

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-205116

(P2017-205116A)

(43) 公開日 平成29年11月24日(2017.11.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21 Z N A	4 B 0 5 0
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00	4 B 0 6 5
C 1 2 N 9/04 (2006.01)	C 1 2 N 9/04	
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 152 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-122737 (P2017-122737)	(71) 出願人	511062818 ゲノマチカ, インク.
(22) 出願日	平成29年6月23日 (2017. 6. 23)		
(62) 分割の表示	特願2015-133621 (P2015-133621) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ 4 7 5 7 ネク サス センター ドライブ
原出願日	平成21年9月9日 (2009. 9. 9)	(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(31) 優先権主張番号	61/191, 710	(72) 発明者	マルク ジェイ. ブルク アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 3 0 サン ディエゴ 1 2 6 3 4 イ ンテルメズゾ ウアイ
(32) 優先日	平成20年9月10日 (2008. 9. 10)	(72) 発明者	アントホニー ピー. ブルガルド アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 6 8 2 3 ベルルエフオンテ 2 3 7 ウア ルケル クロススイング
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/192, 511		
(32) 優先日	平成20年9月17日 (2008. 9. 17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1, 4-ブタンジオールの生成のための微生物体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 1,4-ブタンジオール(BDO)経路を有する非天然微生物体による1,4-ブタンジオールの生産。

【解決手段】 1,4-ブタンジオール(BDO)経路を有する非天然微生物体であって、BDOを生成するための十分な量で発現され、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、ビニルアセチル-CoA Δ-イソメラーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼを含むBDO経路酵素をコードする外因性核酸を含む、前記非天然微生物体。更に、当該微生物体を使用してBDOを生成する方法を提供する。

【選択図】 図 1

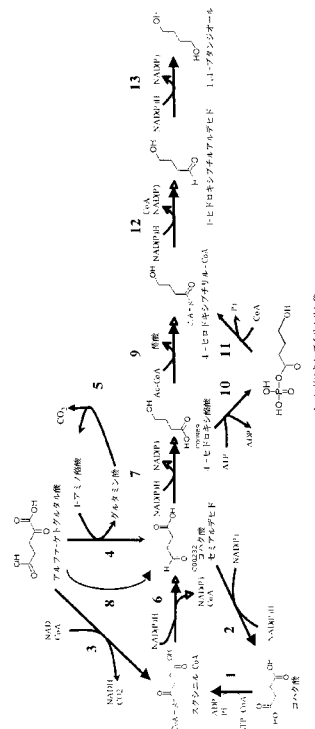


図 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1,4-ブタンジオール(BDO)経路を有する非天然微生物体であって、BDOを生成するための十分な量で発現され、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、ビニルアセチル-CoA Δ -イソメラーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼを含むBDO経路酵素をコードする外因性核酸を含む、前記非天然微生物体。

【請求項 2】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項1記載の非天然微生物体。

10

【請求項 3】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 4】

実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 5】

BDOを生成するための方法であって、請求項1記載の非天然微生物体を、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたって培養することを含む、前記方法。

【請求項 6】

前記非天然微生物体の実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項5記載の方法。

20

【請求項 7】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項5記載の方法。

【請求項 8】

1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドラーゼ、4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼを含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体。

【請求項 9】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項8記載の非天然微生物体。

30

【請求項 10】

それぞれがBDO経路酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、請求項8記載の非天然微生物体。

【請求項 11】

それぞれがBDO経路酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、請求項8記載の非天然微生物体。

【請求項 12】

前記3つの外因性核酸が、4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドラーゼ又は4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ;4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ;及び4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼをコードする、請求項11記載の非天然微生物体。

40

【請求項 13】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項12記載の非天然微生物体。

【請求項 14】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項8記載の非天然微生物体。

【請求項 15】

50

実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項8記載の非天然微生物体。

【請求項16】

BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたって、BDOを生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼを含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、前記方法。

【請求項17】

前記非天然微生物体が実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項16記載の方法。

【請求項18】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項16記載の方法。

【請求項19】

BDOを生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼを含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体。

【請求項20】

前記BDO経路が、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項19記載の非天然微生物体。

【請求項21】

それぞれがBDO経路酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、請求項19記載の非天然微生物体。

【請求項22】

それぞれがBDO経路酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、請求項19記載の非天然微生物体。

【請求項23】

前記3つの外因性核酸が、4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ又は4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ;4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成);及び4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼをコードする、請求項22記載の非天然微生物体。

【請求項24】

前記BDO経路が、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項23記載の非天然微生物体。

【請求項25】

それぞれがBDO経路酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、請求項19記載の非天然微生物体。

【請求項26】

前記4つの外因性核酸が、4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ又は4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ;4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ;4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ及び4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼをコードする、請求項25記載の非天然微生物体。

【請求項27】

前記BDO経路が、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項26記載の非天然微生物体。

【請求項28】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項19記載の非天然微生物体。

【請求項 29】

実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項19記載の非天然微生物体。

【請求項 30】

BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたって、BDOを生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼを含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、前記方法。 10

【請求項 31】

前記非天然微生物体を実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項30記載の方法。

【請求項 32】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項30記載の方法。

【請求項 33】

BDOを生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、4-アミノ酪酸キナーゼ、4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ、[(4-アミノブタノイル)オキシ]ホスホン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、[(4-アミノブタノイル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-リン酸デヒドロゲナーゼ又は4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体。 20

【請求項 34】

前記BDO経路が、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項33記載の非天然微生物体。

【請求項 35】

それぞれがBDO経路酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、請求項33記載の非天然微生物体。 30

【請求項 36】

それぞれがBDO経路酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、請求項33記載の非天然微生物体。

【請求項 37】

それぞれがBDO経路酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、請求項33記載の非天然微生物体。

【請求項 38】

前記4つの外因性核酸が、4-アミノ酪酸キナーゼ;4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化);4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ;及び4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼをコードする、請求項37記載の非天然微生物体。 40

【請求項 39】

前記BDO経路が、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項38記載の非天然微生物体。

【請求項 40】

前記4つの外因性核酸が、4-アミノ酪酸キナーゼ;[(4-アミノブタノイル)オキシ]ホスホン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は[(4-アミノブタノイル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ;4-ヒドロキシブチリル-リン酸デヒドロゲナーゼ;及び4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)をコードする、請求項37記載の非天然微生物 50

体。

【請求項 4 1】

前記BDO経路が、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項40記載の非天然微生物体。

【請求項 4 2】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項33記載の非天然微生物体。

【請求項 4 3】

実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項33記載の非天然微生物体。

【請求項 4 4】

BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたって、BDOを生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、4-アミノ酪酸キナーゼ、4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ、[(4-アミノブタノイル)オキシ]ホスホン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、[(4-アミノブタノイル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-リン酸デヒドロゲナーゼ又は4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、前記方法。

10

【請求項 4 5】

前記非天然微生物体の実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項44記載の方法。

20

【請求項 4 6】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項44記載の方法。

【請求項 4 7】

BDOを生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、アルファ-ケトグルタル酸5-キナーゼ、2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ、アルファ-ケトグルタル酸CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体。

30

【請求項 4 8】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項47記載の非天然微生物体。

【請求項 4 9】

それぞれがBDO経路酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、請求項47記載の非天然微生物体。

【請求項 5 0】

それぞれがBDO経路酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、請求項47記載の非天然微生物体。

40

【請求項 5 1】

前記3つの外因性核酸が、アルファ-ケトグルタル酸CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ;アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成);及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼをコードする、請求項50記載の非天然微生物体。

【請求項 5 2】

前記BDO経路が、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項51記載の非天然微生物体。

50

【請求項 5 3】

前記3つの外因性核酸が、アルファ-ケトグルタル酸CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ;アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成);及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードする、請求項50記載の非天然微生物体。

【請求項 5 4】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項53記載の非天然微生物体。

【請求項 5 5】

それぞれがBDO経路酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、請求項47記載の非天然微生物体。

【請求項 5 6】

前記4つの外因性核酸が、アルファ-ケトグルタル酸5-キナーゼ;2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化);2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼをコードする、請求項55記載の非天然微生物体。

【請求項 5 7】

前記BDO経路が、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項56記載の非天然微生物体。

【請求項 5 8】

前記4つの外因性核酸が、アルファ-ケトグルタル酸5-キナーゼ;2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化);2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードする、請求項55記載の非天然微生物体。

【請求項 5 9】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項58記載の非天然微生物体。

【請求項 6 0】

前記4つの外因性核酸が、アルファ-ケトグルタル酸CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ;アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ;5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼをコードする、請求項55記載の非天然微生物体。

【請求項 6 1】

前記BDO経路が、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項60記載の非天然微生物体。

【請求項 6 2】

前記4つの外因性核酸が、アルファ-ケトグルタル酸CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ;アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ;5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ(脱カルボキシル化)をコードする、請求項55記載の非天然微生物体。

【請求項 6 3】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項60記載の非天然微生物体。

【請求項 6 4】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項47記載の非天然微生物体。

10

20

30

40

50

【請求項 6 5】

実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項47記載の非天然微生物体。

【請求項 6 6】

BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたって、BDOを生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、アルファ-ケトグルタル酸5-キナーゼ、2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ、アルファ-ケトグルタル酸CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、前記方法。 10

【請求項 6 7】

前記非天然微生物体が実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項66記載の方法。

【請求項 6 8】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項66記載の方法。

【請求項 6 9】

BDOを生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、グルタミン酸CoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ、グルタミル-CoAリガーゼ、グルタミン酸5-キナーゼ、グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、グルタミル-CoAレダクターゼ、グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドレダクターゼ、グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体。 20

【請求項 7 0】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項69記載の非天然微生物体。 30

【請求項 7 1】

それぞれがBDO経路酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、請求項69記載の非天然微生物体。

【請求項 7 2】

それぞれがBDO経路酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、請求項69記載の非天然微生物体。

【請求項 7 3】

それぞれがBDO経路酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、請求項69記載の非天然微生物体。 40

【請求項 7 4】

前記4つの外因性核酸が、グルタミン酸CoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ又はグルタミル-CoAリガーゼ;グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成);2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードする、請求項73記載の非天然微生物体。

【請求項 7 5】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、 50

請求項74記載の非天然微生物体。

【請求項 7 6】

前記4つの外因性核酸が、グルタミン酸5-キナーゼ;グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化);2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードする、請求項73記載の非天然微生物体。

【請求項 7 7】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項76記載の非天然微生物体。

10

【請求項 7 8】

それぞれがBDO経路酵素をコードする5つの外因性核酸を含む、請求69記載の非天然微生物体。

【請求項 7 9】

前記5つの外因性核酸が、グルタミン酸CoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ又はグルタミル-CoAリガーゼ;グルタミル-CoAレダクターゼ;グルタミン酸-5-セミアルデヒドレダクターゼ;2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードする、請求項78記載の非天然微生物体。

20

【請求項 8 0】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項79記載の非天然微生物体。

【請求項 8 1】

前記5つの外因性核酸が、グルタミン酸5-キナーゼ;グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化);グルタミン酸-5-セミアルデヒドレダクターゼ;2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードする、請求項78記載の非天然微生物体。

30

【請求項 8 2】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項81記載の非天然微生物体。

【請求項 8 3】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項69記載の非天然微生物体。

【請求項 8 4】

実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項69記載の非天然微生物体。

40

【請求項 8 5】

BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたって、BDOを生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、グルタミン酸CoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ、グルタミル-CoAリガーゼ、グルタミン酸5-キナーゼ、グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、グルタミル-CoAレダクターゼ、グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロレダクターゼ、グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含むBDO経

50

路を有する非天然微生物体を培養することを含む、前記方法。

【請求項 86】

前記非天然微生物体が実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項85記載の方法。

【請求項 87】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項85記載の方法。

【請求項 88】

BDOを生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、ホモセリンデアミナーゼ、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ、ホモセリン-CoAリガーゼ、ホモセリン-CoAデアミナーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エン酸レダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼを含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体。

10

【請求項 89】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項88記載の非天然微生物体。

【請求項 90】

それぞれがBDO経路酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、請求88記載の非天然微生物体。

20

【請求項 91】

それぞれがBDO経路酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、請求88記載の非天然微生物体。

【請求項 92】

前記3つの外因性核酸が、ホモセリンデアミナーゼ;4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ;4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼをコードする請求項91記載の非天然微生物体。

【請求項 93】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項92記載の非天然微生物体。

30

【請求項 94】

前記3つの外因性核酸が、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ又はホモセリンCoAリガーゼ;ホモセリン-CoAデアミナーゼ;及び4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼをコードする、請求項91記載の非天然微生物体。

【請求項 95】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項94記載の非天然微生物体。

40

【請求項 96】

前記3つの外因性核酸が、ホモセリンデアミナーゼ;4-ヒドロキシブタ-2-エン酸レダクターゼ;及び4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼをコードする、請求項91記載の非天然微生物体。

【請求項 97】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項96記載の非天然微生物体。

50

【請求項 98】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項88記載の非天然微生物体。

【請求項 99】

実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項88記載の非天然微生物体。

【請求項 100】

BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたって、BDOを生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、ホモセリンデアミナーゼ、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ、ホモセリン-CoAリガーゼ、ホモセリン-CoAデアミナーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エン酸レダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼを含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、前記方法。

【請求項 101】

前記非天然微生物体の実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項100記載の方法。

【請求項 102】

前記少なくとも1つの核酸が異種核酸である、請求項100記載の方法。

【請求項 103】

BDOを生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、スクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体。

【請求項 104】

前記BDO経路が、スクシニル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項103記載の非天然微生物体。

【請求項 105】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項104記載の非天然微生物体。

【請求項 106】

実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項104記載の非天然微生物体。

【請求項 107】

BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたって、BDOを生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、スクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、前記方法。

【請求項 108】

前記BDO経路が、スクシニル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項107記載の方法。

【請求項 109】

前記非天然微生物体の実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項107記載の方法。

【請求項 110】

10

20

30

40

50

前記少なくとも1つの核酸が異種核酸である、請求項107記載の方法。

【請求項 1 1 1】

BDOを生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、4-アミノ酪酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体。

【請求項 1 1 2】

前記BDO経路が、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項111記載の非天然微生物体。

【請求項 1 1 3】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項111記載の非天然微生物体。

【請求項 1 1 4】

実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項111記載の非天然微生物体。

【請求項 1 1 5】

BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたって、BDOを生成するための十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、4-アミノ酪酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む、前記方法。

【請求項 1 1 6】

前記BDO経路が、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項115記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記非天然微生物体が実質的に嫌気性の培地に存在する、請求項115記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種核酸である、請求項115記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の背景)

本出願は、それぞれの内容全体が引用により本明細書中に組み込まれている、2008年9月10日に出願された米国仮出願第61/191,710号及び2008年9月17日に出願された、米国仮出願第61/192,511号の優先権を主張するものである。

【0002】

本発明は、一般には、生物体のインシリコ設計に関し、より詳細には、1,4-ブタンジオール生合成機能を有する生物体に関する。

【背景技術】

【0003】

化合物4-ヒドロキシブタン酸(4-ヒドロキシブタノエート、4-ヒドロキシ酪酸、4-HB)は、様々な商品及び特殊化学物質のための構成単位として工業的潜在性を有する4-炭素カル

10

20

30

40

50

ボン酸である。特に、4-HBは、溶媒、樹脂、ポリマー前駆体及び特殊化学物質を含む1,4-ブタンジオール系統の化学物質への新たな入口点として機能する潜在性を有する。1,4-ブタンジオール(BDO)は、約30億lb/年の世界市場を有するポリマー中間体及び工業用溶媒である。BDOは、現在、石油化学前駆体、主にアセチレン、無水マレイン酸及び酸化プロピレンから製造されている。

【0004】

例えば、アセチレンをレップ合成反応(Kroschwitz及びGrant, Encyclopedia of Chem. Tech., John Wiley and Sons, Inc., New York (1999))で2分子のホルムアルデヒドと反応させた後、触媒水素化を行って1,4-ブタンジオールを形成する。米国で製造されたアセチレンの90%がブタンジオールの製造に消費されることが推定されている。代替的に、それを、ブタンから誘導された無水マレイン酸のエステル化及び触媒的水素化によって形成することができる。下流において、ブタンジオールを、例えば、ピロリドン及びN-メチル-ピロリドンにさらに変換することができる γ -ブチロラクトンへの酸化、又はテトラヒドロフランへの水素化分解によってさらに変換することができる。これらの化合物は、ポリマー中間体、溶媒及び添加剤としての様々な用途を有し、全体でほぼ20億lb/年の市場を有する。

【0005】

再生可能に石油系供給原料を代用するばかりでなく、より小さいエネルギー及び資本の集約的プロセスを使用する代替的な手段によってこれらの化学物質を製造するための方法を開発することが望ましい。エネルギー省は、ブタンジオール系統の製品を製造するための生物学的に製造される主要な中間体として、1,4-二酸及び特にコハク酸を提案した(DOE Report、「バイオマスからの高付加価値化学物質(Top Value-Added Chemicals from Biomass)」、2004)。しかし、コハク酸は、単離及び精製するのにコストが高く、ブタンジオールへの触媒還元の高い温度及び圧力を必要とする。

【0006】

したがって、商業的な量の1,4-ブタンジオール及びその化学前駆体を効果的に製造するための代替的な手段が必要である。本発明は、この必要性を満たすとともに、関連する利点を提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要旨)

本発明は、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を含む非天然微生物体を提供する。本発明は、さらに、当該微生物体を使用してBDOを生成する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】4-ヒドロキシ酪酸(4-HB)及び1,4-ブタンジオール生成への生化学経路を示す概略図である。最初の5つの工程は、大腸菌に対して内因性であり、残りは、非相同的に発現され得る。生合成反応を触媒する酵素は、(1)スクシニル-CoAシンセターゼ;(2)CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ;(3) α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ;(4)グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ;(5)グルタミン酸デカルボキシラーゼ;(6)CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ;(7)4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ;(8) α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ;(9)4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼ;(10)酪酸キナーゼ;(11)ホスホトランスブチリラーゼ;(12)アルデヒドデヒドロゲナーゼ;(13)アルコールデヒドロゲナーゼである。

【0009】

【図2】大腸菌におけるホモセリン生合成を示す概略図である。

【0010】

【図3】4-HB経路遺伝子の様々な組合せを発現するプラスミドを含む大腸菌株を使用する

10

20

30

40

50

グルコース最小培地での4-HBの生成を示す図である。(a)液体培地における4-HB濃度;(b)液体培地におけるコハク酸濃度;(c)600nmで測定された培養OD。棒の集合体は、24時間、48時間、及び(測定した場合の)72時間の時点を表す。x軸上の符号は、使用した菌株/プラスミド組合せを示す。第1の指数は、宿主菌株: 1、MG1655 *lacI*^Q;2、MG1655 Δ *gabD* *lacI*^Q;3、MG1655 Δ *gabD* Δ *aldA* *lacI*^Qを指す。第2の指数は、使用したプラスミド組合せ: 1、pZE 13-0004-0035及びpZA33-0036;2、pZE13-0004-0035及びpZA33-0010n;3、pZE 13-0004-0008及びpZA33-0036;4、pZE13-0004-0008及びpZA33-0010n;5、対照ベクターpZE13及びpZA33を指す。

【0011】

【図4】ヒト型結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)から α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼを発現する大腸菌株におけるグルコースからの4-HBの生成を示す図である。菌株1~3は、pZE13-0032及びpZA33-0036を含む。菌株4は、空ベクターpZE13及びpZA33のみを発現する。宿主菌株は、1及び4、MG1655 *lacI*^Q;2、MG1655 Δ *gabD* *lacI*^Q;3、MG1655 Δ *gabD* Δ *aldA* *lacI*^Qである。棒は、24及び48時間における濃度を指す。

【0012】

【図5】組換え大腸菌株における10mM 4-HBからのBDOの生成を示す図である。番号付けした*P. ギンギバリス* (*gingivalis*)から*cat2*を発現するpZA33-0024を含むMG1655*lacI*^Q、並びにpZE13上に発現される以下の遺伝子:1、なし(対照);2、0002;3、0003;4、0003n;5、0011;6、0013;7、0023;8、0025;9、0008n;10、0035を用いた実験に対応する。遺伝子番号は、表6に規定されている。各位置について、棒は、それぞれ好気性、ミクロ好気性及び嫌気性条件を指す。ミクロ好気性条件は、培養チューブを排気せずに密閉することによって生成された。

【0013】

【図6】4g/L非標識グルコース(a、c、e及びg)均一標識¹³C-グルコース(b、d、f及びh)が補給されたM9最小培地で成長したMG1655*lacI*^QpZE13-0004-0035-0002pZA33-0034-0036によって生成された4-HB及びBDOの質量スペクトルを示す図である。(a)及び(b)、2個の炭素原子を含む誘導体化BDOの質量116特異的断片;(c)及び(d)、1個の炭素原子を含む誘導体化BDOの質量177特異的断片;(e)及び(f)、2個の炭素原子を含む誘導体化4-HBの質量117特異的断片;(g)及び(h)、4個の炭素原子を含む誘導体化4-HBの質量233特異的断片。

【0014】

【図7】 γ -ブチロラク톤の生成のためのバイオプロセスの概略流れ図である。パネル(a)は、バッチ式分離を用いた流加発酵を示し、パネル(b)は、連続分離を用いた流加発酵を示す。

【0015】

【図8A-B】例示的な1,4-ブタンジオール(BDO)経路を示す図である。図8Aは、スクシニル-CoAからBDO経路を示す図である。図8Bは、アルファケトグルタル酸からのBDO経路を示す図である。

【0016】

【図9A-C】例示的なBDO経路を示す図である。図9A及び9Bは、4-アミノ酪酸からの経路を示す図である。図9Cは、アセトアクチル-CoAから4-アミノ酪酸への経路を示す図である。

【0017】

【図10】アルファ-ケトグルタル酸からの例示的なBDO経路を示す図である。

【0018】

【図11】グルタミン酸からの例示的なBDO経路を示す図である。

【0019】

【図12】アセトアセチル-CoAからの例示的なBDO経路を示す図である。

【0020】

【図13】ホモセリンからの例示的なBDO経路を示す図である。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【0021】

(発明の詳細な説明)

本発明は、4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)、 γ -ブチロラクトン及び1,4-ブタンジオール(BDO)の生合成生成機能を有する細胞及び生物体の設計及び生成に関する。本発明は、特に、BDO経路酵素をコードする1つ以上の核酸を導入することによってBDOを生成することが可能な微生物体の設計に関する。

【0022】

一実施態様において、本発明は、4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)及び1,4-ブタンジオール(BDO)の生合成生成のための代謝設計を特定する大腸菌代謝のインシリコ化学量論モデルを利用する。本明細書に記載されている結果は、代謝経路を設計及び組換え操作して、大腸菌及び他の細胞又は生物体における4-HB並びに1,4-ブタンジオールなどの下流生成物の生合成を達成できることを示す。例えばインシリコ設計のための4-HBの生合成生成物を、設計された代謝遺伝子型を有する菌株を構成することによって確認することができる。これらの代謝操作細胞又は生物体を順応的進化させて、理論的最大成長に近づく条件下を含む4-HB生合成をさらに増強することができる。

10

【0023】

一部の実施態様において、設計された菌株の4-HB生合成特性は、それらを遺伝的に安定にし、特に、連続バイオプロセスに有用なものとする。異なる非原生又は非相同的反応機能は大腸菌又は他の宿主生物体に組み込んで、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンターゼ及びCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、又はグルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼから代謝経路を生成する4-HB及び1,4-ブタンジオールを得る個別の菌株設計手法が特定された。これらの代謝経路の各々からの大腸菌及び酵母種における4-HBの生合成を生じさせるインシリコ代謝設計が特定された。1,4-ブタンジオール中間体 γ -ブチロラクトンを、pH7.5未満の条件下、特に酸性条件下、例えば、pH5.5未満、例えば、pH7未満、pH6.5未満、pH6未満、特にpH5.5以下未満での自然環化によって培養で生成することができる。

20

【0024】

プラットフォームの計算コンポーネントを介して特定された菌株を、4-HB、1,4-ブタンジオール若しくは他の中間体及び/又は下流生成物の生合成生成をもたらす予測代謝変異のいずれかを遺伝子操作することによって実際に生成させることができる。さらなる実施態様において、これらの化合物の生合成生成を示す菌株をさらに適応進化させて、生成物生合成をさらに増強することができる。適応進化の後の生成物生合成収量のレベルを、システムの計算コンポーネントによって予測することができる。

30

【0025】

他の具体的な実施態様において、コハク酸から4-HB及び4-HB-CoAへの酵素工程をコードする4-HB生合成経路を発現するように微生物体を構成した。宿主微生物体におけるコハク酸補酵素Aトランスフェラーゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、NAD依存性4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシ酪酸補酵素Aトランスフェラーゼの同時発現は、4-HB生合成経路を欠いた宿主微生物体と比較して4-HBの有意な生成をもたらした。さらなる具体的な実施態様において、 α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ及びNAD依存性4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼをコードする核酸を導入することによって、 α -ケトグルタル酸を基質として利用する4-HB生成微生物体を生成した。

40

【0026】

別の具体的な実施態様において、4-HBの存在下で培養されると1,4-ブタンジオール(BDO)を生合成するBDO生合成経路を含む微生物体を構成した。BDO生合成経路は、多機能性アルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼをコードする核酸、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼ及びアルコールデヒドロゲナーゼをコードする核酸のいずれかからなっていた。4-HB基質上での成長を支持するために、これらのBDO生成微生物体は、ホスホトランスヒドロキシブチラーゼとともに、4-ヒドロキシ酪酸CoAトランスフェラーゼ又は4-酪酸キナーゼをも発現した。さらなる具体的な実施態様において、機能性4-HB生合成経路及び機能性BD

50

0生合成経路をコードする核酸の外因性発現を介してBDOを合成する微生物体を生成した。4-HB生合成経路は、コハク酸補酵素Aトランスフェラーゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、NAD-依存性4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシ酪酸補酵素Aトランスフェラーゼからなっていた。BDO経路は、多機能性アルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼからなっていた。BDOを生成するためのさらなる経路を本明細書にさらに記載する(図8~13参照)。

【0027】

本明細書に使用されているように、「非天然」という用語は、本発明の微生物体又は微生物に関して使用される場合は、微生物体が、記載の種の野生型菌株を含む記載の種の天然菌株に通常は見いだされない少なくとも1つの遺伝子変異を有することを意味すること
10
を意図する。遺伝子変異は、例えば、代謝ポリペプチドをコードする発現可能な核酸を導入する修飾、他の核酸付加、核酸除去及び/又は微生物遺伝子材料の他の機能的破壊を含む。当該修飾は、例えば、記載の種についての非相同性、相同性又は非相同性及び相同性ポリペプチドに対するコード化領域及びそれらの機能的断片を含む。さらなる修飾は、例えば、修飾が遺伝子又はオペロンの発現を改変する非コード化規則的領域を含む。例示的な代謝ポリペプチドは、BDO系統の化合物のための生合成経路内の酵素又はタンパク質を含む。

【0028】

代謝修飾は、その天然の状態から改変された生化学反応を指す。したがって、非天然微生物は、代謝ポリペプチド又はそれらの機能性断片をコードする核酸に対する遺伝子修飾
20
を有することができる。例示的な代謝修飾を本明細書に開示する。

【0029】

本明細書に使用されているように、「単離された」という用語は、微生物体に関して使用される場合は、記載の微生物体としての少なくとも1つの成分を実質的に含まない生物体
30
が天然に見いだされることを指すことを意図する。該用語は、その天然環境に見いだされる一部又はすべての成分から除去される微生物体を含む。該用語は、微生物体が非天然環境に見いだされるときに、一部又はすべての成分から除去される微生物体を含む。したがって、単離された微生物体は、それが天然に見いだされるとき、又はそれが非天然環境で成長、貯蔵若しくは生存されるときに他の物質から部分的又は完全に分離される。単離微生物体の具体的な例としては、部分的に純粋の微生物、実質的に純粋の微生物及び非天然の培地で培養された微生物が挙げられる。

【0030】

本明細書に使用されているように、「微生物(microbial)」、「微生物体」又は「微生物(microorganism)」は、古細菌、細菌又は真核細菌のドメイン内に含まれる微視的細胞として存在する任意の生物体を指すことを意図する。したがって、該用語は、微視的サイズを有する原核又は真核細胞又は生物体を包含することを意図し、あらゆる種類の細菌、古細菌及び真正細菌、並びに酵母及び真菌などの真核微生物を含む。該用語は、生化学物質の生成のために培養することができる任意の種の細胞培養物をも含む。

【0031】

本明細書に使用されているように、「4-ヒドロキシブタン酸」という用語は、化学式C₄H₈O₃及び104.11g/mol(そのナトリウム塩については126.09g/mol)の分子質量を有する酪酸の4-ヒドロキシ誘導体を指すことを意図する。化学化合物4-ヒドロキシブタン酸は、当該技術分野において、4-HB、4-ヒドロキシ酪酸、ガンマ-ヒドロキシ酪酸又はGHBとしても知られる。該用語は、本明細書で使用されるように、化合物の様々な塩形のいずれかを含み、例えば4-ヒドロキシブタン酸及び4-ヒドロキシ酪酸を含むことを意図する。4-HBについての塩形の具体的な例としては、ナトリウム4-HB及びカリウム4-HBが挙げられる。したがって、4-ヒドロキシブタン酸、4-HB、4-ヒドロキシ酪酸、4-ヒドロキシブタノエート、ガンマ-ヒドロキシ酪酸及びGHBという用語、並びに他の当該技術分野で認識されている名称は、本明細書において同義的に使用される。

【0032】

10

20

30

40

50

本明細書に使用されているように、「モノマー」という用語は、4-HBに関して使用されるときは、非ポリマー又は非誘導体化形の4-HBを指すことを意図する。ポリマー4-HBの具体的な例としては、ポリ-4-ヒドロキシブタン酸、並びに例えば4-HBと3-HBのコポリマーが挙げられる。4-HBの誘導体化形の具体的な例は、4-HB-CoAである。他のポリマー4-HB形及び4-HBの他の誘導体化形も当該技術分野で既知である。

【0033】

本明細書に使用されているように、「 γ -ブチロラクトン」という用語は、化学式 $C_4H_6O_2$ 及び86.089g/molの分子質量を有するラクトンを指すことを意図する。化学化合物 γ -ブチロラクトンは、当該技術分野において、GBL、ブチロラクトン、1,4-ラクトン、4-ブチロラクトン、4-ヒドロキシ酪酸ラクトン及びガンマ-ヒドロキシ酪酸ラクトンとしても既知である。該用語は、本明細書に使用されるときは、化合物の様々な塩形のいずれかを含

10

【0034】

本明細書に使用されているように、「1,4-ブタンジオール」という用語は、化学式 $C_4H_{10}O_2$ 及び90.12g/molの分子質量を有する、2つのヒドロキシル基を保持するアルカンブタンのアルコール誘導体を指すことを意図する。化学化合物1,4-ブタンジオールは、当該技術分野においてBDOとしても既知であり、本明細書ではBDO系統の化合物と称する系統の化合物に対する化学中間体又は前駆体である。

【0035】

本明細書に使用されているように、「テトラヒドロフラン」という用語は、化学式 C_4H_8O 及び72.11g/molの分子質量を有する芳香族化合物フランの完全水素化類似体に対応する複素環式有機化合物を指すことを意図する。化学化合物テトラヒドロフランは、当該技術分野において、THF、テトラヒドロフラン、1,4-エポキシブタン、酸化ブチレン、酸化シクロテトラメチレン、オキサシクロペンタン、酸化ジエチレン、オキソラン、フラニジン、ヒドロフラン、酸化テトラメチレンとしても既知である。該用語は、それが本明細書に使用されるときは、化合物の様々な塩形のいずれかを含むことを意図する。

20

【0036】

本明細書に使用されているように、「CoA」又は「補酵素A」という用語は、多くの酵素(アポ酵素)の活性が活性酵素形を形成するのにその存在が必要とされる有機補因子又は配合団(酵素の非タンパク質部分)を指すことを意図する。補酵素Aは、特定の縮合酵素において機能し、アセチル又は他のアシル基転移並びに脂肪酸合成及び酸化、ピルビン酸酸化及び他のアセチル化において作用する。

30

【0037】

本明細書に使用されているように、「実質的に嫌気性」という用語は、培養又は成長条件に関して使用されるときは、酸素の量が、液体媒体中の溶存酸素について約10%未満の飽和であることを意味することを意図する。該用語は、また、約1%未満の酸素の雰囲気で維持される液体又は固体媒体の密閉チャンバーを含むことを意図する。

【0038】

本発明の非天然微生物体は、変異を低下させることなく、5を超える世代に対して培養することができる微生物を指す安定遺伝子変異を含むことができる。一般に、安定遺伝子変異は、10を超える世代にわたって持続する修飾、特に安定な修飾は、約25を超える世代にわたって持続し、特に、安定な遺伝子修飾は、無限を含めて、50を超える世代にわたって持続することになる。

40

【0039】

当業者は、本明細書に例示される代謝修飾を含む遺伝子変異は、好適な宿主又は由来生物体、例えば、大腸菌、酵母又は本明細書に開示されている他の生物体、並びにそれらの対応する代謝反応、又は所望の遺伝子材料、例えばそれらの対応する代謝反応のための酵素をコードする遺伝子のための好適な由来生物体に関して記載される。しかし、多種多様な生物体の完全ゲノム配列及びゲノムの分野における高度な技能を考慮すると、当業者は、本明細書に示される教示及び指針を実質的にすべての他の生物体に容易に適用すること

50

が可能である。例えば、記載の種意外の種から同一又は類似のコード化核酸を組み込むことによって、本明細書に例示される大腸菌代謝変異を他の種に容易に適用することができる。当該遺伝子変異としては、例えば、概して相同体種の遺伝子変異、及び特にオルソログ、パラログ又は非オルソログ遺伝子置換が挙げられる。

【0040】

オルソログは、垂直降下によって関連づけられ、異なる生物体において実質的に同様又は同一の機能に關与する1つ以上の遺伝子である。例えば、マウスエポキシドヒドロラーゼ及びヒトエポキシドヒドロラーゼをエポキシドの加水分解の生物的功能についてオルソログと見なすことができる。遺伝子は、例えば、それらが相同性であることを示すための十分な量の配列類似性を共有するか、又は共通の祖先からの進化によって関連づけられるときに垂直降下によって関連づけられる。遺伝子が、三次元構造を共有するが、一次配列類似性が識別可能でない程度に、共通の祖先から進化したことを示すための十分な量の配列類似性を必ずしも共有しない場合に、遺伝子をオルソログと見なすこともできる。オルソログである遺伝子は、約25%から100%のアミノ酸配列同一性の配列類似性を有するタンパク質をコードすることができる。25%未満のアミノ酸類似性を共有するタンパク質をコードする遺伝子は、それらの三次元構造も類似性を示す場合に垂直降下によって生じたと見なすこともできる。組織プラスミノゲン活性化剤及びエラスターゼを含むセリンプロテアーゼ系統の酵素の構成要素は、共通の祖先からの垂直降下によって生じたと見なされる。

10

【0041】

オルソログは、例えば進化を介して構造又は全体活性が分岐した遺伝子又はそれらのコード化遺伝子生成物を含む。例えば、1つの種が2つの機能を示す遺伝子生成物をコードし、当該機能が第2の種における異なる遺伝子に分けられた場合は、3つの遺伝子及びそれらの対応する生成物がオルソログと見なされる。生化学生成物の成長連結生成では、導入又は破壊すべき代謝活性を有するオルソログ遺伝子を非天然微生物の構成に選択すべきであることを当業者は理解するであろう。分離可能な活性を示すオルソログの例は、異なる活性が、2つ以上の種の間又は単一種内の異なる遺伝子生成物に分離された場合である。具体例は、2種類のセリンプロテアーゼ活性であるエラスターゼタンパク質分解とプラスミノゲンタンパク質分解をプラスミノゲン活性化剤及びエラスターゼとしての異なる分子に分離することである。第2の例は、マイコプラズマ5'-3'エキソヌクレアーゼ及びドロソフィラDNAポリメラーゼIII活性の分離である。第1の種からのDNAポリメラーゼは、第2の種からのエキソヌクレアーゼ又はポリメラーゼのいずれか又は両方に対してオルソログであり、且つその逆であると思なすことができる。

20

30

【0042】

対照的に、パラログは、例えば、複製、そしてその後の進化的分岐によって関連づけられる相同体であり、類似又は共通するが、同一でない機能を有する。パラログは、例えば同一種又は異なる種から由来又は派生し得る。例えば、微生物エポキシドヒドロラーゼ(エポキシドヒドロラーゼI)及び可溶性エポキシドヒドロラーゼ(エポキシドヒドロラーゼII)は、異なる反応を触媒し、同じ種に2つの異なる機能を有する、共通の祖先から同時進化した2つの異なる酵素を表すため、パラログであると思なすことができる。パラログは、互いに有意な配列類似性を有する同一種のタンパク質であり、それは、それらが相同体であるか、又は共通の祖先からの同時進化を介して関連づけられていることを示唆する。パラログタンパク質系統のグループは、HipA相同体、ルシフェラーゼ遺伝子及びペプチダーゼ等を含む。

40

【0043】

非オルソログ遺伝子置換は、異なる種における記載の遺伝子機能に代わることができる1つの種からの非オルソログ遺伝子である。置換は、例えば、異なる種における被参照機能と比較して、本来の種における実質的に同様又は類似の機能を実施できることを含む。一般に、非オルソログ遺伝子置換は、被参照機能をコードする既知の遺伝子に構造的に関連するものとして識別可能であるが、構造的関連性が低い、機能的に類似の遺伝子及び

50

それらの対応する遺伝子生成物も、本明細書に使用されるとき該用語の意味の範囲内に含まれる。機能的類似性は、例えば、置換しようとする機能をコードする遺伝子と比較して、非オルソログ遺伝子の活性部位又は結合領域において少なくともある程度の類似性を必要とする。したがって、非オルソログ遺伝子は、例えば、パラログ又は非関連遺伝子を含む。

【0044】

したがって、4-HB、GBL及び/又はBDO生合成機能を有する本発明の非天然微生物体を特定及び構成するのに際して、当業者は、本明細書に示される教示及び指針を特定の種に適用すると、代謝修飾の特定が、オルソログの特定及び包含又は不活性化を含むことができることを理解するであろう。パラログ及び/又は非オルソログ遺伝子置換が、類似又は実質的に類似の代謝反応を触媒する酵素をコードする被参照微生物に存在する範囲で、当業者は、これらの進化的に関連する遺伝子を利用することもできる。

【0045】

オルソログ、パラログ及び非オルソログ遺伝子置換を当業者に周知の方法によって測定することができる。例えば、2つのポリペプチドについての核酸又はアミノ酸配列の調査は、比較配列間の配列同一性及び類似性を明らかにすることになる。当該類似性に基づいて、当業者は、タンパク質が共通の祖先からの進化を介して関連することを示すのに類似性が十分に高度なものであるかどうかを判断することができる。Align、BLAST及びClustal W等の当業者に周知のアルゴリズムは、粗配列類似性又は同一性を比較及び判断するとともに、重み又は得点を割り当てることができる配列のギャップの存在又は有意性を判断する。当該アルゴリズムも当該技術分野で既知であり、ヌクレオチド配列類似性又は同一性を判断するのに同様に適用可能である。関連性を判断するための十分な類似性についてのパラメータは、統計的類似性、又はランダムポリペプチドにおける類似の対応を見いだす可能性、及び測定された対応の有意性を計算するための周知の方法に基づいて計算される。望まれる場合は、2つ以上の配列のコンピュータ比較を当業者によって視覚的に最適化することができる。関連遺伝子生成物又はタンパク質は、高い類似性、例えば、25%から100%の配列同一性を有することが期待できる。関連しないタンパク質は、十分なサイズのデータベースを走査した場合に、偶然に生じることが期待される程度と実質的に同じである同一性(約5%)を有し得る。5%から24%の配列は、比較した配列が関連することを結論づけるための十分な相同性を表す場合もあるし、表さない場合もある。データ集合体のサイズが与えられた当該対応の有意性を判断するためのさらなる統計的分析を実施して、これらの配列の関連性を判断することができる。

【0046】

BLASTアルゴリズムを使用して2つ以上の配列の関連性を判断するための例示的なパラメータを、例えば、以下に記載することができる。手短に述べると、BLASTバージョン2.0.8(Jan-05-1999)及び以下のパラメータ:Matrix:0 BLOSUM62;gap open:11;gap extension:1;x_dropoff:50;expect:10.0;wordsize:3;filter:onを使用して、アミノ酸配列アラインメントを実施することができる。BLASTNバージョン2.0.6(Sept-16-1998)及び以下のパラメータ:Match:1;mismatch:-2;gap open:5;gap extension:2;x_dropoff:50;expect:10.0;wordsize:11;filter:offを使用して、核酸配列アラインメントを実施することができる。例えば比較の厳密さを向上又は低下させ、2つ以上の配列の関連性を判断するために上記パラメータにどのような修正を加えることができるかを当業者は把握するであろう。

【0047】

本発明は、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンセターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ又はグルタミン酸デカルボキシラーゼをコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)生合成経路を有する微生物体を含む非天然微生物生触媒であって、該外因性核酸が、モノマー4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)を生成するのに十分な量で発現される非天然微生物生触媒を提供する。4-ヒ

ドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼは、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ又は4-HBデヒドロゲナーゼとも称する。スクシニル-CoAシンセターゼは、スクシニル-CoAシンセターゼ又はスクシニル-CoAリガーゼとも称する。

【0048】

4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンセターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ又は α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼをコードする少なくとも1つの外因性核酸を有する4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)生合成経路を有する微生物体を含む非天然微生物生触媒であって、該外因性核酸が、モノマー4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)を生成するのに十分な量で発現される非天然微生物生触媒も提供される。

10

【0049】

本発明の非天然微生物生触媒は、本発明の化合物を生合成生成するための代謝反応の組合せを採用する微生物体を含む。生合成化合物を細胞内で生成し、且つ/又は培地に分布することができる。非天然微生物によって生成される例示的な化合物としては、例えば、4-ヒドロキシブタン酸、1,4-ブタンジオール及び γ -ブチロラクトンが挙げられる。

【0050】

一実施態様において、非天然微生物体は、4-HBを生成するように操作される。この化合物は、1,4-ブタンジオール系列の化合物への1つの有用な入口点である。コハク酸から、又はスクシニル-CoAを介してコハク酸から、又は α -ケトグルタル酸から4-HBを形成するための生化学反応を図1の工程1~8に示す。

20

【0051】

出発化合物からBDO生成物への変換が達成されるのであれば、BDO経路の適切な酵素の任意の組合せを使用できることが理解される。したがって、本明細書に開示されている代謝経路のいずれかを利用できること、及び本明細書に開示されているように、所望の経路を達成するために適切な酵素をどのように選択すべきかを当業者が十分理解することが理解される。

【0052】

別の実施態様において、本発明は、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDOを有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼを含む非天然微生物体を提供する(実施例VII表17参照)。該BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。

30

【0053】

本明細書に開示されているように、経路の様々な組合せを利用できることが当業者に理解される。例えば、非天然微生物体において、核酸は、4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ又は4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ;4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ;及び4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼをコードすることができる。他の例示的な組合せを以下に具体的に記載し、図8~13にさらに見いだすことができる。例えば、該BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。

40

【0054】

本発明は、さらに、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラ

50

ーゼ、4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼを含む非天然微生物体(実施例VII及び表18)を提供し、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。例えば、外因性核酸は、4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ又は4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ;4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成);及び4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼをコードすることができる。加えて、核酸は、4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ又は4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ;4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ;4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ;及び4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼをコードすることができる。

【0055】

本発明は、さらに、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、4-アミノ酪酸キナーゼ、4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、[(4-アミノブタノイル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-リン酸デヒドロゲナーゼ又は4-ヒドロキシブチラルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含む非天然微生物体を提供する(実施例VII及び表19)。例えば、外因性核酸は、4-アミノ酪酸キナーゼ;4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化);4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ;及び4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼをコードすることができる。代替的に、外因性核酸は、4-アミノ酪酸キナーゼ;[(4-アミノブタノリル)オキシ]リン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ;4-ヒドロキシブチリル-リン酸デヒドロゲナーゼ;及び4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)をコードすることができる。

【0056】

BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、アルファ-ケトグルタル酸5-キナーゼ、2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ、アルファ-ケトグルタル酸CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含む非天然微生物体も提供される(実施例VIII及び表20)。該BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。例えば、該外因性核酸は、アルファ-ケトグルタル酸5-キナーゼ;2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化);2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼをコードすることができる。代替的に、該外因性核酸は、アルファ-ケトグルタル酸5-キナーゼ;2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化);2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードすることができる。代替的に、該外因性核酸は、アルファ-ケトグルタル酸CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ又はアル

ファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ; アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ; 及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼをコードすることができる。別の実施態様において、該外因性核酸は、アルファ-ケトグルタル酸CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ; アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードすることができる。代替的に、該外因性核酸は、アルファ-ケトグルタル酸CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ; アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成); 及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼをコードすることができる。さらに別の実施態様において、該外因性核酸は、アルファ-ケトグルタル酸-CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ; アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成); 及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードすることができる。

10

【0057】

本発明は、さらに、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、グルタミン酸CoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ、グルタミル-CoAリガーゼ、グルタミン酸5-キナーゼ、グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、グルタミル-CoAレダクターゼ、グルタミン酸-5-セミアルデヒドレダクターゼ、グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含む非天然微生物体を提供する(実施例IX及び表21参照)。例えば、該外因性核酸は、グルタミン酸CoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ又はグルタミル-CoAリガーゼ; グルタミル-CoAレダクターゼ; グルタミン酸-5-セミアルデヒドレダクターゼ; 2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ; 及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードすることができる。代替的に、該外因性核酸は、グルタミン酸5-キナーゼ; グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化); グルタミン酸-5-セミアルデヒドレダクターゼ; 2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ; 及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードすることができる。さらに別の実施態様において、該外因性核酸は、グルタミン酸CoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ又はグルタミル-CoAリガーゼ; グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成); 2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ; 及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードすることができる。さらに別の実施態様において、該外因性核酸は、グルタミン酸5-キナーゼ; グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化); 2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ; 及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードすることができる。

20

30

40

【0058】

また、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経

50

路が、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、ビニルアセチル-CoA Δ -イソメラーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼを含む非天然微生物体が提供される(実施例X及び表22参照)。例えば、該外因性核酸は、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ;3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ;ビニルアセチル-CoA Δ -イソメラーゼ;及び4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼをコードすることができる。

【0059】

別の実施態様において、本発明は、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、ホモセリンデアミナーゼ、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ、ホモセリン-CoAリガーゼ、ホモセリン-CoAデアミナーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エン酸レダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoA-トランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼを含む非天然微生物体を提供する(実施例XI及び表23参照)。例えば、該外因性核酸は、ホモセリンデアミナーゼ;4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ;4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼをコードすることができる。代替的に、該外因性核酸は、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ又はホモセリン-CoAリガーゼ;ホモセリン-CoAデアミナーゼ;及び4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼをコードすることができる。さらなる実施態様において、該外因性核酸は、ホモセリンデアミナーゼ;4-ヒドロキシブタ-2-エン酸レダクターゼ;及び4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼをコードすることができる。代替的に、該外因性核酸は、ホモセリン-CoAトランスフェラーゼ、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ又はホモセリン-CoAリガーゼ;ホモセリン-CoAデアミナーゼ;及び4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼをコードすることができる。

【0060】

さらに、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、スクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(本明細書ではアシルリン酸レダクターゼとも称する)を含む非天然微生物体が本発明により提供される(表15参照)。当該BDO経路は、スクシニル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。

【0061】

別の実施態様において、本発明は、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、4-アミノ酪酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(アシルリン酸レダクターゼ)を含む非天然微生物体を提供する(表16参照)。当該BDO経路は、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(

アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。

【0062】

さらなる実施態様において、本発明は、4-HB又はBDO経路を有する非天然微生物体であって、図1に例示されるように、基質を4HB又はBDO経路の生成物に、例えば、スクシニル-CoAをコハク酸セミアルデヒドに、コハク酸セミアルデヒドを4-ヒドロキシ酪酸に、4-ヒドロキシ酪酸を4-ヒドロキシブチリルCoAに、4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチルアルデヒドに、4-ヒドロキシブチルアルデヒドを1,4-ブタンジオールに変換する酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む非天然微生物体を提供する。別の実施態様において、基質から4-HB又はBDO経路の生成物は、図8Aの一実施態様に例示されているように、例えば、スクシニル-CoAからコハク酸セミアルデヒド、コハク酸セミアルデヒドから4-ヒドロキシ酪酸、4-ヒドロキシ酪酸から4-ヒドロキシブチリル-リン酸、4-ヒドロキシブチリル-リン酸から4-ヒドロキシブチリル-CoA、4-ヒドロキシブチリル-CoAから4-ヒドロキシブタナール、4-ヒドロキシブタナールから1,4-ブタンジオールであり得る。したがって、本発明は、酵素又はタンパク質をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む非天然微生物体であって、該酵素又はタンパク質が、図8~13に示されるものなどの基質及び4-HB又はBDO経路の生成物を変換する非天然微生物体を提供し、当業者は、本明細書に開示される4-HB又はBDO経路に基づいて当該基質及び生成物を容易に決定することができる。

