

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-509691

(P2011-509691A)

(43) 公表日 平成23年3月31日(2011.3.31)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
C 1 2 P 7/42 (2006.01)	C 1 2 P 7/42	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 118 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-544425 (P2010-544425)
 (86) (22) 出願日 平成21年1月22日 (2009. 1. 22)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年9月17日 (2010. 9. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/031737
 (87) 国際公開番号 W02009/094485
 (87) 国際公開日 平成21年7月30日 (2009. 7. 30)
 (31) 優先権主張番号 61/022, 804
 (32) 優先日 平成20年1月22日 (2008. 1. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/059, 256
 (32) 優先日 平成20年6月5日 (2008. 6. 5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510199890
 ジェノマティカ、 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 21, サン ディエゴ, ウォーターリ
 ヅジ サークル 10520
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 バーク, マーク
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 30, サン ディエゴ, インターメゾ
 ウェイ 12634

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 合成ガスまたは他のガス状炭素源およびメタノールを利用するための方法および生物体

(57) 【要約】

本発明は、アセチルC o A 経路ならびに合成ガスまたは合成ガスおよびメタノールを利用する能力を有する、天然に存在しない微生物の生物体を提供する。一実施形態では、本発明は、天然に存在しない微生物であって、C O、C O₂ および/またはH₂ をアセチル補酵素A (アセチルC o A)、メチルトetraヒドロ葉酸 (メチルT H F) または他の所望の生成物に変換する経路を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下で、C OまたはC O₂ およびH₂ をアセチルC o AまたはメチルT H Fに変換する能力を欠く微生物を提供する。

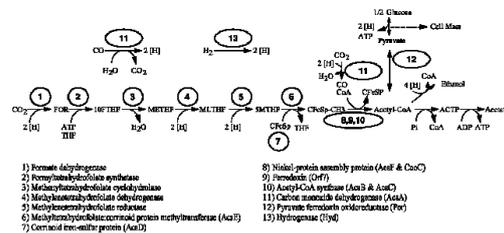


FIG. 6

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

天然に存在しない微生物であって、COおよびH₂をアセチル補酵素A（アセチルCoA）に変換する経路を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下でCOおよびH₂をアセチルCoAに変換する能力を欠く微生物。

【請求項 2】

前記1つまたは複数の外因性タンパク質が、コバラミドコリノイド/鉄-硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、アセチルCoAシンターゼ、アセチルCoAシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼから選択される、請求項1に記載の天然に存在しない微生物。

10

【請求項 3】

コバラミドコリノイド/鉄-硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、アセチルCoAシンターゼ、アセチルCoAシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼがそれぞれ発現される、請求項2に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 4】

天然に存在しない微生物であって、COおよびH₂を含む合成ガスをアセチル補酵素A（アセチルCoA）に変換する経路を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下でCOおよびH₂をアセチルCoAに変換する能力を欠く微生物。

20

【請求項 5】

前記合成ガスがCO₂をさらに含む、請求項4に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 6】

1つまたは複数の外因性タンパク質が、コバラミドコリノイド/鉄-硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、アセチルCoAシンターゼ、アセチルCoAシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼから選択される、請求項5に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 7】

コバラミドコリノイド/鉄-硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、アセチルCoAシンターゼ、アセチルCoAシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼがそれぞれ発現される、請求項6に記載の天然に存在しない微生物。

30

【請求項 8】

天然に存在しない微生物であって、CO₂およびH₂をアセチル補酵素A（アセチルCoA）に変換する経路を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下でCO₂およびH₂をアセチルCoAに変換する能力を欠く微生物。

【請求項 9】

前記1つまたは複数の外因性タンパク質が、コバラミドコリノイド/鉄-硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、アセチルCoAシンターゼ、アセチルCoAシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼから選択される、請求項8に記載の天然に存在しない微生物。

40

【請求項 10】

コバラミドコリノイド/鉄-硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、アセチルCoAシンターゼ、アセチルCoAシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼがそれぞれ発現される、請求項9に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項 11】

天然に存在しない微生物であって、COおよびH₂をメチルテトラヒドロ葉酸（メチル

50

THF)に変換する経路を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下でCOおよびH₂をメチルTHFに変換する能力を欠く微生物。

【請求項12】

前記1つまたは複数の外因性タンパク質が、フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンテターゼ、メテニルテトラヒドロ葉酸シクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼから選択される、請求項11に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項13】

フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンテターゼ、メテニルテトラヒドロ葉酸シクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼがそれぞれ発現される、請求項12に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項14】

天然に存在しない微生物であって、COおよびH₂を含む合成ガスをメチルテトラヒドロ葉酸(メチルTHF)に変換する経路を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下でCOおよびH₂をメチルTHFに変換する能力を欠く微生物。

【請求項15】

前記合成ガスがCO₂をさらに含む、請求項14に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項16】

1つまたは複数の外因性タンパク質が、フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンテターゼ、メテニルテトラヒドロ葉酸シクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼから選択される、請求項15に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項17】

フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンテターゼ、メテニルテトラヒドロ葉酸シクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼがそれぞれ発現される、請求項16に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項18】

天然に存在しない微生物であって、CO₂およびH₂をメチルテトラヒドロ葉酸(メチルTHF)に変換する経路を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下でCO₂およびH₂をメチルTHFに変換する能力を欠く微生物。

【請求項19】

前記1つまたは複数の外因性タンパク質が、フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンテターゼ、メテニルテトラヒドロ葉酸シクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼから選択される、請求項18に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項20】

フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンテターゼ、メテニルテトラヒドロ葉酸シクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼがそれぞれ発現される、請求項19に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項21】

天然に存在しない微生物であって、CO₂、COおよびH₂、またはそれらの組合せからアセチルCoAを生成する遺伝子改変がない前記微生物と比べて、CO₂、COおよび

10

20

30

40

50

H₂、またはそれらの組合せからアセチルC o Aを生成する効率の増加を前記微生物に付与する遺伝子改変を含み、CO₂、COおよびH₂、またはそれらの組合せをアセチルC o Aに変換する経路を含む微生物。

【請求項22】

前記遺伝子改変が1つまたは複数の外因性タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸分子の発現を含み、それによって前記1つまたは複数の外因性タンパク質の発現がCO₂、COおよびH₂、またはそれらの組合せからアセチルC o Aを生成する効率を高める、請求項21に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項23】

前記1つまたは複数の外因性タンパク質が、コバラミドコリノイド/鉄-硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、アセチルC o Aシンターゼ、アセチルC o Aシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼから選択される、請求項22に記載の天然に存在しない微生物。

10

【請求項24】

コバラミドコリノイド/鉄-硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、アセチルC o Aシンターゼ、アセチルC o Aシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼがそれぞれ発現される、請求項23に記載の天然に存在しない微生物。

【請求項25】

天然に存在しない微生物の生物体であって、アセチル補酵素A(アセチルC o A)を生成するのに十分な量で発現されるアセチルC o A経路の酵素またはタンパク質をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むアセチルC o A経路を有する微生物の生物体を含み、前記アセチルC o A経路が、メタノール-メチルトランスフェラーゼおよびアセチルC o Aシンターゼ/一酸化炭素デヒドロゲナーゼを含む微生物の生物体。

20

【請求項26】

前記アセチルC o A経路が、CO₂、COもしくはH₂、またはそれらの組合せ、およびメタノールをアセチルC o Aに変換する能力を付与する、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項27】

前記メタノール-メチルトランスフェラーゼが、メタノールメチルトランスフェラーゼ、コリノイドタンパク質およびメチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼから選択される酵素またはタンパク質を含む、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

30

【請求項28】

前記アセチルC o Aシンターゼ/一酸化炭素デヒドロゲナーゼが、メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ、コリノイド鉄-硫黄タンパク質、ニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質、フェレドキシン、アセチルC o Aシンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼおよびニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質から選択される酵素またはタンパク質を含む、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

40

【請求項29】

前記メタノール-メチルトランスフェラーゼが、メタノールメチルトランスフェラーゼ、コリノイドタンパク質およびメチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼから選択される酵素またはタンパク質を含み、前記アセチルC o Aシンターゼ/一酸化炭素デヒドロゲナーゼが、メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ、コリノイド鉄-硫黄タンパク質、ニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質、フェレドキシン、アセチルC o Aシンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼおよびニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質から選択される酵素またはタンパク質を含む、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項30】

50

それぞれアセチルC o A 経路の酵素またはタンパク質をコードする2つの外因性核酸を含む、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項31】

それぞれアセチルC o A 経路の酵素またはタンパク質をコードする3つの外因性核酸を含む、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項32】

それぞれアセチルC o A 経路の酵素またはタンパク質をコードする4つの外因性核酸を含む、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項33】

それぞれアセチルC o A 経路の酵素またはタンパク質をコードする5つの外因性核酸を含む、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

10

【請求項34】

それぞれアセチルC o A 経路の酵素またはタンパク質をコードする6つの外因性核酸を含む、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項35】

それぞれアセチルC o A 経路の酵素またはタンパク質をコードする7つの外因性核酸を含む、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項36】

それぞれアセチルC o A 経路の酵素またはタンパク質をコードする8つの外因性核酸を含む、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

20

【請求項37】

それぞれアセチルC o A 経路の酵素またはタンパク質をコードする9つの外因性核酸を含む、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項38】

それぞれアセチルC o A 経路の酵素またはタンパク質をコードする10個の外因性核酸を含む、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項39】

前記10個の外因性核酸が、メタノールメチルトランスフェラーゼ、コリノイドタンパク質およびメチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼを含むメタノールメチルトランスフェラーゼをコードし、ならびにメチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ、コリノイド鉄-硫黄タンパク質、ニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質、フェレドキシン、アセチルC o A シンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼおよびニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質を含むアセチルC o A シンターゼ/一酸化炭素デヒドロゲナーゼをコードする、請求項38に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

30

【請求項40】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項41】

実質的に嫌気性の培地中にある、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

40

【請求項42】

ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼをさらに含む、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項43】

ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼが外因性核酸によってコードされる、請求項42に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項44】

ヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項25に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項45】

50

前記ヒドロゲナーゼが内因性核酸によってコードされる、請求項 4 4 に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項 4 6】

前記ヒドロゲナーゼが外因性核酸によってコードされる、請求項 4 4 に記載の天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項 4 7】

アセチル C o A を生成する方法であって、アセチル C o A 経路を有する天然に存在しない微生物の生物体を培養する工程を含み、前記経路が、アセチル C o A を生成する条件下およびアセチル C o A を生成するのに十分な期間、アセチル C o A を生成するのに十分な量で発現されるアセチル C o A 経路の酵素またはタンパク質をコードする少なくとも 1 つの 10 外因性核酸を含み、前記アセチル C o A 経路が、メタノール - メチルトランスフェラーゼおよびアセチル C o A シンターゼノ一酸化炭素デヒドロゲナーゼを含む方法。

【請求項 4 8】

前記メタノール - メチルトランスフェラーゼが、メタノールメチルトランスフェラーゼ、コリノイドタンパク質およびメチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼから選択される酵素またはタンパク質を含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記アセチル C o A シンターゼノ一酸化炭素デヒドロゲナーゼが、メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ、コリノイド鉄 - 硫黄タンパク質、ニッケル - タンパク質アセンブリータンパク質、フェレドキシン、アセチル C o A シンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼおよびニッケル - タンパク質アセンブリータンパク質から選択される酵素またはタンパク質を含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記メタノール - メチルトランスフェラーゼが、メタノールメチルトランスフェラーゼ、コリノイドタンパク質およびメチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼから選択される酵素またはタンパク質を含み、前記アセチル C o A シンターゼノ一酸化炭素デヒドロゲナーゼが、メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ、コリノイド鉄 - 硫黄タンパク質、ニッケル - タンパク質アセンブリータンパク質、フェレドキシン、アセチル C o A シンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼおよびニッケル - タンパク質アセンブリータンパク質から選択される酵素またはタンパク質を含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記天然に存在しない微生物の生物体を実質的に嫌気性の培地中に存在する、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記天然に存在しない微生物の生物体が、C O ₂、C O または H ₂、またはそれらの組合せ、およびメタノールの存在下で培養される、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記微生物の生物体が、それぞれアセチル C o A 経路の酵素またはタンパク質をコードする 2 つの外因性核酸を含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記微生物の生物体が、それぞれアセチル C o A 経路の酵素またはタンパク質をコードする 3 つの外因性核酸を含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記微生物の生物体が、それぞれアセチル C o A 経路の酵素またはタンパク質をコードする 4 つの外因性核酸を含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記微生物の生物体が、それぞれアセチル C o A 経路の酵素またはタンパク質をコードする 5 つの外因性核酸を含む、請求項 4 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 57】

前記微生物の生物体が、それぞれアセチル Co A 経路の酵素またはタンパク質をコードする 6 つの外因性核酸を含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 58】

前記微生物の生物体が、それぞれアセチル Co A 経路の酵素またはタンパク質をコードする 7 つの外因性核酸を含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 59】

前記微生物の生物体が、それぞれアセチル Co A 経路の酵素またはタンパク質をコードする 8 つの外因性核酸を含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 60】

前記微生物の生物体が、それぞれアセチル Co A 経路の酵素またはタンパク質をコードする 9 つの外因性核酸を含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 61】

前記微生物の生物体が、それぞれアセチル Co A 経路の酵素またはタンパク質をコードする 10 個の外因性核酸を含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 62】

前記 10 個の外因性核酸が、メタノールメチルトランスフェラーゼ、コリノイドタンパク質およびメチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼを含むメタノールメチルトランスフェラーゼをコードし、ならびにメチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ、コリノイド鉄 - 硫黄タンパク質、ニッケル - タンパク質アセンブリータンパク質、フェレドキシン、アセチル Co A シンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼおよびニッケル - タンパク質アセンブリータンパク質を含むアセチル Co A シンターゼ / 一酸化炭素デヒドロゲナーゼをコードする、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 64】

前記天然に存在しない微生物の生物体がピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼをさらに含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 65】

ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼが外因性核酸によってコードされる、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

前記天然に存在しない微生物の生物体がヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 67】

前記ヒドロゲナーゼが内因性核酸によってコードされる、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

前記ヒドロゲナーゼが外因性核酸によってコードされる、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 69】

前記天然に存在しない微生物の生物体が、ニトレートの存在下で培養される、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 70】

天然に存在しない微生物の生物体であって、4 - ヒドロキシブチレート (4 - hydroxybutyrate) を生成するのに十分な量で発現される 4 - ヒドロキシブチレート (4 - hydroxybutyrate) 経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む 4 - ヒドロキシブチレート (4 - hydroxybutyrate) 経路を有する微生物の生物体を含み、前記 4 - ヒドロキシブチレート (4 - hydroxybutyrate) 経路の酵素が、アセトアセチル Co A チオラーゼ、3 - ヒドロキシブチリル Co A デヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、クロトニル Co A ヒドラターゼ、4 - ヒド

10

20

30

40

50

ロキシブチリルC o Aトランスフェラーゼ、ホスホトランス - 4 - ヒドロキシブチリラーゼおよび4 - ヒドロキシブチレートキナーゼを含む微生物の生物体。

【請求項71】

前記アセトアセチルC o Aチオラーゼが、a t o B、t h l A、t h l Bおよびe r g 1 0 からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項70に記載の生物体。

【請求項72】

前記3 - ヒドロキシブチリルC o Aデヒドロゲナーゼが、h b d、m s e d __ 1 4 2 3、m s e d __ 0 3 9 9、m s e d __ 0 3 8 9 およびm s e d __ 1 9 3 3 からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項70に記載の生物体。

10

【請求項73】

前記クロトナーゼが、c r t、p a a A、p a a B、p h a A、p h a B、m a o C、p a a F およびp a a G からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項70に記載の生物体。

【請求項74】

前記クロトニルC o Aヒドラターゼが、a b f D、m s e d __ 1 3 2 1 およびm s e d __ 1 2 2 0 からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項70に記載の生物体。

【請求項75】

前記4 - ヒドロキシブチリルC o Aトランスフェラーゼが、c a t 2、a b f T - 2、a b f T - 1 およびa b f T からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項70に記載の生物体。

20

【請求項76】

前記ホスホトランス - 4 - ヒドロキシブチリラーゼが、p t a およびp t b からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項70に記載の生物体。

【請求項77】

前記4 - ヒドロキシブチレートキナーゼが、a c k A、b u k 1、b u k 2 およびp r o B からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項70に記載の生物体。

【請求項78】

コリノイドタンパク質、メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ、コリノイド鉄 - 硫黄タンパク質、ニッケル - タンパク質アセンブリータンパク質、フェレドキシン、アセチルC o Aシンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、ビルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼからなる群から選択される少なくとも1つの酵素またはポリペプチドをさらに含む、請求項70に記載の生物体。

30

【請求項79】

前記コリノイドタンパク質が、m t a C、m t a C 1、m t a C 2 およびm t a C 3 からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項78に記載の生物体。

【請求項80】

前記メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼが、m t a A およびm t a A 1、m t a A 2 からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項78に記載の生物体。

40

【請求項81】

前記メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼが、遺伝子a c s Eによってコードされる、請求項78に記載の生物体。

【請求項82】

前記コリノイド鉄 - 硫黄タンパク質が、遺伝子a c s Dによってコードされる、請求項78に記載の生物体。

【請求項83】

50

前記ニッケル - タンパク質アセンブリータンパク質が、*acsF*および*cooC*からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子によってコードされる、請求項78に記載の生物体。

【請求項84】

前記フェレドキシンが、遺伝子*orf7*によってコードされる、請求項78に記載の生物体。

【請求項85】

前記アセチルCoAシンターゼが、*acsB*および*acsC*からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子によってコードされる、請求項78に記載の生物体。

【請求項86】

前記一酸化炭素デヒドロゲナーゼが、遺伝子*acsA*によってコードされる、請求項78に記載の生物体。

【請求項87】

前記ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼが、*por*および*ydbK*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項78に記載の生物体。

【請求項88】

前記ヒドロゲナーゼが、*hypA*、*hypB*、*hypC*、*hypD*、*hypE*、*hypF*、*moth_2175*、*moth_2176*、*moth_2177*、*moth_2178*、*moth_2179*、*moth_2180*、*moth_2181*、*hycA*、*hycB*、*hycC*、*hycD*、*hycE*、*hycF*、*hycG*、*hycH*、*hycI*、*hyfA*、*hyfB*、*hyfC*、*hyfD*、*hyfE*、*hyfF*、*hyfG*、*hyfH*、*hyfI*、*hyfJ*、*hyfR*、*moth_2182*、*moth_2183*、*moth_2184*、*moth_2185*、*moth_2186*、*moth_2187*、*moth_2188*、*moth_2189*、*moth_2190*、*moth_2191*、*moth_2192*、*moth_0439*、*moth_0440*、*moth_0441*、*moth_0442*、*moth_0809*、*moth_0810*、*moth_0811*、*moth_0812*、*moth_0813*、*moth_0814*、*moth_0815*、*moth_0816*、*moth_1193*、*moth_1194*、*moth_1195*、*moth_1196*、*moth_1717*、*moth_1718*、*moth_1719*、*moth_1883*、*moth_1884*、*moth_1885*、*moth_1886*、*moth_1887*、*moth_1888*、*moth_1452*、*moth_1453*および*moth_1454*からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子によってコードされる、請求項78に記載の生物体。

【請求項89】

遺伝子*acsEps*によってコードされるポリペプチド(*polypeptide*)*Ac**sEps*をさらに含む、請求項78に記載の生物体。

【請求項90】

codh、*codh-I*、*cooF*、*hypA*、*cooH*、*cooU*、*cooX*、*cooL*、*cooK*、*cooM*、*cooT*、*cooJ*および*codh-II*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる少なくとも1つの酵素またはポリペプチドをさらに含む、請求項78に記載の生物体。

【請求項91】

メタノールメチルトランスフェラーゼをさらに含む、請求項78に記載の生物体。

【請求項92】

前記メタノールメチルトランスフェラーゼが、*mtaB*、*mtaB1*、*mtaB2*および*mtaB3*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項91に記載の生物体。

【請求項93】

1)メタノールおよびCO、2)メタノール、CO₂およびH₂、3)メタノール、CO、CO₂およびH₂、4)メタノール、ならびにCOおよびH₂を含む合成ガス、5)

10

20

30

40

50

メタノール、ならびにCO、CO₂およびH₂を含む合成ガスからなる群から選択されるフィードストックを利用する、請求項91に記載の生物体。

【請求項94】

ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼ、メテニルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ、メチレントラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレントラヒドロ葉酸レダクターゼをさらに含む、請求項78に記載の生物体。

【請求項95】

前記ギ酸デヒドロゲナーゼが、moth__2312、moth__2313、moth__2314、sfum__2703、sfum__2704、sfum__2705、sfum__2706、chy__0731、chy__0732およびchy__0733からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項94に記載の生物体。

10

【請求項96】

前記ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼが、moth__0109、chy__2385およびfhsからなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項94に記載の生物体。

【請求項97】

前記メテニルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼが、moth__1516、foldおよびchy__1878からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項94に記載の生物体。

【請求項98】

前記メチレントラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼが、moth__1516、foldおよびchy__1878からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項94に記載の生物体。

20

【請求項99】

前記メチレントラヒドロ葉酸レダクターゼが、moth__1191、metFおよびchy__1233からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項94に記載の生物体。

【請求項100】

1) CO、2) CO₂およびH₂、3) COおよびCO₂、4) COおよびH₂を含む合成ガス、ならびに5) CO、CO₂およびH₂を含む合成ガスからなる群から選択されるフィードストックを利用する、請求項94に記載の生物体。

30

【請求項101】

天然に存在しない微生物の生物体であって、1,4-ブタンジオールを生成するのに十分な量で発現される1,4-ブタンジオール経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む1,4-ブタンジオール経路を有する微生物の生物体を含み、前記1,4-ブタンジオール経路の酵素が、アセトアセチルCoAチオラーゼ、3-ヒドロキシブチリルCoAデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、クロトニルCoAヒドラターゼ、4-ヒドロキシブチリルCoAレダクターゼ(アルコール形成性)、4-ヒドロキシブチリルCoAレダクターゼ(アルデヒド形成性)および1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを含み、前記生物体が、アセチルCoAを生成するのに十分な量で発現されるアセチルCoA経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むアセチルCoA経路をさらに含み、前記アセチルCoA経路の酵素が、コリノイドタンパク質、メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ、コリノイド鉄-硫黄タンパク質、ニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質、フェレドキシン、アセチルCoAシンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼを含む天然に存在しない生物体。

40

【請求項102】

前記アセトアセチルCoAチオラーゼが、atoB、thlA、thlBおよびerg10からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項101に記載の生物体。

50

【請求項103】

前記3 - ヒドロキシブチリルCoAデヒドロゲナーゼが、hbd、msed__1423、msed__0399、msed__0389およびmsed__1933からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項101に記載の生物体。

【請求項104】

前記クロトナーゼが、crt、paaA、paaB、phaA、phaB、maoC、paaFおよびpaaGからなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項101に記載の生物体。

【請求項105】

前記クロトニルCoAヒドラターゼが、abfD、msed__1321およびmsed__1220からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項101に記載の生物体。

10

【請求項106】

前記4 - ヒドロキシブチリルCoAレダクターゼ(アルコール形成性)が、adhE、adhE2、mcr、rcas__2929、nap1__02720およびmgp2080__00535からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項101に記載の生物体。

【請求項107】

前記4 - ヒドロキシブチリルCoAレダクターゼ(アルデヒド形成性)が、acr1、sucD、bphG、msed__0709、mcr、asd-2およびsaci__2370からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項101に記載の生物体。

20

【請求項108】

前記1, 4 - ブタンジオールデヒドロゲナーゼが、alrA、adh2、yqhD、bdhI、bdhIIおよび4hbdからなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項101に記載の生物体。

【請求項109】

前記コリノイドタンパク質が、mtaC、mtaC1、mtaC2およびmtaC3からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項101に記載の生物体。

【請求項110】

前記メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼが、mtaAおよびmtaA1、mtaA2からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項101に記載の生物体。

30

【請求項111】

前記メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼが、遺伝子acsEによってコードされる、請求項101に記載の生物体。

【請求項112】

前記コリノイド鉄 - 硫黄タンパク質が、遺伝子acsDによってコードされる、請求項101に記載の生物体。

【請求項113】

前記ニッケル - タンパク質アセンブリータンパク質が、acsFおよびcooCからなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子によってコードされる、請求項101に記載の生物体。

40

【請求項114】

前記フェレドキシンが、遺伝子orf7によってコードされる、請求項101に記載の生物体。

【請求項115】

前記アセチルCoAシンターゼが、acsBおよびacsCからなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子によってコードされる、請求項101に記載の生物体。

【請求項116】

50

前記一酸化炭素デヒドロゲナーゼが、遺伝子 *acsA* によってコードされる、請求項 101 に記載の生物体。

【請求項 117】

前記ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼが、*por* および *ydbK* からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項 101 に記載の生物体。

【請求項 118】

前記ヒドロゲナーゼが、*hypA*、*hypB*、*hypC*、*hypD*、*hypE*、*hypF*、*moth_2175*、*moth_2176*、*moth_2177*、*moth_2178*、*moth_2179*、*moth_2180*、*moth_2181*、*hycA*、*hycB*、*hycC*、*hycD*、*hycE*、*hycF*、*hycG*、*hycH*、*hycI*、*hyfA*、*hyfB*、*hyfC*、*hyfD*、*hyfE*、*hyfF*、*hyfG*、*hyfH*、*hyfI*、*hyfJ*、*hyfR*、*moth_2182*、*moth_2183*、*moth_2184*、*moth_2185*、*moth_2186*、*moth_2187*、*moth_2188*、*moth_2189*、*moth_2190*、*moth_2191*、*moth_2192*、*moth_0439*、*moth_0440*、*moth_0441*、*moth_0442*、*moth_0809*、*moth_0810*、*moth_0811*、*moth_0812*、*moth_0813*、*moth_0814*、*moth_0815*、*moth_0816*、*moth_1193*、*moth_1194*、*moth_1195*、*moth_1196*、*moth_1717*、*moth_1718*、*moth_1719*、*moth_1883*、*moth_1884*、*moth_1885*、*moth_1886*、*moth_1887*、*moth_1888*、*moth_1452*、*moth_1453* および *moth_1454* からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子によってコードされる、請求項 101 に記載の生物体。

10

20

【請求項 119】

遺伝子 *acsEps* によってコードされるポリペプチド (*polypeptide*) *AcSEps* をさらに含む、請求項 101 に記載の生物体。

【請求項 120】

codh、*codh-I*、*cooF*、*hypA*、*cooH*、*cooU*、*cooX*、*cooL*、*cooK*、*cooM*、*cooT*、*cooJ* および *codh-II* からなる群から選択される遺伝子によってコードされる少なくとも 1 つの酵素またはポリペプチドをさらに含む、請求項 101 に記載の生物体。

30

【請求項 121】

メタノールメチルトランスフェラーゼをさらに含む、請求項 101 に記載の生物体。

【請求項 122】

前記メタノールメチルトランスフェラーゼが、*mtaB*、*mtaB1*、*mtaB2* および *mtaB3* からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項 121 に記載の生物体。

【請求項 123】

1) メタノールおよび CO 、2) メタノール、 CO_2 および H_2 、3) メタノール、 CO 、 CO_2 および H_2 、4) メタノール、ならびに CO および H_2 を含む合成ガス、5) メタノール、ならびに CO 、 CO_2 および H_2 を含む合成ガスからなる群から選択されるフィードストックを利用する、請求項 121 に記載の生物体。

40

【請求項 124】

天然に存在しない微生物の生物体であって、1, 4-ブタンジオールを生成するのに十分な量で発現される 1, 4-ブタンジオール経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む 1, 4-ブタンジオール経路を有する微生物の生物体を含み、前記 1, 4-ブタンジオール経路の酵素が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA デヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、クロトニル CoA ヒドラターゼ、4-ヒドロキシブチリル CoA レダクターゼ (アルコール形成性)、4-ヒドロキシブチリル CoA レダクターゼ (アルデヒド形成性) および 1, 4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼを

50

含み、前記生物体は、アセチルC o Aを生成するのに十分な量で発現されるアセチルC o A経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むアセチルC o A経路をさらに含み、前記アセチルC o A経路の酵素が、アセチルC o Aシンターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼ、メテニルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ、メチレントラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレントラヒドロ葉酸レダクターゼを含む天然に存在しない微生物の生物体。

【請求項125】

前記ギ酸デヒドロゲナーゼが、moth__2312、moth__2313、moth__2314、sfum__2703、sfum__2704、sfum__2705、sfum__2706、chy__0731、chy__0732およびchy__0733からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項124に記載の生物体。

10

【請求項126】

前記ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼが、moth__0109、chy__2385およびfhsからなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項124に記載の生物体。

【請求項127】

前記メテニルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼが、moth__1516、foldおよびchy__1878からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項124に記載の生物体。

【請求項128】

前記メチレントラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼが、moth__1516、foldおよびchy__1878からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項124に記載の生物体。

20

【請求項129】

前記メチレントラヒドロ葉酸レダクターゼが、moth__1191、metFおよびchy__1233からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項124に記載の生物体。

【請求項130】

1) CO、2) CO₂ および H₂、3) CO および CO₂、4) CO および H₂ を含む合成ガス、ならびに5) CO、CO₂ および H₂ を含む合成ガスからなる群から選択されるフィードストックを利用する、請求項124に記載の生物体。

30

【請求項131】

4 - ヒドロキシブチレートを生成する方法であって、4 - ヒドロキシブチレート経路を有する天然に存在しない微生物の生物体を培養する工程を含み、前記経路が、4 - ヒドロキシブチレートを生成する条件下および4 - ヒドロキシブチレートを生成するのに十分な期間、4 - ヒドロキシブチレートを生成するのに十分な量で発現される4 - ヒドロキシブチレート経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、前記4 - ヒドロキシブチレート経路が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、3 - ヒドロキシブチリルC o Aデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、クロトニルC o Aヒドラターゼ、4 - ヒドロキシブチリルC o Aトランスフェラーゼ、ホスホトランス - 4 - ヒドロキシブチリラーゼおよび4 - ヒドロキシブチレートキナーゼを含む方法。

40

【請求項132】

前記アセトアセチルC o Aチオラーゼが、atoB、thlA、thlBおよびerg10からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項131に記載の方法。

【請求項133】

前記3 - ヒドロキシブチリルC o Aデヒドロゲナーゼが、hbd、msed__1423、msed__0399、msed__0389およびmsed__1933からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項131に記載の方法。

【請求項134】

50

前記クロトナーゼが、*c r t*、*p a a A*、*p a a B*、*p h a A*、*p h a B*、*m a o C*、*p a a F*および*p a a G*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項131に記載の方法。

【請求項135】

前記クロトニルC o Aヒドラターゼが、*a b f D*、*m s e d _ 1 3 2 1*および*m s e d _ 1 2 2 0*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項131に記載の方法。

【請求項136】

前記4 - ヒドロキシブチリルC o Aトランスフェラーゼが、*c a t 2*、*a b f T - 2*、*a b f T - 1*および*a b f T*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項131に記載の方法。

10

【請求項137】

前記ホスホトランス - 4 - ヒドロキシブチリラーゼが、*p t a*および*p t b*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項131に記載の方法。

【請求項138】

前記4 - ヒドロキシブチレートキナーゼが、*a c k A*、*b u k 1*、*b u k 2*および*p r o B*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項131に記載の方法。

【請求項139】

前記生物体が、コリノイドタンパク質、メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ、コリノイド鉄 - 硫黄タンパク質、ニッケル - タンパク質アセンブリータンパク質、フェレドキシン、アセチルC o Aシンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼからなる群から選択される少なくとも1つの酵素またはポリペプチドをさらに含む、請求項131に記載の方法。

20

【請求項140】

前記コリノイドタンパク質が、*m t a C*、*m t a C 1*、*m t a C 2*および*m t a C 3*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項131に記載の方法。

【請求項141】

前記メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼが、*m t a A*および*m t a A 1*、*m t a A 2*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項139に記載の方法。

30

【請求項142】

前記メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼが、遺伝子*a c s E*によってコードされる、請求項139に記載の方法。

【請求項143】

前記コリノイド鉄 - 硫黄タンパク質が、遺伝子*a c s D*によってコードされる、請求項139に記載の方法。

【請求項144】

前記ニッケル - タンパク質アセンブリータンパク質が、*a c s F*および*c o o C*からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子によってコードされる、請求項139に記載の方法。

40

【請求項145】

前記フェレドキシンが、遺伝子*o r f 7*によってコードされる、請求項139に記載の方法。

【請求項146】

前記アセチルC o Aシンターゼが、*a c s B*および*a c s C*からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子によってコードされる、請求項139に記載の方法。

【請求項147】

前記一酸化炭素デヒドロゲナーゼが、遺伝子*a c s A*によってコードされる、請求項1

50

39に記載の方法。

【請求項148】

前記ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼが、porおよびydbKからなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項139に記載の方法。

【請求項149】

前記ヒドロゲナーゼが、hypA、hypB、hypC、hypD、hypE、hypF、moth__2175、moth__2176、moth__2177、moth__2178、moth__2179、moth__2180、moth__2181、hycA、hycB、hycC、hycD、hycE、hycF、hycG、hycH、hycI、hyfA、hyfB、hyfC、hyfD、hyfE、hyfF、hyfG、hyfH、hyfI、hyfJ、hyfR、moth__2182、moth__2183、moth__2184、moth__2185、moth__2186、moth__2187、moth__2188、moth__2189、moth__2190、moth__2191、moth__2192、moth__0439、moth__0440、moth__0441、moth__0442、moth__0809、moth__0810、moth__0811、moth__0812、moth__0813、moth__0814、moth__0815、moth__0816、moth__1193、moth__1194、moth__1195、moth__1196、moth__1717、moth__1718、moth__1719、moth__1883、moth__1884、moth__1885、moth__1886、moth__1887、moth__1888、moth__1452、moth__1453およびmoth__1454からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子によってコードされる、請求項139に記載の方法。

10

20

【請求項150】

遺伝子acsEpsによってコードされるポリペプチド(polypeptide)Acsepsをさらに含む、請求項139に記載の方法。

【請求項151】

codh、codh-I、cooF、hypA、cooH、cooU、cooX、cooL、cooK、cooM、cooT、cooJおよびcodh-IIからなる群から選択される遺伝子によってコードされる少なくとも1つの酵素またはポリペプチドをさらに含む、請求項139に記載の方法。

30

【請求項152】

メタノールメチルトランスフェラーゼをさらに含む、請求項139に記載の方法。

【請求項153】

前記メタノールメチルトランスフェラーゼが、mtaB、mtaB1、mtaB2およびmtaB3からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項152に記載の方法。

【請求項154】

前記生物体が、1)メタノールおよびCO、2)メタノール、CO₂およびH₂、3)メタノール、CO、CO₂およびH₂、4)メタノール、ならびにCOおよびH₂を含む合成ガス、5)メタノール、ならびにCO、CO₂およびH₂を含む合成ガスからなる群から選択されるフィードストックを利用する、請求項152に記載の方法。

40

【請求項155】

前記生物体が、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンテターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼをさらに含む、請求項139に記載の方法。

【請求項156】

前記ギ酸デヒドロゲナーゼが、moth__2312、moth__2313、moth__2314、sfum__2703、sfum__2704、sfum__2705、sfum__2706、chy__0731、chy__0732およびchy__0733からなる群から

50

選択される遺伝子によってコードされる、請求項 155 に記載の方法。

【請求項 157】

前記ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼが、*moth__0109*、*chy__2385* および *fhs* からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項 155 に記載の方法。

【請求項 158】

前記メテニルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼが、*moth__1516*、*fold* および *chy__1878* からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項 155 に記載の方法。

【請求項 159】

前記メチレントetraヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼが、*moth__1516*、*fold* および *chy__1878* からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項 155 に記載の方法。

【請求項 160】

前記メチレントetraヒドロ葉酸レダクターゼが、*moth__1191*、*metF* および *chy__1233* からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項 155 に記載の方法。

【請求項 161】

前記生物体が、1) CO 、2) CO_2 および H_2 、3) CO および CO_2 、4) CO および H_2 を含む合成ガス、ならびに 5) CO 、 CO_2 および H_2 を含む合成ガスからなる群から選択されるフィードストックを利用する、請求項 155 に記載の方法。

【請求項 162】

1, 4 - ブタンジオールを生成する方法であって、1, 4 - ブタンジオール経路を有する天然に存在しない微生物の生物体を培養する工程を含み、前記経路が、1, 4 - ブタンジオールを生成する条件下および 1, 4 - ブタンジオールを生成するのに十分な期間、1, 4 - ブタンジオールを生成するのに十分な量で発現される 1, 4 - ブタンジオール経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含み、前記 1, 4 - ブタンジオール経路が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、3 - ヒドロキシブチリル CoA デヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、クロトニル CoA ヒドラターゼ、4 - ヒドロキシブチリル CoA レダクターゼ (アルコール形成性)、4 - ヒドロキシブチリル CoA レダクターゼ (アルデヒド形成性)、1, 4 - ブタンジオールデヒドロゲナーゼを含み、前記生物体が、アセチル CoA を生成するのに十分な量で発現されるアセチル CoA 経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含むアセチル CoA 経路をさらに含み、前記アセチル CoA 経路の酵素が、コリノイドタンパク質、メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ、コリノイド鉄 - 硫黄タンパク質、ニッケル - タンパク質アセンブリータンパク質、フェレドキシン、アセチル CoA シンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼを含む方法。

【請求項 163】

前記アセトアセチル CoA チオラーゼが、*atoB*、*thlA*、*thlB* および *erg10* からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項 162 に記載の方法。

【請求項 164】

前記 3 - ヒドロキシブチリル CoA デヒドロゲナーゼが、*hbd*、*msed__1423*、*msed__0399*、*msed__0389* および *msed__1933* からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項 162 に記載の方法。

【請求項 165】

前記クロトナーゼが、*crt*、*paaA*、*paaB*、*phaA*、*phaB*、*maoC*、*paaF* および *paaG* からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項 162 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 166】

前記クロトニルCoAヒドラーゼが、*abfD*、*msed__1321*および*msed__1220*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項162に記載の方法。

【請求項 167】

前記4-ヒドロキシブチリルCoAレダクターゼ(アルコール形成性)が、*adhE*、*adhE2*、*mcr*、*rcas__2929*、*nap1__02720*および*mgp2080__00535*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項162に記載の方法。

【請求項 168】

前記4-ヒドロキシブチリルCoAレダクターゼ(アルデヒド形成性)が、*acr1*、*sucD*、*bphG*、*msed__0709*、*mcr*、*asd-2*および*saci__2370*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項162に記載の方法。

【請求項 169】

前記1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼが、*alrA*、*adh2*、*yqhD*、*b dh I*、*b dh I I*および*4 h b d*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項162に記載の方法。

【請求項 170】

前記コリノイドタンパク質が、*mtaC*、*mtaC1*、*mtaC2*および*mtaC3*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項162に記載の方法。

【請求項 171】

前記メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼが、*mtaA*および*mtaA1*、*mtaA2*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項162に記載の方法。

【請求項 172】

前記メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼが、遺伝子*acsE*によってコードされる、請求項162に記載の方法。

【請求項 173】

前記コリノイド鉄-硫黄タンパク質が、遺伝子*acsD*によってコードされる、請求項162に記載の方法。

【請求項 174】

前記ニッケル-タンパク質アセンブリ-タンパク質が、*acsF*および*cooC*からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子によってコードされる、請求項162に記載の方法。

【請求項 175】

前記フェレドキシンが、遺伝子*orf7*によってコードされる、請求項162に記載の方法。

【請求項 176】

前記アセチルCoAシクターゼが、*acsB*および*acsC*からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子によってコードされる、請求項162に記載の方法。

【請求項 177】

前記一酸化炭素デヒドロゲナーゼが、遺伝子*acsA*によってコードされる、請求項162に記載の方法。

【請求項 178】

前記ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼが、*por*および*ydbK*からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項162に記載の方法。

【請求項 179】

前記ヒドロゲナーゼが、*hypA*、*hypB*、*hypC*、*hypD*、*hypE*、*hypF*、*moth__2175*、*moth__2176*、*moth__2177*、*moth__2178*、*moth__2179*、*moth__2180*、*moth__2181*、*hycA*、*hyc*

10

20

30

40

50

B、h y c C、h y c D、h y c E、h y c F、h y c G、h y c H、h y c I、h y f A、h y f B、h y f C、h y f D、h y f E、h y f F、h y f G、h y f H、h y f I、h y f J、h y f R、m o t h _ 2 1 8 2、m o t h _ 2 1 8 3、m o t h _ 2 1 8 4、m o t h _ 2 1 8 5、m o t h _ 2 1 8 6、m o t h _ 2 1 8 7、m o t h _ 2 1 8 8、m o t h _ 2 1 8 9、m o t h _ 2 1 9 0、m o t h _ 2 1 9 1、m o t h _ 2 1 9 2、m o t h _ 0 4 3 9、m o t h _ 0 4 4 0、m o t h _ 0 4 4 1、m o t h _ 0 4 4 2、m o t h _ 0 8 0 9、m o t h _ 0 8 1 0、m o t h _ 0 8 1 1、m o t h _ 0 8 1 2、m o t h _ 0 8 1 3、m o t h _ 0 8 1 4、m o t h _ 0 8 1 5、m o t h _ 0 8 1 6、m o t h _ 1 1 9 3、m o t h _ 1 1 9 4、m o t h _ 1 1 9 5、m o t h _ 1 1 9 6、m o t h _ 1 7 1 7、m o t h _ 1 7 1 8、m o t h _ 1 7 1 9、m o t h _ 1 8 8 3、m o t h _ 1 8 8 4、m o t h _ 1 8 8 5、m o t h _ 1 8 8 6、m o t h _ 1 8 8 7、m o t h _ 1 8 8 8、m o t h _ 1 4 5 2、m o t h _ 1 4 5 3 および m o t h _ 1 4 5 4 からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子によってコードされる、請求項 1 6 2 に記載の方法。

10

【請求項 1 8 0】

前記生物体が、遺伝子 a c s E p s によってコードされるポリペプチド (p o l y p e t i d e) A c s E p s をさらに含む、請求項 1 6 2 に記載の方法。

【請求項 1 8 1】

c o d h、c o d h - I、c o o F、h y p A、c o o H、c o o U、c o o X、c o o L、c o o K、c o o M、c o o T、c o o J および c o d h - I I からなる群から選択される遺伝子によってコードされる少なくとも1つの酵素またはポリペプチドをさらに含む、請求項 1 6 2 に記載の方法。

20

【請求項 1 8 2】

メタノールメチルトランスフェラーゼをさらに含む、請求項 1 6 2 に記載の方法。

【請求項 1 8 3】

前記メタノールメチルトランスフェラーゼが、m t a B、m t a B 1、m t a B 2 および m t a B 3 からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項 1 6 2 に記載の方法。

【請求項 1 8 4】

前記生物体が、1)メタノールおよび C O、2)メタノール、C O₂ および H₂、3)メタノール、C O、C O₂ および H₂、4)メタノール、ならびに C O および H₂ を含む合成ガス、5)メタノール、ならびに C O、C O₂ および H₂ を含む合成ガスからなる群から選択されるフィードストックを利用する、請求項 1 6 2 に記載の方法。

30

【請求項 1 8 5】

1, 4 - ブタンジオールを生成する方法であって、1, 4 - ブタンジオール経路を有する天然に存在しない微生物の生物体を培養する工程を含み、前記経路が、1, 4 - ブタンジオールを生成する条件下および 1, 4 - ブタンジオールを生成するのに十分な期間、1, 4 - ブタンジオールを生成するのに十分な量で発現される 1, 4 - ブタンジオール経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、前記 1, 4 - ブタンジオール経路が、アセトアセチル C o A チオラーゼ、3 - ヒドロキシブチリル C o A デヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、クロトニル C o A ヒドラターゼ、4 - ヒドロキシブチリル C o A レダクターゼ (アルコール形成性)、4 - ヒドロキシブチリル C o A レダクターゼ (アルデヒド形成性)、1, 4 - ブタンジオールデヒドロゲナーゼを含み、前記生物体が、アセチル C o A を生成するのに十分な量で発現されるアセチル C o A 経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むアセチル C o A 経路をさらに含む、前記アセチル C o A 経路の酵素が、アセチル C o A シンターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼを含む方法。

40

【請求項 1 8 6】

前記ギ酸デヒドロゲナーゼが、m o t h _ 2 3 1 2、m o t h _ 2 3 1 3、m o t h _

50

2314、sfum__2703、sfum__2704、sfum__2705、sfum__2706、chy__0731、chy__0732およびchy__0733からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項185に記載の方法。

【請求項187】

前記ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼが、moth__0109、chy__2385およびfhsからなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項185に記載の方法。

【請求項188】

前記メテニルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼが、moth__1516、foldおよびchy__1878からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項185に記載の方法。

10

【請求項189】

前記メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼが、moth__1516、foldおよびchy__1878からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項185に記載の方法。

【請求項190】

前記メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼが、moth__1191、metFおよびchy__1233からなる群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項185に記載の方法。

【請求項191】

前記生物体が、1)CO、2)CO₂およびH₂、3)COおよびCO₂、4)COおよびH₂を含む合成ガス、ならびに5)CO、CO₂およびH₂を含む合成ガスからなる群から選択されるフィードストックを利用する、請求項185に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2008年1月22日に出願された米国仮特許出願第61/022,804号および2008年6月5日に出願された米国仮特許出願第61/059,256号の優先権の利益を主張し、各々のこれらの全内容は、本明細書において参考として援用される。

