C M 1 6 8 4、M C M 1 6 8 5、及びM C M 1 6 8 6を作成した(表6)。凍結バイアルから掻きとった抗生物質を添加した5 mL L Bで、37で、250 r p mで振とうしながら親細胞を生育させた。細胞密度がO D 0.5 ~ 0.8に達した時点で、培養物を氷上に置いて冷却し、3 mLの培養物サンプルを氷冷再蒸留水で3回洗浄した後、氷冷再蒸留水200 μLに再懸濁した。エッペンドルフチューブ中で、100 μL細胞懸濁液サンプルを1~3 μL D N Aと混合した後、電気穿孔用2 mmキュベットに移し、25 u F D、2000 ohm、2.5 k Vで電気穿孔し、直ちに500 μL L Bでクエンチした。37で1時間振とうさせて細胞を回復させ、記載の抗生物質を添加したL Bプレートで37で形質転換体を選別した。単一のコロニーを5 mL L B + 抗生物質に採取し、37で生育させ、16.5%グリセロールにより-80で保管した。M C M 1 6 8 6株にはp C L 1 9 2 0の空のプラスミドを含有させたため、上流M V A経路は発現されず、D X P経路によるイソプレン生産に指向した。

30

【0229】

40

【表6】

表6. MVAを生産するための経路をコードしている遺伝子操作株

| 株 | 遺伝子型 | 親 | プラスミド | 抗生物質 |
|---------|--|-----------|-----------------|---------------|
| MCM1331 | atoB(Keio)+pCL-Ptrc-mvaR-mvaS-nphT7_StrepCL190_clone3-2 | Keio atoB | pMCM1321 | Spec50 |
| MCM1681 | HMB_gi1.2-gltA atoB::FRT pACYC-pTrcAlba-mMVK CARB | CMP861 | pMCM1623 | Carb50 |
| MCM1684 | HMB_gi1.2-gltA atoB::FRT pACYC-pTrcAlba-mMVK CARB+pCL-Ptrc-mvaR-mvaS-nphT7_StrepCL190_clone3-1 | MCM1681 | pMCM1320 | Carb50 spec50 |
| MCM1685 | HMB_gi1.2-gltA atoB::FRT pACYC-pTrcAlba-mMVK CARB+pCL-Ptrc-mvaR-mvaS-nphT7_StrepCL190_clone3-2 | MCM1681 | pMCM1321 | Carb50 spec50 |
| MCM1686 | HMB_gi1.2-gltA atoB::FRT pACYC-pTrcAlba-mMVK CARB+pCL1920 | MCM1681 | pCL1920 ベクター | Carb50 spec50 |

【0230】

実施例5：遺伝子操作株を用いるアセトアセチルCoAシンターゼ(NphT7)によるイソプレン生産

株MCM1684、MCM1685、及びMCM1686のイソプレンの比生産性を測定した。Carb50及びSpec50を含有させたLB培地でOD1.0付近で生育させた10uLの細胞培養サンプルを、1%グルコース、0.02%酵母エキス、並びにcarb50及びspec50を含有させたTM3細胞培養培地に播種し、34で一晩培養した。これらの培養物を用い、同様のTM3培地5mLにOD0.2で播種し、続いて250rpmで浸透しながら34で2時間45分生育させた。400uM IPTGにより培養物に発現誘導を行い、更に2時間15分生育させた。プロスを1:10希釈して細胞密度を測定した。2mLヘッドスペースバイアルでプロス100uLを34で30分インキュベートした後、70で12分熱殺菌した。ヘッドスペース中のイソプレン濃度をガスクロマトグラフ(Model G1562A, Agilent Technologies) (Mergen et al., LCGC North America, 28(7):540~543, 2010)を連結した水素炎イオン化検出器により測定した。イソプレン生産のデータ解析により、DXP経路に加えてNphT7によりイソプレンを生産する経路を含有しているMCM1684及びMCM1685が、それぞれ、DXP経路のみを含有させたMCM1686の生産速度と比較して、2.4倍及び2.5倍でイソプレンを生産することが実証される(表7及び図1)。

【0231】

【表7】

表7. イソプレン生産

| 株 | イソプレンの比生産性 (イソプレンμg/プロスL/OD/hr) |
|---------|------------------------------------|
| MCM1684 | 1286 |
| MCM1685 | 1381 |
| MCM1686 | 542 |

【0232】

以降の配列は各種コンストラクトを作成した際の配列である：

Strep CL190 Upper MVA pTrcHis2A

【0233】

10

20

30

40

【 0 2 3 4 】

(上配列表の続き)

(上配列表の続き)

```
【 0 2 3 6 】  
p M C M 1 1 8 7 - p E T 1 5 b - N p h T 7 ( G e n e O r a c l e   G c M M 1 3  
4 )
```

[0 2 3 7]

【 0 2 3 8 】

10

20

30

40

50

(上配列表の続き)

(上配列表の続き)

aaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttgtctgacagttaccatgttaatcagtgaggcacctatcagcgatctgtctatttcgttcatccatagtgcctgactccccgtctgttagataactacgatacgggagggttaccatctggcccccagtgtcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagttatcagcaataaaaccagccagccgaaaggccgagcgcagaagtgtccgtcaacttatccgcctccatccagttatattgtgcggagaagctagtagtaagttagtgcctgatgtttgcgcacgttgttgcattgtcaaggcattcgtgtcactcggtgtcacgtcgtctgtatggcttcattcagtcgtccgttcccaacgatcaaggcagttacatgateccccatgttgcaaaaaagcggttagctccctcggtcctccgatctgtcagaagtaagtggccgcagtgttatcactatggttatggcagcactgcataattctttactgtcatgcctccgttaagatgtttctgtactggtagtactcaaccaagtcatctgagaatagtgtatgcggcaccgcagggtctttggccggcgtcaacacggataatccgcgcacatagcagaactttaaaagtgtcatcatggaaaacgttctcgggcggaaaactctcaaggatctaccgtgttagatecagttcgtatgtaaacccactcgtgcaccaactgtatctcagcatttactttcaccagcgttctgtggtagcaaaaaacagggaaaggcaaaaatgcgcaaaaaagggaataaggcgcacacggaaatgtgaatactcatactttcattttcaatatttgtgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaaatgtttagaaaaataaacaatagggttccgcacattccccggaaagtgcacactgtcaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcagcggcccttcgttcaagaa
(配列番号2,3)