10

【0063】

上記経路は、単に例示である。当業者は、要望に応じて、本明細書に開示されるものから適切な経路を容易に選択して、好適な4-HB若しくはBDO経路又は他の代謝経路を得ることができる。

20

【0064】

代謝反応、その反応物質又は生成物の一般的言及により、或いは被参照代謝反応、反応物質又は生成物に伴う、又はそれを触媒する酵素をコードする1つ以上の核酸又は遺伝子の具体的言及により本発明を本明細書に記載する。そうでないことが本明細書に明記される場合を除いて、当業者は、反応の言及が、また、反応の反応物質及び生成物の言及を構成することを理解するであろう。同様に、そうでないことが本明細書に明記される場合を除いて、反応物質又は生成物の言及が、また、反応を指し、これらの代謝構成要素のいずれかの言及が、また、被参照反応、反応物質又は生成物を触媒する酵素をコードする1つ以上の遺伝子を指す。同様に、代謝生化学、酵素学及びゲノム解析の周知の分野を考慮すると、本明細書における遺伝子又はコード化核酸の言及は、対応する被コード化酵素及びそれが触媒する反応、並びに該反応の反応物質及び生成物の言及を構成する。

30

【0065】

本発明の微生物体を使用する生合形成態を介する4-HBの生成は、モノマー4HBを生成することができるため、特に有用である。本発明の非天然微生物並びに4-HB及びBDO系統の化合物のそれらの生合成は、また、4-HB生成物が(1)分泌可能であり、(2)補酵素Aなどの任意の誘導体化を避けることができ、(3)生合成中の熱力学的変化を回避し、(4)BDOの直接的な生合成を可能にし、(5)酸性pH培地における4-HBの γ -ブチロラクトン(GBL)への自然化学変換を可能にするため、特に有用である。後者の特性は、また、例えば1,4-ブタンジオール及び/又はテトラヒドロフラン(THF)などのBDO系統の化合物の効率的な化学合成又は生合成に特に有用である。

40

【0066】

微生物体は、一般に、4-HBを合成する能力が欠如している。1,4-ブタンジオール系統の化合物の範囲内であることが本明細書に開示されている化合物、又は1,4-ブタンジオール系統の化合物の範囲内であることが当業者に知られる化合物のいずれもが、1,4-ブタンジオール系統の化合物の範囲内にあると見なされる。さらに、必須の代謝酵素機能のすべてを有する生物体は、記載の酵素及び本明細書に例示される生化学経路から4-HBを生成することが知られていない。むしろ、恐らくは以下にさらに記載されるいくつかの嫌気性微生物を除いては、酵素機能を有する微生物は、4-HBを基質として使用して、例えばコハク酸

50

を生成する。対照的に、本発明の非天然微生物体は、4-HB又はBDOを生成物として生成することができる。上述のように、そのモノマー型における4-HBの生合成は、BDO系統の化合物の化学合成に特に有用であるだけでなく、BDO系統の化合物のさらなる生合成を可能にし、化学合成手順を完全に回避する。

【0067】

4-HB又はBDOを生成することができる本発明の非天然微生物体は、宿主微生物体が、本発明の少なくとも1つの4-HB又はBDO生合成経路の完全な生化学合成のための機能的能力を含むようにすることによって生成される。少なくとも1つの必須の4-HB又はBDO生合成経路を確保することで、4-HB生合成機能が宿主微生物体に付与される。

【0068】

5つの4-HB生合成経路を本明細書に例示し、例示の目的で図1に示す。さらなる4-HB及びBDO経路を図8～13に記載する。1つの4-HB生合成経路は、コハク酸(コハク酸経路)からの4-HBの生合成を含む。この4-HB経路に関係する酵素は、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼを含む。この経路において、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼは、図1に示される矢印方向に対する逆反応を触媒する。別の4-HB生合成経路は、スクシニル-CoA(スクシニル-CoA経路)を介するコハク酸からの生合成を含む。この4HB経路に関係する酵素は、スクシニル-CoAシンセターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼを含む。3つの他の4-HB生合成経路は、 α -ケトグルタル酸(α -ケトグルタル酸経路)からの4-HBの生合成を含む。したがって、第3の4-HB生合成経路は、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ及び4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼを介するコハク酸セミアルデヒドの生合成である。第4の4-HB生合成経路は、 α -ケトグルタル酸からの4HBの生合成をも含むが、 α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼを利用して、コハク酸セミアルデヒド合成を触媒する。4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼは、コハク酸セミアルデヒドの4-HBへの変換を触媒する。第5の4-HB生合成経路は、スクシニル-CoAを介する α -ケトグルタル酸からの生合成を含み、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼを利用して、上記のスクシニル-CoA経路に入り込むスクシニル-CoAを生成する。これらの4-HB生合成経路、それらの基質、反応物質及び生成物のそれぞれを以下の実施例にさらに記載する。本明細書に記載されるように、4-HBを、適切な酵素を含めることによってBDOにさらに生合成変換してBDOを生成することができる(実施例参照)。したがって、4-HB経路を、4-HBをBDOに変換するための酵素と併用して、BDO経路を生成できることが理解される。

【0069】

1つ以上の4-HB又はBDO生合成経路に関係する酵素の1種以上をコードする発現可能な核酸を導入することによって、本発明の非天然微生物体を生成することができる。生合成のために選択された宿主微生物体に応じて、特定の4-HB又はBDO生合成経路の一部又はすべてに対する核酸を発現することができる。例えば、選択された宿主が所望の生合成経路、例えば、コハク酸から4-HBへの経路において1つ以上の酵素が不足する場合は、不足する酵素、例えば、この例ではCoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼの両方が、後の外因性発現のために宿主に導入される。代替的に、選択された宿主がいくつかの経路酵素の外因性発現を示すが、他の酵素が不足する場合は、不足する酵素が4-HB又はBDO生合成を達成するためにコード化核酸が必要になる。例えば、選択された宿主がCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼを示すが、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼが不足する場合は、この酵素が4-HB生合成を達成するためにコード化核酸が必要になる。したがって、外因性酵素又はタンパク質活性を導入して所望の生合成経路を得ることによって、本発明の非天然微生物体を生成することができ、或いは1つ以上の外因性酵素又はタンパク質と一緒に、4-HB又はBDOなどの所望の生成物を生成する1つ以上の外因性酵素又はタンパク質活性を導入することによって所望の生合成経路を得ることができる。

【0070】

同様にして、4-HB生合成が、コハク酸からスクシニル-CoA経路(スクシニル-CoA経路)を介して生じるように選択される場合は、酵素スクシニル-CoAシンセターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び/又は4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼの宿主欠乏に対するコード化核酸が、受容体宿主に外因的に発現されるべきである。 α -ケトグルタル酸からコハク酸セミアルデヒド経路(α -ケトグルタル酸経路)を介する4-HB生合成の選択は、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ及び/又は4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ又は α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ及び4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼについての酵素の1種以上の宿主欠乏に対する外因性発現を利用することができる。当業者は、本明細書に開示されるように、4-HB又はBDOの生成のための経路酵素を容易に決定することができる。

10

【0071】

選択された宿主微生物体の4-HB又はBDO生合成経路構成要素に応じて、本発明の非天然微生物体は、少なくとも1つの外因発現された4-HB又はBDO経路コード化核酸、及び1つ以上の4-HB又はBDO生合成経路のためのすべてのコード化核酸を含むことになる。例えば、4-HB又はBDO生合成を、対応するコード化核酸の外因性発現を介して、経路酵素又はタンパク質が欠乏した宿主に確立することができる。4-HB又はBDO経路のすべての酵素又はタンパク質が欠乏した宿主において、すべての酵素又はタンパク質の外因性発現を含むことができるが、宿主が経路酵素又はタンパク質の少なくとも1つを含む場合でも経路のすべての酵素又はタンパク質を発現できることが理解される。例えば、BDOの生成のための経路におけるすべての酵素又はタンパク質の外因性発現を含むことができる。例えば、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼコード化核酸の外因性発現を介して、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼが欠乏した宿主におけるすべての5つの経路から4-HB生合成を確立することができる。対照的に、CoA非依存性コハク酸デヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンセターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、 α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼのすべての8つの酵素の外因性発現を介して、すべての8つの酵素が欠乏した宿主にすべての5つの経路から4-HB生合成を確立することができる。

20

【0072】

本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、発現可能な形で導入すべきコード化核酸の数は、少なくとも、選択された宿主微生物体の4-HB又はBDO経路欠乏に相応することを当業者は理解するであろう。したがって、本発明の非天然微生物体は、1つ以上の4HB又はBDO生合成経路を構成する、本明細書に開示される酵素をコードする1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ又はすべての核酸を有することができる。いくつかの実施態様において、非天然微生物体は、4-HB又はBDO生合成を促進又は最適化する、或いは他の有用な機能を宿主微生物体に付与する他の遺伝子修飾を含むこともできる。1つの当該他の機能は、例えば、コハク酸、スクシニル-CoA、 α -ケトグルタル酸、4-アミノ酪酸、グルタミン酸、アセトアセチル-CoA及び/又はホモセリンなどの4-HB経路前駆体の1種以上の合成の増強を含むことができる。

30

40

【0073】

一般に、宿主微生物体は、天然生成分子、所望の前駆体の新たな生成、又は宿主微生物体によって自然に生成される前駆体の生成の増大をもたらす操作生成物として、4-HB又はBDO経路の前駆体を生成するように選択される。例えば、スクシニル-CoA、 α -ケトグルタル酸、4-アミノ酪酸、グルタミン酸、アセトアセチル-CoA及びホモセリンは、大腸菌などの宿主生物体に自然に生成される。宿主生物体を操作して、本明細書に開示される前駆体の生成を増強することができる。加えて、所望に前駆体を生成するために操作された微生物体を宿主生物体として使用し、さらに操作して、4-HB又はBDO経路の酵素又はタンパク質を発現させることができる。

【0074】

50

いくつかの実施態様において、本発明の非天然微生物体は、4-HB又はBDOを合成する酵素機能を含む宿主から生成される。この特定の実施態様において、4-HB又はBDO経路生成物の合成又は蓄積を増強して、例えば、4-HB又はBDO経路反応を4-HB又はBDOの生成に向けて誘導することが有用であり得る。合成又は蓄積の増強を、例えば、本明細書に開示される4-HB又はBDO経路酵素の1種以上をコードする核酸の過剰発現によって達成することができる。1つ以上の4-HB又はBDO経路酵素の過剰発現は、例えば、1つ以上の内因性遺伝子の外因性発現、或いは1つ以上の非相同性遺伝子の外因性発現を介して起こり得る。したがって、天然生物体を、4-HB又はBDO生合成経路をコードするすべての核酸まで1つ、2つ、3つ、4つ、5つ及び6つ等の核酸の過剰発現を介して、本発明の非天然4-HB又はBDO生成微生物体になるように容易に生成することができる。加えて、4-HB又はBDO生合成経路において酵素の活性を増強させる外因性遺伝子の突然変異によって非天然生物体を生成することができる。

10

【0075】

特に有用な実施形態において、コード化核酸の外因性発現が採用される。外因性発現は、発現及び/又は調節要素を宿主及び用途に合わせて調整して、使用者によって制御される所望の発言レベルを達成する能力を付与する。しかし、例えば、誘導性プロモーター又は他の調節要素と連結されたときに負の調節エフェクターを除外するか、又は遺伝子のプロモーターを誘導することによって、外因性発現を他の実施態様に利用することができる。したがって、天然誘導性プロモーターを有する外因性遺伝子を、適切な誘導剤を供給することによって上方制御することができ、又は外因性遺伝子の調節領域を操作して、誘導性調節要素を組み込むことによって、所望の時間における外因性遺伝子の発現の増強の調節を可能にする。同様に、誘導性プロモーターを、非天然微生物体に導入された外因性遺伝子に対する調節要素として含めることができる(実施例参照)。

20

【0076】

「外因性」は、本明細書に使用されるように、被参照分子又は被参照活性が宿主微生物体に導入されることを意味することを意図する。分子を、例えば、コード化核酸の宿主遺伝子材料への導入、例えば宿主染色体への統合によって、又はプラスミドなどの非染色体遺伝子材料として導入することができる。したがって、該用語は、コード化核酸の発現に関して使用されるときは、コード化核酸の発現可能な形での微生物体への導入を指す。該用語は、生合成活性に関して使用されるときは、宿主参照生物体に導入される活性を指す。源は、例えば、宿主微生物体への導入後に被参照活性を発現する相同性又は非相同性コード化核酸であり得る。したがって、「外因性」という用語は、宿主に存在する被参照分子又は活性を指す。同様に、該用語は、コード化核酸の発現に関して使用されるときは、微生物体内に含まれるコード化核酸の発現を指す。「非相同性」という用語は、被参照種以外の源に由来する分子又は活性を指すのに対して、「相同性」は、宿主微生物体に由来する分子又は活性を指す。よって、本発明のコード化核酸の外因性発現は、非相同性又は相同性コード化核酸のいずれか、又は両方を利用することができる。

30

【0077】

4-HB又はBDO経路酵素のためのコード化核酸の源としては、例えば、被コード化遺伝子生成物が、被参照反応を触媒することが可能であるあらゆる種を挙げることができる。当該種は、古細菌及び真核細菌を含む細菌、並びに酵母、植物、昆虫、動物、及びヒトを含む哺乳類を含む真核生物を含むが、それらに限定されない原核生物体及び真核生物体を含む。当該源の例示的な種としては、例えば、以下に列挙する生物体、並びに本明細書に開示されるか、又は対応する遺伝子のための源生物体として入手可能な他の例示的な種が挙げられ、それらは、エシェリキア・コリ(*Escherichia coli*)、サッカロミセス・セレビスシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・クルイベリ(*Saccharomyces kluyveri*)、クロストリジウム・クルイベリ(*Clostridium kluyveri*)、クロストリジウム・アセトブチリクム(*Clostridium acetobutylicum*)、クロストリジウム・ベイジェリクキー(*Clostridium beijerinckii*)、クロストリジウム・サッカロペルブチルアセトニクム(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*)、クロストリジウム・ペルフリゲンス(*Clostridium*

40

50

perfringens)、クロストリジウム・ジフィシレ(*Clostridium difficile*)、クロストリジウム・ボツリヌム(*Clostridium botulinum*)、クロストリジウム・チロブチリクム(*Clostridium tyrobutyricum*)、クロストリジウム・テタノモルフム(*Clostridium tetanomorphum*)、クロストリジウム・テタニ(*Clostridium tetani*)、クロストリジウム・プロピオニクム(*Clostridium propionicum*)、クロストリジウム・アミノブチリクム(*Clostridium aminobutyricum*)、クロストリジウム・スブテルミナレ(*Clostridium subterminale*)、クロストリジウム・スティックランジ(*Clostridium sticklandii*)、ラルストニア・ユートロファ(*Ralstonia eutropha*)、ミコバクテリウム・ボビス(*Mycobacterium bovis*)、ミコバクテリウム・ツベルクローシス(*Mycobacterium tuberculosis*)、ポルフィロモナス・ギンギバリス(*Porphyromonas gingivalis*)、アラビドプシス・タリアナ(*Arabidopsis thaliana*)、テルムス・テルモフィルス(*Thermus thermophilus*)、シュードモナス・アエルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・スツトゼリ(*Pseudomonas stutzeri*)、シュードモナス・フルオレセンス(*Pseudomonas fluorescens*)を含むシュードモナス(*Pseudomonas*)属、ホモサピエンス(*Homo sapiens*)、オリクトラグス・クニクルス(*Oryctolagus cuniculus*)、ロドバクテル・スパエロイデス(*Rhodobacter spaeroides*)、テルモアナエロバクテル・ブロッキー(*Thermoanaerobacter brockii*)、メタロスファエラ・セデュラ(*Metallosphaera sedula*)、ロイコノストク・メセンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides*)、クロロフレクスウス・アウランチアクス(*Chloroflexus aurantiacus*)、ロセイフレクスウス・カステンホルジー(*Roseiflexus castenholzii*)、エリトロバクテル(*Erythrobacter*)、シモンドシア・キネンシス(*Simmondsia chinensis*)、アシネトバクテル・カルコアセチクス(*Acinetobacter calcoaceticus*)及びアシネトバクテル・バイリイ(*Acinetobacter baylyi*)を含むアシネトバクテル(*Acinetobacter*)属、ポルフィロモナス・ギンギバリス(*Porphyromonas gingivalis*)、スルホロブス・トコダイ(*Sulfolobus tokodaii*)、スルホロブス・ソルファタリクス(*Sulfolobus solfataricus*)、スルホロブス・アシドカルダリウス(*Sulfolobus acidocaldarius*)、バシルス・スブチリス(*Bacillus subtilis*)、バシルス・セレウス(*Bacillus cereus*)、バシルス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*)、バシルス・ブレビス(*Bacillus brevis*)、バシルス・プミルス(*Bacillus pumilus*)、ラツス・ノルベギクス(*Rattus norvegicus*)、クレブシエラ・ニューモニア(*Klebsiella pneumonia*)、クレブシエラ・オキシトカ(*Klebsiella oxytoca*)、ユーグレナ・グラシリス(*Euglena gracilis*)、トレポネマ・デンチコラ(*Treponema denticola*)、ムーレラ・テルモアセチカ(*Moorella thermoacetica*)、テルモトガ・マリチマ(*Thermotoga maritima*)、ハロバクテリウム・サリナルム(*Halobacterium salinarum*)、ゲオバシルス・ステアロテルモフィルス(*Geobacillus stearothermophilus*)、アエロピルム・ペルニクス(*Aeropyrum pernix*)、サス・スクロファ(*Sus scrofa*)、カエノルハブジチス・エレカンス(*Caenorhabditis elegans*)、コリネバクテリウム・グルタミクム(*Corynebacterium glutamicum*)、アシダミノコッカス・フェルメンタンス(*Acidaminococcus fermentans*)、ラクトコッカス・ラクチス(*Lactococcus lactis*)、ラクトバシルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*)、ストレプトコクス・テルモフィルス(*Streptococcus thermophilus*)、エンテロバクテル・アエロゲネス(*Enterobacter aerogenes*)、カンジダ(*Candida*)、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、ペジコッカス・ペントサセウス(*Pedococcus pentosaceus*)、ジモモナス・モビルス(*Zymomonas mobilis*)、アセトバクテル・パステウリアンス(*Acetobacter pasteurians*)、クルイペロマイセス・ラクチス(*Kluyveromyces lactis*)、ユーバクテリウム・バルケリ(*Eubacterium barkeri*)、バクテロイデス・カピロサス(*Bacteroides capillosus*)、アナエロツルンカス・コリホミニス(*Anaerotruncus colihominis*)、ナトラナエロビウス・テルモフィルスム(*Natranaerobius thermophilus*)、カンピロバクテル・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*)、ハエモフィルス・インフルエンザエ(*Haemophilus influenzae*)、セラチア・マルセセンス(*Serratia marcescens*)、シトロバクテル・アマロナチクス(*Citrobacter amalonaticus*)、ミクコッカス・キサントス(*Myxococcus xanthus*)、フソバクテリウム・ヌレアツム(*Fusobacterium nucleatum*)、ペニシルム・クリソゲヌム(*Penicillium chrysogenum*)マリンガンマプロテオバ

クテリア、酪酸生成バクテリア、及び本明細書に開示されている他のバクテリア(実施例参照)を含むが、それらに限定されない。例えば、4-HB又はBDO生合成生成を有する微生物体を、大腸菌及び酵母宿主に関して本明細書に例示する。しかし、今では、395種の微生物ゲノム並びに様々な酵母、真菌、植物及び哺乳類ゲノムを含む550を超える種について完全ゲノム配列が利用可能である(これらの半数超がNCBIなどの公的なデータベースで利用可能である)ため、例えば、既知の遺伝子の相同体、オルソログ、パラログ及び非オルソログ遺伝子置換、並びに生物体間の遺伝子変性の交換を含む、関連又は遠縁種における1つ以上の遺伝子のための必須4-HB又はBDO生合成活性をコードする遺伝子の特定は、当該技術分野において慣例且つ既知である。よって、4-HB又はBDO、及び大腸菌又は酵母などの特定の生物体に関して本明細書に記載されている本発明の他の化合物の生合成を可能にする代謝変性を、原核生物体及び真核生物体を含む他の微生物に容易に適用することができる。本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、1つの生物において例示される代謝変性を他の生物にも等しく適用できることを把握するであろう。

10

【0078】

4-HB又はBDO生合成経路が非関連種に存在する場合など、場合によっては、例えば、被参照反応に取って代わる類似するが、非特定の代謝反応を触媒する非関連種からの1つ以上のパラログの外因性発現によって、4-HB又はBDO生合成を宿主種に付与することができる。異なる生物体の間に、代謝ネットワーク間の一定の差異が存在するため、当業者は、異なる生物体の間の実際の遺伝子使用が異なり得ることを理解するであろう。しかし、本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、モノマー4-HBなどの4-HB又はBD

20

【0079】

例えば、細菌、酵母、真菌、又は発酵処理に適用可能な様々な他の微生物のいずれかから、宿主微生物体を選択し、非天然微生物体をそれらに生成することができる。例示的な細菌としては、エシェリキア・コリ、クレブシエラ・オキシトカ(*Klebsiella oxytoca*)、アナエロビオスピリウム・スクシニシプロデュセンス(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)、アクチノバシルス・スクシノゲネス(*Actinobacillus succinogenes*)、マンヘイミア・スクシニシプロデュセンス(*Mannheimia succiniciproducens*)、リゾビウム・エトリ(*Rhizobium etli*)、バシルス・スブチリス(*Bacillus subtilis*)、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)、グルコノバクテル・オキシダンス(*Gluconobacter oxydans*)、ジモモナス・モビリス(*Zymomonas mobilis*)、ラクトコッカス・ラクチス(*Lactococcus lactis*)、ラクトバシルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*)、ストレプトマイセス・コエリコロール(*Streptomyces coelicolor*)、クロストリジウム・アセトブチリクム(*Clostridium acetobutylicum*)、シュードモナス・フルオレセンス(*Pseudomonas fluorescens*)及びシュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)から選択される種が挙げられる。例示的な酵母又は真菌としては、サッカロマイセス・セレビシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、スキゾサッカロマイセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベロマイセス・ラクチス(*Kluyveromyces lactis*)、クルイベロマイセス・マルキシアニス(*Kluyveromyces marxianus*)、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、アスペルギルス・ニゲル(*Aspergillus niger*)及びピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)から選択される種が挙げられる。大腸菌は、遺伝子工学に好適な十分に特徴づけられた微生物体であるため、特に有用な宿主生物体である。他の特に有用な宿主生物体としては、サッカロマイセス・セレビシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)などの酵母が挙げられる。

30

40

【0080】

非天然4-HB又はBDO生成宿主の発現レベルを構成及び試験するための方法を、例えば、当該技術分野で周知の組換え及び検出方法によって実施することができる。当該方法を、例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed., Cold Spring

50

ng Harbor Laboratory, New York(2001);Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD(1999)に見いだすことができる。4-HB及びGBLを、例えば、Spherisorb 5 ODS1カラム並びに70%の10mMリン酸緩衝液(pH=7)及び30%メタノールの移動相を使用するHPLCによって分離し、215nmでUV検出器を使用して検出することができる(Hennessyら、2004, J. Forensic Sci. 46(6):1-9)。BDOは、ガスクロマトグラフィーによって、又はAminex HPX-87Hカラム及び0.5mM硫酸の移動相を使用するHPLC及び屈折率検出器によって検出される(Gonzalez-Pajueloら、Met. Eng. 7:329-336(2005))。

【0081】

4-HB又はBDOの生成のための経路に関係する外因性核酸配列を、接合、電気穿孔、化学変換、形質導入、形質移入及び超音波変換を含むが、それらに限定されない、当該技術分野で周知の技術を用いて安定的又は過渡的に宿主細胞に導入することができる。大腸菌又は他の原核細胞における外因性発現では、真核性核酸の遺伝子又はcDNAにおけるいくつかの核酸配列は、望まれる場合は原核宿主細胞への導入前に除去することができるN末端ミトコンドリア又は他のターゲッティングシグナルなどのターゲッティングシグナルをコードすることができる。例えば、ミトコンドリアリーダー配列を除去すると、大腸菌における発現が増強される(Hoffmeisterら、J. Biol. Chem. 280:4329-4338(2005))。酵母又は他の真核細胞における外因性発現では、遺伝子を、リーダー配列を加えることなくサイトソルに発現することができ、又はミトコンドリア若しくは他の細胞期間に導くことができ、或いは宿主細胞に好適なミトコンドリアターゲッティング若しくは分泌シグナルなどの好適なターゲッティング配列を加えることによって分泌に導くことができる。したがって、ターゲッティング配列を除去又は包含するための核酸配列に対する適切な修飾を外因性核酸配列に組み込んで、所望の特性を付与することができることが理解される。また、当該技術分野で周知の技術を用いて遺伝子をコドン最適化して、タンパク質の最適化発現を達成することができる。

【0082】

宿主生物体において機能的な発現制御配列に機能的に結合された、本明細書に例示される1つ以上の4-HB生合成経路及び/又は1つ以上のBDO生合成コード化核酸を含むように1つ以上の発現ベクターを構成することができる。本発明の微生物宿主生物体における使用に適用可能な発現ベクターは、例えば、宿主染色体への安定な統合のために機能するベクター及び選択配列又はマーカーを含むプラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター、エピソーム及び人工染色体を含む。また、発現ベクターは、1つ以上の選択可能なマーカー遺伝子及び適切な発言制御配列を含むことができる。例えば、抗生物質又は毒素に対する抵抗性を提供し、又は栄養要求欠乏を補完し、又は培地に存在しない重要栄養物を供給する選択可能遺伝子を含むこともできる。発現制御配列は、当該技術分野で周知である構成的及び誘導性プロモーター、転写エンハンサー及び転写ターミネーターを含むことができる。2つ以上の外因性コード化核酸が同時発現されるときは、両核酸を単一の発現ベクター又は個別の発現ベクターに挿入することができる。単一のベクター発現では、コード化核酸を1つの共通の発現制御配列に操作的に結合させるか、又は1つの誘導性プロモーター及び1つの構成的プロモーターなどの異なる発現制御配列に結合させることができる。代謝又は合成経路に関係する外因性核酸配列の変換を、当該技術分野で周知の方法を使用して確認することができる。当該方法は、例えば、ノーザンブロット又はmRNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅などの核酸分析、或いは遺伝子生成物の発現のための免疫プロテティング、或いは導入された核酸配列又はその対応する遺伝子生成物の発現を試験するための他の好適な分析法を含む。外因性核酸が、所望の生成物を生成するのに十分な量で発現されることが理解され、当該技術分野で周知の方法及び本明細書に開示される方法を使用して、発現レベルを最適化して十分な発現を得ることができることがさらに理解される。

【0083】

本発明の非天然微生物体は、モノマー4-HBなどの4-HB又はBDOを生成するのに十分な4-H

B又はBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの核酸を外因的に発現するために、本明細書に例示される、当該技術分野で周知の方法を使用して構成される。本発明の微生物体は、4-HB又はBDOを生成するのに十分な条件下で培養されることが理解される。各経路における4-HB酵素についての例示的な発現のレベルを以下の実施例にさらに記載する。本明細書に示される教示及び指針に従って、本発明の非天然微生物体は、モノマー4-HBなどの4-HB又はBDOの生合成を達成して、約0.1~200mM以上、例えば0.1~25mM以上の細胞内濃度を達成することができる。一般に、モノマー4-HBなどの4-HB又はBDOの細胞内濃度は、約10mM、20mM、50mM又は80mM以上を含めて、約3~150mM以上、特に約5~125mM以上、特に約8~100mM以上、例えば約3~20mM、特に約5~15mM以上、特に約8~12mMである。これらの例示的な範囲の各々の間及びそれを超える範囲の細胞内濃度を、本発明の非天然微生物体から達成することができる。

【0084】

いくつかの実施態様において、培養条件としては、嫌気性又は実質的に嫌気性成長又は維持条件を含む。例示的な嫌気性条件は、既に記載されており、当該技術分野で周知である。発酵処理の例示的な嫌気性条件は、本明細書に記載されており、例えば、2007年8月10日に出願された米国特許出願第11/891,602号に記載されている。これらの条件のいずれかを、非天然微生物体並びに当該技術分野で周知の他の嫌気性条件とともに採用することができる。当該嫌気性条件下において、4-HB又はBDO産生株は、5~10mM以上の細胞内濃度、並びに本明細書に例示されるすべての他の濃度で4-HB又はBDOを合成することができる。上記記載は細胞内濃度を指すが、4-HB又はBDO生成微生物体は、4-HB又はBDOを細胞内で生成し、且つ/又は生成物を培地に分泌することができる。

【0085】

培養条件は、例えば、液体培養手順、並びに発酵及び他の大規模培養手順を含むことができる。本明細書に記載されるように、本発明の生合成生成物の特に有用な収率を、嫌気性又は実質的に嫌気性培養条件下で達成することができる。

【0086】

本明細書に記載されるように、4-HB又はBDOの生合成を達成するための1つの例示的な成長条件は、嫌気性培養又は発酵条件を含む。ある実施態様において、本発明の非天然微生物体を、嫌気性又は実質的に嫌気性条件下で維持、培養又は発酵することができる。手短に述べると、嫌気性条件は、酸素が欠乏した環境を指す。実質的に嫌気性条件は、例えば、培地における溶存酸素濃度が飽和の0から10%に維持される培養、バッチ式発酵又は連続発酵を含む。実質的に嫌気性条件は、1%未満の酸素の雰囲気中で維持された密閉チャンバーの内部の液体培地中又は固体寒天上で成長又は休止細胞をも含む。例えば、培養物にN₂/CO₂混合物又は他の好適な1つ以上の無酸素ガスを散布することによって、酸素の百分率を維持することができる。

【0087】

本発明は、また、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンセターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシ酪酸:CoAトランスフェラーゼ、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミラーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、CoA非依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)及び1,4-ブタンジオール(BDO)生合成経路を有する微生物体を含む非天然微生物生触媒であって、該外因性核酸が、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現される非天然微生物生触媒を提供する。4-ヒドロキシ酪酸:CoAトランスフェラーゼは、4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとしても知られる。さらなる4-HB又はBDO経路酵素も本明細書に開示される(実施例及び図8~13参照)。

【0088】

本発明は、4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)及び1,4-ブタンジオール(BDO)生合成経路を有する微生物体を含む非天然微生物生触媒であって、該経路が、4-ヒドロキシブタン酸デヒ

ドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンセターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシ酪酸:CoAトランスフェラーゼ、4-酪酸キナーゼ、ホスホトランスブチラーゼ、 α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ又はアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼを含み、該外因性核酸が、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現される非天然微生物生触媒を提供する。

【0089】

BDOを生合成する非天然微生物体を生成することもできる。本発明の4-HB生成微生物体のように、BDO生成微生物体は、BDOを細胞内生成するか、又は培地中に分泌することができる。4-HBを合成する微生物体の構成について既に示されている教示及び指針に従って、さらなるBDO経路を4-HB生成微生物体に組み込んで、BDO及び他のBDO系統の化合物を合成する生物体を生成することができる。BDOの化学合成及びその下流生成物は既知である。BDO生合成が可能な本発明の非天然微生物体は、図1に例示される入口点として4-HBを使用して、これらの化学合成を回避する。以下にさらに記載するように、4-HB産生株を使用して、例えば、4-HBをGBLに変換し、次いでBDOをTHFに変換することができる。代替的に、4-HB産生株を、4-HB及び/又はGBLのBDOへの変換のための生合成機能を含むようにさらに修飾することができる。

【0090】

4-HB産生株に導入するさらなるBDO経路は、例えば、宿主欠乏背景における外因性発現、或いは工程9~13として図1に例示される1種以上の酵素の過剰発現を含む。1つの当該経路は、例えば、アルデヒド及びアルコールデヒドロゲナーゼが、個別の酵素、又はアルデヒド及びアルコールデヒドロゲナーゼ活性の両方を有する多機能性酵素であり得る、図1に工程9、12及び13として示される反応を実施するのに必要である酵素活性を含む。別の当該経路は、例えば、ここでもアルデヒド及びアルコールデヒドロゲナーゼが、個別の酵素、又はアルデヒド及びアルコールデヒドロゲナーゼ活性の両方を有する多機能性酵素であり得る、図1に工程10、11、12及び13として示される反応を実施するのに必要である酵素活性を含む。よって、4-HB産生株に導入するさらなるBDO経路は、例えば、宿主欠乏背景における外因性発現、又は4-ヒドロキシ酪酸:CoAトランスフェラーゼ、酪酸キナーゼ、ホスホトランスブチラーゼ、CoA依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼの1つ以上の過剰発現を含む。4-HBを修飾することが可能な外因性アシルCoAシンセターゼの不在下で、非天然BDO生成微生物体は、4-HBに対して選択的な外因性アシル-CoAシンセターゼ、又は4-HBの4-HB-CoAへの正味反応変換を有する複数の酵素の組合せをさらに含むことができる。以下の実施例にさらに例示されるように、酪酸キナーゼ及びホスホトランスブチラーゼは、BDO経路活性を示し、4-HB基質を用いて図1に例示される変換を触媒する。したがって、これらの酵素は、本明細書では、それぞれ4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ及びホスホトランスヒドロキシブチラーゼと称することもできる。

【0091】

4-HBからBDOへのこれらのインビボ変換に使用できる例示的なアルコール及びアルデヒドデヒドロゲナーゼを以下の表1に示す。

10

20

30

40

【表 1】

表 1. 4-HBのBDOへの変換のためのアルコール及びアルデヒド デヒドロゲナーゼ

アルコール デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.77	ラクトアルデヒド レダクターゼ	
ec:1.1.1.1	アルコール デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.78	メチルグリオキサール レダクターゼ(NADH-依存性)	
ec:1.1.1.2	アルコール デヒドロゲナーゼ (NADP+)	ec:1.1.1.79	グリオキシル酸 レダクターゼ (NADP+)	
ec:1.1.1.4	(R,R)-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.80	イソプロパノール デヒドロゲナーゼ (NADP+)	
ec:1.1.1.5	アセトイン デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.81	ヒドロキシビルビン酸 レダクターゼ	
ec:1.1.1.6	グリセロール デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.82	リンゴ酸 デヒドロゲナーゼ (NADP+)	10
ec:1.1.1.7	プロパンジオール-リン酸	ec:1.1.1.83	D-リンゴ酸 デヒドロゲナーゼ (脱炭酸化)	
デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.84	ジメチルリンゴ酸 デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.8	グリセロール-3-リン酸	ec:1.1.1.85	3-イソプロピルリンゴ酸 デヒドロゲナーゼ	
デヒドロゲナーゼ (NAD+)		ec:1.1.1.86	ケトール酸 レダクトイソメラーゼ	
ec:1.1.1.11	D-アラビニトール 4-デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.87	ホモイソクエン酸 デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.12	L-アラビニトール 4-デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.88	ヒドロキシメチルグルタリル-CoA	
ec:1.1.1.13	L-アラビニトール 2-デヒドロゲナーゼ	レダクターゼ		
ec:1.1.1.14	L-イジトール 2-デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.90	アリール-アルコール デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.15	D-イジトール 2-デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.91	アリール-アルコール デヒドロゲナーゼ (NADP+)	
ec:1.1.1.16	ガラクトクトール 2-デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.92	オキサログリコール酸 レダクターゼ (脱炭酸化)	20
ec:1.1.1.17	マンニトール-トリリン酸 5-	ec:1.1.1.94	グリセロール-3-ホスフェート デヒドロゲナーゼ [NAD(P)+]	
デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.95	ホスホグリセリン酸 デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.18	イノシトール 2-デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.97	3-ヒドロキシベンジル-アルコール	
ec:1.1.1.21	アルデヒド レダクターゼ	デヒドロゲナーゼ		
ec:1.1.1.23	ヒスチジノール デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.101	アシルグリセロリン-ホスフェートレダクターゼ	
ec:1.1.1.26	グリオキシル酸 レダクターゼ	ec:1.1.1.103	L-トレオニン 3-デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.27	L-乳酸 デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.104	4-オキソプロリン レダクターゼ	
ec:1.1.1.28	D-乳酸 デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.105	レチノール デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.29	グリセリン酸 デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.110	インドール乳酸 デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.30	3-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.112	インダノール デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.31	3-ヒドロキシイソ酪酸	ec:1.1.1.113	L-キシロース 1-デヒドロゲナーゼ	
デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.129	L-トレオニン 3-デヒドロゲナーゼ	30
ec:1.1.1.35	3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.137	リビトール-5-ホスフェート 2-デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.36	アセトアセチル-CoA レダクターゼ	ec:1.1.1.138	マンニトール 2-デヒドロゲナーゼ (NADP+)	
ec:1.1.1.37	リンゴ酸 デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.140	ソルビトール-6-ホスフェート 2-デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.38	リンゴ酸 デヒドロゲナーゼ (オキサロ酢酸-脱炭酸化)	ec:1.1.1.142	D-ピニトール デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.39	リンゴ酸 デヒドロゲナーゼ (脱炭酸化)	ec:1.1.1.143	セクオイトール デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.40	リンゴ酸 デヒドロゲナーゼ (オキサロ酢酸-脱炭酸化) (NADP+)	ec:1.1.1.144	ペリリル-アルコール デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.41	イソクエン酸 デヒドロゲナーゼ (NAD+)	ec:1.1.1.156	グリセロール 2-デヒドロゲナーゼ (NADP+)	
ec:1.1.1.42	イソクエン酸 デヒドロゲナーゼ (NADP+)	ec:1.1.1.157	3-ヒドロキシブチリル-CoA	40
ec:1.1.1.54	アリール-アルコール デヒドロゲナーゼ	デヒドロゲナーゼ		
ec:1.1.1.55	ラクトアルデヒド レダクターゼ (NADPH)	ec:1.1.1.163	シクロペンタノール デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.56	リビトール 2-デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.164	ヘキサデカノール デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.59	3-ヒドロキシプロピオン酸	ec:1.1.1.165	2-アルキン-1-オール デヒドロゲナーゼ	
デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.166	ヒドロキシシクロヘキサノール	
ec:1.1.1.60	2-ヒドロキシ-3-オキソプロピオン酸	デヒドロゲナーゼ		
レダクターゼ		ec:1.1.1.167	ヒドロキシマロン酸 デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.61	4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.174	シクロヘキサノール-1,2-ジオール	
ec:1.1.1.66	オメガ-ヒドロキシデカン酸	デヒドロゲナーゼ		
デヒドロゲナーゼ				
ec:1.1.1.67	マンニトール 2-デヒドロゲナーゼ			
ec:1.1.1.71	アルコール デヒドロゲナーゼ [NAD(P)+]			
ec:1.1.1.72	グリセロール デヒドロゲナーゼ (NADP+)			
ec:1.1.1.73	オクタノール デヒドロゲナーゼ			
ec:1.1.1.75	(R)-アミノプロパノール デヒドロゲナーゼ			
ec:1.1.1.76	(S,S)-ブタンジオール デヒドロゲナーゼ			

Docket No.: 066662-0251

ec:1.1.1.177	グリセロール-3-リン酸 1-	アルデヒド デヒドロゲナーゼ	
デヒドロゲナーゼ(NADP+)			
ec:1.1.1.178	3-ヒドロキシ-2-メチルブチリル-CoA	ec:1.2.1.2	ギ酸 デヒドロゲナーゼ
デヒドロゲナーゼ		ec:1.2.1.3	アルデヒド デヒドロゲナーゼ(NAD+)
ec:1.1.1.185	L-グリコール デヒドロゲナーゼ	ec:1.2.1.4	アルデヒド デヒドロゲナーゼ(NADP+)
ec:1.1.1.190	インドール-3-アセトアルデヒド レダクターゼ	ec:1.2.1.5	アルデヒド デヒドロゲナーゼ
(NADH)		[NAD(P)+]	
ec:1.1.1.191	インドール-3-アセトアルデヒド レダクターゼ	ec:1.2.1.7	ベンズアルデヒド デヒドロゲナーゼ
(NADPH)		(NADP+)	10
ec:1.1.1.192	長鎖-アルコール デヒドロゲナーゼ	ec:1.2.1.8	ベタイン-アルデヒド デヒドロゲナーゼ
ec:1.1.1.194	コニフェリル-アルコール デヒドロゲナーゼ	ec:1.2.1.9	グリセルアルデヒド-3-ホスフェート
ec:1.1.1.195	シンナミル-アルコール デヒドロゲナーゼ	デヒドロゲナーゼ(NADP+)	
ec:1.1.1.198	(+)-ボルネオール デヒドロゲナーゼ	ec:1.2.1.10	アセトアルデヒド デヒドロゲナーゼ
ec:1.1.1.202	1,3-プロパンジオール デヒドロゲナーゼ	(アセチル化)	
ec:1.1.1.207	(-)-メントール デヒドロゲナーゼ	ec:1.2.1.11	アスパラギン酸-セミアルデヒド
ec:1.1.1.208	(+)-ネオメントール デヒドロゲナーゼ	デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.216	ファルネソール デヒドロゲナーゼ	ec:1.2.1.12	グリセルアルデヒド-3-ホスフェート
ec:1.1.1.217	ベンジル-2-メチル-ヒドロキシ酪酸	デヒドロゲナーゼ(リン酸化)	
デヒドロゲナーゼ		ec:1.2.1.13	グリセルアルデヒド-3-ホスフェート
ec:1.1.1.222	(R)-4-ヒドロキシフェニル乳酸	デヒドロゲナーゼ(NADP+) (リン酸化)	
デヒドロゲナーゼ		ec:1.2.1.15	マロン酸-セミアルデヒド
ec:1.1.1.223	イソビペリテノール デヒドロゲナーゼ	デヒドロゲナーゼ	20
ec:1.1.1.226	4-ヒドロキシシクロヘキサンカルボン酸	ec:1.2.1.16	コハク酸-セミアルデヒド
デヒドロゲナーゼ		デヒドロゲナーゼ[NAD(P)+]	
ec:1.1.1.229	ジエチル 2-メチル-3-オキシコハク酸	ec:1.2.1.17	グリオキシル酸 デヒドロゲナーゼ
レダクターゼ		(アシル化)	
ec:1.1.1.237	ヒドロキシフェニルピルビン酸 レダクターゼ	ec:1.2.1.18	マロン酸-セミアルデヒド
ec:1.1.1.244	メタノール デヒドロゲナーゼ	デヒドロゲナーゼ (アセチル化)	
ec:1.1.1.245	シクロヘキサノール デヒドロゲナーゼ	ec:1.2.1.19	アミノブチルアルデヒド
ec:1.1.1.250	D-アラビニトール 2-デヒドロゲナーゼ	デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.251	ガラクトトール 1-ホスフェート 5-	ec:1.2.1.20	グルタル酸-セミアルデヒド
デヒドロゲナーゼ		デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.255	マンニトール デヒドロゲナーゼ	ec:1.2.1.21	グリコールアルデヒド デヒドロゲナーゼ
ec:1.1.1.256	フルオレン-9-オール デヒドロゲナーゼ	ec:1.2.1.22	ラクタルデヒド デヒドロゲナーゼ
ec:1.1.1.257	4-	ec:1.2.1.23	2-オキソアルデヒド デヒドロゲナーゼ
(ヒドロキシメチル)ベンゼンスルホン酸 デヒドロゲナーゼ		(NAD+)	30
ec:1.1.1.258	6-ヒドロキシヘキサン酸	ec:1.2.1.24	コハク酸-セミアルデヒド
デヒドロゲナーゼ		デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.259	3-ヒドロキシピメロイル-CoA	ec:1.2.1.25	2-オキソイソ吉草酸 デヒドロゲナーゼ
デヒドロゲナーゼ		(アシル化)	
ec:1.1.1.261	グリセロール-1-ホスフェート	ec:1.2.1.26	2,5-ジオキソ吉草酸 デヒドロゲナーゼ
デヒドロゲナーゼ[NAD(P)+]		ec:1.2.1.27	メチルマロン酸-セミアルデヒド
ec:1.1.1.265	3-メチルブタノール レダクターゼ	デヒドロゲナーゼ(アシル化)	
ec:1.1.1.283	メチルグリオキサール レダクターゼ (NADPH-	ec:1.2.1.28	ベンズアルデヒド デヒドロゲナーゼ
依存性)		(NAD+)	
ec:1.1.1.286	イソクエン酸-ホモイソクエン酸	ec:1.2.1.29	アリール-アルデヒド デヒドロゲナーゼ
デヒドロゲナーゼ		ec:1.2.1.30	アリール-アルデヒド デヒドロゲナーゼ
ec:1.1.1.287	D-アラビニトール デヒドロゲナーゼ	(NADP+)	40
(NADP+)		ec:1.2.1.31	L-アミノアジピン酸-セミアルデヒド
ブタノール デヒドロゲナーゼ		デヒドロゲナーゼ	
		ec:1.2.1.32	アミノムコン酸-セミアルデヒド
		デヒドロゲナーゼ	
		ec:1.2.1.36	レチナール デヒドロゲナーゼ
		ec:1.2.1.39	フェニルアセトアルデヒド デヒドロゲナーゼ

Docket No.: 066662-0251

ec:1.2.1.41	グルタミン酸-5-セミアルデヒド	
デヒドロゲナーゼ		
ec:1.2.1.42	ヘキサデカナール デヒドロゲナーゼ	
(アシル化)		
ec:1.2.1.43	ギ酸 デヒドロゲナーゼ (NADP+)	
ec:1.2.1.45	4- カルボキシ-2-ヒドロキシムコン酸-6-	
セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ		
ec:1.2.1.46	ホルムアルデヒド デヒドロゲナーゼ	10
ec:1.2.1.47	4-トリメチルアンモニオブチルアルデヒド	
デヒドロゲナーゼ		
ec:1.2.1.48	長鎖-アルデヒド	
デヒドロゲナーゼ		
ec:1.2.1.49	2- オキソアルデヒド デヒドロゲナーゼ	
(NADP+)		
ec:1.2.1.51	ピルビン酸 デヒドロゲナーゼ(NADP+)	
ec:1.2.1.52	オキソグルタル酸 デヒドロゲナーゼ	
(NADP+)		
ec:1.2.1.53	4-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒド	
デヒドロゲナーゼ		
ec:1.2.1.57	ブタナール デヒドロゲナーゼ	
ec:1.2.1.58	フェニルグリオキシル酸 デヒドロゲナーゼ	20
(アシル化)		
ec:1.2.1.59	グリセルアルデヒド-3-ホスフェート	
デヒドロゲナーゼ(NAD(P)+) (リン酸化)		
ec:1.2.1.62	4-ホルミルベンゼンスルホン酸	
デヒドロゲナーゼ		
ec:1.2.1.63	6-オキソヘキサン酸 デヒドロゲナーゼ	
ec:1.2.1.64	4-ヒドロキシベンズアルデヒド	
デヒドロゲナーゼ		
ec:1.2.1.65	サリチルアルデヒド デヒドロゲナーゼ	
ec:1.2.1.66	マイコチオール-依存性 ホルムアルデヒド	
デヒドロゲナーゼ		
ec:1.2.1.67	バニリン デヒドロゲナーゼ	30
ec:1.2.1.68	コニフェリル-アルデヒド デヒドロゲナーゼ	
ec:1.2.1.69	フルオロアセトアルデヒド デヒドロゲナーゼ	
ec:1.2.1.71	スクシニルグルタミン酸-セミアルデヒド	
デヒドロゲナーゼ		

【0092】

他の例示的な酵素及び経路を本明細書に開示する(実施例参照)。また、基質が天然基質でない反応を実施するために酵素を利用できることが理解される。非天然基質の活性は天然基質より低くてよいが、当該酵素を天然酵素として、又は本明細書に開示されるように指向性進化若しくは順応性進化を使用して修飾された酵素として利用できることが理解される(実施例も参照)。

【0093】

本明細書に開示される経路のいずれかを介するBDO生成は、部分的に、前駆体のBDOへの変換のための適切な酵素の特定に基づく。それらの反応工程のいくつかに対する多くの具体的な酵素が特定された。反応前駆体に特異的な酵素が特定されていない変換では、反応工程を触媒するのに最も適する酵素候補が特定された。酵素は、以下に記載するように、広範な基質に対して作用することが証明されている。加えて、タンパク質操作の分野における進歩は、天然基質でなくても、基質に対して効率的に作用するように酵素を変質することを実現可能にする。BDO経路に好適な多様なクラスの広範な特異性の酵素、並びに酵素を非天然基質に対して作用するように発展させるために使用された方法のいくつかの例を以下に記載する。

