(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年8月16日(16.08.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/147446 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 9/90* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 5/02* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2018/004729

(22) 国際出願日： 2018年2月9日(09.02.2018)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2017-023633 2017年2月10日(10.02.2017) JP

(71) 出願人: 味の素株式会社 (**AJINOMOTO CO., INC.**) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目１５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 西尾 陽介(**NISHIO, Yosuke**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 西山 恵(**NISHIYAMA, Megumi**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 葛山 智久(**KUZUYAMA, Tomohisa**); 〒1138657 東京都文京区弥生１－１－１ 東京大学 生物生産工学研究センター内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人酒井国際特許事務所 (**SAKAI INTERNATIONAL PATENT OFFICE**); 〒1000013 東京都千代田区霞が関３丁目８番１号 虎の門三井ビルディング Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

WO 2018/147446 A1

(54) **Title:** PRODUCTION METHOD FOR ISOPRENOID COMPOUND

(54) 発明の名称： イソプレノイド化合物の製造方法

(57) **Abstract:** The present invention provides a production method for an isoprenoid compound. The method includes generating an isoprenoid compound by culturing, in a culture medium, a microbe that expresses: a protein having the full-length amino-acid sequence of SEQ ID NO: 13; a protein having the full-length amino-acid sequence of SEQ ID NO: 14; and a protein having a sequence similar to or homologous to the foregoing and having an isopentenyl diphosphate isomerase activity.

(57) 要約：本発明は、配列番号１３の全長アミノ酸配列を含むタンパク質、配列番号１４の全長アミノ酸配列を含むタンパク質、及びこれらと類似又は相同の配列を含みかつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質を発現する細菌を培養培地中で培養してイソプレノイド化合物を生成することを含む、イソプレノイド化合物の製造方法を提供する。

明　細　書

発明の名称 ： イソプレノイド化合物の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、イソプレノイド化合物の製造方法などに関する。

背景技術

[0002] イソペンテニル二リン酸イソメラーゼ（イソペンテニル二リン酸デルタイソメラーゼ：ＥＣ：５．３．３．２）は、ジメチルアリル二リン酸（ＤＭＡＰＰ）とイソペンテニル二リン酸（ＩＰＰ）の間の異性化反応を触媒する酵素である。非特許文献１と２にはそれぞれ、放線菌であるストレプトマイセス・ｓｐ．ＣＬ１９０、およびストレプトマイセス・グリセロスポレウス（Ｋｉｔａｓａｔｏｓｐｏｒａ ｇｒｉｓｅｏｌａ）ＭＦ７３０－Ｎ６株がイソペンテニル二リン酸イソメラーゼを有することが記載されている。

[0003] 非特許文献３には、大腸菌においてイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ遺伝子を含むストレプトマイセス属細菌由来のメバロン酸経路遺伝子クラスターを発現させることにより、リコピンやアスタキサンチンの産生量が増大し得ることが記載されている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Ｋａｎｅｄａ Ｋ，Ｋｕｚｕｙａｍａ Ｔ，Ｔａｋａｇｉ Ｍ，Ｈａｙａｋａｗａ Ｙ，Ｓｅｔｏ Ｈ．，Ａｎ ｕｎｕｓｕａｌ ｉｓｏｐｅｎｔｅｎｙｌ ｄｉｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｉｓｏｍｅｒａｓｅ ｆｏｕｎｄ ｉｎ ｔｈｅ ｍｅｖａｌｏｎａｔｅ ｐａｔｈｗａｙ ｇｅｎｅ ｃｌｕｓｔｅｒ ｆｒｏｍ Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．ｓｔｒａｉｎ ＣＬ１９０．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２００１ Ｊａｎ ３０；９８（３）：９３２－７

非特許文献2：Ｈａｍａｎｏ Ｙ，Ｄａｉｒｉ Ｔ，Ｙａｍａｍｏｔｏ Ｍ，Ｋａｗａｓａｋｉ Ｔ，Ｋａｎｅｄａ Ｋ，Ｋｕｚｕｙａｍａ Ｔ，Ｉｔｏ

h N, Seto H. Cloning of a gene cluster encoding enzymes responsible for the mevalonate pathway from a terpenoid-antibiotic-producing Streptomyces strain. Biosci Biotechnol Biochem. 2001 Jul;65(7):1627-35.

非特許文献3：Harada H, Yu F, Okamoto S, Kuzuyama T, Utsumi R, Misawa N., Efficient synthesis of functional isoprenoids from acetoacetate through metabolic pathway-engineered Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol. 2009 Jan;81(5):915-25

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかし、従来知られている放線菌由来イソペンテニルニリン酸イソメラーゼを異種発現させても、イソプレノイド化合物を十分に効率的に産生することができなかった。本発明は、イソプレノイド化合物の効率的な製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

〔1〕以下の（Ａ－１）～（Ｂ－３）からなる群より選ばれるタンパク質を発現する細菌を培養培地中で培養してイソプレノイド化合物を生成することを含む、イソプレノイド化合物の製造方法。

（Ａ－１）配列番号１３の全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

（Ａ－２）配列番号１３の全長アミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニルニリン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質；

（Ａ－３）配列番号１３の全長アミノ酸配列において１個または数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加または挿入されているアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質；

（Ｂ－１）配列番号１４の全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

（Ｂ－２）配列番号１４の全長アミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質；

（Ｂ－３）配列番号１４の全長アミノ酸配列において１個または数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加または挿入されているアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質。

〔２〕前記タンパク質が放線菌に由来する、〔１〕に記載の方法。

〔３〕前記細菌は、前記タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む異種発現単位を含む、〔１〕または〔２〕に記載の方法。

〔４〕前記ポリヌクレオチドは、以下の（ａ－１）～（ｃ）からなる群より選ばれる１または２以上のポリヌクレオチドである、〔３〕に記載の方法。

（ａ－１）配列番号９の全長塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（ａ－２）配列番号９の全長塩基配列と９０％以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ａ－３）配列番号９の全長塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｂ－１）配列番号１０の全長塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（ｂ－２）配列番号１０の全長塩基配列と９０％以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｂ－３）配列番号１０の全長塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｃ）（ａ－１）～（ｂ－３）からなる群より選ばれるポリヌクレオチドの縮重変異体。

〔５〕前記細菌が、メチルエリスリトールリン酸経路および／またはメバロン酸経路によるイソペンテニル二リン酸またはジメチルアリル二リン酸の合成能を有する、〔１〕～〔４〕のいずれか１項に記載の方法。

〔６〕前記細菌は、イソプレノイド化合物合成活性を有するタンパク質をさらに発現する細菌である、〔１〕～〔５〕のいずれか１項に記載の方法。

〔７〕前記細菌は、腸内細菌科に属する細菌である、〔１〕～〔６〕のいずれか１項に記載の方法。

〔８〕前記細菌は、エシェリヒア属またはパントエア属に属する細菌である、〔７〕に記載の方法。

〔９〕前記細菌がエシェリヒア・コリまたはパントエア・アナナティスである、〔７〕または〔８〕に記載の方法。

〔１０〕以下の（Ａ－１）～（Ｂ－３）からなる群より選ばれるタンパク質：

（Ａ－１）配列番号１３の全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

（Ａ－２）配列番号１３の全長アミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質；

（Ａ－３）配列番号１３の全長アミノ酸配列において１個または数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加または挿入されているアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質；

（Ｂ－１）配列番号１４の全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

（Ｂ－２）配列番号１４の全長アミノ酸配列と９０％以上の同一性を有する

アミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質；

（Ｂ－３）配列番号１４の全長アミノ酸配列において１個または数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加または挿入されているアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質。

〔１１〕放線菌に由来する、〔１０〕に記載のタンパク質。

〔１２〕以下の（ａ－１）～（ｃ）からなる群より選ばれるポリヌクレオチド：

（ａ－１）配列番号９の全長塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（ａ－２）配列番号９の全長塩基配列と９０％以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ａ－３）配列番号９の全長塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｂ－１）配列番号１０の全長塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（ｂ－２）配列番号１０の全長塩基配列と９０％以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｂ－３）配列番号１０の全長塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｃ）（ａ－１）～（ｂ－３）からなる群より選ばれるポリヌクレオチドの縮重変異体。

〔１３〕〔１０〕または〔１１〕に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド、または〔１２〕に記載のポリヌクレオチド、およびそれに作動可

能に連結された異種プロモーターを含む、発現ベクター。

〔１４〕〔１３〕に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

〔１５〕〔１４〕に記載の宿主細胞を用いて前記タンパク質を産生することを含む、タンパク質の製造方法。

〔１６〕〔１０〕または〔１１〕に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む異種発現単位を含む、細菌。

〔１７〕前記細菌は、腸内細菌科に属する細菌である、〔１６〕に記載の細菌。

〔１８〕エシェリヒア属またはパントエア属に属する細菌である、〔１６〕または〔１７〕に記載の細菌。

〔１９〕エシェリヒア・コリまたはパントエア・アナナティスである、〔１６〕～〔１８〕のいずれか１項に記載の細菌。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、優れたイソプレノイド化合物生産系を確立することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図１は、ｃｓ７９ｌＤｌとｇｆｇｋ８５８ｌＤｌのアライメントと一致度を示す図である。

[図2]図２は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによるｅｃｌＤｌとｃｓ７９ｌＤｌとｆｇｋ８５８ｌＤｌの分子質量の解析結果を示す図である。図中、Ｍはｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｗｅｉｇｈｔ ｍａｒｋｅｒを、１はｅｃｌＤｌの結果を、２はｃｓ７９ｌＤｌの結果を、３はｆｇｋ８５８ｌＤｌの結果をそれぞれ示す。

[図3]図３は、反応開始前（左図）および酵素添加後（右図）の^{1}Ｈ－ＮＭＲチャートを示す図である。図中、横軸は化学シフト値（ｐｐｍ）、ピーク上部の数値はピーク面積の相対値を表す。

[図4]図４は、各酵素のＩＰＰおよびＤＭＡＰＰの異性化反応におけるストイキオメトリーを示すグラフである。左側のグラフはＩＰＰを、右側のグラフ

はＤＭＡＰＰを、それぞれ開始基質とした各酵素の異性化反応を示す。

発明を実施するための形態

[0009] 本発明は、イソプレノイド化合物の製造方法を提供する。本発明の方法は、イソペンテニル二リン酸イソメラーゼを発現する微生物を培養培地中で培養してイソプレノイド化合物を生成することを含む。

[0010] イソプレノイド化合物は、分子式（C_5H_8）$_n$を有する１以上のイソプレン単位からなる。イソプレン単位の前駆体は、イソペンテニルピロリン酸、またはジメチルアリルピロリン酸である。３０，０００種のイソプレノイド化合物が同定されており、新たな化合物が同定されている。イソプレノイド化合物は、「テルペン」または「テルペノイド」とも呼ばれる。テルペンとテルペノイドとの相違は、テルペンが炭化水素であるのに対し、テルペノイドはさらなる官能基を含む点にある。テルペンは、分子中のイソプレン単位数により分類される〔例えば、ヘミテルペン（Ｃ５）、モノテルペン（Ｃ１０）、セスキテルペン（Ｃ１５）、ジテルペン（Ｃ２０）、セステルテルペン（Ｃ２５）、トリテルペン（Ｃ３０）、セスカルテルペン（Ｃ３５）、テトラテルペン（Ｃ４０）、ポリテルペン、ノルイソプレノイド〕。モノテルペンとしては、例えば、ピネン、ネロール、シトラール、カンファー、メントール、リモネン、およびリナロールが挙げられる。セスキテルペンとしては、例えば、ネロリドール、およびファルネソールが挙げられる。ジテルペンとしては、例えば、フィトール、およびビタミンＡ１が挙げられる。スクアレンはトリテルペンの例であり、カロテン（プロビタミンＡ１）はテトラテルペンである（Ｎａｔｕｒｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２，６７４～６８１（２００６）；Ｎａｔｕｒｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ５，２８３～２９１（２００９）；Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ３，９３７～９４７（２００５）；Ａｄｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｅｎｇ Ｂｉｏｔｅｃｈｍｏｌ（ＤＯＩ：１０．１００７／１０＿２０１４＿２８８）。不規則なイソプレノイドおよびポリテルペンが報告されており、これらもイソプレノイド化合物に含まれる。「イソプレノイ

ド」、「イソプレノイド化合物」、「テルペン」、「テルペン化合物」、「テルペノイド」、および「テルペノイド化合物」という表現は、本明細書で互換的に使用される。

[0011] イソペンテニル二リン酸イソメラーゼ（イソペンテニル二リン酸デルタイソメラーゼ：ＥＣ:５．３．３．２）は、ジメチルアリル二リン酸（ＤＭＡＰＰ）とイソペンテニル二リン酸（ＩＰＰ）の間の異性化反応を触媒する酵素である。本発明者らは、後述のタンパク質が、既報のイソペンテニル二リン酸イソメラーゼに比し、異性化活性が高いことを見出した。

[0012] ＜イソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質＞

一実施形態では、本発明のタンパク質は、以下である：

（Ａ－１）配列番号１３の全長アミノ酸配列を含むタンパク質；および

（Ｂ－１）配列番号１４の全長アミノ酸配列を含むタンパク質。

[0013] 配列番号１３は、放線菌Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．ＦＧＫ８５８由来のイソペンテニル二リン酸イソメラーゼＦＧＫ８５８ＩＤＩのアミノ酸配列である。配列番号１４は、放線菌Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．ＣＳ７９由来のイソペンテニル二リン酸イソメラーゼＣＳ７９ＩＤＩのアミノ酸配列である。ＥＭＢＯＳＳ Ｓｔｒｅｔｃｈｅｒ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｐｓａ／ｅｍｂｏｓｓ＿ｓｔｒｅｔｃｈｅｒ／ｈｅｌｐ／ｉｎｄｅｘ－ｐｒｏｔｅｉｎ．ｈｔｍｌ）を使用して得られる両者の同一性は７５．８％、相同性は８３．７％であり（図１、実施例３および表７参照）、両者は多くの共通の配列部分を有している。

[0014] 別の実施形態では、本発明のタンパク質は、（Ａ－１）または（Ｂ－１）のタンパク質の相同タンパク質である。このような相同タンパク質としては、例えば、以下が挙げられる：

（Ａ－２）配列番号１３の全長アミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質；および

（Ｂ－２）配列番号１４の全長アミノ酸配列と９０％以上の同一性を有する

アミノ酸配列を含み、かつイソペンテニルニリン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質。

[0015] アミノ酸配列との同一性%は、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％以上であってもよい。