10

20

30

40

[0 2 4 0]

$p M C M 1 3 2 0$ and $p M C M 1 3 2 1 - p C L - P t r c - m v a R - m v a$
 $S - n p h T 7 - S t r e p C L 1 9 0$

【 0 2 4 1 】

【 0 2 4 2 】

(上配列表の続き)

(上配列表の続き)

10

【 0 2 4 4 】

実施例 6：遺伝子操作株を用いるアセトアセチル CoA シンターゼ (NphT7) によるイソブレノイド生産

(i) 材料

TM3 培地の組成 (発酵培地 1 L 当たり) :

K_2HPO_4 を 13.6 g、 KH_2PO_4 を 13.6 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ を 2 g、クエン酸一水和物を 2 g、クエン酸鉄アンモニウムを 0.3 g、 $(NH_4)_2SO_4$ を 3.2 g、酵母エキスを 0.2 g、1000 X 微量金属溶液を 1 mL。すべての成分を共に加え、 diH_2O に溶解させる。水酸化アンモニウム (30%) により pH を 6.8 に調整し、及び容量を調整する。次に、0.22 μm のフィルタを用い培地を濾過滅菌した。滅菌及び pH 調整後にグルコース 10.0 g 及び抗菌剤を添加する。

20

【 0 2 4 5 】

1000X微量金属溶液(発酵培地1Lあたり):

クエン酸^{*} H_2O を40g、 $MnSO_4$ ^{*} H_2O を30g、 $NaCl$ を10g、 FeS
 O_4 ^{*} $7H_2O$ を1g、 $CoCl_2$ ^{*} $6H_2O$ を1g、 $ZnSO_4$ ^{*} $7H_2O$ を1g、 $CuSO_4$ ^{*} $5H_2O$ を100mg、 H_3BO_3 を100mg、 $NaMoO_4$ ^{*} $2H_2O$ を
100mg。各成分を1成分ずつ $d_i H_2O$ に溶解する。pHを $HC1/NaOH$ で3.0に調整した後、溶液を用量に調整し、0.22μmフィルタでフィルタ滅菌する。

30

【 0 2 4 6 】

(j i) 實驗手順

ルリア・ベルターニプロス + 抗生物質で細胞を一晩生育させる。翌日、OD 600 が 0.5 になるよう細胞を 20 mL の TM 3 培地 (50 µg / mL のスペクチノマイシン及び 50 µg / mL のカルベニシリンを含有 (250 mL のバッフル付き三角フラスコ)) により希釈し、34 かつ 200 rpm でインキュベートする。接種前に、培養フラスコには 20% (v / v) ドデカン (Sigma - Aldrich) を積層し、これまでに記載のとおり、揮発性セスキテルペン産物を捕捉する (Newman et al., Biotechnol. Bioeng. 95: 684 ~ 691, 2006)。

[0 2 4 7]

2時間生育させた後、OD600を測定し、0.05~0.40mMのイソプロピル-d-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を加えた。発酵工程の間、規則的に試料を採取する。各時点でOD600を測定する。また、積層したドデカンを酢酸エチルに希釈し、有機層中のイソプレノイド濃度を分析する。ドデカン/酢酸エチル抽出物をこれまでに報告されているGC-MS法により解析する(Martin et al., Nat. Biotechnol. 2003, 21: 96~802)。濃度の判明しているイソプレノイドサンプルを注入し、イソプレノイドの標準曲線を作成した。このイソプレノイドの標準曲線を使用し、サンプルあたりのイソプレノイド量を算出した。

40

〔 0 2 4 8 〕

実施例 7：アセトアセチル CoA シンターゼ (NphT7) 活性を有するよう遺伝子操作されたサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) によるイソプレン生

50

産

s . c . E a s y C o m p 形質転換キット (I n v i t r o g e n) に記載のプロトコルを用い、上記のプラスミドにより親株を形質転換させ酵母株を作成する。プラスミドを含有している酵母株を、2%グルコースと指定の選択マーカーを添加した S C 最少培地で選択及び維持する。プラスミドを含有している単離コロニーを以降の実験に備え選別する。

【 0 2 4 9 】

遺伝子操作した酵母株からのイソブレンの比生産性を測定する。プラスミドのコードする遺伝子の発現を誘導するため、選択マーカーを添加した液体 S C 最少培地で培養物を一晩生育させた。次に培養物の O D ₆₀₀ が約 0.2 になるよう希釈し、2~3時間生育させる。100 μL プロスサンプルを 2 mL ヘッドスペースバイアルで 34~30 分インキュベートし、続いて 70~12 分熱殺菌する。ヘッドスペース中のイソブレン濃度を、例えば、ガスクロマトグラフ (Model G 1 5 6 2 A , Agilent Technologies) (Mergen et al . , L C G C N o r t h A m e r i c a , 2 8 (7) : 5 4 0 ~ 5 4 3 , 2 0 1 0) を連結した水素炎イオン化検出器により測定する。

【 0 2 5 0 】

実施例 8 : ストレプトコッカス・スイス (*Streptococcus suis*) に由来する上流 M V A 経路の酵素を大腸菌 (*E. coli*) において用いることによるアセトアセチル C o A シンターゼ (n p h T 7) によるイソブレン生産の向上

プラスミド p M C M 1 2 2 1 の作成

以降の設計を用い、上流 M V A 経路をコードしているプラスミドを G e n e O r a c l e (M o u n t a i n V i e w , C A) により作成した。アセチル C o A アセチルトランスフェラーゼ - R B S - 3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタルリル C o A シンターゼ - R B S - ヒドロキシメチルグルタルリル C o A レダクターゼをコードしている合成 D N A を作成し、次に、 N c o I 及び P s t I 部位間に存在するオペロンと置き換えて p M C M 8 2 (米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 1 5 9 5 5 7 号を参照されたい) にクローン化した。ベクターにより m v a E 用の R B S を提供した。プラスミドマップについては図 5 を参照されたい。

