(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2015-516173
(P2015-516173A)
(43) 公表日 平成27年6月11日(2015.6.11)

| (51) Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| C12N 1/21 | (2006.01) | C12N | 1/21 | | 4B024 |
| C12P 5/00 | (2006.01) | C12P | 5/00 | ZNA | 4B064 |
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N | 15/00 | A | 4B065 |

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 42 頁）

(21) 出願番号　特願2015-512786 (P2015-512786)
(86) (22) 出願日　平成25年5月15日 (2013.5.15)
(85) 翻訳文提出日　平成26年11月13日 (2014.11.13)
(86) 国際出願番号　PCT/US2013/041108
(87) 国際公開番号　WO2013/173437
(87) 国際公開日　平成25年11月21日 (2013.11.21)
(31) 優先権主張番号　61/688,514
(32) 優先日　平成24年5月16日 (2012.5.16)
(33) 優先権主張国　米国 (US)
(31) 優先権主張番号　61/776,485
(32) 優先日　平成25年3月11日 (2013.3.11)
(33) 優先権主張国　米国 (US)

(71) 出願人　512146731
グリコス　バイオテクノロジーズ　インコーポレイテッド
Ｇｌｙｃｏｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，　Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国　７７００７　テキサス州　ヒューストン　レバークーンストリート　７１１
７１１　Ｌｅｖｅｒｋｕｈｎ　Ｓｔｒｅｅｔ，　Ｈｏｕｓｔｏｎ，　Ｔｅｘａｓ　７７００７　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　ｏｆ　Ａｍｅｒｉｃａ
(74) 代理人　100114775
弁理士　高岡　亮一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】イソプレン生産用微生物およびプロセス

(57)【要約】

本発明は、３－メチル－２－ブテン－１－オールまたは２－メチル－３－ブテン－２－オールからのイソプレン生成のための新規生合成経路を提供する。さらなる実施形態は、３－メチル－２－ブテン－１－オールまたは２－メチル－３－ブテン－２－オールからイソプレンを生成するように改変された非天然微生物、および前記微生物を使ってイソプレンを生成する方法を提供する。
【選択図】図１

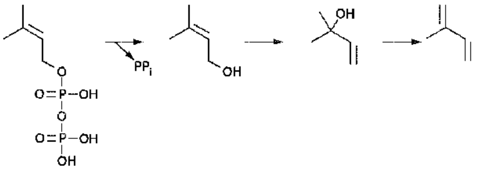



Fig. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
イソプレン生合成経路を含む非天然微生物生命体であって、前記イソプレン生合成経路が、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素、２－メチル－３－ブテン－２－オール合成酵素、３－メチル－２－ブテン－１－オール合成酵素およびこれらの任意の組み合わせから選択されるイソプレン生合成経路の少なくとも１種の酵素をコードする外来核酸を含み、さらに、前記イソプレン生合成経路が、イソプレンを生成するために十分なレベルで発現される非天然微生物生命体。
【請求項２】
前記生物体が、メチルエリトリトールホスファート経路の酵素、またはメバロナート経路の酵素から選択される少なくとも１種の酵素をコードする１種または複数種の内在性または外来性遺伝子を過剰発現する、請求項１に記載の非天然微生物生命体。
【請求項３】
イソプレンへの変換に有用なジメチルアリルジホスファートが増加される、請求項２に記載の非天然微生物生命体。
【請求項４】
前記２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素が、リナロール脱水酵素－異性化酵素である、請求項１に記載の非天然微生物生命体。
【請求項５】
前記３－メチル－２－ブテン－１－オール合成酵素が、ホスファターゼである、請求項１に記載の非天然微生物生命体。
【請求項６】
前記ホスファターゼが、枯草菌ｙｑｋＧ、枯草菌ｙｈｆＲ、または大腸菌ｙｔｊＣ由来である、請求項５に記載の非天然微生物生命体。
【請求項７】
前記３－メチル－２－ブテン－１－オール合成酵素が、テルペン合成酵素である、請求項１に記載の非天然微生物生命体。
【請求項８】
前記テルペン合成酵素が、ゲラニオール合成酵素である、請求項７に記載の非天然微生物生命体。
【請求項９】
前記ゲラニオール合成酵素が、スイートバジル、レモンエゴマ、Ｐｅｒｉｌｌａ　ｆｒｕｔｅｓｃａｎｓ、またはＣｉｎｎａｍｏｍｏｍ　ｔｅｎｕｉｐｉｌｅ由来である、請求項８に記載の非天然微生物生命体。
【請求項１０】
前記テルペン合成酵素が、ファルネソル合成酵素である、請求項７に記載の非天然微生物生命体。
【請求項１１】
前記ファルネソル合成酵素が、トウモロコシまたはＯｒｙｚａ　ｓａｔｉｚａ由来である、請求項１０に記載の非天然微生物生命体。
【請求項１２】
前記２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素がＣａｓｔｅｌｌａｎｉｅｌｌａ　ｄｅｆｒａｇｒａｎｓ由来のリナロール脱水酵素－異性化酵素である、請求項４に記載の非天然微生物生命体。
【請求項１３】
前記２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素が、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素活性をさらに含む二官能性の酵素である、請求項１に記載の非天然微生物生命体。
【請求項１４】
１－デオキシ－Ｄ－キシルロース－５－ホスファート合成酵素、１－デオキシ－Ｄ－キ

シルロース－５－ホスファートレダクトイソメラーゼ、４－ジホスホシチジル－２－Ｃ－メチル－Ｄ－エリスリトール合成酵素、４－ジホスホシチジル－２－Ｃ－メチル－Ｄ－エリスリトールキナーゼ、２－Ｃ－メチル－Ｄ－エリスリトール－２、４－シクロジホスファート合成酵素、１－ヒドロキシ－２－メチル－２－（Ｅ）－ブテニル－４－ジホスファート合成酵素、ジメチルアリル－ジホスファート／イソペンテニル－ジホスファート：ＮＡＤ（Ｐ）$^{+}$酸化還元酵素、イソペンテニルジホスファート異性化酵素、およびこれらの組み合わせから選択される前記メチルエリトリトールホスファート経路の少なくとも１種の酵素をコードする１種または複数種の内在性または外来性遺伝子をさらに含む、請求項１に記載の非天然微生物生命体。

【請求項１５】

アセチル－ＣｏＡアセチルトランスフェラーゼ、３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリル－ＣｏＡ合成酵素、３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリル－ＣｏＡ還元酵素、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロナートデカルボキシラーゼ、イソペンテニル－ジホスファート異性化酵素およびこれらの組み合わせから選択される前記メバロナート経路の少なくとも１種の酵素をコードする１種または複数種の内在性または外来性遺伝子をさらに含む、請求項１に記載の非天然微生物生命体。

【請求項１６】

前記微生物生命体が、大腸菌である、請求項１に記載の非天然微生物生命体。

【請求項１７】

前記２－メチル－３－ブテン－２－オール合成酵素が、テルペン合成酵素である、請求項１に記載の非天然微生物生命体。

【請求項１８】

前記テルペン合成酵素が、リナロール合成酵素である、請求項１７に記載の非天然微生物生命体。

【請求項１９】

前記リナロール合成酵素が、クラーキア・ブレウェリ、シロイヌナズナ、セトエゴマ、Ｐｅｒｉｌｌａ　ｆｒｕｔｅｓｃａｎｓ、サルナシ、Ａｃｔｉｎｉｄｉａ　ｐｏｌｙｇａｍａ、クソニンジン、スイートバジル、またはウォーターミント由来である、請求項１８に記載の非天然微生物生命体。

【請求項２０】

前記テルペン合成酵素が、ネロリドール合成酵素である、請求項１７に記載の非天然微生物生命体。

【請求項２１】

前記メチルエリトリトールホスファート経路の前記少なくとも１種の酵素が、１－デオキシ－Ｄ－キシルロース－５－ホスファート合成酵素、１－デオキシ－Ｄ－キシルロース－５－ホスファートレダクトイソメラーゼ、４－ジホスホシチジル－２－Ｃ－メチル－Ｄ－エリスリトール合成酵素、４－ジホスホシチジル－２－Ｃ－メチル－Ｄ－エリスリトールキナーゼ、２－Ｃ－メチル－Ｄ－エリスリトール－２、４－シクロジホスファート合成酵素、１－ヒドロキシ－２－メチル－２－（Ｅ）－ブテニル－４－ジホスファート合成酵素、ジメチルアリル－ジホスファート／イソペンテニル－ジホスファート：ＮＡＤ（Ｐ）$^{+}$酸化還元酵素、イソペンテニルジホスファート異性化酵素、およびこれらの組み合わせから選択される、請求項２に記載の非天然微生物生命体。

【請求項２２】

前記メチルエリトリトールホスファート経路の前記少なくとも１種の酵素が、１－デオキシ－Ｄ－キシルロース－５－ホスファート合成酵素、１－デオキシ－Ｄ－キシルロース－５－ホスファートレダクトイソメラーゼおよびイソペンテニルジホスファート異性化酵素から選択される、請求項２１に記載の非天然微生物生命体。

【請求項２３】

前記メバロナート経路の前記少なくとも１種の酵素が、アセチル－ＣｏＡアセチルトランスフェラーゼ、３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリル－ＣｏＡ合成酵素、３－ヒドロ

キシ－３－メチルグルタリル－ＣｏＡ還元酵素、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロナートデカルボキシラーゼ、イソペンテニル－ジホスファート異性化酵素、およびこれらの組み合わせから選択される、請求項２に記載の非天然微生物生命体。

【請求項２４】

前記生物体が、３－メチル－２－ブテン－１－オール合成酵素、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素、および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素をコードする外来核酸を含み、さらに、任意選択で、イソプレンへの変換に有用な前記ジメチルアリルジホスファートが増加される、請求項１に記載の非天然微生物生命体。

【請求項２５】

前記生物体が、２－メチル－３－ブテン－２－オール合成酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素をコードする外来核酸を含み、さらに、任意選択で、イソプレンへの変換に有用な前記ジメチルアリルジホスファートが増加される、請求項１に記載の非天然微生物生命体。

【請求項２６】

イソプレンを生成する方法であって、炭素源を含む適切な培地中、前記非天然微生物が少なくとも一部の前記炭素源をイソプレンに変換するような条件下で請求項２４に記載の非天然微生物生命体を培養するステップ、および、任意選択で、前記イソプレンを回収するステップを含む方法。

【請求項２７】

イソプレンを生成する方法であって、炭素源を含む適切な培地中、前記非天然微生物が少なくとも一部の前記炭素源をイソプレンに変換するような条件下で請求項２５に記載の非天然微生物生命体を培養するステップ、および、任意選択で、前記イソプレンを回収するステップを含む方法。

【請求項２８】

ジメチルアリルジホスファートが、前記生物体により過剰発現され、かつ、メチルエリトリトールホスファート経路または前記メバロナート経路の少なくとも１種の酵素が、前記生物体により過剰発現されている、請求項２６に記載の方法。

【請求項２９】

ジメチルアリルジホスファートが、前記生物体により過剰発現され、かつ、前記メチルエリトリトールホスファート経路または前記メバロナート経路の少なくとも１種の酵素が、前記生物体により過剰発現されている、請求項２７に記載の方法。

【請求項３０】

前記ネロリドール合成酵素が、イチゴ由来である、請求項２０に記載の非天然微生物。

【請求項３１】

２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素、２－メチル－３－ブテン－２－オール合成酵素、３－メチル－２－ブテン－１－オール合成酵素およびこれらの任意の組み合わせから選択されるイソプレン生合成経路の少なくとも１種の酵素を含む酵素調製物であって、少なくとも１種のイソプレン生合成経路の反応を触媒できる酵素調製物。

【請求項３２】

少なくとも１種のイソプレン生合成経路の精製された酵素を含むか、または少なくとも１種のイソプレン生合成経路の酵素を含む細胞抽出物を含む、請求項３１に記載の酵素調製物。

【請求項３３】

前記イソプレン生合成経路が、３－メチル－２－ブテン－１－オール合成酵素によるジメチルアリルジホスファートの３－メチル－２－ブテン－１－オールへの変換、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素による３－メチル－２－ブテン－１－オールの２－メチル－３－ブテン－２－オールへの変換、および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素による２－メチル－３－ブテン－２－オールのイソプレンへの変換を含む３ス

テップを含む、請求項３２に記載の酵素調製物。

【請求項３４】

前記イソプレン生合成経路が、２－メチル－３－ブテン－２－オール合成酵素によるジメチルアリルジホスファートの２－メチル－３－ブテン－２－オールへの変換、および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素による２－メチル－３－ブテン－２－オールのイソプレンへの変換を含む２ステップを含む、請求項３２に記載の酵素調製物。

【請求項３５】

２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素をコードする外来核酸を含む非天然微生物生命体であって、前記２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素が、２－メチル－３－ブテン－２－オールをイソプレンに変換するのに十分なレベルで発現される非天然微生物生命体。

【請求項３６】

前記２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素が、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素活性をさらに含む二官能性酵素である、請求項３５に記載の非天然微生物生命体。

【請求項３７】

前記２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素が、リナロール脱水酵素－異性化酵素である、請求項３６に記載の非天然微生物生命体。

【請求項３８】

前記２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素が、Ｃａｓｔｅｌｌａｎｉｅｌｌａ　ｄｅｆｒａｇｒａｎｓ由来のリナロール脱水酵素－異性化酵素である、請求項３７に記載の非天然微生物生命体。

【請求項３９】

２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素をコードする外来核酸を含む非天然微生物生命体であって、前記２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素が、３－メチル－２－ブテン－１－オールを２－メチル－３－ブテン－２－オールに変換するのに十分なレベルで発現され、前記２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素が、２－メチル－３－ブテン－２－オールをイソプレンに変換するのに十分なレベルで発現される非天然微生物生命体。

【請求項４０】

前記２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素活性が、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素活性の両方を含む二官能性の酵素により触媒される、請求項３９に記載の非天然微生物生命体。

【請求項４１】

前記２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素活性が、リナロール脱水酵素－異性化酵素により触媒される、請求項４０に記載の非天然微生物生命体。

【請求項４２】

前記２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素活性が、Ｃａｓｔｅｌｌａｎｉｅｌｌａ　ｄｅｆｒａｇｒａｎｓ由来のリナロール脱水酵素－異性化酵素により触媒される、請求項４１に記載の非天然微生物生命体。

【請求項４３】

イソプレンを生成する方法であって、２－メチル－３－ブテン－２－オールを含む適切な培地中、前記非天然微生物生命体が少なくとも一部の前記２－メチル－３－ブテン－２－オールをイソプレンに変換するような条件下で、請求項３５または３９に記載の非天然微生物生命体を培養するステップ、および任意選択で、前記イソプレンを回収するステップ、を含む方法。

【請求項４４】

イソプレンを生成する方法であって、３－メチル－２－ブテン－１－オールを含む適切な培地中、前記非天然微生物生命体が少なくとも一部の前記３－メチル－２－ブテン－１－オールをイソプレンに変換するような条件下で、請求項３９に記載の非天然微生物生命体を培養するステップ、および任意選択で、前記イソプレンを回収するステップを含む方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、２０１３年3月１１日出願の米国特許仮出願第６１／７７６，４８５号、および２０１２年5月１６日出願の米国特許仮出願第６１／６８８，５１４号の利益を主張する。上記出願の全教示は、参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本開示は、広義には、イソプレンの生産のための非天然微生物の使用に関する。さらに具体的には、本開示は、異なるアルコール、特に、３－メチル－２－ブテン－１－オールまたは２－メチル－３－ブテン－２－オールからのイソプレンを生成可能にする酵素を発現するように改変された非天然微生物に関する。
【背景技術】
【０００３】
発明の背景
最近では、主として石油や天然ガスなどの炭化水素から多くの高価値化学薬品または燃料が熱化学プロセスにより生産されている。また、高価値化学薬品が、原油を使用可能留分へ処理する際の「副産物」として生産される場合もある。例えば、イソプレンは、主に、原油留分の接触分解の際に生産されてきた。しかし、近年、接触分解装置のユーザーが注力を原油から天然ガスに移したために、原油中に存在するが天然ガス中には存在しない４および５炭素鎖分子の供給源が減少してしまった。
【０００４】
短鎖炭素分子であるために、イソプレンは、種々の化学薬品合成用の出発材料として有用である。イソプレンは、高価値ポリマー生産用のモノマーまたはコモノマーとして使用できる。イソプレンを使って生産できる化学薬品の例には、ポリイソプレン、ポリブチレン、スチレン－イソプレン－スチレンブロックコポリマー、などが含まれる。イソプレンを使う産業の一例は、合成ゴム産業である。
【０００５】
イソプレンの増えている需要、減少している供給および多くの用途を考慮すれば、イソプレン生産の新規方法が望まれる。また、エネルギー保証、オイルおよび天然ガス価格の高騰、ならびに地球温暖化に対する懸念がますます高まっていることを理由に、化学製品製造産業は、環境に優しい手法を使って、再生不可能な供給原料から作られる化学薬品を再生能な供給原料から作られる化学薬品で置き換えることを模索している。
【０００６】
イソプレンの生物学的生産は、１９５０年代から研究されている（Ｓｈａｒｋｅｙ，Ｔ．Ｄ．２００９．Ｔｈｅ　Ｆｕｔｕｒｅ　ｏｆ　Ｉｓｏｐｒｅｎｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ．Ｂｕｌｌ．Ｇｅｏｒｇ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．３：１０６－１１３）。イソプレンを放出する多くの異なる生物が知られているが、従来、イソプレン生成に対する生化学的経路は、少数の植物種で明らかになっているに過ぎない。植物では、イソプレンは、ジメチルアリルジホスファート（本明細書ではジメチルアリルピロホスファート（ＤＭＡＰＰ）とも呼ばれる）から、葉緑体または他の色素体中で、色素体ターゲティングシグナル配列により色素体に向けられる核内コード化酵素のイソプレン合成酵素により単一ステップで生成されると考えられる。イソプレン合成酵素は、通常、典型的には、１ミリモル以上の高いミカエリスメンテン定数（$K_m$）を有するため、効率的に機能させるには高濃度

のジメチルアリルジホスファートが必要である。

【０００７】

天然でイソプレンを生成する微生物が当技術分野で知られている（Ｋｕｚｍａ，Ｊ．，Ｎｅｍｅｃｅｋ－Ｍａｒｓｈａｌｌ，Ｍ．，Ｐｏｌｌｏｃｋ，Ｗ．Ｈ．，ａｎｄ Ｒ．Ｆａｌｌ．１９９５．Ｂａｃｔｅｒｉａ ｐｒｏｄｕｃｅ ｔｈｅ ｖｏｌａｔｉｌｅ ｈｙｄｒｏｃａｒｂｏｎ ｉｓｏｐｒｅｎｅ．Ｃｕｒｒ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３０：９７－１０３；Ｗａｇｎｅｒ，Ｗ．Ｐ．，Ｎｅｍｅｃｅｋ－Ｍａｒｓｈａｌｌ，Ｍ．，ａｎｄ Ｒ．Ｆａｌｌ．１９９９．Ｔｈｒｅｅ ｄｉｓｔｉｎｃｔ ｐｈａｓｅｓ ｏｆ ｉｓｏｐｒｅｎｅ ｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｄｕｒｉｎｇ ｇｒｏｗｔｈ ａｎｄ ｓｐｏｒｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ．Ｊ．Ｂａｃｔ．１８１：４７００－４７０３；Ｆａｌｌ，Ｒ．ａｎｄ Ｓ．Ｄ．Ｃｏｐｌｅｙ．２０００．Ｂａｃｔｅｒｉａｌ ｓｏｕｒｃｅｓ ａｎｄ ｓｉｎｋｓ ｏｆ ｉｓｏｐｒｅｎｅ，ａ ｒｅａｃｔｉｖｅ ａｔｍｏｓｐｈｅｒｉｃ ｈｙｄｒｏｃａｒｂｏｎ．Ｅｎｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２：１２３－１３０；Ｘｕｅ，Ｊ．，ａｎｄ Ｂ．Ｋ．Ａｈｒｉｎｇ．２０１１．Ｅｎｈａｎｃｉｎｇ ｉｓｏｐｒｅｎｅ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｂｙ ｔｈｅ ｇｅｎｅｔｉｃ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ １－ｄｅｏｘｙ－Ｄ－ｘｙｌｕｌｏｓｅ－５－ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｐａｔｈｗａｙ ｉｎ Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ．Ａｐｐｌ．Ｅｎｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．７７：２３９９－２４０５）が、しかし、イソプレン生成機序は未知であり、イソプレンの生成レベルは、比較的低い。いくつかの非天然微生物がイソプレンを生成するように操作されており、例えば、米国特許出願第１２／３３５，０７１号では、イソプレンの生成にはイソプレン合成酵素が必要である。イソプレン合成酵素の効率的な作用のためにジメチルアリルジホスファートの高い細胞内のレベルが必要であるが、しかし、高レベルの細胞内ジメチルアリルジホスファートは、細胞に対し有毒でもあり、増殖を妨げ、イソプレン生成速度と収率を低下させる（Ｍａｒｔｉｎ，Ｖ．Ｊ．Ｊ．，Ｐｉｔｅｒａ，Ｄ．Ｊ．，Ｗｉｔｈｅｒｓ，Ｓ．Ｔ．，Ｎｅｗｍａｎ，Ｊ．Ｄ．ａｎｄ Ｊ．Ｄ．Ｋｅａｓｌｉｎｇ．２００３．Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ａ ｍｅｖａｌｏｎａｔｅ ｐａｔｈｗａｙ ｉｎ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｆｏｒ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ｔｅｒｐｅｎｏｉｄｓ．Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．２１：７９６－８０２；Ｗｉｔｈｅｒｓ，Ｓ．Ｔ．，Ｇｏｔｔｌｉｅｂ，Ｓ．Ｓ．，Ｌｉｅｕ，Ｂ．，Ｎｅｗｍａｎ，Ｊ．Ｄ．，ａｎｄ Ｊ．Ｄ．Ｋｅａｓｌｉｎｇ．２００７．Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｉｓｏｐｅｎｔｅｎｏｌ ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｔｉｃ ｇｅｎｅｓ ｆｒｏｍ Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ ｂｙ ａ ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ｍｅｔｈｏｄ ｂａｓｅｄ ｏｎ ｉｓｏｐｒｅｎｏｉｄ ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ ｔｏｘｉｃｉｔｙ．Ａｐｐｌ．Ｅｎｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．７３：６２７７－７２８３；Ｓｉｖｙ，Ｔ．Ｌ．，Ｆａｌｌ，Ｒ．，ａｎｄ Ｔ．Ｎ．Ｒｏｓｅｎｔｉｅｌ．２０１１．Ｅｖｉｄｅｎｃｅ ｏｆ ｉｓｏｐｒｅｎｏｉｄ ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ ｔｏｘｉｃｉｔｙ ｉｎ Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ．Ｂｉｏｓｃｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．７５：２３７６－２３８３）。イソプレン合成酵素によるＤＭＡＰＰからイソプレンへの直接化学的変換に付随する問題により、商業的に適する量のイソプレンの生物学的生産に対する可能性が制限される。

【０００８】

このように、より効率的な生物学的なイソプレン生産のための微生物およびプロセスが必要とされている。

【発明の概要】

【０００９】

本発明の実施形態は、広義には、イソプレン生産用酵素、非天然微生物、および方法を提供する。

【００１０】

本発明の実施形態は、非天然微生物生命体、すなわち、生合成イソプレン経路を含む微生物を提供する。微生物は、生合成経路の酵素をコードする外来核酸を含む。酵素は、２

－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素であり、生合成経路は、イソプレンの生成に十分な量で発現される。生合成経路は、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素をさらに含んでもよい。２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素は、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素活性も同時に備えた二官能性酵素の一部であってもよい。このような二官能性の酵素の一例は、リナロール脱水酵素－異性化酵素である。微生物は、３－メチル－２－ブテン－１－オール合成酵素をさらに含んでもよい。