[0016] 上述したアミノ酸配列および後述する塩基配列の相同性（即ち、同一性または類似性）は、例えばＫａｒｌｉｎおよびＡｌｔｓｃｈｕｌによるアルゴリズムＢＬＡＳＴ（Ｐｒｏ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０，５８７３（１９９３））、ＰｅａｒｓｏｎによるＦＡＳＴＡ（ＭｅｔｈｏｄｓＥｎｚｙｍｏｌ．，１８３，６３（１９９０））を用いて決定することができる。このアルゴリズムＢＬＡＳＴに基づいて、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮとよばれるプログラムが開発されているので（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ参照）、これらのプログラムをデフォルト設定で用いて、相同性を計算してもよい。また、相同性としては、例えば、Ｌｉｐｍａｎ－Ｐｅａｒｓｏｎ法を採用している株式会社ゼネティックスのソフトウェアＧＥＮＥＴＹＸ　Ｖｅｒ７．０．９を使用し、ＯＲＦにコードされるポリペプチド部分全長を用いて、Ｕｎｉｔ　Ｓｉｚｅ　ｔｏ　Ｃｏｍｐａｒｅ＝２の設定でＳｉｍｉｌａｒｉｔｙをｐｅｒｃｅｎｔａｇｅ計算させた際の数値を用いてもよい。あるいは、相同性は、ＮＥＥＤＬＥプログラム（Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　１９７０；４８：４４３－４５３）検索において、デフォルト設定のパラメータ（Ｇａｐ　ｐｅｎａｌｔｙ＝１０、Ｅｘｔｅｎｄ　ｐｅｎａｌｔｙ＝０．５、Ｍａｔｒｉｘ＝ＥＢＬＯＳＵＭ６２）を用いて得られた値（Ｉｄｅｎｔｉｔｙ）であってもよい。相同性として、これらの計算で導き出される値のうち、最も低い値を採用してもよい。

[0017] さらに別の実施形態では、本発明のタンパク質は、（Ａ－１）または（Ｂ－１）のタンパク質の改変タンパク質である。このような改変タンパク質としては、例えば、以下が挙げられる：

（Ａ－３）配列番号１３の全長アミノ酸配列において１個または数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加または挿入されているアミノ酸配列を含み、か

つイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質；および

（Ｂ－３）配列番号１４の全長アミノ酸配列において１個または数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加または挿入されているアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質。

[0018] 上記タンパク質では、アミノ酸残基の欠失、置換、付加および挿入からなる群より選ばれる１、２、３または４種の変異により、１個または数個のアミノ酸残基が改変され得る。アミノ酸残基の変異は、アミノ酸配列中の１つの領域に導入されてもよいが、複数の異なる領域に導入されてもよい。用語「１個または数個」は、タンパク質の活性を大きく損なわない個数を示す。用語「１個または数個」が示す数は、例えば、１～１００個、好ましくは１～８０個、より好ましくは１～５０個、１～３０個、１～２０個、１～１０個または１～５個（例、１個、２個、３個、４個、または５個）である。

[0019] 本明細書中で用いられる場合、用語「イソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性」とは、イソペンテニル二リン酸（ＩＰＰ）とジメチルアリル二リン酸（ＤＭＡＰＰ）を相互に異性化する酵素活性をいう。本発明のタンパク質イソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性は、（Ａ－１）または（Ｂ－１）のタンパク質のイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性の５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上または９５％以上の活性を有することが好ましい。一方、同一反応液〔例、５０ｍＭ　イミダゾール（ｐＨ７．５）、５ｍＭ　$MgCl_2$、６．７ｍＭ　ＩＰＰ、および１．０ｍｇ／ｍｌ酵素〕でＩＰＰとＤＭＡＰＰの濃度が１：１になる時の反応時間が、上記（Ａ－１）または（Ｂ－１）のタンパク質の場合の反応時間に対し約１．１倍以下、約１．２倍以下、約１．３倍以下、約１．４倍以下、約１．５倍以下、約１．６倍以下、約１．７倍以下、約１．８倍以下、約１．９倍以下、約２．０倍以下、約２．１倍以下、約２．２倍以下、約２．３倍以下、約２．４倍以下、または約２．５倍以下であってもよい。あるいは、同一反応液〔例、５０ｍＭ　イミダゾール（ｐＨ７．５）、５ｍＭ　$MgCl_2$、６．７ｍＭ　ＤＭＡＰＰ、および１．０ｍｇ／ｍｌ酵素〕でＩＰＰとＤＭＡＰ

Ｐの濃度が平衡状態に達する時の反応時間が、上記（Ａ－１）または（Ｂ－１）のタンパク質の場合の反応時間に対し、特に限定されないが、約１．１倍以下、約１．２倍以下、約１．３倍以下、約１．４倍以下、約１．５倍以下であってもよい。

[0020] 本発明のタンパク質は、目的活性を保持し得る限り、触媒ドメイン中の部位、および触媒ドメイン以外の部位に、変異が導入されていてもよい。目的活性を保持し得る、変異が導入されてもよいアミノ酸残基の位置は、当業者に明らかである。具体的には、当業者は、１）同種の活性を有する複数のタンパク質のアミノ酸配列（例、配列番号１３または１４のアミノ酸配列、および他のイソペンテニル二リン酸イソメラーゼのアミノ酸配列）を比較し、２）相対的に保存されている領域、および相対的に保存されていない領域を明らかにし、次いで、３）相対的に保存されている領域および相対的に保存されていない領域から、それぞれ、機能に重要な役割を果たし得る領域および機能に重要な役割を果たし得ない領域を予測できるので、構造・機能の相関性を認識できる。したがって、当業者は、イソペンテニル二リン酸イソメラーゼのアミノ酸配列において変異が導入されてもよいアミノ酸残基の位置を特定できる。

[0021] アミノ酸残基が置換により変異される場合、アミノ酸残基の置換は、保存的置換であってもよい。本明細書中で用いられる場合、用語「保存的置換」とは、所定のアミノ酸残基を、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換することをいう。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で周知である。例えば、このようなファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β位分岐側鎖を有するアミノ酸（例、スレオニン、バ

リン、イソロイシン）、芳香族側鎖を有するアミノ酸（例、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）、ヒドロキシル基（例、アルコール性、フェノール性）含有側鎖を有するアミノ酸（例、セリン、スレオニン、チロシン）、および硫黄含有側鎖を有するアミノ酸（例、システイン、メチオニン）が挙げられる。好ましくは、アミノ酸の保存的置換は、アスパラギン酸とグルタミン酸との間での置換、アルギニンとリジンとヒスチジンとの間での置換、トリプトファンとフェニルアラニンとの間での置換、フェニルアラニンとバリンとの間での置換、ロイシンとイソロイシンとアラニンとの間での置換、およびグリシンとアラニンとの間での置換であってもよい。

[0022] 本発明のタンパク質はまた、異種部分とペプチド結合を介して連結された融合タンパク質であってもよい。このような異種部分としては、例えば、目的タンパク質の精製を容易にするペプチド成分（例、ヒスチジンタグ、Ｓｔｒｅｐ－ｔａｇ　ＩＩ等のタグ部分；グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質等の目的タンパク質の精製に利用されるタンパク質）、目的タンパク質の可溶性を向上させるペプチド成分（例、Ｎｕｓ－ｔａｇ）、シャペロンとして働くペプチド成分（例、トリガーファクター）、他の機能を有するペプチド成分（例、全長タンパク質またはその一部）、ならびにリンカーが挙げられる。

[0023] 本発明のタンパク質はまた、本発明のタンパク質の産生が所望される宿主細胞の種類に応じて、翻訳後修飾（例、グリコシル化）タンパク質、または翻訳後非修飾（例、非グリコシル化）タンパク質であってもよい。本発明のタンパク質は、真核生物であるギンコウバイに由来するので、天然では翻訳後修飾（例、グリコシル化）される可能性があると考えられる。原核生物では、タンパク質が翻訳後修飾されないこと、ならびに動物細胞、植物細胞、昆虫細胞（例、Ｓｆ９細胞）、および下等真核生物（例、酵母）では、タンパク質の翻訳後修飾が大きく異なることが一般に知られている〔例、Ｂｒｅｔｔｈａｕｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏ

ｃｈｅｍ．（１９９９），３０（１９），３－２００を参照〕。したがって、天然で植物細胞に由来するタンパク質を、このような異種宿主細胞で産生させた場合、天然では生じ得ない、翻訳後非修飾タンパク質、または異なる翻訳後修飾を有するタンパク質を入手し得ると考えられる。

[0024] 上述したような本発明のタンパク質としては、例えば、放線菌に由来するタンパク質、天然に生じるそのホモログ、または人為的に作出された変異タンパク質が挙げられる。変異タンパク質は、例えば、目的タンパク質をコードするＤＮＡに変異を導入し、得られた変異ＤＮＡを用いて変異タンパク質を産生させることにより、得ることができる。変異導入法としては、例えば、部位特異的変異導入、ならびに無作為変異導入処理（例、変異剤による処理、および紫外線照射）が挙げられる。

[0025] 本明細書において放線菌としては例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ属、Ｋｉｔａｓａｔｏｓｐｏｒａ属、Ｓｔｒｅｐｔａｃｉｄｉｐｈｉｌｕｓ属、Ｐｓｅｕｄｏｎｏｃａｒｄｉａ属、Ａｃｔｉｎｏａｌｌｏｔｅｉｃｈｕｓ属、Ａｃｔｉｎｏｋｉｎｅｏｓｐｏｒａ属、Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｏｓｐｏｒａ属、Ａｃｔｉｎｏｐｈｙｔｏｃｏｌａ属、Ａｃｔｉｎｏｓｙｎｎｅｍａ属、Ａｌｌｏａｃｔｉｎｏｓｙｎｎｅｍａ属、Ａｌｌｏｋｕｔｚｎｅｒｉａ属、Ａｍｙｃｏｌａｔｏｐｓｉｓ属、Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ属、Ｇｏｏｄｆｅｌｌｏｗｉｅｌｌａ属、Ｈａｌｏｅｃｈｉｎｏｔｈｒｉｘ属、Ｋｉｂｄｅｌｏｓｐｏｒａｎｇｉｕｍ属、Ｋｕｔｚｎｅｒｉａ属、Ｌａｂｅｄａｅａ属、Ｌｅｃｈｅｖａｌｉｅｒｉａ属、Ｌｅｎｔｚｅａ属、Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ属、Ｐｒａｕｓｅｒｅｌｌａ属、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｏｎｏｓｐｏｒａ属、Ｓａｃｃｈａｒｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ属、Ｓａｃｃｈａｒｏｔｈｒｉｘ属、Ｓｃｉｓｃｉｏｎｅｌｌａ属、Ｓｔｒｅｐｔｏａｌｌｏｔｅｉｃｈｕｓ属、Ｔａｍａｒｉｃｉｈａｂｉｔａｎｓ属、Ｔｈｅｒｍｏｂｉｓｐｏｒａ属、Ｔｈｅｒｍｏｃｒｉｓｐｕｍ属、Ｔｈｅｒｍｏｔｕｎｉｃａ属、Ｕｍｅｚａｗａｅａ属、Ｙｕｈｕｓｈｉｅｌｌａ属等の微生物が挙げられ、好ましくはＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ属微生物（例：Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ

ｃｌａｖｕｌｉｇｅｒｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｇｒｉｓｅｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ａｖｅｒｍｉｔｉｌｉｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｅｒｔｉｃｉｌｌｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｐｅｕｃｅｔｉｃｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｔｓｕｋｕｂａｅｎｓｉｓ、Ｓｔｅｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｈｙｇｒｏｓｃｏｐｉｃｕｓ ｖａｒ．ｌｉｍｏｎｅｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．ＣＳ７９、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．ＦＧＫ８５８、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．ＣＬ１９０）である。

[0026] ＜イソペンテニルニリン酸イソメラーゼをコードするポリヌクレオチド＞

本発明においてポリヌクレオチドは、ＤＮＡであってもＲＮＡであってもよいが、ＤＮＡであることが好ましい。本発明のポリヌクレオチドは、放線菌に由来し得る。本発明のポリヌクレオチドは、前記タンパク質をコードする限り特に限定されないが、例えば、以下に述べるポリヌクレオチドであってもよい。

[0027] 一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、以下である：

（ａ－１）配列番号９の全長塩基配列を含むポリヌクレオチド；ならびに

（ｂ－１）配列番号１０の全長塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0028] 配列番号９の塩基配列は、配列番号１３のアミノ酸配列をコードする。配列番号１０の塩基配列は、配列番号１４のアミノ酸配列をコードする。

[0029] 本明細書中で用いられる場合、用語「開始コドン」とは、タンパク質の合成開始を指定するコドンをいう。開始コドンとしては、例えば、メチオニン残基をコードするコドン（例、ＡＵＧ）、バリン残基をコードするコドン（例、ＧＵＧ）、イソロイシン残基をコードするコドン（例、ＡＵＡ）、およびロイシン残基をコードするコドン（例、ＵＵＧ）が挙げられるが、メチオニン残基をコードするコドン（例、ＡＵＧ）が好ましい。本発明のポリヌクレオチドがＲＮＡの場合、上記のとおりヌクレオチド残基「Ｕ」が利用されるべきであるが、本発明のポリヌクレオチドがＤＮＡの場合、ヌクレオチド残基「Ｕ」の代わりに「Ｔ」が利用されるべきである。

[0030] 別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、（ａ）または（ｂ）のポリヌクレオチドの相同ポリヌクレオチドである。このような相同ポリヌクレオチドとしては、例えば、以下が挙げられる：

（ａ－２）配列番号９の全長塩基配列と９０％以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；ならびに

（ｂ－２）配列番号１０の全長塩基配列と９０％以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0031] 塩基配列との同一性％は、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％以上であってもよい。

[0032] さらに別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、（ａ－３）または（ｂ－３）のポリヌクレオチドのアナログポリヌクレオチドである。このようなアナログポリヌクレオチドとしては、例えば、以下が挙げられる：

（ａ－３）配列番号９の全長塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；ならびに

（ｂ－３）配列番号１０の全長塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0033] 本明細書中で用いられる場合、用語「ストリンジェント条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、ストリンジェント条件としては、６×ＳＳＣ（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）中、約４５℃でのハイブリダイゼーション、続いて、０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中、５０～６５℃での１または２回以上の洗浄が挙げられる。

[0034] なおさらに別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、縮重ポリヌクレオチドである。このような縮重ポリヌクレオチドとしては、例えば、以下が挙げられる：

（ｃ）（ａ－１）～（ｂ－３）からなる群より選ばれるポリヌクレオチドの縮重変異体。

[0035] 本明細書中で用いられる場合、用語「縮重変異体」とは、変異前のポリヌクレオチド中の所定のアミノ酸残基をコードする少なくとも１つのコドンが、同一アミノ酸残基をコードする別のコドンに変更されたポリヌクレオチド変異体をいう。このような縮重変異体はサイレント変異に基づく変異体であることから、縮重変異体によりコードされるタンパク質は、変異前のポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質と同一である。