30

【0002】

本発明は、一般に生合成プロセスに、より具体的には合成ガスまたは他のガス状炭素源およびメタノールを用いることができる生物体に関する。

【背景技術】

【0003】

合成ガス(Synthesis gas (syngas))は、石炭、石油、天然ガス、バイオマスまたは廃棄有機物などの任意の有機フィードストックのガス化を通して得ることができる、H₂およびCOを主とする混合物である。多数のガス化プロセスが開発されており、ほとんどの設計は、高い温度(500~1500)における、酸素の制限が完全燃焼を回避する有機物質の部分酸化に基づいて、0.5:1~3:1のH₂/COの混合物として合成ガスを提供する。水素分を増加させるために蒸気が時々加えられ、典型的には、水性ガス転化反応を通してCO₂生成が増加する。

40

【0004】

今日、石炭は合成ガスの工業生産に用いられる主な基質であり、それは伝統的に加熱および動力に、またメタノールおよび液体炭化水素のフィッシャー-トロプシュ合成のためのフィードストックとして用いられる。多くの大きな化学会社およびエネルギー会社は、大規模な石炭ガス化プロセスを採用し、この技術を用いる産業において経験がある。

【0005】

石炭に加えて、多種類のバイオマスが合成ガス生産に用いられている。合成ガスおよびCO₂などのガス状基質は、再生可能な化学物質および燃料の生物学的生産で利用可能な

50

、最も安価で最も柔軟性のあるフィードストックを代表する。第二次世界大戦の間、主に欧州で、車、トラック、ボートおよびバスを走らせるために、1,000,000以上の小規模バイオマスガス化ユニットが操業されていた。現在では、商業規模(>20,000,000ポンドのバイオマス/年)で検証されたかまたは検証中の、少なくとも3つの主要なバイオマスガス化技術がある。バイオマスガス化技術は、特に熱およびエネルギー生産のために、商業的に実践されている。燃料または化学物質生産との統合が開発中であり、商業規模ではまだ広く実証されていない。

【0006】

概して、世界の実質的にいかなる場所においても、石炭、バイオマス、廃棄物、ポリマーなどを含む過剰の材料から、合成ガスを高い費用効果で生産する技術が現在存在する。合成ガスはバイオマスを含むほとんどの有機物質から生産することができるので、合成ガスを用いる利点には柔軟性が含まれる。別の利点は合成ガスが安価であることであり、100万Btuにつき6ドル以下の費用であり、それは、製品1ポンドにつき0.10ドル以下の原材料費に相当する。さらに、クロストリジウム属の複数の種などの生物体の場合のように、合成ガスを効果的に利用する公知の経路がある。

10

【0007】

合成ガスを利用する生物体の利用可能性にもかかわらず、一般に公知の生物体は十分に特徴付けられていなく、商業的開発にあまり適していない。例えば、クロストリジウム属および関連細菌は、高濃度のブタノールなどの特定の生成物に不耐容である偏性嫌気性菌であるので、力価および商品化の可能性が制限される。クロストリジウム属は複数の生成物も生成し、そのことは所望の生成物を得るときに分離の問題を提示する。最後に、クロストリジウム属の遺伝子を操作するための容易な遺伝子ツールの開発は、初期の段階にある。したがって、それらは、所望の生成物の収率または生成特性を改善するための遺伝子工学に直ちに適合させることができない。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

したがって、所望の化学物質および燃料の生成に合成ガスまたは他のガス状炭素源を利用するための微生物およびそれらの使用方法を開発する必要性が存在する。より具体的には、合成ガス利用のための微生物であって、有用な速度および量で価値ある生成物を生成するためのそれらの速やかな設計製作を可能にするための既存の効率的な遺伝子ツールも有する微生物を開発する必要性が存在する。本発明はこの必要性を満たし、関連する利点も提供する。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、アセチルCoA経路ならびに合成ガスまたは合成ガスおよびメタノールを利用する能力を有する、天然に存在しない微生物の生物体を提供する。一実施形態では、本発明は、天然に存在しない微生物であって、CO、CO₂および/またはH₂をアセチル補酵素A(アセチルCoA)、メチルテトラヒドロ葉酸(メチルTHF)または他の所望の生成物に変換する経路を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下で、COまたはCO₂およびH₂をアセチルCoAまたはメチルTHFに変換する能力を欠く微生物を提供する。例えば、微生物の生物体は、アセチルCoA経路の酵素またはタンパク質をコードする少なくとも1つの外因性の核酸を含むことができる。微生物の生物体は、CO、CO₂および/またはH₂を単独で、またはメタノールと一緒に含む合成ガスを利用して、アセチルCoAを生成することができる。本発明は、例えば、アセチルCoA生成の微生物の生物体を培養することによってアセチルCoAを生成する方法であって、前記微生物の生物体が、アセチルCoAを生成する条件下および十分な期間、アセチルCoAを生成するのに十分な量で、アセチルCoA経路の酵素またはタンパク質をコードする少なくとも1つの外因性の核酸を発現する方法をさらに提供する。

40

50

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、合成ガスを炭素源として用いる例示的なWood-Ljungdahl経路を示す図である。メチルテトラヒドロ葉酸(Me-THF)を生成するための合成ガスの利用を示すメチル分岐を示す。

【図2】図2は、合成ガスを炭素源として用いる例示的なWood-Ljungdahl経路を示す図である。アセチル補酵素A(アセチルCoA)を生成するための合成ガスの利用を示すカルボニル分岐を示す。ヒドロゲナーゼ(12)は、合成ガスの水素を、示す多くの反応に必要である還元当量に変換するのに必要である。

【図3】図3は、Wood-Ljungdahlおよびブタノール生成経路の統合を示す代謝経路図である。合成ガスで増殖することができる生物体に一般的に特有である変換は、1)COデヒドロゲナーゼ、2)ヒドロゲナーゼ、3)エネルギー保存ヒドロゲナーゼ(ECH)および4)二元機能COデヒドロゲナーゼ/アセチルCoAシンターゼである。

【図4A】図4は、ブタノールを生成するために合成ガスを利用するプロセスを示す図である。図4Aは、合成ガスからブタノールへのプロセスのブロック流れ図を示す。図4Bは、ガス化装置の詳細を示す図である。ASUは、空気分離ユニットを表す。

【図4B】図4は、ブタノールを生成するために合成ガスを利用する方法を示す図である。図4Aは、合成ガスからブタノールへのプロセスのブロック流れ図を示す。図4Bは、ガス化装置の詳細を示す図である。ASUは、空気分離ユニットを表す。

【図5】図5は、1-ブタノールを生成するR.rubrumにおける提案されるポリヒドロキシ酪酸(PHB)経路の改変を示す図である。肉太矢印は、C.acetobutylicumの1-ブタノール経路を形成する4遺伝子オペロンの異種発現により導入される反応段階を示す。用いる略語は、PHB、ポリ-ヒドロキシブチレート；PhbC、PHBシンターゼ；Crt、クロトナーゼ；Bcd、ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ；Etf、電子伝達フラビンタンパク質；AdhE2、アルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼである。

【図6】図6は、後に細胞集団およびエタノールまたは酢酸塩などの生成物に変換することができる、アセチルCoAへのCO、CO₂および/またはH₂を含むガスの変換を可能にする完全なWood-Ljungdahl経路を示す図である。産生宿主に設計製作することができる例示的な特定の酵素変換に番号を付ける。略語：10FTHF：10-ホルミルテトラヒドロ葉酸、5MTHF：5-メチルテトラヒドロ葉酸、ACTP：リン酸アセチル、FOR：ギ酸塩、METHF：メチレンテトラヒドロ葉酸、MLTHF：メテニルテトラヒドロ葉酸、THF：テトラヒドロ葉酸

【図7】図7は、アセチルCoAへのCO、CO₂および/またはH₂およびメタノールを含むガスの変換を可能にする合成代謝経路を示す図である。産生宿主に設計製作することができる特定の酵素変換に番号を付ける。さらなる略語：MeOH：メタノール

【図8】図8は、細胞集団および発酵生成物へのメタノール、COおよびCO₂の変換の経路を示す図である。

【図9】図9は、10マイクログラムのACS90(レーン1)、ACS91(レーン2)、Mta98/99(レーン3および4)細胞抽出物とサイズ標準(レーン5)およびM.thermoaceticaのCODH(Moth_1202/1203)またはMtr(Moth_1197)タンパク質(50、150、250、350、450、500、750、900および1000ng)の対照のウエスタンブロットを示す図である。

【図10】図10は、CO酸化アッセイ結果を示す図である。細胞(CODH/ACSオペロンを有するM.thermoaceticaまたはE.coli；ACS90またはACS91または空ベクター：pZA33S)を増殖させ、抽出物を調製した。アッセイは、抽出物を調製した当日に55で種々の時間実施した。メチルピオローゲンの還元を578nmで120秒間にわたって追跡した。

【図11】図11は、アセチル-CoAへの、さらには4-ヒドロキシ酪酸へのCO、C

10

20

30

40

50

O₂ および / または H₂ およびメタノールを含むガスの変換の合成代謝経路を示す図である。

【図 1 2】図 1 2 は、アセチル CoA への、さらには 1, 4 - ブタンジオールへの CO、CO₂ および / または H₂ およびメタノールを含むガスの変換の合成代謝経路を示す図である。

【図 1 3】図 1 3 は、アセチル CoA への、さらには 4 - ヒドロキシ酪酸への CO、CO₂ および / または H₂ を含むガスの変換の合成代謝経路を示す図である。

【図 1 4】図 1 4 は、アセチル CoA への、さらには 1, 4 - ブタンジオールへの CO、CO₂ および / または H₂ を含むガスの変換の合成代謝経路を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は、合成ガスまたは他のガス状炭素源を利用して所望の生成物を生成することができる微生物の開発および使用に関する。さらに本発明は、合成ガスを利用する微生物の製品範囲を広げること、合成ガスを利用して所望の生成物を生成することができる組換え生物体を生成すること、それらの収率、力価および生産性を最適化することに関する。増殖および化学物質生産の基質として合成ガスを効率的に利用することができる、商業的スケールアップに適する組換え生物体、例えば *Escherichia coli* または他の生物体の開発は、再生可能な化学物質および燃料の製造にとって費用的に有利なプロセスを提供する。生物体は、速やかに、また相応な費用で最適化および試験することができる。

【0012】

フィードストックとしての合成ガスの大きな可能性は、対象とする化学物質および燃料に効率的に、またはコスト的に効率よく変換されるその能力に存在する。合成ガス変換のための 2 つの主な技術は、フィッシャー - トロプシュプロセスおよび発酵プロセスである。フィッシャー - トロプシュ (F - T) 技術は、第二次世界大戦以来開発され、燃料としてのメタノールまたは混合炭化水素の有効生産を可能にする、無機および金属ベースの触媒を含む。F - T プロセスの欠点は、以下の通りである：1) 所望の生成物の分離の困難をもたらす生成物選択性の欠如；2) 中毒への触媒感受性；3) 必要とされる高温および高圧のための高いエネルギーコスト；ならびに 4) 商業的に競争力のある費用で入手可能な生成物の限られた範囲。

【0013】

発酵プロセスについては、合成ガスは、この材料をエタノール、アセテートおよび水素などの生成物に変換することができる多くの嫌気性微生物のための炭素およびエネルギー源の役目を果たすことが示されている (下記および表 1 を参照)。合成ガスの発酵的変換の主な利点は、単一の生成物の生成のための生物体の選択性、合成ガス不純物に対するより大きな耐性、より低い作用温度および圧力、ならびに合成ガスからの生成物の大きなポートフォリオの可能性である。発酵プロセスの主要な欠点は、合成ガスを変換することが公知の生物体が、エタノールおよびアセテートなどの限られた範囲の化学物質だけを生成する傾向があり、他の化学物質の効率的な生産体でないこと、生物体が遺伝子操作のための確立されたツールをもたないこと、および生物体が高い濃度の最終生成物に感受性であるということである。

【0014】

本発明は、合成ガスまたは他のガス状炭素源から化学物質および燃料を含む所望の生成物を生成するのに有効である微生物の生成に関する。本発明の生物体および方法は、従来の石油系生成物、およびグルコース、ショ糖またはリグノセルロース糖から直接に誘導される生成物の両方よりかなり有利な費用で、化学物質および燃料の生成を可能にする。一実施形態では、本発明は、合成ガスまたは他のガス状炭素源を利用して所望の生成物を生成することができる天然に存在しない微生物を提供し、ここで、親微生物は合成ガスを利用する天然の能力を欠く (実施例 V I I I を参照)。そのような微生物では、1 つまたは複数のタンパク質または酵素が微生物で発現され、それによって、合成ガスまたは他のガ

10

20

30

40

50

ス状炭素源を利用して所望の生成物を生成する経路を付与する。他の実施形態では、本発明は、例えば、所望の生成物を生成する高い効率を付与する1つまたは複数の外因性タンパク質または酵素を発現させることによって、遺伝子改変された天然に存在しない微生物を提供し、ここで、親微生物は合成ガスまたは他のガス状炭素源を利用して所望の生成物を生成する能力を有する。したがって、本発明は、合成ガスを利用することができる新しい代謝経路を有する微生物を生成すること、ならびに合成ガスまたは他のガス状炭素源を利用して所望の生成物を生成する改善された効率を有する微生物を生成することに関する。

【0015】

さらに本発明は、M t a A B C型のメチルトランスフェラーゼ系と一緒にW o o d - L j u n g d a h l経路のカルボニル分岐を触媒する酵素およびそれに関連するタンパク質をコードする遺伝子を発現する、天然に存在しない微生物を提供する。そのような生物体は、合成ガスから誘導することができる比較的安価な有機フィードストックであるメタノール、ならびにC O、C O₂および/またはH₂を含むガスを、アセチルC o A、細胞集団および生成物に変換することができる。

10

【0016】

E s c h e r i c h i a c o l iは、他に類を見ない遺伝子ツールを揃えている、産業上の馬車馬(w o r k h o r s e)生物体である。合成ガスをアセチルC o A、すなわち全ての細胞集団の成分および多くの価値ある生成物を誘導することができる中心的な代謝産物に変換する能力をE . c o l iなどの外来の宿主に導入する(e n g i n e e r i n g)ことは、W o o d - L j u n g d a h l経路の様々なタンパク質をコードする外因性の遺伝子の発現の後に達成することができる。この経路は、1942年のその単離(F o n t a i n e r、J B a c t e r i o l . 43巻、701~715頁(1942年))以来、W o o d - L j u n g d a h l経路を解明するためのモデル生物体であるM o o r e l l a t h e r m o a c e t i c a(旧称、C l o s t r i d i u m t h e r m o a c e t i c u m)などの酢酸生成性生物体で非常に活発である。W o o d - L j u n g d a h l経路は、2つの分岐を含む：メチルテトラヒドロ葉酸(M e - T H F)へのC O₂の変換を可能にするイースタンまたはメチル分岐、ならびにアセチルC o AへのメチルT H F、C Oおよび補酵素Aの変換を可能にするウエスタンまたはカルボニル分岐(図1および2を参照)。本明細書で開示されるように、本発明はW o o d - L j u n g d a h l経路の両分岐を触媒する遺伝子を発現する天然に存在しない微生物を提供する。そのような生物体は、C O、C O₂および/またはH₂を含むガスを、アセチルC o A、細胞集団および生成物に変換することができる。さらに本発明は、M t a A B C型のメチルトランスフェラーゼ系と一緒にW o o d - L j u n g d a h l経路のカルボニル分岐を触媒する酵素をコードする遺伝子を発現する、天然に存在しない微生物を提供する。そのような生物体は、合成ガスから誘導することができる比較的安価な有機フィードストックであるメタノール、ならびにC O、C O₂および/またはH₂を含むガスを、アセチルC o A、細胞集団および生成物に変換することができる。

20

30

【0017】

合成ガス(s y n g a s)またはプロデューサーガスとしても公知の合成ガス(s y n t h e s i s g a s)は、石炭、ならびに炭素質の材(例えば農作物および残渣を含むバイオマス材)のガス化の主要な生成物である。合成ガスはH₂およびC Oを主とする混合物であり、それらに限定されないが石炭、石油、天然ガス、バイオマスおよび廃棄有機物を含む任意の有機フィードストックのガス化から得ることができる。ガス化は、高い燃料対酸素比の下で一般に実施される。ほとんどH₂およびC Oであるが、合成ガスはより少ない量のC O₂および他のガスを含むこともできる。したがって、合成ガスはC O、さらにC O₂などのガス状炭素の経済的供給源を提供する。

40

【0018】

本明細書で開示されるように、C Oおよび/またはC O₂を含む合成ガスなどのガス状炭素源は、本発明の天然に存在しない微生物によって利用されて所望の生成物を生成する

50

ことができる。本明細書で一般に合成ガスとして例示されるが、本発明の天然に存在しない微生物はCOおよび/またはCO₂を含む任意のガス状炭素源を利用することができるものと理解される。したがって、本発明は、炭素源としてCOおよび/またはCO₂を利用することができる天然に存在しない微生物に関する。

【0019】

Wood-Ljungdahl経路は、アセチルCoAおよびアセテートなどの他の生成物へのCOおよびH₂の変換を触媒する。一般にCOおよび合成ガスを利用することができる生物体は、Wood-Ljungdahl経路に包含されるものと同じ酵素および形質転換の基本セットを通して、CO₂およびCO₂/H₂混合物を利用する能力も有する。同じ生物体がCOを用いることもでき、同じ経路が含まれることが明らかにされるずっと前に、微生物によるアセテートへのCO₂のH₂依存性変換が認識された。水素が存在して必要な還元当量を供給する限り、多くのアセテート生成菌がCO₂の存在下で増殖し、アセテートなどの化合物を生成することが示された(例えば、Drake、Acetogenesis、3~60頁、Chapman and Hall、New York、(1994年)参照)。これは、以下の式に要約することができる：



したがって、Wood-Ljungdahl経路を有する天然に存在しない微生物は、アセチルCoAおよび他の所望の生成物の生成のためにCO₂およびH₂混合物も利用することができる。

【0020】

Wood-Ljungdahl経路は当技術分野で周知であり、12個の反応からなり、それらは2つの分岐、すなわち(1)メチル分岐および(2)カルボニル分岐に分けることができる。メチル分岐は合成ガスをメチルテトラヒドロ葉酸(メチルTHF)に変換し、カルボニル分岐はメチルTHFをアセチルCoAに変換する。メチル分岐における反応は、以下の酵素またはタンパク質によって順番に触媒される：フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼ、メチルテトラヒドロ葉酸シクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ。カルボニル分岐における反応は、以下の酵素またはタンパク質によって順番に触媒される：メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ(例えば、AcSE)、コリノイド鉄-硫黄タンパク質、ニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質(例えば、AcSF)、フェレドキシン、アセチルCoAシンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼおよびニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質(例えば、Cooc)。十分な数のコード核酸を導入してアセチルCoA経路を生成するための、本明細書で提供される教示および指針に従って、当業者は、宿主生物体に存在しないWood-Ljungdahl酵素またはタンパク質をコードする核酸を少なくとも導入することに関して、同じ技術設計を実施することもできることを理解するであろう。したがって、改変された生物体が1つの分岐または完全なWood-Ljungdahl経路を含むように、本発明の微生物の生物体へ1つまたは複数のコード核酸を導入することは、合成ガス利用能を付与する。

【0021】

したがって、本発明の天然に存在しない微生物は、COおよび/またはCO₂を提供する合成ガスまたは他のガス状炭素源を用いて、所望の生成物を生成することができる。CO₂の場合、追加の供給源には、それらに限定されないが、メタンがCO₂に変換される、アンモニアおよび水素プラントにおける副産物としてのCO₂の生成；木および化石燃料の燃焼；ビール、ウィスキーおよび他のアルコール飲料の醸造、または他の発酵プロセスにおける糖発酵の副産物としてのCO₂の生成；石灰CaOの製造における石灰岩CaCO₃の熱分解；リン酸ナトリウム製造の副産物としてのCO₂の生成；石灰岩またはドロマイトに対する酸性化された水の作用によって生成される、天然の二酸化炭素源からの直接生成とが含まれる。

【0022】

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

10

【0023】

代謝改変は、その天然の状態から変更された生化学反応を指す。したがって、天然に存在しない微生物は、代謝ポリペプチドまたはその機能的断片をコードする核酸に対する遺伝子改変を有することができる。例示的な代謝改変が、本明細書で開示される。

【0024】

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

20

【0025】

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

30

【0026】

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

【0027】

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

40

【0028】

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

50

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

【0029】

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

10

【0030】

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

20

【0031】

オルソログは、垂直伝達 (vertical descent) が関係し、異なる生物体での実質的に同じか同一の機能の役割を担う1つまたは複数の遺伝子である。例えば、マウスエポキシドヒドロラーゼおよびヒトエポキシドヒドロラーゼは、エポキシドの加水分解の生物学的機能のためのオルソログと考えることができる。遺伝子は、例えば、それらが同種であるか共通祖先からの進化によって関係していることを示すのに十分な量の配列類似性をそれらが共有する場合、垂直伝達に関係している。それらが、一次配列類似性が識別可能でない程度までそれらが共通祖先から進化したことを示すのに十分な量の三次元構造を共有するが必ずしも配列類似性を共有しない場合にも、遺伝子はオルソログと考えることができる。オルソログである遺伝子は、約25%~100%アミノ酸配列同一性の配列類似性を有するタンパク質をコードすることができる。それらの三次元構造も類似性を示す場合、25%未満のアミノ酸類似性を共有するタンパク質をコードする遺伝子も、垂直伝達によって生じたと考えることができる。組織プラスミノゲン活性化因子およびエラスターゼを含む、酵素のセリンプロテアーゼファミリーのメンバーは、共通祖先から垂直伝達によって生じたと考えられる。

30

【0032】

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

40

50

なる分子への分離である。第2の例は、マイコプラズマ5' - 3' エキソヌクレアーゼおよび *Drosophila* DNAポリメラーゼIII活性の分離である。第1の種からのDNAポリメラーゼは、第2の種からのエキソヌクレアーゼまたはポリメラーゼの一方または両方にオルソログであると、またはその逆とみなすことができる。

【0033】

対照的に、パラログは、例えば複製とそれに続く進化的分岐によって関係があるホモログであり、類似または共通しているが、同一でない機能を有する。パラログは、例えば、同じ種または異なる種を起源とするかそれに由来することができる。例えば、ミクロソームのエポキシドヒドロラーゼ(エポキシドヒドロラーゼI)および可溶性のエポキシドヒドロラーゼ(エポキシドヒドロラーゼII)は、同じ種で異なる反応を触媒し、異なる機能を有する、共通祖先から共進化した2つの異なる酵素を表すので、パラログと考えることができる。パラログは、かなりの相互配列類似性を有する同じ種からのタンパク質であり、共通祖先からの共進化を通してそれらが相同であるか関係することを示唆している。パラログスのタンパク質ファミリー群には、HipAホモログ、ルシフェラーゼ遺伝子、ペプチダーゼなどが含まれる。

10

【0034】

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

20

【0035】

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

30

【0036】

オルソログ、パラログおよび非オルソログスな遺伝子置換は、当業者に周知である方法によって決定することができる。例えば、2つのポリペプチドのための核酸またはアミノ酸配列の検査は、比較される配列間の配列の同一性および類似性を明らかにする。そのような類似性に基づいて、タンパク質が共通祖先からの進化を通して関係していることを示すのにその類似性が十分に高いかどうか、当業者は決定することができる。当業者に周知であるアルゴリズム、例えばAlign、BLAST、Clustal Wなどは、生の配列の類似性または同一性を比較、決定し、さらに、重みまたはスコアを割り当てることができる配列中のギャップの存在または重要性を決定する。そのようなアルゴリズムは当技術分野でも公知であり、ヌクレオチド配列の類似性または同一性を決定することに同様に適用できる。関連性を決定するのに十分な類似性のパラメータは、統計的類似性、またはランダムなポリペプチド中で類似したマッチを見出す可能性、および決定されるマッチの有意性を計算するための周知の方法に基づいて計算される。所望により、2つ以上の配列のコンピュータによる比較を、当業者が視覚的に最適化することもできる。関係する遺伝子生成物またはタンパク質は、高い類似性、例えば25%~100%の配列同一性を有すると予想することができる。無関係であるタンパク質は、十分なサイズのデータベース

40

50

をスキャンする場合に偶然に起こることが予想されるのと事実上同じである同一性を有することができる(約5%)。5%から24%の間の配列は、比較する配列が関係していると結論するのに十分な相同性を表すことができるか、表すことができない。これらの配列の関連性を決定するために、データセットのサイズを前提とするそのようなマッチの有意性を決定する追加の統計分析を実施することができる。

【0037】

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

【0038】

一実施形態では、本発明は、天然に存在しない微生物であって、COおよび/またはCO₂およびH₂をアセチル補酵素A(アセチルCoA)に変換する経路を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下で、COおよび/またはCO₂およびH₂をアセチルCoAに変換する能力を欠く微生物を提供する。例えば、前記1つまたは複数の外因性タンパク質または酵素は、コバラミドコリノイド/鉄-硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、アセチルCoAシンターゼ、アセチルCoAシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼから選択することができる(図1、実施例VIIおよびVIIを参照)。微生物は、COおよび/またはCO₂およびH₂をアセチルCoAに変換する経路を付与する、全てまでを含む2つ以上、3つ以上、などのタンパク質および酵素、例えばコバラミドコリノイド/鉄-硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、アセチルCoAシンターゼ、アセチルCoAシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼを発現することもできる。

【0039】

本明細書で開示されるように、本発明の実施形態は、COおよび/またはCO₂を炭素源として利用して所望の生成物を生成することができる、天然に存在しない微生物を生成することに関する。例えば、Wood-Ljungdahl経路のカルボニルおよび/またはメチル分岐のタンパク質および酵素(図1および2)が、Wood-Ljungdahl酵素を天然に含まない微生物に導入される。Wood-Ljungdahl経路の遺伝子操作に特に有用な生物体はE.coliであり、それは、利用可能な遺伝子操作ツールだけでなく発酵条件に関してもよく特徴付けられている(実施例VIIを参照)。

【0040】

別の実施形態では、本発明は、天然に存在しない微生物であって、COおよびH₂を含む、合成ガスとしても公知の合成ガスまたは他のガス状炭素源をアセチル補酵素A(アセチルCoA)に変換する経路を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下で、COおよびH₂をアセチルCoAに変換する能力を欠く微生物を提供する。そのような合成ガスまたは他のガスは、CO₂をさらに含むことができる。したがって、本発明の天然に存在しない微生物は、CO₂、COおよび/またはH₂をアセチルCoAに変換する効率を増加させる経路を含むことができる。さらに、本発明は、天然に存在しない微生物であって、CO₂およびH₂を含むガス状炭素源をアセチルCoAに変換する経路を前記微生物に付与する1つまたは

複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下で、CO₂およびH₂をアセチルCoAに変換する能力を欠く微生物を提供する。ガスは、COをさらに含むことができる。本明細書に記載のように、外因性タンパク質は、コバラミドコリノイド/鉄-硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、アセチルCoAシンターゼ、アセチルCoAシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼから選択することができる。

【0041】

さらに別の実施形態では、本発明は、天然に存在しない微生物であって、COおよび/またはCO₂およびH₂をメチルテトラヒドロ葉酸(メチルTHF)に変換する経路を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下で、COおよび/またはCO₂およびH₂をメチルTHFに変換する能力を欠く微生物を提供する。本明細書で開示されるように、前記1つまたは複数の外因性タンパク質は、フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼ、メチルテトラヒドロ葉酸シクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼから選択することができる(図1および実施例VIIを参照)。前記微生物は、COおよび/またはCO₂およびH₂をメチルTHFに変換する経路を付与する、全てまでを含む2つ以上、3つ以上、などのタンパク質および酵素を発現することもでき、それらには、フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼ、メチルテトラヒドロ葉酸シクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼの全てまでが含まれる。

10

20

【0042】

さらに、本発明は、天然に存在しない微生物であって、COおよびH₂を含む合成ガスまたは他のガス状炭素源をメチルTHFに変換する経路を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下で、COおよびH₂をメチルTHFに変換する能力を欠く微生物を提供する。合成ガスは、CO₂をさらに含むことができる。さらに、本発明は、天然に存在しない微生物であって、CO₂およびH₂を含むガス状炭素源をメチルTHFに変換する経路を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下で、CO₂およびH₂をメチルTHFに変換する能力を欠く微生物を提供する。ガス状炭素源は、COをさらに含むことができる。上記のように、外因性タンパク質は、フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼ、メチルテトラヒドロ葉酸シクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼから選択することができる。

30

【0043】

したがって、本発明は、天然に存在しない微生物、およびそのような微生物を利用して、COおよび/またはCO₂を含む合成ガスまたは他のガスからアセチルCoAまたはメチルTHFなどの所望の生成物を生成する方法、特に、それ以前にはCOおよび/またはCO₂を含む合成ガスまたは別のガスを炭素源として利用することができなかった、COおよび/またはCO₂を含む合成ガスまたは他のガスを利用することができる微生物を生成することに関する(実施例VIIを参照)。さらに、微生物はWood-Ljungdahl経路のメチルおよびカルボニル分岐の両方を含むように設計製作することができる(図1、2および6)。さらに、所望の生成物を生成すること(例えばアセチルCoAまたはメチルTHFを前駆体として有する生成物を生成すること)ができるタンパク質または酵素を発現させることによって所望の生成物を生成するように微生物を設計製作することによって、他の所望の生成物を生成することもできる(図3を参照)。本明細書で開示されるように、そのような微生物は、所望の代謝経路を付与するタンパク質または遺伝子を発現させることによって、または代謝を所望の生成物の方へ誘導することができる欠

40

50

失を決定することによって生成することができる。

【0044】

さらに、本発明は、天然に存在しない微生物であって、その遺伝子改変が存在しない前記微生物と比べて高い、COおよび/またはCO₂およびH₂からアセチルCoAを生成する効率を前記微生物に付与する遺伝子改変を含み、COおよび/またはCO₂およびH₂をアセチルCoAに変換する経路を含む微生物を提供する。そのような微生物において、遺伝子改変は、1つまたは複数の外因性タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸分子の発現を含むことができ、それによって前記1つまたは複数の外因性タンパク質の発現は、COおよび/またはCO₂およびH₂からアセチルCoAを生成する効率を高める。本明細書で開示されるように、1つまたは複数の外因性タンパク質は、コバラミドコリノイド/鉄-硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、アセチルCoAシンターゼ、アセチルCoAシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼから、そのようなタンパク質の全てまでを含め、選択することができる。そのような天然に存在しない微生物は、1つまたは複数の遺伝子破壊を含む遺伝子改変を代わりに、または追加で有することができる、それによって前記1つまたは複数の遺伝子破壊は、COおよび/またはCO₂およびH₂からアセチルCoAを生成する効率を高める。さらに、本発明は、天然に存在しない微生物であって、本明細書で開示される方法を用いてメチルTHFまたは他の所望の生成物を生成する高い効率を付与する遺伝子改変を含む微生物を提供する。したがって、本発明は、COおよび/またはCO₂を含む合成ガスまたは他のガスから所望の生成物を生成する能力を既に有する微生物において、所望の生成物の生成効率を向上させることにさらに関する。

10

20

【0045】

本発明は、天然に存在しない微生物であって、COおよび/またはCO₂を炭素源として含む合成ガスまたは他のガスの利用を前記微生物に付与する1つまたは複数のタンパク質を含み、COおよび/またはCO₂の利用を付与する前記1つまたは複数のタンパク質の不在下で炭素源を利用する能力を欠く微生物にも関する。さらに本発明は、天然に存在しない微生物であって、炭素源としての一酸化炭素および/または二酸化炭素の利用を前記微生物に付与する1つまたは複数のタンパク質を含み、前記1つまたは複数のタンパク質の不在下で前記炭素源を利用する能力を欠く微生物を提供する。さらに別の実施形態では、本発明は、天然に存在しない微生物であって、H₂と組み合わせた炭素源としてのCOおよび/またはCO₂の利用を前記微生物に付与する1つまたは複数のタンパク質を含み、前記1つまたは複数のタンパク質の不在下で前記炭素源を利用する能力を欠く微生物を提供する。さらに本発明は、天然に存在しない微生物であって、H₂およびCO₂と組み合わせた炭素源としてのCOの利用を前記微生物に付与する1つまたは複数のタンパク質を含み、前記1つまたは複数のタンパク質の不在下で前記炭素源を利用する能力を欠く微生物を提供する。そのような微生物は、炭素源から所望の生成物、例えばメチルテトラヒドロ葉酸またはアセチル補酵素A（アセチルCoA）、またはアセチルCoAもしくはメチルTHFから合成される生成物を含む、本明細書で開示される他の所望の生成物を生成するために用いることができる。そのような天然に存在しない微生物は、本明細書で開示されるような、生成物の生成を増加させる1つまたは複数の外因性タンパク質を発現することができる（図1および2を参照）。

30

40

【0046】

さらに本発明は、天然に存在しない微生物であって、合成ガスまたは他のガス状炭素源の利用を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下で前記炭素源を利用する能力を有し、それによって前記1つまたは複数の外因性タンパク質の発現が前記炭素源の利用効率を高める微生物を提供する。さらに本発明は、天然に存在しない微生物であって、炭素源としての一酸化炭素の利用を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下で前記炭素源を利用する能力を有し、それによって前記1つまたは複数の外因性タンパク質の発現が前記炭素源の利用効率を高める微生物を提

50

供する。

【0047】

さらに別の実施形態では、本発明は、天然に存在しない微生物であって、 H_2 と組み合わせた炭素源としての CO および/または CO_2 の利用を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下で前記炭素源を利用する能力を有し、それによって前記1つまたは複数の外因性タンパク質の発現が前記炭素源の利用効率を高める微生物を提供する。さらに、天然に存在しない微生物であって、 H_2 および CO_2 と組み合わせた炭素源としての CO の利用を前記微生物に付与する1つまたは複数の外因性タンパク質を含み、前記1つまたは複数の外因性タンパク質の不在下で前記炭素源を利用する能力を有し、それによって前記1つまたは複数の外因性タンパク質の発現が前記炭素源の利用効率を高める微生物が提供される。本明細書で開示されるように、そのような微生物は、アセチル CoA 、メチル THF または他の所望の生成物などの所望の生成物を前記炭素源から生成するために用いることができる。

10

【0048】

本発明は、メタノールおよび合成ガスを利用してアセチル CoA を生成することができる、天然に存在しない微生物の生物体も提供する。したがって、本微生物の生物体は、メタノールおよび CO 、 CO_2 および/または H_2 、例えば、 CO_2 、 CO_2 および H_2 、 CO 、 CO および H_2 、 CO_2 および CO 、または CO_2 、 CO および H_2 を利用して、アセチル CoA を生成することができる。アセチル CoA はほとんどの微生物の生物体で生成されるので、アセチル CoA を生成することができる本発明の天然に存在しない微生物の生物体は、所望の経路を含むように設計製作されたものであると理解される。さらに、微生物の生物体は、メタノールおよび合成ガスを利用してアセチル CoA を生成するように設計製作される(実施例を参照)。一実施形態では、本発明は、天然に存在しない微生物の生物体であって、アセチル CoA を生成するのに十分な量で発現されるアセチル CoA 経路の酵素またはタンパク質をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むアセチル補酵素A(アセチル CoA)経路を有し、前記アセチル CoA 経路は、メタノール-メチルトランスフェラーゼおよびアセチル CoA シンターゼ/一酸化炭素デヒドロゲナーゼを含む微生物の生物体を提供する。そのような天然に存在しない微生物の生物体では、アセチル CoA 経路は、 CO_2 、 CO および/または H_2 、すなわちそれらの組合せを、アセチル CoA に変換する能力を付与することができる。そのようなアセチル CoA 経路のメタノール-メチルトランスフェラーゼ活性は、例えば、メタノールメチルトランスフェラーゼ、コリノイドタンパク質(Mt a Cなど)およびメチルテトラヒドロ葉酸:コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ(Mt a Aなど)から選択される酵素またはタンパク質を含むことができる(実施例IIおよびIIIを参照)。そのようなアセチル CoA 経路のアセチル CoA シンターゼ/一酸化炭素デヒドロゲナーゼ活性は、例えば、メチルテトラヒドロ葉酸:コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ(A c s Eなど)、コリノイド鉄-硫黄タンパク質(A c s Dなど)、ニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質(A c s Fなど)、フェレドキシン、アセチル CoA シンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼおよびニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質(C o o Cなど)から選択される酵素またはタンパク質を含むことができる(実施例IIおよびIIIを参照)。本明細書で開示されるように、アセチル CoA 経路をコードする2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上などの核酸を、本発明の天然に存在しない微生物の生物体で発現させることができる。特定の実施形態では、天然に存在しない微生物の生物体は、メタノール-メチルトランスフェラーゼ(メタノールメチルトランスフェラーゼ、コリノイドタンパク質(Mt a Cなど)およびメチルテトラヒドロ葉酸:コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ(Mt a Aなど)を含む)、ならびにアセチル CoA シンターゼ/一酸化炭素デヒドロゲナーゼ(メチルテトラヒドロ葉酸:コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ(A c s Eなど)、コリノイド鉄-硫黄タンパク質(A c s Dなど)、ニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質(C o o Cなど)、フェレドキシン、アセチル CoA シンターゼ、一酸化炭素デヒドロ

20

30

40

50

ゲナーゼおよびニッケル - タンパク質アセンブリータンパク質 (A c s F など) を含む) をコードする 10 個の外因性核酸を含むことができる。

【 0049 】

さらに別の実施形態では、天然に存在しない微生物の生物体は、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼをさらに含むことができる。例えば、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼは、外因性核酸によってコードされてもよい。さらに別の実施形態では、本明細書で開示されるように、天然に存在しない微生物の生物体はヒドロゲナーゼをさらに含むことができ、それは内因性または外因性の核酸によってコードすることができる (実施例 I I および I I I を参照) 。

【 0050 】

本明細書で開示されるように、天然に存在しない微生物の生物体は、例えば、異種の核酸である少なくとも 1 つの外因性の核酸を含むことができる。本明細書でさらに開示されるように、天然に存在しない微生物の生物体は、例えば、実質的に嫌気性の培地で増殖させることができる。

【 0051 】

本発明は、一般に代謝反応、その反応体もしくは生成物に関して、または、参照代謝反応、反応体もしくは生成物に関連するかそれを触媒する酵素、またはそれに関連するタンパク質をコードする 1 つまたは複数の核酸または遺伝子に特にして本明細書に記載される。本明細書で明示的に特記されていない場合、当業者は、反応への言及が、反応の反応体および生成物への言及も構成することを理解するであろう。同様に、本明細書で明示的に特記されない場合、反応体または生成物への言及は反応へも言及し、これらの代謝構成要素のいずれかへの言及は、参照反応、反応体または生成物を触媒する酵素、またはそれらに関連するタンパク質をコードする遺伝子または複数の遺伝子にも言及する。同様に、代謝生化学、酵素学およびゲノミクスの周知の分野を考慮すると、本明細書での遺伝子またはコード核酸への言及は、対応するコードされた酵素およびそれが触媒する反応、またはその反応に関連するタンパク質、ならびにその反応の反応体および生成物への言及も構成する。

【 0052 】

本発明の天然に存在しない微生物の生物体は、 1 つまたは複数のアセチル C o A 生合成経路に関連する 1 つまたは複数の酵素またはタンパク質をコードする発現可能な核酸を導入することによって生成することができる。生合成のために選択される宿主の微生物の生物体によって、特定のアセチル C o A 生合成経路の一部または全部のための核酸を発現させることができる。例えば、選択された宿主で所望の生合成経路の 1 つまたは複数の酵素またはタンパク質が不足する場合、不足する (1 つまたは複数の) 酵素または (1 つまたは複数の) タンパク質のための発現可能な核酸が、その後の外因性発現のために宿主に導入される。あるいは、選択された宿主が経路の一部の遺伝子の内因性発現を示すが、他が不足する場合、アセチル C o A 生合成を達成するために、不足する (1 つまたは複数の) 酵素または (1 つまたは複数の) タンパク質のコード核酸が必要である。したがって、本発明の天然に存在しない微生物の生物体は、所望の生合成経路を得るために外因性の酵素もしくはタンパク質の活性を導入することによって生成することができ、または、所望の生合成経路は、 1 つまたは複数の内因性の酵素もしくはタンパク質と一緒にアセチル C o A などの所望の生成物を生成する、 1 つまたは複数の外因性酵素もしくはタンパク質の活性を導入することによって得ることができる。

【 0053 】

選択された宿主の微生物の生物体のアセチル C o A 生合成経路構成要素によって、本発明の天然に存在しない微生物の生物体は、外因的に発現されるアセチル C o A 経路をコードする少なくとも 1 つの核酸、および 1 つまたは複数のアセチル C o A 生合成経路のためのコード核酸の全てまでを含む。例えば、アセチル C o A 生合成は、対応するコード核酸の外因性発現を通して、経路の酵素またはタンパク質に欠ける宿主で確立することができる。アセチル C o A 経路の全ての酵素またはタンパク質に欠ける宿主では、その経路の全

10

20

30

40

50

ての酵素またはタンパク質の外因性発現が含まれてもよいが、経路の全てのタンパク質またはタンパク質は、宿主が経路の酵素またはタンパク質の少なくとも1つを含む場合にも発現させることができるものと理解される。例えば、メタノールメチルトランスフェラーゼ、コリノイドタンパク質 (M t a C など) およびメチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ (M t a A など) を含めることができるメタノール・メチルトランスフェラーゼ、ならびにメチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ (A c s E など)、コリノイド鉄・硫黄タンパク質 (A c s D など)、ニッケル・タンパク質アセンブリータンパク質 (A c s F など)、フェレドキシン、アセチルC o A シンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼおよびニッケル・タンパク質アセンブリータンパク質 (C o o C など) を含めることができるアセチルC o A シンターゼ/一酸化炭素デヒドロゲナーゼなど、アセチルC o A の生成のための経路の全ての酵素またはタンパク質の外因性発現が含まれてもよい。

10

【0054】

別の実施形態では、合成ガスまたは他のガス状炭素源からアセチルC o A を生成する経路において、その生合成経路の1つまたは複数のタンパク質は、コバラミドコリノイド/鉄・硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、アセチルC o A シンターゼ、アセチルC o A シンターゼジスルフィドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼから選択することができる (図2、実施例V I I IおよびV I I I Iを参照)。メチルT H Fを生成する経路において、その生合成経路の1つまたは複数のタンパク質は、フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼ、メチルテトラヒドロ葉酸シクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼから選択することができる (図1および実施例V I I I Iを参照)。さらに、アセチルC o A およびメチルT H Fの両方を生成するために必要とされる酵素をコードする遺伝子を、微生物に導入することができる (図3および実施例V I I I Iを参照)。スクシネート、4 - ヒドロキシブチレートおよび1, 4 - ブタンジオールを含む追加の所望の生成物の生成のための代謝経路が、例えば2007年8月10日出願の米国特許出願第11/891, 602号、およびW O / 2008/115840に記載される (実施例V I I I Iを参照)。

20

【0055】

本明細書で提供される教示および指針を考慮すると、当業者は、発現可能な形で導入するためのコード核酸の数が、少なくとも選択される宿主の微生物の生物体のアセチルC o A 経路の不足に対応することを理解するであろう。したがって、本発明の天然に存在しない微生物の生物体は、本明細書で開示されるアセチルC o A 生合成経路を構成する酵素またはタンパク質をコードする1、2、3、4、5、6、7、8、9個、または全てまでの核酸を有することができる。一部の実施形態では、天然に存在しない微生物の生物体は、アセチルC o A 生合成を促進もしくは最適化するか、または宿主の微生物の生物体に他の有用な機能を付与する他の遺伝子改変を含むこともできる。1つのそのような他の機能は、例えば、メタノールなどのアセチルC o A 経路前駆体の1つまたは複数の合成の増強を含むことができる。

30

【0056】

一般に宿主の微生物の生物体は、それがアセチルC o A 経路の前駆体を、天然に生成された分子として、または所望の前駆体の新規の生成を提供するか、宿主の微生物の生物体によって天然に生成される前駆体の生成を増加させる設計製作された生成物として生成するように選択される。本明細書で開示されるように、宿主生物体は、前駆体の生成を増加させるように設計製作することができる。さらに、所望の前駆体を生成するように設計製作された微生物の生物体は、宿主生物体として用いることができ、また、アセチルC o A 経路の酵素またはタンパク質を発現するようにさらに設計製作することができる。

40

【0057】

一部の実施形態では、本発明の天然に存在しない微生物の生物体は、アセチルC o A を合成する酵素能力を含む宿主から生成される。この具体的な実施形態では、例えばアセチ

50

ルC o A 経路反応をアセチルC o A 生成の方へ向けるために、アセチルC o A 経路生成物の合成または蓄積を増加させることが有用なことがある。合成または蓄積の増加は、例えば、上記のアセチルC o A 経路の酵素またはタンパク質の1つまたは複数をコードする核酸の過剰発現によって達成することができる。アセチルC o A 経路の1つまたは複数の酵素および/または1つまたは複数のタンパク質の過剰発現は、例えば内因性の1つまたは複数の遺伝子の外因性発現を通して、または異種の1つまたは複数の遺伝子の外因性発現を通して起こることができる。したがって、天然に存在する生物体は、アセチルC o A 合成経路の酵素またはタンパク質をコードする1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の、すなわち、全てまでの核酸の過剰発現を通して、例えばアセチルC o A を生成する、本発明の天然に存在しない微生物の生物体になるように容易に生成することができる。さらに、天然に存在しない生物体は、アセチルC o A 合成経路の酵素の活性の増加をもたらす内因性遺伝子の突然変異誘発によって生成することができる。