【 0 2 5 1 】

【 表 8 】

表 8. p M C M 1 2 2 1 の詳細

| プラスミド名 | 生物資源 | アセチル C o A アセチルトランスフェラーゼ | 3-ヒドロキシ - 3 - メチルグルタルリル C o A シンターゼ | ヒドロキシメチルグルタルリル C o A レダクターゼ | 由来及び 選択マーカー |
|---|--|--|---|--|-----------------------------------|
| pCL-Ptre- Upper_GcMM_159 (ストレプトコッカス・スイス (<i>Streptococcus suis</i>)) | ストレプトコッカス・スイス (<i>Streptococcus suis</i>) | gi 146321498 ref YP_001201209.1 Acetyl-CoA acetyltransferase [<i>Streptococcus suis</i> _98H4H33] | gi 146321499 ref YP_001201210.1 3-hydroxy-3- methylglutaryl-CoA synthase [<i>Streptococcus suis</i> _98H4H33] | gi 146321500 ref YP_001201211.1 hydroxymethylglutaryl- CoA_reductase [<i>Streptococcus suis</i> _98H4H33] | pSC101, スペクチノマイシン (50ug/mL) |

【 0 2 5 2 】

プラスミドコンストラクト p M C M 1 2 2 1 - p C L - P t r c - U p p e r _ G c M M _ 1 5 9 (ストレプトコッカス・スイス (*Streptococcus suis*)) の D N A 配列

【 0 2 5 3 】

10

20

30

40

10

【 0 2 5 4 】

(上配列表の続き)

(上配リストの続き)

gccaactacetcataatgttgcataacttcggcgatcaccgcgttccctatgtttaacttttttagggcgactgcctgtcgtaac
 atcggtgtgtccataacatcaacatcgacccacggcgtaacgcgttgcgtgtggatgcccaggcatagactgtacccaaaaaaa
 cagtcataacaaggcatgaaaacccgcactgcgcgttaccaccgcgtgcgttcggtaagggtctggaccagttgcgtgagcgcatacgct
 acttgcattacagcttaacaaccgaacaggctatgtccactgggttcgtgccttcacgcgttgcgttcacccggcaacccctgg
 gcagcagcgaagtcgaggcattctgtccctggcgaaacgcgcgcaagggttcggctccacgcgtcaggcattggcggccgtct
 gttttctacggcaagggtctgtcgcacggatctgccttcaggagatcggaaagactcggccgtcgccggcgcttgcgggtgtct
 accccggatgaagttgtcgatcctcggttctggaaaggcgagcatcgttgtcgccttcaggatgtatggaaacggcatgcggatcagt
 gagggttgcacttgcgggtcaaggatctgcgttcacggcactcgatgcggggaggcagggctcaaggatcggcctt
 gatgttacccggagacttgcacccgcgagcaggaaattaattccacgggttgcgtccgcggaaacgggtctgtgtgtt
 gctagttgttatcagaatcgagatccggcgttcagccggttgcggctgaaagcgcgttccagaattgcgttgcattttcccaagg
 gaggcgtcaactggcgttgcgttcatttcatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 aagtgtctcagggttcaatttcatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 ctgttcatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 ttcccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 ccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 aaaaatttgcctcaaaactggtagctgaattttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gttgtgttatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 agtcggcggcctcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 actcatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 accactcataatcctatagagtttttcaaaagacttaacatgttccagattatatttatgaaatggaaaactcaacgtat
 tcttcactaaaaactaatttcataattttcgcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 tccacagttctcgcatcgtctgggtgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gaacgataccgtccgttccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gtcatagcgactaatcgcttagttcatttcatttcatttcatttcatttcatttcatttcatttcatttcatttcatttcatttcatt
 gatggctagtcatagtataattacttagtcatttcatttcatttcatttcatttcatttcatttcatttcatttcatttcatttcatt
 gacccctgttaatccgttagccattttgtgttttttttattcaagtgttataatttataatttataatttataatttataatttata
 gaatagatcccagccctgtgtataactcactacttttagtcagttccgcgttattacaaaaggatgtcgcgttgcgttgcgt
 agacccctaaagcttaagttagcaccctcgttagccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 tcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 caaggaaactaccataatacaagaaaagccctgtcaccgggttctcaggcgttttatggcggtctgtctatgtgtctatctgactt
 tgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ggtatcatcaacaggctta (配列番号 25)

【0256】

実施例9：アセトアセチルCoAシンターゼ(Npht7)を含有しているプラスミドの調製

ストレプトコッカス・スイス(*Streptococcus suis*)に由来する上流MVA経路の3つの要素をプラスミドコンストラクトpMCM1221(pCL-Ptrc-Upper_GcMM_159)に含有させ、使用した。ストレプトミセス属(*Streptomyces* sp.)株CL190に由来し、プラスミドコンストラクトMCM1187内でnphT7によりコードされるアセトアセチルCoAシンターゼについてはこれまでに記載している(表2を参照されたい)。5' BglII rbs nphT7プライマー及び3' PstI nphT7プライマーを使用し、製造元の推奨するプロトコルに従い、PfuUltra II Fusion HS DNAポリメラーゼ(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)により、MCM1187テンプレートからnphT7遺伝子をPCR増幅させた。一般的な分子生物学的手法を用い、nphT7を含有しているPCR産物をアガロースゲル電気泳動(E-gel 0.8% (GP), Invitrogen)により確認し、次にPCR産物をQIAquick PCR精製キット(Qiagen, Germantown, MD)により洗浄し、PCR産物及びpMCM1221の精製アリコートをBglII及びPstI (Roche, Indiana polis, IN)により切断し、制限消化産物をQIAquickゲル抽出キット(Q

10

20

30

40

50

i a g e n , Germantown , M D) により洗浄し、得られた、清浄な B g l I I - P s t I 断片を New England Biolabs の T 4 DNA リガーゼにより連結した。次に、 Bio - Rad の 0.1 cm 電極間隔キュベット及び Bio - Rad ジーンバルサー・システム (Bio - Rad Laboratories , Hercules , CA) を利用し、ライゲーション産物を電気穿孔コンピテントセル Top 10 (Invitrogen , Carlsbad , CA) に形質移入させた。形質移入させた細胞を、 50 ug / mL スペクチノマイシン (Teknova , Hollister , CA) を含有させた LB 培地で選別した。推奨されるプロトコルに従い、 QIAprep Spin Miniprep キット (Qiagen , Germantown , MD) を使用し、スペクチノマイシン耐性コロニーにより得られた培養物からプラスミドを調製した。続いて、 n p h T 7 (現在、株 REM B 5_25 と命名されている) を含有するプラスミドコンストラクトを保有している陽性の Top 10 クローンを、 n p h T 7 top seq プライマー、 n p h T 7 bot seq プライマー、 p S E 3 8 0 3 (Sequtech in-house プライマー) 、 5' B g l I I r b s n p h T 7 プライマー、及び 3' P s t I n p h T 7 プライマーを使用し、 DNA 配列を解析 (Sequtech , Mountain View , CA) することにより確認した。 n p h T 7 を含有しているプラスミドコンストラクトを「 n p h T 7 with S suis H M G R S / p C L 」と名づけ、図 6 に例示する。