【００１１】

別の実施形態では、生合成イソプレン経路を含む非天然微生物が提供され、微生物は、生合成イソプレン経路の酵素をコードする外来核酸の２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素を含む。経路は、２－メチル－３－ブテン－２－オール合成酵素をさらに含み、経路は、イソプレンの生成のために十分な量で発現される。

【００１２】

一実施形態では、本発明は、少なくとも１種または複数種のイソプレン生合成経路の１種または複数種の酵素をコードする外来核酸を含む非天然微生物を提供し、イソプレン生合成経路の１種または複数種の酵素は、イソプレンの生成のために十分な量で発現され、前記イソプレン生合成経路は、３－メチル－２－ブテン－１－オール合成酵素、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素、および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素を含む。

【００１３】

別の実施形態では、本発明は、少なくとも１種または複数種のイソプレン生合成経路の１種または複数種の酵素をコードする外来核酸を含む非天然微生物を提供し、１種または複数種のイソプレン生合成経路の酵素は、イソプレンの生成のために十分な量で発現され、前記イソプレン生合成経路は、２－メチル－３－ブテン－２－オール合成酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素を含む。

【００１４】

さらなる実施形態では、本発明は、イソプレンを生成する方法を提供し、この方法は、炭素源を含む適切な培地中、非天然微生物が少なくとも一部の炭素源をイソプレンに変換する条件下で、１種または複数種のイソプレン生合成経路の酵素をコードする少なくとも１種または複数種の外来核酸を含む非天然微生物生命体を培養するステップであって、１種または複数種のイソプレン生合成経路の酵素がイソプレンの生成のために十分な量で発現されるステップ、およびイソプレンを回収するステップを含む。

【００１５】

上記本開示の特徴が詳細に理解できるように、実施形態を参照しながら上記で簡単に要約された本開示のさらに具体的な説明が行われる。また、その説明の一部は、添付図に示される。しかし、添付図は本発明の代表的な実施形態を例示するのみであり、従って、本発明が他の等価な効果のある実施形態を許容できるという理由から、この添付図が本発明の範囲を限定するものと見なされるべきではないことに留意されたい。

【図面の簡単な説明】

【００１６】

【図１】３－メチル－２－ブテン－１－オール合成酵素、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素、および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素を含むイソプレン生合成経路を示す図である。

【図２】２－メチル－３－ブテン－２－オール合成酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素を含むイソプレン生合成経路を示す図である。

【図３】Ｃａｓｔｅｌｌａｎｉｅｌｌａ　ｄｅｆｒａｇｒａｎｓ株６５Ｐｈｅｎのリナロール脱水酵素－異性化酵素のための、人工リボソーム結合部位およびアミノ末端６－ヒスチジンエピトープタグを含む大腸菌コドン最適化核酸配列（配列番号１）を示す図である。

【図４】ストロベリーアルコールアシル転移酵素のための、人工リボソーム結合部位およびアミノ末端６－ヒスチジンエピトープタグを含む大腸菌コドン最適化核酸配列（配列番

号２）を示す図である。
【図５】ＬＢ培地に溶解した１ｍＭの３－メチル－２－ブテン－１－オールを含む２０ｍｌバイアルのヘッドスペースの１ｍｌの試料のガスクロマトグラムの図である。ピーク１は、保持時間３．９６分の３－メチル－２－ブテン－１－オールである。
【図６】１００μｇ／ｍｌのアンピシリンで補充したＬＢ培地中で１ｍＭの３－メチル－２－ブテン－１－オールと共に一晩培養したプラスミドｐＪ４０４－ＬＤＩ含有大腸菌株ＢＬ２１を含む２０ｍｌバイアルのヘッドスペースの１ｍｌの試料のガスクロマトグラムの図である。ピーク１は、３．９６分の保持時間の３－メチル－２－ブテン－１－オールである。ピーク２は、２．９６分の保持時間の２－メチル－３－ブテン－２－オールである。ピーク３は、２．４９分の保持時間のイソプレンである。
【図７】ＬＢ培地に溶解した１ｍＭの２－メチル－３－ブテン－２－オールを含む２０ｍｌのヘッドスペースの１ｍｌの試料のガスクロマトグラムの図である。ピーク１は、２．９６分の保持時間の２－メチル－３－ブテン－２－オールである。
【図８】１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを補充したＬＢ培地中の１ｍＭの２－メチル－３－ブテン－２－オールと共に一晩培養したプラスミドｐＪ４０４－ＬＤＩ含有大腸菌株ＢＬ２１を含む２０ミリリットルバイアルのヘッドスペースの１ｍｌの試料のガスクロマトグラムの図である。ピーク１は、２．９６分の保持時間の２－メチル－３－ブテン－２－オールである。ピーク２は、２．４９分の保持時間のイソプレンである。
【図９】基準イソプレンのＧＣ／ＭＳ分析の結果を示す図である。
【図１０】実施例１の２．４９分のピークのＧＣ／ＭＳ分析の結果の図である。イソプレンのピークと同じである事が確認できる。
【図１１】枯草菌ｙｈｆＲ遺伝子のための人工リボソーム結合部位を含む大腸菌コドン最適化核酸配列（配列番号３）の図である。
【図１２】ストロベリー由来のＦａＮＥＳ１およびＨ．ｐｌｕｖｉａｌｉｓ由来のｉｄｉをコードする合成オペロンのための、人工結合部位およびサブクローニング用制限エンドヌクレアーゼ部位を含む大腸菌コドン最適化ヌクレオチド配列（配列番号４）の図である。
【図１３】ＬＢ培地に溶解した１ｍＭのリナロールを含む２０ｍｌバイアルのヘッドスペースの１ｍｌの試料のガスクロマトグラムを示す図である。ピーク１は、８．８分の保持時間のリナロールである。
【図１４】リナロールの検出に使用したのと同じカラム条件下でＬＢ培地に溶解した１ｍＭの２－メチル－３－ブテン－２－オールを含む２０ｍｌバイアルのヘッドスペースの１ｍｌの試料のガスクロマトグラムを示す図である。ピーク１は、４．８分の保持時間の２－メチル－３－ブテン－２－オールである。
【図１５】５０μｇ／ｍｌのカナマイシンおよび１００μＭのＩＰＴＧを補充したＬＢ培地中で２４時間培養したプラスミドｐＪ４０１－ＮＥＳ１－ｉｄｉ含有大腸菌ＢＬ２１を含む２０ｍｌバイアルのヘッドスペースの１ｍｌの試料のガスクロマトグラムを示す図である。ピーク１は、８．８分の保持時間のリナロールである。ピーク２は、４．８分の保持時間の２－メチル－３－ブテン－２－オールである。４．７５分のピークは、２－ブタノンと同定された。
【図１６】１００μｇ／ｍｌのアンピシリンおよび１００μＭのＩＰＴＧを補充したＬＢ培地中で２４時間培養したプラスミドｐＪ４０４－ＳＡＡＴ含有大腸菌ＢＬ２１を含む２０ｍｌバイアルのヘッドスペースの１ｍｌの試料のガスクロマトグラムを示す図である。リナロールおよび２－メチル－３－ブテン－２－オールに対応するピークは存在しない。４．７５分のピークは、２－ブタノンと同定された。
【図１７】基準リナロールのＧＣ／ＭＳ分析の結果を示す図である。
【図１８】図１５の８．８分のピークのＧＣ／ＭＳ分析の結果を示す図である。リナロールのピークと同じである事が確認できる。
【図１９】基準２－メチル－３－ブテン－２－オールのＧＣ／ＭＳ分析の結果を示す図である。

【図２０】図１５の４．９分のピークのＧＣ／ＭＳ分析の結果を示す図である。２－メチル－３－ブテン－２－オールのピークと同じである事が確認できる。
【図２１】プラスミドｐＧＡ３１Ｒ－ｍｃｓのＤＮＡ配列（配列番号５）を示す図である。
【図２２】プラスミドｐＧＳ３１Ｒ－ｍｃｓのＤＮＡ配列（配列番号６）を示す図である。
【図２３】その後のクローニングステップで使われる組み込まれたリボソーム結合部位および隣接の制限エンドヌクレアーゼ部位を含むフェカリス菌ＡＴＣＣ７００８０２のｍｖａＥおよびｍｖａＳ遺伝子の大腸菌コドン最適化配列（配列番号７）を示す図である。
【図２４】その後のクローニングステップで使われる組み込まれたリボソーム結合部位および隣接の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む、タノカルドコックス・ヤンナスキイのメバロン酸キナーゼ遺伝子、フェカリス菌ＡＴＣＣ７００８０２のホスホメバロン酸キナーゼ遺伝子、出芽酵母Ｓ２８８Ｃのメバロン酸ジホスファートデカルボキシラーゼ遺伝子、および大腸菌ＭＧ１６５５のイソペンテニルジホスファート異性化酵素遺伝子をコードする合成オペロンの大腸菌コドン最適化配列（配列番号８）を示す図である。
【図２５】プラスミドｐＧＢ１０２６の生成のためのクローニング方法を示す図である。
【図２６】プラスミドｐＧＢ１０３３の生成のためのクローニング方法を示す図である。
【図２７】プラスミドｐＧＢ１０３６の生成のためのクローニング方法を示す図である。
【図２８】５０μｇ／ｍｌカナマイシン、２０μｇ／ｍｌクロラムフェニコール、および２００μｇ／ｍｌアンヒドロテトラサイクリンを補充したＬＢ培地中で２４時間培養したプラスミドｐＪ４０１－ＮＥＳ１－ｉｄｉおよびｐＧＢ１０３６含有大腸菌ＢＬ２１を含む２０ｍｌのバイアルのヘッドスペースの１ｍｌの試料のガスクロマトグラムを示す図である。ピーク１は、８．８分の保持時間のリナロールである。ピーク２は、４．８分の保持時間の２－メチル－３－ブテン－２－オールである。４．７５分のピークは、２－ブタノンと同定された。
【図２９】６００ナノメーターの吸光度として測定した細胞密度、発酵培地中の２－メチル－３－ブテン－２－オールの濃度（ｍＭ）、および０～４８時間にわたりオンラインガス質量分析で測定した発酵オフガスのイソプレン含量のグラフを示す図である。
【図３０】６００ナノメーターの吸光度として測定した細胞密度、発酵培地中の２－メチル－３－ブテン－２－オールの濃度（ｍＭ）、および０～４８時間にわたりオンラインガス質量分析で測定した発酵オフガスのイソプレン含量のグラフを示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００１７】
前述の一般説明および以下の詳細説明の両方は、代表的で、説明のみの目的のためであり、請求項に係る発明を制限するものではないことを理解されたい。この出願では、特に記載のない限り、単数形の単語は、複数形の単語を含み、単語の「ａ」または「ａｎ」は、「少なくとも１つ（ａｔ　ｌｅａｓｔ　ｏｎｅ）」を意味し、「または（ｏｒ）」の使用は、「および／または（ａｎｄ／ｏｒ）」を意味する。さらに、用語「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、ならびに、他の形、例えば、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」および「含まれる（ｉｎｃｌｕｄｅｄ）」の使用は、限定を意味しない。また、「要素（ｅｌｅｍｅｎｔ）」または「成分（ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ）」などの用語は、特に記載のない限り、１つの単位を含む要素または成分、および２つ以上の単位を含む要素または成分の両方を包含する。
【００１８】
本明細書で使われるセクション見出しは、構成上の目的のみのためであり、記載主題を限定するものと解釈されるべきではない。限定されないが、特許、特許出願、論文、本、および論説を含む本出願に引用された全ての文書、または文書の一部は、あらゆる目的に対して、本明細書での参照によりその全体が明示的に本明細書に組み込まれる。組み込まれた文献および類似の資料の１種または複数種で、本出願中のその用語の定義と矛盾するように用語を定義している場合には、本出願が優先する。

【００１９】
本明細書で使われる用語の「非天然」は、本発明の微生物生命体または微生物に関連して使用される場合、微生物生命体が参照種の天然株には認められない少なくとも１種の遺伝的変化を有することの意味であることが意図されている。これには、参照種の野性型株を含む。遺伝的変化には、例えば、代謝ポリペプチド、他の核酸付加物、核酸欠失および／または微生物の遺伝的物質のその他の機能的破壊をコードする発現可能な核酸を導入する改変が含まれる。このような改変は、例えば、参照種に対して異種の、相同または異種および相同両方のポリペプチドのコード領域およびその機能性断片を含む。さらなる改変は、例えば、改変が遺伝子またはオペロンの発現を変える非コード調節領域を含む。代表的代謝ポリペプチドは、グリセロール異化またはイソプレン生合成経路内の酵素またはタンパク質を含む。本明細書で定義されるように「イソプレン生合成経路」は、経路、例えば、一連の１種または複数種の酵素または生物体による、すなわち、生物学的なイソプレンの生成に関与する活性を含み、この場合、１種または複数種のこれらの酵素または活性が生物体に対し外来性である。

【００２０】
代謝改変は、その天然状態から変えられた生化学的反応を意味する。従って、代謝ポリペプチドまたはその機能性断片をコードする非天然微生物の核酸に対し遺伝子組換えを行うことができる。代表的な代謝改変は、本明細書で開示される。

【００２１】
本明細書で使われる用語の「単離された」は、微生物生命体に関連して使用される場合、天然に認められる参照微生物生命体に比べて、少なくとも１種の成分を実質的に含まない生物体を意味することが意図されている。この用語は、天然の環境で認められるものの一部または全ての成分から取り出されている微生物生命体を含む。また、この用語は、非天然環境で認められるものの一部または全ての成分から取り出されている微生物生命体を含む。従って、単離微生物生命体は、天然に認められるか、または非天然環境で培養され、貯蔵され、もしくは存続させられている他の物質から部分的にまたは完全に分離されている。単離微生物生命体の具体的な例には、部分的に純粋な微生物、実質的に純粋な微生物および非天然の培地中で培養された微生物が含まれる。

【００２２】
本明細書で使用される用語の「微生物（ｍｉｃｒｏｂｅ）」、「微生物の（ｍｉｃｒｏｂｉａｌ）」、「微生物生命体（ｍｉｃｒｏｂｉａｌ　ｏｒｇａｎｉｓｍ）」または「微生物（ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍ）」は、古細菌、細菌または真核生物のドメイン内に含まれる顕微鏡的細胞として存在する任意の生物体を意味することが意図されている。従って、この用語は、顕微鏡的大きさの原核細胞または真核細胞または生物を包含し、全種類の細菌、古細菌および真正細菌、ならびに酵母および真菌などの真核生物微生物を含むことが意図されている。また、この用語は、生化学的生成のために培養できる任意の種の細胞培養物も含む。

【００２３】
本明細書で使われる「外来性の」は、参照分子または参照活性が宿主微生物生命体に導入されることを意味することが意図されている。分子は、例えば、宿主染色体への組込みなどのコード核酸の宿主遺伝的物質中への導入により、またはプラスミドなどの非染色体遺伝的物質として導入できる。従って、コード核酸の発現に関連して使用されるこの用語は、発現可能な形態での微生物生命体へのコード核酸の導入を意味する。生合成活性に関連して使用される場合は、この用語は、参照宿主生物体中へ導入される活性を意味する。元の物質は、宿主微生物生命体への導入後、参照活性を発現する、例えば、相同または異種のコード核酸であってもよい。従って、用語の「内在性」は、宿主中に存在する参照分子または活性を意味する。同様に、この用語は、コード核酸の発現に関連して使用される場合、微生物生命体内に含まれるコード核酸の発現を意味する。用語の「異種の」は、参照種以外の元の物質由来の分子または活性を意味し、他方、「相同」は、宿主微生物生命体由来の分子または活性を意味する。従って、本発明のコード核酸の外来性発現は、異種ま

たは相同コード核酸の片方または両方を利用できる。
【００２４】
本発明の非天然微生物生命体は、安定な遺伝的変化を得ることができ、変化の消失なしに５世代を超えて培養できる微生物を意味する。通常、安定な遺伝的変化は、１０世代を超えて持続する改変を含み、特に、安定な改変は、約２５世代を超えて持続し、さらに特別な場合には、安定な遺伝子組換えは５０世代を超え、無期限の長い間持続する場合も含まれるであろう。
【００２５】
当業者なら、本明細書で例示される代謝改変を含む遺伝的変化は、大腸菌などの適切な宿主生物体および対応するそれらの代謝反応、または所望の代謝経路に対する遺伝子などの所望の遺伝的物質のための適切な元の生物体に関連して記載されることを理解するであろう。しかし、各種生物の完全なゲノムシーケンシングおよびゲノム科学領域での高レベルの技術を考慮すれば、当業者なら、本明細書で提供される教示および手引きを実質的に全ての他の生物に容易に適用できるであろう。例えば、本明細書で例示される大腸菌代謝変化は、参照種以外の種から同じまたは相似のコード核酸を組み込むことにより、他の種に容易に適用できる。このような遺伝的変化は、例えば、一般的に、種相同体の遺伝的変化、および、特に、オーソログ、パラログまたは非オーソロガス遺伝子置換を含む。
【００２６】
オーソログは、直系により関係する遺伝子または複数遺伝子であり、異なる生物での実質的に同じまたは等価の機能の原因である。例えば、マウスエポキシド加水分解酵素およびヒトエポキシド加水分解酵素は、エポキシドの加水分解の生物学的機能に関してオーソログと見なすことができる。例えば、十分な量の配列類似性を共有して相同であることを示す場合、遺伝子は直系により関連付けられるか、または共通の先祖からの進化によって関連付けられる。また、遺伝子がコードするタンパク質が、一次配列の類似性が特定可能ではない程度に共通の先祖から進化したことを示すのに十分な量の３次元構造（配列の類似性は必ずしも必要ではない）を共有する場合、その遺伝子は、オーソログであると見なすことができる。オーソロガスである遺伝子は、約２５％～１００％の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できる。コードするそれらの３次元構造もまた類似性を示す場合、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は、また、直系により生じたと見なすことができる。組織プラスミノーゲンアクチベーターおよびエラスターゼを含むセリンプロテアーゼ酵素ファミリーのメンバーは、共通の先祖から直系により生じたと見なされる。
【００２７】
オーソログには、例えば、進化により構造または全体活性が分岐した遺伝子またはそれらのコード化遺伝子産物が含まれる。例えば、１つの種が２つの機能を示す遺伝子産物をコードする場合で、このような機能が第２の種の異なる遺伝子中に分配される場合、３つの遺伝子およびそれらの対応する産物は、オーソログと見なされる。生化学的産物の生成の場合に、導入されるか、または破壊される代謝活性を含むオーソロガス遺伝子は、非天然微生物の作成用に選択されることになることを当業者なら理解するであろう。分離可能活性を示すオーソログの一例は、異なる活性が、２種以上の種の間で、または単一種内で異なる遺伝子産物中に分配された場合である。具体的な例は、２つのタイプのセリンプロテアーゼ活性であるエラスターゼタンパク質分解およびプラスミノーゲンタンパク質分解の、プラスミノーゲン活性化因子およびエラスターゼとして異なる分子中への分離である。２つ目の例は、マイコプラズマ５’－３’エキソヌクレアーゼおよびショウジョウバエＤＮＡポリメラーゼＩＩＩ活性の分離である。第１の種由来のＤＮＡポリメラーゼは、第２の種由来のエキソヌクレアーゼまたはポリメラーゼとオーソログであると見なすことができ、逆もまた同じである。
【００２８】
対照的に、パラログは、構造または祖先により関連付けられるが、異なる機能を有する相同体である。これらは、例えば、遺伝子の複製とそれに続く進化的分岐を行い、類似ま

たは共通であるが同等ではない機能を有するタンパク質を生成することにより生じる可能性がある。パラログは、同じ種または異なる種が起源であるか、またはそれ由来であり得る。例えば、ミクロソームエポキシド加水分解酵素（エポキシド加水分解酵素Ｉ）および可溶性エポキシド加水分解酵素（エポキシド加水分解酵素ＩＩ）は、パラログであると見なすことができる。理由は、同じ種で異なる反応を触媒し、異なる機能を有する共通の先祖から同時進化した２つの異なる酵素であるためである。パラログは、相同であるか、または共通の先祖からの同時進化により関連付けられることを示唆する相互にかなりの配列類似性を有する同じ種由来のタンパク質である。パラロガスタンパク質ファミリーグループには、ＨｉｐＡ相同体、ルシフェラーゼ遺伝子、ペプチダーゼ、などが挙げられる。

【００２９】

非オーソロガス遺伝子置換は、異なる種中の参照遺伝子機能を置換できる１つの種由来の非オーソロガス遺伝子による置換である。置換は、例えば、異なる種中の参照機能に比べて、元の種と実質的に同じまたは類似の機能を行うことができることを含む。通常、非オーソロガス遺伝子置換は、参照機能をコードする既知の遺伝子に構造的に関連するとして特定できるが、本明細書で使われるように、構造的関連性は少ないが機能的に類似の遺伝子およびそれらの対応する遺伝子産物の場合でも、まだこの用語の意味に含まれる。機能的類似性には、置換しようとしている機能をコードする遺伝子に比べて、非オーソロガス遺伝子産物の活性部位または結合領域の少なくともいくつかの構造的類似性が必要である。従って、非オーソロガス遺伝子の例には、パラログまたは非関連遺伝子が含まれる。

【００３０】

従って、本発明のイソプレン生合成経路を有する非天然微生物生命体の特定および作成では、当業者なら、本明細書で提供される教示および手引きを特定の種に適用して、代謝改変の特定がオーソログの特定および包含または不活性化を含んでもよいことを理解するであろう。パラログ、および／または非オーソロガス遺伝子置換が、類似のまたは実質的に類似の代謝反応を触媒する酵素をコードする参照微生物中に存在する限りにおいて、当業者なら、また、これらの進化的に関連する遺伝子を利用できる。オーソログ、パラログおよび非オーソロガス遺伝子置換は、当業者によく知られた方法により測定できる。本明細書で定義されるように、生物体「に由来する」と記載または請求される酵素または遺伝子は、実質的に類似の活性を有する任意の相同体、パラログ、非オーソロガス遺伝子置換を含む。

【００３１】

本明細書で開示の微生物を培養または生成するために利用される方法および技術は、微生物学的および組換えＤＮＡ技術を訓練された熟練作業者には既知である。微生物（例えば、細菌性細胞）の培養、単離ＤＮＡ分子の宿主細胞中への移送、および単離、単離核酸分子のクローニングおよびシーケンシング、特定の遺伝子発現のノックアウト、などのための方法および技術は、このような技術および方法の例である。これらの方法は、下記の標準的文献の多くの項目に記載されている（これらは、その全体が本明細書に組み込まれる）：「Ｂａｓｉｃ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ」（Ｄａｖｉｓ，ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ．ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ　Ｐｒｏｆｅｓｓｉｏｎａｌ，Ｃｏｌｕｍｂｕｓ，ＯＨ，１９８６）；Ｍｉｌｌｅｒ，「Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ」（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，１９７２）；Ｍｉｌｌｅｒ，「Ａ　Ｓｈｏｒｔ　Ｃｏｕｒｓｅ　ｉｎ　Ｂａｃｔｅｒｉａｌ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ」（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，１９９２）；Ｓｉｎｇｅｒ　ａｎｄ　Ｂｅｒｇ，「Ｇｅｎｅｓ　ａｎｄ　Ｇｅｎｏｍｅｓ」（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｂｏｏｋｓ，Ｍｉｌｌ　Ｖａｌｌｅｙ，ＣＡ，１９９１）；「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，」２$^{ｎｄ}$　Ｅｄ．（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂ

or, NY, 1989)；「Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine」(Kaufman, et al., eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1995)；「Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology」(Glick and Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1993)；およびSmith－Keary,「Molecular Genetics of Escherichia coli」(The Guilford Press, New York, NY, 1989)。