10

【0058】

特に有用な実施形態では、コード核酸の外因性発現が使用される。外因性発現は、発現エレメントおよび/または調節エレメントを宿主および用途に対し特別仕立てにする(c u s t o m t a i l o r) 能力を付与し、使用者によって制御される所望の発現レベルを達成する。しかし、誘導可能なプロモーターまたは他の調節エレメントに連結される場合、例えば負の調節エフェクターの除去または遺伝子のプロモーターの誘導によって、内因性発現を他の実施形態で利用することもできる。したがって、天然に存在する誘導可能なプロモーターを有する内因性遺伝子は、適当な誘導剤を提供することによって上方制御することができるか、または、内因性遺伝子の調節領域を誘導可能な調節エレメントを組み込むように設計製作し、それによって所望の時間における内因性遺伝子の発現の増加の調節を可能にすることができる。同様に、天然に存在しない微生物の生物体に導入される外因性遺伝子のための調節エレメントとして、誘導可能なプロモーターが含まれてもよい。

20

【0059】

本発明の方法では、1つまたは複数の外因性核酸のいずれかを微生物の生物体に導入して、本発明の天然に存在しない微生物の生物体を生成することができるものと理解される。核酸は、例えば、微生物の生物体にアセチルC o A 合成経路を付与するために導入することができる。あるいは、コード核酸を導入して、アセチルC o A 合成能力を付与するために必要とされる反応のいくつかを触媒する生合成能力を有する、中間の微生物の生物体を生成することができる。例えば、アセチルC o A 合成経路を有する天然に存在しない微生物の生物体は、所望の酵素またはタンパク質、例えば、メタノールメチルトランスフェラーゼおよびコリノイドタンパク質；メタノールメチルトランスフェラーゼおよびメチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ；コリノイドタンパク質およびコリノイド鉄-硫黄タンパク質；ニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質およびフェレドキシンなどの組合せをコードする少なくとも2つの外因性核酸を含むことができる。したがって、生合成経路の2つ以上の酵素またはタンパク質の任意の組合せが、本発明の天然に存在しない微生物の生物体に含まれてもよいと理解される。同様に、所望の生合成経路の酵素および/またはタンパク質の組合せが対応する所望の生成物の生成をもたらす限り、所望により、生合成経路の3つ以上の酵素またはタンパク質の任意の組合せ、例えば、メタノールメチルトランスフェラーゼ、コリノイド鉄-硫黄タンパク質(A c s D など) およびアセチルC o A シンターゼ；コリノイドタンパク質(M t a C など)、一酸化炭素デヒドロゲナーゼおよびニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質(例えばC o o C またはA c s F)；メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ(A c s E など)、フェレドキシンおよびアセチルC o A シンターゼなどが、本発明の天然に存在しない微生物の生物体に含まれてもよいと理解される。同様に、所望の生合成経路の酵素および/またはタンパク質の組合せが対応する所望の生成物の生成をもたらす限り、所望により、本明細書で開示される生合成経路の4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つまたはそれを超える酵素またはタンパク質の任意の組合

30

40

50

せが、本発明の天然に存在しない微生物の生物体に含まれてもよい。

【0060】

本明細書に記載のアセチルC o Aの生合成に加えて、他の経路による生成物生合成を達成するために、本発明の天然に存在しない微生物の生物体および方法は、様々な相互組合せならびに当技術分野で周知である他の微生物の生物体および方法との組合せで利用することもできる。例えば、アセチルC o A生産体の使用以外のアセチルC o Aを生成する1つの代替形態は、アセチルC o A経路の中間体をアセチルC o Aに変換することができる別の微生物の生物体を追加することによるものである。そのような方法の1つは、例えば、アセチルC o A経路の中間体を生成する微生物の生物体の発酵を含む。次に、アセチルC o A経路の中間体は、アセチルC o A経路の中間体をアセチルC o Aに変換する第2の微生物の生物体のための基質として用いることができる。アセチルC o A経路の中間体を、第2の生物体の別の培養物に直接加えることができ、または、アセチルC o A経路中間体の生産体の元の培養物から、例えば細胞分離によってこれらの微生物の生物体を除去することができ、次に、発酵プロセスへの第2の生物体のその後の添加を利用して、中間体の精製工程なしで最終生成物を生成することができる。

10

【0061】

他の実施形態では、本発明の天然に存在しない微生物の生物体および方法は、例えばアセチルC o Aの生合成を達成するために、多種多様の下位経路で組み立てることができる。これらの実施形態では、本発明の所望の生成物のための生合成経路を異なる微生物の生物体に分離することができ、異なる微生物の生物体を共培養して最終生成物を生成することができる。そのような生合成スキームでは、1つの微生物の生物体の生成物は、最終生成物が合成されるまで第2の微生物の生物体のための基質である。例えば、アセチルC o Aの生合成は、別の経路の中間体または生成物への1つの経路の中間体の変換のための生合成経路を含む微生物の生物体を構築することによって達成することができる。あるいは、アセチルC o Aは、同じ容器中の2つの生物体を用いる共培養または共発酵を通して微生物の生物体から生合成的に生成することもでき、その場合、第1の微生物の生物体はアセチルC o A中間体を生成し、第2の微生物の生物体は中間体をアセチルC o Aに変換する。

20

【0062】

本明細書で提供される教示および指針を考慮すると、当業者は、本発明の天然に存在しない微生物の生物体および方法と、他の微生物の生物体との、下位経路を有する他の天然に存在しない微生物の生物体の共培養との、およびアセチルC o Aを生成することが当技術分野で周知である他の化学的および/または生化学的方法の組合せとの、多種多様の組合せおよび並べかえが存在することを理解するであろう。さらに、アセチルC o Aは他の望ましい生成物の前駆体であるので、本発明の天然に存在しない微生物の生物体は、所望により、アセチルC o Aを前駆体または中間体として利用する他の所望の経路を付与できる宿主生物体として用いることができる。

30

【0063】

アセチルC o A経路の酵素またはタンパク質のためのコード核酸の供給源には、例えば、コードされる遺伝子生成物が参照反応を触媒することができる任意の種を含めることができる。そのような種には、それらに限定されないが、古細菌および真正細菌を含む細菌、ならびに酵母、植物、昆虫、動物およびヒトを含む哺乳動物を含む真核生物を含む、原核生物および真核生物両方の生物体が含まれる。そのような供給源のための例示的な種には、例えば、*Escherichia coli*、*Methanosarcina barkeri*、*Methanosarcina acetivorans*、*Moorella thermoacetica*、*Carboxydothemus hydrogenoformans*、*Rhodospirillum rubrum*、*Acetobacterium woodii*、*Butyrivibacterium methylotrophicum*、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium carboxidivorans*、*Clostridium ljung*

40

50

dahlia, Eubacterium limosum, Oxobacter pfe
 nniigi, Peptostreptococcus productus, Rhod
 opseudomonas palustris P4, Rubrivivax gel
 atinosus, Citrobacter sp Y19, Methanosarci
 na acetivorans C2A, Methanosarcina barker
 i, Desulfosporosinus orientis, Desulfovibr
 io desulfuricans, Desulfovibrio vulgaris,
 Moorella thermoautotrophica, Carboxydi bra
 chium pacificus, Carboxydo cella thermo aut
 otrophica, Thermicola carboxydiphila, The
 rmolithobacter carboxydivorans, Thermosin
 us carboxydivorans, Methanothermobacter t
 hermoautotrophicus, Desulfotomaculum carb
 oxydivorans, Desulfotomaculum kuznetsovi
 i, Desulfotomaculum nigrificans, Desulfotom
 aculum thermobenzoicum subsp. thermosynt
 rophicum, Syntrophobacter fumaroxidans, Cl
 ostridium acidurici, Desulfovibrio africa
 nusなど、ならびに本明細書で開示されるか、対応する遺伝子の供給源生物体として利
 用可能な他の例示的な種が含まれる。しかし、395種の微生物ゲノムおよび様々な酵母
 20、真菌類、植物および哺乳動物のゲノムを含む、今では550を超える種（これらの半分
 以上はNCBIなどの公開データベースで利用可能）について完全なゲノム配列が利用可
 能であるので、例えば、公知の遺伝子のホモログ、オルソログ、パラログおよび非オルソ
 ログ遺伝子の置換を含む、関係のあるまたは遠戚の種の1つまたは複数の遺伝子のため
 の必要なアセチルCoA生合成活性をコードする遺伝子の同定、ならびに生物体の中の遺
 伝子改変の交換は、当技術分野で日常的であり周知である。したがって、E. coliな
 どの特定の生物体に関して本明細書に記載されるアセチルCoAの生合成を可能にする代
 謝改変は、原核生物および真核生物の生物体を同様に含む他の微生物に容易に適用す
 ることができる。本明細書で提供される教示および指針を考慮すると、当業者は、1つの生物
 体で例示される代謝改変を他の生物体に同等に適用することができることを知るであらう
 30。

【0064】

代替のアセチルCoA生合成経路が無関係な種に存在する場合などの一部の例では、例
 えば、参照反応の代わりに類似するが同一でない代謝反応を触媒する、無関係な種からの
 1つまたは複数のパラログの外因性発現によってアセチルCoA生合成を宿主種に付与す
 ることができる。異なる生物体の中で代謝ネットワークの間の特定の違いが存在するので
 、当業者は、異なる生物体の中の実際の遺伝子の使用が異なることがあることを理解す
 るであろう。しかし、本明細書で提供される教示および指針を考慮すると、当業者は、アセ
 チルCoAを合成する対象種で微生物の生物体を構築するために、本明細書で例示される
 微生物の生物体へのコグネイト代謝改変を用いて本発明の教示および方法を全ての微生物
 40の生物体に適用することができることも理解するであろう。

【0065】

宿主の微生物の生物体を、例えば、細菌、酵母、真菌、または発酵プロセスに適用でき
 る様々な他の微生物のいずれかから選択し、天然に存在しない微生物の生物体をそれらで
 生成することができる。例示的な細菌には、Escherichia coli, Kle
 bsiella oxytoca, Anaerobiospirillum succi
 niciiproducens, Actinobacillus succinogene
 s, Mannheimia succiniciiproducens, Rhizobiu
 m etli, Bacillus subtilis, Corynebacterium
 glutamicum, Gluconobacter oxydans, Zymomo
 50

nas mobilis、Lactococcus lactis、Lactobacillus plantarum、Streptomyces coelicolor、Clostridium acetobutylicum、Pseudomonas fluorescensおよびPseudomonas putidaから選択される種が含まれる。例示的な酵母または真菌類には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Kluyveromyces marxianus、Aspergillus terreus、Aspergillus nigerおよびPichia pastorisから選択される種が含まれる。E. coliは遺伝子工学に適する特徴のよくわかっている微生物の生物体であるので、特に有用な宿主生物体である。他の特に有用な宿主生物体には、Saccharomyces cerevisiaeなどの酵母が含まれる。宿主生物体として適する例示的なアセテート生成菌には、Rhodospirillum rubrum、Moorella thermoaceticaおよびDesulfitobacterium hafnienseが含まれるが、これらに限定されない（実施例を参照）。

【0066】

天然に存在しないアセチルCoA産生宿主を構築してその発現レベルを検査するための方法は、例えば、当技術分野で周知である組換え方法および検出方法によって実施することができる。そのような方法は、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory、New York（2001年）およびAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley and Sons、Baltimore、MD（1999年）に記載されているのを見ることができる。

【0067】

アセチルCoAの生成のための経路に関する外因性核酸配列は、それらに限定されないがコンジュゲーション、エレクトロポレーション、化学的形質転換、形質導入、トランスフェクションおよび超音波形質転換を含む当技術分野で周知の技術を用いて、宿主細胞に安定してまたは一時的に導入することができる。E. coliまたは他の原核細胞での外因性発現のために、遺伝子のいくつかの核酸配列または真核生物の核酸のcDNAは、N末端ミトコンドリアなどのターゲティングシグナルまたは他のターゲティングシグナルをコードすることができ、それは、所望により、原核生物の宿主細胞への形質転換の前に除去してもよい。例えば、ミトコンドリアのリーダー配列の除去は、E. coliでの発現の増加をもたらした（Hoffmeisterら、J. Biol. Chem. 280巻、4329～4338頁（2005年））。酵母または他の真核細胞での外因性発現のために、宿主細胞に適するミトコンドリアのターゲティングシグナルまたは分泌シグナルなどの適切なターゲティング配列を加えることによって、遺伝子は、リーダー配列を加えることなしでサイトゾルで発現させることができるか、またはミトコンドリアもしくは他のオルガネラを標的にすることができるか、または分泌を標的にすることができる。したがって、ターゲティング配列を除去するか含むための核酸配列への適当な改変を外因性核酸配列に組み込んで、望ましい特性を付与することができるものと理解される。さらに、当技術分野で周知の技術で遺伝子にコドン最適化を受けさせ、タンパク質の最適化された発現を達成することができる。

【0068】

宿主生物体で機能的である発現調節配列に作動可能に連結されている、本明細書で例示される核酸をコードする1つまたは複数のアセチルCoA生合成経路を含むように、1つまたは複数の発現ベクターを構築することができる。本発明の微生物宿主生物体での使用に適用できる発現ベクターには、例えば、プラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター、エピソーム、ならびに宿主染色体への安定した組込みのために操作可能なベクターおよび選択配列もしくはマーカーを含む人工染色体が含まれる。さらに、発現ベクターに

は、1つまたは複数の選択可能なマーカー遺伝子および適当な発現調節配列を含めることができる。例えば、抗生物質もしくは毒素への耐性を提供するか、栄養要求性の欠乏を補充するか、または培地でない重大な栄養素を供給する、選択可能なマーカー遺伝子が含まれてもよい。発現調節配列には、当技術分野で周知である、構成的プロモーターおよび誘導可能なプロモーター、転写エンハンサー、転写ターミネーターなどを含めることができる。2つ以上の外因性コード核酸を共発現させる場合、両方の核酸は、例えば、単一の発現ベクターまたは別々の発現ベクターに挿入することができる。単一ベクターの発現のために、コード核酸は、作動的に1つの共通の発現調節配列に連結するか、異なる発現調節配列に、例えば1つの誘導可能なプロモーターおよび1つの構成的プロモーターに連結することができる。代謝経路もしくは合成経路に關与する外因性核酸配列の形質転換は、当技術分野で周知である方法を用いて確認することができる。そのような方法には、例えば、mRNAのノーザンブロットもしくはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅などの核酸分析、または遺伝子生成物の発現のためのイムノブロッティング、または導入された核酸配列もしくはその対応する遺伝子生成物の発現を試験する他の適切な分析法が含まれる。外因性核酸は所望の生成物を生成するために十分な量で発現されることは当業者によって理解され、また、当技術分野で周知であって本明細書で開示される方法を用いて十分な発現を得るために、発現レベルを最適化することができることがさらに理解される。

10

【0069】

本発明は、アセチルCoA経路を有する本発明の天然に存在しない微生物の生物体を培養することによってアセチルCoAを生成する方法をさらに提供する。アセチルCoA経路は、例えば、アセチルCoAを生成する条件下およびそれに十分な期間、アセチルCoAを生成するのに十分な量で発現されるアセチルCoA経路の酵素またはタンパク質をコードする少なくとも1つの外因性の核酸を含むことができ、アセチルCoA経路は、メタノール-メチルトランスフェラーゼおよびアセチルCoAシンターゼ/一酸化炭素デヒドロゲナーゼを含む。そのようなアセチルCoA経路では、メタノール-メチルトランスフェラーゼは、メタノールメチルトランスフェラーゼ、コリノイドタンパク質(Mt a Cなど)およびメチルテトラヒドロ葉酸:コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ(Mt a A)から選択される酵素またはタンパク質を含むことができる。さらに、そのようなアセチルCoA経路では、アセチルCoAシンターゼ/一酸化炭素デヒドロゲナーゼは、メチルテトラヒドロ葉酸:コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ(Ac s Eなど)、コリノイド鉄-硫黄タンパク質(Ac s Dなど)、ニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質(Ac s Fなど)、フェレドキシン、アセチルCoAシンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼおよびニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質(Co o Cなど)から選択される酵素またはタンパク質を含むことができる。天然に存在しない微生物の生物体は、実質的に嫌気性の培地中に存在することができる。特定の実施形態では、天然に存在しない微生物の生物体は、CO₂、COおよび/またはH₂、すなわちそれらの組合せ、およびメタノールの存在下で培養することができる。天然に存在しない微生物の生物体は、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼをさらに含むことができ、それは、外因性核酸によって発現させることができる。天然に存在しない微生物の生物体は、例えば、内因性または外因性の核酸によってコードされるヒドロゲナーゼをさらに含むこともできる。

20

30

40

【0070】

別の実施形態では、天然に存在しない微生物の生物体は、特に実質的に嫌気性の条件下で、電子受容体、例えばニトレートの存在下で培養することができる(実施例I I Iを参照)。バイオマスの所望の増加を達成するために、その加える量がバイオマスの所望の増加のために十分な量の電子受容体を提供する限り、所望により、微生物培養物に適量のニトレート、例えば1 mM ~ 100 mM、またはより低いかより高い濃度のニトレートを加えることができるものと理解される。バイオマスの所望の増加を達成するために適当なものとして、そのような量には、5 mM、10 mM、15 mM、20 mM、25 mM、30 mM、40 mM、50 mMが含まれるが、これらに限定されない。

50

【0071】

アセチルCoAの生成を試験するための適切な精製および/またはアッセイは、周知の方法を用いて実施することができる。試験する各設計製作した株について、3連の培養物などの適切な複製物を増殖させることができる。例えば、設計製作した産生宿主における生成物および副産物の形成を観察することができる。最終生成物および中間体、ならびに他の有機化合物を、HPLC（高性能液体クロマトグラフィー）、GC-MS（ガスクロマトグラフィー-質量分析）およびLC-MS（液体クロマトグラフィー-質量分析）などの方法、または当技術分野で周知である常用の手順を用いる他の適切な分析法によって分析することができる。発酵プロセス中の生成物の放出を、培養上清で試験することもできる。副産物および残留グルコースは、例えば、グルコースおよびアルコールのための屈折率検出器および有機酸のための紫外線検出器を用いてHPLCによって（Linら、Biotechnol. Bioeng. 90巻、775~779頁（2005年））、または当技術分野で周知である他の適切なアッセイおよび検出方法によって定量化することができる。外因性DNA配列からの個々の酵素またはタンパク質活性を、当技術分野で周知である方法を用いて分析することもできる（実施例IIIを参照）。

10

【0072】

アセチルCoAまたはアセチルCoAから誘導される生成物は、当技術分野で周知である様々な方法を用いて培養物中の他の成分から分離することができる。アセチルCoAから誘導される生成物には、エタノール、ブタノール、イソブタノール、イソプロパノール、1,4-ブタンジオール、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、4-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、乳酸、メタクリル酸、アジピン酸およびアクリル酸が含まれるが、これらに限定されない。そのような分離法には、例えば抽出法、ならびに連続液液抽出、浸透気化法、膜濾過、膜分離、逆浸透、電気透析、蒸留、結晶化、遠心分離、抽出濾過、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーおよび限外濾過を含む方法が含まれる。上の方法の全ては、当技術分野において周知である。

20

【0073】

本明細書に記載される天然に存在しない微生物の生物体のいずれかを培養して、本発明の生合成生成物を生成および/または分泌することができる。例えば、アセチルCoAまたはアセチルCoAから誘導された生成物の生合成生成のために、アセチルCoA生産体を培養することができる。

30

【0074】

アセチルCoAの生成のために、メタノールおよびCO、CO₂および/またはH₂を含むガスの炭素源およびエネルギー源、ならびに他の必要不可欠な栄養素を含む培地で組換え株が培養される。全プロセスの費用を削減するために、発酵槽の嫌气的条件を維持することが非常に望ましい。そのような条件は、例えば、最初に培地に窒素をスパーシ、次にセプタムおよびクランプキャップでフラスコを密封することによって得ることができる。嫌気条件で増殖が観察されない株のために、限定的通気のための小さな穴をセプタムに開けることによって、微好气的条件を適用することができる。例示的な嫌气的条件は以前に記載されており、当技術分野において周知である。例示的な好气的および嫌气的条件は、例えば、2007年8月10日に出願の米国特許出願第11/891,602号およびWO/2008/115840に記載されている。本明細書で開示されるように、発酵はバッチ、フェドバッチまたは連続的方法で実施することができる。

40

【0075】

所望により、培地を望ましいpHに維持するために、必要により塩基、例えばNaOHもしくは他の塩基、または酸の添加によって培地のpHを所望のpH、特に中性pH、例えば約7のpHに維持してもよい。増殖速度は、分光光度計（600nm）を用いて光学濃度を測定することによって決定することができ、グルコース取込み速度は、炭素源減損を経時的に監視することによって決定できる。

【0076】

50

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

10

20

30

40

50

【0077】

したがって、本明細書で提供される教示および指針を考慮すると、当業者は、炭水化物、メタノールならびにCO、CO₂および/またはH₂を含むガスなどの炭素源で増殖させるとき、本発明の生合成された化合物を細胞内発現するか分泌する、天然に存在しない微生物の生物体を生成することができることを理解するであろう。そのような化合物には、例えばアセチルC o Aおよび任意のアセチルC o A経路の中間代謝産物、ならびにアセチルC o Aから誘導される生成物（例えばエタノール、ブタノール、イソブタノール、イソプロパノール、1,4-ブタンジオール、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、4-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、乳酸、メタクリル酸、アジピン酸およびアクリル酸）が含まれる。必要なのは、例えば、アセチルC o A生合成経路の一部もしくは全部の組入れを含む、所望の化合物または中間体の生合成を達成するために必要とされる酵素またはタンパク質活性の1つまたは複数における設計製作することだけである。したがって、本発明は、炭水化物または他の炭素源で増殖させるとアセチルC o Aを生成し、炭水化物または他の炭素源で増殖させるとアセチルC o A経路で示される中間代謝産物のいずれかを生成および/または分泌するか、あるいはアセチルC o Aから誘導される生成物を生成および/または分泌する、天然に存在しない微生物の生物体を提供する。本発明のアセチルC o Aを生成する微生物の生物体は、中間体、例えば5-メチルテトラヒドロ葉酸(Me-THF)から合成を開始することができる。

【0078】

本発明の天然に存在しない微生物の生物体は、本明細書で例示される当技術分野で周知である方法を用いて、アセチルC o A経路の酵素またはタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸を、アセチルC o Aの生成に十分な量で外因的に発現するように構築される。本発明の微生物の生物体は、アセチルC o Aの生成に十分な条件下で培養されると理解される。本明細書で提供される教示および指針に従い、本発明の天然に存在しない微生物の生物体は、約0.001~200mMまたはそれを超える細胞内濃度をもたらずアセチルC o Aの生合成を達成することができる。一般に、アセチルC o Aの細胞内濃度は、約3~150mM、詳細には約5~125mM、より詳細には約8~100mM、例えば約10mM、20mM、50mM、80mM、またはそれを超える。これらの例示的な範囲のそれぞれの間のおよびそれを超える細胞内濃度も、本発明の天然に存在しない微生物の生物体から達成することができる。

【0079】

一部の実施形態では、培養条件は、嫌氣的または実質的に嫌氣的な増殖または維持条件を含む。例示的な嫌氣的条件は以前に記載されており、当技術分野において周知である。発酵プロセスの例示的な嫌氣的条件が本明細書に記載され、例えば、2007年8月10日に出願の米国特許出願第11/891,602号およびWO/2008/115840に記載されている。これらの条件のいずれかを、当技術分野で周知である他の嫌氣的条件と同様に、天然に存在しない微生物の生物体で使用することができる。そのような嫌氣的条件の下で、アセチルC o A生産体は、5~10mMまたはそれを超える細胞内濃度、な

らびに本明細書で例示される他の全ての濃度で、アセチルC o Aを合成することができる。上の記載が細胞内濃度に言及し、アセチルC o A産生の微生物の生物体はアセチルC o Aを細胞内で生成することができるものと理解される。さらに、アセチルC o Aから誘導される生成物は、細胞内で生成することおよび/または分泌させることができる。そのような生成物には、エタノール、ブタノール、イソブタノール、イソプロパノール、1, 4-ブタンジオール、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、4-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、乳酸、メタクリル酸、アジピン酸およびアクリル酸が含まれるが、これらに限定されない。

【0080】

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

10

【0081】

本明細書に記載されるように、アセチルC o Aの生合成を達成するための1つの例示的な増殖条件には、嫌気培養または発酵条件が含まれる。特定の実施形態では、本発明の天然に存在しない微生物の生物体は、嫌氣的または実質的に嫌氣的な条件の下で維持し、培養し、または発酵させることができる。簡単に述べると、嫌気条件とは酸素が欠けている環境を指す。実質的に嫌氣的な条件には、例えば、培地中の溶解酸素濃度が飽和の0~10%の間にあるような、培養、バッチ発酵または連続発酵が含まれる。実質的に嫌氣的な条件には、1%未満の酸素の雰囲気中で維持される密封チャンバー内の液体培地または固体寒天で細胞を増殖または休止させることも含まれる。酸素の割合は、例えば、培養物をN₂/CO₂混合物または他の適切な1つまたは複数の非酸素ガスでスパージすることによって維持することができる。

20

【0082】

本明細書に記載される培養条件は、アセチルC o Aを製造するために規模を拡大して、連続的に増殖させることができる。例示的な増殖法には、例えば、フェドバッチ発酵およびバッチ分離；フェドバッチ発酵および連続分離、または連続発酵および連続分離が含まれる。これらのプロセスの全ては、当技術分野においては周知である。発酵法は、特に商業的な量のアセチルC o Aの生合成による生産に有用である。一般に、また非連続培養法と同様に、アセチルC o Aの連続的および/またはほとんど連続的な生成には、指数増殖期の増殖を持続および/またはほとんど持続させるために十分な栄養素および培地で、本発明の天然に存在しないアセチルC o A産生生物体を培養することが含まれよう。そのような条件下での連続培養は、例えば、1日、2、3、4、5、6または7日、またはそれを超えて含むことができる。さらに、連続培養は、1週間、2、3、4または5週間、またはそれを超える週および最高数カ月を含むことができる。あるいは、本発明の生物体は、特定の用途に適する場合は数時間培養することができる。連続的および/またはほとんど連続的な培養条件は、これらの例示的な期間の間の全ての期間を含むこともできることを理解すべきである。本発明の微生物の生物体を培養する時間は、所望の目的のために十分な量の生成物を生成するために十分な期間であることがさらに理解される。

30

【0083】

発酵法は、当技術分野において周知である。簡単に述べると、アセチルC o Aの生合成生成のための発酵は、例えば、フェドバッチ発酵およびバッチ分離；フェドバッチ発酵および連続分離、または連続発酵および連続分離で利用することができる。バッチ発酵および連続発酵法の例は、当技術分野で周知である。

40

【0084】

かなりの量のアセチルC o Aの連続的生成のために本発明のアセチルC o A生産体を用いる上記の発酵法に加えて、アセチルC o A生産体は、例えば、生成物を他の化合物に変換するための化学合成法に同時にかけること、または、生成物を発酵培養物から分離し、続いて、所望により、生成物を他の化合物に変換するために、化学変換にかけることができる。

50

【0085】

合成ガスをエタノールに変換することができる微生物を含む、少なくとも30個の異なる野生型生物体が多年かけて単離され、合成ガスまたは合成ガスの成分で増殖することが示された (Vegara, Appl. Biochem. Biotechnol. 20 / 21 巻、781~797頁 (1989年)) (表1を参照)。改善された合成ガス発酵のための候補生物体には、アセテート生成菌 (acetogen)、光栄養生物、硫酸塩還元細菌およびメタン生成菌が含まれ、これらは、唯一の炭素源およびエネルギー源としてCOおよび/またはCO₂/H₂を利用することができる (Sipma, Crit. Rev. Biotechnol. 26 巻、41~65頁、(2006年))。中温性のアセテート生成菌 *Clostridium carboxidivorans* は、速い倍加時間を有し、合成ガスでの増殖の間にエタノールおよび少量のブタノールを天然に生成することが示されているので、合成ガス-化学物質のプラットホームのための最も期待される生物体の1つである (Henstra, Curr. Opin. Biotechnol. 18 巻、200~206頁 (2007年))。この生物体のために遺伝子ツールを開発することができる。標的遺伝子欠失もしくは挿入のための遺伝子ツールが存在する水素生成 (hydrogenic) 紅色非硫黄細菌 *Rhodospirillum rubrum* は、所望の生成物を生成するための合成ガス利用の開発のための別の良好な候補生物体であるが、それは合成ガスから水素を天然に生成するので、必要に応じて代謝改変を設計製作することができる。

10

【0086】

一部の合成ガス利用生物体の代謝が知られている。例えば、*C. carboxidivorans* などのアセテート生成菌は、水素が存在して必要な還元当量を供給する限り、グルコースの不在下でさえ、Wood-Ljungdahl 経路を利用することによってCOまたはCO₂の存在下で増殖することができる。Wood-Ljungdahl 経路は、図3 (図1および2も参照) に図示されているが、重要な代謝中間体アセチルCoAの生成を通して唯一の炭素源およびエネルギー源としてCOを利用するアセテート生成菌の能力を示す。具体的には、COを酸化して還元当量およびCO₂を生成することができ、またはアセチルCoAに直接に同化することができ、それはバイオマスまたは代謝産物にその後変換される。重要なことに、アセチルCoAは広範囲の代謝産物および他の化学成分 (chemical entity) の前駆体の役目を果たすことができる、重要な代謝中間体である。したがって、合成ガスまたは他のガス状炭素源からアセチルCoAを生成する微生物の能力は、所望の生成物としての広範囲の化学物質および燃料の生成のために、合成ガス利用生物体、または他のガス状炭素源を利用することができる生物体の設計製作を可能にする。

20

30

【0087】

発酵による化学物質および燃料の商業生産のための存続可能なフィードストックとしての合成ガスまたは他のガス状炭素源の使用を特徴付けるために、現行システムに関連する重要な問題および難題に対処するために実行可能性調査を実施する。予備代謝モデル化研究は、化学物質への合成ガスの変換が熱力学的に非常に好ましいものであること、および特定の化学物質を独占的生成物として作製することができることを示した。このことは、下流での処理の必要性を減少させるだけでなく、生成物の収率を最大にする。さらに、所望により、発酵を連続的に行うことができるように、所望の生成物の生成を増殖と関連させてもよい。連続法は高い細胞濃度に維持され、バッチターンアラウンド時間を回避するので、それらは経済的により好ましい。

40

【0088】

本明細書で開示されるように、本発明は合成ガスまたは他のガス状炭素源を利用することができ、高い収率、力価および生産性での化学生成物へのCOおよび/またはCO₂の効率的な変換を可能にする微生物の開発に関する。1つの例示的な有用な商業的实施形態は、理論最大値の80%以上の収率、50g/L以上の生成物許容度、50g/L以上の力価および少なくとも2g/L/時間の生産性による特定の化学物質の生成を達成するこ

50

とができる生物体の開発に関する。これらの基準は商業上特に有用であるが、これらのいずれかまたは全部の基準未滿を達成することができる生物体も、本発明で有用であるものと理解される。例えば、所望の用途のために十分な収率が達成される限り、生物体は、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%などのいずれか以上の収率で特定の化学物質の生成を達成してもよい。同様に、所望の用途のために十分な収率が達成される限り、生物体は、45 g/L、40 g/L、35 g/L、30 g/L、25 g/L、20 g/L、15 g/L、10 g/Lなどのいずれか以上の生成物許容度を達成することができる。さらに、所望の用途のために十分な収率が達成される限り、生物体は、200 g/L、190 g/L、180 g/L、170 g/L、160 g/L、150 g/L、140 g/L、130 g/L、120 g/L、110 g/L、100 g/L、90 g/L、80 g/L、70 g/L、60 g/L、50 g/L、45 g/L、40 g/L、35 g/L、30 g/L、25 g/L、20 g/L、15 g/L、10 g/Lなどのいずれか以上の力価を達成することができる。さらに、所望の用途のために十分な収率が達成される限り、生物体は、1.5 g/L/時間、1 g/L/時間、0.5 g/L/時間などの少なくともいずれかの生産性を達成することができる。

10

20

30

40

50

【0089】

本明細書で開示されるように、合成ガス利用からの生成物としてのブタノールの仮説分析は、フィードストックとして安く容易に入手できる合成ガスを効率的に利用する能力が、特にフィードストックとしての合成ガスの低い費用からみて、現在の石油化学プロセスよりもおそらく50%以上費用的に有利であるプロセスをもたらすことができることを示す。低い費用に加えて、合成ガスは、石炭、ならびにスイッチグラスなどのエネルギー作物だけでなく廃棄物、例えば木屑、農業廃棄物、酪農廃棄物および都市ごみを含む多くの型のバイオマスから生成することができる、豊富で柔軟な基質である。したがって、合成ガスまたは他のガス状炭素源を利用して所望の生成物を生成することができる生物体を生成する能力は、ほとんどいかなるバイオマス源からの生成をも可能にする。この特徴は、生物燃料または化学物質の生成のために用いられる各タイプのバイオマスに特異な、異なるプロセスを開発することを不要にする。合成ガスの生成のための廃棄物の使用は、環境汚染物を減少させ、生物廃棄物の深刻な処理問題を軽減するために利用することもできる。さらに、フィードストックとしての合成ガスは、例えば、トウモロコシ由来のエタノール生産に関連するフィード対燃料論争とは無縁である。合成ガス生成で利用可能な広範囲の基質を考慮すると、このフィードストックの供給および経費構造は、経年的に比較的安定なままであることが予想される。最後に、合成ガスは加熱およびエネルギーのために広く用いられ、したがって、生産のための石油系エネルギーの必要性を補うか除去することができる、バイオマス由来のエネルギー源として用いることができ、さらなる費用節約を提供する。

【0090】

ブタノールを所望の生成物として本明細書の様々な実施形態で例示されているが、所望により、本発明の微生物によって生成することができる任意の生成物を生成することができる、生成物を生成するために利用することができるものと理解される。一般に、所望の生成物には、化学合成で有用な、または燃料として有用な炭化水素が含まれるが、これらに限定されない。例示的な所望の生成物には、それらに限定されないが、メタノール、エタノール、ブタノール、アセテート、ブチレート、ラクテート、スクシネート、4-ヒドロキシブチレート、1,4-ブタンジオールなどが含まれる。

【0091】

他の態様では、本発明は、4-ヒドロキシブチレートを生成するのに十分な量で発現される4-ヒドロキシブチレート(4-hydroxybutyrate)経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性の核酸を含むことができる4-ヒドロキシブチレート経路を有する天然に存在しない微生物の生物体を提供する。4-ヒドロキシブチレート経路の酵素には、アセトアセチルCoAチオラーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒド

ロゲナーゼ、クロトナーゼ、クロトニル - C o Aヒドラターゼ、4 - ヒドロキシブチリル - C o Aトランスフェラーゼ、ホスホトランス - 4 - ヒドロキシブチリラーゼおよび4 - ヒドロキシブチレートキナーゼを含めることができる。

【0092】

さらに他の態様では、本発明は、1, 4 - ブタンジオールを生成するのに十分な量で発現される1, 4 - ブタンジオール経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むことができる1, 4 - ブタンジオール経路を有する天然に存在しない微生物の生物体を提供する。1, 4 - ブタンジオール経路の酵素には、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、3 - ヒドロキシブチリル - C o Aデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、クロトニル - C o Aヒドラターゼ、4 - ヒドロキシブチリル - C o Aレダクターゼ（アルコール形成性）、4 - ヒドロキシブチリル - C o Aレダクターゼ（アルデヒド形成性）および1, 4 - ブタンジオールデヒドロゲナーゼを含めることができる。そのような生物体は、アセチルC o Aを生成するのに十分な量で発現されるアセチルC o A経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性の核酸を有するアセチルC o A経路を含むこともできる。アセチルC o A経路の酵素には、コリノイドタンパク質、メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ、コリノイド鉄 - 硫黄タンパク質、ニッケル - タンパク質アセンブリタンパク質、フェレドキシン、アセチルC o Aシンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼを含めることができる。

10

【0093】

さらに他の態様では、本発明は、1, 4 - ブタンジオールを生成するのに十分な量で発現される1, 4 - ブタンジオール経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むことができる1, 4 - ブタンジオール経路を有する天然に存在しない微生物の生物体を提供する。1, 4 - ブタンジオール経路の酵素には、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、3 - ヒドロキシブチリル - C o Aデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、クロトニル - C o Aヒドラターゼ、4 - ヒドロキシブチリル - C o Aレダクターゼ（アルコール形成性）、4 - ヒドロキシブチリル - C o Aレダクターゼ（アルデヒド形成性）および1, 4 - ブタンジオールデヒドロゲナーゼを含めることができる。そのような生物体は、アセチルC o Aを生成するのに十分な量で発現されるアセチルC o A経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性の核酸を含むアセチルC o A経路を含むこともできる。アセチルC o A経路の酵素には、アセチルC o Aシンターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンテターゼ、メチルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼを含めることができる。

20

30

【0094】

さらなる態様では、本発明は、4 - ヒドロキシブチレート経路を有する天然に存在しない微生物の生物体を培養することを含むことができる、4 - ヒドロキシブチレートを生成する方法を提供する。前記経路は、4 - ヒドロキシブチレートを生成する条件下およびそれに十分な期間、4 - ヒドロキシブチレートを生成するのに十分な量で発現される4 - ヒドロキシブチレート経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むことができる。4 - ヒドロキシブチレート経路は、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、3 - ヒドロキシブチリル - C o Aデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、クロトニル - C o Aヒドラターゼ、4 - ヒドロキシブチリル - C o Aトランスフェラーゼ、ホスホトランス - 4 - ヒドロキシブチリラーゼおよび4 - ヒドロキシブチレートキナーゼを含むことができる。

40

【0095】

さらに他の態様では、本発明は、1, 4 - ブタンジオール経路を有する天然に存在しない微生物の生物体を培養することを含むことができる、1, 4 - ブタンジオールを生成する方法を提供する。前記経路は、1, 4 - ブタンジオールを生成する条件下およびそれに十分な期間、1, 4 - ブタンジオールを生成するのに十分な量で発現される1, 4 - ブタンジオール経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むことができる。1

50

、4 - ブタンジオール経路は、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、3 - ヒドロキシブチリル - C o Aデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、クロトニル - C o Aヒドラターゼ、4 - ヒドロキシブチリル - C o Aレダクターゼ (アルコール形成性)、4 - ヒドロキシブチリル - C o Aレダクターゼ (アルデヒド形成性)、1, 4 - ブタンジオールデヒドロゲナーゼを含むことができる。そのような生物体は、アセチルC o Aを生成するのに十分な量で発現されるアセチルC o A経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むアセチルC o A経路を含むこともできる。アセチルC o A経路の酵素には、コリノイドタンパク質、メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ、コリノイド鉄 - 硫黄タンパク質、ニッケル - タンパク質アセンブリータンパク質、フェレドキシン、アセチルC o Aシンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼを含めることができる。

10

【0096】

最後に一部の態様では、本発明は、1, 4 - ブタンジオール経路を有する天然に存在しない微生物の生物体を培養することを含むことができる、1, 4 - ブタンジオールを生成する方法を提供する。前記経路は、1, 4 - ブタンジオールを生成する条件下およびそれに十分な期間、1, 4 - ブタンジオールを生成するのに十分な量で発現される1, 4 - ブタンジオール経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むことができる。1, 4 - ブタンジオール経路は、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、3 - ヒドロキシブチリル - C o Aデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、クロトニル - C o Aヒドラターゼ、4 - ヒドロキシブチリル - C o Aレダクターゼ (アルコール形成性)、4 - ヒドロキシブチリル - C o Aレダクターゼ (アルデヒド形成性) および1, 4 - ブタンジオールデヒドロゲナーゼを含むことができる。そのような生物体は、アセチルC o Aを生成するのに十分な量で発現されるアセチルC o A経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を有するアセチルC o A経路を含むこともできる。アセチルC o A経路の酵素には、アセチルC o Aシンターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンテターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼを含めることができる。

20

【0097】

他の実施形態では、図11に表すように、本発明の生物体は、機能的メチルトランスフェラーゼ系、アセチルC o Aを合成する能力、およびアセチルC o Aから4 - HBを合成する能力を有する。本明細書に記載のさらに他の生物体は、図12に表す、機能的メチルトランスフェラーゼ系、アセチルC o Aを合成する能力、およびアセチルC o AからBD Oを合成する能力を有する。

30

【0098】

本発明は、4 - ヒドロキシブチレートを生成するのに十分な量で発現される4 - ヒドロキシブチレート経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むことができる4 - ヒドロキシブチレート経路を有する天然に存在しない微生物の生物体も提供する。4 - ヒドロキシブチレート経路の酵素には、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、3 - ヒドロキシブチリル - C o Aデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、クロトニル - C o Aヒドラターゼ、4 - ヒドロキシブチリル - C o Aトランスフェラーゼ、ホスホトランス - 4 - ヒドロキシブチリラーゼおよび4 - ヒドロキシブチレートキナーゼを含めることができる。

40

【0099】

そのような生物体は、コリノイドタンパク質、メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ、コリノイド鉄 - 硫黄タンパク質、ニッケル - タンパク質アセンブリータンパク質、フェレドキシン、アセチルC o Aシンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼなどの少なくとも1つの酵素またはポリペプチドを含むこともできる。

【0100】

一部の実施形態では、4 - ヒドロキシブチレート経路を有する生物体は、メタノールメチルトランスフェラーゼを含むことができる。そのような生物体は、1) メタノールおよ

50

びCO、2)メタノール、CO₂およびH₂、3)メタノール、CO、CO₂およびH₂、4)メタノール、ならびにCOおよびH₂を含む合成ガス、ならびに5)メタノール、ならびにCO、CO₂およびH₂を含む合成ガスなどのフィードストックを利用する。

【0101】

4-ヒドロキシブチレート経路を有する他の生物体は、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンテターゼ、メチルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼを有することができる。そのような生物体は、1)CO、2)CO₂およびH₂、3)COおよびCO₂、4)COおよびH₂を含む合成ガス、5)CO、CO₂およびH₂を含む合成ガスなどのフィードストックを利用する。

10

【0102】

本発明は、1,4-ブタンジオールを生成するのに十分な量で発現される1,4-ブタンジオール経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むことができる1,4-ブタンジオール経路を有する天然に存在しない微生物の生物体も提供する。1,4-ブタンジオール経路の酵素には、例えばアセトアセチルCoAチオラーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、クロトニル-CoAヒドラターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成性)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルデヒド形成性)および1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼが含まれる。

【0103】

そのような生物体は、コリノイドタンパク質、メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ、コリノイド鉄-硫黄タンパク質、ニッケル-タンパク質アセンブリタンパク質、フェレドキシン、アセチルCoAシンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびヒドロゲナーゼなどの少なくとも1つの酵素またはポリペプチドを含むこともできる。

20

【0104】

一部の実施形態では、1,4-ブタンジオール経路を有する生物体は、メタノールメチルトランスフェラーゼを含むことができる。そのような生物体は、1)メタノールおよびCO、2)メタノール、CO₂およびH₂、3)メタノール、CO、CO₂およびH₂、4)メタノール、ならびにCOおよびH₂を含む合成ガス、5)メタノール、ならびにCO、CO₂およびH₂を含む合成ガスなどのフィードストックを利用する。

30

【0105】

他の実施形態では、1,4-ブタンジオール経路を有する生物体は、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンテターゼ、メチルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼを含むことができる。そのような生物体は、1)CO、2)CO₂およびH₂、3)COおよびCO₂、4)COおよびH₂を含む合成ガス、ならびに5)CO、CO₂およびH₂を含む合成ガスからなる群から選択されるフィードストックを利用する。

【0106】

本発明の例示的な微生物の生物体は、図13に表すような経路を含むことができる。そのような生物体は、Wood-Ljungdahl経路の機能的メチル分岐、アセチルCoAを合成する能力、およびアセチルCoAから4-ヒドロキシブチレートを合成する能力を含むことができる。本発明の別の例示的な微生物の生物体は、図14に表すような経路を含むことができる。そのような微生物の生物体は、Wood-Ljungdahl経路の機能的メチル分岐、アセチルCoAを合成する能力、およびアセチルCoAから1,4-ブタンジオールを合成する能力を含むことができる。

40

【0107】

より良好な生産体を生成するために、代謝モデル化を利用して増殖条件を最適化することができる。モデル化を用いて、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計することもできる(例えば、米国特許公開US2002/0012939、US200

50

3 / 0 2 2 4 3 6 3、US 2 0 0 4 / 0 0 2 9 1 4 9、US 2 0 0 4 / 0 0 7 2 7 2 3、US 2 0 0 3 / 0 0 5 9 7 9 2、US 2 0 0 2 / 0 1 6 8 6 5 4 および US 2 0 0 4 / 0 0 9 4 6 6、ならびに米国特許第 7, 1 2 7, 3 7 9 号を参照)。モデル化分析は、細胞増殖に及ぼす、アセチル Co A またはアセチル Co A から誘導される生成物のより効率的な生産への代謝の移行の影響の、信頼できる予測を可能にする。

