

FIG. 2

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも 1 種のポリペプチドを含むブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) であって、前記微生物の内在性 GPD の K_M と比べて高い NADH の場合の K_M を有する異種性 GPD と、

(c) GPD をコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物において、

前記組換え微生物では、前記異種性 GPD のない対照組換え微生物と比べてブタノール産生が向上する、組換え微生物。

10

【請求項 2】

前記ブタノール生合成経路が、

(a) 1 - ブタノール生合成経路、

(b) 2 - ブタノール生合成経路、および

(c) イソブタノール生合成経路

からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組換え微生物。

【請求項 3】

前記 1 - ブタノール生合成経路が、

(a) アセチル - CoA からアセトアセチル - CoA (アセチル - CoA アセチルトランスフェラーゼによって触媒される)、

(b) アセトアセチル - CoA から 3 - ヒドロキシブチリル - CoA (3 - ヒドロキシブチリル - CoA デヒドロゲナーゼによって触媒される)、

(c) 3 - ヒドロキシブチリル - CoA からクロトニル - CoA (クロトナーゼによって触媒される)、

(d) クロトニル - CoA からブチリル - CoA (ブチリル - CoA デヒドロゲナーゼによって触媒される)、

(e) ブチリル - CoA からブチルアルデヒド (ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼによって触媒される)、および

(f) ブチルアルデヒドから 1 - ブタノール (1 - ブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒される)

のうちの少なくとも 1 つの基質から生成物への変換を行うポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の遺伝子を含む、請求項 2 に記載の組換え微生物。

20

30

【請求項 4】

前記 2 - ブタノール生合成経路が、

(a) ピルベートからアルファ - アセト乳酸 (アセト乳酸合成酵素によって触媒される)、

(b) アルファ - アセト乳酸からアセトイン (アセト乳酸デカルボキシラーゼによって触媒される)、

(c) アセトインから 2, 3 - ブタンジオール (ブタンジオールデヒドロゲナーゼによって触媒される)、

(d) 2, 3 - ブタンジオールから 2 - ブタノン (ブタンジオールデヒドラターゼによって触媒される)、および

(e) 2 - ブタノンから 2 - ブタノール (2 - ブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒される)

のうちの少なくとも 1 つの基質から生成物への変換を行うポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の遺伝子を含む、請求項 2 に記載の組換え微生物。

40

【請求項 5】

前記イソブタノール生合成経路が、

50

(a) ピルベートからアセト乳酸 (アセト乳酸合成酵素によって触媒される)、

(b) アセト乳酸から 2, 3 - ジヒドロキシイソバレレート (アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼによって触媒される)、

(c) 2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートから - ケトイソ吉草酸 (ジヒドロキシ酸デヒドラターゼによって触媒される)、

(d) - ケトイソ吉草酸からイソブチルアルデヒド (分岐鎖ケト酸デカルボキシラーゼによって触媒される)、および

(e) イソブチルアルデヒドからイソブタノール (分岐鎖アルコールデヒドロゲナーゼによって触媒される)

のうちの少なくとも 1 の基質から生成物への変換を行うポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の遺伝子を含む、請求項 2 に記載の組換え微生物。

10

【請求項 6】

前記微生物が、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ジモモナス属 (*Zymomonas*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、セラチア属 (*Serratia*)、エルウィニア属 (*Erwinia*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、赤痢菌属 (*Shigella*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、バシラス属 (*Bacillus*)、ラクトバシラス属 (*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、パエニバチルス属 (*Paenibacillus*)、アルトロバクター属 (*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、ブレヴィバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*)、クルイベロミセス属 (*Kluveromyces*)、ヤロウイア属 (*Yarrowia*)、ピキア属 (*Pichia*)、ザイゴサッカロミセス属 (*Zygosaccharomyces*)、デバリオミセス属 (*Debaryomyces*)、カンジダ属 (*Candida*)、ブレタノマイセス属 (*Brettanomyces*)、パチソレン属 (*Pachysolen*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*)、イサタケンキア属 (*Issatchenkia*)、トリコスポロン属 (*Trichosporon*)、ヤマダザイマ属 (*Yamadazyma*)、およびサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) からなる群から選択される属のものである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組換え微生物。

20

30

【請求項 7】

前記微生物が前記サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) のものである、請求項 6 に記載の組換え微生物。

【請求項 8】

前記異種性 GPD が自然界に存在する GPD である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組換え微生物。

【請求項 9】

前記異種性 GPD が、メキシコリーシュマニア (*Leishmania mexicana*)、ドナリエラ・ヴィリディス (*Dunaliella viridis*)、オオミユビトビネズミ (*Jaculus orientalis*)、アーキオグロブス・フルジダス (*Archeoglobus fulgidus*)、発疹チフスリケッチア (*Rickettsia prowazekii*)、ベギアトア・アルバ (*Beggiatoa alba*)、カンジエラ・コレニス (*Kangielia koreensis*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、カンジダ・バーサチルス (*Candida versatilis*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、およびアナウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) からなる群から選択される生物からの GPD の配列を含む、請求項 8 に記載の組換え微生物。

40

【請求項 10】

前記異種性 GPD が改変 GPD である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組換え微

50

生物。

【請求項 1 1】

前記改変 G P D は、配列番号 1 9 5 の位置 4 2、4 4、4 5、7 1、7 3、7 5、9 5、1 2 4、1 2 6、1 2 9、1 5 1、1 5 2、1 8 3、1 8 4、1 8 5、2 4 6、3 1 0、3 3 6、3 3 7、または 3 3 9 に対応する残基に少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 1 0 に記載の組換え微生物。

【請求項 1 2】

前記改変 G P D は、配列番号 1 9 5 の位置 7 3 に対応する残基に少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 1 1 に記載の組換え微生物。

【請求項 1 3】

前記改変 G P D は、配列番号 1 9 5 の位置 1 2 9 に対応する残基に少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 1 1 に記載の組換え微生物。

【請求項 1 4】

前記改変 G P D は、配列番号 1 9 5 の位置 7 3 に対応する残基に置換を含み、配列番号 1 9 5 の位置 1 2 9 に対応する残基に置換を含む、請求項 1 1 に記載の組換え微生物。

【請求項 1 5】

前記微生物が、N A D H を利用するケトール酸レダクトイソメラーゼ (K A R I) を含む、請求項 5 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の組換え微生物。

【請求項 1 6】

配列番号 1 9 5 との少なくとも 8 5 % の同一性を有する改変グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (G P D) 酵素。

【請求項 1 7】

前記酵素が、配列番号 1 9 5 の位置 4 2、4 4、4 5、7 1、7 3、7 5、9 5、1 2 4、1 2 6、1 2 9、1 5 1、1 5 2、1 8 3、1 8 4、1 8 5、2 4 6、3 1 0、3 3 6、3 3 7、または 3 3 9 に対応する残基に少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 1 5 に記載の改変 G P D 酵素。

【請求項 1 8】

前記酵素が、配列番号 1 9 5 の位置 7 3 に対応する少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 1 7 に記載の改変 G P D 酵素。

【請求項 1 9】

前記酵素が、配列番号 1 9 5 の位置 1 2 9 に対応する少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 1 7 に記載の改変 G P D 酵素。

【請求項 2 0】

前記酵素が、配列番号 1 9 5 の位置 7 3 に対応する置換および配列番号 1 9 5 の位置 1 2 9 に対応する置換を含む、請求項 1 7 に記載の改変 G P D 酵素。

【請求項 2 1】

N A D H の場合の前記 K_M が約 0 . 0 1 m M ~ 約 1 m M である、請求項 1 6 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の改変 G P D 酵素。

【請求項 2 2】

請求項 1 6 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の改変 G P D 酵素を含む組換え微生物。

【請求項 2 3】

前記微生物が、前記組換え微生物とは非相同である少なくとも 1 種の遺伝子を含むブタノール生合成経路を含み、前記微生物が、G P D をコードする内在性遺伝子の欠失または破損を含み、前記組換え微生物が、前記改変 G P D 酵素のない微生物と比べてブタノール産生が向上する、請求項 2 2 に記載の組換え微生物。

【請求項 2 4】

前記ブタノール生合成経路が、

- (a) 1 - ブタノール生合成経路、
- (b) 2 - ブタノール生合成経路、および
- (c) イソブタノール生合成経路

10

20

30

40

50

からなる群から選択される、請求項 2 3 に記載の組換え微生物。

【請求項 2 5】

前記 1 - ブタノール生合成経路が、

(a) アセチル - C o A からアセトアセチル - C o A (アセチル - C o A アセチルトランスフェラーゼによって触媒される)、

(b) アセトアセチル - C o A から 3 - ヒドロキシブチリル - C o A (3 - ヒドロキシブチリル - C o A デヒドロゲナーゼによって触媒される)、

(c) 3 - ヒドロキシブチリル - C o A からクロトニル - C o A (クロトナーゼによって触媒される)、

(d) クロトニル - C o A からブチリル - C o A (ブチリル - C o A デヒドロゲナーゼによって触媒される)、 10

(e) ブチリル - C o A からブチルアルデヒド (ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼによって触媒される)、および

(f) ブチルアルデヒドから 1 - ブタノール (1 - ブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒される)

のうちの少なくとも 1 つの基質から生成物への変換を行うポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の遺伝子を含む、請求項 2 4 に記載の組換え微生物。

【請求項 2 6】

前記 2 - ブタノール生合成経路が、

(a) ピルベートからアルファ - アセト乳酸 (アセト乳酸合成酵素によって触媒される)、 20

(b) アルファ - アセト乳酸からアセトイン (アセト乳酸デカルボキシラーゼによって触媒される)、

(c) アセトインから 2 , 3 - ブタンジオール (ブタンジオールデヒドロゲナーゼによって触媒される)、

(d) 2 , 3 - ブタンジオールから 2 - ブタノン (ブタンジオールデヒドラターゼによって触媒される)、および

(e) 2 - ブタノンから 2 - ブタノール (2 - ブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒される)

のうちの少なくとも 1 つの基質から生成物への変換を行うポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の遺伝子を含む、請求項 2 4 に記載の組換え微生物。 30

【請求項 2 7】

前記イソブタノール生合成経路が、

(a) ピルベートからアセト乳酸 (アセト乳酸合成酵素によって触媒される)、

(b) アセト乳酸から 2 , 3 - ジヒドロキシイソバレレート (アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼによって触媒される)、

(c) 2 , 3 - ジヒドロキシイソバレレートから - ケトイソ吉草酸 (ジヒドロキシ酸デヒドラターゼによって触媒される)、

(d) - ケトイソ吉草酸からイソブチルアルデヒド (分枝鎖ケト酸デカルボキシラーゼによって触媒される)、および 40

(e) イソブチルアルデヒドからイソブタノール (分枝鎖アルコールデヒドロゲナーゼによって触媒される)

のうちの少なくとも 1 つの基質から生成物への変換を行うポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の遺伝子を含む、請求項 2 4 に記載の組換え微生物。

【請求項 2 8】

前記微生物が、クロストリジウム属 (*C l o s t r i d i u m*)、ジモモナス属 (*Z y m o m o n a s*)、エシェリキア属 (*E s c h e r i c h i a*)、サルモネラ属 (*S a l m o n e l l a*)、セラチア属 (*S e r r a t i a*)、エルウィニア属 (*E r w i n i a*)、クレブシエラ属 (*K l e b s i e l l a*)、赤痢菌属 (*S h i g e l l a*)、ロドコッカス属 (*R h o d o c o c c u s*)、シュードモナス属 (*P s e u d o m o n a s*)、 50

バシラス属 (*Bacillus*)、ラクトバシラス属 (*Lactobacillus*)、
 エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、
 パエニバチルス属 (*Paenibacillus*)、アルトロバクター属 (*Arthrobacter*)、
 コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、ブレビバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*)、
 クルイベロミセス属 (*Kluveromyces*)、ヤロウイア属 (*Yarrowia*)、ピキア属 (*Pichia*)、ザイゴサッ
 カロミセス属 (*Zygosaccharomyces*)、デバリオミセス属 (*Debaryomyces*)、カンジダ属 (*Candida*)、ブレタノマイセス属 (*Brettanomyces*)、
 パチソレン属 (*Pachysolen*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*)、イサタケンキア属 (*Issatchenkia*)、トリコスポロン属 (*Trichosporon*)、
 ヤマダザイマ属 (*Yamadazyma*)、およびサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) からなる群から選択される属のものである、請求
 項 22 ~ 27 のいずれか一項に記載の組換え微生物。

10

【請求項 29】

前記微生物が前記サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) のものである、請求
 項 28 に記載の組換え微生物。

【請求項 30】

前記微生物が、NADH を利用するケトール酸レダクトイソメラーゼ (KARI) を含
 む、請求項 27 ~ 29 のいずれか一項に記載の組換え微生物。

20

【請求項 31】

(a)

i . 改変イソブタノール生合成経路と、

ii . GPD1 をコードする内在性遺伝子の欠失または破損と、

iii .

a . 請求項 16 ~ 22 のいずれか一項に記載の前記改変 GPD 酵素；または

b . 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) であって、
 前記微生物の内在性 GPD の K_M と比べて高い NADH の場合の K_M を有する異種性 GPD
 の少なくとも 1 種と

を含む組換え微生物を用意するステップと、

30

(b) イソブタノールが産生される条件下で、前記組換え微生物を少なくとも 1 種の発
 酵性炭素物質と接触させるステップと

を含む、イソブタノールを製造するための方法。

【請求項 32】

前記組換え微生物が嫌気条件下で成長する、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記改変 GPD が、配列番号 195 の 42、44、45、71、73、75、95、1
 24、126、129、151、152、183、184、185、246、310、3
 36、337、または 339 に対応する残基に少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 31
 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 34】

前記 GPD の NADH の場合の K_M が約 0.01 mM ~ 約 1 mM である、請求項 31 ~
 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも 1 種のポリペプチドを含むブタノ
 ール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) であって、
 前記微生物の内在性 GPD の K_m と比べて高い NADH の場合の K_M を有する異種性 GPD
 と、

50

(c) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損とを含む組換え微生物であって、
前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

【請求項36】

組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも1種のポリペプチドを含むブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)であって、前記微生物の内在性GPDの K_M と比べて高いNADHの場合の K_M を有する異種性GPDと、

10

(c) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損とを含む組換え微生物において、
前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてブタノールとグリセロールとのモル比が増大する、組換え微生物。

【請求項37】

組換え微生物であって、

(a) 異種性グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)であって、前記微生物の内在性GPDの K_M と比べて高いNADHの場合の K_M を有する異種性GPDと、

20

(b) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損とを含む組換え微生物において、
前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

【請求項38】

組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも1種のポリペプチドを含む改変ブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)であって、NADHおよびNADPHに対して実質的に同じ親和性を有する異種性GPDと、

30

(c) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損とを含む組換え微生物において、
前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてブタノール産生が向上する、組換え微生物。

【請求項39】

組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも1種のポリペプチドを含む改変ブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)であって、NADHおよびNADPHに対して実質的に同じ親和性を有する異種性GPDと、

40

(c) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損とを含む組換え微生物において、
前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

【請求項40】

組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも1種のポリペプチドを含む改変ブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)であって、NADHおよびNADPHに対して実質的に同じ親和性を有する異種性GPDと、

50

(c) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損とを含む組換え微生物において、
前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてブタノールとグリセロールとのモル比が増大する、組換え微生物。

【請求項41】

前記改変ブタノール生合成経路が、

- (a) 1 - ブタノール生合成経路、
- (b) 2 - ブタノール生合成経路、および
- (c) イソブタノール生合成経路

からなる群から選択される、請求項38～40のいずれか一項に記載の組換え微生物。

10

【請求項42】

前記微生物が、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ジモモナス属 (*Zymomonas*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、セラチア属 (*Serratia*)、エルウィニア属 (*Erwinia*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、赤痢菌属 (*Shigella*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、バシラス属 (*Bacillus*)、ラクトバシラス属 (*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、パエニバチルス属 (*Paenibacillus*)、アルトロバクター属 (*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、ブレビバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*)、クルイベロミセス属 (*Kluyveromyces*)、ヤロウイア属 (*Yarrowia*)、ピキア属 (*Pichia*)、ザイゴサッカロミセス属 (*Zygosaccharomyces*)、デバリオミセス属 (*Debaryomyces*)、カンジダ属 (*Candida*)、ブレタノマイセス属 (*Brettanomyces*)、パチソレン属 (*Pachysolen*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*)、イサタケンキア属 (*Issatchenkia*)、トリコスポロン属 (*Trichosporon*)、ヤマダザイマ属 (*Yamadazyma*)、およびサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) からなる群から選択される属のものである、請求項38～41のいずれか一項に記載の組換え微生物。

20

30

【請求項43】

前記微生物が前記サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) のものである、請求項42に記載の組換え微生物。

【請求項44】

前記異種性GPDが、EC番号1.1.1.94を有するGPDである、請求項38～43のいずれか一項に記載の組換え微生物。

【請求項45】

前記異種性GPDが、大腸菌 (*E. coli*) GPD、カンジダ・バーサチルス (*Candida versatilis*) GPD、およびアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) GPDから選択される、請求項44に記載の組換え微生物。

40

【請求項46】

(a) 請求項38～40のいずれか一項に記載の組換え微生物を用意するステップと、
(b) ブタノールが産生される条件下で、前記組換え微生物を少なくとも1種の発酵性炭素物質と接触させるステップとを含む、ブタノールを製造するための方法。

【請求項47】

前記改変ブタノール生合成経路が、

- (a) 1 - ブタノール生合成経路、
- (b) 2 - ブタノール生合成経路、および

50

(c) イソブタノール生合成経路

からなる群から選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 48】

前記微生物が、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ジモモナス属 (*Zymomonas*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、セラチア属 (*Serratia*)、エルウィニア属 (*Erwinia*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、赤痢菌属 (*Shigella*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、バシラス属 (*Bacillus*)、ラクトバシラス属 (*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、パエニバチルス属 (*Paenibacillus*)、アルトロバクター属 (*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、ブレヴィバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*)、クルイベロミセス属 (*Kluveromyces*)、ヤロウイア属 (*Yarrowia*)、ピキア属 (*Pichia*)、ザイゴサッカロミセス属 (*Zygosaccharomyces*)、デバリオミセス属 (*Debaryomyces*)、カンジダ属 (*Candida*)、ブレタノマイセス属 (*Brettanomyces*)、パチソレン属 (*Pachysolen*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*)、イサタケンキア属 (*Issatchenkia*)、トリコスボロン属 (*Trichosporon*)、ヤマダザイマ属 (*Yamadazyma*)、およびサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) からなる群から選択される属のものである、請求項 46 または 47 に記載の方法。

10

20

【請求項 49】

前記微生物が前記サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) のものである、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記異種性 GPD が、EC 番号 1.1.1.94 を有する GPD である、請求項 46 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

前記異種性 GPD が、大腸菌 (*E. coli*) GPD、カンジダ・バーサチルス (*Candida versatilis*) GPD、およびアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) GPD から選択される、請求項 50 に記載の方法。

30

【請求項 52】

(a) 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) であって、NADH および NADPH に対して実質的に同じ親和性を有する異種性 GPD と、