[0036] 好ましくは、縮重変異体は、それが導入されるべき宿主細胞のコドン使用頻度に適合するようにコドンが変更されたポリヌクレオチド変異体である。ある遺伝子を異種宿主細胞（例、微生物）で発現させる場合、コドン使用頻度の相違により、対応するｔＲＮＡ分子種が十分に供給されず、翻訳効率の低下および／または不正確な翻訳（例、翻訳の停止）が生じることがある。例えば、エシェリヒア・コリでは、表１に示される低頻度コドンが知られている。

[0037] [表1]

表１　エシェリヒア・コリにおける低頻度コドン

アミノ酸残基	コドン	低頻度コドン
Arg	AGG/AGA/CGG/CGA/CGU/CGC	AGG/AGA/CGG/CGA
Gly	GGG/GGA/GGU/GGC	GGA
Ile	AUA/AUU/AUC	AUA
Leu	UUG/UUA/CUG/CUA/CUU/CUC	CUA
Pro	CCG/CCA/CCU/CCC	CCC

[0038] したがって、本発明では、後述するような宿主細胞（例、微生物）のコドン使用頻度に適合する縮重変異体を利用することができる。例えば、本発明の縮重変異体は、アルギニン残基、グリシン残基、イソロイシン残基、ロイシン残基、およびプロリン残基からなる群より選ばれる１種以上のアミノ酸

残基をコードするコドンが変更されたものであってもよい。より具体的には、本発明の縮重変異体は、低頻度コドン（例、ＡＧＧ、ＡＧＡ、ＣＧＧ、ＣＧＡ、ＧＧＡ、ＡＵＡ、ＣＵＡ、およびＣＣＣ）からなる群より選ばれる１種以上のコドンが変更されたものであってもよい。好ましくは、縮重変異体は、以下からなる群より選ばれる１種以上（例、１種、２種、３種、４種、または５種）のコドンの変更を含んでいてもよい：

ｉ）Ａｒｇをコードする４種のコドン（ＡＧＧ、ＡＧＡ、ＣＧＧ、およびＣＧＡ）からなる群より選ばれる少なくとも１種のコドンの、Ａｒｇをコードする別のコドン（ＣＧＵ、またはＣＧＣ）への変更；

ｉｉ）ＧｌｙをコードするＩ種のコドン（ＧＧＡ）の、別のコドン（ＧＧＧ、ＧＧＵ、またはＧＧＣ）への変更；

ｉｉｉ）ＩｌｅをコードするＩ種のコドン（ＡＵＡ）の、別のコドン（ＡＵＵ、またはＡＵＣ）への変更；

ｉｖ）ＬｅｕをコードするＩ種のコドン（ＣＵＡ）の、別のコドン（ＵＵＧ、ＵＵＡ、ＣＵＧ、ＣＵＵ、またはＣＵＣ）への変更；ならびに

ｖ）ＰｒｏをコードするＩ種のコドン（ＣＣＣ）の、別のコドン（ＣＣＧ、ＣＣＡ、またはＣＣＵ）への変更。

[0039] 本発明の縮重変異体がＲＮＡの場合、上記のとおりヌクレオチド残基「Ｕ」が利用されるべきであるが、本発明の縮重変異体がＤＮＡの場合、ヌクレオチド残基「Ｕ」の代わりに「Ｔ」が利用されるべきである。宿主細胞のコドン使用頻度に適合させるためのヌクレオチド残基の変異数は、変異前後で同一のタンパク質をコードする限り特に限定されないが、例えば、１～５００個、１～４００個、１～３００個、１～２００個、または１～１００個である。

[0040] 低頻度コドンの同定は、当該分野で既知の技術を利用することにより、任意の宿主細胞の種類およびゲノム配列情報に基づいて容易に行うことができる。したがって、縮重変異体は、低頻度コドンの非低頻度コドン（例、高頻度コドン）への変更を含むものであってもよい。また、低頻度コドンのみな

らず、生産菌株のゲノムＧＣ含量への適合性などの要素を考慮して変異体を設計する方法が知られているので（Ａｌａｎ Ｖｉｌｌａｌｏｂｏｓ ｅｔ ａｌ．, Ｇｅｎｅ Ｄｅｓｉｇｎｅｒ: ａ ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ ｂｉｏｌｏｇｙ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｎｇ ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ ＤＮＡ ｓｅｇｍｅｎｔｓ, ＢＭＣ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ. ２００６ Ｊｕｎ ６；７：２８５．）、このような方法を利用してもよい。このように、上述の変異体は、それが導入され得る任意の宿主細胞（例、後述するような微生物）の種類に応じて適宜作製できるが、例えば、異種タンパク質の発酵生産に汎用される宿主細胞の種類に適合するように作製されてもよい。異種タンパク質の発酵生産に汎用される宿主細胞としては、例えば、後述する任意の微生物が挙げられるが、細菌および酵母が好ましい。このような細菌および酵母としては、例えば、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）等のバシラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属細菌、コリネバクテリウム・グルタミカム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｌｕｔａｍｉｃｕｍ）等のコリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属細菌、エシェリヒア・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）等のエシェリヒア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）属細菌、パントエア・アナナティス（Ｐａｎｔｏｅａ ａｎａｎａｔｉｓ）等のパントエア（Ｐａｎｔｏｅａ）属細菌、エンテロバクター・アエロゲネス（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ａｅｒｏｇｅｎｅｓ）等のエンテロバクター（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）属細菌、ならびにサッカロミセス・セレビシエー（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）等のサッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属、およびシゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ）等のシゾサッカロミセス（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属の酵母が挙げられる。したがって、このような微生物（例、細菌、酵母）における低頻度コドンの非低頻度コドンへの変更、およびゲノムＧＣ含量適合性等の要素の考慮が好ましい。

[0041] ＜発現ベクター＞

本発明の発現ベクターは、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド、または本発明のポリヌクレオチドを含む。

[0042] 本発明の発現ベクターは、上記ポリヌクレオチドに作動可能に連結された異種プロモーターをさらに含んでいてもよい。用語「異種プロモーター」とは、放線菌由来イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ遺伝子の天然プロモーター以外のプロモーターをいう。したがって、異種プロモーターとしては、例えば、放線菌由来イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ遺伝子以外の放線菌由来遺伝子のプロモーター、放線菌以外の他の生物（例、微生物、動物、昆虫、および植物）由来プロモーター、ウイルス由来プロモーター、ならびに人工合成プロモーターが挙げられる。異種プロモーターとしてはまた、異種タンパク質生産に汎用されるプロモーターを用いてもよい。このようなプロモーターとしては、例えば、ＰｈｏＡプロモーター、ＰｈｏＣプロモーター、Ｔ７プロモーター、Ｔ５プロモーター、Ｔ３プロモーター、ｌａｃプロモーター、ｔｒｐプロモーター、ｔｒｃプロモーター、ｔａｃプロモーター、ＰＲプロモーター、ＰＬプロモーター、ＳＰ６プロモーター、アラビノース誘導プロモーター、コールドショックプロモーター、テトラサイクリン誘導性プロモーターが挙げられる。

[0043] 本発明の発現ベクターはまた、上記ポリヌクレオチドの下流にターミネーターをさらに含んでいてもよい。このようなターミネーターとしては、例えば、Ｔ７ターミネーター、ｆｄファージターミネーター、Ｔ４ターミネーター、テトラサイクリン耐性遺伝子のターミネーター、エシェリヒア・コリｔｒｐＡ遺伝子のターミネーターが挙げられる。

[0044] 本発明の発現ベクターはまた、開始コドンの上流にリボゾーム結合部位（例、シャイン・ダルガノ配列）をさらに含んでいてもよい。

[0045] 本発明の発現ベクターはまた、薬剤耐性遺伝子をコードするポリヌクレオチドをさらに含んでいてもよい。薬剤耐性遺伝子としては、例えば、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ホスフィノスリシン等の薬剤に対する耐性遺伝子が挙げられる。

[0046] 本発明の発現ベクターとしては、例えば、宿主においてタンパク質を発現させる細胞系ベクター、およびタンパク質翻訳系を利用する無細胞系ベクターが挙げられる。発現ベクターはまた、プラスミド、ウイルスベクター、ファージ、組込み型（ｉｎｔｅｇｒａｔｉｖｅ）ベクター、または人工染色体であってもよい。組込み型ベクターは、その全体が宿主細胞のゲノムに組み込まれるタイプのベクターであってもよい。あるいは、組込み型ベクターは、その一部（例、後述の発現単位）のみが宿主細胞のゲノムに組み込まれるタイプのベクターであってもよい。発現ベクターはさらに、ＤＮＡベクターまたはＲＮＡベクターであってもよい。

[0047] 細胞系ベクターとしては、宿主に適した公知の発現ベクターが用いられる。このようなベクターとしては、例えば、ｐＵＣ（例、ｐＵＣ１９、ｐＵＣ１８）、ｐＳＴＶ、ｐＢＲ（例、ｐＢＲ３２２）、ｐＨＳＧ（例、ｐＨＳＧ２９９、ｐＨＳＧ２９８、ｐＨＳＧ３９９、ｐＨＳＧ３９８）、ＲＳＦ（例、ＲＳＦ１０１０）、ｐＡＣＹＣ（例、ｐＡＣＹＣ１７７、ｐＡＣＹＣ１８４）、ｐＭＷ（例、ｐＭＷ１１９、ｐＭＷ１１８、ｐＭＷ２１９、ｐＭＷ２１８）、ｐＱＥ（例、ｐＱＥ３０）、およびその誘導体が挙げられる。

[0048] 無細胞系ベクターとしては、例えば、Ｔ７またはＴ３プロモーターを有する発現ベクター、ＳＰ６プロモーター等を有するｐＥＵ系プラスミド等の小麦無細胞タンパク質合成用ベクター等が挙げられる。

[0049] ＜細菌（宿主細胞、形質転換体）＞

本発明においては、本発明のタンパク質を発現する、または本発明のポリヌクレオチドを発現してタンパク質を産生できる細菌を用いる。具体的には、本発明の細菌は、本発明のポリヌクレオチドを含む発現単位を含む宿主細胞である。本発明のポリヌクレオチドを含む発現単位とは、本発明のポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーター（例、同種プロモーター、異種プロモーター）を含む、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質の発現を可能にする単位をいう。本発明のポリヌクレオチドを含む発現単位を含む細菌としては、例えば、本発明の発現ベクター

を含む宿主細胞（形質転換体）が挙げられる。宿主細胞は、本発明のタンパク質を発現できる限り特に限定されない。宿主細胞は、本発明のタンパク質および本発明のポリヌクレオチドに対して同種であっても異種であってもよいが、異種であることが好ましい。宿主細胞はまた、上記プロモーターに対して同種であっても異種であってもよいが、異種であることが好ましい。宿主細胞としては、例えば、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、および微生物が挙げられるが、微生物が好ましい。微生物としては、例えば、腸内細菌科（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ）に属する細菌等の細菌、および真菌が挙げられる。細菌は、グラム陽性菌であってもグラム陰性菌であってもよい。

[0050] グラム陽性細菌としては、バシラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属細菌、リステリア（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）属細菌、スタフィロコッカス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）属細菌、ストレプトコッカス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）属細菌、エンテロコッカス（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）属細菌、クロストリジウム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）属細菌、コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属細菌、ストレプトマイセス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）属細菌等が挙げられ、バシラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属細菌、コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属細菌が好ましい。

[0051] バシラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属細菌としては、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、炭疽菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｎｔｈｒａｃｉｓ）、セレウス菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｅｒｅｕｓ）等が挙げられ、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）がより好ましい。

[0052] コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属細菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｌｕｔａｍｉｃｕｍ）、コリネバクテリウム・エフィシエンス（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｅｆｆｉｃｉｅｎｓ）、コリネバクテリウム・カルナエ（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｃａｌｌｕｎａｅ）等が挙げら

れ、コリネバクテリウム・グルタミカムがより好ましい。

[0053] グラム陰性細菌としては、エシェリヒア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）属細菌、パントエア（Ｐａｎｔｏｅａ）属細菌、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）属細菌、ビブリオ（Ｖｉｖｒｉｏ）属細菌、セラチア（Ｓｅｒｒａｔｉａ）属細菌、エンテロバクター（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）属細菌等が挙げられ、エシェリヒア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）属細菌、パントエア（Ｐａｎｔｏｅａ）属細菌、エンテロバクター（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）属細菌が好ましい。

[0054] エシェリヒア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）属細菌としては、エシェリヒア・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）が好ましい。

[0055] パントエア（Ｐａｎｔｏｅａ）属細菌としては、パントエア・アナナティス（Ｐａｎｔｏｅａ　ａｎａｎａｔｉｓ）、パントエア・スチューアルティ（Ｐａｎｔｏｅａ　ｓｔｅｗａｒｔｉｉ）、パントエア・アグロメランス（Ｐａｎｔｏｅａ　ａｇｇｌｏｍｅｒａｎｓ）、パントエア・シトレア（Ｐａｎｔｏｅａ　ｃｉｔｒｅａ）等が挙げられ、パントエア・アナナティス（Ｐａｎｔｏｅａ　ａｎａｎａｔｉｓ）、パントエア・シトレア（Ｐａｎｔｏｅａ　ｃｉｔｒｅａ）が好ましい。また、パントエア属細菌としては、欧州特許出願公開０９５２２２１号明細書に例示された株を使用してもよい。パントエア属細菌の代表的な株としては、例えば、欧州特許出願公開０９５２２２１号明細書に開示されるパントエア・アナナティスＡＪ１３３５５株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－６６１４）、パントエア・アナナティスＡＪ１３３５６株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－６６１５）、およびパントエア・アナナティスＳＣ１７（０）株が挙げられる。パントエア・アナナティスＳＣ１７（０）株（Ｋａｔａｓｈｋｉｎａ　Ｊｌ　ｅｔ　ａｌ．，ＢＭＣ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．，２００９；１０：３４）は、２００５年９月２１にロシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイ　クロオーガニズム（Ｒｕｓｓｉａｎ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ　Ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｓ　（ＶＫＰＭ），　ＧＮＩＩ　Ｇｅｎ

ｅｔｉｋａ）（住所：Ｒｕｓｓｉａ，　１１７５４５　Ｍｏｓｃｏｗ，　１　Ｄｏｒｏｚｈｎｙ　ｐｒｏｅｚｄ．　１）に受託番号ＶＫＰＭ　Ｂ－９２４６として登録されている。