【0108】

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

10

20

【0109】

簡単に述べると、OptKnockは細胞代謝のモデル化のためのコンピュータによる方法およびシステムを指すために本明細書で用いられる用語である。OptKnockプログラムは、特定の制約をフラックスバランス分析(FBA)モデルに組み込む、モデルおよび方法のフレームワークに関する。これらの制約には、例えば、定性的動態学情報、定性的調節情報および/またはDNAマイクロアレイ実験データが含まれる。OptKnockは、例えばフラックスバランスモデルを通して誘導されるフラックス境界を締め、その後、遺伝子付加または欠失の存在下で代謝ネットワークの性能限界を調査することによって、様々な代謝問題の解法も計算する。OptKnock コンピュータフレームワークは、代謝ネットワークの性能限界の効果的なクエリーを可能にするモデル式の構築を可能にし、生じる混合整数線形計画法の問題を解決する方法を提供する。OptKnockとして本明細書で言及される代謝モデル化およびシミュレーション法は、例えば、2002年1月10日に出願の米国特許公開第2002/0168654号、2002年1月10日に出願の国際特許PCT/US02/00660、および2007年8月10日に出願の米国特許出願第11/891,602号、およびWO/2008/115840に記載されている。

30

【0110】

生成物の生合成生成を有利にする代謝改変を特定および設計するための別のコンピュータ方法は、SimPheny (登録商標) と呼ばれる代謝モデル化およびシミュレーションシステムである。このコンピュータ方法およびシステムは、例えば、2002年6月14日に出願の米国特許公開2003/0233218および2003年6月13日に出願の国際特許出願PCT/US03/18838に記載されている。SimPheny (登録商標) は、コンピュータでネットワークモデルを生成し、生物系の化学反応を通して質量、エネルギーまたは電荷のフラックスをシミュレートして、その系の化学反応の任意のまたは全ての可能な機能を含む解空間を定義し、それによってその生物系に許される様々な活性を決定するために用いることができるコンピュータシステムである。この手法は制約に基づくモデル化と称されるが、その理由は、含まれる反応の公知の化学量などの制約、ならびに反応を通して最大フラックスに関連する熱力学反応および容量制約によって解

40

50

空間が定義されるからである。これらの制約によって定義される空間を調べて、生物系またはその生化学成分の表現型能力および挙動を決定することができる。

【0111】

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

10

【0112】

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

20

【0113】

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

30

【0114】

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

40

【0115】

所望の生成物の増殖連結型の生合成を含む生合成をもたらすことができる破壊すべきさらなる反応セットまたは代謝変化をもたらす上記の2層のOptKnock問題のさらなる生産的解法を特定するために、整数カットと呼ばれる最適化法を実施することができる。この方法は、各反復での整数カットと呼ばれる追加の制約の組み込みで、上に例示されるOptKnock問題を反復して解決することによって進行する。整数カット制約は、解決手法が、生成物生合成を増殖に不可避免的に連結する任意の前の反復で特定されるものと正確に同じ反応セットを選択することを、効果的に防止する。例えば、前に特定された増殖連結型の代謝変化が破壊のための反応1、2および3を特定する場合、以下の制約は、その後の解法で同じ反応が同時に考慮されることを防止する。整数カット法は当技術分野で周知であり、例えば、Burgardら、Biotechnol. Prog. 17

50

巻、791～797頁(2001年)に記載されているのを見ることができる。代謝モデル化およびシミュレーションのためのOptKnockコンピュータフレームワークと組み合わせたそれらの使用に関して本明細書に記載される全ての方法と同様に、反復性コンピュータ分析でのリダンダンシーを減らす整数カット法は、例えばSimPheny(登録商標)を含む当該技術分野で周知である他のコンピュータフレームワークとともに適用することもできる。

【0116】

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

10

【0117】

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

20

【0118】

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

30

【0119】

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

40

【実施例】

【0120】

(実施例I)

合成ガス発酵のための生物体および経路

この実施例では、合成ガスを利用することができる生物体および例示的な経路について記載する。

【0121】

少なくとも30種の異なる生物体が長年にわたり単離され、合成ガスまたはCO、CO

50

2 および H₂ などの合成ガスの成分で増殖することが示された (Henstraら、Curr. Opin. Biotechnol.、18巻、200~206頁(2007年); Sipmaら、Crit. Rev. Biotechnol.、26巻、41~65頁(2006年))。表1にそのような生物体の例ならびにそれらの増殖至適温度、増殖至適 pH、倍加時間、生成物プロファイルおよび生理学的群などのそれらのいくつかの特性を示す。

【0122】

【表1-1】

表1:CO利用種およびそれらの生理学的特性の例

種	生理学的特徴付け	T (°C)	pH	t _d (h)	生成物
<i>Acetobacterium woodii</i>	酢酸生成	30	6.8	13	アセテート
<i>Butyribacterium metholithrophicum</i>	酢酸生成	37	6	12-20	アセテート、エタノール、ブチレート、ブタノール
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	酢酸生成	37	5.8-6.0	nr	アセテート、エタノール
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	酢酸生成	38	6.2	6.25	アセテート、エタノール、ブチレート、ブタノール
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	酢酸生成	37	6	3.8	アセテート、エタノール
<i>Eubacterium limosum</i>	酢酸生成	38-39	7.0-7.2	7	アセテート
<i>Oxobacter pfennigii</i>	酢酸生成	36-38	7.3	13.9	アセテート、n-ブチレート
<i>Peptostreptococcus proeductus</i>	酢酸生成	37	7	1.5	アセテート
<i>Rhodospseudomonas palustris P4</i>	水素発生、光栄養生物体	30	nr	23	H ₂
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	水素発生、光栄養生物体	30	6.8	8.4	H ₂
<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	水素発生、光栄養生物体	34	6.7-6.9	6.7	H ₂
<i>Citrobacter</i> sp Y19	水素発生、通性嫌気性	30-40	5.5-7.5	8.3	H ₂
<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A	メタン生成	37	7	24	アセテート、ホルメート、CH ₄
<i>Methanosarcina barker</i> i	メタン生成	37	7.4	65	CH ₄ 、CO ₂
<i>Desulfosporosinus orientis</i>	硫酸塩還元菌	35	7	nr	H ₂ S、CO ₂
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	硫酸塩還元菌	37	nr	nr	H ₂ 、CO ₂ 、H ₂ S
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	硫酸塩還元菌	37	nr	nr	H ₂ 、CO ₂ 、H ₂ S

細菌細胞

10

20

30

40

【0123】

【表 1 - 2】

種	生理学的特徴付け	T (°C)	pH	t _d (h)	生成物
<i>Moorella thermoacetica</i>	酢酸生成	55	6.5-6.8	10	アセテート
<i>Moorella thermoautotrophica</i>	酢酸生成	58	6.1	7	アセテート
<i>Carboxydibrachium pacificus</i>	水素発生、偏性嫌気性菌	70	6.8-7.1	7.1	H ₂
<i>Carboxydocella thermoautotrophica</i>	水素発生、偏性嫌気性菌	58	7	1.1	H ₂
<i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i>	水素発生、偏性嫌気性菌	70-72	6.8-7.0	2	H ₂
<i>Thermincola carboxydiphila</i>	水素発生、偏性嫌気性菌	55	8	1.3	H ₂
<i>Thermolithobacter carboxydivorans</i>	水素発生、偏性嫌気性菌	70	7	8.3	H ₂
<i>Thermosinus carboxydivorans</i>	水素発生、偏性嫌気性菌	60	6.8-7.0	1.2	H ₂
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	メタン発生	65	7.4	140	CH ₄ 、CO ₂
<i>Desulfotomaculum carboxydivorans</i>	硫酸塩還元菌	55	7	1.7	H ₂ 、H ₂ S
<i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i>	硫酸塩還元菌	60	7	nr	アセテート、H ₂ S
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	硫酸塩還元菌	55	7	nr	H ₂ S、CO ₂
<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i> subsp. <i>thermosyntrophicum</i>	硫酸塩還元菌	55	7	nr	アセテート、H ₂ S

好熱性細菌

10

20

30

Henstraら、Curr. Opin. Biotechnol.、18巻、200～206頁(2007年)；Sipmaら、Crit. Rev. Biotechnol.、26巻、41～65頁(2006年)から転載

合成ガスの利用の検討に供する生物体の1つの種類は、72 と高い温度に耐えることができるという理由から好熱性アセテート生成菌であり、これにより、汚染問題が低減し、蒸留によるブタノールなどの生成物の分離に伴う加熱コストが低くなるであろう。しかし、合成ガスからのアルコール生成は、好熱生物においていまだ実証されておらず、それらの主要な生成物は、水素、アセテートおよび/またはH₂Sである。酢酸生成好熱性細菌の倍加時間も中温性アセテート生成菌より長かった。したがって、初期の試験は、これらの生物体が最も速い倍加時間を有し、合成ガスからアルコールを生成することが示されたので、ブタノールなどの望まれる生成物の生成用の中温性アセテート生成菌に焦点が絞られる。初期の特徴付けは、*Clostridium ljungdahlii*および*Clostridium carboxydivorans*において実施されている。全ての合成ガス利用生物体のうち、*C. ljungdahlii*は、その代謝能および至適発酵条件に関する実質的な一連の知識を保有する。*C. carboxydivorans*は、合成ガスでの増殖中に少量のブタノールを天然で生成することが示された(Henstraら、Curr. Opin. Biotechnol.、18巻、200～206頁(2007年))。

40

【0124】

50

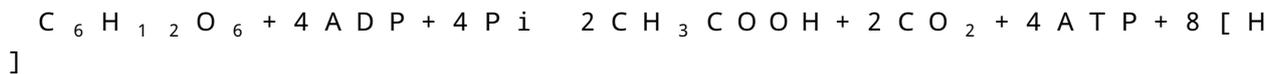
いくつかの例示的な合成ガス利用生物体の代謝経路が公知である。合成ガスを利用する2つの例示的な経路を図1および2に示す。

【0125】

C. ljungdahlii および *C. carboxidivorans* などのアセテート生成菌は、ヘキソース糖から一酸化炭素までに及ぶいくつかの炭素源で増殖することができる。グルコースなどのヘキソースは、最初にエムデン・マイヤーホフ・パルナス (EMP) 解糖によりピルベートに代謝され、これが次にピルビン酸：フェレドキシンオキシドレダクターゼによりアセチルCoAに変換される。アセチルCoAは、バイオマス前駆体を構築するのに用いることができ、あるいは、酢酸キナーゼおよびホスホトランスアセチラーゼによりエネルギーを生ずるアセテートに変換することができる。グルコースのアセテート、エネルギーおよび還元当量への総括的変換は、以下の通りである。

10

【0126】



アセテート生成菌は、以下のようにWood-Ljungdahl経路によりCO₂をさらにアセテートに変換することによりレドックスバランスも維持しながら、グルコースのアセテートへの変換からより多くのエネルギーを取り出す。

【0127】



多くのアセテート生成菌は、必要な還元当量を供給するために水素が存在する限り、グルコースの不在下でもWood-Ljungdahl経路によりCO₂の存在下で増殖することができるので、上式の係数nは、この変換がエネルギー発生活動であることを意味している。

20

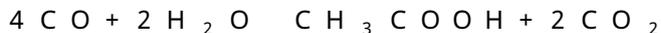
【0128】



図3に示すWood-Ljungdahl経路は、それぞれNa⁺またはH⁺依存性ATPシナーゼによりATPを生成し得るNa⁺またはH⁺のイオン勾配の形成と連結している (Muller, Appl. Environ. Microbiol., 69巻、6345~6353頁 (2003年))。これらの公知の形質転換に基づいて、アセテート生成菌は、唯一の炭素およびエネルギーの源としてCOを利用する能力も有する。特に、COは、酸化されて、還元当量およびCO₂を生成するか、または後にバイオマスもしくはアセテートに変換されるアセチルCoAへと直接同化され得る。

30

【0129】



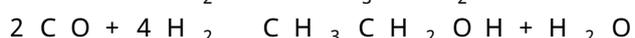
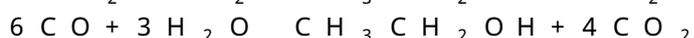
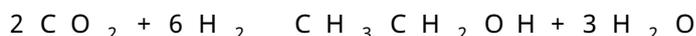
しかし、還元当量の要件を満たすのに十分な水素が存在する場合に、より高いアセテートの収率を達成することができる。

【0130】



図3によれば、アセチルCoAによるアセテートの生成は、1つのATP分子を生成させるが、アセチルCoAからのエタノールの生成はそれを生成させず、2つの還元当量を必要とする。したがって、合成ガスからのエタノールの生成は、アセテートの生成が存在しない場合には細胞の増殖に十分なエネルギーを発生すると予想されない。しかし、特定の条件下では、*Clostridium ljungdahlii* は合成ガスから主としてエタノールを生成し (Klassonら、Fuel, 72巻、1673~1678頁 (1993年))、以下の経路

40



のある組合せは、実際に細胞増殖を支えるのに十分なエネルギーを発生することが示唆される。*R. rubrum* などの水素生成細菌もCOおよび水の水素への変換によりエネルギー

50

ギーを発生することもできる(図3を参照)(Sipmaら、Crit. Rev. Biotechnol.、26巻、41~65頁(2006年))。重要なメカニズムは、エネルギー変換ヒドロゲナーゼ(ECH)およびCOデヒドロゲナーゼの協調作用である。COデヒドロゲナーゼは、COからの電子を供給し、これが次に、活性がエネルギー発生プロトントランスロケーションに連結される、ECHによりプロトンをH₂に還元するのに用いられる。正味の結果は、水性ガス転化反応によるエネルギーの発生である。

【0131】

合成ガス発酵の生成物プロファイルは、生物体および実験条件の選択により決定される。例えば、Clostridium ljungdahliiは、エタノールとアセテートの混合物を生成する(Klassonら、Fuel、72巻、1673~1678頁(1993年); GaddyおよびClausen、米国特許第5,173,429号)が、Clostridium carboxidivoransは、エタノール、アセテート、ブタノールおよびブチレートの混合物を生成する(Liouら、Int. J. Syst. Evol. Microbiol.、55巻(Pt5)、2085~2091頁(2005年))。それぞれ26.8g/Lおよび12.4g/Lと高いアセテートおよびバイオマスの濃度、ならびに1g/Lを下回るエタノール濃度がC. ljungdahliiについて報告された(Gaddy、米国特許第5,807,722号、第6,136,577号、第6,340,581号)。しかし、この生成物プロファイルは、例えば、栄養制限、培地の変更、より低いpH、還元剤添加などを用いる、クロストリジウム属における酸の生成と比べて溶媒の生成を増加する伝統的な手段により、エタノール生成の増加の方向に移動させることができる。いくつかの条件、例えば、パントテン酸カルシウム制限、コバルト制限、H₂過剰供給、CO過剰供給、アセテートの条件付けなどに対する生成物プロファイルの感受性が記載された(Gaddyら、米国特許第7,285,402号)。エタノールの生成について最適化された条件下で細胞リサイクルがない場合にC. ljungdahlii株C-01について、それぞれ33.0g/L、4.0g/Lおよび2.7g/Lのエタノール、アセテートおよび細胞の濃度が示された。最大のエタノール生産性は、細胞リサイクルがない場合の21g/L/日から細胞リサイクルがある場合の39g/L/日までの範囲にあった。

【0132】

阻害物質に対する合成ガス発酵の感受性も測定することができる。特定の生成物の生成のためにC. carboxidivoransの発酵条件を最適化する労力がより少ないこと(Liouら、Int. J. Syst. Evol. Microbiol.、55巻(Pt5)、2085~2091頁(2005年))が報告された。しかし、いくつかの最近の試験は、合成ガス阻害物質によるC. carboxidivoransの増殖の抑制を目的とするものであった。具体的には、CO、CO₂、N₂およびH₂のみからなる「清浄な」シリンダー入り圧縮ガスを導入したとき増殖は回復したが、バイオマス生成のプロデューサーガスに存在する阻害物質がC. carboxidivoransの増殖およびH₂の利用を停止させた(Datarら、Biotechnol. Bioeng.、86巻、587~594頁(2004年))。ガスを0.025μmフィルターに通すことにより、H₂利用は依然として阻害されていたが、細胞増殖を可能にするのに十分にガスが浄化された(Ahmedら、Biomass Bioenergy、30巻、665~672頁(2006年))。フィルターの走査型電子顕微鏡分析により、灰ではなく、タール粒子が細胞休止をもたらす考え得る原因であったことが示された。可能なタール種は、ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、p-キシレン、o-キシレンおよびナフタレンと同定された。細胞は、0.2μmフィルターの後に存在するタールに10~15日以内に順応することができた。H₂利用がフィルターサイズに無関係に停止したという事実は、濾過されない成分がヒドロゲナーゼ酵素を阻害していたことを示すものであった。この成分は、後に一酸化窒素と同定された。NOは、60ppmレベルでヒドロゲナーゼを阻害する(AhmedおよびLewis、Biotechnol. Bioeng.、97巻、1080~1086頁(2007年))。所望の生成物を生成する特定の

生物体における合成ガスの利用の適切な条件を決定するために同様の試験を行うことができる。

【0133】

例示的な実験において、スイッチグラスガス化について以前に記載されたシステム (Datarら、*Biotechnol. Bioeng.*、86巻、587~594頁(2004年)；Ahmedら、*Biomass Bioenergy*、30巻、665~672頁(2006年))と同様に、ガス化装置を出る合成ガスがサイクロン、凝縮塔、スクラバーおよび0.2 μ mフィルターに通されることが想定される。以前に提案された (AhmedおよびLewis、*Biotechnol. Bioeng.*、97巻、1080~1086頁(2007年))ように、40ppm未満のNOレベルを達成することができるように空気吹きと対立するものとしての酸素吹きガス化を用いる。さらに、C. *ljungdahlii*を用いた試験で、細胞をあらかじめ順応させない場合でさえ、2.7%未満のH₂Sレベルは阻害的でないことが明らかにされ (Klassonら、*Fuel*、72巻、1673~1678頁(1993年))、レベルは、バイオマスまたは石炭ガス化から得られる合成ガスのレベルより低いと予想される。さらに、進化または順応により、タール微粒子に対する耐性を達成することができる (Ahmedら、*Biomass Bioenergy*、30巻、665~67頁(2006年))。

10

【0134】

(実施例II)

合成ガスの利用のための微生物株の設計およびモデリング

20

この実施例では、合成ガスからの所望の生成物の生成のための例示的な微生物株の設計について記載する。

【0135】

初期の試験では、合成ガスを炭素源として用いることができる微生物株の設計のためにC. *ljungdahlii*、C. *carboxidivorans*およびR. *rubrum*のゲノムスケールモデルを用いる。代謝モデルおよびシミュレーションアルゴリズムを用いて、合成ガスを利用する株を発生させる。所望の微生物のゲノム配列ならびに密接に関連する種の配列を用いて、標的生物体のゲノムスケール代謝モデルを構築する。この過程を促進するために、Genomaticaは、我々の既存の手作業で構築した高品質の代謝モデルとの徹底的な配列比較に基づいて、代謝ネットワークの最初のドラフトを自動的に構築する包括的な方法を開発した。次に、自動的に発生させた遺伝子-タンパク質-反応(GPR)割当て(図2参照)を手作業によりチェックし、それらができる限り透明であることを確実にするために、詳細な記録を、Genomaticaの自社開発のモデル構築およびシミュレーションプラットフォームであるSimPheny(商標)内に目録として収載する。例示的な生成物としてのブタノールの生成のために、ブタノール経路における酵素を、天然ではブタノールを生成しない微生物、例えば、C. *ljungdahlii*およびR. *rubrum*において発現させる。

30

【0136】

制約ベースモデリングアプローチ (constraint-based modeling approach) (Schillingら、*Biotechnol. Prog.*、15巻、288~295頁(1999年)；Edwardsら、*Environ. Microbiol.*、4巻、133~40頁(2002年)；VarmaおよびPalsson、*Biotechnol.*、12巻、994~998頁(1994年)；Patilら、*Curr. Opin. Biotechnol.*、15巻、64~69頁(2004年))を用いて、代謝モデルを問い合わせる。簡単に述べると、生物体がなすことを計算し、正確に予測することを試みるよりはむしろ、制約ベースアプローチは、支配する物理化学的制約(例えば、化学量論的、熱力学的、容量および調節の制約)が連続的に課せられることに基づいて生物体が示すことができる可能な表現型の範囲を狭くする (Priceら、*Trends Biotechnol.*、21巻、162~169頁(2003年)；Priceら、*Nat. Rev. Microbiol.*、2巻、886~8

40

50

97頁(2004年))。したがって、生物体が所定の遺伝的および環境条件下でどのように挙動するかについて正確である、正確な表現型の「解」を計算する代わりに、このアプローチは、生物体が起こすことができる表現型の解の可能な組を決定することができる。一般的に、ゲノムスケールの制約ベースモデルは、増殖および副産物分泌パターンなどのいくつかの生理学的特性を予測する(EdwardsおよびPalsson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97巻、5528~5533頁(2000年); Varmaら, Appl. Environ. Microbiol., 59巻、2465~2473頁(1993年); VarmaおよびPalsson, Appl. Environ. Microbiol., 60巻、3724~3731頁(1994年); Edwardsら, Nat. Biotechnol., 19巻、125~130(2001年)、基質利用の範囲を決定する(EdwardsおよびPalsson、前出(2000年))、増殖のための最少培地を決定する(Schillingら, J. Bacteriol., 184巻、4582~4593頁(2002年))、適応進化の結果を予測する(Ibarraら, Nature, 420巻、186~189頁(2002年))、理論的な生成物の収率を計算する(Varmaら, Biotechnol. Bioengineer., 42巻、59~73頁(1993年))、ノックアウト表現型を予測する(EdwardsおよびPalsson, BMC Bioinformatics, 1巻、1頁(2000年); Segreら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99巻、15112~15117頁(2002年); Shlomiら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102巻、7695~7700頁(2005年))および異なる生物体の代謝能を比較する(Forsterら, Genome Res., 13巻、244~253(2003年))の有用であることが示された。これらの予測能力に基づいて、モデルを用いて実験室および生産規模の発酵条件下での工業用微生物の代謝挙動を明らかにする。制約ベースアプローチは、株の性能を改善することを目的とした正確に目標を定めた成功を収める遺伝子操作に一般的に適用される程度まで成熟した(Broら, Metab. Eng., 8巻、102~111頁(2006年); Alperら, Nat. Biotechnol., 23巻、612~616頁(2005年); Alperら, Metab. Eng., 7巻、155~164頁(2005年); Fongら, Biotechnol. Bioengineer., 91巻、643~648頁(2005年); Parkら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104巻、7797~7802頁(2007年))。条件のさらなる最適化を行うために、特性をモニターし続ける。

【0137】

生物体のさらなる最適化は、ブタノールなどの所望の生成物の増殖連結型生成を含む、所望の生成物の生成を増大させる遺伝子ノックアウトを決定することによって行うことができる(実施例V)。C. ljungdahliiは、現在CO、CO₂およびH₂の混合物をアセテートおよびエタノールに変換することができるが、C. carboxidivoransは、アセテート、エタノール、ブチレートおよびブタノールの混合物を生成する。R. rubrumは、アルコールを天然で生成しないが、高レベルのポリ-ヒドロキシアルカノエート(PHA)を蓄積することが示された。モデリング解析により、生体触媒生物体の代謝をブタノールなどの所望の生成物のより効率のよい生成の方向に移動させる細胞増殖に対する効果の予測が可能である。モデリングはまた、所望の生成経路、例えば、ブタノールの生成により代謝フラックスを推進することを目的とする代謝操作を示す。1つのモデリング方法は、ブタノールなどの所望の生成物の増殖連結型生成を集合的にもたらず遺伝子ノックアウトを選択するために適用される、2層の最適化アプローチであるOptKnock(Burgardら, Biotechnol. Bioengineer., 84巻、647~657頁(2003年))である。他の全ての増殖選択肢が除去されたため、遺伝子ノックアウト戦略により設計された株は、ネットワーク化学量論により、効率のよい増殖のためにブタノールなどの高レベルの所望の生成物を生成するよう強制される。そのような株は、自己最適化しており、安定である。したがって、それ

らは、強い増殖選択圧に直面した場合でも生成レベルを典型的には維持または改善し、バッチまたは連続バイオプロセッシングに、また進化工学にも適用可能になる。

【0138】

いくつかの候補株を設計し、生成条件の最適化を行う。最初のプロセスパラメータを用いる対照発酵と共に、発酵条件を3連で試験する。試験発酵のデータを用いて、プロセスの変更に起因する代謝の変化を評価し、予測と比較するために、シミュレーションを行われ得る。生産性が予想されたものを有意に下回る場合、株を最適化するために、設計過程の第2の反復のためのこの新しい知識を用いてさらなるシミュレーションを行う。

【0139】

(実施例 I I I)

標的生物体の遺伝的ツールの開発

この実施例では、標的生物体の遺伝子操作および設計製作されたツールの開発について記載する。

【0140】

合成ガスの利用のための候補株における遺伝系を開発する。特に、*C. ljungdahlii* および *C. carboxidivorans* の遺伝系を開発する。遺伝的形質転換も *Rhodospirillum rubrum* において試験する。所望の遺伝エレメントの選択のための可能なマーカーを決定するために、抗生物質耐性を試験する。例えば、多くのクロストリジウム属は、エリスロマイシンおよびクロラムフェニコールに対して感受性である。エレクトロポレーション、コンジュゲーションまたは超音波形質転換を含むが、これらに限定されない、周知の方法を用いてDNA移入法を開発する。グラム陽性菌のいくつかの発現ベクター、特に *C. acetobutylicum* に用いるベクターについて追加の試験を行って、*C. ljungdahlii* および / または *C. carboxidivorans* における所望の遺伝エレメントの発現に対するそれらの有効性を判定する。ベクターのプロモーターを天然 *C. ljungdahlii* または *C. carboxidivorans* のプロモーターで置換することにより、さらなるベクターを開発することができる。さらに、*C. acetobutylicum* および *C. cellulolyticum* の自殺プラスミドを含むいくつかの自殺プラスミドを遺伝子操作について試験する。他のクロストリジウム属について開発したアンチセンスRNA阻害のノックダウン技術も試験する。

【0141】

形質転換、発現およびアンチセンスRNA阻害のツールは、中温性種 *Clostridium cellulolyticum* および *Clostridium acetobutylicum* について利用可能である。*C. cellulolyticum* は、セルロース分解のモデル系であり (Desvaux, FEMS Microbiol Rev., 741~764頁(2005年))、一方 *C. acetobutylicum* は、ブタノールなどの溶媒を生成するその能力について広範に特徴付けがなされた (Durre, Biotechnol. J., 2巻, 1525~1534頁(2007年))。特に、両種は、エタノールおよび水素を最終生成物として生成することができる。したがって、これらの2つの株から得られる知識は、他のエタノールおよび / または水素生成クロストリジウム属の種について有益なものである。*C. cellulolyticum* における標的突然変異誘発の試験が開始されており、それを他の候補生物体において同様に用いることができる。

【0142】

これらの試験の結果は、*C. ljungdahlii* および / または *C. carboxidivorans* の遺伝子工学を可能にするだけでなく、発生させた突然変異体の表現型の特徴付けも可能にする。必要に応じてさらなる最適化を行って、方法、プラスミドおよび条件を変化させることにより遺伝系を開発して最適化結果を達成する (Lyndら, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66巻, 506~577頁(2002年))。

10

20

30

40

50

【0143】

さらに詳細には、*C. ljungdahlii*および*C. carboxidivorans*の抗生物質耐性能のプロファイリングを行う。遺伝系の開発における重要な段階は、標的株の天然の抗生物質耐性特性を決定することである。エリスロマイシンおよびクロラムフェニコールは、*C. acetobutylicum*および*C. cellulolyticum*におけるプラスミド上で機能的であることが示された耐性マーカーを有する2つの抗生物質である(KashketおよびCao、Appl. Environ. Microbiol.、59巻、4198~4202頁(1993年); GreenおよびBenNET、Biotechnol. Bioeng.、58巻、215~221頁(1998年))。しかし、それらは、その代わりにしばしばアンピシリン、ゲンタマイシン、リファンピシン、カナマイシンおよびテトラサイクリンの抗生物質マーカーを含む一般的な自殺プラスミドでは通常利用可能でない。抗生物質感受性を判定するために、*C. ljungdahlii*および*C. carboxidivorans*を嫌気性チャンパー内の規定培地中で増殖させる(AhmedおよびLewis、Biotechnol. Bioeng.、97巻、1080~1086頁(2007年); Younesiら、Bioresour. Technol.、2007年6月18日)。上で示したような一般的な抗生物質を1 μ g/ml~500 μ g/mlの勾配の濃度で加える。Type FP-1100-C Bioscreen C装置(Thermo Lab systems; Waltham MA)などの機器を用いて増殖温度を37に制御し、種々の間隔で細胞増殖の光学濃度を自動的に測定する。平均値および標準偏差を計算することができるように、生理学的試験の全てを反復して、例えば、3連で行う。この増殖データは、供試抗生物質に対する*C. ljungdahlii*および*C. carboxidivorans*の感受性を示す。当該株の増殖を阻害する抗生物質をさらなる試験に用いる。

10

20

30

40

50

【0144】

さらに詳細には、単純かつ効率のよいDNA送達方法を遺伝子工学に提供するために、DNA移入方法および遺伝子発現システムを開発する。細菌DNA移入の方法は、コンジュゲーション、エレクトロポレーション、化学的形質転換、形質導入および超音波形質転換を含む。それらのうち、エレクトロポレーションおよびコンジュゲーションは、いくつかのクロストリジウム属の種において以前に確立された(Jenneretら、Microbiol.、146巻、3071~3080頁(2000年); Tardifら、J. Ind. Microbiol. Biotechnol.、27巻、271~274頁(2001年); Tyurinら、J. Appl. Microbiol.、88巻、220~227頁(2000年); Tyurinら、Appl. Environ. Microbiol.、70巻、883~890頁(2004年))。超音波形質転換は、グラム陰性菌に対して高い形質転換効率(>10⁶ CFU/ μ g DNA)を与え(Songら、Nucl. Acids Res.、35巻、e129頁(2007年))、グラム陽性菌において試験することができる使いやすい効率的な方法である。

【0145】

エレクトロポレーション、超音波形質転換およびコンジュゲーションを*C. ljungdahlii*および*C. carboxidivorans*形質転換効率について試験する。種々のレプリコン、例えば、pIP404、pAM1およびpIM13を有するグラム陽性菌の種々のプラスミドを試験する。必要な場合、サブクロニングを用いて、既存のプラスミドの抗生物質耐性カセットを抗生物質耐性試験に基づく適切なもので置換する。制限酵素消化、T4リガーゼによる連結反応および*E. coli*形質転換を含む、標準的分子サブクロニング技術をプラスミドの工学的作製に用いる(Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989年))。多くの他のクロストリジウム属の種について必要な場合、宿主細菌による分解から保護するためにDNA送達の前に、これらのプラスミドをメチル化する。エレクトロポレーションおよびコンジュゲーションについては、*C. cellulolyticum*およ

び *C. acetobutylicum* の既存のプロトコルを最初に試験する。エレクトロポレーション設定、回復時間ならびにエレクトロポレーションバッファー中の Ca^{2+} および Mg^{2+} の濃度などのパラメータを変化させて、形質転換効率を最適化する。超音波形質転換については、実験は、以前に記載されたように (Songら、前出、2007年)、低周波数超音波、例えば、40kHz および延長された回復時間の条件下で行う。

【0146】

効率的なDNA移入プロトコルが特定のプラスミドについて確立されたならば、プラスミドを設計製作して天然 *C. ljungdahlii* または *C. carboxidivorans* プロモーターを組み込み、続いて、複数のクローニング部位を組み込んで、発現ベクターを作製する。pSOS95 および pIMP1 などの *C. acetobutylicum* の既存の発現ベクターがプロモーターの変化なしに *C. ljungdahlii* または *C. carboxidivorans* において機能することができる可能性がある」と予想され、したがって、これらのプラスミドを最初の試験に用いる。

10

【0147】

遺伝子破壊方法を開発するために、pKNOCK、pDS3.0、pSPUC および pBlucscript SKII などのいくつかの自殺プラスミドを、*C. ljungdahlii* および / または *C. carboxidivorans* の自殺プラスミドとしての適合性についてスクリーニングする。上述のように、結果は、既存の抗生物質耐性カセットが用いられるか、または適切な抗生物質耐性カセットで置換されるかである。選択される標的遺伝子のDNA断片を適切な自殺プラスミドにサブクローニングする。最初の標的として選択される遺伝子は、エタノール生成に関与するアルコールデヒドロゲナーゼをコードするものである。これらの遺伝子は、副産物の生成をもたらし、ブタノール生成株の破壊の標的として特定される可能性があり、発酵プロセス中のエタノールを分析することによって容易なスクリーニングが可能になるため、選択した。*C. carboxidivorans* におけるアルコールデヒドロゲナーゼの欠失が、これらの酵素の広い基質特異性のため、エタノールの生成を低下させることに加えて、ブタノールの生成を低下させるならば、エタノールの生成と比べてブタノールの生成に有利である *C. acetobutylicum* の adhE2 のようなアルコールデヒドロゲナーゼ (Atsuimiら、Metab. Eng.、2007年9月14日) は、他のブタノール経路遺伝子と共にクローニングしてブタノール経路を構築することができる。

20

30

【0148】

設計製作した自殺プラスミドをメチル化し、*C. ljungdahlii* および *C. carboxidivorans* 内に移入させる。適切な抗生物質を含む固形培地上でコロニーを選択する。PCR増幅ならびにその後の破壊ゲノム領域の配列決定、サザンブロットおよび生理学的試験を用いて、ゲノムにおける標的遺伝子の正確な破壊を確認する。遺伝子破壊の代替として、発現システムを用いて、その遺伝子発現を抑制するが、完全には根絶しない標的遺伝子のアンチセンスRNAを発現させることもできる。したがって、アンチセンスRNAシステムは、所望の遺伝子の遺伝子ノックダウンの簡便なアプローチとしての機能を果たす。

40

【0149】

(実施例IV)

Rhodospirillum rubrum の遺伝的評価

この実施例では、合成ガスの利用のための生物体としての *Rhodospirillum rubrum* の遺伝的ツールの開発について記載する。

【0150】

Rhodospirillum rubrum は、嫌氣的条件下でCOを酸化するグラム陰性の紅色非硫黄細菌である (Kerbyら、J. Bacteriol.、177巻、2241~2244頁(1995年); Kerbyら、J. Bacteriol.、174巻、5284~5294頁(1992年))。 *R. rubrum* は、水素の生成と連結する、COの酸化を触媒するNi-Fe-S COデヒドロゲナーゼ (CODH) を

50

有する (Ensign および Ludden, J. Biol. Chem., 1991、266 巻、18395 ~ 18403 頁 (1991 年))。その CO 酸化能および CO₂ を固定する能力を考慮すると、R. rubrum は、暗所において合成ガスで効率のよい増殖をすることができる (Doら、Biotechnol. Bioeng., 97 巻、279 ~ 286 頁 (2007 年))。さらに、合成ガスで増殖中に総細胞炭素の最大 34% が、主として -ヒドロキシブチレート (PHB) からなるポリ -ヒドロキシアルカノエート (PHA) の形で貯蔵されることが示された。細胞炭素が還元 4 炭素化合物を形成することを効率的に誘導する能力が R. rubrum にあるため、それが 1 - ブタノールなどの所望の生成物の工学的生産のための魅力的なプラットフォームになる。さらに、遺伝系が R. rubrum について確立され、広い宿主範囲の RK2 誘導体を含む広範囲のクローニングベクターが利用可能である (Saegesserら、FEMS Microbiol. Lett., 95 巻、7 ~ 12 頁 (1992 年))。R. rubrum を利用する他の魅力的な態様は、PHB および 1 - ブタノール合成をもたらす経路におけるかなりの重複が存在することである (図 5)。PHB の合成は生分解性プラスチックとしてのその使用について研究されたので、PHB 経路の制御および過剰発現に関するかなりの情報が入手可能である (Anderson および Dawes, Microbiol. Rev., 54 巻、450 ~ 472 頁 (1990 年))。上述のようにクロストリジウム属の株を操作するために必要な遺伝的ツールを確立することと並行して、1 - ブタノール合成経路を形成する Clostridium acetobutylicum 由来のいくつかの遺伝子からなる合成オペロンも同様に開発する。

10

20

【0151】

R. rubrum は、配列が決定され、扱いやすい遺伝系を有する (Saegesserら、FEMS Microbiol. Lett., 95 巻、7 ~ 12 頁 (1992 年)) ので、選択される遺伝子座における標的欠失を作ることができると予想される。マーカーレス欠失を発生させることを可能にする、広い宿主範囲の部位特異的遺伝子切除システムが利用可能である (Hoangら、Gene, 212 巻、77 ~ 86 頁 (1998 年))。したがって、複数の抗生物質選択に依拠することなく、単一の株における複数のノックアウトを発生させることは可能であろう。この方法は、PHB 合成における最後の段階である、PHB シンターゼ遺伝子の欠失を引き起こすことによって試験することができる (Hustedera、FEMS Microbiol. Lett., 72 巻、285 ~ 290 頁 (1992 年))。PHB 合成が 4 炭素前駆体および還元当量の提案されるブタノール経路と競合する可能性がある (図 5) ため、これを選択する。30 重量% 以上の PHB を蓄積することも公知であるグラム陰性細菌である Methylobacterium extorquens における同等の遺伝子の欠失に成功し、増殖に対する有害な影響がないことが報告された (Korotkova および Lidstrom, J. Bacteriol., 183 巻、1038 ~ 1046 頁 (2001 年))。

30

【0152】

(実施例 V)

合成ガスからのブタノールの生成のための微生物の設計製作

この実施例では、合成ガスからのブタノール構成物の生成のための微生物の設計製作について記載する。

40

【0153】

最初の試験において、クロストリジウム属の株、特に、C. carboxidivorans を用いて、ブタノールの生成のためおよびブタノールに対する耐性を得るための合成ガスの利用について設計製作する。C. carboxidivorans は、合成ガスからブタノールを生成することが示された (Liouら、Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55 巻 (Pt 5)、2085 ~ 2091 頁 (2005 年))。C. carboxidivorans を設計製作して、合成ガスの利用効率を増加させ、例示的な所望の生成物としての合成ガスからのブタノールの生成の効率を増加させ、所望の生成物のより高い収率を得ることができるよう生成物耐性を増大させる。

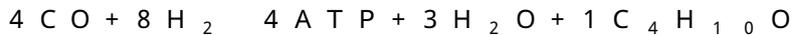
50

【0154】

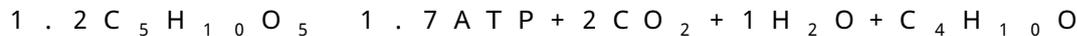
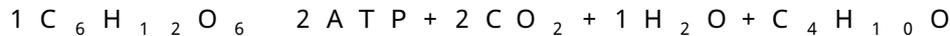
予備的代謝ネットワーク解析により、リグノセルロース由来合成ガスのブタノールへの理論的変換は、糖発酵と比較して有利であることが明らかになった。

【0155】

合成ガスからブタノールへ：



糖からブタノールへ：



バイオマスのガス化では最適には1：1のCO対H₂の比が得られことを考慮すると、1モルのブタノールの生成には12モルのCO+H₂が必要である。重要なことに、合成ガスのブタノールへの発酵による変換は、エネルギー発生活動であり、したがって、生成物の高い収率で細胞増殖を支持する。さらに、最初の計算で、基質の費用は、必要とする等価量の糖より安価であることが明らかになっている。

10

【0156】

上述のように、モデルおよび遺伝的ツールを用いて、細胞増殖の必須の産物としてのブタノールまたは他の所望の生成物の生成を促進する株を設計する。言い換えれば、ブタノールがCOでの増殖する間の必要な電子の吸い込み口 (electron sink) であるように、細胞を設計製作する。遺伝子ノックアウトと適切な酵素の過剰発現の組合せを有することができ、生成の改善および増殖条件からの耐性のために進化させることができる株を構築する。

20

【0157】

ブタノールを生成するクロストリジウム属の株の構築のために、上述のようなゲノム解析を用いて、*C. ljungdahlii* および *C. carboxidivorans* におけるブタノール生成を確立し、かつ/または改善するために必要な生物学的経路を同定する。ブタノール生成のさらなる改善は、合成ガス利用経路および/またはブタノール生成経路タンパク質および酵素の発現を増大させることによって達成することができる。標的生物学的経路における遺伝子を発現させるために、上述のように開発した遺伝子発現ベクターを用いる。複数の遺伝子が存在する場合、遺伝子をPCR増幅し、合成オペロンとして発現ベクターにクローニングする。得られた発現プラスミドを *C. ljungdahlii* および *C. carboxidivorans* 内に移入させる。ノーザンプロットおよび/またはリアルタイムPCR、あるいは他の適切な技術を用いて、転写レベルでの遺伝子発現を試験する。

30

【0158】

ブタノールの生成を改善するために、*C. ljungdahlii* および *C. carboxidivorans* の内因性遺伝子を不活性化してレドックス電位を別の経路によりブタノール生成の方向に移動させることはあり得ることである。このために、標的遺伝子の内部DNA断片をPCR増幅し、自殺プラスミド内にクローニングする。次いで、該プラスミドを *C. ljungdahlii* および *C. carboxidivorans* 内に移入させ、単一交差組換えにより標的遺伝子の破壊をもたらす。正しい破壊は、破壊された遺伝子座から増幅させたPCR産物の配列決定および/またはサザンプロットにより、あるいは他の適切な分析技術を用いて確認する。複数の標的遺伝子が存在する場合、複数の遺伝子ノックアウトを単一株において発生させることができるように、自殺プラスミドを設計製作して抗生物質マーカーを変化させる。最大3～6つまでの遺伝子欠失がブタノール生成を最適化するうえで有用であり得ると予想される。

40

【0159】

ブタノール生成のための *Rhodospirillum rubrum* の遺伝子工学では、*Clostridium acetobutylicum* におけるブタノール合成経

50

路を形成するいくつかの遺伝子からなる合成オペロンを開発する。E. coliにおけるブタノール生成を可能にする同様なアプローチが最近報告され、グラム陰性生物体における経路の異種発現が可能であることが立証された (Atsumiら、Metab. Eng., 2007年9月14日)。R. rubrumにおけるブタノール生成に必要な遺伝子を広い宿主範囲発現ベクター上で発現させることができる。発現は、tacプロモーターなどの誘導プロモーターを用いて制御することができる。合成4遺伝子オペロンは、融合PCR技術を用いて構築し、クロトナーゼ、プチリルCoAデヒドロゲナーゼ、電子伝達フラビンタンパク質の遺伝子、ならびにアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼ活性を含む。融合/アセンブリーPCR技術を用いて異種宿主における発現のための合成オペロンが構築された (Craneeyら、Nucl. Acids Res., 35巻、e46頁 (2007年); Hillら、Mol. Gen. Genet., 226巻、41~48頁 (1991年))。ブタノールオペロンを野生型およびPHB合成欠失R. rubrum株内に形質転換し、下で述べるように試験する。複数の遺伝子をモデリング試験に基づく除去のために標的にすることが望ましいという可能性もある。これらの欠失は、上述のようにマーカーレス法を用いて実現することができる。

10

20

30

40

50

【0160】

中間株は構築されているので、それらを生理学的に試験して、ブタノール生成に向けての進行、ならびに確実な増殖および副産物の生成の減少を持続する能力を評価する。増殖およびブタノール生成の初期のスクリーニングは、最初に1mLマイクロリアクター (MicroReactor Technologies, Inc; Mountain View, CAなど) 中で行う。24ウエルプレートのような構造は、pH、温度およびガス組成について制御することができる。次の段階として、血清容器を温度およびガス組成制御インキュベーター中で激しく振とうする。これは、ガスヘッドスペースならびに液相のサンプリングと分析を可能にする。ブタノール、エタノールおよび有機酸などの生成物は、常用の手順を用いてガスクロマトグラフィー (GC/MS) またはHPLCにより分析することができる。ヘッドスペース中のH₂、COおよびCO₂は、以前に記載されたように (NajafpourおよびYounesi、Enzyme Microb. Technol., 38巻、223~228頁 (2006年))、熱伝導度型検出器 (TCD) 検出によるGCにより15% Arを内部標準として用いて分析する。これらの実験において、H₂とCOとの1/1の比を有する合成による合成ガスを用いる。ガス組成の影響は、発酵の最適化の間に探究する。

【0161】

最初に、1つまたは複数の欠失を有する株を分析し、増殖および発酵プロファイルを野生型細胞に対して比較する。複数の欠失を有する株の増殖は、ブタノール経路の発現の増大がない場合には不十分である可能性がある。1つまたは複数のブタノール経路遺伝子あるいは代謝モデリングにより特定された他の標的を発現する株を野生型宿主において試験して、ブタノール経路を経るフラックスを増大させる能力を評価し、どの段階が障害となっている可能性があるかの予備的評価を行う。合成オペロン構築物を最適化するために、異なる遺伝子順序、ならびに可能な場合、別のプロモーターおよびリボソーム部位を試験する。最も肯定的な結果をもたらす (1つまたは複数の) 構築物を所定の遺伝子欠失を含む宿主内に形質転換し、上述のように試験する。結果をモデル予測と比較して、予見できなかった制約および代謝障害が存在する可能性がある箇所を評価する。

【0162】

遺伝子工学操作を行った後に、適応進化を用いて、所望の株における生成を最適化する。ブタノールの生成を増殖に連結させる株設計に基づいて、改善された増殖速度および/または収率を有する細胞に有利であり、より高いブタノールの収率をもたらす選択圧をかける。したがって、増殖および生成特性を改善するために適応進化を行わせる (FongおよびPalsson、Nat. Genet., 36巻、1056~1058頁 (2004年); Alperら、Science, 314巻、1565~1568頁 (2006年))。結果に基づいて、後のラウンドのモデリングおよび遺伝子工学を用いて生成をさ