(b) GPD をコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物であって、

前記組換え微生物では、前記異種性 GPD のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

40

【請求項 53】

異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) を含む組換え微生物であって、前記異種性 GPD が NADH または NADPH に対して実質的に同じ親和性を有し、かつ前記組換え微生物では、前記異種性 GPD のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

【請求項 54】

組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも 1 種のポリペプチドを含む改変ブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) であって、グリセロール - 3 - ホスフェートによって抑制される異種性 GPD と、

50

(c) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損とを含む組換え微生物において、前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてブタノール産生が向上する、組換え微生物。

【請求項55】

組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも1種のポリペプチドを含む改変ブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)であって、グリセロール-3-ホスフェートによって抑制される異種性GPDと、

(c) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物において、

前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

【請求項56】

組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも1種のポリペプチドを含む改変ブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)であって、グリセロール-3-ホスフェートによって抑制される異種性GPDと、

(c) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物において、

前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてブタノールとグリセロールとのモル比が増大する、組換え微生物。

【請求項57】

前記改変ブタノール生合成経路が、

(a) 1-ブタノール生合成経路、

(b) 2-ブタノール生合成経路、および

(c) イソブタノール生合成経路

からなる群から選択される、請求項54～56のいずれか一項に記載の組換え微生物。

【請求項58】

前記微生物が、クロストリジウム属(*Clostridium*)、ジモモナス属(*Zymomonas*)、エシェリキア属(*Escherichia*)、サルモネラ属(*Salmonella*)、セラチア属(*Serratia*)、エルウィニア属(*Erwinia*)、クレブシエラ属(*Klebsiella*)、赤痢菌属(*Shigella*)、ロドコッカス属(*Rhodococcus*)、シュードモナス属(*Pseudomonas*)、バシラス属(*Bacillus*)、ラクトバシラス属(*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属(*Enterococcus*)、アルカリゲネス属(*Alcaligenes*)、パエニバチルス属(*Paenibacillus*)、アルトロバクター属(*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム属(*Corynebacterium*)、ブレビバクテリウム属(*Brevibacterium*)、シゾサッカロミセス属(*Schizosaccharomyces*)、クルイベロミセス属(*Kluveromyces*)、ヤロウイア属(*Yarrowia*)、ピキア属(*Pichia*)、ザイゴサッカロミセス属(*Zygosaccharomyces*)、デバリオミセス属(*Debaryomyces*)、カンジダ属(*Candida*)、ブレタノマイセス属(*Brettanomyces*)、パチソレン属(*Pachysolen*)、ハンゼヌラ属(*Hansenula*)、イサタケンキア属(*Issatchenkia*)、トリコスポロン属(*Trichosporon*)、ヤマダザイマ属(*Yamadazyma*)、およびサッカロミセス属(*Saccharomyces*)からなる群から選択される属のものである、請求項54～57のいずれか一項に記載の組換え微生物。

【請求項 59】

前記異種性 GPD が、EC 番号 1.1.1.94 を有する GPD である、請求項 54 ~ 58 のいずれか一項に記載の組換え微生物。

【請求項 60】

前記異種性 GPD が、大腸菌 (*E. coli*) GPD、カンジダ・バーサチルス (*Candida versatilis*) GPD、およびアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) GPD から選択される、請求項 59 に記載の組換え微生物。

【請求項 61】

(a) 請求項 54 ~ 60 のいずれか一項に記載の組換え微生物を用意するステップと、
(b) ブタノールが産生される条件下で、前記組換え微生物を少なくとも 1 種の発酵性炭素物質と接触させるステップと
を含む、ブタノールを製造するための方法。

【請求項 62】

(a) グリセロール - 3 - ホスフェートによって抑制される異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) と、
(b) GPD をコードする内在性遺伝子の欠失または破損と
を含む組換え微生物であって、
前記組換え微生物では、前記異種性 GPD のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

【請求項 63】

異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) を含む組換え微生物であって、前記異種性 GPD がグリセロール - 3 - ホスフェートによって抑制され、前記組換え微生物では、前記異種性 GPD のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) を含む組換え微生物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013 年 3 月 14 日に提出された米国仮出願第 61/782,651 号明細書および 2014 年 1 月 31 日に提出された米国仮出願第 61/934,096 号明細書の優先権を主張するものであり、これらの各々についてその全体を本明細書に援用する。

【0002】

本発明は、工業微生物学の分野およびブタノールとその異性体の発酵生産に関する。さらに具体的には、本発明は、NADH の場合の K_M が大きい (NADH および NADPH に対する親和性が実質的に同じである) グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) 酵素及び/またはフィードバック阻害される GPD 酵素、そうした酵素を含む組換え微生物、およびそうした酵素を用いてブタノールを製造する方法に関する。

【0003】

電子的手段で提出された配列リストについての記載

本出願と一緒に提出した電子提出 ASCII テキストファイルの配列リストの内容 (名前: 20140314__CL5707USNP__配列リスト; サイズ: 401,408 バイト、作成日: 2014 年 3 月 12 日) は、その全体を本明細書に援用する。

【背景技術】

【0004】

ブタノールは、燃料添加物、プラスチック工業における原料化学物質、また食品香料工業 (food and flavor industry) における食品用エクストラクタントとして役立つ、重要な工業化学物質である。毎年、100 億 ~ 120 億ポンドのブ

10

20

30

40

50

タノールが石油化学的手段で製造され、この汎用化学物質は、将来おそらく、ますます必要とされるであろう。

【0005】

イソブタノールを化学合成するための方法は周知であり、オキシ合成、一酸化炭素の接触水素化（非特許文献1）およびメタノールとn-プロパノールとのGuerbett縮合（非特許文献2）などがある。こうしたプロセスでは、石油化学製品から得られる出発物質を使用し、一般に高価であり、環境に優しくない。植物由来の原料からイソブタノールを製造するなら、温室効果ガス排出が最小限にされるであろうし、当該技術分野における進歩となるであろう。

【0006】

イソブタノールは、酵母発酵の副生成物として生物学的に製造されるか、またはブタノールを産生するためのブタノール生合成経路を発現するよう修飾された組換え改変（recombinantly engineered）微生物によって製造される。例えば、特許文献1（その全体を本明細書に援用する）を参照されたい。真菌類によるアミノ酸代謝が不完全であるために形成される「フーゼル油」の成分として、イソブタノールはL-バリンの異化反応によって特に産生される。L-バリンのアミン基が窒素源として集められた後、得られた α -ケト酸は、いわゆるEhrlich経路の酵素によって脱炭酸され、イソブタノールに還元される（非特許文献3）。

【0007】

酵母菌によるブタノール産生の重要な収率損失メカニズムの1つは、ジヒドロキシアセトンホスフェートからグリセロールへの変換により、解糖作用からそれる炭素および還元性同等物が損失することである。この変換における第1ステップは、グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ（GPD）と呼ばれる酵素によって触媒される。ブタノールを産生する酵母菌内のGPDを除去すること（したがって、グリセロール産生をなくすこと）は、以前から提案されてきた。しかし、グリセロールは成長に必要であり、浸透圧保護剤である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】米国特許第7,851,188号明細書

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th edition, 2003, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co., Weinheim, Germany, Vol. 5, pp. 716-719

【非特許文献2】Carlini et al., J. Molec. Catal. A. Chem. 220: 215-220, 2004

【非特許文献3】Dickinson et al., J. Biol. Chem. 273: 25752-25756, 1998

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって、ブタノール収率を増大させ、かつグリセロール産生を減少させる方法は、当該技術分野における進歩となる。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本明細書では、GPD酵素、組換え微生物、およびブタノールを製造するための方法が提供される。

【0012】

本明細書では、組換え微生物であって、(a)組換え微生物とは非相同である少なくとも1種のポリペプチドを含む改変(engineered)ブタノール生合成経路と、(b)異種性グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)であって、微生物の内在性GPDの K_M と比べて高いNADHの場合の K_M を有する異種性GPDと、(c)GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損とを含む、組換え微生物が提供される。実施形態によっては、組換え微生物は、異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてブタノール産生が向上または増大する。実施形態によっては、組換え微生物は、異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が低下または減少する。実施形態によっては、組換え微生物は、異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてブタノールとグリセロールとのモル比が増大する。実施形態によっては、組換え微生物は、異種性GPDのない対照組換え微生物と比べて有効収率が増大する。

10

【0013】

本明細書ではまた、組換え微生物であって、(a)組換え微生物とは非相同である少なくとも1種のポリペプチドを含む改変ブタノール生合成経路と、(b)異種性グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)であって、NADHおよびNADPHに対して実質的に同じ親和性を有しかつ/またはフィードバック阻害される異種性GPDと、(c)GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損とを含む、組換え微生物も提供される。実施形態によっては、組換え微生物は、異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてブタノール産生が向上する。任意であるが、異種性GPDは、グリセロール-3-ホスフェートによってフィードバック阻害される。実施形態によっては、組換え微生物は、異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が低下または減少する。実施形態によっては、組換え微生物は、異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてブタノールとグリセロールとのモル比が増大する。実施形態によっては、組換え微生物は、異種性GPDのない対照組換え微生物と比べて有効収率が増大する。

20

【0014】

ある特定の実施形態では、異種性GPDは自然界に存在するGPDである。ある特定の実施形態では、自然界に存在するGPDは、EC番号の1.1.1.8, 1.1.5.3、または1.1.1.94から選択される。自然界に存在するGPDは、メキシコリーシュマニア(*Leishmania mexicana*)、ドナリエラ・ヴィリディス(*Unaliella viridis*)、オオミユビトビネズミ(*Jaculus orientalis*)、アーキオグロブス・フルジダス(*Archeoglobus fulgidus*)、発疹チフスリケッチア(*Rickettsia prowazekii*)、ベギアトア・アルバ(*Beggiatoa alba*)、カンジエラ・コレニス(*Kangiaella koreensis*)、アスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)、カンジダ・バーサチルス(*Candida versatilis*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、およびアナウサギ(*Oryctolagus cuniculus*)からなる群から選択される生物からのGPDであってよい。

30

【0015】

ある特定の実施形態では、異種性GPDは改変GPDである。改変GPDは、配列番号195の位置42、44、45、71、73、75、95、124、126、129、151、152、183、184、185、246、310、336、337、または339に対応する、少なくとも1つの置換を含みうる。ある特定の実施形態では、改変GPDは、配列番号195の位置73に対応する残基に少なくとも1つの置換を含む。ある特定の実施形態では、改変GPDは、配列番号195の位置129に対応する残基に少なくとも1つの置換を含む。ある特定の実施形態では、改変GPDは、配列番号195の位置73に対応する残基に少なくとも1つの置換を含み、配列番号195の位置129に対応する残基に置換を含む。

40

【0016】

改変グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)酵素も提供される。

50

ある特定の実施形態では、改変 G P D 酵素は、配列番号 1 9 5 との少なくとも 8 5 % の同一性を有する。ある特定の実施形態では、改変 G P D 酵素は、配列番号 1 9 5 の位置 4 2、4 4、4 5、7 1、7 3、7 5、9 5、1 2 4、1 2 6、1 2 9、1 5 1、1 5 2、1 8 3、1 8 4、1 8 5、2 4 6、3 1 0、3 3 6、3 3 7、または 3 3 9 に対応する残基に少なくとも 1 つの置換を含む。ある特定の実施形態では、改変 G P D 酵素は、配列番号 1 9 5 の位置 7 3 に対応する少なくとも 1 つの置換を含む。ある特定の実施形態では、改変 G P D 酵素は、配列番号 1 9 5 の位置 1 2 9 に対応する少なくとも 1 つの置換を含む。ある特定の実施形態では、改変 G P D 酵素は、配列番号 1 9 5 の位置 7 3 に対応する少なくとも 1 つの置換および配列番号 1 2 9 の位置 1 2 9 に対応する置換を含む。ある特定の実施形態では、改変 G P D 酵素は、N A D H の場合の K_M が約 0 . 0 1 m M ~ 1 m M である。

10

【 0 0 1 7 】

本明細書に開示されている改変 G P D 酵素のいずれかを含む組換え微生物も提供される。必要に応じて、組換え微生物は、組換え微生物とは非相同である少なくとも 1 種の遺伝子を含んでおり、改変ブタノール生合成経路を含むことができる。組換え微生物は、例えば、G P D をコードする内在性遺伝子の欠失または破損を含みうる。ある特定の実施形態では、組換え微生物は、改変 G P D 酵素のない微生物と比べてブタノール産生が向上または増大する。実施形態によっては、組換え微生物は、改変 G P D のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が低下または減少する。実施形態によっては、組換え微生物は、改変 G P D のない対照組換え微生物と比べてブタノールとグリセロールとのモル比が増大する。実施形態によっては、組換え微生物は、改変 G P D のない対照組換え微生物と比べて有効収率が増大する。

20

【 0 0 1 8 】

ブタノールを製造するための方法も提供される。その方法は、(i) 改変ブタノール生合成経路と、(i i) G P D をコードする内在性遺伝子の欠失または破損と、(i i i) (a) 改変 G P D 酵素；(b) 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (G P D) であって、微生物の内在性 G P D の K_M と比べて高い N A D H の場合の K_M を有する異種性 G P D ；または (c) 異種性 G P D であって、N A D H および N A D P H に対して実質的に同じ親和性を有しかつ / またはフィードバック阻害される異種性 G P D のうちの少なくとも 1 つとを含む組換え微生物を用意するステップと；組換え微生物を、ブタノールが産生される条件下で少なくとも 1 種の発酵性炭素物質と接触させるステップとを含む。任意であるが、異種性 G P D は、グリセロール - 3 - ホスフェートによってフィードバック阻害される。ある特定の実施形態では、組換え微生物は嫌気条件下で成長する。

30

【 0 0 1 9 】

組換え微生物は、(a) 1 - ブタノール生合成経路；(b) 2 - ブタノール生合成経路；および (c) イソブタノール生合成経路からなる群から選択される改変ブタノール生合成経路を含むことができる。

【 0 0 2 0 】

必要に応じて、1 - ブタノール生合成経路は、以下の基質から生成物への変換の 1 つを実行する少なくとも 1 種のポリペプチドを含む：(a) アセチル - C o A からアセトアセチル - C o A (アセチル - C o A アセチルトランスフェラーゼによって触媒される) ；(b) アセトアセチル - C o A から 3 - ヒドロキシブチリル - C o A (3 - ヒドロキシブチリル - C o A デヒドロゲナーゼによって触媒される) ；(c) 3 - ヒドロキシブチリル - C o A からクロトニル - C o A (クロトナーゼによって触媒される) ；(d) クロトニル - C o A からブチリル - C o A (ブチリル - C o A デヒドロゲナーゼによって触媒される) ；(e) ブチリル - C o A からブチルアルデヒド (ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼによって触媒される) ；および (f) ブチルアルデヒドから 1 - ブタノール (1 - ブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒される) 。

40

【 0 0 2 1 】

50

必要に応じて、2 - ブタノール生合成経路は、以下の基質から生成物への変換の1つを実行する少なくとも1種のポリペプチドを含む：(a) ピルベートからアルファ - アセト乳酸（アセト乳酸合成酵素によって触媒される）；(b) アルファ - アセト乳酸からアセトイン（アセト乳酸デカルボキシラーゼによって触媒される）；(c) アセトインから2, 3 - ブタンジオール（ブタンジオールデヒドロゲナーゼによって触媒される）；(d) 2, 3 - ブタンジオールから2 - ブタノン（ブタンジオールデヒドラターゼによって触媒される）；および(e) 2 - ブタノンから2 - ブタノール（2 - ブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒される）。

【0022】

必要に応じて、イソブタノール生合成経路は、以下の基質から生成物への変換の1つを実行する少なくとも1種のポリペプチドを含む：(a) ピルベートからアセト乳酸（アセト乳酸合成酵素によって触媒される）；(b) アセト乳酸から2, 3 - ジヒドロキシイソバレレート（ケトール酸レダクトイソメラーゼ (ketol - acid reductoisomerase) によって触媒される）；(c) 2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートから - ケトイソ吉草酸（ジヒドロキシ酸デヒドラターゼによって触媒される）；(d) - ケトイソ吉草酸からイソブチルアルデヒド（分枝鎖ケト酸デカルボキシラーゼによって触媒される）；および(e) イソブチルアルデヒドからイソブタノール（分枝鎖アルコールデヒドロゲナーゼによって触媒される）。

【0023】

ある特定の実施形態では、組換え微生物は、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ジモモナス属 (*Zymomonas*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、セラチア属 (*Serratia*)、エルウィニア属 (*Erwinia*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、赤痢菌属 (*Shigella*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、バシラス属 (*Bacillus*)、ラクトバシラス属 (*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、パエニバチルス属 (*Paenibacillus*)、アルトロバクター属 (*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、ブレビバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*)、クルイベロミセス属 (*Kluyveromyces*)、ヤロウイア属 (*Yarrowia*)、ピキア属 (*Pichia*)、ザイゴサッカロミセス属 (*Zygosaccharomyces*)、デバリオミセス属 (*Debaryomyces*)、カンジダ属 (*Candida*)、ブレタノマイセス属 (*Brettanomyces*)、パチソレン属 (*Pachysolen*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*)、イサタケンキア属 (*Issatchenkia*)、トリコスポロン属 (*Trichosporon*)、ヤマダザイマ属 (*Yamadazyma*)、およびサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) からなる群から選択される属のものである。

【0024】

また、(a) 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) であって、微生物の内在性 GPD の K_M と比べて高い NADH の場合の K_M を有する異種性 GPD と、(b) GPD をコードする内在性遺伝子の欠失または破損を含む組換え微生物も提供される。実施形態によっては、微生物は、異種性 GPD のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する。

【0025】

また、(a) 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) であって、NADH および NADPH に対して実質的に同じ親和性を有しかつ / またはフィードバック阻害される異種性 GPD と、(b) GPD をコードする内在性遺伝子の欠失または破損を含む、組換え微生物も提供される。必要に応じて、異種性 GPD は、グリセロール - 3 - ホスフェートによってフィードバック阻害される。実施形態によっては、微生物

10

20

30

40

50

物は、異種性 G P D のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する。

【 0 0 2 6 】

また、異種性 G P D を含む組換え微生物であって、異種性 G P D が、N A D H および N A D P H に対して実質的に同じ親和性を有しかつ / またはフィードバック阻害され、組換え微生物が、異種性 G P D のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物も提供される。必要に応じて、異種性 G P D は、グリセロール - 3 - ホスフェートによってフィードバック阻害される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 7 】

【図 1】大腸菌 (E . c o l i) 内で変種 G P D タンパク質を発現させるのに用いられるプラスミドのマップを示す。

【図 2】切り取られたヒトの G P D 配列の部分アラインメント (配列番号 1 9 0)、サッカロマイセス・セレビシエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) (G P D 1) (配列番号 1 9 1)、発疹チフスリケッチア (R i c k e t t s i a p r o w a z e k i i) (配列番号 1 9 2)、ベギアトア・アルバ (B e g g i a t o a a l b a) (配列番号 1 9 3)、およびカンジエラ・コレンシス (K a n g i e l l a k o r e e n s i s) (配列番号 1 9 4) を示す。アステリスク (*) は、ヒトの切り取られた配列における p h e 4 1 および p h e 9 7 の位置を示す。