[0056] エンテロバクター（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）属細菌としては、エンテロバクター・アグロメランス（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ　ａｇｇｌｏｍｅｒａｎｓ）、エンテロバクター・アエロゲネス（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ　ａｅｒｏｇｅｎｅｓ）等が挙げられ、エンテロバクター・アエロゲネス（Ｅｎｇｅｒｏｂａｃｔｅｒ　ａｅｒｏｇｅｎｅｓ）が好ましい。また、エンテロバクター属細菌としては、欧州特許出願公開０９５２２２１号に例示された菌株を使用してもよい。エンテロバクター属細菌の代表的な株としては、例えば、エンテロバクター・アグロメランスＡＴＣＣ１２２８７株、エンテロバクター・アエロゲネスＡＴＣＣ１３０４８株、エンテロバクター・アエロゲネスＮＢＲＣ１２０１０株（Ｓａｋａｉ　Ｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．，ｖｏｌ．９８，ｐｐ．３４０－３４８，２００７）、エンテロバクター・アエロゲネスＡＪ１１０６３７（ＦＥＲＭ　ＢＰ－１０９５５）株等が挙げられる。エンテロバクター・アエロゲネスＡＪ１１０６３７株は、２００７年８月２２日付で独立行政法人　産業技術総合研究所（現：国立研究開発法人　産業技術総合研究所）　特許生物寄託センター（〒３０５－８５６６　日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１　中央第６）に受託番号ＦＥＲＭ　Ｐ－２１３４８として寄託され、２００８年３月１３日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、ＦＥＲＭ　ＢＰ－１０９５５の受領番号が付与されている。

[0057] 真菌としては、サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属、シゾサッカロミセス（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属、ヤロウイア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）属、トリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）属、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）属、フザリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）属、ムコール（Ｍｕｃｏｒ）属の微生物等が挙げられ、サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属、シゾサッカロミセス（Ｓｃｈｉｚｏ

ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属、ヤロウイア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）属、またはトリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）属の微生物が好ましい。

[0058] サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属の微生物としては、サッカロミセス・カールスベルゲンシス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃａｒｌｓｂｅｒｇｅｎｓｉｓ）、サッカロミセス・セレビシエー（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、サッカロミセス・ディアスタティクス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｄｉａｓｔａｔｉｃｕｓ）、サッカロミセス・ドウグラシー（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｄｏｕｇｌａｓｉｉ）、サッカロミセス・クルイベラ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｋｌｕｙｖｅｒｉ）、サッカロミセス・ノルベンシス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｎｏｒｂｅｎｓｉｓ）、サッカロミセス・オビフォルミス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｏｖｉｆｏｒｍｉｓ）が挙げられ、サッカロミセス・セレビシエー（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）が好ましい。

[0059] シゾサッカロミセス（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属の微生物としては、シゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ）が好ましい。

[0060] ヤロウイア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）属の微生物としては、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）が好ましい。

[0061] トリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）属の微生物としては、トリコデルマ・ハルジアヌム（Ｔｔｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｈａｒｚｉａｎｕｍ）、トリコデルマ・コニンギー（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｋｏｎｉｎｇｉｉ）、トリコデルマ・ロンギブラキアム（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｌｏｎｇｉｂｒａｃｈｉａｔｕｍ）、トリコデルマ・リーゼイ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｅｉ）、トリコデルマ・ビリデ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｖｉｒｉｄｅ）が挙げられ、トリコデルマ・リーゼイ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｅｉ）が好ましい。

[0062] 表現「ジメチルアリル二リン酸（ＤＭＡＰＰ）の合成能」については、Ｍ

ｉｃｈｅｌｌｅ Ｃ Ｙ Ｃｈａｎｇ およびＪａｙ Ｄ Ｋｅａｓｌｉｎｇ，Ｎａｔｕｒｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２，６７４－６８１（２００６）を参照のこと。

[0063] 表現「メバロン酸（ＭＶＡ）経路」については、Ｋｕｚｕｙａｍａ Ｔおよびｓｅｔｏ Ｈ，Ｐｒｏｃ Ｊｐｎ Ａｃａｄ Ｓｅｒ Ｂ Ｐｈｙｓ Ｂｉｏｌ Ｓｃｉ．８８，４１－５２（２０１２）；Ｍｉｚｉｏｒｋｏ ＨＭ，Ａｒｃｈ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ．５０５，１３１－１４３（２０１１）を参照のこと。

[0064] 表現「メチルエリスリトールリン酸（ＭＥＰ）経路」については、Ｋｕｚｕｙａｍａ ＴおよびＳｅｔｏ Ｈ，Ｐｒｏｃ Ｊｐｎ Ａｃａｄ Ｓｅｒ Ｂ Ｐｈｙｓ Ｂｉｏｌ Ｓｃｉ．８８，４１－５２（２０１２）；Ｇｒａｗｅｒｔ Ｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ．６８，３７９７－３８１４（２０１１）を参照のこと。

[0065] 本発明に用いられる宿主としては、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼの基質であるジメチルアリルニリン酸の合成に関与するメバロン酸（ＭＶＡ）経路および／またはメチルエリスリトールリン酸（ＭＥＰ）経路によるイソプレノイドニリン酸（ＩＰＰ）および／またはジメチルアリルニリン酸（ＤＭＡＰＰ）の合成能を備えていれば特に限定されず、昆虫細胞、動物細胞、植物細胞等であってもよい。例えば、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌、パントエア・アナナティス等のパントエア属細菌は、メチルエリスリトールリン酸経路によるイソプレノイドニリン酸およびジメチルアリルニリン酸の合成能を固有に有し得る。例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐ． ＣＬ１９０、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｄａｖａｗｅｎｓｉｓ等の放線菌は、メバロン酸経路によるイソプレノイドニリン酸およびジメチルアリルニリン酸の合成能を固有に有し得る。

[0066] 本発明の細菌は、さらにイソペンテニルニリン酸イソメラーゼの基質であるＩＰＰおよび／またはＤＭＡＰＰを生産するメバロン酸経路および／またはメチルエリスリトールリン酸経路に関与する１以上の酵素の発現ベクター

が、導入されていてもよい。このような酵素の発現ベクターは、プラスミド、または組込み型（ｉｎｔｅｇｒａｔｉｖｅ）ベクターであってもよい。このような酵素の発現ベクターはまた、ＤＮＡベクターまたはＲＮＡベクターであってもよい。このような酵素の発現ベクターはさらに、メバロン酸経路および／またはメチルエリスリトールリン酸経路に関与する複数（例、１種、２種、３種または４種以上）の酵素を発現するものであってもよく、例えば、ポリシストロニックｍＲＮＡの発現ベクターであってもよい。メバロン酸経路および／またはメチルエリスリトールリン酸経路に関与する１以上の酵素の由来は、宿主に対して同種であってもよいし、異種であってもよい。メバロン酸経路および／またはメチルエリスリトールリン酸経路に関与する酵素の由来が宿主に対して異種である場合、例えば、宿主が上述したような細菌（例、エシェリヒア・コリ）であり、かつ、メバロン酸経路に関与する少なくとも１つの酵素が真菌（例、サッカロミセス・セレビシエ）に由来するものであってもよい。また、宿主が、メチルエリスリトールリン酸経路に関与する酵素を固有に産生するものである場合、宿主に導入される発現ベクターは、メバロン酸経路に関与する１または複数（例、１種、２種、３種または４種以上）の酵素を発現するものであってもよい。

[0067] メバロン酸（ＭＶＡ）経路に関与する酵素としては、例えば、メバロン酸キナーゼ（ＥＣ：２．７．１．３６；例１、Ｅｒｇ１２ｐ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ ＩＤ ＮＰ＿０１３９３５；例２、ＡＴ５Ｇ２７４５０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ ＩＤ ＮＰ＿００１１９０４１１）、ホスホメバロン酸キナーゼ（ＥＣ：２．７．４．２；例１、Ｅｒｇ８ｐ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ ＩＤ ＮＰ＿０１３９４７；例２、ＡＴ１Ｇ３１９１０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ ＩＤ ＮＰ＿００１１８５１２４）、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ（ＥＣ：４．１．１．３３；例１、Ｍｖｄ１ｐ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ ＩＤ ＮＰ＿０１４４４１；例２、ＡＴ２Ｇ３８７００、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ ＩＤ ＮＰ＿１８１４０４；例３、ＡＴ３Ｇ５４２５０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ ＩＤ ＮＰ＿５６６９９５）、アセチル－ＣｏＡ－Ｃ－アセチルトラン

スフェラーゼ（ＥＣ：２．３．１．９；例1、Ｅｒｇ１０ｐ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿０１５２９７；例2、ＡＴ５Ｇ４７７２０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿００１０３２０２８；例3、ＡＴ５Ｇ４８２３０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿５６８６９４）、ヒドロキシメチルグルタリル－ＣｏＡシンターゼ（ＥＣ：２．３．３．１０；例1、Ｅｒｇ１３ｐ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿０１３５８０；例2、ＡＴ４Ｇ１１８２０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿１９２９１９；例3、ＭｖａＳ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＡＡＧ０２４３８）、ヒドロキシメチルグルタリル－ＣｏＡリダクターゼ（ＥＣ：１．１．１．３４；例1、Ｈｍｇ２ｐ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿０１３５５５；例2、Ｈｍｇ１ｐ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿０１３６３６；例3、ＡＴ１Ｇ７６４９０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿１７７７７５；例4、ＡＴ２Ｇ１７３７０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿１７９３２９、ＥＣ：１．１．１．８８、例、ＭｖａＡ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　Ｐ１３７０２）、アセチル－ＣｏＡ－Ｃ－アセチルトランスフェラーゼ／ヒドロキシメチルグルタリル－ＣｏＡリダクターゼ（ＥＣ：２．３．１．９／１．１．１．３４、例、ＭｖａＥ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＡＡＧ０２４３９）が挙げられる。

[0068] メチルエリスリトールリン酸（ＭＥＰ）経路に関与する酵素としては、例えば、１－デオキシ－Ｄ－キシルロース－５－リン酸シンターゼ（ＥＣ：２．２．１．７、例1、Ｄｘｓ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿４１４９５４；例2、ＡＴ３Ｇ２１５００、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿５６６６８６；例3、ＡＴ４Ｇ１５５６０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿１９３２９１；例4、ＡＴ５Ｇ１１３８０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿００１０７８５７０）、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（ＥＣ：１．１．１．２６７；例1、Ｄｘｒ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿４１４７１５；例2、ＡＴ５Ｇ６２７９０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿００１１９０６００）、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（ＥＣ：２．７．７．６０；例1、ＩｓｐD、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿４１７２２７；例2、ＡＴ２Ｇ０２５００、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿５６５２８６）、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（ＥＣ：２．７．１．１４８；例1、ＩｓｐE、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿４１５７２６；例2、ＡＴ２Ｇ２６９３０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿１８０２６１）、２－Ｃ－メチル－Ｄ－エリスリトール－２，４－シクロ二リン酸シンターゼ（ＥＣ：４．６．１．１２；例1、ＩｓｐF、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿４１７２２６；例2、ＡＴ１Ｇ６３９７０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿５６４８１９）、１－ヒドロキシ－２－メチル－２－（Ｅ）－ブテニル－４－二リン酸シンターゼ（ＥＣ：１．１７．７．１；例1、ＩｓｐG、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿４１７０１０；例2、ＡＴ５Ｇ６０６００、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿００１１１９４６７）、４－ヒドロキシ－３－メチル－２－ブテニル二リン酸レダクターゼ（ＥＣ：１．１７．１．２；例1、ＩｓｐH、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿４１４５７０；例2、ＡＴ４Ｇ３４３５０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿５６７９６５）が挙げられる。

[0069] 遺伝子が組込まれた発現ベクターの宿主への導入（形質転換）は、従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、カルシウム処理された菌体を用いるコンピテント細胞法や、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、プラスミドベクター以外にもファージベクターを用いて、菌体内に感染させ導入する方法によってもよい。

[0070] 本発明の細菌は、ＩＰＰおよび／あるいはＤＭＡＰＰからのイソプレノイド化合物の合成能を備えていることが好ましい。本発明の細菌には、ＩＰＰおよび／あるいはＤＭＡＰＰからのイソプレノイド化合物合成に関与する１以上の酵素の発現ベクターが導入されていてもよい。このような酵素の発現ベクターは、プラスミド、または組込み型（ｉｎｔｅｇｒａｔｉｖｅ）ベクターであってもよい。このような酵素の発現ベクターはまた、ＤＮＡベクタ

ーまたはＲＮＡベクターであってもよい。このような酵素の発現ベクターはさらに、イソプレノイド化合物合成に関与する複数（例、１種、２種、３種または４種以上）の酵素を発現するものであってもよく、例えば、ポリシストロニックｍＲＮＡの発現ベクターであってもよい。イソプレノイド化合物合成に関与する１以上の酵素の由来は、宿主に対して同種であってもよいし、異種であってもよい。イソプレノイド化合物合成に関与する酵素の由来が宿主に対して異種である場合、例えば、宿主が上述したような細菌（例、エシェリヒア・コリ）であり、かつ、イソプレノイド化合物合成に関与する少なくとも１つの酵素が真菌（例、サッカロミセス・セレビシエ）に由来するものであってもよい。また、宿主は、イソプレノイド化合物合成に関与する酵素を固有に産生するものであってもよい。

[0071] イソプレノイド化合物合成に関与する酵素としては、例えば、イソプレンシンターゼが挙げられる。イソプレンシンターゼ（ＥＣ：４．２．３．２７）は、ジメチルアリル二リン酸（ＤＭＡＰＰ）をイソプレンに転換する酵素である。イソプレンシンターゼとしては、例えば、Ｐｕｅｒａｒｉａ ｍｏｎｔａｎａ ｖａｒ．ｌｏｂａｔａ（葛）、Ｍｕｃｕｎａ ｐｕｒｕｒｉｅｎｓ（ムクナ）、Ｔｒｕｅ ｍｙｒｔｌｅ（ギンコウバイ）、Ｐｏｐｕｌｕｓ ａｌｂａ（ギンドロ）、Ｐｏｐｕｌｕｓ ｎｉｇｒａ（セイヨウハコヤナギ）、Ｐｏｐｕｌｕｓ ｔｒｅｍｕｌａ ｘ Ｐｏｐｕｌｕｓ ａｌｂａ、Ｐｏｐｕｌｕｓ ｔｒｅｍｕｌａ ｘ Ｐｏｐｕｌｕｓ ｔｒｅｍｕｌｏｉｄｅｓ、Ｐｏｐｕｌｕｓ ｔｒｅｍｕｌｏｉｄｅｓ（アメリカヤマナラシ）、Ｐｏｐｕｌｕｓ ｔｒｉｃｈｏｃａｒｐａ（ブラックコットンウツド）、Ｓａｌｉｘ ｄｉｓｃｏｌｏｒ（ネコヤナギ）等の植物由来のイソプレンシンターゼが挙げられる。別の例として、例えば、ジメチルアリル二リン酸とイソペンテニル二リン酸を基質として利用し、ｈｅａｄ ｔｏ ｔａｉｌ型の縮合反応により、炭素原子数１０のゲラニル二リン酸（ＧＰＰ）を生成するＧＰＰ合成酵素が挙げられる。更に、順次、この反応を繰り返すことにより炭素原子数１５のファルネシル二リン酸（ＦＰＰ）、炭素原子数２０の