【 0 2 5 7 】

プラスミドコンストラクト n p h T 7 with S suis H M G R S / p C L の作成及び確認に使用したプライマー配列

5' B g l I I r b s n p h T 7 プライマー : 5' - G G G C a g a t c t c g c a c t a g g a g g a t a t a c c a a t g a c c g a c g t g c g c t t t c g g (配列番号 26)

3' P s t I n p h T 7 プライマー : 5' - T A T C C T G C A G t c a c c a t t c a a t c a a c g c g a a g g a a g c (配列番号 27)

n p h T 7 top seq プライマー : 5' - C G G C A C T G A A G G C T G C G G (配列番号 28)

n p h T 7 bottom seq プライマー : 5' - C C G C A G C C T T C A G T G C C G (配列番号 29)

(ハウスプライマーにおける配列) p S E 3 8 0 3 : 5' - G G C A T G G G G T C A G G T G G G (配列番号 30)

【 0 2 5 8 】

プラスミドコンストラクト n p h T 7 with S suis H M G R S / p C L の DNA 配列

【 0 2 5 9 】

10

20

30

57

(上配列表の続き)

【 0 2 6 1 】

(上配リストの続き)

aagtgggtcgcatcctcggtttctggaaggcgagcatgttgcgcagttctgtatggaacgggatcgaggatcagtggggttgc
 aactgcgggtcaaggatctggattcgatcaeggcacgatcatgtcgaggcaagggtccaaggatcgggcttgcgttacc
 agagcttgcaccagectgcgcagcagggaaataattccacgggtttgcgtccccgcaaaacgggtttgcgttgcgttagtt
 tcagaatcgagatccggttcagccgggttgcggctgaaagcgctatttccagaattgcctgatgtttccccacgggaggcgtact
 ggctccgttgcggcagttgattcgatcaagcagcatgcctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gtgtcaatttcatgtttagttgtttactggttcacctgtttaggttacatgctgttcatctgttacattgtcgttcatgttgc
 acagcttgaatgcaccaaaaactcgtaaaagctgtatctatcttttacaccgttcatctgtgcataggacagtttcccttgc
 taacggtaacagtgttactttgtttagtcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 agttagtctctgtgtggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 aaaactggtagcgtgaattttgcgttaaagcatcgtagtgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gtcaccattcattttatctgggttcaagtgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ctgcgttcatcaaccaccaattcatattgcgttaagtgtttaatctttacttattggttcaaaacccattggtaagcctttaactcatggtagt
 atttcaagcattaacatgaacttaattcatcaaggctaatcttatattgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ctcattagatatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 actaattctaatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 catcagctctcggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 cggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 atcgctagttcatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 aatgataattacttagtccatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 attccgttagaccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 agccctgttataactactacttagtcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ccctaaaggcttaagttagcaccctcgcaagctcgccaaatcgctgaatattccatttgcgttgcgttgc
 cgtgacattcagttcgctgcgtcaeggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 acccataatacaagaaaagccgtacggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tcctggccctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 caacaggctta - 3' (配列番号 31)

【 0 2 6 2 】

実施例 10：上流 M V A 経路株 R E M C 8 _ 2 5 、 R E M C 9 _ 2 5 、 及び R E M
 D 1 _ 2 5 、 並びに对照株 R E M D 2 _ 2 5 、 R E M D 3 _ 2 5 、 及び R E M D
 4 _ 2 5 の作成

M V A の生産量が高レベルで維持されていることが示された、 a t o B を欠失（内在性
 チオラーゼ活性を欠損）し、かつこれまでに記載した一連の変異を含有している宿主株 C
 M P 8 6 5 を使用して、本開示位に記載の試験及び对照株を作成した。 C M P 8 6 5 を作
 成するため、 C M P 6 4 6 (B L 2 1 p g l + P L . 2 m K K D y I G I 1 . 2
 g l t A M L a c k A - p t a l d h A a t t B : : C m を含有) の P 1 可溶
 化液を作製し、これを使用して株 C M P 8 5 6 に形質導入を行うことにより、株の染色体
 から下流メバロン酸経路（例えば、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼ、ジ
 ホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ、及びイソペンテニルジホスフェートイソメラーゼ

10

20

30

40

50

)を除去した。形質導入反応物をLB + クロラムフェニコール5 ug / mLに播種し、1つのコロニーを選択しCMP859と名づけた。CMP859にpCP20 (Datsenkko及びWanner. 2000年. PNAS 97: 6640~5)を電気穿孔することによりカナマイシン (atob座) 及びクロラムフェニコールマーカー (attB座)を同時に除去し、30にてカルベニシリソ50mg / L耐性コロニーを選別し、次に42にて2つの形質転換体を画線した。カナマイシン感受性、クロラムフェニコール感受性を選別し、CMP865 (BL21 PL. 2mKKDyI GI 1.2 g1t A ML atob attB)と名づけた。

【0263】

標準的な電気穿孔法プロトコルと、上記のBio-Radジーンパルサーキュベット及び電気穿孔システムを使用し、pMCM1221を株CMP865に導入し、50ug / mLスペクチノマイシン (Teknova, Hollister, CA)を含有させたLB培地で選別して、対照株REM D2_25、REM D3_25、D4_25を作製した。更なる解析に備え、得られたスペクチノマイシン耐性コロニーのうち3つを選択し、株REM D2_25、REM D3_25、及びREM D4_25と名づけた。プラスミドコンストラクトnpht7 with S suis HMGRS / pCLをCMP865宿主に導入したことを除き、対照株に関し記載したものと同一の手法により、上流MVAに限定した試験株REM C8_25、REM C9_25、及びREM D1_25を作成した。

【0264】

実施例11：上流MVAに限定した株REM C8_25、REM C9_25、及びREM D1_25、並びに対照株REM D2_25、REM D3_25、及びREM D4_25によるMVA生産