【００３２】

イソプレン合成酵素によるジメチルアリルジホスファートからイソプレンへの直接変換が当技術分野で知られているが、我々は、また、Castellaniella defragrans株６５Phenから単離された酵素であるリナロール脱水酵素－異性化酵素を使って、イソプレンが２種の異なるアルコールである３－メチル－２－ブテン－１－オールおよび２－メチル－３－ブテン－２－オールからも生成できることを示した（実施例１および実施例２ならびに図６および８を参照）。場合によっては、イソプレンおよび酸素の種々の混合物が可燃性になることもあるので、酸素が無い状態でイソプレンを生成するのが望ましいであろう。また、リナロール脱水酵素－異性化酵素は、低酸素または無酸素条件下での外来性の２－メチル－３－ブテン－２－オールまたは３－メチル－２－ブテン－１－オールのイソプレンへの酵素変換のための生体触媒および方法の進展を可能とする。外来性の２－メチル－３－ブテン－２－オールのイソプレンへの酵素変換は、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素を発現する非天然微生物生命体を使って行うことができ（実施例９）、または変換は、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素を含む酵素調製物を使って行うことができる（実施例７）。外来性の３－メチル－２－ブテン－１－オールのイソプレンへの酵素変換は、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素を発現する非天然微生物生命体を使って行うことができ（実施例１０）、または変換は、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素を含む酵素調製物を使って行うことができる（実施例８）。

【００３３】

一実施形態では、本発明の非天然微生物生命体は、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素をコードする外来核酸を含み、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素は、２－メチル－３－ブテン－２－オールをイソプレンに変換するのに十分なレベルで発現される。一実施形態では、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素は、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素活性をさらに含む二官能性の酵素である。一実施形態では、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素は、リナロール脱水酵素－異性化酵素である。一実施形態では、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素は、Castellaniella defragrans由来のリナロール脱水酵素－異性化酵素である。

【００３４】

一実施形態では、本発明の非天然微生物生命体は、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素をコードする外来核酸を含み、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素は、３－メチル－２－ブテン－１－オールを２－メチル－３－ブテン－２－オールに変換するのに十分なレベルで発現され、また、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素は、２－メチル－３－ブテン－２－オールをイソプレンに変換するのに十分なレベルで発現される。一実施形態では、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素活性は、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素活性の両方を含む二官能性酵素で触媒される。一実施形態では、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン

－２－オール脱水酵素活性は、リナロール脱水酵素－異性化酵素により触媒される。一実施形態では、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素活性は、Ｃａｓｔｅｌｌａｎｉｅｌｌａ　ｄｅｆｒａｇｒａｎｓ由来のリナロール脱水酵素－異性化酵素により触媒される。

【００３５】

一実施形態では、本発明は、イソプレンを生成する方法を提供し、この方法は、２－メチル－３－ブテン－２－オールを含む適切な培地中、非天然微生物生命体が２－メチル－３－ブテン－２－オールの少なくとも一部をイソプレンに変換する条件下で、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素をコードする外来核酸を含む本発明の非天然微生物生命体を培養するステップ、および任意選択で、イソプレンを回収するステップを含む。一実施形態では、本発明は、イソプレンを生成する方法を提供し、この方法は、３－メチル－２－ブテン－１－オールを含む適切な培地中、非天然微生物生命体が３－メチル－２－ブテン－１－オールの少なくとも一部をイソプレンに変換する条件下で、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素をコードする外来核酸を含む本発明の非天然微生物生命体を培養するステップ、および任意選択で、イソプレンを回収するステップを含む。

【００３６】

リナロール脱水酵素－異性化酵素は、ＤＭＡＰＰのイソプレンへの変換のための新規生合成経路の２または３ステップによる進展を可能とする。２ステップイソプレン生合成経路では、２－メチル－３－ブテン－２－オール合成酵素などの酵素により、ジメチルアリルジホスファートが２－メチル－３－ブテン－２－オールに変換され、続けて、２－メチル－３－ブテン－２－オールからイソプレンへ変換される。３ステップイソプレン生合成経路では、ジメチルアリルジホスファートを３－メチル－２－ブテン－１－オールに変換できるホスファターゼまたはテルペン合成酵素により、ジメチルアリルジホスファートが３－メチル－２－ブテン－１－オールに変換され、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素により、３－メチル－２－ブテン－１－オールが２－メチル－３－ブテン－２－オールに変換され、さらに、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素により２－メチル－３－ブテン－２－オールがイソプレンに変換される。実施例１および実施例２で示されるように、Ｃａｓｔｅｌｌａｎｉｅｌｌａ　ｄｅｆｒａｇｒａｎｓリナロール脱水酵素－異性化酵素は、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素の両方として機能する。

【００３７】

３ステップイソプレン生合成経路および２ステップイソプレン生合成経路の両方は、検出可能な量でイソプレンを生成するのに十分なレベルで発現される。イソプレンは、検出でき、例えば、ガスクロマトグラフィー／質量分析により特性を測定できる。

【００３８】

３ステップイソプレン生合成経路

本明細書で使用される酵素名は次のように定義される。２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素は、２－メチル－３－ブテン－２－オールのイソプレンへの変換を触媒する酵素である。２－メチル－３－ブテン－２－オール合成酵素は、ジメチルアリルジホスファートの２－メチル－３－ブテン－２－オールへの変換を触媒する酵素である。３－メチル－２－ブテン－１－オール合成酵素またはプレノール合成酵素は、ジメチルアリルジホスファートの３－メチル－２－ブテン－１－オール（本明細書では、プレノールとも呼ばれる）への変換を触媒する酵素である。２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素は、３－メチル－２－ブテン－１－オールの２－メチル－３－ブテン－２－オールへの異性化を触媒する酵素である。

【００３９】

本発明の一実施形態では、１種または複数種のイソプレン生合成経路の酵素をコードする外来性の遺伝子を含む非天然微生物は、ジメチルアリルジホスファートを３ステップでイソプレンに変換する（本明細書では、「３ステップイソプレン生合成経路」図１）。第

１のステップでは、３－メチル－２－ブテン－１－オール合成酵素により、ジメチルアリルジホスファートが３－メチル－２－ブテン－１－オールに変換される。第２のステップでは、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素により、３－メチル－２－ブテン－１－オールが２－メチル－３－ブテン－２－オールに変換される。第３のステップでは、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素により、２－メチル－３－ブテン－２－オールがイソプレンに変換される。

【００４０】

３ステップでジメチルアリルジホスファートのイソプレンへの変換のための天然微生物の好ましい実施形態では、第１のステップは、３－メチル－２－ブテン－１－オール合成酵素により触媒され、第２および第３のステップは、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素の両方の活性を有する単一の、二官能性酵素により触媒される。

【００４１】

ジメチルアリルジホスファートの３－メチル－２－ブテン－１－オール（プレノール）への変換は、ホスファターゼによって触媒できる。このようなホスファターゼの例には、枯草菌遺伝子ｙｑｋＧ（ｎｕｄＦ）およびｙｈｆＲによりコードされる酵素が含まれる（Ｗｉｔｈｅｒｓ，Ｓ．Ｔ．，Ｇｏｔｔｌｉｅｂ，Ｓ．Ｓ．，Ｌｉｅｕ，Ｂ．，Ｎｅｗｍａｎ，Ｊ．Ｄ．ａｎｄ　Ｊ．Ｄ．Ｋｅａｓｌｉｎｇ．２００７．Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｉｓｏｐｅｎｔｅｎｏｌ　ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　ｇｅｎｅｓ　ｆｒｏｍ　Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ　ｂｙ　ａ　ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ　ｍｅｔｈｏｄ　ｂａｓｅｄ　ｏｎ　ｉｓｏｐｒｅｎｏｉｄ　ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ　ｔｏｘｉｃｉｔｙ．Ａｐｐｌ．Ｅｎｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．７３：６２７７－６２８３）、しかし、ホスファターゼ活性が予測される他の既知のホスファターゼおよびコード配列、例えば、大腸菌のｙｔｊＣ遺伝子も使用できる。下表１は、ジメチルアリルジホスファートのプレノールへの変換に使用するためのホスファターゼの例である。

【表１】

表１

| 遺伝子座 | ジェンバンク受入番号 | 生物体 |
|---|---|---|
| BAA12639 (*YqkG*) | BAA12639 | 枯草菌（Bacillus subtilis） |
| CAA74541 (*yhfR*) | CAA74541 | 枯草菌亜種サブティリス（Bacillus subtilis subsp. subtilis）株 168 |
| GPMB_ECOLI | P0A7A2 | 大腸菌（Escherichia coli）K-12 |
| | | 牛腸由来アルカリホスファターゼ（Calf Intestine Alkaline Phosphatase） |
| | | エビ由来アルカリホスファターゼ（Shrimp Alkaline Phosphatase） |

【００４２】

ジメチルアリルジホスファートの３－メチル－２－ブテン－１－オールへの変換は、例えば、テルペン合成酵素、ゲラニオール合成酵素もしくはファルネソル合成酵素またはこれらの変異体などにより触媒され得る。下表２は、ジメチルアリルジホスファートの３－メチル－２－ブテン－１－オールへの変換に使用するためのテルペン合成酵素の例である。

【表２】

表２

| 遺伝子座 | ジェンバンク受入番号 | 生物体 |
|---|---|---|
| ゲラニオール合成酵素 | | |
| AAR11765 | AAR11765 | スイートバジル (Ocimum basilicum) |
| ABB30216 | ABB30216 | レモンエゴマ (Perilla citriodora) |
| ABB30217 | ABB30217 | レモンエゴマ |
| ABB30218 | ABB30218 | シソ (Perilla frutescens) |
| CAE52821 | CAE52821 | Cinnamomum tenuipile |
| ファルネソル合成酵素 | | |
| ACSS_MAIZE | Q84ZW8 | トウモロコシ (Zea mays) |
| ABJ16554 | ABJ16554 | イネ (Oryza sativa) |

【００４３】

３－メチル－２－ブテン－１－オールは、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素により、２－メチル－３－ブテン－２－オールに異性化される。本明細書で使用される場合、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素は、可逆反応で３－メチル－２－ブテン－１－オール（プレノール）を２－メチル－３－ブテン－２－オールに変換する酵素である。このような酵素の一例は、Ｃａｓｔｅｌｌａｎｉｅｌｌａ　ｄｅｆｒａｇｒａｎｓ株６５Ｐｈｅｎのリナロール脱水酵素－異性化酵素（ジェンバンク受入番号ＦＲ６６９４４７）である。この酵素は、３－メチル－２－ブテン－１－オールの２－メチル－３－ブテン－２－オールへの異性化、および２－メチル－３－ブテン－２－オールのイソプレンへの脱水を触媒する（下記実施例１、および図６）。リナロール脱水酵素－異性化酵素のオーソログ、パラログおよび非オーソロガス遺伝子置換は、当業者によく知られた方法で測定できる。

【００４４】

本明細書で使用される場合、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素は、２－メチル－３－ブテン－２－オールをイソプレンに変換する酵素である。このような酵素の一例は、Ｃａｓｔｅｌｌａｎｉｅｌｌａ　ｄｅｆｒａｇｒａｎｓ株６５Ｐｈｅｎのリナロール脱水酵素－異性化酵素（ジェンバンク受入番号ＦＲ６６９４４７）である。この酵素は、２－メチル－３－ブテン－２－オールのイソプレンへの脱水を触媒できる（下記実施例２、および図８）。リナロール脱水酵素－異性化酵素のオーソログ、パラログおよび非オーソロガス遺伝子置換は、当業者によく知られた方法で測定できる。例えば、２種のポリペプチドに対する核酸またはアミノ酸配列の検査により、比較配列間の配列同一性および類似性が明らかになる。このような類似性に基づいて、当業者は、タンパク質が共通の先祖からの進化を通して関係付けられることを示すだけの十分高い類似性を有するか否かを判定できる。Ａｌｉｇｎ、ＢＬＡＳＴ、Ｃｌｕｓｔａｌ　Ｗなどの当業者によく知られたアルゴリズムにより、生の配列類似性または同一性が比較、決定され、また、ウエイトまたはスコアに割り付けることができる配列中のギャップの存在または有意性が判定される。また、このようなアルゴリズムは、当技術分野で既知であり、同様に、ヌクレオチド配列類似性または同一性の判定に適用できる。関連性の判定に必要な類似性のパラメータは、統計的類似性またはランダムポリペプチドの類似適合の検出の確率、および決定された適合の有意性を計算するよく知られた方法に基づいて計算される。また、必要に応じ、当業者により２種以上の配列のコンピュータ比較を視覚的に最適化できる。関連する遺伝子産物またはタンパク質は、例えば、２５％～１００％配列同一性などの高い類似性を有することが期待できる。関連性のないタンパク質は、十分な大きさのデータベースがスキャンされる場合には、偶然に発生することが期待される場合と実質的に同じである同一性を

有し得る（約５％）。５％と２４％との間の配列では、十分な相同性を示して比較配列が関連性を有すると結論づけることができる場合もあり、そのような結論が得られるような十分な相同性を示すことができない場合もある。与えられたデータセットの大きさを前提として、このような適合の有意性を判定する追加の統計的分析を行って、これらの配列の関連性を判定できる。

【００４５】

例えば、ＢＬＡＳＴアルゴリズムを使って２種以上の配列の関連性を判定するための代表的パラメータは、下記に示す値であってよい。簡単に述べると、アミノ酸配列の整列は、ＢＬＡＳＴＰバージョン２．０．８（１９９９年1月5日）を使って、次のパラメータを使って行うことができる：置換行列：０　ＢＬＯＳＵＭ６２；ギャップ開始ペナルティ：１１；ギャップ伸長ペナルティ：１；ｘ＿ｄｒｏｐｏｆｆ：５０；期待値：１０．０；文字列の長さ：３；フィルター：オン。ＢＬＡＳＴＮバージョン２．０．６（１９９８年9月１６日）および次記のパラメータを使って核酸配列の整列化を行うことができる：マッチペナルティ：１；ミスマッチペナルティ：－２；ギャップ開始ペナルティ：５；ギャップ伸長ペナルティ：２；ｘ＿ｄｒｏｐｏｆｆ：５０；期待値：１０．０；文字列の長さ：１１；フィルター：オフ。当業者なら、例えば、比較の厳密性を高めるか、または低下させるために、上記パラメータにどのような修正を行って、２種以上の配列の関連性を判定できるかを分かるであろう。

【００４６】

また、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素活性は、Ａｑｕｉｎｃｏｌａ　ｔｅｒｔｉａｒｉｃａｒｂｏｎｉｓ中でも特定されている（Ｓｃｈｕｓｔｅｒ，Ｊ．，Ｓｃｈａｆｅｒ，Ｆ．，Ｈｕｂｌｅｒ，Ｎ．，Ｂｒａｎｄｔ，Ａ．，Ｒｏｓｅｌｌ，Ｍ．，Ｈａｒｔｉｇ，Ｃ．，Ｈａｒｍｓ，ｈ．，Ｍｕｌｌｅｒ，Ｒ．Ｈ．ａｎｄ　Ｔ．Ｒｏｈｗｅｒｄｅｒ．２０１２．Ｂａｃｔｅｒｉａｌ　ｄｅｇｒａｄａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｔｅｒｔ－ａｍｙｌ　ａｌｃｏｈｏｌ　ｐｒｏｃｅｅｄｓ　ｖｉａ　ｈｅｍｉｔｅｒｐｅｎｅ２－ｍｅｔｈｙｌ－３－ｂｕｔｅｎ－２－ｏｌ　ｂｙ　ｅｍｐｌｏｙｉｎｇ　ｔｈｅ　ｔｅｒｔｉａｒｙ　ａｌｃｏｈｏｌ　ｄｅｓａｔｕｒａｓｅ　ｆｕｎｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｒｉｅｓｋｅ　ｎｏｎｈｅｍｅ　ｍｏｎｏｎｕｃｌｅａｒ　ｉｒｏｎ　ｏｘｙｇｅｎａｓｅ　ＭｄｐＪ．Ｊ．Ｂａｃｔ．１９４：９７２－９８１）。この２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素の配列は、報告されなかった。

【００４７】

２ステップイソプレン生合成経路

別の実施形態では、１種または複数種のイソプレン生合成経路の酵素をコードする外来性遺伝子を含む非天然微生物は、２－メチル－３－ブテン－２－オール合成酵素（ＭＢＯ合成酵素）および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素により、ジメチルアリルジホスファートをイソプレンに２ステップで変換する（本明細書では、「２ステップイソプレン生合成経路」、図２）。

【００４８】

本明細書で使用される場合、２－メチル－３－ブテン－２－オール合成酵素の一例は、いくつかの植物色素体、特に、葉緑体中で認められ、ジメチルアリルジホスファートを２－メチル－３－ブテン－２－オールに変換する天然ポリペプチド、および天然でジメチルアリルジホスファートを２－メチル－３－ブテン－２－オールに変換するポリペプチドの誘導体（変異体）である。ＭＢＯ合成酵素は、一部は、ポリペプチドを葉緑体に送るアミノ末端色素体ターゲティング配列により特徴付けられる。葉緑体への移動に際し、輸送ペプチドは、ポリペプチドから切断されて前駆物質タンパク質より小さい分子量の成熟タンパク質を生成することができる。微生物生命体中での外来性のＭＢＯ合成酵素の過剰発現の代わりに、天然に認められる成熟型に近い短縮型ＭＢＯ合成酵素を発現するのが好ましい。基本的に、輸送ペプチドをコードする配列は、ＭＢＯ合成酵素コード配列から除去される。当業者なら、目視検査によりイソプレン合成酵素コード配列を短縮する場所を選択することが可能となるが、ＣｈｌｏｒｏＰ１．１などのコンピュータベースアルゴリズム

を使って、どのアミノ酸が輸送ペプチドかを予測するのを容易にすることができる（Ｅｍａｎｕｅｌｓｓｏｎ，Ｏ．，Ｎｉｅｌｓｅｎ，Ｈ．，Ｇ．ｖｏｎ　Ｈｅｉｊｎｅ．１９９９．ＣｈｌｏｒｏＰ，ａ　ｎｅｕｒａｌ　ｎｅｔｗｏｒｋ－ｂａｓｅｄ　ｍｅｔｈｏｄ　ｆｏｒ　ｐｒｅｄｉｃｔｉｎｇ　ｃｈｌｏｒｏｐｌａｓｔ　ｔｒａｎｓｉｔ　ｐｅｐｔｉｄｅｓ　ａｎｄ　ｔｈｅｉｒ　ｃｌｅａｖａｇｅ　ｓｉｔｅｓ．Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉ．８：９７８－９８４）。ＭＢＯ合成酵素の一例は、Ｐｉｎｕｓ　ｓａｂｉｎｉａｎａ（ジェンバンク受入番号ＡＥＢ５３０６４．１）中で認められる。

【００４９】

ジメチルアリルジホスファートの２－メチル－３－ブテン－２－オールへの変換は、テルペン合成酵素、例えば、リナロール合成酵素（例えば、Ｅ．Ｃ．Ｎｏ．４．２．３．２５または４．２．３．２６）またはネロリドール合成酵素もしくはそれらの変異体により触媒され得る。下表３は、ジメチルアリルジホスファートの２－メチル－３－ブテン－２－オールへの変換に使用するためのテルペン合成酵素の例である。

【表３】

表3

| 遺伝子座 | ジェンバンク受入番号 | 生物体 |
|---|---|---|
| Ｓ－リナロール合成酵素 | | |
| LIS_CLABR | Q96376 | クラーキア・ブレウェリ (Clarkia breweri) |
| LINS_ARATH | Q84UV0 | シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) |
| C0KWV3_9LAMI | C0KWV3 | セトエゴマ (Perilla setoyensis) |
| C0KWV5_PERFR | C0KWV5 | トラノオジソ (Perilla frutescens var. hirtella) |
| C0KWV7_PERFR | C0KWV7 | トラノオジソ (Perilla frutescens var. hirtella) |
| D4N3A0_9ERIC | D4N3A0 | サルナシ (Actinidia arguta) |
| D4N3A1_9ERIC | D4N3A1 | マタタビ (Actinidia polygama) |
| Ｒ－リナロール合成酵素 | | |
| LLOS1_ARTAN | Q9SPN0 | クソニンジン (クソニンジン) |
| LLOS_OCIBA | Q5SBP3 | スイートバジル (Ocimum basilicum) |
| LLOS5_ARTAN | Q9SPN1 | クソニンジン (Artemesia annua) |
| LLOS_MENAQ | Q8H2B4 | ウォーターミント (Mentha aquatica) |
| Q1XBU5_SOLLC | Q1XBU5 | トマト (Solanum lycopersicum) |
| （３Ｓ，６Ｅ）－ネロリドール合成酵素 | | |
| Q5UB06_MEDTR | Q5UB06 | タルウマゴヤシ (Medicago trunculata) |
| F8TWD1_POPTR | F8TWD1 | コットンウッド (Populus trichocarpa) |
| NES1_FRAVE | P0CV96 | エゾヘビイチゴ (Fragaria vesca) |
| NES1_FRAAN | P0CV94 | イチゴ (Fragaria ananassa) |
| NES2_FRAAN | P0CV95 | イチゴ (Fragaria ananassa) |

ジメチルアリルジホスファートを２－メチル－３－ブテン－２－オールに変換するテルペン合成酵素の使用の一例は、実施例３に示されている。

【００５０】

２－メチル－３－ブテン－２－オールのイソプレンへの変換は、上述のように、２－メ

チルー３－ブテン－２－オール脱水酵素により触媒できる。２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素は、上述のリナロール脱水酵素－異性化酵素のように、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素の両方の活性を有する二官能性の酵素であってよく、または酵素は、２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素活性のみをコードして、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素活性がなくてもよい。

【００５１】

本発明の好ましい実施形態では、２ステップイソプレン生合成経路または３ステップイソプレン生合成経路によりイソプレンへの変換に利用できるジメチルアリルジホスファートは、１種または複数種の内在性遺伝子の過剰発現により、またはメチルエリトリトールホスファート経路の酵素：１－デオキシ－Ｄ－キシルロース－５－ホスファート合成酵素、１－デオキシ－Ｄ－キシルロース－５－ホスファートレダクトイソメラーゼ、４－ジホスホシチジル－２－Ｃ－メチル－Ｄ－エリスリトール合成酵素、４－ジホスホシチジル－２－Ｃ－メチル－Ｄ－エリスリトールキナーゼ、２－Ｃ－メチル－Ｄ－エリスリトール－２、４－シクロジホスファート合成酵素、１－ヒドロキシ－２－メチル－２－（Ｅ）－ブテニル－４－ジホスファート合成酵素、ジメチルアリル－ジホスファート／イソペンテニル－ジホスファート：ＮＡＤ（Ｐ）$^{+}$酸化還元酵素、またはイソペンテニルジホスファート異性化酵素、をコードする１種または複数種の外来性の遺伝子の発現により増加してもよい。例えば、１－デオキシ－Ｄ－キシルロース－５－ホスファート合成酵素、１－デオキシ－Ｄ－キシルロース－５－ホスファートレダクトイソメラーゼ、およびイソペンテニルジホスファート異性化酵素をコードする外来性の遺伝子の発現は、増加したレベルのジメチルアリルジホスファートを生成することができ、２ステップイソプレン生合成経路または３ステップイソプレン生合成経路と共に発現される場合、イソプレンの収量の増加がもたらされる。

【００５２】

別の好ましい本発明の実施形態では、２ステップイソプレン生合成経路または３ステップイソプレン生合成経路によりイソプレンへの変換に利用できるジメチルアリルジホスファートは、例えば、限定されないが：アセチル－ＣｏＡアセチルトランスフェラーゼ（チオラーゼとしても知られる）、３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリル－ＣｏＡ合成酵素、３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリル－ＣｏＡ還元酵素、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロナートデカルボキシラーゼ、およびイソペンテニルジホスファート異性化酵素などのメバロナート経路の酵素をコードする１種または複数種の外来性の遺伝子の発現により増加させることができる。メバロナート経路をコードする外来性の遺伝子の過剰発現の一例は、実施例４に記載されている。