【0094】

10

20

30

40

50

BDO経路における主要なクラスの酵素は、ケトン又はアルデヒドをアルコール(1.1.1)に相互変換するオキシドレダクターゼである。このクラスにおける多くの例示的な酵素は、広範な基質に対して作用することができる。土壌細菌ブレビバクテリウム(*Brevibacterium*)属KU 1309(Hiranoら、J. Biosc. Bioeng. 100:318-222(2005))から精製されたアルコールデヒドロゲナーゼ(1.1.1.1)は、高度な活性を有する過剰の脂肪族並びに芳香族アルコールに対して作用することが証明された。表2は、異なるアルコールに対する酵素の活性及びその K_m を示す。酵素は、可逆的であり、いくつかのアルデヒドに対しても高い活性を有する(表3)。

【表 2】

表2. ブレビバクテリウム属KU由来のアルコールデヒドロゲナーゼの、
各種アルコールを酸化する相対的活性

基質	相対的活性 (0%)	K_m (mM)
2-フェニルエタノール	100*	0.025
(S)-2-フェニルプロパノール	156	0.157
(R)-2-フェニルプロパノール	63	0.020
ビンジル アルコール	199	0.012
3-フェニルプロパノール	135	0.033
エタノール	76	
1-ブタノール	111	
1-オクタノール	101	
1-ドデカノール	68	
1-フェニルエタノール	46	
2-プロパノール	54	

* 19.2 U/mgに相当する2-フェニルエタノールの活性を100%とした。

【表 3】

表3. ブレビバクテリウム属 KU 1309由来のアルコールデヒドロゲナーゼの、
各種カルボニル化合物を還元する相対的活性

基質	相対的活性 (%)	K_m (mM)
フェニルアセトアルデヒド	100	0.261
2-フェニルプロピオンアルデヒド	188	0.864
1-オクチルアルデヒド	87	
アセトフェノン	0	

【0095】

ラルストニア・ユーロファ(*Ralstonia eutropha*)からの乳酸デヒドロゲナーゼ(1.1.1.27)は、2-オキシ酪酸、2-オキシペンタン酸及び2-オキシグルタル酸(2-オキシアジピン酸に類似のC5化合物)などのいくつかの2-オキシ酸に対して高い活性を有する(Steinbuechel及びSchlegel、Eur. J. Biochem. 130:329-334(1983))。表4の第2欄は、異なる基質に対するR.ユーロファ(正式にはA.ユーロファ)のldhAの活性を示す(Steinbuechel及びSchlegel、前出、1983)。

【表 4】

表 4. ピルビン酸と比較した様々な基質における*R. ユートロファ* *ldhA*(Steinbuchel及びSchlegel, *supra*, 1983)のインビトロ活性

基質	A. ユートロファ由来の L(+)-乳酸 デヒドロゲナーゼ	ウサギ筋肉由来の L(+)-乳酸 デヒドロゲナーゼ	L. レイクマニ 由来の D(-)-乳酸 デヒドロゲナーゼ
グリオキシル酸	8.7	23.9	5.0
ピルビン酸	100.0	100.0	100.0
2-オキソ酪酸	107.0	18.6	1.1
2-オキソ吉草酸	125.0	0.7	0.0
3-メチル-2- オキソ酪酸	28.5	0.0	0.0
3-メチル-2- オキソ吉草酸	5.3	0.0	0.0
4-メチル-2- オキソペンタン酸	39.0	1.4	1.1
オキサロ酢酸	0.0	33.1	23.1
2-オキソグルタル酸	79.6	0.0	0.0
3-フルオロピルビン酸	33.6	74.3	40.0

【0096】

2-オキソ酸をそれらのアシルCoA対応物(1.2.1)に変換できるオキシドレダクターゼも複数の基質を受容することが証明された。例えば、2-オキソイソ吉草酸デヒドロゲナーゼ(1.2.1.25)としても知られる分枝鎖2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体(BCKAD)は、分枝鎖アミノ酸分解経路に参加して、バリン、ロイシン及びイソロイシンの2-ケト酸誘導体をそれらのアシル-CoA誘導体及びCO₂に変換する。ラッタス・ノルベギクス(*Rattus norvegicus*) (Paxtonら、*Biochem. J.* 234:295-303(1986))及びサッカロマイセス・セレビシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*) (Sinclairら、*Biochem. Mol Biol. Int.* 32:911-922(1993))を含むいくつかの生物において、この複合体は、分枝鎖アミノ酸前駆体に加えて、2-オキソブタン酸及びアルファ-ケトグルタル酸などの直鎖状オキソ酸を含む広い基質範囲を有することが証明された。

【0097】

別のクラスの酵素、即ちアミノトランスフェラーゼ(2.6.1)の構成要素は、複数の基質に対して作用することが報告された。大腸菌に発現されるピロコッカス・フルシオウス(*Pyrococcus fursiosus*)のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(aspAT)が特定され、組換えタンパク質は、酵素がアスパラギン酸及びアルファ-ケトグルタル酸に対して最も高い活性を有し、アラニン、グルタミン酸及び芳香族アミノ酸に対してより低い、有意な活性を有することを証明するように特徴づけられた(Wardら、*Archaea* 133-141(2002))。別の場合において、レイシュマニア・メキシカナ(*Leishmania mexicana*)から特定され、大腸菌に発現されるアミノトランスフェラーゼ(Vernalら、*FEMS Microbiol. Lett.* 229:217-222(2003))は、それぞれチロシン(チロシンに対して100%と考えられる活性)、フェニルアラニン(90%)、トリプトファン(85%)、アスパラギン酸(30%)、ロイシン(25%)及びメチオニン(25%)に対して広い基質特異性を有することが報告された(Vernalら、*Mol. Biochem. Parasitol* 96:83-92(1998))。同様の広い特異性が、トリパノソマ・クルジ(*Trypanosoma cruzi*)からのチロシン・アミノトランスフェラーゼについて報告されているが、これらの酵素は、いずれも配列相同性が6%にすぎない。後者の酵素は、効率的なアミノ供与体として、ロイシン、メチオニン、並びにチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン及びア

ラニンを受容することができる(Nowickiら、Biochem. Biophys. Acta 1546: 268-281(2001))。

【0098】

CoAトランスフェラーゼ(2.8.3)は、1つを超える基質に対して作用する能力を有することが証明された。具体的には、CoAトランスフェラーゼは、クロストリジウム・アセトブチリウム(*Clostridium acetobutylicum*)から精製され、酢酸、プロピオン酸及び酪酸に対して最も高い活性を有することが報告された。それは、吉草酸、イソ酪酸及びクロトン酸に対しても有意な活性を有していた(Wiesenbornら、Appl. Environ. Microbiol. 55:323-329(1989))。別の研究において、酢酸-CoAトランスフェラーゼ(EC2.8.3.8)としても知られる大腸菌アシル-CoA: 酢酸-CoAトランスフェラーゼは、イソ酪酸(Matthies及びSchink、App. Environ. Microbiol. 58:1435-1439(1992))、吉草酸(Vanderwinkelら、Biochem. Biophys. Res Commun. 33:902-908(1968b)、及びブタン酸(Vanderwinkelら、Biochem. Biophys. Res Commun. 33:902-908(1968a))を含む様々な分枝状及び直鎖状アシル-CoA基質からCoA部分を酢酸に転移することが証明された。

【0099】

他の酵素クラスは、酵素に対する広い基質特異性をさらに支持する。いくつかのイソメラーゼ(5.3.3)も複数の基質に対して作用することが証明された。シュードモナス・ツツェリ(*Pseudomonas stutzeri*)のL-ラムノースイソメラーゼは、様々なアルデヒド及びケトンの間の異性を触媒する(Yoshidaら、J. Mol. Biol. 365:1505-1516(2007))。これらは、L-ラムノースとL-ラムヌロース、L-マンノースとL-フルクトース、L-キシロースとL-キシルロース、D-リボースとD-リブロース及びD-アロースとD-ブシコースの間の異性を含む。

【0100】

さらに別のクラスの酵素において、ホスホトランスフェラーゼ(2.7.1)、L-ホモセリンをリン酸L-ホモセリンに変換する大腸菌のホモセリンキナーゼ(2.7.1.39)は、多くのホモセリン類似体をリン酸化することが判明した。これらの基質において、R位のカルボキシル官能基が、エステル又はヒドロキシメチル基によって置き換えられた(Huo及びViola、Biochemistry 35:16180-16185(1996))。表5は、このキナーゼに対する広い基質特異性を実証する。

【表5】

表5. ホモセリンキナーゼの基質特異性

基質	k_{cat}	% k_{cat}	K_m (mM)	k_{cat}/K_m
L-ホモセリン	18.3 ± 0.1	100	0.14 ± 0.04	184 ± 17
D-ホモセリン	8.3 ± 1.1	32	31.8 ± 7.2	0.26 ± 0.03
L-アスパラギン酸 β -セミアルデヒド	2.1 ± 0.1	8.2	0.28 ± 0.02	7.5 ± 0.3
L-2-アミノ-1,4-ブタンジオール	2.0 ± 0.5	7.9	11.6 ± 6.5	0.17 ± 0.06
L-2-アミノ-5-ヒドロキシ吉草酸	2.5 ± 0.4	9.9	1.1 ± 0.5	2.3 ± 0.3
L-ホモセリンメチル エステル	14.7 ± 2.6	80	4.9 ± 2.0	3.0 ± 0.6
L-ホモセリンエチル エステル	13.6 ± 0.8	74	1.9 ± 0.5	7.2 ± 1.7
L-ホモセリンイソプロピル エステル	13.6 ± 1.4	74	1.2 ± 0.5	11.3 ± 1.1
L-ホモセリン <i>n</i> -プロピル エステル	14.0 ± 0.4	76	3.5 ± 0.4	4.0 ± 1.2
L-ホモセリンイソブチル エステル	16.4 ± 0.8	84	6.9 ± 1.1	2.4 ± 0.3
L-ホモセリン <i>n</i> -ブチル エステル	29.1 ± 1.2	160	5.8 ± 0.8	5.0 ± 0.5

【0101】

BDO経路に有用な別のクラスの酵素は、酸-チオールリガーゼ(6.2.1)である。他のクラスにおける酵素と同様に、このクラスにおける特定の酵素は、広い基質特異性を有することが確認された。例えば、シュードモナス・プチダのアシルCoAリガーゼは、酢酸、プロ

ピオン酸、酪酸、吉草酸、ヘキサン酸、ヘプタン酸及びオクタン酸を含むいくつかの脂肪酸基質、並びにフェニル酢酸及びフェノキシ酢酸などの芳香族化合物に対して作用することが証明された(Fernandez-Valverdeら、Appl. Environ. Microbiol. 59:1149-1154(1993))。関連酵素、リゾビウム・トリフォリ(Rhizobium trifoli)のマロニルCoAシンセターゼ(6.3.4.9)は、いくつかの二酸、即ちマロン酸エチル、プロピル、アリル、イソプロピル、ジメチル、シクロプロピル、シクロプロピルメチレン、シクロブチル及びベンジルをそれらの対応するモノチオエステルに変換することが可能であった(Pohlら、J. Am. Chem. Soc. 123:5822-5823 (2001))。同様に、デカルボキシラーゼ(4.1.1)も広い基質範囲を有することが判明した。ケト-酸デカルボキシラーゼとも呼ばれるピルビン酸デカルボキシラーゼ(PDC)は、ピルビン酸のアセトアルデヒドへの脱カルボキシル化を触媒するアルコール発酵における主要な酵素である。サッカロマイセス・セレビスシアエから単離された酵素は、2-ケト酪酸、2-ケト吉草酸及び2-フェニルピルビン酸を含む脂肪酸2-ケト酸に対して広い基質範囲を有する(Li及びJordan、Biochemistry 38:10004-10012 (1999))。同様に、ベンゾイルギ酸デカルボキシラーゼは、広い基質範囲を有し、酵素工学の研究のターゲットであった。シュードモナス・プチダの酵素が広範囲に研究され、この酵素の結晶構造が利用可能である(Polovnikovaら、Biochemistry 42:1820-1830 (2003); Hassonら、Biochemistry 37:9918-9930 (1998))。分枝鎖アルファ-ケト酸デカルボキシラーゼ(BCKA)は、3から6個の炭素原子の鎖長が異なる様々な化合物に対して作用することが証明された(Oku及びKaneda、Biol. Chem. 263:18386-18396 (1998); Smitら、Appl. Environ. Microbiol. 71:303-311 (2005))。ラクトコッカス・ラクチスの酵素は、2-オキソブタン酸、2-オキソヘキサン酸、2-オキソペンタン酸、3-メチル-2-オキソブタン酸、4-メチル-2-オキソブタン酸及びイソカプロン酸を含む様々な分枝状及び直鎖状基質に対して特徴づけられた(Smitら、Appl. Environ. Microbiol. 71:303-311(2005))。

10

20

【0102】

興味深いことに、1つの主要な活性を有することが知られる酵素は、全く異なる機能を触媒することも報告された。例えば、バシルス・ステアロテルモフィルス及びバシルス・スプチリスの共同因子依存性ホスホグリセリン酸ムターゼ(5.4.2.1)は、ホスファターゼとしても機能することが知られる(Rigdenら、Protein Sci. 10:1835:1846(2001))。B.ステレオテルモフィルスの酵素は、3-ホスホグリセリン酸、アルファ-ナフチルリン酸、p-ニトロフェニルリン酸、AMP、フルクトース-6-リン酸、リボース-5-リン酸及びCMPを含むいくつかの基質に対して活性を有することが知られる。

30

【0103】

酵素が自然に広い基質特異性を有するこれらの例と対照的に、多くの酵素が、それらの非天然基質に対するそれらの特異性を広げるために、指向性進化を使用して修飾された。代替的に、指向性進化を使用して、酵素の基質嗜好性を変化させた。したがって、天然基質に対する効率的な機能、例えば機能の向上、又は非天然基質に対する効率的な機能、例えば機能の拡大のために所与の酵素を操作することが実現可能である。例えば、シュードモナス・アエルギノサのリパーゼのエナンチオ選択性が有意に向上したことが報告されている(Reetzら、Agnew. Chem. Int. Ed Engl. 36:2830-2832(1997))。この酵素は、(S)-酸のために、エナンチオマー過剰(ee)が2%にすぎない2-メチルデカン酸p-ニトロフェニルを加水分解した。しかし、4回の連続的な誤りがちな変異誘発及びスクリーニングの後に、81%eeで必須の反応を触媒する変異体が生成された(Reetzら、Agnew. Chem. Int. Ed Engl. 36:2830-2832(1997))。

40

【0104】

酵素を多くの非天然基質のアレイに対して機能するように修飾するために、指向性進化法が使用された。P.アエルギノサにおけるリパーゼの基質特異性が、活性部位付近のアミノ酸残渣の無作為化によって拡大された。これは、この酵素によるアルファ置換カルボン酸の許容を可能にした(Reetzら、Agnew. Chem. Int. Ed Engl. 44:4192-4196(2005))。酵素の別の成功裡の修飾において、野生型酵素によってあまり許容されないβ-分枝状基質を許容するエシェリキア・コリアミノトランスフェラーゼを生成するためにDNAシャフリ

50

ングが採用された(Yanoら、Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A. 95:5511-5515 (1998))。具体的には、4回のシャフリングの終了時に、バリニン及び2-オキシバリニンに対するアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの活性が5倍程度まで増加したのに対して、天然基質、アスパラギン酸に対する活性を30分の1まで低下させた。最近、非天然及び無生物基質、4-ヒドロキシ-4-(6-メトキシ-2-ナフチル)-2-ブタノンにおける炭素-炭素結合開裂を触媒するのに使用することが可能であるレトロ-アルドラーゼを設計するためのアルゴリズムが使用された(Jiangら、Science 319:1387-1391(2008))。これらのアルゴリズムは、新しい酵素を設計するために4つの異なる触媒モチーフの組合せを使用し、実験的特徴づけのための選択された設計の20種は、触媒されていない反応と比較して速度が4倍向上した(Jiangら、Science 319:1387-1391(2008))。したがって、これらの工学的アプローチは、酵素が作用できる基質のアレイを拡大することが可能であるだけでなく、非常に効率的な酵素の設計及び構成を可能にする。例えば、DNAシャフリングの方法(過渡的な鋳型又はRACHITT上の無作為キメラ生成)は、複合基質上の脱硫化の速度が向上するとともに、非天然基質の変換率が20倍である操作モノオキシゲナーゼをもたらすことが報告された(Cocoら、Nat. Biotechnol. 19:354-359(2001))。同様に、緩慢な変異体トリオセリン酸イソメラーゼ酵素の特定の活性が、1.3倍から19倍まで向上された(Hermesら、Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 87:696-700 (1990))。特定の活性のこの向上は、タンパク質の全長に対して無作為変異誘発を使用することによって達成され、6つのアミノ酸残基の変異に対して向上を追跡することが可能であった。

【0105】

所望の基質に対する酵素の基質特異性を改変するためのタンパク質操作アプローチの効果は、いくつかの研究においても実証された。テルムス・テルモフィルスのイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼは、それが次に基質としてのリンゴ酸及びD-乳酸に対して作用することが可能になるように、活性部位に近い残基を変化させることによって修飾された(Fujitaら、Biosci. Biotechnol. Biochem. 65:2695-2700(2001))。この研究並びに他の研究において、1つ又はいくつかの残基を修飾して基質特異性を改変できることが指摘された。例えば、単一のアミノ酸が推定基質結合領域において変化したジヒドロフラボノール4-レダクターゼは、ジヒドロカエムプフェロールを優先的に還元することが可能であった(Johnsonら、Plant. J. 25:325-333(2001))。エシェリキア・コリの非常に特異的なイソクエン酸デヒドロゲナーゼの基質特異性は、活性部位における1つの残基を変化させることによってイソクエン酸からイソプロピルリンゴ酸に変化した(Doyleら、Biochemistry 40:4234-4241(2001))。同様に、NAD⁺依存性1,5-ヒドロキシプロスタグランジンデヒドロゲナーゼの共同因子特異性は、N末端付近のいくつかの残基を変化させることによって、NADP⁺に改変された(Choら、Arch. Biochem. Biophys. 419:139-146(2003))。配列分析及び分子モデル化分析を使用して、修飾のための主要残基が特定され、それらが部位指向性変異誘発によってさらに調査された。

【0106】

酵素の天然基質と比較して非天然基質に有利になるように酵素の機能を変化させた多くの例が、多様なクラスの酵素にわたって存在する。フコシダーゼが、DNAシャフリング及びスクリーニングによって大腸菌のガラクトシダーゼから進化された(Zhangら、Proc. Natl Acad. Sci U.S.A. 94:4504-4509 (1997))。同様に、大腸菌のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼが、相同性モデル化及び部位指向性変異誘発を使用して、トリオシニアミノトランスフェラーゼに変換された(Onuffer及びKirsch Protein Sci., 4:1750-1757(1995))。P. プチダのベンゾイルギ酸デカルボキシラーゼの活性部位における2つの残基の部位指向性変異誘発は、天然及び非天然基質に対する親和性(K_m)を変性することが報告された(Siegiertら、Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005))。サッカロマイセス・セレビシアエのシトクロムcペルオキシダーゼ(CCP)を指向性分子進化させて、従来のペルオキシダーゼ基質グアイアコールに対する活性が増強された変異体を生成することで、CCPの基質特異性をタンパク質シトクロムcから小器官分子に変化させた。3回のDNAシャフリング及びスクリーニングの後に、グアイアコールに対する活性が300倍に増大し、天然基質に

対するものと比較してこの基質に対する特異性が1000倍まで増大した変異体が単離された(Ifflandら、Biochemistry 30:10790-10798(2000))。

【0107】

いくつかの場合において、親酵素のいずれとも異なる基質嗜好性を有する酵素が得られた。例えば、ポリ塩素化ビフェニルのビフェニルジオキシゲナーゼ媒介分解が、2つの細菌、即ちシュードモナス・シュードアルカルゲンス(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)及びブルクホルデリア・セバシア(*Burkholderia cepacia*)の遺伝子をシャフリングすることによって促進された(Kumamaruら、Nat. Biotechnol. 16:663-666(1998))。得られたキメルビフェニルオキシゲナーゼは、いずれの親酵素とも異なる基質嗜好性を示し、その酵素にとって本来は劣った基質である関連ビフェニル化合物並びにトルエン及びベンゼンなどの単一芳香族環炭化水素に対する分解活性を高めた。

10

【0108】

酵素特異性を変化させることに加えて、酵素が本質的に低活性を有する基質に対する活性を高めることも可能である。1つの研究は、(リシン、アルギニン、アラニン、セリン、メチオニン、システイン、ロイシン及びヒスチジン等に対する)広い基質特異性を有するが、トリプトファンに対する活性が低いP.プチダのアミノ酸ラセマーゼをランダム変異誘発によって有意に向上させることが可能であることを実証した(Kinoら、Appl. Microbiol. Biotechnol. 73:1299-1305(2007))。同様に、ウシBCKADの活性部位が、代替的な基質のアセチル-CoAに有利になるように操作された(Meng及びChuang、Biochemistry 33:12879-12885(1994))。これらのアプローチの興味深い側面は、ランダム法を適用して、効果的な活性を有する変異酵素を生成しても、活性の向上を付与する正確な変異又は構造変化を特定できることである。例えば、前記研究において、トリプトファンに対する活性の向上を促進する変異が2つの異なる位置に対して追跡された。

20

【0109】

発現するのが困難であるタンパク質を発現させるために指向性進化も使用された。例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼにランダム変異誘発及び遺伝子組換えさせることによって、野生型と比較して14倍を超える活性を有する変異体が特定された(Linら、Biotechnol. Prog. 15:467-471(1999))。

【0110】

指向性進化の別の例は、一連の所望の機能を達成するために酵素に施すことができる大規模な修飾を示す。バシルス・ステアロテルモフィルスの酵素乳酸デヒドロゲナーゼが部位指向性変異誘発され、異なるヒドロキシ酸に対する特異性を決定づけると考えられる部位において3つのアミノ酸代用物が作製された(Clarkeら、Biotechnol. Biophys. Commun. 148:15-23(1987))。これらの変異の後に、ピルビン酸と比較したオキサロ酢酸に対する特異性が、オキサロ酢酸と比較したピルビン酸に対する触媒特性が1000である野生型酵素と対照的に500まで高められた。この酵素は、分枝鎖置換ピルビン酸に対する活性を有するように、部位指向性変異誘発を使用してさらに操作された(Wilksら、Biochemistry 29:8587-8591(1990))。具体的には、酵素は、アルファ-ケトイソカプロン酸に対する K_{cat} が5倍に高められた。3つの構造修飾を同じ酵素に施して、その基質特異性を乳酸からリンゴ酸に変化させた。酵素は、活性が高く、リンゴ酸に対して特異的であった(Wilksら、Science 242:1541-1544(1988))。続いて、B.ステアロテルモフィルスの同じ酵素が、アンモニウム基を含むものなどの、正に帯電した側鎖を有するアルファ-ケト酸に対して高度な触媒活性を有するように操作された(Hoganら、Biochemistry 34:4225-4230(1995))。酵素の102位置に導入された酸性アミノ酸を有する変異体は、当該側鎖アンモニウム基の結合に有利であった。得られた結果は、オメガ-アミノ-アルファ-ケト酸基質に対する k_{cat}/K_m 値の25倍までの向上を示すことを証明した。興味深いことに、この酵素は、また、乳酸デヒドロゲナーゼの代わりにフェニル乳酸デヒドロゲナーゼとして機能するように構造的に修飾された(Wilksら、Biochemistry 31:7802-7806 1992)。制限部位が、遺伝子の領域を励起することを可能にする酵素に対する遺伝子に導入された。この領域は、通常はバルク溶媒から活性部位をシールし、基質特異性の主たる決定因子であるポリペプチド(残基98~1

30

40

50

10)の移動表面ループに対してコードされる。基質特異性が変化したヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼが生成されるように、可変長及び配列ループが挿入された。より長いループ構成の場合は、ピルビン酸に対する活性が100万分の1に低下したが、フェニルピルビン酸に対する活性はほとんど変化しなかった。390000倍の特異性(k_{cat}/K_m)の切換が達成された。ピルビン酸と比較したフェニルピルビン酸に対するこの酵素の1700:1の選択性は、フェニル乳酸デヒドロゲナーゼに必要とされる選択性である。上記研究は、酵素工学の様々なアプローチを使用して、本明細書に開示されるBDO経路のための酵素を得ることができることを示している。

【0111】

本明細書に開示されているように、アセチル-CoA、スクシニル-CoA、アルファ-ケトグルタル酸、グルタミン酸、4-アミノ酪酸及びホモセリンを含む多くの中央代謝中間体から1,4-ブタンジオールへの生合成経路を利用することができる。アセチル-CoA、スクシニル-CoA及びアルファ-ケトグルタル酸は、細胞呼吸のために酸素を利用するほぼすべての生細胞にその全体が存在し、多くの嫌気性生物体に切断された形で存在する一連の反応物であるトリカルボン酸(TCA)回路の共通の中間体である。グルタミン酸は、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ又は多くの伝達反応物のいずれかを介してアルファ-ケトグルタル酸から誘導されるアミノ酸である(図8B参照)。4-アミノ酪酸をグルタミン酸の脱カルボキシル化(図8B参照)によって、又は図9Cに開示される経路を介してアセトアセチル-CoAから形成することができる。アセトアセチル-CoAは、酵素、アセチル-補酵素Aアセチルトランスフェラーゼ、又は同等にアセトアセチル-補酵素Aチオラーゼによる2つのアセチル-CoA分子の縮合から誘導される。ホモセリンは、アスパラギン酸を介してオキサロ酢酸から形成される、トレオニン及びメチオニン代謝における中間体である。オキサロ酢酸のホモセリンへの変換には、NADH、2つのNADPH及び1つのATPが必要である。

【0112】

以上に例示した経路以外の経路を採用して、非天然微生物生物体にBDOの生合成を生成することができる。一実施態様において、L-ホモセリンからBDOへの経路を使用して生合成を達成することができる(図13)。この経路は、還元当量の可溶性によって制限されると思われる0.90モル/モルグルコースのモル収率を有する。第2の経路は、アセトアセチル-CoA(アセト酢酸)からBDOを合成し、1.091モル/モルグルコースの最大理論収率を達成することが可能である(図9参照)。いずれかの経路の実装を、2つの外因性酵素を大腸菌などの宿主生物体に導入することによって達成することができ、両経路は、スクシニル-CoAを介してBDO生成をさらに補完することができる。経路酵素、熱力学、理論的収率及び全体的な実現可能性を以下にさらに記載する。

【0113】

ホモセリン経路を、BDO生成微生物体を生成するように操作することもできる。ホモセリンは、アスパラギン酸を介してオキサロ酢酸から形成されるトレオニン及びメチオニン代謝における中間体である。オキサロ酢酸のホモセリンへの変換には、NADH、2つのNADPH及び1つのATPが必要である。形成されると、ホモセリンは、トレオニン及びメチオニンの両方のための生合成回路に供給される。たいていの生物体において、高量のトレオニン又はメチオニンが逆戻りして、ホモセリン生合成経路を抑圧する(Caspiら、Nucleic Acids Res. 34:D511-D516(1990))。

【0114】

ホモセリンの4-ヒドロキシ酪酸(4-HB)への変換を本明細書に開示される2つの酵素工程で達成することができる(図13参照)。この経路の第1の工程は、推定上のアンモニアリアーゼによるホモセリンの脱アミノ化である。工程2において、生成物アルケン、4-ヒドロキシブタ-2-エン酸が、1つのNADHを消費して推定上のレダクターゼにより4-HBに還元される。次いで、4-HBをBDOに変換することができる。

【0115】

上記変換を触媒するために利用可能な酵素が本明細書に開示されている。例えば、経路の工程1におけるアンモニアリアーゼは、アスパラギン酸アンモニア-リアーゼ(アスパラ

10

20

30

40

50

ギン酸)の化学的性質に酷似している。アスパラギン酸は、微生物における広範に及ぶ酵素であり、広く特徴づけられてきた(Viola, R.E., Mol. Biol. 74:295-341(2008))。大腸菌アスパルターゼの結晶構造が解明された(Shiら、Biochemistry 36:9136-9144(1997))ため、その基質特異性を、ホモセリンを含むように改変する酵素の活性部位における変異を直接操作することが可能である。工程2におけるオキシドレダクターゼは、大腸菌TCA回路にフマル酸レダクターゼを含むいくつかの十分に特徴づけられた酵素に類似する化学的性質を有する。この反応の熱力学が極めて好ましいため、広い基質特異性を有する外因性レダクターゼは、4-ヒドロキシブタ-2-エン酸を還元できる可能性が高い。嫌気性条件下でのこの経路の収率は、グルコース1モル当たり0.9モルのBDOである。

【0116】

スクシニル-CoA経路は、よりエネルギー的に効率がいため、より高い収率を有することが判明した。ホモセリン回路を介する1つのオキサロ酢酸分子のBDOへの変換には、2つのATP同等物の消費が必要になる。PEPカルボキシキナーゼが可逆的であると想定すると、グルコースの2つのオキサロ酢酸分子への変換が最大で3つのATP分子を生成することができるため、ホモセリンを介するグルコースのBDOへの全変換は、負のエネルギー収率を有する。推定されるように、エネルギーが呼吸を介して生成され得ると想定すると、ホモセリン経路の最大収率は、スクシニル-CoA経路収率の96%であるグルコース1モル当たり1.05モルまで増加する。スクシニル-CoA経路は、炭素流の一部を、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ及びTCA回路の酸化性分枝を介して誘導して、エネルギー消費を伴わずに還元当量及びスクシニル-CoAの両方を生成することができる。したがって、流れのすべてがオキサロ酢酸を介してスクシニル-CoAからBDOに誘導されることがないため、それは、ホモセリン経路と同じエネルギー上の問題に遭遇しない。全体にわたり、ホモセリン経路はBDOへの高収率経路を示す。

【0117】

アセトアセチル-CoA(アセト酢酸)経路を操作して、BDO生成微生物体を生成することもできる。アセトアセチル-CoA(アセト酢酸)を、アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼ及びアセトアセチル-CoAトランスフェラーゼを含む、脂肪酸代謝に関与する酵素によってアセチル-CoAから形成することができる。アセト酢酸を介する生合成経路は、また、一酸化炭素、二酸化炭素又はメタノールなどの単一の炭素化合物を代謝させてアセチル-CoAを形成することができる微生物体に特に有用である。

【0118】

アセトアセチル-CoA(アセト酢酸)から4-アミノ酪酸への3工程経路(図9C参照)を使用して、アセトアセチル-CoA(アセト酢酸)を介してBDOを合成することができる。図8Bに示されるように、4-アミノ酪酸をコハク酸セミアルデヒドに変換することができる。スクシニル-CoAから除去された1つの還元工程又は α -ケトグルタル酸から除去された1つの脱カルボキシ化工程であるコハク酸セミアルデヒドを、3つの還元工程に従ってBDOに変換することができる(図1)。手短に述べると、この経路の工程1は、例えば、atoA及びatoD遺伝子によってコードされた大腸菌アセトアセチル-CoAによるアセトアセチル-CoAのアセト酢酸への変換を含む(Hanaiら、Appl. Environ. Microbiol. 73:7814-7818(2007))。アセトアセチル-CoA生合成の工程2は、 ω -アミノトランスフェラーゼによるアセト酢酸の3-アミノブタン酸への変換を含む。アルカリゲンス・デニトリフィカンス(*Alcaligenes denitrificans*)の ω -アミノ酸:ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ(ω -APT)は、大腸菌に過剰発現され、インビトロで3-アミノブタン酸に対する高い活性を有することが証明された(Yunら、Appl. Environ. Microbiol. 70:2529-2534(2004))。

【0119】

工程3において、推定上のアミノムターゼは、アミン基を炭素骨格の3位から4位にシフトさせる。3-アミノブタン酸に対してこの機能を果たすアミノムターゼは、特徴づけられていないが、クロストリジウム・スティックランジ(*Clostridium sticklandii*)の酵素は、極めて類似したメカニズムを有する。酵素D-リシン-5.6-アミノムターゼは、リシン生合成に関与する。

【0120】

アセトアセチル-CoA(アセト酢酸)からBDOへの合成経路は、通常、グルタミン酸の脱カルボキシ化から形成される大腸菌における代謝物質であるアミノブタン酸を通る。4-アミノブタン酸は、形成されると、生化学的に特徴づけられた酵素である4-アミノブタン酸トランスアミナーゼ(2.6.1.19)によってコハク酸セミアルデヒドに変換され得る。

【0121】

この経路における候補酵素を選択するための1つの検討事項は、工程2及び3に関与する酵素の立体選択性である。アルカリゲンス・デニトリフィカンスの ω -ABTは、3-アミノブタン酸のL-立体異性体の特異的であり、D-リシン-5,6-アミノムターゼは、D-立体異性体を必要とする可能性が高い。相補的な立体選択性を有する酵素が最初に見いだされないか、又は操作されない場合は、L-3-アミノブタン酸をD-3アミノブタン酸に変換することができるラセマーゼ活性を有する第3の酵素を経路に加えることができる。アミノ酸ラセマーゼは普及しているが、これらの酵素が ω -アミノ酸に対して機能できるかどうかは未知である。

10

【0122】

嫌気性条件下でのこの経路の最大理論モル収率は、グルコース1モル当たり1.091モルである。アセトアセチル-CoA(アセト酢酸)からBDOへの流れを生成するために、アセチル-CoA:アセトアセチル-CoAトランスフェラーゼが可逆的であると想定した。大腸菌におけるこの酵素の機能は、最初にそれらをチオエステルに変換することによって短鎖脂肪酸を代謝させることである。

20

【0123】

酢酸を消費する方向のアセチル-CoA:アセトアセチル-CoAトランスフェラーゼの作用は、大腸菌において実験的に実証されていないが、他の生物体における類似の酵素に関する研究は、この反応が可逆的であることを裏づけている。腸細菌ロセブリア属及びF.プラスニツィの酵素ブチリル-CoA:酢酸:CoAトランスフェラーゼは、酢酸を利用する方向に作用して、酪酸を生成する(Duncanら、Appl. Environ. Microbiol. 68:5186-5190(2002))。別の極めて類似する酵素、即ちトリパノソマ・ブルセイ(Trypanosoma brucei)のアセチル:コハク酸CoAトランスフェラーゼも酢酸を利用する方向に作用する。この反応は、平衡に近い $\Delta_{rxn}G$ を有するため、高濃度の酢酸は、対象となる方向に反応を誘導し得る可能性が高い。グルコース1モル当たり1.09モルの最大理論BDO生成速度では、大腸菌は、発酵副産物を伴わずにグルコース1モル当たり1.098モルのATPを生成できることがシミュレーションによって想定される。このATP収率は、細胞の成長、維持及び生成に十分なものである必要がある。アセトアセチル-CoA(アセト酢酸)生物経路は、アセチル-CoAからBDOへの高収量経路である。

30

【0124】

したがって、選択された宿主に4-HB生合成を確立するための既に例示した様々な修飾のいずれかに加えて、BDO生成微生物体は、4-HB経路代謝修飾の先述の組合せ及び置換のいずれか、並びにCoA非依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ若しくはアルコールデヒドロゲナーゼ、又はGBL及び/又はBDOのための生合成経路を生成する本明細書に開示される他の酵素の発現のいずれかの組合せを含むことができる。したがって、本発明のBDO産生株は、例えば、本明細書に開示される4-HB経路のいずれか及び/又はBDO経路のいずれかに対応する1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ又はすべての酵素の外因性発現を有することができる。

40

【0125】

遺伝子修飾微生物体の設計及び構成は、BDOを生成するための十分な量の発現を達成するための当該技術分野で周知の方法を使用して実施される。特に、本発明の非天然微生物体は、上述のように、約0.1~25mM以上などの約0.1~200mM以上の細胞内濃度をもたらしBDOの生合成を達成することができる。例えば、BDOの細胞内濃度は、約3~20mM、特に約5~15mM以上、特に約10mM以上を含む約8~12mMである。これらの例示的な範囲の各々の間又はそれを超える細胞内濃度を本発明の非天然微生物体から達成することができる。4-HB

50

産生株の場合と同様に、BDO産生株を嫌気性条件下で維持、培養又は発酵することができる。

【0126】

本発明は、さらに、4-HBを生成するための方法を提供する。該方法は、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンセターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、アルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼを、モノマー4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)を生成するのに十分な時間にわたって実質的に嫌気性条件下でコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)生合成経路を有する非天然微生物体を培養することを含む。該方法は、例えば、4-HBのGBL及びBDO又はTHFへの化学変換をさらに含むことができる。

10

【0127】

また、4-HBを生成するための方法が提供される。該方法は、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンセターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ又はアルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼを、モノマー4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)を生成するのに十分な時間にわたって実質的に嫌気性条件下でコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)生合成経路を有する非天然微生物体を培養することを含む。4-HB生成物を培地に分泌させることができる。

【0128】

さらに、BDOを生成するための方法が提供される。該方法は、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンセターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシ酪酸:CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、ホスホトランスヒドロキシブチラーゼ、 α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ又はアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼを、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な時間にわたってコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)及び1,4-ブタンジオール(BDO)生合成経路を有する微生物体を含む非天然微生物生触媒を培養することを含む。BDO生成物を培地に分泌させることができる。

20

【0129】

また、本発明のBDO経路を有する非天然微生物体を培養することによってBDOを生成するための方法が提供される。BDO経路は、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むことができ、該BDO経路は、4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドローラーゼ、4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ、又はヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼを含む。(実施例VII及び表17参照)。

30

【0130】

代替的に、BDO経路は、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むことができ、該BDO経路は、4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドローラーゼ、4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼを含む(実施例VII及び表18参照)。

40

【0131】

加えて、本発明は、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、4-アミノ酪酸キナーゼ、4-アミノブチラールアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブタン-1-オール

50

トランスアミナーゼ、[(4-アミノブタノイル)オキシ]リン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、[(4-アミノブタノイル)オキシ]リン酸トランスアミナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-リン酸デヒドロゲナーゼ又は4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法を提供する(実施例VII及び表19参照)。

【0132】

本発明は、さらに、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、アルファ-ケトグルタル酸5-キナーゼ、2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ、アルファ-ケトグルタル酸CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法を提供する(実施例VIII及び表20参照)。

【0133】

本発明は、さらに、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、グルタミン酸CoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ、グルタミル-CoAリガーゼ、グルタミン酸5-キナーゼ、グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、グルタミル-CoAレダクターゼ、グルタミン酸-5-セミアルデヒドレダクターゼ、グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法を提供する(実施例IX及び表21参照)。

【0134】

本発明は、さらに、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、ビニルアセチル-CoA Δ -イソメラーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼを含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法を含む(実施例X及び表22参照)。

【0135】

また、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、ホモセリンデアミナーゼ、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリンCoA-ヒドロラーゼ、ホモセリン-CoAリガーゼ、ホモセリン-CoAデアミナーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エン酸レダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼを含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法が提供される(実施例XI及び表23参照)。

【0136】

本発明は、さらに、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコー

10

20

30

40

50

ドする少なくとも1つの外因性核酸を含み、スクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(アシルリン酸レダクターゼ)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法を提供する。当該BDO経路は、スクシニル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。

【0137】

また、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、4-アミノ酪酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(アシルリン酸レダクターゼ)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法が提供される。

【0138】

本発明の方法において、1つ以上の外因性核酸のいずれかを微生物体に導入して、本発明の非天然微生物体を生成できることが理解される。例えば、4-HB、BDO、THF又はGBL生合成経路を微生物体に付与するように核酸を導入することができる、代替的に、コード化核酸を導入して、4-HB、BDO、THF又はGBL生合成機能を付与するための必要な反応のいくつかを触媒する生合成機能を有する中間微生物体を生成することができる。例えば、4-HB生合成経路を有する非天然微生物体は、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ;4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼとCoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ;4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼとCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ;CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼとスクシニル-CoAシンセターゼ;スクシニル-CoAシンセターゼとグルタミン酸デカルボキシラーゼ等の組合せなどの所望の酵素をコードする少なくとも2つの外因性核酸を含むことができる。したがって、生合成経路の2つ以上の酵素の任意の組合せを本発明の非天然微生物体に含めることができることが理解される。同様に、所望の生合成経路の酵素の組合せが対応する所望の生成物の生成をもたらすのであれば、要望に応じて、生合成経路の3つ以上の酵素、例えば、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼとCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ;CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼとスクシニル-CoAシンセターゼ;4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼとCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼとグルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ等の任意の組合せを本発明の非天然微生物体に含めることができることが理解される。

【0139】

同様に、例えば、BDO生成を付与するために導入される任意の1つ以上の外因性核酸に関して、BDO生合成経路を有する非天然微生物体は、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ;4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼ;4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと酪酸キナーゼ;4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼとホスホトランスブチリラーゼ;4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼ;4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとアルコールデヒドロゲナーゼ;4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼ、4-アミノ酪酸-CoAトランスフェラーゼと4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ;4-アミノ酪酸キナーゼと4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)等の組合せなどの所望の酵素をコードする少なくとも2つ

10

20

30

40

50

の外因性核酸を含むことができる。したがって、生合成経路の2つ以上の酵素の任意の組合せを本発明の非天然微生物体に含めることができることが理解される。同様に、生合成経路の3つ以上の酵素、例えば、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼと4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼ;4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと酪酸キナーゼとホスホトランスブチリラーゼ;4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼと4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼ;4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼとアルコールデヒドロゲナーゼ;酪酸キナーゼとホスホトランスブチリラーゼとアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼ;4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼと4-アミノブチリル-CoAレダクターゼと4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ;及び3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼと3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼと4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ等の任意の組合せを本発明の非天然微生物体に含めることができることが理解される。同様に、所望の生合成経路の酵素の組合せが対応する所望の生成物を生成させるのであれば、要望に応じて、本明細書に開示される生合成経路の4つ又は5つ以上の酵素を本発明の非天然微生物に含めることができる。

10

【0140】

本明細書に記載の非天然微生物体のいずれかを培養して、本発明の生合成生成物を生成及び/又は分泌させることができる。例えば、4-HB産生株を4-HBの生合成生成のために培養することができる。4-HBを上記のように単離又は処理して、GBL、THF及び/又はBDOを生成することができる。同様に、BDO産生株をBDOの生合成生成のために培養することができる。本明細書に開示されるように、BDO系統の化合物の化学合成のために単離又はさらに処理することができる。

20

【0141】

成長培地は、例えば、炭素源を非天然微生物に供給することができる任意の炭水化物源を含むことができる。当該源は、例えば、グルコース、キシロース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、スクロース及びデンプンなどの糖を含む。他の炭水化物源は、例えば、再生可能な原料及びバイオマスを含む。本発明の方法において原料として使用できる例示的な種類のバイオマスは、セルロース系バイオマス、ヘミセルロース系バイオマス及びリグニン原料又は原料の部分を含む。当該バイオマス原料は、例えば、グルコース、キシロース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、フルクトース及びデンプンなどの炭素源として有用な炭水化物基質を含む。本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、4-HB又はBDO及び本発明の他の化合物の生成のための本発明の微生物体を培養するために、以上に例示したもの以外の再生可能な原料及びバイオマスを使用することもできることを理解するであろう。

30

【0142】

よって、本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、炭水化物などの炭素源上で成長させると本発明の生合成化合物を分泌する非天然微生物体を生成できることを理解するであろう。当該化合物は、例えば、4-HB、BDO、並びに4-HB経路、BDO経路及び/又は4-HBとBDO経路の組合せにおける中間体代謝物質を含む。必要なことは、図1に示される1つ以上の酵素活性を操作して、例えば、4-HB及び/又はBDO生合成経路の一部又はすべてを含む所望の化合物又は中間体の生合成を達成することだけである。よって、本発明は、炭水化物上で成長すると4-HBを分泌し、炭水化物上で成長するとBDOを分泌し、且つ/又は炭水化物上で成長すると図1に示される中間代謝物質のいずれかを分泌する非天然微生物体を提供する。本発明のBDO生成微生物体は、例えば、コハク酸、スクシニル-CoA、アルファ-ケトグルタル酸、コハク酸セミアルデヒド、4-HB、4-ヒドロキシブチリルリン酸、4-ヒドロキシブチリル-CoA(4-HB-CoA)及び/又は4-ヒドロキシブチルアルデヒドから合成を開始することができる。

40

【0143】

いくつかの実施態様において、培養条件は、嫌気性又は実質的に嫌気性の成長又は維持

50

条件を含む。例示的な嫌気性条件は、既に記載されており、当該技術分野で周知である。発酵処理のための例示的な嫌気性条件を以下の実施例に記載する。これらの条件のいずれかを、非天然微生物体並びに当該技術分野で周知の他の嫌気性条件とともに採用することができる。当該嫌気性条件下において、4-HB及びBDO産生株は、5~10mM以上の細胞内濃度、並びに既に例示されたすべての他の濃度でそれぞれモノマー4-HB又はBDOを合成することができる。

【0144】

本発明の4-HB及びBDO生成非天然微生物体のための多くの下流化合物を生成することもできる。本発明の4-HB生成微生物体に関して、モノマー4-HB及びGBLが培地に平衡状態で存在する。4-HBのGBLへの変換を、例えば、微生物体を酸性pH培地で培養することによって効率的に達成することができる。7.5以下のpH、特に5.5以下のpHは、自然に4-HBをGBLに変換する。

10

【0145】

当該技術分野で周知の様々な方法を使用して、得られたGBLを4-HB及び他の成分から分離することができる。当該分離方法は、例えば、実施例に例示される抽出手順、並びに連続液液抽出、浸透気化、メンブレン濾過、メンブレン分離、逆浸透、電気透析、蒸留、結晶化、遠心、抽出濾過、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー及び限外濾過を含む方法を含む。上記方法のすべてが当該技術分野で周知である。分離GBLを例えば蒸留によってさらに精製することができる。

20

【0146】

本発明の4-HB生成非天然微生物体から生成することができる別の下流化合物は、例えばBDOを含む。この化合物を例えばGBLの化学的水素化によって合成することができる。化学的水素化反応は、当該技術分野で既知である。1つの例示的な手順は、1,4-ブタンジオールを生成するために、異種又は同種水素化触媒を水素、又は化学量論的若しくは触媒的に使用される水素化物系還元剤とともに使用して、培養物に由来する4-HB及び/又はGBL或いはこれらの2つの成分の混合物を化学的に還元することを含む。

【0147】

当該技術分野で周知の他の手順も上記化学反応に等しく適用可能であり、例えば、酸化銅及び酸化亜鉛触媒による蒸気相でのガンマ-ブチロラクトンの水素化分解が記載されている国際公開第82/03854号(Bradleyら)を含む。英国特許第1,230,276号には、酸化銅-酸化クロム触媒を使用するガンマ-ブチロラクトンの水素化が記載されている。水素化は、液相で実施される。高い反応器全圧を有するバッチ反応も例示されている。反応器における反応物質及び生成物分圧は、それぞれの露点を十分に上回る。英国特許第1,314,126号には、酸化ニッケル-コバルト-トリウム触媒による液相でのガンマ-ブチロラクトンの水素化が記載されている。バッチ反応が、高い反応器全圧、及びそれぞれの成分の露点を十分に上回る成分分圧を有するものとして例示されている。英国特許1,344,557号には、酸化銅-酸化クロム触媒による液相でのガンマ-ブチロラクトンの水素化が記載されている。蒸気相又は蒸気含有混合相が、場合によっては好適であることが示される。高い反応器全圧を使用する連続流管状反応器が例示されている。英国特許第1,512,751号には、酸化銅-酸化クロム触媒による液相でのガンマ-ブチロラクトンの1,4-ブタンジオールへの水素化が記載されている。高い反応器全圧を有し、確定可能な場合は、それぞれの露点を十分に上回る反応物質及び生成物分圧を有するバッチ反応が例示されている。米国特許第4,301,077号には、Ru-Ni-Co-Zn触媒によるガンマ-ブチロラクトンの1,4-ブタンジオールへの水素化が記載されている。該反応を液相又は気相或いは気液混合相で実施することができる。反応器全圧が高く、反応器生産性が比較的低い連続流液相反応が例示されている。米国特許第4,048,196号には、酸化銅-酸化亜鉛触媒を用いたガンマ-ブチロラクトンの液相水素化による1,4-ブタンジオールの製造が記載されている。さらに、高い反応器全圧並びに高い反応物質及び生成物分圧で動作する連続流管状反応器が例示されている。また、米国特許第4,652,685号には、ラク톤のグリコールへの水素化が記載されている。

30

40

【0148】

50

本発明の4-HB生成微生物体から生成できるさらなる下流化合物は、例えばTHFを含む。この化合物を例えばGBLの化学的水素化によって合成することができる。GBLのTHFへの変換のために適用可能な当該技術分野で周知の1つの例示的な手順は、例えば、テトラヒドロフランを生成するために、同種又は異種水素化触媒を水素、又は化学量論的若しくは触媒的に使用される水素化物系還元剤とともに使用して、培養物に由来する4-HB及び/又はGBL或いはこれらの2つの成分の混合物を化学的に還元することを含む。当該技術分野で周知の他の手順も上記化学反応に等しく適用可能であり、例えば、大表面積ゾル-ゲル経路調製水素化触媒が記載されている米国特許第6,686,310号を含む。マレイン酸のテトラヒドロフラン(THF)及び1,4-ブタンジオール(BDO)への還元、並びにガンマブチロラクトンからテトラヒドロフラン及び1,4-ブタンジオールへの還元のための方法も記載されている。 10

