

(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2015-521036

(P2015-521036A)

(43) 公表日 平成27年7月27日(2015.7.27)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 9/00 (2006.01)	C 12 N 9/00	Z N A 4 B 0 2 4
C 07 K 14/415 (2006.01)	C 07 K 14/415	4 B 0 5 0
C 12 P 5/02 (2006.01)	C 12 P 5/02	4 B 0 6 3
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/09	A 4 B 0 6 4
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 117 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-510461 (P2015-510461)	(71) 出願人	509240479 ダニスコ・ユース・インク
(86) (22) 出願日	平成25年5月2日 (2013.5.2)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94 304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
(85) 翻訳文提出日	平成26年12月25日 (2014.12.25)	(71) 出願人	513158760 ザ・グッドイヤー・タイヤ・アンド・ラバー・カンパニー
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/039315		アメリカ合衆国、オハイオ州 44316 、アクロン イノベーション・ウェイ 2 OO
(87) 國際公開番号	W02013/166320	(74) 代理人	100071010 弁理士 山崎 行造
(87) 國際公開日	平成25年11月7日 (2013.11.7)	(74) 代理人	100118647 弁理士 赤松 利昭
(31) 優先権主張番号	61/641,861		
(32) 優先日	平成24年5月2日 (2012.5.2)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	13/802,360		
(32) 優先日	平成25年3月13日 (2013.3.13)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】イソブレン生産用のマメ科植物イソブレン合成酵素

(57) 【要約】

【解決手段】

本発明は、改良された性能特性を備えるイソブレン合成酵素活性を有するポリペプチドに関する方法及び組成物を提供する。特に、本発明は、組換え宿主細胞においてイソブレン生産を増加させる、マメ科植物イソブレン合成酵素を提供する。

【選択図】図1

Figure 1

```

peanut_fom_1n24.TRR5ANYCIPNLWDFEFICGSVENDLQVERLEERARKLEEVRGLMKKVEIPLSLELMON
Palba_from_1n24.AIRSANYEPNSWYDYLSSDTDESEIEVYDKAKKLAEVREINNEKAFTLTLEIJON
peanut_fom_1n24.VERGLITYKFEIDKSALNNRIVPLHHHTINNYG---IATALSFRFLQHAFHVSPD
Palba_from_1n24.VORLIGLGYRFSDIRGALDR----FVSSGGFDAVTKTSLHGTALSFRLLRQHGFEVSQE
peanut_fom_1n24.VFESFKKEGK-FKKEISGQVIGLNLNIVETSYLGFEGEITLDEARASATHLKNLQLTNOV
Palba_from_1n24.APSGFQDQNGNFIENLKDIALKALISLYEASFLAEGENILDEAKFASHLKLSE-EKI
peanut_fom_1n24.CNIVUMAEKVHRHALEYHIRRVRHLEARWPIERIYEQKAEHDGALLEIAKLDNFNMWOSVMKK
Palba_from_1n24.GKELAEQ-VNHALEPLHRRRTQRLLEAVWSIEAVRKEDANCVLLEALDYNMIOSVYQR
peanut_fom_1n24.ELGELLSRWWRREIGLUKLDVDRMLMEYFWALGMAPHPOLTECRKAVTKMFGVLTIDD
Palba_from_1n24.DIRETSRWWRVRLGATKLHFARDRILISPWVAVGVAEPCVSDCRNSVAKMFSFVTTIJD
peanut_fom_1n24.VDYVTGTLDELQLGTDADVRWDVNAETLPDYMKLCYLAYNNSVNDTAYSTLERKGDNLS
Palba_from_1n24.IYDVVTGLDELFIDAVERWDVNAINDUDPVYMKLCFLAINTINSIAYDNLKOKGENIL
peanut_fom_1n24.PHLIAKSWRDLCKAFLQEAWSNNKIPPFDAYRNASVSSSGGALLACPYFVTSVTDSTSQ
Palba_from_1n24.PYLTKAWADLNCALFCAKWLYNKSTPTDDVFCNAWKSSSGPLQVFAFYAVV-QNIKK
peanut_fom_1n24.-AIDSITNYHGIVRSSCAIFRLCNNDLATSAAEELERGETTNITSYMTENGTEEEARESL
Palba_from_1n24.EEENILOKYHDTSRSPHIFRLCNCLASASAEEARGETANVSCYMTKIGSEELATESV
peanut_fom_1n24.GKLUDQEWKKMMNRDVVLESAPVNPKFIAINMARSHCTYQYGDLGRPDDTAENRIKLS
Palba_from_1n24.MWUDETWKKMMKEKLGGSLFAKPFVETAINLAROSHCTYHNGDAHTSDELTTRKRVLSV
peanut_fom_1n24.LIEPIP
Palba_from_1n24.ITEPIL

```

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イソプレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドであって、前記ポリペプチドは、配列番号 1 に対して少なくとも 40 % の配列同一性を含み、前記ポリペプチドは、配列番号 1 に対応する 1 つ以上のアミノ酸残基に対応する 1 つ以上のアミノ酸残基を有し、前記 1 つ以上のアミノ酸残基は、F 2 8 7、G 3 9 7、N 4 3 8、E 4 5 1、及び Y 5 1 4 からなる群から選択され、前記単離ポリペプチドは、ブエラリア・モンタナ (*P. montana*) のものではない、単離ポリペプチド。

【請求項 2】

前記単離ポリペプチドが、ラッカセイ種 (*Arachis sp.*)、ムクナ種 (*Mucuna sp.*)、キマメ種 (*Cajanus sp.*)、ダイズ種 (*Glycine sp.*)、ミヤコグサ種 (*Lotus sp.*)、及びウマゴヤシ種 (*Medicago sp.*) からなる群から選択されるイソプレン合成酵素である、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。 10

【請求項 3】

前記単離ポリペプチドが、ラッカセイ (*A. hypogaea*)、ハッショウマメ (*M. pruriens*)、キマメ (*C. cajans*)、ダイズ (*G. max*)、ツルマメ (*G. soja*)、ミヤコグサ (*L. japonicus*)、及びタルウマゴヤシ (*M. truncatula*) からなる群から選択されるイソプレン合成酵素である、請求項 2 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 4】

前記単離ポリペプチドが、ラッカセイ (*A. hypogaea*) イソプレン合成酵素である、請求項 2 に記載の単離ポリペプチド。 20

【請求項 5】

前記単離ポリペプチドが、ハッショウマメ (*M. pruriens*) イソプレン合成酵素である、請求項 2 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 6】

前記単離ポリペプチドが、ポプラ (*poplar*) イソプレン合成酵素と比較して基質阻害が低減されている、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 7】

前記単離ポリペプチドが、ポプラ (*poplar*) イソプレン合成酵素と比較して向上されているイソプレン合成酵素活性を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の単離ポリペプチド。 30

【請求項 8】

向上されているイソプレン合成酵素活性が、ポプラ (*poplar*) イソプレン合成酵素を含む宿主細胞と比較してメバロン酸の存在下での増殖性が改良されていることを示す前記イソプレン合成酵素を含む宿主細胞により表される、請求項 7 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 9】

前記単離ポリペプチドが、ラッカセイ (*A. hypogaea*) (配列番号 3)、ダイズ 1 (*G. max 1*) (配列番号 5)、ダイズ 2 (*G. max 2*) (配列番号 7)、ハッショウマメ (*M. pruriens*) (配列番号 9)、及びキマメ (*C. cajans*) (配列番号 11) からなる群から選択されるイソプレン合成酵素である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の単離ポリペプチド。 40

【請求項 10】

前記単離ポリペプチドが、配列番号 3 のアミノ酸配列を含むラッカセイ (*A. hypogaea*) イソプレン合成酵素である、請求項 9 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 11】

配列番号 3 のアミノ酸配列を含むマメ科植物イソプレン合成酵素に対し少なくとも 70 % の配列同一性を含む、イソプレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチド。

【請求項 12】

前記イソプレン合成酵素が、少なくとも約 1 . 3 の K_{cat} 値を有する、請求項 1 ~ 1

50

1のいずれか一項に記載のイソブレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチド。

【請求項 1 3】

前記イソブレン合成酵素が、少なくとも約2.5の K_m 値を有する、請求項1～11のいずれか一項に記載のイソブレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチド。

【請求項 1 4】

前記イソブレン合成酵素が、少なくとも約13.0の K_i 値を有する、請求項1～11のいずれか一項に記載のイソブレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチド。

10

【請求項 1 5】

イソブレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、配列番号1のアミノ酸配列を含むポプラ(*poplar*)イソブレン合成酵素に対し少なくとも40%配列同一性を含み、及び前記ポリペプチドが、少なくとも約1.3の K_{cat} 値を有する、単離ポリペプチド。

【請求項 1 6】

イソブレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、前記配列番号1のアミノ酸配列を含むポプラ(*poplar*)イソブレン合成酵素に対し少なくとも40%配列同一性を含み、前記ポリペプチドが少なくとも約2.5の K_m 値を有する、単離ポリペプチド。

20

【請求項 1 7】

イソブレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、配列番号1のアミノ酸配列を含むポプラ(*poplar*)イソブレン合成酵素に対し少なくとも40%配列同一性を含み、及び前記ポリペプチドが少なくとも約13.0の K_i 値を有する、単離ポリペプチド。

【請求項 1 8】

操作可能なようにプロモータと組み合わせられた請求項1～17のいずれか一項に記載のイソブレン合成酵素をコードする異種ポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

【請求項 1 9】

前記ポリヌクレオチド配列が、プラスミド内に含有される、請求項18に記載の宿主細胞。

30

【請求項 2 0】

前記ポリヌクレオチド配列が、前記宿主細胞の染色体に組み込まれる、請求項18に記載の宿主細胞。

【請求項 2 1】

前記宿主細胞が、グラム陽性菌細胞、グラム陰性菌細胞、糸状菌細胞、及び酵母細胞からなる群から選択される、請求項18に記載の宿主細胞。

【請求項 2 2】

前記宿主が、エシェリキア種(*Escherichia sp.*)（大腸菌(*E. coli*)）、パントエア種(*Panteoa sp.*)（パントエア・シトレア(*P. citrea*)）、バチルス種(*Bacillus sp.*)（バチルス・スブチリス(*B. subtilis*)）、ヤロウイア種(*Yarrowia sp.*)（ヤロウイア・リポリティカ(*Y. lipolytica*)）、トリコデルマ(*trichoderma*)（トリコデルマ・リーゼイ(*T. reesei*)）及びサッカロミセス(*Saccharomyces*)（サッカロミセス・セレヴィシエ(*S. cerevisiae*)）からなる群から選択される、請求項18に記載の宿主細胞。

40

【請求項 2 3】

前記宿主細胞が、グルコース、グリセロール、グリセリン、ジヒドロキシアセトン、酵母エキス、バイオマス、糖蜜、スクロース、及び油からなる群から選択される炭素源を含有する培地で培養される、請求項18に記載の宿主細胞。

【請求項 2 4】

50

前記宿主細胞が、1種以上のメバロン酸（MVA）経路ポリペプチドをコードする1つ以上の異種又は天然の核酸を更に含む、請求項18に記載の宿主細胞。

【請求項25】

前記宿主細胞が、サッカロミセス・セレヴィシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）及びエンテロコッカス・フェカリス（*Enterococcus faecalis*）由来のMVA経路のポリペプチドからなる群から選択されるメバロン酸（MVA）経路ポリペプチドをコードする異種核酸を更に含む、請求項24に記載の宿主細胞。

【請求項26】

IDIポリペプチドをコードする異種又は天然の核酸をコードする1つ以上の核酸を更に含む、請求項24に記載の宿主。

10

【請求項27】

前記宿主細胞が、所望により前記天然のDXP経路と組み合わせて、IDIポリペプチドをコードする異種又は天然の核酸並びに／あるいはDXSポリペプチドをコードする異種又は天然の核酸を更に含む、請求項18に記載の宿主細胞。

【請求項28】

前記宿主細胞が、IDIポリペプチド及び前記DXSポリペプチドをコードする1つ以上の核酸を更に含む、請求項27に記載の宿主細胞。

【請求項29】

前記宿主細胞が、前記イソプレン合成酵素、前記IDIポリペプチド、及び前記DXSポリペプチドをコードする1種のベクターを含む、請求項27に記載の宿主細胞。

20

【請求項30】

前記宿主細胞が、MVA経路のポリペプチド及び／又はDXSポリペプチドをコードする1つ以上の核酸を更に含む、請求項18に記載の宿主細胞。

【請求項31】

前記宿主細胞が、DXSポリペプチド、IDIポリペプチド、前記DXP経路に関係するその他の1種以上のポリペプチド、又はMVA経路のポリペプチド、をコードする1つ以上の核酸を更に含む、請求項30に記載の宿主細胞。

【請求項32】

DXSを更に含む、請求項26に記載の宿主細胞。

30

【請求項33】

(a)イソプレン生産に好適な培養条件下で、請求項18～32のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養する工程、並びに

(b)前記イソプレンを生産させる工程、を含む、イソプレン生産方法。

【請求項34】

(c)前記イソプレンを回収する工程、を更に含む、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

(d)前記イソプレンを重合させる工程、を更に含む、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

イソプレン合成酵素活性を検出する方法であって、(a)前記発現ベクターを含む宿主細胞を、マメ科植物イソプレン合成酵素を生産させるのに好適な条件下で培養する工程、(b)リゾチームを含む溶解緩衝液で前記宿主細胞を溶解させて、細胞可溶化液を生成する工程、並びに(c)ジメチルアリルニリン酸(DMAPP)から生成されるイソプレンを測定することにより、前記細胞可溶化液に含まれるイソプレン合成酵素活性を検出する工程、を含む、方法。

40

【請求項37】

前記宿主細胞が、グラム陽性菌細胞、グラム陰性菌細胞、糸状菌細胞、及び酵母細胞からなる群から選択される、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記宿主細胞が、エシェリキア種(*Escherichia sp.*)（大腸菌(*E. coli*)）、パントエア種(*Panteoa sp.*)（パントエア・シトレア(*P. citrea*)）、バチルス種(*Bacillus*

50

sp.) (バチルス・スブチリス (*B. subtilis*))、ヤロウイア種 (*Yarrowia* sp.) (ヤロウイア・リポリティカ (*Y. lipolytica*))、トリコデルマ (*trichoderma*) (トリコデルマ・リーゼイ (*T. reesei*)) 及びサッカロミセス (*Saccharomyces*) (サッカロミセス・セレヴィシエ (*S. cerevisiae*)) からなる群から選択される、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記宿主細胞が、グルコース、グリセロール、グリセリン、ジヒドロキシアセトン、酵母エキス、バイオマス、糖蜜、スクロース、及び油からなる群から選択される炭素源を含有する培地で培養される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 0】

ハイスループットスクリーニングにおいて、複数のサンプル中のイソプレンを検出する方法であって、

(a) i) それぞれがイソプレン合成酵素を含む複数のサンプル、 i ii) 複数のウェルを含むガラスプレート、及び i iii) ガラスプレート用シールを準備する工程、

(b) 前記ガラスプレートの前記複数のウェル中に前記複数のサンプルを配置する工程、

(c) 前記シールにより前記ガラスプレートを密閉して、前記複数のウェルのそれぞれの中の前記サンプルと関連するヘッドスペースを有する密閉されたガラスプレートを作り出す工程、

(d) 前記イソプレン合成酵素が活性である条件下で前記ガラスプレートをインキュベートする工程、並びに

(e) 前記ヘッドスペース中のイソプレンを検出する工程、を含む、方法。

【請求項 4 1】

前記イソプレンが、ガスクロマトグラフィー - 質量分析法 (GC - MS) により検出される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記複数のサンプルが、操作可能なようにプロモータと組み合わせられたイソプレン合成酵素変異体をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む宿主細胞を含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記複数のサンプルが、前記宿主細胞の可溶化液、リゾチーム、及びジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) を含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記ガラスプレートが、ディープウェルガラスブロックである、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記複数のウェルが、少なくとも 24 ウェルから構成される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記複数のウェルのそれぞれが、2 mL 以下の容量を含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願の相互参照)

本出願は、米国特許出願番号第 6 1 / 6 4 1 , 8 6 1 号 (2012 年 5 月 2 日出願) 、並びに米国特許出願第 1 3 / 8 0 2 , 3 6 0 号 (2013 年 3 月 13 日) に対する優先権を主張し、これらの開示は、参照によりその全容が本明細書に援用される。

【0 0 0 2】

(参考文献による組み込み)

ASCII テキストファイル (ST. 25 テキストフォーマット) 上の次の提出書類の

10

20

30

40

50

内容は、参照によりその全体が本案件に援用される：コンピュータ読み取り可能な形態（C R F）の配列リスト（ファイル名「6 4 3 8 4 2 0 0 4 6 4 0 _ Sequence _ L i s t i n g . t x t」；データ記録日：2013年4月26日；及びA S C I I テキストファイルのファイルサイズ185,972バイト）

【0003】

（発明の分野）

本発明は、改良されたイソプレン生産のためのイソプレン合成酵素を含む方法及び組成物を提供する。特に、本発明は、宿主細胞においてイソプレン生産を増加させる、マメ科植物イソプレン合成酵素を提供する。

【背景技術】

【0004】

イソプレン（2-メチル-1,3-ブタジエン）は、水不溶性でかつアルコール溶解性の揮発性炭化水素である。採算の合う量のイソプレンは、石油分解生成物中のC5留分から直接得ることができ、あるいはC5イソアルカン又はイソアルケンを脱水することにより得ることができる（Weissermel and Arpe, 工業有機化学（Industrial Organic Chemistry），第4版，Wiley-VCH, pp. 117~122, 2003）。C5骨格は、より小さなサブユニットから合成することもできる。しかしながら、再生不能資源に依存せずとも採算の合うイソプレン生産方法が所望されている。

【0005】

ポリイソプレン及び多様なコポリマー（イソブチレン、ブタジエン、スチレン、又は他のモノマー）の製造にイソプレンモノマーを使用する。採算の合うレベルのイソプレンを生産し得る株（原核生物又は真核生物の株）を樹立するには、D X P又はM V A経路の一部又は全体、あるいはM V A及びD X P経路の両方を最適化する必要がある。この経路において鍵となる酵素はイソプレン合成酵素（I s p S）であり、この酵素は前駆体であるD M A P Pをイソプレンに変換する。これまでに同定されているイソプレン合成酵素（I s p S）としては、ポプラ（poplar）、ヨーロッパナラ（English oak）及びクズ（kudzu vine）などの植物由来のものが挙げられる。同定されている植物I s p S酵素のうちいくつかは、大腸菌で発現させることによりある程度特性評価されており、これらの酵素のいくつかの動態パラメーターは、精製タンパク質をもとにインピトロで決定されている。しかしながら、天然のI s p S酵素及び更には一部の組換え酵素の動態パラメーター（K_m、K_i、及びK_{c a t}を含む）は、宿主生物におけるイソプレンの商業生産には不十分である。加えて、発現レベルが不十分であることに起因して、一部のI s p S酵素の商業利用は制限され得る。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、解決すべき課題のうち1つとしては、商業利用用に、より多量のイソプレンを生物学的に生産することができるよう改良された特性を有するイソプレン合成酵素を提供することが挙げられる。本明細書に記載されるような課題を解決するにあたり、改良された特性を有するイソプレン合成酵素を宿主（例えば、宿主微生物）で発現させることができる。特に、本発明は、宿主細胞におけるイソプレン生産の向上のため改良された特徴を示すマメ科植物イソプレン合成酵素を提供する。

【0007】

本明細書において引用するすべての特許、特許出願、刊行物、文書、又クレオチド及びタンパク質配列のデータベースのアクセッション番号、それらが示す配列、並びに論文は、いずれも参照によりそれらの全容を本明細書に援用するものである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本明細書で提供される発明は、とりわけ、イソプレン生産に関し改良された特性を備え、イソプレン合成酵素活性を有する、ポリペプチド組成物、並びにイソプレン生産のため

10

20

30

40

50

このようなポリペプチドを特定、生産及び使用する方法を開示する。いくつかの態様では、本発明は、宿主細胞におけるイソプレン生産を向上させるためのマメ科植物イソプレン合成酵素を提供する。

【0009】

適宜に、いくつかの態様では、本発明は、イソプレン合成酵素活性を有する、マメ科植物由来の単離ポリペプチドを提供し、前記ポリペプチドは、配列番号1に対し少なくとも40%の配列同一性を有し、前記ポリペプチドは、配列番号1に対応する1つ以上のアミノ酸残基に対応する1つ以上のアミノ酸残基を有し、前記1つ以上のアミノ酸残基は、F287、G397、N438、E451、及びY514からなる群から選択される。他の態様では、単離ポリペプチドは、エラリア・モンタナ(*P. montana*)由来のものではない。いくつかの態様では、単離ポリペプチドは、ラッカセイ種(*Arachis sp.*)、ムクナ種(*Mucuna sp.*)、キマメ種(*Cajanus sp.*)、ダイズ種(*Glycine sp.*)、ミヤコグサ種(*Lotus sp.*)、及びウマゴヤシ種(*Medicago sp.*)からなる群から選択されるイソプレン合成酵素である。更なる態様では、単離ポリペプチドは、ラッカセイ(*A. hypogaea*)、ハッショウマメ(*M. pruriens*)、キマメ(*C. cajans*)、ダイズ(*G. max*)、ツルマメ(*G. soja*)、ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)及びタルウマゴヤシ(*M. truncatula*)からなる群から選択されるイソプレン合成酵素である。尚更なる態様では、すなわち請求項2に記載の単離ポリペプチドでは、単離ポリペプチドはラッカセイ(*A. hypogaea*)イソプレン合成酵素である。更に別の態様では、単離ポリペプチドはハッショウマメ(*M. pruriens*)イソプレン合成酵素である。いくつかの態様では、本発明は、ポプラ(*poplar*)イソプレン合成酵素と比較した場合に、少なくとも1つの特性が改良されているマメ科植物イソプレン合成酵素を提供する。いくつかの態様では、改良されている少なくとも1つの特性は、限定するものではないが、比生産性、収率、細胞性能指数及びタンパク質発現からなる群から選択される。いくつかの態様では、改良されている少なくとも1つの特性は、限定するものではないが、比活性、 K_{cat} 、 K_i 、及び K_m からなる群から選択される。本明細書における任意の態様では、単離ポリペプチドは、ポプラ(*poplar*)イソプレン合成酵素と比較して基質阻害が低減されている。本明細書における任意の態様では、単離ポリペプチドは、ポプラ(*poplar*)イソプレン合成酵素と比較して向上されているイソプレン合成酵素活性を有する。いくつかの態様では、向上されているイソプレン合成酵素活性は、イソプレン合成酵素を含む宿主細胞の、メバロン酸の存在下での増殖性が、ポプラ(*poplar*)イソプレン合成酵素を含む宿主細胞と比較して改良されていることを示すことにより表される。本明細書における任意の態様では、単離ポリペプチドは、ラッカセイ(*A. hypogaea*)（配列番号3）、ダイズ1(*G. max* 1)（配列番号5）、ダイズ2(*G. max* 2)（配列番号7）、ハッショウマメ(*M. pruriens*)（配列番号9）、並びにキマメ(*C. cajans*)（配列番号11）からなる群から選択されるイソプレン合成酵素である。更なる態様では、単離ポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸配列を含むラッカセイ(*A. hypogaea*)イソプレン合成酵素である。

【0010】

加えて、いくつかの態様では、本発明は、配列番号3に対し少なくとも70%の配列同一性を含み、イソプレン合成酵素活性を有する、マメ科植物由来の単離ポリペプチドを提供する。本明細書における任意の態様、すなわちイソプレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドでは、少なくとも約1.3の K_{cat} 値を有する前記イソプレン合成酵素が提供される。本明細書における任意の態様、すなわちイソプレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドでは、少なくとも約2.5の K_m 値を有する前記イソプレン合成酵素が提供される。本明細書における任意の態様、すなわちイソプレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドでは、少なくとも約13.0の $K_{i D M A P P}$ 値を有する前記イソプレン合成酵素が提供される。

【0011】

加えて、いくつかの態様では、本発明は、イソプレン合成酵素活性を有する、マメ科植物由来の単離ポリペプチドを提供し、該ポリペプチドは、配列番号1に対し少なくとも4

10

20

30

40

50

0 % の配列同一性を含み、かつ前記ポリペプチドは、少なくとも約 1 . 3 の K_{cat} 値を有する。他の態様では、本発明は、イソプレン合成酵素活性を有する、マメ科植物由來の単離ポリペプチドを提供し、該ポリペプチドは、配列番号 1 に対し少なくとも 40 % の配列同一性を含み、かつ前記ポリペプチドは、少なくとも約 2 . 5 の K_m 値を有する。更に他の態様では、本発明は、イソプレン合成酵素活性を有する、マメ科植物由來の単離ポリペプチドを提供し、該ポリペプチドは、配列番号 1 に対し少なくとも 40 % の配列同一性を含み、かつ前記ポリペプチドは、少なくとも約 13 . 0 の K_{IDMAPP} 値を有する。本明細書における任意の態様では、操作可能なようにプロモータと組み合わせられたイソプレン合成酵素をコードする異種ポリヌクレオチド配列を含む、宿主細胞が提供される。いくつかの態様では、ポリヌクレオチド配列は、プラスミド内に含有される。他の態様では、ポリヌクレオチド配列は、宿主細胞の染色体に組み込まれる。更に他の態様では、宿主は、グラム陽性菌細胞、グラム陰性菌細胞、糸状菌細胞、及び酵母細胞からなる群から選択される。他の態様では、宿主は、エシエリキア種 (*Escherichia sp.*) (大腸菌 (*E. coli*))、パントエア種 (*Panteoa sp.*) (パントエア・シトレア (*P. citrea*))、バチルス (*Bacillus sp.*) (バチルス・スブチリス (*B. subtilis*))、ヤロウイア (*Yarrowia sp.*) (ヤロウイア・リポリティカ (*Y. lipolytica*))、トリコデルマ (*trichoderm a*) (トリコデルマ・リーゼイ (*T. reesei*)) 及びサッカロミセス (*Saccharomyces*) (サッカロミセス・セレヴィシエ) からなる群から選択される。いくつかの態様では、宿主細胞は、グルコース、グリセロール、グリセリン、ジヒドロキシアセトン、酵母エキス、バイオマス、糖蜜、スクロース、及び油脂からなる群から選択される炭素源を含有する培地で培養される。本明細書における任意の態様では、宿主細胞は、メバロン酸 (MVA) 経路のポリペプチドを 1 種以上コードする 1 つ以上の異種又は天然の核酸を更に含む。いくつかの態様では、宿主細胞は、サッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・カッセリフラバス (*E. casseliflavus*)、及びエンテロコッカス・ガリナラム (*E. galilinarum*) 由來の MVA 経路のポリペプチドからなる群から選択される、メバロン酸 (MVA) 経路のポリペプチドをコードする異種核酸を更に含む。一部の他の態様では、IDI ポリペプチドをコードする異種又は天然の核酸をコードする 1 つ以上の核酸を更に含む宿主細胞が提供される。いくつかの態様では、宿主細胞は、IDI ポリペプチドをコードする異種又は天然の核酸並びに / あるいは DXS ポリペプチドをコードする異種又は天然の核酸を、所望により天然の DXP 経路と組み合わせて更に含む。いくつかの態様では、宿主細胞は、IDI ポリペプチド及び DXS ポリペプチドをコードする 1 つ以上の核酸を更に含む。一部の更なる態様では、宿主細胞は、イソプレン合成酵素、IDI ポリペプチド、及び DXS ポリペプチドをコードする 1 種のベクターを含む。更に他の態様では、宿主細胞は、MVA 経路のポリペプチド及び / 又は DXS ポリペプチドをコードする 1 つ以上の核酸を更に含む。更なる態様では、宿主細胞は、DXS ポリペプチド、IDI ポリペプチド、DXP 経路に関係するその他の 1 つ以上のポリペプチド、又は MVA 経路のポリペプチド、をコードする 1 つ以上の核酸を更に含む。一部の更なる態様では、更に DXS を含む宿主細胞が提供される。

【0012】

更に、いくつかの態様では、本発明は、イソプレン生産方法であって、(a) イソプレン生産に好適な培養条件下で、本明細書における任意の態様の宿主細胞を培養する工程、並びに (b) イソプレンを生産する工程、を含む、方法を提供する。一部の更なる態様では、(c) イソプレンを回収する工程、を更に含む方法が提供される。尚更なるいくつかの態様では、(d) イソプレンを重合させる工程、を更に含む方法が提供される。

【0013】

更に、いくつかの態様では、本発明は、イソプレン合成酵素活性を検出する方法を更に提供し、方法は：(a) 発現ベクターを含む宿主細胞を、マメ科植物イソプレン合成酵素を生産させるのに好適な条件下で培養する工程、(b) リゾチームを含む溶解緩衝液で宿主細胞を溶解させて、細胞可溶化液を生成する工程、並びに (c) ジメチルアリルジホス

10

20

30

40

50

フェート(D M A P P)から生成されるイソプレンを測定することにより、細胞可溶化液に含まれるイソプレン合成酵素活性を検出する工程、を含む。いくつかの態様では、宿主細胞は、グラム陽性菌細胞、グラム陰性菌細胞、糸状菌細胞、及び酵母細胞からなる群から選択される。一部の更なる態様では、エシェリキア種(*Escherichia sp.*) (大腸菌(*E. coli*))、パントエア種(*Panteoa sp.*) パントエア・シトレア(*P. citrea*)、バチルス(*Bacillus sp.*) (バチルス・スブチリス(*B. subtilis*))、ヤロワイア(*Yarrowia sp.*) (ヤロワイア・リポリティカ(*Y. lipolytica*))、トリコデルマ(*trichoderma*) (トリコデルマ・リーゼイ(*T. reesei*))、及びサッカロミセス(*Saccharomyces*) (サッカロミセス・セレヴィシエ)からなる群から選択される宿主細胞が提供される。他の態様では、宿主細胞はグルコース、グリセロール、グリセリン、ジヒドロキシアセトン、酵母エキス、バイオマス、糖蜜、スクロース、及び油脂からなる群から選択される炭素源を含有する培地で培養される。

10

【0014】

いくつかの態様では、本発明は、ハイスループットスクリーニングで複数のサンプル中のイソプレンを検出する方法を提供し、方法は、(a)i) それぞれがイソプレン合成酵素を含む複数のサンプル、ii) 複数個のウェルを含むガラスプレート、及びiii) ガラスプレート用シール、を提供する工程と、(b)ガラスプレートの複数個のウェル中に複数のサンプルを配置する工程と、(c)ガラスプレートをシール材によりシールすることで、複数個のウェルのそれぞれの中にサンプルに関連するヘッドスペースを有するシールされたガラスプレートを準備する工程と、(d)イソプレン合成酵素が活性である条件下でガラスプレートをインキュベートする工程と、(e)ヘッドスペース中のイソプレンを検出する工程と、を含む。一態様では、イソプレンは、ガスクロマトグラフィー-質量分析法(GC-MS)により検出される。更なる態様では、複数のサンプルが、操作可能なようにプロモータと組み合わせられたイソプレン合成酵素変異体をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む宿主細胞を含む、方法が提供される。他の更なる態様では、複数のサンプルが、宿主細胞可溶化液、リゾチーム、及びジメチルアリルニリン酸(DMAPP)を含む方法が提供される。尚更なる他の態様では、ガラスプレートがディープウェルガラスブロックである方法が提供される。尚更なる他の態様では、複数個のウェルが、少なくとも24ウェルから構成されるものである、方法が提供される。一部の更なる態様では、複数個のウェルのそれぞれが2mL以下の容量を含むものである、方法が提供される。

20

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】ラッカセイ(*A. hypogaea*)イソプレン合成酵素(「ピーナツ」とも表記)及びMEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素のアミノ酸配列のアラインメントである。これらの配列は残基3から開始するものとして示される(配列番号56、57)。

30

【図2A】MEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素を参照配列として用いる、推定上のイソプレン合成酵素のアミノ酸配列のアラインメントである。配列アラインメントの最下部に共通配列を示す(それぞれ配列番号18、20、22、24、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、26、1、28)。

40

【図2B】MEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素を参照配列として用いる、推定上のイソプレン合成酵素のアミノ酸配列のアラインメントである。配列アラインメントの最下部に共通配列を示す(それぞれ配列番号18、20、22、24、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、26、1、28)。

【図2C】MEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素を参照配列として用いる、推定上のイソプレン合成酵素のアミノ酸配列のアラインメントである。配列アラインメントの最下部に共通配列を示す(それぞれ配列番号18、20、22、24、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、26、1、28)。

【図2D】MEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素を参照配列として

50

用いる、推定上のイソプレン合成酵素のアミノ酸配列のアラインメントである。配列アラインメントの最下部に共通配列を示す（それぞれ配列番号18、20、22、24、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、26、1、28）。

【図2E】MEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素を参照配列として用いる、推定上のイソプレン合成酵素のアミノ酸配列のアラインメントである。配列アラインメントの最下部に共通配列を示す（それぞれ配列番号18、20、22、24、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、26、1、28）。

【図2F】MEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素を参照配列として用いる、推定上のイソプレン合成酵素のアミノ酸配列のアラインメントである。配列アラインメントの最下部に共通配列を示す（それぞれ配列番号18、20、22、24、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、26、1、28）。

【図3A】ウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素及びブエラリア・モンタナ(*P. montana*)イソプレン合成酵素を参照配列として用いる、推定上のイソプレン合成酵素のアミノ酸配列のアラインメントである（それぞれ、配列番号1、15、3、58、7、5、59、13）。

【図3B】ウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素及びブエラリア・モンタナ(*P. montana*)イソプレン合成酵素を参照配列として用いる、推定上のイソプレン合成酵素のアミノ酸配列のアラインメントである（それぞれ、配列番号1、15、3、58、7、5、59、13）。

【図3C】ウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素及びブエラリア・モンタナ(*P. montana*)イソプレン合成酵素を参照配列として用いる、推定上のイソプレン合成酵素のアミノ酸配列のアラインメントである（それぞれ、配列番号1、15、3、58、7、5、59、13）。

【図4】クマシー染色したSDS-PAGEゲルであり、推定イソプレン合成酵素の溶解度を既知のイソプレン合成酵素と比較して示す。A)可溶性画分（レーン1）及び不溶性画分（レーン2）中のMEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素のタンパク質量を示す。B)は、総可溶化液（レーン2）、可溶性画分（レーン3）、及び不溶性ペレット画分（レーン4）中のラッカセイ(*A. hypogaea*)イソプレン合成酵素のタンパク質量、総可溶化液（レーン5）、可溶性画分（レーン6）、及び不溶性ペレット画分（レーン7）中のダイズ1(*G. max* 1)イソプレン合成酵素のタンパク質量、並びに総可溶化液（レーン8）、可溶性画分（レーン9）、及び不溶性ペレット画分（レーン10）中のダイズ2(*G. max* 2)イソプレン合成酵素のタンパク質量を示す。レーン1は分子量マーカーを含有する。矢印は、イソプレン合成酵素の分子量に一致するバンドを示す。

【図5】クマシー染色したSDS-PAGEゲルであり、推定イソプレン合成酵素の溶解度を既知のイソプレン合成酵素と比較して示す。可溶性画分の3通りの希釈液を、左から右に向かってタンパク質濃度が減少するようレーンに装填した。可溶性ウラジロハコヤナギ(*P. alba*)変異体3イソプレン合成酵素（レーン2、3、及び4）、ハッショウマメ(*M. pruriens*)（レーン5、6、及び7）、及びキマメ(*C. cajans*)（レーン8、9、及び10）のタンパク質量を示す。レーン1は分子量マーカーを含有する。矢印は、イソプレン合成酵素の分子量に一致するバンドを示す。

【図6】インビトロイソプレン生産アッセイにおける、推定イソプレン合成酵素のイソプレン合成酵素活性を実証するグラフを示す。ラッカセイ(*A. hypogaea*)又はフユナラ(*Q. petraea*)から単離されるポリペプチドを発現する細胞から回収した可溶化液から調製した上清を、高濃度DMAPPとともにインキュベートし、そのままのイソプレン生産をGC-FID（ガスクロマトグラフ-水素炎イオン化検出器）により測定した。

【図7】インビトロイソプレン生産アッセイにおける、推定イソプレン合成酵素のイソプレン合成酵素活性を実証するグラフを示す。ハッショウマメ(*M. pruriens*)から単離されるポリペプチド又はウラジロハコヤナギ(*P. alba*)変異体3から単離されるイソプレン合成酵素を発現する細胞から回収した可溶化液から調製した上清を、高濃度DMAPPとともにインキュベートし、そのままのイソプレン生産をGC-FID（ガスクロマトグラフ-水素炎イオン化検出器）により測定した。

10

20

30

40

50

ラフ - 水素炎イオン化検出器)により測定した。

【図8】インビトロイソプレン生産アッセイから測定されるものとして、推定イソプレン合成酵素の比生産性を実証するグラフである。ラッカセイ (*A. hypogaea*)、ダイズ1 (*G. max 1*)、ダイズ2 (*G. max 2*)、ハッショウマメ (*M. pruriens*)、又はキマメ (*C. cajan*) から単離されるポリペプチドを発現する細胞から回収した可溶化液から調製した上清を、高濃度D M A P Pとともにインキュベートし、イソプレン生産をG C - F I Dにより測定した。イソプレン合成酵素の比生産性を、イソプレンmg / L / hr / O Dの単位で算出した。ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 野生型由来のポプラ (poplar) イソプレン合成酵素を陽性対照として使用した。

【図9】インビトロイソプレン生産アッセイにおける、マメ科植物ラッカセイ (*A. hypogaea*) から単離されたポリペプチドのイソプレン合成酵素比活性を示すグラフである。ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 由来のイソプレン合成酵素と比較して、ラッカセイ (*A. hypogaea*) イソプレン合成酵素は、高濃度D M A P P下での基質阻害の低減を示した。イソプレン合成酵素活性は、 s^{-1} の単位で記録される。
10

【図10】10 mM又は100 mMマグネシウム (Mg) の存在下でのインビトロイソプレン生産アッセイにおける、マメ科植物ラッカセイ (*A. hypogaea*) から単離されたポリペプチドのイソプレン合成酵素比活性を示すグラフである。ラッカセイ (*A. hypogaea*) イソプレン合成酵素は、高濃度D M A P Pの存在下でも、100 mM濃度のMg²⁺が提供されたときに基質阻害の低減を示した。低濃度のMg²⁺下では、ラッカセイ (*A. hypogaea*) イソプレン合成酵素は、低濃度D M A P P下での基質阻害に感受性を示した。イソプレン合成酵素活性は、 s^{-1} の単位で記録される。
20

【図11】図インビトロイソプレン生産アッセイにおける、マメ科植物ラッカセイ (*A. hypogaea*) から単離されたポリペプチドのイソプレン合成酵素比活性を示すグラフである。ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 野生型由来のイソプレン合成酵素と比較して、ラッカセイ (*A. hypogaea*) イソプレン合成酵素は、高濃度D M A P P下での基質阻害の低減を示した。ラッカセイ (*A. hypogaea*) イソプレン合成酵素は、親ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 配列と比較してイソプレン合成酵素比活性が向上していることが予め判明しているイソプレン合成酵素変異体、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体1並びにウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体2と比較して、高濃度D M A P P下での基質阻害をより低減させることも示した。イソプレン合成酵素活性は、 s^{-1} の単位で記録される。
30

【図12】p C L 2 0 1のプラスミドマップを示す。

【図13】アッセイ株の増殖性と、D M A P P濃度との間の関係性を示すグラフである。ラッカセイ (*A. hypogaea*) (DW 6 6 8) を発現する細菌株を、I P T Gによる発現誘導後、0、15、30、45、60、又は75 mMメバロン酸 (M V A) の存在下で1時間増殖させ、アッセイの開始時及び1時間毎に5時間後まで、600 nmでの光学密度 (O D) を評価することにより増殖性を測定した。ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体1、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体2、又はウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体3由来のイソプレン合成酵素を発現する細菌株を陽性対照として使用した。

【図14】アッセイ株において、イソプレン生産と、D M A P P濃度との間の関係性を示すグラフである。ラッカセイ (*A. hypogaea*) (DW 6 6 8) を発現する細菌株を、I P T Gによる発現誘導後、0、15、30、45、60、又は75 mMメバロン酸 (M V A) の存在下で1時間増殖させ、アッセイの開始時及び1時間毎に5時間後まで、G C - F I Dによりイソプレン生産を測定した。イソプレン合成酵素の比生産性を、イソプレンmg / L / hr / O Dの単位で算出した。ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体1、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体2、又はウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体3由来のイソプレン合成酵素を発現する細菌株を陽性対照として使用した。
40

【図15】p E W L 1 0 3 6のプラスミドマップを示す。

【図16】マメ科植物イソプレン合成酵素を、上流M V A経路のポリペプチド (エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*)) 又は上流M V A経路のポリペプチド (エンテロコッカス・カッセリフラバス (*E. casseliflavus*)) 及びエンテロコッカス・ガリナラム (E. galilaeum) 由来のイソプレン合成酵素を発現する細菌株を陽性対照として使用した。
50

E. gallinarum))と共に発現する細菌株の増殖を示すグラフである。増殖は、IPTGによる発現誘導後、ラッカセイ (*A. hypogaea*) を、エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*) 上流MVA経路ポリペプチド (EWL1043及びEWL1047) 、エンテロコッカス・カッセリフラバス (*E. casseliflavus*) 上流MVA経路のポリペプチド (EWL1049) 、又はエンテロコッカス・ガリナラム (*E. gallinarum*) 上流MVA経路のポリペプチド (EWL1052) と共に発現する細菌株において測定した。増殖アッセイの開始時、及び1時間毎に5時間後までの増殖を、600nmでの吸光度 (OD) により評価した。異なる上流MVA経路を有するウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体1由来のイソブレン合成酵素を発現する細菌株を、対照として使用した。

【図17】マメ科植物イソブレン合成酵素を、上流MVA経路のポリペプチド (エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*)) 又は上流MVA経路のポリペプチド (エンテロコッカス・カッセリフラバス (*E. casseliflavus*) 及びエンテロコッカス・ガリナラム (*E. gallinarum*)) と共に発現する細菌株のイソブレン生産を示すグラフである。イソブレン生産は、IPTGによる発現誘導後、ラッカセイ (*A. hypogaea*) を、エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*) 上流MVA経路ポリペプチド (EWL1043及びEWL1047) 、エンテロコッカス・カッセリフラバス (*E. casseliflavus*) 上流MVA経路のポリペプチド (EWL1049) 、又はエンテロコッカス・ガリナラム (*E. gallinarum*) 上流MVA経路のポリペプチド (EWL1052) と共に発現する細菌株において測定した。イソブレンは、アッセイの開始時、及び1時間毎に5時間後までGC-FIDにより測定した。イソブレン合成酵素の比生産性を、イソブレンmg/L/hr/ODの単位で算出した。異なる上流MVA経路を有するウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体1由来のイソブレン合成酵素を発現する細菌株を、対照として使用した。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、特性の改良された少なくとも1つのマメ科植物イソブレン合成酵素酵素を含む方法及び組成物を提供する。マメ科植物イソブレン合成酵素は、配列番号1に対し少なくとも40%の配列同一性を含み、マメ科植物イソブレン合成酵素は、配列番号1に対応する1つ以上のアミノ酸残基に対応する1つ以上のアミノ酸残基を有する。いくつかの態様では、1つ以上のアミノ酸残基は、F287、G397、N438、E451、及びY514であり得る。いくつかの実施態様では、マメ科植物イソブレン合成酵素はプエラリア・モンタナ (*P. montana*) のものではない。本発明は、ポプラ (poplar) イソブレン合成酵素と比較して少なくとも1つの特性が改良されているマメ科植物イソブレン合成酵素を提供する。いくつかの好ましい実施形態では、改良されている少なくとも1つの特性は、限定するものではないが、比生産性、収率、細胞性能指数、及びタンパク質発現からなる群から選択される。いくつかの特に好ましい実施形態では、改良されている少なくとも1つの特性は、限定するものではないが、比活性、 K_{cat} 、 K_i 、及び K_m からなる群から選択される。特に、本発明は、宿主細胞においてイソブレン生産を増加させる、マメ科植物イソブレン合成酵素を提供する。生物生産により製造される本発明のイソブレンは、ゴム、ポリマー、及びエラストマーを製造する際の使用が見出される。

【0017】

更に、本開示で提供される表題は本発明の様々な態様又は実施形態を制限するものではなく、総じて本明細書において参照として用いられ得るものである。したがって、以降で定義される用語は、総じて本明細書を参照することでより詳しく定義される。それでもなお、本発明に対する理解を容易にさせる目的で、数多くの用語を以下に定義する。

【0018】

I. 一般的技術

本発明の実施においては、別途記載のない限り、当業者の技能の範囲内に含まれる従来の分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の技術を用いる。これらの手法は、次の文献：「分子クローニング：実験マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第2版 (Sambrook et al., 198

10

20

30

40

50

9) ; 「オリゴヌクレオチド合成法 (Oligonucleotide Synthesis)」(M. J. Gait, ed., 1984); 「動物細胞培養法 (Animal Cell Culture)」(R. I. Freshney, ed., 1987); 「酵素学的実験法 (Methods in Enzymology)」(Academic Press, Inc.); 「分子生物学標準プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」(F. M. Ausubel et al., eds., 1987、定期的に改定); 「PCR: ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR: The Polymerase Chain Reaction)」(Mullis et al., eds., 1994)。Sington et al.、「微生物学及び分子生物学辞典 (Dictionary of Microbiology and Molecular Biology)」、第2版、J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994)、Baltz et al.、「工業微生物学及びバイオテクノロジー・マニュアル (Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology)」、第3版 (Washington, DC: ASM Press, 2010)、並びに「有機化学反応、機序及び構造第4版 (Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed.)」, John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992) 中に十分に説明されており、これらの文献は、本出願で使用される数多くの用語の一般的な指針を当業者に提供する。
10

【0019】

I I . 用語の定義

本明細書において別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術及び科学用語は、本発明の属する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同様の意味を持つ。本明細書において述べられるものと同様又は同等のあらゆる方法及び材料を本発明の実施において使用することができるが、好ましい方法及び材料については本明細書に述べる。したがって、以降で定義される用語は、総じて本明細書を参照することでより詳しく説明される。