ゲラニルゲラニル二リン酸（ＧＧＰＰ）、炭素原子数２５のゲラニルファルネシル二リン酸（ＧＦＰＰ）を生成するＦＰＰ合成酵素、ＧＧＰＰ合成酵素、ＧＦＰＰ合成酵素が挙げられる。このようにして生成した炭素原子数１０から炭素原子数２５までの鎖状アルコール二リン酸エステルは、それぞれのテルペノイドの前駆体となることが知られている。別の例として、ＦＰＰ二分子を結合し、スクワレンを合成するスクワレン合成酵素が挙げられる。スクワレンはトリテルペノイドやステロイドの共通前駆体である事が知られている。別の例として、ＧＧＰＰの二量化によりフィトエンを合成するフィトエン合成酵素が挙げられる。フィトエンはアスタキサンチン等のカロテノイド化合物の共通前駆体であることが知られている。

[0072] ＧＰＰを前駆体としたモノテルペノイド類の合成酵素の例として、例えば、ゲラニオールシンターゼ、リナロールシンターゼ、リモネンシンターゼ、ミルセンシンターゼ、オシメンシンターゼ、α－ピネンシンターゼ、β－ピネンシンターゼ、サビネンシンターゼ、γ－テルピネンシンターゼ、テルピノレンシンターゼが挙げられる。

[0073] ＦＰＰを前駆体としたセスキテルペノイド類の合成酵素の例として、例えば、ファルネソールシンターゼ、バレンセンシンターゼ、アモルファジエンシンターゼ、ネロリドールシンターゼ、パチョロールシンターゼが挙げられる。

[0074] ＧＧＰＰを前駆体としたジテルペノイド類の合成酵素の例として、例えば、アビエタジエンシンターゼ、フシコッカジエンシンターゼ、カウレンシンターゼ、タキサジエンシンターゼ、アビエタジエンシンターゼが挙げられる。

[0075] イソプレノイド化合物生合成に関与する酵素として、鎖状アルコール二リン酸エステルを前駆体とした酵素以外にも、生成したテルペノイド類化合物を基質として、別のテルペノイド類化合物に変換する酵素が挙げられる。例えば、リモネン　６－モノオキシゲナーゼはリモネンの６位に水酸基を付与し、カルベオールを生成する。カルベオールデヒドロゲナーゼはカルベオー

ルからカルボンを生成する。別の例として、ある種のシトクロムＰ４５０はバレンセンを基質とし、ヌートカトールを生成する。更に、ある種のアルコールデヒドロゲナーゼはヌートカトールを酸化し、ヌートカトンを生成する。

[0076] 本発明の細菌では、１箇所または複数（例、２、３、４または５箇所）の特定のゲノム領域（例、コーディングまたはノンコーディング領域）が、破壊されていてもよい。このようなゲノム領域としては、例えば、ｃｒｔオペロン（ポリプレニルシンテターゼ、ベーターカロテンヒドロキシラーゼ、フィトエンシンターゼ、フィトエンデヒドロゲナーゼ、リコペンシクラーゼ等のイソプレノイド生合成経路をコードする）、ａｍｐ遺伝子（例、ａｍｐＣ遺伝子、またはａｍｐＨ遺伝子）が挙げられる。例えば、ｃｒｔオペロンの破壊は、イソプレノイド化合物の生成を抑制できるので有利であり得る。ａｍｐ遺伝子の破壊は、アンピシリン耐性遺伝子（薬剤耐性選択マーカー）が利用可能になるので有利であり得る。

[0077] 遺伝子について用語「破壊」とは、遺伝子よりコードされるタンパク質の機能または発現を低下または完全消失させるように、遺伝子コーディング領域が改変されることを意味する。オペロンについて用語「破壊」とは、オペロンの機能を低下または完全消失させるように、オペロンに対応するゲノム領域が改変されることを意味する。エンハンサーとして作用し得るオペロン（例、上述したｃｒｔオペロン）の機能が低下または完全消失すると、当該オペロンに作動可能に連結されている遺伝子によりコードされるタンパク質の発現が低下または完全消失し得る。一方、リプレッサーとして作用し得るオペロンの機能が低下または完全消失すると、当該オペロンに作動可能に連結されている遺伝子によりコードされるタンパク質の発現が向上し得る。当該改変としては、例えば、挿入、欠失および交換が挙げられるが、これらに限定されない。

[0078] ゲノム領域は、例えば、既知の遺伝子ターゲティング法に従い上述の遺伝子（例、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ遺伝子）を当該ゲノム領域に

導入することにより、破壊されてもよい。

[0079] イソペンテニル二リン酸イソメラーゼは、本発明の細菌から精製されてもよい。精製方法としては、例えば、塩析法、および各種クロマトグラフィーを用いた方法が挙げられる。イソペンテニル二リン酸イソメラーゼがヒスチジンタグ等の異種部分を含むように設計されている場合、ニッケル等の金属、または異種部分に親和性を有する物質を用いたアフィニティーカラムにより、イソペンテニル二リン酸イソメラーゼを精製することができる。その他、イオン交換クロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィー等の方法を適宜組み合わせて精製することにより、本発明のタンパク質の純度を高めることができる。

[0080] ＜イソプレノイド化合物の製造方法＞

本発明は、本発明のタンパク質を用いてイソプレノイド化合物を生成することを含む、イソプレノイド化合物の製造方法を提供する。

[0081] 一実施形態では、本発明のイソプレノイド化合物の製造方法は、本発明のタンパク質自体を用いて行うこともできる。本発明のタンパク質として、天然タンパク質または組換えタンパク質を利用することができる。組換えタンパク質は、例えば、無細胞系ベクターを用いて、または本発明の細菌から得ることができる。本発明のタンパク質は、未精製、粗精製または精製タンパク質として利用することができる。

[0082] 別の実施形態では、本発明のイソプレノイド化合物の製造方法は、本発明の細菌を用いて行うことができる。イソプレノイド化合物の原料となるイソペンテニル二リン酸、ジメチルアリル二リン酸は、培地中の炭素源を素に、宿主内のメバロン酸経路またはメチルエリスリトールリン酸経路で合成される。あるいは、イソペンテニル二リン酸、ジメチルアリル二リン酸を培地に加えてもよい。

[0083] 本発明の細菌を培養する培地としては、メバロン酸またはイソプレンに転換されるための炭素源を含むことが好ましい。炭素源としては、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、多糖類等の炭水化物；ショ糖を加水分解した転化糖；グ

リセロール；メタノール、ホルムアルデヒド、ギ酸塩、一酸化炭素、二酸化炭素等の炭素原子数が１の化合物（以下、Ｃ１化合物という。）；コーン油、パーム油、大豆油等のオイル；アセテート；動物油脂；動物オイル；飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸等の脂肪酸；脂質；リン脂質；グリセロ脂質；モノグリセライド、ジグリセライド、トリグリセライド等のグリセリン脂肪酸エステル；微生物性タンパク質、植物性タンパク質等のポリペプチド；加水分解されたバイオマス炭素源等の再生可能な炭素源；酵母エキス；またはこれらを組み合わせたものが挙げられる。窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。有機微量栄養源としては、ビタミンＢ１、Ｌ－ホモセリンなどの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。なお、本発明で用いる培地は、炭素源、窒素源、無機イオンおよび必要に応じてその他の有機微量成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでもよい。

[0084] 単糖類としては、ケトトリオース（ジヒドロキシアセトン）、アルドトリオース（グリセルアルデヒド）等のトリオース；ケトテトロース（エリトルロース）、アルドテトロース（エリトロース、トレオース）等のテトロース；ケトペントース（リブロース、キシルロース）、アルドペントース（リボース、アラビノース、キシロース、リキソース）、デオキシ糖（デオキシリボース）等のペントース；ケトヘキソース（プシコース、フルクトース、ソルボース、タガトース）、アルドヘキソース（アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロース）、デオキシ糖（フコース、フクロース、ラムノース）等のヘキソース；セドヘプツロース等のヘプトースが挙げられ、フルクトース、マンノース、ガラクトース、グルコース等のＣ６糖；キシロース、アラビノース等のＣ５糖の炭水化物が好ましい。

[0085] 二糖類としては、スクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ツラノース、セロビオース等が挙げられ、スクロース、ラクトースが好ましい。

[0086] オリゴ糖類としては、ラフィノース、メレジトース、マルトトリオース等の三糖類；アカルボース、スタキオース等の四糖類；フラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）、マンナンオリゴ糖（ＭＯＳ）等のその他のオリゴ糖類が挙げられる。

[0087] 多糖類としては、グリコーゲン、デンプン（アミロース、アミロペクチン）、セルロース、デキストリン、グルカン（β１，３－グルカン）が挙げられ、デンプン、セルロースが好ましい。

[0088] 微生物性タンパク質としては、酵母または細菌由来のポリペプチドが挙げられる。

[0089] 植物性タンパク質としては、大豆、コーン、キャノーラ、ジャトロファ、パーム、ピーナッツ、ヒマワリ、ココナッツ、マスタード、綿実、パーム核油、オリーブ、紅花、ゴマ、亜麻仁由来のポリペプチドが挙げられる。

[0090] 脂質としては、Ｃ４以上の飽和、不飽和脂肪酸を１以上含む物質が挙げられる。

[0091] オイルとしては、Ｃ４以上の飽和、不飽和脂肪酸が１以上含み、室温で液体の脂質が好ましく、大豆、コーン、キャノーラ、ジャトロファ、パーム、ピーナッツ、ヒマワリ、ココナッツ、マスタード、綿実、パーム核油、オリーブ、紅花、ゴマ、亜麻仁、油性微生物細胞、ナンキンハゼ、またはこれらの２以上の組み合わせからなるものが挙げられる。

[0092] 脂肪酸としては、式ＲＣＯＯＨ（「Ｒ」は炭化水素基を表す。）で表される化合物が挙げられる。

[0093] 不飽和脂肪酸は、「Ｒ」に少なくとも１の炭素－炭素二重結合を有する化合物であり、オレイン酸、バクセン酸、リノール酸、パルミテライジン酸、アラキドン酸等が挙げられる。

[0094] 飽和脂肪酸は、「Ｒ」が飽和脂肪族基である化合物であり、ドコサン酸、

イコサン酸、オクタデカン酸、ヘキサデカン酸、テトラデカン酸、ドデカン酸等が挙げられる。

[0095] 中でも、脂肪酸としては、１以上のＣ２からＣ２２の脂肪酸が含まれるものが好ましく、Ｃ１２脂肪酸、Ｃ１４脂肪酸、Ｃ１６脂肪酸、Ｃ１８脂肪酸、Ｃ２０脂肪酸、Ｃ２２脂肪酸が含まれるものがより好ましい。

[0096] また、炭素源としては、これら脂肪酸の塩、誘導体、誘導体の塩も挙げられる。塩としては、リチウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩等が挙げられる。

[0097] また、炭素源としては、脂質、オイル、油脂、脂肪酸、グリセリン脂肪酸エステルとグルコース等の炭水化物との組み合わせが挙げられる。

[0098] 再生可能な炭素源としては、加水分解されたバイオマス炭素源が挙げられる。

[0099] バイオマス炭素源としては、木、紙、およびパルプの廃材、葉状植物、果肉等のセルロース系基質；柄、穀粒、根、塊茎等の植物の一部分が挙げられる。

[0100] バイオマス炭素源として用いられる植物としては、コーン、小麦、ライ麦、ソルガム、トリティケイト、コメ、アワ、大麦、キャッサバ、エンドウマメ等のマメ科植物、ジャガイモ、サツマイモ、バナナ、サトウキビ、タピオカ等が挙げられる。

[0101] バイオマス等の再生可能な炭素源を細胞培地に添加する際には、前処理することが好ましい。前処理としては、酵素的前処理、化学的前処理、酵素的前処理と化学的前処理の組み合わせが挙げられる。

[0102] 再生可能な炭素源を細胞培地に添加する前に、その全部または一部を加水分解することが好ましい。

[0103] また、炭素源としては、酵母エキス、または酵母エキスと、グルコース等の他の炭素源との組み合わせが挙げられ、酵母エキスと、二酸化炭素やメタノール等のＣ１化合物との組み合わせが好ましい。

[0104] 本発明において、細菌の培養方法としては、生理食塩水と栄養源を含む標

準的培地で培養する方法が好ましい。

[0105] 培養培地としては、特に限定されず、Ｌｕｒｉａ Ｂｅｒｔａｎｉ（ＬＢ）ブロス、Ｓａｂｏｕｒａｕｄ Ｄｅｘｔｒｏｓｅ（ＳＤ）ブロス、Ｙｅａｓｔ ｍｅｄｉｕｍ（ＹＭ）ブロス等の一般的に市販されている既成の培地が挙げられる。特定の宿主の培養に適した培地を適宜選択して用いることができる。

[0106] 細胞培地には適切な炭素源の他に、適切なミネラル、塩、補助因子、緩衝液、および培養に適していること、またはイソプレン産出を促進することが当業者にとって公知の成分が含まれていることが望ましい。

[0107] 本発明の細菌において、目的タンパク質の発現を維持するために、糖、金属塩、抗菌物質等を培地に添加しておくことが好ましい。

[0108] 本発明の細菌の培養条件としては、目的タンパク質の発現が可能な条件であれば、特に限定されず、標準的な細胞培養条件を用いることができる。

[0109] 培養温度としては、２０℃～３７℃が好ましく、ガス組成としては、CO_2濃度が約６％～約８４％であることが好ましく、ｐＨが、約５～約９であることが好ましい。

[0110] また、宿主の性質に応じて好気性、無酸素性、または嫌気性条件下で培養を行うことが好ましい。

[0111] 培養方法としては、細菌をバッチ培養法、流加培養法、連続培養法等の公知の発酵方法を用いて培養する方法が挙げられる。

[0112] バッチ培養法は、発酵開始時に培地組成物に仕込み、宿主を培地に植菌し、ｐＨや酸素濃度等の制御を行いながら細菌の培養を行う方法である。バッチ培養法による培養において、細菌は、穏やかな誘導期から対数増殖期を経て最終的に成長速度が減少または停止する定常期に至る。イソプレノイド化合物は、対数増殖期や定常期の形質転換体によって産出される。