【図 3】は、示されている G P D 1 変種および対照細胞培養物についての 2 0 時間産生データを示すグラフを示す。それぞれの変種の 2 種類のクローンを 2 回試験した。2 1 4 5 : W T G P D を有するイソブタノロゲン (i s o b u t a n o l o g e n) 対照菌株 (p L M H 1 1 - J M 4 4 で形質転換された P N Y 2 1 4 5 である)。E C _ 1 および E C _ 2 : 大腸菌 (E . c o l i) 最適化 G P D。E 3 および E 8 : 大腸菌 (E . c o l i) 最適化 G P D 1 変種。N 3 および N 8 : 酵母菌の天然コドン使用頻度 (n a t i v e c o d o n - u s a g e) の G P D 変種。M 3 および M 8 : 酵母菌コドン最適化 G P D 変種。変種である E 3、N 3、および M 3 は、F 7 3 置換を有し、変種である E 8、N 8、および M 8 は F 7 3 G / F 1 2 9 G 置換を有する。

【図 4】イソブタノール (i B u O H) / グリセロール (G l y) 比と、測定された G P D 活性 (U / m g) との比較を示したグラフを示す。i B u O H / G l y 比の回帰方程式は、 $2.93 - 234 \text{ GPD (U/mg)}$ と等しい ($R - S q = 60.1\%$; $R - S q (p r e d) = 25.04\%$)。

【図 5】測定されたイソブタノール濃度 (i s o b u t a n o l t i t e r) と、線形回帰方程式で計算された値 (F I T _ 2) との比較を示したグラフを示す ($S = 0.159277$; $R - S q = 98.6\%$; $R - S q (a d j) = 97.6\%$; $P R E S S = 0.415575$; $R - S q (p r e d) = 94.32\%$)。回帰方程式の定数および係数を表 1 2 に示す。

【図 6】イソブタノールの収率 (イソブタノール (g) / 消費されたグルコース (g)) と、線形回帰方程式で計算された値 (F I T _ 4) との比較を示したグラフを示す ($S = 0.0101071$; $R - S q = 93.9\%$; $R - S q (a d j) = 91.4\%$; $P R E S S = 0.00197878$; $R - S q (p r e d) = 76.30\%$)。回帰方程式の定数および係数を表 1 3 に示す。

【図 7】C P N 9 7 および P N Y 2 3 1 0 のイソブタノロゲン菌株の場合の、2 8 および 4 2 時間でのイソブタノールの収率 (消費されるグルコース 1 グラム当たりの産生イソブタノールのグラム数) のグラフを示す。

【図 8】C P N 9 7 および P N Y 2 3 1 0 のイソブタノロゲン菌株の場合の、2 8 および 4 2 時間でのイソブタノール / グリセロール比のグラフを示す。

【図 9】C P N 9 7 および P N Y 2 3 1 0 のイソブタノロゲン菌株について時間との関係で示した消費グルコースのグラフを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 8 】

10

20

30

40

50

特に定義されていない限り、本明細書に用いられている技術用語および科学用語はすべて、本発明が関係する技術分野の当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。相反する場合には、定義を含んでいる本出願が優先されることになる。また、文脈から明らかでない限り、単数形の用語は複数を含むものとし、複数形の用語は単数を含むものとする。本明細書に述べられている出版物、特許および他の文献はすべて、それぞれ個々の刊行物または特許出願が具体的かつ個別に参照によって組み込まれている場合と同様に、あらゆる目的のためにその全体を援用する。ただし、特許または特許公報の特定の節のみが参照によって組み込まれることが示されている場合は除く。

【0029】

本発明をさらに明確にするために、以下の用語、略語および定義を示す。

10

【0030】

本明細書に開示されているポリペプチドに関連した「得られる」には、示されている生物体に存在するGPD（または他の酵素）のアミノ酸配列に基づいて合成される配列ならびに生物の遺伝物質から直接クローン化されたものが包含されると理解されるであろう。

【0031】

本明細書で使用される「含む (comprises)」、「含んでいる (comprising)」、「含む (includes)」、「含んでいる (including)」、「有する (has)」、「有している (having)」、「含む (contains)」または「含んでいる (containing)」という用語あるいはそれらの他の任意の変形は、示されている実体 (integer) または実体群を含むことを意味するが、他の実体または実体群を除外することを意味しないと理解され、非排他的または限定的ではないことを意図している。例えば、列挙された要素を含む組成物、混合物、プロセス、方法、物品、または装置は、必ずしもそうした要素に限定されるわけではなく、明確に列挙されていない他の要素あるいはそうした組成物、混合物、プロセス、方法、物品、または装置に固有の他の要素も含みうる。さらに、逆のことを特に述べていない限り、「または」は、包含的な「または」であり、排他的な「または」ではない。例えば、AまたはBという条件は、以下のいずれによっても満たされる：Aが正しく（または存在し）かつBが誤りである（または存在しない）、Aが誤りであり（または存在せず）かつBが正しい（または存在する）、さらにAおよびBの両方が正しい（または存在する）。

20

【0032】

本明細書で使用される「からなる (consists of)」という用語、または本明細書全体および請求項を通じて使用されている「からなる (consist of)」または「からなる (consisting of)」などの変形は、挙げられている任意の実体または実体群を含むことを示すが、さらなる実体または実体群を、明記されている方法、構造、または組成物に加えることができないことを示す。

30

【0033】

本明細書で使用される「から基本的になる (consists essentially of)」という用語、あるいは本明細書全体および請求項を通じて使用される「から基本的になる (consist essentially of)」または「から基本的になる (consisting essentially of)」などの変形は、挙げられている任意の実体または実体群を含むこと、ならびに明記されている方法、構造、または組成物の基本的特性または新規の特性を実質的に変えることのない、挙げられている任意の実体または実体群を任意選択的に含むことを示す。M.P.E.P. § 2111.03を参照されたい。

40

【0034】

また、本発明の要素または成分の前に付いている不定冠詞の「ある (a)」および「ある (an)」は、実例の数、すなわち要素または成分の出現に関して非制限的であることを意図している。したがって「ある (a)」または「ある (an)」は、1つまたは少なくとも1つを含むと理解すべきであり、さらに要素または成分を示す語の単数形も、数が明らかに単数を意味するのでない限り、複数を含む。

50

【0035】

本明細書で使用される「発明」または「本発明」という用語は、非制限的用语であり、特定の発明のいずれかの1つの実施形態を指すことを意図するものではなく、提示されているか、または後日補正および補足される請求項に、または本明細書に記載された可能な実施形態すべてを包含する。

【0036】

使用される本発明の成分または反応物の量を修飾する、本明細書で使用される「約」という用語は、起こりうる数値的量的変動を表し、そうした変動は、例えば、現実の世界で濃縮物または溶液を作るために使用する普通の測定手順および液体処理手順によって；そうした手順における不注意による間違いによって；組成物を作るかまたは方法を実施するために用いる成分の製造、供給源、または純度の違いなどによって、起こりうる。「約」という用語は、特定の初期混合物から得られる組成物の種々の平衡状態のせいで違ってくる量も包含する。「約」という用語で修飾されているかどうかにかかわらず、請求項は量に相当するものを含む。ある実施形態では、「約」という用語は、報告されている数値の10%以内、または報告されている数値の5%以内を意味する。

【0037】

本明細書で使用される「ブタノール生合成経路」という用語、1 - ブタノール、2 - ブタノール、またはイソブタノールを生み出す酵素経路を表す。

【0038】

「1 - ブタノール生合成経路」という用語は、1 - ブタノールを生み出す酵素経路を表す。「1 - ブタノール生合成経路」は、アセチル - 補酵素A（アセチル - CoA）から1 - ブタノールを生み出す酵素経路を表しうる。例えば、1 - ブタノール生合成経路は、米国特許出願公開第2008/0182308号明細書および国際公開第2007/041269号パンフレット（これらについては、その全体を本明細書に援用する）に開示されている。

【0039】

「2 - ブタノール生合成経路」という用語は、2 - ブタノールを生み出す酵素経路を表す。「2 - ブタノール生合成経路」は、ピルベートから2 - ブタノールを生み出す酵素経路を表しうる。例えば、2 - ブタノール生合成経路は、米国特許第8,206,970号明細書、米国特許出願公開第2007/0292927号明細書、国際公開第2007/130518号パンフレットおよび国際公開第2007/130521号パンフレット（これらについては、その全体を本明細書に援用する）に開示されている。

【0040】

「イソブタノール生合成経路」という用語は、イソブタノールを生み出す酵素経路を表す。「イソブタノール生合成経路」という用語は、ピルベートからイソブタノールを生み出す酵素経路を表しうる。例えば、イソブタノール生合成経路は、米国特許第7,851,188号明細書、米国特許出願公開第2007/0092957号明細書、および国際公開第2007/050671号パンフレット（これらについては、その全体を本明細書に援用する）に開示されている。時々、「イソブタノール生合成経路」は、「イソブタノール産生経路」と同じ意味で使用される。

【0041】

本明細書で使用される「ブタノール」という用語は、ブタノール異性体である1 - ブタノール（1 - BuOH）、2 - ブタノール（2 - BuOH）、tert - ブタノール（t - BuOH）、及び/またはイソブタノール（i BuOHまたはi - BuOH。これは2 - メチル - 1 - プロパノールとしても知られる）のいずれか、またはこれらの混合物を表す。時々、本明細書で使用される「バイオブタノール」および「生物産生（bio - produced）ブタノール」という用語は、「ブタノール」と同じ意味で使用されることがある。

【0042】

ブタノールの用途としては、燃料（例えば、バイオ燃料）、燃料添加物、アルコール（

10

20

30

40

50

ディーゼルまたはバイオディーゼル燃料として使用できるエステル製造に使用されるもの)、プラスチック工業における化学物質、配合製品(化粧品など)の成分、および化学中間体を挙げることができるが、これらに限定されない。ブタノールは、ペイント、コーティング、ワニス、樹脂、ガム、染料、脂肪、ワックス、樹脂、シェラック、ゴム、およびアルカロイドといったものの溶剤として使用することもできる。

【0043】

本明細書で使用される「生物産生」という用語は、分子(例えば、ブタノール)が再生可能資源から作られることを意味する(例えば、分子は、発酵プロセスの間に、再生可能な供給原料から作ることができる)。したがって、例えば、生物産生イソブタノールは、再生可能な供給原料から発酵プロセスによって生み出されるイソブタノールでありうる。再生可能資源から生み出される分子は、 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 同位体比によってさらに定義できる。 $1:0\sim 0:1$ の範囲を超える $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 同位体比は、生物産生分子であることを示すが、 $0:1$ の比率は、分子が化石由来であることを示す。

10

【0044】

「改変アルコール産生経路」(改変ブタノールまたはイソブタノール産生経路など)を含む組換え宿主細胞は、宿主細胞内に通常存在するものとは異なる仕方でアルコールを生み出す修飾経路を含む宿主細胞を表す。そのような異なる点としては、宿主細胞が普通は産生しないアルコールの産生、あるいは産生の増大あるいは効率化がある。

【0045】

本明細書で使用される「異種性生合成経路」という用語は、少なくとも1種の酵素が、生合成経路を含んでいる宿主細胞の内からのものではない生成物を生み出す酵素経路を表す。

20

【0046】

本明細書で使用される「エクストラクト」という用語は、発酵ブロスからアルコール(例えば、ブタノール)を抽出するのに使用できる1種または複数種の有機溶剤を表す。

【0047】

本明細書で使用される「有効イソブタノール生産性」という用語は、細胞1グラム当たりの産生イソブタノールの総グラム数を表す。

【0048】

本明細書で使用される「有効濃度(effective titer)」という用語は、発酵培地1リットル当たりの発酵によって産生される特定のアルコール(例えば、ブタノール)の総量を表す。ブタノールの総量には、(i)発酵培地中のブタノールの量；(ii)有機エクストラクトから回収されたブタノールの量；および(iii)気相から回収されたブタノールの量(ガストリッピングを使用する場合)が含まれる。

30

【0049】

本明細書で使用される「有効量(effective rate)」という用語は、1時間の発酵で、発酵培地1リットルにつき発酵で産生されるアルコール(例えば、ブタノール)の総量を表す。

【0050】

本明細書で使用される「有効収率」という用語、生体触媒が消費する発酵性炭素物質1単位当たりの産生アルコール(例えば、ブタノール)の量を表す。

40

【0051】

本明細書で使用される「分離」という用語は、「回収」と同じ意味であり、初期混合物から化合物を取り出して、初期混合物中の化合物の純度または濃度よりも高い純度または濃度で化合物を得ることを表す。

【0052】

本明細書で使用される「水性相」という用語は、発酵ブロスを水不混和性有機エクストラクトと接触させることにより得られる二相性混合物の水性相を表す。発酵抽出を含む本明細書で述べるプロセスの一実施形態では、「発酵ブロス」という用語は、特に、二

50

相性発酵抽出における水性相を表す。

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用される「有機相」という用語は、発酵ブ罗斯を水不混和性有機エクストラクトと接触させることにより得られる二相性混合物の非水相を表す。

【 0 0 5 4 】

「炭素物質」または「発酵性炭素物質」という用語は、本発明の宿主生物が代謝できる炭素源を表し、特に単糖類、オリゴ糖類、多糖類、および炭素が1個の物質またはそれらの混合物よりなる群から選択される炭素源を表す。炭素物質の非限定的な例は、本明細書に記載されており、それには、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、多糖類、エタノール、ラクテート、スクシネート、グリセロール、二酸化炭素、メタノール、グルコース、フルクトース、乳糖、スクロース、キシロース、アラビノース、デキストロース、セルロース、メタン、アミノ酸、またはそれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。

10

【 0 0 5 5 】

本明細書で使用される「発酵ブ罗斯」は、水、糖質類（発酵性炭素源）、溶解固体（存在する場合）、アルコールを産生する微生物、生成物アルコールおよび（生成物アルコールが、存在する微生物により、糖質類からアルコール、水および二酸化炭素（ CO_2 ）への反応によって作られている）物質の他のすべての成分からなる混合物を意味する。時々、本明細書で使用される「発酵培地」および「発酵混合物」という用語は、「発酵ブ罗斯」と同じ意味で使用できる。

【 0 0 5 6 】

20

本明細書で使用される「発酵槽」は、物質の発酵に使用される任意の容器、容器類、または装置を表す。発酵槽は、発酵培地および発酵を行うことができる微生物を含むことができる。「発酵容器」という用語は、発酵反応が行われ、それによってアルコール（ブタノールなど）が作られる容器を表す。「発酵槽」は、本明細書では「発酵容器」と同義語的に使用できる。

【 0 0 5 7 】

「発酵生成物」という用語は、注目している任意の所望の生成物を含み、それには1 - ブタノール、2 - ブタノール、イソブタノールなどがあるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 8 】

30

本明細書で使用される「バイオマス」は、発酵性糖を生じる加水分解性デンプンを含む天然物を表し、その天然物には、任意のセルロース物質またはリグノセルロース物質およびセルロース含有物質（必要に応じて、ヘミセルロース、リグニン、デンプン、オリゴ糖類、二糖類、及び/または単糖類をさらに含む）も含まれる。バイオマスはまた、タンパク質及び/または脂質などの更なる成分を含みうる。バイオマスは、単一供給源から得ることができるか、またはバイオマスは、2種類以上の供給源から得られる混合物を含みうる。例えば、バイオマスは、トウモロコシの穂軸とトウモロコシのわらの混合物、または草と葉の混合物を含むことができる。バイオマスとしては、バイオエネルギー作物、農業残渣、固形都市廃棄物、固形産業廃棄物、紙製造のスラッジ、庭ゴミ、木屑および林業廃棄物があるが、これらに限定されない。バイオマスの例としては、トウモロコシ穀粒、トウモロコシの穂軸、穀物残渣（トウモロコシの皮など）、トウモロコシのわら、草、小麦、ライ麦、小麦のわら、大麦、大麦のわら、干し草、稲わら、スイッチグラス、紙くず、サトウキビバガス、モロコシ、大豆、（穀物、木、枝、根、葉、木片、おがくず、低木および灌木の）粉砕によって得られる成分、野菜、果物、花、家畜ふん尿、およびそれらの混合物があるが、これらに限定されない。

40

【 0 0 5 9 】

本明細書で使用される「供給原料」は、発酵性炭素源を含んでいる生産物を意味する。好適な供給原料としては、ライ麦、小麦、トウモロコシ、トウモロコシのマッシュ、サトウキビ、大麦、セルロース物質、リグノセルロース物質、およびそれらの混合物があるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 0 】

50

本明細書で使用される「バイオマス」という用語は、場合によっては、培養物のかたまり、例えば、組換え微生物の量（典型的には、乾燥菌体重量（d c w）（グラム）/ リットル（g / l）の単位で示される）を表す。

【0061】

本明細書で使用される「好気条件」という用語は、酸素が存在する成長条件を意味する。

【0062】

本明細書で使用される「微好氣的条件」という用語は、酸素レベルが低い（すなわち、標準大気酸素レベルより低い）成長条件を表す。

【0063】

本明細書で使用される「嫌気条件」という用語は、酸素が存在しない成長条件を意味する。

【0064】

「ポリヌクレオチド」という用語は、単一の核酸ならびに複数の核酸を包含することを意図しており、核酸分子または構築物（例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）またはプラスミドDNA（pDNA））を表す。ポリヌクレオチドは、完全長のcDNA配列のヌクレオチド配列（またはそのフラグメント）（非翻訳の5'および3'配列およびコード配列を含む）を含むことができる。ポリヌクレオチドは、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチド（無修飾RNAまたはDNAあるいは修飾RNAまたはDNAであってよい）から構成されうる。例えば、ポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖領域と二本鎖領域とが混じり合っているDNA、一本鎖および二本鎖のRNA、および一本鎖領域と二本鎖領域とが混じり合っているRNA、DNAおよびRNA（一本鎖であってよく、より一般的には、二本鎖または一本鎖領域と二本鎖領域とが混ざり合っているものであってよい）を含むハイブリッド分子から構成されうる。「ポリヌクレオチド」は、化学的に修飾、酵素的に修飾、あるいは代謝的に修飾された形態を包含する。

【0065】

ポリヌクレオチド配列は、その天然環境から取り出された場合、「分離された」と言うことができる。例えば、ベクターに含まれている、ALS活性を有するポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントをコードする異種性ポリヌクレオチドは、本発明においては分離されていると考えられる。分離ポリヌクレオチドの更なる例としては、異種性宿主細胞内に維持される組換えポリヌクレオチドまたは溶液中にある（部分的または実質的に）精製されたポリヌクレオチドがある。本発明による分離されたポリヌクレオチドまたは核酸としてはさらに、合成によって作り出されたそうした分子がある。DNAポリマーの形の分離されたポリヌクレオチドフラグメントは、cDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAの1つまたは複数の断片から構成されうる。