20

【0020】

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

20

【0021】

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

30

【0022】

「異種ポリペプチド」は、宿主細胞と異なる生物、種、又は株由来の核酸配列によりコードされるポリペプチドを意味する。いくつかの態様では、異種ポリペプチドは、同様の宿主細胞に天然に見られる野生型ポリペプチドと同一ではない。異種タンパク質の例としては、イソブレン合成酵素などの酵素が挙げられる。いくつかの実施態様では、タンパク質をコードする遺伝子が天然に生じる遺伝子であるのに対し、他の実施形態では、変異の生じている及び／又は合成遺伝子が使用される。

40

【0023】

「内在性ポリペプチド」は、宿主細胞においてそのアミノ酸配列が天然に見られるポリペプチドである。いくつかの実施態様では、内在性ポリペプチドは、宿主細胞において天然に見られる野生型ポリペプチドと同一である。

【0024】

本明細書で使用するとき、「核酸」は、共有結合により単鎖又は二本鎖のいずれかの形態で連結している、2つ以上のデオキシリボヌクレオチド及び／又はリボヌクレオチドを指す。本明細書で定義される通りの核酸には、单一ヌクレオチド変異などの変異が生じ得ることは理解されるであろう。

【0025】

50

「組換え核酸」とは、対象とする核酸が由来する生物において自然に存在するゲノムにおいて、対象とする核酸に隣接する1つ以上の核酸（例えば遺伝子）を含まない、対象とする核酸のことを意味する。したがって、この用語には、例えば、ベクターに組み込まれた、プラスミド又はウィルスに自己複製的に組み込まれた、原核生物若しくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれた、又は他の配列とは独立して別個の分子（例えば、cDNA、ゲノムDNA断片、又はPCRにより生産された若しくは制限エンドヌクレアーゼによる消化により生産されたcDNA断片）として存在する、組み換えDNAが含まれる組み換え核酸は、当該技術分野において既知である分子生物学的手法により得ることができ、あるいは、組み換え核酸の一部又は全長を化学合成することもできる。

【0026】

10

「異種核酸」は、宿主細胞と異なる生物、種又は株由来の核酸配列を意味する。いくつかの態様では、異種核酸は、同様の宿主細胞に天然に見られる野生型核酸と同一ではない。いくつかの態様では、異種核酸は、同様の宿主細胞に天然に見られる野生型核酸と同一ではない。

【0027】

「内在性の核酸」は、宿主細胞においてその核酸配列が天然に見られる核酸である。いくつかの実施態様では、内在性の核酸は、宿主細胞において天然に見られる野生型核酸と同一である。いくつかの実施態様では、内在性の核酸の1つ以上のコピーを宿主細胞に組み込む。

【0028】

20

本発明の核酸又はタンパク質は、単離又は精製形態であってよい。本明細書で使用するとき、核酸又はタンパク質に対して「単離」とは、これらが、限定するものではないが、細胞又は細胞培養物などの他の成分から分離されていることを意味する。均一な状態が好みしいものの、乾燥形態又は水溶液形態のいずれかであってもよい。純度及び均一性は、典型的には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又は高速液体クロマトグラフィーなどの分析化学技術を用いて判定される。調製液中に存在する主要なタンパク質又は核酸が実質的に精製される。用語「精製」は、核酸又はタンパク質が、電気泳動ゲル中で基本的に1本のバンドとして検出されることを意味する。具体的には、「精製された」は、単離した際に、単離物が、単離物の少なくとも90重量%、少なくとも95重量%、少なくとも98重量%、又はより好みしくは少なくとも99重量%の核酸又はタンパク質を含有することを意味する。精製ポリペプチドは、例えば、研究室での合成、クロマトグラフィー、分取用電気泳動、ゲル電気泳動、遠心分離、沈殿、親和的精製などの数多くの手法により得ることができる（概して、R Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982), Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182、「タンパク質精製の手引（Guide to Protein Purification）」, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)を参照されたい）。

30

【0029】

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

40

【0030】

「調節可能に連結された」は、核酸発現制御配列（プロモータなど）及び第2の核酸配列間の機能的連結を意味し、発現制御配列は、第2の配列に対応する核酸の転写を指示する。

【0031】

50

用語「イソブレン」は、2-メチル-1,3-ブタジエン(CAS # 78-79-5)を指す。3,3-ジメチルアリルニリン酸(DMAPP)からピロリン酸を除去することで、揮発性のC5炭化水素を、直接的に及び最終的に生成することができる。IPP分子をDMAPP分子に結合又は重合させることは包含しない場合がある。用語「イソブレン」は、概して、本明細書に別途記載のない限り、生産方法を限定されることを意図しない。

【0032】

本明細書で使用するとき、用語「イソブレン合成酵素」、「イソブレン合成酵素変異体」及び「IspS」は、ジメチルアリルニリン酸(DMAPP)からピロリン酸を除去してイソブレンを生成する反応を触媒する酵素を指す。「イソブレン合成酵素」は、野生型配列であっても、あるいはイソブレン合成酵素変異体配列であってもよい。

10

【0033】

本明細書で使用するとき、用語、「自然発生」は、自然に見られる(例えば、組み換え法又は化学的方法により操作されていない)任意のもの(例えば、タンパク質、アミノ酸又は核酸配列)を指す。本明細書で使用するとき、用語「非天然に生じる」は、天然には見られない任意の対象(例えば、組み換えにより生成されたタンパク質又は化学合成されたタンパク質、アミノ酸、又は研究施設で作成された核酸配列)を指す。

【0034】

対象とするアミノ酸配列に含まれるアミノ酸残基が、参照アミノ酸配列のアミノ酸残基と「対応する」又は「対応している」又は「対応した」とは、対象とする配列に含まれるアミノ酸残基が、参照アミノ酸配列中のアミノ酸残基の位置と相同である位置又は等しい位置に配置されていることを示す。当業者は、ポリペプチド中の特定のアミノ酸残基の位置が、相同的な参照配列の位置に対応するかどうかを判定することができる。例えば、イソブレン合成酵素ポリペプチドの配列を、既知の手法(例えば、基本的な局所的アラインメント/検索ツールであるBLAST、ClustalW2、又は構造に基づき配列をアライメントするプログラムであるSTRAPなど)により参照配列(例えば、配列番号1)とアライメントさせることもできる。加えて、ホモログポリペプチド残基の三次元構造を求める際に参照配列の結晶構造座標を補助として使用することもできる(例えば、国際出願第US2010/032134号を参照されたい)。他の態様では、立体構造レベルでの相同性を決定することで等価な残基を同定することもできる。このような手法を用いる場合、イソブレン合成酵素ポリペプチド又はイソブレン合成酵素変異体のアミノ酸残基は、対応する参照配列のアミノ酸残基の位置番号に従い、番号付けすることもできる。例えば、アミノ酸残基の位置を決定し、対象とするイソブレン合成酵素の各アミノ酸残基に付番する際に、配列番号1のアミノ酸配列を使用することもできる。

20

【0035】

本明細書で使用するとき、「相同性」は、配列類似性又は同一性を指し、同一性が好ましい。相同性は、当該技術分野において既知の標準法を使用して求めることができる(例えば、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981); Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970); Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444(1988); Wisconsin Genetics Software Packageに含まれるGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTAなどのソフトウェアパッケージ(Genetics Computer Group, Madison, WI);並びにDevereux et al., Nucleic Acid Res. 12:387~395(1984)を参照されたい)。有用なアルゴリズムの一例は、PILEUPである。PILEUPは、ペアワイズアライメントのプログレッシブ法を用いて、一群の関連する配列から複数の配列のアライメントを行う。PILEUPは、アライメントを行うのに使用されるクラスタリング関係を示す系統樹をプロットすることもできる。PILEUPは、Feng及びDoolittleのプログレッシブアライメント法を単純化させて用いる(Feng及びDoolitt

30

40

50

tle、J. Mol. Evol. 35: 351~360 (1987) を参照されたい)。この方法は、Higgins及びSharpにより記載されるものと類似のものである (Higgins and Sharp, CABIOS 5: 151~153 (1989) を参照されたい)。有用なPILEUPパラメーターとしては、3.00のデフォルトギャップウェイト (default gap weight)、0.10のデフォルトギャップレンジングウェイト (default gap length weight) 及びウェイティッドエンドギャップ (weighted end gaps) が挙げられる。Altschul et al. により報告されているBLASTアルゴリズムもその他の有用なアルゴリズムの例である (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403~410 (1990); 並びにKarlins and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873~5787 (1993) を参照されたい)。特に有用なBLASTプログラムはWU-BLAST-2プログラムである (Altschul et al., Meth. Enzymol. 266: 460~480 (1996) を参照されたい)。WU-BLAST-2は、複数の検索パラメーターを使用し、これらのうちのほとんどはデフォルト値に設定される。調製可能なパラメーターは以下の値に設定される: overlap span = 1, overlap fraction = 0.125, word threshold (T) = 11。HSPS及びHSPS2パラメーターは動的な値であり、特定の配列の構成及び、所望の配列を検索する特定のデータベースの構成に依存してプログラム自体により確立される。しかしながら、これらの値は、感度を上昇させるように調整することができる。

【0036】

参照配列と対象とする試験配列との配列同一率は、当業者により容易に判定することができる。ポリヌクレオチド又はポリペプチド配列により共有される同一率は、配列をアライメントし、当該技術分野において既知の方法により同一性を判定することによって分子間での配列情報を直接比較することにより、判定される。配列類似性を判定するのに好適なアルゴリズムの一例は、BLASTアルゴリズムである (Altschulら、J. Mol. Biol., 215: 403~410 (1990) を参照されたい)。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、米国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information) より公的に入手可能である。このアルゴリズムは、まず、データベース配列中の同じ長さのワードとアライメントを行ったときに一致するか又はある程度ポジティブであると評価された (positive-valued) 閾値スコアTを満たすかのいずれかである問い合わせ配列中の長さWの短いワードを同定することにより、高スコアの配列ペア (HSP) を同定する。これらの最初にヒットした隣接ワードは、これらを含むより長いHSPを見つけるための開始点として働く。ワードのヒットは、累積アライメントスコアが増加し得る限り比較されている2つの配列の各々に沿って両方向に拡張される。ワードのヒットの拡張は、次の場合に止まる: 累積アライメントスコアが最大達成値から量Xだけ減少する、累積スコアがゼロ以下になる、又は、いずれかの配列の末端に到達する。BLASTアルゴリズムパラメーターW、T及びXは、感度及びアライメントの速度を決定する。BLASTプログラムは、ワード長 (W) : 11、BLOSUM62スコアリングマトリックス (Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1992) を参照されたい) アライメント (B) : 50、期待値 (E) : 10、M'5、N'-4をデフォルトとして使用し、両鎖を比較する。

【0037】

次に、BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性の統計分析を行う (例えば、上記Karlins and Altschulを参照されたい)。BLASTアルゴリズムにより提供される類似性の一つの尺度は、最小和確率 (smallest sum probability) (P(N)) であり、これは、2つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間の一致が偶然により生じ得る確率の指標を提供する。例えば、試験核酸をイソプレン合成酵素の核酸と比較した際の最小和確率が、約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、及び最も好ましく

10

20

30

40

50

は約 0.001 未満である場合、核酸は本発明のイソプレン合成酵素の核酸と類似していると考えられる。イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする試験核酸は、最小和確率の比較結果が約 0.5 未満、及びより好ましくは約 0.2 未満である場合に、イソプレン合成酵素に関係している特定の核酸と類似していると考えられる。

【0038】

2つ以上の核酸又はポリペプチド配列についての文脈において、「同一率 (percent identical or percent identity)」は、2つ以上の配列を最も一致するように比較及びアライメントし、配列比較アルゴリズムを用いて又は目視確認により判定したときに、2つ以上の配列が、同一であるか、あるいは核酸残基又はアミノ酸残基と、表記される割合で同一であることを指すものである。参照アミノ酸配列に対する、対象とするアミノ酸配列の、「配列相同性」又は「相同 (%)」又は「配列相同性 (%)」又は「アミノ酸配列相同性 (%)」は、対象とするアミノ酸配列が、配列を最適にアライメントした際の比較長さにわたって参照アミノ酸配列に対して表記される割合（すなわち、アミノ酸とアミノ酸を並べたときの一一致度）だけ相同であることを意味する。したがって、2つのアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一率 80% 又は同一率 80% は、最適にアライメントした2つのアミノ酸配列中のアミノ酸残基のうち 80% が同一であることを意味する。

10

【0039】

参照核酸配列に対する、対象とする核酸配列の、「配列相同性」又は「相同性 (%)」又は「配列相同性 (%)」は、対象とする核酸配列が、配列を最適にアライメントした際の比較長さにわたって参照配列に対して表記される割合（すなわち、ヌクレオチドとヌクレオチドを並べたときの一一致度）だけ相同であることを意味する。したがって、2つの核酸配列に対するヌクレオチド配列同一率 80% 又は同一率 80% は、最適にアライメントした2つの核酸配列中のヌクレオチド残基のうち 80% が同一であることを意味する。

20

【0040】

一様では、参照配列に対する対象とする配列の「配列相同性」又は「配列相同性 (%)」、又は「相同性 (%)」は、2つの配列を最適にアライメントし、比較長さにわたって、2つの最適にアライメントした配列を比較することで、算出することができる。最適なアライメントにおいて両方の配列の残基が一致している位置の数は、一致する位置の数を求めて一致する位置の数を比較長さ（別途記載のない限り、参照配列の長さである）のうちの位置の合計数で除することで決定される。得られる数に 100 を乗じることで、参照配列に対する対象とする配列の配列同一性を算出する。

30

【0041】

「最適アライメント」又は「最適アライメントを行った」は、最高同一率スコアを与える2つ（以上）の配列のアライメントを指す。例えば、2つのポリペプチド配列の最適アライメントは、各配列中の同一のアミノ酸残基の最大数が共にアライメントされているように手作業で配列のアライメントを行うことにより、あるいは、本明細書に記載の又は当該技術分野において既知の、ソフトウェアプログラム又は手順を用いることにより、達成することができる。2つの核酸配列の最適アライメントは、各配列中の同一のヌクレオチド残基の最大数が共にアライメントされているように手作業で配列のアライメントを行うことにより、あるいは、本明細書に記載の又は当該技術分野において既知の、ソフトウェアプログラム又は手順を用いることにより、達成することができる。

40

【0042】

既定のアミノ酸置換マトリックス、ギャップ存在ペナルティ（ギャップオープンペナルティとも呼ばれる）及びギャップ伸張ペナルティなどの既定パラメーターを用い、2つの配列（例えば、ポリペプチド配列）がこのペアの配列について類似性スコアが最も高くなるようアライメントされた場合、「最適アライメントが行われた」とみなされ得る。BLOSUM62 スコアリングマトリックス（上記Henikoff 及びHenikoff を参照されたい）は、多くの場合、ポリペプチド配列アライメントアルゴリズム（例えば、BLASTP）においてデフォルトのスコアリング置換マトリックスとして使用される。ギャップ存在ペナルティはアライメントされた配列の1つにアミノ酸ギャップが

50

1つ導入された際に課せられ、ギャップ伸張ペナルティはギャップ中の各残基位置に対して課される。用いられる代表的なアラインメントは以下のものである：BLOSUM62スコアリングマトリックス、ギャップ存在ペナルティ = 11、及びギャップ伸張ペナルティ = 1。アラインメントスコアは、アラインメントが開始及び終了する各配列のアミノ酸位置により（例えば、アラインメントウィンドウ）、並びに、場合によっては可能な限り最高の類似性スコアを達成するように一方若しくは両方の配列の中に1つ若しくは複数のギャップを挿入することにより、決定される。

【0043】

2つ以上の配列間の最適アラインメントは、目視確認により手作業で、あるいは、コンピュータ（例えば、アミノ酸配列に対するBLASTPプログラム及び核酸配列に対するBLASTNプログラム（例えば、Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25 (17) : 3389 ~ 3402 (1997)）を参照されたい。米国国立生物工学情報センター（NCBI）のウェブサイトも参照されたい。）又はCLUSTALWプログラムが挙げられるがこれらに限定されない）を使用することにより、判定することができる。

10

【0044】

2つの核酸又はポリペプチド配列の文脈において、用語「同一」は、以下の配列比較又は解析アルゴリズムのうちの1つを用いて評価する際に、最も一致するようにアライメントしたときに、2つの配列中の残基が同じのものであることを指す。

20

【0045】

対象とするポリペプチドが、参照ポリペプチドのアミノ酸配列に対して少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は少なくとも約99.5%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む場合、対象とするポリペプチドは参照ポリペプチドに対して「実質的に同一」であることができる。2つのこのようなポリペプチド間の同一性（%）は、最適にアラインメントされた2つのポリペプチド配列を目視確認することにより、又は標準的なパラメーターを用いるソフトウェアプログラム又はアルゴリズム（例えば、BLAST, ALIGN, CLUSTAL）を使用することで、手作業で判定することができる。2つのポリペプチドが実質的に同一である一つの指標は、第一のポリペプチドが第二のポリペプチドと免疫学的に交差反応することである。典型的には、保存アミノ酸置換によって異なるポリペプチドは免疫学的に交差反応する。したがって、ポリペプチドは、例えば、2つのペプチドが1つの保存的アミノ酸置換又は1つ以上の保存的アミノ酸置換のみで異なる場合、第二ポリペプチドに対して実質的に同一である。

30

【0046】

対象とする核酸が、参照核酸のヌクレオチド配列に対して少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は少なくとも約99.5%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む場合、対象とする核酸は参照核酸に対して「実質的に同一である」ということができる。2つのこのような核酸間の同一性（%）は、最適にアラインメントされた2つの核酸配列を目視確認することにより、又は標準的なパラメーターを用いるソフトウェアプログラム又はアルゴリズム（例えば、BLAST、ALIGN、CLUSTAL）を使用することで、手作業で判定することができる。厳密な条件下（例えば、中程度に厳密～非常に厳密という範囲）で、2つの核酸分子が互いにハイブリッド形成することは、核酸配列が実質的に同一であることの1つの指標になる。

40

50

【 0 0 4 7 】

本明細書で使用するとき、用語「質量収率」は、組み換え（例えば、細菌）細胞により生産される生産物の質量を、組み換え細胞により消費されたグルコースの質量より除算し、100を乗じたものを指し、あるいは割合として表される。

【 0 0 4 8 】

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

【 0 0 4 9 】

「力価」は、組み換え（例えば、細菌）細胞により生産される生産物の質量を、培養体積により除したものを意味する。

10

【 0 0 5 0 】

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

【 0 0 5 1 】

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

【 0 0 5 2 】

別途記載のない限り、それぞれ、核酸は左から右に5'、3'の向きで記述され、アミノ酸は左から右にアミノ末端 カルボキシ末端の向きで記述される。

20

【 0 0 5 3 】

本開示において、実施形態に包含される（及び説明する）「約 (about)」を付した値又はパラメーターについては、「約」を付したその値又はパラメーター自体を目的とする。

30

【 0 0 5 4 】

本開示に記載される本発明のすべての態様及び実施形態は、態様及び実施形態「を含む (comprising)」、態様及び実施形態「からなる (consisting)」、及び態様及び実施形態「から本質的になる (consisting essentially of)」を含むことが理解される。記載の要素から「本質的になる」方法又は組成物には、特定の工程又は材料のみが含まれ、かつこれらの工程又は材料は、方法及び組成物の基本特性及び新規特性に実質的に影響しないことは理解されるであろう。

【 0 0 5 5 】

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

【 0 0 5 6 】

本発明は記載される特定の方法論、プロトコル、及び試薬に制限されるものではなく、これらは当業者により使用される文脈に応じて変化させ得ることが理解されるであろう。

【 0 0 5 7 】

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

40

【 0 0 5 8 】

I I I . イソプレン合成酵素配列

ポリペプチドは、参照配列に対する配列アラインメントにより、並びにその他の特性（

50

例えば、イソプレン合成酵素活性)により、イソプレン合成酵素であるとして同定することができる。いくつかの実施態様では、参照配列は、植物イソプレン合成酵素配列である。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号1のアミノ酸配列を含む、MEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素である。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号2の配列を含む核酸配列によりコードされるMEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)合成酵素である。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号15のアミノ酸配列を含むプエラリア・モンタナ(*P. montana*) (クズ(kudzu))イソプレン合成酵素である。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号16の配列を含む核酸配列によりコードされるプエラリア・モンタナ(*P. montana*) (クズ(kudzu))合成酵素である。本発明の任意の態様では、参照配列に対する配列アラインメントは、成熟ポリペプチド配列との配列アラインメントをもとにしたものであってよく、前記成熟ポリペプチドは、未成熟なシグナル配列のプロセシングを受け、完了したものとして定義される。本発明の任意の態様では、参照配列に対する配列アラインメントは、参照配列のC末端領域との配列アラインメントをもとにしたものであってよく、C末端領域は、触媒活性部位を含有する。本発明の態様では、参照配列に対するポリペプチド配列の配列アラインメントにより、共通配列の確認がなされ、前記共通配列により、ポリペプチドがイソプレン合成酵素活性を有することが決定される。一実施形態では、共通配列は、図2A~Fに示されるものである。いくつかの実施態様では、参照配列は植物イソプレン合成酵素配列である。いくつかの実施態様では、参照配列は配列番号1のアミノ酸配列を含むMEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素である。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号15のアミノ酸配列を含むプエラリア・モンタナ(*P. montana*) (クズ(kudzu))イソプレン合成酵素である。本発明の任意の態様では、イソプレン合成酵素活性を有するポリペプチドの同定には、限定するものではないが、ポプラ(poplar)イソプレン合成酵素の1つ以上の共通アミノ酸残基に対応するアミノ酸残基を1つ以上有するポリペプチドが含まれる。いくつかの実施態様では、ポプラ(poplar)イソプレン合成酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様では、ポプラ(poplar)イソプレン合成酵素残基の1つ以上の共通部は、F287、G397、N438、E451、及びY514からなる群から選択される。本発明のいくつかの態様では、共通配列は、すべての候補イソプレン合成酵素配列及び対象とする配列が比較される原型となるアミノ酸配列を指す。本発明の他の態様では、共通配列は、対象とするDNA配列中に最も豊富に存在する記載のヌクレオチド配列を指す。遺伝子の各位置に関し、共通配列は、多重配列アラインメントにおいてその位置に最も豊富なアミノ酸を与える。本発明のいくつかの態様では、多重配列アラインメントは、アルゴリズム(例えば、Clustal W)を使用してアラインメントされる参照配列の複数の相同性配列を指す。いくつかの実施態様では、参照配列は、植物イソプレン合成酵素配列である。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号1のアミノ酸配列を含むMEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)合成酵素である。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号2の配列を含む核酸配列によりコードされるMEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)合成酵素である。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号15のアミノ酸配列を含むプエラリア・モンタナ(*P. montana*) (クズ(kudzu))である。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号16の配列を含む核酸配列によりコードされるプエラリア・モンタナ(*P. montana*) (クズ(kudzu))合成酵素である。

【0059】

本発明のいくつかの態様では、イソプレン合成酵素を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドは、配列番号1に対し少なくとも40%の配列同一性を含み、マメ科植物イソプレン合成酵素は、配列番号1に対応する1つ以上のアミノ酸残基に対応する1つ以上のアミノ酸残基を有し、1つ以上のアミノ酸残基は、F287、G397、N438、E451、及びY514からなる群から選択される。いくつかの実施態様では、マメ科植物イソプレン合成酵素はプエラリア・モンタナ(*P. montana*)由来のものではない。

【0060】

10

20

30

40

50

本発明の任意の態様では、イソプレン活性を有するポリペプチドは、イソプレン合成酵素ポリペプチドである。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、マメ (Leguminosae) 科、ブナ (Fagaceae) 科、ミカン (Rutaceae) 科、クスノキ (Lauraceae) 科、ブドウ (Vitaceae) 科、又はフトモモ (Myrtaceae) 科由来のものである。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチド又は核酸は、ピーナツ (peanut) (ラッカセイ (*Arachis hypogaea*) など)、八升豆 (ハッショウマメ (*Mucuna pruriens*) など)、キマメ ((*Cajanus cajan*) など)、大豆 (ダイズ (*Glycine max*) など)、野生のマメ科植物 (ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) など)、又はクローバー様植物 (タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) など) を含むがこれらに限定されないマメ科植物に由来する、天然に生じるポリペプチド又は核酸である。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチド又は核酸は、限定するものではないが、レモン (シトラス・レモン (*Citrus limon*)) を含む柑橘類由来の、天然に生じるポリペプチド又は核酸である。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチド又は核酸は、シナモマム・テヌイパイル (*Cinnamomum tenuipile*) 由来の、天然に生じるポリペプチド又は核酸である。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチド又は核酸は、限定するものではないが、ワイン用ブドウ (ビティス・ヴィニフェラ (*Vitis vinifera*)) を含むブドウ由来の、天然に生じるポリペプチド又は核酸である。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチド又は核酸は、フユナラ (*Querus petraea*) 又はケルクス・アイレックス (*Querus ilex*) などのオーク由来の、天然に生じるポリペプチド又は核酸である。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチド又は核酸は、ユーカリ・グロブルス (*Eucalyptus globulus*) 又はティーツリー (*Melaleuca alternifolia*) 由来の、天然に生じるポリペプチド又は核酸である。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチド又は核酸は、プエラリア・モンタナ (*P. montana*) に由来するものではない。本発明のイソプレン合成酵素としては、J G I 寄託番号 G 1 y m a 0 9 g 2 1 9 0 0 . 1、G 1 y m a 2 0 g 1 8 2 8 0 . 1、G 1 y m a 0 6 g 4 5 7 8 0 . 1、及び G 1 y m a 1 2 g 1 0 9 9 0 . 1 として識別されるものが挙げられるがこれに限定されない。本発明のイソプレン合成酵素には、ダイズ (*G. max*) ゲノム配列にコードされており、F G E N E S H により予測されるポリペプチド、例えば、G 1 y m a 2 0 g 1 8 2 8 0 _ 1 _ F G として特定されるポリペプチドにより特定されるものが挙げられるがこれらに限定されない。本発明の任意の態様では、イソプレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドは、配列番号 3 のアミノ酸配列を含むラッカセイ (*A. hypogaea*) イソプレン合成酵素と少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 92%、少なくとも約 94%、少なくとも約 96%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% の配列同一性を有する。本発明の任意の態様では、イソプレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドは、配列番号 4 の配列を含む核酸配列によりコードされるラッカセイ (*A. hypogaea*) イソプレン合成酵素と少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 92%、少なくとも約 94%、少なくとも約 96%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% の配列同一性を有する。

【0061】

本発明の任意の態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む M E A ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) シンターゼと少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 92%、少なくとも約 94%、少なくとも約 96%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% の配列同一性を有する。他の実施形態では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、配列番号 2 の配列を含む核酸配列によりコードされる M E A ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) シンターゼと少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 92%、少なくとも約 94%、少なくとも約 96%、少なくとも約 98% の配列同一性を有する。

10

20

30

40

50

8 %、少なくとも約99 %の配列同一性を有する。本発明の任意の態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、配列番号15のアミノ酸配列を含むエラリア・モンタナ(*P. montana*) (クズ(kudzu))と少なくとも約40 %、少なくとも約50 %、少なくとも約60 %、少なくとも約70 %、少なくとも約80 %、少なくとも約90 %、少なくとも約92 %、少なくとも約94 %、少なくとも約96 %、少なくとも約98 %、少なくとも約99 %の配列同一性を有する。他の実施形態では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、配列番号16の配列を含む核酸配列によりコードされるエラリア・モンタナ(*P. montana*) (クズ(kudzu))シンターゼと少なくとも約40 %、少なくとも約50 %、少なくとも約60 %、少なくとも約70 %、少なくとも約80 %、少なくとも約90 %、少なくとも約92 %、少なくとも約94 %、少なくとも約96 %、少なくとも約98 %、少なくとも約99 %の配列同一性を有する。

10

【0062】

イソプレン合成酵素変異体は、本発明のイソプレン合成酵素より生成することもでき、イソプレン合成酵素は、野生型及び非野生型イソプレン合成酵素を含む、本明細書に記載される通りのイソプレン合成酵素であり得る。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素は、マメ科植物イソプレン合成酵素である。代表的なイソプレン合成酵素の核酸としては、イソプレン合成酵素ポリペプチドの活性を少なくとも1種有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又は融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。代表的なイソプレン合成酵素ポリペプチド及び核酸としては、本明細書に記載される任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに本明細書に記載される任意の生物資源から誘導されるポリペプチド及び核酸の変異体が挙げられる。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素変異体は、配列番号1に対応する1つ以上のアミノ酸残基に対応する1つ以上のアミノ酸残基に1つ以上のアミノ酸置換を有し、前記配列番号1に対応する1つ以上のアミノ酸残基は、T481、K463、K393、L376、K161、S288、T240、E472、G389、及びR242からなる群から選択される。いくつかの実施態様では、アミノ酸置換はS288Cである。

20

【0063】

本発明のイソプレン合成酵素変異体を生成するのに好適な様々な方法が当該技術分野において既知であり、限定するものではないが、例えば、部位飽和変異導入、系統的変異導入、変異挿入、ランダム変異、部位特異的変異導入、及び定向進化、並びに様々な他の組み換え手法が挙げられる。

30

【0064】

I V . イソプレン合成酵素の特性

本明細書に記載の本発明の任意の態様では、イソプレン合成酵素活性を有するポリペプチドは、参照配列よりも改良されている少なくとも1つの特性を有する。いくつかの実施態様では、参照配列は、植物イソプレン合成酵素配列である。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号1のアミノ酸配列を含むMEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)シンターゼである。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号2の配列を含む核酸配列によりコードされるMEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)シンターゼである。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号15のアミノ酸配列を含むエラリア・モンタナ(*P. montana*) (クズ(kudzu))である。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号16の配列を含む核酸配列によりコードされるエラリア・モンタナ(*P. montana*) (kudzu)シンターゼである。いくつかの好ましい実施形態では、改良されている少なくとも1つの特性は、限定するものではないが、比生産性、収率、細胞性能指数、及びタンパク質発現からなる群から選択される。いくつかの特に好ましい実施形態では、改良されている少なくとも1つの特性は、限定するものではないが、比活性、 K_{cat} 、 K_i 、及び K_m からなる群から選択される。いくつかの実施態様では、ポリペプチドは、少なくとも約1.3の K_{cat} 値を有する。いくつかの実施態様では、ポリペプチドは、少なくとも約2.5の K_m 値を有する。いくつかの実施態様では、ポリペプチドは、少なくとも約13.0の $K_{i D M A P P}$ 値を有する。

40

50

【0065】

対象とする特性としては、限定するものではないが、細胞内活性の増加、比生産性の増加、収率の増加、及び細胞性能指数の増加が挙げられる。いくつかの実施態様では、比生産性は、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上に増加する。一実施形態では、比生産性は約20mg/L/OD/hrである。他の実施形態では、収率は、少なくとも約2、3、4、5倍以上に増加する。他の実施形態では、細胞性能指数は、少なくとも約2、3、4、5倍以上に増加する。他の実施形態では、細胞内活性は少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上に増加する。

【0066】

理論に束縛されるものではないが、これらの特性は、以降の本発明のIspSの特性のいずれか1つにより又はこれらを組み合わせることにより達成され得る：細胞生存率の上昇、 k_{cat} の上昇、 K_m の低下、 K_m の上昇、 K_i の上昇、比生産性の上昇、比活性の上昇、溶解性の上昇、不溶性の低下、リボソーム結合の改良、翻訳開始率の上昇、翻訳伸長率の上昇、転写開始率の上昇、転写伸長率の上昇、DNAの二次構造の減少、RNAの二次構造の減少、DNAの二次構造の増加、RNAの二次構造の増加、折り畳み速度の増加、細胞内シャペロンとの親和性の向上、安定性の向上、タンパク質の代謝回転の減少、タンパク質発現量の増加、細胞内プロテアーゼへの暴露の減少、細胞内プロテアーゼに対する親和性の低下、周辺質への局在の減少、細胞質への局在の増加、封入体形成の減少、膜への局在の減少、より望ましいコドンによる発現の上昇、DNA安定度の増加、RNA安定度の増加、及びRNA分解の減少。IspSをコードする又は発現する核酸配列(DNA及びRNA)の特性に、あるいはIspS酵素自体のもつ生化学的特性に好ましく作用する任意の変異により、細胞内部の活性をより増加させることができる。対象とする他の特性としては、至適pH、温度安定性(例えば、 T_m 値)、並びに基質阻害又は生成物阻害などを引き起こす可能性のあるインヒビターに対する感受性が挙げられる。酸化安定性及びタンパク質分解安定性も対象とする。更に、金属イオンの作用及び金属イオンのイオン強度による活性化又は阻害も対象とする。

10

20

30

40

【0067】

本発明のイソプレン合成酵素をコードする核酸を含む宿主細胞の増殖指数又は性能指数を使用して、特定のイソプレン合成酵素が対象とする特性を有するか否かを示すことができる。増殖指数及び性能指数は、当業者に既知の手法、及び/又は本開示に教示される通りの手法に従い測定することもできる。増殖及び性能指数は、特定のイソプレン合成酵素を参照配列と比較することにより求めることができる。いくつかの実施態様では、参照配列は、植物イソプレン合成酵素配列である。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号1のアミノ酸配列を含むMEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)合成酵素である。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号2の配列を含む核酸配列によりコードされるMEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)合成酵素である。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号15のアミノ酸配列を含むプエラリア・モンタナ(*P. montana*) (クズ(kudzu))である。いくつかの実施態様では、参照配列は、配列番号16の配列を含む核酸配列によりコードされるプエラリア・モンタナ(*P. montana*) (kudzu)合成酵素である。各種実施態様では、イソプレン合成酵素の増殖指数は、参照配列と比較した場合に少なくとも約0.8、少なくとも約0.9、少なくとも約1.0、少なくとも約1.1、少なくとも約1.2、少なくとも約1.3である。各種実施態様では、イソプレン合成酵素の性能指数は、参照配列と比較した場合に少なくとも約0.7、少なくとも約0.8、少なくとも約0.9、少なくとも約1.0、少なくとも約1.1、少なくとも約1.2である。

50

【0068】

対象とする特性を測定する手法は当業者に既知である。いくつかの手法を実施例において更に記載する。イソプレン合成酵素活性を有するポリペプチドは、所望の結果又は改良される特性をもとに評価することができる。例えば、イソプレン合成酵素は、精製又は一部精製したイソプレン合成酵素により、インビトロで、あるいは、大腸菌(*E. coli*)な

50

どの宿主生物に関する文脈においてインピボで、D M A P P のイソプレンへの変換率について試験することができる。場合により、大腸菌は、D X P 経路、M V A 経路、又はこれらの両方を発現し得る。改良された活性は、他のイソプレン合成酵素；例えば、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) イソプレン合成酵素、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体イソプレン合成酵素、又は他の参照ポリペプチドとの比較において評価される。多様な宿主においてイソプレンを生産させることを目的とした本発明において、1種以上の試験条件下で、例えば、様々な程度の安定性、溶解度、活性、及び／又は発現レベルを示す酵素を使用することが見出されるものと企図される。ハイスループットな手法を用いると、効率的な方法でこれらの特性を評価することができる。

【0069】

10

細胞内 D M A P P 濃度の増加と、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) イソプレン合成酵素 (I s p S) を発現させることで軽減され得る大腸菌の増殖阻害との間には、強い相関がある。理論に束縛されるものではないが、I s p S 活性が増強されると、D M A P P は、より迅速にイソプレンへと変換されるようになり、その結果増殖性が更に良好になるはずである。これらの条件下で、対象とするポリペプチドを発現する大腸菌 (*E. coli*) の増殖率を監視することにより、本発明者らは、細胞内で D M A P P をイソプレンへと変換する能力が増強されている、I s p S 酵素を特定した。いくつかの実施態様では、I s p S はマメ科植物 I s p S である。いくつかの実施態様では、I s p S はラッカセイ (*A. hypogaea*) I s p S である。他の実施形態では、I s p S はハッショウマメ (*M. pruriens*) I s p S である。

【0070】

20

本発明は、イソプレン合成酵素活性に関しポリペプチドを選別するための方法も想到し、方法は、(a)宿主細胞を、約 10 μM～約 70 μM IPTG、及び約 5 mM～約 20 mM メバロン酸 (M V A) を含む培地と接触させる工程、ここで、宿主細胞は、操作可能なようにプロモータと組み合わせられた対象とするポリペプチドをコードする核酸を含む、並びに (b)宿主細胞の増殖率を測定する工程、を含む。イソプレン合成酵素による増殖率は、参照イソプレン合成酵素 (例えば、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 野生型イソプレン合成酵素、M E A ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) イソプレン合成酵素、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体、又はプエラリア・モンタナ (*P. montana*)) と比較することができる。この方法を使用して、対象とする特定の特性、例えば、本明細書に記載の1つ以上の特性に關し、イソプレン合成酵素活性を有するポリペプチドを選別することができる。いくつかの実施態様では、増殖率の増加により、イソプレン合成酵素が D M A P P をイソプレンに変換する能力が宿主細胞合成酵素の能力よりも向上していることが意味される。例えば、増殖速度は、当該技術分野で既知の手法により、あるいは以降の実施例において例示される通りに解析することができる。いくつかの実施態様では、手法は、イソプレン合成酵素の増殖指數を決定する工程を更に含む。いくつかの実施態様では、手法は、イソプレン合成酵素の性能指數を決定する工程を更に含む。対数増殖期における細胞の増殖率及び／又は細胞の最終密度は、改良された特性を有するイソプレン合成酵素を選別する際の因子として検討され得る。

30

【0071】

40

いくつかの実施態様では、IPTG は、約 10 μM～約 60 μM の濃度で培地中に存在する。いくつかの実施態様では、IPTG は、約 20 μM～約 60 μM の濃度で培地中に存在する。いくつかの実施態様では、IPTG は、約 40 μM～約 60 μM の濃度で培地中に存在する。いくつかの実施態様では、IPTG は、約 50 μM の濃度で培地中に存在する。いくつかの実施態様では、M V A は、約 5 mM～約 75 mM の濃度で培地中に存在する。いくつかの実施態様では、M V A は、約 10 mM～約 60 mM の濃度で培地中に存在する。いくつかの実施態様では、M V A は、約 15 mM～約 45 mM の濃度で培地中に存在する。いくつかの実施態様では、M V A は、約 5 mM～約 30 mM の濃度で培地中に存在する。いくつかの実施態様では、M V A は、約 5 mM～約 15 mM の濃度で培地中に存在する。いくつかの実施態様では、M V A は、約 15 mM の濃度で培地中に存在する。

50

【0072】

V. イソプレン生産のためのマメ科植物イソプレン合成酵素

本発明は、イソプレンの生産量を増加させるための組成物及び方法を特徴とする。特に、これらの組成物及び方法は、イソプレンの生成速度を増加させ、かつ生成されるイソプレンの総量を増加させる。天然ゴムを用いる代わりに、本開示に記載のイソプレン生産に関する生合成工程を用いることは望ましい。以降に更に説明される通り、細胞により生産されるイソプレンの量は、本発明のイソプレン合成酵素（IspS）をコードする異種核酸を細胞に導入することにより大幅に増加させることができる。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素はマメ科植物イソプレン合成酵素である。

【0073】

10

A. イソプレン生産のための組換え細胞

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

【0074】

20

イソプレンは、イソプレン合成酵素の触媒作用によりD M A P Pから製造される。したがって、理論に束縛されるものではないが、更に多量のイソプレン生産をもたらす上記の任意の組成物及び方法により、組換え細胞において、別の下流M V A経路を介しメバロン酸からのイソペンテニルピロリン酸の細胞生産量が増加されるものと考えられる。グルコースからのイソペンテニルピロリン酸生産のモル収率を増加させ、適切な酵素活性濃度で、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ、イソペンテニルキナーゼ、及びイソプレン生産に適切な他の酵素と組み合わせるとき、グルコースから生産されるイソプレンのモル収率の増大につながる。

【0075】

30

いくつかの態様では、イソプレン生産に使用される任意の細胞は、イソプレンの細胞生産を増加させる1種以上のポリペプチドをコードする1つ以上の異種核酸を発現することができる。他の態様では、細胞は、イソプレン生産に関する代謝経路（M V A経路など）を通し、イソプレン生産を増強する又は炭素利用能を増加させる、特異的なゲノム変異も保有し得る。

【0076】

40

本明細書に記載されるとき、本発明は、イソプレンを生産することのできる組換え細胞を提供し、細胞は、M V A経路の1種以上のポリペプチドをコードする1つ以上の核酸、並びにイソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする異種核酸を含み、細胞を好適な培地で培養することによりイソプレン生産が提供される。更なる実施形態では、組換え細胞は、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ（I D I）ポリペプチドをコードする1つ以上の核酸を更に含む。特定の実施形態では、本発明はイソプレンを生産することのできる組換え細胞を提供し、細胞は、M V A経路の1種以上のポリペプチドをコードする1つ以上の核酸、及びイソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする異種核酸を含み、細胞は、ホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸及び／又はイソペンテニルキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を含まないイソプレン生産細胞と比較して多量にイソプレンを生産する。更なる実施形態では、組換え細胞は、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ（I D I）ポリペプチドをコードする1つ以上の核酸を更に含む。

【0077】

50

イソプレン生産は、1つ以上の酵素経路を更に操作された、本明細書に記載の任意の組換え宿主細胞を使用することによりなすこともでき、この場合、酵素活性は、メバロン酸生産に取り込まれる炭素を増加させるよう調節される。本明細書に記載の、メバロン酸生産に取り込まれる炭素量が増加するよう操作された各種酵素経路を有する組換え細胞を、イソプレン生産に使用することができる。一実施形態では、組換え細胞は、ホスホケトラ

ーゼをコードする核酸を更に含む。別の実施形態では、組換え細胞には、次の、リボース-5-リン酸イソメラーゼ(*rpiA*及び/又は*rpiB*)、D-リブロース-5-リン酸3-エピメラーゼ(*rpe*)、トランスケトラーゼ(*tktA*及び/又は*tktB*)、トランスアルドラーーゼB(*talB*)、リン酸アセチルトランスフェラーゼ(*pta*及び/又は*eutD*)からなる群から選択される遺伝子のうちの1つ以上の活性を増加させるよう、遺伝子操作を施すことができる。別の実施形態では、これらの組換え細胞には、次の、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(*zwf*)、6-ホスホフルクトキナーゼ-1(*pfkA*及び/又は*pfkB*)、フルクトースビスリン酸アルドラーーゼ(*fbfa*、*fbAA*、*fbAB*、及び/又は*fbAC*)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(*gapA*及び/又は*gapB*)、酢酸キナーゼ(*ackA*)、クエン酸シンターゼ(*gltA*)、EI(*ptsI*)、EIICB^{G1c}(*ptsG*)、EIIC^{G1c}(*crr*)、及び/又はHPr(*ptsH*)といった遺伝子のうち、1種以上の遺伝子の活性を減少させるよう更に遺伝子操作を施すことができる。

【0078】

1. イソプレン合成酵素の核酸及びポリペプチド

本発明のいくつかの態様では、本明細書に記載の任意の組成物又は方法に記載の組換え細胞は、イソプレン合成酵素ポリペプチド又はイソプレン合成酵素活性を有するポリペプチドをコードする1つ以上の核酸を発現する。本発明のいくつかの態様では、本明細書に記載の任意の組成物又は方法に記載される細胞(本明細書に記載される通りに改変された宿主細胞を含む)は、イソプレン合成酵素ポリペプチド又はイソプレン合成酵素活性を有するポリペプチドをコードする1つ以上の核酸を更に含む。核酸及び/又はポリペプチドは、内在性又は異種性のいずれであっても良い。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは内在性ポリペプチドである。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする内在性核酸は、常時発現型プロモータに調節可能なように連結される。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする内在性核酸は、誘導型プロモータに調節可能なように連結される。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする内在性核酸は、高発現型プロモータに調節可能なように連結される。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする内在性の核酸を1つ以上(例えば、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする内在性の核酸の2、3、又は4つ以上のコピー)使用する。

【0079】

いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは異種ポリペプチドである。いくつかの態様では、細胞は、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする異種核酸のコピーを1つ以上含む。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする異種核酸は、常時発現型プロモータに調節可能なように連結される。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする異種核酸は、誘導型プロモータに調節可能なように連結される。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする異種核酸は、高発現型プロモータに調節可能なように連結される。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする異種核酸は、低発現型プロモータに調節可能なように連結される。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、ブエラリア(*Pueraria*)又はハコヤナギ属(*Populus*)、あるいはウラジロハコヤナギ(*Populus alba*)×ヤマナラシ(*Populus tremula*)などの交雑種由来のポリペプチド又はこれらの変異体である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、クズ(*Pueraria montana*又は*Pueraria lobata*)、アメリカヤマナラシ(*Populus tremuloides*)、ウラジロハコヤナギ(*Populus alba*)、セイヨウハコヤナギ(*Populus nigra*)、及びコットンウッド(*Populus trichocarpa*)由来のポリペプチド又はこれらの変異体である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドはユーカリプタス(*Eucalyptus*)に由来するものである。

【0080】

イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込むこ

10

20

30

40

50

とができる、あるいは細胞で安定的に発現させることができる。イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする核酸は、更にベクターに組み込むこともできる。

【0081】

特定の態様では、細胞は、野生型細胞と比べ、内在性イソプレン合成酵素経路のポリペプチドが過剰発現するよう設計する。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする内在性核酸は、低発現型プロモータに調節可能なように連結される。