らに最適化することができる。進化工学段階は、定常期が達成される前のバッチ培養物の新鮮培地中への連続継代によって長期の指数増殖に細胞を自動的に維持する装置中で行うことができる。具体的には、特定の細胞密度に達したとき、指数関数的に増殖しつつある細胞を含む培地の一部を1つの領域から、新鮮な培地を希釈のために加えながら隣接する領域に送る。光学濃度測定および液体処理を自動化することにより、連続移動を高速で行い、それにより、細胞適合性の進化のためのケモスタットの効率に近づけることができる(Dykhuisen, *Methods Enzymol.*, 224巻、613~631頁(1993年))。しかし、単一容器中で細胞を維持するケモスタットと異なり、この方法は、壁増殖(wall-growth)に順応した細胞の有害な選択の可能性がない(ChaoおよびRamsdell, *J. Gen. Microbiol.*, 131巻、1229~1236頁(1985年); Lynchら, *Nat. Methods*, 4巻、87~93頁(2007年))。さらに、この方法は、クロストリジウム属の増殖の要件である厳密な嫌気的条件を確実にする閉鎖系で細胞を維持することを可能にする。

10

【0163】

適応進化が果たし得るさらなる役割は、ブタノールならびにNO_xおよびタールなどの不純物に対する耐性がより大きい株を開発することである。ブタノール耐性レベルは、*C. ljungdahlii*および*C. carboxidivorans*について公表されておらず、これは、耐性レベルを確定するために野生型細胞について測定する。野生型*C. acetobutylicum*は、約180mM(1.2重量/容積%)の耐性を有すると報告され(Tomasら, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69巻、4951~4965頁(2003年))、2.1%と高い耐性レベルを達成するように設計製作された(Ezejiら, *Chem. Rec.*, 4巻、305~314頁(2004年))。クロストリジウム属のブタノール耐性を改善するための2つのアプローチが現在優勢である。1つは、脂質含量の合理的な遺伝的改変により、あるいは連続富化(Soucailleら, *Curr. Microbiol.*, 14巻、295~299頁(1987年))またはランダム突然変異誘発(Jainら, 米国特許第5,192,673号1993)などの進化法により、膜の脂質組成および流動性を変化させることを含む。しかし、耐性は、複数の因子の複雑な関数であり、定方向の改変のみによっては達成することは困難である。さらに、細胞は、高濃度のブタノールで溶解すると報告されている(Van Der Westhuizenら, *Appl. Environ. Microbiol.*, 44巻、1277~1281頁(1982年))。したがって、株の最適化は、遺伝学、進化および代謝モデリングの組み合わせに基づく。クロストリジウム属におけるブタノール耐性をこの方法により改善することができることを示すために、連続的に増加しつつある濃度のブタノールの存在下で野生型株を適応により進化させることができる。1つの目標は、例えば、25g/Lと高い濃度のブタノールに対する耐性を得るために細胞を進化させることによって細胞を最適化することである。同様な方法を実施することができ、同様な方法を用いて、例えば、NOおよびタールが優勢である芳香族化合物を用いて合成ガス不純物に対する株の耐性を評価することができる。生成および/または不純物耐性の最適化のための適応進化は、連続的または同時に行わせることができる。このアプローチは、商業規模生成に適する耐性レベルを最適化するために、ブタノール耐性および膜流動性に関連する遺伝子の定方向突然変異と統合することもできる。

20

30

40

【0164】

例示的な合成ガスからブタノールへの方法を図4に示す。図4にブタノールを生成するための合成ガスを利用する方法のブロック流れ図を示す。

【0165】

(実施例VI)

合成ガス発酵プロセスの開発および最適化

この実施例では、合成ガス発酵プロセスの開発および最適化について記載する。商業規模生成における目標収率を実証し、最適化するために、標準の合成ガスを用いた実験室規模の合成ガス発酵を行う。

50

【0166】

合成ガス発酵で重要なプロセスの考慮事項は、高いバイオマス濃度および良好なガス-液物質移動である (Bredwellら、*Biotechnol. Prog.*、15巻、834~844頁(1999年))。水中のCOの溶解度は、酸素の溶解度よりいくぶん低い。連続ガススパージ発酵は、制御された発酵槽中で質量分析による常時のオフガス分析ならびに定期的な液体サンプリングとGCおよびHPLCによる分析により行うことができる。液相は、バッチモードで機能し得る。ブタノールおよび副産物の生成を時間の関数として測定する。最終の工業的プロセスは連続的な液体の流れがある可能性があるが、特徴付けおよび最適化の初期の段階における生理学的特性を試験するためにバッチ操作を用いることができる。これらのシステムにおける全ての配管は、嫌気的条件を維持するためにガラスまたは金属である。ガスのスパージは、気泡径を減少させ、物質移動を改善するためにガラスフリットを用いて行う。約0.1~1vvm(1分当たりの蒸気容積)の範囲の種々のスパージ速度を試験する。ガスの取込み速度の正確な測定値を得るために、ガスの流れを一時的に止める定期的なチャレンジを行い、ガス相の組成を時間の関数としてモニターする。

10

【0167】

合成ガス利用に固有の発酵システムも開発する。設計は設計製作した生物体を用いて試験するが、発酵システムの試験は、最初に野生型生物体を用いて株の開発と並行して行うことができる。総括的な目標生産性を達成するために、細胞保持またはリサイクルの方法を用いる。連続して操作されるそのようなシステムに関する通常の問題は、細胞が非生産性表現型に進化する可能性があることである。生物体は所望の生成物の増殖連結型生成のために設計されているので、生物体は遺伝的に安定である。微生物の生物体の濃度を増加させる1つの方法は、タンジェンシャルフロー膜を介して側留から細胞をリサイクルすることである。Moorellaによるアセテートの生成について以前に記載されたように (Sakai S.、Y. Nakashimada、K. Inokuma、M. Kita、I. OkadaおよびN. Nishio、*Acetate and ethanol production from H₂ and CO₂ by Moorella sp. using a repeated batch culture*、*J. Biosci. Bioeng.*、99巻、252~258頁(2005年))、反復バッチ式培養も用いることができる。他の種々の方法も用いることができる (Bredwellら、*Biotechnol. Prog.*、15巻、834~844頁(1999年)) ; Datarら、*Biotechnol. Bioeng.*、86巻、587~594頁(2004年))。物質移動を改善するために、1.5気圧の超過圧力などのさらなる最適化も試験することができる (NajafpourおよびYounesi、*Enzyme Microb. Technol.*、38巻、223~228頁(2006年))。

20

30

【0168】

フィードとして純粋なH₂/COを用いて満足のいく成績が達成されたならば、商用合成ガス中に存在する可能性が高い阻害物質を含む合成ガス混合物を生成させる。例えば、典型的な不純物プロファイルは、4.5%CH₄、0.1%C₂H₂、0.35%C₂H₆、1.4%C₂H₄および150ppmの一酸化窒素である (Datarら、*Biotechnol. Bioeng.*、86巻、587~594頁(2004年))。ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、p-キシレン、o-キシレンおよびナフタレンなどの化合物に代表されるタールは、生成に対する影響の有無を試験するためにppmレベルで加える。例えば、40ppmのNOはC. carboxidivoransに対して阻害性であることが示されている (AhmedおよびLewis、*Biotechnol. Bioeng.*、97巻、1080~1086頁(2007年))。培養物は、発酵槽に移す前に振とうフラスコ培養物中で試験する。また、異なるレベルの潜在的阻害性化合物を試験して、それらが細胞増殖に及ぼす影響を定量化する。この知識を用いて、スケールアップ試験および生産のために用いられる合成ガス純度に関する仕様を策定する。特定の

40

50

成分がスケールアップに用いる合成ガスから減少または除去することが困難であることがわかった場合、1つまたは複数の不純物に耐えるように細胞を適応させるために、上述のような適応進化法を利用することができる。

【0169】

(実施例VII)

合成ガス利用微生物を発生させるための最小限の遺伝子セット

この実施例では、特に所望の生成物を生成するために合成ガスを天然では利用しない微生物における、合成ガス利用微生物の発生のための最小限の遺伝子/タンパク質セットの決定について記載する。

【0170】

一般的に、微生物はテトラヒドロ葉酸 (tetrahydrofolate) を生成する能力を有し、メチルテトラヒドロ葉酸 (Me-THF) が生合成における、例えば、メチオニン生成における一般的な中間体である。したがって、上で概説し、図1に示すメチル分岐は、合成ガスを利用する生物体の特有な特徴ではない。しかし、Me-THFを生成するために必要な酵素は、合成ガスを利用しない生物体と比較して合成ガスを利用する生物体においてはるかに活性が高いことが見出された。実際、アセテート生成菌のテトラヒドロ葉酸依存性酵素は、E. coli および真核生物などの他の供給源からのものより50~100倍高い比活性を有する (Mortonら、Genetics and Molecular Biology of Anaerobic Bacteria、M. Sebald編、28章、389~406頁、Springer-Verlage、New York、NY (1993年))。合成ガスを利用することができる生物体を設計するための遺伝子/タンパク質セットを規定するより適当かつ特有な方法は、経路のカルボニル分岐を用いることである (図2を参照)。この分岐は、次の6種のタンパク質の遺伝子を含む：コバラミドコリノイド/鉄-硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ (CODH)、アセチルCoAシンターゼ (ACS)、アセチルCoAシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびCO耐性ヒドロゲナーゼ。したがって、これらの6種の遺伝子/タンパク質は、アセチルCoAを生成することができる合成ガス利用経路を付与するための1つまたは複数のタンパク質セットである。

【0171】

(実施例VIII)

合成ガス利用微生物を発生させるための遺伝子セット

この実施例では、合成ガス利用微生物を発生させるための例示的な遺伝子セットについて記載する。

【0172】

ギ酸デヒドロゲナーゼ。ギ酸デヒドロゲナーゼは、Moorella thermoaceticaにおけるホルメートへのCO₂の組込みを触媒する2サブユニットのセレノシステイン含有タンパク質である (AndreesenおよびLjungdahl、J. Bacteriol.、116巻、867~873頁 (1973年); Liら、J. Bacteriol.、92巻、405~412頁 (1966年); Yamamotoら、J. Biol. Chem.、258巻、1826~1832頁 (1983年))。遺伝子座、Moth__2312およびMoth__2313は、ギ酸デヒドロゲナーゼのサブユニットをコードすることに関与する実際は1つの遺伝子であるが、サブユニットは、Moth__2314によってコードされる (Pierceら、Environ. Microbiol. (2008年))。CO₂還元を有するギ酸デヒドロゲナーゼ活性をコードする遺伝子の別のセットは、Syntrophobacter fumaroxidansにおけるSfum__2703~Sfum__2706によってコードされる (de Bokら、Eur. J. Biochem.、270巻、2476~2485頁 (2003年); Redaら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、105巻、10654~10658頁 (2008年))。それらのM. thermoaceticaカウンターパートと同様に、Sfum__2705およびSfum__

10

20

30

40

50

2706は、実際は1つの遺伝子である。同じ機能を果たすと推測される遺伝子の同様なセットは、*C. hydrogenoformans*におけるCHY__0731、CHY__0732およびCHY__0733によってコードされる(Wuら、PLoS Genet.、1巻、e65頁(2005年))。

【0173】

【数1】

タンパク質	GenBank ID	生物体
Moth_2312	YP_431142	Moorella thermoacetica
Moth_2313	YP_431143	Moorella thermoacetica
Moth_2314	YP_431144	Moorella thermoacetica
Sfum_2703	YP_846816.1	Syntrophobacter fumaroxidans
Sfum_2704	YP_846817.1	Syntrophobacter fumaroxidans
Sfum_2705	YP_846818.1	Syntrophobacter fumaroxidans
Sfum_2706	YP_846819.1	Syntrophobacter fumaroxidans
CHY_0731	YP_359585.1	Carboxydothemus hydrogenoformans
CHY_0732	YP_359586.1	Carboxydothemus hydrogenoformans
CHY_0733	YP_359587.1	Carboxydothemus hydrogenoformans

10

ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼ。ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼは、1つのATPを消費してホルメートをテトラヒドロ葉酸に連結させる。この反応は、*M. thermoacetica*におけるMoth__0109(Lovellら、Arch. Microbiol.、149巻、280~285頁(1988年); Lovellら、Biochemistry、29巻、5687~5694頁(1990年); O'brienら、Experientia. Suppl.、26巻、249~262頁(1976年))、*Clostridium acidurici*におけるFHS(WhiteheadおよびRabinowitz、J. Bacteriol.、167巻、205~209頁(1986年); WhiteheadおよびRabinowitz、J. Bacteriol.、170巻、3255~3261頁(1988年))ならびに*C. hydrogenoformans*におけるCHY__2385(Wuら、PLoS Genet.、1巻、e65頁(2005年))の遺伝子産物によって触媒される。

20

30

【0174】

【数2】

タンパク質	GenBank ID	生物体
Moth_0109	YP_428991.1	Moorella thermoacetica
CHY_2385	YP_361182.1	Carboxydothemus hydrogenoformans
FHS	P13419.1	Clostridium acidurici

メテニルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ。*M. thermoacetica*、*E. coli*および*C. hydrogenoformans*において、メテニルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼがそれぞれMoth__1516、foldおよびCHY__1878の二元機能遺伝子産物によって遂行される(D'AriおよびRabinowitz、J. Biol. Chem.、266巻、23953~23958頁(1991年); Pierceら、Environ. Microbiol. (2008年); (Wuら、PLoS Genet.、1巻、e65頁(2005年))。

40

【0175】

【数3】

タンパク質	GenBank ID	生物体
Moth_1516	YP_430368.1	Moorella thermoacetica
folD	NP_415062.1	Escherichia coli
CHY_1878	YP_360698.1	Carboxydotherrmus hydrogenoformans

メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ。Wood-Ljungdahl経路のメチル分岐の最終段階は、メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼによって触媒される。M. thermoaceticaにおいて、この酵素は、酸素感受性であり、鉄-硫黄クラスターを含む(ClarkおよびLjungdahl、J. Biol. Chem.、259巻、10845~10849頁(1984年))。この酵素は、E. coliにおけるmetF(Sheppardら、J. Bacteriol.、181巻、718~725頁(1999年))およびC. hydrogenoformansにおけるCHY_1233によってコードされる(Wuら、PLoS Genet.、1巻、e65頁(2005年))。M. thermoacetica遺伝子およびそのC. hydrogenoformansカウンターパートは、推定上のヒドロゲナーゼ遺伝子およびヘテロジスルフイドレダクターゼ遺伝子によって隔てられているCODH/ACS遺伝子クラスターの近くに位置する。

【0176】

【数4】

タンパク質	GenBank ID	生物体
metF	NP_418376.1	Escherichia coli
CHY_1233	YP_360071.1	Carboxydotherrmus hydrogenoformans

アセチルCoAシンターゼ/一酸化炭素デヒドロゲナーゼ(ACS/CODH)および関連タンパク質。

【0177】

ACS/CODHは、Wood-Ljungdahl経路のカルボニル分岐の中心酵素である。これは、二酸化炭素の一酸化炭素への可逆的還元を、また一酸化炭素、補酵素A、およびメチル化コリノイド-鉄-硫黄タンパク質のメチル基からのアセチルCoAの合成も触媒する。このコリノイド-鉄-硫黄タンパク質は、メチルトランスフェラーゼを介してメチルテトラヒドロ葉酸によってメチル化される。外来宿主におけるACS/CODHの発現は、全てではないとしても、多くの以下のタンパク質およびそれらの対応する活性を導入することを含む。

【0178】

メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ(AcsE)

コリノイド-鉄-硫黄タンパク質(AcsD)

ニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質(AcsF)

フェレドキシン(Orf7)

アセチルCoAシンターゼ(AcsBおよびAcsC)

一酸化炭素デヒドロゲナーゼ(AcsA)

ニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質(CooC)

一酸化炭素デヒドロゲナーゼ/アセチルCoAシンターゼ活性に必要な遺伝子は、延長オペロンであり得る天然ゲノムの限られた領域に典型的には存在する(Mortonら、J. Biol. Chem.、266巻、23824~23828頁(1991年); Ragsdale、Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.、39巻、165~195頁(2004年); Robertsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86巻、32~36頁(1989年))。アセテート生成菌M. thermoaceticaのこのオペロンにおける遺伝子はそれぞれ既にク

10

20

30

40

50

ローニングされ、E. coli 中で活発に発現した (Luら、J. Biol. Chem.、268巻、5605~5614頁(1993年); Mortonら、前出、1991年; Robertsら、前出、1989年)。これらの遺伝子のタンパク質配列は、以下のGenBankアクセッション番号により特定することができる。

【0179】

【数5】

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
AcsE	YP_430054	Moorella thermoacetica
AcsD	YP_430055	Moorella thermoacetica
AcsF	YP_430056	Moorella thermoacetica
Orf7	YP_430057	Moorella thermoacetica
AcsC	YP_430058	Moorella thermoacetica
AcsB	YP_430059	Moorella thermoacetica
AcsA	YP_430060	Moorella thermoacetica
CooC	YP_430061	Moorella thermoacetica

10

水素生成細菌 *Carboxydothemus hydrogenoformans* は、アセチルCoAシターゼによる増殖基質として一酸化炭素を利用することができる (Wuら、PLoS Genet.、1巻、e65頁(2005年))。株Z-2901において、アセチルCoAシターゼ酵素複合体は、フレームシフト突然変異のため一酸化炭素デヒドロゲナーゼを欠いている (Wuら、前出、2005年) が、株DSM6008においては、このタンパク質の機能的な非フレームシフト完全長型が精製された (Svetlitchnyiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、101巻、446~451頁(2004年))。株Z-2901の*C. hydrogenoformans* 遺伝子のタンパク質配列は、以下のGenBankアクセッション番号により特定することができる。*Carboxydothemus hydrogenoformans* DSM6008の配列は、公的に利用可能なデータベースにおいて現在アクセス可能ではないが、配列が利用可能になると容易に決定することができる。

20

【0180】

【数6】

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
AcsE	YP_360065	Carboxydothemus hydrogenoformans
AcsD	YP_360064	Carboxydothemus hydrogenoformans
AcsF	YP_360063	Carboxydothemus hydrogenoformans
Orf7	YP_360062	Carboxydothemus hydrogenoformans
AcsC	YP_360061	Carboxydothemus hydrogenoformans
AcsB	YP_360060	Carboxydothemus hydrogenoformans
CooC	YP_360059	Carboxydothemus hydrogenoformans

30

メタン生成古細菌 *Methanosarcina acetivorans* は、一酸化炭素で増殖することもでき、アセチルCoAシターゼ/一酸化炭素デヒドロゲナーゼ活性を示し、アセテートおよびホルメートの両方を生成する (Lessnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、103巻、17921~17926頁(2006年))。この生物体は、ACS/CODH活性をコードする2セットの遺伝子を含む (RotherおよびMetcalfe、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、101巻、16929~16934頁(2004年))。M. acetivorans 遺伝子の両セットのタンパク質配列は、以下のGenBankアクセッション番号により特定することができる。

40

【0181】

【数7】

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
AcsC	NP_618736	Methanosarcina acetivorans
AcsD	NP_618735	Methanosarcina acetivorans
AcsF、CooC	NP_618734	Methanosarcina acetivorans
AcsB	NP_618733	Methanosarcina acetivorans
AcsEps	NP_618732	Methanosarcina acetivorans
AcsA	NP_618731	Methanosarcina acetivorans
AcsC	NP_615961	Methanosarcina acetivorans
AcsD	NP_615962	Methanosarcina acetivorans
AcsF、CooC	NP_615963	Methanosarcina acetivorans
AcsB	NP_615964	Methanosarcina acetivorans
AcsEps	NP_615965	Methanosarcina acetivorans
AcsA	NP_615966	Methanosarcina acetivorans

10

AcsC、AcsD、AcsB、AcsEpsおよびAcsAのタンパク質は、メタン生成CODH/ACSのガンマ、デルタ、ベータ、イプシロンおよびアルファサブユニットと一般的に呼ばれている。イプシロンをコードする遺伝子のホモログは、*M. thermoacetica*などのアセテート生成菌または*C. hydrogenoformans*などの水素生成細菌において存在しない。*M. acetivorans*における2つの活性CODH/ACSオペロンの存在に関する仮説は、カルボキシドトロフィック(*carboxidotrophic*)もしくはアセチクラスチック(*aceticlastic*)増殖に有利な触媒特性(すなわち、 K_m 、 V_{max} 、 k_{cat})、または種々の刺激がCODH/ACS発現を誘導することを可能にする差次的遺伝子制御を含む(Rotherら、*Arch. Microbiol.*、188巻、463~472頁(2007年))。

20

【0182】

*M. thermoacetica*および*C. hydrogenoformans*の両方において、CODHをコードするさらなる遺伝子が、ACS/CODHオペロンの外側に位置する。これらの酵素は、一酸化炭素の二酸化炭素への変換から電子または還元当量を抽出する能力をもたらす。次いで還元当量は、酸化フェレドキシン、NADP⁺、水または過酸化水素などの受容体に渡されて、それぞれ還元フェレドキシン、NADPH、H₂または水を形成する。場合によって、ヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、CODHに隣接して位置する。*Rhodospirillum rubrum*において、コードされたCODH/ヒドロゲナーゼタンパク質は、プロトン勾配の形のエネルギーがCOのCO₂およびH₂への変換により発生する部位であることが提唱されている、膜結合酵素複合体を形成する(Foxら、*J. Bacteriol.*、178巻、6200~6208頁(1996年))。*C. hydrogenoformans*のCODH-Iおよびその隣接遺伝子は、*R. rubrum* CODH/ヒドロゲナーゼ遺伝子クラスターとそれらが類似性を有することに基づいて、類似の機能的役割を触媒することが提唱された(Wuら、*PLoS Genet.*、1巻、e65頁(2005年))。*C. hydrogenoformans*のCODH-Iはまた、電極に連結させたとき、強いCO酸化およびCO₂還元活性を示すことが示された(Parkinら、*J. Am. Chem. Soc.*、129巻、10328~10329頁(2007年))。*C. hydrogenoformans*のCODH-IIおよび隣接タンパク質CooFをコードする遺伝子がクローニングされ、配列決定された(GonzalezおよびRobb、*FEMS Microbiol. Lett.*、191巻、243~247頁(2000年))。CODH-IIの細胞質画分はNADPHの生成を触媒することが示され、同化作用の役割が示唆されるが、得られた複合体は膜結合性であった(Svetlitchnyiら、*J. Ba*

30

40

50

cteriol., 183巻、5134～5144頁(2001年)。CODH-IIの結晶構造も入手可能である(Dobбекら、Science、293巻、1281～1285頁(2001年))。例示的なCODH遺伝子およびヒドロゲナーゼ遺伝子のタンパク質配列は、以下のGenBankアクセッション番号により特定することができる。

【0183】

【数8】

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>	
CODH (推定)	YP_430813	Moorella thermoacetica	
CODH-I (CooS-I)	YP_360644	Carboxydothemus hydrogenoformans	
CooF	YP_360645	Carboxydothemus hydrogenoformans	
HypA	YP_360646	Carboxydothemus hydrogenoformans	
CooH	YP_360647	Carboxydothemus hydrogenoformans	
CooU	YP_360648	Carboxydothemus hydrogenoformans	
CooX	YP_360649	Carboxydothemus hydrogenoformans	
CooL	YP_360650	Carboxydothemus hydrogenoformans	
CooK	YP_360651	Carboxydothemus hydrogenoformans	
CooM	YP_360652	Carboxydothemus hydrogenoformans	10
CooM	AAC45116	Rhodospirillum rubrum	
CooK	AAC45117	Rhodospirillum rubrum	
CooL	AAC45118	Rhodospirillum rubrum	
CooX	AAC45119	Rhodospirillum rubrum	
CooU	AAC45120	Rhodospirillum rubrum	
CooH	AAC45121	Rhodospirillum rubrum	
CooF	AAC45122	Rhodospirillum rubrum	
CODH (CooS)	AAC45123	Rhodospirillum rubrum	
CooC	AAC45124	Rhodospirillum rubrum	
CooT	AAC45125	Rhodospirillum rubrum	30
CooJ	AAC45126	Rhodospirillum rubrum	
CODH-II (CooS-II)	YP_358957	Carboxydothemus hydrogenoformans	
CooF	YP_358958	Carboxydothemus hydrogenoformans	

アセチルCoAシンターゼジスルフィドレダクターゼ。Moorella thermoaceticaにおいて、ヘテロジスルフィドレダクターゼをコードする遺伝子のセット(Moth_1194～Moth_1196)は、上述のacs遺伝子クラスターのすぐ下流に位置する。さらに、M.thermoaceticaと同様に、C.hydrogenoformansは、acsEの直後のヘテロジスルフィドレダクターゼをコードする遺伝子のセットを含む。

【0184】

【数9】

タンパク質	GenBank ID	生物体
HdrC	YP_430053	Moorella thermoacetica
HdrB	YP_430052	Moorella thermoacetica
HdrA	YP_430052	Moorella thermoacetica
HdrC	YP_360066	Carboxydotherrmus hydrogenoformans
HdrB	YP_360067	Carboxydotherrmus hydrogenoformans
HdrA	YP_360068	Carboxydotherrmus hydrogenoformans

ヒドロゲナーゼ (Hyd)。CO およびメタノールのアセチルCoA またはアセテートへのレドックス中性変換と異なり、エタノール、ブタノール、イソブタノール、イソプロパノール、1,4-ブタンジオール、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、4-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、乳酸、メタクリル酸、アジピン酸およびアクリル酸などのより高度に還元された生成物の最高可能収率での生成には、CO およびH₂の両者からのさらなる還元当量の抽出が必要である(例えば、図7におけるエタノール生成を参照)。具体的には、還元当量(例えば、図6における2[H])は、実施例IIで述べたように一酸化炭素デヒドロゲナーゼによるCO および水のCO₂への変換により、あるいはH₂からフェレドキシン、フラボドキシン、FAD⁺、NAD⁺またはNADP⁺などの受容体に電子を移動させる水素利用ヒドロゲナーゼの活性から直接得られる。

【0185】

最大4つのヒドロゲナーゼをコードする複数の遺伝子は、E. coli および他の腸内細菌に固有のものである(Sawers, Antonie Van Leeuwenhoek, 66巻、57~88頁(1994年); Sawersら, J. Bacteriol., 164巻、1324~1331頁(1985年); Sawers および Boxer, Eur. J. Biochem., 156巻、265~275頁(1986年); Sawersら, J. Bacteriol., 168巻、398~404頁(1986年))。酵素活性の多重性を考慮すると、E. coli または他の宿主生物体は、入って来る分子水素を分裂させ、対応する受容体を還元するのに十分なヒドロゲナーゼ活性をもたらすことができる可能性がある。E. coli の内因性水素リアーゼ酵素の中に、フェレドキシンを受容体として用いる膜結合酵素複合体である、ヒドロゲナーゼ3、およびフェレドキシン受容体も用いる、ヒドロゲナーゼ4がある。ヒドロゲナーゼ3および4は、それぞれhyc およびhyf 遺伝子クラスターによってコードされる。E. coli におけるヒドロゲナーゼ活性はまた、対応するタンパク質がヒドロゲナーゼ複合体のアセンブリに関与する、hyp 遺伝子の発現に依存する(Jacobiら, Arch. Microbiol., 158巻、444~451頁(1992年); Rangarajanら, J. Bacteriol., 190巻、1447~1458頁(2008年))。産生宿主が十分な内因性ヒドロゲナーゼ活性を欠いている場合、M. thermoacetica ヒドロゲナーゼは適切な候補である。M. thermoacetica は、唯一の炭素源としてのCO₂により増殖することができ、還元当量がH₂から抽出され、Wood-Ljungdahl 経路によりアセチルCoA 合成が可能であることが示唆される(Drake, J. Bacteriol., 150巻、702~709頁(1982年); Drake および Daniel, Res. Microbiol., 155巻、869~883頁(2004年); Kellum および Drake, J. Bacteriol., 160巻、466~469頁(1984年))(図6参照)。M. thermoacetica は、E. coli のいくつかのhyp、hyc およびhyf 遺伝子のホモログを有する。これらの遺伝子によってコードされる、これらのタンパク質配列は、以下のGenBank アクセッション番号により特定することができる。さらに、ヒドロゲナーゼおよび/またはヘテロジスルフィドレダクターゼの機能性をコードするいくつかの遺伝子クラスターがM. thermoacetica 中に存在し、それらの対応するタンパク質配列も以下に示す。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 6 】

【 数 1 0 】

Hypアセンブリータンパク質

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
HypA	NP_417206	Escherichia coli
HypB	NP_417207	Escherichia coli
HypC	NP_417208	Escherichia coli
HypD	NP_417209	Escherichia coli
HypE	NP_417210	Escherichia coli
HypF	NP_417192	Escherichia coli

10

遺伝子がE.coliのhyp遺伝子と相同であるM.thermoaceticaにおけるタンパク質

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
Moth_2175	YP_431007	Moorella thermoacetica
Moth_2176	YP_431008	Moorella thermoacetica
Moth_2177	YP_431009	Moorella thermoacetica
Moth_2178	YP_431010	Moorella thermoacetica
Moth_2179	YP_431011	Moorella thermoacetica
Moth_2180	YP_431012	Moorella thermoacetica
Moth_2181	YP_431013	Moorella thermoacetica

20

ヒドロゲナーゼ3

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
HycA	NP_417205	Escherichia coli
HycB	NP_417204	Escherichia coli
HycC	NP_417203	Escherichia coli
HycD	NP_417202	Escherichia coli
HycE	NP_417201	Escherichia coli
HycF	NP_417200	Escherichia coli
HycG	NP_417199	Escherichia coli
HycH	NP_417198	Escherichia coli
HycI	NP_417197	Escherichia coli

30

【 0 1 8 7 】

【数 1 1】

ヒドロゲナーゼ4

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>	
HyfA	NP_416976	Escherichia coli	
HyfB	NP_416977	Escherichia coli	
HyfC	NP_416978	Escherichia coli	
HyfD	NP_416979	Escherichia coli	
HyfE	NP_416980	Escherichia coli	
HyfF	NP_416981	Escherichia coli	
HyfG	NP_416982	Escherichia coli	10
HyfH	NP_416983	Escherichia coli	
HyfI	NP_416984	Escherichia coli	
HyfJ	NP_416985	Escherichia coli	
HyfR	NP_416986	Escherichia coli	

遺伝子がE.coliのhycおよび/またはhyf遺伝子と相同であるM.thermoaceticaにおけるタンパク質

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>	
Moth_2182	YP_431014	Moorella thermoacetica	
Moth_2183	YP_431015	Moorella thermoacetica	
Moth_2184	YP_431016	Moorella thermoacetica	20
Moth_2185	YP_431017	Moorella thermoacetica	
Moth_2186	YP_431018	Moorella thermoacetica	
Moth_2187	YP_431019	Moorella thermoacetica	
Moth_2188	YP_431020	Moorella thermoacetica	
Moth_2189	YP_431021	Moorella thermoacetica	
Moth_2190	YP_431022	Moorella thermoacetica	
Moth_2191	YP_431023	Moorella thermoacetica	
Moth_2192	YP_431024	Moorella thermoacetica	

M.thermoaceticaにおけるさらなるヒドロゲナーゼコード遺伝子クラスター

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>	
Moth_0439	YP_429313	Moorella thermoacetica	30
Moth_0440	YP_429314	Moorella thermoacetica	
Moth_0441	YP_429315	Moorella thermoacetica	
Moth_0442	YP_429316	Moorella thermoacetica	
Moth_0809	YP_429670	Moorella thermoacetica	
Moth_0810	YP_429671	Moorella thermoacetica	
Moth_0811	YP_429672	Moorella thermoacetica	
Moth_0812	YP_429673	Moorella thermoacetica	
Moth_0813	(おそらく偽遺伝子、 GenBank ID入手不能)	Moorella thermoacetica	40
Moth_0814	YP_429674	Moorella thermoacetica	
Moth_0815	YP_429675	Moorella thermoacetica	
Moth_0816	YP_429676	Moorella thermoacetica	

【 0 1 8 8 】

【数 1 2】

Moth_1193	YP_430050	Moorella thermoacetica
Moth_1194	YP_430051	Moorella thermoacetica
Moth_1195	YP_430052	Moorella thermoacetica
Moth_1196	YP_430053	Moorella thermoacetica
Moth_1717	YP_430562	Moorella thermoacetica
Moth_1718	YP_430563	Moorella thermoacetica
Moth_1719	YP_430564	Moorella thermoacetica
Moth_1883	YP_430726	Moorella thermoacetica
Moth_1884	YP_430727	Moorella thermoacetica
Moth_1885	YP_430728	Moorella thermoacetica
Moth_1886	YP_430729	Moorella thermoacetica
Moth_1887	YP_430730	Moorella thermoacetica
Moth_1888	YP_430731	Moorella thermoacetica
Moth_1452	YP_430305	Moorella thermoacetica
Moth_1453	YP_430306	Moorella thermoacetica
Moth_1454	YP_430307	Moorella thermoacetica

10

20

補充反応 (anapleurosis) の能力も天然に有するこれらの能力を有するよう
に設計製作した宿主生物体 (例えば、E. coli) は、ニトレートなどの適切な外部
電子受容体の存在下で合成ガス発生アセチル CoA で潜在的により効率よく増殖し得る。
この電子受容体は、コハク酸デヒドロゲナーゼによって生成する還元キノンから電子を受
容することが必要である。外部電子受容体を加えるさらなる利点は、細胞増殖、維持およ
び生成物の生成のためのさらなるエネルギーをアセチル CoA の呼吸から発生させること
ができることである。代替の戦略は、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ (P
FOR) 酵素を株に工学的に導入して、外部電子受容体の不在下でバイオマス前駆体の
合成を可能にすることを含む。

30

【0189】

ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ (PFOR)。外部電子受容体の不在
下での合成ガスおよびメタノールでの嫌気性増殖は、ピルビン酸フェレドキシンオキシド
レダクターゼ (PFOR) によるピルベートの合成を可能にすることによって ACS / C
ODH 活性を有する宿主生物体に与えられる。Desulfovibrio africanus の PFOR がクローニングされ、E. coli 中で発現され、酸素の存在下で数
日間安定であった活性な組換え酵素が得られた (Pieulle ら、J. Bacter
iol.、179 巻、5684 ~ 5692 頁 (1997 年))。酸素安定性は、PFOR
において比較的まれであり、D. africanus 酵素のポリペプチド鎖における 60
残基の延長により付与されると考えられる。M. thermoacetica の PFOR
も十分に特徴付けられ (Menon および Ragsdale、Biochemistry
、36 巻、8484 ~ 8494 頁 (1997 年))、独立栄養増殖の間にピルベート合成
の方向の高い活性を有することが示された (Furdui および Ragsdale、J.
Biol. Chem.、275 巻、28494 ~ 28499 頁 (2000 年))。さら
に、E. coli は、M. thermoacetica の PFOR と 51% 同一である
タンパク質をコードする、特徴付けられていないオープンリーディングフレームである y
dbK を有する。E. coli におけるピルビン酸オキシドレダクターゼ活性の証拠が記
載されている (Blaschkowski ら、Eur. J. Biochem.、123 巻、563 ~ 569 頁 (1982 年))。これらの例示的な PFOR 酵素のタンパク
質配列は、以下の GenBank アクセッション番号により特定することができる。いく

40

50

つかのさらなる P F O R 酵素が記載されている (R a g s d a l e, C h e m . R e v ., 103 巻、2333 ~ 2346 頁 (2003 年))。

【0190】

【数13】

タンパク質	GenBank ID	生物体
Por	CAA70873.1	Desulfovibrio africanus
Por	YP_428946.1	Moorella thermoacetica
YdbK	NP_415896.1	Escherichia coli

この実施例では、CO、CO₂ および H₂ の少なくとも 1 つを含むガスからアセチル CoA を生成するように生物体を設計製作するための例示的な遺伝子セットについて記載する。

10

【0191】

(実施例 IX)

微生物への合成ガス利用経路の設計製作

この実施例では、合成ガス利用経路を含むように微生物を設計製作することについて記載する。

【0192】

CO および / または CO₂ を炭素源として利用する天然の能力を有するクロストリジウム属の種などの微生物の効率を改善すること (実施例 I I、I I I および V) に加えて、CO および / または CO₂ を利用する天然の能力を有さない微生物を、CO および / または CO₂ 利用経路を付与する 1 つまたは複数のタンパク質もしくは酵素を発現するように設計製作する。1 つの例示的な経路は、CO および / または CO₂ の炭素源としての利用を可能にし、それにより、微生物が合成ガスまたは他のガス状炭素源を利用することを可能にする Wood - L j u n g d a h l 経路である (実施例 I および V I I)。

20

【0193】

最初の試験において、天然で合成ガスを利用しない *Escherichia coli* を、Wood - L j u n g d a h l 経路などの CO および / または CO₂ 利用経路を導入するための標的生物体として用いる。Wood - L j u n g d a h l 経路は、酸素感受性タンパク質および膜結合タンパク質ならびに *E. coli* 中で天然でない特異的補因子を含む。いくつかの Wood - L j u n g d a h l 経路遺伝子が *E. coli* にクローニングされたが、1 つの酵素メチルトランスフェラーゼのみが活性な形で発現することが見出された (R o b e r t s ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、86 巻、32 ~ 36 頁 (1989 年))。Clostridium thermoacetatum からカルボニル分岐 (図 2 参照) 経路遺伝子の精製により、メチル THF からアセチル CoA への *in vitro* 変換試験に必要な酵素の最小限のセットが明らかになった (R o b e r t s ら、J . B a c t e r i o l ., 174 巻、4667 ~ 4676 頁 (1992 年))。

30

【0194】

初期の試験は、Wood - L j u n g d a h l 経路、特にカルボニル分岐 (図 2) を *E. coli* に設計製作し、増殖を試験、ならびにメチル THF および合成ガスの両者からのアセテート生成を試験することを対象とする。*E. coli* は、遺伝子操作に適用でき、グルコースから嫌気的条件下でエタノール、アセテートおよびスクシネートのような様々な生成物を効率よく生成することができることが公知であることから、合成ガスまたは他のガス状炭素源を利用することができる天然に存在しない微生物を開発するための良好なモデルである。

40

【0195】

Wood - L j u n g d a h l 経路を含むように設計製作された *E. coli* 株を発生させるために、該経路のカルボニル分岐に必要なタンパク質および酵素をコードする核酸 (図 2 および実施例 V I I 参照) を、周知の分子生物学技術 (例えば、S a m b r o o k

50

、前出、2001年；Ausubel、前出、1999年；Robertsonら、前出、1989年を参照）を用いてE. coli中で発現させる。前記のように、Clostridium thermoaceticumにおけるアセチルCoA合成における重要なタンパク質をコードする遺伝子クラスターをクローニングし、E. coli中で発現させた（Robertsonら、前出、1989年）。活性タンパク質の生成を確実にするために、培地の金属組成などの条件の特定の変化が必要である。コバラミドコリノイド/鉄-硫黄タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ（CODH）、アセチルCoAシンターゼ（ACS）、アセチルCoAシンターゼジスルフィドレダクターゼおよびCO耐性ヒドロゲナーゼをコードする遺伝子をクローニングし、E. coli中で発現させて、Wood-Ljungdahl経路のカルボニル分岐酵素を導入する（Wood-Ljungdahl経路の遺伝子については、Ragsdale、Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.、39巻、165～195頁（2004年）も参照のこと）。E. coliは、コバラミドコリノイド/鉄-硫黄タンパク質活性に必要なコバラミンまたはコバラミン様補因子を通常合成しないので、補因子または必要な補因子の合成のためのタンパク質および酵素をコードする遺伝子も導入することもできる。費用面がおそらくこのアプローチのスケールアップおよび商業的製造の妨げとなると思われるが、コバラミンまたはコバラミン様補因子を培地に加えることができる。より良い代替は、コバラミン要求性タンパク質を発現するE. coli株に必要な遺伝子をクローニングし、発現させることである。これは、Salmonella typhimuriumからE. coliへの20遺伝子を含むコバラミンオペロンの移入および機能発現によって実証された（Rauxら、J. Bacteriol.、178巻、753～767頁（1996年））。

【0196】

Wood-Ljungdahl経路遺伝子の発現を、導入された遺伝子の発現を測定するための常用のアッセイ、例えば、ノーザンブロット、mRNAのPCR増幅、イムノブロットング、または導入された遺伝子の核酸およびタンパク質発現を確認するための他の周知のアッセイを用いて試験する。発現酵素の酵素活性は、個別に、またはアセチルCoAなどの生成物の生成について試験することができる（例えば、Robertsonら、前出、1989年を参照）。設計製作されたE. coli株がCOおよび/またはCO₂を炭素源として利用してアセチルCoAを生成する能力は、ガスクロマトグラフィー-質量分析（GCMS）もしくは液体クロマトグラフィー-質量分析（LCMS）を用いて直接分析することができるか、あるいは代謝放射性標識または同位元素標識の使用（例えば、放射性COもしくはCO₂の使用）とアセチルCoA生成物への放射性標識の取込みまたは同位元素標識COもしくはCO₂前駆体の取込みの分析、また質量分析（GCMSもしくはLCMS）または核磁気共鳴分光法（NMR）などの技術による分析を通して、分析することができる。H₂の存在下または不在下で唯一の炭素源としてCOおよび/またはCO₂のみを使用するE. coliの増殖は、完全に機能的な経路についての他の有用な試験である。

【0197】

機能的なWood-Ljungdahl経路がE. coli株に設計製作したならば、その経路の効率のよい利用について該株を最適化する。設計製作された株を試験して、導入された遺伝子のいずれが律速レベルで発現するかどうかを決定することができる。必要に応じて、該経路を通してのフラックスを制限する可能性がある1つまたは複数のタンパク質または酵素の発現の増加を用いて、該経路の利用およびアセチルCoAの生成を最適化することができる。

【0198】

代謝モデリングを用いて、増殖条件を最適化することができる（実施例II参照）。モデリングは、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計するためにも用いることができる（実施例II、IVおよびVならびに例えば、米国特許公開US2002/0012939、US2003/0224363、US2004/0029149、U

S 2 0 0 4 / 0 0 7 2 7 2 3、U S 2 0 0 3 / 0 0 5 9 7 9 2、U S 2 0 0 2 / 0 1 6 8 6 5 4 および U S 2 0 0 4 / 0 0 0 9 4 6 6、ならびに米国特許第 7, 1 2 7, 3 7 9 号を参照)。モデリング解析は、アセチル Co A または他の所望の生成物のより効率の高い生成の方向に代謝を移動させる細胞増殖に対する影響の予測を可能にする。1 つのモデリング方法は、下で述べるようなアセチル Co A または他の所望の生成物の増殖連結型生成を集合的にもたらず遺伝子ノックアウトを選択するために適用される、2 層の最適化アプローチである Opt Knock (Burgard ら、Biotechnol. Bioengineering、84 巻、647~657 頁(2003 年)) である。遺伝子ノックアウト戦略により設計された株は、他の全ての増殖選択肢が除去されたため、ネットワーク化学量論により、効率のよい増殖のための所望の生成物を高レベルで生成することを余儀なくされる。そのような株は、自己最適化しており、安定である。したがって、それらは、強い増殖選択圧に直面した場合でも生成レベルを典型的には維持または改善し、バッチまたは連続式バイオプロセシングに、また進化学にも適用可能となる。適応進化を用いて、アセチル Co A の生成をさらに最適化することができる(実施例 V)。したがって、適応進化は、増殖および生成特性を改善するために行われる(Fong および Palsson、Nat. Genet.、36 巻、1056~1058 頁(2004 年); Alper ら、Science、314 巻、1565~1568 頁(2006 年))。結果に基づいて、モデリング、遺伝子工学および適応進化のその後のラウンドを用いて、さらに生成を最適化しかつ合成ガスまたは合成ガス中の不純物に対する酵素の耐性を最適化することができる。

10

20

【0199】

設計製作した微生物株が Wood-Ljungdahl 経路の利用について最適化されたならば、周知の方法を用いて、また例えば、実施例 VI) で述べたように、発酵プロセスの最適化を行って、収率を増加させることができる。例えば、合成ガスからの 0.5 g/L/時間での 20 g/L アセテートの生産性レベルは、経路の効率のよい利用のための株のさらなる最適化ならびに発酵条件の最適化を用いて所望の生成レベルを達成することができる所望の生成範囲を表すであろう。

【0200】

CO および / または CO₂ を利用する能力を、設計製作された微生物株に付与するためのカルボニル分岐の導入で例示したが、同様なアプローチを適用して、メチル THF の生成のための酵素を E. coli に導入する。実施例 VII) で上述したように、E. coli はメチル THF を生成する能力を有するが、アセテート生成菌の THF 依存性酵素はより高い比活性を有する(Morton ら、前出、1993 年)。Wood-Ljungdahl 経路のカルボニル分岐を導入するための上述のような方法を用いて、メチル分岐酵素を同様な技術を用いて E. coli に導入する。フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼ、メチルテトラヒドロ葉酸シクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼおよびメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼの酵素の 1 つまたは複数をコードする遺伝子を導入する(図 1 参照)。この場合、遺伝子を導入して、内因性酵素活性を増大させ、かつ / またはメチル THF を生成するための CO および / または CO₂ の利用の効率を増大させる。経路および発酵条件の最適化を上述のように行う。さらに、Wood-Ljungdahl 経路のカルボニル分岐およびメチル分岐の両方を同じ微生物に導入することができる。そのような設計製作された生物体において、CO および / または CO₂ からのメチル THF の生成の増加を用いて、Wood-Ljungdahl 経路のカルボニル分岐を用いて CO および / または CO₂ を利用するように設計製作された生物体におけるアセチル Co A の生成をさらに増加させることができる(図 3 および 6 参照)。