[0113] 流加培養法は、上述したバッチ法に加えて、発酵プロセスが進行するに従い徐々に炭素源を添加する方法である。流加培養法は、カタボライト抑制により細菌の代謝が抑制される傾向があり、培地中の炭素源の量を制限するこ

とが好ましいときに有効である。流加培養法は、制限された量または過剰な量のグルコース等の炭素源を用いて行うことができる。

[0114] 連続培養法は、一定の速度でバイオリアクターに所定量の培地を連続的に供給しながら、同時に同量の培養液を抜き取る培養法である。連続培養法では培養物を一定の高密度に保つことができ、培養液中の細菌は主に対数増殖期にある。

[0115] 適宜、培地の一部または全部を入れ換えることにより、栄養素の補給を行うことができ、細菌の生育に悪影響を及ぼす可能性のある代謝副産物、および死細胞の蓄積を防ぐことができる。

[0116] 発現ベクターがｌａｃプロモーター等の誘導的プロモーターを有している場合には、培養液中に、例えばＩＰＴＧ（イソプロピル－β－チオガラクトピラノシド）等の誘導剤を添加して、目的タンパク質の発現を誘導してもよい。

[0117] 以下、イソプレノイド化合物がイソプレンモノマーである場合を例にとり、これらの方法を説明する。本発明の細菌を培養することにより得られるイソプレンモノマーの生産量の評価方法としては、ヘッドスペース法により気相を採取し、この気相をガスクロマトグラフィー法で分析する方法が挙げられる。

[0118] 詳細には、密封したバイアル中で細菌を含む培養液を振蕩しながら培養したときのヘッドスペース中のイソプレノイド化合物を、標準的なガスクロマトグラフィーを用いて分析する。次いで、検量線を用いて、ガスクロマトグラフィー測定カーブから得られる面積を、細菌のイソプレンモノマー生産量に換算する。

[0119] 本発明の細菌を培養することにより得られるイソプレンモノマーの回収方法としては、ガスストリッピング、分留、あるいは、固相に吸着させたイソプレンモノマーの熱若しくは真空による固相からの脱着、または溶媒による抽出等が挙げられる。

[0120] ガスストリッピングでは、アウトガスから連続的にイソプレンガスを除去

する。このようなイソプレンガスの除去は種々の方法で行うことができ、固相への吸着、液相への分離、またはイソプレンガスを直接凝縮させる方法が挙げられる。

[0121] イソプレンモノマーの回収は一段階または多段階で行うことができる。イソプレンモノマーを一段階で回収する場合には、アウトガスからのイソプレンモノマーの分離と、イソプレンモノマーの液相への変換を同時に行う。イソプレンモノマーをアウトガスから直接凝縮させて液相にすることもできる。イソプレンモノマーを多段階で回収する場合には、オフガスからのイソプレンモノマーの分離と、イソプレンモノマーの液相への変換とを順次行う。例えば、イソプレンモノマーを固相に吸着させ、溶媒で固相から抽出する方法が挙げられる。

[0122] 更に、イソプレンモノマーの回収方法は、イソプレンモノマーを精製する工程が含まれていてもよい。精製工程としては、液相抽出物からの蒸留による分離や各種クロマトグラフィーが挙げられる。

[0123] 本発明はまた、イソプレンポリマーの製造方法を提供する。本発明のイソプレンポリマーの製造方法は、以下（ｉ）および（ｉｉ）を含む：

（ｉ）本発明の方法によりイソプレンモノマーを生成すること；

（ｉｉ）イソプレンモノマーを重合してイソプレンポリマーを生成すること。

[0124] 工程（ｉ）は、上述した本発明のイソプレンモノマーの製造方法と同様にして行うことができる。工程（ｉｉ）におけるイソプレンモノマーの重合は、当該分野で公知の任意の方法（例、有機化学的な合成法）により行うことができる。

実施例

[0125] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0126] 実施例１

（１－１）エシェリヒア・コリ由来ＩＤＩ発現プラスミドの構築

配列番号１で示したイソプレンシンターゼ発現プラスミドｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－Ｍｍａｍｖｋ（ＷＯ２０１５／０５６８１３Ａ１）を鋳型に、配列番号２、３に示したオリゴヌクレオチドを用いてＰＣＲ（ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ（登録商標）　ＧＸＬ　ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ；９２℃　１０秒、５４℃　２０秒、７２℃　６０秒、４０サイクル）を実施し、ｍｖｋ（ｍｖａ）遺伝子を除くＤＮＡ断片（Ａ）を取得した。次に、エシェリヒア・コリ由来ＩＤＩをコードするｉｄｉ遺伝子断片の取得を実施した。エシェリヒア・コリＫ－１２株のゲノムの全塩基配列（Ｇｅｎｂａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　ＮＯ．Ｕ００００９６）は既に明らかにされている（Ｓｃｉｅｎｃｅ，２７７，１４５３－１４７４（１９９７））。本配列を基にｉｄｉ遺伝子のクローニングを行った。配列番号４、５に示したオリゴヌクレオチドを用いて、エシェリヒア・コリ　ＭＧ１６５５株（ＡＴＣＣ４７０７６，ＡＴＣＣ７００９２６）のゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行い、エシェリヒア・コリ由来ｉｄｉ遺伝子断片（Ｂ）（配列番号６）を得た。エシェリヒア・コリ由来ＩＤＩのアミノ酸配列を配列番号７に記載する。ＤＮＡ断片（Ａ）とエシェリヒア・コリ由来ｉｄｉ遺伝子断片（Ｂ）をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（Ｒ）　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔを用いて連結させ、イソプレンシンターゼとエシェリヒア・コリ由来ｉｄｉの共発現プラスミドｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ｅｃｏＩＤＩを構築した。ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ｅｃｏＩＤＩの塩基配列を配列番号８に記載する。

[0127] （１－２）放線菌由来ＩＤＩ発現プラスミドの構築

放線菌由来ＩＤＩをコードする２種類のｉｄｉ遺伝子断片の取得を実施した。２種類の異なる放線菌由来ＩＤＩを人工遺伝子合成により取得した。配列番号９、１０で示したＦＧＫ８５８ｉｄｉとＣＳ７９ｉｄｉ遺伝子を人工合成し、ｐＵＣ５７にクローニングされたｐＵＣ－ＦＧＫ８５８ＩＤＩ（配列番号１１）、ｐＵＣ－ＣＳ７９ＩＤＩ（配列番号１２）を取得した（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ社に合成依頼）。ＦＧＫ８５８ＩＤＩとＣＳ７９ＩＤＩのア

ミノ酸配列を、配列番号１３、１４に記載する。ｐＵＣ－ＦＧＫ８５８ＩＤＩを鋳型に、配列番号１５、１６で示したオリゴヌクレオチドを用いてＰＣＲ（ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ（登録商標） ＧＸＬ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ；９２℃ １０秒、５４℃ ２０秒、７２℃ ６０秒、４０サイクル）を実施し、ＦＧＫ８５８ｉｄｉ遺伝子断片（Ｃ）を取得した。前項で得られたＤＮＡ断片（Ａ）と放線菌由来ＦＧＫ８５８ｉｄｉ遺伝子断片（Ｃ）をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標） ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔを用いて連結させ、イソプレンシンターゼと放線菌由来ＦＧＫ８５８ＩＤＩの共発現プラスミドｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＦＧＫ８５８ＩＤＩを構築した。ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＦＧＫ８５８ＩＤＩの塩基配列を配列番号１７に記載する。

[0128] 同様にＣＳ７９ｉｄｉ遺伝子のクローニングを実施した。ｐＵＣ－ＣＳ７９ＩＤＩを鋳型に、配列番号１８、１９で示したオリゴヌクレオチドを用いてＰＣＲ（ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ（登録商標） ＧＸＬ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ；９２℃ １０秒、５４℃ ２０秒、７２℃ ６０秒、４０サイクル）を実施し、ＣＳ７９ｉｄｉ遺伝子断片（Ｄ）を取得した。前項で得られたＤＮＡ断片（Ａ）と放線菌由来ＣＳ７９ｉｄｉ遺伝子断片（Ｄ）をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標） ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔを用いて結合させ、イソプレンシンターゼと放線菌由来ＣＳ７９ＩＤＩの共発現プラスミドｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＣＳ７９ＩＤＩを構築した。ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＣＳ７９ＩＤＩの塩基配列を配列番号２０に記載する。

[0129] （１－３）エシェリヒア・コリ由来イソプレン生産菌の構築

イソプレン生産能が付与されたエシェリヒア・コリを構築した。上記で得られた３種類の共発現プラスミド、ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ｅｃｏＩＤＩ、ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＦＧＫ８５８ＩＤＩ、ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＣＳ７９ＩＤＩ、とｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ(Ｍ)（ＷＯ２０１３／１７９７２２の実

施例３参照）をエシェリヒア・コリＭＧ１６５５株に電気パルス法により導入した。その後、クロラムフェニコール４０μｇ／ｍｌを含むＬＢ寒天培地に塗布し、３４℃で約１６時間培養した。出現したコロニーを純化し、定法によりプラスミドを抽出し、目的のプラスミドが導入されていることを確認した。得られた株をそれぞれＭＧ１６５５／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ｅｃｏＩＤＩ株、ＭＧ１６５５／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＦＧＫ８５８ＩＤＩ株、ＭＧ１６５５／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＣＳ７９ＩＤ株、ＭＧ１６５５／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）と命名した。

[0130] （１－４）パントエア・アナナティス由来イソプレン生産菌の構築

前項と同様に、イソプレン生産能が付与されたパントエア・アナナティスを構築した。上記で得られた３種類の共発現プラスミド、ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ｅｃｏＩＤＩ、ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＦＧＫ８５８ＩＤＩ、ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＣＳ７９ＩＤＩとｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）（ＷＯ２０１３／１７９７２２）を用いて、パントエア・アナナティスＳＣ１７（０）株に電気パルス法により導入した。その後、クロラムフェニコール４０μｇ／ｍｌを含むＬＢ寒天培地に塗布し、３４℃で約１６時間培養した。出現したコロニーを純化し、定法によりプラスミドを抽出し、目的のプラスミドが導入されていることを確認した。得られた株をそれぞれＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ｅｃｏＩＤＩ株、ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＦＧＫ８５８ＩＤＩ株、ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＣＳ７９ＩＤＩ株、ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）株と命名した。

[0131] （１－５）エシェリヒア・コリ由来イソプレン生産菌のイソプレン生産量の測定

エシェリヒア・コリにおいて、各ＩＤＩの発現強化がイソプレン生産能に及ぼす影響を評価した。ＭＧ１６５５／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ

（Ｍ）－ｅｃｏＩＤＩ株、ＭＧ１６５５／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＦＧＫ８５８ＩＤＩ株、ＭＧ１６５５／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＣＳ７９ＩＤＩ株、ＭＧ１６５５／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）株を、クロラムフェニコール４０μｇ／ｍｌを含むＬＢプレートに均一に塗布し、３４℃にて１６時間培養した。得られたプレートから、１白金耳分の菌体を、ヘッドスペースバイアル中のＭ９グルコース培地１ｍＬに接種し、ヘッドスペースバイアル用キャップブチルゴムセプタム付（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製ＣＲＩＭＰＳ　ｃａｔ＃Ｂ０１０４２４０）で密栓後、往復振とう培養装置（１２０ｒｐｍ）で、３０℃にて４８時間培養を行った。培養終了後、バイアルの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ィーにより測定し、ＯＤ値は分光光度計（ＨＩＴＡＣＨＩ　Ｕ－２９００）によって６００ｎｍで測定した。表３に各菌株の培養終了時のイソプレン濃度とＯＤ値を記載した。

[0132] 以下にガスクロマトグラフィーの分析条件とＭ９培地の組成を記載する。

[0133] Ｈｅａｄｓｐａｃｅ　Ｓａｍｐｌｅｒ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製　Ｔｕｒｂｏ　Ｍａｔｒｉｘ　４０）

バイアル保温温度　４０℃

バイアル保温時間　３０ｍｉｎ

加圧時間　３．０ｍｉｎ

注入時間　０．０２ｍｉｎ

ニードル温度　７０℃

トランスファー温度　８０℃

キャリアガス圧力（高純度ヘリウム）　１２４ｋＰａ

[0134] ガスクロマトグラフィー（島津社製　ＧＣ－２０１０　Ｐｌｕｓ　ＡＦ）

カラム（Ｒｘｉ（登録商標）－１ｍｓ：長さ３０ｍ、内径０．５３ｍｍ、液相膜厚１．５μｍ　ｃａｔ＃１３３７０）

カラム温度　３７℃

圧力　２４．８ｋＰａ

カラム流量　５ｍＬ／ｍｉｎ

流入方法　スプリット　１：０（実測１：１８）

トランスファー流量　９０ｍＬ

ＧＣ注入量　１．８ｍＬ（トランスファー流量×注入時間）

カラムへの試料注入量　０．１ｍＬ

注入口温度　２５０℃

検出機　ＦＩＤ（水素　４０ｍＬ／ｍｉｎ、空気　４００ｍＬ／ｍｉｎ、メイクアップガス　ヘリウム　３０ｍＬ／ｍｉｎ）

検出器温度　２５０℃

[0135] （１－６）イソプレン標準試料の調製

試薬イソプレン（比重０．６８１）を冷却したメタノールで１０、１００、１０００、１００００、１０００００倍希釈し、添加用標準溶液を調製した。その後、水１ｍＬを入れたヘッドスペースバイアルに各添加用標準溶液を、それぞれ１μＬ添加し、標準試料とした。

[0136] [表2]

表２　Ｍ９グルコース培地組成（１Ｌに含まれる各試薬の濃度）

試薬	終濃度
Glucose	3.0 g/L
Na_2HPO_4	6.0 g/L
KH_2PO_4	3.0 g/L
NaCl	0.5 g/L
NH_4Cl	1.0 g/L
$MgSO_4$	1mM
$CaCl_2$	0.1 mM
クロラムフェニコール	60 mg/L

[0137] 培地を調製後、フィルター滅菌を実施した。

[0138] [表3]

表３　エシェリヒア・コリにおいて、各種IDIの発現強化がイソプレン生産能に及ぼす影響

株名	OD_{600}	イソプレン濃度(mg/L)
MG1655/pSTV28-Ptac-ispS(M)	4.35±0.26	0.016±0.001
MG1655/pSTV28-Ptac-ispS(M)-ecoIDI	3.95±0.11	0.158±0.012
MG1655/pSTV28-Ptac-ispS(M)-FGK858IDI	3.66±0.05	0.334±0.032
MG1655/pSTV28-Ptac-ispS(M)-CS79IDI	4.29±0.20	0.136±0.015