【0082】

いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、マメ科、ブナ科、ミカン科、クスノキ科、ブドウ科、又はフトモモ科由来のポリペプチドである。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドはマメ科植物由来である。いくつかの実施態様では、マメ科植物イソプレン合成酵素は、ラッカセイ (*Arachis hypogaea*) (配列番号3)、ダイズ1 (*G. max 1*) (配列番号5)、ダイズ2 (*G. max 2*) (配列番号7)、ハッショウマメ (*M. pruriens*) (配列番号9)、キマメ (*C. cajans*) (配列番号11)、ミヤコグサ (*Lotus japonicas*) (配列番号33)、又はタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) (配列番号35) である。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは柑橘類に由来し、限定するものではないが、シトラス・レモン (*Citrus limon*) に由来する (配列番号17)。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、シナモマム・テヌイパイル (*Cinnamomum tenuipile*) である (配列番号23)。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、ブドウであり、限定するものではないが、ビティス・ヴィニフェラ (*Vitis vinifera*) (配列番号21) が挙げられる。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、フユナラ (*Querus petraea*) (配列番号13) 又はケルクス・アイレックス (*Querus ilex*) (配列番号19) などのオーク由来である。いくつかの実施態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、ユーカリ・グロブルス (*Eucalyptus globulus*) (配列番号25) 又はティーツリー (*Melaleuca alternifolia*) (配列番号27) 由来である。本発明のイソプレン合成酵素としては、J G I 寄託番号 G 1 y m a 0 9 g 2 1 9 0 0 . 1、G 1 y m a 2 0 g 1 8 2 8 0 . 1、G 1 y m a 0 6 g 4 5 7 8 0 . 1、及び G 1 y m a 1 2 g 1 0 9 9 0 . 1として識別されるものが挙げられるがこれに限定されない。本発明のイソプレン合成酵素には、ダイズ (*G. max*) ゲノム配列にコードされており、F G E N E S Hにより予測されるポリペプチド、例えば、G 1 y m a 2 0 g 1 8 2 8 0 _ 1 _ F G として特定されるポリペプチドにより特定されるものが挙げられるがこれらに限定されない。

【0083】

本発明の任意の態様では、イソプレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸配列を含むラッカセイ (*A. hypogaea*) イソプレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。本発明の任意の態様では、イソプレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドは、配列番号5のアミノ酸配列を含むダイズ1 (*G. max*) 1イソプレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。本発明の任意の態様では、イソプレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドは、配列番号7のアミノ酸配列を含むダイズ2 (*G. e max 2*) イソプレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。本発明の任意の態様では、イソプレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸配列を含むハッショウマメ (*M. pruriens*) イソプレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少

10

20

30

40

50

くとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。本発明の任意の態様では、イソプレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドは、配列番号11のアミノ酸配列を含むキマメ(*C. cajan*)イソプレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。本発明の任意の態様では、イソプレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドは、配列番号33のアミノ酸配列を含むミヤコグサ(*Lotus japonicas*)イソプレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。本発明の任意の態様では、イソプレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドは、配列番号35のアミノ酸配列を含むタルウマゴヤシ(*Medicago truncatula*)イソプレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。

【0084】

いくつかの態様では、本発明は、イソプレン合成酵素活性を有する単離ポリペプチドを提供し、単離ポリペプチドはマメ科植物のものではない。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素活性を有する柑橘類由来の単離ポリペプチドは、配列番号17のアミノ酸配列を含むシトラス・レモン(*Citrus limon*)イソプレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素活性を有するシナモマム(*Cinnamomum*)由来の単離ポリペプチドは、配列番号23のアミノ酸配列を含む(シナモマム・テヌイパイル(*Cinnamomum tenuipile*)イソプレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素活性を有するブドウ由来の単離ポリペプチドは、配列番号21のアミノ酸配列を含むビティス・ヴィニフェラ(*Vitis vinifera*)イソプレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素活性を有するオーク単離ポリペプチドは、配列番号13のアミノ酸配列を含むフユナラ(*Querus petraea*)イソプレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素活性を有するオーク由来の単離ポリペプチドは、配列番号19のアミノ酸配列を含むケルクス・アイレックス(*Querus ilex*)イソプレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素活性を有するユーカリプタス(*Eucalyptus*)由来の単離ポリペプチドは、配列番号25のアミノ酸配列を含むユーカリ・グロブルス(*Eucalyptus globulus*)イソプレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、

10

20

30

40

50

少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 % の配列同一性を有する。いくつかの態様では、マヌカ (manuka) イソプレン合成酵素活性を有する単離ポリペプチドは、配列番号 27 のアミノ酸配列を含むティーツリー (*Melaleuca alternifolia*) イソプレン合成酵素と少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 % の配列同一性を有する。

【 0 0 8 5 】

イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、あるいは細胞で安定的に発現させることができる。イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする核酸は、ベクター（複数種のベクターを含む）上に存在するものであってもよい。

10

【 0 0 8 6 】

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

20

【 0 0 8 7 】

インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボで、ポリペプチドが D M A P P をイソプレンへと変換する能力を測定して、ポリペプチドがイソプレン合成酵素ポリペプチド活性を有するか否かを判定する際には、標準法を使用できる。細胞抽出物中のイソプレン合成酵素ポリペプチド活性は、例えば、S i l v e r et al . , J . B i o l . C h e m . 270 : 13010 ~ 13016 , (1995) に記載のとおりに測定することができる。代表的なアッセイでは、D M A P P (S i g m a) は窒素流下で蒸発させ、乾燥させ、1 0 0 m M リン酸カリウム緩衝液 (p H 8 . 2) を用い 1 0 0 m M の濃度に再水和し、- 2 0 で保存する。アッセイを実施するために、金属製スクリューキャップと、テフロンコーティングのなされたシリコン製隔壁 (A g i l e n t T e c h n o l o g i e s) とを取り付けた 2 0 m L のヘッドスペースバイアル内で、5 μ L の 1 M M g C l 2 、1 m M (2 5 0 μ g / m L) D M A P P 、6 5 μ L の植物抽出緩衝液 (P E B) (5 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0) 、2 0 m M M g C l 2 、5 % グリセロール、及び 2 m M D T T) に、2 5 μ L の細胞抽出物を加え、振とうさせながら 3 7 で 1 5 分間培養した。2 0 0 μ L の 2 5 0 m M E D T A を加えて反応をクエンチさせ、G C / M S により定量することができる。

30

【 0 0 8 8 】

いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、植物のイソプレン合成酵素ポリペプチド又はそれらの変異体である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、プエラリア (*Pueraria*) に由来するイソプレン合成酵素又はそれらの変異体である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、ハコヤナギ属 (*Populus*) 由来のイソプレン合成酵素又はそれらの変異体である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、ポプラ (*poplar*) のイソプレン合成酵素ポリペプチド又はそれらの変異体である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドはクズ (*kudzu*) のイソプレン合成酵素ポリペプチド又はそれらの変異体である。いくつかの態

40

50

様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、ヤナギ (willow) イソプレン合成酵素ポリペプチド又はそれらの変異体である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、ユーカリピタス (Eucalyptus) イソプレン合成酵素ポリペプチド又はこれらの変異体である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、クズ (Pueraria) 又はハコヤナギ (Populus)、ウラジロハコヤナギ (Populus alba) × ヤマナラシ (Populus tremula) などの交雑種、又はこれらの変異体由来のポリペプチドである。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、ハリエンジュ (Robinia)、ヤナギ (Salix)、又はコバノブラシノキ (Melaleuca) あるいはこれらの変異体に由来する。

【0089】

いくつかの実施態様では、植物イソプレン合成酵素は、マメ科、ヤナギ科 (Salicaceae)、又はブナ科に由来する。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチド又は核酸は、タイワンクズ (Pueraria montana) (クズ (kudzu)) (Sharkey et al., Plant Physiology 137: 700~712, (2005))、クズ (Pueraria lobata)、ポプラ (poplar) (ウラジロハコヤナギ (Populus alba)、セイヨウハコヤナギ (Populus nigra)、コットンウッド (Populus trichocarpa)、又はウラジロハコヤナギ (Populus alba) × トレムラ (tremula) (CAC35696) など (Miller et al., Plantae 213: 483~487, (2001))、ヤマナラシ (aspen) (アメリカヤマナラシ (Populus tremuloides) など) (Silver et al., JBC 270 (22): 13010~1316, (1995))、ヨーロッパナラ (English oak) (ヨーロッパナラ (Quercus robur)) (Zimmer et al., 国際公開第98/02550号)、又はこれらの変異体由来のポリペプチド又は核酸である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、エラリア・モンタナ (Pueraria montana)、エラリア・ロバタ (Pueraria lobata)、ポプラ・トレムロイド (Populus tremuloides)、ウラジロハコヤナギ (Populus alba)、ポプラ・ニグラ (Populus nigra) 又はポプラ・トリコカルパ (Populus trichocarpa) 由来のイソプレン合成酵素、又はこれらの変異体である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、ウラジロハコヤナギ (Populus alba) 由来のイソプレン合成酵素であるか、又はこれらの変異体である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素は、バルサムポプラ (Populus balsamifera) (Genbank JN173037)、アメリカクロヤマナラシ (Populus deltoides) (Genbank JN173039)、フレモントコットンウッド (Populus fremontii) (Genbank JN173040)、オオバギンドロ (Populus grandidentata) (Genbank JN173038)、ヤナギ属 (Salix) (Genbank JN173043)、ニセアカシア (Robinia pseudoacacia) (Genbank JN173041)、フジ属 (Wisteria) (Genbank JN173042)、ユーカリ・グロブルス (Eucalyptus globulus) (Genbank AB266390) 又はティーツリー (Melaleuca alterniflora) (Genbank AY279379) 又はこれらの変異体である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素 (例えば、ウラジロハコヤナギ (Populus alba) 又はこれらの変異体由来のイソプレン合成酵素) をコードする核酸は、コドンを最適化されている。

【0090】

いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、マメ科植物イソプレン合成酵素ポリペプチド又はこれらの変異体である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、落花生又はこれらの変異体由来のイソプレン合成酵素である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、ムクナ (Mucuna) 又はこれらの変異体由来のイソプレン合成酵素である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、キマメ (Cajanus) 又はこれらの変異体由来のイソプレン合成酵素である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、ダイズ (Glycine) 又はこれらの変異体由来のイソプレン合成酵素である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、ミヤコグサ (Lotus) 又はこれらの変異体由来のイソプレン合成酵素である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、ウマゴヤシ (Medicago) 又は

10

20

30

40

50

これらの変異体由来のイソブレン合成酵素である。いくつかの態様では、イソブレン合成酵素ポリペプチドは、ポプラ (poplar) のイソブレン合成酵素ポリペプチド又はそれらの変異体である。いくつかの態様では、イソブレン合成酵素ポリペプチドはクズのイソブレン合成酵素ポリペプチド又はそれらの変異体である。

【0091】

本発明の任意の態様では、イソブレン合成酵素ポリペプチドは、マメ科、ブナ科、ミカン科、クスノキ科、ブドウ科、又はフトモモ科由来の核酸によりコードされる。いくつかの実施態様では、イソブレン合成酵素ポリペプチドは、マメ科植物由来の核酸によりコードされる。いくつかの実施態様では、マメ科植物イソブレン合成酵素をコードする核酸は、ラッカセイ (*Arachis hypogaea*) (配列番号4)、ダイズ1 (*G. max* 1) (配列番号6)、ダイズ2 (*G. max* 2) (配列番号8)、ハッショウマメ (*M. pruriens*) (配列番号10)、キマメ (*C. cajan*) (配列番号12)、野生のマメ科植物 (*Lotus japonicus*) など)、又はクローバー様の植物 (タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) など) に由来する。いくつかの実施態様では、イソブレン合成酵素ポリペプチド又は核酸は限定するものではないが、レモン (シトラス・レモン (*Citrus limon*)) を含む柑橘類由来の核酸によりコードされる。いくつかの実施態様では、イソブレン合成酵素ポリペプチドは、シナモマム・テヌイパイル (*Cinnamomum tenuipile*) 由来の核酸によりコードされる。いくつかの実施態様では、イソブレン合成酵素ポリペプチドは、限定するものではないが、ワイン用ブドウ (ビティス・ヴィニフェラ (*Vitis vinifera*) など) を含む、ブドウ由来の核酸によりコードされる。いくつかの実施態様では、イソブレン合成酵素ポリペプチドは、フユナラ (*Quercus petraea*) (配列番号14) 又はケルクス・アイレックス (*Quercus ilex*) などのオーク由来の核酸によりコードされる。いくつかの実施態様では、イソブレン合成酵素ポリペプチドは、ユーカリ・グロブルス (*Eucalyptus globulus*) 又はティーツリー (*Melaleuca alternifolia*) 由来の核酸によりコードされる。本発明のイソブレン合成酵素としては、J G I 寄託番号G 1 y m a 0 9 g 2 1 9 0 0 . 1、G 1 y m a 2 0 g 1 8 2 8 0 . 1、G 1 y m a 0 6 g 4 5 7 8 0 . 1、及びG 1 y m a 1 2 g 1 0 9 9 0 . 1として識別されるものが挙げられるがこれに限定されない。本発明のイソブレン合成酵素には、ダイズ (*G. max*) ゲノム配列にコードされており、F G E N E S H により予測されるポリペプチド、例えば、G 1 y m a 2 0 g 1 8 2 8 0 _ 1 _ F G として特定されるポリペプチドにより特定されるものが挙げられるがこれらに限定されない。

【0092】

本発明の任意の態様では、イソブレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドは、配列番号4の配列を含む核酸配列によりコードされるラッカセイ (*A. hypogaea*) イソブレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。本発明の任意の態様では、イソブレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドは、配列番号6の配列を含む核酸配列によりコードされるダイズ1 (*G. max* 1) イソブレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。本発明の任意の態様では、イソブレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドは、配列番号8の配列を含む核酸配列によりコードされるダイズ2 (*G. max* 2) イソブレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。本発明の任意の態様では、イソブレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドは、配列番号10の配列を含む核酸配列によりコードされるハッショウマメ (*M. pruriens*) イソブレン合成酵素と少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なく

10

20

30

40

50

とも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %の配列同一性を有する。本発明の任意の態様では、イソプレン合成酵素活性を有するマメ科植物由来の単離ポリペプチドは、配列番号 1 2 の配列を含む核酸配列によりコードされるキマメ (*C. cajan*) イソプレン合成酵素と少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %の配列同一性を有する。

【 0 0 9 3 】

いくつかの態様では、イソプレン合成酵素核酸又はポリペプチドは、天然に生じるポリペプチド又は核酸である（例えば、ハコヤナギ属から天然に生じるポリペプチド又は核酸）。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素核酸又はポリペプチドは、野生型又は天然に生じるポリペプチド又は核酸ではない。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素核酸又はポリペプチドは、野生型又は天然に生じるポリペプチド又は核酸の変異体である（例えば、ハコヤナギ属の野生型又は天然に生じるポリペプチド又は核酸の変異体）。

【 0 0 9 4 】

いくつかの態様では、イソプレン合成酵素核酸又はポリペプチドは、天然に生じるポリペプチド又は核酸である（例えば、ラッカセイ (*Arachis*) 由来の天然に生じるポリペプチド又は核酸）。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素核酸又はポリペプチドは、野生型又は天然に生じるポリペプチド又は核酸ではない。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素核酸又はポリペプチドは、野生型又は天然に生じるポリペプチド又は核酸の変異体である（例えば、ラッカセイ (*Arachis*) 由来の野生型又は天然に生じるポリペプチド又は核酸の変異体）。

【 0 0 9 5 】

いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、マメ科植物イソプレン合成酵素である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、野生型又は天然型マメ科植物イソプレン合成酵素である。いくつかの態様では、マメ科植物イソプレン合成酵素は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む M E A ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) イソプレン合成酵素などの参照イソプレン合成酵素と比較して、改良された触媒活性など、改良された活性を有する。活性（例えば、触媒活性）の向上は、少なくとも約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、又は 9 5 %のうちのいずれかの程度であり得る。いくつかの態様では、触媒活性などの活性の向上は、少なくとも約 1 倍、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、75 倍、又は 100 倍のいずれかである。いくつかの態様では、触媒活性などの活性の向上は、約 1 0 %～約 1 0 0 倍である（例えば、約 2 0 %～約 1 0 0 倍、約 5 0 %～約 5 0 倍、約 1 倍～約 2 5 倍、約 2 倍～約 2 0 倍、又は約 5 倍～約 2 0 倍）。いくつかの態様では、マメ科植物イソプレン合成酵素は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む M E A ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) イソプレン合成酵素などの参照イソプレン合成酵素と比較して改良された溶解度を有する。溶解度における上昇は、少なくとも約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、又は 9 5 %のうちの任意であり得る。可溶性の向上は、少なくとも約 1 倍、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、75 倍、又は 100 倍のうちのいずれかの程度であり得る。いくつかの態様では、溶解性の向上は、約 1 0 %～約 1 0 0 倍のうちのいずれかの程度であり得る（例えば、約 2 0 %～約 1 0 0 倍、約 5 0 %～約 5 0 倍、約 1 倍～約 2 5 倍、約 2 倍～約 2 0 倍、又は約 5 倍～約 2 0 倍）。

【 0 0 9 6 】

いくつかの態様では、 k_{cat} は少なくとも約 1 . 1 、1 . 2 、1 . 3 、1 . 4 、1 . 5 、1 . 6 、1 . 7 、1 . 8 、1 . 9 、2 . 0 、2 . 1 、2 . 2 、2 . 3 、2 . 4 、2 . 5 、2 . 6 、2 . 7 、2 . 8 、2 . 9 、又は 3 . 0 である。他の態様では、 k_{cat} は少なくとも約 3 . 1 、3 . 2 、3 . 3 、3 . 4 、3 . 5 、3 . 6 、3 . 7 、3 . 8 、3 . 9

10

20

30

40

50

、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6.4.7、4.8、4.9
 、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8.5.9
 又は6.0である。

【0097】

いくつかの態様では、 K_m は少なくとも約1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、16、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、又は25である。

【0098】

いくつかの態様では、 K_{IDMAPP} 値少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、又は60である。
 。

【0099】

いくつかの態様では、マメ科植物イソプレン合成酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含むMEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素に対し少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約110%、少なくとも約120%、少なくとも約130%、少なくとも約140%、少なくとも約150%、少なくとも約160%、少なくとも約170%、少なくとも約180%、少なくとも約190%、少なくとも約200%を有する。マメ科植物イソプレン合成酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含むMEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素と配列相同性を共有することができる。いくつかの態様では、マメ科植物イソプレン合成酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含むMEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素と、少なくとも約40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、又は99.9%のうちの任意のアミノ酸配列同一性を有し得る。いくつかの態様では、マメ科植物イソプレン合成酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含むMEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレン合成酵素と、約70%～約99.9%、約75%～約99%、約80%～約98%、約85%～約97%、又は約90%～約95%のうちの任意のアミノ酸配列同一性を有し得る。

【0100】

いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは変異体である。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素ポリペプチドは、野生型又は天然型イソプレン合成酵素の変異体である。いくつかの態様では、変異体は、野生型又は天然型イソプレン合成酵素と比較して触媒活性が改良されているなど、活性が改良されている。

【0101】

本発明の任意の態様では、イソプレン合成酵素変異体は、野生型又は天然型イソプレン合成酵素中に変異を含む。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素変異体は、少なくとも1箇所のアミノ酸置換、少なくとも1つのアミノ酸挿入、及び/又は少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素変異体は、少なくとも1箇所のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様では、変異体と、野生型又は天然型イソプレン合成酵素との間で異なっているアミノ酸残基の数は、1以上であってよく、例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、又は50以上のアミノ酸残基が異なっていてよい。天然型イソプレン合成酵素には、植物、例えば、ピーナツ(ラッカセイ(*Arachis hypogaea*)など)、八升豆(ハッショウマメ(*Mucuna pruriens*)など)

10

20

30

40

50

、キマメ(キマメ(*Cajanus cajans*))、大豆(ダイズ(*G. max*)など)、野生のマメ科植物(ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)など)、クローバー様の植物(タルウマゴヤシ(*Medicago truncatula*)など)、柑橘類(シトラス・レモン(*Citrus limon*)など)、シナモマム・テヌイパイル(*Cinnamomum tenuipile*)、ワイン用ブドウ(ビティス・ヴィニフェラ(*Vitis vinifera*)など)、オーク(フユナラ(*Querus petraea*)又はケルクス・アイレックス(*Querus ilex*)など)、ユーカリ・グロブルス(*Eucalyptus globulus*)又はティーツリー(*Melaleuca alternifolia*)由来の任意のイソプレン合成酵素が含有され得る。いくつかの態様では、変異体は、ラッカセイ(*Arachis hypogaea*)由来のイソプレン合成酵素の変異体である。いくつかの態様では、ラッカセイ(*Arachis hypogaea*)由来のイソプレン合成酵素変異体は、少なくとも1箇所のアミノ酸置換、少なくとも1つのアミノ酸挿入、及び/又は少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する。いくつかの態様では、変異体は、トランケート型ラッカセイ(*Arachis hypogaea*)イソプレン合成酵素である。いくつかの態様では、変異体(例えば、ラッカセイ(*Arachis hypogaea*)由来のイソプレン合成酵素の変異体)をコードする核酸は、コドンを最適化させたものである(例えば、異種イソプレン合成酵素を発現させる宿主細胞に基づきコドンを最適化している)。いくつかの態様では、変異体は、ハッショウマメ(*Mucuna pruriens*)由来のイソプレン合成酵素の変異体である。いくつかの態様では、ハッショウマメ(*Mucuna pruriens*)由来のイソプレン合成酵素の変異体は、少なくとも一箇所にアミノ酸置換、少なくとも1箇所にアミノ酸挿入、及び/又は少なくとも1箇所にアミノ酸欠失を有する。いくつかの態様では、変異体は、トランケート型のハッショウマメ(*Mucuna pruriens*)イソプレン合成酵素である。いくつかの態様では、変異体(例えば、ハッショウマメ(*Mucuna pruriens*)由来のイソプレン合成酵素の変異体)をコードする核酸は、コドンを最適化させたものである(例えば、異種イソプレン合成酵素を発現させる宿主細胞に基づきコドンを最適化している)。

【0102】

本開示のイソプレン合成酵素ポリペプチドは、国際公開第2009/132220号、同第2010/124146号、米国特許出願第2010/0086978号に記載のいずれかのイソプレン合成酵素又はイソプレン合成酵素変異体であってよい。これらの文献に記載される、イソプレン合成酵素及びイソプレン合成酵素変異体に関するすべての内容は、参照により本開示に明示的に組み込む。

【0103】

本開示のプロモータのうちのいずれか(例えば、本開示に記載され、本開示の実施例において識別される、誘導型プロモータ及び常時発現型プロモータなどのプロモータ)を使用して、本開示のいずれかのイソプレン合成酵素の発現を駆動させることができる。

【0104】

好適なイソプレン合成酵素としては、J G I 寄託番号G1yma09g21900.1、G1yma20g18280.1、G1yma06g45780.1、及びG1yma12g10990.1により識別されるものが挙げられるがこれに限定されない。本発明のイソプレン合成酵素には、ダイズ(*G. max*)ゲノム配列にコードされており、F G E N E S Hにより予測されるポリペプチド、例えば、G1yma20g18280_1_F Gとして特定されるポリペプチドにより特定されるものが挙げられるがこれらに限定されない。本明細書に記載のイソプレン合成酵素をコードする微生物を作製する方法を含む組成物又は方法のいずれかにおいて使用することのできるイソプレン合成酵素のタイプは、国際出願第2009/076676号、国際出願第2010/003007号、国際出願第2009/132220号、国際出願第2010/031062号、国際出願第2010/031068号、国際出願第2010/031076号、国際出願第2010/013077号、国際出願第2010/031079号、国際出願第2010/148150号、国際出願第2010/124146号、国際出願第2010/078457、及び国際出願第2010/148256号、米国特許出願第13/283564号、並びにS h a r k e y e t a l. , 「T p s - B テルペンシンターゼファミリーのアクリル系テル

10

20

30

40

50

ペンシンターゼの単系統群を形成するイソブレン合成酵素遺伝子（Isoprene Synthase Genes Form A Monophyletic Clade Of Acyclic Terpene Synthases In The Tps-B Terpene Synthase Family）」，Evolution (2012)（オンラインでもDOI:10.1111/j.1365-2013.12013に利用可能）にも記載されており、これらの文献の内容は、イソブレン合成酵素及びイソブレン合成酵素変異体に関し、参照によりその全体が本明細書に明示的に援用される。

【0105】

2. MVA経路の核酸及びポリペプチド

完全なMVA経路は、上流経路及び下流経路の2群に分けることができる。MVA経路の上流部位では、細胞代謝中に産出されたアセチルCo-Aは、(a)(i)チオラーゼ活性又は(ii)アセトアセチル-CoA合成酵素活性、(b)HMG-CoAレダクターゼ、及び(c)HMG-CoA合成酵素酵素活性のいずれかを有するポリペプチド部位によりメバロン酸へと変換される。最初に、チオラーゼ又はアセトアセチル-CoAシンターゼ（アセチル-CoA及びマロニル-CoAを利用する）の作用によりアセチルCo-AをアセトアセチルCoAに変換する。次に、アセトアセチル-CoAは、HMG-CoA合成酵素の酵素作用により、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリル-CoA(HMG-CoA)へと変換される。このCo-A誘導体をHMG-CoA還元酵素により還元してメバロン酸を生成する。この反応は、メバロン酸経路によるイソプレノイド生産の律速段階となる。下流MVA経路では、メバロン酸塩は、次にメバロン酸キナーゼの作用により5-ホスホメバロン酸へと変換され、これは続いてホスホメバロン酸キナーゼの酵素活性により5-ジホスホメバロン酸へと転換される。最後に、酵素のメバロン酸-5-ピロリン酸塩デカルボキシラーゼの活性により、5-ジホスホメバロン酸からIPPが形成される。メバロン酸依存性生合成経路は、イソプレノイド前駆体分子のジメチルアリルジホスフェート(DMAPP)及びイソペンテニルピロリン酸(IPP)の生産に特に重要である。

10

20

30

40

【0106】

MVA経路のポリペプチド例としては、限定するものではないが、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリル-CoAシンターゼ(HMG-CoAシンターゼ)ポリペプチド（例えば、mvaSによりコードされる酵素）、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリル-CoAレダクターゼ(HMG-CoAレダクターゼ)ポリペプチド（例えば、mvaRによりコードされる酵素又はチオラーゼは欠損しているものの還元酵素活性は保持するよう改変を受けたmvaEによりコードされる酵素）、メバロン酸キナーゼ(MVK)ポリペプチド、ホスホメバロン酸キナーゼ(PMK)ポリペプチド、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ(MVD)ポリペプチド、ホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ(PMDC)ポリペプチド、イソペンテニルリン酸キナーゼ(IPK)ポリペプチド、IPPイソメラーゼポリペプチド、IDIポリペプチド、及びMVA経路ポリペプチドに関係する2つ又はそれ以上の活性を有するポリペプチド（例えば、融合ポリペプチド）、が挙げられる。特に、MVA経路ポリペプチドとしては、MVA経路のポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド及び融合ポリペプチドが挙げられる。MVA経路の代表的な核酸としては、MVA経路に含まれるポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又は融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。MVA経路に含まれる代表的なポリペプチド及び核酸としては、本明細書に記載されるような任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸が挙げられる。更に、イソブレンの生産を増大させるような、MVA経路のポリペプチド変異体も、良好に使用することができる。

【0107】

使用され得るMVA経路ポリペプチドの非限定例は、国際出願公開第2009/076676号；同第2010/003007号及び同第2010/148150号に記載のものである。

【0108】

50

a . 上流 M V A 経路のポリペプチドをコードする核酸

M V A 経路の上流は、細胞内代謝により生産されるアセチル C o - A を、(a) (i) チオラーゼ活性又は(ii) アセトアセチル - C o A 合成酵素活性、(b) H M G - C o A 還元酵素、及び(c) H M G - C o A 合成酵素活性のいずれかの活性をもつポリペプチドの作用によりメバロン酸に変換する際の開始基質として利用する。最初に、チオラーゼ又はアセトアセチル - C o A シンターゼ(アセチル - C o A 及びマロニル - C o A を利用する)の作用によりアセチル C o - A をアセトアセチル C o A に変換する。次に、アセトアセチル - C o A は、H M G - C o A 合成酵素の酵素作用により、3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタルリル - C o A (H M G - C o A) へと変換される。この C o - A 誘導体を H M G - C o A 還元酵素により還元してメバロン酸を生成する。この反応は、メバロン酸経路によるイソプレノイド生産の律速段階となる。

10

【 0 1 0 9 】

M V A 経路上流に関係するポリペプチドの非限定例としては、アセチル - C o A アセチルトランスフェラーゼ(A A - C o A チオラーゼ)ポリペプチド、アセトアセチル - C o A シンターゼポリペプチド、3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタルリル - C o A シンターゼ(H M G - C o A シンターゼ)ポリペプチド、3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタルリル - C o A 還元酵素(H M G - C o A 還元酵素)ポリペプチドが挙げられる。M V A 経路上流のポリペプチドには、M V A 経路上流のポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド及び融合ポリペプチドが含まれる。M V A 経路上流に関係する代表的な核酸としては、M V A 経路上流に関係するポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又は融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。M V A 経路に含まれる代表的なポリペプチド及び核酸としては、本明細書に記載されるような任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸が挙げられる。したがって、本開示では、M V A 経路上流関連性ポリペプチドをコードする任意の遺伝子は、本発明において使用できることを企図する。

20

【 0 1 1 0 】

特定の実施形態では、リストリア・グレイ(L. grayi)、エンテロコッカス・フェシウム(E. faecium)、エンテロコッカス・ガリナラム(E. gallinarum)、エンテロコッカス・カセリフラブス(E. casseliflavus)及び/又はエンテロコッカス・フェカリス(E. faecalis)由来の様々な m v a E 及び m v a S 遺伝子を、単独で、あるいは M V A 経路上流関連性タンパク質をコードする1つ以上の他の m v a E 及び m v a S 遺伝子と組み合わせて選択することが、本発明の範囲内のものとして企図される。他の実施形態では、アセトアセチル - C o A 合成酵素の遺伝子は、(i) 3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタルリル - C o A 合成酵素(H M G - C o A 合成酵素)ポリペプチド及び3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタルリル - C o A 還元酵素(H M G - C o A 還元酵素)ポリペプチドをコードする1つ以上の他の遺伝子との組み合わせで本発明の範囲内のものとして企図される。したがって、特定の態様では、本明細書において企図される遺伝子の任意の組み合わせを、本開示に記載される任意の手法により、組み換え細胞で発現させることができる。

30

【 0 1 1 1 】

本明細書に使用することのできる上流 M V A 経路ポリペプチドの更なる非限定例は、国際出願公開第 2 0 0 9 / 0 7 6 6 7 6 号；同第 2 0 1 0 / 0 0 3 0 0 7 号及び同第 2 0 1 0 / 1 4 8 1 5 0 号に記載される。

40

【 0 1 1 2 】

(i) アセトアセチル - C o A シンターゼ核酸及びポリペプチド

アセトアセチル C o A シンターゼ遺伝子(n p h T 7 としても知られる)は、マロニル C o A 及びアセチル C o A からアセトアセチル C o A を合成する活性を有し、かつ2分子のアセチル C o A からアセトアセチル C o A を合成する活性は最小限である(例えば、非活性である)酵素をコードする遺伝子である。例えば、O k a m u r a e t a l . , P N A S V o l 1 0 7 , N o . 2 5 , p p . 1 1 2 6 5 ~ 1 1 2 7 0 (2 0 1 0) を参照されたい。この文献中の n p h T 7 に関する教示は、本開示に明確に援用される。日

50

本国特許公開第2008-61506(A)号及び米国特許出願公開第2010/0285549号には、放線菌のストレプトマイセス属CL190株のアセトアセチル-CoA合成酵素遺伝子が記載されている。アセトアセチル-CoA合成酵素も、アセチルCoA:マロニルCoAアシル基転移酵素として参照され得る。使用することのできる代表的なアセトアセチル-CoA合成酵素(又はアセチルCoA:マロニルCoAアシル基転移酵素)としては、Genbank AB540131.1が挙げられる。

【0113】

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

【0114】

これに加え、アセトアセチルCoAシンターゼを使用してイソプレンを生成した場合には、アセトアセチルCoAシンターゼが、マロニルCoAの脱炭酸によりマロニルCoAをアセチルCoAへと変換し得るという更なる利点も提供する。したがって、開始基質の貯蔵量は、アセチルCoAの開始量により制限されない。アセトアセチルCoAシンターゼによるアセトアセチルCoAの合成は、開始基質がマロニルCoAのみである場合のみ引き続き生じ得る。一実施形態では、開始時のマロニルCoAのプール量は、よりマロニルCoAを有する宿主株を使用することにより増加する。このようなプール量の増加は、天然に生じ得るものであり又は分子操作により設計され得るものである。例えば、Fowler, et al., Applied and Environmental Microbiology, Vol. 75, No. 18, pp. 5831~5839 (2009)を参照されたい。

【0115】

本開示に記載の任意の態様又は実施例では、マロニル-CoA及びアセチル-CoAからアセトアセチル-CoAを合成する能力を有する酵素を使用できる。このような酵素の非限定例を本明細書に記載する。本開示に記載の特定の実施形態では、マロニルCoA及びアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する能力を有する放線菌のストレプトマイセス属から誘導されるアセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子を使用できる。このようなアセトアセチルCoAシンターゼの遺伝子の例としては、配列番号15のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。このような、配列番号15のアミノ酸配列を有するタンパク質は、マロニルCoA及びアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する活性を有し、2分子のアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する活性は有さないアセトアセチルCoAシンターゼに相当する。

【0116】

アセトアセチル-CoAシンターゼ配列

10

20

30

40

MTDVRFRIIGTGAYVPERIVSNDEVGAPAGVDDDWITRKTGIRQ

RRWAADDQATSDLATAAGRAALKAAAGITPEQLTVIATSTPDRPQPPTAAYVQHHLG
 ATGTAADFVNACSGTVFALSSVAGTLVYRGGYALVIGADLYSRILNPADRKTVVLF
 DGAGAMVLGPTSTGTGPIVRRVALHTFGGLTDLIRVPAGGSRQPLTDGLDAQLQYFA
 MDGREVRRFVTEHLPQLIKGFLHEAGVDAADISHFVPHQANGVMLDEVFGELHLPRAT
 MHRTVETYGNTGAASIPITMDAAVRAGSFRPGELVLLAGFGGGMAASFALIEW

(配列番号15)

10

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

20

【0117】

(i) mvaE及びmvaSポリペプチドをコードする遺伝子

特定の実施形態では、リストリア・グレイ(*L. grayi*)、エンテロコッカス・フェシウム(*E. faecium*)、エンテロコッカス・ガリナラム(*E. gallinarum*)、エンテロコッカス・カセリフラバス(*E. casseliflavus*)及び/又はエンテロコッカス・フェカリス(*E. faecalis*)由来の様々なmvaE及びmvaS遺伝子を、単独で、あるいはMVA経路上流関連性タンパク質をコードする1つ以上の他のmvaE及びmvaS遺伝子と組み合わせて選択することが、本発明の範囲内のものとして企図される。いくつかの実施態様では、mvaE遺伝子は、チオラーゼ及びHMG-C_oA還元酵素活性の両方を保有するポリペプチドをコードする(Hedl, et al., J. Bacteriol. 2002 April; 184(8): 2116~2122)。リストリア・グレイ(*L. grayi*)、エンテロコッカス・フェシウム(*E. faecium*)、エンテロコッカス・ガリナラム(*E. gallinarum*)、エンテロコッカス・カセリフラバス(*E. casseliflavus*)、及びエンテロコッカス・フェカリス(*E. faecalis*)では、mvaE遺伝子は、チオラーゼ及びHMG-C_oA還元酵素の活性のいずれをも保有しているポリペプチドをコードする。実際に、mvaE遺伝子産物は、真性細菌で見られる、IPP生合成に関係する最初の二機能性酵素となるものであり、HMG-C_oA還元酵素の第一例は、天然において他のタンパク質と融合していた(Hedl, et al., J. Bacteriol. 2002 April; 184(8): 2116~2122)。それに対し mvaS遺伝子は、HMG-C_oAシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードし得る。

30

【0118】

適宜に、組換え細胞(例えば、大腸菌(*E. coli*))は、リストリア・グレイ(*L. grayi*)、エンテロコッカス・フェシウム(*E. faecium*)、エンテロコッカス・ガリナラム(*E. gallinarum*)、エンテロコッカス・カセリフラバス(*E. casseliflavus*)及び/又はエンテロコッカス・フェカリス(*E. faecalis*)由来の1種以上のmvaE及びmvaS遺伝子を発現して、イソプレンを生産するよう遺伝子操作することができる。1つ以上のmvaE及びmvaS遺伝子をマルチコピープラスミドで発現させることもできる。プラ

40

50

スミドは高コピー数プラスミド、低コピー数プラスミド又は中程度コピー数プラスミドであつてよい。あるいは、1つ以上のmvaE及びmvaS遺伝子を宿主細胞の染色体に組み込むことができる。プラスミド上の、あるいは宿主細胞染色体の一部に組み込まれた、1つ以上のmvaE及びmvaS遺伝子のいずれもの異種発現に際し、遺伝子発現は、誘導型プロモータ又は常時発現型プロモータのいずれかにより駆動できる。プロモータは、1つ以上のmvaE及びmvaS遺伝子の発現を強力に駆動することができ、弱く駆動することができ、あるいは中程度に駆動することができる。

【0119】

mvaE遺伝子は、チオラーゼ活性及びHMG-CoA還元酵素活性を両方保有しているポリペプチドをコードする。mvaE遺伝子によりコードされているポリペプチドのチオラーゼ活性は、アセチルCo-AをアセトアセチルCoAに変換するのに対し、HMG-CoA還元酵素ポリペプチドの酵素活性は、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoAをメバロン酸に変換する。mvaEポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びにmvaEポリペプチドの活性を少なくとも1つ有する、本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。

10

【0120】

変異型mvaEポリペプチドとしては、1つ以上のアミノ酸残基がアミノ酸置換を受けており、かつmvaEポリペプチド活性（すなわち、アセチルCo-AをアセトアセチルCoAに変換する能力並びに3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoAをメバロン酸に変換する能力）を保持しているものが挙げられる。アミノ酸置換は、保存的なものであっても非保存的なものであってもよく、アミノ酸残基の置換は遺伝子暗号によりコードされていてもコードされていなくてもよい。標準的な20個のアミノ酸「記号(alphabet)」を、側鎖の類似性に基づき化学的なファミリーに分けた。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、極性無電荷側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システィン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を持つアミノ酸が挙げられる。「保存的アミノ酸置換」では、アミノ酸残基は、化学的に類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される（すなわち、塩基性側鎖を有するアミノ酸は、塩基性側鎖を有する別のアミノ酸により置換される）。「非保存的アミノ酸置換」では、アミノ酸残基は、化学的に異なる側鎖を有するアミノ酸残基で置換される（すなわち、塩基性側鎖を有するアミノ酸は、芳香族側鎖を有する別のアミノ酸により置換される）。

20

【0121】

mvaEポリペプチド中にアミノ酸置換を導入することで、分子の官能性を改良することができる。例えば、mvaEポリペプチドの、基質に対する結合親和性を増加させるアミノ酸置換、あるいはアセチルCo-AをアセトアセチルCoAに変換する能力及び/又は3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoAをメバロン酸に変換する能力を改良するアミノ酸置換を、mvaEポリペプチドに導入することができる。いくつかの態様では、mvaEポリペプチド変異体は、1つ以上の保存的なアミノ酸置換を含有する。

30

【0122】

一態様では、イソブレン生産には、分解していない又は分解しにくいmvaEタンパク質を使用することができる。使用することのできる、分解されていない又は分解しにくいmvaE遺伝子産物の例としては、限定するものではないが、エンテロコッカス・フェシウム(*E. faecium*)、エンテロコッカス・ガリナラム(*E. gallinarum*)、エンテロコッカス・カセリフラブス(*E. casseliflavus*)、エンテロコッカス・フェカリス(*E. faecalis*)及びリストリア・グレイ(*L. grayi*)に由来するものが挙げられる。当業者は、大腸菌(*E. coli*)BL21(DE3)においてmvaEタンパク質を発現させ、任意の標

40

50

準的な分子生物学手法により断片が存在していないか調べることができる。例えば、H i s - t a g を利用して精製した後、すなわちメバロン酸又はイソプレンを生産する大腸菌 (E. coli) B L 2 1において発現させた後、本明細書に記載の検出法を使用して、S D S - P A G E ゲルを S a f e s t a i n で染色することにより、断片が存在していないことを確認することができる。

【0123】

H e d l e t a l . , (J B a c t e r i o l . 2 0 0 2 , A p r i l ; 1 8 4 (8) : 2 1 1 6 ~ 2 1 2 2) に記載のものなどの標準法を使用して、アセトアセチルC o A チオラーゼ活性並びに H M G - C o A 還元酵素活性を測定することにより、ポリペプチドが m v a E 活性を有しているか評価することができる。代表的なアッセイでは、アセトアセチルC o A チオラーゼ活性は、アセトアセチルC o A の形成又はリオリシスに伴う吸光度の変化を分光光度計により 3 0 2 n m にて監視することで測定できる。アセトアセチルC o A 合成を判定するための各反応に関する標準的なアッセイ条件は、1 m M のアセチルC o A 、1 0 m M の M g C l₂ 、5 0 m M のトリス (p H 1 0 . 5) というものであり、反応は酵素の添加により開始される。アッセイは最終用量 2 0 0 μ L で実施できる。アッセイに関し、1 酵素単位 (e u) は、1 分間で 1 μ m o l のアセトアセチルC o A を合成又はリオリシスすることを意味する。他の代表的なアッセイでは、H M G - C o A 還元酵素活性は、分光光度計により、3 4 0 n m での N A D P (H) の出現又は消失をもとに監視することもできる。H M G - C o A のメバロン酸への還元的脱アシル化について測定した各反応の標準的なアッセイ条件は、0 . 4 m M の N A D P H 、1 . 0 m M の (R , S) - H M G - C o A 、1 0 0 m M の K C l 及び 1 0 0 m M の K_x P O₄ (p H 6 . 5) というものである。アッセイは最終用量 2 0 0 μ L で実施する。反応は酵素の添加により開始される。アッセイに関し、1 e u は、1 分間で 1 μ m o l の N A D P (H) が代謝回転されることを意味する。これは、0 . 5 μ m o l の H M G - C o A 又はメバロン酸が代謝回転することに相当する。

【0124】

m v a E 核酸の例としては、m v a E ポリペプチド活性を少なくとも 1 つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又はポリペプチド融合物をコードする核酸が挙げられる。m v a E ポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。代表的な m v a E 核酸としては、例えば、リストリア・グレイ (Listeria grayi) D S M 2 0 6 0 1 、エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) 、エンテロコッカス・ガリナラム (Enterococcus gallinarum) E G 2 、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) 、及び / 又はエンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus) から単離された m v a E 核酸が挙げられる。リストリア・グレイ (Listeria grayi) D S M 2 0 6 0 1 の m v a E 遺伝子によりコードされる m v a E 核酸は、配列番号 4 7 に対し、少なくとも約 9 9 % 、 9 8 % 、 9 7 % 、 9 6 % 、 9 5 % 、 9 5 % 、 9 3 % 、 9 2 % 、 9 1 % 、 9 0 % 、 8 9 % 、 8 8 % 、 8 7 % 、 8 6 % 、又は 8 5 % の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) の m v a E 遺伝子によりコードされる m v a E 核酸は、配列番号 4 8 に対し、少なくとも約 9 9 % 、 9 8 % 、 9 7 % 、 9 6 % 、 9 5 % 、 9 5 % 、 9 3 % 、 9 2 % 、 9 1 % 、 9 0 % 、 8 9 % 、 8 8 % 、 8 7 % 、 8 6 % 又は 8 5 % の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ガリナラム (Enterococcus gallinarum) E G 2 の m v a E 遺伝子によりコードされる m v a E 核酸は、配列番号 4 9 に対し、少なくとも約 9 9 % 、 9 8 % 、 9 7 % 、 9 6 % 、 9 5 % 、 9 5 % 、 9 3 % 、 9 2 % 、 9 1 % 、 9 0 % 、 8 9 % 、 8 8 % 、 8 7 % 、 8 6 % 又は 8 5 % の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus) の m v a E 遺伝子によりコードされる m v a E 核酸は、配列番号 5 0 に対し、少なくとも約 9 9 % 、 9 8 % 、 9 7 % 、 9 6 % 、 9 5 % 、 9 5 % 、 9 3 % 、 9 2 % 、 9 1 % 、 9 0 % 、 8 9 % 、 8 8 % 、 8 7 % 、 8 6 % 又は 8 5 % の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェカリス (En

10

20

30

40

50

terococcus faecalis) の mvaE 遺伝子によりコードされている mvaE 核酸は、これまでにメバロン酸を生産するための大腸菌 (*E. coli*) において開示されている mvaE 遺伝子に対し、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、又は 85% の配列同一性を有し得る (米国特許第 2005 / 0287655 A1 号; Tabata, K. and Hashimoto, S. - I. Biotechnology Letters 26 : 1487 ~ 1491, 2004 を参照されたい)。