【0066】

本明細書で使用される、「活性低下」は、ポリペプチドの知られている生物活性の測定可能な減少を表し、活性低下をもたらす変更が行われる前のポリペプチドの同じ生物活性と比較した場合の活性低下を表す。そのような変更としては、本明細書に記載しているポリペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの修飾を挙げることができる。本明細書に開示されているポリペプチドの活性低下は、当該技術分野において周知でありかつ本明細書に開示されている方法によって測定できる。酵素の活性低下は、野生型酵素の活性と比べた場合の（部分的または全体的な）酵素活性のダウンレギュレーションを表す。天然遺伝子（native gene）に「破損」または「修飾」（その遺伝子の一部の中の挿入、欠失、または目的とした変異を表す）がある場合、ダウンレギュレーションが起こりうる。それによって、例えば、完全な遺伝子ノックアウトが行われ、その結果として遺伝子がゲノムから欠失し、タンパク質が翻訳されないか、あるいは挿入、欠失、アミノ酸置換または他の目的とした突然変異を有する翻訳された副単位タンパク質がもたらされる。タンパク質における修飾の位置は、例えば、タンパク質のN末端部分また

10

20

30

40

50

はタンパク質のC末端部分内にあることがある。修飾タンパク質は、破損していないタンパク質と比べて活性が損なわれるであろう。また、非機能性でありうる。上流の制御領域の操作、あるいはセンス、アンチセンスまたはRNAi技術などの使用により、酵素の活性低下も起こりうる。酵素の活性低下の別のメカニズムは、酵素の速度的特性を変える（例えば、基質に対する親和性の低下、 k_{cat} の低下など）変異の導入である。

【0067】

本明細書で使用される「活性除去」は、活性除去を引き起こした変更の前のポリペプチドの同じ生物活性と比較した場合に、ポリペプチドの周知の生物活性が完全になくすることを表す。そのような変更として、本明細書で述べているようなポリペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの修飾を挙げることができる。活性除去には、活性の除去をもたらした変更の前のポリペプチドのその生物活性と比較した場合に、測定不能であるポリペプチドの生物活性が含まれる。本明細書に開示されているポリペプチドの活性除去は、当該技術分野において周知でありかつ本明細書に開示されている方法で判定することができる。

10

【0068】

本明細書で使用される「PDC-」、「PDCノックアウト」、または「PDC-KO」という用語は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（PDC）をコードする遺伝子の発現を不活性化するかまたは低下させる遺伝子修飾を有する細胞を表し、その修飾の結果、その細胞は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ酵素活性が実質的にまたは完全になくなる。複数の発現（活性）PDC遺伝子が細胞にある場合、活性PDC遺伝子のそれぞれを不活性化することができるか、あるいは発現が最小になるようにしてPDC細胞が作られるようにすることができる。

20

【0069】

本明細書で使用される「比活性」という用語は、所与の量のタンパク質における活性の単位と定義される。それゆえに、比活性は、直接測定されることはないが、1) 酵素試料の活性（単位/ml）を、2) その試料中のタンパク質濃度で割って計算される。したがって、比活性は、単位/mg（ここで、酵素単位は、形成される生成物（モル）/分と定義される）で表される。純粋な完全活性酵素の試料の比活性は、その酵素の特徴となる。タンパク質混合物の試料の比活性は、注目している活性酵素からなる試料中のタンパク質の相対フラクションの尺度である。

30

【0070】

「 k_{cat} 」および「 K_M 」という用語は、当業者に知られており、Enzyme Structure and Mechanism, 2nd ed. (Ferst; W. H. Freeman Press, NY, 1985; pp 98 - 120)に記載されている。 K_M （ミカエリス定数）は、最大速度の半分となるような基質の濃度である。「 k_{cat} 」という用語（「代謝回転数」と呼ばれることが多い）は、単位時間当たりの、生成物に変換される基質分子の最大数/活性部位、または単位時間当たりの酵素の代謝回転の数として定義される。 $k_{cat} = V_{max} / [E]$ （ここで、 $[E]$ は酵素濃度である）（Ferst, supra）。「全代謝回転」および「全代謝回転数」という用語は、本明細書では、酵素と基質との反応によって形成される生成物の量を表す。

40

【0071】

「触媒効率」という用語は、酵素の k_{cat} / K_M で定義される。触媒効率は、基質に対する酵素の特異性を数量化するのに使用される。

【0072】

「分離された核酸分子」、「分離された核酸フラグメント」および「遺伝的構成体」という用語は同義語として用いられ、一本鎖または二本鎖であるRNAまたはDNAのポリマーを意味し、必要に応じて、合成された、自然のものでない、または変更されたヌクレオチド塩基を含んでいる。DNAポリマーの形の分離された核酸フラグメントは、cDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAの1つまたは複数のセグメントから構成されうる。

【0073】

50

「アミノ酸」という用語は、タンパク質またはポリペプチドの基本的な化学構造単位を表す。本明細書では、表 1 の略号を用いて特定のアミノ酸を識別する。

【 0 0 7 4 】

【 表 1 】

表 1:アミノ酸とその略号

アミノ酸	3 文字の略号	1 文字の略号
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン	Gln	Q
グルタミン酸	Glu	E
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

10

20

30

【 0 0 7 5 】

「遺伝子」という用語は、特定のタンパク質として発現可能な核酸フラグメントを表し、これは必要に応じてコード配列の前にくる制御配列（5' 非コード配列）および後にくる制御配列（3' 非コード配列）を含む。「天然遺伝子」は、独自の制御配列を有する自然に存在する遺伝子を表す。「キメラ遺伝子」は、自然には一緒に見出されない制御配列およびコード配列を含む、天然遺伝子ではない任意の遺伝子を表す。したがってキメラ遺伝子は、異なる源から得られる制御配列およびコード配列、または同じ源から得られるが、自然に見出されるものとは違った仕方で配置されている制御配列およびコード配列を含みうる。「内在性遺伝子」は、微生物のゲノム内で自然の位置にある天然遺伝子を表す。「外来遺伝子」は、通常は宿主微生物に存在しないが、遺伝子導入によって宿主微生物に導入される遺伝子を表す。外来遺伝子は、天然でない微生物に挿入された天然遺伝子、つまりキメラ遺伝子を含みうる。「導入遺伝子」は、形質転換法によってゲノムに導入された遺伝子である。

40

【 0 0 7 6 】

本明細書で使用される「天然」とは、独自の制御配列を持つ（存在する場合）天然に見出される形のポリヌクレオチド、遺伝子、またはポリペプチドを表す。

【 0 0 7 7 】

50

本明細書で使用される「コード配列」または「コード領域」という用語は、特定アミノ酸配列をコードするDNA配列を表す。

【0078】

本明細書で使用される「内在性」とは、生物または生物のゲノム中の生来の位置にある天然の形のポリヌクレオチド、遺伝子またはポリペプチドを表す。「内在性ポリヌクレオチド」は、生物のゲノム内で生来の位置にある天然ポリヌクレオチドを含む。「内在性遺伝子」は、生物体のゲノム内で生来の位置にある天然遺伝子を含む。「内在性ポリペプチド」は、生物のゲノムにおいて生来の位置にある天然ポリヌクレオチドまたは天然遺伝子から転写および翻訳される、生物の生来の位置にある天然ポリペプチドを含む。

【0079】

ポリヌクレオチド、遺伝子、またはポリペプチドに関連して使用される「異種性」という用語は、宿主生物中に通常は見出されないポリヌクレオチド、遺伝子、またはポリペプチドを表す。「異種性」は、対応する天然遺伝子とは異なる形（例えば、生物のゲノム内の生来の位置にない）で元の生物に再導入される天然コード領域（またはその一部）も含む。異種性のポリヌクレオチドまたは遺伝子は、例えば、遺伝子導入によって宿主生物に導入できる。異種遺伝子は、天然宿主に再導入される非天然制御領域と一緒に、天然コード領域を含むことができる。例えば、異種遺伝子は、キメラ遺伝子の一部（天然宿主に再導入される非天然制御領域を含む）である天然コード領域を含むことができる。「異種性ポリペプチド」は、対応する天然ポリペプチドとは異なる形で元の生物に再導入される天然ポリペプチドを含む。「異種性」ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとしては、「天然」ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとは相違点のある改変ポリペプチドまたはポリヌクレオチドも挙げることができる（例えば、内在性ポリヌクレオチド内の点突然変異により「異種性」ポリペプチドが生み出されうる）。本明細書で使用される「キメラ遺伝子」、「外来遺伝子」、および「導入遺伝子」はすべて、「異種性」遺伝子の例でありうる。

【0080】

「導入遺伝子」は、形質転換法によってゲノムに導入された遺伝子である。

【0081】

本明細書で使用される「修飾」という用語は、本明細書に開示されているポリヌクレオチドの変更（ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドの活性の低下または消失をもたらす）、ならびに本明細書に開示されているポリペプチドの変更（ポリペプチドの活性の減少または消失をもたらす）を表す。そのような変更は、当該技術分野において周知である方法によって行うことができ、それには、欠失、突然変異（例えば、自然突然変異誘発、ランダム突然変異誘発、変異誘発遺伝子によって引き起こされる突然変異誘発、またはトランスポゾン突然変異）、置換、挿入、ダウンレギュレート、細胞部位の変更、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの状態の変更（例えば、メチル化、リン酸化またはユビキチン結合）、補助因子の除去、アンチセンスRNA/DNAの導入、妨害RNA/DNAの導入、化学修飾、共有結合修飾、UVまたはX線による照射、相同組換え、有糸分裂組換え、プロモーター置換の各方法、および/またはこれらの組合せがあるが、それらに限定されない。どのヌクレオチドまたはアミノ酸残基を修飾できるかを判断する際の手引きは、特定のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列を、相同ポリヌクレオチドまたはポリペプチド（例えば、酵母菌または細菌性）の配列と比較し、高度な相同性の領域（保存領域）または共通配列の領域で行われる修飾の数を最大化することにより、得られる。

【0082】

「組換え遺伝発現要素（recombinant genetic expression element）」という用語は、1種または複数種の特定のタンパク質を発現する核酸フラグメント（タンパク質のコード配列の前にくる制御配列（5'非コード配列）およびその後にくる制御配列（3'終止配列）を含む）を表す。キメラ遺伝子は組換え遺伝発現要素である。オペロンのコード領域は、作動的に連結された（operably linked）プロモーターおよび終止領域と一緒にあって、組換え遺伝発現要素を形成

することができる。

【0083】

「制御配列」は、コード配列の上流に位置するヌクレオチド配列（5'非コード配列）、コード配列内に位置するヌクレオチド配列、あるいはコード配列の下流に位置するヌクレオチド配列（3'非コード配列）を表し、転写、RNAのプロセッシングまたは安定性、または関連したコード配列の翻訳に影響を与えるものである。制御配列としては、プロモーター、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー、転写終結シグナル、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列、RNAプロセッシング部位、エフェクター結合部位およびステムループ構造を挙げることができる。

【0084】

「プロモーター」という用語は、コード配列または機能RNAの発現を制御できる核酸配列を表す。一般に、コード配列はプロモーター配列の3'に位置する。プロモーターは、その全体が天然遺伝子から誘導されうるか、または天然に見出される種々のプロモーターから得られる種々の要素から構成されうるか、または合成核酸セグメントを含むことさえできる。種々のプロモーターは、種々の組織または細胞型内で、または発育の種々の段階で、または種々の環境条件または生理学的条件に応じて遺伝子の発現を指示できる、と当業者は理解している。ほとんどの細胞型でほとんどの場合に遺伝子の発現を引き起こすプロモーターは、一般的に、「常時発現プロモーター（*constitutive promoters*）」と呼ばれる。一方、「誘導性プロモーター」では、プロモーターがプロモーター特有のシグナルまたは分子によって誘起または活性化されると、遺伝子の発現が引き起こされる。さらに、大抵の場合、制御配列の正確な境界が完全には定まっていないので、様々な長さのDNAフラグメントが同一のプロモーター活性を有しているであろうと理解される。例えば、「FBA1プロモーター」を用いて、FBA1遺伝子のプロモーター領域から得られるフラグメントを表すことができると理解されるであろう。

【0085】

本明細書で使用される「ターミネーター」という用語は、コード配列の下流に位置するDNA配列を表す。これには、ポリアデニル化認識配列、およびmRNAプロセッシングまたは遺伝子発現に影響を与えることのできる調節シグナルをコードする他の配列が含まれる。ポリアデニル化シグナルは普通、mRNA前駆体の3'末端へのポリアデニル酸領域（*polyadenylic acid tracts*）の追加に影響を与えるという特徴がある。3'領域は、転写、RNAのプロセッシングまたは安定性、あるいは関連するコード配列の翻訳に影響を及ぼしうる。大抵の場合、制御配列の正確な境界が完全には定まっていないので、様々な長さのDNAフラグメントが同一のターミネーター活性を有しているであろうと理解される。例えば、CYC1遺伝子のターミネーター領域から得られるフラグメントを表すのに「CYC1ターミネーター」を使用できることが理解されるであろう。

【0086】

「作動的に連結された」という用語は、単一の核酸フラグメント上の核酸配列の結合であって、一方の機能が他方によって影響されるようなものを表す。例えば、プロモーターが、あるコード配列の発現に影響を与えることができる場合、プロモーターはそのコード配列と作動的に連結されている（すなわち、そのコード配列はそのプロモーターの転写制御下にある）。コード配列は、センス方向またはアンチセンス方向に向かって制御配列に作動的に連結されうる。

【0087】

本明細書で使用される「発現」という用語は、本発明の核酸フラグメントから得られるセンスRNA（mRNA）またはアンチセンスRNAの転写および安定した集積を表す。発現は、mRNAをポリペプチドに翻訳することを指す場合もある。

【0088】

本明細書で使用される「過剰発現」という用語は、同じかまたは関連した遺伝子の内在性発現よりも多くの発現を表す。異種遺伝子は、その発現が同等の内在性遺伝子の発現よ

10

20

30

40

50

りも多い場合に過剰発現される。

【0089】

過剰発現という用語は、宿主細胞中の核酸またはタンパク質のレベルの増大を表す。したがって、過剰発現は、宿主細胞内の内在性配列の転写または翻訳レベルの増大から起こりうるか、あるいは異種性配列を宿主細胞へ導入することで起こりうる。過剰発現は、核酸またはタンパク質配列の安定性が増大することからも起こりうる。

【0090】

本明細書で使用される「形質転換」という用語は、宿主微生物のゲノムへの核酸フラグメントの導入を指し、その結果として遺伝的に安定した遺伝形質が生じる。形質転換された核酸フラグメントを含む宿主微生物は、「トランスジェニック」微生物または「組換え」微生物または「形質転換」微生物と呼ばれる。

10

【0091】

「プラスミド」、「ベクター」および「カセット」という用語は、細胞の中央代謝の一部ではない遺伝子を持っていることが多い、余分の染色体要素（普通は、環状二本鎖DNAフラグメントの形である）を指す。そのような要素は、任意の源から誘導される一本鎖または二本鎖DNAまたはRNAの、自己複製配列、ゲノム組込み配列、ファージまたはヌクレオチド配列（線状または環状）であってよく、それらにおいては、幾つものヌクレオチド配列が固有の構成体に結合されるかまたは再結合されており、その構成体は、選択された遺伝子産物のプロモーターフラグメントおよびDNA配列を、適切な3'非翻訳配列と一緒に細胞に導入することができる。「形質転換カセット」は、外来遺伝子を含みかつ（外来遺伝子に加えて）特定宿主細胞の形質転換を促進する要素を有している特定ベクターを表す。「発現カセット」は、外来遺伝子を含みかつ（外来遺伝子に加えて）外来宿主（foreign host）のその遺伝子の発現を増強させることができる要素を有している特定のベクターを表す。

20

【0092】

本明細書で使用される「コドン縮重」という用語は、コード化ポリペプチドのアミノ酸配列に影響を与えることなく、ヌクレオチド配列が変化することを許すという遺伝暗号の性質を表す。当業者は、ある特定のアミノ酸を指定するためのヌクレオチドコドンの使用の際に特定の宿主細胞が示す「コドンバイアス」についてよく知っている。それゆえに、宿主細胞内での発現を向上させるために遺伝子を合成する場合、そのコドン使用の頻度が宿主細胞の好ましいコドン使用の頻度に近づくように遺伝子を設計するのが望ましい。

30

【0093】

「コドン最適化」という用語は、様々な宿主の形質転換を行うための核酸分子の遺伝子またはコード領域と関係している場合、DNAがコードするポリペプチドを変化させることなく、核酸分子の遺伝子またはコード領域におけるコドンを変更して宿主生物の典型的なコドン使用頻度を反映させることを表す。そのような最適化には、少なくとも1、または2つ以上、またはかなりの数のコドンを、その生物の遺伝子でもっと頻用される1つまたは複数のコドンと置き換えることが含まれる。

【0094】

任意のポリペプチド鎖のアミノ酸をコードするコドンを含むヌクレオチド配列が多様であることにより、遺伝子をコードする配列において変化が可能となる。各コドンは、3個のヌクレオチドからなり、DNAを含むヌクレオチドは、4つの特定の塩基に限定されるので、ヌクレオチドの可能な組合せは64個あることになり、そのうちの61個がアミノ酸をコードする（残りの3つのコドンは、翻訳終了のシグナルを送る）。どのコドンがどのアミノ酸をコードするかを示す「遺伝暗号」が、本明細書では表2Aとして複製されている。その結果として、多数のアミノ酸が複数のコドンによって指定される。例えば、アミノ酸であるアラニンおよびプロリンは、4個のトリプレットによってコードされ、セリンおよびアルギニンは6個によってコードされるが、トリプトファンおよびメチオニンはただ1つのトリプレットによってコードされる。この縮重により、DNA塩基組成物は、DNAによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を変更することなく、広範囲にわ

40

50

たって変化することが可能になる。

【 0 0 9 5 】

【 表 2 】

表2A:標準遺伝暗号

	T	C	A	G
T	TTT Phe (F) TTC “ TTA Leu (L) TTG “	TCT Ser (S) TCC “ TCA “ TCG “	TAT Tyr (Y) TAC “ TAA 停止 TAG 停止	TGT Cys (C) TGC TGA 停止 TGG Trp (W)
C	CTT Leu (L) CTC “ CTA “ CTG “	CCT Pro (P) CCC “ CCA “ CCG “	CAT His (H) CAC “ CAA Gln (Q) CAG “	CGT Arg (R) CGC “ CGA “ CGG “
A	ATT Ile (I) ATC “ ATA “ ATG Met (M)	ACT Thr (T) ACC “ ACA “ ACG “	AAT Asn (N) AAC “ AAA Lys (K) AAG “	AGT Ser (S) AGC “ AGA Arg (R) AGG “
G	GTT Val (V) GTC “ GTA “ GTG “	GCT Ala (A) GCC “ GCA “ GCG “	GAT Asp (D) GAC “ GAA Glu (E) GAG “	GGT Gly (G) GGC “ GGA “ GGG “