【００５３】

さらなる実施形態では、本発明は、イソプレンを生成する方法を提供し、この方法は、炭素源を含む適切な培地中、非天然微生物が少なくとも一部の炭素源をイソプレンに変換する条件下で、イソプレン生合成経路の１種または複数種の酵素をコードする少なくとも１種または複数種の外来核酸を含む非天然微生物生命体を培養するステップであって、イソプレン生合成経路の１種または複数種の酵素がイソプレンを生成するのに十分な量で発現されるステップ、およびイソプレンを回収するステップを含む。炭素源は、グリセロール、グルコース、キシロース、アラビノース、またはこれらの混合物；ジメチルアリルジホスファート、３－メチル－２－ブテン－１－オール、または２－メチル－３－ブテン－２－オールであっても、これらを含んでもよい。好ましくは、炭素源は、セルロース系バイオマスプロセス由来のグリセロール、グルコースまたは糖であるか、またはこれらを含む。イソプレンは、下記の実施例に記載のように回収されてもよい。

【００５４】

別の追加の実施形態では、本発明によるイソプレン生成用全細胞（例えば、本発明の非天然微生物生命体）調製物の代わりに、またはそれに加えて、酵素調製物を使うことができる。酵素調製物は、精製酵素、および／または本発明に対応する酵素を含む細胞抽出物

を含む。このような酵素調製物は、本発明によるイソプレン生合成経路の１種または複数種の反応を触媒できる。一実施形態では、酵素調製物は、本明細書記載の３ステップ経路を経由してイソプレンを生成できる１種または複数種の酵素を含むことができる。一実施形態では、酵素調製物は、本明細書記載の２ステップ経路を経由してイソプレンを生成できる１種または複数種の酵素を含むことができる。一実施形態では、全細胞および酵素調製物の組み合わせを使って、本発明によるイソプレンの生成を触媒できる。

【００５５】

次の本発明の実施形態の実施例では、共通の大腸菌株ＢＬ２１を使用した。ＢＬ２１（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）細胞をエレクトロコンピテント細胞にして、細胞をエレクトロコンピテントにする際に培養物の育成に塩を含まないＬＢを使ったこと以外は、ＭｉｃｒｏＰｕｌｓｅｒ Ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ Ａｐｐａｒａｔｕｓ Ｏｐｅｒａｔｉｎｇ Ｉｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ Ｇｕｉｄｅ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ ｃａｔａｌｏｇ ｎｕｍｂｅｒ １６５－２１００）のプロトコルに従って電気穿孔を行った。

【００５６】

実施例１

３－メチル－２－ブテン－１－オールからイソプレンを生成するための微生物

この実施例は、１種または複数種のイソプレン生合成経路の外来性遺伝子を発現する非天然微生物による３－メチル－２－ブテン－１－オールからのイソプレンの生成について示す。

【００５７】

Ｃａｓｔｅｌｌａｎｉｅｌｌａ ｄｅｆｒａｇｒａｎｓ株６５Ｐｈｅｎのリナロール脱水酵素－異性化酵素（ＬＤＩ）の大腸菌コドン最適化配列（配列番号１）を使って、ＤＮＡ２．０（Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ、ＣＡ）によりプラスミドｐＪ４０４－ＬＤＩを構築した。ＬＤＩコード配列を、大腸菌中での発現用としてコドン最適化し、合成して、プラスミド発現ベクターｐＪｅｘｐｒｅｓｓ４０４中に挿入した。得られたプラスミドのｐＪ４０４－ＬＤＩを電気穿孔法により大腸菌ＢＬ２１エレクトロコンピテント細胞中に導入した。

【００５８】

ストロベリーアシル－ＣｏＡトランスフェラーゼ（ＳＡＡＴ）のコドン最適化配列（配列番号２）を使って、ＤＮＡ２．０（ＭｅｎｌｏＰａｒｋ、ＣＡ）によりプラスミドｐＪ４０４－ＳＡＡＴを構築した。ＳＡＡＴコード配列を大腸菌中での発現用としてコドン最適化し、合成して、プラスミド発現ベクターｐＪｅｘｐｒｅｓｓ４０４中に挿入した。得られたプラスミドのｐＪ４０４－ＳＡＡＴを電気穿孔法により大腸菌ＢＬ２１エレクトロコンピテント細胞中に導入した。ｐＪ４０４－ＳＡＡＴを陰性対照として使用した。

【００５９】

１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含むルリアーベルターニ（ＬＢ）寒天プレート（１０ｇ／Ｌの酵母エキス、５ｇ／ＬのＢａｃｔｏトリプトン、１０ｇ／Ｌの塩化ナトリウム、１５ｇ／ＬのＢａｃｔｏ寒天）を使ってｐＪ４０４－ＬＤＩまたはｐＪ４０４－ＳＡＡＴを含むＢＬ２１の形質転換体を選択した。

【００６０】

ＬＢ－寒天プレート由来ｐＪ４０４－ＬＤＩまたはｐＪ４０４－ＳＡＡＴを含むＢＬ２１の単一コロニーを使って、１２５－ｍＬのエルレンマイヤーフラスコ中の１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む１０ｍｌのＬＢ培地（１０ｇ／Ｌの酵母エキス、５ｇ／ＬのＢａｃｔｏトリプトン、１０ｇ／Ｌの塩化ナトリウム）に播種した。回転振盪インキュベーター中、３７℃で１６時間、フラスコをインキュベートした。１６時間後、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む新しいＬＢ培地を使って得られた培養液を６００ｎｍの光学密度０．１６に希釈した。５０ｍｌの希釈培養液を３００－ｍｌのエルレンマイヤーフラスコ中に入れ、回転振盪インキュベーター中、３７℃で６００ｎｍの光学密度が約０．６になるまで、典型的な例では、９０分間インキュベートした。次に、４ｍｌの得られた培養

液を２０ｍｌガスクロマトグラフィーヘッドスペースバイアル中に入れた。３－メチル－２－ブテン－１－オールを１ｍＭの最終濃度になるように加え、ＩＰＴＧ（イソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド）を０．１ｍＭになるように加え、振盪を加えながらさらに３７℃で１６時間培養液を育成した。

【００６１】

イソプレンをＣＴＣ－ＰＡＬオートサンプラーおよびＦＩＤを備えたＡｇｉｌｅｎｔ７８９０Ａ　ＧＣでヘッドスペース分析を使って測定した。５００ｒｐｍで２分間攪拌子ながら５０℃でヘッドスペースバイアル（２０ｍｌ）をインキュベートした。その後、１ｍｌのヘッドスペースを、５０℃で、ヘッドスペースシリンジを使って取り出し、ＧＣ注入口に注入した（２５０℃、スプリット比；２０：１）。ＤＢ－６２４　３０ｍｘ５３０μｍｘ３μｍカラム（Ｊ＆Ｗ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に流すキャリアガスとして２ｍｌ／分の流速のヘリウムを使った３００℃に設定のＦＩＤ検出器、および８５℃で５．２５分のオーブンプログラムを使って試料を分析した。試料中のイソプレン濃度は、同じＧＣ／ＦＩＤ法で分析したイソプレン較正標準ガスから生成される較正曲線から計算した。また、５９７５Ｃ　ＭＳＤおよびＣＴＣ－ＰＡＬオートサンプラーを備えたＡｇｉｌｅｎｔ７８９０Ａ　ＧＣを使って、ヘッドスペースＧＣ／ＭＳによりイソプレン生成物を確認した。６００ｒｐｍで５分間攪拌して８５℃でヘッドスペースバイアルをインキュベートした。その後、１ｍｌのヘッドスペースをヘッドスペースシリンジを使って８５℃で取り出し、ＧＣ注入口に注入した（２５０℃、スプリット比；２５：１）。ＧＣ／ＭＳには、ＨＰ－５ＭＳ　３０ｍｘ２５０μｍｘ０．２５μｍカラム（Ｊ＆Ｗ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に流すキャリアガスとして１ｍｌ／分の流速のヘリウム、３５℃で４分保持後２５℃／分で１５０℃まで昇温するオーブンプログラム、２３０℃のＭＳソース温度、および１５０℃の四重極温度を使用した。質量分析計をスキャンモード（２５～１６０質量単位）で操作した。ＮＩＳＴ　１１ＭＳライブラリーにより、ならびに基準試料（１３５ｐｐｍイソプレン、ドライ窒素ガス中の１３５ｐｐｍ二酸化炭素、Ｍａｔｈｅｓｏｎ　ＴＲＩＧＡＳ、Ｈｏｕｓｔｏｎ、ＴＸ）に対する比較により、イソプレンピークを特定した。

【００６２】

３－メチル－２－ブテン－１－オールおよび２－メチル－３－ブテン－２－オールを、ＣＴＣ－ＰＡＬオートサンプラーおよびＦＩＤを備えたＡｇｉｌｅｎｔ７８９０Ａ　ＧＣによるヘッドスペース分析を使って測定した。８５℃、６００ｒｐｍで５分間攪拌子ながらヘッドスペースバイアル（２０ｍｌ）をインキュベートした。その後、８５℃加熱ヘッドスペースシリンジを使って１ｍｌのヘッドスペースを取り出し、ＧＣ注入口に注入した（２５０℃、スプリット比；２５：１）。ＤＢ－６２４　３０ｍｘ５３０μｍｘ３μｍカラム（Ｊ＆Ｗ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に流すキャリアガスとして３ｍｌ／分の流速のヘリウムを使った３５０℃に設定のＦＩＤ検出器、および９０℃後、２０℃／分で昇温して２３０℃で３分間保持のオーブンプログラムを使用して試料を分析した。同じＧＣ／ＦＩＤ法で分析したそれぞれの化合物希釈標準から生成した較正曲線を使って試料中の３－メチル－２－ブテン－１－オールおよび２－メチル－３－ブテン－２－オールの濃度を計算した。

【００６３】

この実施例の結果を図５と図６に示す。大腸菌細胞を含まず、１ｍＭの３－メチル－２－ブテン－１－オールを含むＬＢ培地は、３－メチル－２－ブテン－１－オールに対応する３．９６分にピークを示した（図５）。同様に、ｐＪ４０４－ＳＡＡＴを含むＢＬ２１細胞と共に１ｍＭの３－メチル－２－ブテン－１－オールを含む培養液は、３－メチル－２－ブテン－１－オールに対応する３．９６分のピーク、およびアルデヒドの３－メチル－２－ブテン－１－アール（プレナール、データは示さず）に対応する追加のピークを示した。対照的に、ｐＪ４０４－ＬＤＩを含むＢＬ２１細胞と共に１ｍＭの３－メチル－２－ブテン－１－オールを含む培養液は、３－メチル－２－ブテン－１－オールを、それぞれ、２．９６分のピークおよび２．４９分のピークに対応する２－メチル－３－ブテン－２－オールおよびイソプレンに変換した。このことは、ｐＪ４０４－ＬＤＩを含む大腸菌

細胞は、３－メチル－２－ブテン－１－オールを２－メチル－３－ブテン－２－オールに異性化し、２－メチル－３－ブテン－２－オールをイソプレンに脱水することを示している。図９は、基準イソプレン試料のＧＣ／ＭＳ分析を示し、図１０は、２．４９分の保持時間のピークのＧＣ／ＭＳ分析を示し、これは、図９の基準イソプレンと同じ断片化パターンを有する。

【００６４】

実施例２

２－メチル－３－ブテン－２－オールからイソプレンを生成するための微生物

この実施例は、イソプレン生合成経路の１種または複数種の外来性遺伝子を発現する非天然微生物を使った２－メチル－３－ブテン－２－オールからのイソプレンの生成について示す。

【００６５】

ＬＢ寒天プレートからのｐＪ４０４－ＬＤＩまたはｐＪ４０４－ＳＡＡＴを含むＢＬ２１の単一コロニーを使って、１２５－ｍＬエルレンマイヤーフラスコ中の１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む１０ｍｌのＬＢ培地（１０ｇ／Ｌ酵母エキス、５ｇ／ＬのＢａｃｔｏトリプトン、１０ｇ／Ｌ塩化ナトリウム）に播種した。フラスコを回転振盪インキュベーター中、３７℃で１６時間インキュベートした。１６時間後、培養液を１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む新しいＬＢ培地を使って、６００ｎｍで０．１６の光学密度に希釈した。５０ｍｌの希釈培養液を３００－ｍＬエルレンマイヤーフラスコ中に入れ、回転振盪インキュベーター中、６００ｎｍの光学密度が約０．６に達するまで、典型的な例では９０分間、３７℃でインキュベートした。その後、４ｍｌの培養液を２０－ｍｌのガスクロマトグラフィーヘッドスペースバイアル中に入れた。２－メチル－３－ブテン－２－オールを１ｍＭの最終濃度になるまで加えた。ＩＰＴＧ（イソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド）を０．１ｍＭの最終濃度になるまで加えた。２－メチル－３－ブテン－２－オールを含む培養液を３７℃で１６時間、振盪を加えながら培養した。

【００６６】

イソプレン、３－メチル－２－ブテン－１－オールおよび２－メチル－３－ブテン－２－オールを前述のように測定した。実施例１で上述のように、イソプレンピークの同一性もＧＣ／ＭＳを使って同様に確認された。

【００６７】

この実施例の結果を図７と図８に示す。大腸菌細胞を含まず、１ｍＭの２－メチル－３－ブテン－２－オールを含むＬＢ培地は、２－メチル－３－ブテン－２－オールに対応する２．９６分のピークを示した（図７）。同様に、１ｍＭの２－メチル－３－ブテン－２－オールおよびｐＪ４０４－ＳＡＡＴ含有ＢＬ２１細胞を含む培養液は、２－メチル－３－ブテン－２－オールに対応する２．９６分のピークを示した（データは示さず）。対照的に、１ｍＭの２－メチル－３－ブテン－２－オールおよびｐＪ４０４－ＬＤＩ含有ＢＬ２１細胞を含む培養液は、２－メチル－３－ブテン－２－オールを２．４９分のピークに対応するイソプレンに変換した。これは、ｐＪ４０４－ＬＤＩ含有大腸菌細胞が２－メチル－３－ブテン－２－オールをイソプレンに脱水することを実証している。

【００６８】

実施例３

ＦａＮＥＳ１は、ジメチルアリルジホスファートから２－メチル－３－ブテン－２－オールの形成を触媒する

この実施例は、外来性テルペン合成酵素：イチゴの（３Ｓ、６Ｅ）－ネロリドール合成酵素を発現する非天然微生物によるジメチルアリルジホスファートから２－メチル－３－ブテン－２－オールの生成について示す。

【００６９】

イチゴの（３Ｓ，６Ｅ）－ネロリドール合成酵素：ＦａＮＥＳ１（ジェンバンク受入番号Ｐ０ＣＶ９４；Ａｈａｒｏｎｉ，Ａ．，Ｇｉｒｉ，Ａ．Ｐ．，Ｖｅｒｓｔａｐｐｅｎ，Ｆ．Ｗ．Ａ．，Ｂｅｒｔｅａ，Ｃ．Ｍ．，Ｓｅｖｅｎｉｅｒ，Ｒ．，Ｓｕｎ，Ｚ．，Ｊｏ

ｎｇｓｍａ，Ｍ．Ａ．，Ｓｃｈｗａｂ，Ｗ．ａｎｄ　Ｈ．Ｊ．Ｂｏｕｗｍｅｅｓｔｅｒ．２００４．Ｇａｉｎ　ａｎｄ　ｌｏｓｓ　ｏｆ　ｆｒｕｉｔ　ｆｌａｖｏｒ　ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ　ｐｒｏｄｕｃｅｄ　ｂｙ　ｗｉｌｄ　ａｎｄ　ｃｕｌｔｉｖａｔｅｄ　ｓｔｒａｗｂｅｒｒｙ　ｓｐｅｃｉｅｓ．Ｔｈｅ　Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　１６：３１１０－３１３１）のコドン最適化配列およびヘマトコッカスプルビアリスのコドン最適化イソペンテニルジホスファート異性化酵素遺伝子：ｉｄｉを使って、ＤＮＡ２．０（Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ、ＣＡ）によりプラスミドｐＪ４０１－ＮＥＳ１－ｉｄｉを構築した。ＦａＮＥＳ１およびｉｄｉの両方のコード配列を大腸菌中での発現用にコドン最適化し、合成し、プラスミド発現ベクターｐＪｅｘｐｒｅｓｓ４０１中に挿入した。得られたプラスミド：ｐＪ４０１－ＮＥＳ１－ｉｄｉを、電気穿孔法で大腸菌ＢＬ２１エレクトロコンピテント細胞中に導入した。サブクローニング用の人工リボソーム結合部位および隣接制限エンドヌクレアーゼを含むコドン最適化配列（配列番号４）を図１２に示す。

【００７０】

ネロリドール、リナロールおよび２－メチル－３－ブテン－２－オールの生成を以下のようにアッセイした。ＬＢ寒天プレートからのプラスミドｐＪ４０１－ＮＥＳ１－ｉｄｉ含有ＢＬ２１の単一コロニーを使って、５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含む１０ｍｌのＬＢ培地（１０ｇ／Ｌ酵母エキス、５ｇ／ＬのＢａｃｔｏトリプトン、１０ｇ／Ｌ塩化ナトリウム）に播種した。フラスコを３７℃で１６時間、回転振盪インキュベーターでインキュベートした。１６時間後、５０μｇ／ｍｌのカナマイシンおよび０．１ｍＭのＩＰＴＧを含む新しいＬＢ培地を使って培養液を希釈し、６００ｎｍの初期細胞密度を０．４～０．５にした。４ｍＬの希釈培養液を２０ｍｌのＧＣバイアルに入れ、３０℃で６または２４時間、振盪を加えながらインキュベートした。６または２４時間後に、ヘッドスペースガスをＧＣ／ＭＳ－ＳＩＭで分析した。

【００７１】

５９７５Ｃ　ＭＳＤおよびＣＴＣ－ＰＡＬオートサンプラーを備えたＡｇｉｌｅｎｔ７８９０Ａ　ＧＣを使って、ヘッドスペースＧＣ／ＭＳによりセレクトイオンモード（ＳＩＭ）で試料を分析した。ヘッドスペースバイアル（２０ｍｌ）を６００ｒｐｍで攪拌しながら８５℃で５分間インキュベートした。その後、１ｍｌのヘッドスペース中ガスを８５℃でヘッドスペースシリンジを使って取り出し、ＧＣ注入口に注入した（２５０℃、スプリット比：２５：１）。ＶＦ－６２４ＭＳ　６０ｍｘ２５０μｍｘ１．４μｍカラム（Ｊ＆Ｗ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に流すキャリアガスとして１．５ｍｌ／分の流速のヘリウム、９０℃で１分の保持後２５℃／分で昇温して２３０℃で５分間保持のオーブンプログラムを使用した。質量分析計をＳＩＭモードで操作した。ＭＳソース温度：２３０℃、四重極温度：１５０℃、および溶媒遅延：３．５５分。対象分析物の濃度を各分析物の較正曲線から求めた。２－メチル－３－ブテン－２－オール、３－メチル－２－ブテン－１－オール、３－メチル－２－ブテナール、およびリナロールの較正標準を１０ｍＬの脱イオン水中の１、１０、および１００ｐｐｍの濃度で調製した。各較正標準用のヘッドスペースを同じＧＣ／ＭＳ－ＳＩＭ法を使って分析した。イソプレンを１４、１３５、および１３７５ｐｐｍの濃度で認証標準ガスから較正した。較正曲線の線形相関係数は、全不純物成分に対し０．９９以上であった。図１３は、ＧＣ／ＭＳ－ＳＩＭ条件で取得した基準リナロールのガスクロマトグラムを示す。図１４は、ＧＣ／ＭＳ－ＳＩＭ条件で取得した基準２－メチル－３－ブテン－２－オールのガスクロマトグラムを示す。

【００７２】

この実施例の結果を図１５に示す。ｐＪ４０１－ＮＥＳ１－ｉｄｉ含有ＢＬ２１細胞は、１．４７ｍｇ／Ｌの８．８分のピークに対応するリナロール、および０．０５ｍｇ／Ｌの４．８分のピークに対応する２－メチル－３－ブテン－２－オールを生成した。これは、ｐＪ４０１－ＮＥＳ１－ｉｄｉ含有大腸菌細胞が、リナロールに加えて、２－メチル－３－ブテン－２－オールを生成することを示す。類似の条件下で培養したｐＪ４０４－ＳＡＡＴ含有ＢＬ２１の対照培養液には、リナロールおよび２－メチル－３－ブテン－２－オールに対応するピークは存在しない（図１６）。ピークは、ＮＩＳＴ　１１　ＭＳライ

ブラリーにより特定された。基準試料に対する保持時間およびイオン断片化パターンの比較により、リナロール（図１７と図１８）および２－メチル－３－ブテン－２－オール（図１９と図２０）のピークも特定された。

【００７３】

実施例４

ＦａＮＥＳ１による２－メチル－３－ブテン－２－オールの生成を改善するためのメバロナート経路の過剰発現

この実施例は、外来性テルペン合成酵素のイチゴの（３Ｓ，６Ｅ）－ネロリドール合成酵素を発現する非天然微生物によるジメチルアリルジホスファートから２－メチル－３－ブテン－２－オールの生成が異種のメバロナート経路の過剰発現により高められ、２－メチル－３－ブテン－２－オールへの変換に有用なジメチルアリルジホスファートのプールを増加させることを示す。

【００７４】

異種のメバロナート経路を以下のようにプラスミド：ｐＧＢ１０３６上に構築した。

【００７５】

図２１に示すヌクレオチド配列（配列番号５）を使って、ＤＮＡ合成によりプラスミドｐＧＡ３１Ｒ－ＭＣＳ全体を構築した。

【００７６】

標準的クローニング技術を使ってｐＧＡ３１Ｒ－ＭＣＳ上のｐ１５Ａ複製起点を、ＡｖｒＩＩ／ＳａｃＩ断片として低コピーｐＳＣ１０１起点で置換することによりプラスミドｐＧＳ３１Ｒ－ＭＣＳを構築した。ヌクレオチド配列（配列番号６）を図２２に示す。

【００７７】

フェカリス菌ＡＴＣＣ７００８０２のｍｖａＥおよびｍｖａＳ遺伝子（ｍｖａＥおよびｍｖａＳのコドン最適化配列は図２３に示す通り）のコドン最適化配列（配列番号７）を使ってプラスミドｐＪ２４８－ｍｖａＥＳを構築した。フェカリス菌ＡＴＣＣ７００８０２のｍｖａＥおよびｍｖａＳ遺伝子を大腸菌中での発現用にコドン最適化し、合成し、プラスミドｐＪ２４８中に挿入した。プラスミド作成に使用する隣接エンドヌクレアーゼ制限酵素部位と共に固有のリボソーム結合部位を各遺伝子の前に入れた。

【００７８】

図２４に示すヌクレオチド配列（配列番号８）を有する、コドン最適化合成オペロンを含むプラスミドｐＪ２４１－ＭＫ．ＰＭＫ．ＭＰＤ．ＩＤＩ全体をＤＮＡ合成により構築した。大腸菌中での発現にコドン最適化した合成オペロンの配列は、タノカルドコックス・ヤンナスキイのメバロン酸キナーゼ遺伝子、フェカリス菌ＡＴＣＣ７００８０２のホスホメバロン酸キナーゼ、出芽酵母Ｓ２８８Ｃのメバロン酸ジホスファートデカルボキシラーゼ、および大腸菌ＭＧ１６５５のイソペンテニルジホスファート異性化酵素遺伝子をコードし、その後のクローニングステップで使われる組み込まれたリボソーム結合部位および隣接制限エンドヌクレアーゼ部位を含む。

【００７９】

標準的クローニング技術を使って、ｐＪ２４８－ｍｖａＥＳ由来最適化ｍｖａＥＳ遺伝子をＫｐｎＩ／ＭｌｕＩ　ＤＮＡ断片としてｐＧＡ３１Ｒ－ＭＣＳに挿入することによりプラスミドｐＧＢ１００８を構築した。