【 0 1 2 5 】

リステリア・グレイ (Listeria grayi) D S M 2 0 6 0 1 m v a E の配列
atggtaaagacattgtataattgtatgccctccgtactcccacatcgtaagtaccgcggcagctctaagatgacggcggttgaattggaa
accgcaggtaacaaggctctgtcgagaagaacgaccaggcaaaagaccatgtagaacaagtcattttgcacacgtttacaggcaggga
acggccagaatcccggccgtcagatgccttaattctggcctgtccgcagagataccggcttcgactattaaccagggtgtggttctggc
ctgaaagcaataagcatggcgccaaacagatcctactcgagaagcggaaagtaatagtagcaggaggtatcgaatccatgacgaatgc
gccgagtattacatattataataaagaagaagacaccctctcaaagcctgtcctacgatgacccatgcgttgcaccgacgcgttagcgg
aaagattatgggttaacagccaaaatgtgcgaacagtgccgtatcagtgaggcccaggacgccttgcgtatggatcgcagatg
aaagcagcaaaaggccaagaacaggcatttcgcagctgaaatactgcctttgaaatagggacgaagtattactcaggacgagggg
gttcgtcaagagaccaccctcgaaaaattaagtctgtcgaccattttaaagaagatggactctgtacagcggcaacgcctcaacgatc
aatgatggcgccctagccgtatgcattgtatcaaaggagttgtcgagacaaaccagatccctacccatgtcgatgtatgatattacag
ataggcattgtatccatcaataatggcattgtctccgtgatgcataaaactgtatcgatgtatgaaatattgtatggaaatcgat
ctctttgaaattaatgaggcattgcagcatcctcggttgtcaaaaagagttaaagcattcccgatgaaaagatcaatattggcggttccg
gtattgcactaggccatcccttgcgccacaggagcgcgcattgtatcccgatgtgaaacgtacacacggacgcgtatgg
tattgcctccctgtcattggcggtggcttgccttagcaatattatagaagtgcctcaggaagatcagccgttaaaaaattttatcaattgg
cccgtagggaccgtctggctagacttcaggagcaagccgtatcagcccgatcacaaatgtactggcagaaatgacacttcctgaaat
atattgccgacaatctgtatcgaaaatcaaataatctgaaatggaaatcccttggctgtggcttgaatctgagggtcaatgataagat
atcccaacttagcaactgaggaaccgagtgtaatcgctgcgtatggcaaaaatggcaaaaccacccatggcggtttcagtcagaatt
aaaagatggttccctcggtggcaattgtacttatgtatcgtcaaaagaacccgcaactatcgacgtatcgtatccatggcagaga
attttcgtgccgcagcgcagtcacatccatcgattgtgaaacgagggtggggctaaagagatagtagtgcgtacgttcgtatgatccg
acgttccctgttattgtatctgtatgtactaaagacgcaatggcgctaacatcattacaccatttcgcagggttagccggcttctgag
ggaaatccctaccgaagaattctgttcttattctatcattacgcaaccgaatcaattgtgaccgcctgcgtatcgtatccatggc
gagtaaaaaaggtatggtaaacaatcgctgaaaaagtggctgtcatctaaatgtccccagttatcgtatccatgcgtatgc
acaaaggatattatgtatggatttgaggccgtgtttggccctcaggaaatgacacacacggcggtcgccgcagccgcacatgcgtatgc
acgcgatcgcactatcgccgtttaagccagtgccgtgtcagaaggcgcttacacggggagatcagtctaccacttcgcactcgca
gcgttggcggtgcaattgaggcttgcctaaagcgaaggccgttacatcgaaatcatgggatcacagaggcgaaggagtcgtgc
acagctgcggtagggctggcgaaaacctggcgcttaagcgttgcgtttagtgaaggaaatcagcaaggatcgtatgcgttgc
cgctcttgcattatcggttaggtgtatcaggcgaaggtaatcctggccgaaaaattacaggcgttgcgtatgaatcaggcgaacgc
tcagaccatactcgcaagatcgcggaaatgtga (配列番号47)

【 0 1 2 6 】

エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) mvaE の配列

atgaccatgaacgttggaatcgataaaatgtcattcttgcaccactttgtggacatgactgatctggcagtagcacggatgtcgatcc
caataagttctgatgttattggccaggaccatggcagtaatccgaaaacgcaggatattgtgacattgccacaatgtccaaaaa
catactgtcagctgaggaccitgataaaattgatatggcatagtcggcaccgagagtggaatcgatgaatccaaagcgagtgcgttagtgc
ttcacaggtgctcggtatccagaagttgctcgctttagaaatcaaagaagccgttatggggtaccgcggcttacagttcgctgtaaac
cacattagaatcatcctgaatcaaagggttttagttcatcagatatcgcaaaatacggcctggctctggaggtgaaccaacgcaaggt
gcaggcgctgtggctatgctcgtcaactgaccctaagatcattgcttcaacgcacgatagcctcgcttacacaagatatctatgacttct
ggcgaccagttggacatgactatcctatggcagggcctttagtacagagacatccagtcattcagaccgtatggcaggaatac
acaaaaacggtcgcagcatgcactggcagactttgctgcccttagttcatatccgtataactaaaatggcaaaaaggcgctgtcaatc
cttgaaggcgaatcagaggaggctcagaaccgtatactagcaaaatatgaaaagagtatagcctactccagaaaggcggttaacctgtata
ccggtagcctgtatctaggacttacttgcggaaaatgcagaagacctaaagctggatttaataggcctttctacggccgt
ctgttgcggagtttctcaggaaggctgggtgaggactatcaggaacagctactaaaacaaaacatgccgaacagctggccatagaaag
caactgacaatcgaggagtgaaacgttgtctccgtcgctggacgtggacaaagacgccgaatacgaagacacattagcttagca
ttcgtcagtccgaaacaccgtacgtgagtacaggagttga (配列番号48)

【 0 1 2 7 】

エンテロコッカス・ガリナラム (*Enterococcus gallinarum*) EG2 mvaE の配列

atgaaagaagtgttatgtatgcggctgcacaccattggaaatacagagtagtcttagtcctttacagcggtggagctggggac
 actggcacgaaaggcgtgataaaacaaagctaagaagacaagatagaccaagtatccgcaatgtcgtcaggcagaaaa
 cggacaaaacgttcaagacaatagccctgaacagtggcttaccagttacgtgcgtccggcgtactattaacgaagttgcgggtccgga
 atgaaagcggtgatTTAGCCGCCAGTTAATACAGTTAGGGAGGCAGAGTTGTCATTGCAAGGGGTACGGAGTCAATGTCACAAGCAC
 CCATGCTGAAACCTTACCGACTCAGAGACCAACGAATAACGGAGAGCCGATATCATCAATGGTTAATGACGGGCTGACGGATGCGTTCCAAT
 GTCACATGGGTCTTACTGCCAAAAGGTGGCGACCCAGTTTCAGTGTGCGCGAGGAACAAGACCGGTACGCATTGCCAGGCAATTGA
 AAGCAGCGCACGCGGTGAAGCCGGGTCTCAGAAGAGATTTCAGGTTAAGATTAGCGACGAGGGATGCTTGAGTGAAGACGAGG
 CAGTAAGAGGCAACAGCACTTGGAAAAACTGGCACCTGCGACGGTGTTCAGAAGAGGGCACGGTACCGCTGCAATGCTCACC
 GCTGAATGACGGCGTAGTGTGATTCTGATCAAAGAACATAACCGGAAAACAATACTGCCATTGCGACGATAAAGGAGGTTG
 CGGAAGTGGTATCGATCCTCTATCATGGTTATTGCCCAATAAAGGCCATTCAAAGTTAACAGATCGTGGGATGACACCTGTCACGA
 TTGATCTGTCGAAATTAAATGAAGCATTGCGCATCTAGCATTGTTCTCAAGAGCTGCAATTGGACGAAGAAAAAGTGAATATCTATGGC
 GGGCGATAGCTTAGGCCATCCAATCGCGCAAGCGGAGCCCGATACTGACAACCTTAGCATACTGCCCTCTGCGTAGCAAAAGCG
 TTATGGTATTGCGTATTGTCGGGTCTGGCTGGCTGCTGTTAGAAGCTAATATGGAGCAGACCCACAAAGACGTTAGAAG
 AAAAGTTTACCACTTACCCCTCCGAGCGGAGATCGCAGCTTATCGAGAAGAACGTTCTACTCAAGAAACCGGACTTATTTCCAGGA
 GCAGACGTTGTCGAAGAACGTCCGATCACATGATTGAGAATCAGGTCCTGAGTGGAAATTCCAATGGGAATTGCAACAAATTTCAGAT
 TAATGCGAAGAAAAATGGATTCTATGGCGACTGAAGAACCTTAGTAATAGCGCAGCATCGAACGGGCCAAACTCGGGGAACATT
 TGC CGGAAACGCCCTCAGCGCTTATGCGCGGGCAGATTGCTCTGCAATCAGAACCGTGTATAATTGCGTGAATCATC
 GCAAAGAACACTGATTCTGCGCAAACCGAGTCGTACCCAGTATTGTTAAACCGGGGGAGGTGTTAGGATAATTCTACCGGGAGTTA
 TGGTTCTTTCACCGTATTATCAATCGACTTCTGGTGGACGTCAAGGACGCAATTGGGGCAAACATGATCAACTCTATTCTGAAAGCGTT
 GCAAATAACTCGGTGAATGGTCCCAGGAAGAGGAATACTGTTCTCCATCCTGTCAAACTCGCTACGGAGTCCCTGCACTCGATGTTG
 GAGATTCTTGAAGACTTGGTGTAAACAAAGAAATTGGTGAACAGATGCCAAGAAAATTCAACAGGCAGGGAAATGCTAAGCTTGA
 CCCTTACCGCGCGGCAACCCATAACAAGGGATTATGAACGGTATCGAAGCCGTCGGCACAACGGGAAACGACACACGGCTGTT
 CGCTCTTCTACCGCATACCGCCGCCGTAATGGCTGTACCAAGGTTAACGGATTGGCAGATCAAGGGCGATAACTGGTGGTAAATTAC
 AGTCCCACTGGCTGGCGACTGTCGGTGGCGCGTCGAACATATTACCAAAAGCCAAGCTCCCTGCCATGCTGGATATTGATTCCGAA
 AAGAACTGGCCAAGTGTACGCCCGGTAGGTTAGCACAGAATCTGGCGGTACGTGCTTACAGAGAAGGAGTACAGCGAAAGGAC
 ACATGGGCTTGCAAGCACGTTCTAGCGATTGCGATAGGTGCCATCGGTGAGGAGATAGAGCAAGTCGEGAAAAACTCGGTGAAGCTGA
 AAAAATGAATCAGCAAACGGCAATAACAGATTAGAAAAATTGCGAGAAATGA (配列番号49)

【0128】

エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) m v a E の配列

10

20

30

40

atgaaaatcggattgaccgtctgtccttcataccgaatttgtatttgacatgactgagctgcagaatcacgcgggatgatccagcta
aatatcatattggaatcgacaagatcagatggcagtgaatcgcaaaacgaggacatcataacactgggtgcaaacgcgtcgagtaaga
tcgtgacagagaaagaccgcgagttgatgtatggtaatcggtggcacggaatcaggaattgaccactccaaagcaagcgcgtgattt
caccatctcctaaaattcagtcgtcgcccgttctcgaggtaaaagaagcttgcataatggcgaaactgcgtccctgcacatggcgaaggag
tatgtcaaaaatcatccggagcgtaaaggcttggtaattgcgtcagacatcgccgttatggttggccagcgaggagaagttactcaagg
cgtggggccgtagccatgtgattacacaaaaccccgattttcgatttgcgttgcgatgttttctcacagaggatctatgatttct
ggcggcctgattactccgagttccctgttagtggacggccccttcaaactcaacgtatagagatgtttcagaaagtggaccggcaca
aggaattgtccgaaagaggcgtggaaagatttcaagctttcacataccctatacgaagatggtaagaaagcgtccagagtgttt
tagaccaaaccgatgaagataaccaggagcgttaatggctagatgaggagttcgctatgccggagaattgtaacctgtacaca
ggcagcttgttacccgttacaagcttgtggaaaactctaaaagttacaaccggagatcggttgcctttccatggcagtgg
cggtgtccgagttccctaccgggtattnagaagaaaattaccaagagtacctgttcgctaaagccatcaagaaatgctgatagccggactc
ggattacggtcgatgaatacggagaccatccctcagagactctggcagaacatggtaatgcggcaatacggagcgtccctttcta
taaccaagattgagaacgacattcgattataaaatctga (配列番号50)

10

20

【0129】

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

【0130】

mvaS遺伝子は、HMG-CoAシンターゼ活性を保有するポリペプチドをコードする。このポリペプチドは、アセトアセチルCoAを、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリル-CoA (HMG-CoA) を変換させることができる。mvaSポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びにmvaSポリペプチドの活性を少なくとも1つ有する、本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。

30

【0131】

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

40

【0132】

Quant et al. (Biochem J., 1989, 262: 159~164)に記載のものなどの標準法を使用して、HMG-CoAシンターゼの活性を測定することにより、ポリペプチドがmvaS活性を有するか評価することもできる。代表的なアッセイでは、HMG-CoAシンターゼの活性は、303nmでの吸光度の変化を監視し、エノール形態のアセトアセチルCoAの消失を分光光度をもとに評価することで、検定

50

できる。30 下で、50 mMのTris/HCl(pH 8.0)、10 mMのMgCl₂及び0.2 mMのジチオスレイトールを含有する標準的な1 mLのアッセイ系に、5 μLのアセチルリン酸、10 μM-アセトアセチル-CoA及び5 uLの抽出試料を加え、続いてアセチルCoA(100 uM)及び10 ユニットのPTAを同時に加えることができる。次に、HMG-CoAシンターゼの活性を、アセチルCoA添加前及び添加後の速度(rate)の差として測定する。使用した条件下(pH 8.0、10 mM-MgCl₂)での、アセトアセチルCoAの吸光係数は、 $12.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。定義によると、1ユニットの酵素活性により、1分あたり1 μmolのアセトアセチルCoAが変換されることになる。

【0133】

10

あるいは、組換え細胞におけるメバロン酸の生産量は、限定するものではないが、ガスクロマトグラフィー(米国特許出願公開番号第2005/0287655(A1)号を参照されたい)又はHPLC(米国特許出願第公開2011/0159557(A1)号を参照されたい)で測定することができる。代表的なアッセイの際には、1種以上の抗生物質を添加したLBプロスを含有させた振とうチューブに培養物を接種し、34にて、250 rpmで14時間インキュベートする。次に、1%グルコース、0.1%酵母エキス及び200 μMのIPTGを添加したTM3培地を入れたウェルプレート中で、最終的なODが0.2になるよう培養物を希釈する。次に、プレートを、Breath Easier membrane(Diversified Biotech)でシールし、振とう/恒温器で、34にて、600 rpmで24時間インキュベートした。次に各培養物1 mLを3,000 × gで5分遠心分離する。次に、上清に20%硫酸を添加し、氷上で5分インキュベートする。次に、混合物を3000 × gで5分遠心分離し、HPLC解析のため上清を回収する。メバロン酸(Sigma)の標準曲線と比較して、試料中のメバロン酸濃度を測定する。更に、当該技術分野において既知の任意の手法によりグルコースオキシダーゼアッセイを実施し、グルコース濃度を測定する。HPLCを使用し、各試料により得られた屈折率を、濃度既知の各種メバロン酸溶液のHPLCをもとに作成した検量線に対し比較して、メバロン酸濃度を定量することができる。

20

【0134】

30

mvaS核酸の例としては、mvaSポリペプチド活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又はポリペプチド融合物をコードする核酸が挙げられる。mvaSポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。代表的なmvaS核酸としては、例えば、リステリア・グレイ(Listeria grayi)DSM 20601、エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)、エンテロコッカス・ガリナラム(Enterococcus gallinarum)EG2、エンテロコッカス・フェカリス(Enterococcus faecalis)、及び/又はエンテロコッカス・カセリフラブス(Enterococcus casseliflavus)から単離されたmvaS核酸が挙げられる。リステリア・グレイ(Listeria grayi)DSM 20601のmvaS遺伝子によりコードされるmvaS核酸は、配列番号51に対し、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%又は85%の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)のmvaS遺伝子によりコードされるmvaS核酸は、配列番号52に対し、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%又は85%の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ガリナラム(Enterococcus gallinarum)EG2のmvaS遺伝子によりコードされるmvaS核酸は、配列番号53に対し、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%又は85%の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・カセリフラブス(Enterococcus casseliflavus)のmvaS遺伝子によりコードされるmvaS核酸は、配列番号54に対し、少なくとも約99%、98%、9

40

50

7%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%又は85%の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) mvaS 遺伝子によりコードされている mvaS 核酸は、これまでにメバロン酸を生産するための大腸菌 (*E. coli*) において開示されている mvaE 遺伝子に対し、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、又は 85% の配列同一性を有し得る (米国特許第 2005/0287655 A1 号; Tabata, K. and Hashimoto, S.-I. Biotechnology Letters 26: 1487~1491, 2004 を参照されたい)。

【 0 1 3 5 】

10

リステリア・グレイ (Listeria grayi) D S M 2 0 6 0 1 m v a S の配列
atggaagaagtggtaattatagatgcacgtcgactccgattggtaaatatcacgggtcggtgaagaagtttcagcggtgccgtggggac
ggccgtggctaaagacatgtcgaaacgcaaccagaaaatcaaagaggagatcgccaggtcataattggtaatgtctgcaggcaggaaa
tggccagaaccccgcggcaagttgtctcaatcagggtgtccgttgcattcccgcttacaattaacgagggttgtggctgggttgg
aaagctatctgtatggcatggaaacaaatccaactcgcaagcgcaagtagtgcggcaggcgttgcattgaatcaatgacaaatgcgcca
agcctgtcccactataacaaggcggaggatacgtatagtgtcccgatgtcgagcatgacactggatggctgacagacgcatttcgtt
acctatggattaaacagcggaaaacgtcgacagegctacggatctccgtgaggcgaagatcaattcgatcatcaatctcagatgaaa
gcagcaaaagcgcaggcagaaaacaattcgtcaaggaaattgtgccactggcgggtgaaactaaaaccatcacagctgacgaaggat
cagatccaaacaacgatgggaaaactggcaagtctcaacccgtttaaccatggactgtaccgcaggaaatgcttagcaccatt
aatgacggggccgcctgtgtctgttagaaaaacttactgcgaaactaatgacataccgtacccgtgacaaatcaaagaaaattgtgaa
gttggaaatcgatccggagattatggcatctccgataaaagcgataaaacattgttacaaaatcaaaaagttagcctcgaaatattgg
gttttggaaataatgaagccttgccgcaagtagcatgtgttagtggattatccgctaaagttaaccgttatgggggt
gtatatcccttaggtcatgcaattggcaaccggcgtcgccacttcaactgggtatcaatgcaggagatacaagcacgttatggta
ttgcgagccctgtcggtggacttgcgcaatgttttagaactcgccactattgagaaggctaaaccgacagacaaaaagttct
atgaattgtcaccagctgaacgggtcaagagctggaaaatcaacagaaaatcagttctgaaactaaacagcagttatctcagatgtctt
ccgaggacactgcaaaaccatttgatagaaaatcaaatatcagagattgaactcccaatggcgtggatgaacctgaaggatggaa
gcctatgtgtgccaatggcggacggaaagagccgtccgtcatecgccatgtcaatggccaaaatggccggcgaattcacactcag
tcgaaagaacggctgctcagaggtcagattgtttcagcgcgaagaatccgaatgaaatcgaacagagaatagctgagaaccacgatgtt
tttcgaacgtggccaaacagtctatccattgtggaaaagagggagggtctccggcattgcacttgcattttcctgcgattctcag
caggagtctcgccgaccagtccacattttatcagtgaccctttgttagatgtgaaagacgcgtatggggcaaatatcataatgcaatactt
agggcgtcgccgcgttgcgaatgggtcccaatgagggaaatttttctattctcgtcaacttgcgtacggagagcttagtcacggct
gttggtaagtcccttagtgcacttagcaagagaggtggcaacgggtggccagaaaattgtcaggcgtcgttgcgaaagacag
accataccgcgcgtgaccacaaacaaaggattatgaacggtagaggcttgcattgcacccgcacaggcaacgacacgcgcgcgc
cagccgcgttgcattggatacgcagcgcgcaccggtagctatcagggtctgactaactggacgattgcgttgcacccgc
taacactgcgcgtggccatcgtacagttggaggcgtaccaagtgcccaagctcaagcggcactggagattgtatgttact
tctcaagagcttgcagcccttagcggcgttaggttttagtacaaaatctcgccgcgtcactgggttccgaaggatataaaaaagg
gcacatgtccatgcagccccggctctegcaatecggtcggtgtcaaaaaagccgagatcgagcaggcgtcgcggcggc
acccgcgaatgaatcagcagcagcgcgtccgttttgcgagatccgcgaacaatga (配列番号51)

20

30

40

50

【 0 1 3 6 】

エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) m v a S の配列

atgaacgtcgccattgacaaaattaattttcggtccaccgtattatctggatatggtcgacctggcccacgcacgcaagtggaccgcac
 aaatttacaattggaaattggacaggatcagatggctgtgagcaaaaagacgcacgatatcgtaacattcgccggctagtgccgcgaaggaaa
 ttttagaacctgaggacttgcaagctatacatggttatagttggtaccgaatcgccgcattgacgagagcaagcattccgcggctgtttac
 atcgtttgtggcgtacaaccccttcgctcgcatgttgaattaaagaagcctgtacgggcaaccgcaggcattcagttgccaagactca
 tatacaagcgaacccggagagcaaggtcctgtaattgcaagcgatatacgctgtatggcttcggtcaggtggagagccccacacaagg
 cgcaggggcagttgtatgcttcacggcaaattccagaatcctgacccatcgaaatctgtatgttaacgcagatatttatgacttc
 tggagaccacttggtcacgcttaccctatggtagatggccacccattcaatcaagtctatattgacagtttaagaaggctggcaagcacattg
 cgaacgcaatcaagctctataccgactatgccgcgatttagttcatattccgtataaaaaatggtaagaaagccctgctcgctgtttgc
 agatgaagtggaaactgaacaggaacgcgttatggcacggatgaagagtctatcgatattcagccggatcggcaactgtatacggat
 cattgtacctgggctgatccattggaaaacagtttcacctgtcgccggcgaccggataggattgttagttatggagtgccgtgt
 cagegaatttctccggcgttagtggcaggctatgaaaatcaattgaacaaagaggcgcataccagctctggatcagcgtcagaagc
 ttccatcgaagagatgaggcgattttacagattccattgatcaggatgcagcgttcggatgacctgcatattccatccgcgag
 ataaaaaacacgattcggtactataaggagagctga (配列番号52)

10

20

【 0 1 3 7 】

エンテロコッカス・ガリナラム (*Enterococcus gallinarum*) E G 2 m v a S の配列

(配列番号53)

【0138】エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) m v a S の配列

atgaacgttggaaattgataaaatcaattttcggtccgcctattcattgatatggatctcgcatgcaagagaagttgaccccaacaag
 ttcaactataggataggccaagatcagatggcagtaaaacaagaaaacgcaagatatcgtaacgttcgcgatgcacgcgcgaaggatattc
 tgactaaggaagattcacaggccatagatatggtaatagtgggactgagtcgtggatcgacgagagcaaggcaagtgttgtattgcat
 cggcttttaggtattcagcccttgcgcgccttggaaattaaggaggcatgtatgggactgcccgcctcagttgcaaaagctcatgt
 gcaggctaattccccagagcaaggcctggtagctccgatatacgctacggactggcatcggaggagaaccgactcaagggt
 aggtgtggcaatgttgattccgcgtatccagctatcgtcagttagaaaatgataatctcatgttgacccaaagatatacgattttggcg
 cccggcggcatcaatatccatggtagacggccatctgtctaattccgtacacgaaaatggtaagaaagctctgttagcgggttttgcg
 gaggaagatgagacagaacaaaagcggtaatggcacgttatgaagaatcaattgtatacagtcgtcgactggaaatctgtatactggctc
 actctatctggcctgatttcctactggagaatagtagcagttacaggcgaacgatcgcataggtctgttagctatggcaggggccgttg
 cggaaattttcagttggccttgcgttaccgggttacgagaaacaattagcgaagctgcccattcaagcttctggacgaccggcaaaaactg
 actatcgcagactacgaagccatgttaatgatcaggaccagtcatgtgaggatgacttactccatcagagaga
 taaaaaacactattcgctactataacgaggagaatgaataa (配列番号54)

10

【0139】

20

mvaS核酸は、組み換え細胞において多コピープラスミド上で発現させることができ。プラスミドは高コピー数プラスミド、低コピー数プラスミド又は中程度コピー数プラスミドであってよい。あるいは、mvaS核酸は、宿主細胞の染色体に組み込むことができる。プラスミド上の、あるいは宿主細胞染色体の一部に組み込まれた、mvaS核酸の異種発現に際し、核酸の発現は、誘導型プロモータ又は常時発現型プロモータのいずれかにより駆動できる。プロモータは、mvaS核酸の発現を強力に駆動することができ、弱く駆動することができ、あるいは中程度に駆動することができる。

【0140】

30

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

【0141】

b. MVA経路下流のポリペプチドをコードする核酸

40

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

【0142】

50

メバロン酸生合成経路の下流は、メバロン酸キナーゼ(MVK)、ホスホメバロン酸キナーゼ(PMK)及びジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ(MVD)を含む。いくつかの態様では、MVA経路の下流は、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ(IDI)を更に含む。本明細書に提供される細胞は、イソプレン合成酵素、MVA経路上流の1種以上のポリペプチド及び/又はMVA経路下流の1種以上のポリペプチドをコードする核酸を含み得る。MVA経路下流のポリペプチドは、(a)メバロン酸を5-ホスホメバロン

酸へとリン酸化する酵素、(b) 5 - ホスホメバロン酸を 5 - ジホスホメバロン酸へと変換する酵素、(c) 5 - ジホスホメバロン酸をイソペンテニルピロリン酸へと変換する酵素、のうちの任意の酵素であり得る。より具体的には、メバロン酸を 5 - ホスホメバロン酸へとリン酸化する酵素は、M. mazeyi (M. mazeyi) メバロン酸キナーゼ、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、メタノコックシド (*Methanococcoides burtonii*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、メタノコックシド・バートニイ (*Methanococcoides burtonii*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ (*Lactobacillus sakei*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトミセス (*Streptomyces*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、及びストレプトミセス (*Streptomyces*) C L 190 メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群に由来するものであり得る。他の態様では、メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸へとリン酸化する酵素は M. mazeyi (M. mazeyi) ・メバロン酸キナーゼである。

10

【0143】

いくつかの態様では、MVA 経路下流のポリペプチドは異種ポリペプチドである。いくつかの態様では、細胞は、MVA 経路下流のポリペプチドをコードする異種核酸のコピーを 1 つ以上含む。いくつかの態様では、MVA 経路下流のポリペプチドをコードする異種核酸は、調節可能なように常時発現型プロモータに連結される。いくつかの態様では、MVA 経路下流のポリペプチドをコードする異種核酸は、調節可能なように誘導型プロモータに連結される。いくつかの態様では、MVA 経路下流のポリペプチドをコードする異種核酸は、調節可能なように高発現型プロモータに連結される。いくつかの態様では、MVA 経路下流のポリペプチドをコードする異種核酸は、調節可能なように低発現型プロモータに連結される。いくつかの態様では、異種 MVA 経路下流のポリペプチドは、サッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) 又はメタノサルシナ・マゼイ (*Methanosarcina mazeyi*) 由来のポリペプチドである。

20

【0144】

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

30

【0145】

MVA 経路下流のポリペプチドの例としては、次の(i) メバロン酸キナーゼ (MVK) ; (i i) ホスホメバロン酸キナーゼ (PMK) ; (i i i) ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (MVD) ; 及び (i v) イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ (IDI) も挙げられる。詳細には、下流のMVK ポリペプチドは、メタノサルシナ (*Methanosarcina*) 属由来のものであってよく、更に詳細には、下流のMVK ポリペプチドは、メタノサルシナ・マゼイ (*Methanosarcina mazeyi*) 由来のものであってよい。他の態様では、下流MVK ポリペプチドは、メタノコックシド (*Methanococcoides*) 属、及びより詳細には、メタノコックシド・バートニイ (*M. Burtonii*) 由来のものであってよい。MVA 経路下流のポリペプチドのその他の例は、米国特許出願公開第 2010 / 0086978 号に見出すことができ、この内容は、MVK 経路下流のポリペプチド及びMVK 経路下流のポリペプチド変異体に關し參照によりその全文が明示的に本明細書に援用される。

40

【0146】

本明細書に記載の細胞のうち任意のものは、IDI 核酸 (例えば、IDI をコードする内在性又は異種核酸) を含み得る。イソペンテニルジホスフェートイソメラーゼポリペプチド (イソペンテニル - ジホスフェート - イソメラーゼ又は IDI) は、イソペンテニルジホスフェート (IPP) 及びジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) の相互変換を触媒する (例えば、IPP を DMAPP へと変換し及び / 又は DMAPP を IPP へと変換

50

する）。例示的な I D I ポリペプチドとしては、I D I ポリペプチドの活性を少なくとも 1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、及び融合ポリペプチドが挙げられる。標準法（本明細書に記載されるものなど）を用い、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボでポリペプチドが I P P 及び D M A P P を相互変換する能力を測定することで、ポリペプチドが I D I ポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。I D I 核酸の例としては、I D I ポリペプチド活性を少なくとも 1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又はポリペプチド融合物をコードする核酸が挙げられる。I D I ポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。

10

【 0 1 4 7 】

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

20

【 0 1 4 8 】

いくつかの態様では、M V A 経路下流のポリペプチドは、サッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) 又はメタノサルシナ・マゼイ (*Methanosarcina mazei*) 由来のポリペプチドである。いくつかの態様では、前記 M V K は、ラクトバチルス (*Lactobacillus*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ (*Lactobacillus sakei*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母・メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニアエ (*Streptococcus pneumoniae*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトマイセス (*Streptomyces mevalonate*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトマイセス C L 1 9 0 (*Streptomyces CL190*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、M . バートニイ (*M. burtonii*)・メバロン酸キナーゼポリペプチド、及びメタノサルシナ・マゼイ (*Methanosarcina mazei*)・メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群から選択される。本開示のプロモータのうちのいずれか（例えば、本開示に記載され、本開示の実施例において識別される、誘導型プロモータ及び常時発現型プロモータなどのプロモータ）を使用して、本開示のいずれかの M V A ポリペプチドの発現を駆動させることができる。

30

【 0 1 4 9 】

3 . D X P 経路核酸及びポリペプチド

本発明のいくつかの態様では、本明細書に記載の任意の組成物又は方法に記載の組換え細胞（本明細書に記載される通りに改変された宿主細胞を含む）は、D X S ポリペプチド及び / 又は他の D X P 経路ポリペプチドをコードする 1 つ以上の異種核酸を更に含む。いくつかの態様では、細胞は、D X S ポリペプチド及び / 又は他の D X P 経路ポリペプチドをコードする内在性の核酸の染色体コピーを更に含む。いくつかの態様では、大腸菌 (*E. coli*) 細胞は、I D I ポリペプチド及び D X S ポリペプチド並びに / 又は他の D X P 経路ポリペプチドをコードする 1 つ以上の核酸を更に含む。いくつかの態様では、1 種の核酸は、イソブレン合成酵素ポリペプチド、I D I ポリペプチド、及び D X S ポリペプチド、並びに / 又は他の D X P 経路ポリペプチドをコードする。いくつかの態様では、1 種のプラスミドは、イソブレン合成酵素ポリペプチド、I D I ポリペプチド及び D X S ポリペプチド並びに / 又は他の D X P 経路ポリペプチドをコードする。いくつかの態様では、複

40

50

数のプラスミド (multiple plasmids) は、イソプレン合成酵素、I D I ポリペプチド及びD X S ポリペプチド又は他のD X P 経路ポリペプチドをコードする。

【0150】

例示的なD X S ポリペプチドとしては、D X S ポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、及び融合ポリペプチドが挙げられる。標準法（本明細書に記載されるものなど）を用い、ポリペプチドが、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビオでピルビン酸及びD - グリセルアルデヒド - 3 - リン酸を1 - デオキシ - D - キシリロース - 5 - リン酸へと変換する能力を測定することで、ポリペプチドがD X S ポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。D X S ポリペプチド及び核酸の例並びにD X S 活性の測定法は、国際公開第2009/076676号、米国特許出願第12/335,071号（米国特許出願公開第2009/0203102号）、国際公開第2010/003007号、米国特許出願公開第2010/0048964号、国際公開第2009/132220号、及び米国特許出願公開第2010/0003716号に、より詳細に記載される。10

【0151】

D X P 経路に含まれるポリペプチドの例としては、限定するものではないが、次の任意のポリペプチド：D X S ポリペプチド、D X R ポリペプチド、M C T ポリペプチド、C M K ポリペプチド、M C S ポリペプチド、H D S ポリペプチド、H D R ポリペプチド、及びD X P 経路のポリペプチドの活性を1つ、又は2つ以上有するD X P 経路ポリペプチド（例えば、融合ポリペプチド）、が挙げられる。特に、D X P 経路ポリペプチドとしては、D X P 経路のポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド及び融合ポリペプチドが挙げられる。例示的なD X P 経路に関する核酸としては、D X P 経路のポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又は融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。D X P 経路に含まれる代表的なポリペプチド及び核酸としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。D X P 経路のポリペプチド及び核酸の例としては、並びにD X P 経路のポリペプチド活性を測定する方法については、国際公開第2010/148150号に、より詳細に記載されている。20

【0152】

例示的なD X S ポリペプチドとしては、D X S ポリペプチドの活性を少なくとも1つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、及び融合ポリペプチドが挙げられる。標準法（本明細書に記載されるものなど）を用い、ポリペプチドが、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビオでピルビン酸及びD - グリセルアルデヒド - 3 - リン酸を1 - デオキシ - D - キシリロース - 5 - リン酸へと変換する能力を測定することで、ポリペプチドがD X S ポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。D X S ポリペプチド及び核酸の例並びにD X S 活性の測定法は、国際公開第2009/076676号、米国特許出願第12/335,071号（米国特許出願公開第2009/0203102号）、国際公開第2010/003007号、米国特許出願公開第2010/0048964号、国際公開第2009/132220号、及び米国特許出願公開第2010/0003716号に、より詳細に記載される。30

【0153】

特に、D X S ポリペプチドは、ピルビン酸及びD - グリセルアルデヒド3 - リン酸を1 - デオキシ - d - キシリロース5 - リン酸（D X P ）へと変換する。標準法を用い、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビオでポリペプチドがピルビン酸及びD - グリセルアルデヒド - 3 - リン酸を変換する能力を測定することで、ポリペプチドがD X S ポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。40

【0154】

D X R ポリペプチドは、1 - デオキシ - d - キシリロース5 - リン酸（D X P ）を2 - C - メチル - D - エリスリトール4 - リン酸（M E P ）へと変換する。標準法を用い、イ50

ンビトロで、細胞抽出物中で又はインビボでポリペプチドがDXPを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがDXRポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。

【0155】

MCTポリペプチドは、2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸(MEP)を4-(シチジン5'-ジホスホ)-2-メチル-D-エリスリトール(CDP-ME)へと変換する。標準法を用い、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボでポリペプチドがMEPを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがMCTポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。

【0156】

CMKポリペプチドは、4-(シチジン5'-ジホスホ)-2-C-メチル-D-エリスリトール(CDP-ME)を2-ホスホ-4-(シチジン5'-ジホスホ)-2-C-メチル-D-エリスリトール(CDP-MEP)へと変換する。標準法を用い、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボでポリペプチドがCDP-MEを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがCMKポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。

10

【0157】

MCSポリペプチドは、2-ホスホ-4-(シチジン5'-ジホスホ)-2-C-メチル-D-エリスリトール(CDP-MEP)を2-C-メチル-D-エリスリトール2,4-シクロジホスフェート(ME-CPP又はcMEPP)へと変換する。標準法を用い、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボでポリペプチドがCDP-MEPを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがMCSポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。

20

【0158】

HDSポリペプチドは、2-C-メチル-D-エリスリトール2,4-シクロジホスフェートを(E)-4-ヒドロキシ-3-メチルブタ-2-エン-1-イルジホスフェート(HMBPP又はHDMAPP)へと変換する。標準法を用い、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボでポリペプチドがME-CPPを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがHDSポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。

30

【0159】

HDRポリペプチドは、(E)-4-ヒドロキシ-3-メチルブタ-2-エン-1-イルジホスフェートをイソペンテニルジホスフェート IPP 及びジメチルアリルジホスフェート(DMAPP)へと変換する。一実施形態では、HDRポリペプチドのコードには、ispH遺伝子を使用することができる。ispHは、1-ヒドロキシ-2-メチル-2-(E)-ブテニル4-ジホスフェート還元酵素、4Fe-4Sタンパク質、ECK0030、JW0027、lytB、yaaE、及びb0029としても知られている。標準法を用い、インビトロで、細胞抽出物中で又はインビボでポリペプチドがHMBPPを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがHDRポリペプチド活性を有するか否かを判定することができる。

40

【0160】

4.MVA経路、イソプレン合成酵素、IDI及びDXP経路のポリペプチドに関する生物資源

イソプレン合成酵素、IDI、DXP経路及び/又は下流MVA経路の核酸は、イソプレン合成酵素、IDI、DXP経路及び/又はMVA経路の核酸を天然に含有する任意の生物から得ることができる。イソプレンは、バクテリア、酵母、植物及び動物などの様々な生物により天然に生成される。一部の生物は、イソプレンの生産に関係するMVA経路を含有する。イソプレン合成酵素の核酸は、例えば、イソプレン合成酵素を含有する任意の生物から得ることができる。したがってMVA経路の核酸は、例えば、MVA経路を含有する任意の生物から得ることができる。IDI及びDXP経路の核酸は、例えば、IDI及びDXP経路を含有する任意の生物から得ることができる。

50

【0161】

イソブレン合成酵素、DXP経路、IDI、及び/又はMVA経路の核酸の核酸配列は、細菌、真菌、植物、藻類、又はシアノバクテリアから単離することができる。例示的な生物資源としては、例えば、酵母、例えばサッカロミセス(*Saccharomyces*)種(例えば、サッカロミセス・セレヴィシエ(*S. cerevisiae*)、バクテリア、例えば、エシェリキア(*Escherichia*)種(例えば、エシェリキア・コリ)、又はメタノサルシナ(*Methanosa rcina*)種(例えば、メタノサルシナ・マゼイ(*Methanosarcina mazei*))、植物、例えば葛又はポプラ(例えば、ウラジロハコヤナギ(*Populus alba*)又はウラジロハコヤナギ×トレムラCAC35696(*Populus alba* × *tremula CAC35696*))又はヤマナラシ(例えば、アメリカヤマナラシ(*Populus tremuloides*))が挙げられる。使用することのできるイソブレン合成酵素、IDI、及び/又はMVA経路ポリペプチドの資源例は、国際出願公開第2009/076676号、同第2010/003007号、同第2009/132220号、同第2010/031062号、同第2010/031068号、同第2010/031076号、同第2010/013077号、同第2010/031079号、同第2010/148150号、同第2010/078457号、及び同第2010/148256号にも記載される。

10

【0162】

いくつかの態様では、生物資源は酵母であり、例えば、酵母菌属、シゾサッカロミセス属、ピキア(*Pichia* sp.)又はカンジダ(*Candida* sp.)である。

20

【0163】

いくつかの態様では、宿主細胞は、バチルス・リケノフォルミス(*B. licheniformis*)又はバチルス・サブチリス(*B. subtilis*)などのバチルス株、シュードアルテロモナス・シトреア(*P. citrea*)などのパントエア(*Pantoea*)株、シュードモナス・アルカリゲネス(*P. alcaligenes*)などのシュードモナス属(*Pseudomonas*)株、ストレプトマイセス・リビダンス(*S. lividans*)又はストレプトマイセス・ルビギノーサス(*S. rubiginosus*)などのストレプトマイセス(*Streptomyces*)株、大腸菌(*E. coli*)などのエシェリキア(*Escherichia*)株、エンテロバクター株(*Enterobacter*)、ストレプトコッカス(*S. streptococcus*)株、又はメタノサルシナ・マゼイ(*Methanosarcina mazei*)などの古細菌株である。

30

【0164】

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

40

50

(*Virgibacillus*) にも当てはまる。

【0165】

いくつかの態様では、生物資源はグラム陽性細菌である。非限定的な例としては、ストレプトマイセス (*treptomyces*) 株 (例えば、ストレプトマイセス・リビダンス (*S. livingi*))、ストレプトマイセス・コエリカラ (*S. coelicolor*)、又はストレプトマイセス・グリセウス (*S. griseus*)) 及びバチルス株が挙げられる。いくつかの態様では、生物資源は、大腸菌 (*E. coli*) 又はシュードモナス属 (*Pseudomonas sp.*) などのグラム陰性細菌である。いくつかの態様では、生物資源は *L. acidophilus* (*L. acidophilus*) である。

【0166】

いくつかの態様では、微生物源は植物であり、例えば、マメ科 (Fabaceae)、例えばマメ亜科 (Faboideae) などの植物である。いくつかの態様では、生物資源はクズ、ポプラ (例えば、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) × トレムラ (*tremula*) C A C 3 5 6 9 6 など)、アスペン (例えば、アメリカヤマナラシ (*Populus tremuloides*))、又はヨーロッパナラ (*Quercus robur*) である。

10

【0167】

いくつかの態様では、微生物源は、藻類、例えば緑藻、紅藻、灰色藻、クロララクニオン藻、ミドリムシ目、クロミスタ、又は渦鞭毛藻類である。

【0168】

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

20

【0169】

5. ホスホケトラーゼ核酸及びポリペプチド

本発明のいくつかの態様では、本明細書に記載の任意の組成物又は方法に記載の組換え細胞は、ホスホケトラーゼポリペプチド又はホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする 1 つ以上の核酸を更に含む。いくつかの態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドは内在性ポリペプチドである。いくつかの態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、調節可能なように常時発現型プロモータに連結される。いくつかの態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、調節可能なように誘導型プロモータに連結される。いくつかの態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、調節可能なように高発現型プロモータに連結される。いくつかの態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする内在性の核酸を 1 つ以上 (例えば、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする内在性の核酸の 2、3、又は 4 つ以上のコピー) を使用する。特定の態様では、細胞は、野生型細胞と比べ、内在性のホスホケトラーゼポリペプチドが過剰発現するよう遺伝子操作される。いくつかの態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、調節可能なように低発現型プロモータに連結される。

30

【0170】

ホスホケトラーゼ酵素は、キシリロース 5 - リン酸のグリセルアルデヒド 3 - リン酸及びアセチルリン酸への変換、並びに / 又はフルクトース 6 - リン酸のエリトロース 4 - リン酸及びアセチルリン酸への変換を触媒する。特定の実施形態では、ホスホケトラーゼポリペプチドは、セドヘプツロース - 7 - リン酸の生成物 (例えば、リボース - 5 - リン酸) 及びアセチルリン酸への変換を触媒する。したがって、理論に束縛されるものではないが、本明細書に記載のホスホケトラーゼの発現の結果として、炭素源から生成されるアセチルリン酸の量は増加し得る。このアセチルリン酸をアセチル CoA へと変換させ、更にこれをを利用して、MVA 経路に関係する酵素活性により、メバロン酸及び / 又はイソブレンを生成させることができる。したがって、炭素源から生成されるこれらの化合物の量は増加し得る。特定の実施形態では、ホスホケトラーゼ酵素は、キシリロース 5 - リン酸の

40

50

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

10

【 0 1 7 1 】

適宜に、特定の実施形態では、本明細書に記載の任意の方法に記載の組換え細胞は、ホスホケトライゼポリペプチド又はホスホケトライゼ活性を有するポリペプチドをコードする 1 つ以上の核酸を更に含む。いくつかの態様では、ホスホケトライゼポリペプチドは内在性ポリペプチドである。いくつかの態様では、ホスホケトライゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、調節可能なように常時発現型プロモータに連結される。いくつかの態様では、ホスホケトライゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、調節可能なように誘導型プロモータに連結される。いくつかの態様では、ホスホケトライゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、調節可能なように高発現型プロモータに連結される。いくつかの態様では、ホスホケトライゼポリペプチドをコードする内在性の核酸を 1 つ以上（例えば、ホスホケトライゼポリペプチドをコードする内在性の核酸の 2、3、又は 4 つ以上のコピー）を使用する。特定の態様では、細胞は、野生型細胞と比べ、内在性のホスホケトライゼポリペプチドが過剰発現するよう遺伝子操作される。いくつかの態様では、ホスホケトライゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、調節可能なように低発現型プロモータに連結される。

20

【 0 1 7 2 】

ホスホケトライゼの核酸の例としては、ホスホケトライゼポリペプチドの活性を少なくとも 1 つ有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、又はポリペプチド融合物をコードする核酸が挙げられる。ホスホケトライゼのポリペプチド及び核酸の例としては、本明細書に記載の任意の生物資源から天然に生じるポリペプチド及び核酸、並びに本明細書に記載の任意の生物資源から誘導されるポリペプチド変異体及び核酸変異体が挙げられる。いくつかの態様では、ホスホケトライゼをコードする核酸は、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*)、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・パラプランタルム (*Lactobacillus paraplantarum*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス (*Bifidobacterium animalis*)、ビフィドバクテリウム・ブレビ (*Bifidobacterium breve*)、エンテロコッカス・ガリナラム (*Enterococcus gallinarum*)、ガードネレラ・バギナリス (*Gardnerella vaginalis*)、フェリモナス・バレアリカ (*Ferrimonas balearica*)、ムチラギニバクター・パルディス (*Mucilaginibacter paludis*)、ノストック・パンクチホルム (*Nostoc punctiforme*)、ノストック・パンクチホルム (*Nostoc punctiforme*) P C C 7 3 1 0 2、パントエア (*Pantoea*)、ペドバクター・サルタンス (*Pedobacter saltans*)、ラーネラ・アクアティリス (*Rahnella aquatilis*)、ロードシュードモナス・パルストリス (*Rhodopseudomonas palustris*)、ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、ストレプトマイセス・アベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*)、ノカルディオプシス・ダッソンビレイ (*Nocardiopsis dassonvillei*)、及び / 又はサーモビフィダ・フスカ (*Thermobifida fusca*) 由来である。本明細書において使用することができるホスホケトライゼ酵素の更なる例は、米国特許第 7,785,858 号及び国際出願公開第 2011/159853 号に開示されており、これらの特許文献は参照により

30

40

50

本明細書に援用される。

【0173】

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

【0174】

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

【0175】

本明細書に記載の任意の一実施形態では、組換え細胞は、次のリボース-5-リン酸イソメラーゼ(rpiA及び/又はrpiB)、D-リブロース-5-ホスフェート3-エピメラーゼ(rpe)、トランスケトラーゼ(tktA及び/又はtktB)、トランスアルドラーーゼB(talB)、ホスフェートアセチルトランスフェラーゼ(pta及び/又はeutD)からなる群から選択される遺伝子のうちの1種以上の活性を増加させるよう更に遺伝子操作を施すことができる。別の実施形態では、組換え細胞は、次の、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(zwf)、6-ホスホフルクトキナーゼ-1(pfkA及び/又はpfkB)、フルクトースビスリン酸アルドラーーゼ(fba、fbaA、fbaB、及び/又はfbaC)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(gapA及び/又はgapB)、酢酸キナーゼ(ackA)、クエン酸シンターゼ(gltA)、EI(ptsI)、EIICBG^{1c}(ptsG)、EIICAG^{1c}(crr)、及び/又はHPr(ptsH)といった遺伝子のうち、1つ以上の遺伝子の活性を減少させるよう更に遺伝子操作を施すことができる。