10

20

【 0 0 9 6 】

多数の生物体には、増大するペプチド鎖への特定アミノ酸の挿入をコードする特定コドンが使用される偏った傾向がある。生物体の間でのコドン使用頻度のコドン優先性 (codon preference) (つまりコドン偏向 (codon bias)) の相違は、遺伝暗号の縮重によってもたらされ、多数の生物体の間において十分に実証されている。コドン偏向は、多くの場合、メッセンジャーRNA (mRNA) の翻訳効率と相関があり、それは、とりわけ、翻訳されるコドンの特性および特定の転移RNA (tRNA) 分子の利用可能性に依存すると考えられる。細胞中の選択されるtRNAの優性は一般に、ペプチド合成にもっとも頻繁に使用されるコドンの反映である。したがって遺伝子は、コドン最適化に基づいて、所与の生物中での最適な遺伝子発現に合わせて調整できる。

30

【 0 0 9 7 】

多種多様な動物、植物および微生物種に利用できる多数の遺伝子配列があるならば、コドンの相対使用頻度を計算することが可能である。コドン使用頻度表は、例えば、<http://www.kazusa.or.jp/codn/> (2008年3月20日にアクセス) から入手できる「コドン使用頻度データベース (Codon Usage Database)」から容易に手に入れることができ、こうした表は、多くの仕方で転用することができる。Nakamura, Y., et al. Nucl, Acids Res. 28: 292 (2000) を参照されたい。GenBank Release 128.0 [2002年2月15日] から計算された酵母菌のコドン使用頻度表を、以下の表2Bとして再現する。この表では、mRNA命名法を使用しており、そのためDNAに見出されるチミン (T) の代わりに、表では、RNAに見出されるウラシル (U) を使用している。表2Bは、64個のコドンすべてではなく、各アミノ酸について頻度が計算されており、作り替えられている。

40

【 0 0 9 8 】

【表 3】

表2B:サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)のコドン使用頻度表

アミノ酸	コドン	数	1000当たりの頻度
Phe	UUU	170666	26.1
Phe	UUC	120510	18.4
Leu	UUA	170884	26.2
Leu	UUG	177573	27.2
Leu	CUU	80076	12.3
Leu	CUC	35545	5.4
Leu	CUA	87619	13.4
Leu	CUG	68494	10.5
Ile	AUU	196893	30.1
Ile	AUC	112176	17.2
Ile	AUA	116254	17.8
Met	AUG	136805	20.9
Val	GUU	144243	22.1
Val	GUC	76947	11.8
Val	GUA	76927	11.8
Val	GUG	70337	10.8
Ser	UCU	153557	23.5
Ser	UCC	92923	14.2

10

20

【 0 0 9 9 】

【表 4】

アミノ酸	コドン	数	1000当たりの頻度
Ser	UCA	122028	18.7
Ser	UCG	55951	8.6
Ser	AGU	92466	14.2
Ser	AGC	63726	9.8
Pro	CCU	88263	13.5
Pro	CCC	44309	6.8
Pro	CCA	119641	18.3
Pro	CCG	34597	5.3
Thr	ACU	132522	20.3
Thr	ACC	83207	12.7
Thr	ACA	116084	17.8
Thr	ACG	52045	8.0
Ala	GCU	138358	21.2
Ala	GCC	82357	12.6
Ala	GCA	105910	16.2
Ala	GCG	40358	6.2
Tyr	UAU	122728	18.8
Tyr	UAC	96596	14.8
His	CAU	89007	13.6
His	CAC	50785	7.8
Gln	CAA	178251	27.3
Gln	CAG	79121	12.1
Asn	AAU	233124	35.7
Asn	AAC	162199	24.8
Lys	AAA	273618	41.9
Lys	AAG	201361	30.8
Asp	GAU	245641	37.6
Asp	GAC	132048	20.2
Glu	GAA	297944	45.6
Glu	GAG	125717	19.2
Cys	UGU	52903	8.1
Cys	UGC	31095	4.8

10

20

30

40

【 0 1 0 0 】

【表 5】

アミノ酸	コドン	数	1000当たりの頻度
Trp	UGG	67789	10.4
Arg	CGU	41791	6.4
Arg	CGC	16993	2.6
Arg	CGA	19562	3.0
Arg	CGG	11351	1.7
Arg	AGA	139081	21.3
Arg	AGG	60289	9.2
Gly	GGU	156109	23.9
Gly	GGC	63903	9.8
Gly	GGA	71216	10.9
Gly	GGG	39359	6.0
停止	UAA	6913	1.1
停止	UAG	3312	0.5
停止	UGA	4447	0.7

10

20

【0101】

この表または同様の表を利用することにより、当業者はその頻度を任意の所与のポリペプチド配列に当てはめて、（ポリペプチドをコードするが、所与の種にとって最適なコドンを使用する）コドン最適化コード領域の核酸フラグメントを作り出すことができる。

【0102】

最適化頻度で、所与のポリペプチド配列をコードするコドンをランダムに割り当てることは、アミノ酸ごとにコドン頻度を計算し、その後コドンをポリペプチド配列にランダムに割り当てることにより、手作業で行うことができる。さらに、当業者は、様々なアルゴリズムおよびコンピューターソフトウェアプログラムを容易に入手できる。例えば、Lasergene Package (DNASTAR, Inc., Madison, WI) の「EditSeq」機能、VectorNTI Suite (Informax, Inc., Bethesda, MD から入手可能) の逆翻訳機能、および GCG - Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA から入手可能) の「逆翻訳」機能がある。さらに、様々なリソースが、コドン最適化コード領域配列に公に利用できる。例えば、「逆翻訳」機能 (<http://www.entelechon.com/bioinformatics/backtranslation.php?lang=eng>) (2008年4月15日にアクセス) および「backtranseq」機能 (<http://bioinfo.pbil.nrc.ca:8090/EMBOSS/index.html>) (2002年7月9日にアクセス) がある。所与の頻度に基づいてコドンを割り当てる基本的なアルゴリズムを構成することも、基礎的な数学関数を用いて当業者が容易に達成できる。

30

40

【0103】

コドン最適化コード領域は、当業者に知られている様々な方法で設計でき、その方法には、「合成遺伝子デザイナー (synthetic gene designer)」などのソフトウェアパッケージ (userpages.umbc.edu/~wug1/codon/sgd/) (2012年3月19日にアクセス) がある。

【0104】

温度および溶液イオン強度の適切な条件下で、一本鎖の形の核酸フラグメントが他の核

50

酸フラグメントにアニールしうる場合、ポリヌクレオチドまたは核酸フラグメントは、別の核酸フラグメント(cDNA、ゲノムDNA、またはRNA分子など)と「ハイブリッド形成可能」である。ハイブリッド形成および洗浄の条件はよく知られており、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989)に、特に、その中の第11章および表11.1(全体を本明細書に援用する)に例示されている。温度およびイオン強度の条件により、ハイブリッド形成の「緊縮性(stringency)」が決まる。緊縮性の条件は、類似性が中程度のフラグメント(遠縁関係にある生物からの相同配列など)を探すため、また類似性の高いフラグメント(近縁関係にある生物からの機能酵素を複製する遺伝子など)を探すために調整できる。ハイブリッド形成後の洗浄により、緊縮性条件が決まる。一式の条件では、 $6\times$ SSC、 0.5% SDS、室温、 15 min から開始し、次いで $2\times$ SSC、 0.5% SDS、 45°C 、 30 min を繰り返し、その後、 $0.2\times$ SSC、 0.5% SDS、 50°C 、 30 min を2回繰り返すという一連の洗浄を使用する。別の一式の緊縮条件では、もっと高い温度を使用し、その場合、 $0.2\times$ SSC、 0.5% SDS中での最後の2回の 30 min の洗浄の温度を 60°C まで増大させたこと以外は、洗浄が上記と同じである。別の一式の高緊縮条件では、 $0.1\times$ SSC、 0.1% SDS、 65°C での2回の最終洗浄を使用する。更なる一式の緊縮条件は、例えば、 $0.1\times$ SSC、 0.1% SDS、 65°C でのハイブリッド形成、 $2\times$ SSC、 0.1% SDSでの洗浄、その後、 $0.1\times$ SSC、 0.1% SDSを含む。

【0105】

ハイブリッド形成では、2個の核酸が相補的配列を含んでいることが必要であるが、ハイブリッド形成の緊縮性によっては、塩基間のミスマッチが起こりうる。核酸のハイブリッド形成のための適切な緊縮性は、核酸の長さおよび相補性の度合い、当該技術分野において周知である変数によって異なる。2つのヌクレオチド配列間の類似性または相同性の度合いが大きいほど、そうした配列を有する核酸のハイブリッドの T_m 値は大きくなる。核酸ハイブリッド形成の相対的安定性(T_m が大きくなることに対応する)は、RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNAの順序で減少する。長さが100個より長いヌクレオチドのハイブリッドの場合、 T_m の計算式が導かれている(Sambrook et al., (上記参照), 9.50-9.51を参照)。短い核酸(すなわち、オリゴヌクレオチド)とのハイブリッド形成では、ミスマッチの位置がより重要になり、オリゴヌクレオチドの長さによってその特異性が決まる(Sambrook et al., (上記参照), 11.7-11.8を参照)。1つの実施形態では、ハイブリッド形成可能な核酸の長さは、少なくとも約10個のヌクレオチドである。1つの実施形態では、ハイブリッド形成可能な核酸の最小長さは、少なくとも約15個のヌクレオチドであり、少なくとも約20個のヌクレオチド、またはその長さは少なくとも約30個のヌクレオチドである。さらに、当業者であれば、必要な場合に、プローブの長さなどの因子に応じて、温度および洗浄溶液の塩濃度を調節できることを認めるであろう。

【0106】

本明細書で使用される「ポリペプチド」という用語は、単一の「ポリペプチド」ならびに複数の「ポリペプチド」を包含することを意図しており、アミド結合(ペプチド結合としても知られている)で直線的に結合したモノマー(アミノ酸)からなる分子を表す。「ポリペプチド」という用語は、2つ以上アミノ酸からなる任意の鎖(1つまたは複数)を表し、特定長の生成物を表すわけではない。したがって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または2つ以上のアミノ酸の鎖(1本または複数本)を表すのに使用される他の任意の用語は、「ポリペプチド」の定義に含まれ、さらに「ポリペプチド」という用語は、そうした他の任意の用語の代わりに、あるいは同義語的に使用できる。ポリペプチドは、自然の生物源から得ることができるか、または組換え技術によって作り出すことができる。ただし、必ずしも指定された核

酸配列から翻訳する必要はない。化学合成を含め、任意の仕方で作り出すことができる。

【0107】

「分離された」ポリペプチドまたはフラグメント、変種、またはそれらの誘導体とは、自然環境には存在しないポリペプチドを意図している。特定レベルの精製が必要とされるわけではない。例えば、分離ポリペプチドは、その天然環境または自然環境から取り出すことができる。宿主細胞内で発現された組換え産生されたポリペプチドおよびタンパク質は、本発明においては分離されたと見なされ、任意の好適な手法によって分離、分別、あるいは部分的または実質的に精製された天然または組換えポリペプチドもそのようにみなされる。

【0108】

本明細書で使用される「変種 (variant)」および「変異体 (mutant)」という用語は同義語であり、1つまたは複数のアミノ酸の挿入、欠失、変異、および置換の点で、具体的に列挙されているポリペプチドとは異なり、例えば、組換えDNA技術(突然変異誘発など)を用いて作成されたポリペプチドを表す。注目している活性を消失させることなく、どのアミノ酸残基を交換、追加、または削除できるかを判別する際の手引きは、特定ポリペプチドの配列を、相同ポリペプチド(例えば、酵母菌または細菌性)の配列と比較し、高度な相同性の領域(保存領域)で行われるアミノ酸配列の変更数を最小限にする(またはアミノ酸を共通配列で置き換える)ことにより、得ることができる。

【0109】

本明細書で使用される「改変ポリペプチド」は、合成のポリペプチド、すなわち、自然に見出されるポリペプチドとは何らかが違っているポリペプチドを表す。

【0110】

あるいは、こうした同じ(または類似の)ポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチド変種は、遺伝暗号における「重複性」を利用して合成または選択することができる。様々なコドン置換(様々な制限酵素部位を作り出す目立たない変更など)を導入して、発現用のプラスミドまたはウイルスベクターへのクローニングを最適化する。ポリヌクレオチド配列の変異は、ポリペプチドまたはポリペプチドに追加された他のペプチドの領域に反映されて、ポリペプチドの任意の部分の特性を変更することができる。例えば、変異は、標的タンパク質の発現を低下またはなくすのに使用でき、それには、遺伝子全体または遺伝子の一部の欠失、(プロモーターまたはコード領域のいずれかの)遺伝子へのDNAフラグメントの挿入(その結果、タンパク質は発現されないか、または低レベルでしか発現されない)、コード領域への変異の導入(停止コドンまたはフレームシフトが加わり、その結果、機能性タンパク質が発現されない)、およびコード領域への1つまたは複数の変異の導入(アミノ酸が変更され、その結果、非機能性かまたは酵素活性の低下したタンパク質が発現される)があるが、これらに限定されない。

【0111】

アミノ酸「置換」は、1つのアミノ酸を、類似の構造及び/または化学的性質を有する別のアミノ酸で置き換えることの結果であっても(すなわち、保存アミノ酸置換)か、あるいは1つのアミノ酸を異なる構造及び/または化学的性質を有するアミノ酸と置き換えることの結果であってもよい(すなわち、非保存アミノ酸置換)。「保存」アミノ酸置換は、関係する残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、または両親媒性といったものの類似性に基づいて行われうる。例えば、非極性(疎水性の)アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが含まれ、極性の中性アミノ酸には、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが含まれ、正電荷を帯びた(塩基性)アミノ酸には、アルギニン、リジン、およびヒスチジンが含まれ、さらに負電荷を帯びた(酸性)アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。あるいは、「非保存」アミノ酸置換は、そうしたアミノ酸のいずれかの極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、または両親媒性といったものの相違を選択することにより行われうる。「挿入」または「欠失」が、組換えタンパク質によって構造的または機能的に許容される変化の範

10

20

30

40

50

囲内であることがある。組換えDNA技術を用いて、ポリペプチド分子におけるアミノ酸の挿入、欠失、または置換を体系的に行い、得られた組換え変種の活性を分析することにより、許容される変化を実験的に求めることができる。

【0112】

アミノ酸配列またはヌクレオチド配列の「実質的部分」とは、当業者による配列の手作業での評価か、またはBLAST (Altschul, S. F., et al., J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1993)) などのアルゴリズムを使用したコンピュータによる自動配列比較・同定のいずれかによって、そのポリペプチドまたは遺伝子の推定的同定を行うための、十分なポリペプチドのアミノ酸配列または遺伝子のヌクレオチド配列を含んでいる部分である。一般に、ポリペプチド配列または核酸配列を、既知のタンパク質または遺伝子と相同であるという推定的同定を行うためには、10個以上の連続アミノ酸の配列または30個以上のヌクレオチドの配列が必要である。さらに、ヌクレオチド配列に関しては、20~30個の連続ヌクレオチドを含んでいる遺伝子特有のオリゴヌクレオチドプローブを、遺伝子同定 (例えば、サザンハイブリダイゼーション) および分離 (例えば、細菌コロニーまたはバクテリオファージ・ブランクのインサイトハイブリダイゼーション) といった配列依存法で使用する。加えて、12から15個の塩基の短いオリゴヌクレオチドは、プライマーを含む特定の核酸フラグメントを得るために、PCRで増幅プライマーとして使用できる。したがって、ヌクレオチド配列の「実質的部分」は、その配列を含む核酸フラグメントを明確に同定し、かつ/または分離するのに十分な配列を含む。本明細書は、特定のタンパク質をコードする完全なアミノ酸・ヌクレオチド配列を教示するものである。本明細書で報告している配列の恩恵を受ける当業者は、開示されている配列の全部または実質的部分を、当業者に知られている目的のためにこれから使用することができるであろう。したがって本発明は、添付の配列リストで報告されている完全な配列、ならびに上に記載したそうした配列の実質的部分を含む。

【0113】

「相補的」という用語は、互いにハイブリッド形成することができるヌクレオチド塩基間の関係を記述するのに用いられる。例えば、DNAに関して、アデニンはチミンと相補的であり、シトシンはグアニンと相補的である。またRNAに関しては、アデニンはウラシルと相補的であり、シトシンはグアニンと相補的である。

【0114】

当該技術分野において知られている「同一性パーセント (percent identity)」という用語は、2つ以上のポリペプチド配列または2つ以上のポリヌクレオチド配列の関係であり、それらの配列を比較することによって求められる。当該技術分野においては、「同一性」は、場合によっては、ポリペプチド配列間またはポリヌクレオチド配列間の配列の類似度をも意味し、場合によっては、そのような配列の列と列との間での突き合わせによって求められる。「同一性」および「類似性」は、次に記載する方法 (これらに限定されない) を含む周知の方法で容易に計算できる: 1.) Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., Ed.) Oxford University: NY (1988); 2.) Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., Ed.) Academic: NY (1993); 3.) Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., Eds.) Humania: NJ (1994); 4.) Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., Ed.) Academic (1987); および 5.) Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., Eds.) Stockton: NY (1991)。

【0115】

同一性を求める方法は、試験する配列間で最高の一致をもたらすように設計される。同

一性および類似性を求める方法は、一般に入手可能なコンピュータプログラムに基づいて分類される。配列アラインメントおよび同一性パーセントの計算は、LASERGENE バイオインフォマティクス計算スーツの MegAlign (商標) プログラム (DNASTAR Inc., Madison, WI) を用いて実施できる。配列のマルチプルアラインメントは、「Clustal アラインメント方法」を用いて実施されるが、その方法は、Clustal V と名付けられたアラインメント方法 (Higgins and Sharp, CABIOS. 5: 151-153 (1989); Higgins, D. G. et al., Comput. Appl. Biosci., 8: 189-191 (1992) に記載) に対応する「Clustal V アラインメント方法」を含め、アルゴリズムの幾つかの種類を包含する。またそのアラインメント方法は、LASERGENE バイオインフォマティクス計算スーツの MegAlign (商標) プログラム (DNASTAR Inc.) の中に見出されるものである。マルチプルアラインメントの場合、デフォルト値は、GAP PENALTY = 10 および GAP LENGTH PENALTY = 10 に対応する。Clustal 法を用いたペアワイズアラインメントおよびタンパク質配列の同一性パーセントの計算でのデフォルト・パラメータは、KTUPLE = 1、GAP PENALTY = 3、WINDOW = 5 および DIAGONALS SAVED = 5 である。核酸の場合、これらのパラメータは、KTUPLE = 2、GAP PENALTY = 5、WINDOW = 4 および DIAGONALS SAVED = 4 である。Clustal V プログラムを用いて配列のアラインメントを行った後、同じプログラムの「配列距離 (sequence distances)」表を見て「同一性パーセント」を得ることが可能である。さらに「Clustal W アラインメント法」が入手可能であるが、これは、Clustal W と名付けられたアラインメント法 (Higgins and Sharp, CABIOS. 5: 151-153 (1989); Higgins, D. G. et al., Comput. Appl. Biosci., 8: 189-191 (1992) に対応しており、LASERGENE バイオインフォマティクス計算スーツの MegAlign (商標) v6.1 プログラム (DNASTAR Inc.) の中にある。マルチプルアラインメントのデフォルト・パラメータ (GAP PENALTY = 10、GAP LENGTH PENALTY = 0.2、Delay Divergen Seqs (%) = 30、DNA Transition Weight = 0.5、Protein Weight Matrix = Gonnet Series、DNA Weight Matrix = IUB)。Clustal W プログラムを用いて配列のアラインメントを行った後、同じプログラムの「配列距離」表を見て「同一性パーセント」を得ることが可能である。