IPTGにより介在される上流MVA経路遺伝子の導入後、22時間の生産期間中に、MVAに限定した試験株REM C8_25、REM C9_25、及びREM D1_25、並びに対照株REM D2_25、REM D3_25、D4_25により生産されるMVA力価。簡潔に述べると、対照及び試験株を、34にて1%グルコース / 0.025%酵母エキス / TM3培地4mLで生育させ、200μM IPTGにより発現を誘導させ、誘導した時点を0時とした。細胞を含まない上清のMVAを測定した。MVA力価を顕著に示す、pMCM1221由来のMVA経路成分を発現している対照株を、試験株と比較した。3つの試験株中2つの試験株ではMVAの検出濃度は低かった。これらのatob (チオラーゼ)欠失株で顕著にMVAが検出されたことから、大腸菌 (E. coli) BL21宿主により、npht7の機能性を確認した。

【0265】

実施例12：完全なMVA経路を作製する、イソブレン生産株REM F7_25、REM F8_25、及びREM F9_25、並びにIspSのみを含有する対照株REM F3_25。

大腸菌 (E. coli) BL21株CMP861 (実施例3を参照されたい)を宿主株として使用した。宿主株CMP861は、大腸菌 (E. coli)の内在性DXP経路により得られるものと比べて多量にイソブレンを生産させるために、ストレプトミセス (Streptomyces sp.)株CL190に由来する遺伝子npht5、npht6、及びnpht7によりコードされる上流MVA経路の酵素を利用する上記のMCM1684及びMCM1685株を作製するために使用したものと同様のバックグラウンドをもつ。IPTG誘導性IspS (イソブレンシンターゼ)変異体及びカルベニシリソ耐性遺伝子を保有しているプラスミドコンストラクトpDW240 (pTrc P. alba IspS MEA-mmVK (Carb50))は、IPTG誘導性のIspS (イソブレンシンターゼ)対立遺伝子と、カルベニシリソ耐性遺伝子とをコードするものである。簡潔に述べると、標準的な電気穿孔プロトコルと、上記Bio-Radジーンパルサーキュベット及び電気穿孔システムとを使用し、プラスミドコンストラクトnpht7 with S suis HMGRS / pCLと、プラスミドコンストラクトpDW240を、株CMP861に導入

10

20

30

40

50

し、50 ug / mL スペクチノマイシン及び50 ug / mL カルベニシリン (Teknova, Hollister, CA) を含有させたLB培地で選別することで、完全なMVA経路をもつ、イソブレン生産試験株REM_F7_25、REM_F8_25、及びREM_F9_25を作成した。更なる解析に備え、得られたスペクチノマイシン及びカルベニシリン耐性コロニーのうち3つを選択し、株REM_F7_25、REM_F8_25、及びREM_F9_25と名づけた。同様にして、電気穿孔法により、pDW240プラスミドコンストラクトのみを株CMP861に導入し、50 ug / mL カルベニシリン (Teknova, Hollister, CA) のみを含有させたLB培地で選別することで、IspSのみの対照株を作成した。以降の実験の対照株としてカルベニシリン耐性コロニーを選別し、REM_F3_25と名づけた。IspSのみの対照株REM_F3_25によるイソブレン産生量は、評価する生育条件下において、大腸菌 (E. coli) が維持するDXP経路のIspS基質 (DMAPP) の内在濃度を反映する。

【0266】

実施例13：完全なMVA経路のみの試験株REM_F7_25、REM_F8_25、及びREM_F9_25、これまでに記載のMCM1684及びMCM1685 NphT7利用株、並びにIspSのみの対照株によるイソブレン生産

図7には、IPTGにより、関連する遺伝子発現を誘導した3.5時間後に、完全なMVA経路のみの試験株REM_F7_25、REM_F8_25、及びREM_F9_25（それぞれ図8において株NphT7_a~cとして記載する）、これまでに記載のMCM1684及びMCM1685 NphT7利用株、並びにIspSのみの対照株について測定された吸光度 (OD) 及びイソブレン濃度をもとに算出したイソブレンの比生産性 (ug / L OD hr) を示す。簡潔に述べると、対照及び試験株を、1%グルコース / 0.05%酵母エキス / TM3培地 20mL 中で34にて生育させ、200 uM IPTGにより発現誘導を行い、誘導を行った時点を0時とした。ほぼ上記のとおりにイソブレン及びOD測定を行い、イソブレンの比生産性を算出した。結果を図7に示す。IPTGによる発現誘導の5.5時間後に前述の各18mLの培養物から細胞ペレットを回収し、続いて、上流MVA経路及びIspS活性（下記を参照されたい）について解析した。これまでに観察されたとおり、ストレプトミセス種 (Streptomyces sp.) 株CL190由来の上流MVA経路の3つの成分のすべてを発現しているMCM1684及びMCM1685 NphT7利用株では、IspSのみの対照株と比較して、イソブレンの比生産性がわずかに高いことが裏付けられる。興味深いことに、本開示において新規に作製した試験株REM_F7_25、REM_F8_25、及びREM_F9_25は、これまでに特性の評価されているMCM1684及びMCM1685株と比較しておおよそ3倍も多量にイソブレンを生産した。このデータにより、NphT7が大腸菌 (E. coli) BL21宿主内で機能することが裏付られる。このデータにより、NphT7アセトアセチルCoAシンターゼとストレプトコッカス・スuis (Streptococcus suis) HMG-CoAシンターゼ及びHMG-CoAレダクターゼとをコードしているプラスミドコンストラクトS suis HMGRS/pCLは、株MCM1684及びMCM1685が発現するストレプトミセス種 (Streptomyces sp.) 株CL190の遺伝子から、もっぱら経路の (previously described) 3つの成分のみを有する株と比較して、より活性な上流MVA経路をもたらすことも示唆される。

【0267】

実施例14：アセトアセチルCoAシンターゼ (NphT7) 株の触媒活性の解析
材料：

アセチルCoA、マロニルCoA、NADPH、TRIS塩類、AEBSF、DNAase、リゾチーム、塩化ナトリウム、及び塩化マグネシウムはシグマから購入した。DMAPPは化学合成した。