【0176】

グリセルアルデヒド3-リン酸を包含する経路

グリセルアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(gapA及び/又はgapB)は、解糖に重要な酵素であり、グリセルアルデヒド3-ホスフェートの1,3-ビホスホ-D-グリセリン酸への変換を触媒する(Branlant G. and Branlant C. 1985. Eur. J. Biochem. 150: 61~66)。

【0177】

特定の態様では、本明細書で開示されるモノリン酸デカルボキシラーゼ及び/又はイソペンテニルキナーゼポリペプチドをコードする核酸を1種以上発現した組換え細胞は、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つ以上の核酸を更に含む。ホスホケトラーゼ酵素を炭素に直接作用させるために、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼの発現を調節(例えば、酵素活性を低下させるなど)して、より多量の炭素をフルクトース6-リン酸及びキシリロース5-リン酸へと変換させ、以降に続くイソブレンの生産量を増加させることもできる。グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼの活性を低下させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して任意の量で低下させることができる。場合によっては、酵素活性の低下は、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%

10

20

30

40

50

、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%低下する。いくつかの態様では、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼは、内在性グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼの活性を減少させることにより調節される。このような調節は、内在性グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータを常時低発現型合成プロモータにより置き換えることで実施できる。グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を欠失させることもできる。グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、同様の反応を触媒するもののNADPHよりはNADHを生産するバチルス(*Bacillus*)の酵素と置き換えることもできる。グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼの活性を減少させることで、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼの発現を減少させていない細胞と比較して、より多量にメバロン酸依存性生合成経路に炭素を取り込ませることができる。本発明の任意の態様では、本明細書において、本明細書で開示される通りのモノリン酸デカルボキシラーゼ及び／又はイソペンテニルキナーゼポリペプチドをコードする発現した1つ以上の核酸を含み、更にグリセルアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(gapA及び／又はgapB)の活性を低下させるよう遺伝子操作された組み換え細胞が提供される。グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼイソ酵素の活性を調節(例えば、減少)させることも本明細書において企図される。本発明の任意の態様では、本明細書において、本明細書で開示される通りのモノリン酸デカルボキシラーゼ及び／又はイソペンテニルキナーゼポリペプチドをコードする異種発現した1つ以上の核酸を含み、更にグリセルアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(gapA及び／又はgapB)イソ酵素の活性を低下させるよう遺伝子操作された組み換え細胞が提供される。10
20

【0178】

a. エントナー・ドウドロフ経路に関する経路

エントナー・ドウドロフ(ED)経路は、エムデン・マイヤーホフ・パルナス(EMP-解糖)経路とは異なる経路である。大腸菌(*E. coli*)などの一部の生物がED経路及びEMP経路の両方を内包するのに対し、その他の生物はいずれか1つの経路のみを有する。バチルス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)は、EMP経路のみを有するのに対し、ザイモモナス・モビリス(*Zymomonas mobilis*)はED経路のみを有する(Peekh aus and Conway. 1998. J. Bact. 180: 3495~3502; Stulke and Hillen. 2000. Annu. Rev. Microbiol. 51: 849~880; Dawes et al. 1966. Biochem. J. 98: 795~803)。フルクトースニリン酸アルドラーーゼ(fba、fbaA、fbaB、及び／又はfbaC)はエントナー・ドウドロフ経路と相互作用し、フルクトース1,6~2リン酸のジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)及びグリセルアルデヒド3-リン酸(GAP)への変換を可逆的に触媒する(Baldwin S. A., et al., Biochem. J. (1978) 169(3): 633~41)。30

【0179】

ホスホグルコン酸デヒドラターゼ(edd)は、6-ホスホ-D-グルコネートから一分子のH₂Oを除去して2-デヒドロ-3-デオキシ-D-グルコネート6-リン酸を生成するのに対し、2-ケト-3-デオキシグルコネート6-リン酸アルドラーーゼ(edd)はアルドールの開裂を触媒する(Egan et al. 1992. J. Bact. 174: 4638~4646)。2つの遺伝子はオペロンの関係である。40

【0180】

ホスホケトラーゼ経路に指向する代謝経路をED経路に迂回させることもできる。ED経路に取り込まれる代謝産物が損失することを回避するため、ホスホグルコン酸デヒドラターゼ遺伝子(例えば、内在性ホスホグルコン酸デヒドラターゼ遺伝子)及び／又は2-ケト-3-デオキシグルコナーゼ6-リン酸アルドラーーゼ遺伝子(例えば、内在性2-ケト-3-デオキシグルコネート6-リン酸アルドラーーゼ遺伝子)活性を減弱させる。1つの手法としては、ホスホグルコン酸デヒドラターゼ(edd)及び／又は2-ケト-3-デオキシグルコネート6-リン酸アルドラーーゼ(edd)を欠失させることで減弱を行う50

ことができる。この欠失は、クロラムフェニコール又はカナマイシンカセットにより片方又はいずれもの遺伝子を置き換え、その後カセットを除去することで導入される。これらの酵素活性を存在させずとも、ホスホケトライゼ酵素によってより多くの炭素を取り込むことができ、ひいてはイソブレンの収率を増加させることができる。

【0181】

ホスホグルコン酸デヒドラターゼ (e d d) 及び / 又は 2 - ケト - 3 - デオキシグルコネート 6 - リン酸アルドラーーゼ (e d a) の活性は、酵素に関する他の分子操作により減少させることもできる。酵素活性を低下させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して任意の量で低下させることができる。一部の例では、酵素活性を、少なくとも約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % 低下させる。

10

【0182】

一部の場合では、内在性ホスホグルコン酸デヒドラターゼ遺伝子及び / 又は内在性 2 - ケト - 3 - デオキシグルコネート 6 - リン酸アルドラーーゼ遺伝子の活性を減弱させることにより、内在性ホスホグルコン酸デヒドラターゼ遺伝子及び / 又は内在性酢酸キナーゼ 2 - ケト - 3 - デオキシグルコネート 6 - リン酸アルドラーーゼ遺伝子の発現を減弱させていない細胞と比較して、多量の炭素がメバロン酸依存性生合成経路に取り込まれることになる。

20

【0183】

b. ペントースリン酸経路の酸化経路に関する経路

大腸菌 (*E. coli*) は、ペントースリン酸経路を使用してヘキソース及びペントースを分解し、各種代謝経路に関する中間体を細胞に提供する。この経路は、NADPH の主要な生成経路でもある。ペントースリン酸経路は、酸化経路 (グルコース 6 - リン酸 1 - デヒドロゲナーゼ (z w f)、6 - ホスホグルコノラクトナーゼ (p g l) 又は 6 - ホスホグルコネートデヒドロゲナーゼ (g n d) などの酵素による) 及び非酸化経路 (トランスケトラーーゼ (t k t A)、トランスアルドラーーゼ (t a l A 又は t a l B)、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ及び (又は) リボース - 5 - リン酸エピメラーゼなどの酵素による) から構成される (Spranger. 1995. Arch. Microbiol. 164 : 324 ~ 330)。

30

【0184】

ホスホケトライゼ酵素に炭素を直接作用させる目的で、ペントースリン酸経路の非酸化的経路 (トランスケトラーーゼ、トランスアルドラーーゼ、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ、及び (又は) リボース - 5 - リン酸エピメラーゼ) の発現を調節して (例えば、酵素活性を上昇させる)、より多くの炭素をフルクトース 6 - ホスフェート及びキシリロース 5 - ホスフェートとして取り込ませて、最終的なイソブレンの生産を増加させることができる。トランスケトラーーゼ、トランスアルドラーーゼ、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ及び (又は) リボース - 5 - リン酸エピメラーゼ活性を増加させることで、活性を操作しなかった場合と比較して比活性又は総活性を任意の量で増加させることができる。一部の例では、酵素活性は少なくとも約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % 上昇する。いくつかの態様では、トランスケトラーーゼ、トランスアルドラーーゼ、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ及び (又は) リボース - 5 - リン酸エピメラーゼの活性は、内在性トランスケトラーーゼ、トランスアルドラーーゼ、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ及び (又は) リボース - 5 - リン酸エピメラーゼの活性を増強させることにより調節される。このような上昇は、内在性トランスケトラーーゼ、トランスアルドラーーゼ、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ及び (又は) リボース - 5 - リン酸エピメラーゼ遺伝子のプロモータを常時高発現型の合成

40

50

プロモータにより置き換えることで得られる。トランスケトラーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロース-5-リン酸-エピメラーゼ及び(又は)リボース-5-リン酸エピメラーゼをコードする遺伝子を、プラスミド上の適切なプロモータの後にクローン化させてもよい。トランスケトラーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロース-5-リン酸-エピメラーゼ及び(又は)リボース-5-リン酸エピメラーゼの活性を増加させることにより、トランスケトラーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロース-5-リン酸-エピメラーゼ及び(又は)リボース-5-リン酸エピメラーゼの発現を増加させていない細胞と比較して大量の炭素をメバロン酸依存型の生合成経路に取り込ませることができる。

【0185】

c. ホスホフルクトキナーゼに関する経路

10

ホスホフルクトキナーゼは、解糖系でフルクトース6-リン酸のリン酸化を触媒する重要な酵素である。大腸菌(*E. coli*)はpfkA及びpfkBによりコードされる2種のイソ酵素を有する。細胞におけるホスホフルクトキナーゼ活性の大部分はpfkAによるものである(Kotlarz et al. 1975, Biochim. Biophys. Acta, 381: 257~268)。

【0186】

ホスホケトラーゼ酵素を炭素に直接作用させるために、ホスホフルクトキナーゼの発現を調節(例えば、酵素活性を低下させるなど)して、より多量の炭素をフルクトース6-リン酸及びキシリロース5-リン酸へと変換させ、最終的なイソブレンの生産量を増加させることもできる。ホスホフルクトキナーゼ活性を低下させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して任意の量で低下させることができる。場合によつては、酵素活性の低減は、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の低減である。いくつかの態様では、内在性ホスホフルクトキナーゼの活性を低下させることにより、ホスホフルクトキナーゼの活性を調節する。このような調節は、内在性ホスホフルクトキナーゼ遺伝子プロモータを常時低発現型合成プロモータと置き換えることにより行うことができる。ホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子を欠失させてもよい。ホスホフルクトキナーゼの活性を低下させることで、メバロン酸依存性の生合成経路への炭素の取り込みを、ホスホフルクトキナーゼの発現を低下させていない細胞と比較して増加させることができる。

20

【0187】

6. その他の宿主細胞変異

本発明は、MVA経路に取り込まれる炭素量を増大させる追加の宿主細胞変異も企図する。炭素取り込み量を増加させることにより、イソブレン生産量を増加させることができる。本明細書に記載される通りのアセトアセチル-CoAシンターゼを含む組換え細胞には、メバロン酸生産に取り込まれる炭素が増加するよう遺伝子操作を施すこともでき、ここで、(a)クエン酸シンターゼ、(b)ホスホトランスクオニンアセチラーゼ；(c)酢酸キナーゼ；(d)乳酸デヒドロゲナーゼ；(e)NADP依存性リンゴ酸酵素、及び；(f)ピルビン酸デヒドロゲナーゼ；(g)6-ホスホグルコノラクトナーゼ；(h)ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ；(i)マグネシウム欠乏時のRssB活性阻害タンパク質；(j)多剤排出ポンプ_{acrAB-TolC}の_{acrA}成分；並びに(k)フマル酸還元及び硝酸還元sRNA(FNR)、からなる群の1種以上の酵素の活性が調節される。

30

【0188】

a. クエン酸合成酵素による経路

クエン酸シンターゼは、オキサロ酢酸とアセチルCoAを縮合させることによるクエン酸(トリカルボン酸(TCA)サイクルの代謝生成物)の生成を触媒する(Ner, S. et al. 1983. Biochemistry 22, : 5243~5249; Bayana, V. and Duckworth, H. 1984. Biochemistry

40

50

y 23 : 2900 ~ 2905)。大腸菌 (E. coli) では、gltA によりコードされたこの酵素は、二量体サブユニットからなる三量体様の挙動を示す。六量体の形成により、酵素は NADH によりアロステリックに制御されるようになる。この酵素は、これまでに広く研究されている (Wiegand, G., and Remington, S. 1986. Annual Rev. Biophysics Biophys. Chem. 15: 97 ~ 117; Duckworth et al. 1987. Biochem Soc Symp. 54: 83 ~ 92; Stockell, D. et al. 2003. J. Biol. Chem. 278: 35435 ~ 43; Maurus, R. et al. 2003. Biochemistry. 42: 5555 ~ 5565)。NADH によるアロステリック阻害を回避するにあたって、これまでに、バチルス・サブチリス (Bacillus subtilis) NADH 非感受性クエン酸合成酵素による置き換え、又はこの酵素の添加が検討されている (Underwood et al. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1071 ~ 1081; Sanchez et al. 2005. Met. Eng. 7: 229 ~ 239)。

【0189】

クエン酸合成酵素による触媒反応は、メバロン酸経路の第一工程を触媒し、同様にアセチル CoA を基質として使用するチオラーゼと直接的に競合する (Hedlett et al. 2002. J. Bact. 184: 2116 ~ 2122)。したがって、当業者は、クエン酸合成酵素の発現を調節して (例えば、酵素活性を減少させて)、より多量の炭素がメバロン酸経路に取り込まれるようにすることで、イソプレンの最終的な生産量を増加させることができる。クエン酸合成酵素活性を低下させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して任意の量で低下させることができる。一部の例では、酵素活性を、少なくとも約 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は 99% 低下させる。いくつかの態様では、クエン酸シンターゼに関係する内在性遺伝子の活性を減少させることにより、クエン酸シンターゼの活性を調節する。この調節は、NADH 非感受性クエン酸合成酵素をコードする導入遺伝子により、あるいはバチルス・スブチリス (Bacillus subtilis) から誘導した NADH 非感受性クエン酸合成酵素をコードする導入遺伝子により、内在性クエン酸合成酵素遺伝子の染色体を置換することで実施できる。クエン酸シンターゼの活性は、内在性クエン酸シンターゼ遺伝子のプロモータを、常時低発現型の合成プロモータと置き換えることによっても調節 (例えば、低下させる) できる。クエン酸合成酵素の活性を低下させることで、メバロン酸依存性の生合成経路への炭素の取り込みを、クエン酸合成酵素の発現を低下させていない微生物と比較して増加させることができる。本明細書において提供される、本発明の任意の態様では、組換え細胞は、本明細書で開示されるモノリン酸デカルボキシラーゼ及び / 又はイソペンテニルキナーゼポリペプチドをコードする発現される核酸を 1 つ以上含み、かつクエン酸合成酵素 (gltA) の活性が減少するよう更に遺伝子操作されている。クエン酸シンターゼイソ酵素の活性の調節 (例えば、低下) も本明細書において企図される。本明細書において提供される、本発明の任意の態様では、組換え細胞は、本明細書で開示されるモノリン酸デカルボキシラーゼ及び / 又はイソペンテニルキナーゼポリペプチドをコードする 1 種以上の発現される核酸を含み、かつクエン酸合成酵素イソ酵素の活性が減少するよう更に遺伝子操作されている。

【0190】

b. ホスホトランスアセチラーゼ及び / 又は酢酸キナーゼの関与する経路

ホスホトランスアセチラーゼ ((大腸菌 (E. coli) において (i) pta (Shimizu et al. 1969. Biochim. Biophys. Acta 191: 550 ~ 558) 又は (ii) eutD (Bologna et al. 2010. J. of Microbiology. 48: 629 ~ 636) によりコードされている) は、アセチル - CoA 及びアセチルリン酸 (アセチル - P) の可逆的な変換を触媒するのに

10

20

30

40

50

対し、酢酸キナーゼ（大腸菌（*E. coli*）において`a c k A`によりコードされる）（K a k u d a , H . e t a l . 1 9 9 4 . J . B i o c h e m . 1 1 : 9 1 6 ~ 9 2 2 ）はアセチル - P を使用して酢酸を生成する。これらの遺伝子は、大腸菌においてオペロンとして転写され得る。これらの遺伝子は共に、ATP の放出により酢酸の異化を触媒する。したがって、当業者は、ホスホトランスマセチラーゼ遺伝子（例えば、内在性ホスホトランスマセチラーゼ遺伝子）及び／又は酢酸キナーゼ遺伝子（例えば、内在性酢酸キナーゼ遺伝子）の活性を減弱させて、利用可能なアセチル Co - A を増加させることができる。特定の実施形態では、増強は、染色体中の遺伝子上流に上方調節されたプロモータを配置するか、又はプラスミドにおいて適切なプロモータの下流に遺伝子のコピーを配置するかによりなすことができる。酢酸に変換されるアセチル Co A の量を減少させる目的で、酢酸キナーゼ遺伝子（例えば、内在性酢酸キナーゼ遺伝子）の活性を減少又は減弱させることができる。減弱させる手法の一つとしては、ホスホトランスマセチラーゼ（`p t a`）及び／又は酢酸キナーゼ（`a c k A`）の欠失が挙げられる。この欠失は、クロラムフェニコールカセットにより片方又はいずれもの遺伝子を置き換え、その後カセットを除去することで導入される。酢酸は多様な理由により大腸菌（*E. coli*）により生成される（W o l f e , A . 2 0 0 5 . M i c r o b . M o l . B i o l . R e v . 6 9 : 1 2 ~ 5 0 ）。理論に束縛されるものではないが、`a c k A - p t a` はアセチル - Co A を使用することから、これらの遺伝子を欠失させることで、炭素は酢酸に転用されず、イソブレンの収率が増加する。理論に束縛されるものではないが、`a c k A` を欠失させることにより、炭素の酢酸の生産への転用が減少し（`a c k A` はアセチル - Co A を利用するため）、イソブレンの収率が増加することになる。

10

20

30

【0191】

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

30

【0192】

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

【0193】

ホスホトランスマセチラーゼ（`p t a` 及び／又は `e u t D`）の活性は、酵素に関する他の分子的操作により増加させることができる。酵素活性を増加させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかつた場合と比較して任意の量で増加させることができる。一部の例では、酵素活性の増加は、少なくとも約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % だけ増加させることができる。一実施形態では、`p t a` の活性は、染色体上のプロモータ及び／又は `r b s` を変更することにより増加させることができ、又はプラスミドに発現させることにより増加させることができる。本明細書において提供される、本発明の任意の態様では、組換え細胞は、本明細書で開示されるモノリン酸デカルボキシラーゼ及び／又はイソペンテニルキナーゼポリペプチド

40

50

をコードする異種発現される核酸を1つ以上含み、かつホスホトランスマセチラーゼ(p t a 及び / 又は e u t D)の活性が増加するよう更に遺伝子操作されている。ホスホトランスマセチラーゼイソ酵素の活性を調節(例えば、増加)することも、本明細書において企図される。本明細書において提供される、本発明の任意の態様では、組換え細胞は、本明細書で開示されるモノリン酸デカルボキシラーゼ及び / 又はイソペンテニルキナーゼポリペプチドをコードする1種以上の発現される核酸を含み、かつホスホトランスマセチラーゼ(p t a 及び / 又は e u t D)の活性が増加するよう更に遺伝子操作されている。

【0194】

酢酸キナーゼ(a c k A)の活性は、酵素に関する他の分子的操作によっても低下させることができる。酵素活性を低下させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して任意の量で低下させることができる。一部の例では、酵素活性を、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%低下させる。本明細書において提供される、本発明の任意の態様では、組換え細胞は、本明細書で開示されるホスホケトラーゼポリペプチドをコードする異種発現される核酸を1つ以上含み、かつ酢酸キナーゼ(a c k A)の活性が減少するよう更に遺伝子操作されている。酢酸キナーゼイソ酵素の活性の調節(例えば、低下)も本明細書において企図される。本明細書において提供される、本発明の任意の態様では、組換え細胞は、本明細書で開示されるモノリン酸デカルボキシラーゼ及び / 又はイソペンテニルキナーゼポリペプチドをコードする発現される核酸を1つ以上含み、かつ酢酸キナーゼイソ酵素の活性が減少するよう更に遺伝子操作されている。

10

20

20

【0195】

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

【0196】

c . 乳酸デヒドロゲナーゼを含む経路

大腸菌(E. coli)では、D-乳酸は、乳酸デヒドロゲナーゼ(l d h A によりコード)により、ピルビン酸から生成される(B u n c h , P . e t a l . 1 9 9 7 . M i c r o b i o l . 1 4 3 : 1 8 7 ~ 1 9 5)。乳酸の生成はNADHの酸化によりなされるため、乳酸は、酸素制限下で、かつ還元当量のすべてを収容できない場合に生成されることになる。したがって、乳酸の生成は、炭素消費の原因となり得る。そのため、当業者は、酵素の活性を低下させるなどにより、乳酸脱水素酵素の活性を調節して、イソブレン生産時の炭素の取り込みを改良することができる。

30

【0197】

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

40

【0198】

乳酸脱水素酵素の活性は、酵素に関するその他の分子操作により低下させることもで

50

きる。酵素活性を低下させることで、比活性又は総活性を、活性を操作しなかった場合と比較して任意の量で低下させることができる。一部の例では、酵素活性を、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%低下させる。

【0199】

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

10

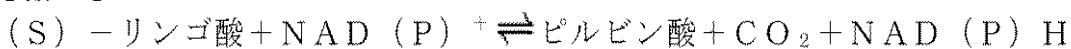
【0200】

d. リンゴ酸酵素の関与する経路

リンゴ酸酵素（大腸菌（*E. coli*）では`sfcA`及び`maeB`）は、次式に従いリンゴ酸のピルビン酸への変換を触媒する（NAD⁺又はNADP⁺を用いる）アナブレオティックな酵素である：

【0201】

【数1】



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

20

【0202】

NADP依存性リンゴ酸酵素(`maeB`) (*Iwikura, M. et al. 1979. J. Biochem. 85: 1355~1365*)を発現させ、1) TCAサイクルの炭素を、それ自体がメバロン酸経路の直接的な前駆体であるアセチル-CoAの直接的な前駆体であるピルビン酸に戻し、2) HMG-CoAレダクターゼによる反応に使用され得る過剰なNADPHを生産することにより(*Oh, MK et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 13175~13183; Bologni, F. et al. (2007) J. Bact. 189: 5937~5946*)、イソプレン収率の増加を助けることができる。

30

【0203】

そのため、リンゴ酸酵素の活性及び/又は発現を増加させるなどして調節することにより、下流でのイソプレン生産に関係する開始基質（ピルビン酸又はアセチル-CoA）がより多く得られる。NADP依存性のリンゴ酸酵素遺伝子は、内在性遺伝子であってよい。非限定的な手法の1つとしては、NADP依存性のリンゴ酸酵素の内在性遺伝子プロモータを、常時発現型の合成発現プロモータにより置き換えるというものが挙げられる。酵素活性を増加させる手法のその他の非限定例としては、NADP依存性のリンゴ酸酵素ポリペプチドをコードする1つ以上の異種核酸を用いるものが挙げられる。当業者は、容易に利用可能な分子生物学的手技を行い、発酵又は培養する際に、`maeB` RNAの発現をモニターすることができる。

40

【0204】

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

【0205】

ピルビン酸生成量の増加は、当業者に既知の所定のアッセイ法により測定できる。ピルビン酸量は、分子的な操作を行なっていない場合と比較して、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%

50

、 35%、 35%、 40%、 45%、 50%、 55%、 60%、 65%、 70%、 75%
、 80%、 85%、 90%、 95%、 96%、 97%、 98%、 又は 99% 増加する。

【0206】

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

10

【0207】

e. ピルビン酸脱水素酵素複合体の関与する経路

ピルビン酸のアセチル - C o A への脱炭酸を触媒するピルビン酸脱水素酵素複合体は、遺伝子 a c e E、a c e F、及び 1 p d A によりコードされるタンパク質から構成される。これらの遺伝子の転写は、複数の制御因子により制御される。したがって、当業者は、ピルビン酸脱水素酵素複合体の活性を調節して、アセチル - C o A を増加させることができる。調節により、ピルビン酸脱水素酵素複合体の活性及び / 又は発現（例えば、常時発現）を増加させることができる。このような調節は、異なる手法により、例えば、P L . 6 (a a t t c a t a t a a a a a c a t a c a g a t a a c c a t c t g c g g t g a t a a a t t a t c t c t g g c g g t g t g a c a t a a a t a c c a c t g g c g t g a t a c t g a g c a c a t c a g c a g c a c t g a c c a c a t g a a g g t g (配列番号 30) ラムダプロモータ、G e n B a n k N C _ 0 0 1 4 1 6) などの強力な常時発現型プロモータをオペロンの前に配置する)ことにより、あるいは常時発現型合成プロモータを 1 種以上用いることにより行うことができる。

20

【0208】

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

30

【0209】

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

40

【0210】

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

【0211】

f. 変異の組み合わせ

本開示の酵素及び / 又は酵素経路の何れかに関し、本開示の酵素及び / 又は酵素経路の

50

任意の組み合わせ（これらのうち2、3、4、5、又は6の組み合わせ）を調節する分子的操作は、明確に企図されることは理解される。組み合わせて詳細説明することを容易にする目的で、クエン酸シンターゼ（g l t A）はAと表記し、ホスホトランスマセチラーゼ（p t a B）はBと表記し、酢酸キナーゼ（a c k A）はCと表記し、乳酸デヒドロゲナーゼ（l d h A）はDと表記し、リンゴ酸酵素（s f c A又はm a e B）はEと表記し、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（a c e E、a c e F及び/又はl p d A）はFと表記し、6-ホスホグルコノラクトナーゼ（y b h E）はGと表記し、及びホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（p p l）はHと表記する。上記の通り、ピルビン酸脱炭酸酵素複合体のa c e E、a c e F、及び/又はl p d A酵素を単独で使用して、又は3つの酵素のうち2つを、又は3つ酵素のうち3つを使用して、ピルビン酸脱炭酸酵素の活性を增加させることができる。

10

【0212】

適宜、酵素A～Hのうちの任意の2つの組み合わせに関し、使用することのできる非限定的な組み合わせは：A B、A C、A D、A E、A F、A G、A H、B C、B D、B E、B F、B G、B H、C D、C E、C F、C G、C H、D E、D F、D G、D H、E F、E G、E H及びG Hである。酵素A～Hのうちの任意の3つの組み合わせに関し、使用することのできる非限定的な組み合わせは：A B C、A B D、A B E、A B F、A B G、A B H、B C D、B C E、B C F、B C G、B C H、C D E、C D F、C D G、C D H、D E F、D E H、A C D、A C E、A C F、A C G、A C H、A D E、A D F、A D G、A D H、A E F、A E G、A E H、B D E、B D F、B D G、B D H、B E F、B E G、B E H、C E F、C E G、C E H、C F G、C F H及びC G Hである。酵素A～Hのうちの任意の4つの組み合わせに関し、使用することのできる非限定的な組み合わせは：A B C D、A B C E、A B C F、A B C G、A B C H、A B D E、A B D F、A B D G、A B D H、A B E F、A B E G、A B E H、B C D E、B C D F、B C D G、B C D H、C D E F、C D E G、C D E H、A C D E、A C D F、A C D G、A C D H、A C E F、A C E G、A C E H、B C E F、B D E F、B G E F、B H E F、A D E Fである。酵素A～Hのうちの任意の5つの組み合わせに関し、使用することのできる非限定的な組み合わせは：A B C D E、A B C D F、A B C D G、A B C D H、A B D E F、A B D E G、A B D E H、B C D E F、B C D E G、B C D E H、A C D E F、A C D E G、A C E D H、A B C E F、A B C E G及びA B C E Hである。酵素A～Hのうちの任意の6つの組み合わせに関し、使用することのできる非限定的な組み合わせは：A B C D E F、A B C D E G、A B C D E H、B C D E F G、B C D E F H及びC D E F G Hである。酵素A～Hのうちの任意の7つの組み合わせに関し、使用することのできる非限定的な組み合わせは：A B C D E F G、A B C D E F H、B C D E F G Hである。他の態様では、全8つの酵素（A B C D E F G H）を組み合わせて使用できる。

20

【0213】

適宜に、本明細書に記載される通りの組換え微生物は、トリカルボン酸（TCA）サイクル活性の条件下で増殖しない微生物と比較して増加しているメバロン酸生産を達成することができ、ここで（a）クエン酸シンターゼ（b）ホスホトランスマセチラーゼ、（c）酢酸キナーゼ、（d）乳酸デヒドロゲナーゼ、（e）NADP依存性リンゴ酸酵素、並びに（f）ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、（g）6-ホスホグルコノラクトナーゼ、（h）ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、（i）マグネシウム欠乏時のRssB活性阻害タンパク質、（j）多剤排出ポンプacrAB-TolCのacrA成分、並びに（k）フマル酸還元及び硝酸還元sRNA（FNR）からなる群由来の1種以上の酵素の活性を調節することにより、組み換え微生物において、代謝される炭素が直接メバロン酸に取り込まれる。

30

【0214】

7. イソプレン生産の増加に関係するその他の制御分子及び因子
他の分子的操作を使用して、イソプレン生産に指向する炭素取り込みを増加させることができる。このような方法のうちの1つは、メバロン酸経路に合流する経路に対する負の

40

50

制御効果を減少させ、低下させるか、又は除去するものである。例えば、一部の場合では、遺伝子 a c e E F - 1 p d A はオペロンであり、 p d h R の上流に遺伝子を 4 つ有する。 p d h R は、このオペロンの転写に対する負の制御因子である。 p d h R は、ピルビン酸の非存在下で標的プロモータに結合し、転写を抑制する。この制御因子は同様の手法で n d h 及び c y o A B C D を制御する (Ogasaawara, H. et al. 2007. J. Bact. 189: 5534 ~ 5541)。一態様では、 p d h R 制御因子の欠失によりピルビン酸の供給が改良され、したがって別の下流 M V A 経路によるイソプレン生産が改良され得る（例えば、 M V K 、 P M e v D C 、 I P K 、及び / 又は I D I ）。

【 0 2 1 5 】

他の実施形態では、上記で得られる任意の株を更に遺伝子操作して、エントナー・ドウドロフ経路の活性を調節することもできる。ホスホグルコン酸デヒドラターゼ又はアルドラーゼをコードする遺伝子を減弱又は欠失させることができる。他の実施形態では、上記で得られる任意の株は、酢酸キナーゼ又はクエン酸シンターゼの活性を減少又は除去するよう遺伝子操作することもできる。他の実施形態では、得られる株のうち任意の株は、ホスホフルクトキナーゼの活性を減少又は除去するよう遺伝子操作することもできる。他の実施形態では、上記で得られる任意の株は、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼの活性を調節するよう遺伝子操作することもできる。グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼの活性は、活性を減少させることにより調節することができる。他の実施形態では、ペントースリン酸経路の非酸化経路の、例えば、トランスケトラーーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロース - 5 - リン酸 - エピメラーゼ及び（又は）リボース - 5 - リン酸エピメラーゼなどの酵素を過剰発現させることができる。

10

20

30

40

50

【 0 2 1 6 】

他の態様では、セドヘプツロース - 1 , 7 - ビスホスファターゼ / フルクトース - 1 , 6 - ビスホスフェートアルドラーゼ及びセドヘプツロース - 1 , 7 - ビスホスファターゼ / フルクトース - 1 , 6 - ビスホスフェートホスファターゼをコードする異種核酸を導入することにより、細胞内アセチル - リン酸濃度を増加させるよう宿主細胞を更に遺伝子操作することができる。特定の実施形態では、これらの分子操作を有する宿主細胞には、トランスアルドラーゼ (t a l B) 及びホスホフルクトキナーゼ (p f k A 及び / 又は p f k B) 遺伝子の減弱又は欠失を組み合わせることにより、エリトロース 4 - リン酸、ジヒドロキシアセトンリン酸、及びグリセルアルデヒド 3 - リン酸を、セドヘプツロース 7 - リン酸及びフルクトース 1 - リン酸へと迅速に変換させることができる。

【 0 2 1 7 】

他の態様では、イソプレンの生産を改良させるために、 P G L を欠損している微生物（各種大腸菌株など）に 6 - ホスホグルコノラクトナーゼ (P G L) を導入し、使用することができる。 P G L は、染色体への組み込み、又はプラスミドなどの染色体外のビヒクリルを用い、導入することができる。更に他の態様では、 P G L を発現している細胞（例えば、各種大腸菌 (E. coli) 株などの微生物）のゲノムから、 P G L を欠失させて、メバロニ酸及び / 又はイソプレンの生産量を増加させることもできる。他の態様では、 P G L のポリペプチドをコードする異種核酸は、内因的に P G L を発現していない細胞で発現させることができる。いくつかの態様では、 P G L を欠失させることで、 P G L を発現している微生物と比較して包括的に約 10 % 、 20 % 、 30 % 、 40 % 、 50 % 、 60 % 、 70 % 、 80 % 、 90 % 、又は 100 % ほど（これらの割合の間の任意の値も含む）、イソプレンの収率が高くなる。他の態様では、 P G L を欠失させることで、 P G L を発現している微生物と比較して包括的に約 10 % 、 20 % 、 30 % 、 40 % 、 50 % 、 60 % 、 70 % 、 80 % 、 90 % 、又は 100 % ほど（これらの割合の間の任意の値も含む）、イソプレンの瞬間的な収率が高くなる。他の態様では、 P G L を欠失させることで、 P G L を発現している微生物と比較して、包括的に約 10 % 、 20 % 、 30 % 、 40 % 、 50 % 、 60 % 、 70 % 、 80 % 、 90 % 、又は 100 % ほど（これらの割合の間の任意の値も含む）、細胞生産性指数が高くなる。他の態様では、 P G L を欠失させることで、 P G L を発現している微生物と比較して、包括的に約 10 % 、 20 % 、 30 % 、 40 % 、 50 % 、 60 % 、 70 % 、 80 % 、 90 % 、又は 100 % ほど（これらの割合の間の任意の値も含む）、

0%、70%、80%、90%、又は100%ほど（これらの割合の間の任意の値も含む）、容積生産量が高くなる。他の態様では、PGLを欠失させることで、PGLを発現している微生物と比較して、包括的に約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100%ほど（これらの割合の間の任意の値も含む）、最大比生産量が高くなる。いくつかの態様では、PGLを欠失させることで、PGLを発現している微生物と比較して、より長い期間、最大比生産量が維持されることになる。

【0218】

8. ベクター

本明細書に記載の任意の組成物及び方法には好適なベクターを使用することができる。例えば、好適なベクターを使用して、細胞において、イソプレン合成酵素、アセトアセチルco-Aシンターゼ、MVA経路酵素、DXP経路酵素、ホスホケトラーーゼ、及び／又はポリプレニルピロリン酸シンターゼをコードする遺伝子の1つ以上のコピーの発現を最適化することができる。いくつかの態様では、ベクターには選択マーカーを含有させる。選択可能なマーカーの例としては、これらに限定されるものではないが、抗生物質耐性核酸（例えば、カナマイシン、アンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、ヒグロマイシン、フェロマイシン、ブレオマイシン、ネオマイシン又はクロラムフェニコール）、及び／又は宿主細胞に栄養的な利点などの代謝的な利点を与える核酸が挙げられる。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素、アセトアセチルco-Aシンターゼ、MVA経路酵素、DXP経路酵素、ホスホケトラーーゼ、及び／又はポリプレニルピロリン酸シンターゼ核酸のうちの1つ以上のコピーが、選択マーカーは伴わずに宿主細胞のゲノムに組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0219】

本開示の実施例において特徴づけられ又は使用される任意の1つのベクターを使用することができる。

【0220】

9. 例示的な宿主細胞

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

【0221】

イソプレン生産を増加させるために本明細書に記載される任意の遺伝子を調節するために、遺伝子を異種発現させるのに使用することのできる任意の微生物又はこれらの子孫を使用することができる（例えば、クエン酸シンターゼ、ホスホトランスマセチラーゼ、酢酸キナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、リンゴ酸酵素、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、6-ホスホグルコノラクトナーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ及び／又はFNR）。同様に、細胞において、イソプレン合成酵素、アセトアセチルco-Aシンターゼ、MVA経路酵素、DXP経路酵素、ホスホケトラーーゼ、及び／又はポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする1つ以上の異種核酸を発現させるために、遺伝子を異種発現させるのに使用することのできる任意の微生物又はこれらの子孫を使用することができる。いくつかの態様では、イソプレン合成酵素をコードする1種以上の遺伝子を異種発現するために任意の微生物又はこれらの子孫を使用することができる（限定するものではないが、ラッカセイ（*A. hypogaea*）、ハッショウマメ（*M. pruriens*）、キマメ（*C. cajans*）、ダイズ（*G. max*）、ツルマメ（*G. soja*）、ミヤコグサ（*L. japonicus*）、タルウマゴヤシ（*M. truncatula*）、シトラス・レモン（*C. limon*）、シナモマム・テヌイパイル（*C. tenuipile*）、ビティス・ヴィニフェラ（*Vitis vinifera*）、フユナラ（フユナラ（*Q. petraea*））、ケルクス・アイレックス（*Q. ilex*）、ユーカリノキ（*E. globulus*）、及び／又はティーツリー（*M. alternifolia*）由来のイソプレン合成酵素遺伝子など）。上記の核酸又はポリペプチドのいずれかを発現させるために、グラム陽性

又はグラム陰性細菌を含む微生物細胞を使用することができる。いくつかの実施態様では、宿主細胞は、グラム陽性細菌である。非限定例としては、ストレプトミセス (*Streptomyces*) (例えば、ストレプトミセス・リビダンス (*S. lividans*)、ストレプトマイセス・セリカラー (*S. coelicolor*)、ストレプト・ルビギノーサス (*S. rubiginosus*)、又はストレプトマイセス・グリセウス (*S. griseus*))、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)、バチルス (*Bacillus*) (例えば、バチルス・リケノフォルミス (*B. licheniformis*) 又はバチルス・スブチリス (*B. subtilis*))、リステリア (*Listeria*) (例えば、リステリア・モノサイトジェネス (*L. monocytogenes*))、コリネバクテリア (*Corynebacteria*)、又はラクトバチルス (*Lactobacillus*) (例えば、ラクトバチルス (*L. spp.*)) の株が挙げられる。いくつかの実施態様では、微生物源はグラム陰性細菌である。非限定例としては、エシェリキア (*Escherichia*) (例えば、大腸菌 (*E. coli*))、シュードモナス (*Pseudomonas*) (例えば、シュードモナス・アルカリゲネス (*P. alcaligenes*))、パントエア (*Pantoea*) (例えば、パントエア・シトレア (*P. citrea*))、エンテロバクター (*Enterobacter*)、又はヘリコバクター (*Helicobacter*) (ヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*)) 株が挙げられる。具体的には、イソプレン合成酵素、アセトアセチルco-Aシンターゼ、MVA経路酵素、DXP経路酵素、ホスホケトライゼ、及び／又はポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする核酸の1種以上のコピーは、パントエア・シトレア (*P. citrea*)、バチルス・スブチリス (*B. subtilis*)、バチルス・リケニフォルミス (*B. licheniformis*)、バチルス・レンタス (*B. lentus*)、バチルス・ブレビス (*B. brevis*)、バチルス・ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*)、バチルス・アルカロフィルス (*B. alkalophilus*)、B. アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*)、バチルス・クラウシイ (*B. clausii*)、バチルス・ハロドュランス (*B. halodurans*)、バチルス・メガテリウム (*B. megaterium*)、バチルス・コアギュランス (*B. coagulans*)、バチルス・サーキュランス (*B. circulans*)、バチルス・ロータス (*B. lautus*)、バチルス・チューリングンシス (*B. thuringiensis*)、ストレプトマイセス・アルバス (*S. albus*)、ストレプトミセス・リビダンス (*S. lividans*)、ストレプトマイセス・セリカラー (*S. coelicolor*)、ストレプトマイセス・グリセウス (*S. griseus*)、シュードモナス種 (*Pseudomonas sp.*)、及びシュードモナス・アルカリゲネス (*P. alcaligenes*) 細胞のうちのいずれかにおいて発現させることができる。いくつかの態様では、宿主細胞は、ラクトバチルス・ラクチス (*Lactobacillus lactis*) 又はラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) などのラクトバチルス菌種 (*Lactobacillus spp.*) であり得る。

【0222】

例示的な宿主細胞としては、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 種 (例えば、サッカロミセス・セレヴィシエ (*S. cerevisiae*)) などの酵母、エシェリキア (*Escherichia*) 種 (例えば、大腸菌 (*E. coli*)) などの細菌、メタノサルシナ (*Methanosarcina*) 種 (例えば、メタノサルシナ・マゼイ (*Methanosarcina mazei*)) などの古細菌、クズ (*kudzu*) 又はポプラ (*poplar*) (例えば、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) 又はウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) × トレムラ (*tremula*) C A C 3 5 6 9 6) 又はヤマナラシ (*aspen*) (例えば、アメリカヤマナラシ (*Populus tremuloides*)) などの植物が挙げられる。

【0223】

本発明の組成物及び方法には、数多くの種類の嫌気生細胞を宿主細胞として使用することができる。本発明の一態様では、本明細書に記載の任意の組成物又は方法に関し記載される細胞は、絶対嫌気性細胞及びその子孫細胞である。絶対嫌気性菌は、典型的には、条件下に酸素が存在する場合には良好に増殖しない。絶対嫌気性菌が低濃度の酸素に対しある程度の耐性を示す場合には、少量の酸素が存在してもよいことは理解されるであろう。一態様では、イソプレンを生産するよう遺伝子操作した偏性嫌気性菌を、本明細書に記載のいずれかの方法及び／又は組成物のための宿主細胞として提供し、実質的に無酸素条件下で増殖させることができ、存在する酸素量は、嫌気性菌の増殖、維持、及び／又は発酵

10

20

30

40

50

に有害な量ではない。

【0224】

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

【0225】

宿主細胞は、糸状真菌細胞及びその子孫細胞であってもよい。（例えば、Berka & Barnett, Biotechnology Advances, (1989), 7(2):127~154を参照されたい）。いくつかの態様では、糸状菌細胞はトリコデルマ・ロンギプラキアタム(*Trichoderma longibrachiatum*)、トリコデルマ・ビリデ(*T. viride*)、トリコデルマ・コニンギ(*T. koningii*)、*T. harzianum*、ペニシリウム種(*Penicillium sp.*)、ヒュミコラ・インソレンス(*Humicola insolens*)、ヒュミコラ・ラヌギノーサ(*H. lanuginosa*)、ヒュミコラ・グリセア(*H. grisea*)、クリソスボリウム種(*Chrysosporium sp.*)、クリソスボリウム・ラックノウエンス(*C. lucknowense*)、グリオクラジウム種(*Gliocladium sp.*)、アスペルギルス(*A. sperrgillus sp.*)、例えば、アスペルギルス・オリザエ(*A. oryzae*)、アスペルギルス・ニガー(*A. niger*)、ショウユコウジカビ(*A. sojae*)、アスペルギルス・ジャポニクス(*A. japonicus*)、アスペルギルス・ニデュランス(*A. nidulans*)、又はアワモリコウジカビ(*A. awamori*)、フザリウム種(*Fusarium sp.*)、例えば、フザリウム・ロゼウム(*F. roseum*)、フザリウム・グラミナム(*F. graminum*)、フザリウム・セレアリス(*F. cerealis*)、フザリウム・オキシスポラム(*F. oxysporum*)、又はフザリウム・ベネナタム(*F. venenatum*)、ニューロスボラ種(*Neurospora sp.*)、例えば、ニューロスボラ・クラッサ(*N. crassa*)、ヒポクレア種(*Hypocrea sp.*)、ムコール種(*Mucor sp.*)、例えば、ムコール・ミエヘイ(*M. miehei*)、リソップス種(*Rhizopus sp.*)又はエメリセラ種(*Emericella sp.*)のいずれか由来のものであってよい。いくつかの態様では、真菌は、アスペルギルス・ニデュランス(*A. nidulans*)、アワモリコウジカビ(*A. awamori*)、アスペルギルス・オリザエ(*A. oryzae*)、アスペルギルス・アクレタス(*A. aculeatus*)、アスペルギルス・ニガー(*A. niger*)、アスペルギルス・ジャポニクス(*A. japonicus*)、トリコデルマ・リーゼイ(*T. reesei*)、トリコデルマ・ビリデ(*T. viride*)、フザリウム・オキシスポラム(*F. oxysporum*)、又はフザリウム・ソラニ(*F. solani*)である。特定の実施形態では、本明細書で使用するためのプラスミド又はプラスミド配列には、米国特許出願公開第2011/0045563号に記載のものが含まれる。

【0226】

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

【0227】

宿主細胞は、マメ(Fabaceae)亜科などのマメ科由来の植物など、植物種であってもよい。いくつかの態様では、宿主細胞は、クズ(kudzu)、ポプラ(poplar)(ウラジロハ

10

20

30

40

50

コヤナギ (*Populus alba*) × トレムラ (*tremula*) C A C 3 5 6 9 6などの)、ヤマナラシ (*aspen*) (アメリカヤマナラシ (*Populus tremuloides*)など)、又はヨーロッパナラ (*Quercus robur*) である。

【0228】

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

10

20

30

40

50

【0229】

大腸菌 (*E. coli*) 宿主細胞は、本明細書に記載の組成物及び方法において、1種以上のイソブレン合成酵素、アセトアセチルco-Aシンターゼ、MVA経路酵素、DXP経路酵素、ホスホケトラーゼ、及び/又はポリブレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドを発現させるために使用することができる。一態様では、宿主細胞は、イソブレンを生産することができ、イソブレン合成酵素、アセトアセチルco-Aシンターゼ、MVA経路酵素、DXP経路酵素、ホスホケトラーゼ、及び/又はポリブレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする1つ以上の核酸を発現する大腸菌 (*Escherichia coli*、*E. coli*) 株又はこれらの子孫の組み換え細胞である。大腸菌 (*E. coli*) 宿主細胞は、イソブレン合成酵素、アセトアセチルco-Aシンターゼ、MVA経路酵素、DXP経路酵素、ホスホケトラーゼ、及び/又はポリブレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする1つ以上の核酸の異種発現を欠く同種の細胞を上回る量、ピーク力価、及び細胞生産性でイソブレンを生産することができる。加えて、大腸菌 (*E. coli*) において異種発現される、イソブレン合成酵素、アセトアセチルco-Aシンターゼ、MVA経路酵素、DXP経路酵素、ホスホケトラーゼ、及び/又はポリブレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする1つ以上の核酸は染色体コピーであってよい(例えば、大腸菌 (*E. coli*) 染色体に組み込まれる)。他の態様では、大腸菌 (*E. coli*) 細胞は培養物である。