【0116】

多数のレベルの配列同一性が、他の種からのものなどのポリペプチド (そのようなポリペプチドは、同一または類似の機能または活性を有する) を同定するのに、あるいは対応するポリヌクレオチドを記述するのに役立つことを、当業者はよく理解している。有用な同一性パーセントの例には、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%があるが、これらに限定されない。あるいは55%~100%の任意の整数パーセントが、本発明を説明するのに役立つが、それには、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%がある。好適なポリヌクレオチドフラグメントは、上記の相同性を有するだけでなく、典型的には、少なくとも50個のヌクレオチド、少なくとも100個のヌクレオチド、少なくとも150個のヌクレオチド、少なくとも200個のヌクレオチド、または少なくとも250個のヌクレオチドを有するポリヌクレオチドを含む。さらに、上記の相同性を有する好適なポリヌクレオチドフラグメントは、少なくとも50個のアミノ酸、少なくとも100個のアミノ酸、少なくとも150個のアミノ酸、少

なくとも200個のアミノ酸、または少なくとも250個のアミノ酸を有するポリペプチドをコードする。

【0117】

「配列分析ソフトウェア」という用語は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の分析に役立つ任意のコンピュータアルゴリズムまたはソフトウェアプログラムを指す。「配列分析ソフトウェア」は、市販のものでも、独自に開発したものでもよい。典型的な配列分析ソフトウェアとしては次のものがあるであろうが、それらに限定されない：1.) GCGプログラムスーツ (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI); 2.) BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., J Mol. Biol., 215:403-410 (1990)); 3.) DNASTAR (DNASTAR, Inc. Madison, WI); 4.) Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI); および5.) Smith-Watermanアルゴリズムを組み込んでいるFASTAプログラム (W.R. Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Editor(s): Suhai, Sandor. Plenum: New York, NY)。本出願との関連においては、配列分析ソフトウェアを分析に用いる場合、特に明記されていない限り、分析の結果は、参照されているプログラムの「デフォルト値」に基づくものであることが理解されるであろう。本明細書で使用される「デフォルト値」とは、最初の初期設定時に、ソフトウェアと一緒に初めにロードされる値またはパラメーターの任意のセットを意味する。

【0118】

ここで用いている標準組換えDNAおよび分子クローニング技術は、当該技術分野において周知であり、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) (以下、「Maniatis」); およびSilhavy, T. J., Bennan, M. L. and Enquist, L. W., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1984); およびAusubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, published by Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) に記載されている。ここで用いられる更なる方法は、Methods in Enzymology, Volume 194, Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology (Part A, 2004, Christine Guthrie and Gerald R. Fink (Eds.), Elsevier Academic Press, San Diego, CA) にある。他の分子ツールおよび技術は当該技術分野において知られており、それには、延長ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のオーバーラップによるスプライシング (Yu, et al. (2004) Fungal Genet. Biol. 41: 973-981)、サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) のURA3位置での変異のポジティブ選択 (Boeke, J. D. et al. (1984) Mol. Gen. Genet. 197, 345-346; M. A. Romanos, et al. Nucleic Acids Res. 1991 January 11; 19(1): 187)、cre-lox部位特異的組換え系ならびに変異体lox部位およびFLP基質変異体 (Sauer, B. (1987) Mol Cell Biol 7: 2087-2096; Senecoff, et al. (1988)

Journal of Molecular Biology, Volume 201, Issue 2, Pages 405 - 421; Albert, et al. (1995) The Plant Journal. Volume 7, Issue 4, pages 649 - 659)、*「シームレス」*遺伝子欠失 (Akada, et al. (2006) Yeast; 23 (5): 399 - 405)、およびギャップ修復法 (gap repair methodology) (Ma et al., Genetics 58: 201 - 216; 1981)がある。

【0119】

GPD活性を有するポリペプチド

内在性NAD依存性の「グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ」または「GPD」は、ジヒドロキシアセトンホスフェート (DHAP) からグリセロール - 3 - ホスフェートへの変換を行う、グリセロール合成における重要な酵素である。「グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ」および「GPD」という用語は、GPDの生物学的機能を有する任意のポリペプチド (または複数のポリペプチド) を表す。そのようなポリペプチドとしては、ジヒドロキシアセトンホスフェートからグリセロール - 3 - ホスフェートへの変換を触媒する酵素活性を有するポリペプチドがある。GPDは自然に広く見られるものであり、3つのカテゴリーに分けることができる。第1のカテゴリー (EC 1.1.1.8) では、GPDは、酸化還元補助因子がNAD/NADHの対である可溶性細胞質酵素であり、EC 1.1.1.8カテゴリーのGPDは、NADH特有として述べられるが、そのことは、いくらかのGPDがNADPHで測定可能な活性を有しうること
を除外するものではない。サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) GPD1は、このタイプのGPDの一例である (Albert et al., 1992, FEBS Lett 308: 130 - 132; Valadi, et al., 2004, J. Biol. Chem 279: 39677 - 39685)。別の例はヒトGPD1であり、これに関しては複数の三次元構造の研究が行われている (Ouet al., 2005, J. Mol. Biol. 357: 858 - 869)。このカテゴリーの酵素の分析法では、DHAPおよびGPD酵素の存在下でNADH酸化の分光光度測定を利用できる (Niesel et al., 1982, Methods Enzymol 89: 296 - 301)。第2のカテゴリー (EC 1.1.5.3) のGPD酵素は、ミトコンドリア内膜の内在性膜タンパク質であり、フラビン補助因子
を含み、還元性同等物は、ミトコンドリア内のキノン/キノール対に移される。GPDの3番目の小カテゴリー (EC 1.1.1.94) があり、これは、実質的に同じ親和性を有するNADHまたはNADPHのいずれかを利用する。この3番目の小カテゴリーのGPDはまた、グリセロール - 3 - ホスフェートによってフィードバック阻害されうる。

【0120】

組換え微生物 (酵母菌など) は、グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) をコードする1つまたは複数の内在性遺伝子を有することができる。*S. セレビシエ* (*S. cerevisiae*)、*S. ポンベ* (*S. pombe*)、および*P. スティピティス* (*P. stipitis*) などの一部の酵母菌では、GPD1およびGPD2は機能性相同体である。酵母菌のGPD酵素をコードする遺伝子はいずれも破損して、酵母菌細胞のGPD活性を低下させうる。

【0121】

酵母菌によるブタノール産生の重要な収率損失メカニズムの1つは、ジヒドロキシアセトンホスフェートからグリセロールへの変換により、解糖作用からそれる炭素および還元性同等物が損失することである。GPDは、ジヒドロキシアセトンホスフェートからグリセロールへの変換の第1ステップを触媒するので、GPDの活性は、グリセロールの産生およびブタノール収率の損失に影響しうる。その結果、ブタノールを産生する酵母菌におけるGPDの機能を (例えば、GPDタンパク質をコードする遺伝子をノックアウトすることにより) なくすことを考えた人々がいる。しかし、グリセロールは成長にとって必要であり、重要な浸透圧保護剤である。したがって、いくらかのグリセロールを作る能

力を維持することには、ある特定の利点がある。

【0122】

グリセロールを作る能力を維持するだけでなく、生成物アルコールの産生を向上させるための1つの方法は、GPDの補助因子特異性を変えることである。サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) GPD1は一般に、酵母菌細胞においてジヒドロキシアセトンホスフェートからグリセロールへの変換の第1ステップを触媒する際に、補助因子のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (「NADH」) を好む。しかし、本明細書に示されているように、GPD酵素は、補助因子であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸 (「NADPH」) を使用することもできる。

10

【0123】

NADHよりもNADPHを好むGPD酵素を使用すると、NADHを好む酵素と比べた場合に、宿主細胞は、様々な代謝条件下でグリセロールを産生する能力を維持することができる。しかし、このグリセロール産生は、NADPHの産生が限られる場合、嫌気条件下ではうまく具合に制限することができる。

【0124】

同時に、NADHを好むGPDの傾向を減少させると、宿主細胞内のNADHをいっそう利用可能にすることができる。NADHは、生成物アルコール産生経路内で他の酵素によっても使用される。例えば、イソブタノール製造経路では、KARIおよびアルコールデヒドロゲナーゼは、利用可能なNADHを使用することができる。したがって、NADHに対するGPDの親和性を減少させると、生成物アルコール (例えば、イソブタノール) の産生を増大させることができる。それゆえに、実施形態によっては、異種性及び/または改変GPDは、NADHを利用する酵素 (例えば、イソブタノール製造経路で働くNADHを利用する酵素 (KARIおよびアルコールデヒドロゲナーゼなど)) も発現する組換え微生物で発現される。

20

【0125】

生成物アルコール (例えば、ブタノール) の産生を向上させる更なるやり方は、GPDを変えてNADPHの場合の K_M を減少させることである。GPDを変えてNADPHの場合の K_M を減少させると、GPDが触媒するNADPH酸化の速度を増大させることができ、それによって宿主細胞内でNADHがいっそう利用可能になる。利用可能なNADHは、生成物アルコール産生経路内で他の酵素が使用できる。例えば、イソブタノール産生経路内で、利用可能なNADHをKARIおよびアルコールデヒドロゲナーゼが利用できる。したがって、NADPHに対するGPDの親和性を増大させると、生成物アルコール (例えば、イソブタノール) の産生を増大させることができる。それゆえに、実施形態によっては、異種性及び/または改変GPDは、NADHを利用する他の酵素 (例えば、イソブタノール製造経路で働くNADHを利用する酵素 (KARIおよびアルコールデヒドロゲナーゼなど)) も発現する組換え微生物で発現される。

30

【0126】

いくつかのグリセロールを作る能力を維持させ、かつ生成物アルコールの産生を向上させるための別のやり方は、内在性GPD酵素が産生する量と比べて、産生されるグリセロールの量を低下させることのできる異種性GPD酵素を使用することである。異種性酵素の例に、大腸菌 (*E. coli*) gpsAがある。グリセロールの産生を少なくする能力に寄与しうる大腸菌 (*E. coli*) gpsAの2つのメカニズム的特徴としては、(1) gpsAは、グリセロール-3-ホスフェートによって抑制される生成物であるという点、また(2) gpsAは、実質的に同じ親和性を有する補助因子NADHおよびNADPHを利用し (Edgar and Bell, JBC 255:3492-7 (1980))、ある条件下では、これによってNADPHを使用したグリセロールが産生されるようになり、こうして宿主細胞内でNADHが利用できるようになるという点がある。サッカロマイセス属 (*Saccharomyces*) でのグリセロール-3-ホスフェートによる生成物阻害により、グリセロール産生が低下することがある。それは特に、グリセ

40

50

ロール - 3 - ホスフェートフォスファターゼの酵素反応が G P D の酵素反応よりも遅い場合に起こる。サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) のフォスファターゼ G P P 1 および G P P 2 の公表されているミカエリス定数は、それぞれ 3 . 1 および 3 . 9 である (Norbeck, JBC 271:13875-81 (1996))。それは、大腸菌 (*E. coli*) g p s A でのグリセロール - 3 - ホスフェートの阻害定数 (K_i) のほぼ 1000 倍大きい (Edgar and Bell, JBC 253:6345-63 (1978))。ほとんどの条件は、グリセロール - 3 - ホスフェートによる生成物の阻害につながる。

【0127】

N A D H または N A D P H を利用でき、かつ / またはグリセロール - 3 - ホスフェートによってフィードバック阻害される G P D 酵素としては、自然界に存在するタンパク質および改変タンパク質の両方を挙げるができる。例えば、N A D H を利用するかまたは N A D P H を利用する G P D 酵素は、E C 1 . 1 . 1 . 9 4 によって記述されており、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、カンジダ・バーサチルス (*Candida versatilis*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、およびカイウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) に見出されてきた。

【0128】

実施形態によっては、ここで使用される異種性 G P D は、メキシコリーシュマニア (*Leishmania mexicana*)、ドナリエラ・ヴィリディス (*Dunaliella viridis*)、オオミコビトビネズミ (*Jaculus orientalis*)、アーキオグロブス・フルジダス (*Archeoglobus fulgidus*)、発疹チフスリケッチア (*Rickettsia prowazekii*)、ベギアトア・アルバ (*Beggiatoa alba*)、カンジエラ・コレニス (*Kangielia koreensis*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、カンジダ・バーサチルス (*Candida versatilis*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、またはアナウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) の G P D である。

【0129】

ある特定の実施形態では、N A D H または N A D P H のいずれかを利用でき、かつ / またはグリセロール - 3 - ホスフェートによってフィードバック阻害される他の G P D 酵素の配列は、文献で特定することができ、候補は、本明細書に開示されていて当該技術分野において入手可能な配列を用いて、当業者によく知られているバイオインフォマティクスデータベースで特定できる。例えば、そのような配列は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列をコードする周知の G P D に関して、公に利用可能なデータベースの B L A S T 検索によって特定できる。そのような方法では、同一性は、デフォルト・パラメーターの G A P P E N A L T Y = 10、G A P L E N G T H P E N A L T Y = 0 . 1、および G o n n e t 250 series of protein weight matrix を用いた C l u s t a l W アラインメント法に基づいたものであってよい。

【0130】

さらに、本明細書に開示されているかまたは当該技術分野において知られている G P D ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を使用して、自然界にある他の候補 G P D 相同体を同定できる。例えば、本明細書に開示されているかまたは当該技術分野において知られている G P D をコードする核酸配列を使用して、相同タンパク質をコードする遺伝子を分離することができる。配列に依存するプロトコルを用いた相同遺伝子の分離には、(1) 核酸ハイブリダイゼーションの方法；(2) D N A および R N A 増幅の方法で、核酸増幅技術のいろいろな使用によって例示されているもの (例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、M u l l i s e t a l .、米国特許第 4,683,202 号明細書；リガーゼ連鎖反応 (L C R)、T a b o r, S . e t a l ., P N A S U S A 82:1074 (1985)；または鎖置換増幅 (s t r a n d d i s p l a c e m e n t a

10

20

30

40

50

mplification) (SDA), Walker et al., PNAS USA 89:392 (1992)] ; および (3) ライブラリー構築および相補性によるスクリーニングの方法があるが、これらに限定されない。

【0131】

生成物アルコールの産生を向上させる別のやり方は、GPDを変えてNADHの場合の K_M を増大させることである。GPDを変えてNADHの場合の K_M を増大させると、GPDが触媒するNADHの酸化の速度を減少させることができ、それによって宿主細胞内でのNADHがいっそう利用可能になる。利用可能なNADHは、生成物アルコール産生経路内で他の酵素が使用できる。例えば、イソブタノール産生経路内で、利用可能なNADHをKARIおよびアルコールデヒドロゲナーゼが利用できる。したがって、NADHに対するGPDの親和性を減少させると、生成物アルコール（例えば、イソブタノール）の産生を増大させることができる。したがって実施形態によっては、異種性及び/または改変GPDは、NADHを利用する他の酵素（例えば、KARIおよびアルコールデヒドロゲナーゼなど、イソブタノール産生経路で働くNADHを利用する酵素）も発現する組換え微生物で発現される。

10

【0132】

NADHの場合の K_M が大きいGPD酵素は、タンパク質工学によっても製造できる。実施形態によっては、GPDは、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) GPD1 (配列番号195) との同一性が、少なくとも50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%または95%であるが、配列番号195と100%同一ではない。実施形態によっては、GPDは、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) GPD1 (配列番号195) の位置42, 44, 45, 71, 73, 75, 95, 124, 126, 129, 151, 152, 183, 184, 185, 246, 310, 336, 337、または339に対応する残基に少なくとも1つの置換を含む。

20

【0133】

例えば、実施形態によっては、GPDは、配列番号195の位置44に対応する残基 (配列番号195のAsn) が、A、C、G、I、L、M、S、およびVからなる群から選択されるアミノ酸に置換される。

【0134】

実施形態によっては、GPDは、配列番号195の位置45に対応する残基 (配列番号195のTrp) が、A、C、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、およびVからなる群から選択されるアミノ酸に置換される。

30

【0135】

実施形態によっては、GPDは、配列番号195の位置73に対応する残基 (配列番号195のPhe) が、G、A、R、およびKからなる群から選択されるアミノ酸に置換される。

【0136】

実施形態によっては、GPDは、配列番号195の位置129に対応する残基 (配列番号195のPhe) が、G、A、R、およびKからなる群から選択されるアミノ酸に置換される。

40

【0137】

実施形態によっては、GPDは、配列番号195の位置337に対応する残基 (配列番号195のSer) が、A、C、D、E、G、I、L、M、N、Q、およびVからなる群から選択されるアミノ酸に置換される。

【0138】

実施形態によっては、GPDは、配列番号195の位置339に対応する残基 (配列番号195のGln) が、A、C、G、I、L、M、S、およびVからなる群から選択されるアミノ酸に置換される。

【0139】

50

実施形態によっては、GPDは、配列番号195の位置42、71、75、95、124、126、151、152、183、184、185、246、310、及び/または336に対応する残基（配列番号195のそれぞれ、Ser、Trp、Glu、Tyr、Gln、Pro、Leu、Lys、Asn、Ile、Ala、Asn、Arg、Gln）が、19種の自然界に存在するアミノ酸から選択される他のいずれかのアミノ酸に置換される。

【0140】

実施形態によっては、GPDは、NADHの場合の K_M が約0.01mM～約1mMである。実施形態によっては、GPDは、NADHの場合の K_M が約0.05mM～約1mMである。実施形態によっては、GPDは、NADHの場合の K_M が約0.10mM～約1mMである。実施形態によっては、GPDは、NADHの場合の K_M が約0.15mM～約1mMである。実施形態によっては、GPDは、NADHの場合の K_M が約0.20mM～約1mMである。実施形態によっては、GPDは、NADHの場合の K_M が約0.30mM～約1mMである。実施形態によっては、GPDは、NADHの場合の K_M が約0.40mM～約1mMである。実施形態によっては、GPDは、NADHの場合の K_M が約0.50mM～約1mMである。NADHの場合のGPDの K_M を測定するための分析法は、以下の実施例1に開示されており、当該技術分野において知られている。例えば、Niesel et al., Methods Enzymol. 89:296-301 (1982)を参照されたい。ある特定の分析法は、「NADH消費分析法(NADH consumption assays)」と呼ぶことができ、それは、GPD酵素の比活性を求めるための酵素試験法を表し、酵素反応からのGPD補助因子であるNADHの消失を測定することが関係する。