【００８０】

プラスミドｐＧＢ１０２６。ｐＧＢ１０２６のクローニング方法を図２５に示す。大腸菌のｐｎｔＡＢ遺伝子をコードする約３，０００塩基対ＰＣＲ産物をｐＧＢ１００８のＭｌｕＩ部位に挿入することによりプラスミドｐＧＢ１０２６を構築した。下記のオリゴヌクレオチドプライマーと共にＡｃｃｕＰｒｉｍｅ　Ｐｆｘポリメラーゼを使って、ｐｎｔＡＢ遺伝子をコードするＰＣＲ産物をＭＧ１６５５のゲノムＤＮＡから増幅した：

プライマー１：５’－ＣＣＧ　ＴＡＡ　ＣＴＡ　ＡＡＣ　ＧＣＧ　ＡＡＧ　ＧＧＡ　ＡＴＡ　ＴＣＡ　ＴＧＣ　ＧＡＡ　ＴＴＧ　Ｇ－３’（配列番号９）

プライマー２：５’－ＣＴＡ　ＧＡＧ　ＡＴＣ　ＴＡＣ　ＧＣＧ　ＴＣＡ　ＧＧＧ　Ｔ

ＴＡ　CAG　AGC　TTT　Ｃ－３’（配列番号１０）

【００８１】

プライマー１は、ｐｎｔＡの開始コドンの前にリボソーム結合部位を組み込んでいる。また、プライマー１および２は、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）で使用するための適切なベクターオーバーラップ５’配列を含む。制限エンドヌクレアーゼＭｌｕＩで直鎖化されたｐＧＢ１００８状態のままで、ＰＣＲ産物をゲル精製した。メーカーの説明書に従って、Ｉｎ－ＦｕｓｉｏｎクローニングキットおよびＧＣ５コンピテント細胞を使って断片を方向を定めて連結した。形質転換体を選別し、制限エンドヌクレアーゼ消化プラスミドＤＮＡのアガロースゲル電気泳動法により、適切なプラスミドを特定した。

【００８２】

図２６に示す以下のプロセスによりプラスミドｐＧＢ１０３３を作製した。ｐＧＢ１０２６を制限エンドヌクレアーゼＮｃｏＩおよびＳｐｈＩで消化し、得られた８．３ｋｂ断片をゲル精製した。ｐＧＢ１０２６の２回目の一定分量を制限エンドヌクレアーゼＭｌｕＩおよびＳｐｈＩで消化し、得られた１．４ｋｂ断片をゲル精製した。プラスミドｐＪ２４１－MK．PMK．MPD．ＩＤＩを制限エンドヌクレアーゼＮｃｏＩおよびＭｌｕＩで消化し、得られた合成オペロンを含む４．１ｋｂをゲル精製した。ＮＥＢ　Ｑｕｉｃｋ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ）を使って、3分子連結反応により断片を一緒に連結し、ＧＣ５コンピテント細胞に挿入して形質転換した。形質転換体を選別し、制限エンドヌクレアーゼ消化プラスミドＤＮＡのアガロースゲル電気泳動法により適切なプラスミドを特定した。

【００８３】

図２７に示すような標準的クローニング技術を使って、プロモータおよびターミネーターを有するｐＧＢ１０３３由来2オペロンをＢａｍＨＩ／ＡｖｒＩＩ　ＤＮＡ断片としてｐＧＳ３１Ｒ－ＭＣＳに挿入することによりプラスミドｐＧＢ１０３６を構築した。断片をＮＥＢ　Ｑｕｉｃｋ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ）を使って一緒に連結し、ＧＣ５コンピテント細胞中に挿入し形質転換した。形質転換体を選別し、制限エンドヌクレアーゼ消化プラスミドＤＮＡのアガロースゲル電気泳動法により適切なプラスミドを特定した。

【００８４】

電気穿孔法を使って大腸菌ＢＬ２１エレクトロコンピテント細胞中にプラスミドｐＧＢ１０３６およびｐＪ４０１－ＮＥＳ１－ｉｄｉを挿入することにより同時形質転換した。

【００８５】

ネロリドール、リナロールおよび２－メチル－３－ブテン－２－オール生成を以下のようにアッセイした。ＬＢ寒天プレートからのプラスミドｐＪ４０１－ＮＥＳ１－ｉｄｉおよびｐＧＢ１０３６を含むＢＬ２１の単一コロニーを使って、５０μｇ／ｍｌのカナマイシンおよび３７μｇ／ｍｌのクロラムフェニコールを含む１０ｍｌのＬＢ培地（１０ｇ／Ｌの酵母エキス、５ｇ／ＬのＢａｃｔｏトリプトン、１０ｇ／Ｌの塩化ナトリウム）に播種した。３７℃で１６時間、回転振盪インキュベーター中でフラスコをインキュベートした。１６時間後、５０μｇ／ｍｌのカナマイシン、２０μｇ／ｍｌのクロラムフェニコール、２００μｇ／ｍｌのアニドロテトラサイクリン、および0．１ｍＭのＩＰＴＧを含む新しいＬＢ培地を使って、６００ｎｍで０．４～０．５の初期細胞密度になるまで培養液を希釈した。４ｍｌの希釈培養液を２０ｍｌのＧＣバイアルに入れ、３０℃で６または２４時間、振盪を加えながらインキュベートした。実施例３で記載のように、６または２４時間後、ヘッドスペースガスをＧＣ／ＭＳ－ＳＩＭにより分析した。

【００８６】

この実施例の結果を図２８に示す。ｐＪ４０１－ＮＥＳ１－ｉｄｉおよびｐＧＢ１０３６を含むＢＬ２１細胞は、約４．０５ｍｇ／Ｌの８．８分のピークに対応するリナロール、および０．３８ｍｇ／Ｌの４．８分のピークに対応する２－メチル－３－ブテン－２－オールを生成した。これは、ｐＪ４０１－ＮＥＳ１－ｉｄｉおよびｐＧＢ１０３６を含む

大腸菌細胞が、ｐＪ４０１－ＮＥＳ１－ｉｄｉを単独で含む細胞より７倍多くの２－メチル－３－ブテン－２－オールを生成することを示す。

【００８７】

実施例５

２－メチル－３－ブテン－２－オールに対するリナロールの比率を変えるＦａＮＥＳ１変異

この実施例は、ＦａＮＥＳ１への変異の導入により、生成される２－メチル－３－ブテン－２－オールの量に対する生成されるリナロールの量を変えることができることを示す。

【００８８】

部位特異的変異誘発または完全遺伝子合成を使って、野性型ＦａＮＥＳ１アミノ酸配列中に特異的アミノ酸置換を導入した。表４は、変異体酵素名および対応する変異を示す。表４のアミノ酸およびこの実施例の番号付与は、ジェンバンク受入番号Ｐ０ＣＶ９４で公表されている野性型ＦａＮＥＳ１酵素のアミノ酸位置に対応する

【表４】

表４

| 酵素名 | 導入変異 |
|---|---|
| NES1v2 | I266F, S374F およびI490F |
| NES1#1 | I266F |
| NES1#2 | S374F |
| NES1#3 | I490F |
| NES1#4 | G375D |
| NES1#5 | I266F および S374F |
| NES1#6 | I266F および 1490F |
| NES1#7 | S374F および I490F |
| NES1#8 | L413F |
| NES1#9 | I490K |
| NES1#10 | I490Y |

【００８９】

ＦａＮＥＳ１およびＨ．ｐｌｕｖｉａｌｉｓ ｉｄｉ遺伝子のコドン最適化配列を使って、プラスミドｐＪ４０１－ＮＥＳ１ｖ２－ｉｄｉからＮＥＳｖ２を生成した。作成中、３種のアミノ酸変異を導入し、位置２６６のイソロイシンをフェニルアラニンに（Ｉ２６６Ｆ）、位置３７４のセリンをフェニルアラニンに（Ｓ３７４Ｆ）、および位置４９０のイソロイシンをフェニルアラニンに（Ｉ４９０Ｆ）置換した。

【００９０】

プラスミドｐＪ４０１－ＮＥＳ１ｖ２－ｉｄｉをテンプレートとして使って、標準的部位特異的変異誘発技術によりＦａＮＥＳ１変異体のＮＥＳ１＃１～ＮＥＳ１＃１０を生成した。部位特異的変異をＤＮＡシーケンシングにより確認した。確認された変異体を電気穿孔法により大腸菌ＢＬ２１エレクトロコンピテント細胞中に挿入した。それぞれ個別変異体に対するリナロールおよび２－メチル－３－ブテン－２－オールの生成を３０℃で６時間の培養時間を使って実施例３に記載の方法に従ってアッセイした。結果を表５に示す。

【表５】

表５

| FaNES1変異酵素 | リナロール (mg/L) | 2-メチル-3-ブテン-2-オール (mg/L) |
|---|---|---|
| 野性型 | 0.54 | 0.02 |
| NESv2 | − | − |
| NES#1 | − | − |
| NES#2 | − | − |
| NES#3 | − | − |
| NES#4 | − | − |
| NES#5 | − | − |
| NES#6 | − | − |
| NES#7 | − | − |
| NES#8 | 0.05 | − |
| NES#9 | − | − |
| NES#10 | − | − |

【００９１】
ジメチルアリルジホスファートの供給を増やすと、野性型ＦａＮＥＳ１によるリナロールおよび２－メチル－３－ブテン－２－オールの生成が増加することが示されている（実施例４）ので、一部のＦａＮＥＳ１変異体をコードするプラスミドをｐＧＢ１０３６と共にＢＬ２１エレクトロコンピテント細胞中に挿入して同時形質転換を行った。３０℃で２４時間のインキュベーション時間を使って実施例３に示す方法に従って、変異体酵素のリナロールおよび２－メチル－３－ブテン－２－オールを生成する能力をアッセイした。結果を表６に示す。

【表６】

表６

| FaNES1変異体酵素* | Lin* (mg/L) | 232-MB* (mg/L) |
|---|---|---|
| 野性型 | 4.05 | 0.38 |
| NES1#1 | | 0.04 |
| NES1#3 | 0.08 | 0.04 |
| NES1#8 | 0.79 | 0.05 |
| NES1#9 | XX | XX |
| NES1#10 | XX | XX |

＊ｐＧＢ１０３６により供給された高ジメチルアリルジホスファート濃度でインビボアッセイを行った。Lin＝リナロール；232-MB＝２－メチル－３－ブテン－２－オール。

【００９２】
実施例６
ジメチルアリルジホスファートからイソプレンを生成するための微生物
この実施例は、ホスファターゼ、２－メチル－３－ブテン－２－オール異性化酵素、および２－メチル－３－ブテン－２－オール脱水酵素を発現する非天然微生物を使って、どのようにしてイソプレンを生成できるかを示す。

【００９３】
枯草菌のｙｈｆＲ遺伝子を大腸菌中での発現用にコドン最適化し、合成し、プラスミドベクターｐＪｅｘ４０４に挿入して、ｐＪｅｘ４０４－ｙｈｆＲを生成した。リボソーム結合部位を含むコドン最適化ｙｈｆＲ配列（配列番号３）を図１１に示す。下記のオリゴヌクレオチドプライマーを使って、リボソーム結合部位およびｙｈｆＲコード配列をポリ

メラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）で増殖した。
５’－ＧＧＧ　ＣＡＡ　ＧＴＡ　ＡＣＴ　ＣＧＡ　ＴＴＡ　ＡＡＧ　ＡＧＧ　ＡＧＡ　ＡＡＡ　ＴＡＴ　ＡＡＴ　ＧＡＣ　ＧＧＣ　ＡＧ－３’（配列番号１１）
５’－ＧＣＣ　ＣＴＴ　ＧＧＧ　ＧＣＴ　ＣＧＡ　ＧＴＴ　ＡＴＴ　ＴＧＡ　ＴＧＡ　ＡＡＣ　ＣＧＣ　ＴＣＡ　ＧＡＴ　ＧＧ－３’（配列番号１２）．

【００９４】
酵素ＸｈｏＩを使ったエンドヌクレアーゼ制限によりプラスミドｐＪ４０４－ＬＤＩを直鎖化した。ｙｈｆＲコード配列およびＸｈｏＩ消化ｐＪ４０４－ＬＤＩを含むＰＣＲ産物を、標準的実験技術を使ってアガロースゲル精製した。メーカーの指示書に従って、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，ＣＡ）を使って断片を連結した後、コンピテント大腸菌ＧＣ５細胞（Ｇｅｎｅ　Ｃｈｏｉｃｅ：Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣから入手可能）中に化学的に挿入して形質転換した。形質転換体を選別し、制限エンドヌクレアーゼ消化プラスミドＤＮＡのアガロースゲル電気泳動法により適切なプラスミドを特定した。その後、適切なプラスミドをエレクトロコンピテント大腸菌ＢＬ２１中に挿入して形質転換した。得られたプラスミドをｐＪ４０４－ＬＤＩ．ｙｈｆＲと命名した。

【００９５】
プラスミドｐＪ４０４－ＬＤＩ．ｙｈｆＲを含むＢＬ２１によるイソプレンの生成は、以下のようにアッセイできる。ＬＢ寒天プレートからのｐＪ４０４－ＬＤＩ．ｙｈｆＲまたはｐＪ４０４－ＬＤＩを含むＢＬ２１の単一コロニーを使って、１２５ｍＬエルレンマイヤーフラスコ中の、２０ｇ／Ｌのグリセロールおよび１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む１０ｍＬのＬＢ培地（１０ｇ／Ｌの酵母エキス、５ｇ／ＬのＢａｃｔｏトリプトン、１０ｇ／Ｌの塩化ナトリウム）に播種する。フラスコを３７℃で１６時間、回転振盪インキュベーターでインキュベートする。１６時間後、２０ｇ／Ｌのグリセロールおよび１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む新しいＬＢ培地を使って６００ｎｍで０．１６の光学密度まで培養液を希釈する。５０ｍｌの希釈培養液を３００－ｍＬエルレンマイヤーフラスコに入れ、回転振盪インキュベーターで、６００ｎｍの光学密度が約０．６になるまで、典型的な例では９０分間、３７℃でインキュベートする。その後、４ｍｌの培養液を２０ｍｌガスクロマトグラフィーヘッドスペースバイアルに入れる。ＩＰＴＧ（イソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド）を加えて０．１ｍＭとする。培養液を３７℃で１６時間、振盪を加えながら培養する。

【００９６】
イソプレン、３－メチル－２－ブテン－１－オールおよび２－メチル－３－ブテン－２－オールを前述のように測定する。イソプレンピークの同一性は、ＧＣ／ＭＳを使って前述のように確認できる。

【００９７】
実施例７
２－メチル－３－ブテン－２－オールのイソプレンへの酵素変換
この実施例は、酵素調製物による２－メチル－３－ブテン－２－オールからのイソプレンの生成について示す。

【００９８】
ｐＪ４０４－ＬＤＩを含むＢＬ２１の形質転換体を１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含むルリアーベルターニ（ＬＢ）寒天プレート（１０ｇ／Ｌの酵母エキス、５ｇ／ＬのＢａｃｔｏトリプトン、１０ｇ／Ｌの塩化ナトリウム、１５ｇ／ＬのＢａｃｔｏ寒天）上で選択した。

【００９９】
ＬＢ寒天プレートからのｐＪ４０４－ＬＤＩを含むＢＬ２１の単一コロニーを、１２５－ｍＬのエルレンマイヤーフラスコ中の１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む１０ｍｌのＬＢ培地（１０ｇ／Ｌの酵母エキス、５ｇ／ＬのＢａｃｔｏトリプトン、１０ｇ／Ｌの

塩化ナトリウム）に播種した。フラスコを３７℃で１６時間、回転振盪インキュベーターでインキュベートした。１６時間後、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む新しいＬＢ培地を使って６００ｎｍで０．１６の光学密度になるまで得られた培養液を希釈した。５０ｍｌの希釈培養液を３００－ｍＬのエルレンマイヤーフラスコに入れ、回転振盪インキュベーターで、６００ｎｍの光学密度が約０．６になるまで、典型的な例では９０分間、３７℃でインキュベートした。その後、ＩＰＴＧ（イソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド）を加えて１．０ｍＭとし、培養液を３７℃でさらに４時間、振盪を加えながら培養した。

【０１００】

遠心分離（６，５００ｒｐｍ、１０分、４℃）により液体培養物から細胞を集め、沈殿物の重量を測定した。沈殿物を、１グラム細胞沈殿物当たり５ｍＬの室温Ｎｏｖａｇｅｎ　ＢｕｇＢｕｓｔｅｒ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）中に再懸濁し、低速設定の回転ミキサーを使って室温で２０分間インキュベートした。不溶性の細胞壊死組織片を遠心分離（１６，０００ｘｇ、２０分、４℃）で除去し、上清を新しいチューブに移した。

【０１０１】

２－メチル－３－ブテン－２－オールのイソプレンへの酵素変換を以下のように行った。種々の濃度の緩衝液（５０ｍＭのトリスｐＨ７．８、２ｍＭのジチオスレイトール）および基質（２－メチル－３－ブテン－２－オール）を氷上の２０ｍＬのヘッドスペースバイアル中で混合した。ＬＤＩ抽出物（０．１５ｍＬ）の添加により反応を開始し、最終反応容量は、１ｍＬであった。バイアルを３７℃の振盪インキュベーターに移し、１～６時間インキュベートした。８５℃に５分間加熱することにより反応を停止させた。

【０１０２】

５９７５Ｃ　ＭＳＤおよびＣＴＣ－ＰＡＬオートサンプラーを備えたＡｇｉｌｅｎｔ７８９０Ａ　ＧＣを使って、ヘッドスペースＧＣ／ＭＳにより２－メチル－３－ブテン－２－オールおよびイソプレン生成物を定量した。 ヘッドスペースバイアルを６００ｒｐｍで攪拌しながら８５℃で５分間インキュベートした。 その後、８５℃で１ｍｌのヘッドスペースガスをヘッドスペースシリンジを使って取り出し、ＧＣ注入口に注入した（２５０℃、スプリット比；２０：１）。ＧＣ／ＭＳ法では、ＶＦ－６２４ｍｓ　６０ｍｘ２５０μｍｘ１．４μｍカラム（Ｊ＆Ｗ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に流すキャリアガスとして１．５ｍｌ／分の流速のヘリウム、９０℃で１分保持後２５℃／分で昇温し２３０℃で２分間保持のオーブンプログラム、２３０℃のＭＳソース温度、および１５０℃の四重極温度、を使用した。質量分析計をスキャンモード（２０～１６０質量単位）で操作した。ＮＩＳＴ　１１　ＭＳライブラリー、ならびに基準試料（２－メチル－３－ブテン－２－オール（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）；１３５ｐｐｍｖイソプレン、乾燥窒素ガス中の１３５ｐｐｍｖ二酸化炭素（Ｍａｔｈｅｓｏｎ　ＴＲＩＧＡＳ，Ｈｏｕｓｔｏｎ，ＴＸ））に対する比較により２－メチル－３－ブテン－２－オールおよびイソプレンピークを特定した。結果を次の２つの表に示す。

【表７】

| インキュベーション時間（時間） | 2-メチル-3-ブテン-2-オール | イソプレン |
|---|---|---|
| 0（酵素抽出物なし） | 10 mM | N.D. |
| 1 | 10 mM | 169.2 |
| 3 | 10 mM | 505.0 |
| 6 | 10 mM | 846.2 |

注記： N.D.；検出されず。

注記： N.D.；検出されず。

【表８】

| インキュベーション 時間（時間） | 2-メチル-3-ブテン-2-オール | イソプレン |
|---|---|---|
| 3 | 0 mM | N.D. |
| 3 | 0.5 mM | 56.6 |
| 3 | 5 mM | 356.4 |
| 3 | 50 mM | 706.6 |

【０１０３】
結果は、リナロール脱水酵素－異性化酵素は、２－メチル－３－ブテン－２－オールをイソプレンに効率的に変換することを示す。
【０１０４】
実施例８
３－メチル－２－ブテン－１－オールのイソプレンへの酵素変換
この実施例は、酵素調製物による３－メチル－２－ブテン－１－オールからのイソプレンの生成について示す。
【０１０５】
ｐＪ４０４－ＬＤＩを含むＢＬ２１の形質転換体を１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含むルリアーベルターニ（ＬＢ）寒天プレート（１０ｇ／Ｌの酵母エキス、５ｇ／ＬのＢａｃｔｏトリプトン、１０ｇ／Ｌの塩化ナトリウム、１５ｇ／ＬのＢａｃｔｏ寒天）上で選択した。
【０１０６】
ＬＢ寒天プレートからのｐＪ４０４－ＬＤＩを含むＢＬ２１の単一コロニーを使って１２５－ｍＬエルレンマイヤーフラスコ中の１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む１０ｍｌのＬＢ培地（１０ｇ／Ｌの酵母エキス、５ｇ／ＬのＢａｃｔｏトリプトン、１０ｇ／Ｌの塩化ナトリウム）に播種した。３７℃で１６時間、回転振盪インキュベーターでフラスコをインキュベートした。１６時間後、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む新しいＬＢ培地を使って６００ｎｍで０．１６の光学密度になるまで得られた培養液を希釈した。５０ｍｌの希釈培養液を３００－ｍＬエルレンマイヤーフラスコに入れ、回転振盪インキュベーターで、６００ｎｍの光学密度が約０．６になるまで、典型的な例では９０分間、３７℃でインキュベートした。その後、ＩＰＴＧ（イソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド）を加えて１．０ｍＭとし、培養液を３７℃でさらに４時間、振盪を加えながら培養した。
【０１０７】
遠心分離（６，５００ｒｐｍ、１０分、４℃）により液体培養物から細胞を集め、沈殿物の重量を測定した。沈殿物を、１グラム細胞沈殿物当たり５ｍＬの室温Ｎｏｖａｇｅｎ ＢｕｇＢｕｓｔｅｒ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）中に再懸濁し、低速設定の回転ミキサーを使って室温で２０分間インキュベートした。不溶性の細胞壊死組織片を遠心分離（１６，０００ｘｇ、２０分、４℃）で除去し、上清を新しいチューブに移した。
【０１０８】
３－メチル－２－ブテン－１－オールのイソプレンへの酵素変換を以下のように行った。種々の濃度の緩衝液（５０ｍＭのトリスｐＨ７．８、２ｍＭのジチオスレイトール）および基質（３－メチル－２－ブテン－１－オール）を氷上の２０ｍＬのヘッドスペースバイアル中で混合した。ＬＤＩ抽出物（０．１５ｍＬ）の添加により反応を開始し、最終反応容量は、１ｍＬであった。バイアルを３７℃の振盪インキュベーターに移し、１～６時間インキュベートした。８５℃に５分間加熱することにより反応を停止させた。
【０１０９】

５９７５Ｃ　ＭＳＤおよびＣＴＣ－ＰＡＬオートサンプラーを備えたＡｇｉｌｅｎｔ７８９０Ａ　ＧＣを使って、ヘッドスペースＧＣ／ＭＳにより３－メチル－２－ブテン－１－オール、２－メチル－３－ブテン－２－オールおよびイソプレン生成物を定量した。ヘッドスペースバイアルを６００ｒｐｍで攪拌しながら８５℃で５分間インキュベートした。その後、８５℃で１ｍｌのヘッドスペースガスを、ヘッドスペースシリンジを使って取り出し、ＧＣ注入口に注入した（２５０℃、スプリット比；２０：１）。ＧＣ／ＭＳ法では、ＶＦ－６２４ｍｓ　６０ｍｘ２５０μｍｘ１．４μｍカラム（Ｊ＆Ｗ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に流すキャリアガスとして１．５ｍｌ／分の流速のヘリウム、９０℃で１分保持後２５℃／分で昇温し２３０℃で２分間保持のオーブンプログラム、２３０℃のＭＳソース温度、および１５０℃の四重極温度、を使用した。質量分析計をスキャンモード（２０～１６０質量単位）で操作した。ＮＩＳＴ　１１　ＭＳライブラリー、ならびに基準試料（３－メチル－２－ブテン－１－オール、２－メチル－３－ブテン－２－オール（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）；１３５ｐｐｍイソプレン、乾燥窒素ガス中の１３５ｐｐｍ二酸化炭素（Ｍａｔｈｅｓｏｎ　ＴＲＩＧＡＳ，Ｈｏｕｓｔｏｎ，ＴＸ））に対する比較により３－メチル－２－ブテン－１－オール、２－メチル－３－ブテン－２－オールおよびイソプレンピークを特定した。結果を次の表７および８に示す。