30

40

【0201】

アセチル Co A は、他の所望の生成物の前駆体として機能し得る。アセチル Co A 生成微生物を発生させたならば、炭素源としての CO および / または CO₂ から他の所望の生成物を生成するための前駆体としてアセチル Co A を利用するために、さらなる遺伝子を

50

微生物中に導入することができる。例えば、ブタノールの生成のための酵素を導入することができる（図3および実施例V参照）。アセチルCoAからのブタノール経路の代表的な遺伝子は、Atob、アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ；Th1、アセチルCoAチオラーゼ；Hbd、3-ヒドロキシブチリルCoAデヒドロゲナーゼ；Crt、クロトナーゼ；Bed、ブチリルCoAデヒドロゲナーゼ；Etf、電子伝達フラビンタンパク質；AdhE2、アルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼである（Atsumiら、Metabolic Engineering、2007年9月14日を参照）。

【0202】

スクシネート、4-ヒドロキシブチレートおよび1,4-ブタンジオールなどのさらなる所望の生成物の生成のための代謝経路は、例えば、2007年8月10日に出願された米国出願第11/891,602号およびWO/2008/115840に記載されており、そのような経路の酵素を同様に導入することができ、例えば、スクシニルCoAリガーゼ、スクシニルCoA:CoAトランスフェラーゼ、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、4-ヒドロキシブチリルCoAトランスフェラーゼ、CoA依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼなどである。アセチルCoAが全ての細胞のTCAサイクルに直接送入され、スクシネートがTCAサイクル中間体である。したがって、COおよび/またはCO₂から生成するアセチルCoAを利用することができる経路を付与するさらなる酵素を、上述のように設計製作し、最適化して、設計製作した微生物から所望の生成物を生成させることができる。

10

20

【0203】

（実施例X）

合成ガスおよびメタノールからアセチルCoAを生成するための経路

この実施例では、合成ガス（synthesis gas（syngas））およびメタノールを利用してアセチルCoAを生成するための例示的な経路について記載する。

【0204】

合成ガスおよびメタノールからアセチルCoAを生成することができる生物体は、図7中に示す2つの重要な能力を含有する。1つの能力は、メタノールおよびTHFからの5-メチル-テトラヒドロ葉酸（Me-THF）の生成を可能にする機能的メチルトランスフェラーゼ系である。第2の能力は、CO、補酵素A、およびMe-THFのメチル基を組み合わせて、アセチルCoAを形成する能力である。生物体は、外因性のCOおよび/またはCO₂およびメタノール由来の炭素を「固定」して、アセチルCoA、細胞集団、および生成物を合成することができる。メタノールおよび合成ガスからアセチルCoAを形成するためのこの経路は、完全なWood-Ljungdahl経路の利用と比較してエネルギー学的に有利である。例えば、アセテートへの合成ガスの直接転換は、エネルギー学的には中性のプロセスである（図6参照）。具体的には、1個のATP分子がホルミル-THFシンターゼによるホルミル-THFの形成中に消費され、かつ1個のATP分子が、酢酸キナーゼによるアセテートの生成中に生成される。メタノールに関するこの新たな戦略は、メチル分岐生成物、メチル-THF上のメチル基が、CO₂ではなくメタノールから得られることを確実にすることによって、ATP消費の必要を回避する。したがってこれは、アセテートの形成が、細胞増殖および維持の支援を助けることができる正のATP収率を有することを確実にする。補充反応の能力も天然に有するこれらの能力を有するように設計製作した宿主生物体（例えば、E.coli）は、ニトレートなどの適切な外部電子受容体の存在下で、メタノールおよび合成ガスで発生したアセチルCoAで増殖することができる。この電子受容体は、コハク酸デヒドロゲナーゼによって形成された還元キノンから電子を受容することが必要である。外部電子受容体を加えるさらなる利点は、細胞増殖、維持、および生成物の形成のさらなるエネルギーを、アセチルCoAの呼吸から生成することができることである。

30

40

【0205】

代替の戦略は、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ（PFOR）酵素を株

50

に工学的に導入して、外部電子受容体の不在下でバイオマス前駆体の合成を可能にすることを含む。設計製作した生物体のさらなる特徴は、分子水素から還元当量を抽出する能力である。これは、エタノール、ブタノール、イソブタノール、イソプロパノール、1,4-ブタンジオール、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、4-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、乳酸、メタクリル酸、アジピン酸、およびアクリル酸などの還元生成物の高収率を与える。

【0206】

生物体は、以下の供給源：1)メタノールおよびCO、2)メタノール、CO₂、およびH₂、3)メタノール、CO、CO₂、およびH₂、4)メタノールならびにCOおよびH₂を含む合成ガス、および5)メタノールならびにCO、CO₂、およびH₂を含む合成ガスから、アセチルCoA、細胞集団、および標的化学物質を生成することができる。

10

【0207】

生物体へのこの経路の首尾よい工学的導入は、適切な酵素のセットを同定すること、それらの対応する遺伝子を産生宿主にクローニングすること、これらの遺伝子の安定性および発現を最適化すること、発酵条件を最適化すること、および発酵後に生成物形成に関してアッセイすること(実施例II~IV参照)を含む。以下に記載するのは、アセチルCoAへの合成ガスおよびメタノールの転換に必要とされる経路のそれぞれの段階を触媒するいくつかの酵素である。合成ガスおよびメタノールの利用のために産生宿主を設計製作するために、必須酵素をコードする(1つまたは複数の)外因性DNA配列を微生物中で発現させる。

20

【0208】

この実施例では、合成ガスおよびメタノールからのアセチルCoA生成についての例示的な経路について記載する。

【0209】

(実施例XI)

メタノールおよび合成ガスを利用する微生物を生成するための遺伝子セット

この実施例では、メタノールおよび合成ガスを利用する微生物を生成するための例示的な遺伝子セットについて記載する。

【0210】

メタノール-メチルトランスフェラーゼ(MTR)。外来宿主中での改変Wood-Ljungdahl経路の発現(図7参照)は、1セットのメチルトランスフェラーゼを導入して、メタノールによって与えられる炭素と水素ならびにCOおよび/またはCO₂によって与えられる炭素を利用することを必要とする。MtaA、MtaB、およびMtaCで示す、3メチルトランスフェラーゼタンパク質の複合体は、望ましいメタノールメチルトランスフェラーゼ活性を実行する(NaiduおよびRagsdale, J. Bacteriol. 183巻、3276~3281頁(2001年); Ragsdale、Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 39巻、165~195頁(2004年); Sauerら、Eur. J. Biochem. 243巻、670~677頁(1997年); TallantおよびKrzycki, J. Bacteriol. 178巻、1295~1301頁(1996年); TallantおよびKrzycki, J. Bacteriol. 179巻、6902~6911頁(1997年); Tallantら、J. Biol. Chem. 276巻、4485~4493頁(2001年))。

30

40

【0211】

メタノールメチルトランスフェラーゼ(MtaB)およびコリノイドタンパク質(MtaC)。MtaBは、メタノールからMtaC(コリノイドタンパク質)へのメチル基の移入を触媒する亜鉛タンパク質である。MtaBおよびMtaCをコードする例示的な遺伝子は、Methanosarcina barkeri(Maederら、J. Bacteriol. 188巻、7922~7931頁(2006年))およびMetha

50

nosarcina acetivorans (Galaganら、Genome Res. 12巻、532~542頁(2002年))などのメタン生成の古細菌、およびアセテート生成菌の*Moorella thermoacetica* (Dasら、Proteins 67巻、167~176頁(2007年))において見ることができる。一般に、それらの活性は密接に相互依存しているので、MtaB遺伝子とMtaC遺伝子は染色体上で互いに隣接している。*M. barkeri*、*M. acetivorans*、および*M. thermoaceticum*中の様々なMtaBおよびMtaCコード遺伝子のタンパク質配列は、それらの以下のGenBankアクセッション番号により特定することができる。

【0212】

10

【数14】

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
MtaB1	YP_304299	<i>Methanosarcina barkeri</i>
MtaC1	YP_304298	<i>Methanosarcina barkeri</i>
MtaB2	YP_307082	<i>Methanosarcina barkeri</i>
MtaC2	YP_307081	<i>Methanosarcina barkeri</i>
MtaB3	YP_304612	<i>Methanosarcina barkeri</i>
MtaC3	YP_304611	<i>Methanosarcina barkeri</i>
MtaB1	NP_615421	<i>Methanosarcina acetivorans</i>
MtaB1	NP_615422	<i>Methanosarcina acetivorans</i>
MtaB2	NP_619254	<i>Methanosarcina acetivorans</i>
MtaC2	NP_619253	<i>Methanosarcina acetivorans</i>
MtaB3	NP_616549	<i>Methanosarcina acetivorans</i>
MtaC3	NP_616550	<i>Methanosarcina acetivorans</i>
MtaB	YP_430066	<i>Moorella thermoacetica</i>
MtaC	YP_430065	<i>Moorella thermoacetica</i>

20

30

*M. barkeri*由来のMtaB1およびMtaC1遺伝子、YP__304299およびYP__304298を、*E. coli*にクローニングし配列決定した(Sauerら、Eur. J. Biochem. 243巻、670~677頁(1997年))。このメタノール-コバラミンメチルトランスフェラーゼ複合体の結晶構造も利用可能である(Hagemeyerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103巻、18917~18922頁(2006年))。*M. barkeri*中のMtaB遺伝子、YP__307082およびYP__304612は、YP__304299との配列相同性によって同定した。一般に、MtaBコード遺伝子はトリメチルアミン、ジメチルアミン、モノメチルアミン、またはジメチルスルフィドなどの代替の基質に作用するメチルトランスフェラーゼとの類似性をほとんど、または全く示さないで、相同性検索はメタノールメチルトランスフェラーゼを同定する有効な手段である。MtaC遺伝子、YP__307081およびYP__304611は、MtaB遺伝子とのそれらの近接性、さらにYP__304298とのそれらの相同性に基いて同定した。*M. acetivorans*由来の3セットのMtaBおよびMtaC遺伝子が遺伝的、生理的、および生化学的に特徴付けられている(PritchettおよびMetcalfe、Mol. Microbiol. 56巻、1183~1194頁(2005年))。そのセットの2つを欠く突然変異体株はメタノールで増殖することができ、一方3セットのMtaBおよびM

40

50

t a C 遺伝子の全てを欠く株は、メタノールで増殖することができなかった。これは、遺伝子のそれぞれのセットがメタノール利用において役割を果たすことを示唆する。M . t h e r m o a c e t i c a の M t a B 遺伝子は、メタン生成 M t a B 遺伝子との相同性に基づいて、さらに結晶化しているメタノール誘導コリノイドタンパク質の M t a C とのその隣接染色体の近接性によって同定し (Z h o u ら、A c t a C r y s t a l l o g r . S e c t . F S t r u c t . B i o l . C r y s t . C o m m u n . 6 1 巻、5 3 7 ~ 5 4 0 頁 (2 0 0 5 年))、ノーザンハイブリダイゼーションおよびウエスタンブロッティングによってさらに特徴付けした (D a s ら、P r o t e i n s 6 7 巻、1 6 7 ~ 1 7 6 頁 (2 0 0 7 年))。

【 0 2 1 3 】

メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ (M t a A)。M t a A は、メタン生成菌中の補酵素 M へのまたはアセテート生成菌中のテトラヒドロ葉酸へのいずれかへの、M t a C からのメチル基の転移を触媒する亜鉛タンパク質である。M t a A は、メチルドナーとしてメチルコバラミンを利用することもできる。M t a A をコードする例示的な遺伝子は、M e t h a n o s a r c i n a b a r k e r i (M a e d e r ら、J . B a c t e r i o l . 1 8 8 巻、7 9 2 2 ~ 7 9 3 1 頁 (2 0 0 6 年)) およびメタン生成の古細菌 (G a l a g a n ら、G e n o m e R e s . 1 2 巻、5 3 2 ~ 5 4 2 頁 (2 0 0 2 年)) などの m e t h a n o g e n i c a r c h a e a、およびアセテート生成菌の M o o r e l l a t h e r m o a c e t i c a (D a s ら、P r o t e i n s 6 7 巻、1 6 7 ~ 1 7 6 頁 (2 0 0 7 年)) において見ることができる。一般に、C H ₃ - M t a C からのメチル基の転移を触媒する M t a A タンパク質は、他のコリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼと類似性を共有し、染色体上の M t a B および M t a C 遺伝子と隣接配向ではないので、パイオインフォマティクスにより同定するのは難しい。それにもかかわらず、いくつかの M t a A コード遺伝子が特徴付けされている。M . b a r k e r i および M . a c e t i v o r a n s 中のこれらの遺伝子のタンパク質配列は、以下の G e n B a n k アクセッション番号により特定することができる。

【 0 2 1 4 】

【 数 1 5 】

タンパク質	GenBank ID	生物体
MtaA	YP_304602	Methanosarcina barkeri
MtaA1	NP_619241	Methanosarcina acetivorans
MtaA2	NP_616548	Methanosarcina acetivorans

M . b a r k e r i 由来の M t a A 遺伝子、Y P _ 3 0 4 6 0 2 をクローニングし、配列決定し、E . c o l i 中で機能的に過剰発現させた (H a r m s および T h a u e r、E u r . J . B i o c h e m . 2 3 5 巻、6 5 3 ~ 6 5 9 頁 (1 9 9 6 年))。M . a c e t i v o r a n s では、M t a A 1 はメタノールでの増殖に必要とされ、一方 M t a A 2 は、メタノールからのメタン生成が M t a A 2 突然変異体中で低減するが必ずしも必要ではない (B o s e ら、J . B a c t e r i o l . 1 9 0 巻、4 0 1 7 ~ 4 0 2 6 頁 (2 0 0 8 年))。M . b a r k e r i および M . a c e t i v o r a n s において、今まで特徴付けられていないが、コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ活性を触媒し得る、多数のさらなる M t a A ホモログが存在することに留意することも重要である。

【 0 2 1 5 】

M . t h e r m o a c e t i c a 中の推定 M t a A コード遺伝子を、特徴付けられたメタン生成菌 M t a A 遺伝子とのそれらの配列類似性によって同定した。具体的には、3 つの M . t h e r m o a c e t i c a の遺伝子が、M . b a r k e r i 由来の Y P _ 3 0 4 6 0 2 と高い相同性 (3 0 % を超える配列同一性) を示す。C H ₃ - M t a C からの補酵素 M へのメチル基の転移を本来触媒するメタン生成菌の M t a A タンパク質と異なり、M

10

20

30

40

50

. *thermoacetica* の MtaA は、それぞれメタン生成菌およびアセテート生成菌中のテトラヒドロ葉酸および補酵素 M の類似した役割を考慮して、テトラヒドロ葉酸にメチル基を転移させる可能性がある。M. *thermoacetica* 由来の推定 MtaA コードの遺伝子のタンパク質配列は、以下の GenBank アクセション番号により特定することができる。

【0216】

【数16】

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
MtaA	YP_430937	Moorella thermoacetica
MtaA	YP_431175	Moorella thermoacetica
MtaA	YP_430935	Moorella thermoacetica

10

アセチル CoA シンターゼ / 一酸化炭素デヒドロゲナーゼ (ACS / CODH)。ACS / CODH は、Wood-Ljungdahl 経路のカルボニル分岐の中心酵素である。これは、二酸化炭素の一酸化炭素への可逆的還元を、また一酸化炭素、補酵素 A、およびメチル化コリノイド-鉄-硫黄タンパク質のメチル基からのアセチル CoA の合成も触媒する。このコリノイド-鉄-硫黄タンパク質は、メチルトランスフェラーゼを介してメチルテトラヒドロ葉酸によってメチル化される。外来宿主における ACS / CODH の発現は、全てではないとしても、多くの以下のタンパク質およびそれらの対応する活性を導入することを含む。

20

【0217】

メチルテトラヒドロ葉酸：コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ (Acse)

コリノイド-鉄-硫黄タンパク質 (AcSD)

ニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質 (AcSF)

フェレドキシン (Orf7)

アセチル CoA シンターゼ (AcSB および AcSC)

一酸化炭素デヒドロゲナーゼ (AcSA)

ニッケル-タンパク質アセンブリータンパク質 (CooC)

一酸化炭素デヒドロゲナーゼ / アセチル CoA シンターゼ活性に必要な遺伝子は、延長オペロンであり得る天然ゲノムの限られた領域に典型的には存在する (Mortonら、J. Biol. Chem.、266巻、23824~23828頁 (1991年); Ragsdale、Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.、39巻、165~195頁 (2004年); Robertsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86巻、32~36頁 (1989年))。アセテート生成菌 M. *thermoacetica* のこのオペロンにおける遺伝子はそれぞれ既にクローニングされ、E. coli 中で活発に発現した (Luら、J. Biol. Chem.、268巻、5605~5614頁 (1993年); Mortonら、前出、1991年; Robertsら、前出、1989年)。これらの遺伝子のタンパク質配列は、以下の GenBank アクセション番号により特定することができる。

30

40

【0218】

【数 17】

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
AcsE	YP_430054	Moorella thermoacetica
AcsD	YP_430055	Moorella thermoacetica
AcsF	YP_430056	Moorella thermoacetica
Orf7	YP_430057	Moorella thermoacetica
AcsC	YP_430058	Moorella thermoacetica
AcsB	YP_430059	Moorella thermoacetica
AcsA	YP_430060	Moorella thermoacetica
CooC	YP_430061	Moorella thermoacetica

10

水素生成細菌 *Carboxydothemus hydrogenoformans* は、アセチルCoAシンターゼによる増殖基質として一酸化炭素を利用することができる (Wuら、PLoS Genet.、1巻、e65頁(2005年))。株Z-2901において、アセチルCoAシンターゼ酵素複合体は、フレームシフト突然変異のため一酸化炭素デヒドロゲナーゼを欠いている (Weら、前出、2005年)が、株DSM6008においては、このタンパク質の機能的な非フレームシフト完全長型が精製された (Svertlitchnyiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、101巻、446~451頁(2004年))。株Z-2901からの*C. hydrogenoformans* 遺伝子のタンパク質配列は、以下のGenBankアクセッション番号により特定することができる。*Carboxydothemus hydrogenoformans* DSM6008の配列は、公的に利用可能なデータベースにおいて現在アクセス可能ではないが、配列が利用可能になると容易に決定することができる。

20

【0219】

【数 18】

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
AcsE	YP_360065	Carboxydothemus hydrogenoformans
AcsD	YP_360064	Carboxydothemus hydrogenoformans
AcsF	YP_360063	Carboxydothemus hydrogenoformans
Orf7	YP_360062	Carboxydothemus hydrogenoformans
AcsC	YP_360061	Carboxydothemus hydrogenoformans
AcsB	YP_360060	Carboxydothemus hydrogenoformans
CooC	YP_360059	Carboxydothemus hydrogenoformans

30

メタン生成古細菌 *Methanosarcina acetivorans* は、一酸化炭素で増殖することもでき、アセチルCoAシンターゼ/一酸化炭素デヒドロゲナーゼ活性を示し、アセテートおよびホルメートの両方を生成する (Lessnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、103巻、17921~17926頁(2006年))。この生物体は、ACS/CODH活性をコードする2セットの遺伝子を含む (RotherおよびMetcalfe、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、101巻、16929~16934頁(2004年))。M. acetivorans 遺伝子の両セットのタンパク質配列は、以下のGenBankアクセッション番号により特定することができる。

40

【0220】

【数 19】

タンパク質	GenBank ID	生物体
AcsC	NP_618736	Methanosarcina acetivorans
AcsD	NP_618735	Methanosarcina acetivorans
AcsF、CooC	NP_618734	Methanosarcina acetivorans
AcsB	NP_618733	Methanosarcina acetivorans
AcsEps	NP_618732	Methanosarcina acetivorans
AcsA	NP_618731	Methanosarcina acetivorans
AcsC	NP_615961	Methanosarcina acetivorans
AcsD	NP_615962	Methanosarcina acetivorans
AcsF、CooC	NP_615963	Methanosarcina acetivorans
AcsB	NP_615964	Methanosarcina acetivorans
AcsEps	NP_615965	Methanosarcina acetivorans
AcsA	NP_615966	Methanosarcina acetivorans

10

AcsC、AcsD、AcsB、AcsEpsおよびAcsAタンパク質は、メタン生成CODH/ACSのガンマ、デルタ、ベータ、イプシロンおよびアルファサブユニットと一般的に呼ばれている。イプシロンをコードする遺伝子のホモログは、*M. thermoacetica*などのアセテート生成菌または*C. hydrogenoformans*などの水素生成細菌において存在しない。*M. acetivorans*における2つの活性なCODH/ACSオペロンの存在に関する仮説は、カルボキシドトロフィックもしくはアセチクラスチック増殖に有利な触媒特性（すなわち、 K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} ）、または種々の刺激がCODH/ACS発現を誘導することを可能にする差次的遺伝子制御を含む（Rotherら、*Arch. Microbiol.*、188巻、463~472頁（2007年））。

20

【0221】

*M. thermoacetica*および*C. hydrogenoformans*の両方において、CODHをコードするさらなる遺伝子が、ACS/CODHオペロンの外側に位置する。これらの酵素は、一酸化炭素の二酸化炭素への変換から電子または還元当量を抽出する手段をもたらす。次いで還元当量は、酸化フェレドキシン、NADP⁺、水または過酸化水素などの受容体に渡されて、それぞれ還元フェレドキシン、NADPH、H₂または水を形成する。場合によって、ヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、CODHに隣接して位置する。*Rhodospirillum rubrum*において、コードされたCODH/ヒドロゲナーゼタンパク質は、プロトン勾配の形のエネルギーがCOのCO₂およびH₂への変換により発生する部位であることが提唱されている、膜結合酵素複合体を形成する（Foxら、*J. Bacteriol.*、178巻、6200~6208頁（1996年））。*C. hydrogenoformans*のCODH-Iおよびその隣接遺伝子は、*R. rubrum* CODH/ヒドロゲナーゼ遺伝子クラスターに対するそれらの類似性に基づいて、類似の機能的役割を触媒することが提唱された（Wuら、*PLoS Genet.*、1巻、e65頁（2005年））。*C. hydrogenoformans*のCODH-Iはまた、電極に連結させたとき、強いCO酸化およびCO₂還元活性を示すことが示された（Parkinら、*J. Am. Chem. Soc.*、129巻、10328~10329頁（2007年））。*C. hydrogenoformans*のCODH-IIおよび隣接タンパク質CooFをコードする遺伝子がクローニングされ、配列決定された（GonzalezおよびRobb、*FEMS Microbiol. Lett.*、191巻、243~247頁（2000年））。CODH-IIの細胞質画分はNADPHの形成を触媒することが示され、同化作用の役割が示唆されるが、得られた複合体は膜結合性であった（Svetlitchnyiら、*J. Bacteriol.*、183巻、5134~5144頁（2001年））。CODH-IIの結晶

30

40

50

構造も入手可能である (Dobbeckerら、Science、293巻、1281~1285頁(2001年))。例示的なCODHおよびヒドロゲナーゼ遺伝子のタンパク質配列は、以下のGenBankアクセッション番号により特定することができる。

【0222】

【数20】

タンパク質	GenBank ID	生物体	
CODH (推定)	YP_430813	Moorella thermoacetica	
CODH-I (CooS-I)	YP_360644	Carboxydotherrmus hydrogenoformans	
CooF	YP_360645	Carboxydotherrmus hydrogenoformans	10
HypA	YP_360646	Carboxydotherrmus hydrogenoformans	
CooH	YP_360647	Carboxydotherrmus hydrogenoformans	
CooU	YP_360648	Carboxydotherrmus hydrogenoformans	
CooX	YP_360649	Carboxydotherrmus hydrogenoformans	
CooL	YP_360650	Carboxydotherrmus hydrogenoformans	
CooK	YP_360651	Carboxydotherrmus hydrogenoformans	
CooM	YP_360652	Carboxydotherrmus hydrogenoformans	
CooM	AAC45116	Rhodospirillum rubrum	
CooK	AAC45117	Rhodospirillum rubrum	20
CooL	AAC45118	Rhodospirillum rubrum	
CooX	AAC45119	Rhodospirillum rubrum	
CooU	AAC45120	Rhodospirillum rubrum	
CooH	AAC45121	Rhodospirillum rubrum	
CooF	AAC45122	Rhodospirillum rubrum	
CODH (CooS)	AAC45123	Rhodospirillum rubrum	
CooC	AAC45124	Rhodospirillum rubrum	
CooT	AAC45125	Rhodospirillum rubrum	
CooJ	AAC45126	Rhodospirillum rubrum	
CODH-II (CooS-II)	YP_358957	Carboxydotherrmus hydrogenoformans	30
CooF	YP_358958	Carboxydotherrmus hydrogenoformans	

ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ (PFOR)。外部電子受容体の不在下での合成ガスおよびメタノールでの嫌気性増殖は、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ (PFOR) によるピルベートの合成を可能にすることによってMTRおよびACS/CODH活性を有する宿主生物体に与えられる。Desulfovibrio africanusのPFORがクローニングされ、E. coli中で発現され、酸素の存在下で数日間安定であった活性な組換え酵素が得られた (Pieulleら、J. Bacteriol.、179巻、5684~5692頁(1997年))。酸素安定性は、PFORにおいて比較的まれであり、D. africanus酵素のポリペプチド鎖における60残基延長により付与されると考えられる。M. thermoaceticaのPFORも十分に特徴付けられ (MenonおよびRagsdale、Biochemistry、36巻、8484~8494頁(1997年))、独立栄養増殖の間にピルベート合成の方向の高い活性を有することが示された (FurduiおよびRagsdale、J. Biol. Chem.、275巻、28494~28499頁(2000年))。さらに、E. coliは、M. thermoaceticaのPFORと51%同一であるタンパク質をコードする、特徴付けられていないオープンリーディングフレームであるydbKを有する。E. coliにおけるピルビン酸オキシドレダクターゼ活性の証拠が記載されている (Blaschkowskiら、Eur. J. Bioche 40

m.、123巻、563～569頁(1982年)。これらの例示的なPFOR酵素のタンパク質配列は、以下のGenBankアクセッション番号により特定することができる。いくつかのさらなるPFOR酵素が記載されている(Ragsdale、Chem. Rev.、103巻、2333～2346頁(2003年))。

【0223】

【数21】

タンパク質	GenBank ID	生物体
Por	CAA70873.1	Desulfovibrio africanus
Por	YP_428946.1	Moorella thermoacetica
YdbK	NP_415896.1	Escherichia coli

10

ヒドロゲナーゼ(Hyd)。COおよびメタノールのアセチルCoAまたはアセテートへのレドックス中性変換と異なり、エタノール、ブタノール、イソブタノール、イソプロパノール、1,4-ブタンジオール、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、4-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、乳酸、メタクリル酸、アジピン酸およびアクリル酸などのより高度に還元された生成物の最高可能収率での生成には、COおよびH₂の両方からのさらなる還元当量の抽出が必要である(例えば、図7におけるエタノール形成を参照)。具体的には、還元当量(例えば、図6における2[H])は、実施例IIで述べたように一酸化炭素デヒドロゲナーゼによるCOおよび水のCO₂への変換により得られるか、あるいはH₂からフェレドキシン、フラボドキシン、FAD⁺、NAD⁺またはNADP⁺などの受容体に電子を移動させる水素利用ヒドロゲナーゼの活性から直接得られる。

20

【0224】

最大4つのヒドロゲナーゼをコードする複数の遺伝子は、E. coliおよび他の腸内細菌に固有のものである(Sawers、Antonie Van Leeuwenhoek、66巻、57～88頁(1994年); Sawersら、J. Bacteriol.、164巻、1324～1331頁(1985年); SawersおよびBoxer、Eur. J. Biochem.、156巻、265～275頁(1986年); Sawersら、J. Bacteriol.、168巻、398～404頁(1986年))。酵素活性の多重性を考慮すると、E. coliまたは他の宿主生物体は、入って来る分子水素を分裂させ、対応する受容体を還元するのに十分なヒドロゲナーゼ活性をもたらすことができる可能性がある。E. coliの内因性水素リアーゼ酵素の中に、フェレドキシンを受容体として用いる膜結合酵素複合体である、ヒドロゲナーゼ3、およびフェレドキシン受容体も用いる、ヒドロゲナーゼ4がある。ヒドロゲナーゼ3および4は、それぞれhycおよびhyf遺伝子クラスターによってコードされる。E. coliにおけるヒドロゲナーゼ活性はまた、対応するタンパク質がヒドロゲナーゼ複合体のアセンブリに関与する、hyp遺伝子の発現に依存する(Jacobiら、Arch. Microbiol.、158巻、444～451頁(1992年); Rangarajanら、J. Bacteriol.、190巻、1447～1458頁(2008年))。産生宿主が十分な内因性ヒドロゲナーゼ活性を欠いている場合、M. thermoaceticaヒドロゲナーゼは適切な候補である。M. thermoaceticaは、唯一の炭素源としてのCO₂により増殖することができ、還元当量がH₂から抽出され、Wood-Ljungdahl経路によりアセチルCoA合成が可能であることが示唆される(Drake、J. Bacteriol.、150巻、702～709頁(1982年); DrakeおよびDaniel、Res. Microbiol.、155巻、869～883頁(2004年); KellumおよびDrake、J. Bacteriol.、160巻、466～469頁(1984年))(図6参照)。M. thermoaceticaは、E. coliのいくつかのhyp、hycおよびhyf遺伝子のホモログを有する。これらの遺伝子によってコードされる、これらのタンパク質配列は、以下のGenBankアクセッション番号により特定することができる。さらに、ヒドロゲナーゼおよび/またはヘテロジスルフィドレダクターゼの機能性をコードするいくつかの遺伝子ク

30

40

50

ラスターが *M. thermoacetica* 中に存在し、それらの対応するタンパク質配列も以下に示す。

【 0 2 2 5 】

【 数 2 2 】

Hypアセンブリータンパク質

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
HypA	NP_417206	<i>Escherichia coli</i>
HypB	NP_417207	<i>Escherichia coli</i>
HypC	NP_417208	<i>Escherichia coli</i>
HypD	NP_417209	<i>Escherichia coli</i>
HypE	NP_417210	<i>Escherichia coli</i>
HypF	NP_417192	<i>Escherichia coli</i>

10

遺伝子が *E. coli* の *hyp* 遺伝子と相同である *M. thermoacetica* におけるタンパク質

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
Moth_2175	YP_431007	<i>Moorella thermoacetica</i>
Moth_2176	YP_431008	<i>Moorella thermoacetica</i>
Moth_2177	YP_431009	<i>Moorella thermoacetica</i>
Moth_2178	YP_431010	<i>Moorella thermoacetica</i>
Moth_2179	YP_431011	<i>Moorella thermoacetica</i>
Moth_2180	YP_431012	<i>Moorella thermoacetica</i>
Moth_2181	YP_431013	<i>Moorella thermoacetica</i>

20

【 0 2 2 6 】

【 数 2 3 】

ヒドロゲナーゼ3

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
HycA	NP_417205	Escherichia coli
HycB	NP_417204	Escherichia coli
HycC	NP_417203	Escherichia coli
HycD	NP_417202	Escherichia coli
HycE	NP_417201	Escherichia coli
HycF	NP_417200	Escherichia coli
HycG	NP_417199	Escherichia coli
HycH	NP_417198	Escherichia coli
HycI	NP_417197	Escherichia coli

10

ヒドロゲナーゼ4

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
HyfA	NP_416976	Escherichia coli
HyfB	NP_416977	Escherichia coli
HyfC	NP_416978	Escherichia coli
HyfD	NP_416979	Escherichia coli
HyfE	NP_416980	Escherichia coli
HyfF	NP_416981	Escherichia coli
HyfG	NP_416982	Escherichia coli
HyfH	NP_416983	Escherichia coli
HyfI	NP_416984	Escherichia coli
HyfJ	NP_416985	Escherichia coli
HyfR	NP_416986	Escherichia coli

20

遺伝子がE.coliのhycおよび/またはhyf遺伝子と相同であるM.thermoaceticaにおけるタンパク質

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
Moth_2182	YP_431014	Moorella thermoacetica
Moth_2183	YP_431015	Moorella thermoacetica
Moth_2184	YP_431016	Moorella thermoacetica
Moth_2185	YP_431017	Moorella thermoacetica
Moth_2186	YP_431018	Moorella thermoacetica
Moth_2187	YP_431019	Moorella thermoacetica
Moth_2188	YP_431020	Moorella thermoacetica
Moth_2189	YP_431021	Moorella thermoacetica
Moth_2190	YP_431022	Moorella thermoacetica
Moth_2191	YP_431023	Moorella thermoacetica
Moth_2192	YP_431024	Moorella thermoacetica

30

40

【 0 2 2 7 】

【数 2 4】

M.thermoaceticaにおけるさらなるヒドロゲナーゼコード遺伝子クラスター

<u>タンパク質</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>	
Moth_0439	YP_429313	Moorella thermoacetica	
Moth_0440	YP_429314	Moorella thermoacetica	
Moth_0441	YP_429315	Moorella thermoacetica	
Moth_0442	YP_429316	Moorella thermoacetica	
Moth_0809	YP_429670	Moorella thermoacetica	
Moth_0810	YP_429671	Moorella thermoacetica	10
Moth_0811	YP_429672	Moorella thermoacetica	
Moth_0812	YP_429673	Moorella thermoacetica	
Moth_0813	(おそらく偽遺伝子、 GenBank ID入手不能)	Moorella thermoacetica	
Moth_0814	YP_429674	Moorella thermoacetica	
Moth_0815	YP_429675	Moorella thermoacetica	
Moth_0816	YP_429676	Moorella thermoacetica	
Moth_1193	YP_430050	Moorella thermoacetica	
Moth_1194	YP_430051	Moorella thermoacetica	20
Moth_1195	YP_430052	Moorella thermoacetica	
Moth_1196	YP_430053	Moorella thermoacetica	
Moth_1717	YP_430562	Moorella thermoacetica	
Moth_1718	YP_430563	Moorella thermoacetica	
Moth_1719	YP_430564	Moorella thermoacetica	
Moth_1883	YP_430726	Moorella thermoacetica	
Moth_1884	YP_430727	Moorella thermoacetica	
Moth_1885	YP_430728	Moorella thermoacetica	30
Moth_1886	YP_430729	Moorella thermoacetica	
Moth_1887	YP_430730	Moorella thermoacetica	
Moth_1888	YP_430731	Moorella thermoacetica	
Moth_1452	YP_430305	Moorella thermoacetica	
Moth_1453	YP_430306	Moorella thermoacetica	
Moth_1454	YP_430307	Moorella thermoacetica	

この実施例では、生物体を設計製作して合成ガスおよびメタノールからアセチルC o Aを生成するための例示的な遺伝子セットについて記載する。

【0 2 2 8】

40

(実施例 X I I)

生物体を設計製作して合成ガスおよびメタノールからアセチルC o Aを生成するための遺伝子およびコードされる酵素に関するクローニング、発現および活性のアッセイ

この実施例では、合成ガスおよびメタノールを利用する生物体をもたらす酵素をコードする遺伝子のクローニングおよび発現について記載する。

【0 2 2 9】

メタノール - メチルトランスフェラーゼ (M T R)。メタノールから M e - T H F を生成するための、少なくとも最小の遺伝子セット、例えば M t a A、M t a B、および M t a C をクローニングし、 E . c o l i 中で発現させる。これらの遺伝子はブルーフリーディング P C R によってクローニングし、抑制性 P A 1 - l a c O 1 プロモーターの制御下

50

での pZ E 2 2 - S などの高コピー数ベクターにおける発現用に一緒に連結させる (L u t z および B u j a r d、N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 巻、1 2 0 3 ~ 1 2 1 0 頁 (1 9 9 7 年))。これらのメチルトランスフェラーゼ活性は補因子としてコバリンを必要とするので、補酵素 B 1 2 を増殖培地に加える。クローニングした遺伝子は、構築および 3 遺伝子セットの発現ベクターへの挿入を実証するための P C R および / または制限酵素マッピングによって確認する。推定クローンの D N A 配列決定を実施して、それぞれの遺伝子の予想配列を確認する。確認後、0 . 0 5 m M と 1 m M の間の最終濃度でイソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシド (I P T G) 誘導剤を加えることによって、E . c o l i K - 1 2 (M G 1 6 5 5) 細胞中で最終構築物を発現させる。クローニングした遺伝子の発現は、全細胞抽出物の S D S - P A G E を使用してモニター 10 する。M t a A B C タンパク質の発現がメタノールからテトラヒドロ葉酸 (T H F) にメチル基を転移させる能力を E . c o l i にもたすかどうか決定するために、メタノールを様々な濃度で組換え株に供給し、その取込みをメチル - T H F 合成と共にモニターする。メチルトランスフェラーゼ系の活性は、M . t h e r m o a c e t i c a 中でのメチル供給源としてのパニレートに関して (N a i d u および R a g s d a l e、J . B a c t e r i o l . 1 8 3 巻、3 2 7 6 ~ 3 2 8 1 頁 (2 0 0 1 年))、または M e t h a n o s a r c i n a b a r k e r i のメタノールメチルトランスフェラーゼ (S a u e r r a、E u r . J . B i o c h e m . 2 4 3 巻、6 7 0 ~ 6 7 7 頁 (1 9 9 7 年)) ; T a l l a n t および K r z y c k i . J . B a c t e r i o l . 1 7 8 巻、1 2 9 5 ~ 1 3 0 1 頁 (1 9 9 6 年) ; T a l l a n t および K r z y c k i . J . B 20 a c t e r i o l . 1 7 9 巻、6 9 0 2 ~ 6 9 1 1 頁 (1 9 9 7 年) ; T a l l a n t ら、J . B i o l . C h e m . 2 7 6 巻、4 4 8 5 ~ 4 4 9 3 頁 (2 0 0 1 年)) に関して記載されたのと同様に嫌氣的にアッセイする。陽性対照用に、E . c o l i 細胞を並行して培養し、内因性メチルトランスフェラーゼ活性をモニターする。活性が外から加えた補酵素 B 1 2 に依存することが実証されると、E . c o l i 中でのメタノール : コリノイドメチルトランスフェラーゼ活性の発現が確認される。

【 0 2 3 0 】

アセチル C o A シンターゼ / 一酸化炭素デヒドロゲナーゼ (A C S / C O D H)。標準的な P C R 法を使用して、M . t h e r m o a c e t i c a、C . h y d r o g e n o f 30 o r m a n s、および M . a c e t i v o r a n s 由来の A C S / C O D H 活性に必要な不可欠な遺伝子をコードする全オペロンを、p Z A 3 3 - S (P 1 5 A ベース) または p Z S 1 3 - S (p S C 1 0 1 ベース) などの低または中コピー数ベクターに構築する。メチルトランスフェラーゼ遺伝子に関して記載したように、クローニングした遺伝子の構造および配列を確認する。必須金属 (N i、Z n、F e) を含み補酵素 B 1 2 を与えた厳密に嫌氣的な条件下で増殖させた全細胞の溶解産物のタンパク質ゲル電気泳動によって発現をモニターする。必要に応じて、遺伝子クラスターを、任意の明らかなターミネーターの同定および除去、および E . c o l i 中で有効であることが公知である部位から選択したコンセンサスリボソーム結合部位の導入によって、E . c o l i における発現用に改変する (B a r r i c k ら、N u c l e i c A c i d s R e s . 2 2 巻、1 2 8 7 ~ 1 2 9 5 頁 (1 9 9 4 年) ; R i n g q u i s t ら、M o l . M i c r o b i o l . 6 巻 40、1 2 1 9 ~ 1 2 2 9 (1 9 9 2 年))。しかしながら、それぞれの遺伝子クラスターは、その天然構造および発現と並行した形式でクローニングし発現させる。これは、その大部分が互いに相互作用する様々な遺伝子産物間の、望ましい化学量論を確実にするのを助ける。嫌氣的条件下での C O D H / A C S 遺伝子クラスターの満足のいく発現を得た後、これらの遺伝子を発現して C O および / または C O ₂ を細胞の炭素に固定する細胞の能力をアッセイする。初期条件は、炭素源としておよびエネルギー源として外因性グルコースを与え、基質レベルのリン酸化または電子受容体としてのニトレートを用いる嫌氣的呼吸を介して厳密に嫌氣的に増殖させた細胞を利用する。さらに、外から与えた C H ₃ - T H F を培地に加える。

【 0 2 3 1 】

10

20

30

40

50

MTRおよびACS/CODH経路とを組み合わせた活性のアッセイ。実施例II中に記載したACS/CODH遺伝子をクローニングし、実施例II中でも記載したメタノール-メチルトランスフェラーゼ系も発現する細胞中で発現させる。MTR発現細胞中へのACS/CODHを発現する適合性プラスミドの導入によって、これを実施する。長期安定性を追加するために、ACS/CODHおよびMTR遺伝子を染色体中に組み込むこともできる。メタノールを利用してMe-THFを生成することができ、かつ活性なCODH/ACS遺伝子を発現することができるE.coli株を作製した後、メタノールおよび合成ガスの両方を利用して細胞集団およびアセテートに取込む能力に関してそれらをアッセイする。初期条件は、炭素源およびエネルギー源として外因性グルコースを与えて厳密に嫌氣的に増殖させた細胞を利用する。あるいは、または、グルコースの添加に加えて、ニトレートを発酵プロスに加えて、電子受容体および増殖の開始剤として働かせることが可能である。最終的にアセチルCoAに代謝される脂肪酸でのE.coliの嫌氣的増殖は、ニトレートの存在下で実証されている(Campbellら、Mol. Microbiol. 47巻、793~805頁(2003年))。ニトレートなどの電子受容体の存在下で微生物の生物体を培養することによる、同様の条件を利用することができる。その細胞内レベルが設計製作した酵素の任意の阻害閾値未満に維持される限り、酸素を提供することもできる。これらの実験に適した組成の「合成による合成ガス」をメタノールと共に利用する。¹³C標識メタノールまたは¹³C標識COを細胞に提供し、質量分析法を利用して、アセテートおよび細胞集団への標識炭素の取込み、例えばタンパク質性アミノ酸を測定する。

10

20

30

40

50

【0232】

ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ。M.thermoacetica、D.africanus、およびE.coliのピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ遺伝子をクローニングし、MTRおよびACS/CODH活性を示す株中で発現させる。条件、プロモーターなどは前に記載されている。PFOR遺伝子の大きなサイズおよび対応する酵素の酸素感受性を考慮して、低または単コピーのプラスミドベクターの使用または単コピーの染色体への組込みを使用して試験を実施する。(FurduiおよびRagsdale、J. Biol. Chem. 275巻、28494~28499頁(2000年)中に記載されたのと同様の)活性のアッセイを適用して活性を実証する。さらに、外部電子受容体の不在下でのガス状炭素源およびメタノールでの増殖の実証は、in vivoでのPFOR活性のさらなる証拠をもたらす。

【0233】

ヒドロゲナーゼ。宿主生物体の内因性水素を利用するヒドロゲナーゼ活性を、水素の存在および不在下で前に記載したように細胞を増殖させることによって試験する。発酵中により還元された生成物の形成への劇的な変化を観察する場合(例えば、アセテートに対して増加したエタノール)、これは内因性ヒドロゲナーゼ活性が十分活性であることを示す。この場合、異種ヒドロゲナーゼはクローニングおよび発現されない。天然酵素が十分な活性を有していない、または必要とされる受容体を還元しない場合、個々のヒドロゲナーゼ複合体をコードする遺伝子をクローニングし、MTR、ACS/CODH、およびPFOR活性を示す株中で発現させる。条件、プロモーターなどは前に記載されている。

【0234】

この実施例では、合成ガスおよびメタノール利用経路をもたらす遺伝子のクローニングおよび発現、および適切な活性のアッセイについて記載する。

【0235】

(実施例XIII)

合成ガスおよびメタノールを利用するように設計製作した生物体からアセチルCoAを生成するための発酵プロセスの開発および最適化

この実施例では、合成ガスおよびメタノールを利用する生物体の発酵条件の開発および最適化について記載する。

【0236】

合成ガス発酵で重要なプロセスの考慮事項は、高いバイオマス濃度および良好なガス-液物質移動である (Bredwellら、*Biototechnol. Prog.*、15巻、834~844頁(1999年))。水中のCOの溶解度は、酸素の溶解度よりいくぶん低い。連続ガススパージ発酵は、制御された発酵槽中で質量分析による常時のオフガス分析ならびに定期的な液体サンプリングとGCおよびHPLCによる分析により行うことができる。液相は、バッチモードで機能し得る。アルコール、有機酸、および残留グルコース、ならびに残留メタノールなどの発酵産物は、HPLC (Shimadzu、Columbia MD) によって、例えばAminex (登録商標) シリーズのHPLCカラム (例えばHPX-87系) (BioRad、Hercules CA) を使用し、グルコースおよびアルコールに対して屈折率検出器を、そして有機酸に対してUV検出器を使用して定量化する。増殖速度は分光光度計を使用して光学密度 (600nm) を測定することにより決定する。これらのシステムにおける全ての配管は、嫌氣的条件を維持するためにガラスまたは金属である。ガスのスパージは、気泡径を減少させ、物質移動を改善するためにガラスフリットを用いて行う。約0.1~1vvm (1分当たりの蒸気容積) の範囲の種々のスパージ速度を試験する。ガスの取込み速度の正確な測定値を得るために、ガスの流れを一時的に止める定期的なチャレンジを行い、ガス相の組成を時間の関数としてモニターする。