【0230】

他の態様では、宿主細胞は、限定するものではないが、ピキア種 (*Pichia spp.*)、カンジダ種 (*Candida spp.*)、ハンゼヌラ種 (*Hansenula spp.*)、クリベロミセス種 (*Kluyveromyces spp.*)、クリベロミセス種 (*Kluyveromyces spp.*)、又はシゾサッカロミセス種 (*Schizosaccharomyces spp.*)などの、サッカロミセス・セレヴィシエ (*S. cerevisiae*) 以外の酵母種であり得る。更に他の態様では、宿主細胞は、アルスロバクター種 (*Arthrobacter spp.*)、ザイモモナス種 (*Zymomonas spp.*)、ブレビバクテリウム種 (*Brevibacterium spp.*)、クロストリジウム種 (*Clostridium spp.*)、アエルコッカス種 (*Aerococcus spp.*)、バチルス種 (*Bacillus spp.*)、アクチノバチルス種 (*Actinobacillus spp.*) (限定するものではないが、アクチノバチルス・スクシノゲネス (*A. succinogens*)など)、カルボバクテリウム (種 *Carbobacterium spp.*)、コリネバクテリウム種 (*Corynebacterium spp.*)、エンテロコッカス種 (*Enterococcus spp.*)、エリジペロスリックス種 (*Erysipelothrix spp.*)、ゲメラ種 (*Gemella spp.*)、ゲオバチルス種 (*Geobacillus spp.*)、グロビカテラ種 (*Globicatella spp.*)、ラクトバチルス種 (*Lactobacillus sp*

p.)（限定するものではないが、ラクトバチルス・ラクチス（*L. lactis*）及びラクトバチルス・ラムノサス（*L. rhamnosus*）など）、ラクトコッカス種（*Lactococcus spp.*）、ロイコノストック種（*Leuconostoc spp.*）、ペディオコッカス種（*Pediococcus spp.*）、ストレプトコッカス種（*Streptococcus spp.*）、テトラゲノコッカス種（*Tetragenococcus spp.*）、アクチノバチルス種（*Actinobacillus spp.*）、又はバゴコッカス種（*Vagococcus spp.*）が挙げられるがこれらに限定されない細菌種であり得る。他の態様では、発酵微生物にはリゾpus（*Rhizopus spp.*）が挙げられるが、これらに限定されない真菌であり得る。

【0231】

他の態様では、宿主細胞は、アエルコッカス（*Aerococcus*）、バチルス（*Bacillus*）、カルノバクテリウム（*Carbobacterium*）、エンテロコッカス（*Enterococcus spp.*）、エリジペロスリックス（*Erysipelothrix*）、ゲメラ（*Gemella*）、グロビカテラ（*Globicatella*）、ラクトバチルス（*Lactobacillus*）、ラクトコッカス（*Lactococcus*）、ロイコノストック（*Leuconostoc*）、ペディオコッカス（*Pediococcus*）、ストレプトコッカス（*Streptococcus*）、テトラゲノコッカス（*Tetragenococcus*）、及びバゴコッカス（*Vagococcus spp.*）属のものなどの乳酸菌であり得る。例えば、置き換えることのできるラクトバチルス（*Lactobacillus*）属の他の細菌としては、ラクトバチルス・ヘルベティカス（*L. helveticus*）、ラクトバチルス・デルブリュッキ（*L. delbrueckii*）、ラクトバチルス・カゼイ（*L. casei*）、ラクトバチルス・アシドフィラス（*L. acidophilus*）、ラクトバチルス・アミロボラス（*L. amylovorus*）、ラクトバチルス・ライヒマニ（*L. leichmanii*）又はラクトバチルス・ブルガリクス（*L. bulgaricus*）、ラクトバチルス・アミロボラス（*L. amylovorus*）、及びラクトバチルス・ペントーサス（*L. pentosus*）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0232】

使用することのできる他の代表的な宿主細胞は、米国特許出願公開第2009/0203102号、国際公開第2009/076676号、同第2010/003007号、同第2009/132220号、同第2010/031062号、同第2010/031068号、同第2010/031076号、同第2010/031077号、及び国同第2010/031079号に記載されている。

【0233】

B. イソプレンの生産方法

本明細書では、本明細書に記載される通りの任意のイソプレンを使用して、本明細書に開示されるものなどの条件下で、本明細書に記載のいずれかの組換え細胞を培養することによる、イソプレンの生産方法が提供される。一態様では、イソプレンは、培養培地中で、(a)イソプレン合成酵素ポリペプチド、ここで、イソプレン合成酵素ポリペプチドは異種核酸によりコードされる、並びに(b)1種以上のメバロン酸(MVA)経路ポリペプチド、をコードする1つ以上の核酸を発現する組換え細胞により生産され得る。一態様では、チオラーゼ、HMG-CoAレダクターゼ、下流MVA経路のポリペプチド、及びイソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする1つ以上の異種核酸を使用することができる。別の態様では、チオラーゼ、HMG-CoAレダクターゼ及びHMG-CoA合成酵素、下流MVA経路のポリペプチド、並びにイソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする1つ以上の異種核酸を含む組み換え細胞を培養することによりイソプレンを生産することができる。更に別の態様では、上流MVA経路の1つ以上のポリペプチド、下流MVA経路の1つ以上のポリペプチド、及び/又はDXP経路の1つ以上のポリペプチドをコードする1つ以上の異種核酸を使用することができる。いくつかの態様では、本明細書に記載の組換え細胞は、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする1つ以上の異種核酸及びMVA経路のポリペプチドを1種以上含まない細胞と比較して、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、95%、又は100%（これらの割合間における任意の値を包含する）向上されたイソプレン生産を示す。イソプレンは、本開示の任意の方法に従い、本

10

20

30

40

50

明細書に記載の任意の細胞から生産することができる。本明細書に記載される通りの任意のイソプレン合成酵素を使用してイソプレンを生産させる目的で、任意の細胞を使用することができる。

【0234】

細胞には、上記の下流MVA経路ポリペプチド（例えば、MVK、PMK、MVD及び／又はIDH）、上記の上流MVA経路ポリペプチドのいずれか（例えば、チオラーゼ、アセトアセチル-CoAシンターゼ、HMG-CoA還元酵素、及び／又はHMG-CoAシンターゼ）及び／又は上記のイソプレン合成酵素ポリペプチドのいずれか（例えば、ラッカセイ（*A. hypogaea*）イソプレン合成酵素）をコードする1つ以上の核酸分子を更に発現させることができる。いくつかの態様では、組換え（例えば、細菌）細胞は、本明細書に記載の任意の細胞であってよい。本明細書に記載の任意のイソプレン合成酵素又はこれらの変異体、本明細書に記載の任意の細菌株、本明細書に記載の任意のプロモータ、及び／又は本明細書に記載の任意のベクターを使用して、イソプレンを生産させることもできる。いくつかの態様では、イソプレンの生産方法は更に、イソプレンを回収する工程を含む。

10

【0235】

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

20

【0236】

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

30

【0237】

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

40

50

は約400～約1,000ng/g_{wcm}/hである。

【0238】

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

【0239】

いくつかの態様では、培養において細胞により生産されるイソブレン(本明細書に記載のいずれかの組換え細胞など)は、少なくとも約1、2、5、10、15、20、又は25体積%の発酵時排出気体を含む。いくつかの態様では、イソブレンは、排出気体の体積の約1～約25%を構成し、例えば、約5～約15%、約15～約25%、約10～約20%又は約1～約10%を構成する。
20

【0240】

いくつかの実施態様では、イソブレン生産条件下で細胞を培養培地で培養する。いくつかの実施態様では、培養時に細胞が生産するイソブレン量は、1時間につき、細胞の湿潤重量1g当たり、約1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、又は5,000ナノモル(nmol/gwcm/hr)以上である。いくつかの実施態様では、イソブレンの量は、約2～約5,000nmol/gwcm/hr、例えば、約2～約100nmol/gwcm/hr、約100～約500nmol/gwcm/hr、約500～約1,000nmol/gwcm/hr、約1,000～約2,000nmol/gwcm/hr、又は約2,000～約5,000nmol/gwcm/hrである。nmol/gwcm/hr単位のイソブレンの量は、米国特許第5,849,970号に開示の通りに測定できる。例えば、ヘッドスペース2mLに含まれるイソブレン(例えば、密封したバイアル瓶で、32、200rpmで振盪せながら約3時間培養した2mL培養物などの培養物から、ヘッドスペースに放出されたイソブレン)は、n-オクタン/porasil Cカラム(Alltech Associates, Inc.(Deerfield, IL))を取り付け、RGD2酸化水銀還元ガス検出器(Trace Analytical(Menlo Park, CA))に連結させた等温操作系(85)などの、一般的なガスクロマトグラフィー系を用い測定する(例えば、Greenberg et al., Atmos. Environ. 27A: 2689～2692, 1993; Silver et al., Plant Physiol. 97: 1588～1591, 1991を参照されたい)。標準イソブレン濃度をもとにした検量線により、ガスクロマトグラフィーの面積単位をイソブレン量(nmol)に変換する。いくつかの実施態様では、細胞の湿潤重量(g)当たりの値は、細胞培養物サンプルのA₆₀₀値を得、次に、A₆₀₀値が既知である細胞培養物の湿潤重量に関する検量線をもとにA₆₀₀値を細胞重量(g)に変換することで算出する。いくつかの実施態様では、細胞重量(g)は、プロス1L(細胞培地及び細胞を含む)のA₆₀₀値が1である場合、湿潤細胞が1g含まれているものと仮定し、概算する。この値を、培養物をインキュベートした時間数(例えば3時間)で除算する。
30
40
50

【0241】

いくつかの実施態様では、培養時に細胞が生産するイソプレン量は、1時間につき、細胞の湿潤重量1g当たり、約1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、又は100,000ng(gwcm/h)以上である。いくつかの実施態様では、イソプレン量は、約2～約5,000ng/gwcm/h、例えば、約2～約100ng/gwcm/h、約100～約500ng/gwcm/h、約500～約1,000ng/gwcm/h、約1,000～約2,000ng/gwcm/h、又は約2,000～約5,000ng/gwcm/hである。イソプレン量(inng/gwcm/h)は、上記のイソプレン生産量(nmol/gwcm/hr)に68.1を乗じることで算出できる(以下の式5に記載の通り)。

【0242】

いくつかの実施態様では、細胞は、培養時に累積力価(総量)約1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、50,000、100,000mg/L(プロス1L当たりの生産量mg)。ここで、プロス体積には、細胞体積及び細胞培地の体積を含む)以上のイソプレンを生産する。いくつかの実施態様では、イソプレン量は約2～約5,000mg/L、例えば、約2～約100mg/L、約100～約500mg/L、約500～約1,000mg/L、約1,000～約2,000mg/L、又は約2,000～約5,000mg/Lである。振盪フラスコ又は同様の培養装置のヘッドスペースにおけるイソプレンの比生産量(mg/L)は、OD₆₀₀が約1.0の細胞培養物から試料を1mL採取し、20mLバイアル瓶に移し入れ、30分インキュベートした後に、ヘッドスペース中のイソプレン量を測定することで、測定できる。OD₆₀₀が1.0でない場合、測定値は、OD₆₀₀により除算して、OD₆₀₀が1.0になるよう標準化できる。ヘッドスペースに含まれるイソプレン量(mg/L)に係数3.8を乗じ、培養培地のOD₆₀₀値をもとにした、1時間当たりのイソプレン生産量(mg/L(プロス)/hr/OD₆₀₀)に変換することもできる。単位「mg/L(プロス)/hr/OD₆₀₀」の値に、時間数とOD₆₀₀値を乗じ、イソプレンmg/L(プロス)単位での累積力価を得ることもできる。

【0243】

発酵槽の瞬間イソプレン生産速度(mg/L(プロス)/hr)は、発酵槽で放出された気体試料を採取し、イソプレン量(気体1L当たりのイソプレン重量mg)などの単位)を解析し、この値に、プロス1Lにつき放出される気体速度(例えば、1時間当たりに60Lの気体が放出されることを意味する1vvm(気体体積/プロス体積/分))を乗じることで測定することができる。したがって、気体の放出濃度が1mg/Lである場合、空気流1vvm下での瞬間生産速度は60mg/L(プロス)/hrに相当する。必要に応じて、単位mg/L(プロス)/hrの値をOD₆₀₀により除算することで、mg/L(プロス)/hr/OD単位で比速度を得ることもできる。イソプレンの平均放出濃度に、発酵時の発酵プロス1L当たりの放出気体総量(off-gas sparged)を乗じることで、イソプレン/L(気体)の平均値を総生産物の生産性(発酵プロス1L当たりのイソプレン重量、mg/(プロス)L)に変換することもできる。したがって、イソプレンの平均放出濃度が0.5mg/(プロス)L/hrである場合、1vvm下10時間経過時の総生成物濃度は300mg/(プロス)Lに相当する。

【0244】

いくつかの実施態様では、細胞は、培養時に、細胞培養培地に含まれる炭素の約0.015、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.12、0.14、0.16、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.4、又は1.6%以上をイソプレンに変換する。いくつかの実

施設では、炭素のイソブレンへの変換率は約 0.002 ~ 約 1.6 % であり、例えば、約 0.002 ~ 約 0.005 %、約 0.005 ~ 約 0.01 %、約 0.01 ~ 約 0.05 %、約 0.05 ~ 約 0.15 %、0.15 ~ 約 0.2 %、約 0.2 ~ 約 0.3 %、約 0.3 ~ 約 0.5 %、約 0.5 ~ 約 0.8 %、約 0.8 ~ 約 1.0 %、又は約 1.0 ~ 約 1.6 % である。炭素のイソブレンへの変換率（「炭素収率（%）」とも呼ばれる）は、生産されたイソブレンに含まれる炭素原子のモル数を、炭素源（バッチ中の並びに供給したグルコース及び酵母エキスに含まれる炭素モル濃度）に含まれる炭素原子のモル数により除算することで測定できる。この数に 100 % を乗じ、百分率を生成する（式 1 に示す通り）。

式 1

10

$$\text{炭素収率（%）} = (\text{生産されたイソブレンに含まれる炭素のモル数}) / (\text{炭素源に含まれる炭素のモル数}) * 100$$

【0245】

この計算式では、酵母エキスには 50 重量 % の炭素が含有されるものと仮定することができる。

式 2

$$\text{炭素収率（%）} = (39.1 \text{ g イソブレン} * 1 / 68.1 \text{ mol/g} * 5 \text{ C/mol}) / [(181221 \text{ g グルコース} * 1 / 180 \text{ mol/g} * 6 \text{ C/mol}) + (17780 \text{ g 酵母エキス} * 0.5 * 1 / 12 \text{ mol/g})] * 100 = 0.042\%$$

20

【0246】

当業者であれば、イソブレン生産速度又は生産されたイソブレン量は、容易に任意の単位に変換できる。単位を相互変換するための、代表的な等式を以下に掲載する。

【0247】

イソブレン生産速度単位（総生産量及び比生産量）

式 3

$$1 \text{ g イソブレン/L プロセス/hr} = 14.7 \text{ mmol イソブレン/L プロセス/hr} \text{ (合計容積流量)}$$

式 4

$$1 \text{ nmol イソブレン/g}_{\text{wcm}}/\text{hr} = 1 \text{ nmol イソブレン/L プロセス/hr} / 0.001 \text{ (この変換式では、OD}_{600} \text{ の値が 1 のプロセス 1 L には、1 g の湿潤細胞が含まれているものと仮定する)}.$$

30

式 5

$$1 \text{ nmol イソブレン/g}_{\text{wcm}}/\text{hr} = 68.1 \text{ ng イソブレン/g}_{\text{wcm}}/\text{hr} \text{ (イソブレンの分子量)}$$

式 6

$$1 \text{ nmol イソブレン/L ガス中 O}_2/\text{hr} = 90 \text{ nmol イソブレン/L プロセス/hr} \text{ (培養プロセス 1 L 当たりの O}_2 \text{ 流速 } 90 \text{ L/hr)}$$

式 7

$$1 \mu\text{g イソブレン/L 放出ガス中イソブレン} = 60 \mu\text{g イソブレン/L プロセス/hr} \text{ (流速 } 60 \text{ L/gas/L プロセス) (1 vvm)}$$

40

【0248】

力価単位（合計単位及び比単位）

式 8

$$1 \text{ nmol イソブレン/1 mg 細胞タンパク質} = 150 \text{ nmol イソブレン/L プロセス} / 0.001 \text{ (この変換式では、OD}_{600} \text{ 値が 1 のプロセス 1 L に含まれる合計細胞タンパク質量は約 } 150 \text{ mg であると仮定する) (比生産性)}$$

式 9

$$1 \text{ g イソブレン/L プロセス} = 14.7 \text{ mmol イソブレン/L プロセス} \text{ (合計力価)}$$

【0249】

必要に応じて、細胞の湿潤重量単位を細胞の乾燥重量単位へと変換する際に、式 10 を

50

使用することができる。

式 1 0

$$\text{細胞乾燥重量} = (\text{細胞湿潤重量}) / 3.3$$

【 0 2 5 0 】

本発明に包含される一部の実施例では、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする異種核酸を含む細胞は、本質的に同一の条件下で、イソプレン合成酵素ポリペプチドをコードする核酸を含まない対応する細胞を増殖させた場合のイソプレン生産量の、少なくとも約2倍、3倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、150倍、200倍、又は400倍以上の量のイソプレンを生産する。

10

本発明に包含される一部の実施例では、イソプレン合成酵素のポリペプチドと、DXS、IDI、及び／又はMVA経路ポリペプチドのうちの1種以上とをコードする異種核酸を含む細胞は、本質的に同一の条件下で、異種核酸を含まない対応する細胞を増殖させた場合のイソプレン生産量の、少なくとも約2倍、3倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、150倍、200倍、又は400倍以上の量のイソプレンを生産する。

20

【 0 2 5 1 】

1. 形質転換法

mvaE及びmvaSポリペプチド、イソプレン合成酵素ポリペプチド、MVA経路ポリペプチド、DXP経路ポリペプチド、ホスホケトラーゼポリペプチド、及び／又はポリブレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする核酸の1つ以上のコピーをコードする核酸を、好適な技術を使用して微生物に入れることができる。加えて、これらの核酸又はこれらを含むベクターは、宿主細胞内にDNAコンストラクト又はベクターを導入するための、形質転換、電気穿孔法、核マイクロインジェクション、形質導入、遺伝子導入（例えばリポフェクション法による若しくはDEAE-デキストラン法による遺伝子導入、又は組換えファージウイルスを使用したトランスフェクション）、リン酸カルシウムDNA沈殿法とインキュベーションの併用、DNAコーティングした微粒子を用いる高速微粒子銃、及びプロトプラスト融合などの、標準的な技術を使用して、宿主細胞（例えば本明細書において述べられるような植物細胞、真菌細胞、酵母細胞、又は細菌細胞）に入れることができる。一般的な形質転換法は、当該技術分野で既知である（例えば、分子生物学領域の現行のプロトコル（F.M.Ausubel et al. (eds.) Chapter 9, 1987; Sambrook et al., 「分子クローニング（Molecular Cloning）」：「実験室マニュアル（A Laboratory Manual）第2版」，Cold

30

Spring Harbor, 1989；及びCampbell et al., Current Genetics 16: 53~56, 1989を参照されたい）。導入された核酸は、染色体DNAに組み込むことができ、又は染色体外の複製配列として維持することができる。形質転換体は、当該技術分野において既知の任意の方法により選別することができる。形質転換体の選別に好適な方法は、国際公開第2009/076676号、米国特許出願第12/335,071号（米国特許出願公開第2009/0203102号）、国際公開第2010/003007号、米国特許出願公開第2010/0048964号、国際公開第2009/132220号、及び米国特許出願公開第2010/0003716に記載される。

40

【 0 2 5 2 】

2. 例示的な細胞培養培地

本明細書で使用するとき、用語「最少培地（minimal medium又はminimal media）」は、概して細胞増殖に必要とされる最低限の栄養素を含有している増殖培地を指すが、常にアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10種以上のアミノ酸）が存在していないわけではない。最少培地は、（1）微生物を増殖させるための炭素源；（2）微生物種及び増殖条件によって異なる様々な塩；並びに（3）水；を含有する。炭素源は、グルコースなどの単糖から、本明細書で以下により詳細に記載されるような、他のバイオマスのより複雑な加水分解物、例えば、酵母エキスなどといった多様なものであ

50

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

【0254】

宿主細胞を培養するにあたり、任意の最少培地処方を使用することができる。例示的な最少培地処方としては、例えば、M9最少培地及びTM3最少培地が挙げられる。M9最少培地は、1Lにつき(1)200mLの滅菌M9塩類(1L当たり6.4gのNa₂HPO₄・7H₂O、1.5gのKH₂PO₄、2.5gのNaCl及び5.0gのNH₄Cl)；(2)2mLの1MのMgSO₄(滅菌)；(3)20mLの20%(w/v)グルコース(又は他の炭素源)；及び(4)100μLの1MのCaCl₂(滅菌)を含有する。TM3最少培地は、1L中に(1)K₂HPO₄(13.6g)；(2)KH₂PO₄(13.6g)；(3)MgSO₄·7H₂O(2g)；(4)クエン酸一水和物(2g)；(5)クエン酸鉄アンモニウム(0.3g)；(6)(NH₄)₂SO₄(3.2g)；(7)酵母エキス(0.2g)；及び(8)1000×微量元素溶液(1mL)を含有する。pHは約6.8に調整し、溶液は濾過滅菌する。1000×微量元素は、1L中に(1)クエン酸一水和物(40g)；(2)MnSO₄·H₂O(30g)；(3)NaCl(10g)；(4)FeSO₄·7H₂O(1g)；(4)CoCl₂·6H₂O(1g)；(5)ZnSO₄·7H₂O(1g)；(6)CuSO₄·5H₂O(100mg)；(7)H₃BO₃(100mg)；及び(8)NaMoO₄·2H₂O(100mg)を含有する。pHは約3.0に調節する。

【0255】

その他の最小培地の例は、(1)リン酸カリウムK₂HPO₄、(2)硫酸マグネシウムMgSO₄·7H₂O、(3)クエン酸一水和物C₆H₈O₇·H₂O、(4)クエン酸鉄アンモニウムNH₄FeC₆H₅O₇、(5)酵母エキス(biospringer)、(6)1000×改変微量元素溶液、(7)硫酸50%(w/v)、(8)foamblast 882(Emerald Performance Materials)及び(9)微量元素溶液を3.36mL含有する。すべての成分を同時に加え、脱イオン水に溶解させた後、加熱滅菌した。続いて室温に冷却し、水酸化アンモニウム(28%)によりpHを7.0に調節し、用量に調整する。滅菌後にビタミン溶液及びスペクチノマイシンを加え、pHを調整する。

【0256】

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

【0257】

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

【0258】

10

20

30

40

50

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

【0259】

いくつかの態様では、本明細書に記載の細胞は、エネルギー及び／又は炭素源として合成ガスを使用することができる。いくつかの実施態様では、合成ガスは、少なくとも一酸化炭素及び水素を含有する。いくつかの実施態様では、合成ガスは、二酸化炭素、水、又は窒素のうちの1つ以上を更に含有する。いくつかの実施態様では、合成ガス中の一酸化炭素に対する水素のm/o比は、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、3.0、4.0、5.0、又は10.0である。いくつかの実施態様では、合成ガスは、10、20、30、40、50、60、70、80、又は90体積%の一酸化炭素を含む。いくつかの実施態様では、合成ガスは、10、20、30、40、50、60、70、80、又は90体積%の水素を含む。いくつかの実施態様では、合成ガスは、10、20、30、40、50、60、70、80、又は90体積%の二酸化炭素を含む。いくつかの実施態様では、合成ガスは、10、20、30、40、50、60、70、80、又は90体積%の水を含む。いくつかの実施態様では、合成ガスは、10、20、30、40、50、60、70、80、又は90体積%の窒素を含む。

10

20

30

40

【0260】

合成ガスは、天然又は合成資源に由来するものであり得る。合成ガスの由来する資源を「フィードストック」として参照する。いくつかの実施態様では、合成ガスは、バイオマス（例えば、木材、スイッチグラス、農業廃棄物、都市ごみ）又は炭水化物（例えば、糖類）に由来する。他の実施形態では、合成ガスは、石炭、石油、油母、タールサンド、オイルシェール、又は天然ガスに由来する。他の実施形態では、合成ガスは、ゴムタイヤなどのゴムに由来する。

【0261】

メタン改質、石炭液化、混焼、発酵反応、酵素反応、及びバイオマスのガス化などの多様な加工法により、フィードストックから合成ガスを得ることができる。バイオマスのガス化は、反応器中で、化学量論量未満の酸素の存在下、約700℃を超える温度にて、バイオマスを部分的に酸価することにより実施される。空気、高純度酸素、又は蒸気の形態で酸素をバイオリアクタに導入する。ガス化は、主に、1) 最初に加熱して、バイオマスに含有されている何らかの水分を乾燥させる工程、2) 酸化剤の非存在下で、バイオマスを300～500℃に加熱して、ガス、タール、油及び炭化固体残渣を生成する、熱分解工程、並びに3) 炭化固体、タール、及びガスをガス化して、合成ガスの主成分を生成する工程、の3工程で生じ得る。混焼は、石炭／バイオマス混合物をガス化することにより実施される。合成ガス成分の同一性及びm/o比など、合成ガスの組成は、合成ガスの由来するフィードストック、並びにフィードストックを合成ガスに変換する方法に応じ変化し得る。

50

【0262】

合成ガスは不純物を含有してもよく、不純物の性質及び量は、生産に使用されたフィードストック及び加工法の両方によって異なる。発酵は、ある種の不純物に対し許容性を示し得るもの、発酵装置及び関連する設備を損傷させる恐れのあるタール及び微粒子などは、合成ガス材料から除去する必要がある。イソプレン産物に混入し得る、揮発性有機化合物、酸性気体、メタン、ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、キシレン、H₂S、CO₂、CS₂、HCl、O₃、有機硫黄化合物、アンモニア、酸化窒素、窒素含有有機化合物、及び重金属蒸気などの化合物を除去することも好ましい。合成ガスからの不純物の除去は、ガス洗浄、固相吸着剤による処置、及びガス透過性膜を用いる精製などの数種類

50

の手法のいずれかにより実施することができる。

【0263】

3. 例示的な細胞培養条件

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

10

【0264】

細胞を培養するにあたり、標準的な細胞培養条件を使用することができる（例えば、国際公開第2004/033646号及び該当特許中に引用される参考文献を参照されたい）。いくつかの態様では、細胞は適切な温度、気体混合物、及びpH（例えば、約20～約37、約6%～約84%のCO₂、及び約5～約9のpH）で増殖し、維持される。いくつかの態様では、細胞は適切な細胞培地の中で35で増殖する。いくつかの態様では、発酵の際のpH範囲は約pH 5.0～約pH 9.0（例えば、約pH 6.0～約pH 8.0、又は約6.5～約7.0）である。細胞は、宿主細胞に必要とされる条件に基づき、好気性、無酸素性、又は嫌気性条件下で生育させることができる。加えて、細胞を培養するにあたり、より特異的な細胞培養条件を使用することができる。例えばいくつかの実施態様では、高発現型プロモータの調節下の低～中間コピー数のプラスミドにおいてmvaE及びmvaSポリペプチドをコードする1つ以上の異種核酸を発現するバクテリア細胞（例えば、大腸菌（E. coli）細胞など）を34で培養する。

20

【0265】

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

30

【0266】

いくつかの態様では、細胞はグルコース制限条件下で培養される。「グルコース制限条件」は、添加されるグルコースの量が、細胞により消費されるグルコース量の約105%以下（例えば、約100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、又は10%）であることを意味する。特定の態様では、培養培地に添加されるグルコース量は、特定の期間中に細胞により消費されるグルコース量とほぼ同様である。いくつかの態様では、細胞の増殖速度は、細胞培地中のグルコースの量により維持することができる速度で細胞が増殖するよう、添加するグルコース量を制限することで制御される。いくつかの態様では、グルコースは細胞培養時に蓄積しない。様々な態様で、細胞は

40

50

グルコース制限条件下で、約1、2、3、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、又は70時間以上培養される。様々な態様で、細胞は、細胞を培養する合計時間の長さの約5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、95又は100%以上の時間にわたって、グルコース制限条件下で培養される。任意の特定の理論に束縛されることを意図するものではないが、グルコース制限条件は、細胞をより都合よく制御し得るものであると考えられる。

【0267】

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

【0268】

4. 例示的な精製方法

いくつかの実施態様では、本明細書に記載の任意の方法は更に、イソブレンを回収する工程を包含する。例えば、本発明の組成物及び方法により生産されるイソブレンは、ガス・ストリッピング、高機能分離膜による分離 (membrane enhanced separation)、分画、吸着/脱着、浸透気化法、固相からのイソブレンの熱又は真空脱着、あるいは固相に対し固定化させた又は吸着させたイソブレンの溶媒による抽出 (例えば、米国特許第4,703,007号及び同第4,570,029号を参照されたい。これらの特許文献のそれぞれは参考により本開示に援用し、特にイソブレンの回収及び精製法に関し援用する。)などの標準法により回収することができる。一態様では、イソブレン吸着ストリッピングにより回収できる (例えば、米国特許出願公開第2011/0178261号を参照されたい)。特定の態様では、イソブレンの回収には、アルコール (エタノール、メタノール、プロパノール、又はこれらの組み合わせなど) による抽出蒸留が使用される。いくつかの実施態様では、イソブレンの回収には、液体イソブレン (イソブレンの未希釀溶液又はイソブレンの溶媒希釀液など) の単離を包含する。ガス・ストリッピングには、連続的な様式で、発酵による放出気流からイソブレン蒸気を除去することを包含する。このような除去は、限定するものではないが、固相への吸着、液相への分配、又は直接濃縮 (濃縮コイルへの暴露、又は加圧による凝縮など) などの、いくつかの異なる手法により実施できる。いくつかの実施形態では、蒸気の露点を上回る温度での希釀イソブレン蒸気ストリームの膜濃縮により、液体イソブレンの凝縮がもたらされる。いくつかの実施態様では、回収は、米国特許出願公開番号第2011/0178261号に記載のとおりに実施される。いくつかの態様では、イソブレンを加圧濃縮する。

【0269】

10

20

30

40

50

イソブレンの回収には、一工程又は複数工程を包含し得る。いくつかの実施態様では、発酵により生じた気体からのイソブレン蒸気の回収、及びイソブレンの液相への転換は同時にに行う。例えば、放出される気体流から、イソブレンを直接液体へと凝縮させることができる。いくつかの実施態様では、発酵により生じた気体からのイソブレン蒸気の回収、及びイソブレンの液相への転換は連続的に行う。例えば、イソブレンを、固相に吸着させ、次に溶媒を用い固相から抽出することができる。一態様では、イソブレンは、米国特許出願第12/969,440号(米国特許出願公開第2011/0178261号)に記載の通りに吸着ストリッピングを用い回収する。

【0270】

いくつかの実施態様では、本開示の任意の方法は、イソブレンの精製を更に包含する。例えば、本発明の組成物及び方法を用い生成したイソブレンを、標準法により精製することができる。精製とは、イソブレンを生成した際に存在している1種以上の成分から、イソブレンを分離する手法を指す。いくつかの実施態様では、イソブレンは実質的に純粋な液体として得られる。精製法の例としては(i)抽出溶媒からの蒸留、及び(ii)クロマトグラフィーが挙げられる。本明細書で使用するとき、「精製イソブレン」は、イソブレンを生成した際に存在している1種以上の成分から分離したイソブレンを意味する。例えば、米国特許出願公開第2009/0203102号、PCT出願国際公開第2009/076676号、米国特許出願第12/496,573号を参照されたい。いくつかの実施態様では、イソブレンはイソブレンの生産時に存在する他の成分を少なくとも約20重量%含んでいない。各種実施形態では、イソブレンの純度は、少なくとも又は約25重量%、30重量%、40重量%、50重量%、60重量%、70重量%、75重量%、80重量%、90重量%、95重量%、重量%又は99重量%である。純度は、例えば、カラムクロマトグラフィー、HPLC分析、又はGC-MS分析等の任意の適切な方法で分析することができる。いくつかの態様では、イソブレン除去の際の1回以上の回収工程後に残存している気体相の少なくとも一部は、気体層をイソブレン生産用の細胞培養系(発酵槽など)に導入することでリサイクルされる。

10

20

20

30

40

50

【0271】

いくつかの態様では、本開示の任意の方法は、本明細書で開示される任意の組換え細胞により生産されたイソブレンを回収する工程を更に含有する。いくつかの態様では、イソブレンは吸着ストリッピングにより回収される(例えば、米国特許出願公開第2011/0178261(A1)号を参照されたい)。

【0272】

いくつかの態様では、本明細書に記載の任意の方法は更に異種核酸を回収する工程を包含する。いくつかの態様では、本明細書に記載の任意の方法は更に異種ポリペプチドを回収する工程を包含する。

【0273】

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

【0274】

本明細書の上記のすべての刊行物及び特許は、参考により本開示に援用される。本発明の範囲及び精神から逸脱せずとも、本発明に記載の方法及び系の様々な修正及び改変が、当業者には明白であろう。これまでに、本発明を、特定の実施形態に関連付けて記載したが、本発明は、特定の実施形態に不当に制限されるよう請求されるものではないことは理解されるべきである。本明細書に記載の各種実施形態に関する1つの、幾つかの、又は全ての特性は、本発明の他の実施形態と組み合わせることができることも理解されるであろう。本発明のこれらの態様及び他の態様は、当業者にとって自明のものであろう。

【0275】

本明細書を通じ、各種特許、特許出願及び他の種類の刊行物(例えば、学術論文)を参考する。本明細書に引用する、本開示に関係する全ての特許、特許出願及び刊行物は、すべての目的に關し、参考によりその全文が本明細書に援用される。

【0276】

本発明は、実例として提供され、本発明の範囲を制限することを意図するものではない。以降の実施例を参照することにより更に完全に理解され得る。本開示中のすべての引用は、参照により本明細書に明示的に援用される。

【実施例】**【0277】**

以降の実施例は例示目的で提供され、更に特定の好ましい実施形態及び本発明の態様を示すものであり、発明の範囲を制限するよう解釈されるものではない。

【実施例1】**【0278】****実施例1：イソプレン合成酵素候補の特定**

ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 及びプエラリア・モンタナ (*P. montana*) から単離されたイソプレン合成酵素 (IspS) をコードするアミノ酸配列を、所有権及び公共の配列データベースに対し解析し、イソプレン合成酵素活性を有し得るポリペプチドを特定した。イソプレン合成酵素活性を保有し得るポリペプチド候補を特定するための選別基準としては、1) M E A ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) イソプレン合成酵素アミノ酸残基 F 287、G 397、N 438、E 451、Y 514 に対応する1つ以上の不变のアミノ酸残基の有無；2) 未熟なシグナル配列のプロセシングが完了したポリペプチドとして定義される成熟配列との配列アラインメント；並びに3) IspS の触媒活性部位を含有している C 末端領域に基づく配列アラインメント、が挙げられる。配列アラインメントにより、ラッカセイ (*A. hypogaea*) (ピーナッツ)、ダイズ1 (*G. max* 1) (大豆)、ダイズ2 (*G. max* 2) (大豆)、フユナラ (フユナラ (*Q. petraea*)) (オーク)、ケルクス・アイレックス (*Q. ilex*)、ハッショウマメ (*M. pruriens*) (八升豆)、及びキマメ (*C. cajans*) (キマメ) (図1、2A～F 及び 3A～C) を含む数種類のイソプレン合成酵素が特定された。

10

20

【実施例2】**【0279】**

実施例2：インビトロでのイソプレン生産により測定されるイソプレン合成酵素活性を評価することによるイソプレン合成酵素候補の解析

インビトロで DMAPP をイソプレンへと変換する能力について、イソプレン合成酵素候補を解析した。

30

【0280】**材料及び方法****IspS 酵素のコドン最適化及び株構築**

ラッカセイ (*A. hypogaea*)、キマメ (*C. cajans*)、ダイズ (*G. max*)、ハッショウマメ (*M. pruriens*)、及びフユナラ (*Q. petraea*) 由来の推定 IspS 酵素をコードする DNA 配列をコドン最適化し、合成し、DNA 2.0 によりウラジロハコヤナギ (*P. alba*) IspS MEA 酵素と同一の向きで pCL201 発現ベクターにクローニングした (図12)。精製したプラスミドにより、製造元の推奨するプロトコルに従って発現宿主 BL21 DE3 pLysS (Invitrogen) を形質転換させ、更なる試験のため推定 IspS 酵素の発現力セットを保有する耐性コロニーを選別した。株の詳細な説明は表1を参照されたい。

40

【0281】

【表1】

表1. 本試験で使用した株

株	関係のある遺伝型
DW331	BL21 DE3 pLysS(Invitrogen), pET24a PT7-P. alba IspS MEA, Kan50, Chlor25
DW668	BL21 DE3 pLysS(Invitrogen), pET24a PT7-A. hypogaea putative IspS, Kan50, Chlor25
DW669	BL21 DE3 pLysS(Invitrogen), pET24a PT7-Q. petraea putative IspS, Kan50, Chlor25
DW688	BL21 DE3 pLysS(Invitrogen), pET24a PT7-G. max 18280 putative IspS, Kan50, Chlor25
DW689	BL21 DE3 pLysS(Invitrogen), pET24a PT7-G. max 21900 putative IspS, Kan50, Chlor25
DW731	BL21 DE3 pLysS(Invitrogen), pET24a PT7-M. pruriens putative IspS, Kan50, Chlor25
DW732	BL21 DE3 pLysS(Invitrogen), pET24a PT7-C. cajan putative IspS, Kan50, Chlor25

10

【0282】

イソプレン合成酵素比生産性の決定

材料

Tris / NaCl (pH 7.6)、MgCl₂、4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホン酸フルオリド塩酸塩 (AEB SF)、DNase I、DMAPPトリアンモンウム塩 (Cayman chemicals)、リゾチーム (Sigma-Aldrich)、96ウェルZinsserガラスブロック、Seal & Sample Aluminum foil lids (製品番号 538619) (Beckman coulter)、ポリプロピレン製高容量Nuncマイクロウェル96ウェルプレート (製品番号 2449946) (Thermo Scientific) (VWR)。

20

【0283】

タンパク質発現及び溶解度特性の測定

ウラジロハコヤナギ (P. alba) MEAイソプレン合成酵素、ウラジロハコヤナギ (P. alba) 変異体3イソプレン合成酵素、ラッカセイ (A. hypogaea) イソプレン合成酵素、ダイズ1 (G. max 1) (G, max 21900又はGlyma09g21900.1) イソプレン合成酵素、ダイズ (G. max) 2 (G, max 18280又はGlyma20g18280_1_FG) イソプレン合成酵素、ハッショウマメ (M. pruriens) イソプレン合成酵素、又はキマメ (C. cajan) イソプレン合成酵素を発現する大腸菌 (E. coli) 形質転換体をLB培地で増殖させ、OD₆₀₀が約0.5になった時点で200 μM IPTGを導入し、5時間発現誘導した。細胞を回収する前に、最終的なOD₆₀₀値を記録した。細胞ペレットを遠心分離により回収し、-80°で保存した。3mL溶解緩衝液 (100 mM Tris、100 mM NaCl (pH 7.6)、1 mg / mL BSA、1 mg / mL リゾチーム、0.1 mg / mL DNase、0.5 mM AEB SF、5 mM MgCl₂) を各凍結ペレットに加え、このペレットを再懸濁し、続いて氷上で30分間インキュベートした。次に、可溶化液が透明になり始めるまで、フレンチプレス (5.52 MPa (800 psi) / Low 設定に設定した小型フレンチプレスセル) のセルに2~3回通過させて、細胞懸濁液を完全に可溶化させた。次に混合物を4下、14000 rpmにて25分間遠心分離した。酵素活性アッセイにおいて使用するため、上清を回収した。SDS-PAGE及びクマシーブルー染色により、タンパク質の可溶性について、総可溶化液、可溶性画分、及びペレット由来のサンプルを解析した。

30

40

【0284】

イソプレン合成酵素酵素活性アッセイ

イソプレン合成酵素を含有している25 μLの大腸菌 (E. coli) 上清を、アルミホイル製の蓋により密封したZinsser 96ウェルガラスブロック内にて、50 mM MgCl₂ 及び100 mM Tris / NaClを含有している100 μL反応液中で、

50

0.25、0.5、1、3、5、7、10、15、20、及び25 mM DMAPととともに34にて30分インキュベートした。次にガラスブロックを80の水浴に移し2分間置いた。次に、GC-FID(以降を参照のこと)によりガラスブロックを解析して、反応時に生成されたイソブレン濃度を求めた。

【0285】

GC-FID解析

装置及び材料

ガスクロマトグラフィー(GC)、7890(Agilent Technologies)、水素炎イオン化検出器(FID)7890(Agilent Technologies)、HP-5msカラム、5% -フェニル-メチルポリシロキサン、 $15\text{m} \times 0.25\text{mm} \times 0.25\mu\text{m}$ (Agilent Technologies)、CTCオートサンプラー(Leap Technologies)、0.2% v/vイソブレン、窒素バランス(Air Liquide)、Enhanced Data Analysis(D.03.00.611)をインストールしたChemstation。

10

【0286】

手順

次のパラメーターを用いGC-FIDを使用して、96ウェルガラスブロックを解析した。

【0287】

【表2】

オーブン:

20

速度(°C/分)	温度(°C)	時間(分)
0	37	28

【0288】

実施時間: 28分間

【0289】

【表3】

前側取り込み口	
前側取り込み温度	110°C
流速	3.4 mL/分
フロー モード	一定流量
分割比	50 : 1
キャリアガス	ヘリウム
水素炎イオン化検出器	
検出温度	160°C
水素流	40 mL/分
空気流	400 mL/分
構成流	0.1 mL/分
構成気体の種類	ヘリウム

30

40

【0290】

計算

ピーク面積を、窒素校正標準において0.2%(v/v)イソブレンから算出された反応係数により除算し、ピーク面積をイソブレン濃度に変換した。イソブレン合成酵素の比生産性をmg(イソブレン)/L/hr/OD単位で算出した。

【0291】

イソブレン合成酵素比活性の決定

6×Hisタグ付加したイソブレン合成酵素の発現

50

N-末端 6 × His タグ付加ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 野生型イソプレン合成酵素、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 1 イソプレン合成酵素、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 2 イソプレン合成酵素、及びラッカセイ (*A. hypogaea*) イソプレン合成酵素を発現させ、精製した。増殖法は、BL21 (DE3) pLysS 細胞で発現させたヒスチジンタグ付加酵素に好適なものである。各 1 L の予定していた増殖用に、10 mL の一晩培養物を調製した。25 mL フラスコを用い、10 mL LB 培地に適切な抗生素質 (50 mg / mL カナマイシン、25 mg / mL クロラムフェニコール) を加え、新しい細胞プレートから 1 コロニーを接種し、あるいは凍結させたグリセロールストックを直接摂取した。約 220 rpm で振盪させながら、培養物を 30 ℃ で一晩増殖させた。一日培養物は、各培養時に適切な抗生素質を添加した 1 L LB 培地で調製した。各 1 L の一日培養物に 10 mL の一晩培養物を接種し、OD600 が約 0.4 ~ 0.6 に到達するまで、約 220 rpm で振盪しながら 30 ~ 37 ℃ で増殖させた。次に、400 μM の IPTG により 1 日培養物に発現誘導を行い、220 rpm で振盪しながら 30 ℃ にて 5 ~ 6 時間増殖させた。次に、4 ℃ にて 10,000 × g で 10 分間遠心沈降し、細胞を回収した。回収後、細胞は次工程に直接用いるか、あるいは使用までの間 -80 ℃ で保存した。
10

【0292】

6 × His タグ付加したイソプレン合成酵素の精製

ヒスチジンタグ付加した酵素を BL21 (DE3) pLysS 細胞から精製するにあたって、細胞を新鮮な溶解緩衝液 (溶解緩衝液 (pH 8.0) : Ni 洗浄緩衝液 + 0.5 mM PMSF、1 mg / mL リゾチーム、0.2 mg / mL DNase I、Ni 洗浄緩衝液 : 50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、20 mM イミダゾール) に穏やかに再懸濁した。細胞ペレットに対し、培養培地 1 L につき約 40 ~ 50 mL 溶解緩衝液を使用した。次に細胞を氷上で約 30 分インキュベートした。次に、可溶化液が透明になり始めるまで、フレンチプレスのセルを 2 ~ 3 回通過させて (8.27 MPa / High (1200 psi / High) に設定して大型フレンチプレスセルを使用)、細胞懸濁液を完全に可溶化させた。活性解析及びゲル解析 (約 100 μL) のため可溶化液を保存した。次に、Sorvall Discovery 90SE 超遠心機により、4 ℃ にて 30,000 × g で 30 分遠心分離し、可溶化液を清澄化させた。上清を回収し、維持した。「清澄化させた可溶化液」試料を、活性解析及びゲル解析のため保存した (約 100 μL)。
20

【0293】

清澄化させた可溶化液を、0 ~ 100% Ni 緩衝液 B を用い、HisTrap HP カラム (GE health care) に充填した。カラムに可溶化液を充填した後、このカラムを Ni 洗浄緩衝液 (50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、20 mM イミダゾール (pH 8.0)) により洗浄した。次に、0 ~ 100% Ni 溶出緩衝液 (50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、500 mM イミダゾール (pH 8.0)) を用い、カラムから His タグ付加イソプレン合成酵素を溶出させ、His タグ付加イソプレン合成酵素を含有している画分を回収した。次にカラムを Ni 脱着緩衝液 (20 mM NaH₂PO₄、0.5 M NaCl、50 mM EDTA (pH 7.4)) で洗浄した。次に、製造元の指示に従い、試料を SDS-PAGE ゲル (4 ~ 12% ゲル NUPAGE、Invitrogen) により解析した。所望の画分をスピンドルタ (Vivaspin-20、Sartorius) で濃縮し、次に、Sephadex G25 樹脂を装填した Hi Prep 26/10 脱塩カラム (GE health care) で脱塩した。G-25 緩衝液は、50 mM HEPES、50 mM NaCl、及び 1 mM DTT からなり、pH 7.4 であった。次に画分を解析し、濃縮した。次に試料を -80 ℃ で保存した。
30