【0149】

培養条件は、例えば、液体培養手順並びに発酵及び他の大規模培養手順を含むことができる。以下の実施例にさらに記載されるように、嫌気性又は実質的に嫌気性培養条件下で本発明の生合成生成物の特に有用な収率を得ることができる。

【0150】

4-HB又はBDOの生成について試験する好適な精製及び/又はアッセイを、周知の方法を使用して実施することができる。好適な反復培養物、例えば三通り培養物を、試験すべき各操作菌株について成長させることができる。例えば、操作生成宿主における生成物及び副産物の形成を監視することができる。最終生成物及び中間体並びに他の有機化合物を、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)、GC-MS(ガスクロマトグラフィー-質量分光分析)及びLC-MS(液体クロマトグラフィー-質量分光分析)、又は当該技術分野で周知の慣例の手順を使用する他の好適な分析法などの方法によって分析することができる。発酵肉汁への生成物の放出を、培養上澄みを用いて試験することもできる。例えば、グルコース及びアルコールに対しては屈折率検出器を使用し、有機酸に対してはUV検出器を使用するHPLC(Linら、Biotechnol. Bioeng. 90:775-779(2005))、又は当該技術分野で周知の他の好適なアッセイ及び検出方法によって、副産物及び残留グルコースを定量することができる。外因性DNA配列の個々の酵素又はタンパク質活性を、当該技術分野で周知の方法を使用してアッセイすることもできる。 20

【0151】

当該技術分野で周知の様々な方法を使用して、4-HB又はBDO生成物を培養物における他の成分から分離することができる。当該分離方法は、例えば、抽出手順、並びに連続液液抽出、浸透気化、メンブレン濾過、メンブレン分離、逆浸透、電気透析、蒸留、結晶化、遠心、抽出濾過、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー及び限外濾過を含む方法を含む。上記方法のすべてが当該技術分野で周知である。 30

【0152】

本発明は、さらに、4-HBを製造する方法を提供する。該方法は、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンセターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミラーゼ、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ又はグルタミン酸デカルボキシラーゼを、モノマー4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)を生成するのに十分な時間にわたって実質的に嫌気性条件下でコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)生合成経路を有する非天然微生物体を発酵させることを含み、そのプロセスは、流加発酵及びバッチ分離:流加発酵及び連続分離、又は連続発酵及び連続分離を含む。 40

【0153】

4-HB、GBL、BDO及び/又はTHFの製造のために、上記培養及び化学的水素化をスケールアップし、連続的に成長させることができる。例示的な成長手順は、例えば、流加発酵及びバッチ分離;流加発酵及び連続分離、又は連続発酵及び連続分離を含む。これらのプロセスのすべてが当該技術分野で周知である。4-HB産生株を採用すると、上記水素化手順を発 50

酵などの連続培養法と同時に採用することによって、4-HB生合成とGBL、BDO及び/又はTHFへの化学的変換を同時に行うことが可能になる。他の水素化手順も当該技術分野で周知であり、本発明の方法に等しく適用され得る。

【0154】

発酵手順は、商業的な量の4-HB及び/又はBDOの生合成生成に特に有用である。概して、且つ非連続培養手順と同様に、連続的及び/又はほぼ連続的な4-HB又はBDOの生成は、対数期の成長を維持及び/又はほぼ維持するための十分な栄養物及び培地で本発明の非天然4-HB又はBDO生成生物体を培養することを含む。当該条件下の連続培養は、例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日又は7日以上を含むことができる。また、連続培養は、1週間、2週間、3週間、4週間又は5週間以上及び数ヵ月までを含むことができる。代替的に、本発明の生物体を、特定の用途に好適であれば数時間培養することができる。連続的及び/又はほぼ連続的な培養条件は、これらの例示的な時間の間すべての時間間隔を含むこともできることが理解されるべきである。本発明の微生物体を培養する時間は、所望の目的のための十分な量の生成物を生成するのに十分な時間に対応することがさらに理解される。

【0155】

発酵手順は、当該技術分野で周知である。手短に述べると、本発明の4-HB、BDO又は他の4-HB誘導生成物の生合成生成のための発酵を、例えば、流加発酵及びバッチ分離;流加発酵及び連続分離、又は連続発酵及び連続分離に利用することができる。当該技術分野で周知のバッチ及び連続発酵手順を、以下の実施例にさらに例示する。

【0156】

それぞれ実質的な量のモノマー4-HB及びBDOの連続生成のために本発明の4-HB又はBDO産生株を使用する上記発酵手順に加えて、4-HB産生株に、例えば、モノマー4HBの例えばGBL、BDO及び/又はTHFへの化学的変換のための先述の化学合成手順を同時に施すことができる。同様に、BDO産生株に、例えば、BDOの例えばTHF、GBL、ピロリドン及び/又は他のBDO系統の化合物への化学的変換のための先述の化学合成手順を同時に施すことができる。加えて、4-HB及びBDO産生株の生成物を発酵培養物から分離し、続いて本明細書に開示されるように化学変換させることができる。

【0157】

手短に述べると、発酵肉汁におけるGBLの水素化を、Frostら、Biotechnology Progress 18:201-211(2002)に記載されているように実施することができる。発酵時の水素化のための別の手順は、例えば、米国特許第5,478,952号に記載されている方法を含む。この方法を以下の実施例にさらに例示する。

【0158】

したがって、本発明は、また、 γ -ブチロラクトン(GBL)、テトラヒドロフラン(THF)又は1,4-ブタンジオール(BDO)を製造する方法を提供する。該方法は、4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)及び/又は1,4-ブタンジオール(BDO)生合成経路を有する非天然微生物体を発酵することを含み、該経路は、4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼ、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンセターゼ、CoA依存性セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシ酪酸:CoAトランスフェラーゼ、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミラーゼ、 α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブタン酸キナーゼ、ホスホトランスブチリラーゼ、CoA非依存性1,4-ブタンジオールセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA依存性1,4-ブタンジオールセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA非依存性1,4-ブタンジオールアルコールデヒドロゲナーゼ又はCoA依存性1,4-ブタンジオールアルコールデヒドロゲナーゼを、1,4-ブタンジオール(BDO)、GBL又はTHFを生成するための十分な時間にわたって実質的に嫌気性条件下でコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、該発酵は、流加発酵及びバッチ分離;流加発酵及び連続分離、又は連続発酵及び連続分離を含む。

【0159】

4-HB、BDO及び本明細書に記載の本発明の他の生成物に加えて、本発明の非天然微生物体及び方法を、互いの組合せ、及び当該技術分野で周知の他の微生物体及び方法との組合

せで利用して、他の経路による生成物生合成を達成することができる。例えば、4-HB産生株及び化学的工場の使用、又はBDO産生株の直接的な使用以外のBDOを生成するための1つの別法は、4HB又は本明細書に例示される4-HB生成物をBDOに変換することが可能な別の微生物体を添加することによるものである。

【0160】

1つの当該手順は、例えば、以上及び以下に記載されている、4HBを生成するための本発明の4-HB生成微生物体の発酵を含む。次いで、4-HBを例えばBDO、GBL及び/又はTHFに変換する第2の微生物体に対する基質として使用することができる。4-HBを第2の生物体の別の培養物にそのまま添加するか、又は例えば細胞分離によって4-HB産生株の本来の培養物からこれらの微生物体を除去し、次いで第2の生物体の発酵肉汁への後の添加を利用して、中間精製工程を経ずに、最終生成物を生成することができる。BDOへの変換のために基質として4-HBを生化学的に利用する能力を有する1つの例示的な第2の生物体は、例えばクロストリジウム・アセトブチリウムである(例えば、Jewellら、Current Microbiology、13: 215-19(1986)参照)。

【0161】

他の実施態様において、本発明の非天然微生物体及び方法を多種多様な小経路にて組み合わせ、例えば、記載の4-HB及び/又はBDOの生合成を達成することができる。これらの実施態様において、本発明の所望の生成物のための生合成経路を異なる微生物体に分離することができる。それらの異なる微生物体を同時培養して、最終生成物を生成することができる。当該生合成スキームにおいて、1つの微生物体の生成物は、最終生成物が合成されるまで第2の微生物体に対する基質である。例えば、1つの経路中間体を別の経路中間体又は生成物に変換する、例えば、外因性コハク酸などの基質を、4-HBを介して最終生成物BDOに変換するための生合成経路を含む微生物体を変換することによって、BDOの生合成を先述のように達成することができる。代替的に、同じ容器内の2つの生物体を使用する同時培養又は同時発酵によりBDOを微生物体から生合成生成することもできる。第1の微生物体は、4-HBをコハク酸から生成する遺伝子を有する4-HB産生株であり、第2の微生物体は、4-HBをBDOに変換する遺伝子を有するBDO産生株である。

【0162】

本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、小経路を有する他の非天然微生物体の同時培養、並びに本発明の4-HB、BDO、GBL及びTHF生成物を生成するための当該技術分野で周知の他の化学及び/又は生化学的手順の組合せによる、他の微生物体とともに本発明の非天然微生物体及び方法に対する多種多様な組合せ及び置換が存在することを理解するであろう。

【0163】

より良好な産生株を生成するために、代謝モデル化を利用して成長条件を最適化することができる。モデル化を使用して、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計することもできる(例えば、米国特許公開第2002/0012939号、同第2003/0224363号、同第2004/0029149号、同第2004/0072723号、同第2003/0059792号、同第2002/0168654号及び同第2004/0009466号並びに米国特許第7,127,379号参照)。モデル化分析は、代謝をBDOのより効率的な生成にシフトさせることの細胞成長に対する影響の確実な予測を可能にする。

【0164】

所望の生成物の生合成に有利である代謝変性を特定及び設計するための方法は、OptKnock計算フレームワークである(Burgardら、Biotechnol. Bioeng. 84:647-657(2003))。OptKnockは、目標生成物を過剰生成する遺伝子的に安定な微生物をもたらす遺伝子破壊又は欠失手法を示唆する代謝モデル化及びシミュレーションプログラムである。具体的には、該フレームワークは、所望の生化学物質を細胞成長の必須副産物にする遺伝子操作を示唆するために、微生物の完全代謝及び/又は生化学ネットワークを調査する。生化学的生成と細胞成長とを、戦略的に配置された遺伝子破壊若しくは欠失又は他の機能的遺伝子破壊、例えば、遺伝子全体の欠失、転写又は翻訳に必要な制御配列の欠失、切断遺伝子生成物

をもたらす遺伝子の一部の欠失を介して組み合わせることによって、或いは被コード化遺伝子生成物を不活性化する様々な変異手法のいずれかによって、バイオリクターにおける長時間の後に操作菌株に加えられた成長選択圧力は、強制的成長廉潔性化学的生成の結果として性能を向上させる。最後に、遺伝子欠失が構築されると、OptKnockによって選択された遺伝子がゲノムから完全に除去されることになるため、設計された菌株がそれらの野生型状態に復帰する可能性が無視できる。したがって、この計算手法は、所望の生成物の生合成をもたらす代替的経路を特定するために使用され得るか、又は所望の生成物の生合成のさらなる最適化のために非天然微生物体と併用され得る。

【0165】

手短に述べると、OptKnockは、本明細書では、細胞代謝をモデル化するための計算方法及びシステムを指すように使用される用語である。OptKnockプログラムは、特定の制約を流れ均衡分析(FBA)モデルに組み込むモデル及び方法のフレームワークに関する。これらの制約は、例えば、定性的動力学情報、定性的制御情報及び/又はDNAマイクロアレイ実験データを含む。OptKnockは、また、例えば、流れ均衡モデルを介して誘導された流れ境界を緻密化し、続いて遺伝子付加又は破壊/欠失の存在下で代謝ネットワークの性能限界を探索することによって、様々な代謝上の問題に対する解を計算する。OptKnock計算フレームワークは、代謝ネットワークの性能限界の効果的な問い合わせを可能にするモデル公式の構築を可能にし、得られた混合整数線形プログラミング問題を解くための方法を提供する。本明細書においてOptKnockと称する代謝モデル化及びシミュレーション方法は、例えば、2002年1月10日に出願された米国公開第2002/0168654号、2002年1月10日に出願された国際特許第PCT/US02/00660号、及び2007年8月10日に出願された米国特許出願第11/891,602号に記載されている。

【0166】

生成物の生合成生成に有利である代謝変性を特定及び設計するための別の計算方法は、SimPheny(登録商標)という名称の代謝モデル化及びシミュレーションシステムである。この計算方法及びシステムは、例えば、2002年6月14日に出願された米国公開第2003/0233218号、及び2003年6月13日に出願された国際特許出願第PCT/US03/18838号に記載されている。SimPheny(登録商標)は、ネットワークモデルインシリコを生成し、生物系の化学反応を介して質量、エネルギー又は電荷の流れをシミュレートして、系における化学反応のあらゆる可能な官能基を含む溶液空間を画定することによって、生物系のための許容活性の範囲を決定するために使用できる計算システムである。この手法は、含まれる反応物の既知の化学量論組成などの制約、並びに反応を介する最大限の流れに伴う反応の熱力学及び容量の制約によって溶液空間が画定されるため、制約ベースのモデル化と呼ばれる。これらの制約によって画定される空間を調べて、生物系又はその生化学的成分の表現型機能及び挙動を確認することができる。

【0167】

これらの計算手法は、生物系が柔軟であり、多くの異なる方式で同じ結果に到達できるため、生物学的現実と一致する。生物系は、すべての生態系が直面しなければならない基本的な制約によって制限された進化的メカニズムを介して設計される。したがって、制約ベースのモデル化手法は、これらの包括的な現実を包含する。さらに、制約の緻密化を介してネットワークモデルに対してさらなる制限を連続的に加える能力は、溶液空間のサイズの縮小をもたらすことによって、生理学的性能又は表現型を予測できる精度を向上させる。

【0168】

本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、宿主微生物体において所望の化合物の生合成を設計及び実装する代謝モデル化及びシミュレーションのための様々な計算フレームワークを適用することが可能になる。当該代謝モデル化及びシミュレーション方法は、例えば、SimPheny(登録商標)及びOptKnockとして以上に例示した計算システムを含む。本発明を例示するために、モデル化及びシミュレーションのためのOptKnock計算フレームワークに関していくつかの方法を本明細書に記載する。当業者は、OptKnockを使

用する代謝変性の特定、設計及び実装を当該技術分野で周知の当該他の代謝モデル化及びシミュレーション計算フレームワークのいずれかに適用する方法を把握するであろう。

【0169】

上記方法は、破壊する代謝反応の1つの集合体を提供することになる。その集合体又は代謝修飾内の各反応を消滅させると、生物体の成長期を通じて、必須生成物としての所望の生成物を得ることができる。反応が既知であるため、二層のOptKnock問題の解は、また、反応物の集合体内の各反応を触媒する1つ以上の酵素をコードする1つ以上の付随遺伝子を提供することになる。反応の集合体、及び各反応に参加する酵素をコードするそれらの対応する遺伝子の特定は、一般には、酵素と符号化遺伝子との関係を有する反応データベースによる反応の関連づけを介して実施される。

10

【0170】

特定されると、所望の生成物の生成を達成するために破壊されることになる反応の集合体が、集合体内の各代謝反応をコードする少なくとも1つの遺伝子の機能的破壊によって標的細胞又は生物体の実装される。反応集合体の機能的破壊を達成する1つの特に有用な手段は、各コード化遺伝子の除去によるものである。しかし、場合によっては、例えば、プロモーターなどの制御領域又は制御因子に対するシス結合部位の変異、除去を含む他の遺伝子異常によって、或いは多くの箇所のいずれかにおけるコード化配列の切断によって反応を破壊することが有益であり得る。例えば、生成物の連結の迅速な評価が所望される場合、又は遺伝子逆転が起こりそうもない場合に、遺伝子を完全に破壊させないこれらの後者の異常が有益であり得る。

20

【0171】

所望の生成物の成長連結生合成を含む生合成をもたらすことができる、破壊すべき反応又は代謝修飾のさらなる集合体を招く上記二層OptKnock問題に対するさらなる生産的解を特定するために、整数カットという名称の最適化方法を実施することができる。この方法は、各回において整数カットと呼ばれる追加的な制約を組み込みながら、以上に例示したOptKnock問題を反復的に解くことによって進行する。整数カット制約は、解法手順が、生成物生合成を成長に強制的に連結させる、任意の先の回において特定された全く同一の反応集合体を選択するのを効果的に防止する。例えば、既に特定された成長連結代謝修飾が、破壊のための反応1、2及び3を指定すると、次の制約は、後の解に同じ反応が同時に考慮されることを防止する。整数カット法は、当該技術分野で周知であり、例えば、Burgardら、Biotechnol. Prog. 17:791-797(2001)に見いだされ得る。代謝モデル化及びシミュレーションのためのOptKnock計算フレームワークとそれらの併用に関して本明細書に記載されているすべての方法と同様に、反復的計算分析における冗長性を低減する整数カット法を、例えばSimPheny(登録商標)を含む当該技術分野で周知の他の計算フレームワークに適用することができる。

30

【0172】

本明細書に例示される方法は、特定された遺伝子変性を含むように操作された細胞又は生物体の成長に対する標的生化学生成物の生成の強制連結を含む、所望の生成物を生合成生成する細胞及び生物体の構築を可能にする。したがって、本明細書に記載の計算方法は、OptKnock又はSimPheny(登録商標)から選択されるインシリコ法によって特定される代謝修飾の特定及び実現を可能にする。代謝修飾の集合体は、例えば、1つ以上の生合成経路酵素の添加、及び/又は例えば遺伝子欠失による破壊を含む1つ以上の代謝反応の機能的破壊を含むことができる。

40

【0173】

上述のように、1つのOptKnock手法は、変異微生物ネットワークが、長時間の成長選択に曝されると、それらの計算により推定された最大成長表現型の方に進化し得ることを前提として開発された。換言すると、そのアプローチは、選択的圧力下で自己最適化する生物体の能力を強化する。OptKnockフレームワークは、ネットワーク化学量論組成に基づく生化学的生成と細胞成長との連結を強制する遺伝子欠失の組合せの網羅的列举を可能にする。最適遺伝子/反応ノックアウトの特定は、得られたネットワークに対する最適な成長

50

溶液が興味深い生化学物質を過剰生成するように活性反応の集合体を選択する二層最適化問題の解を必要とする(Burgardら、Biotechnol. Bioeng. 84:647-657(2003))。

【0174】

大腸菌代謝のインシリコ化学量論モデルを採用して、既に例示されており、且つ例えば、米国特許公開第2002/0012939号、同第2003/0224363号、同第2004/0029149号、同第2004/0072723号、同第2003/0059792号、同第2002/0168654号及び同第2004/0009466号並びに米国特許第7,127,379号に記載されている代謝経路のための必須遺伝子を特定することができる。本明細書に開示されるように、OptKnock数理フレームワークを適用して、所望の生成物の成長連結生成をもたらす遺伝子欠失を正確に指摘することができる。さらに、二層OptKnock問題の解は、欠失の1つの集合体のみを提供する。すべての有意義の解、即ち成長連結生成形成をもたらすノックアウトのすべての集合体を列挙するために、整数カットという名称の最適化技術を実施することができる。これは、上述のように、各回において整数カットと称する追加的な制約を組み込みながらOptKnock問題を反復的に解くことを含む。

10

【0175】

以上に例示された方法及び以下の実施例にさらに示される方法は、特定された遺伝子変性を含むように操作された細胞又は生物体の成長に対する標的生化学生成物の強制連結性を含む生合成生成を行う細胞及び生物体の構築を可能にする。この点において、代謝変性は、4-HB及び1,4-ブタンジオールの生合成をもたらす代謝変性が特定された。特定された代謝変性を用いて構築された微生物株は、非修飾微生物体と比較して、高量の4-HB又はBDOを生成する。これらの菌株を、有利には、例えば、負の選択圧力に曝すことなく、4-HB、BDO、THF及びGBLの商業的生産に使用することができる。

20

【0176】

したがって、本明細書に記載の計算方法は、OptKnock又はSimPheny(登録商標)から選択されるインシリコ法によって特定される代謝修飾の特定及び実現を可能にする。代謝修飾の集合体は、例えば、1つ以上の生合成経路酵素の付加、及び/又は例えば遺伝子欠失による破壊を含む1つ以上の代謝反応の機能的破壊を含むことができる。

【0177】

本発明の様々な実施態様の活性に実質的に影響を与える修飾も本明細書に示される本発明の定義内に含まれることが理解される。よって、以下の実施例は、本発明を例示することを意図し、限定するものではない。

30

【0178】

本明細書に記載の非天然微生物体のいずれかを培養して、本発明の生合成生成物を生成及び/又は分泌することができる。例えば、BDO産生株をBDOの生合成生成のために培養することができる。

【0179】

BDOの生成のために、組換え菌株を炭素源及び他の必須栄養物とともに培地で培養する。プロセス全体のコストを低減するために発酵槽に嫌気性条件を維持することが大いに望ましい。例えば、最初に培地に窒素を散布し、次いでフラスコを核膜及びクリンプキャップで密栓することによって当該条件を得ることができる。嫌氣的に成長が観察されない菌株では、限定された通気のために核膜に小穴をあけることによって微好気性条件を適用することができる。例示的な嫌気性条件は、既に記載されており、当該技術分野で周知である。例示的な好気性及び嫌気性条件は、例えば、2007年8月10日に出願された米国特許出願第11/891,602号に記載されている。発酵を、本明細書に開示されているように、バッチ式、流加又は連続法で実施することができる。

40

【0180】

望まれる場合は、培地を望ましいpHに維持する必要に応じて、NaOH又は他の塩基などの塩基或いは酸を添加することによって培地のpHを所望のpH、特に7付近のpHなどの中性のpHに維持することができる。分光光度計(600nm)を使用して光学密度を測定することによって成長速度を測定し、経時的な炭素源消費を監視することによってグルコース取込み速度

50

を測定することができる。

【0181】

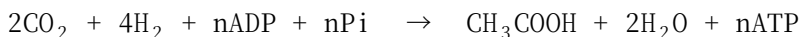
以上に例示されているものなどの再生可能原料に加えて、本発明のBDO生成微生物体をその炭素源としてのシンガス上での成長のために修飾することができる。この具体的な実施態様において、1つ以上のタンパク質又は酵素をBDO生成生物体に発現させて、シンガス又は他の気体炭素源を利用するための代謝経路を提供する。

【0182】

シンガス又は産生株ガスとしても既知である合成ガスは、石炭、並びに農業作物及び残留物を含むバイオマス材料などの炭素質材料のガス化の主な生成物である。シンガスは、主に、 H_2 とCOの混合物であり、石炭、石炭油、天然ガス、バイオマス及び廃棄有機物を含むが、それらに限定されない任意の有機原料のガス化から得ることが可能である。ガス化は、一般には、高い燃料対酸素比の下で実施される。多くが H_2 及びCOであるが、シンガスは、 CO_2 及び他のガスを少量で含むこともできる。したがって、合成ガスは、CO及びさらには CO_2 などのコスト効率の高い気体炭素源を提供する。

【0183】

Wood-Ljungdahl経路は、CO及び H_2 のアセチル-CoA及び酢酸などの他の生成物への変換を触媒する。CO及びシンガスを利用することが可能な生物体は、一般には、Wood-Ljungdahl経路によって包含される酵素及び形質転換の同じ集合体を介して CO_2 及び CO_2/H_2 混合物を利用する能力をも有する。微生物による CO_2 の酢酸への H_2 依存性変換は、COを同じ生物体によって利用することも可能であること、及び同じ経路が関与することが明らかになったはるか前に認識されていた。多くのアセトゲンは、 CO_2 の存在下で成長し、必要な還元当量を供給するための水素が存在する限り酢酸などの化合物を生成することが証明された(例えば、Drake、Acetogenesis、pp. 3-60 Chapman及びHall、New York、(1994)参照)。これを以下の式で要約することができる。



したがって、Wood-Ljungdahl経路を有する非天然微生物は、アセチル-CoA及び他の所望の生成物を生成するために CO_2 と H_2 の混合物をも利用することができる。

【0184】

Wood-Ljungdahl経路は、当該技術分野で周知であり、2つのブランチ、即ち(1)メチルブランチ及び(2)カルボニルブランチに分けることができる12の反応からなる。メチルブランチは、シンガスをメチル-テトラヒドロ葉酸(メチル-THF)に変換するのに対して、カルボニルブランチは、メチル-THFをアセチル-CoAに変換する。メチルブランチにおける反応は、以下の酵素又はタンパク質:フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンセターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸シクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ及びメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼによって順に触媒される。カルボニルブランチにおける反応は、以下の酵素又はタンパク質:メチルテトラヒドロ葉酸:コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ(例えばAcsE)、コリノイド鉄-硫黄タンパク質、ニッケル-タンパク質アセンブリタンパク質(例えばAcsF)、フェレドキシン、アセチル-CoAシンターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ及びニッケル-タンパク質アセンブリタンパク質(例えばCooC)によって順に触媒される。BDO経路を生成するための十分な数のコード化核酸を導入するための本明細書に示される教示及び指針に従って、当業者は、少なくとも、宿主生物体に存在しないWood-Ljungdahl酵素又はタンパク質をコードする核酸を導入することに関して、同じ操作設計を実施できることを理解するであろう。したがって、修飾生物体が完全なWood-Ljungdahl経路を含むように、1つ以上のコード化核酸を本発明の微生物体に導入するとシンガス利用能力が付与されることになる。

【0185】

よって、本明細書に示される教示及び指針を考慮して、当業者は、炭水化物などの炭素源上で成長させると、本発明の生合成化合物を分泌する非天然微生物体を生成できることが理解される。当該化合物は、例えば、BDO及びBDO経路における中間代謝物質のいずれか

を含む。必要なことは、必要とされる酵素又はタンパク質活性の1種以上を操作して、例えば、BDO生合成経路の一部又はすべてを含む所望の化合物又は中間体の生合成を達成することだけである。よって、本発明は、炭水化物又は他の炭素源上で成長させると生成及び/又は分泌し、炭水化物又は他の炭素源上で成長させるとBDO経路に示される中間代謝物質のいずれかを生成及び/又は分泌する非天然微生物体を提供する。本発明のBDO生成微生物体は、本明細書に開示されるように、BDO経路における中間体から合成を開始することができる。

【0186】

より良好な産生株を生成するために、代謝モデル化を利用して成長条件を最適化することができる。モデル化を使用して、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計することもできる(例えば、米国特許公開第2002/0012939号、同第2003/0224363号、同第2004/0029149号、同第2004/0072723号、同第2003/0059792号、同第2002/0168654号及び同第2004/0009466号並びに米国特許第7,127,379号参照)。モデル化分析は、代謝をBDOのより効率的な生成にシフトさせることの細胞成長に対する影響の確実な予測を可能にする。

【0187】

所望の生成物の生合成に有利である代謝変性を特定及び設計するための計算方法は、OptKnock計算フレームワークである(Burgardら、Biotechnol. Bioeng. 84:647-657(2003))。OptKnockは、目標生成物を過剰生成する遺伝子的に安定な微生物をもたらす遺伝子欠失手法を示唆する代謝モデル化及びシミュレーションプログラムである。具体的には、該フレームワークは、所望の生化学物質を細胞成長の必須副産物にする遺伝子操作を示唆するために、微生物の完全代謝及び/又は生化学ネットワークを調査する。生化学的生成と細胞成長とを、戦略的に配置された遺伝子欠失又は他の機能的遺伝子破壊を介して組み合わせることによって、バイオリアクターにおける長時間の後に操作菌株に加えられた成長選択圧力は、強制成長廉潔性化学的生成の結果として性能を向上させる。最後に、遺伝子欠失が構築されると、OptKnockによって選択された遺伝子がゲノムから完全に除去されることになるため、設計された菌株がそれらの野生型状態に復帰する可能性が無視できる。したがって、この計算手法は、所望の生成物の生合成をもたらす代替的経路を特定するために使用され得るか、又は所望の生成物の生合成のさらなる最適化のために非天然微生物体と併用され得る。

【0188】

手短に述べると、OptKnockは、本明細書では、細胞代謝をモデル化するための計算方法及びシステムを指すように使用される用語である。OptKnockプログラムは、特定の制約を流れ均衡分析(FBA)モデルに組み込むモデル及び方法のフレームワークに関する。これらの制約は、例えば、定性的動力学情報、定性的制御情報及び/又はDNAマイクロアレイ実験データを含む。OptKnockは、また、例えば、流れ均衡モデルを介して誘導された流れ境界を緻密化し、続いて遺伝子付加又は欠失の存在下で代謝ネットワークの性能限界を探索することによって、様々な代謝上の問題に対する解を計算する。OptKnock計算フレームワークは、代謝ネットワークの性能限界の効果的な問い合わせを可能にするモデル公式の構築を可能にし、得られた混合整数線形プログラミング問題を解くための方法を提供する。本明細書においてOptKnockと称する代謝モデル化及びシミュレーション方法は、例えば、2002年1月10日に出願された米国公開第2002/0168654号、2002年1月10日に出願された国際特許第PCT/US02/00660号、及び2007年8月10日に出願された米国特許出願第11/891,602号に記載されている。

【0189】

生成物の生合成生成に有利である代謝変性を特定及び設計するための別の計算方法は、SimPheny(登録商標)という名称の代謝モデル化及びシミュレーションシステムである。この計算方法及びシステムは、例えば、2002年6月14日に出願された米国公開第2003/0233218号、及び2003年6月13日に出願された国際特許出願第PCT/US03/18838号に記載されている。SimPheny(登録商標)は、ネットワークモデルインシリコを生成し、生物系の化学反応を

介して質量、エネルギー又は電荷の流れをシミュレートして、系における化学反応のあらゆる可能な官能基を含む溶液空間を画定することによって、生物系のための許容活性の範囲を決定するために使用できる計算システムである。この手法は、含まれる反応物の既知の化学量論組成などの制約、並びに反応を介する最大限の流れに伴う反応の熱力学及び容量の制約によって溶液空間が画定されるため、制約ベースのモデル化と呼ばれる。これらの制約によって画定される空間を調べて、生物系又はその生化学的成分の表現型機能及び挙動を確認することができる。

【0190】

これらの計算手法は、生物系が柔軟であり、多くの異なる方式で同じ結果に到達できるため、生物学的現実と一致する。生物系は、すべての生態系が直面しなければならない基本的な制約によって制限された進化的メカニズムを介して設計される。したがって、制約ベースのモデル化手法は、これらの包括的な現実を包含する。さらに、制約の緻密化を介してネットワークモデルに対してさらなる制限を連続的に加える能力は、溶液空間のサイズの縮小をもたらすことによって、生理学的性能又は表現型を予測できる精度を向上させる。

【0191】

本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、宿主微生物体において所望の化合物の生合成を設計及び実装する代謝モデル化及びシミュレーションのための様々な計算フレームワークを適用することが可能になる。当該代謝モデル化及びシミュレーション方法は、例えば、SimPheny(登録商標)及びOptKnockとして以上に例示した計算システムを含む。本発明を例示するために、モデル化及びシミュレーションのためのOptKnock計算フレームワークに関していくつかの方法を本明細書に記載する。当業者は、OptKnockを使用する代謝変性の特定、設計及び実装を当該技術分野で周知の当該他の代謝モデル化及びシミュレーション計算フレームワークのいずれかに適用する方法を把握するであろう。

【0192】

上記方法は、破壊する代謝反応の1つの集合体を提供することになる。その集合体又は代謝修飾内の各反応を消滅させると、生物体の成長期を通じて、必須生成物としての所望の生成物を得ることができる。反応が既知であるため、二層のOptKnock問題の解は、また、反応物の集合体内の各反応を触媒する1つ以上の酵素をコードする1つ以上の付随遺伝子を提供することになる。反応の集合体、及び各反応に参加する酵素をコードするそれらの対応する遺伝子の特定は、一般には、酵素と符号化遺伝子との関係を有する反応データベースによる反応の関連づけを介して実施される。

【0193】

特定されると、所望の生成物の生成を達成するために破壊されることになる反応の集合体が、集合体内の各代謝反応をコードする少なくとも1つの遺伝子の機能的破壊によって標的細胞又は生物体の実装される。反応集合体の機能的破壊を達成する1つの特に有用な手段は、各コード化遺伝子の除去によるものである。しかし、場合によっては、例えば、プロモーターなどの制御領域又は制御因子に対するシス結合部位の変異、除去を含む他の遺伝子異常によって、或いは多くの箇所のいずれかにおけるコード化配列の切断によって反応を破壊することが有益であり得る。例えば、生成物の迅速な評価が所望される場合、又は遺伝子逆転が起こりそうもない場合に、遺伝子を完全に破壊させないこれらの後者の異常が有益であり得る。

【0194】

所望の生成物の成長連結生合成を含む生合成をもたらすことができる、破壊すべき反応又は代謝修飾のさらなる集合体を招く上記二層OptKnock問題に対するさらなる生産的解を特定するために、整数カットという名称の最適化方法を実施することができる。この方法は、各回において整数カットと呼ばれる追加的な制約を組み込みながら、以上に例示したOptKnock問題を反復的に解くことによって進行する。整数カット制約は、解法手順が、生成物生合成を成長に強制的に連結させる、任意の先の回において特定された全く同一の反応集合体を選択するのを効果的に防止する。例えば、既に特定された成長連結代謝修飾が、

10

20

30

40

50

破壊のための反応1、2及び3を指定すると、次の制約は、後の解に同じ反応が同時に考慮されることを防止する。整数カット法は、当該技術分野で周知であり、例えば、Burgardら、Biotechnol. Prog. 17:791-797(2001)に見いだされ得る。代謝モデル化及びシミュレーションのためのOptKnock計算フレームワークとそれらの併用に関して本明細書に記載されているすべての方法と同様に、反復的計算分析における冗長性を低減する整数カット法を、例えばSimPheny(登録商標)を含む当該技術分野で周知の他の計算フレームワークに適用することができる。

【0195】

本明細書に例示される方法は、特定された遺伝子変性を含むように操作された細胞又は生物体の成長に対する標的生化学生成物の生成の強制連結を含む、所望の生成物を生合成生成する細胞及び生物体の構築を可能にする。したがって、本明細書に記載の計算方法は、OptKnock又はSimPheny(登録商標)から選択されるインシリコ法によって特定される代謝修飾の特定及び実現を可能にする。代謝修飾の集合体は、例えば、1つ以上の生合成経路酵素の添加、及び/又は例えば遺伝子欠失による破壊を含む1つ以上の代謝反応の機能的破壊を含むことができる。

【0196】

上述のように、1つのOptKnock手法は、変異微生物ネットワークが、長時間の成長選択に曝されると、それらの計算により推定された最大成長表現型の方に進化し得ることを前提として開発された。換言すると、そのアプローチは、選択的圧力下で自己最適化する生物体の能力を強化する。OptKnockフレームワークは、ネットワーク化学量論組成に基づく生化学的生成と細胞成長との連結を強制する遺伝子欠失の組合せの網羅的列举を可能にする。最適遺伝子/反応ロックアウトの特定は、得られたネットワークに対する最適な成長溶液が興味深い生化学物質を過剰生成するように活性反応の集合体を選択する二層最適化問題の解を必要とする(Burgardら、Biotechnol. Bioeng. 84:647-657(2003))。

【0197】

大腸菌代謝のインシリコ化学量論モデルを採用して、既に例示されており、且つ例えば、米国特許公開第2002/0012939号、同第2003/0224363号、同第2004/0029149号、同第2004/0072723号、同第2003/0059792号、同第2002/0168654号及び同第2004/0009466号並びに米国特許第7,127,379号に記載されている代謝経路のための必須遺伝子を特定することができる。本明細書に開示されるように、OptKnock数理フレームワークを適用して、所望の生成物の成長連結生成をもたらす遺伝子欠失を正確に指摘することができる。さらに、二層OptKnock問題の解は、欠失の1つの集合体のみを提供する。すべての有意味の解、即ち成長連結生成形成をもたらすロックアウトのすべての集合体を列举するために、整数カットという名称の最適化技術を実施することができる。これは、上述のように、各回において整数カットと称する追加的な制約を組み込みながらOptKnock問題を反復的に解くことを含む。

【0198】

本発明の様々な実施態様の活性に実質的に影響を与えない修飾も、本明細書に示される発明の定義内で提供されることが理解される。よって、以下の実施例は、本発明を例示するものであり、限定しないことを意図する。

【実施例】

【0199】

(実施例I)

(4-ヒドロキシブタン酸の生合成)

本実施例では、4-HB生成のための例示的な生化学合成経路について記載する。

【0200】

微生物における4-HB合成についてのこれまでの報告は、生分解性プラスチックヒドロキシアルカノエート(PHA)の製造における中間体としてのこの化合物に焦点をおいていた(米国特許第6,117,658号)。ポリ-3-ヒドロキシ酪酸ポリマー(PHB)に対して4-HB/3-HBコポリマーを使用すると、より脆性の小さいプラスチックを得ることができる(Saito及びDoi、I

10

20

30

40

50

ntl. J. Biol. Macromol, 16:99-104 (1994))。本明細書に記載のモノマー4-HBの製造は、いくつかの理由で基本的に独特の方法である。(1)生成物は、細胞内で生成され、細胞に留まるPHAと異なり分泌される。(2)ヒドロキシブタン酸ポリマーを生成する生物体では、遊離4-HBが生成されず、補酵素A誘導体がポリヒドロキシアルカノエートシンターゼによって使用される。(3)ポリマーの場合は、顆粒状生成物の形成が熱力学を変化させる。(4)細胞外pHは、ポリマーの生成にとって重要でないが、4-HBが遊離酸の状態で存在するか共役塩基状態で存在するかということ、並びに4-HBとGBLの平衡に影響を与えることになる。

【0201】

4-HBを、コハク酸セミアルデヒドを中間体として、TCA回路の中心代謝物質であるコハク酸から2つの酵素還元工程で生成することができる(図1)。これらの酵素の第1の酵素、即ちセミアルデヒドデヒドロゲナーゼは、NADH及びNADPH依存性酵素が見いだされた大腸菌を含む多くの生物体に固有である(Donnelly及びCooper、Eur. J. Biochem. 113:555-561(1981);Donnelly及びCooper、J. Bacteriol. 145:1425-1427(1981);Marek及びHenson、J. Bacteriol. 170:991-994(1988))。S.セレビスシアエにおけるコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を裏づける証拠も存在し(Ramosら、Eur. J. Biochem. 149:401-404(1985))、配列相同性によって推定上の遺伝子が特定された。しかし、たいていの報告は、この酵素が、図1に示されるコハク酸合成の方向に進み(Donnelly及びCooper、前出;Lutke-Eversloh及びSteinbuchel、FEMS Microbiol. Lett.181:63-71(1999))、4-HB及びガンマ-アミノ酪酸の分解経路に参加することを示している。コハク酸セミアルデヒドは、また、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ及びグルタミン酸デカルボキシラーゼの2つの酵素の作用によりTCA回路中間体 α -ケトグルタル酸を介して大腸菌などの特定の微生物体によって自然に生成される。コハク酸を分解するために必須の嫌気性菌クロストリジウム・クルイベリによって使用される代替的経路は、コハク酸をスクシニル-CoAに活性化させ、次いでこの方向に機能することが知られる代替的コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼを使用してスクシニル-CoAをコハク酸セミアルデヒドに変換する(Sohling及びGottschalk、Eur. J. Biochem. 212:121-127(1993))。しかし、この経路は、コハク酸をスクシニル-CoAに変換するのに必要とされるATPのエネルギーコストを有する。

【0202】

経路の第2の酵素、即ち4-ヒドロキシブタン酸デヒドロゲナーゼは、大腸菌又は酵母に固有でなく、C.クルイベリ及びラルストニア・ユートロファなどの様々な細菌に見いだされる(Lutke-Eversloh及びSteinbuchel、前出;Sohling及びGottschalk、J. Bacteriol. 178:871-880(1996);Valentinら、Eur. J. Biochem. 227:43-60(1995);Wolff及びKenealy、Protein Expr. Purif. 6:206-212(1995))。これらの酵素は、NADH依存性であることが知られるが、NADPH依存型も存在する。アルファ-ケトグルタル酸から4-HBへのさらなる経路が大腸菌においてポリ(4-ヒドロキシ酪酸)を蓄積させることが実証された(Songら、Wei She ng Wu Xue. Bao. 45:382-386(2005))。組換え菌株は、2つの原生大腸菌遺伝子:グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ及びグルタミン酸デカルボキシラーゼとともに、3つの異種遺伝子:PHAシンターゼ(R.ユートロファ)、4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(R.ユートロファ)及び4-ヒドロキシ酪酸:CoAトランスフェラーゼ(C.クルイベリ)の過剰発現を必要とした。代替的に、図1の工程4及び5を、ユーグレナ・グラシリスに特定されるものなどのアルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼによって実施することができる(Shigeokaら、Biochem. J. 282(Pt2):319-323(1992);Shigeoka及びNakano、Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28(1991);Shigeoka及びNakano、Biochem J. 292(Pt 2):463-467(1993))。しかし、この酵素は何らかの生物体における4-HB又は関連ポリマーの生成に影響を及ぼすようにこれまで適用されていなかった。

【0203】

各生物体のインシリコ代謝モデルを使用して、エシェリキア・コリ及びサッカロマイセス・セレビスシアエの2つの微生物における微生物の4-ヒドロキシ酪酸の生成機能を調べた。4-HBへの潜在的な経路は、コハク酸、スクシニル-CoA、又は図1に示されるアルファ-ケ

トグルタル酸中間体を介して進行する。

【0204】

コハク酸からの4-HB生成経路における第1の工程は、NADH又はNADPH依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼを介するコハク酸のコハク酸セミアルデヒドへの変換を含む。大腸菌において、gabDは、NADP依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼであり、4-アミノ酪酸取込み及び分解に関与する遺伝子集団の一部である(Niegemannら、Arch. Microbiol. 160:454-460(1993);Schneiderら、J.Bacteriol. 184:6976-6986(2002))。sadは、NAD依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性(Marek及びHenson、前出)に対する酵素をコードすると考えられる。S.セレビスシアエは、サイトソルに集まる、推定上UGA2に割り当てられたNADPH依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼのみを含む(Huhら、Nature 425:686-691(2003))。大腸菌及びS.セレビスシアエの両方における4-HBへのコハク酸経路を想定する最大収率計算は、非原生4-HBデヒドロゲナーゼがそれらの代謝ネットワークに加えられたという前提のみを必要とする。

10

【0205】

スクシニル-CoAから4-ヒドロキシ酪酸への経路が、4-ヒドロキシ酪酸モノマー単位を含むポリヒドロキシアルカノエートを製造するための方法の一部として、米国特許第6,117,658号に記載された。クロストリジウム・クルイベリは、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有することが知られる1つの生物体の例である(Sohling及びGottschalk、前出;Sohling及びGottschalk、前出)。この調査において、C.クルイベリ又は別の生物体のこの酵素は、スクシニル-CoAから4-HBへの経路を完成するために非原生又は異種4-HBデヒドロゲナーゼとともに大腸菌又はS.セレビスシアエに発現される。4-HBへのアルファ-ケトグルタル酸の経路は、大腸菌においてポリ(4-ヒドロキシ酪酸)を乾燥細胞重量の30%まで蓄積させることが証明された(Songら、前出)。大腸菌及びS.セレビスシアエは、グルタミン酸:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ及びグルタミン酸デカルボキシラーゼを自然又は内因的に有するため(Colemanら、J. Biol. Chem. 276:244-250(2001))、非原生4-HBデヒドロゲナーゼが存在することのみを想定することによって、AKGから4-HBへの経路を両方の生物体に完成することができる。

20

【0206】

(実施例II)

(コハク酸及びアルファ-ケトグルタル酸からの1,4-ブタンジオールの生合成)

30

本実施例では、微生物体からの4-HB及びBDOの構築及び生合成生成を例示する。4-HB及びBDOのための経路は、本明細書に開示されている。

【0207】

上記経路に利用できるいくつかの代替的な酵素が存在する。コハク酸をスクシニル-CoAに変換するための原生又は内因性酵素(図1の工程1)の代わりに、工程9と同様に機能する、cat1遺伝子C.クルイベリによってコードされたCoAトランスフェラーゼを使用することができる(Sohling及びGottschalk、Eur. J Biochem. 212:121-127(1993))。しかし、この酵素による酢酸の生成は、それがアセチル-CoAに逆変換されるのではなく、分泌され得るため、最適であり得ない。この点において、工程9における酢酸形成を除外することも有利であり得る。CoAトランスフェラーゼに対する1つの代替として、4-HBを最初にATPによってリン酸化し、次いで酢酸のアセチルCoAへの変換のための大腸菌における酢酸キナーゼ/ホスホトランスアセチラーゼ経路と同様にCoA誘導体に変換するメカニズムを採用することができる。この経路の正味のコストは、アセチル-CoAを酢酸から再生するのに必要とされるのと同じである1つのATPである。酵素ホスホトランスブチリラーゼ(ptb)及び酪酸キナーゼ(bk)は、C.アセトブチリクムにおける酪酸生成のために非ヒドロキシル化分子に対してこれらの工程を実施することが知られる(Caryら、Appl Environ Microbiol 56:1576-1583(1990);Valentine, R. C.及びR. S. Wolfe、J Biol Chem. 235:1948-1952(1960))。これらの酵素は可逆的であり、合成が4-HBの方向に進行することを可能にする。

40

【0208】

コハク酸に加えて、又はコハク酸の代わりにアルファ-ケトグルタル酸を介してBDOを生

50

成することもできる。既に記載し、以下にさらに例示するように、生成物生合成を実施するための1つの経路は、内因性酵素を使用して、 α -ケトグルタル酸を介してコハク酸セミアルデヒドを生成することである(図1、工程4~5)、別法は、この変換を1つの工程で実施することができる α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼを使用することである(図1、工程8;Tianら、Proc Natl Acad Sci US. A 102:10670-10675(2005))。

【0209】

BDO生成微生物体の異なる菌株を構築するために、確認のために適用可能な遺伝子の一覧を結集させた。手短に述べると、4-HB及び/又はBDO生合成経路内の1つ以上の遺伝子を利用可能な文献情報源、NCBI遺伝子データベース及び同族体検索を使用して、図1に示される完全なBDO生合成経路の工程毎に特定した。この研究で複製及び評価された遺伝子を、ポリペプチド配列の適切な文献及びURL引用とともに以下の表6に示す。さらに以下に記載されるように、いくつかの遺伝子をコドン最適化のために合成し、他の遺伝子を、原生又は野生型生物体のゲノムDNAからPCRを介して複製した。遺伝子によっては、両方のアプローチを使用した。この場合、原生遺伝子は、実験に使用される際に、遺伝子識別番号に対する添字「n」によって示される。DNA配列のみが相違し、タンパク質は同一であることに留意されたい。

【表 6】

表 6. 宿主BDO産生微生物において発現される遺伝子

遺伝子 ID番号	反応番号 (図1)	遺伝子 名	微生物源	酵素名	タンパク質配列のリンク先
0001	9	Cat2	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	4-ヒドロキシ酪酸 補酵素 A トランスフェラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=nucleotide&id= 1228100
0002	12/13	adhE	クロストリジウム アセトブチリウム ATCC 824	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&val= 15004739
0003	12/13	adhE2	クロストリジウム アセトブチリウム ATCC 824	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=NP_149325. 1
0004	1	Cat1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 補酵素 A トランスフェラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=nucleotide&id= 1228100
0008	6	sucD	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ (CoA-依存性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=nucleotide&id= 1228100
0009	7	4-HBd	ラルストニア ユーロファH16	4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ (NAD-依存性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=YP_726053. 1
0010	7	4-HBd	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ (NAD-依存性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=nucleotide&id= 1228100
0011	12/13	adhE	<i>E. コリ</i>	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pe c/genes.List.DetailAction.do?f romListFlag=true&featureTyp e=1&orfId=1219
0012	12/13	yqhD	<i>E. コリ</i>	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pe c/genes.List.DetailAction.do
0013	13	bdhB	クロストリジウム アセトブチリウム ATCC 824	ブタノール デヒドロゲナーゼ II	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=NP_349891. 1
0020	11	ptb	クロストリジウム アセトブチリウム ATCC 824	ホスホ- トランスブチリラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=1 5896327
0021	10	buk1	クロストリジウム アセトブチリウム ATCC 824	酪酸キナーゼ I	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=2 0137334
0022	10	buk2	クロストリジウム アセトブチリウム ATCC 824	酪酸キナーゼ II	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=2 0137415
0023	13	adhEm	嫌気性汚水 消化微生物 コンソーシア のメタライ ブラリから単離	アルコール デヒドロゲナーゼ	

10

20

30

40

表6 (続き)

遺伝子 ID番号	反応番号 (図1)	遺伝子 名	微生物源	酵素名	タンパク質配列のリンク先
0024	13	adhE	クロストリジウム テルモセルム	アルコール デヒドロゲナーゼ	www.genome.jp/dbget- bin/www_bget?cth:Cthe_0423
0025	13	ald	クロストリジウム ベージェリンクキー	補酵素 A- アシル化アルデヒド デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=4 9036681
0026	13	bdhA	クロストリジウム アセトブチリウム ATCC 824	ブタノール デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=NP_349892. 1
0027	12	bld	クロストリジウム サッカロペルブチ ルアセトニウム	ブチルアルデヒド デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=3 1075383
0028	13	bdh	クロストリジウム サッカロペルブチ ルアセトニウム	ブタノール デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=1 24221917
0029	12/13	adhE	クロストリジウム テタニ	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.genome.jp/dbget- bin/www_bget?ctc:CTC01366
0030	12/13	adhE	クロストリジウム ペルフリゲンス	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.genome.jp/dbget- bin/www_bget?cpe:CPE2531
0031	12/13	adhE	クロストリジウム ジフィシレ	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.genome.jp/dbget- bin/www_bget?cdf:CD2966
0032	8	sucA	ミコバクテリウム ボビス BCG, Pasteur	α -ケトグルタル酸 デカルボキシラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=YP_977400. 1
0033	9	cat2	クロストリジウム アミノブチリウム	4-ヒドロキシ酪酸 補酵素 A トランスフェラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&val= 6249316
0034	9	cat2	ボルフィロモナス ギンギバリス W83	4-ヒドロキシ酪酸 補酵素 A トランスフェラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&val= 34541558
0035	6	sucD	ボルフィロモナス ギンギバリス W83	コハク酸 セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ (CoA-依存性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=NP_904963. 1
0036	7	4-HBd	ボルフィロモナス ギンギバリス W83	NAD-依存性 4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=NP_904964. 1
0037	7	gbd	培養されなかつ たバクテリア	4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=nucleotide&id= 5916168
0038	1	sucCD	E. コリ	スクシニル-CoA シンテターゼ	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pe c/genes.List.DetailAction.do

【0210】

BDO経路のための発現ベクターの構築. ベクター骨格及びいくつかの菌株をDr. Rolf Lutz of Expressys(www.expressys.de/)から得た。ベクター及び菌株は、Dr. Rolf Lutz及びProf. Hermann Bujard(Lutz, R. 及びH. Bujard, Nucleic Acids Res 25:1203-1210(1997))によって開発されたpZ発現システムに基づく。得られたベクターは、pZE13luc、pZA33luc、pZS*13luc及びpZE22lucであり、スタッファー断片としてルシフェラーゼ遺伝子を含んでいた。ルシフェラーゼスタッファー断片を、適切な酵素部位によって側面が固められたlacZ-アルファ断片で置き換えるために、ルシフェラーゼスタッファー断片を、最初にEcoRI及びXbaIによる消化によって各ベクターから除去した。lacZ-アルファ断片は、以下の

プライマーpUC19から増幅されたPCRであった。

lacZalpha-RI

【化1】

5'GACGAATTCGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGTCCAATTCAGTGGCCGTCGTT
TTAC3'

lacZalpha3'BB

【化2】

5'-GACCCTAGGAAGCTTTCTAGAGTCGACCTATGCGGCATCAGAGCAGA-3'.