10

【0237】

総括的な目標生産性を達成するために、細胞保持またはリサイクルの方法を用いる。微生物の生物体の濃度を増加させる1つの方法は、タンジェンシャルフロー膜を介して側流から細胞をリサイクルすることである。Moorellaによるアセテートの生成について以前に記載されたように (Sakaiら、*J. Biosci. Bioeng.*、99巻、252~258頁(2005年))、反復バッチ式培養も用いることができる。他の種々の方法も用いることができる (Bredwellら、*Biototechnol. Prog.*、15巻、834~844頁(1999年); Datarら、*Biototechnol. Bioeng.*、86巻、587~594頁(2004年))。物質移動を改善するために、1.5気圧の超過圧力などのさらなる最適化も試験することができる (NajafpourおよびYounesi、*Enzyme and Microbial Technology*、38巻、223~228頁(2006年))。

20

【0238】

フィードとして純粋なH₂/COを用いて満足のいく成績が達成されたならば、商用合成ガス中に存在する可能性が高い阻害物質を含む合成ガス混合物を発生させる。例えば、典型的な不純物プロファイルは、4.5%CH₄、0.1%C₂H₂、0.35%C₂H₆、1.4%C₂H₄および150ppmの一酸化窒素である (Datarら、*Biototechnol. Bioeng.*、86巻、587~594頁(2004年))。ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、p-キシレン、o-キシレンおよびナフタレンなどの化合物に代表されるタールは、生成に対する影響の有無を試験するためにppmレベルで加える。例えば、40ppmのNOはC. carboxidivoransに対して阻害性であることが示されている (AhmedおよびLewis、*Biototechnol. Bioeng.*、97巻、1080~1086頁(2007年))。培養物は、発酵槽に移す前に振とうフラスコ培養物中で試験する。また、異なるレベルのこれらの潜在的阻害性化合物を試験して、それらが細胞増殖に及ぼす影響を定量化する。この知識を用いて、スケールアップ試験および生産のために用いられる合成ガス純度に関する仕様を策定する。特定の成分がスケールアップに用いる合成ガスから減少させるかまたは除去することが困難であることがわかった場合、1つまたは複数の不純物に耐えるように細胞を適応させるために、適応進化法を利用する。

30

40

【0239】

この実施例では、合成ガスおよびメタノールを利用する生物体の発酵条件の開発および最適化について記載する。

【0240】

50

(実施例 X I V)

C Oおよび嫌気性培養物を取り扱うための方法

この実施例では、C Oおよび嫌気性培養物を取り扱うための方法について記載する。

【0241】

アッセイ用の少量のC Oおよび少量の培養物の取扱い。C Oは、毒性である無臭、無色および無味の気体である。したがって、C Oを利用する培養物およびアッセイは特別な取扱いを必要とし得る。C O酸化、アセチルC o A合成、ミオグロビンを使用するC O濃度、および少量のバッチ培養物中のC O耐性/利用を含めた、いくつかのアッセイは、換気フード内で分注し取り扱うことができる少量のC O気体を必要とする。生化学的アッセイは、非常に少量 (< 2 m l) の生化学的アッセイ用培地またはバッファーをC Oで飽和し、次いでアッセイを実施することを必要とした。C Oを取り扱う段階の全てを、適切な高さでサッシセットを有し送風機のスイッチを入れた換気フード内で実施し、C Oはシュレンクラインと結合した圧縮気体シリンダーおよびレギュレーターから分注した。後者は、等しい濃度のC Oがいくつかの考えられるキュベットまたはバイアルのそれぞれに分注されることを確実にする。インプット側に酸素スクラバー、および反対側に油圧放出バブラーおよび通気口を含有する、シュレンクラインを設定した。あるいは、冷却トラップを使用することができる。アッセイ用キュベットは嫌気性とC O含有の両方であった。したがって、アッセイ用キュベットはゴム栓でしっかりと密閉し、気密性ニードルおよびシリンジを使用して試薬を添加または除去した。第2に、少量 (約50 m l) の培養物を、しっかりと密閉した血清容器中において飽和C Oで増殖させた。生化学的アッセイと同様に、C O飽和微生物培養物を、シュレンクラインの設定を使用して換気フード内で平衡状態にした。生化学的アッセイと微生物培養物の両方がポータブルな密閉容器中であり、かつ少量であり、これにより換気フードの外側での安全な取扱いを可能にした。圧縮C Oタンクは換気フードと隣接していた。

10

20

【0242】

典型的には、シュレンクラインを使用してC Oをキュベットに分注し、それぞれに通気口を設けた。キュベット上のゴム栓は19または20ゲージの使い捨て注射針で穴を開け、同様に通気口を設ける。油圧バブラー (oil bubbler) をC Oタンクおよび酸素スクラバーと共に使用する。ガラス製または石英製の分光光度計用キュベットは上部に丸穴を有し、その中にK o n t e s ストッパースリーブ、S z 7 7 7 4 2 5 0 - 0 0 0 7 を適合させた。C O検出器ユニットは換気フードの近くに配置した。

30

【0243】

大規模培養物に供給する多量のC Oの取扱い。発酵培養物にC OまたはC OとH₂の混合物のいずれかを供給して、発酵生産中の合成ガスまたはフィードストックとしての合成ガスをシミュレートする。したがって、1リットルから数リットルの範囲の量の細胞が、培地中のC Oの溶解濃度を増大するためのC O気体の添加を含み得る。これらの状況では、非常に多くの連続投与される量のC O気体を培養物に加える。異なる時点において、培養物を採取し、またはサンプルを除去する。あるいは、発酵槽の一部である組み込んだ連続流遠心分離機を用いて細胞を採取することができる。

40

【0244】

発酵プロセスは嫌气的条件下において一般的に実施する。いくつかの場合、酸素または空気を発酵槽中にポンプで注入して、呼吸環境を与えるのに適した酸素飽和状態を確実にすることは経済的ではない。さらに、嫌气的発酵中に生じる還元力は、呼吸よりも生成物の形成において必要とされる可能性がある。さらに、様々な経路に考えられる酵素の多くは、様々な程度で酸素感受性である。M . t h e r m o a c e t i c a などの古典的なアセテート生成菌は偏性嫌気性菌であり、W o o d - L j u n g d a h l 経路中の酵素は分子状酸素による不可逆的失活に対して非常に感受性がある。酸素耐性アセテート生成菌が存在する一方で、W o o d - L j u n g d a h l 経路中の酵素のレパートリーは、大部分が金属酵素であり、重要な構成要素はフェレドキシンであり、制御は代謝をW o o d - L j u n g d a h l 経路から逸脱させてエネルギー入手を最大にする可能性があるので、酸

50

素の存在下でいずれも問題を有する可能性がある。同時に、培養中の細胞は酸素スカベンジャーとして働くことができ、これらは大規模な細胞増殖の存在下での非常手段の必要性を抑える。

【0245】

嫌氣的チャンパーおよび条件。例示的な嫌氣的チャンパーは市販されている（例えば、Vacuum Atmospheres Company、Hawthorne CA；MBraun、Newburyport MAを参照）。例示的な条件は、1 ppm以下の O_2 濃度および1 atmの純粋 N_2 を含む。一例では、3 酸素スクラバー/触媒再生器を使用することができ、チャンパーは O_2 電極を含むことができる（Teledyneなど；City of Industry CA）。ほぼ全てのアイテムおよび試薬を、内側チャンバードアを開く前にチャンパーのエアロック中で4回（4X）循環させる。5 mlを超える体積を有する試薬を、チャンパーへの導入前に純粋 N_2 でスパージする。グローブは1年で約2回とりかえ、チャンパーが酸素レベルの変化に対して次第に緩慢な応答を示すとき、触媒容器は定期的に再生する。チャンパーの圧力はソレノイドにより活性化される一方向バルブによって制御する。それによって周囲より高いレベルにチャンパー圧を設定することができ、パージバルブによる非常に小さなチューブの移動を可能にするので、この特徴は非常に好都合である。

10

【0246】

嫌氣的チャンパーは、絶えず非常に低く高度に酸素感受性である嫌氣的条件に必要とされる、到達可能な O_2 のレベルを得ることができる。しかしながら、細胞の増殖および取扱いは通常このような予防措置を必要としない。代替の嫌氣的チャンパーの構成では、混合中にいくらかの水素ガスを必要とする触媒として、プラチナまたはパラジウムを使用することができる。ソレノイドバルブを使用する代わりに、圧力放出はバブラーによって制御する。機器ベースの O_2 モニタリングを使用する代わりに、試験用ストリップを代わりに使用することができる。嫌氣的条件を改善するために、本発明者らのシステム中にいくつかの比較的簡単な変化を施すことができ、いくつかは既に進行中である。

20

【0247】

嫌気性微生物学。COの取扱いに関して前に記載したように少量の培養物を取り扱う。特に、血清容器または培地容器に厚いゴム栓を取り付け、アルミニウム製クリンプを使用して容器を密閉する。Terrific Brothなどの培地を従来の方法で作製し、適切にサイズ分けした血清容器に分注する。容器には適度なバブリングで約30分間窒素をスパージする。これは培地から大部分の酸素を除去し、この段階の後、それぞれの容器にゴム栓でキャップし（Bellcoの20 mmセプタムストッパーなど；Bellco、Vineland、NJ）、クリンプで密閉する（Bellcoの20 mm）。次いで培地容器を、緩慢な（液体）排出サイクルを使用してオートクレーブにかける。少なくとも時折、ストッパーを介して針を突き刺しオートクレーブ中に排出をもたらすことができ、オートクレーブからの除去時に針はすぐに除去する必要がある。滅菌培地は、シリンジおよび針を介して加えた残存培地成分、例えばバッファーまたは抗生物質を有する。還元剤を加える前に、容器は窒素（または用途に応じてCO）を用いて30～60分間平衡状態にする。100×150 mMの硫化ナトリウム、200 mMのシステイン-HClなどの還元剤を加えることができる。これは、硫化ナトリウムを乾燥ビーカー中に計量し、システインを血清容器中に計量し、両方を嫌氣的チャンパーに入れ、硫化ナトリウムを嫌気水に溶かし、次いでこれを血清容器中のシステインに加えることによって行った。硫化ナトリウム溶液はシステインとの接触によって硫化水素ガスを発生するので、容器はすぐに密閉するべきである。培養物に注入するとき、シリンジフィルターを使用して溶液を滅菌する。B12（10 μMのシアノコバラミン）、塩化ニッケル（NiCl₂、チャンパー内の嫌気水中で作製した40 mMストックからの20 マイクロモルの最終濃度、かつオートクレーブ処理によって、または培養物への注入時のシリンジフィルターの使用によって滅菌済み）、および硫酸第一鉄アンモニウム（必要とされる最終濃度は100 μMである - チャンパー内の嫌気水中で100～1000×ストック溶液として作製、かつオートク

30

40

50

レーブ処理によって、または培養物への注入時のシリンジフィルターの使用によって滅菌済み)などの、他の成分を注射針を介して加えることができる。嫌気的条件下でのより速い増殖を容易にするために、1リットル容器に嫌気的に増殖した50mlの前培養物を接種した。ベクターにおけるpA1-lacO1プロモーターの誘導は、0.2mMの最終濃度までイソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を加えることによって実施し、約3時間実施した。

【0248】

バブリングしながら連続的な気体の添加を使用して、大容器中で多量の培養物を増殖させることができる。金属製パプラーを備えるゴム栓を培地添加後に容器中に置き、容器の残り部分をセットアップする前に30分以上窒素をスパーズする。滅菌フィルターが容器内で気泡化する気体を滅菌し、容器上のホースが小型Cクランプで圧縮可能であるように、それぞれの容器を一緒に置く。培地および細胞は磁気攪拌バーで攪拌する。全ての培地成分および細胞を加えた後、容器を室内空気中においてインキュベーター中でインキュベートすることはできるが、容器中には連続的に窒素をスパーズする。

10

【0249】

この実施例では、COおよび嫌気性培養物の取扱いについて記載する。

【0250】

(実施例XV)

CO酸化(CODH)アッセイ

この実施例では、CO酸化(COデヒドロゲナーゼ; CODH)を測定するためのアッセイ法について記載する。

20

【0251】

*Moorella thermoacetica*の7遺伝子CODH/ACSオペロンを*E. coli*発現ベクターにクローニングした。完全な約10kbpのDNA断片をクローニングしたが、この領域中の遺伝子のいくつかはそれら独自の内因性プロモーターから発現され、全てが内因性リボソーム結合部位を含有する可能性がある。*M. thermoacetica*はグラム陽性菌であり、リボソーム結合部位のエLEMENTは*E. coli*中でよく働くと予想される。CODH活性を定量的に測定するアッセイを使用して、これらのクローンをCO酸化に関してアッセイした。*M. thermoacetica*の遺伝子産物に対する抗血清をウエスタンブロットに使用して、比活性を推定した。以下でより詳細に記載するこの活性は、*M. thermoacetica*の比活性の約50分の1であると推定した。

30

【0252】

組換え*E. coli*細胞のCODH活性は、*M. thermoacetica*の酵素が55近辺で温度最適性を有するという事実によって制限される可能性があると考えられる。したがって、中温性であり明らかに完全なCODH/ACSオペロンおよびWood-Ljungdahl経路を有する*Moorella*の近縁、*Desulfitobacterium hafniense*などの中温性CODH/ACS経路が有利である可能性がある。考えられる宿主生物体としてのアセテート生成菌には、*Rhodospirillum rubrum*、*Moorella thermoacetica*および*Desulfitobacterium hafniense*があるが、これらだけには限られない。

40

【0253】

CO酸化は、CODH/ACSアッセイの最も感度が高くかつ最も確実な酸化である。*E. coli*ベースの合成ガスを使用する系は、特に最大活性に関して、クロストリジウム属(すなわち、*Moorella*)系と同程度に嫌気的であることを最終的に必要とする可能性がある。CODHの改善は実行できるはずであるが、最終的には水中でのCOガスの溶解性によって制限される。

【0254】

最初に、遺伝子のそれぞれを発現ベクターに個別にクローニングした。複数のサブユニ

50

ット / 1 複合体の組合せ発現単位を作製した。タンパク質レベルでの *E. coli* 中での発現を決定した。組合せた *M. thermoacetica* CODH / ACS オペロンと個別の発現クローンの両方を作製した。

【 0 2 5 5 】

CO 酸化アッセイ。このアッセイは Wood - Ljungdahl 経路内の酵素活性のうち、より簡潔で、より信頼できる、より用途が広いアッセイの 1 つであり、CODH を試験する (Seravalli ら、Biochemistry 43 巻、3944 ~ 3955 頁 (2004 年))。 *M. thermoacetica* の CODH の比活性の典型的な活性は、55 での 500 U または 25 での約 60 U である。このアッセイは、CO の存在下でのメチルピオローゲンの還元を利用する。これはストッパー付き、嫌気性の、ガラス製キュベット中において 578 nm で測定する。

10

【 0 2 5 6 】

より詳細には、最初に脱イオン水で 4 回、およびアセトンで 1 回キュベットを洗浄した後、ガラス製のゴム栓付きキュベットを調製した。少量の真空グリースをラバーガスケットの上部に塗った。キュベットに CO ガスを与え、22 Ga. ニードルおよび排気用ニードルで 10 分間乾燥させた。0.98 ml 体積の反応バッファー (50 mM の Heps、pH 8.5、2 mM のジチオスレイトール (DTT)) を、排気用ニードルをつけて、22 Ga. ニードルを使用して加え、そして 100% CO を加えた。メチルピオローゲン (CH₃ ピオローゲン) ストックは水中に 1 M であった。それぞれのアッセイは、20 mM の最終濃度で 20 マイクロリットルを使用した。メチルピオローゲンを加えたとき、18 Ga. ニードル (一部分) は CH₃ ピオローゲンを引き出すためのハミルトンシリンジの使用を容易にするためのジャケットとして使用した。4 ~ 5 のアリコート調製し、廃棄して洗浄し、ガスでシリンジを平衡化した。CH₃ ピオローゲンストックを作製して CH₃ ピオローゲンをわずかに還元したとき、少量の亜ジチオン酸ナトリウム (0.1 M ストック) を加えた。温度は加温した Ols 分光光度計 (Bogart GA) 中で 55 に平衡化した。ブランク反応 (CH₃ ピオローゲン + バッファー) を最初に実施して、CH₃ ピオローゲン還元の基本速度を測定した。ACS 90 および ACS 91 (それぞれ第 1 の cooC 有りおよび無し) の *M. thermoacetica* の CODH - ACS オペロン) の粗製 *E. coli* 細胞抽出物。10 マイクロリットルの抽出物を一度に加え、混合しアッセイした。還元 CH₃ ピオローゲンは紫色になる。アッセイの結果は表 X 中に示す。

20

30

【 0 2 5 7 】

【表 2】

表2. 粗製抽出物のCO酸化活性

ACS90	7.7 mg/ml	ACS91	11.8 mg/ml
Mta98	9.8 mg/ml	Mta99	11.2 mg/ml

抽出物	体積	OD/	U/ml	U/mg
ACS90	10 マイクロリットル	0.073	0.376	0.049
ACS91	10 マイクロリットル	0.096	0.494	0.042
Mta99	10 マイクロリットル	0.0031	0.016	0.0014
ACS90	10 マイクロリットル	0.099	0.51	0.066
Mta99	25 マイクロリットル	0.012	0.025	0.0022
ACS91	25 マイクロリットル	0.215	0.443	0.037
Mta98	25 マイクロリットル	0.019	0.039	0.004
ACS91	10 マイクロリットル	0.129	0.66	0.056

平均

ACS90	0.057 U/mg
ACS91	0.045 U/mg
Mta99	0.0018 U/mg

10

20

Mta98 / Mta99 は、M. thermoacetica 由来のメチルトランスフェラーゼ遺伝子を発現する E. coli MG1655 株であり、したがって、M. thermoacetica の CODH オペロンを含有する ACS90 ACS91 E. coli 株の陰性対照である。

【0258】

約 1% の細胞タンパク質が CODH である場合、これらの数字は、純粋な M. thermoacetica の CODH の 500 U/mg 活性より約 100 倍低いことになる。ウエスタンブロットに基づく実際の推定値は 0.5% の細胞タンパク質であり、したがって活性は、M. thermoacetica の CODH の活性より約 50 倍低い。それにもかかわらず、この実験は、陰性対照における一層少ない量での組換え E. coli 中での CO の酸化活性を明らかに実証した。陰性対照において見られた少量の CO の酸化 (CH₃ ビオローゲンの還元) は、E. coli が CH₃ ビオローゲンを還元する限られた能力を有し得ることを示す。

30

40

【0259】

CODH および Mtr タンパク質の最終濃度を推定するために、SDS-PAGE、次にウエスタンブロット分析を、CO 酸化、ACS、メチルトランスフェラーゼ、およびコリノイド Fe-S アッセイにおいて使用した同じ細胞抽出物に実施した。使用した抗血清は精製された M. thermoacetica の CODH-ACS および Mtr タンパク質に対するポリクローナル抗血清であり、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギ二次抗体を使用して視覚化した。ウエスタンブロット分析を実施し、結果を図 9A および 9B に示す。ACS90 および ACS91 中の CODH の量は、対照レーンとの比較によって 50 ng であると推定した。2 CODH サブユニットおよびメチルトランスフェラーゼを含む CODH-ACS オペロン遺伝子の発現は、ウエスタンブロット分析によって確認した。したがって、組換え E. coli 細胞は 7 遺伝子オペロンの複数の成分を発現する。さらに、メチルトランスフェラーゼとコリノイド鉄硫黄タンパク質の両方が同じ組換え E. coli 細胞中で活性があった。これらのタンパク質は、同じ細胞にクローニングした同じオペロンの一部分である。

【0260】

CO 酸化アッセイを、陽性対照の Moorella thermoacetica 細胞の抽出物を使用して繰り返した。E. coli ACS90 および ACS91 中の CODH

50

活性は測定可能であったが、それは *M. thermoacetica* 対照より約 130 ~ 150 倍低かった。アッセイの結果は図 10 中に示す。簡単に述べると、細胞 (*CODH* / *ACS* オペロンを有する *M. thermoacetica* または *E. coli*、*ACS90* または *ACS91* または空ベクター: *pZA33S*) を増殖させ、抽出物を前に記載したように調製した。抽出物を調製した日に、様々な時間で 55 において前に記載したようにアッセイを実施した。メチルピオローゲンの還元は 120 秒間にわたるタイムコースで 578 nm において追跡した。

【0261】

これらの結果は、CO 酸化 (*CODH*) アッセイおよび結果について記載する。メチルピオローゲン還元アッセイにより測定して、組換え *E. coli* 細胞は CO 酸化活性を発現した。

10

【0262】

(実施例 XVI)

アセチル CoA シンターゼ (*ACS*) の活性アッセイ (CO 交換アッセイ)

この実施例では、*ACS* のアッセイ法について記載する。

【0263】

このアッセイは、CO とアセチル CoA のカルボニル基の *ACS* 触媒型交換を測定する (*Raybuck* ら、*Biochemistry* 27 巻、7698 ~ 7702 頁 (1988 年))。(精製酵素または細胞抽出物の一部のいずれかとしての) *ACS* を、CO 雰囲気下でカルボニル炭素において ^{14}C で標識したアセチル CoA と共にインキュベートする。活性 *ACS* の存在下において、反応物の液体相中の放射活性は、それが ^{14}C 標識アセチル CoA と ^{14}C 標識 CO のレベル間の平衡により定義される最小値に達するまで、指数関数的に低減する。*ACS90* および *ACS91* を発現する *E. coli* *MG1655* の同じ細胞抽出物は他のアッセイで利用し、かつ対照抽出物はこの方法によってアッセイした。

20

【0264】

簡単に述べると、より詳細には、正常雰囲気下で小さなアッセイ用バイアル中に、0.3 M の *MES* バッファー、pH 6.0 中の 0.2 mM アセチル CoA、0.1 mM メチルピオローゲン、および 2 mM *Ti* (*III*) シトレート の溶液を作製した。全成分を加えたときの合計反応物体積は 500 μl であった。バイアルはゴム栓 (*Bellco*) およびクリンパルミニウムシール (*Bellco*) で密閉して、気密性の反応雰囲気をもたらした。それぞれのバイアルに 100% CO を数分間、バイアルの雰囲気を完全に交換するほど十分長くスパージし、嫌氣的チャンバーに移した。アッセイ用バイアルは 55 の砂浴中に置き、その温度に平衡化した。40 μl の 1 M の *HCl* を含む合計 10 個のシンチレーションバイアルを、それぞれのアッセイ用バイアルに関して調製した。気密性のハミルトンシリンジを使用して *ACS* をアッセイ用バイアルに加え、約 2 ~ 3 分間インキュベートして反応を平衡状態に近づけた。気密性のハミルトンシリンジを使用して 1 μl (0.36 nmol) の ^{14}C アセチル CoA を加え、アッセイを開始した (時間 = 0 分)。開始して直ちに時点 (*time point*) をとった。気密性のハミルトンシリンジを用いて、アッセイ用バイアルからサンプル (40 μl) を除去した。調製したシンチレーションバイアル中の 40 μl の *HCl* にそれぞれのサンプルを加えて、反応をクエンチした。*ACS* 酵素はアセチル CoA から CO に ^{14}C 標識を移すので、アイソトープの濃度は指数関数的に低下する。したがって、アッセイでは初期の時点で頻りにサンプル採取した。それぞれのサンプルに関する正確な時間を記録した。反応の正確なペースは *ACS* 酵素に依存するが、一般に数個のサンプルをすぐに得て、最初の 10 ~ 15 分にわたってサンプル採取する。サンプルは 1 ~ 2 時間採取し続ける。

30

40

【0265】

特定の例示的なアッセイでは、4つのアッセイ条件、ブランク (*ACS* 含まず)、*M. thermoacetica* の *ACS* を発現する 12 μl の精製 *E. coli* 株、4 μl の精製 *E. coli ACS*、および 3.7 μl の *M. thermoacetica COD*

50

H / A C S を使用した。別の例示的なアッセイでは、4つのアッセイ条件、108 μ g の C O D H / A C S、1mg の M t a 9 9 細胞抽出物、1mg の A C S 9 0 細胞抽出物、および1mg の A C S 9 1 細胞抽出物を使用した。酵素は100 μ l 溶液(50mMのK P i、0.1MのN a C l、pH7.6)として加えた。大部分のC O D H - A C S 活性に使用することができるより高感度なアッセイは、以下に記載する合成アッセイである。

【0266】

この実施例では、A C S 活性を測定するためのアッセイ条件について記載する。

【0267】

(実施例X V I I)

アセチルC o A の合成およびメチルトランスフェラーゼアッセイ

この実施例では、アセチルC o A の合成およびメチルトランスフェラーゼアッセイについて記載する。

【0268】

合成アッセイ。このアッセイは、C O D H / A C S、メチルトランスフェラーゼ(M e T r)、およびコリノイドF e - S タンパク質(C F e S P)を使用して、メチルテトラヒドロ葉酸、C O、およびC o A からアセチルC o A を合成する *in vitro* 反応である(R a y b u c k ら、B i o c h e m i s t r y 27巻、7698~7702頁(1988年))。関与するそれぞれの酵素を添加または除外することによって、このアッセイは、活性に関する、1つまたは複数の精製酵素または細胞抽出物の試験から、様々な条件下または限られた量の基質または酵素を用いた反応のキネティクスの決定まで、広範囲の実験に使用することができる。様々な時点で得た反応のサンプルを1MのH C l でクエンチし、これによってアセテートをアセチルC o A の最終産物から切り離す。D o w e x カラムでの精製後、クロマトグラフィー、質量分析によって、または放射活性の測定によってアセテートを分析することができる。正確な方法は、反応物中で使用する特異的基質によって決定される。

【0269】

¹⁴C 標識メチルT H F を利用して、単離したアセテートサンプルの放射活性を測定した。主な目的はC F e S P サブユニットを試験することであった。このアッセイは+/- 精製メチルトランスフェラーゼ酵素も含んでいた。以下の6つの異なる条件、(1)陽性対照として、精製C O D H / A C S、M e T r、およびC F e S P、(2)精製C O D H / A C S およびA C S 9 0 細胞抽出物、(3)精製C O D H / A C S およびA C S 9 1 細胞抽出物、(4)精製C O D H / A C S、M e T r およびA C S 9 0 細胞抽出物、(5)精製C O D H / A C S、M e T r およびA C S 9 1 細胞抽出物、(6)精製C O D H / A C S、M e T r および可能な限り多くのA C S 9 1 細胞抽出物(M E S バッファー除く)をアッセイした。

【0270】

C O を充填したアッセイ用バイアル中嫌氣的チャンパー中で反応物を構築する。合計反応物体積はバイアル体積と比較して小さく、したがって、気密性のハミルトンシリンジを使用し試薬を嫌氣性に保つ限り、バイアルをC O で充填する前後に試薬を加えることができる。反応物(合計約60 μ l)は、細胞抽出物(アッセイ番号1以外)、C o A、T i (I I I) シトレート、M E S (アッセイ番号6以外)、精製C O D H / A C S、¹⁴C メチルテトラヒドロ葉酸、メチルピオロゲン、およびフェレドキシンからなっていた。さらに、精製M e T r をアッセイ番号1および番号4~6に加え、かつ精製C F e S P をアッセイ番号1に加えた。

【0271】

55 での砂浴中の嫌氣的チャンパーにおいて反応を実施した。加えた最終試薬は¹⁴C メチルテトラヒドロ葉酸であり、これによって反応を開始した(t = 0秒)。初期サンプルをすぐに採取し、次に30分、1時間、および2時間でサンプルを採取した。6つの条件は同時に実施したので(この実験は主に定性実験であったので)、これらの時点は正確ではない。シンチレーションバイアル中の15 μ lの1M H C l に15 μ lのサンプル

10

20

30

40

50

ルを加えた。最終サンプルに関して、15 μ l未満が反応物中に残った場合、アッセイ用バイアルは15 μ lのHClですすいで、反応物の残りを得た。10 μ l体積の細胞抽出物をアッセイ番号2~5に使用し、かつ26.4 μ l体積の細胞抽出物をアッセイ番号6に使用した。

【0272】

アッセイ中で使用する精製酵素の典型的な量は以下の通りである：CODH / ACS = 約0.2 nmole、MeTr = 0.2 nmole、CFeSP = 0.05 nmole。以下のような典型的なアッセイ濃度を使用する：CODH / ACS = 1 μ M、Me - CF e S P = 0.4 μ M、MeTr = 1 μ M、フェレドキシン = 3 μ M、CoA = 0.26 mM、¹⁴Cメチル - THF = 0.4 mM、メチルピオロゲン = 0.1 mM、およびTi (III)シトレート = 3 mM。

10

【0273】

反応混合物を計数した後、ACS90抽出物中のコリノイドFe - Sタンパク質は活性があり、全体活性は陽性対照の約1/5に近づき、陰性対照(抽出物含まず)を有意に超えたと決定した。

【0274】

非放射性合成アッセイを使用することもできる。任意選択の非放射性アッセイ条件は以下の通りである：アッセイ条件番号1：100 mMのMES、pH 6.0、1 mMのCoA、1 mMのMe - THF、0.33 mM Ti (III)シトレート、950 μ lまでの体積、+ 50 μ lの抽出物、55 でCO雰囲気(対照に関してAr)下でインキュベートした。コリノイドメチル担体は光感受性であるので、これらの反応は暗所で実施すべきである。アッセイ条件番号2：100 mMのMES、pH 6.0、1 mMのCoA、1 mMのMe - THF、1 mMのメチルピオロゲン、950 μ lまでの体積、+ 50 μ lの抽出物、暗所中55 での、CO雰囲気下でインキュベートした。反応は10 μ lの10%ギ酸でクエンチし、サンプルは1時間、3時間、および6.5時間で採取し、- 20 で保存した。アッセイ条件番号3：100 mMのTris、pH 7.6、5 mM CoA、7.5 mMのMe - THF、1 mMのMe - ピオロゲン、90 μ lまでの体積、+ 10 μ lの抽出物、1時間暗所中55 での、COまたはAr下でインキュベートし、10 μ lの10%ギ酸でクエンチし、- 20 で保存した。

20

【0275】

Luら(J. Biol. Chem. 265巻、3124~3133頁(1990年))では、合成反応に関するpH最適条件は7.2と7.5の間であることがわかった。Luらは、10 mMを超えるCoA濃度は阻害的であったことも発見した。LuらはMe - THFの代わりにメチルドナーとしてのヨウ化メチルの使用を記載し、5~7.5 mMの濃度を使用した。LuらはDTTまたは他の還元剤が必要ではなかったことも決定したが、彼らは電子伝達体としてフェレドキシンを使用した。メチルピオロゲンは前に記載した反応中で置換された。さらに、Maynardら、J. Biol. Inorg. Chem. 9巻、316~322頁(2004年)は、電子伝達体は厳密には必要ではなかったが、それを含まないと合成のタイムラグをもたらしたことを決定した。Maynardらは、使用のときに電子伝達体として1 mMのメチルピオロゲンを使用した。

30

40

【0276】

メチルトランスフェラーゼアッセイ。CODH - ACSオペロン内には、アセチルCoAの合成の一部としてメチルテトラヒドロ葉酸からACS複合体へのCH₃の移動を触媒する、必須のメチルトランスフェラーゼ活性がコードされている。これはメチル経路とカルボニル経路が合流する段階である。M. thermoaceticaのオペロン内では、Mtrコード遺伝子はMoth_1197であり、主要なCODHサブユニットおよびACSサブユニットの後に来る。したがってMtr活性は、より近隣の遺伝子が発現され得るという間接的な証拠を構成するであろう。

【0277】

50

M t r の活性は分光法によってアッセイした。具体的には、C o (I I I) を含むメチル化 C F e S P は約 4 5 0 n m で小さな吸収ピークを有し、一方 C o (I) を含む非メチル化 C F e S P は約 3 9 0 n m で大きなピークを有する。このスペクトルは、コバルトと鉄 - 硫黄クラスター発色団の両方に起因する。さらに、C F e S P は C o (I I) に自然に酸化することができ、これは約 4 7 0 n m で広範囲の吸収ピークをもたらす (S e r a v a l l i ら、B i o c h e m i s t r y 3 8 巻、5 7 2 8 ~ 5 7 3 5 頁 (1 9 9 9 年)) 。組換えメチルトランスフェラーゼは、E . c o l i 細胞抽出物、M . t h e r m o a c e t i c a から精製した C F e S P およびメチルトetraヒドロ葉酸を使用して試験する。コリノイドタンパク質のメチル化は、4 7 0 n m での主要ピークの不在と共に、4 5 0 n m での吸収の同時増大を伴う 3 9 0 n m での吸収の低下として観察される。

10

【0278】

非放射性アッセイも、 ^{13}C -メタノールを使用して開発されている。これはテトラヒドロ葉酸に移動し、分子質量 + 1 の M T H F を生成するはずである。あるいは、メチルトランスフェラーゼは、メタノールのメチル基のホモシステインへの移動によるメチオニン形成することにも働くと考えられる。メチオニンの + 1 の質量は M T H F + 1 またはいくつか他の可能性のものより容易に検出可能であるので、このアッセイも有用である。 ^{13}C の使用に加えて、重水素をトレーサーとして使用することもでき、この両方は質量分析を使用して測定することができる。これらのトレーサーは *i n v i v o* 標識試験で使用することもできる。例えば電子常磁性共鳴 (E P R)、メスバウアー分光法、電子核二重共鳴 (E N D O R)、赤外線、磁気円二色性 (M C D)、結晶学、X 線吸収、ならびに

20

【0279】

図 8 は、メタノールメチルトランスフェラーゼを C O D H / A C S (「合成ガス」) 経路に適合させることが可能である方法を例示する。本質的に、メタノールのメチル基は、コバラミン (c o b a b a l a m i n) 依存性のプロセスによってテトラヒドロ葉酸、次いで C O D H / A C S のコリノイド - F e S タンパク質 (さらにコバラミンタンパク質) に移動し、それは次にメチル基を A C S 反応に与え、アセテートの合成をもたらす。メタノールメチルトランスフェラーゼ複合体は 3 つの遺伝子産物からなり、これらの 2 つ、M t a B と M t a C、(M o t h _ 1 2 0 9 と M o t h _ 1 2 0 8) は隣接しており、容易にクローニングした。第 3 の M t a A は 3 つの異なる遺伝子 (M o t h _ 2 1 0 0、M o t h _ 2 1 0 2、および M o t h _ 2 3 4 6) によってコードされる可能性があり、3 つの遺伝子全てが必要とされるかどうか、またはこの 3 つのサブセットが機能し得るかどうかは不明である。E . c o l i における全てのクローニングは、L u t z - B u j a r d のベクターを使用して実施した (L u t z および B u j a r d、N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 巻、1 2 0 3 ~ 1 2 1 0 頁 (1 9 9 7 年)) 。

30

【0280】

以下のアッセイを使用して、メタノールメチルトランスフェラーゼの遺伝子産物をコードする M t a B の活性を決定することができる。後者の陽性対照はバニレート (v a n i l l a t e) の *o*-脱メチル化で実施することができる。

40

【0281】

メタノールメチルトランスフェラーゼ反応。例示的なメタノールメチル転移反応は以前に記載されている (S a u e r および T h a u e r、E u r . J . B i o c h e m . 2 4 9 巻、2 8 0 ~ 2 8 5 頁 (1 9 9 7 年) ; N a i d u および R a g s d a l e、J . B a c t e r i o l . 1 8 3 巻、3 2 7 6 ~ 3 2 8 1 頁 (2 0 0 1 年)) 。反応条件は以下の通りである：5 0 m M の M O P S / K O H、p H 7 . 0 ; 1 0 m M の M g C l ₂ ; 4 m M の T i (I I I) シトレート、0 . 2 % のドデシルマルトシド (S D S の代わり、S a u e r および T h a u e r、E u r . J . B i o c h e m . 2 5 3 巻、6 9 8 ~ 7 0 5 頁 (1 9 9 8 年) を参照)、2 5 μ M のヒドロキシコバラミン、1 % の M e O H または 1 m M のバニレート (メチルトランスフェラーゼの型に応じて) 。

50

【0282】

これらの反応は、37 または55 において暗所でのスペクトログラフの読取りによって測定する。このアッセイは、それぞれメタノールまたはバニレートからコバラミンにメチル基を移動させる、M t a BまたはM t v Bの能力を試験する。

【0283】

(実施例X V I I I)

E . c o l iのCO耐性実験およびCO濃度アッセイ(ミオグロビンアッセイ)

この実施例では、高濃度のCOに対するE . c o l iの耐性について記載する。

【0284】

飽和量のCOの存在下でE . c o l iが嫌氣的に増殖することができるかどうか試験するために、小体積の嫌気性微生物学に関して前に記載したように、50mlのT e r r i f i c B r o t h培地(および還元溶液、N i C l ₂、F e (I I) N H ₄ S O ₄、シアノコバラミン、I P T G、およびクロラムフェニコール)を含む120mlの血清容器中に培養物をセットアップした。これらの容器のうちの半分は窒素ガスで30分間平衡化し、半分はCOガスで30分間平衡化した。空ベクター(p Z A 3 3)は対照として使用し、p Z A 3 3空ベクターならびにA C S 9 0とA C S 9 1の両方を含有する培養物はN₂とCOの両方で試験した。全てを接種し、37 で攪拌(250rpm)しながら36時間増殖させた。36時間の間の最後に、フラスコの検査によって全てにおける多量の増殖が示された。観察した増殖の大部分は一晚で長いラグを伴って生じた。

10

【0285】

全ての培養物がCOの存在下で十分増殖したように見えたことを考慮して、最終CO濃度を確認した。これはCOに曝したときのミオグロビンのスペクトルシフトのアッセイを使用して実施した。亜ジチオン酸ナトリウムで還元したミオグロビンは435nmで吸収ピークを有し、このピークはCOを用いると423nmにシフトする。低波長および300nm以降の全スペクトルを記録することが必要であるため、石英製キュベットを使用しなければならない。CO濃度は標準曲線に対して測定し、COの最大水溶性に関するヘンリーの法則の定数=20 および1atmで970マイクロモルに依存する。

20

【0286】

CO濃度のミオグロビン試験用に、キュベットは水で10回、アセトンで1回洗浄し、次いでCODHアッセイと同様にストッパーで密閉した。N₂をキュベットに約10分間吹き付けた。1ml体積の嫌気性バッファー(HEPES、pH8.0、2mMのDTT)を、ハミルトンシリンジを用いてブランク(COで平衡化せず)に加えた。10マイクロリットル体積のミオグロビン(約1mM、変動があり得、非常に多くの量がまさに必要となる)および1マイクロリットルの亜ジチオン酸(dithionite)(20mMストック)を加えた。COの標準曲線は、1マイクロリットル増分で加えたCO飽和バッファーを使用して作製した。ピーク高およびシフトはそれぞれの増分に関して記録した。試験した培養物はp Z A 3 3 / CO、A C S 9 0 / CO、およびA C S 9 1 / COであり、これらのそれぞれを同じキュベットに1マイクロリットル増分で加えた。実験の途中で、第2のキュベットをセットアップし使用した。その結果は表3中に示す。

30

【0287】

40

【表 3】

表3. 一酸化炭素濃度、36時間

株および増殖条件	最終CO濃度(マイクロモル)
pZA33-CO	930
ACS90-CO	638
	494
	734
	883
平均	687
標準偏差	164
ACS91-CO	728
	812
	760
	611
平均	728
標準偏差	85

10

表3中に示す結果は、COの存在または不在下で株を培養したかどうかとは無関係に培養物が増殖したことを示す。これらの結果は、E. coliが嫌氣的条件下でCOへの曝露に対して耐性であり得ること、およびCODH-ACSオペロンを発現するE. coli細胞がいくらかのCOを代謝し得ることを示す。

【0288】

20

これらの結果は、E. coli細胞が、CODH/ACSを発現しようとしまいと、飽和量のCOの存在下で増殖することができたことを実証する。さらに、これらはCOの代わりに窒素中で、対照と同程度に十分増殖した。この実験は、E. coliの研究室株が、正常大気圧で実施した合成ガスプロジェクトにおいて到達可能なレベルで、COに無反応であることを実証した。さらに、予備実験は、CODH/ACSを発現する組換えE. coli細胞が、おそらく二酸化炭素への酸化によって、いくらかのCOを実際に消費したことを示した。

【0289】

(実施例 I X X)

4-ヒドロキシブチレートおよび1,4-ブタンジオールを生成するための例示的な経路

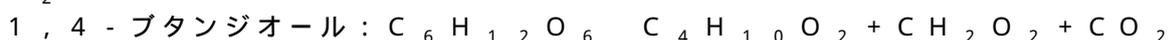
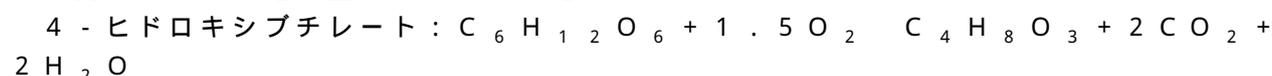
30

この実施例では、アセチルCoAから4-ヒドロキシブチレートおよび1,4-ブタンジオールを生成するための例示的な経路について記載する。

【0290】

本明細書で開示するような、(1)メタノール有りおよび無しでの合成ガスをアセチルCoAに変換するための経路と、(2)アセチルCoAを4-ヒドロキシブチレート、または1,4-ブタンジオールに変換するための経路の組合せ。このように、本発明は、炭水化物フィードストックから4-ヒドロキシブチレート、または1,4-ブタンジオールを生成するように設計製作された生物体に優る固有の収率の利点を有する生産生物体および変換経路を提供する。例えば、グルコースからの4-ヒドロキシブチレート、および1,4-ブタンジオールの最大理論収率は、本明細書に記載するアセチルCoAから進行する代謝経路を使用して1モル当たり1モルである。具体的には、解糖によりグルコース1モル当たり2モルのアセチルCoAが誘導され、かつ2モルのアセチルCoAが、4-ヒドロキシブチレート、または1,4-ブタンジオールの1モル当たり必要とされる。正味の変換は以下の化学量論式によって記載される：

40



一方、そのより単純な成分、COおよびH₂へのグルコースのガス化、次に本明細書に記載する経路を使用する、4-ヒドロキシブチレート、および1,4-ブタンジオールへ

50

のそれらの変換は、以下の最大理論収率をもたらす：

4 - ヒドロキシブチレート： $6\text{CO} + 6\text{H}_2 \rightarrow 1.333\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3 + 0.667\text{CO}_2 + 0.667\text{H}_2\text{O}$

1, 4 - ブタンジオール： $6\text{CO} + 6\text{H}_2 \rightarrow 1.091\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2 + 1.636\text{CO}_2 + 0.545\text{H}_2\text{O}$

グルコースのガス化は、6モルのCOおよび6モルのH₂を最大で与えることができることに留意されたい。合成ガスからの4 - ヒドロキシブチレート、および1, 4 - ブタンジオールの最大理論収率は、以下に記載するようなメタノールの添加によってさらに高めることができる：

4 - ヒドロキシブチレート： $\text{CH}_4\text{O} + 6\text{CO} + 6\text{H}_2 \rightarrow 1.667\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3 + 0.333\text{CO}_2 + 1.333\text{H}_2\text{O}$

1, 4 - ブタンジオール： $\text{CH}_4\text{O} + 6\text{CO} + 6\text{H}_2 \rightarrow 1.364\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2 + 1.545\text{CO}_2 + 1.182\text{H}_2\text{O}$

4 - ヒドロキシブチレート： $2\text{CH}_4\text{O} + 6\text{CO} + 6\text{H}_2 \rightarrow 2\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$

1, 4 - ブタンジオール： $2\text{CH}_4\text{O} + 6\text{CO} + 6\text{H}_2 \rightarrow 1.636\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2 + 1.455\text{CO}_2 + 1.818\text{H}_2\text{O}$

したがって、本明細書に記載する生物体および変換経路は、炭水化物を4 - ヒドロキシブチレート、または1, 4 - ブタンジオールに変換する有効な手段をもたらすことは明らかである。

【0291】

アセトアセチルCoAチオラーゼは、2分子のアセチルCoAをそれぞれアセトアセチルCoAとCoAの1分子に変換する。例示的なアセトアセチルCoAチオラーゼ酵素は、*E. coli*由来のatoB (Martinら、*Nat. Biotechnol.* 21巻、796~802頁(2003年))、*C. acetobutylicum*由来のthlAおよびthlB (Hanaiら、*Appl Environ Microbiol.* 73巻、7814~7818頁(2007年)；Winzerら、*J. Mol. Microbiol Biotechnol.* 2巻、531~541頁(2000年)、および*S. cerevisiae*由来のERG10 (Hiserら、*J. Biol. Chem.* 269巻、31383~31389頁(1994年))の遺伝子産物を含む。

【0292】

【数25】

タンパク質	GenBank ID	生物体
AtoB	NP_416728	<i>Escherichia coli</i>
ThIA	NP_349476.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
ThIB	NP_149242.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
ERG10	NP_015297	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

アセトアセチルCoAを3 - ヒドロキシブチリルCoAに変換する例示的な3 - ヒドロキシアシルデヒドロゲナーゼは、*C. acetobutylicum*由来のhbd (Boyntonら、*Journal of Bacteriology* 178巻、3015~3024頁(1996年))、*C. beijerinckii*由来のhbd (ColbyおよびChenら、*Appl Environ. Microbiol.* 58巻、3297~3302頁(1992年))、および*Metallosphaera sedula*由来のいくつかの類似した酵素 (Bergら、2007 *Science* 318巻、1782~1786頁(2007年))を含む。

【0293】

【数 2 6】

タンパク質	GenBank ID	生物体
hbd	NP_349314.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
hbd	AAM14586.1	<i>Clostridium beijerinckii</i>
Msed_1423	YP_001191505	<i>Metallosphaera sedula</i>
Msed_0399	YP_001190500	<i>Metallosphaera sedula</i>
Msed_0389	YP_001190490	<i>Metallosphaera sedula</i>
Msed_1993	YP_001192057	<i>Metallosphaera sedula</i>

*C. acetobutylicum*由来のcrtの遺伝子産物は、クロトニルCoAへの3-ヒドロキシブチリルCoAの脱水を触媒する (Atsumiら、Metab Eng (2007年); Boyntonら、Journal of Bacteriology 178巻、3015~3024頁(1996年))。さらに、エノイルCoAヒドラターゼは可逆的酵素であり、したがってクロトニルCoAへの3-ヒドロキシブチリルCoAの脱水を触媒するのに適した候補である。エノイルCoAヒドラターゼ (*P. putida*のphaAおよびphaB)は、フェニルアセートの異化中に二重結合のヒドロキシル化を実施すると考えられる (Oliveraら、Proc Nat Acad Sci U.S.A. 95巻、6419~6424頁(1998年))。P. fluorescens由来のpaaAおよびpaaBは類似した形質転換を触媒する (Oliveraら、Proc Nat Acad Sci U.S.A. 95巻、6419~6424頁(1998年))。最後に、いくつかの*Escherichia coli*遺伝子は、maoC、paaF、およびpaaGを含めた、エノイルCoAヒドラターゼの機能性を実証することが示されている (Ismailら、European Journal of Biochemistry 270巻、3047~3054頁(2003年); ParkおよびLee、J Bacteriol. 185巻、5391~5397頁(2003年); ParkおよびLee、Appl Biochem. Biotechnol 113~116:335~346頁(2004年); ParkおよびYup、Biotechnol Bioeng 86巻、681~686頁(2004年))。

【0294】

【数 2 7】

タンパク質	GenBank ID	生物体
crt	NP_349318.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
paaA	NP_745427.1	<i>Pseudomonas putida</i>
paaB	NP_745426.1	<i>Pseudomonas putida</i>
phaA	ABF82233.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
phaB	ABF82234.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
maoC	NP_415905.1	<i>Escherichia coli</i>
paaF	NP_415911.1	<i>Escherichia coli</i>
paaG	NP_415912.1	<i>Escherichia coli</i>

*in vivo*での逆反応(すなわち、クロトニルCoAへの4-ヒドロキシブチリルCoAの脱水)を天然に触媒するいくつかの酵素が、多数の種において同定されている。この形質転換は、*Clostridium aminobutyricum*による4-アミノブチレートの発酵 (ScherfおよびBuckel、Eur. J Biochem. 215巻、421~429頁(1993年))および*Clostridium kluyveri*によるスクシネート-エタノールの発酵 (Scherfら、Arch. Microbiol 161巻、239~245頁(1994年))に使用される。この形質転換は、3-ヒドロキシプロピオネート/4-ヒドロキシブチレートの独立栄養二酸化炭素同化経路の一部としての、古細菌 (Archaea)、例えば*Metallosphaera sedula*における段階でもある (Bergら、Science 31

8巻、1782～1786頁(2007年)。この経路は、4-ヒドロキシブチリルCoAを形成するためにクロトニルCoAの水和反応を使用する。4-ヒドロキシブチリルCoAデヒドラターゼの可逆性は十分に文書化されており(Friedrichら、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 47巻、3254～3257頁(2008年); Muhら、Eur. J. Biochem. 248巻、380～384頁(1997年); Muhら、Biochemistry 35巻、11710～11718頁(1996年)、平衡定数はクロトニルCoAの側で約4であると報告されている(ScherfおよびBuckel、Eur. J. Biochem. 215巻、421～429頁(1993年))。これは、下流4-ヒドロキシブチリルCoAデヒドロゲナーゼが、クロトニルCoAにおいて熱力学的障害をもたらさないように4-ヒドロキシブチリルCoA濃度を低く保つことを示す。

【0295】

【数28】

タンパク質	GenBank ID	生物体
AbfD	CAB60035	<i>Clostridium aminobutyricum</i>
AbfD	YP_001396399	<i>Clostridium kluyveri</i>
Msed_1321	YP_001191403	<i>Metallosphaera sedula</i>
Msed_1220	YP_001191305	<i>Metallosphaera sedula</i>

4-ヒドロキシブチリルCoAトランスフェラーゼは、4-ヒドロキシブチリルCoAからアセテートにCoA部分を移動させ、次いで4-ヒドロキシブチレートおよびアセチルCoAを形成する。1つの例示的な4-ヒドロキシブチリルCoAトランスフェラーゼは、*Clostridium kluyveri*のcat2遺伝子によってコードされる(Seedorfら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105巻、2128～2133頁(2008年); SohlingおよびGottschalk J. Bacteriol. 178巻、871～880頁(1996年))。Porphyromonas gingivalis由来のabfT-2遺伝子は、4-ヒドロキシブチレートおよび1,4-ブタンジオールを生成するための経路の一部として働くときには、4-ヒドロキシブチリルCoAトランスフェラーゼ活性を示すことも示された(Burkら、WO/2008/115840(2008年))。P. gingivalis由来のabfT-1によってコードされるさらなる候補の酵素は、配列相同性によって推測することができる。別の4-ヒドロキシブチリルCoAトランスフェラーゼは、*Clostridium aminobutyricum*由来のabfTの遺伝子産物によってコードされる(Gerhardtら、Arch. Microbiol. 174巻、189～199頁(2000年))。

【0296】

【数29】

タンパク質	GenBank ID	生物体
cat2	YP_001396397	<i>Clostridium kluyveri</i>
abfT-2	NP_906037	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
abfT-1	NP_904965.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
abfT	CAB60036	<i>Clostridium aminobutyricum</i>

例示的なリン酸転移アシルトランスフェラーゼには、ptaによってコードされるホストランスアセチラーゼ、およびptbによってコードされるホストランスブチリラーゼが含まれる。E. coli由来のpta遺伝子は、アセチルCoAをリン酸アセチルに、およびその逆に変換することができる酵素をコードする(Suzuki、T. 1969 Biochim. Biophys. Acta 191巻、559～569頁(1969年))。この酵素はアセチルCoAの代わりにプロピオニルCoAを利用して、プロセス中でプロピオネートを形成することもできる(Hesslingerら、Mol.