【0268】

細胞の生育及び可溶化液の調製

1%グルコース、0.05%酵母エキス及び200 uM IPTGを含有させたTM3

10

20

30

40

50

培地で、細胞を 5 . 5 時間 34 にて生育させた。次に、E p p e n d o r f 5804 R 遠心機により、細胞を 4 にて 5000 RPM で 15 分遠心分離した。100 mM Tris、100 mM NaCl、0.5 mM AEBSF、1 mg / mL リゾチーム、0.1 mg / mL DNAase を含有している溶液 (pH 7.6) に、細胞ペレットを再懸濁した。フレンチプレスセルにより、細胞懸濁液を 96.5 MPa (14,000 psi) で可溶化した。次に、E p p e n d o r f 5804 R 遠心機により、可溶化液を 4 にて 15,000 RPM で 10 分遠心分離した。酵素活性アッセイに備え、上清を回収した。

【0269】

(A) アセトアセチルCoA シンターゼ (NphT7)、HMG-CoA シンターゼ、HMG-CoA レダクターゼ触媒活性を組み合わせたアッセイ

1 mM アセチルCoA、1 mM マロニルCoA、又はこれら両方、0.4 mM NADPH、100 mM Tris、100 mM NaCl、及び 20 μL 清澄化細胞可溶化液を用い、pH 7.6 で、細胞可溶化液のアセチルCoA 及びマロニルCoA 活性アッセイを実施した。アセチルCoA、マロニルCoA 又はこれら両方を加えて反応を開始した。SpectraMax Plus 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を使用し、96 ウェルプレートで、340 nm にて NADPH の酸化をモニターした。すべての反応は、最終用量 100 μL で 25 にて実施した。アセチルCoA、マロニルCoA、又はこれら両方を存在させた場合の反応速度から、アセチルCoA 又はマロニルCoA の非存在下で NADPH の酸化速度を減算した。

10

20

【0270】

(B) イソプレンシンターゼ触媒活性アッセイ

2 mL ガスタイルバイアル中で、25 μL 大腸菌 (E. coli) 可溶化液に、5 mM DMAPP、50 mM MgCl₂、及び 100 mM Tris / NaCl、(pH 7.6) を加え、最終用量 100 μL で、34 にて 15 分間インキュベートした。250 mM EDTA 100 μL を加え、反応を停止させた。GC-MS によりガラスバイアルを解析し、反応により生成されたイソプレン濃度を測定した。

30

【0271】

結果：

これらの試験により、細胞可溶化液と、アセチルCoA、マロニルCoA、又はアセチルCoA 及びマロニルCoA の両方の存在下で、NADPH の酸化を測定した。この結果により、アセトアセチルCoA シンターゼ (NphT7) 含有株における NADPH の酸化速度は、アセチルCoA 及びマロニルCoA の存在下で最も大きくなることが示される (図 8 を参照されたい)。アセトアセチルCoA シンターゼ (NphT7) を欠損している対照株における NADPH 酸化速度は、アセトアセチルCoA シンターゼ (NphT7) 含有株と比較して減少し、対照株の酸化速度は、アセチルCoA 又はマロニルCoA の存在に依存するものではなかった (図 8)。これらの結果は、アセトアセチルCoA シンターゼ (NphT7)、HMG-CoA シンターゼ、及び HMG-CoA レダクターゼ活性を複合させるには、マロニルCoA 及びアセチルCoA を存在させる必要があることと一致する。HMG-CoA シンターゼ触媒活性は、アセチルCoA の存在に依存することから、アセトアセチルCoA シンターゼ (NphT7) 活性にはマロニルCoA を存在させる必要があるものと結論付けることができる。これらの結果により、アセトアセチルCoA シンターゼ (NphT7) は、アセトアセチルCoA 生産時の基質として両方のマロニルCoA を利用することが明瞭に裏付けされる。イソプレンシンターゼ活性を解析して、イソプレン比生産性 (図 7 を参照されたい) における違いを確認したところ、イソプレンシンターゼ活性の差によるものではなかった (図 9)。

40

【0272】

実施例 15：アモルファジエン又はファルネセン生産株の構築

MCM521 可溶化液を使用し、下流メバロン酸経路を MCM1684 に形質導入させた。製造元に従いカナマイシンマーカーを除去する (Gene Bridges, Hei

50

de1berg, Germany)。MCM521の下流経路は、別の遺伝子を使用することにより各遺伝子の前に位置するrbsを改変し、オペロン上流のプロモーターを変更することで改変することができる。染色体上のプロモーター及び/又はrbsを変更させるとか、又はプラスミドから発現させるかのいずれかにより、ファルネシルニリン酸合成酵素(ispA)を過剰発現させる。多様なプラスミドpDW34(米国特許第2010/0196977号;図2を参照されたい)を用い、プラスミドpMCM1321を同時電気穿孔した。pDW34変異体のプラスミドは、大腸菌(E. coli)用にコドンを最適化させたファルネセンシンターゼ又は大腸菌(E. coli)用にコドンを最適化させたアモルファジエンシンターゼを、イソブレンシンターゼの代わりに含有する。LB+スペクチノマイシン50ug/mL+カルベニシリン50ug/mLでコロニーを選択する。

10

【0273】

実施例16:アセトアセチルCoAシンターゼを有するプラスミドを含む株におけるアモルファジエン又はファルネセンの生産

(i) 材料

TM3培地組成(発酵培地1L当たり):K2HPO4(13.6g)、KH2PO4(13.6g)、MgSO4*7H2O(2g)、クエン酸一水和物(2g)、クエン酸鉄アンモニウム(0.3g)、(NH4)2SO4(3.2g)、酵母エキス(0.2g)、1000X微量金属溶液(1mL)。すべての成分を共に加え、脱イオン水に溶解させる。水酸化アンモニウム(30%)によりpHを6.8に調整し、及び容量を調整する。次に、0.22μmのフィルタを用い培地を濾過滅菌した。滅菌及びpH調整後にグルコース10.0g及び抗菌剤を添加する。

20

【0274】

1000X微量金属溶液(発酵培地1L当たり):クエン酸*H2O(40g)、MnSO4*H2O(30g)、NaCl(10g)、FeSO4*7H2O(1g)、CoCl2*6H2O(1g)、ZnSO4*7H2O(1g)、CuSO4*5H2O(100mg)、H3BO3(100mg)、NaMoO4*2H2O(100mg)。各成分を1成分ずつ脱イオン水に溶解する。pHをHCl/NaOHで3.0に調整した後、溶液を用量に調整し、0.22μmフィルタでフィルタ滅菌する。