【表９】

表7

| インキュベーション時間（時間） | 3-メチル-2-ブテン-1-オール | 2-メチル-3-ブテン-2-オール | イソプレン |
|---|---|---|---|
| 0（酵素抽出物なし） | 10 mM | N.D. | N.D. |
| 1 | 10 mM | 0.31 | 2.35 |
| 3 | 10 mM | 0.49 | 3.8 |
| 6 | 10 mM | 0.72 | 6.85 |

注記：N.D.；検出されず。

【表１０】

表8

| インキュベーション時間（時間） | 3-メチル-2-ブテン-1-オール | 2-メチル-3-ブテン-2-オール | イソプレン |
|---|---|---|---|
| 3 | 0 mM | N.D. | N.D. |
| 3 | 0.5 mM | N.D. | N.D. |
| 3 | 5 mM | 0.26 | 2.16 |
| 3 | 50 mM | 3.04 | 8.67 |

【０１１０】

結果は、リナロール脱水酵素－異性化酵素が、３－メチル－２－ブテン－１－オールを２－メチル－３－ブテン－２－オールおよびイソプレンに効率的に変換することを示す。

【０１１１】

実施例９

２－メチル－３－ブテン－２－オールのイソプレンへの変換用全細胞生体触媒

この実施例は、リナロール脱水酵素－異性化酵素を発現する非天然微生物による２－メチル－３－ブテン－２－オールからのイソプレンの生成について示す。

【０１１２】

ｐＪ４０４－ＬＤＩを含むＢＬ２１の形質転換体を１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含むルリアーベルターニ（ＬＢ）寒天プレート（１０ｇ／Ｌの酵母エキス、５ｇ／ＬのＢａｃｔｏトリプトン、１０ｇ／Ｌの塩化ナトリウム、１５ｇ／ＬのＢａｃｔｏ寒天）上で選択した。

【０１１３】

ＬＢ寒天プレートからの　ｐＪ４０４－ＬＤＩを含むＢＬ２１の単一コロニーを使って

２５０－ｍＬエルレンマイヤーフラスコ中の１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む５０ｍｌのＬＢ培地（１０ｇ／Ｌの酵母エキス、５ｇ／ＬのＢａｃｔｏトリプトン、１０ｇ／Ｌの塩化ナトリウム）に播種した。３７℃で１６時間、回転振盪インキュベーターでフラスコをインキュベートした。１６時間後、得られた培養液を使って、６０ｇ／Ｌのグリセロール、１００μｇ／ｍＬのアンピシリン、１ｍＭのＩＰＴＧ、および５ｍＭの２－メチル－３－ブテン－２－オールを補充した４５０ｍＬのＭＭ３２培地を含むバイオリアクター（Ｑ＋、Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）に播種した。

【０１１４】

ＭＭ３２培地は、以下のように調製した。次の化学薬品を約８００ミリリットルの蒸留水に加えることにより一価陽イオン溶液を調製した：０．６６ｇの$(NH_4)_2SO_4$、１．２ｇの$Na_2HPO_4$、０．２５ｇの$K_2SO_4$、および１ミリリットルの１０００×微量栄養素溶液（下記）。蒸留水を使って容量を９９０ミリリットルにした。オートクレーブを使って溶液を無菌化した。

【０１１５】

１０００×微量栄養素溶液を次の化学薬品約８００ミリリットルの蒸留水に加えて調製した：０．１７３ｇの亜セレン酸ナトリウム、０．００４ｇの$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$、０．０２５ｇの$H_3BO_3$、０．００７ｇの$CoCl_2\cdot 6H_2O$、０．００３ｇの$CuSO_4\cdot 5H_2O$、０．０１６ｇの$MnCl_2\cdot 4H_2O$、および０．００３ｇの$ZnSO_4\cdot 7H_2O$。３モル塩酸を使って、ｐＨを３．０に調節して化学薬品を完全に溶解し、蒸留水を加えて容量を１リットルにした。濾過により１０００×微量栄養素溶液を無菌化した。

【０１１６】

約８００ミリリットルの蒸留水に次の化学薬品を加えることにより１００×二価陽イオン溶液を調製した：４０ｇの$MgCl_2\cdot 6H_2O$、７ｇの$CaCl_2\cdot 2H_2O$、および０．３ｇの$FeSO_4\cdot 7H_2O$。オートクレーブにより溶液を無菌化した。

【０１１７】

１０ミリリットルの無菌の１００×二価陽イオン溶液を９９０ミリリットルの無菌の一価陽イオン溶液に無菌的に加え、混合することによりＭＭ３２培地を調製した。

【０１１８】

バイオリアクターを３７℃で操作した。ｐＨを７．０に設定し、９％水酸化アンモニウムを使って制御した。気流を１００ｍＬ／分に設定した。撹拌を５５０ｒｐｍに設定した。０、２、４、６、２４、３０および４８時間目に、バイオリアクターから２－ｍＬの試料を取り出した。これらの試料を６００ｎｍでの細胞密度測定に使用し、２－メチル－３－ブテン－２－オールを定量した。イソプレン生成を質量分析により連続的にモニターした。

【０１１９】

５９７５Ｃ　ＭＳＤおよびＣＴＣ－ＰＡＬオートサンプラーを備えたＡｇｉｌｅｎｔ７８９０Ａ　ＧＣを使って、ヘッドスペースＧＣ／ＭＳで２－メチル－３－ブテン－２－オールを定量した。種々の時点の１－ｍＬの試料培養液を２０－ｍＬのヘッドスペースバイアルに入れた。ヘッドスペースバイアルを６００ｒｐｍで撹拌しながら８５℃で５分間インキュベートした。その後、加熱ヘッドスペースシリンジを使って８５℃で１ｍｌのヘッドスペースガスを取り出し、ＧＣ注入口に注入した（２５０℃、スプリット比；２０：１）。ＧＣ／ＭＳ法では、ＶＦ－６２４ｍｓ　６０ｍｘ２５０μｍｘ１．４μｍカラム（Ｊ＆Ｗ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に流すキャリアガスとして１．５ｍｌ／分の流速のヘリウム、９０℃で１分保持後２５℃／分で昇温し２３０℃で２分間保持のオーブンプログラム、２３０℃のＭＳソース温度、および１５０℃の四重極温度、を使用した。質量分析計をスキャンモード（２０～１６０質量単位）で操作した。ＮＩＳＴ　１１　ＭＳライブラリー、ならびに基準試料（３－メチル－２－ブテン－１－オール、２－メチル－３－ブテン－２－オール（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）；１３５ｐｐｍイソプレン、乾燥窒素ガス中の１３５ｐｐｍ二酸化炭素（Ｍａｔｈｅｓｏｎ　ＴＲＩＧＡＳ，Ｈｏｕｓｔｏｎ，ＴＸ

））に対する比較により３－メチル－２－ブテン－１－オール、２－メチル－３－ブテン－２－オールおよびイソプレンのピークを特定した。

【０１２０】

０．５Ｌバイオリアクターからの発酵オフガスのＮ$_2$、ＣＯ$_2$、Ｈ$_2$、Ｏ$_2$、およびイソプレン含量をＨｉｄｅｎ　ＨＰＲ－２０質量分析計（Ｈｉｄｅｎ　Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ，英国）を使ってオンラインガス質量分析によりモニターした。Ｈｉｄｅｎ　ＨＰＲ－２０質量分析計の較正に使われた認証イソプレンガス混合物（１３７５ｐｐｍｖイソプレン、１３７５ｐｐｍｖ二酸化炭素、および乾燥窒素ガス；Ｍａｔｈｅｓｏｎ　ＴＲＩＧＡＳ，Ｈｏｕｓｔｏｎ，ＴＸ）から相対的オフガスイソプレン濃度を決定した。

【０１２１】

この実験の結果を図２９に示す。ｐＪ４０４－ＬＤＩを含むＢＬ２１細胞は、長期間にわたり、５ｍＭの２－メチル－３－ブテン－２－オールをイソプレンに効率的に変換する。２－メチル－３－ブテン－２－オールが消費されるに伴い、イソプレン生成速度は低下する。

【０１２２】

実施例１０

３－メチル－２－ブテン－１－オールのイソプレンへの変換用全細胞生体触媒

この実施例は、リナロール脱水酵素－異性化酵素を発現する非天然微生物による３－メチル－２－ブテン－１－オールからのイソプレンの生成について示す。

【０１２３】

ｐＪ４０４－ＬＤＩを含むＢＬ２１の形質転換体を１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含むルリアーベルターニ（ＬＢ）寒天プレート（１０ｇ／Ｌの酵母エキス、５ｇ／ＬのＢａｃｔｏトリプトン、１０ｇ／Ｌの塩化ナトリウム、１５ｇ／ＬのＢａｃｔｏ寒天）上で選択した。

【０１２４】

ＬＢ寒天プレートからのｐＪ４０４－ＬＤＩを含むＢＬ２１の単一コロニーを使って２５０－ｍＬのエルレンマイヤーフラスコ中の１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む５０ｍｌのＬＢ培地（１０ｇ／Ｌの酵母エキス、５ｇ／ＬのＢａｃｔｏトリプトン、１０ｇ／Ｌの塩化ナトリウム）に播種した。３７℃で１６時間、回転振盪インキュベーターでフラスコをインキュベートした。１６時間後、得られた培養液を使って、６０ｇ／Ｌのグリセロール、１００μｇ／ｍＬのアンピシリン、１ｍＭのＩＰＴＧ、および３０ｍＭの３－メチル－２－ブテン－１－オールを補充した４５０ｍＬのＭＭ３２培地（実施例９）を含むバイオリアクター（Ｑ＋、Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）に播種した。バイオリアクターを３７℃で操作した。ｐＨを７．０に設定し、９％水酸化アンモニウムを使って制御した。気流を１００ｍＬ／分に設定した。撹拌を５５０ｒｐｍに設定した。０、２、４、６、２４、３０および４８時間目に、バイオリアクターから２－ｍＬの試料を取り出した。これらの試料を６００ｎｍでの細胞密度測定に使用し、３－メチル－２－ブテン－１－オールを定量した。イソプレン生成を質量分析により連続的にモニターした。

【０１２５】

５９７５Ｃ　ＭＳＤおよびＣＴＣ－ＰＡＬオートサンプラーを備えたＡｇｉｌｅｎｔ７８９０Ａ　ＧＣを使って、ヘッドスペースＧＣ／ＭＳで３－メチル－２－ブテン－１－オールを定量した。種々の時点の１－ｍＬの試料培養液を２０－ｍＬのヘッドスペースバイアルに入れた。ヘッドスペースバイアルを６００ｒｐｍで撹拌しながら８５℃で５分間インキュベートした。その後、加熱ヘッドスペースシリンジを使って８５℃で１ｍｌのヘッドスペースガスを取り出し、ＧＣ注入口に注入した（２５０℃、スプリット比；２０：１）。ＧＣ／ＭＳ法では、ＶＦ－６２４ｍｓ　６０ｍｘ２５０μｍｘ１．４μｍカラム（Ｊ＆Ｗ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に流すキャリアガスとして１．５ｍｌ／分の流速のヘリウム、９０℃で１分保持後２５℃／分で昇温し２３０℃で２分間保持のオーブンプログラム、２３０℃のＭＳソース温度、および１５０℃の四重極温度、を使用した。質量分析計をスキャンモード（２０～１６０質量単位）で操作した。ＮＩＳＴ　１１　ＭＳライブラリ

ー、ならびに基準試料（３－メチル－２－ブテン－１－オール、２－メチル－３－ブテン－２－オール（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）；１３５ｐｐｍイソプレン、乾燥窒素ガス中の１３５ｐｐｍ二酸化炭素（Ｍａｔｈｅｓｏｎ　ＴＲＩＧＡＳ，Ｈｏｕｓｔｏｎ，ＴＸ））に対する比較により３－メチル－２－ブテン－１－オール、２－メチル－３－ブテン－２－オールおよびイソプレンピークを特定した。

【０１２６】

０．５Ｌバイオリアクターからの発酵オフガスの$Ｎ_2$、$ＣＯ_2$、$Ｈ_2$、$Ｏ_2$、およびイソプレン含量をＨｉｄｅｎ　ＨＰＲ－２０質量分析計（Ｈｉｄｅｎ　Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ，英国）を使ってオンラインガス質量分析によりモニターした。Ｈｉｄｅｎ　ＨＰＲ－２０質量分析計の較正に使われた認証イソプレンガス混合物（１３７５ｐｐｍｖイソプレン、１３７５ｐｐｍｖ二酸化炭素、および乾燥窒素ガス；Ｍａｔｈｅｓｏｎ　ＴＲＩＧＡＳ，Ｈｏｕｓｔｏｎ，ＴＸ）から相対的オフガスイソプレン濃度を決定した。
この実験の結果を図３０に示す。ｐＪ４０４－ＬＤＩを含むＢＬ２１細胞は、長期間にわたり、３０ｍＭの３－メチル－２－ブテン－１－オールを効率的にイソプレンに変換する。

【０１２７】

本明細書で言及された特許および化学的文献は、当業者に利用可能な知識を形成する。本明細書で引用された全ての米国特許および公告または非公告米国特許出願は、参照によって組み込まれる。本明細書で引用された全ての外国の広告特許および特許出願は、本明細書による参照によって組み込まれる。本明細書で引用された全ての他の出版文献、文書、手稿および科学文献は、本明細書による参照によって組み込まれる。

【０１２８】

前述の事項は、本発明の実施形態に関するが、他のおよび追加の本発明の実施形態も、その基本的範囲を逸脱することなく考案でき、その範囲は、次の請求項によって定められる。

【図１】

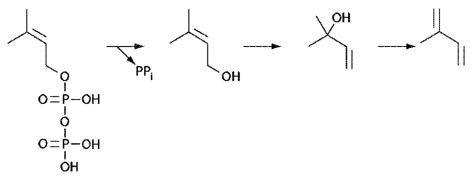



Fig. 1

【図２】

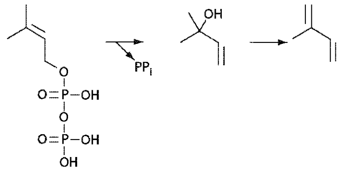



Fig. 2

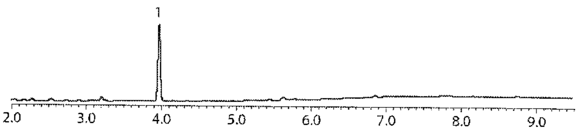
【図３】

AGGAGGTAAAACATATGCACCACCATCATCACCACATGCGCTTTACGTTGAAAACCACCGCCAT
CGTGTCCGCTGCGGCGTTGCTGGCAGGTTTCGGTCCGCCACCGCGTGCGGCGGAGCTGCCGCCA
GGCCGTCTGGCGACCACCGAAGATTACTTCGCGCAACAAGCGAAACAGGCGGTGACGCCGGATG
TGATGGCACAACTGGCCTACATGAACTACATTGACTTCATCAGCCCGTTCTACAGCCGTGGTTG
CAGCTTTGAAGCGTGGGAGTTGAAGCATACGCCGCAACGCGTCATTAAGTATAGCATTGCGTTC
TATGCATACGGTCTGGCGTCGGTCGCACTGATTGACCCGAAGCTGCGTGCCCTGGCAGGTCACG
ATCTGGATATCGCGGTGTCTAAAATGAAGTGCAAGCGTGTTTGGGGTGACTGGGAAGAGGATGG
TTTTGGCACCGACCCGATCGAGAAAGAGAACATCATGTACAAAGGTCATCTGAACCTGATGTAT
GGCCTGTATCAGCTGGTGACGGGTAGCCGTCGCTACGAGGCAGAGCACGCGCACCTGACCCGTA
TCATCCATGACGAGATTGCCGCTAATCCGTTCGCCGGCATCGTATGTGAACCGGACAATTACTT
TGTCCAGTGTAACAGCGTCGCGTACTTGAGCCTGTGGGTTTATGACCGTCTGCACGGCACTGAT
TATCGCGCAGCCACCCGTGCTTGGTTGGATTTCATTCAGAAGGACCTGATCGACCCGGAGCGCG
GTGCATTCTACCTGTCTTACCACCCGGAAAGCGGTGCTGTTAAGCCGTGGATTAGCGCGTATAC
CACTGCATGGACGCTGGCCATGGTTCACGGCATGGATCCGGCGTTTAGCGAGCGCTACTATCCG
CGCTTCAAACAGACCTTCGTTGAAGTGTACGACGAGGGCCGTAAAGCCCGGGTTCGTGAAACCG
CCGGTACCGACGACGCCGACGGTGGCGTGGGTCTGGCGAGCGCGTTTACGCTGTTGTTGGCACG
TGAGATGGGCGATCAGCAACTGTTTGATCAGCTGCTGAATCATCTGGAACCGCCTGCCAAACCG
AGCATTGTCAGCGCGTCCCTGCGTTATGAACACCCTGGCTCCCTGCTGTTTGATGAGCTGCTGT
TCCTGGCTAAAGTTCATGCAGGTTTTGGTGCGCTGCTGCGTATGCCGCCACCGGCAGCGAAGCT
GGCGGGCAAGTAACTCGAG（　配列番号　：１）

【図４】

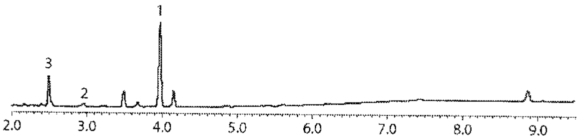
AGGAGGTAAAACATATGCATCATCACCACCACCACATGGAAAAGATCGAGGTAAGCATTAACAG
CAAACATACGATTAAACCGAGCACGAGCTCCACCCCGTTGCAGCCGTATAAGCTGACCCTGCTG
GACCAACTGACCCCACCGGCATACGTCCCAATCGTCTTTTTCTATCCGATTACGGATCACGACT
TCAATCTGCCGCAGACGCTGGCAGACCTGCGTCAAGCCCTGTCCGAAACCCTGACTCTGTATTA
CCCGCTGAGCGGTCGTGTGAAGAATAACTTGTACATTGACGACTTCGAAGAGGGCGTTCCGTAC
CTGGAAGCGCGTGTCAATTGTGATATGACGGACTTCCTGCGCCTGCGTAAGATTGAGTGTTTGA
ACGAGTTCGTGCCGATTAAGCCGTTTAGCATGGAAGCCATTAGCGACGAGCGTTACCCGTTGCT
GGGTGTTCAAGTCAACGTGTTCGATAGCGGTATCGCGATCGGTGTTTCGGTTTCTCATAAACTG
ATCGACGGCGGCACCGCGGACTGCTTCCTGAAATCCTGGGGTGCGGTTTTCCGCGGTTGCCGCG
AGAATATCATCCACCCGAGCCTGAGCGAGGCGGCACTGCTGTTCCCACCGCGCGATGATTTGCC
GGAGAAATATGTTGATCAGATGGAAGCCCTGTGGTTCGCGGGTAAAAAGGTTGCGACCCGTCGC
TTTGTCTTTGGTGTTAAGGCGATCAGCAGCATCCAGGACGAGGCAAAGTCTGAATCGGTGCCTA
AGCCGTCCCGTGTGCACGCGGTCACCGGCTTTCTGTGGAAGCACCTGATTGCGGCAAGCCGTGC
TCTGACCTCTGGCACCACCTCGACGCGCCTGAGCATTGCGGCACAGGCCGTTAATCTGCGTACC
CGCATGAACATGGAAACTGTGCTGGACAATGCGACCGGCAACCTGTTTTGGTGGGCGCAGGCTA
TTCTGGAGTTGAGCCACACCACCCCGGAGATCAGCGATCTGAAGCTGTGCGATCTGGTGAACTT
GTTGAATGGCAGCGTTAAACAATGCAATGGTGATTACTTCGAAACGTTTAAAGGTAAAGAGGGC
TATGGCCGTATGTGTGAATATCTGGATTTTCAGCGTACGATGAGCAGCATGGAGCCGGCACCGG
ATATCTACCTGTTTAGCAGCTGGACGAACTTCTTTAACCCGCTGGACTTTGGTTGGGGTCGTAC
CAGCTGGATCGGTGTCGCAGGTAAGATCGAGAGCGCCAGCTGCAAATTCATTATTCTGGTGCCT
ACCCAATGTGGCTCTGGTATCGAGGCTTGGGTGAACCTGGAAGAAGAGAAAATGGCCATGCTGG
AACAAGACCCGCATTTCCTGGCGCTGGCTAGCCCGAAAACCTTGATTTAACTCGAG
（　配列番号　：２）

【図５】



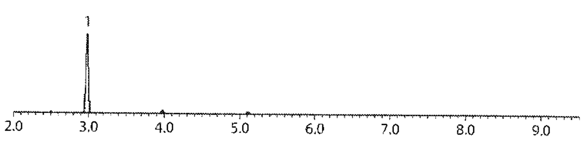

ＬＢ培地中の３−メチル−２−ブテン−１−オール

【図６】



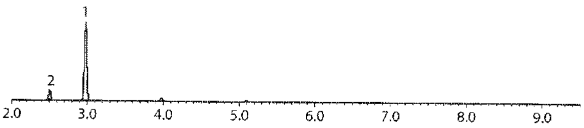

３−メチル−２−ブテン−１−オール＋ＢＬ２１（ｐＪ４０４−ＬＤＩ）

【図７】



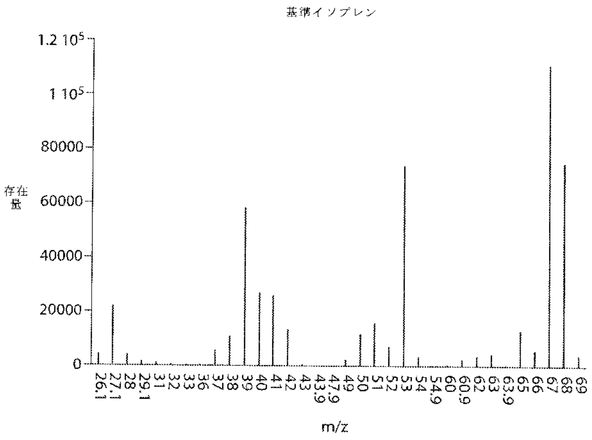

ＬＢ培地中の２−メチル−３−ブテン−２−オール

【図８】

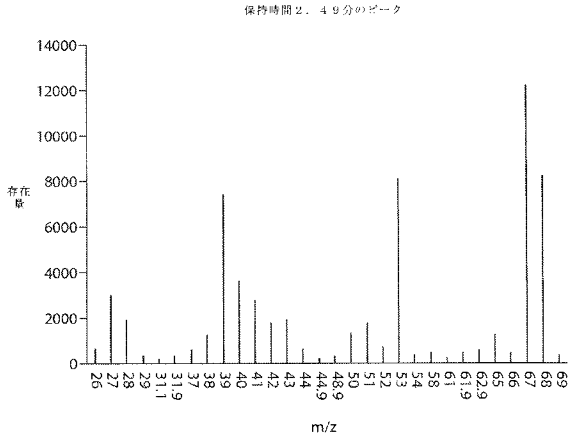



２−メチル−３−ブテン−２−オール＋ＢＬ２１（ｐＪ４０４−ＬＤＩ）

【図９】



【図１０】




【図１１】

ATTAAAGAGGAGAAAATATAATGACGGCAGTATGCCTGGTCCGCCACGGCGAAACCGATTGGAACCTGCAACAGAAA
TGCCAGGGTAAAACCGATATCCCGCTGAATGCGACGGGCGAACGTCAGGCCCGTGAAACGGGTGAATACGTCAAAGA
CTTTAGCTGGGACATCATTGTTACCAGCCCGCTGAAGCGCGCCAAGCGTACGGCTGAGATCATCAATGAATACCTGC
ATCTGCCGATCGTTGAAATGGACGACTTTAAAGAGCGCGATTATGGCGATGCTGAGGGTATGCCGTTGGAGGAGCGC
ACCAAGCGTTATCCGGACAACATTTATCCGAACATGGAGACTCTGGAAGAGCTGACGGACCGTTTGATGGCGGTCT
GGCAAAAGTCAATCAGGCATACCCGAACAAAAGGTGCTGATCGTTGCACATGGTGCGGCAATTCACGCGCTGCTGA
CGGAGATTTCTGGTGGTGACCCGGAGCTGCAAAGCACCCGTCTGGTCAATGCGTGTTTGTCGAATATTGAATTTGCG
GAAGAAAAGTGGCGTATCAAAGACTACAACATTAACTCCCATCTGAGCGGTTTCATCAAATAA（ 配列番号 ： 3）