【0294】

TEV 切断によるヒスチジンタグの除去

Eton Bioscience Inc. の TurboTEV プロテアーゼにより消

10

20

30

40

50

化を実施した。10 µg の精製タンパク質当たり1ユニットのTurboTEVを使用した。消化は4で一晩行った。試料をNi緩衝液で平衡化させた他のNiカラムに素通りさせ、未切断の酵素、タグ、TurboTEVプロテアーゼ（同様にタグ付加されている）、及び不純物を除去した。Niカラムを素通りさせ、洗浄液をSDS-PAGEゲル（NUPAGE、Invitrogen）を用い解析し、及びDMAPP活性を解析した。純粋な酵素を含有しているサンプルをプールし、50 mM NaCl（pH 7.4）緩衝液中に脱塩し、A₂₈₀での吸光度を使用してタンパク質濃度を決定し、次に精製タンパク質を分割し、-80で保存した。

【0295】

イソプレン合成酵素の酵素活性アッセイ

上記の通り、イソプレン合成酵素の酵素アッセイを実施した。

10

【0296】

イソプレン合成酵素の動態パラメーターの計算

イソプレン合成酵素活性は、s⁻¹の単位で記録される。DMAPPアッセイにおいてイソプレン濃度を決定し、換算係数1.47E⁻⁰⁴を乗じ、µM/L/秒の単位を得る。次に、各基質濃度にて、各変異体についてイソプレン合成酵素の活性を計算する。

【0297】

【数2】

$$\text{イソプレン合成酵素活性} = \frac{\text{酵素} \left(\frac{\mu\text{M}}{\text{L}} \right)}{\text{イソプレン} \left(\frac{\mu\text{M}}{\text{L}/\text{秒}} \right)}$$

20

【0298】

Kaleidagraph 4.0 (Synergy Software) を使用して、基質阻害を考慮に入れ、イソプレン合成酵素の動態アッセイ由来のデータを、アンリ・ミカエリス・メンテン式の改変式に従って代入し、解析した各イソプレン合成酵素に関してK_M、k_{cat}及びk_{i DMAPP}値を求めた。

【0299】

【数3】

30

$$\frac{\text{速度}}{[\text{イソプレン合成酵素}]} = \frac{k_{cat} * [\text{DMAPP}]}{KM + [\text{DMAPP}] \left(1 + \frac{[\text{DMAPP}]}{Ki\text{DMAPP}} \right)}$$

【0300】

結果

記載のIspSを発現する細胞から調製した可溶化液のSDS-PAGE解析により、ラッカセイ(*A. hypogaea*) IspS(図4B; レーン3及び4)及びダイズ1(*G. max* 1) IspS(図4B; レーン6及び7)が可溶性であり、ウラジロハコヤナギ(*P. alba*) MEA IspS(図4A; レーン2)に匹敵するレベルで発現していたことを実証した。対照的に、ダイズ2(*G. max* 2) IspS(図4B; レーン9及び10)は、ウラジロハコヤナギ(*P. alba*) MEA IspSと比較してほとんど不溶性であった。ハッショウマメ(*M. pruriens*) IspS(図5; レーン5、6及び7)又はキマメ(*C. cajan*) IspS(図5; レーン8、9及び10)を発現する細胞の可溶性画分から調製した3つの希釈物の解析により、これらが可溶性であり、かつウラジロハコヤナギ(*P. alba*)変異体3 IspS(図5; レーン2、3及び4)に匹敵するレベルで発現していたことを実証した。

40

【0301】

記載のIspSを含有する細胞可溶化液にもたらされるDMAPPからのイソプレン生産を測定した。高濃度DMAPPの存在下で、ラッカセイ(*A. hypogaea*) IspSを含

50

有する可溶化液によりイソブレンを生産するラッカセイ (*A. hypogaea*) I s p S 又はフユナラ (フユナラ (*Q. petraea*)) I s p S を発現する細胞由来の可溶化液は、フユナラ (フユナラ (*Q. petraea*)) I s p S (図 6) を発現する細胞由来の可溶化液と比較して、優位に高いイソブレン生産を示す。陽性対照のウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 3 I s p S を含有する細胞可溶化液によるイソブレン産生との比較により示される通り、高濃度 D M A P P が存在する場合、ハッショウマメ (*M. pruriens*) I s p S を含有する細胞可溶化液から、イソブレンが生産された (図 7)。これらの結果から、ポリペプチド候補、ラッカセイ (*A. hypogaea*) I s p S、フユナラ (フユナラ (*Q. petraea*)) I s p S、及びハッショウマメ (*M. pruriens*) I s p S がイソブレン合成酵素活性を有することが示される。

10

【 0 3 0 2 】

I s p S 候補のラッカセイ (*A. hypogaea*) (ピーナツ (peanut))、ダイズ 1 (*G. max 1*) (ダイズ (soybean))、ダイズ 2 (*G. max 2*) (ダイズ (soybean))、ハッショウマメ (*M. pruriens*) (八升豆)、又はキマメ (*C. cajan*) (キマメ (pigeon pea)) を発現する細胞から調製した可溶化液における I s p S 比生産性の解析により、ラッカセイ (*A. hypogaea*) 及びハッショウマメ (*M. pruriens*) の有する比生産性が、その他の I s p S 候補及びウラジロハコヤナギ (*P. alba*) I s p S よりも高かったことが実証された (図 8 及び表 2)。ダイズ 1 (*G. max 1*) I s p S、ダイズ 2 (*G. max 2*) I s p S、及びキマメ (*C. cajan*) I s p S を含有する細胞可溶化液は、D M A P P の存在下ではイソブレンを生産しなかった。

20

【 0 3 0 3 】

【 表 4 】

表 2. I s p S 比生産性の比較

DMAPP (mM)	ウラジロハコヤナギ (<i>P. alba</i>) 野生型		ラッカセイ (<i>A. hypogaea</i>)		ダイズ 1 (<i>G. max 1</i>)		ダイズ 2 (<i>G. max 2</i>)		ハッショウマメ (<i>M. pruriens</i>)		キマメ (<i>C. cajan</i>)	
	SP	Std Dev	SP	Std Dev	SP	Std Dev	SP	Std Dev	SP	Std Dev	SP	Std Dev
0.25	3.7	0.173	1.2	0.132	0.000	0.000	0.000	0.000	1.1	0.013	0.000	0.000
0.5	5.6	0.167	2.1	0.027	0.000	0.000	0.000	0.000	1.8	0.045	0.000	0.000
1	8.3	0.340	4.0	0.164	0.000	0.000	0.000	0.000	4.0	0.160	0.000	0.000
3	13.2	0.782	11.0	0.378	0.000	0.000	0.000	0.000	10.1	0.710	0.000	0.000
5	14.4	0.860	14.6	3.445	0.201	0.014	0.171	0.004	15.3	0.328	0.202	0.006
7	14.6	0.437	22.4	0.561	0.272	0.030	0.244	0.025	17.5	0.582	0.291	0.031
10	13.4	0.761	26.9	0.660	0.397	0.032	0.322	0.018	19.8	2.569	0.427	0.004
15	11.1	0.299	30.8	1.013	0.591	0.007	0.473	0.021	19.0	3.933	0.570	0.020
20	9.4	0.358	33.1	0.733	0.802	0.065	0.598	0.003	19.0	1.648	0.765	0.014
25	7.8	0.217	32.6	0.596	0.958	0.075	0.784	0.034	17.3	0.274	0.928	0.008

SP=比生産性(mg/L/h/OD)

30

【 0 3 0 4 】

ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) I s p S を発現する細胞から調製した可溶化液に、基質に対し標準化させた場合のイソブレン生産解析を行うことにより、約 6 mM D M A P P 濃度下で酵素が基質阻害を示したことが実証された (図 9)。対照的に、ラッカセイ (*A. hypogaea*) I s p S は、アッセイした高濃度 D M A P P では基質阻害を示さなかった (図 9)。ラッカセイ (*A. hypogaea*) I s p S による基質阻害の欠如は、酵素活性に関し I s p S により必要とされる補助因子であるマグネシウム (Mg^{2+}) の存在に依存した。ラッカセイ (*A. hypogaea*) I s p S が 10 mM Mg^{2+} で提供された場合、約 1 0 mM D M A P P の濃度で基質阻害が観察された (図 10)。しかしながら、100 mM Mg^{2+} が提供された場合、アッセイした高濃度 D M A P P 下では基質阻害は観察されなかった (図 10)。

40

【 0 3 0 5 】

精製タンパク質を用い、インビトロでラッカセイ (*A. hypogaea*) I s p S の動態パラメーターを求め、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) I s p S (野生型)、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 1 I s p S、及びウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 2 I s p S と比較した。基質に対し正規化したとき、イソブレン生産の解析により、約 10 mM D M A P P の存在下でウラジロハコヤナギ (*P. alba*) I s p S が基質阻害を示すことが実証された (図 11 及び表 3)。ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 1 I s p

50

S 及びウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 2 I s p S は、いずれも濃度約 15 mM の D M A P P で基質阻害を示した（図 11 及び表 3）。比較すると、ラッカセイ (*A. hypogaea*) I s p S は、それぞれ 2.17、1.68、及び 1.62 の $K_{i,D M A P P}$ 値を有する（表 4）ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) I s p S（野生型）、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 1 I s p S 又はウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 2 I s p S と比較して、30.6 の高い $K_{i,D M A P P}$ 値により濃度約 25 mM の D M A P P 下で基質阻害を示す（図 11 及び表 3）。加えて、ラッカセイ (*A. hypogaea*) I s p S は、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) I s p S（野生型）、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 1 I s p S、又はウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 2 I s p S の K_m 値よりも優位に高い 18.3 の K_m 値を有しており、かつラッカセイ (*A. hypogaea*) I s p S では 1.81 の K_{cat} 値が測定された（表 4）。

10

【0306】

【表 5】

表 3. I s p S 活性の比較

DMAAPP (mM)	ウラジロハコヤナギ (<i>P. alba</i>) 野生型		ウラジロハコヤナギ (<i>P. alba</i>) 変異体 1		ウラジロハコヤナギ (<i>P. alba</i>) 変異体 2		ラッカセイ (<i>A. hypogaea</i>)	
	活性(s-1)	Std Dev	活性(s-1)	Std Dev	活性(s-1)	Std Dev	活性(s-1)	Std Dev
0.25	0.208	0.009	0.166	0.009	0.168	0.006	0.018	0.001
0.5	0.366	0.011	0.295	0.023	0.277	0.003	0.036	0.001
1	0.560	0.013	0.427	0.021	0.407	0.025	0.077	0.001
3	0.951	0.025	0.751	0.018	0.734	0.024	0.233	0.012
5	1.079	0.028	0.871	0.037	0.878	0.045	0.371	0.016
7	1.144	0.048	0.892	0.048	0.930	0.030	0.468	0.014
10	1.128	0.047	0.911	0.020	0.962	0.034	0.584	0.007
15	0.965	0.014	0.779	0.030	0.878	0.043	0.677	0.016
20	0.833	0.008	0.667	0.023	0.783	0.009	0.695	0.007
25	0.646	0.025	0.558	0.019	0.674	0.031	0.680	0.008

20

【0307】

【表 6】

表 4. I s p S 動態パラメーターの比較

	ウラジロハコヤナギ (<i>P. alba</i>) 野生型		ウラジロハコヤナギ (<i>P. alba</i>) 変異体 1		ウラジロハコヤナギ (<i>P. alba</i>) 変異体 2		ラッカセイ (<i>A. hypogaea</i>)	
	平均値	平均誤差	平均値	平均誤差	平均値	平均誤差	平均値	平均誤差
K_{cat}	2.17	0.309	1.68	0.192	1.62	0.166	1.81	0.502
K_m	2.83	0.727	2.79	0.587	2.88	0.568	18.3	6.538
K_i	13.5	3.5	14.9	3.3	22.1	5.1	30.6	17.1

30

【実施例 3】

【0308】

実施例 3 : DMAAPP 毒性を軽減させることによるイソプレン合成酵素候補の解析

細胞内 DMAAPP 濃度の増加と、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) I s p S を発現させることで軽減され得る大腸菌 (*E. coli*) の増殖阻害との間には、強い相関がある。理論に束縛されるものではないが、I s p S 活性が増強されると、DMAAPP は、より迅速にイソプレンへと変換されるようになり、その結果増殖性が更に良好になるはずである。I s p S 候補を発現する大腸菌 (*E. coli*) の増殖速度を監視して、細胞内で DMAAPP をイソプレンに変換する能力を示す候補を特定した。

40

【0309】

材料及び方法

プラスミド p EWL1036 の構築

大腸菌 (*E. coli*) での発現に関しラッカセイ (*A. hypogaea*) I s p S 遺伝子を最適化し、DNA 2.0 により合成した。生産宿主において使用するための発現コンストラクトを作製するため、プライマー E L 1304 及び E L 1305 に関する製造元のプロトコルにしたがって、Agilent Technologies (Santa Clara,

50

C A) の P f u U l t r a I I F u s i o n D N A ポリメラーゼを用い、D N A 2 . 0 発現ベクターからラッカセイ (*A. hypogaea*) I s p S を増幅させた(表5)。プライマー E L 1 3 0 6 及び E L 1 3 0 7 により p D W 3 4 主鎖を増幅した(表5)。Life Technologies(Carlsbad, CA)のG E N E A R T S e a m l e s s C l o n i n g a n d A s s e m b l y キットを使用し、2つのP C R 産物を精製し(Q i a g e n)、及び組み替えてインビトロで環状産物を形成した。標準的な分子生物学的プロトコルにしたがって、電気穿孔法により生成物をC M P 4 5 1 株に導入した。非選択的L B 培地に細胞を回収し、L A + 5 0 μ g / μ L カルベニシリン+5 mM メバロン酸プレートに接種し、37°で一晩インキュベートした。翌日、P C R により形質転換体を選別して、プライマー E L 1 0 0 5 及び E L 1 3 1 0 によりラッカセイ (*A. hypogaea*) I s p S - m M V K 断片の有無について確認した(表5)。適切な大きさのP C R 産物を含有する形質転換体を、L B + 5 0 μ g / μ L カルベニシリン中で一晩増殖させ、選別のためプラスミドを精製した(Q i a g e n)。プライマー E L 1 0 0 4 、E L 1 0 0 5 、E L 1 0 0 6 、E L 1 2 3 8 、E L 1 3 0 8 、E L 1 3 0 9 、E L 1 3 1 0 を用いる配列決定(Quintara Biosciences)によりプラスミドを確認した(表5)。1種のプラスミド、p E W L 1 0 3 6 を更なる試験のため選別した(図15及び表6)。

10

20

30

【0310】

【表7】

表5. プライマー配列

プライマーネーム	プライマーパターン	配列番号
E L 1 0 0 4	A C A A T T C A C A C A G G A A C A G C	37
E L 1 0 0 5	C C A G G C A A A T T C T G T T T A T C A G	38
E L 1 0 0 6	G A C A G C T T A T C A T C G A C T G C A C G	39
E L 1 2 3 8	C G A A A A G C A C C C T T A T G T G T C T G	40
E L 1 3 0 4	G G A A T A A A C C A T G A A C A C C C G T C G C A G C G C	41
E L 1 3 0 5	C T T T A T G C A G T T A G T T G A T C G G A A T C G G T T C G	42
E L 1 3 0 6	G A T C A A C T A A C T G C A T A A A G G A G G T A A A A A A C A T G G	43
E L 1 3 0 7	G G G T G T T C A T G G T T T A T T C C T C C T T A T T A A T C G	44
E L 1 3 0 8	C T G A C C T A C A A A T T C G A A G A G G	45
E L 1 3 0 9	G G T G G C G T G A G A T C G G T C T G	46
E L 1 3 1 0	G C A T C G T C C G T T C G A G G C T G C	47

【0311】

40

【表8】

表6. ラッカセイ (*A. hypogaea*) イソプレン合成酵素をコードするプラスミド

プラスミド名	抗生物質耐性	説明
p E W L 1 0 3 6	カルベニシリン	p Trc ラッカセイ (<i>A. hypogaea</i>) I s p S - m M V K

【0312】

50

E W L 1 0 4 3 、 E W L 1 0 4 7 、 E W L 1 0 4 9 、 及び E W L 1 0 5 2 株の構築 E W L 1 0 4 3 株を構築するため、標準的な分子生物学的プロトコルに従う電気穿孔法により、親株C M P 1 1 3 3 をプラスミド p E W L 1 0 3 6 及び M C M 8 2 により同時形質転換した。非選択的液体L B に細胞を回収し、振盪しながら30°で2時間インキュベ

ートし、L A + 50 µg / µL カルベニシリン + 50 µg / µL スペクチノマイシンプレートで選別し、37で一晩インキュベートした。カルベニシリン及びスペクチノマイシンに耐性である個々のコロニーをEWL1043株と命名し、更なる試験に使用した(表7)。

【0313】

EWL1047株を構築するため、標準的な分子生物学的プロトコルに従う電気穿孔法により、親株CMP1133をプラスミドEWL1036及びpCHL276により同時形質転換した。非選択的液体LBに細胞を回収し、振盪しながら30で2時間インキュベートし、L A + 50 µg / µL カルベニシリン + 50 µg / µL スペクチノマイシンプレートで選別し、37で一晩インキュベートした。カルベニシリン及びスペクチノマイシンに耐性である個々のコロニーをEWL1047株と命名し、更なる試験に使用した(表7)。

【0314】

EWL1049株を構築するため、標準的な分子生物学的プロトコルに従う電気穿孔法により、親株CMP1133をプラスミドpEWL1036及びpCHL277により同時形質転換した。非選択的液体LBに細胞を回収し、振盪しながら30で2時間インキュベートし、L A + 50 µg / µL カルベニシリン + 50 µg / µL スペクチノマイシンプレートで選別し、37で一晩インキュベートした。カルベニシリン及びスペクチノマイシンに耐性である個々のコロニーをEWL1049株と命名し、更なる試験に使用した(表7)。

【0315】

EWL1052株を構築すため、標準的な分子生物学的プロトコルに従う電気穿孔法により、親株CMP1133をプラスミドpEWL1036及びMCM1225により同時形質転換した。非選択的液体LBに細胞を回収し、振盪しながら30で2時間インキュベートし、L A + 50 µg / µL カルベニシリン + 50 µg / µL スペクチノマイシンプレートで選別し、37で一晩インキュベートした。カルベニシリン及びスペクチノマイシンに耐性である個々のコロニーをEWL1052株と命名し、更なる試験に使用した(表7)。

【0316】

【表9】

表7. 本試験で使用した株

株名	抗生物質耐性	説明
EWL1043	カルベニシリン、スペクチノマイシン	BL21, pgl-, PL, 2-mKKDyI, GI1, 2-gltA, yhfS-PyddV-ispa, pTrc A, hypogaea IspS-mMVK, pCL Ptrc-E. faecalis Upper MVA
EWL1047	カルベニシリン スペクチノマイシン	BL21, pgl-, PL, 2-mKKDyI, GI1, 2-gltA, yhfS-PyddV-ispa, pTrc A, hypogaea IspS-mMVK, pCL Ptrc-leaderless E. faecalis Upper MVA
EWL1049	カルベニシリン、スペクチノマイシン	BL21, pgl-, PL, 2-mKKDyI, GI1, 2-gltA, yhfS-PyddV-ispa, pTrc A, hypogaea IspS-mMVK, pCL Ptrc-leaderless E. casseliflavus Upper MVA
EWL1052	カルベニシリン スペクチノマイシン	BL21, pgl-, PL, 2-mKKDyI, GI1, 2-gltA, yhfS-PyddV-ispa, pTrc A, hypogaea IspS-mMVK, pCL Ptrc-leaderless E. gallinarum Upper MVA

【0317】

イソブレン生産株の増殖及び比生産性アッセイ

イソブレン生産株の増殖及びイソブレン生産性アッセイは、次のとおりに実施した：30mLガラス製試験管において、適切な抗生物質を加えたLB培地で、培養物のグリセロールストックから一晩培養物を調製し、34で増殖させた。翌日、適切な抗生物質を加えたTM3培地により、OD600が0.2になるよう培養物を希釈し、Breath easierメンブレン(Diversified Biotech)により密封した48ウェルブロック(VWR)に分注し34下、Shel Lab振盪インキュベータ

10

20

30

40

50

内で 600 rpm で増殖させた。OD 600 が 0.4 ~ 0.8 に達したときに、適量の IPTG により培養物に発現誘導を行った。続いて、発現誘導の 1 時間後、選別した培養物にメバロン酸を加えた。次に、4 ~ 5 時間にわたって、1 時間毎に OD 及びイソプレンを測定した。標準的な分子生物学的手順に従って、プレートリーダー (molecular Devices) により、96 ウェルポリスチレンプレート (VWR) 内の OD 600 を測定した。標準的な手順にしたがって、イソプレン測定を実施した。簡潔に述べると、48 ウェルブロックから 100 μL 細菌培養物を取り出し、解析用の 96 ウェルガラスブロック (Zinsser) に再分注した。ホイルメンブレンでガラスブロックを密封し、34 下、450 rpm で 30 分間、Thermomixer (Eppendorf) でインキュベートし、培養物を 80 °C の水浴で 2 分間熱殺菌した。GC - MS による標準的なイソプレン測定の前に、ガラスブロックを冷却した。生産されたイソプレン重量 (g) を、体積、細胞密度、及び時間により分割することにより比生産性を計算した。

10

【0318】

結果

ラッカセイ (*A. hypogaea*) IsopS 発現細胞 (EWL 1043 株)において、高濃度の MVA 存在下での細胞増殖及びイソプレン生産を経時的に測定した。ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 1 IsopS 発現細胞では、増殖は、試験したいずれの MVA 濃度でも阻害された (図 13 ; 1 枚目のパネル)。ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 2 IsopS 発現細胞では、増殖は、MVA が約 15 mM を超える濃度で供給された場合に阻害された (図 13 ; 2 枚目のパネル)。ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 3 IsopS 発現細胞では、増殖は、MVA が少なくとも約 30 mM の濃度で供給された場合に一部阻害され、約 45 ~ 75 mM の濃度では完全に阻害された (図 13 ; 3 枚目のパネル)。ラッカセイ (*A. hypogaea*) IsopS 発現細胞では、増殖は、約 60 ~ 75 mM の MVA 濃度では一部阻害されたものの、約 15 ~ 45 mM の MVA 濃度では優位な増殖が見られた (図 13 ; 4 枚目のパネル)。細胞増殖のレベルは、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 1 IsopS、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 2 IsopS、及びウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 3 IsopS と匹敵する有意なレベルのイソプレンを生産するラッカセイ (*A. hypogaea*) IsopS 発現細胞による、イソプレンの比生産性レベルと一致した (図 14)。

20

【0319】

細胞増殖及びイソプレン生産を、ラッカセイ (*A. hypogaea*) IsopS 又はウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 1 IsopS を、エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*) 上流 MVA 経路 (EWL 1043 及び EWL 1047)、エンテロコッカス・カッセリフラバス (*E. casseliflavus*) 上流 MVA 経路 (EWL 1049) 又はエンテロコッカス・ガリナラム (*E. gallinarum*) 上流 MVA 経路 (EWL 1052) と共に発現する細胞において経時的に測定した。ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 1 IsopS 発現細胞では、エンテロコッカス・カッセリフラバス (*E. casseliflavus*) 又はエンテロコッカス・ガリナラム (*E. gallinarum*) 上流 MVA 経路を共発現させた場合に、エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*) 上流 MVA 経路を共発現した場合と比較して増殖は減少した (図 16 ; 左側のパネル)。ラッカセイ (*A. hypogaea*) IsopS 発現細胞では、エンテロコッカス・カッセリフラバス (*E. casseliflavus*) 又はエンテロコッカス・ガリナラム (*E. gallinarum*) 上流 MVA 経路を共発現させることにより、エンテロコッカス・フェカリス (*E. faecalis*) 上流 MVA 経路を共発現する細胞と匹敵する増殖が得られた (図 16 ; 右側パネル)。細胞増殖のレベルは、ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) 変異体 1 IsopS と匹敵する有意なレベルのイソプレンを生産するラッカセイ (*A. hypogaea*) IsopS 発現細胞による、イソプレンの比生産性レベルと一致した (図 17)。

30

【実施例 4】

【0320】

実施例 4 : 15 L スケールで流加式培養させた、マメ科植物イソプレン合成酵素を発現する大腸菌 (*E. coli*) による、イソプレン生産

40

50

材料及び方法

培地組成(発酵培地1Lあたり) :

K₂HPO₄(7.5g)、MgSO₄*7H₂O(2g)、クエン酸一水和物(2g)、クエン酸鉄アンモニウム(0.3g)、酵母エキス(0.5g)、50%硫酸(1.6mL)、1000X改变微量金属溶液(1mL)。すべての成分を共に加え、脱イオン水に溶解させる。この溶液を加熱滅菌する(123で20分)。水酸化アンモニウム(28%)によりpHを7.0に調整し、容量にメスアップした。滅菌及びpH調整後にグルコース10g、ビタミン溶液8mL、及び抗生物質を加えた。

【0321】

1000X改变微量金属溶液(1Lあたり) :

クエン酸*H₂O(40g)、MnSO₄*H₂O(30g)、NaCl(10g)、FeSO₄*7H₂O(1g)、CoCl₂*6H₂O(1g)、ZnSO₄*7H₂O(1g)、CuSO₄*5H₂O(100mg)、H₃BO₃(100mg)、NaMoO₄*2H₂O(100mg)。各成分を1つずつ脱イオン水に溶解させ、HCl/NaOHによりpHを3.0に調整し、次に溶液を用量に調整し、0.22μmのフィルタを用い過滅菌する。

【0322】

ビタミン溶液(1Lあたり) :

チアミン塩酸塩(1.0g)、D-(+)-ビオチン(1.0g)、ニコチニ酸(1.0g)、D-パントテン酸(4.8g)、塩酸ピリドキシン(4.0g)。各成分を1つずつ脱イオン水に溶解させ、HCl/NaOHによりpHを3.0に調整し、次に溶液を用量に調整し、0.22μmのフィルタを用い過滅菌する。

【0323】

供給溶液(1kgあたり) :

グルコース(0.57kg)、脱イオン水(0.38kg)、K₂HPO₄(7.5g)、及び100%Foamblast(10g)。すべての成分を合わせて混合し、オートクレーブ処理した。溶液を25に冷却した後、マクロ塩溶液(3.4mL)、1000X改变微量金属溶液(0.8mL)、及びビタミン溶液(6.7mL)を加えた。

【0324】

マクロ塩溶液(1Lあたり) :

MgSO₄*7H₂O(296g)、クエン酸水和物(296g)、クエン酸鉄アンモニウム(49.6g)。すべての成分を水に溶解させ、用量に調整し、0.22μmのフィルタを用い、過滅菌する。

【0325】

MVA経路上流(pCLUPper-MCM82)、MVA経路下流(PL.2-mKKDyI)及びラッカセイ(A. hypogaea)(pET24a-PT7-A)由来のイソプレン合成酵素を過剰発現する大腸菌(E. coli)BL21細胞を用い、15Lのバイオリアクターで発酵を実施する。

【0326】

本実験は、所望の発酵pH 7.0及び温度34でのグルコースからのイソプレン生成をモニターするために実施する。大腸菌(E.coli)株を凍結したバイアルを解凍し、トリプトン酵母エキス培地及び適切な抗生物質を入れたフラスコに接種する。550nm(OD₅₅₀)での吸光度が1.0になるまで接種材料を生育させた後、培養物のうち500mLを15Lのバイオリアクターに接種し、初期槽容量を5Lに調整する。

【0327】

最高供給速度が6g/分に達するまで、指數関数的な速度で供給溶液を添加する。この時間後、6g/分以下の速度にて、代謝に必要とされる量のグルコースを供給する。52時間の発酵期間にバイオリアクターに供給したグルコースの総量は6.8kgである。誘導は、イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加し実施する。細胞のOD₅₅₀が6に達した時に、濃度が100uMになるようにして反応槽にIP

10

20

30

40

50

T G を添加し 1 回目の誘導を行い、細胞の O D ₅₅₀ が 100 に達した時に、濃度が 100 uM になるようにして反応槽に I P T G を添加し 2 回目の誘導を行う。

【 0 3 2 8 】

生物反応器から放出された気体に含まれるイソブレン濃度を、 i S C A N (H a m i l t o n S u n d s t r a n d) 質量分析計を用い測定する。

【 0 3 2 9 】

配列

M E A ウラジロハコヤナギ (P. alba) I s p S のアミノ酸配列

MEARRSANYEPNSWDYDYLSSDTDESIEVYKDKAKKLEAEVRREINNEKAELTLLEL
 IDNVQRLGLGYRFESDIRGALDRFVSSGGFDAVTKTS LHGTALSFRLLRQHGFEVSQEAF
 SGFKDQNNGNFLNLKEDIKAILSLYEASFLALEGENILDEAKVFAISHLKELSEEKIGKEL
 AEQVNHALELPLHRRRTQRLEAVWSIEAYRKEDANQVLLELAILDYNMIQS VYQRDLR
 ETSRWWRRVGLATKLHFARDRLIESFYWAVGVAFEPQYSDCRNSVAKMFSFVTIIDDY
 DVYGLDELELFTDAVERWDVNAINDLPDYMKLCFLALYNTINEIAYDNLKDKGENILP
 YLT KAWADLCNAFLQEAKWLYNKSTPTFDDYFGNAWKSSGPLQLVFAYFAVVQNIK
 KEEIENLQKYHDTISRP SHIFRLCN DLASASAEIARGETANSVSCY MRTKGISEELATESV
 MNLI DETWKKMNKEKLGGSLFAKPFVETAINLARQSHCTYHNGDAHTSPDELTRKRVL
 SVITEPILP FER (配列番号1)

10

20

30

40

50

【 0 3 3 0 】

M E A ウラジロハコヤナギ (P. alba) I s p S の核酸配列

atggaaggcacgtcgtctgcgaactacgaaccta acagctggactatgattac ctgcgtcccgacacggac gaggccatcgaagtat
 acaaagaca aaggc gaaaaa agctgg aagccg aagttcgtcgcg a gaga ttataac gaaaaa agcaga atttctgaccctgctt gaaactgattt
 acaacgtccagegcctggcctgggttaccgtt cegagtcgtatccgtt ggtgcgc tggatcgttccgcggcgtt cgtatgcgg
 taaccaagacttccctgcacggta cggcactgttccgtctgcgtcaacacgg tttgagg tttctcagg aagcgtt cagcggc ttca
 agaccaaaa acggca acttctgg aagaacctgaagg aagat atca aagctatccctgagcctgtacgaggccagttctggc tctgg aagg
 cggaaaacatctggac gaggcgaagg tttcgc aatctcatctgaaactgtctgaagaaa agatcggtaa aagagactggcagaaca
 ggtgaaccatgcactggaactgccactgc catgcgcgtactcagcgtt cggatcgttccgc taccgtaaaaggagg
 cgccgaaatcagg tctgtt cggac gtttgc aattctgattaca acatgatccatgtt cgtt accagcgtt gatctgcgtt gaaac
 gtcccgtt ggtt gctt ggcgaccaaa actgcacttgcgtt gaccgcctgattgagatcgtt cacttggccgtt ggtt tagcat
 tgcgc aatactccgactgccgtaactccgtcga aaaaatgtttcttcgttaaccattatcgcac gatatctac gatgtata
 cggcaccctggac gactgagcttactgtcagttgac gttggac gtaaac gccatcaac gacctgccggattacatgaaact
 gtgc tttctgtt ggtt gctt gctt gctt gtaaca aatctccgaccccttgcgtt gacccatctctgc
 ttcccatatctccgtctgtcaatgacctggcttagcgcgtctgcggaaatgcgcgtt gaaaccgc aatagcgttctgtt
 tacatgcgc actaaaggatctccgaagaactggctaccgaaagcgtt gatgaatctgatcgtt gaaaccctgcaaaa
 ataccatgacaccatctctgc tcccatggatgagctgacccgcaaa acgcgtt ctgtt gtaatcactgaacc
 gattctgcctt gttgaac gctaa (配列番号2)

【 0 3 3 1 】

ラッカセイ (*A. hypogaea*) I s p S のアミノ酸配列

MNTRRSANYQPNLWDFEFLQSVENDLQVERLEERARKLEEVRLGMKKVEIEPLSLLELM
MDNVERLGLTYKFEEDIKSALNNRIVPLLHHHTINKYGLHATALSFRFLRQHAFHVSPD
VFESFKEEGKFKEISGDVLGLLNLYETSYLGFEGETILDEARAFSATHLKKNLLQTNQVQ
NKVMAEKVRHALELPYHRRVHRLEARWFIERYEQKEAHDGALLELA
KLDNMVQSV
MKKELQELSRRWWREIGLTSKLDFVRDRLMEVYFWALGMAPHQLTECRKAVTKMFGL
VTIIDDVYDVGTLDELQLFTDAVDRWDVNAVETLPDYMKLCYLALYNSVNDTAYST
LREKGDNSLPHLAKSWRDLCKAFLQEAKWSNNKIIPFDAYIRNASVSSSGALLAPCY
FSVTQDSTSQAIDSITNYHGIVRSSCAIFRLCNDLATSAAE
LERGETTNSITSYMTENGTT
EEEARESLGKLIDQEWWKMNRDVVLESAYPNVFKELAINMARVSHCTYQYGDGLGRPD
DTAENRIKLSLIEPIPIN (配列番号3)

【 0 3 3 2 】

ラッカセイ (*A. hypogaea*) I s p S の核酸配列

〔 0 3 3 3 〕

ダイズ 1 (G. max 1) I s p S のアミノ酸配列

METRRSANYQPNLWNFEFLPPSLENDHKVEKLEERARKVEEEVRRMINGADTEALRL
ELIDEIQLGLTYKFEKDIFKALEKTISLDENEKHISGLHATALSFRLLRQHGFEVSQDV
KRFKDKEGGFINELKGDMDMQGLLSLYEASYLGFEGETLLDEARAYSITHLKNNLKVGVN
TEVKEQVSHALELPYHRGLNRLEARWFLEKYEPNESHVVLLAKIDFNLVQVMYQK
ELRELSRWSEMGLTSKLKFVRDRLMEVYFWVLGMAPRPQFSECRKAVTKTFALIGII
DDVYDVYGTLDLQLFTDAIERWDVNAMNTLPDYMKLCYLAVYNTVNDTCYSTLKA
KGHNNSMSYLTWSWCELCKAFLQEAKWSNNKIVPTFSKYLENASVSSSGMALLTASYFS
VCQQQDISNQQALCSLTNFQGLVRSSSNIFRLCNDLATSAAELETGETANSITCYMHEKD
TSEEQAREELTNLIDAEWKKMNREFVSNSTLPKAFKEIAINMARVSHCMYQYEDGLGR
PGYTENKIKLLLIDPVPIN (配列番号5)

10

【 0 3 3 4 】

20

30

40

(配列番号6)

【 0 3 3 5 】

ダイズ 2 (G. max2) I s p S のアミノ酸配列

METRRSANYQPNLWNFEFLPPSLENDHKVEKLEERAKKVEEEVRKVINGIDTKPLLLEI
 DDVQHLGLTYKFEKDIIKALEKIVSLDENEEHKSELYYTALSFRLLRQHGFEVSDVFKR
 FKDKEGGFSGELKGDVQGLLSLYEASYLGFEGDNLLDEARAFSTTHLKNNLKQGINTKE
 AEQVNHALELPYHRRRLQRLEARWYLEKYEPKEPHQLLLAKLDFNMVQLLHQKEL
 QELSRWWSEMGLASKLEFARDRLMEVYFWALGMAPDPQFRECRKAVTKMFGLVTIID
 DVYDIYGTDELQLFTDAVERWDVNNTLPDYMKLCYLALYNTVNDTAYSILKEKG
 RNNLSYLLKKSWCELCKAFLQEAKWSNNKIVPAFSKYLENASVSSSGVALLAPSYSVCQ
 EQDISFSDKTLHYLTNFGLVRSSCTIFRLCNDLTTSAAELEGETTNSIMSYMHENGTS
 EEHACEELRNLDIEWKKMNRQRVSDSTLPKAFAEIAMNARVSHNTYQYGDGLGRPD
 YNIENRIKFLLIDPVPIN (配列番号7)

10

【 0 3 3 6 】

ダイズ2 (G. max 2) I s p S の核酸配列
 atggaaacccgtctgtagcgccaattatacaacctaacctgtggattttagttttgcgcgcgtccctggagaatgtatcacaagggtggaaaaaa
 ctggaaagagcgcgcgaagaaggctcgagaagaagaggctcgcaaggcatcaatggcattgataccaaaccgcgttgctggagttgatcga
 cgtatgtcaacatctggctgacccataagttttagaaggacatcattaaggcgctggagaatgttagtgcgttgcggatgagaacgaagag
 cacaaggcgaattgttattacaccgcgttagcttcgcctgtcgatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 ataaaagggtggttcagcgtgtactgaaaggcgacgtccaaaggctgtgtatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 taacctgctggacgaggcacgtgcatttctacgacgcacctgaagaacaatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 aaccacgcactgaaactgccgtatcaccgtctgcacgtctggaaaggcgatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 ccaccaactgctttggactggctaaatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 gcgagatgggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 agttccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 gcaactgtttacggacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 cacggtaatgatactgcgtactctattctgaaaggagaaggccgcaacaatctgagcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 ctttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 cgctctgtggcccgagctacttcagcgtgtcaggagcaggatattgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 gtctgt
 cattatgttcttatatgcacgagaacggtagccaggcgaagagcatgcctgcgaagagttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 aaccgcacgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 cggcgatggccctgggtcgccggattacaacatcgagaatcgcatcaaatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 (配列番号8)

20

【 0 3 3 7 】

ハッショウマメ (M. pruriens) I s p S のアミノ酸配列

30

40

MATKVLCLSNQFLYPTPTLTSTRFLQTENFTQKTSLINPKPYPLFCVVTSQFSQITEDNTR
RSANYHPNLWNFEFLQSLENDPKIEKLEEKATKLVEEVRHMMNKAETEPLSLLELIDDV
QRLGLTYKFEKDIINALEKTISLDENQKHISGLHATSLSFRLLRQHGFEVSQDVFKKFKD
EDGGFSAELKGDVQGLLSLYEASYLGFEGENLLDEAREFSIEHLKNNLNKGITTKVAEQ
VSHALELPYHRRRIHRLEARWFLDKYEPKESQHKLLLAKLDFNMVQSLHQKELRELS
MWWRREIGLTSKLDVFVRDRLMEVYFWALGMAPDPQFSECRKAVTKMFGLVTIIDDVYD
VYGTLDLQLFTAVERWDVNAINTLPDYMKLCFLALYNTVNDTTYSILKEGHNNIS
YLTWSWCELCKAFLQEAKWSNNKIPTFNKYLRNASVSSSGVALLAPSFFLVCQEVDISE
QALHSLINFHGLVRSSCVIFRLCNDLATSAAEALERGETTNSITSYMHENGTEEQARQEL
RILIDAEWKNMNQERYLDSTLPDAFMEITINLARVSHCTYQYGDGLGRPDYTTKNRIKL
LLIDPLPIN (配列番号9)

[0 3 3 8]

ハッショウマメ (M. pruriens) I s p S の核酸配列
atgaacacgcgtcgctggccaactatcacccaaacctgtggaaacttcgaattctgcaaaggcctggagaatgatccgaagatcgaaaagg
tggaaagagaaggcgacgaagctggcgtgaaggaggttcgacatgtataaggcgaaaccggccgtggccctgtggaaactgt
cgacgacgtgcagcgccctgggttgcacctacaagtgtaaaaagacatcattaatgeactggagaaaacgattagcctggatgagaaccaa
aagcacattagcggcttgcgtgccacgagcctgtcttcgtgtgcggccaaacacgggtttgagggtctcaagatgttgtcaaaaagttaa
agatgaggacgggtggttcagcgccggaaactgaaggcgacgttcagggtctgtcgtcggcggatctggcgtttgagg
tgagaatctgtggatgaagcgccgaaatttccatcgAACACCTGAAAGAACATCTGAACAAGGGTATTACGACCAAGTGGCGGAAACAA
gtgagccacgcctggagctgccgtatcacccgcatecatgcctggaaagcgctgggttccctggacaaatacgAACCGAAAGAGTCC
cagcataagctgtgtggagctggcggaaactggatttcaacatggcagagcctgtcatcaaaaagagctgcgcgagctgagcatgttgt
ggcgtgagattggcctgacccttaagctggacttcgtccgtatcggtatggaaagttactttggcactggcatggcaccggacccgc
aattttctgaatgtcgtaaagcagtgactaaaatgtcggtttggatccatcatgtacgtctacgtgttatgtacgtcgatgttgt
aactgttcaactgacgcggcgtggcgttggacgtcaatgttatcaataccctgcggactatatacgactgtgttgttgcgttacaacac
ggtcaacgacactacccatcagcatcctgaaagaaaaggcacaataacatcagctacttgaccaatcctggcggagctgtgtcaagat
tttctgcaagaagcgaagtggagcaataacaaaatcattccaaaccttcaataagtatctgcgtatgcgagcgtaaacgaccaacagcattaccagct
cctgctggcaccctttctcctgtgtccaggagcaggatattccggcaggcgttgcattccctgttattacgttgcgttgcgttgc
gcagctgtgttatctccgtttgtcaatgtatctggcgtacgcggcgtggcggactgtggatccatgttgcgttgcgttgc
atgcacgagaatggcaccagcgaagagcaggcgtcaggactgtgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
gttatctggatagcagcgtccggatgcctcatggagattaccatcaacctggccgtgttgcgttgcattgttgcgttgcgttgc
tggccgtccggactacaccaccaagaaccgcattaaactgtgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
(配列番号10)

[0 3 3 9]

キマメ (*C. cajan*) I s p S のアミノ酸配列

MATHLLCLSNPSSPSPTLSTATRSFPLTNFNHKTSLANSKPCPFICSQITHHHHTRRS
ANYQPNLWNFEFLQLSQLNHHQVFTMFRRKLEKEVRCCMMNKADAELSLELIDDVQR
LGLTYRFEKDIKVLEKIVSLDEIEKHQSGLHATALTFRLLRQHGFBHQVSQDMFKRFKDK
EGGFNDELKGDVQGLLSLYEASYLGFEGEYLLDEARAFSITHLNNSLKQGINTKLAEQV
SHALQLPHHRRRLHRLEARWQLDKYEPKEPHHLLLHLAKLDFNILQSLYQNELRELSR
WWREMGLTSKLEFVRDRLMEVYFWALGMAPHPEFSECRKAITKMFGVTIIDDVYDV
YGTLDELQLFTDAVERWDVNVVNTLPYYMKLCYLALYNTVNETSYSILKENGHNSLSY
LAKSWCELCKAFLEEAKWSKKVIPALNRYLENAAWVSSSGVALLAPCYFSVCKEEDKI
SDEALHSLTNFHGLVRSSCAIFRLYNDLATSAEELERDETTNSMTCYMHENGSCQQAR
EELRKMIEVEWKMNQEGVLCTLPTAFKEIAMNMARVSHCTYQHGDGLGRPDYTTQ
NRJKLLLIDPLPJN (配列番号11)

10

[0 3 4 0]

20

30

40

【 0 3 4 1 】

フユナラ (*Q. petraea*) I s p S のアミノ酸配列

MTERQSANFQPSLWSYEIQSLKNGYEADLYEDRAKKLGEEVRRMINNKDTKLTTLE
LIDDIERLGLGYRFKEEIMRALDRFTLKGCEEFTNGSIHDTALSFRLLRQHGFGVSQDM
FNCFKDQKGKFKECLSKDIKGLLSLYEASYLGFEGENLLDEAREFTTMHLKDLKGDVSR
TLKEEVHSLEMLHRRMRRLEQRWYIDAYNMKEAHDRKLLEAKLDFNIVQSVHQR
DLKDMSRWQEMGLGNKLSFARDRLMECFFSVGMAFEPQFSNSRKAVTKMFSFITVI
DDIYDVYATLEELEMFTDIVQRWDVKAVKDLPEYMKLCFLALFNTVNEMVYDTLKEQ
GVDILPYLTKAWDICKAFLQETKWRYYKRTPSSEDYLDNAWISVSGALLIAYFLMS
PSITDRAKGLEDYHNILRWPSIIFRLTNLGTSTAELERGETANSILCYMRETSRSEDFA
REHISNLIDKTWKMMNKDRFSDSPFEEPFLETAINLARISHCIYQHGDGHGAPDTRTKDR
VLSLIIEPIPCYDPSTNFHSOIHL (配列番号13)

【 0 3 4 2 】

フユナラ (*Q. petraea*) I s p S の核酸配列

【 0 3 4 3 】

プエラリア・モンタナ (*P. montana*) I s p S のアミノ酸配列

MNSRRSANYQPNLWNFEFLQSLENDLKVEKLEEKATKLEEVRCMINRVDTQPLSLLEL
 IDDVQRQLTYKFEKDIKALENIVLLDENKKNSDLHATALSFRLRQHGFEVSQDVFE
 RFKDKEGGFSGELKGDVQGLLSLYEASYLGFEGENLLEEARTFSITHKNNLKEGINTK
 VAEQVSHALELPYHQRLHRLEARWFLLDKYEPKEPHHQLLLEAKLDFNMVQTLHQKE
 LQDLSRWWTMGLASKLDFVRDRLMEVYFWALGMAPDPQFGECKAVTKMFGLVTII
 DDVYDVYGTLDLQLFTDAVERWDVNAINTLPDYMKLCLALYNTVNDTSYSILKEKG
 HNNLSYLTWSWRELCKAFLQEAKWSNNKIIPAFSKYLENASVSSSGVALLAPSYFSVCQ 10
 QQEDISDHALRSLTDFHGLVRSSCVIFRLCNDLATSAAEALERGETTNSIISYMHENDGTSE
 EQAREELRKLIADAEWKKMNRRVSDSTLLPKAFMEIAVNMARVSHCTYQYGDGLGRP
 DYATENRIKLLLIDPFPINQLMYV (配列番号15)