30

【0275】

(i) 実験手順

ルリア・ベルターニプロス+抗生素質で細胞を一晩生育させる。翌日、OD600が0.05になるよう細胞を20mLのTM3培地(50ug/mLのスペクチノマイシン及び50ug/mLのカルベニシリンを含有(250mLのバッフル付き三角フラスコ))により希釈し、34かつ200rpmでインキュベートする。接種前に、各培養フラスコには20%(v/v)ドデカン(Sigma-Aldrich)を積層し、これまでに記載のとおり、揮発性セスキテルペン産物を捕捉する(Newman et al., 2006)。

【0276】

2時間生育させた後、OD600を測定し、0.05~0.40mMのイソプロピル-d-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を加えた。発酵工程の間、規則的に試料を採取する。各時点でOD600を測定する。また、積層したドデカンを酢酸エチルに希釈し、有機層中のアモルファジエン又はファルネセン濃度を分析する。ドデカン/エチルアセテート抽出物を、従来記載されているとおりの(Martin et al., Nat. Biotechnol. 2003, 21: 96~802)GC-MS法により、アモルファジエンの分子イオン(204m/z)及び189m/zフラグメントイオン又はファルネセンの分子イオン(204m/z)の観察により解析する。濃度既知のアモルファジエン又はファルネセン試料を装填して、それぞれアモルファジエン又はファルネセンの標準曲線を生成する。試料中のアモルファジエン又はファルネセンの量は、それぞれアモルファジエン又はファルネセンの標準曲線を使用し算出する。

40

【0277】

50

(i i i) 結果

p M C M 1 3 2 1 を含有している株を、同様のバックグラウンドを持つもののアセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子は含まない株と比較したところ、アモルファジエン又はフルネセンの比生産性、収率、C P I 及び / 又は力価の上昇が観察された。

【0278】

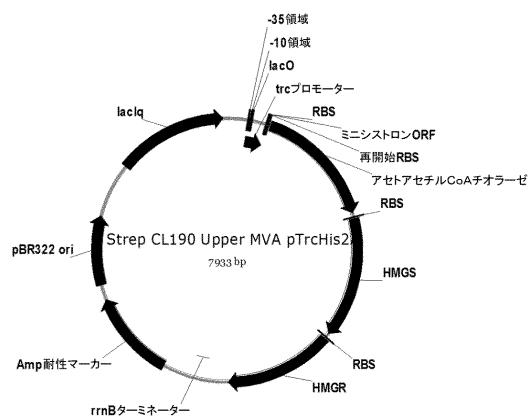
(i v) 引用文献 :

Newman, J. D., Marshall, J. L., Chang, M. C. Y., Nowroozi, F., Paradise, E. M., Pitera, D. J., Newman, K. L., Keasling, J. D., 2006. High-level production of amorphadiene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *E. coli*. *Biotechnol. Bieng.* 95: 684 ~ 691. 10

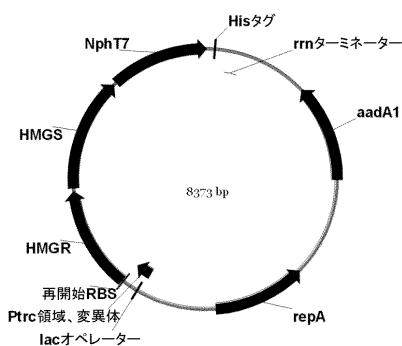
【0279】

Martin, V. J., Pitera, D. J., Withers, S. T., Newman, J. D., Keasling, J. D., 2003. Engineering a mevalonate pathway in *E. coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* 21: 796 ~ 802.