10

20

30

40

50

Microbiol 27巻、477～492頁(1998年)。同様に、C. acetobutylicum由来のptb遺伝子は、ブチリルCoAをリン酸ブチリルに変換することができる酵素をコードする(Huangら、J. Mol. Microbiol Biotechnol 2巻、33～38頁(2000年); (Walterら、Gene 134巻、107～111頁(1993年))。この同じ酵素は、1,4-ブタンジオールを生成するための経路の一部として働くときには、4-ヒドロキシブチリルCoAに対して活性を有することが示された(WO/2008/115840(2008年))。さらなるptb遺伝子は、ブチレート産生細菌L2-50(LjungdahlおよびAndreesen、Methods Enzymol. 53巻、360～372頁(1978年)およびBacillus megaterium(Vazquezら、Curr. Microbiol 42巻、345～349頁(2001年))において見ることができる。

【0297】

【数30】

タンパク質	GenBank ID	生物体
pta	NP_416800.1	Escherichia coli
ptb	NP_349676	Clostridium acetobutylicum
ptb	AAR19757.1	酪酸産生菌L2-50
ptb	CAC07932.1	Bacillus megaterium

例示的なキナーゼには、ackAによってコードされるE. coli酢酸キナーゼ(SkarstedtおよびSilverstein、J. Biol. Chem. 251巻、6775～6783頁(1976年))、buk1およびbuk2によってコードされるC. acetobutylicumの酪酸キナーゼ(Huangら、2000 J. Mol. Microbiol Biotechnol 2巻、33～38頁(2000年); Walterら、Gene 134巻、107～111頁(1993年))、およびproBによってコードされるE. coliグルタミンキナーゼ(Smithら、J. Bacteriol. 157巻、545～551頁(1984年))が含まれる。これらの酵素は、それぞれアセテート、ブチレート、およびグルタネートをリン酸化する。E. coli由来のackA遺伝子産物はプロピオネートもリン酸化する(Hesslingerら、Mol. Microbiol 27巻、477～492頁(1998年))。C. acetobutylicum由来のbuk1の遺伝子産物は、Burkら、WO/2008/115840(2008年)中において、1,4-ブタンジオールを生成するための経路の一部として働くときには、4-ヒドロキシブチリルCoAに対して活性を有することが示された。

【0298】

【数31】

タンパク質	GenBank ID	生物体
ackA	NP_416799.1	Escherichia coli
buk1	NP_349675	Clostridium acetobutylicum
buk2	Q97II1	Clostridium acetobutylicum
proB	NP_414777.1	Escherichia coli

アルコール形成性4-ヒドロキシブチリルCoAレダクターゼ酵素は、4-ヒドロキシブチリルCoAから1,4-ブタンジオールを形成するのに必要とされる2つの還元段階を触媒する。アセチルCoAをアルコールに変換する例示的な2段階のオキシドレダクターゼには、アセチルCoAなどの基質をエタノールに(例えば、E. coli由来のadhE(Kesslerら、FEBS. Lett. 281巻、59～63頁(1991年))、およびブチリルCoAをブタノールに(例えば、C. acetobutylic

um由来のadhE2 (Fontaineら、J. Bacteriol. 184巻、821~830頁(2002年))変換するオキシドレダクターゼが含まれる。C. acetobutylicum由来のadhE2酵素は、Burkら、WO/2008/115840(2008年)の参考文献中で、4-ヒドロキシブチリルCoAからBDOを生成することが具体的に示された。アセチルCoAのエタノールへの還元に加えて、Leuconostoc mesenteroides中でadhEによってコードされる酵素は、分岐鎖化合物イソブチラルデヒド(isobutyraldehyde)をイソブチリルCoAに酸化することが示されてきている(Kazahayaら、J. Gen. Appl. Microbiol. 18巻、43~55頁(1972年); Kooら、Biotechnol Lett. 27巻、505~510頁(2005年))。

【0299】

【数32】

タンパク質	GenBank ID	生物体
adhE	NP_415757.1	Escherichia coli
adhE2	AAK09379.1	Clostridium acetobutylicum
adhE	AAV66076.1	Leuconostoc mesenteroides

別の例示的な酵素はマロニルCoAを3-HPに変換することができる。この活性を有するNADPH依存性酵素がChloroflexus aurantiacusにおいて特徴付けられており、この場合それは3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルに關与する(Huglerら、J. Bacteriol. 184巻、2404~2410頁(2000年); StraussおよびFuchs、Eur. J. Biochem. 215巻、633~643頁(1993年))。300kDaの質量を有するこの酵素は非常に基質特異的であり、他の公知のオキシドレダクターゼとはほとんど配列類似性を示さない(Huglerら、J. Bacteriol. 184巻、2404~2410頁(2002年))。他の生物体において、いずれの酵素もこの特異的反応を触媒することは示されていないが、他の生物体が類似した経路を有する可能性があるバイオフィォマティクスによる証拠が存在する(Klattら、Environ. Microbiol. 9巻、2067~2078頁(2007年))。Roseiflexus castenholzii、Erythrobacter sp. NAP1および海洋生物ガンマプロテオバクテリアHTCC2080を含めた他の生物体中の酵素候補は、配列類似性によって推測することができる。

【0300】

【数33】

タンパク質	GenBank ID	生物体
mcr	AAS20429.1	Chloroflexus aurantiacus
Rcas_2929	YP_001433009.1	Roseiflexus castenholzii
NAP1_02720	ZP_01039179.1	Erythrobacter sp. NAP1
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	海洋生物ガンマプロテオバクテリアHTCC2080

4-ヒドロキシブチリルCoAからBDOへの代替の経路は、最初にこの化合物を4-ヒドロキシブチナールに還元することを含む。いくつかのアシルCoAデヒドロゲナーゼは、アシルCoAをその対応するアルデヒドに還元することができる。このような酵素をコードする例示的な遺伝子には、脂肪酸アシルCoAレダクターゼをコードするAcinetobacter calcoaceticusのacr1(ReiserおよびSomerville、Journal of Bacteriology 179巻、2969~2975頁(1997年))、脂肪酸アシルCoAレダクターゼをコードするAcinetobacter sp.のM-1(Ishigeら、Appl. Environ. Microbiol. 68巻、1192~1195頁(2002年))、ならび

10

20

30

40

50

に *Clostridium kluyveri* 中の *sucD* 遺伝子によってコードされる CoA および NADP 依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼが含まれる (Sohling および Gottschalk, *J. Bacteriol.* 178 巻、871 ~ 880 頁 (1996 年))。 *P. gingivalis* の *SucD* は別のコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼである (Takahashi ら, *J. Bacteriol.* 182 巻、4704 ~ 4710 頁 (2000 年))。これらのコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼは、Burk ら, *WO/2008/115840* (2008 年) の参照文献中で、1,4-ブタンジオールを生成するための経路の一部として、4-ヒドロキシブチリル CoA を 4-ヒドロキシブタナールに変換することが具体的に示された。 *bphG* によってコードされる *Pseudomonas sp* においてアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼをアシル化する酵素はさらに別の有能な酵素である。それはアセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド、およびホルムアルデヒドを酸化およびアシル化することが実証されているからである (Powlowski ら, *J. Bacteriol.* 175 巻、377 ~ 385 頁 (1993 年))。

【0301】

【数34】

タンパク質	GenBank ID	生物体
acr1	YP_047869.1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
acr1	AAC45217	<i>Acinetobacter baylyi</i>
acr1	BAB85476.1	<i>Acinetobacter sp. 株 M-1</i>
sucD	P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
sucD	NP_904963.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
bphG	BAA03892.1	<i>Pseudomonas sp</i>

アシル CoA をその対応するアルデヒドに変換するさらなる酵素型は、マロニル CoA をマロン酸セミアルデヒドに変換するマロニル CoA レダクターゼである。マロニル CoA レダクターゼは、好熱好酸性古細菌中の 3-ヒドロキシプロピオン酸サイクルによる独立栄養炭素固定における重要な酵素である (Berg ら, *Science* 318 巻、1782 ~ 1786 頁 (2007 年); Thauer, R. K. *Science* 318 巻、1732 ~ 1733 頁 (2007 年))。この酵素は補因子として NADPH を利用し、*Metallosphaera* および *Sulfolobus spp* において特徴付けられている (Alber ら, *J. Bacteriol.* 188 巻、8551 ~ 8559 頁 (2006 年); Hugler ら, *J. Bacteriol.* 184 巻、2404 ~ 2410 頁 (2002 年))。この酵素は *Metallosphaera sedula* 中で Msed_0709 によってコードされる (Alber ら, *J. Bacteriol.* 188 巻、8551 ~ 8559 頁 (2006 年); Berg ら, *Science* 318 巻、1782 ~ 1786 頁 (2007 年))。 *Sulfolobus tokodaii* 由来マロニル CoA レダクターゼをコードする遺伝子をクローニングし、*E. coli* 中で異種発現させた (Alber ら, *J. Bacteriol.* 188 巻、8551 ~ 8559 頁 (2006 年))。これらの酵素のアルデヒドデヒドロゲナーゼの機能性は、*Chloroflexus aurantiacus* 由来の二元機能デヒドロゲナーゼと類似しているが、配列類似性はほとんどない。両方のマロニル CoA レダクターゼ酵素の候補が、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (アスパラギン酸セミアルデヒドへのアスパルチル-4-リン酸の還元および同時の脱リン酸化を触媒する酵素) と高い配列類似性を有する。さらなる遺伝子候補は、*Sulfolobus solfataricus* および *Sulfolobus acidocaldarius* を含めた他の生物体中でのタンパク質との配列相同性によって発見することができる。

【0302】

【数 3 5】

タンパク質	GenBank ID	生物体
Msed_0709	YP_001190808.1	Metallosphaera sedula
mcr	NP_378167.1	Sulfolobus tokodaii
asd-2	NP_343563.1	Sulfolobus solfataricus
Saci_2370	YP_256941.1	Sulfolobus acidocaldarius

1, 4 - ブタンジオールデヒドロゲナーゼ活性を示す酵素は、4 - ヒドロキシブタノールから1, 4 - ブタンジオールを形成することができる。アルコールへのアルデヒドの変換を触媒する酵素（すなわち、アルコールデヒドロゲナーゼまたは同様にアルデヒドレダクターゼ）をコードする例示的な遺伝子には、C2 ~ C14の中鎖アルコールデヒドロゲナーゼをコードするalrA (Taniら、Appl. Environ. Microbiol. 66巻、5231~5235頁(2000年))、Saccharomyces cerevisiae由来のADH2 (Atsumiら、Nature 451巻、86~89頁(2008年))、C(3)より長い分子を好むE. coli由来のyqhD (Sulzenbacherら、Journal of Molecular Biology 342巻、489~502頁(2004年))、ならびにブチリルアルデヒドをブタノールに変換するC. acetobutylicum由来のbdh Iおよびbdh II (Walterら、Journal of Bacteriology 174巻、7149~7158頁(1992年))が含まれる。

【0303】

【数 3 6】

タンパク質	GenBank ID	生物体
alrA	BAB12273.1	Acinetobacter sp. Strain M-1
ADH2	NP_014032.1	Saccharomyces cerevisiae
yqhD	NP_417484.1	Escherichia coli
bdh I	NP_349892.1	Clostridium acetobutylicum
bdh II	NP_349891.1	Clostridium acetobutylicum

4 - ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性を示す酵素 (EC 1.1.1.61) もこの範疇に入る。このような酵素は、Ralstonia eutropha (Bravoら、J. Forensic Sci. 49巻、379~387頁(2004年))、Clostridium kluyveri (WolfおよびKenealy、Protein Expr. Purif. 6巻、206~212頁(1995年))およびArabidopsis thaliana (Breitkreuzら、J. Biol. Chem. 278巻、41552~41556頁(2003年))において特徴付けられている。

【0304】

【数 3 7】

タンパク質	GenBank ID	生物体
4hbd	YP_726053.1	Ralstonia eutropha H16
4hbd	L21902.1	Clostridium kluyveri DSM 555
4hbd	Q94B07	Arabidopsis thaliana

4 - ヒドロキシブチレート合成に必要とされる非天然遺伝子を、前に記載したように発現プラスミドにクローニングする。宿主株は、メタノールメチルトランスフェラーゼ活性、CODH / ACS活性、およびおそらくPFORおよびヒドロゲナーゼ活性も発現する。この時点で、これら (CODH / ACSなど) の遺伝子はゲノムに組み込まれ、構成的にまたは誘導剤と共に使用することができるプロモーターから発現される (すなわち、PA1-lacO1はlacIを含有する細胞中では誘導性であり、または別の方法で構成

的である)。4 - ヒドロキシブチレートの発現および収率を最適化した後、中立遺伝子座でのこれらの遺伝子の1コピーの組み込みによってベース株をさらに改変する。相対的に限られた数の遺伝子(最小で5、および多くて6)を考慮して、必要とされる遺伝子をコードする人工オペロンを構築することができる。組み込み型プラスミドを使用してこのオペロンを導入し、*Bacillus*の*sacB*遺伝子によって可能であったように(Linkら、*J Bacteriol.* 179巻、6228~6237頁(1997年))対抗選択法(counter-selection method)と結びつける。このようにして、*E. coli*染色体中の任意の位置に、マーカー無しで傷跡を残さない(scarless)挿入部を作製することができる。最適化は、遺伝子順序ならびにリボソーム結合部位およびプロモーターの改変を含む。

10

【0305】

1, 4 - ブタンジオール合成に必要とされる非天然の(nonnative)遺伝子を、前に記載したように発現プラスミドにクローニングする。宿主株は、メタノールメチルトランスフェラーゼ活性、CODH/ACS活性、およびおそらくPFOR活性およびヒドロゲナーゼ活性も発現する。この時点で、これら(CODH/ACSなど)の遺伝子はゲノムに組み込まれ、構成的にまたは誘導剤と共に使用することができるプロモーターから発現される(すなわち、PA1-lacO1は*lacI*を含有する細胞中では誘導性であり、または別の方法で構成的である)。1, 4 - ブタンジオールの発現および収率を最適化した後、中立遺伝子座でのこれらの遺伝子の1コピーの組み込みによってベース株をさらに改変する。相対的に限られた数の遺伝子(最小で5、および多くて6)を考慮して、必要とされる遺伝子をコードする人工オペロンを構築することができる。組み込み型プラスミドを使用してこのオペロンを導入し、*Bacillus*の*sacB*遺伝子によって可能であったように(Linkら、*J Bacteriol.* 179巻、6228~6237頁(1997年))対抗選択法と結びつける。このようにして、*E. coli*染色体中の任意の位置に、マーカー無しで傷跡を残さない挿入部を作製することができる。最適化は、遺伝子順序ならびにリボソーム結合部位およびプロモーターの改変を含む。

20

【0306】

本出願を通じて、様々な刊行物に言及してきた。これらの刊行物の開示は、本出願において、本発明が属する現況技術をより完全に記載するために、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。前に示した実施例を参照しながら本発明を記載してきたが、本発明の精神から逸脱せずに、様々な改変を加えることができることを理解されたい。

30

合成ガスから化学物質-経路2
Me-THF + CO → テチルCoA

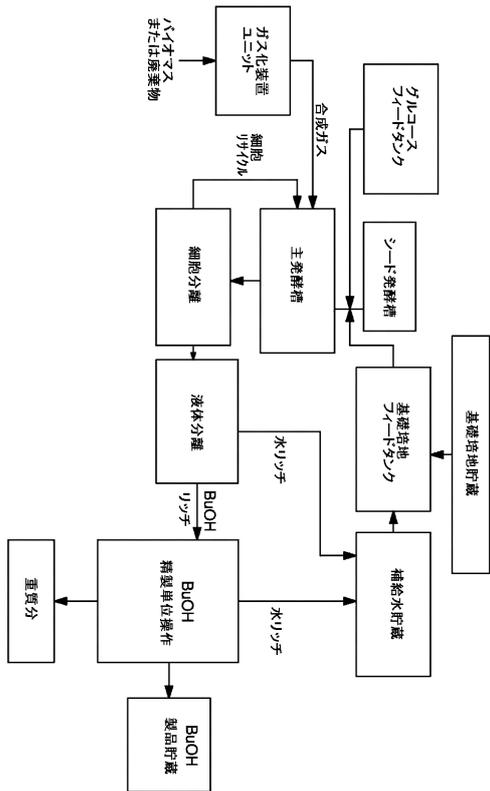
- 2 12. エロクラーゼ

FIG. 2



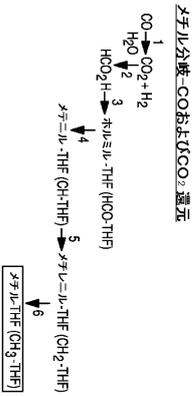
- 4 A 1. テチルCoAシンターゼ
- 2. 一酸化炭素ヒドロゲナーゼ
- 3. メチルトランスフェラーゼ
- 4. コハクジレコリン/イド/酸-遊離タンパク質
- 5. エロクラーゼ
- 6. テチルCoAシンターゼ
- 7. テチルCoAシンターゼジスルホヒドロゲナーゼ

FIG. 4A



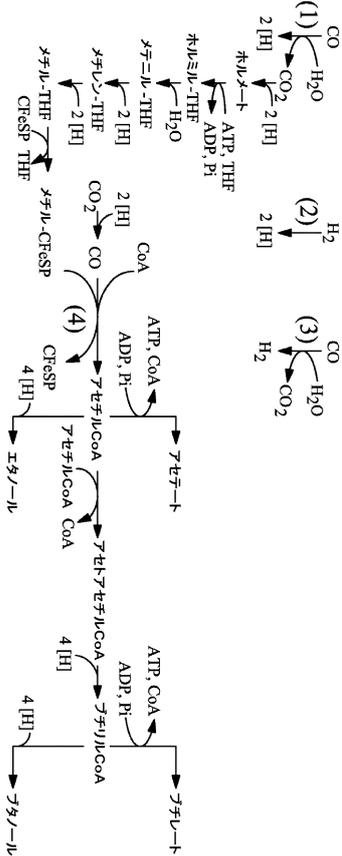
- 1. テチルCoAシンターゼ
- 2. メチルトランスフェラーゼ
- 3. コハクジレコリン/イド/酸-遊離タンパク質
- 4. エロクラーゼ
- 5. テチルCoAシンターゼ
- 6. テチルCoAシンターゼジスルホヒドロゲナーゼ

FIG. 1



- 3 1. テチルCoAシンターゼ
- 2. 一酸化炭素ヒドロゲナーゼ
- 3. メチルトランスフェラーゼ
- 4. コハクジレコリン/イド/酸-遊離タンパク質
- 5. エロクラーゼ
- 6. テチルCoAシンターゼ
- 7. テチルCoAシンターゼジスルホヒドロゲナーゼ

FIG. 3



【 図 4 B 】

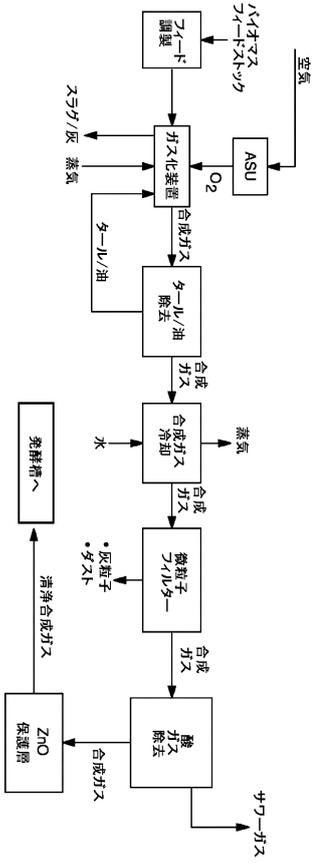


FIG. 4B

【 図 5 】

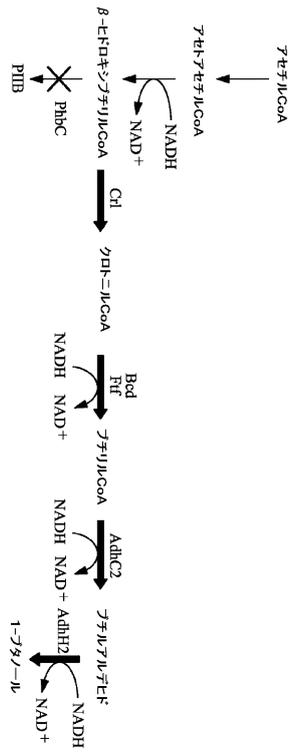


FIG. 5

【 図 6 】

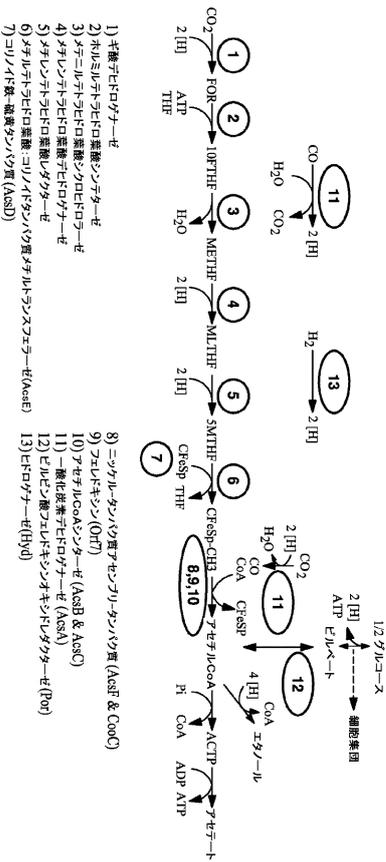


FIG. 6

【 図 7 】

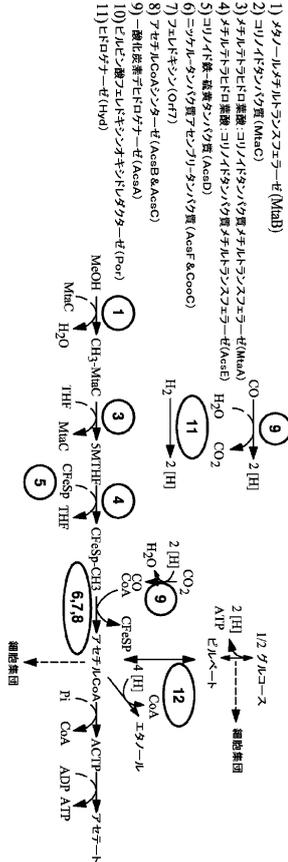
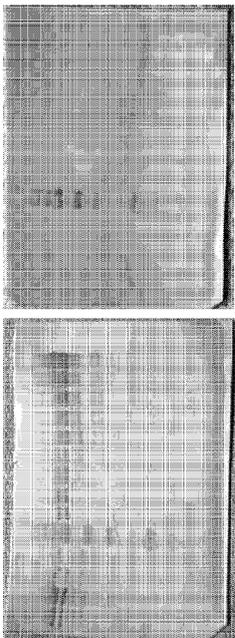


FIG. 7

【 9 】



6 FIG.

【 8 】

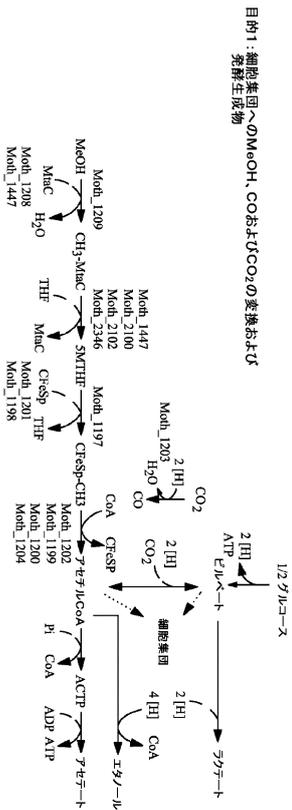


FIG. 8

【 11 】

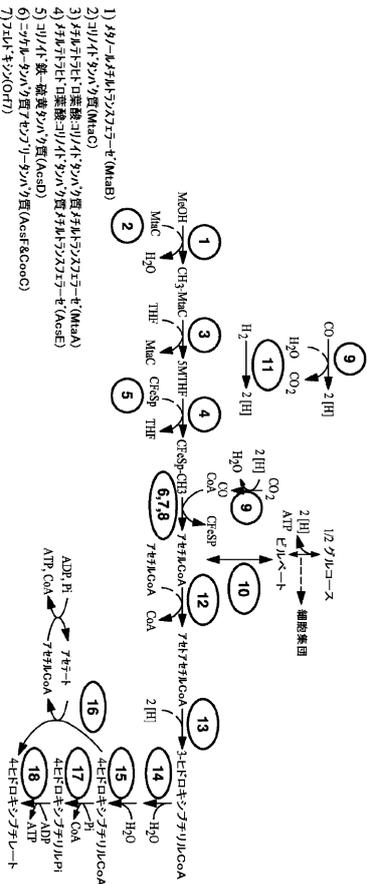


FIG. 11

【 10 】

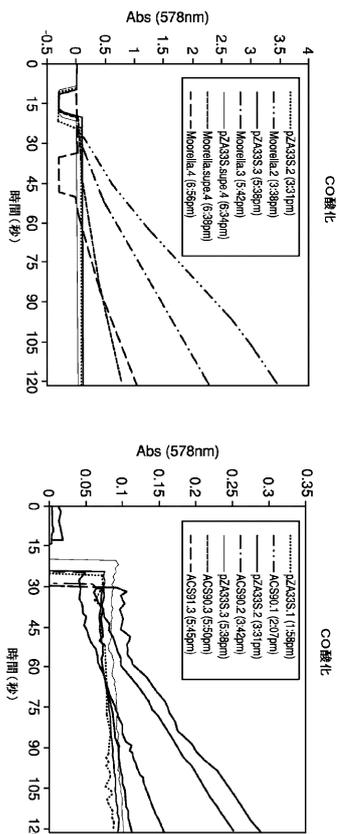


FIG. 10

【 図 13 】

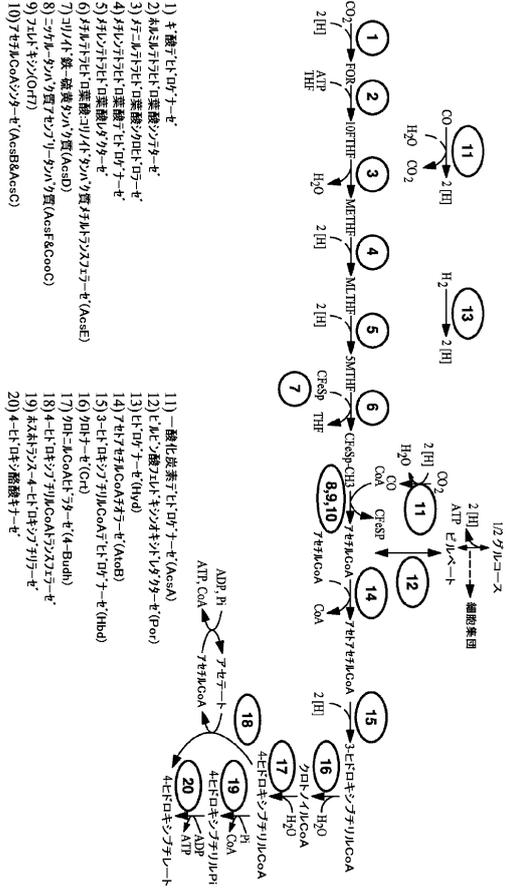


FIG. 13

【 図 12 】

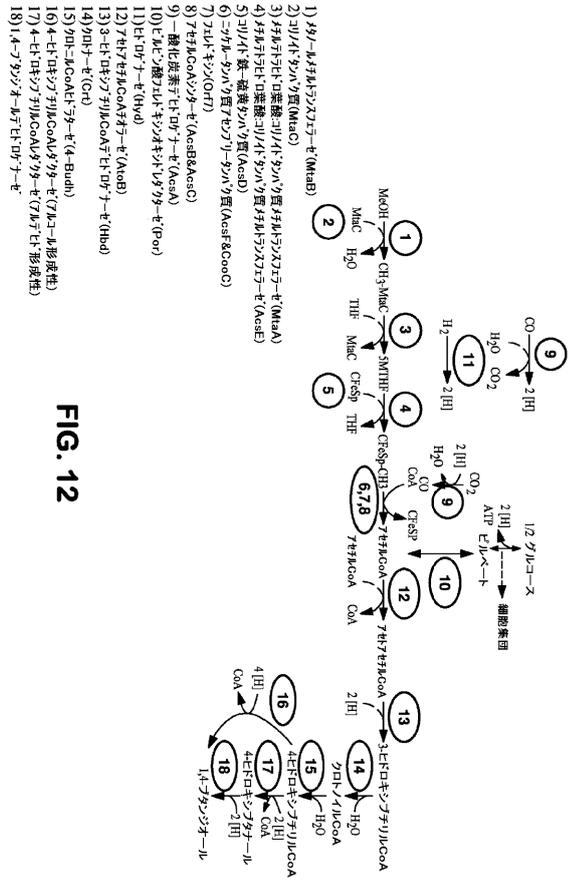


FIG. 12

【 図 14 】

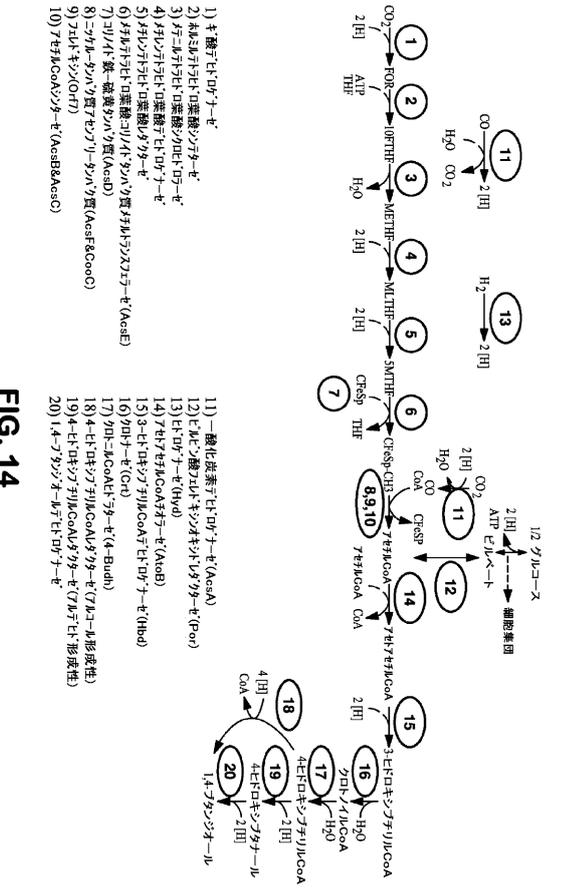


FIG. 14

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 09/31737																					
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 1/20; C12P 21/06; C12P 1/00 (2009.01) USPC - 435/252.3; 435/69.1; 435/41 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																							
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC - 435/252.3; 435/69.1; 435/41 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/41, 435/69.1, 435/87, 435/88, 435/89, 435/136, 435/140, 435/471, 435/190, 435/193, 435/252.3\$ Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST (PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB); Google Exogenous, CO, carbon monoxide, CO2, carbon dioxide, H2, hydrogen, acetyl, coenzyme A, CoA, protein, nucleic acid, acetogenic, acetogenesis, synthesis gas, between, wood pathway, c. thermoacetatum, ten, methyltransferase, and nitrate																							
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>Wood, "Life with CO or CO2 and H2 as a source of carbon and energy". 01 February 1991 (01.02.1991), The Federation of American Societies For Experimental Biology Journal, Vol. 5, pg. 156-163; especially pg 156 col 1 para 1; pg 157 col 2 para 1; pg 158 col 2 para 3; and pg 160 col 1 para 1-3, col 2 para 2, and Fig. 7</td> <td>1-69</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Loke et al. "Active acetyl-CoA synthase from Clostridium thermoacetatum obtained by cloning and heterologous expression of acsAB in Escherichia coli" 07 November 2000 (07.11.2000), Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 97, no. 23, pg 12530712535; especially pg 12530 col 1 para 1-2; and pg 12534 col 1 para 2</td> <td>1-69</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 6,117,658 A (Dennis et al.) 12 September 2000 (12.09.2000), col 4 ln 50-59,</td> <td>1-69</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Grethlein et al. "Bioprocessing of coal-derived synthesis gases by anaerobic bacteria" 01 December 1992 (01.12.1992), Trends In Biotechnology, vol. 10, pp. 418-423; especially pg 418 col 1 para 1-2; and pg 420 col 1 para 1</td> <td>4-7, 14-17, 26 and 52</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Aljundahl, "The Autotrophic Pathway Of Acetate Synthesis In Acetogenic Bacteria" 01 October 1986 (01.10.1986), Annual Review of Microbiology, Vol. 40, pg 415-50; especially pg 423 para 3; pg 425 para 1; pg 426 para 4; pg 427 Table 2; pg 431 para 2; and pg 438 para 2</td> <td>13, 17, 20, 30-39 and 53-62</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Ragsdale et al. "Nitrate-Dependent Regulation of Acetate Biosynthesis and Nitrate Respiration by Clostridium thermoacetatum", 01 March 1999 (01.03.1999) Journal of Bacteriology, Vol. 181, pg 148971495; especially pg 1492 col 2 para 2</td> <td>69</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	Wood, "Life with CO or CO2 and H2 as a source of carbon and energy". 01 February 1991 (01.02.1991), The Federation of American Societies For Experimental Biology Journal, Vol. 5, pg. 156-163; especially pg 156 col 1 para 1; pg 157 col 2 para 1; pg 158 col 2 para 3; and pg 160 col 1 para 1-3, col 2 para 2, and Fig. 7	1-69	Y	Loke et al. "Active acetyl-CoA synthase from Clostridium thermoacetatum obtained by cloning and heterologous expression of acsAB in Escherichia coli" 07 November 2000 (07.11.2000), Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 97, no. 23, pg 12530712535; especially pg 12530 col 1 para 1-2; and pg 12534 col 1 para 2	1-69	Y	US 6,117,658 A (Dennis et al.) 12 September 2000 (12.09.2000), col 4 ln 50-59,	1-69	Y	Grethlein et al. "Bioprocessing of coal-derived synthesis gases by anaerobic bacteria" 01 December 1992 (01.12.1992), Trends In Biotechnology, vol. 10, pp. 418-423; especially pg 418 col 1 para 1-2; and pg 420 col 1 para 1	4-7, 14-17, 26 and 52	Y	Aljundahl, "The Autotrophic Pathway Of Acetate Synthesis In Acetogenic Bacteria" 01 October 1986 (01.10.1986), Annual Review of Microbiology, Vol. 40, pg 415-50; especially pg 423 para 3; pg 425 para 1; pg 426 para 4; pg 427 Table 2; pg 431 para 2; and pg 438 para 2	13, 17, 20, 30-39 and 53-62	Y	Ragsdale et al. "Nitrate-Dependent Regulation of Acetate Biosynthesis and Nitrate Respiration by Clostridium thermoacetatum", 01 March 1999 (01.03.1999) Journal of Bacteriology, Vol. 181, pg 148971495; especially pg 1492 col 2 para 2	69
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
Y	Wood, "Life with CO or CO2 and H2 as a source of carbon and energy". 01 February 1991 (01.02.1991), The Federation of American Societies For Experimental Biology Journal, Vol. 5, pg. 156-163; especially pg 156 col 1 para 1; pg 157 col 2 para 1; pg 158 col 2 para 3; and pg 160 col 1 para 1-3, col 2 para 2, and Fig. 7	1-69																					
Y	Loke et al. "Active acetyl-CoA synthase from Clostridium thermoacetatum obtained by cloning and heterologous expression of acsAB in Escherichia coli" 07 November 2000 (07.11.2000), Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 97, no. 23, pg 12530712535; especially pg 12530 col 1 para 1-2; and pg 12534 col 1 para 2	1-69																					
Y	US 6,117,658 A (Dennis et al.) 12 September 2000 (12.09.2000), col 4 ln 50-59,	1-69																					
Y	Grethlein et al. "Bioprocessing of coal-derived synthesis gases by anaerobic bacteria" 01 December 1992 (01.12.1992), Trends In Biotechnology, vol. 10, pp. 418-423; especially pg 418 col 1 para 1-2; and pg 420 col 1 para 1	4-7, 14-17, 26 and 52																					
Y	Aljundahl, "The Autotrophic Pathway Of Acetate Synthesis In Acetogenic Bacteria" 01 October 1986 (01.10.1986), Annual Review of Microbiology, Vol. 40, pg 415-50; especially pg 423 para 3; pg 425 para 1; pg 426 para 4; pg 427 Table 2; pg 431 para 2; and pg 438 para 2	13, 17, 20, 30-39 and 53-62																					
Y	Ragsdale et al. "Nitrate-Dependent Regulation of Acetate Biosynthesis and Nitrate Respiration by Clostridium thermoacetatum", 01 March 1999 (01.03.1999) Journal of Bacteriology, Vol. 181, pg 148971495; especially pg 1492 col 2 para 2	69																					
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																							
* 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 21 May 2009 (21.05.2009)		Date of mailing of the international search report 23 JUN 2009																					
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/31737

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I: Claims 1-69 are drawn to either a non-naturally occurring microorganism having an acetyl-CoA pathway or a methyltetrahydrofolate pathway (i.e. Wood pathway), or a method for producing acetyl-CoA.

Group II: Claims 70-100, and 131-161 are drawn to either a non-naturally occurring microbial organism having a 4-hydroxybutyrate pathway, or a method for producing 4-hydroxybutyrate.

Group III: Claims 101-130, and 162-191 are drawn to either a non-naturally occurring microbial organism having a 1,4-butanediol pathway, or a method for producing 1,4-butanediol.

*****continued on extra sheet*****

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group I: Claims 1-69

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/31737

Continued from Box III (Unity of Invention is Lacking)

The groups listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons.

The technical feature linking the above listed groups is a non-naturally occurring microorganism having a pathway comprising acetyl-CoA as an intermediate or product. However, this does not represent an improvement over the prior art of US 6,117,658 A to Dennis et al., a non-naturally occurring microorganism having a pathway comprising acetyl-CoA as an intermediate or product (col 3, in 27-39 and fig 3). Although Groups II and III are additionally linked by a pathway comprising 4-hydroxybutyrate (1,4-butanediol and 4-hydroxybutyrate are in the same pathway), this linking technical feature is also taught by Dennis (col 3, in 27-39).

Accordingly, unity of invention is lacking under PCT Rule 13.2 because the groups do not share a same or corresponding special technical feature providing a contribution over the prior art.

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 7/18 (2006.01) C 1 2 P 7/18

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

(72)発明者 シリング, クリストフ エイチ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 0, サン ディエゴ, エル カミノ レアル 1
 2 5 4 - ジー

(72)発明者 パーガード, アンソニー
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 6 8 2 5, ベルフォント, ウォーカー クロッシング
 2 3 7

(72)発明者 トラウィック, ジョン ディー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サン ディエゴ, ウォーターリッジ サーク
 ル 1 0 5 2 0

Fターム(参考) 4B064 AC05 AD30 CA02 CA19 CC24 CD01 CD06 DA01 DA10 DA16
 4B065 AA23Y AB01 AC14 BA01 BB02 CA05 CA10 CA55