[0139] 表中の各値は、ｎ＝４の平均値を表す。

[0140] （１－７）パントエア・アナナティス由来イソプレン生産菌のイソプレン生産量の測定

前項と同様に、パントエア・アナナティスにおいて、各ＩＤＩの発現強化がイソプレン生産能に及ぼす影響を評価した。ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ｅｃｏＩＤＩ株、ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＦＧＫ８５８ＩＤＩ株、ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）－ＣＳ７９ＩＤＩ株、ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－Ｐｔａｃ－ｉｓｐＳ（Ｍ）株を、クロラムフェニコール４０μｇ／ｍｌを含むＬＢプレートに均一に塗布し、３４℃にて１６時間培養した。得られたプレートから、１白金耳分の菌体を、ヘッドスペースバイアル中のＭ９グルコース培地１ｍＬに接種し、ヘッドスペースバイアル用キャップブチルゴムセプタム付（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製ＣＲＩＭＰＳ　ｃａｔ＃Ｂ０１０４２４０）で密栓後、往復振とう培養装置（１２０ｒｐｍ）で、３０℃にて４８時間培養を行った。培養終了後、バイアルの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ィーにより測定し、ＯＤ値は分光光度計（ＨＩＴＡＣＨＩ　Ｕ－２９００）によって６００ｎｍで測定した。表４に各菌株の培養終了時のイソプレン濃度とＯＤ値を記載した。

[0141] [表4]

表４　パントエア・アナナティスにおいて、各種IDIの発現強化がイソプレン生産能に及ぼす影響

株名	OD_{600}	イソプレン濃度(mg/L)
SC17(0)/pSTV28-Ptac-ispS(M)	3.64±0.15	0.027±0.006
SC17(0)/pSTV28-Ptac-ispS(M)-ecoIDI	3.32±0.48	0.208±0.093
SC17(0)/pSTV28-Ptac-ispS(M)-FGK858IDI	3.44±0.20	0.407±0.025
SC17(0)/pSTV28-Ptac-ispS(M)-CS79IDI	4.03±0.18	0.230±0.039

[0142] 表中の各値は、ｎ＝４の平均値を表す。

[0143] 実施例２（イソペンテニル２リン酸イソメラーゼ（ＩＤＩ）の活性測定）

（２－１）ＩＤＩの遺伝子クローニング

表５のようなプライマーを設計し、放線菌Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．ＣＳ７９株およびＦＧＫ８５８株のゲノムＤＮＡをテンプレートとしてＰＣＲを行うことで目的遺伝子断片を得た。増幅した断片をｐＴ７Ｂｌｕｅ Ｔ－ｖｅｃｔｏｒ（Ｎｏｖａｇｅｎ）にクローニングし、塩基配列を確認後、タンパク質発現用ベクターｐＨＩＳ８［Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ．，ｖｏｌ．３９，ｎｏ．５，ｐｐ．８９０－９０２，２０００］にサブクローニングした。Ｎ末端にヒスチジンタグを付加した組換えタンパク質の生産には、発現用プラスミドを導入したＥ．ｃｏｌｉ ＢＬ２１（ＤＥ３）株を用いた。培養条件や精製方法を以下に記す。

[0144] なお、コントロールとして活性測定に使用する大腸菌由来ＩＤＩ（ｅｃＩＤＩ）は、ｐＱＥ－３０ ｖｅｃｔｏｒ（ＱＩＡＧＥＮ）にｅｃＩＤＩ遺伝子をサブクローニングした発現用プラスミドが構築済みであり（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ｖｏｌ．９８，ｎｏ．３，ｐｐ．９３２－９３７，２０００）、定法に従いＥ．ｃｏｌｉ ＪＭ１０９株を用いて組換えタンパク質を調製した。

[0145] [表5]

表５．ＩＤＩクローニング用プライマー

プライマー名	配列
cs79IDInFW	5'-GGGgatccACCACGGAAACCTCCGGCGGCCCC-3'（配列番号２１）
cs79IDInRV	5'-GGGaagcttTCACCAGCCGCCGCCCGGCGCGAC-3'（配列番号２２）
fgk858IDInFw	5'-GGGccatgggACCTCTGTGCAAGCCACCGGAA-3'（配列番号２３）
fgk858IDInRv	5'-GGGaagcttCTACCAGCCGCCCCCCGG-3'（配列番号２４）

[0146] （２－２）組換えタンパク質の発現と精製

組換えタンパク質発現用プラスミドを導入したＥ．ｃｏｌｉ ＢＬ２１（ＤＥ３）株を、ＬＢ＋５０μｇ／ｍｌ ｋａｎａｍｙｃｉｎ培地で前培養後、ＴＢ＋５０μｇ／ｍｌ ｋａｎａｍｙｃｉｎ培地に２％植菌してOD_{600}＝０．５になるまで培養し、そののち終濃度０．１ｍＭとなるようＩＰＴＧを添加して、さらに１８℃で１６時間振盪培養（１２０ｓｔｒｏｋｅｓ／ｍｉｎ）した。培養液を集菌し、Ｗａｓｈ Ｂｕｆｆｅｒに懸濁した後、超音波破砕した。菌体破砕液は４５，１００ｇで２０分遠心し、回収した上清をＮｉ－

ＮＴＡ ｓｕｐｅｒｆｌｏｗ（ＱＩＡＧＥＮ)のオープンカラムにアプライし、Ｗａｓｈ Ｂｕｆｆｅｒで洗浄を行った後、Ｅｌｕｔｉｏｎ Ｂｕｆｆｅｒを用いて目的タンパク質を溶出させた。目的タンパク質を含む画分をＶＩＶＡ ＳＰＩＮ２０（１０，０００ ＭＷＣＯ ＰＥＳ）で濃縮し、目的の可溶性タンパク質を得た（図２を参照）。

[0147] （Ｗａｓｈ Ｂｕｆｆｅｒ）

５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ(ｐＨ８．０）

０．５Ｍ ＮａＣｌ

２０ｍＭ Ｉｍｉｄａｚｏｌｅ（ｐＨ８．０）

[0148] （Ｅｌｕｔｉｏｎ Ｂｕｆｆｅｒ）

５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ(ｐＨ８．０）

０．５Ｍ ＮａＣｌ

２５０ｍＭ Ｉｍｉｄａｚｏｌｅ（ｐＨ８．０）

[0149] （２－３）イソペンテニル２リン酸イソメラーゼの活性測定

ｅｃＩＤＩ（コントロール）、ｃｓ７９ＩＤＩ、ｆｇｋ８５８ＩＤＩの３種類のＩＤＩについて、ＩＰＰからＤＭＡＰＰへの異性化反応およびＤＭＡＰＰからＩＰＰへの異性化反応がそれぞれどのような割合で進行するかを明らかにするため、そのストイキオメトリーを検討した。

[0150] 表６に示した酵素反応溶液（酵素は添加せず）をＮＭＲサンプルチューブ（φ３ｍｍ）に移し、ＪＥＯＬ ＥＣＡ－６００ ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｅｒで^{1}Ｈ－ＮＭＲを測定した。その後、サンプルチューブ内の反応溶液に酵素を添加し、ＮＭＲ機器内（２７℃前後を維持）で６０～１２０分間反応させた。この間、１０～１５分の間隔で^{1}Ｈ－ＮＭＲの測定を行い、ＩＰＰの５位水素原子（１．６５ｐｐｍ）、およびＤＭＡＰＰの５位水素原子（１．６０ｐｐｍ）のそれぞれのピーク面積の経時変化を記録することで（図３）、そのストイキオメトリーを算出した。

[0151]

[表6]

表６．酵素反応溶液(300μl)

50mM	imidazole pH7.5
5mM	$MgCl_2$
6.7mM	IPP or DMAPP
1.0mg/ml	enzyme

[0152] （２－４）結果

^{1}Ｈ－ＮＭＲのピーク面積から算出したストイキオメトリーを図４に示す。左側のグラフはＩＰＰを、右側のグラフはＤＭＡＰＰを開始基質とした各酵素の異性化反応を示している。実験の結果、添加した酵素にかかわらず、すべての反応系において平衡状態に達した時の基質と生成物の割合はほぼＩＰＰ：ＤＭＡＰＰ＝２：３となることがわかった。さらに、ＩＰＰまたはＤＭＡＰＰを開始基質に用いたいずれの反応系においても、ｃｓ７９ＩＤＩおよびｆｇｋ８５８ＩＤＩはｅｃＩＤＩよりも早く平衡状態に到達した。

[0153] 図４左図（ＩＰＰ→ＤＭＡＰＰ）において、ＩＰＰとＤＭＡＰＰの濃度が１：１の時の反応時間を比較すると、ｅｃＩＤＩが約７５分後であるのに対し、ｃｓ７９ＩＤＩで約２２分後、ｆｇｋ８５８ＩＤＩで約３０分後となっている。逆反応（ＤＭＡＰＰ→ＩＰＰ）でも同様に、ｃｓ７９ＩＤＩおよびｆｇｋ８５８ＩＤＩの異性化反応はｅｃＩＤＩよりも進行が早く、反応を開始して３０～４０分後には平衡に達している。以上のｉｎ　ｖｉｔｒｏ実験の結果より、放線菌の二次代謝関連遺伝子クラスター内に存在するｃｓ７９ＩＤＩおよびｆｇｋ８５８ＩＤＩは、大腸菌由来ｅｃＩＤＩと比較して優れたＩＰＰとＤＭＡＰＰの異性化活性を有していることが明らかである。

[0154] 実施例３（種々のイソペンテニル二リン酸イソメラーゼのアミノ酸配列の同一性確認）

以下に列記するイソペンテニル二リン酸イソメラーゼのアミノ酸配列の相同性分析を行った。分析条件および結果を表７に示す。

[0155] ・ＣＳ７９：Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｓｐ．ＣＳ７９由来のイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ（配列番号１４）

・ＦＧＫ８５８：Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．ＦＧＫ８５８由来のイソペンテニルニリン酸イソメラーゼ（配列番号１３）

・ＣＬ１９０：Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．ＣＬ１９０由来のイソペンテニルニリン酸イソメラーゼ（非特許文献１、ＧｅｎＰｅｐｔ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ ｎｕｍｂｅｒ：ＢＡＢ０７７９３．１、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｓｖｉｅｗｅｒ／ｖｉｅｗｅｒ．ｆｃｇｉ？ｄｂ＝ｐｒｏｔｅｉｎ＆ｔｅｒｍ＝ＢＡＢ０７７９３．１＆ｒｅｐｏｒｔ＝ｇｅｎｐｅｐｔ）

・Ｋ．ｇｒｉｓｅｏｌａ：Ｋｉｔａｓａｔｏｓｐｏｒａ ｇｒｉｓｅｏｌａ由来のイソペンテニルニリン酸イソメラーゼ（非特許文献２、ＧｅｎＰｅｐｔ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ ｎｕｍｂｅｒ：ＢＡＢ０７８２０．１、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｓｖｉｅｗｅｒ／ｖｉｅｗｅｒ．ｆｃｇｉ？ｄｂ＝ｐｒｏｔｅｉｎ＆ｔｅｒｍ＝ＢＡＢ０７８２０．１＆ｒｅｐｏｒｔ＝ｇｅｎｐｅｐｔ）

・Ｓ．ｖｉｏｌａｃｅｕｓｎｉｇｅｒ：Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｏｌａｃｅｕｓｎｉｇｅｒ Ｔｕ ４１１３由来のイソペンテニルニリン酸イソメラーゼ、ＧｅｎＰｅｐｔ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ ｎｕｍｂｅｒ：ＡＥＭ８２５４２．１、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｓｖｉｅｗｅｒ／ｖｉｅｗｅｒ．ｆｃｇｉ？ｄｂ＝ｐｒｏｔｅｉｎ＆ｔｅｒｍ＝ＡＥＭ８２５４２．１＆ｒｅｐｏｒｔ＝ｇｅｎｐｅｐｔ）

・Ｅ．ｃｏｌｉ：Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＭＧ１６５５由来のイソペンテニルニリン酸イソメラーゼ（配列番号２５）

[0156]

[表7]

表７

配列1名称	CS79		FGK858		CL190		K. griseola		S. violaceusniger	
配列2名称	一致度	ギャップ	一致度	ギャップ	一致度	ギャップ	一致度	ギャップ	一致度	ギャップ
FGK858	144/190 (75.8%)	0/190 (0.0%)								
CL190	36/385 (9.4%)	217/385 (56.4%)	34/413 (8.2%)	273/413 (66.1%)						
K. griseola	59/422 (14.0%)	290/422 (68.7%)	44/403 (10.9%)	252/403 (62.5%)	289/364 (79.4%)	1/364 (0.3%)				
S. violaceusniger	121/203 (59.6%)	13/203 (6.4%)	128/203 (63.1%)	13/203 (6.4%)	51/393 (13.0%)	220/393 (56.0%)	54/401 (13.5%)	235/401 (58.6%)		
E. coli	60/213 (28.2%)	54/213 (25.4%)	60/206 (29.1%)	40/206 (19.4%)	45/379 (11.9%)	213/379 (56.2%)	47/387 (12.1%)	228/387 (58.9%)	65/211 (30.8%)	37/211 (17.5%)

[0157] 〔表７の脚注〕

一致度：ペアワイズアラインメントにおいて｛一致した残基数｝／｛アラインメント全長｝、およびその結果を％にて表記

ギャップ：ペアワイズアラインメントにおいて｛ギャップを生じた残基数｝／｛アラインメント全長｝、およびその結果を％にて表記

アラインメントはＥＭＢＯＳＳのｎｅｅｄｌｅを利用した。同プログラムはｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ．ｎｌ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ｅｍｂｏｓｓ／ｎｅｅｄｌｅにて利用可能である。

[0158] Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．ＦＧＫ８５８由来のイソペンテニルニリン酸イソメラーゼおよびＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．ＣＳ７９由来のイソペンテニルニリン酸イソメラーゼは高い同一性を示した。斯かる同一性が高いことは、この数値を、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．ＦＧＫ８５８由来のイソペンテニルニリン酸イソメラーゼおよびＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．ＣＳ７９由来のイソペンテニルニリン酸イソメラーゼのそれぞれと、既知で最も同一性の高いＳ．ｖｉｏｌａｃｅｕｓｎｉｇｅｒ由来の同酵素との同一性を比較することにより明白であった。

産業上の利用可能性

[0159] 本発明の方法は、イソプレノイド化合物の製造に有用である。

請求の範囲

[請求項1] 以下の（Ａ－１）～（Ｂ－３）からなる群より選ばれるタンパク質を発現する細菌を培養培地中で培養してイソプレノイド化合物を生成することを含む、イソプレノイド化合物の製造方法。

（Ａ－１）配列番号１３の全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

（Ａ－２）配列番号１３の全長アミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質；

（Ａ－３）配列番号１３の全長アミノ酸配列において１個または数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加または挿入されているアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質；