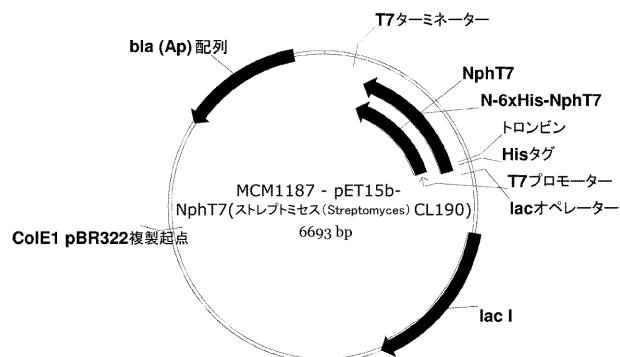
【図 1】



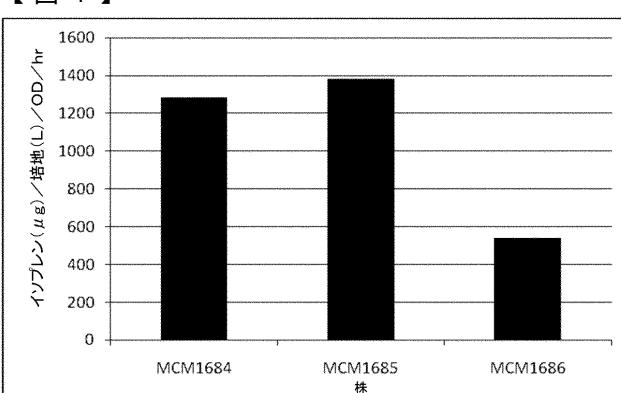
【図 3】



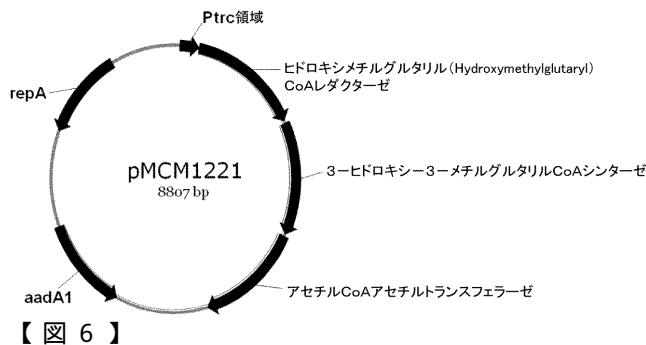
【図 2】



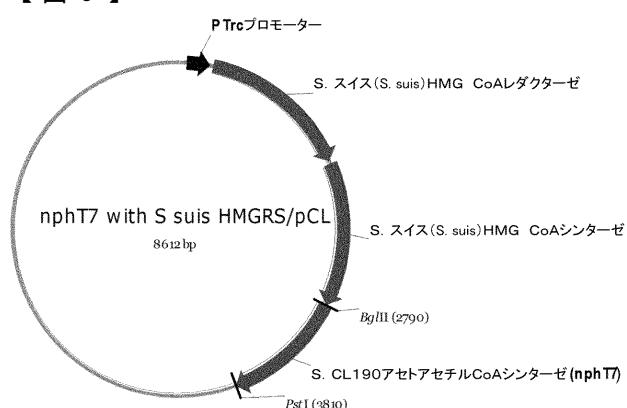
【図 4】



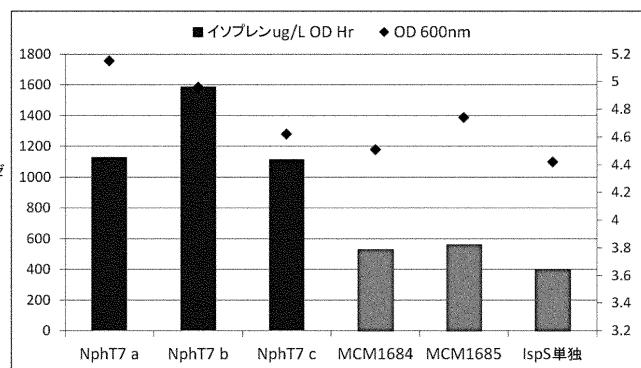
【図5】



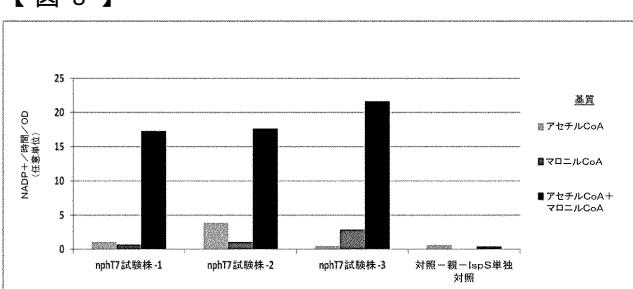
【図6】



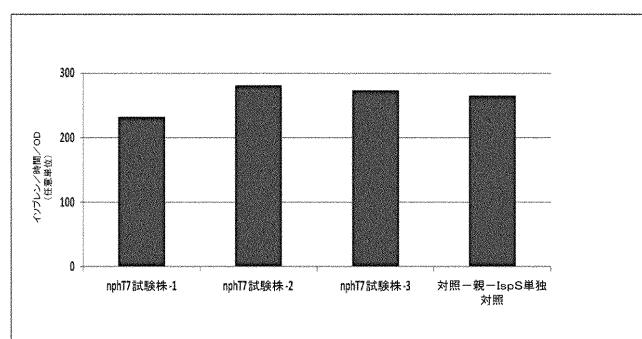
【図7】



【図8】



【図9】



【配列表】

2014528705000001.app

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | | | |
|--|---|--|------------------------------|-------------------|
| <table border="1" style="float: right; margin-right: 10px;"> <tr><td>International application No</td></tr> <tr><td>PCT/US2012/049659</td></tr> </table> | | | International application No | PCT/US2012/049659 |
| International application No | | | | |
| PCT/US2012/049659 | | | | |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C08F36/08 C12P5/00 C12N9/10 C12N9/00 ADD. | | | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C08F C12P C12N | | | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | |
| Y | WO 2011/079314 A2 (DANISCO US INC [US]; GOOD YEAR TIRE & RUBBER COMPANY [US]; BECK ZACHAR) 30 June 2011 (2011-06-30) paragraphs [0090] - [0100], [0190] - [0212]; claims 1-26; figure 1a, ----- -/- | 1-78 | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | | | |
| "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | | | |
| Date of the actual completion of the international search 5 December 2012 | | Date of mailing of the international search report 19/12/2012 | | |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Seroz, Thierry | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|------------------------------|
| International application No |
| PCT/US2012/049659 |

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | <p>OKAMURA EIJI ET AL: "Unprecedented acetoacetyl-coenzyme A synthesizing enzyme of the thiolase superfamily involved in the mevalonate pathway", June 2010 (2010-06), PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, VOL. 107, NR. 25, PAGE(S) 11265-11270, XP002688558, ISSN: 0027-8424</p> <p>page 11268, left-hand column, last paragraph - page 11268, right-hand column, line 4; figure 1</p> <p>Abstract;</p> <p>page 11269, left-hand column, paragraph 2</p> <p>-----</p> <p>US 2010/285549 A1 (MURAMATSU MASAYOSHI [JP] ET AL) 11 November 2010 (2010-11-11)</p> <p>claims 1-7; sequence 1</p> <p>-----</p> | 1-78 |
| Y | | 5 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2012/049659

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|---------------|------------------|
| WO 2011079314 | A2 30-06-2011 | AU 2010336342 | A1 05-07-2012 | |
| | | CA 2785480 | A1 30-06-2011 | |
| | | EP 2516654 | A2 31-10-2012 | |
| | | SG 181856 | A1 30-07-2012 | |
| | | US 2011159557 | A1 30-06-2011 | |
| | | WO 2011079314 | A2 30-06-2011 | |
| <hr/> | | | | |
| US 2010285549 | A1 11-11-2010 | JP 4760951 | B2 31-08-2011 | |
| | | JP 2010259388 | A 18-11-2010 | |
| | | US 2010285549 | A1 11-11-2010 | |
| <hr/> | | | | |

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 P 5/02 (2006.01) C 1 2 P 5/02

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN

(特許庁注:以下のものは登録商標)

1. テフロン

(74) 代理人 100138438
 弁理士 尾首 亘聰
 (74) 代理人 100138519
 弁理士 奥谷 雅子
 (74) 代理人 100123892
 弁理士 内藤 忠雄
 (74) 代理人 100169993
 弁理士 今井 千裕
 (74) 代理人 100131082
 弁理士 小原 正信
 (72) 発明者 アルドア、イラナ・エス
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
 (72) 発明者 ベック、ザッカリー・キュー
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
 (72) 発明者 ミラー、マイケル・シー
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
 (72) 発明者 ペレス、キャロライン・エム
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
 F ターム(参考) 4B024 AA03 BA80 CA01 CA20 DA05 DA06 DA07 DA08 DA09 DA10
 DA11 DA12 EA04 GA11 HA08
 4B064 AB04 CA02 CA04 CA05 CA06 CA08 CA19 CC24 DA16
 4B065 AA01X AA15X AA19X AA20X AA24X AA26X AA30X AA41X AA50X AA57X
 AA58X AA72X AA73X AA77X AA79X AA80X AA83X AB01 AC14 BA02
 CA03 CA60