【 0 3 4 4 】

ブエラリア・モンタナ (P. montana) I s p S の核酸配列

atgaattcccgcttccgc当地actatcagccaaacctgtggatttcgaattcctgcaatccctggagaacgacactgaaagtggaaaagct
 ggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagtgcgtcatgtacaaccgtgttagacaccccagccgtgtccctgtggagctgatcg 20
 acgtgtgcagccctgggtctgaccaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgactgtggacgaaaacaaaaaa
 gaacaaaatctgacctgcacgc当地accgtctgtctttccgtctgc当地cagc当地gggttcaggtgttttgc当地gggtcaagg
 ataaagaaggtggttcagc当地actgaaaggtgacgtccaaggccctgtatgaagc当地tacctgggggggggggggggggggggggg
 gacccgtggaggaggc当地gcttccatc当地ccaccctgaaagaacaaccctgaaagaaggc当地tataccacgaaaccgaaagaaccgca
 tc当地ccagctgtggagctggcaagctggatttaacatggtacagaccctgc当地ccaggc当地gggtccctggataaaatacgaaaccgaaagaaccgca
 accggagatggccctggctagcaaactggatttgacgc当地ccctgtatgggactgggtatggcc当地ccggccagaccgc 30
 agtttggtaatgtc当地caagactgttactaaaatgtttggctgggactgtatggatgtatggactctggacgaaact
 caactgttccaccgtatgttagagc当地ggactgttactaaaatgttccaccgtatgttagagc当地ggactatgttccctggactgttacaaac
 accgttaacgacacgttctattctgaaagagaaaggc当地ataacaaccctgttctatgtacgaaaagctggc当地actgttcaagcc
 ttctgcaagaggcgaaatggccaacaacaacaaaattatcccgcttcccaactgttccctgtatggaaaacgcc当地ggccatgttccctgg
 ctgtggccgcttactttccgtatgccaggc当地ggactatgttccctggactatgttccctggactgttacaaac
 tacatgc当地caacgatggtaccagegaggaacagggcccg当地agaactgttactgttccctgtatggactatgttccctgg
 gtgaaacgctggactccaccctgttccctgtatggactatgttccctggactatgttccctggactatgttccctggactatgttccctgg
 gctgttccctggactatgttccctggactatgttccctggactatgttccctggactatgttccctggactatgttccctggactatgttccctgg
 aa (配列番号16)

【 0 3 4 5 】

p C L 2 0 1 の核酸配列

tggcgaatggacgcgcctgtcgccgcattaagcgccgggtgtgggttacgcgcagcgtaccgctacacttgccagcgcc
ctagcgcccgtccttcgtttcccttcgtccacgttcggcgttccccgtcaagcttaatcgggggctcccttagggtc
cgatttagtgccttaacggcacctegacccaaaaacttgattagggtgatggtcacgttagtggccatgcctgatagacggtttcgccc
cttgacgtggagtccacgtttaatagtggactcttgtccaaactggaacaacactcaaccctatctcggttattttgatttataaggg
atttgccgatttcggcatttggtaaaaaatgagctgatttaaacaaaatttaacgcaatttacaaaatattaacgttacaattttaggtgg
cactttcgggaaatgtcgccgaaccctatttgttatttctaaatcatcattcaataccatatttggaaaaagccgttctgtaatgaaggagaaaactcaccg
aggcagtccataggatggcaagatcctgtatcggtcgattccgactgtccaacatcaataaccattaaattccctcgtaaaaa
taagggttatcaagtgagaaatcaccatgagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagttatgcattttccagacttgtcaacagg
ccagccattacgctcgcatcaaaatcactcgcatcaaccaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgagacgaaatacgcatcgct

(続き)

(続き)

(配列番号34)

(続き)

(続き)

agctgtgaccgtcggagactgcattacgttgcagaggtttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagcagatcaattcgcgcgaa
ggcgaagcggcatgcattacgttgcacccatcgaatggcacaacccatcgccgtatggcatgatagegcggcgaagagagtcaattca
gggttgtaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagtatgccgtgtcttatacagaccgtttccgcgtgtgaaccaggc
agccacgttctcgaaaacgcggaaaaagtggaaagcggcgatggcggagctgaattacattccaacccgtggcacaacaactggc
ggcaaacagtctgtgtatggcgttgcacccatcgccgtgtctggccgtcgcacgcgcgtcgcataattgtcgccgtgataaaatctcgcc
gatcaactgggtgccagcgtgggtgtcgttagaacgaagcggcgtaagcctgtaaagcggcgtgcacaatcttcgc
acgcgtcagtggctgatcatataactatccgtggatgaccaggatgccattgtgttgcgacttgcgtggcatttgcgttatttc
gatgtctctgaccagacacccatcaacagttatttctccatgaagacggtacgcgacttgcgtggcgtggcataaatactca
cagcaaaatcgccgttagcggcccattaagttctgtctggcgtctgcgtggcgtggcataaatactcaactcgcaatcaaattc
agccatagcggaaacgggaaggcgactggagtgccatgtccgggttcaacaaaccatgcataatgctgaatgagggcatgtccactg
cgatgtgttgcacgtccatgttgcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggc
tgggatacgcataccgaagacagactcatgttatatcccgcgtcaaccaccatcaaacaggatttgcgttgcgtggcgtggc
ggaccgttgcactctcagggccaggcgtgaaggcaatcagctgttgcgttgcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggc
gccaatacgcataaccgcctccccgcgttgcgttgcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggc
agcgaacgcataatgttagcgcgaattgatctg (配列番号32)

10

20

【図1】

peanut_fom_1n24. TRRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN
Palba_from_1n24. ARRSPANEPSWVDYDYLSSDDESIEVKDKAKKLEAEVRREINNEKAELTLLEUDN

peanut_fom_1n24. VERLGLTYKFEEDEIKSALNNRIVPLHHHTINKYG---LHATALSFRFLRQAHFVSPD
Palba_from_1n24. VQRQLIGYRFESDIRGALDR---FVSSGGFDAVTKTSLHGTAISFRLLRQHGFVFSQE

peanut_fom_1n24. VFESFKEEKG-FKKEISGDVLGLLNLYETSYLGFEGETILDEARAFSATHLKNLLQTNQV
Palba_from_1n24. AFSGFKDQNGNFMLENLKEDIKAILSLYEASFLAEGENILDEAKVFAISHLKESEL-EKI

peanut_fom_1n24. QNKVMAEKVRHAELPVLHRRVHRLEARWFLERYEQKEAHGDALLEAKLDFNMVQSVMK
Palba_from_1n24. GKELAQ-VNHALEPLHRTQRLAEVWSIEAYRKEDANQVLELAILDYNMIOQSVYQ

peanut_fom_1n24. ELQELSRWWREIGLTSKLDLFRDRMLMEVYFWALGMAPHPQITECRKAVTKMFGLYIIDD
Palba_from_1n24. DLRETCSRWWRRVGLATKLHFARDLRIESFYWAVGVAFEPQYSDCRNSVAKMFSVTIIDD

peanut_fom_1n24. VYDVYGTLDLQLFTDAVDRWDVNAVEITLPDYMMLCYALYNSVNDTAYSTLRKGDNLS
Palba_from_1n24. IYDVYGTLELELFTAVERWDVNAINDLPDYMMLCFLALYNTINEIAYDLNLDKGGENIL

peanut_fom_1n24. PHLAKSWRDLCKAFLQEAWSNNKIIPFDAYIRNASVSSGGALLAPCYFSVTQDSTSQ
Palba_from_1n24. PYLTAKAWDLCNAFLQEAQWLKNKSTPTFDDYFGNAWKSSSGPLQLVVFAYFAVV-QNIKK

peanut_fom_1n24. -AIDSFTNYHGIVRSSCAIFRLCNDLATSAAELERGETTSITSYMTENGTEEEARESL
Palba_from_1n24. EEIENLQKYHDTISRPISHIFRLCNDLASASAEIARGETANSVSCYMRTKGISEEATESV

peanut_fom_1n24. GKLIDQEWKKMNRDVVLSEASYPNVFKEIAINMARVSHCTYQYGDGLGRPDDAENRIKLS
Palba_from_1n24. MNLIDETWWKKMNKEKLGSSLFAKPPVETAINLARQSHCTYHNGDAHTSPDLETRKRVLSV

peanut_fom_1n24. LIEPIK
Palba_from_1n24. ITEPIL

【図2A】

A_hypogaea	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	50
Glyma05g21900_1	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
Glyma20g18280_1_FG	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
P_montana	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
C_limon	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
Q_flex	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
V_vinifera	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
C_Eneupile	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
E.globulus_trunc	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
M_alternifolia	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
Glyma05g45780_1	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
Glyma12g10990_1	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
L_japonicus	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
M_truncatula	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
Q_petraea	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
P.alba	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
S.alba	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
コンセナス配列	(1) METRSANYQPNLWDFEFLQSVENTLQVERLEERARKLEEVRLMKVEIEPLSLELMNDN	
	51	
A_hypogaea	(45) EMKKVEIEPDSLZLMDNNPDRGTTNTYDEIISL-SALINNEPVEVLRHHTIN	100
Glyma05g21900_1	(12) MNGAINTBALPDLLEELIREPQRLGETKTFKQJLIALEK--TISLDENEKH	
Glyma20g18280_1_FG	(46) VENGLDTKEE-LZELTIDWQHGETKTFKQJLIALEK--TISLDENEKH	
P_montana	(45) AENRVDTGELSLISLTDLWQHGETKTFKQJLIALEK--TISLDENEKH	
C_limon	(45) AUKOVI-EUHQELTDLHNLQHQLGAMP-FETB-IHNLHNNYQDYYVWR	
Q_flex	(45) MIHKOVV-NPFOQELTDTQRLGSHYPERK-DELKJLNLJYQYHHEEWQ	
V_vinifera	(45) MIKETDS-SLAQZELLIDVQRLGSHYPERK-DELKJLNLJYQYHHEEWQ	
C_Eneupile	(45) MIKETDS-SLAQZELLIDVQRLGSHYPERK-DELKJLNLJYQYHHEEWQ	
E.globulus_trunc	(51) UNDEKAETPTTFTTDDPQRLGSHYPERK-DELKJLNLJYQYHHEEWQ	
M_alternifolia	(51) ANDGNAED-HAI FADNEDTQRLGSHYPERK-DELKJLNLJYQYHHEEWQ	
Glyma05g45780_1	(18) MEKDENTDWLNEKEDLWDW-RQ-CGISTMEIGEALHRCESSETFIDTT	
Glyma12g10990_1	(40) MEKDENSLEWNLNEKEDLWDW-RQ-CGISTMEIGEALHRCESSETFIDTT	
L_japonicus	(45) EERDRAELWTTEDLIDW-RQ-CGISTMEIGEALHRCESSETFIDTT	
M_truncatula	(6) MEKDEN--VN-1ESLIPMV-A-LGSHYPERK-DEIGALDR-ELSERKCG--RN	
Q_petraea	(45) MNNKDTKLDTTLELIDW-RQ-CGISTMEIGEALHRCESSETFIDTT	
P.alba	(45) EINNEKAEPETLISLTDNQRLGSHYPERK-DEIGALDR-ELSERKCG--RN	
S.alba	(45) KENNETAEPETLQSLIDTQRLGSHYPERK-DEIGALDR-ELSERKCG--RN	
コンセナス配列	(51) MI E L LEID VQRLSL Y FE EIR AL R LS	

【 図 2 B 】

A. hypogaea	(95)	K---YGLLATAFLSPLFQDQEAVVSPVPTESPKD---EGKKEKIGSCSIVGHL	150
Glyma09g21900.1	(60)	I---SELGYLATAFLSPLFQDQEAVVSPVPTESPKDPMKKEGGEGEINNKGMDH	
Glyma09g18200.1_FG	(93)	K---SELGYLATAFLSPLFQDQEAVVSPVPTESPKDPMKKEGGEGEINNKGMDH	
F. montana	(93)	K---SELGYLATAFLSPLFQDQEAVVSPVPTESPKDPMKKEGGEGEINNKGMDH	
C. limon	(93)	KE---NLVYLTAFSLFRLDQHSEYVSEGVENGEVDDG---GFPDFDKEGK	
O. ilex	(94)	AE---NLVYLTAFSLFRLDQHSEYVSEGVENGEVDDG---GFPDFDKEGK	
V. vinifera	(94)	KD---DLVYLTAFSLFRLDQHSEYVSEGVENGEVDDG---GFPDFDKEGK	
C. tempranile	(94)	DEA---DTPLFLLQHSEYVSEGVENGEVDDG---GFPDFDKEGK	
E. globulus_trunc	(101)	K---SELGYLATAFLSPLFQDQEAVVSPVPTESPKDPMKKEGGEGEINNKGMDH	
M. alternifolia	(101)	K---SELGYLATAFLSPLFQDQEAVVSPVPTESPKDPMKKEGGEGEINNKGMDH	
Glyma09g45786.1	(49)	NNHRSLELTLAISLVEVLR---EQLVYLTAFSLFRLDQHSEYVSEGVENGEVDDG	
Glyma12g10990.1	(89)	NH1HGLCQKLAISLVEPRL---EQLVYLTAFSLFRLDQHSEYVSEGVENGEVDDG	
L. japonicus	(91)	--HPLR---KQPLPPLP---EQLVYLTAFSLFRLDQHSEYVSEGVENGEVDDG	
M. truncatula	(52)	MFGCSLLEATLAFSLFRLDQHSEYVSEGVENGEVDDG---GFPDFDKEGK	
O. petreæa	(95)	G---SMTDIALSPLFQDQEAVVSPVPTESPKDPMKKEGGEGEINNKGMDH	
P. alba	(95)	T---SMTDIALSPLFQDQEAVVSPVPTESPKDPMKKEGGEGEINNKGMDH	
S. salsa	(95)	T---SMTDIALSPLFQDQEAVVSPVPTESPKDPMKKEGGEGEINNKGMDH	
コシエンサス配列	(161)	LRHATLAFSLFRLDQHSEYVSEGVENGEVDDG---GFPDFDKEGK	
A. hypogaea	151		200
Glyma09g21900.1	(142)	NLVE---SPLFQDQEAVVSPVPTESPKD---EGKKEKIGSCSIVGHL	
Glyma09g18200.1_FG	(108)	SPLASR---FEQE---TLDLPAASVTHIHNKLNHG---VNTTAEQFW---HALA	
F. montana	(141)	SPLASXLY---FEQE---TLDLPAASVTHIHNKLNHG---VNTTAEQFW---HALA	
C. limon	(141)	SPLASXLY---FEQE---TLDLPAASVTHIHNKLNHG---VNTTAEQFW---HALA	
O. ilex	(138)	SLEASW---VSESE---IMPEW---PTEHKTQVWIKMSKMEEDWVPAEGL	
V. vinifera	(142)	CEKASXLY---VSESE---ADPAPHRHIGQEQ---IQQNAIATVWBNIA	
C. tempranile	(140)	SLEASXLY---VSESE---VLELDEAER---THIMDIEK---IUDFHJH	
E. globulus_trunc	(148)	SLEASAS---LATEE---LH---AASSAATKHNHEDN---SVDQDQDQDV---HELI	
M. alternifolia	(148)	SLEASASLAAE---LH---AASSAATKHNHEDN---HDQDQDQDQDV---HELI	
Glyma09g45780.1	(118)	SLEASASLAAE---LH---AASSAATKHNHEDN---HDQDQDQDQDV---HELI	
Glyma12g10990.1	(138)	SLEASASLAAE---LH---AASSAATKHNHEDN---HDQDQDQDQDV---HELI	
L. japonicus	(139)	SLEASASLAAE---LH---AASSAATKHNHEDN---NN---LMLVQWVH	
M. truncatula	(102)	S---KLASLAAE---LH---AASSAATKHNHEDN---EGH---SS---LMLVQWVH	
O. petreæa	(142)	SLEASASLAAE---LH---AASSAATKHNHEDN---GD---VS---TRKEV---REI	
P. alba	(142)	SLEASASLAAE---LH---AASSAATKHNHEDN---EK---GKELARVWNVH	
S. salsa	(142)	SLEASASLAAE---LH---AASSAATKHNHEDN---EK---GKELARVWNVH	
コシエンサス配列	(151)	SLEYASPLAFEGMEEAARPSA---HHL---L---E---QVWVH	

【 図 2 C 】

(図 2 D)

		350
A. hypogaea	(290)	
Glyma09g21900.1	(254)	
Glyma20g18280.1_FG	(287)	
P. montana	(287)	
C. limon	(287)	
Q. ilex	(288)	
V. vinifera	(288)	
C. tenuepila	(288)	
E. globulus, trunc	(285)	
M. alternifolia	(293)	
Glyma06g45780.1	(293)	
Glyma12g10900.1	(265)	
L. japonicus	(285)	
M. trunacatula	(243)	
Q. petraea	(287)	
P. alba	(288)	
S. alba	(288)	
コンセナス配列	(301)	
A. hypogaea		351
Glyma09g21900.1	(339)	
Glyma20g18280.1_FG	(303)	
P. montana	(336)	
C. limon	(336)	
Q. ilex	(337)	
V. vinifera	(337)	
C. tenuepila	(337)	
E. globulus, trunc	(342)	
M. alternifolia	(342)	
Glyma06g45780.1	(314)	
Glyma12g10900.1	(334)	
L. japonicus	(334)	
M. trunacatula	(297)	
Q. petraea	(336)	
P. alba	(337)	
S. alba	(337)	
コンセナス配列	(301)	
		400

【図2E】

	401	450
<i>A. hypogaea</i>		
Osg21900.1	(389) YERPNASGSSEGGAAIAPCYESTIDPST--S-CGQDLSITNYHGIVTNSC (353) YLENASNGSSGMHNTATSYEWSQCDQ-1NSQACGTCITGQWRSNS	
18280_1_FG	(386) YLENASWVGSGVALLAEPYSSWQCGQDPSISDTKHTYTGQWLPESS	
<i>P_montana</i>	(386) YLENASNGSSGMHNTATSYEWSQCDQ-1NSQACGTCITGQWRSNS	
<i>C. limon</i>	(387) YLENASNGSSGMHNTATSYEWSQCDQ-1NSQACGTCITGQWRSNS	
<i>Q. ilex</i>	(387) YLENASNGSSGMHNTATSYEWSQCDQ-1NSQACGTCITGQWRSNS	
<i>V.vinifera</i>	(387) YLENASNGSSGMHNTATSYEWSQCDQ-1NSQACGTCITGQWRSNS	
<i>Eunipula</i>	(384) YLCTSWNS-SLPMOTW-FALGNGTAA---ES-SFABKISDEGRLR	
<i>Ulmus trunc</i>	(382) YLNNNGWSSVSVVILTHAYELNSPSSR--KEELESLSHVHLLPESS	
<i>termitifolia</i>	(392) YLNNNGWSSVSVVILTHAYELNSPSSR--KEELESLSHVHLLPESS	
Oeg45780.1	(364) YLNNNWMSVGCVVIIHTAYELNSPSSR--KEELESLSHVHLLPESS	
12g10990.1	(384) YLNNNWMSVGCVVIIHTAYELNSPSSR--KEELESLSHVHLLPESS	
<i>Japonicus</i>	(384) YLNNNWMSVGCVVIIHTAYELNSPSSR--KEELESLSHVHLLPESS	
<i>truncatula</i>	(347) YLNNNWMSVGCVVIIHTAYELNSPSSR--KEELESLSHVHLLPESS	
<i>Q.petreae</i>	(386) YLNNNWMSVGCVVIIHTAYELNSPSSR--KEELESLSHVHLLPESS	
<i>P.alba</i>	(387) YGNNAKNSGSSEGLVLTAVAYAVONIK---KEEELDLSKHTPSBPH	
<i>S.alba</i>	(387) YPCKNNSGSSEGLVLTAVAYAVONIK---KEEELDLSKHTPSBPH	
コンセンサス配列	(401) ML_NAWVSVG VIL_HAYEV Q I KEALESLE YH LLK SI 451	500
<i>A. hypogaea</i>		
Osg21900.1	(435) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	
18280_1_FG	(436) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	
<i>P_montana</i>	(425) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	
<i>C. limon</i>	(433) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	
<i>V.vinifera</i>	(433) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	
<i>Eunipula</i>	(433) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	
<i>Ulmus trunc</i>	(433) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	
<i>termitifolia</i>	(438) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	
Oeg45780.1	(430) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	
12g10990.1	(430) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	
<i>Japonicus</i>	(395) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	
<i>truncatula</i>	(395) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	
<i>Q.petreae</i>	(432) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	
<i>P.alba</i>	(433) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	
<i>S.alba</i>	(433) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	
コンセンサス配列	(451) TPLQLDNQDLSIATDEEGETTSNTGTTEN-STECAEEDGKGLIE ERLNLQIEMIISAAEGETTEAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	

【 図 2 F 】

	501	550
<i>A. hypogaea</i>	(484) KGRKQKTRPVLRLSA-KPAPVKEELAQNMPVPSKHCQ-OMVGLGR-----	PDT
Glyma0g211900_1	(451) KGRKQKTRPVLNSIT-LPKAKPEELAQNMAEVSQHMYCQEVGLGR-----	PCT
Glyma0g18280_1_FG	(485) KGRKQKTRPVLPSITP-LPKAKPEELAQNMAEVSQHMYCQEVGLGR-----	PYD
<i>P. montana</i>	(485) KGRKQKTRPVLPSITP-LPKAKPEELAQNMAEVSQHMYCQEVGLGR-----	PYD
<i>C. limon</i>	(452) KGRKQKTRPVLADSKLSPSTTITIE-LNLNLTEFLSHPLVFGEDGCV-----	QYD
<i>Q. ilex</i>	(482) KGRKQKTRPVLKASS--PESHTIETEFLSHPLVFGEDGCV-----	TGE
<i>V. vinifera</i>	(482) KGRKQKTRPVLKASS--PESHTIETEFLSHPLVFGEDGCV-----	TGE
<i>C. tenunipile</i>	(479) WKRKQKTRPVLKASS--PESHTIETEFLSHPLVFGEDGCV-----	TYGE
E.gibbosulus trunc	(487) WKRKQKTRPVLKASS--LPHLPDHDHAGKQWVQKTCGDKG-SGPGDQ-SQ	TYGE
<i>M. alternifolia</i>	(487) WKRKQKTRPVLKASS--LPHLPDHDHAGKQWVQKTCGDKG-SGPGDQ-SQ	PDL
Glyma0g645780_1	(459) WKRKQKTRPVLKASS--LPHLPDHDHAGKQWVQKTCGDKG-SGPGDQ-SQ	PDL
Glyma1z10990_1	(479) WKRKQKTRPVLKASS--PESHTIETEFLSHPLVFGEDGCV-----	PDL
<i>L. japonicus</i>	(479) WKRKQKTRPVLKASS--PESHTIETEFLSHPLVFGEDGCV-----	PDL
<i>M. truncatula</i>	(442) WKRKQKTRPVLKASS--PESHTIETEFLSHPLVFGEDGCV-----	PDL
<i>O. petreata</i>	(481) WKRKQKTRPVLKASS--PESHTIETEFLSHPLVFGEDGCV-----	PDT
<i>P. alba</i>	(482) WKRKQKTRPVLKASS--PESHTIETEFLSHPLVFGEDGCV-----	PDL
<i>S. alba</i>	(482) WKRKQKTRPVLKASS--PESHTIETEFLSHPLVFGEDGCV-----	PDL
コセンサス配列	(501) WKRKQKTRPVL S F K F VEIAINLARSHCTYQYGDGHGA	PD
	551	550
<i>A. hypogaea</i>	(529) AENRKLKSLSPTEIPID-----	SEQ ID NO: 18
Glyma0g211900_1	(496) AENRKLKSLSPTEIPID-----	SEQ ID NO: 20
Glyma0g18280_1_FG	(530) AENRKLKSLSPTEIPID-----	SEQ ID NO: 22
<i>P. montana</i>	(531) AENRKLKSLSPTEIPID-----	SEQ ID NO: 24
<i>C. limon</i>	(528) AENRKLKSLSPTEIPID-----	SEQ ID NO: 17
<i>Q. ilex</i>	(527) AENRKLKSLSPTEIPID-----	SEQ ID NO: 19
<i>V. vinifera</i>	(527) AENRKLKSLSPTEIPID-----	SEQ ID NO: 21
<i>C. tenunipile</i>	(527) AENRKLKSLSPTEIPID-----	SEQ ID NO: 21
E.gibbosulus trunc	(532) KIDMFLPMLAEPDQ-ADEAKGISFVVDGSGA	SEQ ID NO: 23
<i>M. alternifolia</i>	(532) KIDMFLPMLAEPDQ-ADEAKGISFVVDGSGA	SEQ ID NO: 25
Glyma0g645780_1	(504) KIDMFLPMLAEPDQ-ADEAKGISFVVDGSGA	SEQ ID NO: 27
Glyma1z10990_1	(524) AENRKLKSLSPTEIPID-----	SEQ ID NO: 29
<i>L. japonicus</i>	(524) AENRKLKSLSPTEIPID-----	SEQ ID NO: 31
<i>M. truncatula</i>	(487) AENRKLKSLSPTEIPID-----	SEQ ID NO: 33
<i>O. petreata</i>	(526) AENRKLKSLSPTEIPID-----	SEQ ID NO: 35
<i>P. alba</i>	(527) AENRKLKSLSPTEIPID-----	SEQ ID NO: 26
<i>S. alba</i>	(527) AENRKLKSLSPTEIPID-----	SEQ ID NO: 1
コセンサス配列	(551) NPT SLTTEPI I	SEQ ID NO: 28

【図3A】

【図3B】

【図3C】

	449	460	470	480	490	504	Section 9	
ウラジロハコヤナギ(<i>P. alba</i>)	(449)	L ₁ S ₁ A ₁ C ₁ E ₁ A ₂ B ₁ D ₁ M ₁ N ₁ T ₁ R ₁ F ₁ H ₁ K ₁ L ₁ P ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
ブエラリモントナ(<i>P. montana</i>)	(442)	L ₁ S ₁ A ₁ C ₁ E ₁ A ₂ B ₁ D ₁ M ₁ N ₁ T ₁ R ₁ F ₁ H ₁ K ₁ L ₁ P ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
ラッカツイ(A. hypoleuca)	(442)	L ₁ S ₁ A ₁ C ₁ E ₁ A ₂ B ₁ D ₁ M ₁ N ₁ T ₁ R ₁ F ₁ H ₁ K ₁ L ₁ P ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
シマメ(C. cajemae)	(441)	L ₁ S ₁ A ₁ C ₁ E ₁ A ₂ B ₁ D ₁ M ₁ N ₁ T ₁ R ₁ F ₁ H ₁ K ₁ L ₁ P ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
ダイズ(G. max) 18280	(443)	L ₁ S ₁ A ₁ C ₁ E ₁ A ₂ B ₁ D ₁ M ₁ N ₁ T ₁ R ₁ F ₁ H ₁ K ₁ L ₁ P ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
ダイズ(G. max) 21900	(443)	L ₁ S ₁ A ₁ C ₁ E ₁ A ₂ B ₁ D ₁ M ₁ N ₁ T ₁ R ₁ F ₁ H ₁ K ₁ L ₁ P ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
ハッシュドマッシュ(M. pruriens)	(441)	L ₁ S ₁ A ₁ C ₁ E ₁ A ₂ B ₁ D ₁ M ₁ N ₁ T ₁ R ₁ F ₁ H ₁ K ₁ L ₁ P ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
フユナラ(<i>P. petraea</i>)	(439)	L ₁ S ₁ A ₁ C ₁ E ₁ A ₂ B ₁ D ₁ M ₁ N ₁ T ₁ R ₁ F ₁ H ₁ K ₁ L ₁ P ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
	505	510	520	530	540	550	560	Section 10
ウラジロハコヤナギ(<i>P. alba</i>)	(495)	F ₁ A ₁ S ₁ C ₁ E ₁ B ₁ D ₁ G ₁ H ₁ I ₁ J ₁ K ₁ L ₁ M ₁ N ₁ P ₁ R ₁ T ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
ブエラリモントナ(<i>P. montana</i>)	(498)	F ₁ A ₁ S ₁ C ₁ E ₁ B ₁ D ₁ G ₁ H ₁ I ₁ J ₁ K ₁ L ₁ M ₁ N ₁ P ₁ R ₁ T ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
ラッカツイ(A. hypoleuca)	(497)	F ₁ A ₁ S ₁ C ₁ E ₁ B ₁ D ₁ G ₁ H ₁ I ₁ J ₁ K ₁ L ₁ M ₁ N ₁ P ₁ R ₁ T ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
シマメ(C. cajemae)	(496)	F ₁ A ₁ S ₁ C ₁ E ₁ B ₁ D ₁ G ₁ H ₁ I ₁ J ₁ K ₁ L ₁ M ₁ N ₁ P ₁ R ₁ T ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
ダイズ(G. max) 18280	(498)	F ₁ A ₁ S ₁ C ₁ E ₁ B ₁ D ₁ G ₁ H ₁ I ₁ J ₁ K ₁ L ₁ M ₁ N ₁ P ₁ R ₁ T ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
ダイズ(G. max) 21900	(498)	F ₁ A ₁ S ₁ C ₁ E ₁ B ₁ D ₁ G ₁ H ₁ I ₁ J ₁ K ₁ L ₁ M ₁ N ₁ P ₁ R ₁ T ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
ハッシュドマッシュ(M. pruriens)	(496)	F ₁ A ₁ S ₁ C ₁ E ₁ B ₁ D ₁ G ₁ H ₁ I ₁ J ₁ K ₁ L ₁ M ₁ N ₁ P ₁ R ₁ T ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
フユナラ(<i>P. petraea</i>)	(494)	F ₁ A ₁ S ₁ C ₁ E ₁ B ₁ D ₁ G ₁ H ₁ I ₁ J ₁ K ₁ L ₁ M ₁ N ₁ P ₁ R ₁ T ₁ V ₁ W ₁ X ₁ Z ₁						
	565	580	590	600	610	620	630	Section 11
ウラジロハコヤナギ(<i>P. alba</i>)	(565)							
ブエラリモントナ(<i>P. montana</i>)	(568)							
ラッカツイ(A. hypoleuca)	(567)							
シマメ(C. cajemae)	(566)							
ダイズ(G. max) 18280	(568)							
ダイズ(G. max) 21900	(568)							
ハッシュドマッシュ(M. pruriens)	(566)							
フユナラ(<i>P. petraea</i>)	(564)							

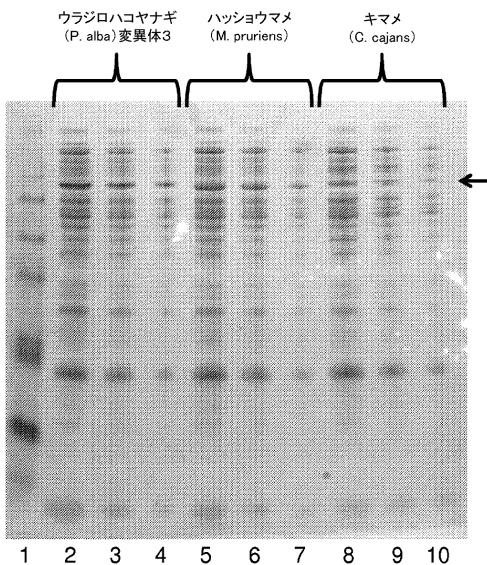
【図4】

A) ウラジロハコヤナギ
(*P. alba*) MEA

B)

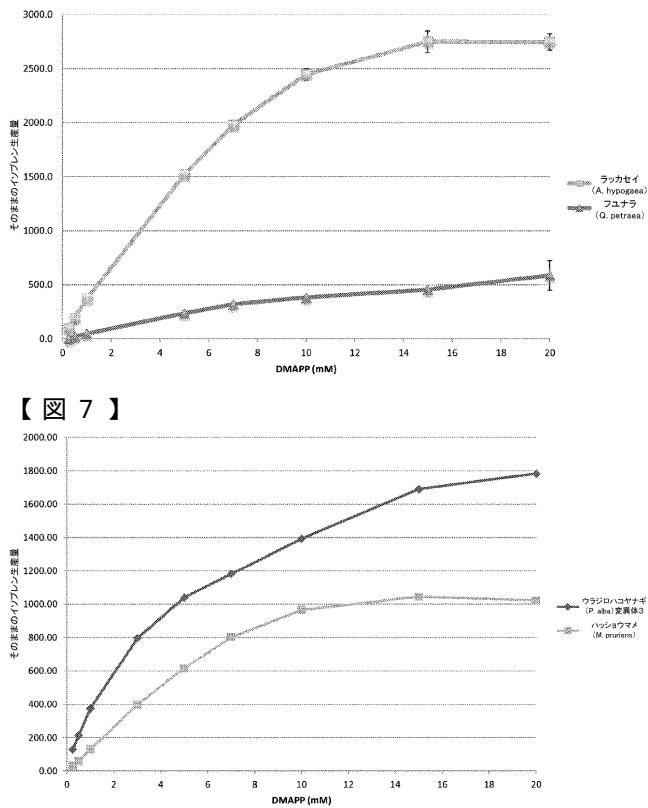
	ラッカセイ (<i>A. hypogaea</i>)	ダイズ1 (<i>G. max</i> 1)	ダイズ2 (<i>G. max</i> 2)
1	Weak band	Strong band	Strong band
2	Strong band	Strong band	Strong band
3	Strong band	Strong band	Strong band
4	Strong band	Strong band	Strong band
5	Strong band	Strong band	Strong band
6	Strong band	Strong band	Strong band
7	Strong band	Strong band	Strong band
8	Strong band	Strong band	Strong band
9	Strong band	Strong band	Strong band
10	Strong band	Strong band	Strong band

【図5】

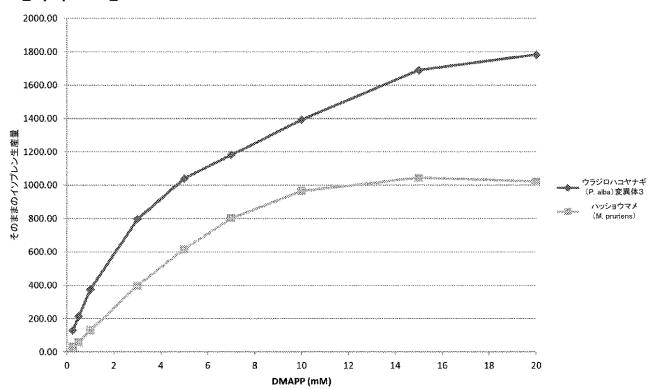


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

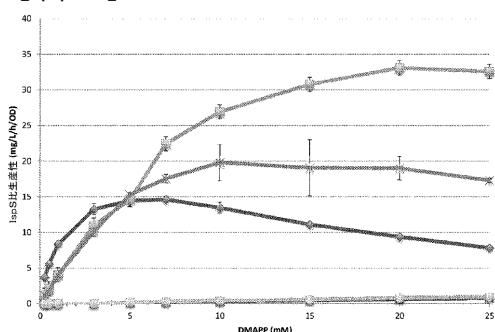
【図6】



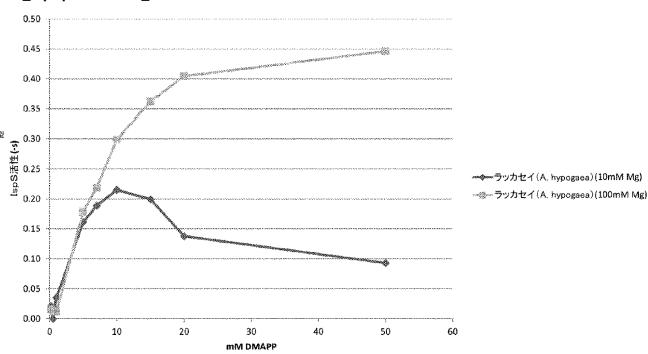
【図7】



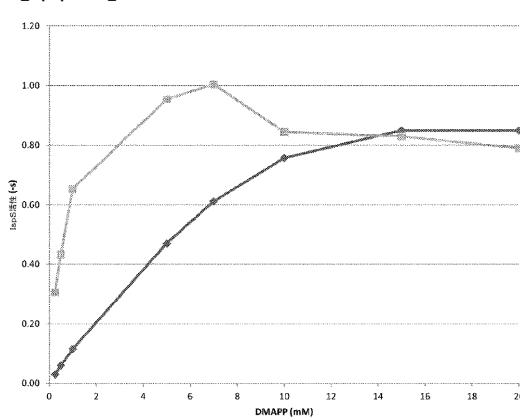
【図8】



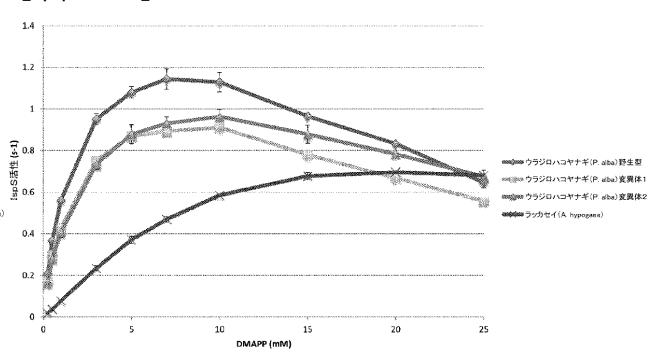
【図10】



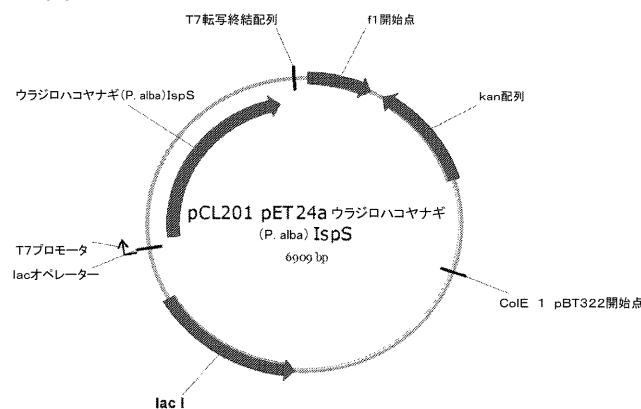
【図9】



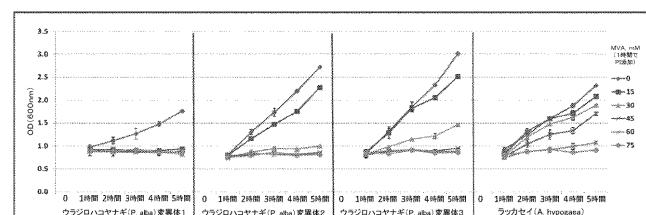
【図11】



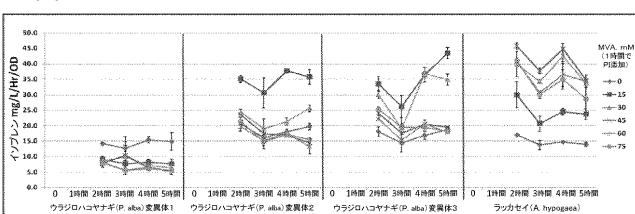
【図12】



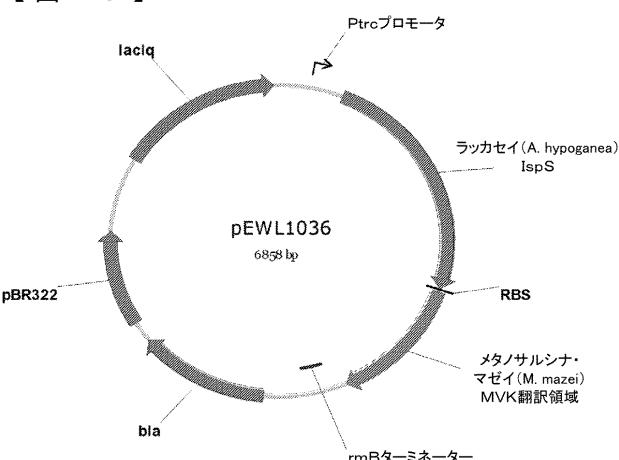
【図13】



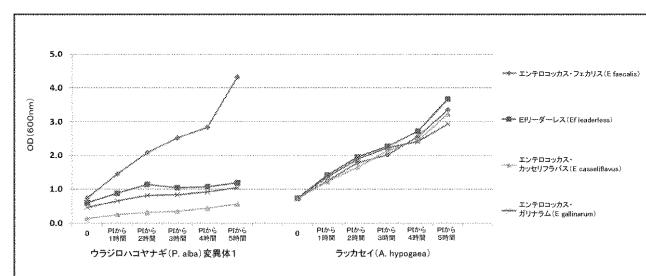
【図14】



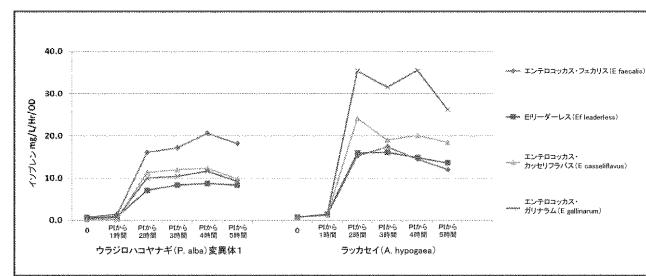
【図15】



【図16】



【図17】



【配列表】

2015521036000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US2013/039315									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/415 C12N9/88 ADD.											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, PAJ, Sequence Search											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 2009/132220 A2 (DANISCO US INC [US]; GOODYEAR TIRE & RUBBER [US]; CERVIN MARGUERITE A) 29 October 2009 (2009-10-29) claims 1-53; sequences 122, 152 -----</td> <td style="padding: 2px;">1-46</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">DATABASE UniProt [Online] 21 March 2012 (2012-03-21). "SubName: Full=Isoprene synthase; Flags: Fragment; ", XP002702769, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:H2CSU6 Database accession no. H2CSU6 the whole document ----- -/--</td> <td style="padding: 2px;">1-11, 18-23</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2009/132220 A2 (DANISCO US INC [US]; GOODYEAR TIRE & RUBBER [US]; CERVIN MARGUERITE A) 29 October 2009 (2009-10-29) claims 1-53; sequences 122, 152 -----	1-46	X	DATABASE UniProt [Online] 21 March 2012 (2012-03-21). "SubName: Full=Isoprene synthase; Flags: Fragment; ", XP002702769, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:H2CSU6 Database accession no. H2CSU6 the whole document ----- -/--	1-11, 18-23
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	WO 2009/132220 A2 (DANISCO US INC [US]; GOODYEAR TIRE & RUBBER [US]; CERVIN MARGUERITE A) 29 October 2009 (2009-10-29) claims 1-53; sequences 122, 152 -----	1-46									
X	DATABASE UniProt [Online] 21 March 2012 (2012-03-21). "SubName: Full=Isoprene synthase; Flags: Fragment; ", XP002702769, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:H2CSU6 Database accession no. H2CSU6 the whole document ----- -/--	1-11, 18-23									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.									
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>											
Date of the actual completion of the international search 16 July 2013	Date of mailing of the international search report 29/07/2013										
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Marchesini, Patrizia										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/039315

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt [Online] 21 March 2012 (2012-03-21), "SubName: Full=Isoprene synthase; Flags: Fragment:", XP002702770, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:H2CSU7 Database accession no. H2CSU7 the whole document -----	1-11, 18-23
Y	JIANMING YANG ET AL: "Bio-isoprene production using exogenous MVA pathway and isoprene synthase in", BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER BV, GB, vol. 104, 12 October 2011 (2011-10-12), pages 642-647, XP028351244, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2011.10.042 [retrieved on 2011-10-20] the whole document -----	1-46
Y	WO 2010/148150 A1 (DANISCO US INC [US]; GOODYEAR TIRE & RUBBER [US]; BECK ZACHARY QUINN []) 23 December 2010 (2010-12-23) claims 1-8 -----	1-46
Y	MILLER BARBARA ET AL: "First isolation of an isoprene synthase gene from poplar and successful expression of the gene in Escherichia coli", PLANTA, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 213, no. 3, 1 July 2001 (2001-07-01), pages 483-487, XP009107808, ISSN: 0032-0935, DOI: 10.1007/S004250100557 the whole document -----	1-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/US2013/039315

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2009132220	A2 29-10-2009	AU 2009240505	A1	29-10-2009
		CA 2722440	A1	29-10-2009
		CN 102171335	A	31-08-2011
		EP 2279251	A2	02-02-2011
		JP 2011518564	A	30-06-2011
		KR 201100290234	A	02-03-2011
		RU 2010147659	A	27-05-2012
		US 2010003716	A1	07-01-2010
		WO 2009132220	A2	29-10-2009
<hr/>				
WO 2010148150	A1 23-12-2010	AR 077115	A1	03-08-2011
		CA 2765805	A1	23-12-2010
		CN 102753697	A	24-10-2012
		EP 2443244	A1	25-04-2012
		SG 176936	A1	28-02-2012
		TW 201111512	A	01-04-2011
		US 2011014672	A1	20-01-2011
		WO 2010148150	A1	23-12-2010
<hr/>				

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 Q 1/25 (2006.01)	C 1 2 Q 1/25	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

(74)代理人 100138438 弁理士 尾首 亘聰
(74)代理人 100138519 弁理士 奥谷 雅子
(74)代理人 100123892 弁理士 内藤 忠雄
(74)代理人 100169993 弁理士 今井 千裕
(74)代理人 100131082 弁理士 小原 正信
(74)代理人 100185535 弁理士 逢坂 敦
(72)発明者 ビーティー、マリー・ケイ アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
(72)発明者 ヘイズ、ケビン アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
(72)発明者 フー、ジェンリン アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
(72)発明者 メイヤー、デービッド・ジェイ アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
(72)発明者 ナンナバネニ、キショー アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
(72)発明者 ライフ、クリストファー・エル アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
(72)発明者 ウェルス、デレク・エイチ アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304-1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925

ド 925

(72)発明者 ザストロー - ヘイズ、ジーナ・エム

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304 - 1013、パロ・アルト、ページ・ミル・ロー
ド 925

Fターム(参考) 4B024 AA03 BA07 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA05 DA06 DA07
DA12 EA04 GA11 GA17 GA19 HA01
4B050 CC03 DD13 LL05
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ06 QQ07 QQ13 QQ21 QQ61 QR01 QS02
QS16 QX01 QX10
4B064 AB04 BA01 CA02 CA05 CA06 CA19 CC24 DA16
4B065 AA01X AA26X AA57X AA72X AA80X AA88Y AB01 AC14 AC20 BA01
CA03
4H045 AA30 BA10 CA33 DA89 EA62 FA72 FA74