【図１２】

GGTACCTTAATTAATATAAGGAGGTAAAACATATGAACGTTGAAACCAAACACACGCGCACGATGGGTGACATTTTT
GTACAACATAGCCAGAAACTGGAACTGCTGAAAACCGTCCTGCGTAACGTCGCTGAGCTGGACGCACTGGAAGGCTT
GAACATGATTGACGCGGTGCAGCGTTTGGGTATCGACTACAATTTTCAGCGTGAGATTGACGAGATTCTGCACAAGC
AGATGAGCATCGTCAGCGCGCGTGACGACTTGCACGAGGTTGCGCTGCGCTTCCGTCTGCTGCGCCAGCATGGCTAT
TTCGTCCCAGAGGATGTTTTCAACAATTTCAAGGACTCGAAAGGTACGTTCAAACAGGTGCTGGGTGAGGACATCAA
GGGCCTGATGAGCCTGTACGAGGCGAGCCAACTGGGCACCGAGGGCGAGGACATTCTGGTTGAAGCGGAGAAGTTCA
GCGGCCACTTGCTGAAAACGAGCCTGAGCCACCTGGATCATCATCGTGTGCGTATTGTGGCGAATACCTTGCGCAAT
CCGCACCACAAAAGCCTGGCGCCTTTCATGGCACGTAACTTTTTCGTTACGAGCCAAGCTACTAATAGCTGGCTGAA
TCTGTTGAAAGAGGTCGCCAAGACGGACTTCAATATGGTGCGCTCTCTGCACCAAAATGAGATTGTTCAGATGTCCA
AATGGTGGAAAGAGCTGGGCCTGGCCAAAGAGCTGAAGTTCGCCCGTGACCAGCCGCTGAAGTGGTACATTTGGAGC
ATGGCGTGCCTGACCGATCCGAAACTGAGCGAAGAGCGTGTTGAGCTGACGAAGCCAATCAGCTTTGTTTACTTGAT
TGACGATATCTTTGACGTTTACGGCACGCTGGACGACCTGATCCTGTTTACCGAGGCCGTTAATCGTTGGGAGATCA
CGGCGATCGACCACTTGCCTGACTATATGAAGATTTGTTTTAAGGCATTGTACGATATGACCAATGAGTTTAGCAGC
AAGGTCTATCTGAAACATGGCTGGAACCCGCTGCAAAGCCTGAAAATCAGCTGGGCGAGCTTGTGTAACGCATTCCT
GGTCGAGGCCAAGTGGTTTGCGAGCGGTAAGCTGCCGAAAAGCGAAGAGTATTTGAAGAATGGTATTGTGAGCAGCG
GTGTTAATGTGGTGCTGGTGCACATGTTTTTCCTGCTGGGTCAAAACATCACCCGCAAATCTGTCGAGCTGCTGAAC
GAAACTCCGGCGATCATTAGCTCTAGCGCTGCGATCCTGCGCCTGTGGGATGATTTGGGTAGCGCGAAGGACGAGAA
TCAAGACGGTAACGATGGTAGCTATGTTCGTTGCTACCTGGAAGAACACGAAGGTTGCAGCATCGAAGAAGCGCGCG
AGAAAACCATCAACATGATTAGCGATGAGTGGAAGAAGTTGAATCGCGAGTTGCTGAGCCCGAACCCGTTCCCAGCA
AGCTTCACCCTGGCGAGCCTGAACCTGGCACGTATGATCCCGCTGATGTACTCCTACGACGGTAATCAGTGCCTGCC
TTCCCTGAAAGAGTATATGAAGCTGATGCTGTACGAAACCGTCAGCATGTGATGAGGAATAAAATTATGCTGCGTAG
CCTGCTGCGTGGCCTGACCCACTTTCCGCGTGTGAACTCCGCTCAACAACCGTCGTGCGCCCATGCCCGCCTGCAAT
TTCGTCCGCGCAGCATGCAGCTGCTGGCCGAAGATCGTACCGACCACATGCGTGGTGCTAGTACGTGGGCGGGCGGT
CAATCCCAAGATGAACTGATGCTGAAAGACGAATGCATTCTGGTCGATGCGGATGACAACATCACCGGTCATGTGAG
CAAACTGGAATGTCATAAGTTTCTGCCGCACCAGCCGGCGGGTCTGCTGCACCGTGCATTCTCTGTTTTTCTGTTCG
ATGACCAGGGTCGCCTGCTGCTGCAGCAACGTGCCCGCAGCAAGATTACCTTTCCGTCTGTTTGGACCAATACGTGC
TGTTCACATCCGCTGCACGGCCAGACCCCGGATGAAGTGGATCAGCTGTCGCAAGTGGCTGATGGCACGGTTCCGGG
TGCAAAAGCGGCGGCAATTCGTAAGCTGGAACATGAACTGGGTATCCCGGCACACCAGCTGCCGGCAAGTGCATTTC
GTTTCCTGACCCGCCTGCATTATTGTGCTGCCGATGTTCAGCCGGCGGCAACCCAATCAGCCCTGTGGGGCGAACAC
GAAATGGATTACATTCTGTTCATCCGTGCTAACGTGACCCTGGCGCCGAATCCGGATGAAGTGGACGAAGTTCGTTA
TGTCACGCAGGAAGAACTGCGCCAGATGATGCAACCGGATAACGGTCTGCAATGGTCCCCGTGGTTTCGCATTATCG
CTGCGCGTTTCCTGGAACGTTGGTGGGCCGATCTGGACGCAGCACTGAACACCGATAAACACGAAGACTGGGGCACC
GTCCATCACATCAACGAAGCATAACCATGG （ 配列番号 ： 4）

【図１３】

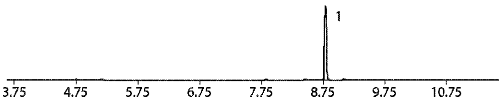



Fig. 13

【図１４】

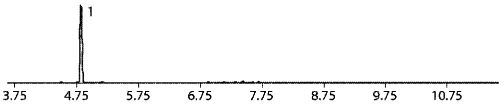



Fig. 14

【図１５】

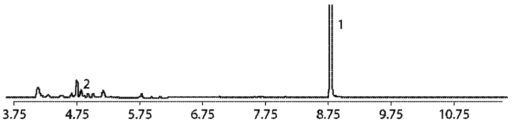



Fig. 15

【図１６】

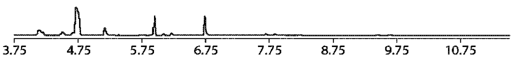
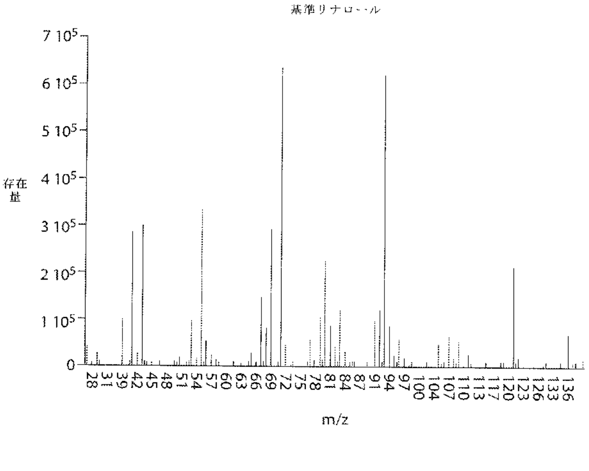
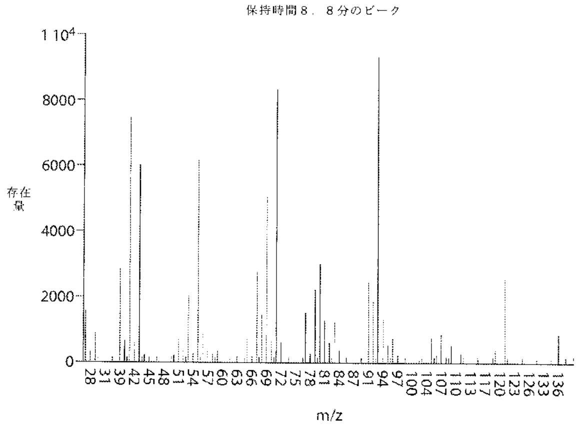



Fig. 16

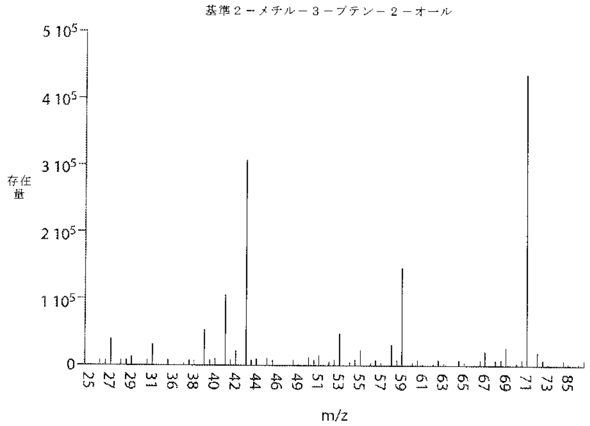
【図１７】



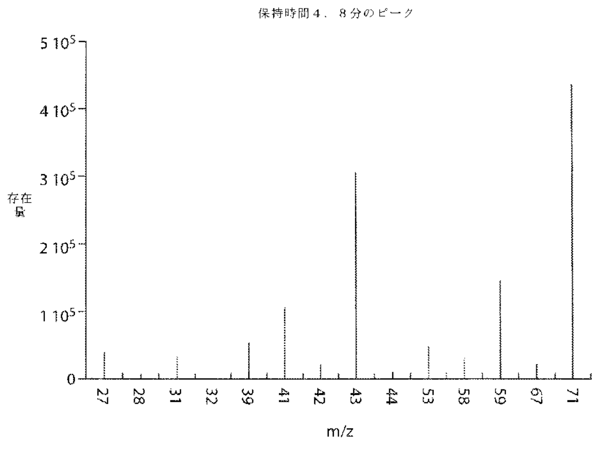
【図１８】




【図１９】




【図２０】




【図２１】

GGATCCTCCCTATCAGTGATAGAGATTGACATCCCTATCAGTGATAGAGATACTGAGCACATCAGCAGGACGCACTG
ACCGGTACCTTTGAATTCCCCACGCGTAGATCTCTAGATGTACACCATGGGCTAGAGGCATCAAATAAAACGAAAGG
CTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCG
CCCTAGACCTAGGCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA
GGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAACGCGCTAGCGGAGTG
TATACTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGTCAGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAAGGCTGCACC
GGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTACGCTCGGTCGTTCGAC
TGCGGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGCGGAGATTTCCTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTG
AGAGGGCCGCGGCAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAG
TGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCC
TGCCTTTCGGTTTACCGGTGTCATTCCGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCATTCCACGCCTGACACTCAGTTCCGGG
TAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGACTGTATGCACGAACCCCCCGTTCAGTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTA
TCGTCTTGAGTCCAACCCGGAAAGACATGCAAAAGCACCACTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTA
GTCTTGAAGTCATGCGCCGGTTAAGGCTAAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTGACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTACC
TCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTCGTTTTCAGAGCAAG
AGATTACGCGCAGACCAAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAAGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACA
GTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAAC
CACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTT
TGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGACTAGTGCTTGG
ATTCTCACCAATAAAAAACGCCCGGCGGCAACCGAGCGTTCTGAACAAATCCAGATGGAGTTCTGAGGTCATTACTG
GATCTATCAACAGGAGTCCAAGCGAGCTCGATATCAAATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAA
TTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAGACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCT
TGTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATCGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCA
AAACTGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCTTTAGGGAAATAGGCCAG
GTTTTCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAAACTGCCGGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGA
GCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCG
TCTTTCATTGCCATACGGAACTCCGGATGAGCATTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAAACTT
GTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAA
CTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTC
TCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCATTATG
GTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAGATATCGACGTCGTCATCAAACCTGTCGC
GCACTCTAGGCTACTCAGCTACTAGAAAGCTTAAGACCCACTTTCACATTTAAGTTGTTTTTCTAATCCGCAGATGA
TCAATTCAAGGCCGAATAAGAAGGCTGGCTCTGCACCTTGGTGATCAAATAATTCGATAGCTTGTCGTAATAATGGC
GGCATACTATCAGTAGTAGGTGTTTCCCTTTCTTCTTTAGCGACTTGATGCTCTTGATCTTCCAATACGCAACCTAA
AGTAAAATGCCCCACAGCGCTGAGTGCATATAATGCATTCTCTAGTGAAAAACCTTGTTGGCATAAAAAGGCTAATT
GATTTTCGAGAGTTTCATACTGTTTTTCTGTAGGCCGTGTACCTAAATGTACTTTTGCTCCATCGCGATGACTTAGT
AAAGCACATCTAAAACTTTTAGCCTTATTACGTAAAAAATCTTGCCAGCTTTCCCCTTCTAAAGGGCAAAAGTGAGT
ATGGTGCCTATCTAACATCTCAATGGCTAAGGCGTCGAGCAAAGCCCGCTTATTTTTTACATGCCAATACAATGTAG
GCTGCTCTACACCTAGCTTCTGGGCGAGTTTACGGGTTGTTAAACCTTCGATTCCGACCTCATTAAGCAGCTCTAAT
GCGCTGTTAATCACTTTACTTTTATCTAATCTTAACATGTGAATACGGGGCGGGATTTCATGGATATGTTTCTTTCT
GCGAGAACCAGCCATATTTAAACTCTTCTCTCAAATTTATGAATCTATTATACAGAAAAATTTTCCTGAAAGCAAAT
AAATTTTTTATGATTTCCCTCGACAATTCGCGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTT
（配列番号：5）

【図２２】

GGATCCTCCCTATCAGTGATAGAGATTGACATCCCTATCAGTGATAGAGATACTGAGCACATCAGCAGGACGCACTGAC
CGGTACCTTTGAATTCCCCACGCGTAGATCTCTAGATGTACACCATGGGCTAGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCA
GTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCCCTAG
ACCTAGGGTACGGGTTTTGCTGCCCGCAAACGGGCTGTTCTGGTGTTGCTAGTTTGTTATCAGAATCGCAGATCCGGCT
TCAGGTTTGCCGGCTGAAAGCGCTATTTCTTCCAGAATTGCCATGATTTTTTCCCCACGGGAGGCGTCACTGGCTCCCG
TGTTGTCGGCAGCTTTGATTCGATAAGCAGCATCGCCTGTTTCAGGCTGTCTATGTGTGACTGTTGAGCTGTAACAAGT
TGTCTCAGGTGTTCAATTTCATGTTCTAGTTGCTTTGTTTTACTGGTTTCACCTGTTCTATTAGGTGTTACATGCTGTT
CATCTGTTACATTGTCGATCTGTTCATGGTGAACAGCTTTAAATGCACCAAAAACTCGTAAAAGCTCTGATGTATCTAT
CTTTTTTACACCGTTTTCATCTGTGCATATGGACAGTTTTCCCTTTGATATCTAACGGTGAACAGTTGTTCTACTTTTG
TTTGTTAGTCTTGATGCTTCACTGATAGATACAAGAGCCATAAGAACCTCAGATCCTTCCGTATTTAGCCAGTATGTTC
TCTAGTGTGGTTCGTTGTTTTTGCGTGAGCCATGAGAACGAACCATTGAGATCATGCTTACTTTGCATGTCACTCAAAA
ATTTTGCCTCAAAACTGGTGAGCTGAATTTTTGCAGTTAAAGCATCGTGTAGTGTTTTTCTTAGTCCGTTACGTAGGTA
GGAATCTGATGTAATGGTTGTTGGTATTTTGTCACCATTCATTTTTATCTGGTTGTTCTCAAGTTCGGTTACGAGATCC
ATTTGTCTATCTAGTTCAACTTGGAAAATCAACGTATCAGTCGGGCGGCCTCGCTTATCAACCACCAATTTCATATTGC
TGTAAGTGTTTAAATCTTTACTTATTGGTTTCAAAACCCATTGGTTAAGCCTTTTAAACTCATGGTAGTTATTTTCAAG
CATTAACATGAACTTAAATTCATCAAGGCTAATCTCTATATTTGCCTTGTGAGTTTTCTTTTGTGTTAGTTCTTTTAAT
AACCACTCATAAATCCTCATAGAGTATTTGTTTTCAAAAGACTTAACATGTTCCAGATTATATTTTATGAATTTTTTTA
ACTGGAAAAGATAAGGCAATATCTCTTCACTAAAAACTAATTCTAATTTTTCGCTTGAGAACTTGGCATAGTTTGTCCA
CTGGAAAATCTCAAAGCCTTTAACCAAAGGATTCCTGATTTCCACAGTTCTCGTCATCAGCTCTCTGGTTGCTTTAGCT
AATACACCATAAGCATTTTCCCTACTGATGTTCATCATCTGAGCGTATTGGTTATAAGTGAACGATACCGTCCGTTCTT
TCCTTGTAGGGTTTTCAATCGTGGGGTTGAGTAGTGCCACACAGCATAAAATTAGCTTGGTTTCATGCTCCGTTAAGTC
ATAGCGACTAATCGCTAGTTCATTTGCTTTGAAAACAACTAATTCAGACATACATCTCAATTGGTCTAGGTGATTTTAA
TCACTATACCAATTGAGATGGGCTAGTCAATGATAATTACTAGTCCTTTTCCCGGGAGATCTGGGTATCTGTAAATTCT
GCTAGACCTTTGCTGGAAAACTTGTAAATTCTGCTAGACCCTCTGTAAATTCCGCTAGACCTTTGTGTGTTTTTTTTGT
TTATATTCAAGTGGTTATAATTTATAGAATAAAGAAAGAATAAAAAAAGATAAAAAGAATAGATCCCAGCCCTGTGTAT
AACTCACTACTTTAGTCAGTTCCGCAGTATTACAAAAGGATGTCGCAAACGCTGTTTGCTCCTCTACAAAACAGACCTT
AAAACCCTAAAGGCTTAAGTAGCACCCTCGCAAGCTCGGGCAAATCGCTGAATATTCCTTTTGTCTCCGACCATCAGGC
ACCTGAGTCGCTGTCTTTTTCGTGACATTCAGTTCGCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGGTAAATGGCACTA
CAGGCGCCTTTTATGGATTCATGCAAGGAAACTACCCATAATACAAGAAAAGCCCGTCACGGGCTTCTCAGGGCGTTTT
ATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGACTTTTTGCTGTTCAGCAGTTCCTGCCCTCTGATTTTCCAGTCTGACCAC
TTCGGATTATCCCGTGACAGGTCATTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCG
TCTTACTGTCCCTAGTGCTTGGATTCTCACCAATAAAAAACGCCCGGCGGCAACCGAGCGTTCTGAACAAATCCAGATG
GAGTTCTGAGGTCATTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGCGAGCTCGATATCAAATTACGCCCCGCCCTGCCACTC
ATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAGACGGCATGATGAACCTGAATCGCC
AGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATCGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGG
CCACGTTTAAATCAAAACTGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCTTTAGG
GAAATAGGCCAGGTTTTCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAAACTGCCGGAAATCGTCGTGGTAT
TCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCA
GCTCACCGTCTTTCATTGCCATACGGAACTCCGGATGAGCATTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATA
AAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGA
GCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTT
TCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCATTATG
GTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAGATATCGACGTCGTCATCAAACCTGTCGCGC
ACTCTAGGCTACTCAGCTACTAGAAAGCTTAAGACCCACTTTCACATTTAAGTTGTTTTTCTAATCCGCAGATGATCAA
TTCAAGGCCGAATAAGAAGGCTGGCTCTGCACCTTGGTGATCAAATAATTCGATAGCTTGTCGTAATAATGGCGGCATA
CTATCAGTAGTAGGTGTTTCCCTTTCTTCTTTAGCGACTTGATGCTCTTGATCTTCCAATACGCAACCTAAAGTAAAAT
GCCCCACAGCGCTGAGTGCATATAATGCATTCTCTAGTGAAAAACCTTGTTGGCATAAAAAGGCTAATTGATTTTCGAG
AGTTTCATACTGTTTTTCTGTAGGCCGTGTACCTAAATGTACTTTTGCTCCATCGCGATGACTTAGTAAAGCACATCTA
AAACTTTTAGCCTTATTACGTAAAAAATCTTGCCAGCTTTCCCCTTCTAAAGGGCAAAAGTGAGTATGGTGCCTATCTA
ACATCTCAATGGCTAAGGCGTCGAGCAAAGCCCGCTTATTTTTTACATGCCAATACAATGTAGGCTGCTCTACACCTAG
CTTCTGGGCGAGTTTACGGGTTGTTAAACCTTCGATTCCGACCTCATTAAGCAGCTCTAATGCGCTGTTAATCACTTTA
CTTTTATCTAATCTTAACATGTGAATACGGGGCGGGATTTCATGGATATGTTTCTTTCTGCGAGAACCAGCCATATTTA
AACTCTTCTCTCAAATTTATGAATCTATTATACAGAAAAATTTTCCTGAAAGCAAATAAATTTTTTATGATTTCCCTCG
ACAATTCGCGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTT（配列番号：6)