（Ｂ－１）配列番号１４の全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

（Ｂ－２）配列番号１４の全長アミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質；

（Ｂ－３）配列番号１４の全長アミノ酸配列において１個または数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加または挿入されているアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質。

[請求項2] 前記タンパク質が放線菌に由来する、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記細菌は、前記タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む異種発現単位を含む、請求項１または２に記載の方法。

[請求項4] 前記ポリヌクレオチドは、以下の（ａ－１）～（ｃ）からなる群より選ばれる１または２以上のポリヌクレオチドである、請求項３に記載の方法。

（ａ－１）配列番号９の全長塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（ａ－２）配列番号９の全長塩基配列と９０％以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ａ－３）配列番号９の全長塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｂ－１）配列番号１０の全長塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（ｂ－２）配列番号１０の全長塩基配列と９０％以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｂ－３）配列番号１０の全長塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｃ）（ａ－１）～（ｂ－３）からなる群より選ばれるポリヌクレオチドの縮重変異体。

[請求項5] 前記細菌が、メチルエリスリトールリン酸経路および／またはメバロン酸経路によるイソペンテニル二リン酸またはジメチルアリル二リン酸の合成能を有する、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項6] 前記細菌は、イソプレノイド化合物合成活性を有するタンパク質をさらに発現する細菌である、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項7] 前記細菌は、腸内細菌科に属する細菌である、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。

[請求項8] 前記細菌は、エシェリヒア属またはパントエア属に属する細菌である、請求項７に記載の方法。

[請求項9] 前記細菌がエシェリヒア・コリまたはパントエア・アナナティスで

ある、請求項７または８に記載の方法。

[請求項10] 以下の（Ａ－１）～（Ｂ－３）からなる群より選ばれるタンパク質：

（Ａ－１）配列番号１３の全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

（Ａ－２）配列番号１３の全長アミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質；

（Ａ－３）配列番号１３の全長アミノ酸配列において１個または数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加または挿入されているアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質；

（Ｂ－１）配列番号１４の全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

（Ｂ－２）配列番号１４の全長アミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質；

（Ｂ－３）配列番号１４の全長アミノ酸配列において１個または数個のアミノ酸残基が欠失、置換、付加または挿入されているアミノ酸配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質。

[請求項11] 放線菌に由来する、請求項１０に記載のタンパク質。

[請求項12] 以下の（ａ－１）～（ｃ）からなる群より選ばれるポリヌクレオチド：

（ａ－１）配列番号９の全長塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（ａ－２）配列番号９の全長塩基配列と９０％以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ａ－３）配列番号９の全長塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ

イソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｂ－１）配列番号１０の全長塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（ｂ－２）配列番号１０の全長塩基配列と９０％以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｂ－３）配列番号１０の全長塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｃ）（ａ－１）～（ｂ－３）からなる群より選ばれるポリヌクレオチドの縮重変異体。

[請求項13] 請求項１０または１１に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド、または請求項１２に記載のポリヌクレオチド、およびそれに作動可能に連結された異種プロモーターを含む、発現ベクター。

[請求項14] 請求項１３に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

[請求項15] 請求項１４に記載の宿主細胞を用いて前記タンパク質を産生することを含む、タンパク質の製造方法。

[請求項16] 請求項１０または１１に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む異種発現単位を含む、細菌。

[請求項17] 前記細菌は、腸内細菌科に属する細菌である、請求項１６に記載の細菌。

[請求項18] エシェリヒア属またはパントエア属に属する細菌である、請求項１６または１７に記載の細菌。

[請求項19] エシェリヒア・コリまたはパントエア・アナナティスである、請求項１６～１８のいずれか１項に記載の細菌。

[図1]

```
#=======================================
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: FGK858
# 2: CS79
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 190
# Identity:    144/190 (75.8%)
# Similarity:  159/190 (83.7%)
# Gaps:          0/190 ( 0.0%)
# Score: 768
#
#
#=======================================

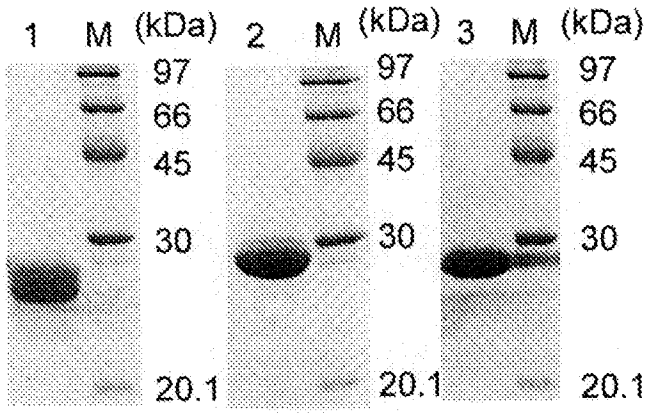
FGK858              1 MTSVQATGTTTEPILLELVDDDGRTIGVAEKLSAHQAPGRLHRAFSVFLF     50
                      ||:..:.|...|||||||||::||||||||||||||||.||||||||||
CS79                1 MTTETSGGPAAEPILLELVDEEGRTIGVAEKLSAHQAPGHLHRAFSVFLF     50

FGK858             51 DSDGRMLLQQRAHTKYHSPGVWSNTCCGHPYPDEPPHVAAARRVREELGL    100
                      |::|||||||||.||||||||||||||||||||||...||||||.|||||
CS79               51 DTEGRMLLQQRALTKYHSPGVWSNTCCGHPYPDEPAQEAAARRVGEELGL    100

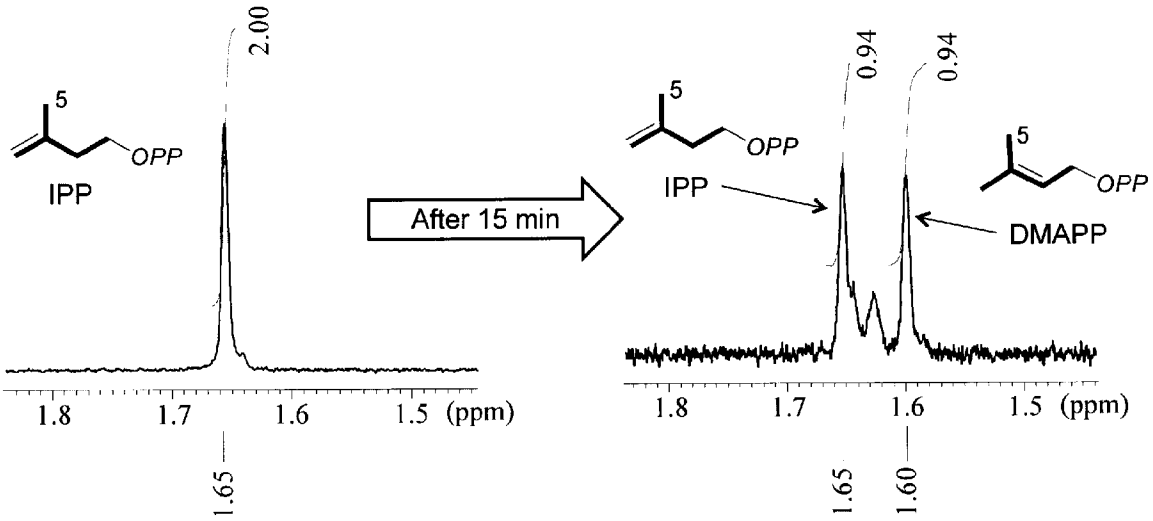
FGK858            101 ENLSLEAAGTVTYEHPDDISGLVEKEYNHLFVGVVDEKPEPDPAEVGDFR    150
                      ..:.||.||||||||||:||||||||||||||:|.:.|||||||:.|:|
CS79              101 HGVPLEPAGTVTYEHPDEISGLVEKEYNHLFVGLVKDTPEPDPAEIHDYR    150

FGK858            151 YVNRAELDDLRGQEPFSAWFMTVLNAATPGMVRVAPGGGW    190
                      :|...||..||.:..|||||.|||.||.||:.||||||||
CS79              151 FVTSGELAALRAETSFSAWFPTVLEAALPGVRRVAPGGGW    190
```

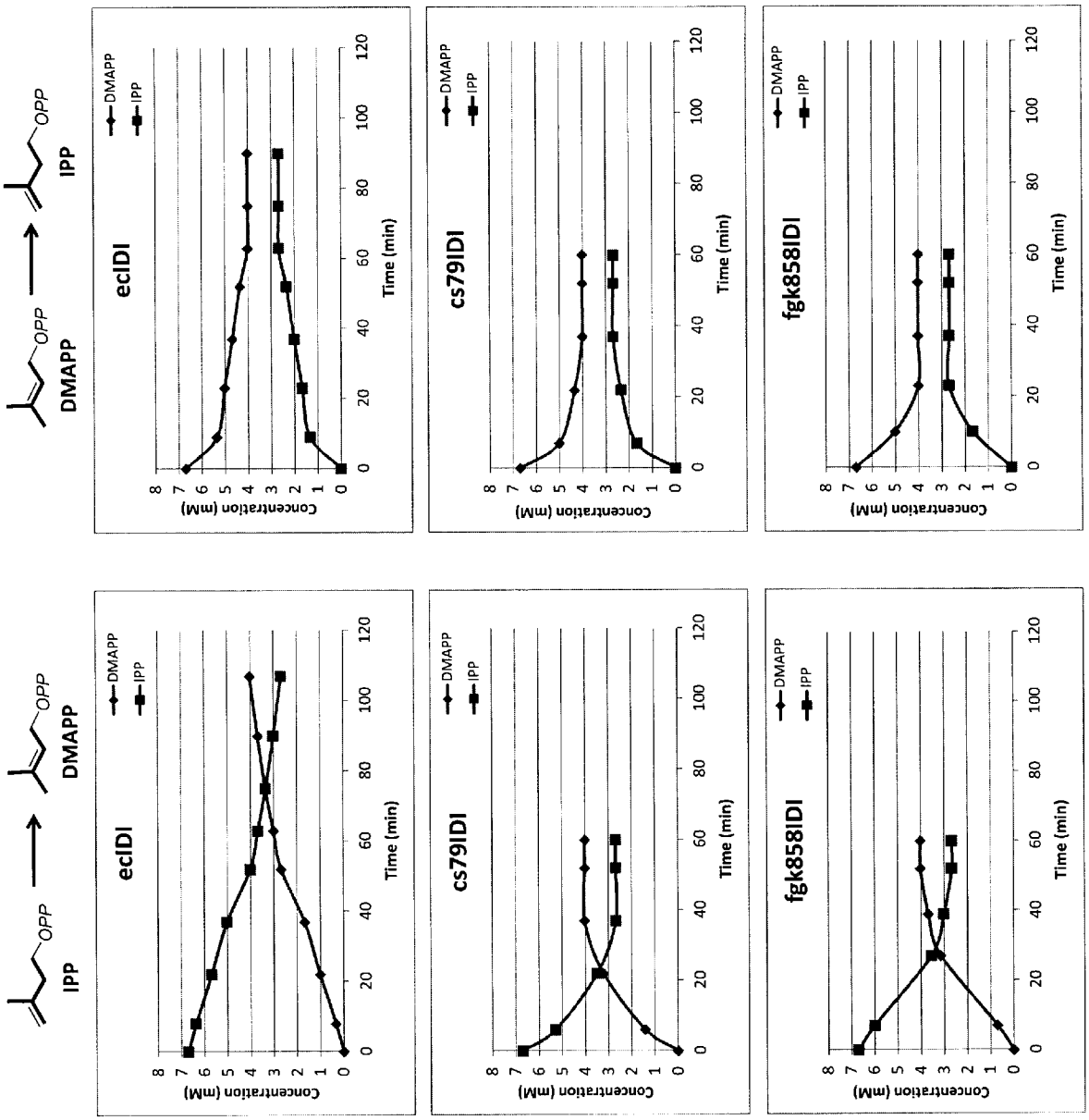
[図2]


1
M
(kDa)
97
66
45
30
20.1
2
M
(kDa)
97
66
45
30
20.1
3
M
(kDa)
97
66
45
30
20.1

[図3]


5
OPP
IPP
2.00
1.8
1.7
1.6
1.5
(ppm)
1.65
After 15 min
5
OPP
IPP
0.94
0.94
5
OPP
DMAPP
1.8
1.7
1.6
1.5
(ppm)
1.65
1.60

[図4]


IPP
OPP
DMAPP
OPP
DMAPP
OPP
IPP
ecIDI
cs79IDI
fgk858IDI
DMAPP
IPP
Concentration (mM)
Time (min)
0
20
40
60
80
100
120
1
2
3
4
5
6
7
8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/004729

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/90(2006.01)i, C12P5/02(2006.01)i

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)
Int.Cl. C12N15/09, C12N1/21, C12N9/90, C12P5/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2011-505841 A (DANISCO US INC.) 03 March 2011, claims & US 2009/0203102 A1, claims & WO 2009/076676 A2 & EP 2235190 A2 & KR 10-2010-0118973 A & CN 102027124 A	1-19
X	"IPP isomerase [Streptomyces sp. MA37]" [31-DEC-2015]	
Y	Retrieved from GenBank [online] Accession no. ALL53316 [retrieved on 01 March 2018] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/943591793?sat=4&satkey=156076155]	10-12 1-19
X	"isopenteny1-diphosphate delta-isomerase	10-12
Y	[Streptomyces sp. PRh5]" [12-MAR-2014] Retrieved from GenBank [online] Accession no. EXU63102 [retrieved on 01 March 2018] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/594127790?sat=37&satkey=180203812]	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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 02 March 2018 (02.03.2018)	Date of mailing of the international search report 13 March 2018 (13.03.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／００４７２９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/90(2006.01)i, C12P5/02(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09, C12N1/21, C12N9/90, C12P5/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１８年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	JP 2011-505841 A（ダニスコ・ユーエス・インク）2011.03.03, 特許請求の範囲 & US 2009/0203102 A1, claims & WO 2009/076676 A2 & EP 2235190 A2 & KR 10-2010-0118973 A & CN 102027124 A	1-19
X Y	"IPP isomerase [Streptomyces sp. MA37]" [31-DEC-2015] Retrieved from GenBank [online] Accession no. ALL53316 [retrieved on 1 Mar 2018] URL:[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/943591793?sat=4&satkey=156076155]	10-12 1-19

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０２．０３．２０１８	１３．０３．２０１８

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　４０４６
川合　理恵
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	″isopentenyl-diphosphate delta-isomerase [Streptomyces sp. PRh5]″ [12-MAR-2014] Retrieved from GenBank [online] Accession no.EXU63102 [retrieved on 1 Mar 2018] URL:[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/594127790?sat=37&satkey=180203812]	10-12 1-19