10

【0211】

これにより、EcoRI部位、NheI部位、リボソーム結合部位、SalI部位及び開始コドンの5'末端を有する断片が生成された。断片の3'末端には、停止コドン、XbaI、HindIII及びAvrII部位が含まれていた。PCR生成物をEcoRI及びAvrIIにより消化させ、EcoRI及びXbaIにより消化された塩基ベクターに結合した(XbaI及びAvrIIは、相溶性末端を有し、非部位を生成する)。NheI及びXbaI制限酵素部位は、互いに結合させることができる相溶性末端を生成する(ただし、いずれの酵素によっても消化されないNheI/XbaI非部位を生成する)ため、ベクターに複製された遺伝子は、互いに「パイオブリック」され得る([http://openwetware.org/wiki/Synthetic Biology:BioBricks](http://openwetware.org/wiki/Synthetic_Biology:BioBricks))。手短に述べると、遺伝子の間の部位が各添加後に破壊されるため、この方法は、(部位が遺伝子に対して内在的でなければ)同じ2つの制限部位を使用して、無数の遺伝子をベクターに接合することを可能にする。

20

【0212】

すべてのベクターは、pZ命名の後に、複製の起源、抗生物質抵抗マーカー及びプロモーター/制御単位を示す文字及び数字が続く。複製の起源は、第2の文字であり、起源に基づいて、ColE1に対するE、p15Aに対するA及びpSC101に対するSによって表される。第1の数字は、抗生物質抵抗マーカーを表す。(アンピシリンに対する1、カナマイシンに対する2、クロラムフェニコールに対する3、スペクチノマイシンに対する4及びテトラシクリンに対する5)。最後の数字は、対象となる遺伝子を制御したプロモーターを規定する($P_{LtetO-1}$ に対する1、 $P_{LlacO-1}$ に対する2、 $P_{AllacO-1}$ に対する3及び $P_{lac/ara-1}$ に対する4)。MCS及び対象となる遺伝子は、直後に続く。ここに述べる研究では、上記パイオブリック挿入のために修飾された2つの塩基ベクター、pZA33及びpZE13を採用した。対象となる遺伝子をそれらに複製すると、表6に示される4桁の遺伝子コードを使用して、得られたプラスミドを例えばpZA33-XXXX-YYYY-...のように表す。

30

【0213】

(宿主菌株の構築)

本明細書に記載のすべての研究における親菌株は、大腸菌K-12菌株MG1655である。adhE、gabD及びaldAにおける無マーカー欠失株を、redET法(Datsenko, K. A. 及び B. L. Wanner, Proc Natl Acad Sci U S A 97:6640-6645(2000))を使用して、第三者によるサービス契約に基づいて構築した。次の菌株を、バクテリオファージP1媒介形質導入(Miller, J. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratories, New York(1973))を介して構築した。菌株C600Z1($lacI^q$ 、PN25-tetR、 Sp^R 、 $lacY1$ 、 $leuB6$ 、 $mcrB^+$ 、 $supE44$ 、 $thi-1$ 、 $thr-1$ 、 $tonA21$)をExpressysから入手し、P1形質導入のための $lacI^q$ 対立遺伝子源として使用した。バクテリオファージP1virを、 $lacI^q$ に結合したスペクチノマイシン抵抗遺伝子を有するC600Z1大腸菌株上で成長させた。C600Z1上で成長したP1溶菌液を使用して、スペクチノマイシン抵抗についての選択によりMG1655を感染させた。次いで、スペクチノマイシン抵抗コロニーを、 $P_{AllacO-1}$ プロモーターに結合した遺伝子の発現を抑制する形質導入体の能力を測定することによって、結合した $lacI^q$ について選別した。得られた菌株をMG1655 $lacI^q$ と命名した。同様の手順を使用して、 $lacI^q$ を欠失菌株に導入した。

40

【0214】

50

(コハク酸からの4-HBの生成)

コハク酸から4-HB産生株を構築するために、以下に記載するように、コハク酸から4-HB及び4-HB-CoAまでの工程(図1の1、6、7及び9)をコードする遺伝子をpZA33及びpZE13上に集めた。様々な遺伝子の組合せ、並びに対照として不完全な経路を保持する構造体を評価した(表7及び8)。次いで、イソプロピル β -D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加することによって、誘発性発現を可能にする、 $lacI^Q$ を含む宿主菌株にプラスミドを変換した。野生型、及び原生コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が欠失した宿主の両方(図1の工程2)を試験した。

【0215】

最初に、経路遺伝子を含むプラスミド構造体に対して、宿主として菌株MG1655 $lacI^Q$ を使用して、異種酵素の活性をインビトロアッセイで試験した。細胞を、構造体毎に適切な抗生物質を含むLB培地(Difco)にて好気性条件で成長させ、光学密度(OD600)が約0.5になったときに1mMのIPTGを添加することによって誘発させた。細胞を6時間後に収穫し、以下に記載するように酵素アッセイを実施した。

【0216】

(インビトロ酵素アッセイ)

活性アッセイのための粗抽出物を得るために、細胞を、10分間にわたる4500rpmの遠心(Beckman-Coulter、Allegera X-15R)によって収穫した。ペレットを、ベンゾナーゼ及びライソザイムを含む0.3mLのBugBuster(Novagen)に再懸濁させ、静かに振盪しながら室温で15分間溶解させた。無細胞溶菌液を、4℃にて30分間にわたって14000rpmで遠心させること(Eppendorf遠心器5402)によって得た。サンプルにおける細胞タンパク質を、Bradfordら、Anal. Biochem. 72:248-254(1976)の方法を使用して測定し、特定の酵素アッセイを以下に記載するように実施した。活性を、活性の単位が、1 μ mの基質を室温にて1分間で変換するのに必要とされる酵素の量で定義されるタンパク質1mg当たりの単位で報告する。概して、報告された値は、少なくとも3回のアッセイの平均値である。

【0217】

既に記載したSohling及びGottschalk、J. Bacteriol. 178:871-880(1996)の手順に従って、スクシニル-CoA及び酢酸からのアセチル-CoAの形成を監視することによって、スクシニル-CoAトランスフェラーゼ(Cat1)活性を測定した。ATPの存在下でのコハク酸及びCoAからのスクシニル-CoAの形成を追従することによってスクシニル-CoAシンセターゼ(SucCD)活性を測定した。実験は、Cha及びParks、J. Biol. Chem. 239:1961-1967(1964)に記載される手順に従った。コハク酸セミアルデヒド及びCoAの存在下における340nmでのNADのNADHへの変換(Sohling及びGottschalk、Eur. J. Biochem. 212:121-127(1993))を追従することによってCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(SucD)活性を測定した。コハク酸セミアルデヒドの存在下における340nmでのNADHのNADへの酸化を監視することによって4-HBデヒドロゲナーゼ(4-HBd)酵素活性を測定した。実験は、Gerhardtら、Arch. Microbiol. 174:189-199 (2000)の公表手順に従った。Scherf及びBuckel、Appl. Environ. Microbiol. 57:2699-2702(1991)からの改良手順を使用して、4-HB CoAトランスフェラーゼ(Cat2)活性を測定した。アセチル-CoA及び4-HB又は酪酸からの4-HB-CoA又はブチリル-CoAの形成を、HPLCを使用して測定した。

【0218】

アルコール(ADH)及びアルデヒド(ALD)デヒドロゲナーゼを、いくつかの文献情報源から適用された手順(Durreら、FEMS Microbiol. Rev. 17:251-262(1995);Palosaari及びRogers、J. Bacteriol. 170:2971-2976(1988)及びWelchら、Arch. Biochem. Biophys. 273:309-318(1989))を使用して、還元方向にアッセイした。NADHの酸化の後に、室温にて全体で240秒間にわたって4秒毎に340nmにおける吸光度を読み取った。還元アッセイを(KOHでpH7.5に調整された)100mMのMOPS、0.4mMのNADH及び1から50 μ lの細胞抽出物にて実施した。ADHに対する100 μ lの100mMアセトアルデヒド又はブチルアルデヒド或いはALDに対する100 μ lの1mMアセチル-CoA又はブチリル-CoAの試薬を添加することによって反応を開始させる。分光高度計を迅速にブランクにし、次いで動力学の読取りを開始する。340nm(6000)にお

10

20

30

40

50

けるNAD(P)Hのモル吸光係数及び抽出物のタンパク質濃度とともに、毎分340nmの吸光度における得られた還元勾配を使用して、比活性を測定することができる。

【0219】

PTBの酵素活性を、Caryら、J. Bacteriol. 170:4613-4618(1988)に記載されているようにブチリル-CoAからブチリル-リン酸への方で測定する。それは、変換のための無機リン酸を提供し、試薬5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)又はDTNBによる遊離CoAの増加を追従する。DTNBは、遊離CoAなどのチオール基と反応して、 14140Mcm^{-1} のモル吸光係数を有する、412nmで吸収する黄色の2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸(TNB)を放出する。アッセイ緩衝液は、pH7.4の150mMリン酸カリウム、0.1mMのDTNB及び0.2mMブチリル-CoAを含んでおり、2から50 μL の細胞抽出物を添加することによって反応を開始させた。ATPを消費する酪酸からブチリル-リン酸の形成の方でBKの酵素活性を測定する。手順は、Roseら、J. Biol. Chem. 211:737-756(1954)に既に記載されている酢酸キナーゼに対するアッセイと同様である。しかし、Sigmaによって提供された別の酢酸キナーゼ酵素アッセイがより有用且つ高感度であることを見いだした。このアッセイは、酢酸キナーゼによるATPのADPへの変換を、ピルビン酸キナーゼによるADP及びピルビン酸ホスホエノール(PEP)のATP及びピルビン酸への変換に連結した後、乳酸デヒドロゲナーゼによってピルビン酸及びNADHを乳酸及びNAD⁺に変換する。酪酸を酢酸に代用することは、アッセイがBK酵素活性を追従することを可能にするための唯一の主たる改造である。アッセイ混合物は、pH7.6の80mMのトリエタノールアミン緩衝液、200mM酪酸ナトリウム、10mMのMgCl₂、0.1mMのNADH、6.6mMのATP、1.8mMホスホピルビン酸を含んでいた。ピルビン酸キナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ及びミオキナーゼを製造者の説明書に従って添加した。2から50 μL の細胞抽出物を添加することによって反応を開始させ、NADH酸化を示す340nmの吸光度の低下に基づいて反応を監視した。

【0220】

(HPLCによるCoA誘導体の分析)

補酵素A(CoA)転移を含む酵素反応を監視するためにHPLCに基づくアッセイを開発した。開発された方法は、インビトロ反応混合物に存在するCoA、アセチルCoA(AcCoA)、ブチリルCoA(BuCoA)及び4-ヒドロキシ酪酸CoA(4-HBCoA)の定量測定によって特徴づけられる酵素活性を可能にした。低 μM への感度の低下、並びに対象となるすべてのCoA誘導体の優れた分解能が達成された。

【0221】

化学物質及びサンプルの調製を以下のように実施した。手短に述べると、CoA、AcCoA、BuCoA及びすべての他の化学物質をSigma-Aldrichから入手した。溶媒、即ちメタノール及びアセトニトリルは、HPLCグレードであった。標準検量線は、0.01~1mg/mL濃度範囲で優れた直線性を示した。酵素反応混合物は、100mMのTris HCl緩衝液(pH7)を含み、アリコットを異なる時点で採取し、ギ酸(0.04%の最終濃度)で失活させ、HPLCによって直接分析した。

【0222】

二元ポンプ、デガッサー、恒温自動サンプラー及びカラム区画室を備えたAgilent 1100 HPLCシステムを使用してHPLC分析を実施し、ダイオードアレイ検出器(DAD)を分析に使用した。4.6×150mmの逆相カラムKromasil 100 5 μm C18(Peeke Scientific)を採用した。25 mMのリン酸カリウム(pH7)及びメタノール又はアセトニトリルを1mL/分の流量で水性及び有機溶媒として使用した。2つの方法:十分に分解されたCoA、AcCoA及びBuCoAの分析のためのより急速な勾配を用いる短い方法、並びに緊密に溶離するAcCoAと4-HBCoAとを区別するためのより長い方法を開発した。短い方法では、アセトニトリル勾配(0分-5%、6分-30%、6.5分-5%、10分-5%)を採用し、CoA、AcCoA及びBuCoAに対してそれぞれ2.7、4.1及び5.5分の滞留時間を得た。長い方法では、メタノールを0分-5%、20分-35%、20.5分-5%、25分-5%の直線勾配で使用した。CoA、AcCoA、4-HBCoA及びBuCoAに対する滞留時間は、それぞれ5.8、8.4、9.2及び16.0分であった。注入容量は、5 μL であり、カラム温度は30℃であり、UV吸光度は260nmで監視した。

【0223】

結果は、4つの経路工程の各々の活性を示したが(表7)、活性は、明らかに、遺伝資源、ベクターにおける遺伝子の位置、及びそれが発現される他の遺伝子の状況に依存する。例えば、遺伝子0035は、0008によってコードされるものより活発なコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードし、0036及び0010nは、0009より活発な4-HBデヒドロゲナーゼ遺伝子である。同じオペロン上でそれに先行する別の遺伝子が存在する場合により良好な4-HBデヒドロゲナーゼ活性も存在すると思われる。

【表7】

表7. 4-HB-CoA経路における遺伝子を発現するプラスミドを含むMG1655 lacI^Q由来の細胞抽出液のインビトロ酵素活性。活性は、単位/mgタンパク質で記載した。活性の単位は、1分間に室温で1 μ molの基質を変換するのに必要な酵素量として定義した。

試料番号	pZE13 (a)	pZA33 (b)	OD600	細胞プロット(c)	Cat1	SucD	4HBd	Cat2
1	cat1 (0004)		2.71	6.43	1.232	0.00		
2	cat1 (0004)-sucD (0035)		2.03	5.00	0.761	2.57		
3	cat1 (0004)-sucD (0008)		1.04	3.01	0.783	0.01		
4	sucD (0035)		2.31	6.94		2.32		
5	sucD (0008)		1.10	4.16		0.05		
6		4hbd (0009)	2.81	7.94	0.003		0.25	
7		4hbd (0036)	2.63	7.84			3.31	
8		4hbd (0010n)	2.00	5.08			2.57	
9	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	2.07	5.04	0.600	1.85	0.01	
10	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	2.08	5.40	0.694	1.73	0.41	
11	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	2.44	4.73	0.679	2.28	0.37	
12	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	1.08	3.99	0.572	-0.01	0.02	
13	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0.77	2.60	0.898	-0.01	0.04	
14	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0.63	2.47	0.776	0.00	0.00	
15		cat2 (0034)	2.56	7.86				1.283
16		cat2(0034)-4hbd(0036)	3.13	8.04			24.86	0.993
17		cat2(0034)-4hbd(0010n)	2.38	7.03			7.45	0.675
18		4hbd(0036)-cat2(0034)	2.69	8.26			2.15	7.490
19		4hbd(0010n)-cat2(0034)	2.44	6.59			0.59	4.101

(a) colEI起点及びアンピシリン耐性を有する高複製プラスミドpZE13におけるPlacから発現される遺伝子

(b) pACYC起点及びクロラムフェニコール耐性を有する中複製プラスミドpZA33におけるPlacから発現される遺伝子

(c) mgタンパク質/ml抽出液として与えられた細胞タンパク質

【0224】

次いで、4-HB経路に遺伝子を含む組換え菌株を、中心代謝中間体から4-HBをインビトロで生成する能力について評価した。細胞を約0.4のOD600までLB培地中にて嫌気性条件で成長させ、次いで1mMのIPTGで誘発した。1時間後、コハク酸ナトリウムを10mMまで添加し、さらに24及び48時間後に分析のためにサンプルを採取した。培養肉汁における4-HBを以下に記載されるようにGC-MSによって分析した。それらの結果は、組換え菌株が24時間後に2mMを超える4-HBを生成できるのに対して、対照菌株では実質的に0であることを示している(表8)。

【表 8】

表 8. 4-HB経路遺伝子の各種組合せを発現するプラスミドを含む*E. coli*株におけるコハク酸からの4-HBの産生

試料番号	宿主株	pZE13	pZA33	24 時間			48 時間		
				OD600	4HB, μM	4HB norm. (a)	OD600	4HB, μM	4HB norm. (a)
1	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	0.47	487	1036	1.04	1780	1711
2	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0027)	0.41	111	270	0.99	214	217
3	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	0.47	863	1835	0.48	2152	4484
4	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	0.46	956	2078	0.49	2221	4533
5	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	0.38	493	1296	0.37	1338	3616
6	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0027)	0.32	26	81	0.27	87	323
7	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0.24	506	2108	0.31	1448	4672
8	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0.24	78	324	0.56	233	416
9	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	0.53	656	1237	1.03	1643	1595
10	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0027)	0.44	92	209	0.98	214	218
11	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	0.51	1072	2102	0.97	2358	2431
12	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	0.51	981	1924	0.97	2121	2186
13	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	0.35	407	1162	0.77	1178	1530
14	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0027)	0.51	19	36	1.07	50	47
15	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0.35	584	1669	0.78	1350	1731
16	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0.32	74	232	0.82	232	283
17	MG1655 lacIq	ベクターのみ	ベクターのみ	0.8	1	2	1.44	3	2
18	MG1655 lacIq gabD	ベクターのみ	ベクターのみ	0.89	1	2	1.41	7	5

(a) 規格化した4-BH濃度、 $\mu\text{M}/\text{OD600}$ 単位

【0 2 2 5】

CoAトランスフェラーゼ(cat1)を使用して、コハク酸からスクシニル-CoAを生成することに対する別法は、スクシニル-CoAシンターゼをコードする原生大腸菌sucCD遺伝子を使用することである。この遺伝子集団を、4-HBに対する残りの工程のための候補遺伝子とともにpZE13上に複製して、pZE13-0038-0035-0036を生成した。

【0 2 2 6】

(グルコースからの4-HBの生成)

上記実験は、中心代謝中間体(コハク酸)から4-HBへの機能的経路を実証しているが、工業的方法では、グルコース又はスクロースなどの低コスト炭水化物からの化学物質の生成が必要になる。したがって、次の実験群は、グルコース上での成長時に細胞によって生成された内因性コハク酸が、4-HB経路を供給し得るかどうかを判断することを目的とした。20g/Lのグルコース、緩衝能力を向上させるための100mMの3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のチアミン及び適切な抗生物質が補給されたM9最小培地(6.78g/Lの Na_2HPO_4 、3.0g/Lの KH_2PO_4 、0.5g/Lの NaCl 、1.0g/Lの NH_4Cl 、1mMの MgSO_4 、0.1mMの CaCl_2)にて嫌気性条件で細胞を成長させた。OD600が約0.2に達すると0.25mMのIPTGを添加し、誘発後24時間毎に4-HB分析のためにサンプルを採取した。いずれの場合も、最良の菌株において約1mMの最大値で、4-HBが24時間後に安定水準に達した(図3a)のに対して、コハク酸濃度は、上昇し続けた(図3b)。これは、経路へのコハク酸の供給が恐らくは限定的でないこと、及び障害が酵素そのものの活性又はNADH利用能にあり得ることを示している。0.035及び0.036は、明らかに、それぞれCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-HBデヒドロゲナーゼの最良の遺伝子候補である。既知(gabD)又は推定上(aldA)の原生コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の一方又は双方を除外しても性能に対する影響がほとんどなかった。最後に、細胞は、対照より4-HB生成菌株においてはるかに低いODまで成長したことに留意されたい(図3c)。

【0 2 2 7】

グルコースから4-HBの生成のための代替的経路は、 α -ケトグルタル酸を介する。結核菌の α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼの使用(Tianら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:10670-10675(2005))を利用して、 α -ケトグルタル酸からコハク酸セミアルデヒドを直接生成した(図1の工程8)。この遺伝子(0032)がインビボで機能的であることを実証するために、pZA33上の4-HBデヒドロゲナーゼ(遺伝子0036)としてそれを同じ宿主におけるpZE

13上に発現させた。この菌株は、1mMのIPTGによる誘発後の24時間以内に1.0mMを超える4-HBを生成することが可能であった(図4)。この菌株は、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼを発現しないため、スクシニル-CoAを介するコハク酸セミアルデヒドの生成の可能性が排除される。コハク酸セミアルデヒドの生成に関与する原生遺伝子がこの経路で機能し得る可能性もある(図1の工程4及び5)、しかし、pZE13-0032プラスミドが宿主の外に出たときに生成される4-HBの量は無視できる。

【0228】

(4-HBからのBDOの生成)

4-HBからのBDOの生成には、デヒドロゲナーゼによって触媒される2つの還元工程が必要であった。アルコール及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ(それぞれADH及びALD)は、ともに分子上のカルボン酸基をアルコール基に還元できる、又は逆にアルコールのカルボン酸への酸化を実施できるNAD⁺/H及び/又はNADP⁺/H依存性酵素である。この生体内変換は、野生型クロストリジウム・アセトブチリクムにおいて実証されたが(Jewellら、Current Microbiology、13:215-19(1986))、関与する酵素も関与する遺伝子も特定されなかった。加えて、4-HB-CoAに対する活性化が最初に必要であるかどうか(図1の工程9)、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼ(工程12)が4-HBに対して直接作用できるかどうか把握されていない。本発明者らは、4-HB及び経路中間体に対する非ヒドロキシル化類似体による既知の活性に基づいて、又はこれらの特徴づけられた遺伝子に対する類似性により、C. アセトブチリクム及び関連生物体からの候補酵素の一覧を作成した(表6)。これらの候補の一部は多官能価デヒドロゲナーゼであるため、それらは、潜在的に酸(又はCoA誘導体)のアルデヒドへの、且つアルデヒドのアルコールへのNAD(P)H依存性還元の両方を触媒する。大腸菌におけるこれらの遺伝子を用いた研究を開始する前に、C. アセトブチリクムATCC824を使用して、上記の結果を最初に検証した。30℃にて10%CO₂、10%H₂及び80%N₂の嫌気性雰囲気中で、10mMの4-HBが補給されたSchaeidler肉汁(Accumedia、ミシガン州Lansing)で細胞を成長させた。定期的な培養サンプルを採取し、遠心し、以下に記載されるように肉汁をGC-MSによってBDOについて分析した。0.1mM、0.9mM及び1.5mMのBDO濃度をそれぞれ1日後、2日後及び7日後に検出した。4-HBを添加せずに成長した培養物にはBDOが検出されなかった。生成されたBDOがグルコースから誘導されることを実証するために、最良のBDO生成菌株MG1655lacI^QpZE13-0004-0035-0002pZA33-0034-0036を、4g/Lの均一標識¹³C-グルコースが補給されたM9最小培地で成長させた。細胞を1mMのIPTGで0.67のODにおいて誘発し、サンプルを24時間後に採取した。培養上澄みの分析を質量分析によって実施した。

【0229】

次に、4-HBからBDOの変換経路のための遺伝子候補を、大腸菌宿主MG1655lacI^Qに発現させたときの活性について試験した。pZA33に発現させた各遺伝子を含む組換え菌株を、37℃にて4時間にわたって0.25mMのIPTGの存在下で成長させて、酵素の発現を十分に誘導した。誘発の4時間後、細胞を収穫し、上記のようにADH及びALD活性についてアッセイした。4-HB-CoA及び4-ヒドロキシブチルアルデヒドは商業的に入手可能でないため、非ヒドロキシル化基質を使用してアッセイを実施した(表9)。C. アセトブチリクムadhE2(2002)及び大腸菌adhE(0011)についての4炭素基質と2炭素基質との活性の比は、文献(Atsumiら、Biochem. Biophys. Acta. 1207-1-11(1994))に既に報告されているものと同様であった。

【表 9】

表 9. アルデヒド及びアルコールデヒドロゲナーゼの遺伝子候補を発現するpZA33を含むMG1655 $lacI^Q$ 由来の細胞抽出液のインビトロ酵素活性。活性を、 $\mu\text{mol分}^{-1}$ 細胞タンパク質 $^{-1}$ で表す。N.D., 決定せず。

遺伝子	基質	アルデヒドデヒドロゲナーゼ		アルコールデヒドロゲナーゼ	
		ブチリル-CoA	アセチル-CoA	ブチルアルデヒド	アセトアルデヒド
0002		0.0076	0.0046	0.0264	0.0247
0003n		0.0060	0.0072	0.0080	0.0075
0011		0.0069	0.0095	0.0265	0.0093
0013		N.D.	N.D.	0.0130	0.0142
0023		0.0089	0.0137	0.0178	0.0235
0025		0	0.0001	N.D.	N.D.
0026		0	0.0005	0.0024	0.0008

10

【0 2 3 0】

BDO生成実験では、ポルフィロモナス・ギンギバリスW83(遺伝子0034)からのcat2を、4-HBの4-HB-CoAへの変換のためにpZA33上に含め、候補デヒドロゲナーゼ遺伝子をpZE13上に発現させた。宿主菌株は、MG1655 $lacI^Q$ であった。アルコール及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ候補とともに、基質の類似性により、この工程で機能するCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(sucD)の能力をも試験した。細胞を、10mMの4-HBが補給されたLB培地中で約0.5のODまで成長させ、1mMのIPTGで誘発し、24時間後に培養肉汁を採取し、以下に記載されるようにBDOについて分析した。C. アセトブチリクムのadhE2、C. クルイベリのsucD又はP. ギンギバリスのsucDを使用すると最良のBDO生成が生じた(図5)。興味深いことに、生成されたBDOの絶対量は、好気性条件下の方が大きかった。しかし、これは、主として、嫌気性培養物においてより低い細胞密度が達成されたことによる。細胞ODに対して正規化すると、単位バイオマス当たりのBDO生成量は、嫌気性条件下の方が大きい(表10)。

20

【表 10】

表 10. *C. アセトブチリクム* 由来 *adhE2*, *C. クルイベリ* 由来 *sucD*, 又は *P. ギンギバリス* 由来 *sucD* (図3の実験2、9及び10からのデータ) を発現する細胞の培養液、並びにネガティブコントロール(実験1)からの絶対的及び規格化BDO濃度

発現された遺伝子	条件	BDO (μM)	OD (600nm)	BDO/OD
なし	好気性	0	13.4	0
なし	微好気性	0.5	6.7	0.09
なし	嫌気性	2.2	1.26	1.75
0002	好気性	138.3	9.12	15.2
0002	微好気性	48.2	5.52	8.73
0002	嫌気性	54.7	1.35	40.5
0008n	好気性	255.8	5.37	47.6
0008n	微好気性	127.9	3.05	41.9
0008n	嫌気性	60.8	0.62	98.1
0035	好気性	21.3	14.0	1.52
0035	微好気性	13.1	4.14	3.16
0035	嫌気性	21.3	1.06	20.1

【0231】

上述のように、副産物として酢酸を生成しない、4-HBを4-HB-CoAに変換するための経路を使用することが有利であり得る。この目的で、図1の工程10及び11を介してこの変換を実施するための*C. アセトブチリクム*のホスホトランスブチラーゼ(*ptb*)及び酪酸キナーゼ(*bk*)の使用を試験した。*C. アセトブチリクム*の原生*ptb/bk*オペロン(遺伝子0020及び0021)を複製し、pZA33に発現させた。得られた構造体を含む細胞の抽出物を採取し、2つの酵素活性についてアッセイした。BKの比活性は約65U/mgであり、PTBの比活性は約5U/mgであった。活性の一単位(U)は、室温における1分間の1μMの基質の変換率と定義される。最後に、構造体を4-HBのBDOへの変換への関与について試験した。宿主菌株を上記pZA33-0020-0021構造体及びpZE13-0002で変換し、以上の図5に使用された好気性手順を使用するBDO生成における*cat2*の使用と比較した。BK/PTB菌株は、*cat2*を使用した場合に2mMであるのに対して1mMのBDOを生成した(表11)。興味深いことに、それらの結果は、宿主菌株が原生*adhE*遺伝子の欠失を含むかどうかによって左右されていた。

10

20

30

【表 1 1】

表 11. *P. ギンギバリス*(0034)由来cat2とともにpZE13における*C. アセトブチリクム*由来*adhE2*、又はpZA33における*C. アセトブチリクム*由来PTB/BK遺伝子を発現する、細胞の培養液からの絶対的及び規格化BDO濃度。宿主株は、MG1655 lacI^Q、又はMG1655 Δ*adhE* lacI^Qである。

遺伝子	宿主株	BDO (μM)	OD (600nm)	BDO/OD
0034	MG1655 lacI ^Q	0.827	19.9	0.042
0020+0021	MG1655 lacI ^Q	0.007	9.8	0.0007
0034	MG1655 Δ <i>adhE</i> lacI ^Q	2.084	12.5	0.166
0020+0021	MG1655 Δ <i>adhE</i> lacI ^Q	0.975	18.8	0.052

10

【0 2 3 2】

(グルコースからのBDOの生成)

経路確認の最終工程は、大腸菌における経路の4-HB及びBDO部分の両方を発現し、グルコース最小培地におけるBDOの生成を実証することである。すべての必要な遺伝子が2つのプラスミドに適合するように新たなプラスミドを構築した。概して、cat1、adhE及びsucD遺伝子をpZE13から発現させ、cat2及び4-HBdをpZA33から発現させた。遺伝子源及び遺伝子順序の様々な組合せをMG1655lacI^Qバックグラウンドで試験した。20g/Lのグルコース、緩衝能力を向上させるための100mMの3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、10 μg/mLのチアミン及び適切な抗生物質が補給されたM9最小培地(6.78g/LのNa₂HPO₄、3.0g/LのKH₂PO₄、0.5g/LのNaCl、1.0g/LのNH₄Cl、1mMのMgSO₄、0.1mMのCaCl₂)にて嫌気性条件で細胞を成長させた。摂取の約15時間後に0.25mMのIPTGを添加し、BDO、4-HBについて培養上澄みサンプルを採取し、誘発の24及び48時間後にコハク酸分析を行った。BDOの生成量は、遺伝子順序への依存性を示すように思われた(表12)。pZA33上に最初にcat2を発現させた後に4-HBdを発現させ、pZE13上にcat1を発現させた後に*P. ギンギバリス* sucDを発現させると、0.5mMを超える最大のBDO生成量が得られた。*C. アセトブチリクム* ashE2をpZE13上の最後の位置に添加すると、わずかな向上がもたらされた。4-HB及びコハク酸もより高い濃度で生成された。

20

30

【表 1 2】

表 12. 20 g/Lグルコースで補充した最小培地で成長させた、BDO経路遺伝子の組合せを発現する組換え*E* コリ 株におけるBDO、4-HB、及びコハク酸の産生。濃度は、mMである。

試料	pZE13	pZA33	導入 OD	24 時間				48 時間			
				OD600nm	Su	4HB	BDO	OD600nm	Su	4HB	BDO
1	cat1(0004)-sucD(0035)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.92	1.29	5.44	1.37	0.240	1.24	6.42	1.49	0.280
2	cat1(0004)-sucD(0008N)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.36	1.11	6.90	1.24	0.011	1.06	7.63	1.33	0.011
3	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0035)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.20	0.44	0.34	1.84	0.050	0.60	1.93	2.67	0.119
4	cat1(0004)-sucD(0035)-adhE(0002)	4hbd (0036)-cat2(0034)	1.31	1.90	9.02	0.73	0.073	1.95	9.73	0.82	0.077
5	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0008N)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.17	0.45	1.04	1.04	0.008	0.94	7.13	1.02	0.017
6	cat1(0004)-sucD(0008N)-adhE(0002)	4hbd (0036)-cat2(0034)	1.30	1.77	10.47	0.25	0.004	1.80	11.49	0.28	0.003
7	cat1(0004)-sucD(0035)	cat2(0034)-4hbd(0036)	1.09	1.29	5.63	2.15	0.461	1.38	6.66	2.30	0.520
8	cat1(0004)-sucD(0008N)	cat2(0034)-4hbd(0036)	1.81	2.01	11.28	0.02	0.000	2.24	11.13	0.02	0.000
9	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0035)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0.24	1.99	2.02	2.32	0.106	0.89	4.85	2.41	0.186
10	cat1(0004)-sucD(0035)-adhE(0002)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0.98	1.17	5.30	2.08	0.569	1.33	6.15	2.14	0.640
11	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0008N)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0.20	0.53	1.38	2.30	0.019	0.91	8.10	1.49	0.034
12	cat1(0004)-sucD(0008N)-adhE(0002)	cat2(0034)-4hbd(0036)	2.14	2.73	12.07	0.16	0.000	3.10	11.79	0.17	0.002
13	ベクターのみ	ベクターのみ	2.11	2.62	9.03	0.01	0.000	3.00	12.05	0.01	0.000

40

【0 2 3 3】

(GCMSによるBDO、4-HB及びコハク酸の分析)

発酵及び細胞培養サンプルにおけるBDO、4-HB及びコハク酸をシリル化によって誘導体化し、文献報告から採用された方法(Simonovら、J. Anal Chem. 59:965-971(2004))を使

50

用してGCMSにより定量分析した。開発された方法は、1 μ Mまでの良好な感度、少なくとも25mMまでの直線性、並びに優れた選択性及び再現性を示した。

【0234】

サンプル調製を以下のように実施した。100 μ Lの濾過(0.2 μ m又は0.45 μ mシリンジフィルタ)サンプル、例えば発酵肉汁、細胞培養物又は標準溶液をスピード・バク・コンセンレータ(Savant SVC-100H)にて室温で約1時間にわたって乾燥させた後、ジメチルホルムアミド中内部標準としての20 μ Lの10mMシクロヘキサノール溶液を添加した。混合物を、均質になるように、水浴(Branson 3510)にて15分間にわたって渦攪拌及び音波処理した。100 μ Lのシリル化誘導体化試薬、即ち1%トリメチルクロロシランを含むN,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロ-アセトイミド(BSTFA)を添加し、混合物を70℃で30分間インキュベートした。誘導体化サンプルを5分間にわたって遠心し、透明溶液をGCMSに直接注入した。すべての化学物質及び試薬は、J. T. Bakerから購入したBDOを除いて、Sigma-Aldrichからのものであった。

10

【0235】

GCMSを、電子衝撃イオン化(EI)モードで動作される質量選択性検出器(MSD)5973Nにインターフェース連結されたAgilentガスクロマトグラフ6890Nで実施されるGCMSを分析に使用した。30m $\times$ 0.25mm(内径) $\times$ 0.25 μ m(膜厚)のDB-5MS毛管カラム(J&W Scientific、Agilent Technologies)を使用した。20:1の分割比で1 μ Lのサンプルを導入する分割注入モードでGCを動作させた。注入ポート温度は、250℃であった。ヘリウムをキャリアガスとして使用し、流量を1.0mL/分に維持した。対象となる分析物の良好な分解能及び最小のマトリックス干渉を確保するように、温度勾配プログラムを最適化した。オーブンを最初に1分間にわたって80℃に保持し、次いで2℃/分で120℃まで昇温させた後、100℃/分で320℃まで高速昇温させ、最終的に6分間にわたって320℃に保持した。MSインターフェース転送ラインを280℃に維持した。「小質量」MS同調設定及び30~400m/z質量範囲走査を使用するデータを取得した。全分析時間は、3分間の溶媒遅延を含む29分間であった。滞留時間は、BSTFA誘導体化シクロヘキサノール、BDO、4-HB及びコハク酸に対してそれぞれ5.2、10.5、14.0及び18.2分に対応する。定量分析では、以下の比質量フラグメントを選択した(抽出イオンクロマトグラム)。m/zを内部標準シクロヘキサノールに対して157、BDOに対して116、4-HB及びコハク酸の両方に対して147とした。サンプルマトリックスをできるだけ調和させるために、対応する細胞培養又は発酵培地に分析物溶液を使用して、標準検量線を作成した。環境データ分析ChemStationソフトウェア(Agilent Technologies)を使用してGCMSデータを処理した。

20

30

【0236】

それらの結果は、生成された4-HB及びBDOのほとんどが¹³Cで標識されていることを示していた(図6、右側)。非標識グルコースで成長された並行培養物からの質量スペクトルを比較のために示す(図6、左側)。認められるピークは、代謝物質からの異なる数の炭素原子を含む誘導体化分子のフラグメントに対するものであることに留意されたい。誘導体化試薬は、天然標識分布するいくつかの炭素及び珪素原子をも与えるため、結果は、厳密に定量的でない。

【0237】

(代替的経路を使用する4-HBからのBDOの生成)

また、様々な代替的経路をBDO生成について試験した。これは、コハク酸をスクシニル-CoA(表13、第2~3列)に変換する原生大腸菌SucCD酵素の使用、 α -ケトグルタル酸経路における α -ケトグルタル酸デカルボキシラーゼの使用(表13、第4列)、及び4HBのCoA誘導体を生成するための代替的手段としてのPTB/BKの使用を含む。これらの変異体を包含する、表13に示される遺伝子を発現するプラスミドを含む菌株を構築した。それらの結果は、すべての場合において、4-HB及びBDOの生成が生じたことを示している(表13)。

40

【表 1 3】

表 13. 20 g/Lグルコースで補充した最小培地で嫌氣的に成長させ、かつ0.1 mM IPTG 導入の24時間後に集菌した、種々のBDO経路変異のための組換え*E. coli*株遺伝子における BDO、4-HB、及びコハク酸の産生。濃度は、mMである。

pZE13の遺伝子	pZA33の遺伝子	コハク酸	4-HB	BDO
0002+0004+0035	0020n-0021n-0036	0.336	2.91	0.230
0038+0035	0034-0036	0.814	2.81	0.126
0038+0035	0036-0034	0.741	2.57	0.114
0035+0032	0034-0036	5.01	0.538	0.154

10

【0 2 3 8】

(実施例III)

(4-ヒドロキシブタン酸、 γ -ブチロラクトン及び1,4-ブタンジオールの生合成)

本実施例では、発酵及び他のバイオプロセスを使用する4-ヒドロキシブタン酸、 γ -ブチロラクトン及び1,4-ブタンジオールの生合成生成について記載する。

20

【0 2 3 9】

4-HB発酵工程を、精製GBL、1,4-ブタンジオール(BDO)及びテトラヒドロフラン(THF)を生成するための完全なプロセスに統合するための方法を以下に記載する。4-HB及びGBLは平衡であるため、発酵肉汁は、両化合物を含むことになる。低いpHにおいて、この平衡は、GBLに有利になるようにシフトする。したがって、発酵は、pH7.5以下、一般にはpH5.5以下で作用することができる。バイオマスの除去後、生成物の流れは、GBLを除去し、4-HBが豊富な残留流れをリサイクルする分離工程に入る。最後に、GBLを蒸留して、あらゆる不純物を除去する。該プロセスは、3つの方法:1)流加発酵及びバッチ分離;2)流加発酵及び連続分離;3)連続発酵及び連続分離の1つで作用する。これらの方式の最初の2つを図7に概略的に示す。以下に記載される統合発酵手順は、また、BDO及び後続のBDO系統の生成物の生合成のための本発明のBDO生成細胞に使用される。

30

【0 2 4 0】

(4-HB/GBLを生成するための発酵プロトコル(バッチ))

5g/Lのリン酸カリウム、2.5g/Lの塩化アンモニウム、0.5g/Lの硫酸マグネシウム及び30 g/Lのコーンステープリッカーを含む5Lの肉汁並びに20g/Lの初期グルコース濃度を使用して、N₂/CO₂混合物が散布された10Lバイオリアクターにて生成生物体を成長させる。細胞が成長し、グルコースを利用すると、さらなる70%のグルコースを、グルコース消費量をほぼ均衡化させる速度でバイオリアクターに供給する。バイオリアクターの温度を摂氏30度に維持する。4-HBが20~200g/Lの濃度に達し、細胞密度が5から10g/Lになるまで成長を約24時間続ける。pHは制御されず、典型的には実験の終了時までpH3~6まで低下することになる。培養時間が終了すると、発酵槽内容物を細胞分離ユニット(例えば遠心器)に通して、細胞及び細胞細片を除去し、発酵肉汁を生成物分離ユニットに移す。4-HB/GBLの有機溶液を得るために、不水溶性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準分離手順によって、4-HB及び/又はGBLの単離を行うことになる。次いで、得られた溶液に標準的な蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離されるGBL(沸点204~205°C)を得る。

40

【0 2 4 1】

(4-HB/GBLを生成するための発酵プロトコル(完全連続))

初期グルコース濃度を30~50g/Lにすることを除いては、上記の装置及び培地組成を使

50

用して生成生物体を最初にバッチ方式で成長させる。グルコースを使い果たすと、同じ組成の供給培地を0.5L/時及び1L/時の速度で連続的に供給し、液体を同じ速度で回収する。バイオリアクターにおける4-HB濃度を30～40g/Lの一定値に維持し、細胞密度を3～5g/Lの一定値に維持する。温度を摂氏30度に維持し、必要に応じて濃NaOH及びHClを使用してpHを4.5に維持する。バイオリアクターを1ヶ月間にわたって連続的に動作させ、4-HBの濃度の一貫性を確認するためにサンプルを毎日採取する。連続方式では、新たな供給培地が供給される毎に発酵槽内容物を除去する。次いで、細胞、培地並びに生成物4-HB及び/又はGBLを含む排出流に、細胞及び細胞細片を除去する、又は除去しない連続生成物分離手順を施し、4-HB/GBLの有機溶液を得るために、不水溶性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する連続液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準分離手順によって行うことになる。続いて、得られた溶液に標準連続蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離されるGBL(沸点204～205℃)を得る。

10

【0242】

(GBL還元プロトコル)

BLを上記のように単離及び精製すると、それに当該技術分野で周知のもの(引用参考文献)などの還元プロトコルを施して、1,4-ブタンジオール又はテトラヒドロフラン(THF)或いはそれらの混合物を生成する。水素圧下でGBLと組み合わされた異種又は同種水素化触媒は、生成物1,4-ブタンジオール又はテトラヒドロフラン(THF)又はそれらの混合物を与えることが周知である。GBL単離及び精製の前に、上記のように発酵肉汁から分離された4-HB/GBL生成物混合物にこれらの同じ還元プロトコルを直接施して、生成物1,4-ブタンジオール又はテトラヒドロフラン又はそれらの混合物を得ることができる。次いで、得られた生成物の1,4-ブタンジオール及びTHFを、当該技術分野で周知の手順によって単離及び精製する。

20

【0243】

(BDO又はTHFを直接生成するための発酵及び水素化プロトコル(バッチ))

5g/Lのリン酸カリウム、2.5g/Lの塩化アンモニウム、0.5g/Lの硫酸マグネシウム及び30g/Lのコーンステープリッカーを含む5Lの肉汁並びに20g/Lの初期グルコース濃度を使用して、N₂/CO₂混合物が散布された10Lバイオリアクターにて細胞を成長させる。細胞が成長し、グルコースを利用すると、さらなる70%のグルコースを、グルコース消費量をほぼ均衡化させる速度でバイオリアクターに供給する。バイオリアクターの温度を摂氏30度に維持する。4-HBが20～200g/Lの濃度に達し、細胞密度が全般的に5から10g/Lになるまで成長を約24時間続ける。pHは制御されず、典型的には実験の終了時までpH3～6まで低下することになる。培養時間が終了すると、発酵槽内容物を細胞分離ユニット(例えば遠心器)に通して、細胞及び細胞細片を除去し、発酵肉汁を還元ユニット(例えば水素化容器)に移し、そこで4-HB/GBL混合物を1,4-ブタンジオール又はTHF又はそれらの混合物に直接還元する。還元手順の完了後に、反応器内容物を生成物分離ユニットに移す。1,4-ブタンジオール及び/又はTHFの有機溶液を得るために、不水溶性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準分離手順によって、1,4-ブタンジオール及び/又はTHFの単離を行うことになる。次いで、得られた溶液に標準的な蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離される1,4-ブタンジオール及び/又はTHFを得る。

30

40

【0244】

(BDO又はTHFを直接生成するための発酵及び水素化プロトコル(完全連続))

初期グルコース濃度を30～50g/Lにすることを除いては、上記の装置及び培地組成を使用して細胞を最初にバッチ方式で成長させる。グルコースを使い果たすと、同じ組成の供給培地を0.5L/時及び1L/時の速度で連続的に供給し、液体を同じ速度で回収する。バイオリアクターにおける4-HB濃度を30～40g/Lの一定値に維持し、細胞密度を3～5g/Lの一定値に維持する。温度を摂氏30度に維持し、必要に応じて濃NaOH及びHClを使用してpHを4.5に維持する。バイオリアクターを1ヶ月間にわたって連続的に動作させ、4-HBの濃度の一貫

50

性を確認するためにサンプルを毎日採取する。連続方式では、新たな供給培地が供給される毎に発酵槽内容物を除去する。次いで、細胞、培地並びに生成物4-HB及び/又はGBLを含む排出流を細胞分離ユニット(例えば遠心器)に通して、細胞及び細胞細片を除去し、発酵肉汁を連続還元ユニット(例えば水素化容器)に移し、そこで4-HB/GBL混合物を1,4-ブタンジオール又はTHF又はそれらの混合物に直接還元する。還元手順の完了後に、反応器内容物を連続生成物分離ユニットに移す。1,4-ブタンジオール及び/又はTHFの有機溶液を得るために、不水溶性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準連続分離手順によって、1,4-ブタンジオール及び/又はTHFの単離を行うことになる。次いで、得られた溶液に標準的な蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離される1,4-ブタンジオール及び/又はTHFを得る。

10

【0245】

(BDOを直接生成するための発酵プロトコル(バッチ))