【図２３】

GGTACCATTAAAGAGGAGAAAATATAATGAAAACTGTAGTAATCATCGACGCCCTGCGCACGCCAATCGGCAAGTAT
AAGGGTTCTCTGAGCCAAGTTAGCGCAGTCGATCTGGGCACCCATGTCACGACCCAGTTGCTGAAGCGTCATTCCAC
CATCAGCGAGGAAATTGATCAGGTGATCTTCGGTAACGTCCTGCAAGCCGGCAATGGTCAGAACCCTGCGCGTCAGA
TTGCGATTAACTCTGGCTTGAGCCACGAGATCCCGGCTATGACGGTGAATGAGGTTTGTGGCAGCGGTATGAAGGCG
GTTATCTTGGCAAAACAGCTGATCCAGTTGGGTGAGGCCGAGGTACTGATTGCGGGTGGTATCGAAAACATGAGCCA
GGCGCCAAAATTGCAACGTTTTAACTATGAAACTGAAAGCTATGACGCGCCGTTTTCCAGCATGATGTACGACGGTC
TGACCGATGCGTTCAGCGGTCAGGCGATGGGCCTGACTGCGGAGAATGTGGCGGAGAAGTACCACGTCACTCGTGAA
GAACAAGACCAGTTTAGCGTGCATTCCCAGCTGAAAGCGGCGCAAGCACAAGCAGAGGGTATCTTCGCAGACGAAAT
CGCGCCGTTGGAGGTGAGCGGCACGCTGGTTGAGAAAGATGAGGGTATCCGCCCTAATTCTAGCGTGGAAAAGCTGG
GTACTCTGAAAACCGTTTTCAAAGAGGACGGTACGGTTACGGCCGGTAACGCGAGCACCATCAATGATGGTGCGAGC
GCCCTGATTATCGCAAGCCAGGAGTACGCAGAGGCTCACGGTCTGCCGTACCTGGCGATTATCCGTGACAGCGTTGA
AGTGGGTATCGATCCGGCATATATGGGTATCAGCCCGATTAAGGCAATTCAGAAATTGCTGGCCCGTAACCAGCTGA
CCACGGAGGAGATTGATCTGTACGAGATTAACGAGGCGTTTGCAGCAACTAGCATCGTTGTGCAGCGTGAGTTGGCC
CTGCCGGAGGAGAAAGTTAACATTTACGGTGGCGGTATCAGCTTGGGTCATGCAATCGGCGCCACGGGCGCTCGTCT
GCTGACCTCCCTGAGCTACCAACTGAATCAGAAGGAGAAGAAATACGGCGTTGCCAGCCTGTGCATTGGCGGTGGCC
TGGGTCTGGCCATGCTGTTGGAACGTCCGCAACAGAAGAAGAATTCACGTTTTTACCAAATGAGCCCGGAGGAGCGT
TTGGCCAGCCTGCTGAATGAGGGTCAGATTAGCGCGGATACCAAGAAAGAATTTGAAAACACCGCGCTGAGCAGCCA
GATTGCTAATCACATGATTGAGAACCAGATCAGCGAAACCGAAGTGCCGATGGGTGTTGGCCTGCACCTGACGGTTG
ATGAAACCGATTACCTGGTTCCGATGGCAACCGAAGAACCTAGCGTTATTGCAGCACTGAGCAACGGTGCAAAGATC
GCTCAGGGCTTCAAAACGGTCAATCAGCAGCGTCTGATGCGTGGCCAAATTGTCTTTTATGATGTGGCAGACCCGGA
GTCCTTGATCGACAAGCTGCAAGTACGTGAGGCGGAAGTTTTCCAACAGGCGGAGCTGAGCTATCCGAGCATCGTCA
AGCGCGGTGGTGGTCTGCGTGACCTGCAATACCGCACGTTTGATGAGAGCTTTGTTAGCGTGGACTTTCTGGTGGAC
GTGAAGGACGCGATGGGTGCCAATATCGTTAATGCAATGCTGGAGGGTGTGGCGGAACTGTTTCGCGAATGGTTCGC
AGAACAAAAGATTCTGTTCAGCATTTTGAGCAACTACGCCACCGAATCGGTAGTTACCATGAAAACCGCGATTCCAG
TGTCTCGTCTGAGCAAGGGTAGCAATGGTCGTGAAATCGCCGAGAAAATTGTGCTGGCCAGCCGCTACGCGAGCCTG
GACCCGTATCGCGCGGTTACCCACAATAAGGGTATCATGAATGGCATTGAAGCGGTCGTTCTGGCCACGGGCAATGA
CACCCGTGCGGTGAGCGCTTCCTGCCACGCATTTGCTGTTAAAGAGGGCCGTTACCAGGGCCTGACCTCGTGGACCC
TGGATGGTGAGCAACTGATCGGCGAGATCAGCGTTCCGTTGGCACTGGCCACCGTGGGTGGTGCGACCAAAGTCTTG
CCGAAGTCCCAGGCGGCAGCGGACCTGCTGGCTGTTACCGATGCGAAGGAGCTGTCCCGCGTGGTTGCTGCTGTCGG
TTTGGCGCAAAACCTGGCGGCACTGCGTGCCCTGGTGAGCGAGGGTATTCAAAAAGGTCACATGGCGTTGCAAGCGC
GTAGCCTGGCAATGACGGTCGGTGCAACCGGCAAAGAAGTGGAGGCGGTCGCCCAACAGCTGAAGCGCCAAAAGACC
ATGAACCAAGACCGCGCAATGGCAATTCTGAATGATCTGCGCAAGCAATGAGAGGAGATAAAATATATGACCATCGG
CATCGACAAAATCAGCTTCTTCGTCCCACCGTACTACATCGATATGACTGCGCTGGCAGAAGCTCGTAACGTTGACC
CGGGTAAATTCCACATTGGCATTGGCCAGGATCAGATGGCAGTTAATCCGATTTCGCAGGATATCGTTACCTTTGCG
GCCAACGCGGCTGAGGCGATCCTGACCAAAGAGGATAAAGAGGCCATTGACATGGTCATCGTGGGTACGGAATCTAG
CATTGATGAATCCAAAGCAGCAGCCGTTGTTCTGCACCGTCTGATGGGTATCCAACCTTTCGCGCGTTCTTTCGAAA
TCAAAGAAGCGTGTTACGGCGCAACGGCGGGTTTGCAGCTGGCTAAAAACCACGTTGCACTGCACCCAGACAAAAAG
GTGTTGGTTGTGGCGGCAGACATCGCGAAGTACGGCCTGAACAGCGGTGGCGAACCAACGCAGGGCGCTGGTGCAGT
GGCGATGCTGGTCGCGAGCGAACCGCGCATCCTGGCGCTGAAAGAAGATAATGTGATGTTGACTCAGGATATCTACG
ACTTCTGGCGTCCGACGGGCCATCCGTACCCGATGGTGGACGGTCCACTGTCGAACGAGACTTACATTCAGAGCTTT
GCACAAGTCTGGGATGAACACAAAAAGCGCACGGGTTTGGACTTCGCGGACTATGACGCCTTGGCGTTTCACATCCC
GTATACGAAGATGGGCAAAAAGGCACTGCTGGCCAAGATTAGCGACCAAACCGAGGCTGAGCAAGAGCGTATCTTGG
CCCGTTATGAAGAGAGCATTGTCTATTCTCGCCGCGTGGGTAATCTGTATACGGGCAGCCTGTATCTGGGCTTGATT
AGCCTGCTGGAGAACGCGACCACGCTGACCGCAGGTAATCAGATTGGTCTGTTTTCCTATGGTAGCGGTGCGGTGGC
GGAGTTTTTCACGGGCGAGCTGGTGGCGGGTTACCAAAATCATTTGCAAAAGGAAACCCATCTGGCGCTGTTGGACA
ATCGCACGGAACTGAGCATTGCAGAATATGAGGCGATGTTCGCGGAAACCCTGGATACCGATATTGACCAGACCCTG
GAGGATGAACTGAAGTACTCTATTAGCGCCATCAACAACACCGTGCGTAGCTACCGTAACTAAACGCGT
（配列番号：7)

【図２４】

ACGCGTGCTAGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCG
GTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCCCTAGATCTCTAGATTCCCTATCAGTGATAGAGATTGACATCC
CTATCAGTGATAGAGATACTGAGCACATCAGCAGGACGCACTGACCTGTACAGAAGGAGATATACATATGATCATCG
AAACCCCATCCAAAGTAATCCTGTTCGGCGAGCACGCGGTTGTTTATGGTTACCGTGCCATCAGCATGGCAATTGAT
CTGACCAGCACCATTGAGATCAAGGAAACGCAAGAGGACGAAATCATCCTGAATCTGAACGATCTGAACAAATCGCT
GGGTCTGAATCTGAACGAAATCAAGAATATCAATCCGAACAATTTTGGCGACTTCAAGTATTGTCTGTGCGCTATCA
AGAACACCCTGGACTACCTGAATATCGAACCGAAAACTGGTTTTAAGATCAACATCAGCTCCAAAATCCCGATTAGC
TGTGGCCTGGGTTCTAGCGCGAGCATTACGATCGGCACGATTAAAGCGGTTTCTGGCTTCTACAATAAAGAGTTGAA
AGACGACGAAATCGCGAAGCTGGGCTACATGGTTGAGAAGGAAATCCAGGGTAAAGCATCCATCACGGATACCAGCA
CTATTACGTACAAAGGTATTCTGGAAATCAAGAATAACAAATTCCGCAAAATCAAAGGTGAGTTCGAGGAATTTCTG
AAGAACTGCAAATTTCTGATCGTTTATGCGGAGAAACGCAAGAAGAAAACCCCCGAATTGGTGAACGAAGTCGCAAA
AATCGAGAACAAAGATGAGATTTTCAAGGAAATCGATAAAGTGATTGACGAGGCGCTGAAGATTAAGAATAAAGAGG
ACTTTGGTAAGTTGATGACCAAAAATCACGAGCTGCTGAAGAAGCTGAACATTAGCACCCCGAAGCTGGACCGCATC
GTTGATATTGGCAACCGTTTTGGCTTCGGTGCTAAACTGACCGGCGCTGGCGGTGGTGGTTGCGTCATTATCCTGGT
TAACGAAGAGAAAGAAAAGGAACTGCTGAAAGAGCTGAACAAAGAGGACGTACGCATTTTCAACTGTCGTATGATGA
ATTGAAGAAGGAGATATACCATGATCGAAGTAACTACCCCAGGCAAACTGTTCATCGCCGGCGAGTATGCAGTGGTT
GAGCCGGGTCACCCGGCGATTATTGTCGCGGTGGACCAGTTCGTCACGGTCACGGTAGAAGAAACCACCGATGAGGG
CAGCATCCAGAGCGCGCAATACAGCAGCCTGCCGATTCGTTGGACCCGTCGCAATGGTGAACTGGTACTGGATATCC
GTGAAAATCCGTTCCATTACGTTCTGGCCGCTATTCACCTGACCGAGAAGTATGCACAAGAACAGAATAAGGAACTG
AGCTTCTACCACCTGAAAGTGACCAGCGAGCTGGATTCGAGCAACGGCCGCAAATACGGTTTGGGCAGCAGCGGTGC
AGTCACCGTCGGTACGGTGAAGGCCCTGAATATCTTTTACGATCTGGGTCTGGAAAACGAGGAAATCTTTAAGCTGT
CCGCGCTGGCGCACCTGGCAGTGCAGGGTAATGGTAGCTGCGGTGACATCGCAGCGTCTTGTTACGGTGGCTGGATC
GCATTTAGCACTTTTGACCACGATTGGGTCAACCAGAAGGTCGCGACCGAGACTCTGACCGATCTGCTGGCTATGGA
CTGGCCGGAGCTGATGATTTTCCCTCTGAAAGTCCCGAAACAATTGCGTCTGCTGATTGGCTGGACGGGTTCGCCTG
CGAGCACCTCTGACCTGGTTGATCGCGTACACCAGTCTAAAGAAGAGAAACAAGCGGCGTATGAGCAATTCCTGATG
AAATCCCGTCTGTGTGTCGAAACCATGATTAACGGTTTCAATACCGGCAAGATTAGCGTGATTCAAAAACAGATCAC
CAAGAACCGTCAACTGTTGGCAGAACTGAGCAGCCTGACGGGCGTTGTCATTGAAACCGAGGCGCTGAAAAACTTGT
GTGACCTGGCGGAGAGCTATACGGGTGCCGCTAAAAGCAGCGGTGCTGGTGGCGGCGACTGCGGTATTGTTATCTTC
CGCCAGAAGTCTGGTATCCTGCCGCTGATGACCGCGTGGGAGAAGGACGGCATCACGCCGCTGCCGTTGCACGTTTA
CACCTATGGTCAGAAAGAATGCAAAGAGAAACACGAGAGCAAGCGTTAAAGGAGGTATAAAAAATGACCGTCTACAC
CGCCAGCGTCACCGCACCAGTAAACATCGCGACGTTGAAGTACTGGGGTAAACGTGATACCAAGCTGAACTTGCCGA
CGAACAGCAGCATCAGCGTTACCCTGTCCCAGGACGATCTGCGTACGCTGACGAGCGCAGCTACTGCGCCGGAGTTC
GAACGTGACACCCTGTGGCTGAACGGCGAACCGCATAGCATTGACAACGAACGTACGCAAAACTGCCTGCGCGACCT
GCGCCAATTGCGCAAAGAAATGGAATCTAAAGATGCAAGCCTGCCTACCCTGAGCCAGTGGAAGCTGCACATTGTGA
GCGAGAACAATTTTCCGACGGCGGCAGGCCTGGCAAGCTCTGCCGCAGGCTTTGCAGCACTGGTCAGCGCCATCGCG
AAATTGTACCAATTGCCGCAATCCACCTCGGAGATTTCTCGCATCGCTCGTAAAGGCAGCGGCAGCGCCTGCCGCTC
TCTGTTTGGCGGTTATGTTGCCTGGGAAATGGGCAAGGCCGAGGACGGTCACGATTCGATGGCTGTCCAGATTGCCG
ACAGCAGCGATTGGCCGCAAATGAAGGCGTGCGTTCTGGTCGTGTCCGACATCAAGAAGGACGTGAGCAGCACCCAG
GGTATGCAACTGACGGTCGCTACCAGCGAGCTGTTCAAAGAGCGCATTGAGCACGTCGTTCCGAAGCGTTTCGAAGT
CATGCGCAAAGCGATCGTAGAGAAAGACTTTGCTACGTTTGCGAAAGAAACCATGATGGACTCCAATAGCTTCCACG
CGACCTGTCTGGATTCTTTTCCGCCGATCTTCTATATGAACGATACGAGCAAACGCATCATCTCCTGGTGTCACACG
ATCAATCAGTTTTATGGCGAAACCATTGTCGCATACACCTTCGATGCGGGTCCGAACGCAGTCCTGTACTACCTGGC
AGAAAACGAAAGCAAGCTGTTCGCCTTCATTTACAAACTGTTTGGCAGCGTGCCGGGTTGGGACAAAAAGTTCACGA
CGGAACAGCTGGAGGCATTTAACCACCAGTTCGAGAGCAGCAATTTCACCGCTCGTGAATTGGATCTGGAGCTGCAA
AAGGACGTGGCGCGTGTTATTCTGACCCAAGTTGGTTCTGGCCCGCAAGAAACGAACGAGTCTCTGATCGATGCGAA
AACCGGCCTGCCGAAGGAGTAGGAAGGAGATATAAAAATGCAAACCGAACACGTAATCCTGCTGAACGCACAAGGCG
TCCCGACGGGTACGCTGGAGAAATATGCAGCCCACACCGCTGACACCCGCTTGCACCTGGCTTTTAGCTCTTGGCTG
TTCAACGCAAAAGGTCAACTGCTGGTTACCCGCCGTGCACTGAGCAAGAAGGCGTGGCCGGGTGTCTGGACTAATAG
CGTGTGCGGTCACCCGCAACTGGGTGAAAGCAATGAGGACGCAGTGATTCGTCGTTGTCGTTATGAATTGGGTGTCG
AAATCACCCCGCCTGAAAGCATTTATCCGGACTTCCGTTACCGTGCCACCGATCCGAGCGGTATCGTTGAAAACGAA
GTTTGTCCGGTCTTTGCGGCACGTACGACCAGCGCGCTGCAAATCAACGACGACGAGGTGATGGACTACCAGTGGTG
TGATCTGGCCGACGTTCTGCATGGCATCGATGCCACCCCGTGGGCCTTTTCTCCGTGGATGGTGATGCAGGCGACCA
ACCGTGAGGCGCGTAAACGTTTGAGCGCGTTCACCCAACTGAAGTAACCATGGGCTAGAGGCATCAAATAAAACGAA
AGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCG
CCGCCCTAGACCTAGG（配列番号：8)

【図２５】

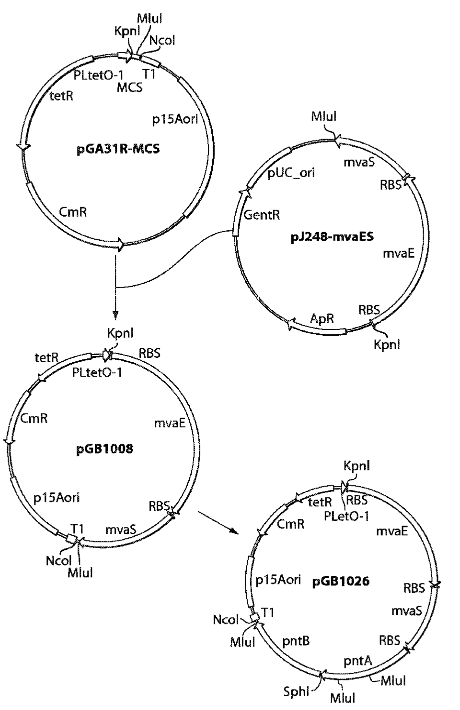



Fig. 25

【図２６】

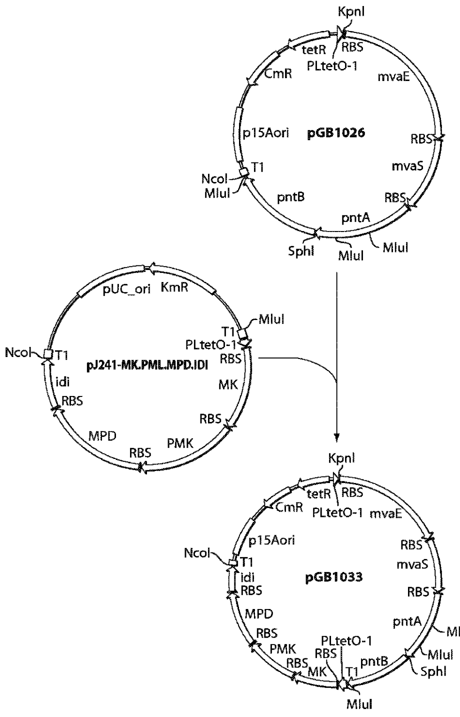



Fig. 26

【図２７】

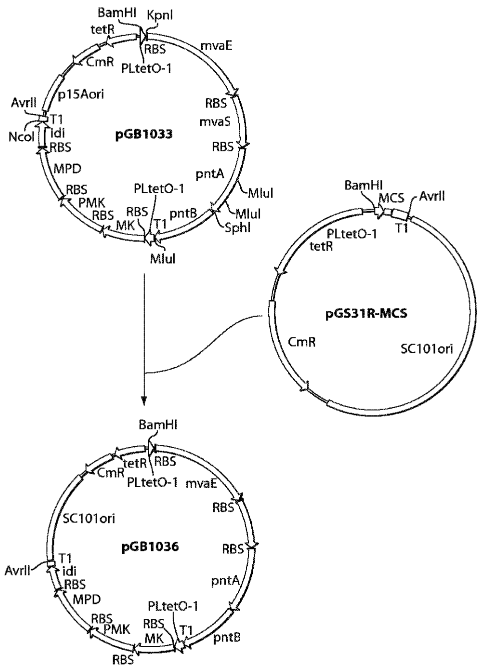



Fig. 27

【図２８】

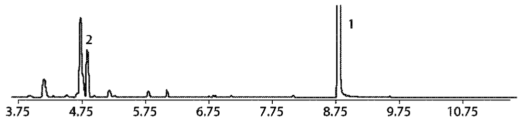
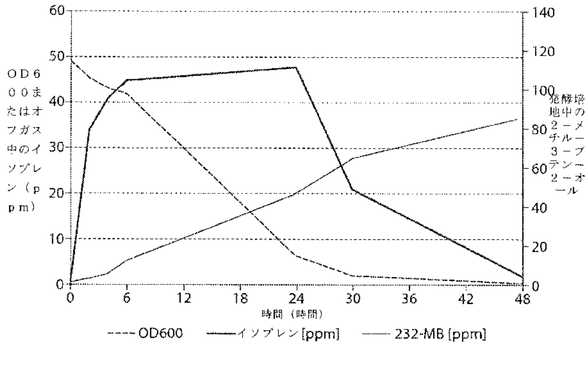
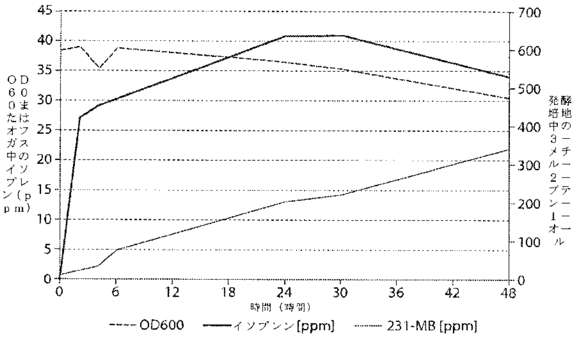



Fig. 28

【図２９】




【図３０】



【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US2013/041108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12P 5/02 (2013.01)
USPC - 585/614
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)
IPC(8) - C07C 11/18; C12N 1/20, 1/21, 15/29; C12P 5/00, 5/02, 7/00, 7/02, 7/04 (2013.01)
USPC - 435/132, 157, 166, 167, 252.33, 252.8, 471; 585/614

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC - C07C 4/10; C12N 15/70; C12P 7/04; C12R 1/19; Y02E 50/343 (2013.01)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Orbit, Google Patents, Google Scholar

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X<br>—<br>Y | US 2010/0144893 A1 (AHARONI et al) 10 June 2010 (10.06.2010) entire document | 1-3, 7, 14-18, 20-23, 30-32<br>—<br>4-6, 8-13, 19, 24-29, 33, 34 |
| X<br>—<br>Y | BRODKORB et al. "Linalool Dehydratase-Isomerase, a Bifunctional Enzyme in the Anaerobic Degradation of Monoterpenes" J. Biol. Chem. 2010, 285: Pages 30436-30442 originally published online 27 July 2010 (27.07.2010) entire document | 35-42<br>—<br>4, 12, 13, 24-29, 33, 34, 43, 44 |
| Y | WITHERS et al "Identification of Isopentenol Biosynthetic Genes from Bacillus subtilis by a Screening Method Based on Isoprenoid Precursor Toxicity" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 73, No. 19 Oct. 2007, Pages 6277-6283 entire document | 5, 6, 24, 26, 28, 33, 34 |
| Y | US 2007/0141574 A1 (KEASLING et al) 21 June 2007 (21.06.2007) entire document | 6, 9 |
| Y | US 2010/0331800 A1 (MCPHEE) 30 December 2010 (30.12.2010) entire document | 10, 11 |
| Y | US 2009/0137014 A1 (TSURUTA et al) 28 May 2009 (28.05.2009) entire document | 19 |
| Y | US 2010/0113846 A1 (MCAULIFFE et al) 06 May 2010 (06.05.2010) entire document | 26-29, 43, 44 |

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"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
20 September 2013

Date of mailing of the international search report
04 OCT 2013

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:
Blaine R. Copenheaver
PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

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

(74)代理人　100121511
弁理士　小田　直
(74)代理人　100191086
弁理士　高橋　香元
(72)発明者　キャンベル，ポール
アメリカ合衆国，テキサス州　７７０２７，ヒューストン，３８０６　ウィッカーズハム　レーン
(72)発明者　ブレドウ，セバスチャン
アメリカ合衆国，テキサス州　７７０２５，ヒューストン，９５０２　ペムバートン　トレース
(72)発明者　ジョウ，フアイジン
アメリカ合衆国，テキサス州　７７００７，ヒューストン，ユニット　ビー，４２１７　ギブソン　ストリート
(72)発明者　ドネスケ，ステファニー
アメリカ合衆国，テキサス州　７７４９４，ケイティ，５１１９　アゼーリア　メドウ　レーン
(72)発明者　モンティチェッロ，ダニエル　ジェー．
アメリカ合衆国，テキサス州　７７３８１，ザ　ウッドランズ，１５２　ノース　ミル　トレース

Ｆターム(参考)　4B024 AA03 BA07 BA08 BA80 CA02 CA04 CA20 DA06 EA04 GA11 HA01
4B064 AB04 CA02 CA19 CA21 CB04 CB22 CB28 CC24 CD06 CE01 DA16
4B065 AA01Y AA15Y AA26X AA26Y AA88Y AB01 AC14 BA02 BB06 BD13 CA03 CA27