5g/Lのリン酸カリウム、2.5g/Lの塩化アンモニウム、0.5g/Lの硫酸マグネシウム及び30g/Lのコーンステープリッカーを含む5Lの肉汁並びに20g/Lの初期グルコース濃度を使用して、N₂/CO₂混合物が散布された10Lバイオリアクターにて生成生物体を成長させる。細胞が成長し、グルコースを利用すると、さらなる70%のグルコースを、グルコース消費量をほぼ均衡化させる速度でバイオリアクターに供給する。バイオリアクターの温度を摂氏30度に維持する。BDOが20~200g/Lの濃度に達し、細胞密度が全般的に5から10g/Lになるまで成長を約24時間続ける。培養時間が終了すると、発酵槽内容物を細胞分離ユニット(例えば遠心器)に通して、細胞及び細胞細片を除去し、発酵肉汁を生成物分離ユニットに移す。BDOの有機溶液を得るために、不水溶性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準分離手順によって、BDOの単離を行うことになる。次いで、得られた溶液に標準的な蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離されるBDO(沸点228~229℃)を得る。

20

【0246】

(BDOを直接生成するための発酵プロトコル(完全連続))

初期グルコース濃度を30~50g/Lにすることを除いては、上記の装置及び培地組成を使用して生成生物体を最初にバッチ方式で成長させる。グルコースを使い果たすと、同じ組成の供給培地を0.5L/時及び1L/時の速度で連続的に供給し、液体を同じ速度で回収する。バイオリアクターにおけるBDO濃度を30~40g/Lの一定値に維持し、細胞密度を3~5g/Lの一定値に維持する。温度を摂氏30度に維持し、必要に応じて濃NaOH及びHClを使用してpHを4.5に維持する。バイオリアクターを1ヶ月間にわたって連続的に動作させ、BDOの濃度の一貫性を確認するためにサンプルを毎日採取する。連続方式では、新たな供給培地が供給される毎に発酵槽内容物を絶えず除去する。次いで、細胞、培地並びに生成物BDOを含む排出流に、細胞及び細胞細片を除去する、又は除去しない連続生成物分離手順を施し、BDOの有機溶液を得るために、不水溶性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する連続液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準分離手順によって行うことになる。続いて、得られた溶液に標準連続蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離されるBDO(沸点228~229℃)を得る(融点20℃)。

30

40

【0247】

(実施例IV)

(例示的なBDO経路)

本実施例では、1,4-ブタンジオール(BDO)合成経路についての例示的な酵素及び対応する遺伝子を記載する。

【0248】

例示的なBDO合成経路を図8~13に示す。図8~13に示される経路は、共通の中心代謝中間体から1,4-ブタンジオールまでである。図8~13に示されるすべての変換は、表14に示

50

される変換の18の一般的範疇に含まれる。各範疇のいくつかの生化学的に特徴づけられた候補遺伝子を以下に記載する。宿主生物体において複製及び発現されると図9～13の適切な変換を触媒するために適用できる遺伝子を具体的に列挙する。図9～13の主要工程の各々についての上から3つの例示的遺伝子を表15～23に示す(以下参照)。図8に示される経路のために提供された例示的な遺伝子は、本明細書に記載されている。

【表 1 4】

表 14. 共通の主要代謝中間体を1,4-ブタンジオールに変換するのに必要な酵素種。各ラベルの最初の3つの数字は、最初の3つの酵素に対応する。コミッション番号の数字は、基質特異性に非依存的な一般的な変換の種類を示す。

ラベル	機能
1.1.1.a	オキシドレダクターゼ(ケトンからヒドロキシル、又はアルデヒドからアルコール)
1.1.1.c	オキシドレダクターゼ(2工程, アシル-CoAからアルコール)
1.2.1.b	オキシドレダクターゼ(アシル-CoAからアルデヒド)
1.2.1.c	オキシドレダクターゼ(2-オキソ酸からアシル-CoA, 脱炭酸)
1.2.1.d	オキシドレダクターゼ(リン酸化/脱リン酸化)
1.3.1.a	オキシドレダクターゼ CH-CH ドナーの開口
1.4.1.a	オキシドレダクターゼ アミノ酸の開口
2.3.1.a	アシルトランスフェラーゼ(リン酸基を転移する)
2.6.1.a	アミノトランスフェラーゼ
2.7.2.a	ホスホトランスフェラーゼ, カルボキシル基アクセプター
2.8.3.a	補酵素-Aトランスフェラーゼ
3.1.2.a	チオールエステルヒドロラーゼ(CoA特異的)
4.1.1.a	カルボキシ-リアーゼ
4.2.1.a	ヒドロ-リアーゼ
4.3.1.a	アンモニア-リアーゼ
5.3.3.a	イソメラーゼ
5.4.3.a	アミノムターゼ
6.2.1.a	酸-チオールリガーゼ

【0 2 4 9】

(1.1.1.a- オキシドレダクターゼ(アルデヒドからアルコール又はケトンからヒドロキシル))

アルデヒドからアルコール、アルデヒドからアルコールの変換を触媒する酵素、即ちアルコールデヒドロゲナーゼ又は同等にアルデヒドレダクターゼをコードする例示的な遺伝子は、C2～C14の中鎖アルコールデヒドロゲナーゼをコードするalrA(Taniら、Appl. Environ. Microbiol. 66:5231-5235(2000))、サッカロマイセス・セレビシアエのADH2(Atsumiら、Nature 451:86-89(2008))、C(3)より長い分子を選択する大腸菌のyqhD(Sulzenbacherら、Journal of Molecular Biology 342:489-502(2004))ブチリアルデヒドをブタノールに変換するC.アセトブチリクムのbdhI及びbdhII(Walterら、Journal of Bacteriology 174:7149-7158(1992))を含む。これらの例示的な遺伝子生成物の各々についてのタンパク質配列を、入手可能であれば、以下のGenBankアクセッション番号を使用して見いだすことができる。

【表 1 5】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>alrA</i>	BAB12273.1	9967138	アシネトバクテル属菌株 M-1
<i>ADH2</i>	NP_014032.1	6323961	サッカロマイセス セレビスシアエ
<i>yqhD</i>	NP_417484.1	16130909	エシェリキア コリ
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	15896543	クロストリジウム アセトブチリウム
<i>bdh II</i>	NP_349891.1	15896542	クロストリジウム アセトブチリウム

【0 2 5 0】

10

4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性を示す酵素(EC 1.1.1.61)もこの範疇に含まれる。当該酵素は、ラルストニア・ユートロファ(Bravoら、J. Forensic Sci 49:379-387(2004))、クロストリジウム・クルイベリ(Wolffら、Protein Expr. Purif. 6:206-212 (1995))及びアラビドプシス・タリアナ(Breitkreuzら、J. Biol. Chem. 278:41552-41556(2003))において特徴づけられた。

【表 1 6】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>4hbd</i>	YP_726053.1	113867564	ラルストニア ユーロファ H16
<i>4hbd</i>	EDK35022.1	146348486	クロストリジウム クルイベリDSM 555
<i>4hbd</i>	Q94B07	75249805	アラビドプシス タリアナ

20

【0 2 5 1】

別の例示的な酵素は、3-ヒドロキシイソ酪酸のメチルマロン酸セミアルデヒドへの可逆的酸化を触媒する3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼである。この酵素は、バリン、ロイシン及びイソロイシン分解に関与し、細菌、真核生物及び哺乳類において特定された。テルムス・テルモフィルスHB8のP84067によってコードされた酵素を構造的に特徴づけた(Lokanathら、J Mol Biol 352:905-17(2005))。同位体標識基質を使用して、ヒト3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼの可逆性を実証した(Manningら、Biochem J 231:481-484(1985))。この酵素をコードするさらなる遺伝子は、ホモサピエンス(Hawesら、Methods Enzymol. 324:218-228(2000))及びオリクトラガス・クニクルス(Chowdhuryら、Biosci. Biotechnol Biochem. 60:2043-2047(1996); Hawesら、Methods Enzymol. 324:218-228(2000))の3hidh、シュードモナス・アエルギノサのmmsb及びシュードモナス・ブチダ(Aberhartら、J Chem. Soc. [Perkin 1] 6:1404-1406(1979); Chowdhuryら、Biosci. Biotechnol Biochem. 67:438-441(2003); Chowdhuryら、Biosci. Biotechnol Biochem. 60:2043-2047(1996))のdhatを含む。

30

【表 1 7】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>P84067</i>	P84067	75345323	テルムス テルモフィルス
<i>mmsb</i>	P28811.1	127211	シュードモナス アエルギノサ
<i>dhat</i>	Q59477.1	2842618	シュードモナス ブチダ
<i>3hidh</i>	P31937.2	12643395	ホモ サピエンス
<i>3hidh</i>	P32185.1	416872	オリクトラガス クニクルス

40

【0 2 5 2】

いくつかの3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ酵素は、また、マロン酸セミアルデヒドを3-ヒドロキシプロピオン酸(3-HP)に変換することが証明された。この活性を示す3つの遺伝子候補は、シュードモナス・アエルギノサPA01(62)のmms β 、シュードモナス・

50

プチダKT2440(Liaoら、US Publication 2005/0221466)のmms β 及びシュードモナス・プチダE23(Chowdhuryら、Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:2043-2047(1996))のmms β である。アルカリゲネス・ファエカリス(*Alcaligenes faecalis*)M3Aにおける3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素も特定された(Gokamら、米国特許第7,393,676号;Liaoら、米国公開第2005/0221466号)。ロドバクテル・スパエロイデスを含む他の生物体からのさらなる遺伝子候補を配列類似性によって推定することができる。

【表 18】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>mmsB</i>	AAA25892.1	151363	シュードモナス アエルギノサ
<i>mmsB</i>	NP_252259.1	15598765	シュードモナス アエルギノサ PAO1
<i>mmsB</i>	NP_746775.1	26991350	シュードモナス プチダ KT2440
<i>mmsB</i>	JC7926	60729613	シュードモナス プチダ E23
<i>orfB1</i>	AAL26884	16588720	ロドバクテル スパエロイデス

10

【0253】

マロン酸セミアルデヒドの3-HPへの変換を2つの他の酵素:NADH依存性3-ヒドロキシプロピオン酸デヒドロゲナーゼ及びNADPH依存性マロン酸セミアルデヒドレダクターゼによって実施することもできる。NADH依存性3-ヒドロキシプロピオン酸デヒドロゲナーゼは、細菌及び植物におけるプロピオン酸からのベータ-アラニン生合成経路に関与すると考えられる(Rathinasabapathi、B. Journal of Plant Pathology 159:671-674(2002);Stadtman, E. R. J. Am. Chem. Soc. 77:5765-5766(1955))。この酵素は、今日まで生物体における遺伝子と対応づけられなかった。NADPH依存性マロン酸セミアルデヒドレダクターゼは、独立栄養性CO₂固定細菌における逆反応を触媒する。酵素活性は、メタロスファエラ・セデュラにおいて検出されたが、遺伝子の特異性は把握されていない(Alberら、J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006))。

20

【0254】

ケトンからヒドロキシル・ケトンヒドロキシル官能基に変換するいくつかの例示的なアルコールデヒドロゲナーゼが存在する。大腸菌の2つの当該酵素をリンゴ酸デヒドロゲナーゼ(mdh)及び乳酸デヒドロゲナーゼ(ldhA)によってコードする。加えて、ラルストニア・ユートロファの乳酸デヒドロゲナーゼは、乳酸、2-オキソ酪酸、2-オキソペンタン酸及び2-オキソグルタル酸などの様々な鎖長の基質に対して高度な活性を示すことが証明された(Steinbuchel, A. 及び H. G. Schlegel Eur. J. Biochem. 130:329-334(1983))。アルファ-ケトアジピン酸のアルファ-ヒドロキシアジピン酸への変換を、ラット及びヒト胎盤に見いだされることが報告された酵素である2-ケトアジピン酸レダクターゼによって触媒することができる(Sudaら、Arch. Biochem. Biophys. 176:610-620(1976);Sudaら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 77:586-591(1977))。この工程のためのさらなる候補は、複製され、特徴づけられたヒト心臓のミトコンドリア3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(bdh)である(Marksら、J. Biol. Chem. 267:15459-15463(1992))。この酵素は、3-ヒドロキシ酸に対して作用するデヒドロゲナーゼである。別の例示的なアルコールデヒドロゲナーゼは、C. ベイジェリンクキー(*beijerinckii*)において示されたように、アセトンをイソプロパノールに変換する(Ismailら、J. Bacteriol. 175:5097-5105(1993))及びT. brockii(Lamedら、Biochem. J. 195:183-190(1981);Peretz及びBurstein Biochemistry 28:6549-6555(1989))。

30

40

【表 19】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>mdh</i>	AAC76268.1	1789632	エシェリキア コリ
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	16129341	エシェリキア コリ
<i>ldh</i>	YP_725182.1	113866693	ラルストニア ユーロファ
<i>bdh</i>	AAA58352.1	177198	ホモ サピエンス
<i>adh</i>	AAA23199.2	60592974	クロストリジウム ベイジェリンクキー NRRL B593
<i>adh</i>	P14941.1	113443	テルモアナエロバクテル ブロッキー HTD4

10

【0255】

アセトアセチル-CoAを3-ヒドロキシブチリル-CoAに変換する例示的な3-ヒドロキシアシルデヒドロゲナーゼは、C. アセトブチリウム (Boyntonら、Journal of Bacteriology 178: 3015-3024(1996))の*hbd*、C. ベイジェリンクキー (Colbyら、Appl Environ. Microbiol 58:3 297-3302(1992))の*hbd*及びメタロファエラ・セデュラ (Bergら、Archaea. Science. 318:1 782-1786(2007))のいくつかの類似酵素を含む。

【表 20】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>hbd</i>	NP_349314.1	15895965	クロストリジウム アセトブチリウム
<i>hbd</i>	AAM14586.1	20162442	クロストリジウム ベイジェリンクキー
<i>Msed_1423</i>	YP_001191505	146304189	メタロファエラ セデュラ
<i>Msed_0399</i>	YP_001190500	146303184	メタロファエラ セデュラ
<i>Msed_0389</i>	YP_001190490	146303174	メタロファエラ セデュラ
<i>Msed_1993</i>	YP_001192057	146304741	メタロファエラ セデュラ

20

【0256】

(1.1.1.c- オキシドレダクターゼ(2工程、アシル-CoAからアルコール))

アシル-CoAをアルコールに変換する例示的な2工程オキシドレダクターゼは、基質を変換するもの、例えば、アセチル-CoAをエタノールに変換するもの(例えば、大腸菌の*adhE* (Kesskerら、FEBS. Lett. 281:59-63(1991))及びブチリル-CoAをブタノールに変換するもの(例えば、C. アセトブチリウムの*adhE2* (Fontaineら、J. Bacteriol. 184:821-830(2002))を含む。アセチル-CoAをエタノールに還元することに加えて、ロイコノストク・メセンテロイデスにおける*adhE*によってコードされる酵素は、分枝鎖化合物イソブチルアルデヒドをイソブチリル-CoAに酸化することが証明された(Kazahayaら、J. Gen. Appl. Microbiol. 18:43-55(1972); Kooら、Biotechnol Lett. 27:505-510(2005))。

30

【表 21】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>adhE</i>	NP_415757.1	16129202	エシェリキア コリ
<i>adhE2</i>	AAK09379.1	12958626	クロストリジウム アセトブチリウム
<i>adhE</i>	AAV66076.1	AAV66076	ロイコノストク メセンテロイデス

40

【0257】

別の例示的な酵素は、マロニル-CoAを3-HPに変換することができる。この活性を有するNADPH依存性酵素は、それが3-ヒドロキシプロピオン酸回路に参与するクロロフレクサス・アウランチクスにおいて特徴づけられた(Huglerら、J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002)); Strauss及びFuchs、Eur. J. Biochem. 215:633-643(1993))。300kDaの質量を有するこの酵素は、基質特異性が高く、他の既知のオキシドレダクターゼとの配列類似性をほとんど示さない(Huglerら、J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002))。他の生物体におけるどの酵

50

素もこの特異的反応を触媒することが示されなかった。しかし、他の生体が類似の経路を有し得る生命情報科学的証拠が存在する(Klattら、Environ. Microbiol. 9:2067-2078(2007))。ロセイフレクス・カステンホルジー(*Roseiflexus castenholzii*)、エリトロバクテル(*Erythrobacter*)属NAP1及びマリガンマプロテオバクテリアHTCC2080を含む他の生体の酵素候補を配列類似性によって推定することができる。

【表 2 2】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>mcr</i>	AAS20429.1	42561982	クロフレクスウス アウランチアクス
<i>Rcas_2929</i>	YP_001433009.1	156742880	ロセイフレクスウス カステンホルジー
<i>NAP1_02720</i>	ZP_01039179.1	85708113	エリトロバクテル属 <i>NAP1</i>
<i>MGP2080_00535</i>	ZP_01626393.1	119504313	マリガンマ プロテオバクテリア HTCC2080

10

【 0 2 5 8 】

より長い鎖アシル-CoA分子を、アルコール形成脂肪酸-CoAレダクターゼをコードするホバ(シモンドシア・キネンシス)FARなどの酵素によって還元することができる。大腸菌におけるその過剰発現は、FAR活性及び脂肪酸の蓄積をもたらした(Metzら、Plant Physiology 122:635-644(2000))。

【表 2 3】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>FAR</i>	AAD38039.1	5020215	シモンドシア キネンシス

20

30

【 0 2 5 9 】

(1.2.1.b- オキシドレダクターゼ(アシル-CoAからアルデヒド))

いくつかのアシル-CoAデヒドロゲナーゼは、アシル-CoAを、その対応するアルデヒドに還元することが可能である。当該酵素をコードする例示的な遺伝子は、脂肪アシル-CoAレダクターゼをコードするアシネトバクテル・カルコアセチクス(*Acinetobacter calcoaceticus*)acr1(Reiser及びSomerville、J. Bacteriology 179:2969-2975(1997))、アシネトバクテル属M-1脂肪アシル-CoAレダクターゼ(Ishigeら、Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195(2002))、並びにクロストリジウム・クルイベリにおけるsucD遺伝子によってコードされるCoA及びNADP依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(Sohling及びGottschalk J Bacteriol 178:871-80(1996);Sohling及びGottschalk J Bacteriol. 178:871-880 (1996))を含む。P. ギンギバリスのSucDは、別のコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼである(Takahashiら、J. Bacteriol. 182:4704-4710 (2000))。bphGによってコード化される、シュードモナス属におけるアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼをアシル化する酵素は、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド及びホルムアルデヒドを酸化及びアシル化することが証明されたため、さらに別の酵素である(Powlowskiら、J Bacteriol. 175:377-385(1993))。

40

【表 2 4】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>acr1</i>	YP_047869.1	50086359	アシネトバクテル カルコアセチクス
<i>acr1</i>	AAC45217	1684886	アシネトバクテル バイリイ
<i>acr1</i>	BAB85476.1	18857901	アシネトバクテル属 菌株 M-1
<i>sucD</i>	P38947.1	730847	クロストリジウム クレイベリ
<i>sucD</i>	NP_904963.1	34540484	ポルフィロモナス ギンギバリス
<i>bphG</i>	BAA03892.1	425213	シュードモナス属

10

【0 2 6 0】

アシル-CoAをその対応するアルデヒドに変換するさらなる酵素型は、マロニル-CoAをマロン酸セミアルデヒドに変換するマロニル-CoAレダクターゼである。マロニル-CoAレダクターゼは、好熱酸性古細菌における3-ヒドロキシプロピオン酸回路を介する独立栄養性炭素固定における主要酵素である(Bergら、Science 318:1782-1786 (2007);Thauer, R. K. Science 318:1732-1733 (2007))。酵素は、NADPHを共同因子として利用し、メタロスファエラ及びスルホロブス属において特徴づけられた(Alberら、J.Bacteriol. 188:8551-8559 (2006);Huglerら、J.Bacteriol. 184:2404-2410(2002))。該酵素は、メタロスファエラ・セデュラにおけるMsed_0709によってコードされる(Alberら、J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006);Bergら、Science 318:1782-1786(2007))。スルホロブス・トコダイのマロニル-CoAをコードする遺伝子を複製し、大腸菌に非相同的に発現させた(Alberら、J.Bacteriol. 188:8551-8559 (2006))。これらの酵素のアルデヒドデヒドロゲナーゼ機能性は、クロロフレクサス・アウランチアクスの二機能性デヒドロゲナーゼに類似するが、配列類似性がほとんどない。両マロニル-CoAレダクターゼ酵素候補は、アスパルチル-4-リン酸のアスパラギン酸セミアルデヒドへの還元及び同時脱リン酸化を触媒する酵素であるアスパラギン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼとの高度な類似性を有する。スルホロブス・ソルファタリクス及びスルホロブス・アシドカルダリウスを含む他の生物体におけるタンパク質に対する配列相同性によってさらなる遺伝子候補を見いだすことができる。

20

30

【表 2 5】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	メタロスファエラ セデュラ
<i>mcr</i>	NP_378167.1	15922498	スルホロブス トコダイ
<i>asd-2</i>	NP_343563.1	15898958	スルホロブス ソルファタリクス
<i>Saci_2370</i>	YP_256941.1	70608071	スルホロブス アシドカルダリウス

40

【0 2 6 1】

(1.2.1.c- オキシドレダクターゼ(2-オキソ酸からアシル-CoA、脱カルボキシ化))

この系統の酵素は、1)分枝鎖2-ケト酸デヒドロゲナーゼ、2)アルファ-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ及び3)ピルビン酸デヒドロゲナーゼ多酵素複合体(PDHC)を含む。これらの酵素は、2-ケト酸の酸化性脱カルボキシ化をもたらす一連の部分反応を触媒する多酵素複合体である。2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体のそれぞれは、中間的代謝における主要位置を占め、酵素活性は、典型的には厳密に制御される(Friesら、Biochemistry 42:6996-7002(2003))。それらの酵素は、アルファ-ケト酸デカルボキシラーゼ(E1)、ジヒドロリポアミドアシルトランスフェラーゼ(E2)及びジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ(E3)

50

の3つの触媒成分の多数の複製物で構成された複雑であるが、共通の構造体を共有する。E3成分は、生物体におけるすべての2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体の間で共有され、E1及びE2成分は、異なる遺伝子によってコードされる。酵素成分は、複合体に多くの複製物で存在し、基質チャネリングを介して反応の指向性配列を触媒するために多数の共同因子を利用する。これらのデヒドロゲナーゼ複合体の全体的なサイズは非常に大きく、分子質量は、4から1000万Daである(即ち、リボソームより大きい)。

【0262】

2-ケト酸デヒドロゲナーゼ系統における酵素の活性は、通常、大腸菌における嫌気性条件下では低く、又は限定される。NADH(又はNADPH)の生成が増加すると、酸化還元不均衡を招く可能性があり、NADHそのものは、酵素機能に対する阻害薬として働く。工学技術的試みによって、大腸菌ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の嫌気性活性が高められた(Kimら、Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771(2007); Kimら、J. Bacteriol. 190:3851-3858(2008); Zhouら、Biotechnol. Lett. 30:335-342(2008))。例えば、NADHの阻害効果を、E3成分におけるH322Y変異を操作することによって克服することができる(Kimら、J. Bacteriol. 190:3851-3858(2008))。個々の成分、及びそれらが複合体において如何に協働するかということについての構造的な研究は、この系統における酵素の触媒メカニズム及び構造への洞察を与える(Aevarssonら、Nat. Struct. Biol. 6:785-792(1999); Zhouら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14802-14807(2001))。デヒドロゲナーゼ複合体の基質特異性は、それぞれの生物体で異なるが、一般に、分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼは、最も広い基質範囲を有する。

【0263】

アルファ-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ(AKGD)は、アルファ-ケトグルタル酸をスクシニル-CoAに変換し、TCA回路を介する代謝の流れの制御の主たる部位である(Hansford, R. G. Curr. Top. Bioenerg. 10:217-278(1980))。大腸菌における遺伝子sucA、sucB及びlpdによってコードされると、AKGD遺伝子発現は、嫌気性条件下で、且つグルコース上での成長時に下方制御される(Parkら、Mol. Microbiol. 15:473-482(1995))。AKGDの基質範囲は狭いが、E2成分の触媒的中核の構造的な研究により、基質特異性に関与する特異的残基が正確に指摘されている(Knappら、J. Mol. Biol. 280:655-668(1998))。odhAB(E1及びE2)並びにpdhD(E3、共有領域)によってコードされるバチルス・スブチリスAKGDは、転写レベルで制御され、生物体の炭素源及び成長段階に依存する(Resnekovら、Mol. Gen. Genet. 234:285-296(1992))。酵母において、E3成分をコードするLPD1遺伝子は、グルコースによって転写レベルで制御される(Roy及びDawes J. Gen. Microbiol. 133:925-933(1987))。KGD1によってコードされるE1成分もグルコースによって制御され、HAP2及びHAP3の生成物によって活性化される(Repetto及びTzagoloff Mol. Cell Biol. 9:2695-2705(1989))。NADH及びスクシニル-CoAによって阻害されるAKGD酵素複合体は、その阻害された機能がいくつかの神経疾患に関連づけられてきたように、哺乳類系において十分に研究されている(Tretter及びdam-Vizi Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci. 360:2335-2345(2005))。

【表 2 6】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>sucA</i>	NP_415254.1	16128701	エシェリキア コリ <i>str. K12 substr. MG1655</i>
<i>sucB</i>	NP_415255.1	16128702	エシェリキア コリ <i>str. K12 substr. MG1655</i>
<i>lpd</i>	NP_414658.1	16128109	エシェリキア コリ <i>str. K12 substr. MG1655</i>
<i>odhA</i>	P23129.2	51704265	バシルス スブチルス
<i>odhB</i>	P16263.1	129041	バシルス スブチルス
<i>pdhD</i>	P21880.1	118672	バシルス スブチルス
<i>KGD1</i>	NP_012141.1	6322066	サッカロマイセス セレビスシアエ
<i>KGD2</i>	NP_010432.1	6320352	サッカロマイセス セレビスシアエ
<i>LPD1</i>	NP_116635.1	14318501	サッカロマイセス セレビスシアエ

【0 2 6 4】

2-オキシイソ吉草酸デヒドロゲナーゼとしても知られる分枝鎖2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体(BCKAD)は、分枝鎖アミノ酸分解経路に参与して、バリン、ロイシン及びイソロイシンの2-ケト酸誘導体をそれらのアシル-CoA誘導体及びCO₂に変換する。バシルス・スブチリス(Wangら、Eur. J. Biochem. 213:1091-1099(1993))、ラッス・ノルベギクス(Nambaら、J. Biol. Chem. 244:4437-4447(1969))及びシュードモナス・プチダ(Sokatch J. Bacteriol. 148:647-652(1981))を含む多くの生物体における複合体が研究された。バシルス・スブチリスにおいて、酵素は、遺伝子pdhD(E3成分)、bfmBB(E2成分)、bfmBAA及びbfmBAB(E1成分)によってコードされる(Wangら、Eur. J. Biochem. 213:1091-1099(1993))。哺乳類において、複合体は、特定のホスファターゼ及びタンパク質キナーゼによるリン酸化によって制御される。複合体は、ラット肝細胞において研究されており(Chiccoら、J. Biol. Chem. 269:19427-19434(1994))、遺伝子Bckdha(E1アルファ)、Bckdhb(E1ベータ)、Dbt(E2)及びDld(E3)によってコードされる。シュードモナス・プチダBCKAD複合体のE1及びE3成分が結晶化され(Aevanssonら、Nat. Struct. Biol. 6:785-792(1999);Mattevi Science 255:1544-1550(1992))、酵素複合体の研究が行われた(Sokatchら、J. Bacteriol. 148:647-652 (1981))。P. プチダBCKAD遺伝子の転写は、bkdRの遺伝子生成物によって活性化される(Hesterら、Eur. J. Biochem. 233:828-836(1995))。ラッス・ノルベギクス(Paxtonら、Biochem. J. 234:295-303(1986))及びサッカロマイセス・セレビスシアエ(Sinclairら、Biochem. Mol. Biol. Int. 31:911-922(1993))を含むいくつかの生物体において、この複合体は、分枝鎖アミノ酸前駆体に加えて、2-オキシブタン酸及びアルファ-ケトグルタル酸などの直鎖状オキシ酸を含む広い基質範囲を有することが証明された。ウシBCKADの活性部位を代替的基質アセチル-CoAに有利になるように操作した(Meng及びChuang、Biochemistry 33:12879-12885(1994))。

【表 2 7】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>bfmBB</i>	NP_390283.1	16079459	バシルス スプトリス
<i>bfmBAA</i>	NP_390285.1	16079461	バシルス スプトリス
<i>bfmBAB</i>	NP_390284.1	16079460	バシルス スプトリス
<i>pdhD</i>	P21880.1	118672	バシルス スプトリス
<i>lpdV</i>	P09063.1	118677	シュードモナス プチダ
<i>bkdB</i>	P09062.1	129044	シュードモナス プチダ
<i>bkdA1</i>	NP_746515.1	26991090	シュードモナス プチダ
<i>bkdA2</i>	NP_746516.1	26991091	シュードモナス プチダ
<i>Bckdha</i>	NP_036914.1	77736548	ラツス ノルベギクス
<i>Bckdhb</i>	NP_062140.1	158749538	ラツス ノルベギクス
<i>Dbt</i>	NP_445764.1	158749632	ラツス ノルベギクス
<i>Dld</i>	NP_955417.1	40786469	ラツス ノルベギクス

10

20

【0 2 6 5】

ピルビン酸のアセチル-CoAへの変換を触媒するピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体についても広範囲に研究が行われた。大腸菌酵素において、E1成分における特異的残基が、基質特異性に関与する(Bisswanger, H. J Biol Chem. 256:815-822(1981);Bremer, J. Eur. J Biochem. 8:535-540(1969);Gongら、J Biol Chem. 275:13645-13653(2000))。既に述べたように、酵素工学技術の試みにより、嫌気性条件下での大腸菌PDH酵素活性が向上した(Kimら、Appl.Environ.Microbiol. 73:1766-1771(2007);Kim J.Bacteriol.190:3851-3858(2008);Zhouら、Biotechnol.Lett. 30:335-342(2008))。大腸菌PDHとは対照的に、B.ス
 チリス複合体は活性であり、嫌気性条件下での成長に必要とされる(Nakano J.Bacteriol. 179:6749-6755 (1997))。グリセロール上での成長時に特徴づけられたクレブシエラ・ニ
 ユーモニアエPDHも嫌気性条件下で活性である(Menzelら、J.Biotechnol. 56:135-142 (19
 97)。ウシ腎臓の酵素複合体(Zhouら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14802-14807(2
 001)及びアゾトバクテル・ビネランジ(*Azotobacter vinelandii*)のE2触媒領域の結晶構造
 が入手可能である(Matteviら、Science 255:1544-1550(1992))。いくつかの哺乳類PDH酵
 素複合体は、2-オキソブタン酸などの代替的基質上で反応することができるが、ラッタス
 ・ノルベギクスPDH及びBCKADの相対的動力学は、BCKADが、基質としての2-オキソブタン
 酸上でより高い活性を有することを示している(Paxtonら、Biochem. J. 234:295-303(198
 6))。

30

40

【表 2 8】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>aceE</i>	NP_414656.1	16128107	エシェリキア コリ <i>str. K12 substr. MG1655</i>
<i>aceF</i>	NP_414657.1	16128108	エシェリキア コリ <i>str. K12 substr. MG1655</i>
<i>lpd</i>	NP_414658.1	16128109	エシェリキア コリ <i>str. K12 substr. MG1655</i>
<i>pdhA</i>	P21881.1	3123238	バシルス スブチリス
<i>pdhB</i>	P21882.1	129068	バシルス スブチリス
<i>pdhC</i>	P21883.2	129054	バシルス スブチリス
<i>pdhD</i>	P21880.1	118672	バシルス スブチリス
<i>aceE</i>	YP_001333808.1	152968699	クレブシエラ ニューモニア <i>MGH78578</i>
<i>aceF</i>	YP_001333809.1	152968700	クレブシエラ ニューモニア <i>MGH78578</i>
<i>lpdA</i>	YP_001333810.1	152968701	クレブシエラ ニューモニア <i>MGH78578</i>
<i>Pdha1</i>	NP_001004072.2	124430510	ラッタス ノルベギクス
<i>Pdha2</i>	NP_446446.1	16758900	ラッタス ノルベギクス
<i>Dlat</i>	NP_112287.1	78365255	ラッタス ノルベギクス
<i>Dld</i>	NP_955417.1	40786469	ラッタス ノルベギクス

【 0 2 6 6 】

上記大きな多酵素2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体の代替として、いくつかの嫌気性生物体は、2-ケト酸オキシドレダクターゼ系統(OFOR)の酵素を利用して、2-ケト酸のアシル化酸化性脱カルボキシル化を触媒する。デヒドロゲナーゼ複合体と異なり、これらの酵素は、鉄-硫黄集団を含み、異なる共同因子を利用し、NAD(P)Hの代わりに電子受容体としてフェレドキシン又はフラボジキシンを使用する。この系統のたいていの酵素は、基質(POR)としてピルビン酸に特異的であるが、いくつかの2-ケト酸:フェレドキシンオキシドレダクターゼは、アルファ-ケトグルタル酸及び2-オキソブタン酸を含む基質として広範囲の2-ケト酸を受容することが証明された(Fukuda及びWakagi Biochim.Biophys.Acta 1597:74-80(2002);Zhangら、J.Biochem. 120:587-599(1996))。1つの当該酵素は、遺伝子ST2300によってコードされたアルファ及びベータサブユニットを含む好熱酸性古菌スルホロブス・トコダイ7のOFORである(Fukuda及びWakagi Biochim.Biophys.Acta 1597:74-80(2002);Zhangら、J.Biochem. 120:587-599(1996))。大腸菌におけるこのタンパク質を効率的に発現させるためにプラスミド系発現システムが開発されており(Fukuda他、Eur. J. Biochem. 268:5639-5646(2001))、基質特異性に関与する残基が確認された(Fukuda及びWakagi Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80(2002))。最近、アエロピルム・ペルニクス(*Aeropyrum pernix*)str.K1の2つのOFORも大腸菌に複製され、特徴づけられ、広範囲の2-オキソ酸と反応することが判明した(Nishizawaら、FEBS Lett. 579:2319-2322(2005))。これらのOFOR候補の遺伝子配列が入手可能であるが、それらは、今日までGenBank識別子が割り当てられていない。類似の酵素がすべての古細菌、いくつかの嫌気性細菌及びミトコンドリアの

ない真核生物に存在する生命情報科学的証拠が存在する(Fukuda及びWakagi Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80(2005))。このクラスの酵素は、還元フェレドキシンを使用して、フェレドキシンNADレダクターゼによりNADHを生成することができるため、エネルギーの観点からも興味深い(Petidemangeら、Biochem. Biophys. Acta 421:334-337(1976))。また、酵素のほとんどが嫌気性条件下で作用するように設計されるため、嫌気性条件下での作用のために必要な酵素操作が、2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体系統における酵素と比べて少なく済む。

【表 2 9】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
ST2300	NP_378302.1	15922633	スルホロブストコダイ7

10

【0 2 6 7】

(1.2.1.d- オキシドレダクターゼ(リン酸化/脱リン酸化))

このクラスにおける例示的な酵素は、グリセルアルデヒド-3-リン酸をD-グリセリン酸1,3-ビスリン酸に変換するグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(例えば、大腸菌 gapA(Branlant及びBranlant Eur. J. Biochem. 150:61-66(1985))、L-アスパラギン酸-4-セミアルデヒドをL-4-アスパルチル-リン酸に変換するアスパラギン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(例えば、大腸菌asd(Biellmannら、Eur. J. Biochem. 104:53-58(1980))、N-アセチル-L-グルタミン酸-5-セミアルデヒドをN-アセチル-L-グルタミル-5-リン酸に変換するN-アセチル-ガンマ-グルタミル-リン酸レダクターゼ(例えば、大腸菌argC(Parso tら、Gene 68:275-283(1988))、及びL-グルタミン酸-5-セミアルデヒドをL-グルタミル-5-リン酸に変換するグルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(例えば、大腸菌pro A(Smithら、J. Bacteriol. 157:545-551(1084))を含む。

20

【表 3 0】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
gapA	P0A9B2.2	71159358	エシェリキア コリ
asd	NP_417891.1	16131307	エシェリキア コリ
argC	NP_418393.1	16131796	エシェリキア コリ
proA	NP_414778.1	16128229	エシェリキア コリ

30

【0 2 6 8】

(1.3.1.a- CH-CH供与体に作用するオキシドレダクターゼ)

例示的なエノイル-CoAレダクターゼは、クロトニル-CoAのブチリル-CoAへの還元を自然に触媒するC.アセトブチリクムのbcdの遺伝子生成物である(Atsumiら、Metab Eng(2007); Boyntonら、Journal of Bacteriology 178:3015-3024(1996))。電子転移フラボタンパク質をコードするC.アセトブチリクムetfAB遺伝子の発現と並行してbcdを発現させることによって酵素の活性を高めることができる。エノイル-CoAレダクターゼ工程のさらなる候補はE.グラシリス(gracilis)のミトコンドリアエノイル-CoAレダクターゼである(Hoffmeisterら、Journal of Biological Chemistry 280:4329-4338(2005))。そのミトコンドリア標的リーダー配列の除去に続いてこの配列から誘導された構造体を大腸菌に複製することで活性酵素を得た(Hoffmeisterら、前出、(2005))。このアプローチは、真核生物遺伝子、特に、原核生物体において、特定の細胞内区画に遺伝子生成物を導くことができるリーダー配列を有する遺伝子を発現させる技術分野の当業者に周知である。原核生物トレポネマ・デンチコラ(Treponema denticola)のこの遺伝子の近相同体TDE0597は、大腸菌において

40

50

複製及び発現された第3のエノイル-CoAレダクターゼを表す(Tucci及びMartin FEBS Letters 581:1561-1566(2007))。

【表 3 1】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>bcd</i>	NP_349317.1	15895968	クロストリジウム アセトブチリウム
<i>etfA</i>	NP_349315.1	15895966	クロストリジウム アセトブチリウム
<i>etfB</i>	NP_349316.1	15895967	クロストリジウム アセトブチリウム
TER	Q5EU90.1	62287512	ユーグレナ グラシリス
TDE0597	NP_971211.1	42526113	トレポネマ デンチコラ

10

【 0 2 6 9 】

例示的な2-エン酸レダクターゼ(EC1.3.1.31)酵素は、多種多様な α , β -不飽和カルボン酸及びアルデヒドのNADH依存性還元を触媒することが知られる(Rohdichら、J. Biol. Chem. 276:5779-5787(2001))。2-エン酸レダクターゼは、C.チロブチリウム及びC.テルモアセチウム(ここではムーレラ・テルモアセチウム(Moorella thermoacetica)と呼ぶ)(Rohdichら、前出、(2001))を含むいくつかの種のクロストリジア(Giesel及びSimon Arch Microbiol. 135(1):p.51-57(2001))におけるenrによってコードされる。最近公表されたC.クルイベリのゲノム配列において、エン酸レダクターゼに対する9つのコード化配列が報告され、そのうちの1つが特徴づけられた(Seedorfら、Proc Natl Acad Sci U. S. A. 105(6):2128-33(2008))。C.チロブチリウム及びC.テルモアセチウムの両方のenr遺伝子が複製及び配列され、互いに59%の同一性を示す。前者の遺伝子は、C.クルイベリにおける特徴づけられた遺伝子に対して約75%の類似性を示すことも判明した(Giesel及びSimon Arch Microbiol. 135(1):51-57(1983))。これらの配列に基づいて、enrは、大腸菌におけるジエノイルCoAレダクターゼ(*fadH*)に極めて類似していることが報告された(163 Rohdichら、前出(2001))。C.テルモアセチウムenr遺伝子は、また、大腸菌において酵素活性型で発現された(163 Rohdichら、前出(2001))。

20

30

【表 3 2】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>fadH</i>	NP_417552.1	16130976	エシェリキア コリ
<i>enr</i>	ACA54153.1	169405742	クロストリジウム ボツリヌス A3 str
<i>enr</i>	CAA71086.1	2765041	クロストリジウム チロブチリウム
<i>enr</i>	CAA76083.1	3402834	クロストリジウム クルイベリ
<i>enr</i>	YP_430895.1	83590886	ムーレラ テルモアセチカ

40

【 0 2 7 0 】

(1.4.1.a- アミノ酸に作用するオキシドレダクターゼ)

アミノ酸に作用するたいのオキシドレダクターゼは、NAD⁺又はNADP⁺を受容体とするアルファ-アミノ酸の酸化性脱アミノ化を触媒する。アミノ酸に作用する例示的なオキシドレダクターゼは、*gdhA*によってコードされるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(脱アミノ化)、*ldh*によってコードされるロイシンデヒドロゲナーゼ(脱アミノ化)、及び*nadX*によってコード化されるアスパラギン酸デヒドロゲナーゼ(脱アミノ化)を含む。エシェリキア・コリの*gdhA*遺伝子生成物(Korberら、J. Mol. Biol. 234:1270-1273(1993);McPherson及びWootton Nucleic. Acids Res. 11:5257-5266(1983))、テルモトガ・マリチマの*gdh*(Kor

50

tら、Extremophiles 1:52-60(1997);Lebbinkら、J. Mol. Biol. 280:287-296(1998));Lebbinkら、J. Mol. Biol. 289:357-369(1999))、及びハロバクテリウム・サリナルムのgdhA1(Ingoldsbyら、Gene 349:237-244(2005))は、グルタミン酸と2-オキソグルタル酸及びアンモニアとの可逆的相互変換を触媒し、それぞれNADP(H)、NAD(H)又はその両方に有利に働く。バシルス・セレウスのldh遺伝子は、ロイシン、イソロイシン、バリン及び2-アミノブタン酸を含む広範な基質を有するLeuDHタンパク質をコードする(Ansorge及びKula Biotechnol Bioeng. 68:557-562(2000);Stoyanら、J.Biotechnol 54:77-80(1997))。アスパラギン酸デヒドロゲナーゼに対してコードするテルモトガ・マリチマ(Thermotoga maritima)のnadX遺伝子は、NADの生合成に関与する(Yangら、J.Biol.Chem. 278:8804-8808 (2003))。

10

【表 3 3】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>gdhA</i>	P00370	118547	エシェリキア コリ
<i>gdh</i>	P96110.4	6226595	テルモトガ マリチマ
<i>gdhA1</i>	NP_279651.1	15789827	ハロバクテリウム サリナルム
<i>ldh</i>	P0A393	61222614	バシルス セレウス
<i>nadX</i>	NP_229443.1	15644391	テルモトガ マリチマ

【0 2 7 1】

20

lysDH遺伝子によってコードされるリシン6-デヒドロゲナーゼは、L-リシンのε-アミノ基の酸化性脱アミノ化を触媒して2-アミノアジピン酸-6-セミアルデヒドを形成し、次にそれが非酵素的に環化して、Δ1-ピペリジン-6-カルボン酸を形成する(Misono及びNagasaki J.Bacteriol. 150:398-401(1982))。ゲオバシルス・ステアロテルモフィルスのlysDH遺伝子は、好熱性(thermophilic)NAD依存性リシン6-デヒドロゲナーゼをコードする(Heydariら、Appl Environ.Microbiol 70:937-942(2004))。加えて、アエロピルム・ペルニクスK1のlysDH遺伝子は、ゲノムプロジェクトから相同性を介して特定される。

【表 3 4】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>lysDH</i>	BAB39707	13429872	ゲオバシルス ステアロテルモフィルス
<i>lysDH</i>	NP_147035.1	14602185	アエロピルム ペルニクスK1
<i>ldh</i>	P0A393	61222614	バシルス セレウス

30

【0 2 7 2】

(2.3.1.a- アシルトランスフェラーゼ(リン酸基の転移))

例示的なリン酸転移アシルトランスフェラーゼは、ptaによってコードされるホスホトランスアセチラーゼ及びptbによってコードされるホスホトランスブチリラーゼを含む。大腸菌のpta遺伝子は、アセチル-CoAをアセチル-リン酸に、又はその逆に変換することができる酵素をコードする(Suzuki, T. Biochim. Biophys. Acta 191:559-569(1969))。この酵素は、そのプロセスでプロピオン酸を形成するアセチル-CoAの代わりにプロピオニル-CoAを利用することもできる(Hesslingerら、Mol.Microbiol 27:477-492(1998))。同様に、C.アセトブチリクムのptb遺伝子は、ブチリル-CoAをブチリル-リン酸に変換することができる酵素をコードする(Walterら、Gene 134(1):p. 107-11 (1993);Huangら、J Mol Microbiol Biotechnol 2(1):p.33-38(2000))。さらなるptb遺伝子を酪酸生成細菌L2-50(Louisら、J.Bacteriol.186:2099-2106(2004))及びバシルス・メガテリウム(Vazquezら、Curr. Microbiol 42:345-349(2001))に見い出すことができる。

40

【表 3 5】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>pta</i>	NP_416800.1	16130232	エシェリキア コリ
<i>ptb</i>	NP_349676	15896327	クロストリジウム アセトブチリクム
<i>ptb</i>	AAR19757.1	38425288	酪酸産生菌 L2-50
<i>ptb</i>	CAC07932.1	10046659	バシルス メガテリウム

(2.6.1.a- アミノトランスフェラーゼ)

【0 2 7 3】

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼは、アミノ基をアスパラギン酸からアルファ-ケトグルタル酸に転移して、グルタミン酸及びオキサロ酢酸を形成する。この変換は、例えば、エシェリキア・コリのaspC(Yagiら、FEBS Lett. 100:81-84(1979);Yagiら、Methods Enzymol. 113:83-89(1985))、サッカロミセス・セレピシアエのAAT2(Yagiら、J Biochem. 92:35-43 (1982))及びアラビドプシス・タリアナのASP5(48, 108, 225 48. de laら、Plant J 46:414-425(2006);Kwok及びHanson J Exp.Bot. 55:595-604(2004);Wilkie及びWarren Protein Expr.Purif. 12:381-389(1998))の遺伝子生成物によって触媒される。バリンアミノトランスフェラーゼは、バリン及びピルビン酸の2-ケトイソ吉草酸及びアラニンへの変換を触媒する。大腸菌遺伝子avtAは、1つの当該酵素をコードする(Whalen及びBerg J.Bacteriol. 150:739-746(1982))。この遺伝子生成物は、また、 α -ケト酪酸のアミノ化を触媒して α -アミノ酪酸を生成するが、この反応におけるアミン供与体は特定されていない(Whalen及びBerg J. Bacteriol. 158:571-574(1984))。大腸菌serCの遺伝子生成物は、2つの反応、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ及びホスホヒドロキシトレオニンアミノトランスフェラーゼを触媒し(Lam及びWinkler J. Bacteriol. 172:6518-6528(1990))、非リン酸化基質に対する活性を検出できなかった(Drewkeら、FEBS. Lett. 390:179-182(1996))。

【表 3 6】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>aspC</i>	NP_415448.1	16128895	エシェリキア コリ
<i>AAT2</i>	P23542.3	1703040	サッカロミセス セレピシアエ
<i>ASP5</i>	P46248.2	20532373	アラビドプシス タリアナ
<i>avtA</i>	YP_026231.1	49176374	エシェリキア コリ
<i>serC</i>	NP_415427.1	16128874	エシェリキア コリ

【0 2 7 4】

Cargillは、マロニル-セミアルデヒドを介してベータ-アラニンから3-HPを生成するためのベータ-アラニン/アルファ-ケトグルタル酸アミノトランスフェラーゼを開発した(PT/US2007/076252(Jessenら))。サッカロマイセス・クルイベリにおけるSkPYD4の遺伝子生成物は、また、ベータ-アラニンをアミノ基供与体として優先的に使用することが証明された(Andersenら、FEBS.J. 274:1804-1817 (2007))。SkUGA1は、サッカロミセス・セレピシアエGABAアミノトランスフェラーゼ、UGA1の相同体をコードする(Ramosら、Eur. J. Biochem. 149:401-404(1985))のに対して、SkPYK4は、 β -アラニン及びGABAアミノ交換反応に関与する酵素をコードする(Andersenら、FEBS.J. 274:1804-1817(2007))。3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼは、メチルマロン酸セミアルデヒドから3-アミノ-2-メチルプロピオン酸への変換を触媒する。該酵素は、ラッタス・ノルベギクス及びサス・スクロファにおいて特徴づけられ、Abatによってコードされる(Kakimotoら、Biochim.Biophys.Acta 156:374-380(1968);Tamakiら、Methods Enzymol. 324:376-389(2000))。3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼに対して高度な配列相同性を有する他の生物体における酵素候補は、C.エレガンスのGta-1及びバシルス・スブチルス(Bacillus

subtilus)のgabTを含む。さらに、遺伝子gabTによってコードされる大腸菌の原生GABAアミノトランスフェラーゼの1つは、広い基質特異性を有することが証明された(Liuら、Biochemistry 43:10896-10905(2004);Schulzら、Appl Environ Microbiol 56:1-6(1990))。puuEの遺伝子生成物は、大腸菌における他の4-アミノ酪酸トランスアミナーゼを触媒する(Kuriharaら、J.Biol.Chem. 280:4602-4608(2005))。

【表 3 7】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	98626772	サッカロミセス クルイベリ
<i>SkUGA1</i>	ABF58894.1	98626792	サッカロミセス クルイベリ
<i>UGA1</i>	NP_011533.1	6321456	サッカロミセス セレビスシアエ
<i>Abat</i>	P50554.3	122065191	ラッタス ノルベギクス
<i>Abat</i>	P80147.2	120968	サス スクロファ
<i>Gta-1</i>	Q21217.1	6016091	カエノルハブジチス エレカンス
<i>gabT</i>	P94427.1	6016090	バシルス スプチルス
<i>gabT</i>	P22256.1	120779	エシェリキア コリ K12
<i>puuE</i>	NP_415818.1	16129263	エシェリキア コリ K12

10

【 0 2 7 5】

阻害薬に結合しない大腸菌4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ及び阻害薬に結合した大腸菌4-アミノ酪酸トランスアミナーゼのX線結晶構造が報告された(Liuら、Biochemistry 43:10896-10905(2004))。基質結合及び基質特異性が研究及び示唆された。活性部位残基の役割が、部位指向性変異及びX線結晶構造解析によって研究された(Liuら、Biochemistry 44:2982-2992(2005))。構造情報に基づいて、新規の酵素活性を有する大腸菌4-アミノ酪酸トランスフェラーゼを操作する試みがなされた。これらの研究は、BDO経路のためのトランスアミナーゼ活性を発展させる基礎を提供する。

20

【 0 2 7 6】

(2.7.2.a- ホスホトランスフェラーゼ、カルボキシル基受容体)

例示的なキナーゼは、ackAによってコードされる大腸菌酢酸キナーゼ(Skarstedt及びSilverstein J. Biol. Chem. 251:6775-6783(1976))、buk1及びbuk2によってコードされるC-アセトブチリクム酪酸キナーゼ(Walterら、Gene 134(1):107-111(1993)(Huangら、J Mol Microbiol Biotechnol 2(1):33-38(2000))、及びproβによってコードされる大腸菌ガンマ-グルタミルキナーゼ(Smithら、J.Bacteriol. 157:545-551(1984))を含む。これらの酵素は、それぞれ酢酸、酪酸及びグルタミン酸をリン酸化する。大腸菌のackA遺伝子生成物は、プロピオン酸をもリン酸化する(Hesslingerら、Mol. Microbiol 27:477-492(1998))。

30

【表 3 8】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>ackA</i>	NP_416799.1	16130231	エシェリキア コリ
<i>buk1</i>	NP_349675	15896326	クロストリジウム アセトブチリクム
<i>buk2</i>	Q97H1	20137415	クロストリジウム アセトブチリクム
<i>proB</i>	NP_414777.1	16128228	エシェリキア コリ

40

【 0 2 7 7】

(2.8.3.a- 補酵素Aトランスフェラーゼ)

CoA-トランスフェラーゼ系統において、酢酸-CoAトランスフェラーゼ(EC2.8.3.8)としても知られる大腸菌酵素アシル-CoA: 酢酸-CoAトランスフェラーゼは、イソ酪酸(Matthies及びSchink Appl Environ Microbiol 58:1435-1439(1992))、吉草酸(Vanderwinkelら、Biochem. Biophys. Res Commun. 33:902-908(1968)及びブタン酸(Vanderwinkel、前出(196

50

8))を含む様々な分枝状及び直鎖状アシル-CoA基質からCoA部分を酢酸に転移することが証明された。この酵素は、大腸菌属K12におけるatoA(アルファサブユニット)及びatoD(ベータサブユニット)(Korolevら、Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr. 58:2116-2121(2002); Vanderwinkel、前出(1968))、並びにコリネバクテリウム・グルタミクムにおけるactA及びcg0592(Duncanら、Appl Environ Microbiol 68:5186-5190(2002))によってコードされる。配列相同性によって見いだされるさらなる遺伝子は、エシェリキア・コリUT189のatoD及びatoAを含む。

【表 3 9】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>atoA</i>	P76459.1	2492994	エシェリキア コリ K12
<i>atoD</i>	P76458.1	2492990	エシェリキア コリ K12
<i>actA</i>	YP_226809.1	62391407	コリネバクテリウム グルタミクム ATCC 13032
<i>cg0592</i>	YP_224801.1	62389399	コリネバクテリウム グルタミクム ATCC 13032
<i>atoA</i>	ABE07971.1	91073090	エシェリキア コリ UT189
<i>atoD</i>	ABE07970.1	91073089	エシェリキア コリ UT189

10

【 0 2 7 8 】

類似の変換が、それぞれスクシニル-CoA、4-ヒドロキシブチリル-CoA及びブチリル-CoAアセチルトランスフェラーゼ活性を示すことが証明されたクロストリジウム・クルイベリ *cat1*、*cat2*及び*cat3*の遺伝子生成物によって触媒される(Seedorfら、Proc Natl Acad Sci U.S.A. 105(6):2128-2133(2008);Sohling及びGottschalk J Bacteriol 178(3):871-880(1996)]。

20

【表 4 0】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>cat1</i>	P38946.1	729048	クロストリジウム クレイベリ
<i>cat2</i>	P38942.2	1705614	クロストリジウム クレイベリ
<i>cat3</i>	EDK35586.1	146349050	クロストリジウム クレイベリ

30

【 0 2 7 9 】

嫌気性細菌アシダミノコッカス・フェルメンタンス(*Acidaminococcus fermentans*)のグルタコン酸-CoA-トランスフェラーゼ(EC2.8.3.12)酵素は、二酸グルタコニル-CoA及び3-ブテノイル-CoAと反応する(Mack及びBuckel FEBS Lett. 405:209-212(1997))。この酵素をコードする遺伝子は、*gctA*及び*gctB*である。この酵素は、活性が低いが検出可能であり、他のCoA誘導体は、グルタリル-CoA、2-ヒドロキシグルタリル-CoA、アジピル-CoA及びアクリリル-CoAを含む(Buckelら、Eur. J. Biochem. 118:315-321(1981))。該酵素は、大腸菌において複製及び発現された(Macら、Eur.J.Biochem. 226:41-51(1994))。

【表 4 1】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>gctA</i>	CAA57199.1	559392	アシダミノコッカス フェルメンタンス
<i>gctB</i>	CAA57200.1	559393	アシダミノコッカス フェルメンタンス

40

【 0 2 8 0 】

(3.1.2.a- チオエステルヒドロラーゼ(CoA特異的))

CoAヒドロラーゼ系統において、酵素3-ヒドロキシイソブチリル-CoAヒドロラーゼは、3-HIBCoAに対して特異的であり、バリン分解中に所望の変換を効率的に触媒することが示された(Shimomuraら、J Biol Chem 269:14248-14253(1994))。この酵素をコードする遺伝子は、ラッタス・ノルベギクス(Shimomuraら、前出(1994);Shimomuraら、Methods Enzymo

50

1. 324:229-240(2000))及びホモサピエンス(Shimomuraら、前出、2000)のhibchを含む。配列相同性による候補遺伝子は、サッカロマイセス・セレビシアエのhibch及びバシルス・セレウスのBC_2292を含む。

【表 4 2】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>hibch</i>	Q5XIE6.2	146324906	ラッタス ノルベギクス
<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	146324905	ホモ サピエンス
<i>hibch</i>	P28817.2	2506374	サッカロマイセス セレビシアエ
<i>BC_2292</i>	Q81DR3	81434808	バシルス セレウス

10

【0 2 8 1】

アジピル-CoAのアジピン酸への変換をアシル-CoAヒドロラーゼ又は同等にチオエステラーゼによって実施することができる。最上の大腸菌遺伝子候補は、アジピル-CoAに対する活性を有するジカルボン酸アセチルトランスフェラーゼであるヒトacot8(Westinら、J Biol Chem 280(46):38125-38132(2005))に対して高い類似性を示すtesB(Naggertら、J. Biol Chem. 266(17):11044-11050(1991))である。この活性は、ラット肝臓において特徴づけられた(Deana、Biochem. Int. 26(4):p.767-773(1992))。

【表 4 3】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>tesB</i>	NP_414986	16128437	エシェリキア コリ
<i>acot8</i>	CAA15502	3191970	ホモ サピエンス
<i>acot8</i>	NP_570112	51036669	ラッタス ノルベギクス

20

【0 2 8 2】

他の見込まれる大腸菌チオールエステルヒドロラーゼは、tesA(Bonner及びBloch、J Biol Chem. 247(10):3123-3133(1972))、ybgC(Kuznetsovaら、FEMS Microbiol Rev. 29(2):263-279(2005);Zhuangら、FEBS Lett. 516(1-3):161-163(2002))、paaI(Songら、J Biol Chem. 281(16):11028-11038(2006))及びybdB(Leducら、J Bacteriol. 189(19):7112-7126(2007))の遺伝子生成物を含む。

【表 4 4】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>tesA</i>	NP_415027	16128478	エシェリキア コリ
<i>ybgC</i>	NP_415264	16128711	エシェリキア コリ
<i>paaI</i>	NP_415914	16129357	エシェリキア コリ
<i>ybdB</i>	NP_415129	16128580	エシェリキア コリ

30

【0 2 8 3】

いくつかの真核性アセチル-CoAヒドロラーゼ(EC3.1.2.1)は、広い基質特異性を有する。ラッタス・ノルベギクス脳の酵素(Robinsonら、Biochem.Biophys. Res.Commun. 71:959-965 (1976))は、ブチリル-CoA、ヘキサノイル-CoA及びマロニル-CoAと反応することができる。

【表 4 5】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>acot12</i>	NP_570103.1	18543355	ラッタス ノルベギクス

40

【0 2 8 4】

50

(4.1.1.a- カルボキシ-リアーゼ)

例示的なカルボキシ-リアーゼは、2-アセト乳酸をアセトインに変換するクエン酸異化及び分枝鎖アミノ酸生合成に関与するアセト乳酸デカルボキシラーゼである。ラクトコッカス・ラクチスにおいて、酵素は、遺伝子aldBによってコードされる6つのサブユニットで構成され、バリン、ロイシン及びイソロイシンによって活性化される(Goupilら、Appl. Environ. Microbiol. 62:2636-2640 (1996); Goupil-Feuilleratら、J. Bacteriol. 182:5399-5408(2000))。この酵素は、大腸菌において過剰発現され、特徴づけられた(Phalipら、FEBS Lett. 351:95-99(1994))。他の生物体において、該酵素は、ストレプトコッカス・テルモフィルスのaldC(Monnetら、Lett. Appl. Microbiol. 36:399-405(2003))、バシルス・ブレビスのaldB(Diderichsenら、J. Bacteriol. 172:4315-4321(1990); Najmudinら、Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 59:1073-1075(2003))及びエンテロバクテル・アエロゲネスのbudA(Diderichsenら、J. Bacteriol. 172:4315-4321(1990))によってコードされる二量体である。バシルス・ブレビスの酵素は、バシルス・スプチリスにおいて複製及び過剰発現され、結晶学的に特徴づけられた(Najmudinら、Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 59:1073-1075(2003))。また、ロイコノストク・ラクチスの酵素は、精製され、特徴づけられたが、遺伝子は単離されていない(O'Sullivanら、FEMS Microbiol. Lett. 194:245-249(2001))。

【表 4 6】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>aldB</i>	NP_267384.1	15673210	ラクトコッカス ラクチス
<i>aldC</i>	Q8L208	75401480	ストレプトコッカス テルモフィルス
<i>aldB</i>	P23616.1	113592	バシルス ブレビス
<i>budA</i>	P05361.1	113593	エンテロバクテル アエロゲネス

【0285】

アコニテートデカルボキシラーゼは、カンジダの菌株及び糸状菌アスペルギルス・テレウスにおけるイタコン酸生合成の最終工程を触媒する(Bonnarmeら、J. Bacteriol. 177:3573-3578 (1995); Willke及びVorlop Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:289-295(2001))。イタコン酸は、バイオ技術的に興味深い化合物であるが、アコニテートデカルボキシラーゼ遺伝子又はタンパク質配列は、今日まで報告されていない。

【0286】

4-オキサロクロネートデカルボキシラーゼは、多くの生物体から単離され、特徴づけられた。この酵素をコードする遺伝子は、シュードモナス属(菌株600)のdmpH及びdmpE (Shinglerら、J. Bacteriol. 174:711-724(1992))、シュードモナス・プチダのxylII及びxylIII I((Kato及びAsano Arch. Microbiol. 168:457-463(1997); Lian及びWhitman J. Am. Chem. Soc. 116:10403-10411 (1994); Stanleyら、Biochemistry 39:3514(2000))並びにラルストニア・ユートロファ JMP134のReut_B5691及びReut_B5692 (Hughesら、J. Bacteriol. 158:79-83(1984))を含む。シュードモナス属(菌株600)の酵素をコードする遺伝子は、大腸菌において複製及び発現された(Shinglerら、J. Bacteriol. 174:711-724(1992))。

【表 4 7】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>dmpH</i>	CAA43228.1	45685	シュードモナス属 <i>CF600</i>
<i>dmpE</i>	CAA43225.1	45682	シュードモナス属 <i>CF600</i>
<i>xylII</i>	YP_709328.1	111116444	シュードモナス プチダ
<i>xylIII</i>	YP_709353.1	111116469	シュードモナス プチダ
<i>Reut_B5691</i>	YP_299880.1	73539513	ラルストニア ユーロファ <i>JMP134</i>
<i>Reut_B5692</i>	YP_299881.1	73539514	ラルストニア ユーロファ <i>JMP134</i>

10

【0 2 8 7】

桂皮酸(フェニルアクリレート)及び置換桂皮酸誘導体の対応するスチレン誘導体への変換を触媒するさらなるクラスのデカルボキシラーゼが特徴づけられた。これらの酵素は、様々な生物体に広く存在し、大腸菌において複製及び発現されたこれらの酵素をコードする特定の遺伝子は、サッカロマイセス・セレビスエの*pad1*(Clausenら、Gene 142:107-112 (1994))、ラクトバシルス・プランタルムの*pdc*(Barthelmebsら、Appl Environ Microbiol 67:1063-1069(2001); Qiら、Metab Eng 9:268-276(2007); Rodriguezら、J. Agric. Food Chem. 56:3068-3072(2008))、クレブシエラ・オキシトカ(Hashidokoら、Biosci. Biotech. Biochem. 58:217-218(1994); Uchiyamaら、Biosci. Biotechnol. Biochem. 72:116-123 (2008))、ペジコッカス・ペントサセウス(Barthelmebsら、Appl Environ Microbiol 67:1063-1069(2001))の*pofK*(*pad*)、並びにバシルス・スプチリス及びバシルス・プミルスの*padC*(Lingenら、Protein Eng 15:585-593 (2002))である。シュードモナス・フルオレセンスのフェルラ酸デカルボキシラーゼも精製され、特徴づけられた(Huangら、J. Bacteriol. 176:5912-5918(1994))。重要なこととして、このクラスの酵素は、安定しており、外因性又は内的結合共同因子を必要としないため、これらの酵素は、生体内変換に理想的に適することが証明された(Sariaslani、Annu. Rev. Microbiol. 61:51-69(2007))。

20

【表 4 8】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>pad1</i>	AB368798, BAG32372.1	188496948, 188496949	サッカロマイセス セレビスエ
<i>pdc</i>	U63827, AAC45282.1	1762615, 1762616	ラクトバシルス プランタルム
<i>pofK</i> (<i>pad</i>)	AB330293, BAF65031.1	149941607, 149941608	クレブシエラ オキシトカ
<i>padC</i>	AF017117, AAC46254.1	2394281, 2394282	バシルス スプチリス
<i>pad</i>	AJ276891, CAC16794.1	11322456, 11322458	ペジコッカス ペントサセウス
<i>pad</i>	AJ278683, CAC18719.1	11691809, 11691810	バシルス プミルス

30

【0 2 8 8】

さらなるデカルボキシラーゼ酵素は、アルファ-ケトグルタル酸からコハク酸セミアルデヒドを形成することができる。これらは、その対応する遺伝子配列がまだ確認されていないユーグレナ・グラシリス(Shigeokaら、Biochem. J. 282(Pt 2):319-323(1992); Shigeoka及びNakano Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28(1991); Shigeoka及びNakano Biochem. J. 292 (Pt 2):463-467(1993))、及び結核菌(Tianら、Proc Natl Acad Sci U.S.A. 102:10670-10675(2005))のアルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ酵素を含む。加えて、グルタミン酸デカルボキシラーゼ酵素は、グルタミン酸を大腸菌*gadA*及び*gadB*遺伝子の生成物などの4-アミノ酪酸に変換することができる(De Biaseら、Protein. Expr. Purif. 8:430-438(1993))。

40

【表 4 9】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>kgd</i>	O50463.4	160395583	ミコバクテリウム ツベルクローシス
<i>gadA</i>	NP_417974	16131389	エシェリキア コリ
<i>gadB</i>	NP_416010	16129452	エシェリキア コリ

【0289】

(ケト酸デカルボキシラーゼ)

ケト酸デカルボキシラーゼとも呼ばれるピルビン酸デカルボキシラーゼ(PDC、EC4.1.1.1)は、ピルビン酸のアセトアルデヒドへの脱カルボキシル化を触媒する、アルコール発酵における主要酵素である。この酵素は、2-ケト酪酸、2-ケト吉草酸、3-ヒドロキシピルビン酸及び2-フェニルピルビン酸を含む、脂肪族2-ケト酸に対する広い基質範囲を有する(Bergら、Science 318:1782-1786(2007))。pdcによってコードされるジモモナス・モビルス(PDCは、異なる基質に対する親和性を変化させた指向的操作研究の対象になってきた(Siegertら、Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005))。サッカロミセス・セレビスシアエのPDCも広範に研究され、変化した活性に対して操作され、大腸菌において機能的に発現された((Killenberg-Jabsら、Eur.J.Biochem. 268:1698-1704(2001);Li及びJordan Biochemistry 38:10004-10012(1999); ter Schureら、Appl.Environ.Microbiol. 64:1303-1307(1998))。この酵素の結晶構造が入手可能である(Killenberg-Jabs Eur.J.Biochem. 268:1698-1704(2001))。他の十分に特徴づけられたPDC候補は、アセトバクテル・パステウリアンス(Chandraら、Arch.Microbiol. 176:443-451(2001))及びクルイペロマイセス・ラクチス(Kriegerら、Eur.J.Biochem. 269:3256-3263(2002))の酵素を含む。

【表 5 0】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>pdc</i>	P06672.1	118391	ジモモナス モビルス
<i>pdcI</i>	P06169	30923172	サッカロミセス セレビスシアエ
<i>pdc</i>	Q8L388	75401616	アセトバクテル パステウリアンス
<i>pdcI</i>	Q12629	52788279	クルイペロマイセス ラクチス

【0290】

PDCのように、ベンゾイルギ酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.7)は、広い基質範囲を有し、酵素操作研究のターゲットになってきた。シュードモナス・ブチダの酵素は、広範に研究され、この酵素の結晶構造が入手可能である(Hassonら、Biochemistry 37:9918-9930(1998);Polovnikovaら、Biochemistry 42:1820-1830(2003))。シュードモナス・ブチダ酵素の活性部位における2つの残基の部位指向性変異は、天然及び非天然基質の親和性(K_m)を変化させた(Siegert Protein Eng Des Sel 18:345-357(2005))。この酵素の特性が、指向的操作によってさらに改良された(Lingenら、Protein Eng 15:585-593(2002));Lingen Chembiochem 4:721-726(2003))。mdlCによってコードされるシュードモナス・アエルギノサの酵素も実験的に特徴づけられた(Barrowmanら、FEMS Microbiology Letters 34:57-60(1986))。シュードモナス・ツツェリ、シュードモナス・フルオレセンシス及び他の生物体のさらなる遺伝子を配列相同性によって推定するか、又はシュードモナス・ブチダにおいて開発された成長選択システムを使用して特定することができる(Henningら、Appl.Environ.Microbiol. 72:7510-7517(2006))。

【表 5 1】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>mdlC</i>	P20906.2	3915757	シュードモナス プチダ
<i>mdlC</i>	Q9HUR2.1	81539678	シュードモナス アエルギノサ
<i>dpgB</i>	ABN80423.1	126202187	シュードモナス スツトゼリ
<i>ilvB-1</i>	YP_260581.1	70730840	シュードモナス フルオレセンス

【0291】

(4.2.1.a- ヒドロ-リアーゼ)

ユーバクテリウム・バルケリの2-(ヒドロキシメチル)グルタル酸デヒドラターゼは、例示的なヒドロ-リアーゼである。この酵素は、ニコチン酸異化の観点で研究され、hmdによってコードされる(Alhapelら、Proc Natl Acad Sci U S A 103:12341-12346(2006))。高度な配列相同性を有する類似の酵素が、バクテロイデス・カピロサス、アナエロツルンカス・コリホミニス及びナトラナエロビウス・テルモフィルスに見いだされる。

【表 5 2】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>hmd</i>	ABC88407.1	86278275	ユーバクテリウム バルケリ
<i>BACCAP_02294</i>	ZP_02036683.1	154498305	バクテロイデス カピロサス ATCC 29799
<i>ANACOL_02527</i>	ZP_02443222.1	167771169	アナエロツルンカス コリホミニス DSM 17241
<i>NtherDRAFT_2368</i>	ZP_02852366.1	169192667	ナトラナエロビウス テルモフィルス JW/NM-WN-LF

【0292】

第2の例示的なヒドロ-リアーゼは、リンゴ酸のフマル酸への脱水を触媒する酵素であるフマル酸ヒドラターゼである。この酵素についての豊富な構造情報が入手可能であり、研究者は、該酵素を成功裡に操作して、活性、阻害及び局在性を変化させた(Weaver, T. Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr. 61:1395-1401(2005))。さらなるフマル酸ヒドラターゼは、エシェリキア・コリ(Estevezら、Protein Sci. 11:1552-1557(2002); Hong及びLee Biotechnol. Bioprocess Eng. 9:252-255(2004); Rose及びWeaver Proc Natl Acad Sci U S A 101:3393-3397(2004))、カンピロバクテル・ジェジュニ(Smithら、Int. J. Biochem. Cell Biol 31:961-975(1999))及びテルムス・テルモフィルス(Mizobataら、Arch. Biochem. Biophys. 355:49-55(1998))のfumC、並びにラッタス・ノルベギクス(Kobayashiら、J Biochem. 89:1923-1931(1981))のfumHによってコードされるものを含む。高度な配列相同性を有する類似の酵素は、アラビドプシス・タリアナのfum1及びコリネバクテリウム・グルタミクムのfumCを含む。

【表 5 3】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>fumC</i>	P05042.1	120601	エシェリキア コリ K12
<i>fumC</i>	O69294.1	9789756	カンピロバクテル ジェジュニ
<i>fumC</i>	P84127	75427690	テルムス テルモフィルス
<i>fumH</i>	P14408.1	120605	ラッタス ノルベギクス
<i>fum1</i>	P93033.2	39931311	アラビドプシス タリアナ
<i>fumC</i>	Q8NRN8.1	39931596	コリネバクテリウム グルタミカム

【0293】

2-メチルリンゴ酸デヒドラターゼとも呼ばれるシトラリンゴ酸ヒドロリラーゼは、2-メ

10

20

30

40

50

チルリンゴ酸をメサコン酸に変換する。2-メチルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性が、グルタミン酸分解VI経路の観点で、クロストリジウム・テタノモルフム、モルガネラ・モルガニ、シトロバクテル・アマロナチクスにおいて検出された(Kato及びAsano Arch.Microbiol 168:457-463(1997))。しかし、この酵素をコードする遺伝子は、今日まで配列されていない。

【0294】

C.アセトブチリクムのcrtの遺伝子生成物は、3-ヒドロキシブチリル-CoAのクロトニル-CoAへの脱水を触媒する(Atsumiら、Metab Eng.;29 (2007));Boyntonら、Journal of Bacteriology 178:3015-3024(1996))。P.プチダのエノイル-CoAヒドラターゼ、phaA及びphaBは、フェニル酢酸異化を通じて二重結合のヒドロキシル化を実施すると考えられる(Oliveiraら、Proc Natl Acad Sci USA 95(11):6419-6424(1998))。P.フルオレセンスのpaaA及びpaaBは、相似変換を触媒する(14 Oliveraら、前出、1998)。最後に、いくつかのエシェリキア・コリ遺伝子は、maoC(Park及びLee J Bacteriol 185(18):5391-5397(2003)), paaF(Park及びLee Biotechnol Bioeng. 86(6):681-686(2004a));Park及びLee Appl Biochem Biotechnol. 113-116:335-346(2004b));Ismailら、Eur J Biochem 270(14):p.3047-3054(2003)及びpaaG(Park及びLee、前出、2004;Park及びLee、前出、2004b;Ismailら、前出、2003)を含むエノイル-CoAヒドラターゼ機能性を示すことが証明された。

【表54】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>maoC</i>	NP_415905.1	16129348	エシェリキア コリ
<i>paaF</i>	NP_415911.1	16129354	エシェリキア コリ
<i>paaG</i>	NP_415912.1	16129355	エシェリキア コリ
<i>crt</i>	NP_349318.1	15895969	クロストリジウム アセトブチリクム
<i>paaA</i>	NP_745427.1	26990002	シュードモナス プチダ
<i>paaB</i>	NP_745426.1	26990001	シュードモナス プチダ
<i>phaA</i>	ABF82233.1	106636093	シュードモナス フルオレセンス
<i>phaB</i>	ABF82234.1	106636094	シュードモナス フルオレセンス

【0295】

大腸菌遺伝子fadA及びfadBは、ケトアシル-CoAチオラーゼ、3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ及びエノイル-CoAヒドラターゼ活性を示す多酵素複合体をコードする(Yangら、Biochemistry 30(27):p. 6788-6795(1991);Yangら、J Biol Chem 265(18): p. 10424-10429(1990);Yangら、J Biol Chem 266(24):p. 16255(1991);Nakahigashi及びInokuchi Nucleic Acids Res 18(16):p. 4937 (1990))。fadI及びfadJ遺伝子は、類似の機能をコードし、嫌気性条件でのみ自然に発現される(Campbellら、Mol Microbiol 47(3):p. 793-805(2003))。(ネガチブレギュレーターfadRをノックアウトすることによって)fadBを活性化し、非原生ケトチオラーゼ(ラルストニア・ユートロファのphaA)を同時発現することを含む、大腸菌のポリ[(R)-3-ヒドロキシ酪酸]を生成する方法が既に記載されている(Satoら、J Biosci Bioeng 103(1):38-44(2007))。この研究は、β-酸化酵素、特に、3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ及びエノイル-CoAヒドラターゼ活性の両方をコードするfadBの遺伝子生成物が、アセチル-CoA前駆体からより長い鎖分子を生成するための経路の一部として機能できることを明確に実証している。

【表 5 5】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>fadA</i>	YP_026272.1	49176430	エシェリキア コリ
<i>fadB</i>	NP_418288.1	16131692	エシェリキア コリ
<i>fadI</i>	NP_416844.1	16130275	エシェリキア コリ
<i>fadJ</i>	NP_416843.1	16130274	エシェリキア コリ
<i>fadR</i>	NP_415705.1	16129150	エシェリキア コリ

【0296】

10

(4.3.1.a- アンモニア-リアーゼ)

アスパラギン酸のフマル酸への脱アミノ化を触媒するアスパルターゼ(EC 4.3.1.1)は、微生物において一般的な酵素であり、広く特徴づけられた(Viola, R. E. Adv.Enzymol. Relat Areas Mol.Biol 74:295-341(2000))。aspAによってコードされる大腸菌アスパルターゼの結晶構造が解明された(Shiら、Biochemistry 36:9136-9144 (1997))。大腸菌酵素は、代替的な基質のアスパラギン酸フェニルメチルエステル、アスパラギン、ベンジル-アスパラギン酸及びリンゴ酸と反応することも証明された(Maら、Ann N.Y.Acad Sci 672:60-65(1992))。個別の研究において、基質特異性を変化させるために、この酵素に対して指向性進化が採用された(Asanoら、Biomol.Eng 22:95-101(2005))。アスパルターゼ機能性を有する酵素は、ハエモフィルス・インフルエンザエ(Sjostromら、Biochim.Biophys.Acta 1324:182-190(1997))、シュードモナス・フルオレセンス(Takagiら、J.Biochem. 96:545-552(1984))、バシルス・スプチルス(Sjostromら、Biochim.Biophys.Acta 1324:182-190(1997))及びセラチア・マルセセンス(Takagi及びKisumi J Bacteriol. 161:1-6(1985))においても特徴づけられた。

20

【表 5 6】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>aspA</i>	NP_418562	90111690	エシェリキア コリ <i>K12 subsp. MG1655</i>
<i>aspA</i>	P44324.1	1168534	ハエモフィルス インフルエンザエ
<i>aspA</i>	P07346.1	114273	シュードモナス フルオレセンス
<i>ansB</i>	P26899.1	114271	バシルス スプチルス
<i>aspA</i>	P33109.1	416661	セラチア マルセセンス

30

【0297】

ベータ-メチルアスパルターゼ又は3-メチルアスパラギン酸アンモニア-リアーゼとしても知られる3-メチルアスパルターゼ(EC 4.3.1.2)は、トレオ-3-メチルアスパラギン酸のメサコン酸への脱アミン化を触媒する。クロストリジウム・テタノモルフムの3-メチルアスパルターゼが複製され、大腸菌に機能的に発現され、結晶化された(Asuncionら、Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr. 57:731-733(2001);Asuncionら、J Biol Chem. 277:8306-8311(2002);Bottingら、Biochemistry 27:2953-2955(1988);Godaら、Biochemistry 31:10747-10756 (1992)。シトロバクテル・アマロナチクスにおいて、この酵素は、BAA28709によってコードされる(Kato及びAsano Arch.Microbiol 168:457-463(1997))。3-メチルアスパルターゼも大腸菌YG1002から結晶化されたが(Asano及びKato FEMS Microbiol Lett. 118:255-258(1994))、タンパク質配列は、GenBankなどの好適データベースに列挙されていない。配列相同性を使用して、C.テタニのCTC_02563及びエシェリキア・コリO157:H7のECs0761を含むさらなる候補遺伝子を特定することができる。

40

【表 5 7】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
MAL	AAB24070.1	259429	クロストリジウム テタノモルフム
BAA28709	BAA28709.1	3184397	シトロバクテル アマロナチクス
CTC_02563	NP_783085.1	28212141	クロストリジウム テタニ
ECs0761	BAB34184.1	13360220	エシェリキア コリ O157:H7 str. Sakai

【 0 2 9 8 】

10

エノイル-CoA生成物を形成するアンモニア-リアーゼ酵素候補は、ベータ-アラニル-CoAを脱アミン化するベータ-アラニル-CoAアンモニア-リアーゼ(EC 4.3.1.6)、及び3-アミノブチリル-CoAアンモニア-リアーゼ(EC 4.3.1.14)を含む。2つのベータ-アラニル-CoAアンモニアリアーゼが、クロストリジウム・プロピオニウムにおいて特定され、特徴づけられた(Herrmannら、FEBS J. 272:813-821(2005))。他のベータ-アラニル-CoAアンモニアリアーゼは、今日まで特定されていないが、遺伝子候補を配列類似性によって特定することができる。1つの当該候補は、ミクソコッカス・キサントスのMXAN_4385である。

【表 5 8】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>ac12</i>	CAG29275.1	47496504	クロストリジウム プロピオニウム
<i>ac11</i>	CAG29274.1	47496502	クロストリジウム プロピオニウム
<i>MXAN_4385</i>	YP_632558.1	108756898	ミクソコッカス キサントス

20

【 0 2 9 9 】

(5.3.3.a- イソメラーゼ)

クロストリジウム・アミノブチリウム及びC.クルイベリの両方の4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼは、4-ヒドロキシブチリル-CoAのクロトニル-CoAへの可逆的変換を触媒し、固有のビニルアセチル-CoA Δ-イソメラーゼ活性を保持する(Scherf及びBuckel Eur .J Biochem. 215:421-429(1993);Scherfら、Arch.Microbiol 161:239-245(1994))。N末端アミノ酸配列を含む両原生酵素が精製され、特徴づけられた(Scherf及びBuckel、前出、1993;Scherfら、前出、1994)。C.アミノブチリウム及びC.クルイベリのabfD遺伝子は、これらのN末端アミノ酸配列と厳密に一致するため、4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ/ビニルアセチル-CoA Δイソメラーゼをコードしている。加えて、ボルフィロモナス・ギンギバリスATCC 33277のabfD遺伝子は、ゲノムプロジェクトから相同性を介して特定される。

30

【表 5 9】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>abfD</i>	YP_001396399.1	153955634	クロストリジウム クレイベリDSM 555
<i>abfD</i>	P55792	84028213	クロストリジウム アセトブチリウム
<i>abfD</i>	YP_001928843	188994591	ボルフィロモナス ギンギバリス ATCC 33277

40

【 0 3 0 0 】

(5.4.3.a- アミノムターゼ)

リシン2,3-アミノムターゼ(EC 5.4.3.2)は、リシンを(3S)-3,6-ジアミノヘキサン酸に変換して、アミン基を2位から3位にシフトさせる例示的なアミノムターゼである。該酵素は、フソバクテリウム・ヌレアツム(*Fusobacterium nuleatum*)(kamA)(Barkerら、J.Bacte

50

riol. 152:201-207(1982))及びクロストリジウム・スブテルミナレ(kamA)(Chirpichら、J. Biol. Chem. 245:1778-1789(1970))を含む、リシンを酢酸及び酪酸に発酵させる細菌に見いだされる。クロストリジウム・スブテルミナレの酵素が結晶化された(Leporeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 102:13819-13824(2005))。この機能をコードする酵素は、バシルス・スブチルスのyodOによってもコードされる(Chenら、Biochem. J. 348 Pt 3:539-549(2000))。該酵素は、ピリドキサル5'-リン酸を共同因子として利用し、S-アデノシルメトイオンによる活性化を必要とし、L-リシンのみと反応する立体選択性を有する。該酵素は、代替的な基質と反応することが証明されていない。

【表 6 0】

10

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
yodO	O34676.1	4033499	バシルス スブチリス
kamA	Q9XBQ8.1	75423266	クロストリジウム スブテルミナレ
kamA	Q8RHX4	81485301	フソバクテリウム スレアツム subsp. スレアツム

【 0 3 0 1】

第2のアミノムターゼ、即ちベータ-リシン5,6-アミノムターゼ(EC5.4.3.3)は、(3S)-3,6-ジアミノヘキサン酸を(3S,5S)-3,5-ジアミノヘキサン酸に変換して、末端アミノ基を6位から5位にシフトさせる酢酸及び酪酸へのリシン発酵の次の工程を触媒する。この酵素は、また、リシンの2,5-ジアミノヘキサン酸への変換を触媒し、リシン-5,6-アミノムターゼ(EC 5.4.3.4)とも呼ばれる。該酵素は、クロストリジウム・スティックランジ(kamD、kamE)において結晶化された(Berkovitchら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 101:15870-15875(2004))。ポルフィロモナス・ギンギバリスの酵素も特徴づけられた(Tangら、Biochemistry 41:8767-8776 (2002))。

20

【表 6 1】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
kamD	AAC79717.1	3928904	クロストリジウム スティックランジ
kamE	AAC79718.1	3928905	クロストリジウム スティックランジ
kamD	NC_002950.2, NP_905288.1	34539880, 34540809	ポルフィロモナス ギンギバリス W83
kamE	NC_002950.2, NP_905289.1	34539880, 34540810	ポルフィロモナス ギンギバリス W83

30

【 0 3 0 2】

オルニチン4,5-アミノムターゼ(EC 5.4.3.5)は、D-オルニチンを2,4-ジアミノペンタン酸に変換して、末端アミンを隣接炭素にシフトさせる。クロストリジウム・スティックランジの酵素は、oraE及びoraSの2つの遺伝子によってコードされ、大腸菌において複製、配列及び発現された(Chenら、J. Biol. Chem. 276:44744-44750(2001))。この酵素は、今日まで他の生物体において特徴づけられていない。

40

【表 6 2】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
oraE	AAK72502	17223685	クロストリジウム スティックランジ
oraS	AAK72501	17223684	クロストリジウム スティックランジ

【 0 3 0 3】

チロシン2,3-アミノムターゼ(EC 5.4.3.6)は、アミンを2位から3位にシフトさせること

50

によってチロシンを3-アミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロパン酸に可逆的に変換するチロシン生合成に参与する。ストレプトマイセス・グロビスポルスにおいて、該酵素は、チロシン誘導体と反応することも証明された(Christensonら、Biochemistry 42:12708-12718(2003))。配列情報は、入手可能でない。

【0304】

ロイシン2,3-アミノムターゼ(EC 5.4.3.7)は、ロイシン分解及び生合成を通じて、L-ロイシンをベータ-ロイシンに変換する。ロイシン2,3-アミノムターゼに対するアッセイは、多くの生物体における活性を検出したが(Poston、J. M. Methods Enzymol. 166:130-135(1988))、該酵素をコードする遺伝子は、今日まで特定されていない。

【0305】

Cargillは、L-アラニン β -アラニンに変換することで、4つの生化学工程でピルビン酸から3-HPへの経路を生成する新規の2,3-アミノムターゼ酵素を開発した(Liaoら、米国公開第2005-0221466号)。

【0306】

(6.2.1.a- 酸-チオールリガーゼ)

例示的な酸-チオールリガーゼは、インビボで可逆的な反応である、1つのATPのコンカミナント消費を伴うコハク酸からのスクシニル-CoAの形成をともに触媒する大腸菌のsucDの遺伝子生成物である(Buckら、Biochemistry 24(22):p.6245-6252(1985))。さらなる例示的なCoA-リガーゼは、配列がまだ特徴づけられていないラットジカルボン酸-CoAリガーゼ(Vamecqら、Biochem J. 230(3):p. 683-693(1985))、P.クリソゲヌムの2つの特徴づけられたフェニル酢酸-CoAリガーゼ(Lamas-Maceirasら、Biochem J 395(1):147-155(2006); Wangら、Biochem Biophys Res Commun、360(2):453-458(2007))、シュードモナス・ブチダのフェニル酢酸-CoAリガーゼ(Martinez-Blancoら、J Biol Chem. 265(12):7084-7090(1990))、及びバシルス・スプチルスの6-カルボキシヘキサン酸-CoAリガーゼ(Bowerら、J Bacteriol 178(14):4122-4130(1996))を含む。

【表63】

遺伝子	アクセッションNo.	GI No.	生物
<i>sucC</i>	NP_415256.1	16128703	エシェリキア コリ
<i>sucD</i>	AAC73823.1	1786949	エシェリキア コリ
<i>phl</i>	CAJ15517.1	77019264	ペニシルム クリソゲヌム
<i>phlB</i>	ABS19624.1	152002983	ペニシルム クリソゲヌム
<i>paaF</i>	AAC24333.2	22711873	シュードモナス ブチダ
<i>bioW</i>	NP_390902.2	50812281	バシルス スプチリス

【0307】

(実施例V)

(スクシニル-CoAからの例示的なBDO経路)

本実施例では、スクシニル-CoAからの例示的なBDO経路について記載する。

【0308】

スクシニル-CoAからのBDO経路は、本明細書に記載されるとともに、これまでに記載されている(それぞれが参照により本明細書に組み込まれている、2008年3月14日に出願された米国出願第12/049,256号及び2008年3月14日に出願されたPCT出願第US08/57168号参照)。さらなる経路を図8Aに示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表15に示す。

【0309】

手短に述べると、スクシニル-CoAをスクシニル-CoAレダクターゼ(又はコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によってコハク酸セミアルデヒドに変換することができる。コハク酸セミアルデヒドを、既に記載されているように4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-ヒドロキシ酪酸に変換することができる。代替的

に、スクシニル-CoAをスクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって4-ヒドロキシ酪酸に変換することができる。4-ヒドロキシ酪酸を、既に記載されているように4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)によって、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)若しくは4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ(若しくは4-ヒドロキシブチリル-CoAシンセターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシ酪酸を、既に記載されているように4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ(EC 2.7.2.a)によって4-ヒドロキシブチリル-リン酸に変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-リン酸を、既に記載されているようにホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ(EC 2.3.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-リン酸を、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)(アシルリン酸レダクターゼ)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを、既に記載されているように1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

【表 6 4】

Docket No.: 066662-0251

表 15. スクシニル-CoAからのBDO経路

図	EC クラス	所望の 基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な 場合)	生物	公知の基質
8A	1.2.1.b	スクシニル-CoA	コハク酸 セミアルデヒド	スクシニル-CoA レタクターゼ (又はコハク酸 セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイベリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ポルフィロモナス ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ セデュラ	マロニル-CoA
8A	1.1.1.a	コハク酸 セミアルデヒド	4- ヒドロキシ酪酸	4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ	<i>4hbd</i>	YP_726053.1	ラルストニア ユーロプア <i>HI6</i>	4-ヒドロキシ酪酸
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイベリ <i>DSM 555</i>	4-ヒドロキシ酪酸
					<i>4hbd</i>	Q94B07	アラビドプシス タリアナ	4-ヒドロキシ酪酸
8A	1.1.1.c	スクシニル-CoA	4- ヒドロキシ酪酸	スクシニル-CoA レタクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトチリウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロフレクスウス アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンドシア キネンシス	長鎖アシル- CoA

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

8A	2.8.3.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル -CoAトランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クレイベリ	コハク酸, 4- ヒドロキシ酪酸, 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコッカス フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア コリ	ブタン酸
8A	3.1.2.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル -CoAトランスフェラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア コリ	アジピル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サピエンス	3- ヒドロキシプロパ ノイル-CoA
8A	6.2.1.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル -CoA リガーゼ (又は4- ヒドロキシブチリル-CoA シンターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシラム クリソゲスム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス スプトリス	6-カルボキシ ヘキサン酸

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

8A	2.7.2.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチ リル-リン酸	4-ヒドロキシ酪酸 キナーゼ	ackA	NP_416799.1	エシエリキア コリ	酢酸, プロピオン酸
					buk1	NP_349675	クロストリジウム アセトブチリウム	酪酸
					buk2	Q97III	クロストリジウム アセトブチリウム	酪酸
8A	2.3.1.a	4- ヒドロキシブチ リル-リン酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	ホスホトランス-4- ヒドロキシブチリラーゼ	ptb	NP_349676	クロストリジウム アセトブチリウム	ブチリル-リン酸
					ptb	AAR19757.1	酪酸-産生 バクテリウム L2-50	ブチリル-リン酸
					ptb	CAC07932.1	バシルス メガテリウム	ブチリル-リン酸
8A	1.2.1.d	4- ヒドロキシブチ リル-リン酸	4-ヒドロキシブチナ ール	4-ヒドロキシブチナール デヒドロゲナーゼ (リン酸化)	asd	NP_417891.1	エシエリキア コリ	L-4-アスパルチル- リン酸
					proA	NP_414778.1	エシエリキア コリ	L-グルタミル-5- リン酸
					gapA	P0A9B2.2	エシエリキア コリ	グリセルアルデヒド- 3-リン酸

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

8A	1.2.1.b	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	4-ヒドロキシブタナ ール	4-ヒドロキシブチリル-CoA レタクターゼ (又は 4- ヒドロキシブタナール デヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイベリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ボルフィロモナス ギンギハリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808. 1	メタロスファエラ セデュラ	マロニル-CoA
8A	1.1.1.c	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	1,4-ブタンジオール	4-ヒドロキシブチリル-CoA レタクターゼ (アルコール 形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトブチリウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロブレクサス アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディシア キネンシス	長鎖 アシル- CoA
8A	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナ ール	1,4-ブタンジオール	1,4-ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカリミセス セレビスシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイベリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

【0310】

(実施例VI)

(アルファ-ケトグルタル酸からのさらなる例示的なBDO経路)

50

本実施例では、アルファ-ケトグルタル酸からのBDO経路について記載する。

【0311】

スクシニル-CoAからのBDO経路は、本明細書に記載されるとともに、これまでに記載されている(それぞれが参照により本明細書に組み込まれている、2008年3月14日に出願された米国出願第12/049,256号及び2008年3月14日に出願されたPCT出願第US08/57168号参照)。さらなる経路を図8Bに示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表16に示す。

【0312】

手短に述べると、アルファ-ケトグルタル酸を、既に記載されているようにアルファ-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.a)によってコハク酸セミアルデヒドに変換することができる。代替的に、アルファ-ケトグルタル酸をグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(EC 1.4.1.a)によってグルタミン酸に変換することができる。4-アミノ酪酸を4-アミノ酪酸オキシドレダクターゼ(脱アミン化)(EC 1.4.1.a)又は4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によってコハク酸セミアルデヒドに変換することができる。グルタミン酸をグルタミン酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.a)によって4-アミノ酪酸に変換することができる。コハク酸セミアルデヒドを、既に記載されているように4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-ヒドロキシ酪酸に変換することができる。4-ヒドロキシ酪酸を、既に記載されているように4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)によって、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)若しくは4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ(若しくは4-ヒドロキシブチリル-CoAシンセターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシ酪酸を4-ヒドロキシ酪酸キナーゼ(EC 2.7.2.a)によって4-ヒドロキシブチリル-リン酸に変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-リン酸を、既に記載されているようにホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ(EC 2.3.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-リン酸を4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)(アシルリン酸レダクターゼ)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを、既に記載されているように4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを、既に記載されているように1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

10

20

30

【表 6 5】

Docket No.: 066662-0251

表16. アルファ-ケトグルタル酸からのBDO経路

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な 場合)	生物	公知の基質
8B	4.1.1.a	アルファ- ケトグルタル酸	コハク酸 セミアルデヒド	アルファ-ケトグルタル 酸デカルボキシナーゼ	<i>kgd</i>	O50463.4	ミコバクテリウム ツベルクローシス	アルファ- ケトグルタル酸
					<i>gadA</i>	NP_417974	エシェリキア コリ	グルタミン酸
					<i>gadB</i>	NP_416010	エシェリキア コリ	グルタミン酸
8B	1.4.1.a	アルファ- ケトグルタル酸	グルタミン酸	グルタミン酸 デヒドロゲナーゼ	<i>gdhA</i>	P00370	エシェリキア コリ	グルタミン酸
					<i>gdh</i>	P96110.4	テルモトガ マリチマ	グルタミン酸
					<i>gdhA1</i>	NP_279651.1	ハロバクテリウム サリナラム	グルタミン酸
8B	1.4.1.a	4-アミノ酪酸	コハク酸 セミアルデヒド	4-アミノ酪酸 オキシドレタクターゼ (脱アミノ化)	<i>lysDH</i>	AB052732	グオバシルス ステアロテルモフィルス	リジン
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	アエロピルム ペルニクス KI	リジン
					<i>ldh</i>	P0A393	バシルス セレウス	ロイシン, イソロイシン, バリン, 2- アミノブタン酸

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

8B	2.6.1.a	4-アミノ酪酸	コハク酸 セミアルデヒド	4-アミノ酪酸 トランスアミナーゼ	<i>gabT</i>	P22256.1	エシエリキア コリ	4- アミノブチリラート
					<i>puuE</i>	NP_415818.1	エシエリキア コリ	4- アミノブチリラート
					<i>UGAI</i>	NP_011533.1	サッカロミセス セレビシアエ	4- アミノブチリラート
8B	4.1.1.a	グルタミン酸	4-アミノ酪酸	グルタミン酸 デカルボキシラーゼ	<i>gadA</i>	NP_417974	エシエリキア コリ	グルタミン酸
					<i>gadB</i>	NP_416010	エシエリキア コリ	グルタミン酸
					<i>kgd</i>	O50463.4	ミコバクテリウム ツベルグロウシス	アルファ- ケトグルタル酸
8B	1.1.1.a	コハク酸 セミアルデヒド	4- ヒドロキシ酪酸	4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ	<i>4hbd</i>	YP_726053.1	ラルストニア ユーロファ H16	4- ヒドロキシ酪酸
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイベリ DSM 555	4- ヒドロキシ酪酸
					<i>4hbd</i>	Q94B07	アラビドプシス タリアナ	4- ヒドロキシ酪酸
8B	2.8.3.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoA トランスフェラー ゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クルイベリ	コハク酸, 4- ヒドロキシ酪酸, 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコツカス フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア コリ	ブタン酸

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

8B	3.1.2.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル- CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア コリ	アジビル-CoA
					<i>acoiI2</i>	NP_570103.1	ラッタス ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サピエンス	3- ヒドロキシプロパノ イル-CoA
8B	6.2.1.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル- CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoA リガーゼ (又は 4- ヒドロキシブチリル- CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシルム クリソゲスム	フェニル 酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス スブチリス	6- カルボキシヘキサ ン酸
8B	2.7.2.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル- リン酸	4-ヒドロキシ酪酸 キナーゼ	<i>ackA</i>	NP_416799.1	エシエリキア コリ	酢酸, プロピオン酸
					<i>buk1</i>	NP_349675	クロストリジウム アセトブチリクム	酪酸
					<i>buk2</i>	Q97III	クロストリジウム アセトブチリクム	酪酸

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

8B	2.3.1.a	4- ヒドロキシブチリ ル-リン酸	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	ホスホトランス-4- ヒドロキシブチラー ゼ	<i>ptb</i>	NP_349676	クロストリジウム アセトブチリクム	ブチリル- リン酸
					<i>ptb</i>	AAR19757.1	酪酸-産生 バクテリウム L2-50	ブチリル- リン酸
					<i>ptb</i>	CAC07932.1	バシルス メガテリウム	ブチリル- リン酸
8B	1.2.1.d	4- ヒドロキシブチリ ル-リン酸	4- ヒドロキシブタナ ール	4-ヒドロキシブタナール デヒドロゲナーゼ (リン酸化)	<i>asd</i>	NP_417891.1	エシエリキア コリ	L-4-アスパルチル- リン酸
					<i>proA</i>	NP_414778.1	エシエリキア コリ	L-グルタミル-5- リン酸
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシエリキア コリ	グリセルアルデヒ ド-3-リン酸
8B	1.2.1.b	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	4- ヒドロキシブタナ ール	4-ヒドロキシブチリル- CoA レダクターゼ (又は 4-ヒドロキシブタナール デヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ボルフィロモナス ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ セデュラ	マロニル-CoA
8B	1.1.1.c	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	1,4-ブタンジオール	4-ヒドロキシブチリル- CoA レダクターゼ (アルコール 形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトブチリクム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロブレクセス アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンジア キネンシス	長鎖 アシル-

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

8B	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナ ール	1,4-ブタンジオール	1,4-ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	ADH2	NP_014032.1	サツカリミセス セレビシアエ	CoA 一般
					yqhD	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					4hbd	L21902.1	クロストリジウム クルイベリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

50

【0313】

(実施例VII)

(4-アミノ酪酸からのBDO経路)

本実施例では、4-アミノ酪酸からの例示的なBDO経路について記載する。

【0314】

図9Aは、4-アミノ酪酸をBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表17に示す。

【0315】

手短に述べると、4-アミノ酪酸を4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又は4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ(又は4-アミノブチリル-CoAシンセターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-アミノブチリル-CoAに変換することができる。4-アミノブチリル-CoAを4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)(EC 1.4.1.a)又は4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によって4-オキソブチリル-CoAに変換することができる。4-オキソブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

【表 6 6】

Docket No.: 066662-0251

表 17. 4-アミノ酪酸からのBDO経路

図	ECクラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
9A	2.8.3.a	4-アミノ酪酸	4-アミノプロチリル-CoA	4-アミノ酪酸-CoAトランスフェラーゼ	<i>cat1</i> , <i>cat2</i> , <i>cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クルイベリ	コハク酸, 4-ヒドロキシ酪酸, 酪酸
					<i>gctA</i> , <i>gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミ/コツカスフェルズ/タンヌ	グルタル酸
					<i>atoA</i> , <i>atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア コリ	ブタン酸
9A	3.1.2.a	4-アミノ酪酸	4-アミノプロチリル-CoA	4-アミノプロチリル-CoAヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア コリ	アジピル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラッタス ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サピエンス	3-ヒドロキシプロパノイル-CoA
9A	6.2.1.a	4-アミノ酪酸	4-アミノプロチリル-CoA	4-アミノ酪酸-CoA リガーゼ (又は 4-アミノプロチリル-CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ベニシルム クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス スプチリス	6-カルボキシヘキサン酸

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

表 17 続き

9A	1.4.1.a	4- アミノプロチリル- CoA	4-オキシプロチリル -CoA	4-アミノプロチリル- CoA オキシドレダクタ ーゼ(脱アミノ化)	<i>lysDH</i>	AB052732	ゲオバシルス ステアロテルモフィルス	リジン
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	アエロピルム ペルニクスKI	リジン
					<i>ldh</i>	P0A393	バシルス セレウス	ロイシン,イソロイシン, バリン,2- アミノブタン酸
9A	2.6.1.a	4- アミノプロチリル- CoA	4-オキシプロチリル -CoA	4-アミノプロチリル- CoA トランスアミナー ゼ	<i>gabT</i>	P22256.1	エシェリキア コリ	4-アミノブチリラート
					<i>abat</i>	P50554.3	ラツス ノルベギクス	3-アミノ-2- メチルプロピオン酸
					<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	サツカロミセス クレイベリ	ベータ-アラニン
9A	1.1.1.a	4-オキシプロチリル -CoA	4- ヒドロキシプロチリ ル-CoA	4-ヒドロキシプロチリル- CoA デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サツカリミセス セレビシエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クレイベリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

表 17 続き

8	1.1.1.c	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	1,4-ブタンジオー ル	4-ヒドロキシブチリル- CoA レダクターゼ (アルコール 形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトブチリウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロフレクサス アウランチアケス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディア キネンシス	長鎖 アシル- CoA
8	1.2.1.b	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	4- ヒドロキシブタナ ール	4-ヒドロキシブチリル- CoA レダクターゼ(又は 4-ヒドロキシブタナ- ールデヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ボルフィロモナス ギンギハリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ セデュラ	マロニル-CoA
8	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナ ール	1,4-ブタンジオー ル	1,4-ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカリミセス セレビスアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

【 0 3 1 6 】

4-アミノ酪酸をBDOに変換する別の例示的なBDO経路を図9Aに示す。当該例示的なBDO経

50

路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表18に示す。

【0317】

手短に述べると、4-アミノ酪酸を4-アミノ酪酸CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又は4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ(又は4-アミノブチリル-CoAシンセターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-アミノブチリル-CoAに変換することができる。4-アミノブチリル-CoAを4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって4-アミノブタン-1-オールに変換することができる。代替的に、4-アミノブチリル-CoAを4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-アミノブタナールデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって4-アミノブタナールに変換し、4-アミノブタナールを4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-アミノブタン-1-オールに変換することができる。4-アミノブタン-1-オールを4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミン化)(EC 1.4.1.a)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

【表 6 7】

Docket No.: 066662-0251

表 18. 4-アミノ酪酸からのBDO経路

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用 可能な場合)	生物	公知の基質
9A	2.8.3.a	4- アミノ酪酸	4- アミノブチリル- CoA	4-アミノ酪酸 CoA トランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム ケルイペリ	コハク酸, 4- ヒドロキシ酪酸, 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコッカス フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア コリ	ブタン酸
9A	3.1.2.a	4- アミノ酪酸	4- アミノブチリル- CoA	4-アミノブチリル-CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア コリ	アジビル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サピエンス	3- ヒドロキシプロパ ノイル-CoA
9A	6.2.1.a	4- アミノ酪酸	4- アミノブチリル- CoA	4-アミノ酪酸-CoA リガーゼ (又は 4- アミノブチリル-CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシリウム クリノゲナム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス スブチリス	6- カルボキシヘキサン 酸

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

表 18 続き

9A	1.1.1.c	4- アミノプロチリル- CoA	4-アミノプロタン- 1-オール	4-アミノプロチリル-CoA レダクターゼ (アルコール 形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトプロチリクム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロフレグスウス アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンドシア キネンシス	長鎖 アシル- CoA
9A	1.2.1.b	4- アミノプロチリル- CoA	4-アミノプロタナー ル	4-アミノプロチリル-CoA レダクターゼ (又は 4- アミノプロタナー ルデヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム ケルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ポルフィロモナス ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ セデユラ	マロニル-CoA
9A	1.1.1.a	4-アミノプロタナー ル	4-アミノプロタン- 1-オール	4-アミノプロタン-1-オール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカリミセス セレシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム ケルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

表 18 続き

9A	1.4.1.a	4-アミノブタン-1-オール	4-ヒドロキシブタナール	4-アミノブタン-1-オール (脱アミノ化)	<i>lysDH</i>	AB052732	ジオバシルス ステアロテルモフィルス	リジン
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	アエロピルム ペルニクス <i>K1</i>	リジン
					<i>ldh</i>	P0A393	バシルス セレウス	ロイシン, イソロイシン, バリン, 2- アミノブタン酸
9A	2.6.1.a	4-アミノブタン-1-オール	4-ヒドロキシブタナール	4-アミノブタン-1-オール トランスアミナーゼ	<i>gabT</i>	P22256.1	エシエリキア コリ	4-アミノブチラート
					<i>abat</i>	P50554.3	ラツス ハルベギクス	3-アミノ-2- メチルプロピオン酸
					<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	サツカロミセス クルイペリ	ベータ-アラニン
9A	1.1.1.a	4-ヒドロキシブタナール	1,4-ブタンジオール	1,4-ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サツカロミセス セレピシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

【 0 3 1 8 】

図9Bは、4-アミノ酪酸をBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路

50

の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表19に示す。

【0319】

手短に述べると、4-アミノ酪酸を4-アミノ酪酸キナーゼ(EC 2.7.2.a)によって[(4-アミノブタノイル)オキシ]ホスホン酸に変換することができる。[(4-アミノブタノイル)オキシ]ホスホン酸を4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によって4-アミノブタナールに変換することができる。4-アミノブタナールを4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-アミノブタン-1-オールに変換することができる。4-アミノブタン-1-オールを4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)(EC 1.4.1.a)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によってヒドロキシブタナールに変換することができる。代替的に、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸を[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)(EC 1.4.1.a)又は[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によって[(4-オキソブタノリル)オキシ]ホスホン酸に変換することができる。[(4-オキソブタノリル)オキシ]ホスホン酸を4-ヒドロキシブチリル-リン酸デヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-リン酸に変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-リン酸を4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

【表 6 8】

表19. 4-アミノ酪酸からのBDO経路

図	ECクラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
9B	2.7.2.a	4-アミノ酪酸	[(4-アミノプタノイル)オキシ]ホスホン酸	4-アミノ酪酸キナーゼ	<i>ackA</i>	NP_416799.1	エシエリキア コリ	酢酸, プロピオン酸
					<i>bukI</i>	NP_349675	クロストリジウム アセトブチリクム	酪酸
					<i>proB</i>	NP_414777.1	エシエリキア コリ	グルタミン酸
9B	1.2.1.d	[(4-アミノプタノイル)オキシ]ホスホン酸	4-アミノプタナール	4-アミノプチアルデヒド デヒドロゲナーゼ (リン酸化)	<i>asd</i>	NP_417891.1	エシエリキア コリ	L-4-アスパルチルリン酸
					<i>proA</i>	NP_414778.1	エシエリキア コリ	L-グルタミル-5-リン酸
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシエリキア コリ	グリセルアルデヒド-3-リン酸
9B	1.1.1.a	4-アミノプタナール	4-アミノプタン-1-オール	4-アミノプタン-1-オール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカリミセス セレジアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

表19 続き

9B	1.4.1.a	4-アミノブタン-1-オール	4-ヒドロキシブタナール	4-アミノブタン-1-オール オキシドレタクターゼ(脱アミノ化)	<i>lysDH</i>	AB052732	デオキシルース ステアロテルモフィルス	リジン
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	アエロピルム ペルニクスKI	リジン
					<i>ldh</i>	P0A393	バシルス セレウス	ロイシン, イソロイシン, バリン, 2- アミノブタン酸
9B	2.6.1.a	4-アミノブタン-1-オール	4-ヒドロキシブタナール	4-アミノブタン-1-オール トランスアミナーゼ	<i>gabT</i>	P22256.1	エシエリキア コリ	4-アミノブチリラート
					<i>abat</i>	P50554.3	ラツス ノルベギクス	3-アミノ-2- メチルプロピオン酸
					<i>SKyPYD4</i>	ABF58893.1	サツカロミセス クルイペリ	ペーターアラニン
9B	1.4.1.a	[(4-アミノブタン-1-オール)オキシ]ホスホン酸	[(4-オキシブタン-1-オール)オキシ]ホスホン酸	[(4-オキシブタン-1-オール)オキシ]ホスホン酸 オキシドレタクターゼ(脱アミノ化)	<i>lysDH</i>	AB052732	デオキシルース ステアロテルモフィルス	リジン
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	アエロピルム ペルニクスKI	リジン
					<i>ldh</i>	P0A393	バシルス セレウス	ロイシン, イソロイシン, バリン, 2- アミノブタン酸

10

20

30

40

表I9 続き

9B	2.6.1.a	[(4- アミノプロパノイル) オキシ] ホスホン酸	[(4- オキシプロパノイル) オキシ] ホスホン酸	[(4- アミノプロパノイル) オキシ] ホスホン酸 トランスアミンナーゼ	<i>gabT</i>	P22256.1	エシエリキア コリ	4-アミノプロチラート
					<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	サッカロミセス クルイペリ	ベータ-アラニン
					<i>serC</i>	NP_415427.1	エシエリキア コリ	ホスホセリン, ホスホヒドロキシトレオニン
9B	1.1.1.a	[(4- オキシプロパノイル) オキシ] ホスホン酸	4- ヒドロキシプロチル -リン酸	4- ヒドロキシプロチル- リン酸 デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカリミセス セレビスシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド
9B	1.2.1.d	4- ヒドロキシプロチル -リン酸	4- ヒドロキシプロチナ- ル	4- ヒドロキシプロチアル デヒド デヒドロゲナーゼ (リン酸化)	<i>asd</i>	NP_417891.1	エシエリキア コリ	L-4-アスパルチル-リン酸
					<i>proA</i>	NP_414778.1	エシエリキア コリ	L-グルタミル-5-リン酸
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシエリキア コリ	グリセルアルデヒド-3- リン酸

10

20

30

40

9B	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナ ール	1,4-ブタンジジオー ル	1,4-ブタンジジオール デヒドロゲナーゼ	ADH2	NP_014032.1	サツカリミセス セレビシアエ	一般
					yqhD	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					4hbd	L21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

【 0 3 2 0 】

図9Cは、アセト酢酸を介する例示的な経路を示す。

50

【0321】

(実施例VIII)

(アルファ-ケトグルタル酸の例示的なBDO経路)

本実施例では、アルファ-ケトグルタル酸からの例示的なBDO経路について記載する。

【0322】

図10は、アルファ-ケトグルタル酸をBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表20に示す。

【0323】

手短に述べると、アルファ-ケトグルタル酸をアルファ-ケトグルタル酸5-キナーゼ(EC 2.7.2.a)によってアルファ-ケトグルタリル-リン酸に変換することができる。アルファ-ケトグルタリル-リン酸を2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によって2,5-ジオキソペンタン酸に変換することができる。2,5-ジオキソペンタン酸を2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ(EC 1.1.1.a)によって5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸に変換することができる。代替的に、アルファ-ケトグルタル酸をアルファ-ケトグルタル酸CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ(又はアルファ-ケトグルタリル-CoAシンセターゼ)(EC 6.2.1.a)によってアルファ-ケトグルタリル-CoAに変換することができる。アルファ-ケトグルタリル-CoAをアルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(又は2,5-ジオキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって2,5-ジオキソペンタン酸に変換することができる。2,5-ジオキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼによって5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸に変換することができる。代替的に、アルファ-ケトグルタリル-CoAをアルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸に変換することができる。5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.a)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)(EC 1.2.1.c)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。

10

20

【表 6 9】

Docket No.: 066662-0251

表20. アルファ-ケトグルタル酸からのBDO経路

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な 場合)	生物	公知の基質
10	2.7.2.a	アルファ- ケトグルタル酸	アルファ- ケトグルタル リン酸	アルファ- ケトグルタル酸 5- キナーゼ	<i>ackA</i>	NP_416799.1	エシエリキア コリ	酢酸, プロピオン酸
					<i>bukI</i>	NP_349675	クロストリジウム アセトブチリクム	酪酸
					<i>proB</i>	NP_414777.1	エシエリキア コリ	グルタミン酸
10	1.2.1.d	アルファ- ケトグルタル リン酸	2,5- ジオキソペンタン 酸	2,5- ジオキソペンタン 酸セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ (リン酸化)	<i>proA</i>	NP_414778.1	エシエリキア コリ	L-グルタミン-5-リン酸
					<i>asd</i>	NP_417891.1	エシエリキア コリ	L-4-アスパルチル-リン酸
					<i>gapA</i>	POA9B2.2	エシエリキア コリ	グリセルアルデヒド-3-リン 酸
10	1.1.1.a	2,5- ジオキソペンタン 酸	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン 酸	2,5- ジオキソペンタン 酸レダクターゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカリミセス セレビシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	1.21902.1	クロストリジウム クレイベリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

表 20 続き

10	2.8.3.a	アルファ- ケトグルタル酸	アルファ- ケトグルタリル- CoA	アルファ- ケトグルタル酸 CoA トランスフェラー ゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クレイベリ	コハク酸, 4- ヒドロキシ酪酸, 酪酸
					<i>gclA, gclB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコッカス フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア コリ	ブタン酸
10	3.1.2.a	アルファ- ケトグルタル酸	アルファ- ケトグルタリル- CoA	アルファ- ケトグルタリル- CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア コリ	アジビル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラッタス ハルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サビエンス	3-ヒドロキシプロパノイル -CoA
10	6.2.1.a	アルファ- ケトグルタル酸	アルファ- ケトグルタリル- CoA	アルファ- ケトグルタリル- CoA リガーゼ (又は アルファ- ケトグルタリル- CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシラム クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス スブチリス	6-カルボキシヘキサノ酸

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

表 20 続き

10	1.2.1.b	アルファ- ケトグルタリル- CoA	2,5- ジオキソペンタン 酸	アルファ- ケトグルタリル- CoA レタクターゼ (又は 2,5- ジオキソペンタン 酸 デヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイベリ	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808 .1	メタロスファエラ セデュラ	マロニル-CoA
					<i>bphG</i>	BAA03892.1	シュードモナス属	アセトアルデヒド, プロピオンアルデヒド, ブチルアルデヒド, イソブチルアルデヒド及び ホルムアルデヒド
10	1.1.1.a	2,5- ジオキソペンタン 酸	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸 デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i> <i>yqhD</i> <i>4hbd</i>	NP_014032.1 NP_417484.1 L21902.1	サッカリミセス セレビシアエ エシエリキア コリ クロストリジウム クルイベリ DSM555	一般 >C3 コハク酸 セミアルデヒド
10	1.1.1.c	アルファ- ケトグルタリル- CoA	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	アルファ- ケトグルタリル- CoA レタクターゼ (アルコール 形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトブチリウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロフレクスウス アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンドシア キネンシス	長鎖 アシル-CoA

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

10	4.1.1.a	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン 酸	4- ヒドロキシブタ ナール	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸 デカルボキシラーゼ	<i>pdC</i>	P06672.1	ジモモナス モビルス	2-オキソペンタン酸
					<i>mdlC</i>	P20906.2	シュードモナス プチダ	2-オキソペンタン酸
					<i>pdC1</i>	P06169	サッカロミセス セレビスシアエ	ピルビン酸
10	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタ ナール	1,4-ブタンジオー ル	1,4-ブタンジオー ル デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカリミセス セレビスシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM555	コハク酸 セミアルデヒド
10	1.2.1.c	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン 酸	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸 デヒドロゲナーゼ (脱炭酸)	<i>sucA, sucB, lpd</i>	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	エシエリキア コリ	アルファ-ケトグルタル酸
					<i>bfmBB, bfmBAA, bfmBAB, bfmBAB, pdhD</i>	NP_390283.1, NP_390285.1, NP_390284.1, P21880.1	バシルス スプチリス	バリン、ロイシン及び イソロイシンの2-ケト酸誘導体
					<i>Bckdha, Bckdhb, Dht, Dld</i>	NP_036914.1, NP_062140.1, NP_445764.1, NP_955417.1	ラッス ノルベギクス	バリン、ロイシン及び イソロイシンの2-ケト酸誘導体

10

20

30

40

50

(グルタミン酸からの例示的なBDO経路)

本実施例では、グルタル酸からの例示的なBDO経路について記載する。

【0325】

図11は、グルタミン酸をBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表21に示す。

【0326】

手短に述べると、グルタミン酸をグルタミン酸CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、グルタミル-CoAヒドローラーゼ(EC 3.1.2.a)又はグルタミル-CoAリガーゼ(又はグルタミル-CoAシンターゼ)(EC 6.2.1.a)によってグルタミル-CoAに変換することができる。代替的に、グルタミン酸をグルタミン酸5-キナーゼ(EC 2.7.2.a)によってグルタミン酸-5-リン酸に変換することができる。グルタミン酸-5-リン酸をグルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によってグルタミン酸-5-セミアルデヒドに変換することができる。グルタミル-CoAをグルタミル-CoAレダクターゼ(又はグルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によってグルタミン酸-5-セミアルデヒドに変換することができる。グルタミン酸-5-セミアルデヒドをグルタミン酸-5-セミアルデヒドレダクターゼ(EC 1.1.1.a)によって2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸に変換することができる。代替的に、グルタミル-CoAをグルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸に変換することができる。2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸を2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)(EC 1.4.1.a)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によって5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸に変換することができる。5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.a)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。代替的に、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシ化)(EC 1.2.1.c)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。

10

20

【表 7 0】

Docket No.: 0666662-0251

表21. グルタミン酸からのBDO経路

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用 可能な場合)	生物	公知の基質
11	2.8.3.a	グルタミン酸	グルタミル-CoA	グルタミル-CoA トランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クルイペリ	コハク酸, 4- ヒドロキシ酪酸, 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコッカス フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア コリ	ブタン酸
11	3.1.2.a	グルタミン酸	グルタミル-CoA	グルタミル-CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア コリ	アジピル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サビエンス	3-ヒドロキシプロパノイ ル-CoA
11	6.2.1.a	グルタミン酸	グルタミル-CoA	グルタミル-CoAリガー ゼ (又は グルタミル- CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシリウム クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス スプチリス	6-カルボキシヘキサン酸
11	2.7.2.a	グルタミン酸	グルタミル-5- リン酸	グルタミル-5-キナー ゼ	<i>ackA</i>	NP_416799.1	エシエリキア コリ	酢酸, プロピオン酸
					<i>bukI</i>	NP_349675	クロストリジウム アセトブチリクム	酪酸
					<i>proB</i>	NP_414777.1	エシエリキア コリ	グルタミン酸

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

表21 続き

11	1.2.1.d	グルタミン酸-5-リン酸	グルタミン酸-5-セミアルデヒド	グルタミン酸-5-セミアルデヒド (リン酸化)	<i>proA</i>	NP_414778.1	エシエリキア コリ	L-グルタミル-5-リン酸
					<i>asd</i>	NP_417891.1	エシエリキア コリ	L-4-アスパルチル-リン酸
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシエリキア コリ	グリセルアルデヒド-3-リン酸
11	1.2.1.b	グルタミル-CoA	グルタミン酸-5-セミアルデヒド	グルタミル-CoA レタクターゼ (又はグルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイベリ	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ セデュラ	マロニル-CoA
					<i>bphG</i>	BAA03892.1	シュードモナス属	アセトアルデヒド, フロピオンアルデヒド, フチアルデヒド, イソフチアルデヒド及びホルムアルデヒド
11	1.1.1.a	グルタミン酸-5-セミアルデヒド	2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸	グルタミン酸-5-セミアルデヒド レタクターゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカリミセス セレビスアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイベリ DSM 555	コハク酸セミアルデヒド

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

表21 続き

11	1.1.1.c	グルタミル-CoA	2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸	グルタミル-CoA レタクトターゼ (アルコ ール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトブチリウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロロフレグスウス アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディシア キネンシス	長鎖 アシル- CoA
11	1.4.1.a	2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸	5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸	2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸 オキシドレタクトターゼ (脱アミノ化)	<i>gdhA</i>	P00370	エシエリキア コリ	グルタミン酸
					<i>ldh</i>	P0A393	バシルス セレウス	ロイシン, イソロイシン, バリン, 2- アミノブタン酸
					<i>nadX</i>	NP_229443.1	テルモガ マリチマ	アスパラギン酸
11	2.6.1.a	2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸	5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸	2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸 トランスアミナーゼ	<i>aspC</i>	NP_415448.1	エシエリキア コリ	アスパラギン酸
					<i>AAT2</i>	P23542.3	サツカロミセス セレベシアエ	アスパラギン酸
					<i>avtA</i>	YP_026231.1	エシエリキア コリ	バリン, アルファ- アミノ酪酸

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

表21 続き

11	4.1.1.a	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	4- ヒドロキシブタナ ール	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸 デカルボキシラーゼ	<i>pdC</i>	P06672.1	ジモナス モビルス	2-オキソペンタン酸
					<i>mdlC</i>	P20906.2	シュードモナス フチダ	2-オキソペンタン酸
					<i>pdC1</i>	P06169	サッカロミセス セレビスシアエ	ピルビン酸
11	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナ ール	1,4-ブタンジオー ール	1,4-ブタンジオー ール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス セレビスシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイベリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド
11	1.2.1.c	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸 デヒドロゲナーゼ (脱炭酸)	<i>sucA, sucB, lpd</i>	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	エシエリキア コリ	アルファ-ケトグルタル 酸
					<i>bfmBB, bfmBAA, bfmBAB, bfmBAB, pdhD</i>	NP_390283.1, NP_390285.1, NP_390284.1, P21880.1	バシルス スプチリス	バリン、ロイシン及び イソロイシンの2-ケト 酸誘導体
					<i>Bckdha, Bckdhb, Dbt, Dld</i>	NP_036914.1, NP_062140.1, NP_445764.1, NP_955417.1	ラッス ナルベギクス	バリン、ロイシン及び イソロイシンの2-ケト 酸誘導体

10

20

30

40

【0327】

(実施例X)

(アセトアセチル-CoAからの例示的なBDO経路)

50

本実施例では、アセトアセチル-CoAからの例示的なBDO経路について記載する。

【0328】

図12は、アセトアセチル-CoAをBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表22に示す。

【0329】

手短に述べると、アセトアセチル-CoAを3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.a) によって3-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。3-ヒドロキシブチリル-CoAを3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ (EC 4.2.1.a) によってクロトノイル-CoAに変換することができる。クロトノイル-CoAをビニルアセチル-CoA Δ イソメラーゼ (EC 5.3.3.3) によってビニルアセチル-CoAに変換することができる。ビニルアセチル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ (EC 4.2.1.a) によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ (アルコール形成) (EC 1.1.1.c) によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ (又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ) (EC 1.2.1.b) によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.a) によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

【表 7 1】

Docket No.: 066662-0251

表 22. アセトアセチル-CoAからのBDO経路

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
12	1.1.1.a	アセトアセチル- CoA	3- ヒドロキシブチリ ル-CoA	3-ヒドロキシブチリル- CoA デヒドロゲナーゼ	<i>hbd</i>	NP_349314.1	クロストリジウム アセトブチリクム	3-ヒドロキシブチリル -CoA
					<i>hbd</i>	AAM14586.1	クロストリジウム ベージェリンクキ	3-ヒドロキシブチリル -CoA
					<i>Msed_1423</i>	YP_001191505	メタスファエアラ セデウラ	推定される3- ヒドロキシブチリル- CoA
12	4.2.1.a	3- ヒドロキシブチリ ル-CoA	クロトノイル-CoA	3-ヒドロキシブチリル- CoA デヒドラターゼ	<i>crt</i>	NP_349318.1	クロストリジウム アセトブチリクム	3-ヒドロキシブチリル -CoA
					<i>maoC</i>	NP_415905.1	エシェリキア コリ	3-ヒドロキシブチリル -CoA
					<i>paaF</i>	NP_415911.1	エシェリキア コリ	3-ヒドロキシアジピル -CoA
12	5.3.3.3	クロトノイル-CoA	ピニルアセチル- CoA	ピニルアセチル-CoA Δ- イソメラーゼ	<i>abfD</i>	YP_001396399.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	4-ヒドロキシブチリル -CoA
					<i>abfD</i>	P55792	クロストリジウム アミノブチリクム	4-ヒドロキシブチリル -CoA
					<i>abfD</i>	YP_001928843	ボルフィロモナス ギンギバリス ATCC 33277	4-ヒドロキシブチリル -CoA

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

表 22 続き

12	4.2.1.a	ピニルアセチル- CoA	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoA デヒドロターゼ	<i>abfD</i>	YP_001396399.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	4-ヒドロキシブチリル -CoA
					<i>abfD</i>	P55792	クロストリジウム アミノブチリウム	4-ヒドロキシブチリル -CoA
					<i>abfD</i>	YP_001928843	ボルフィロモナス キンギバリス ATCC 33277	4-ヒドロキシブチリル -CoA
12	1.1.1.c	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	1,4-ブタンジオー ル	4-ヒドロキシブチリル- CoA レダクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトブチリウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロフレクサス アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディア キネンシス	長鎖 アシル-CoA
12	1.2.1.b	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	4- ヒドロキシブタナ ール	4-ヒドロキシブチリル- CoA レダクターゼ (又 は4-ヒドロキシブタナ ールデヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ボルフィロモナス キンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ セデュラ	マロニル-CoA
12	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナ ール	1,4-ブタンジオー ル	1,4-ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サツカリミセス セレジアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

50

【 0 3 3 0 】

(実施例XI)

(ホモセリンからの例示的なBDO経路)

本実施例では、ホモセリンからの例示的なBDO経路について記載する。

【0331】

図13は、ホモセリンをBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表23に示す。

【0332】

手短に述べると、ホモセリンをホモセリンデアミナーゼ(EC 4.3.1.a)によって4-ヒドロキシブタ-2-エン酸に変換することができる。代替的に、ホモセリンをホモセリンCoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又はホモセリン-CoAリガーゼ(又はホモセリン-CoAシンセターゼ)(EC 6.2.1.a)によってホモセリン-CoAに変換することができる。ホモセリン-CoAをホモセリン-CoAデアミナーゼ(EC 4.3.1.a)によって4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブタ-2-エン酸を4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ(又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAシンセターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブタ-2-エン酸を4-ヒドロキシブタ-2-エン酸レダクターゼ(EC 1.3.1.a)によって4-ヒドロキシ酪酸に変換することができる。4-ヒドロキシ酪酸を4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又は4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ(又は4-ヒドロキシブチリル-CoAシンセターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAを4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼ(EC 1.3.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.C)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

10

20

【表 7 2】

Docket No.: 066662-0251

表 23. ホモセリンからのBDO経路

図	ECクラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
13	4.3.1.a	ホモセリン	4-ヒドロキシブタ- 2-エン酸	ホモセリン デアミナーゼ	<i>aspA</i>	NP_418562	エシエリキア コリ	アスパラギン酸
					<i>aspA</i>	P44324.1	ハエモフィルス インフルエンザエ	アスパラギン酸
					<i>aspA</i>	P07346	シュードモナス フルオレセンス	アスパラギン酸
13	2.8.3.a	ホモセリン	ホモセリン- CoA	ホモセリン CoA トランスフェラーゼ	<i>cat1</i> , <i>cat2</i> , <i>cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クルイペリ	コハク酸, 4- ヒドロキシ酪酸, 酪酸
					<i>gclA</i> , <i>gclB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコッカス フェルメンダンス	グルタル酸
					<i>atoA</i> , <i>atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア コリ	ブタン酸
13	3.1.2.a	ホモセリン	ホモセリン- CoA	ホモセリン CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア コリ	アジピル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラッタス ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サビエンス	3- ヒドロキシプロパノイ ル-CoA

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

表 23 続き

13	6.2.1.a	ホモセリン	ホモセリン- CoA	ホモセリン-CoA リガーゼ (又は ホモセリン-CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシラム クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス スプトリス	6- カルボキシヘキサン酸
13	4.3.1.a	ホモセリン- CoA	4-ヒドロキシブタ- 2-エノイル-CoA	ホモセリン-CoA デアミナーゼ	<i>acI1</i>	CAG29274.1	クロストリジウム プロピオニクム	ベータ-アアラニル-CoA
					<i>acI2</i>	CAG29275.1	クロストリジウム プロピオニクム	ベータ-アアラニル-CoA
					<i>MXAN_438 5</i>	YP_632558.1	ミクコカス キサンタス	ベータ-アアラニル-CoA
13	2.8.3.a	4-ヒドロキシブタ -2-エン酸	4-ヒドロキシブタ- 2-エノイル-CoA	4-ヒドロキシブタ-2- エノイル-CoA トランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クルイペリ	コハク酸, 4- ヒドロキシ酪酸, 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコカス フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエキア コリ	ブタン酸

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

表 23 続き

13	3.1.2.a	4-ヒドロキシブタ -2-エン酸	4-ヒドロキシブタ -2-エノイル-CoA	4-ヒドロキシブタ-2- エノイル-CoA ヒドロラ ーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア コリ	アジビル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラッタス ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サビエンス	3- ヒドロキシプロパノイ ル-CoA
13	6.2.1.a	4-ヒドロキシブタ -2-エン酸	4-ヒドロキシブタ -2-エノイル-CoA	4-ヒドロキシブタ-2- エノイル-CoA リガーゼ (又は4-ヒドロキシブタ -2-エノイル-CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ベニシルム クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス スプチャリス	6- カルボキシヘキササン酸
13	1.3.1.a	4-ヒドロキシブタ -2-エン酸	4- ヒドロキシ酪酸	4-ヒドロキシブタ-2- エン酸 レダクターゼ	<i>enr</i>	CAA71086.1	クロストリジウム チロブチリウム	
					<i>enr</i>	CAA76083.1	クロストリジウム クルイベ	
					<i>enr</i>	YP_430895.1	ムーレラ テルモアセチカ	

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

表 23 続き

13	2.8.3.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリ ル-coA	4-ヒドロキシブチリル- CoA トランスフェラー ゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クレイベリ	コハク酸, 4- ヒドロキシ酪酸, 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコッカス フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア コリ	ブタン酸
13	3.1.2.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリ ル-coA	4-ヒドロキシブチリル- CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア コリ	アジビル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラッタス ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サピエンス	3- ヒドロキシプロパノイ ル-CoA
13	6.2.1.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリ ル-coA	4-ヒドロキシブチリル- CoA リガーゼ (又は 4- ヒドロキシブチリル-Co A シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシルム クリンゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス スプチリス	6- カルボキシヘキサン酸

10

20

30

40

Docket No.: 066662-0251

表 23 続き

13	1.3.1.a	4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoA	4-ヒドロキシブチル-CoA	4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoA レダクターゼ	<i>bcd, efh, efB</i>	NP_349317.1, NP_349315.1, NP_349316.1	クロストリジウム アセトブチリウム	
					<i>TER</i>	Q5EU90.1	ユーグレナ グラシリス	
					<i>TDE0597</i>	NP_971211.1	トレボネマ デンチコラ	
8	1.1.1.c	4-ヒドロキシブチル-CoA	1,4-ブタンジオール	4-ヒドロキシブチル-CoA レダクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトブチリウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロブレクサウス アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンドシア キネンシス	長鎖アシル-CoA
8	1.2.1.b	4-ヒドロキシブチル-CoA	4-ヒドロキシブチル-CoA	4-ヒドロキシブチル-CoA レダクターゼ (又は 4-ヒドロキシブチル-CoA レデヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ボルフィロモナス ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ セデュラ	マロニル-CoA
8	1.1.1.a	4-ヒドロキシブチル	1,4-ブタンジオール	1,4-ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカリミセス セレビシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	I.21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

【0333】

本出願全体を通じて、様々な文献を参照した。これらの文献の開示内容は、本発明が関係する技術分野の状況をより十分に説明するために、その全体が本出願において参照により本明細書に組み込まれている。本発明を、以上に示した実施例に関して説明したが、本

50

発明の主旨から逸脱することなく様々な修正を加えることができることが理解されるべきである。

【 図 1 】

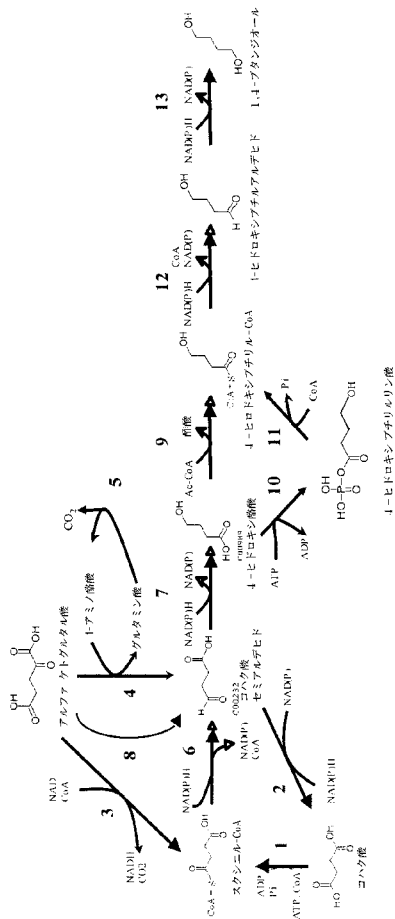


図 1

【 図 2 】

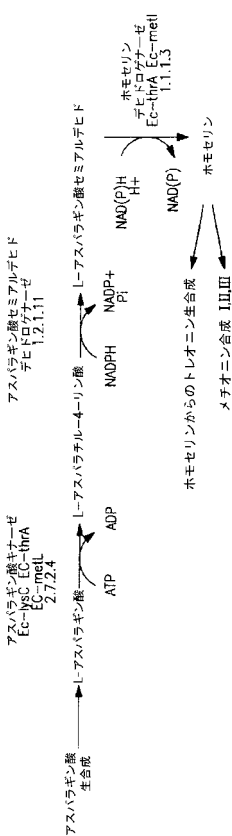


図 2

【図 3 a - c】

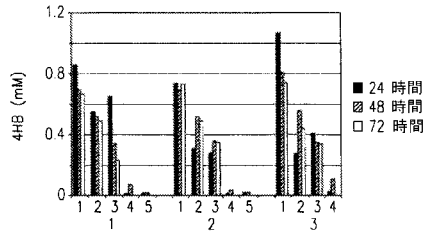


図 3 (a)

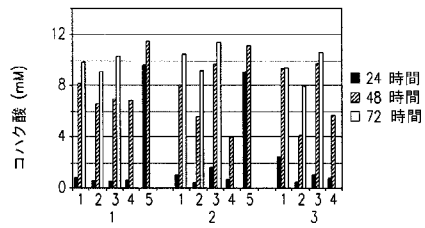


図 3 (b)

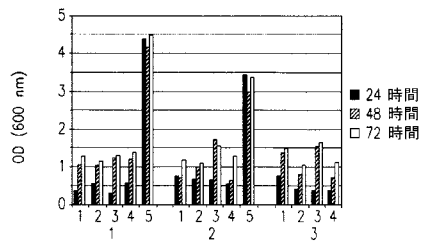


図 3 (c)

【図 4】

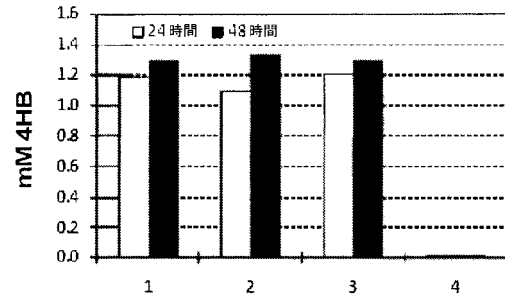


図 4

【図 5】

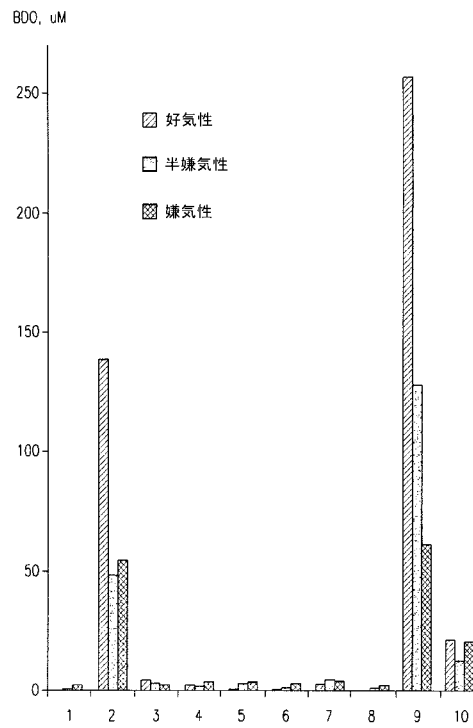


図 5

【図 6】

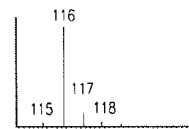


図 6 (a)

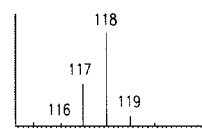


図 6 (b)

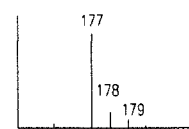


図 6 (c)

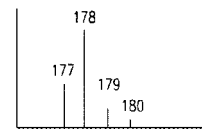


図 6 (d)

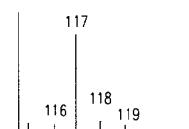


図 6 (e)

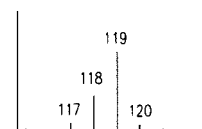


図 6 (f)

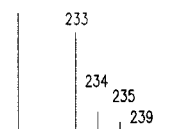


図 6 (g)

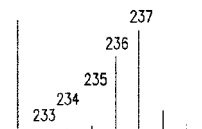


図 6 (h)

【図 7】

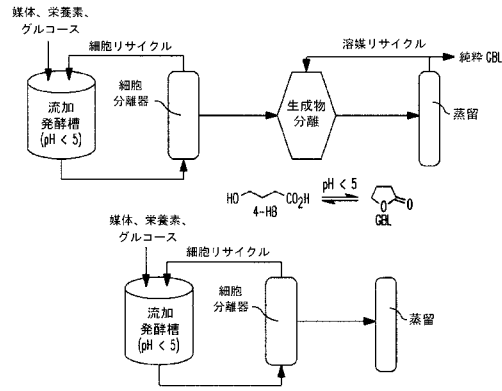


図 7

【図 8 A - B】

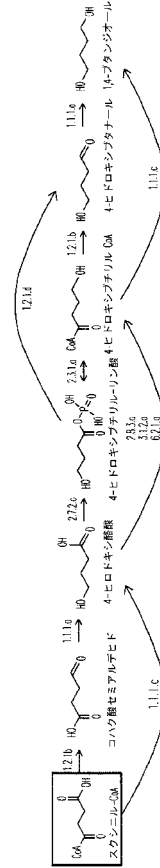


図 8A

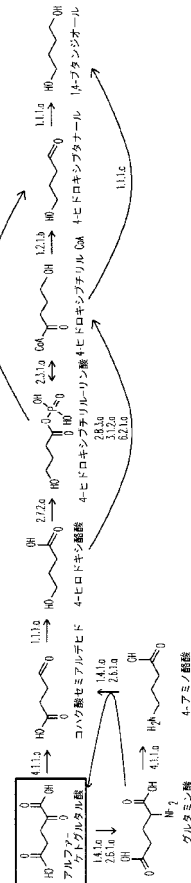


図 8B

【図 9 A】

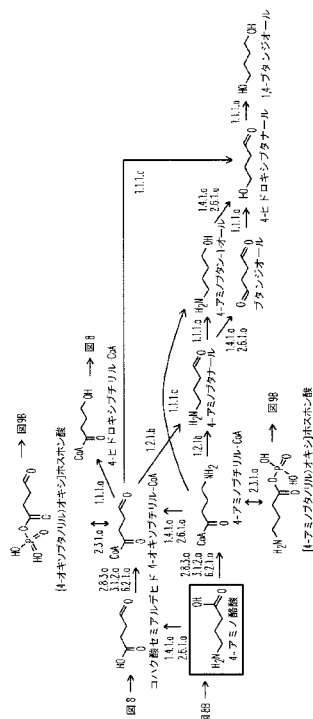


図 9A

【図 9 B - C】

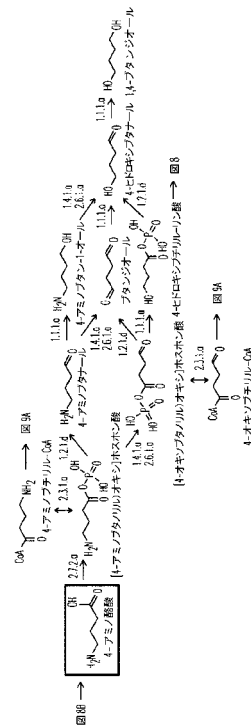


図 9B

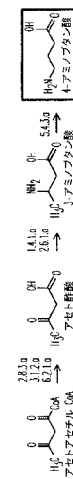


図 9C

【図 10】

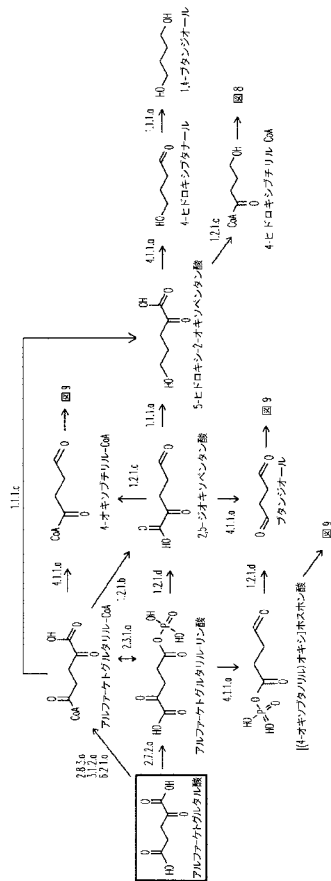


図 10

【図 11】

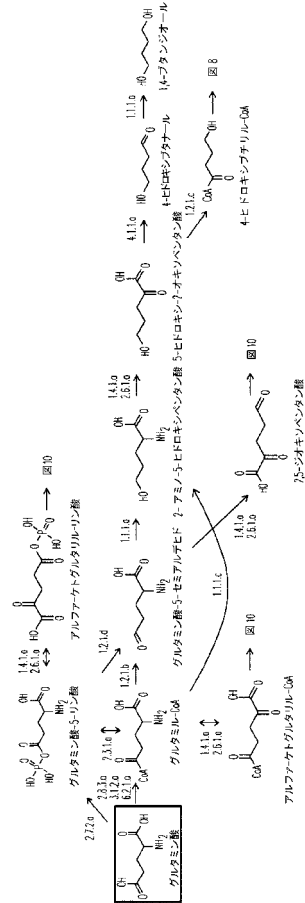


図 11

【図 12】

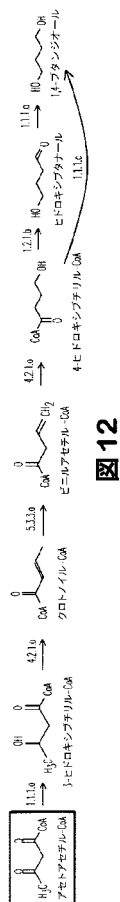


図 12

【図 13】

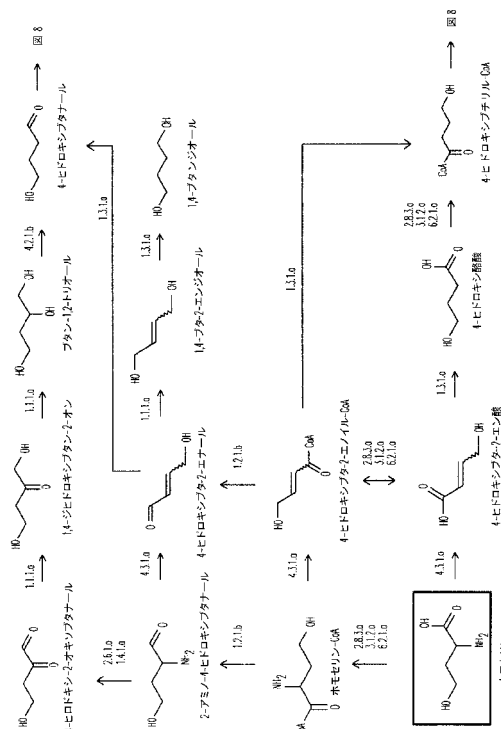


図 13

【配列表】

2017205116000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年7月19日(2017.7.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

1,4-ブタンジオール(BDO)経路を有する非天然微生物体であって、BDOを生成するための十分な量で発現され、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、ビニルアセチル-CoA Δ -イソメラーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼを含むBDO経路酵素をコードする外因性核酸を含む、前記非天然微生物体。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 P 7/18 (2006.01) C 1 2 P 7/18

(72)発明者 ロビン イー. オステルホウト
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 0 7 サン ディエゴ 4 9 1 0 オルチャルド ア
ベニュー

(72)発明者 ジュン スン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 9 サン ディエゴ 8 2 7 4 ブルイン グルエ
ン ウアイ

Fターム(参考) 4B050 CC08 DD02 LL05
4B064 AC05 BJ01 CA02 CA19 CC24 DA20
4B065 AA01Y AA26X AB01 AC14 BA02 BC06 CA05 CA60

【外国語明細書】
2017205116000001.pdf