【0141】

実施形態によっては、GPDは、NADPHの場合の K_M が約0.01mM～約1mMである。実施形態によっては、GPDは、NADPHの場合の K_M が約0.05mM～約1mMである。実施形態によっては、GPDは、NADPHの場合の K_M が約0.10mM～約1mMである。実施形態によっては、GPDは、NADPHの場合の K_M が約0.15mM～約1mMである。実施形態によっては、GPDは、NADPHの場合の K_M が約0.20mM～約1mMである。実施形態によっては、GPDは、NADPHの場合の K_M が約0.30mM～約1mMである。実施形態によっては、GPDは、NADPHの場合の K_M が約0.40mM～約1mMである。実施形態によっては、GPDは、NADPHの場合の K_M が約0.50mM～約1mMである。実施例1で以下に明らかにしているNADH分析法は、NADHをNADPHで置き換えることにより、NADPHの場合のGPDの K_M が測定されるように適応させることができる。NADPHの場合のGPDの K_M を測定するための更なる分析法は、当該技術分野において知られている。例えば、Niesel et al., Methods Enzymol. 89:296-301 (1982)を参照されたい。ある特定の分析法は、「NADPH消費分析法」と呼ぶことができ、それは、GPD酵素の比活性を求めるための酵素試験法を表し、酵素反応からのGPD補助因子であるNADHの消失を測定することが関係する。

【0142】

実施形態によっては、異種性及び/または改変GPDは、異種性及び/または改変GPDを含まない組換え微生物と比べた場合、異種性及び/または改変GPDを含む組換え微生物の成長を増大させることができる。

【0143】

実施形態によっては、異種性及び/または改変GPDは、異種性及び/または改変GPDを含まない組換え微生物と比べた場合、異種性及び/または改変GPDを含む組換え微生物の生成物アルコール（例えば、イソブタノール）の産生を増大させることができる。

【0144】

実施形態によっては、異種性及び/または改変GPDは、異種性及び/または改変GPDを含まない組換え微生物と比べた場合に、GPDを含む組換え微生物のグリセロール産

10

20

30

40

50

生を減少させることができる。

【0145】

実施形態によっては、異種性及び／または改変GPDは、異種性及び／または改変GPDを含まない組換え微生物と比べた場合、異種性及び／または改変GPDを含む組換え微生物が産生する生成物アルコール（例えば、イソブタノール）とグリセロールとの比率を増大させることができる。

【0146】

実施形態によっては、異種性及び／または改変GPDは、異種性及び／または改変GPDを含まない組換え微生物と比べた場合、異種性及び／または改変GPDを含む組換え微生物の収率（例えば、消費される基質1グラム当たりの産生イソブタノールのグラム数）を増大させることができる。

10

【0147】

したがって、ブタノール生合成経路、微生物の内在性GPDよりも高いNADHの場合の K_M を有する異種性及び／または改変GPD、およびGPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損を含む組換え微生物では、「ブタノール産生の向上」は、異種性及び／または改変GPDのない微生物と比べて、ブタノールの産生が増大すること、グリセロールの産生が減少すること、またはその両方に関連しうる。

【0148】

微生物の内在性GPDよりも高いNADHの場合の K_M を有する異種性及び／または改変GPDおよびGPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損を含む組換え微生物では、「アルコール産生の向上」は、異種性及び／または改変GPDのない微生物と比べて、アルコールの産生が増大すること、グリセロールの産生が減少すること、またはその両方に関連しうる。

20

【0149】

したがって、ブタノール生合成経路、NADHおよびNADPHに対して実質的に同じ親和性を有しかつ／またはグリセロール-3-ホスフェートによってフィードバック阻害される異種性GPD、およびGPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損を含む組換え微生物では、「ブタノール産生の向上」は、異種性GPDのない微生物と比べて、ブタノールの産生が増大すること、グリセロールの産生が減少すること、またはその両方に関連しうる。

30

【0150】

NADHおよびNADPHに対して実質的に同じ親和性を有しかつ／またはグリセロール-3-ホスフェートによってフィードバック阻害される異種性GPD、およびGPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損を含む組換え微生物では、「アルコール産生の向上」は、異種性GPDのない微生物と比べて、アルコールの産生が増大すること、グリセロールの産生が減少すること、あるいはその両方に関連しうる。

【0151】

組換え微生物

理論に縛られることは望まないが、本明細書に記載のプロセスは、任意のアルコール産生微生物（特にアルコールを産生する組換え微生物）と組み合わせると有用であると考えられる。

40

【0152】

アルコールを産生する組換え微生物は、当該技術分野においても知られている（例えば、Ohta et al., Appl. Environ. Microbiol. 57: 893-900 (1991); Underwood et al., Appl. Environ. Microbiol. 68: 1071-81 (2002); Shen and Liao, Metab. Eng. 10: 312-20 (2008); Hahnai et al., Appl. Environ. 73: 7814-8 (2007); 米国特許第5, 514, 583号明細書; 米国特許第5, 712, 133号明細書; 国際公開第1995/028476号パンフレット; Feldmann et al., Appl. Micr

50

obiol. Biotechnol. 38:354-61 (1992); Zhang et al., Science 267:240-3 (1995); 米国特許出願公開第2007/0031918A1号明細書; 米国特許第7,223,575号明細書; 米国特許第7,741,119号明細書; 米国特許出願公開第2009/0203099A1号明細書; 米国特許出願公開第2009/0246846A1号明細書; および国際公開第2010/075241号パンフレット(これらを本明細書に援用する))。

【0153】

例えば、微生物の代謝経路は、ブタノールを産生するように遺伝子修飾することができる。こうした経路は、望ましくない代謝産物が少なくなるかまたはなくなるように変更し、それによって生成物アルコールの収率が向上することすることもできる。微生物によるブタノールの産生については、例えば、米国特許第7,851,188号明細書; 米国特許第7,993,889号明細書; 米国特許第8,178,328号明細書、米国特許第8,206,970号明細書、米国特許出願公開第2007/0292927号明細書、米国特許出願公開第2008/0182308号明細書、米国特許出願公開第2008/0274525号明細書、米国特許出願公開第2009/0305363号明細書、米国特許出願公開第2009/0305370号明細書、米国特許出願公開第2011/0250610号明細書、米国特許出願公開第2011/0313206号明細書、米国特許出願公開第2011/0111472号明細書、米国特許出願公開第2012/0258873号明細書、および米国特許出願公開第2013/0071898号明細書に開示されており、それぞれについてその内容全体を本明細書に援用する。ある特定の実施形態では、微生物は、ブタノール生合成経路またはブタノール異性体(1-ブタノール、2-ブタノール、またはイソブタノールなど)の生合成経路を含むように遺伝子修飾される。ある特定の実施形態では、ブタノール生合成経路において基質から生成物への変換を触媒する少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、または少なくとも5種のポリペプチドは、微生物の異種性ポリヌクレオチドによってコードされる。ある特定の実施形態では、ブタノール生合成経路の基質から生成物への変換を触媒するすべてのポリペプチドが、微生物の異種性ポリヌクレオチドによってコードされる。ブタノール生合成経路を含む微生物は、米国特許出願公開第2013/0071898号明細書(その全体を本明細書に援用する)に開示されている1つまたは複数の更なる遺伝子修飾をさらに含んでもよいことが理解されるであろう。

【0154】

実施形態によっては、微生物は、バクテリア、藍色細菌、糸状菌、または酵母であってよい。生合成経路によって生成物アルコール(例えば、ブタノール)を産生できる好適な微生物としては、クロストリジウム属(*Clostridium*)、ジモモナス属(*Zymomonas*)、エシェリキア属(*Escherichia*)、サルモネラ属(*Salmonella*)、セラチア属(*Serratia*)、エルウィニア属(*Erwinia*)、クレブシエラ属(*Klebsiella*)、赤痢菌属(*Shigella*)、ロドコッカス属(*Rhodococcus*)、シュードモナス属(*Pseudomonas*)、バシラス属(*Bacillus*)、ラクトバシラス属(*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属(*Enterococcus*)、アルカリゲネス属(*Alcaligenes*)、パエニバチルス属(*Paenibacillus*)、アルトロバクター属(*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム属(*Corynebacterium*)、ブレビバクテリウム属(*Brevibacterium*)、シゾサッカロミセス属(*Schizosaccharomyces*)、クルイベロミセス属(*Kluveromyces*)、ヤロウイア属(*Yarrowia*)、ピキア属(*Pichia*)、ザイゴサッカロミセス属(*Zygosaccharomyces*)、デバリオミセス属(*Debaryomyces*)、カンジダ属(*Candida*)、ブレタノマイセス属(*Brettanomyces*)、パチソレン属(*Pachysolen*)、ハンゼヌラ属(*Hansenula*)、イサタケンキア属(*Issatchenkia*)、トリコスポロン属(*Trichosporon*)、ヤマダザイマ属(*Yamadazyma*)、またはサッカロミ

セス属 (*Saccharomyces*) のものがある。1つの実施形態では、組換え微生物は、大腸菌 (*Escherichia coli*)、アルカリゲネス・ユートロフス (*Alcaligenes eutrophus*)、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、パエニバチルス・マセランス (*Paenibacillus macerans*)、ロドコッカス・エリスポリス (*Rhodococcus erythropolis*)、シュードモナス・ブチダ (*Pseudomonas putida*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ガリナラム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・フェカーリス (*Enterococcus faecalis*)、バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*)、カンジダ・ソノレンシス (*Candida sonorensis*)、カンジダ・メタノソルボース (*Candida methanosorbosa*)、クルイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、クルイベロミセス・マルキアヌス (*Kluyveromyces marxianus*)、クルイベロミセス・サーモトレランス (*Kluyveromyces thermotolerans*)、イサチェンキア・オリエンタリス (*Issatchenkia orientalis*)、デバリオミセス・ハンゼニ (*Debaryomyces hansenii*)、およびサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) からなる群から選択されてよい。1つの実施形態では、遺伝子修飾される微生物は酵母菌である。1つの実施形態では、遺伝子修飾される微生物は、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、ザイゴサッカロミセス属 (*Zygosaccharomyces*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*)、デッケラ属 (*Dekkera*)、トルロプシス属 (*Torulopsis*)、ブレタノマイセス属 (*Brettanomyces*)、および一部の種のカンジダ属 (*Candida*) から選択されるクラブツリー正酵母 (*crabtree-positive yeast*) である。クラブツリー正酵母の種には、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*)、シゾサッカロミセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、サッカロミセス・バヤヌス (*Saccharomyces bayanus*)、サッカロミセス・ミキタエ (*Saccharomyces mikitaie*)、サッカロミセス・パラドクス (*Saccharomyces paradoxus*)、サッカロミセス・ウバラム (*Saccharomyces uvarum*)、サッカロミセス・カステリ (*Saccharomyces castellii*)、ザイゴサッカロミセス・ロキシ (*Zygosaccharomyces rouxii*)、ザイゴサッカロミセス・ベイリイ (*Zygosaccharomyces baillii*)、およびカンジダ・グラブラタ (*Candida glabrata*) が含まれるが、これらに限定されない。

【0155】

実施形態によっては、宿主細胞は、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) である。サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) は、当該技術分野において知られており、様々な供給源から得ることができる。その供給源としては、American Type Culture Collection (Rockville, MD)、Centralbureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre、LeSaffre、Gert Strand AB、Ferm Solutions、North American Bioproducts、Martrex、および Lallemand があるが、これらに限定されない。S. セレビスエ (*S. cerevisiae*) としては、BY4741、CEN. PK 113-7D、Ethanol Red (登録商標) 酵母菌、Ferm Pro

(商標)酵母菌、Bio-Ferm(登録商標)XR酵母菌、Gert Strand Prestige Batch Turboアルコール酵母菌、Gert Strand Pot Distillers酵母菌、Gert Strand Distiller s Turbo酵母菌、FerMax(商標)Green酵母菌、FerMax(商標)Gold酵母菌、Thermosacc(登録商標)酵母菌、BG-1、PE-2、CAT-1、CBS7959、CBS7960、およびCBS7961があるが、これらに限定されない。

【0156】

実施形態によっては、微生物は、固定化されていてもカプセル化されていてもよい。例えば、微生物は、アルギナート、アルギン酸カルシウム、またはポリアクリルアミドゲルを用いて、あるいは様々な高表面積支持マトリックス(珪藻土、セライト、けいそう土、シリカゲル、プラスチック、または樹脂など)上でのバイオフィーム形成の誘発により、固定化またはカプセル化することができる。実施形態によっては、ISPRは、固定化またはカプセル化微生物と組み合わせて使用してよい。この組合せにより、生産性(比容積生産性(specific volumetric productivity)など)、代謝率、生成物アルコール収率、生成物アルコール耐性を向上させることができる。さらに、固定化およびカプセル化により、微生物に対するプロセス条件(せん断など)の影響を最小限に抑えることができる。

【0157】

イソブタノールを産生させるための使用できる生合成経路には、Donaldson et al.により米国特許第7,851,188号明細書;米国特許第7,993,388号明細書;および国際公開第2007/050671号パンフレットに記載されているものがある(これらを本明細書に援用する)。1つの実施形態では、イソブタノール生合成経路は、以下の基質から生成物への変換を含む:

a)ピルベートからアセト乳酸(これは、例えば、アセト乳酸合成酵素によって触媒されうる);

b)ステップa)からのアセト乳酸から2,3-ジヒドロキシイソバレレート(これは、例えば、ケトール酸レダクトイソメラーゼによって触媒されうる);

c)ステップb)からの2,3-ジヒドロキシイソバレレートから - ケトイソ吉草酸(これは、例えば、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼによって触媒されうる);

d)ステップc)からの - ケトイソ吉草酸からイソブチルアルデヒド(これは、例えば、分枝鎖 - ケト酸デカルボキシラーゼによって触媒されうる);および

e)ステップd)からのイソブチルアルデヒドからイソブタノール(これは、例えば、分枝鎖アルコールデヒドロゲナーゼによって触媒されうる)。

【0158】

別の実施形態では、イソブタノール生合成経路は、以下の基質から生成物への変換を含む:

a)ピルベートからアセト乳酸(これは、例えば、アセト乳酸合成酵素によって触媒されうる);

b)ステップa)からのアセト乳酸から2,3-ジヒドロキシイソバレレート(これは、例えば、ケトール酸レダクトイソメラーゼによって触媒されうる);

c)ステップb)からの2,3-ジヒドロキシイソバレレートから - ケトイソ吉草酸(これは、例えば、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼによって触媒されうる);

d)ステップc)からの - ケトイソ吉草酸からバリン(これは、例えば、トランスアミナーゼまたはバリンデヒドロゲナーゼによって触媒されうる);

e)ステップd)からのバリンからイソブチルアミン(これは、例えば、バリンデカルボキシラーゼによって触媒されうる);

f)ステップe)からのイソブチルアミンからイソブチルアルデヒド(これは、例えば、オメガトランスアミナーゼによって触媒されうる);および

g)ステップf)からのイソブチルアルデヒドからイソブタノール(これは、例えば、

10

20

30

40

50

分枝鎖アルコールデヒドロゲナーゼによって触媒されうる)。

【0159】

別の実施形態では、イソブタノール生合成経路は、以下の基質から生成物への変換を含む：

a) ピルベートからアセト乳酸（これは、例えば、アセト乳酸合成酵素によって触媒されうる）；

b) ステップ a) からのアセト乳酸から 2, 3 - ジヒドロキシイソバレレート（これは、例えば、ケトール酸レダクトイソメラーゼによって触媒されうる）；

c) ステップ b) からの 2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートから - ケトイソ吉草酸（これは、例えば、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼによって触媒されうる）；

d) ステップ c) からの - ケトイソ吉草酸からイソブチリル - CoA（これは、例えば、分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼによって触媒されうる）；

e) ステップ d) からのイソブチリル - CoA からイソブチルアルデヒド（これは、例えば、アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼによって触媒されうる）；および

f) ステップ e) からのイソブチルアルデヒドからイソブタノール（これは、例えば、分枝鎖アルコールデヒドロゲナーゼによって触媒されうる）。

【0160】

1 - ブタノールを産生させるための使用できる生合成経路には、米国特許出願公開第 2008/0182308 号明細書および国際公開公報第 2007/041269 号パンフレット（これらを本明細書に援用する）に記載されているものがある。1つの実施形態では、1 - ブタノール生合成経路は、以下の基質から生成物への変換を含む：

a) アセチル - CoA からアセトアセチル - CoA（これは、例えば、アセチル - CoA アセチルトランスフェラーゼによって触媒されうる）；

b) ステップ a) からのアセトアセチル - CoA から 3 - ヒドロキシブチリル - CoA（これは、例えば、3 - ヒドロキシブチリル - CoA デヒドロゲナーゼによって触媒されうる）；

c) ステップ b) からの 3 - ヒドロキシブチリル - CoA からクロトニル - CoA（これは、例えば、クロトナーゼによって触媒されうる）；

d) ステップ c) からのクロトニル - CoA からブチリル - CoA（これは、例えば、ブチリル - CoA デヒドロゲナーゼによって触媒されうる）；

e) ステップ d) からのブチリル - CoA からブチルアルデヒド（これは、例えば、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼによって触媒されうる）；および

f) ステップ e) からのブチルアルデヒドから 1 - ブタノール（これは、例えば、ブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒されうる）。

【0161】

2 - ブタノールを産生させるための使用できる生合成経路には、Donaldson et al. により米国特許第 8,206,970 号明細書、米国特許出願公開第 2007/0292927 号明細書、米国特許出願公開第 2009/0155870 号明細書、国際公開第 2007/130518 号パンフレット、および国際公開第 2007/130521 号パンフレット（これらすべてを本明細書に援用する）に記載されているものが含まれる。1つの実施形態では、2 - ブタノール生合成経路は、以下の基質から生成物への変換を含む：

a) ピルベートからアルファ - アセト乳酸（これは、例えば、アセト乳酸合成酵素によって触媒されうる）；

b) ステップ a) からのアルファ - アセト乳酸からアセトイン（これは、例えば、アセト乳酸デカルボキシラーゼによって触媒されうる）；

c) ステップ b) からのアセトインから 3 - アミノ - 2 - ブタノール（これは、例えば、アセトインアミナーゼ (acetoin aminase) によって触媒されうる）；

d) ステップ c) からの 3 - アミノ - 2 - ブタノールから 3 - アミノ - 2 - ブタノールホスフェート（これは、例えば、アミノブタノールキナーゼ (aminobutanol

k i n a s e) によって触媒されうる) ;

e) ステップ d) からの 3 - アミノ - 2 - ブタノールホスフェートから 2 - ブタノン (これは、例えば、アミノブタノール (a m i n o b u t a n o l) ホスフェートホスホリラーゼによって触媒されうる) ; および

f) ステップ e) からの 2 - ブタノンから 2 - ブタノール (これは、例えば、ブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒されうる) 。

【 0 1 6 2 】

別の実施形態では、2 - ブタノール生合成経路は、以下の基質から生成物への変換を含む :

a) ピルベートからアルファ - アセト乳酸 (これは、例えば、アセト乳酸合成酵素によって触媒されうる) ;

b) ステップ a) からのアルファ - アセト乳酸からアセトイン (これは、例えば、アセト乳酸デカルボキシラーゼによって触媒されうる) ;

c) アセトインからステップ b) の 2 , 3 - ブタンジオールへ (これは、例えば、ブタンジオールデヒドロゲナーゼによって触媒されうる) ;

d) ステップ c) からの 2 , 3 - ブタンジオールから 2 - ブタノン (これは、例えば、ジオールデヒドラターゼによって触媒されうる) ; および

e) ステップ d) からの 2 - ブタノンから 2 - ブタノール (これは、例えば、ブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒されうる) 。

【 0 1 6 3 】

2 - ブタノンを産生させるための使用できる生合成経路としては、米国特許第 8 , 2 0 6 , 9 7 0 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 2 9 2 9 2 7 号明細書、および米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 1 5 5 8 7 0 号明細書 (これらを本明細書に援用する) に記載されているものがある。1つの実施形態では、2 - ブタノン生合成経路は、以下の基質から生成物への変換を含む :

a) ピルベートからアルファ - アセト乳酸 (これは、例えば、アセト乳酸合成酵素によって触媒されうる) ;

b) ステップ a) からのアルファ - アセト乳酸からアセトイン (これは、例えば、アセト乳酸デカルボキシラーゼによって触媒されうる) ;

c) ステップ b) からのアセトインから 3 - アミノ - 2 - ブタノール (これは、例えば、アセトインアミナーゼによって触媒されうる) ;

d) ステップ c) からの 3 - アミノ - 2 - ブタノールから 3 - アミノ - 2 - ブタノールホスフェート (これは、例えば、アミノブタノールキナーゼによって触媒されうる) ; および

e) ステップ d) からの 3 - アミノ - 2 - ブタノールホスフェートから 2 - ブタノン (これは、例えば、アミノブタノールホスフェートホスホリラーゼによって触媒されうる) 。

【 0 1 6 4 】

別の実施形態では、2 - ブタノン生合成経路は、以下の基質から生成物への変換を含む :

a) ピルベートからアルファ - アセト乳酸 (これは、例えば、アセト乳酸合成酵素によって触媒されうる) ;

b) ステップ a) からのアルファ - アセト乳酸からアセトイン (これは、例えば、アセト乳酸デカルボキシラーゼによって触媒されうる) ;

c) ステップ b) からのアセトインから 2 , 3 - ブタンジオール (これは、例えば、ブタンジオールデヒドロゲナーゼによって触媒されうる) ;

d) ステップ c) からの 2 , 3 - ブタンジオールから 2 - ブタノン (これは、例えば、ジオールデヒドラターゼによって触媒されうる) 。

【 0 1 6 5 】

「アセトヒドロキシ酸シンターゼ」、 「アセト乳酸合成酵素」 および 「アセト乳酸シン

10

20

30

40

50

セターゼ」(「ALS」と省略)という用語は、本明細書では同義語的に使用され、ピルベートからアセトラクテートおよびCO₂への変換を触媒する酵素を表す。例示的なアセト乳酸合成酵素は、酵素番号2.2.1.6(Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego)で知られている。これらの酵素は、多数の産生源から得ることができ、その産生源としては、バシラス・サチリス(*Bacillus subtilis*)(ジェンバンク番号: CAB07802.1、Z99122で、これらはそれぞれNCBI(National Center for Biotechnology Information)アミノ酸配列、NCBIヌクレオチド配列である)、CAB15618、クレブシエラ・ニューモニエ(*Klebsiella pneumoniae*)(ジェンバンク番号: AAA25079、M73842)、および乳酸連鎖球菌(*Lactococcus lactis*)(ジェンバンク番号: AAA25161、L16975)があるが、これらに限定されない。

【0166】

「ケトール酸レダクトイソメラーゼ」(「KARI」)、「アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ(acetohydroxy acid isomero reductase)」および「アセトヒドロキシ酸レダクトイソメラーゼ」という用語は、同義的に使用されるであろう。またこれらは、(S)-アセト乳酸から2,3-ジヒドロキシイソバレレートへの反応を触媒できる酵素を表す。例示的なKARI酵素は、酵素番号EC1.1.1.86に分類することができ(Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego)、無数の微生物から得ることができる。その微生物としては、大腸菌(*Escherichia coli*)(ジェンバンク番号: NP_418222、NC_000913)、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)(ジェンバンク番号: NP_013459、NC_001144)、メタノコッカス・マリバルディス(*Methanococcus maripaludis*)(ジェンバンク番号: CAF30210、BX957220)、およびバシラス・サチリス(*Bacillus subtilis*)(ジェンバンク番号: CAB14789、Z99118)があるが、これらに限定されない。KARIとしては、アナエロスティペス・カカエ(*Anaerostipes caecae*)のKARI変種「K9G9」(配列番号85)、「K9D3」(配列番号86)、および「K9JB4P」(配列番号87)がある。ケトール酸レダクトイソメラーゼ(KARI)酵素については、米国特許第7,910,342号明細書および米国特許第8,129,162号明細書、米国特許出願公開第2008/0261230号明細書、米国特許出願公開第2009/0163376号明細書、米国特許出願公開第2010/0197519号明細書、PCTの国際公開公報第2011/041415号パンフレット、PCTの国際公開公報第2012/129555号パンフレット、および米国特許出願第14/038,455号明細書(2013年9月26日出願)に記載されており、これらすべてを本明細書に援用する。それらに開示されているKARIの例には、乳酸連鎖球菌(*Lactococcus lactis*)、コレラ菌(*Vibrio cholera*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)PAO1、および蛍光菌(*Pseudomonas fluorescens*)PF5変異体からのものがある。実施形態によっては、KARIはNADHを利用する。実施形態によっては、KARIはNADPHを利用する。実施形態によっては、KARIはNADHまたはNADPHを利用する。

【0167】

「アセトヒドロキシ酸デヒドラターゼ」および「ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ」(「DHAD」)という用語は、2,3-ジヒドロキシイソバレレートから - ケトイソ吉草酸への変換を触媒する酵素を表す。例示的なアセトヒドロキシ酸デヒドラターゼは、酵素番号4.2.1.9で知られている。そのような酵素は、無数の微生物から得ることができ、そうした微生物としては、大腸菌(*E. coli*)(ジェンバンク番号: YP_026248、NC000913)、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomy*

ces cerevisiae) (ジェンバンク番号: NP__012550、NC 001142)、M. マリパルディス (M. maripaludis) (ジェンバンク番号: CAF29874、BX957219)、B. サブチリス (B. subtilis) (ジェンバンク番号: CAB14105、Z99115)、L. ラクトリス (L. lactis) (配列番号 88)、および N. クラサ (N. crassa) があるが、これらに限定されない。米国特許出願公開第 2010/0081154 号明細書、米国特許第 7,851,188 号明細書、および米国特許第 8,241,878 号明細書 (これらについては、その全体を援用する) は、ジヒドロキシ酸デヒドロターゼ (dihydroxy acid dehydratase) (DHAD) (ストレプトコッカス・ミュータンス (Streptococcus mutans) (配列番号 89) およびその変種からの DHAD を含む) について記載している。

10

【0168】

「分枝鎖 - ケト酸デカルボキシラーゼ」、「 - ケト酸デカルボキシラーゼ」、「 - ケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼ (- ketoisovalerate decarboxylase)」、または「2 - ケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼ (「KIVD」) という用語は、 - ケトイソ吉草酸からイソブチルアルデヒドおよび CO_2 への変換を触媒する酵素を表す。例示的な分枝鎖 - ケト酸デカルボキシラーゼは、酵素番号 4.1.1.72 で知られており、乳酸連鎖球菌 (Lactococcus lactis) (ジェンバンク番号: AAS49166、AY548760; CAG34226、AJ746364)、ネズミチフス菌 (Salmonella typhimurium) (ジェンバンク番号: NP__461346、NC__003197)、クロストリジウム・アセトブチリウム (Clostridium acetobutylicum) (ジェンバンク番号: NP__149189、NC__001988)、M. カゼオリチカス (M. caseolyticus)、および L. グレイ (L. grayi) を含む (ただし、これらに限定されない) 多数の産生源から得ることができる。好適な分枝鎖 - ケト酸デカルボキシラーゼは、ラクトコッカス・ラクティス (Lactococcus lactis) からの配列番号 90 および リステリア・グレイ (Listeria grayi) からの配列番号 91 を含む。

20

【0169】

「分枝鎖アルコールデヒドロゲナーゼ (「ADH」) という用語は、イソブチルアルデヒドからイソブタノールへの変換を触媒する酵素を表す。例示的な分枝鎖アルコールデヒドロゲナーゼは、酵素番号 1.1.1.265 で知られているが、他のアルコールデヒドロゲナーゼ (特に、EC 1.1.1.1 または 1.1.1.2) に分類することもできる。アルコールデヒドロゲナーゼは、NADPH 依存性または NADH 依存性であってよい。そのような酵素は、多数の産生源から得ることができ、その産生源としては、S. セレビシエ (S. cerevisiae) (ジェンバンク番号: NP__010656、NC__001136、NP__014051、NC__001145)、大腸菌 (E. coli) (ジェンバンク番号: NP__417484、NC__000913)、C. アセトブチリウム (C. acetobutylicum) (ジェンバンク番号: NP__349892、NC__003030; NP__349891、NC__003030) があるが、これらに限定されない。米国特許出願公開第 2009/0269823 号明細書は、SadB (アクロモバクター・キシロソキシダンス (Achromobacter xylosoxidans) からのアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) (配列番号 92)) を記載している。アルコールデヒドロゲナーゼは、ウマの肝臓の ADH (配列番号 93) および ベイジェリンキア・インディカ (Beijerinikia indica) の ADH (配列番号 94) (米国特許出願公開第 2011/0269199 号明細書に記載されており、これを本明細書に援用する) も含む。

30

40

【0170】

「ブタノールデヒドロゲナーゼ」という用語は、イソブチルアルデヒドからイソブタノールへの変換または 2 - ブタノンおよび 2 - ブタノールの変換を触媒する酵素活性を有す

50

るポリペプチド（１種または複数種）を表す。ブタノールデヒドロゲナーゼは、アルコールデヒドロゲナーゼの広範なファミリーの中のサブセットである。ブタノールデヒドロゲナーゼは、NAD依存性またはNADP依存性でありうる。NAD依存性酵素はEC 1.1.1として知られており、例えば、ロドコッカス・ルベル（*Rhodococcus ruber*）（ジェンバンク番号：CAD36475、AJ491307）から得ることができる。NADP依存性酵素はEC 1.1.1.2として知られており、例えば、パイロコッカス・フリオサス（*Pyrococcus furiosus*）（ジェンバンク番号：AAC25556、AF013169）から得ることができる。さらに、ブタノールデヒドロゲナーゼは、大腸菌（*Escherichia coli*）（ジェンバンク番号：NP417484、NC_000913）から得ることができ、シクロヘキサノールデヒドロゲナーゼは、アシネトバクター種（ジェンバンク番号：AAG10026、AF282240）から得ることができる。「ブタノールデヒドロゲナーゼ」という用語はまた、NADHまたはNADPHのいずれかを補助因子として用いて、ブチルアルデヒドから1-ブタノールへの変換を触媒する酵素も表す。ブタノールデヒドロゲナーゼは、例えば、C.アセトブチリウム（*C. acetobutylicum*）（ジェンバンク番号：NP_149325、NC_001988（注：この酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性およびアルコールデヒドロゲナーゼ活性の両方を有する）；NP_349891、NC_003030；およびNP_349892、NC_003030）および大腸菌（*E. coli*）（ジェンバンク番号：NP_417-484、NC_000913）から得ることができる。

10

20

【0171】

「分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ」という用語は、 α -ケトイソ吉草酸からイソブチリル-CoA（イソブチリル-補酵素A）への変換を、典型的にはNAD⁺（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）を電子受容体として用いて触媒する酵素を表す。例示的な分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼは、酵素番号1.2.4.4で知られている。そのような分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼは、4つのサブユニットから構成され、すべてのサブユニットの配列は、膨大な数の微生物から得ることができる。その微生物としては、B.サブチリス（*B. subtilis*）（ジェンバンク番号：CAB14336、Z99116；CAB14335、Z99116；CAB14334、Z99116；およびCAB14337、Z99116）およびシュードモナス・プチダ（*Pseudomonas putida*）（ジェンバンク番号：AAA65614、M57613；AAA65615、M57613；AAA65617、M57613；およびAAA65618、M57613）があるが、これらに限定されない。

30

40

【0172】

「アセチル化アルデヒドデヒドロゲナーゼ」という用語は、イソブチリル-CoAからイソブチルアルデヒドへの変換を、典型的にはNADHまたはNADPHのいずれかを電子供与体として用いて触媒する酵素を表す。例示的なアセチル化アルデヒドデヒドロゲナーゼは、酵素番号1.2.1.10および1.2.1.57で知られている。そのような酵素は、多数の産生源から得ることができ、その産生源としては、クロストリジウム・ベエージェリンキー（*Clostridium beijerinckii*）（ジェンバンク番号：AAD31841、AF157306）、C.アセトブチリウム（*C. acetobutylicum*）（ジェンバンク番号：NP_149325、NC_001988；NP_149199、NC_001988）、P.プチダ（*P. putida*）（ジェンバンク番号：AAA89106、U13232）、およびサーマス・サーモフィラス（*Thermus thermophilus*）（ジェンバンク番号：YP_145486、NC_006461）があるが、これらに限定されない。

【0173】

「トランスアミナーゼ」という用語は、アラニンまたはグルタメートのいずれかをアミン供与体として用いて、 α -ケトイソ吉草酸からL-バリンへの変換を触媒する酵素を表す。例示的なトランスアミナーゼは、酵素番号2.6.1.42および2.6.1.66

50

で知られている。そのような酵素は数多くの産生源から得ることができる。アラニン依存性酵素の産生源の例としては、大腸菌 (*E. coli*) (ジェンバンク番号: YP__026231、NC__000913) およびバシラス・リシェニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) (ジェンバンク番号: YP__093743、NC__006322) があるが、これらに限定されない。グルタメート依存性酵素の産生源の例としては、大腸菌 (*E. coli*) (ジェンバンク番号: YP__026247、NC__000913)、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) (ジェンバンク番号: NP__012682、NC__001142) およびメタノバクテリウム・テルモオートトロフィカム (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) (ジェンバンク番号: NP__276546、NC__000916) があるが、これらに限定されない。

10

【0174】

「バリンデヒドロゲナーゼ」という用語は、 α -ケトイソ吉草酸から L-バリンへの変換を、典型的には NAD(P)H を電子供与体として用いかつアンモニアをアミン供与体として用いて、触媒する酵素を表す。例示的なバリンデヒドロゲナーゼは、酵素番号 1.4.1.8 および 1.4.1.9 で知られており、そのような酵素は、多数の産生源から得ることができる。その産生源としては、ストレプトマイセス・セリカラー (*Streptomyces coelicolor*) (ジェンバンク番号: NP__628270、NC__003888) および B. サブチリス (*B. subtilis*) (ジェンバンク番号: CAB14339、Z99116) があるが、これらに限定されない。

20

【0175】

「バリンデカルボキシラーゼ」という用語は、L-バリンからイソブチルアミンおよび CO_2 への変換を触媒する酵素を表す。例示的なバリンデカルボキシラーゼは、酵素番号 4.1.1.14 で知られている。そのような酵素は、例えば、ストレプトマイセス・ビリジファシエンス (*Streptomyces viridifaciens*) (ジェンバンク番号: AAN10242、AY116644) などのストレプトミセス属 (*Streptomyces*) などに見いだされる。

【0176】

「オメガ-トランスアミナーゼ」という用語は、好適なアミノ酸をアミン供与体として用いてイソブチルアミンからイソブチルアルデヒドへの変換を触媒する酵素を表す。例示的なオメガ-トランスアミナーゼは、酵素番号 2.6.1.18 で知られており、多数の産生源から得ることができる。その産生源としては、アルカリゲネス・デニトリフィカンス (*Alcaligenes denitrificans*) (AAP92672、AY330220)、ラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) (ジェンバンク番号: YP__294474、NC__007347)、シェワネラ・オネイデンシス (*Shewanella oneidensis*) (ジェンバンク番号: NP__719046、NC__004347)、および P. プチダ (*P. putida*) (ジェンバンク番号: AAN66223、AE016776) があるが、これらに限定されない。

30

【0177】

「アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ」という用語は、2分子のアセチル-CoA からアセトアセチル-CoA および補酵素 A (CoA) への変換を触媒する酵素を表す。例示的なアセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼは、短鎖アシル-CoA およびアセチル-CoA に対して基質選択性 (順方向の反応) を有するアセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼであり、E.C. 2.3.1.9 [Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego] として分類されている。ただし、基質範囲の広い酵素 (E.C. 2.3.1.16) も機能するであろう。アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼは、多数の産生源から入手可能であり、その産生源は、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) (ジェンバンク番号: NP__416728、NC__000913; NCBI (National

40

50

Center for Biotechnology Information) アミノ酸配列、NCBIヌクレオチド配列)、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) (ジェンバンク番号: NP_349476.1、NC_003030; NP_149242、NC_001988、バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) (ジェンバンク番号: NP_390297、NC_000964)、およびサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) (ジェンバンク番号: NP_015297、NC_001148) である。

【0178】

「3 - ヒドロキシブチリル - CoAデヒドロゲナーゼ」という用語は、アセトアセチル - CoAから3 - ヒドロキシブチリル - CoAへの変換を触媒する酵素を表す。例示的な3 - ヒドロキシブチリル - CoAデヒドロゲナーゼは、(S) - 3 - ヒドロキシブチリル - CoAまたは(R) - 3 - ヒドロキシブチリル - CoAに対する基質選択性のある、還元ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) 依存性のものであってよい。これらの例はそれぞれ、E.C. 1.1.1.35およびE.C. 1.1.1.30に分類できる。さらに、3 - ヒドロキシブチリル - CoAデヒドロゲナーゼは、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸 (NADPH) 依存性であってよく、(S) - 3 - ヒドロキシブチリル - CoAまたは(R) - 3 - ヒドロキシブチリル - CoAに対する基質選択性がある。それらは、それぞれE.C. 1.1.1.157およびE.C. 1.1.1.36として分類される。3 - ヒドロキシブチリル - CoAデヒドロゲナーゼは、多数の産生源から得ることができ、それらの産生源は、例えば、C. アセトブチリウム (*C. acetobutylicum*) (ジェンバンク番号: NP_349314、NC_003030)、B. サブチリス (*B. subtilis*) (ジェンバンク番号: AAB09614、U29084)、ラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) (ジェンバンク番号: YP_294481、NC_007347)、およびアルカリゲネス・ユートロフス (*Alcaligenes eutrophus*) (ジェンバンク番号: AAA21973、J04987) である。

【0179】

「クロトナーゼ」という用語は、3 - ヒドロキシブチリル - CoAからクロトニル - CoAおよびH₂Oへの変換を触媒する酵素を表す。例示的なクロトナーゼは、(S) - 3 - ヒドロキシブチリル - CoAまたは(R) - 3 - ヒドロキシブチリル - CoAに対する基質選択性を有するもので、それぞれE.C. 4.2.1.17およびE.C. 4.2.1.55に分類されうる。クロトナーゼは多数の産生源から得ることができ、それらの産生源は、例えば、大腸菌 (*E. coli*) (ジェンバンク番号: NP_415911、NC_000913)、C. アセトブチリウム (*C. acetobutylicum*) (ジェンバンク番号: NP_349318、NC_003030)、B. サブチリス (*B. subtilis*) (ジェンバンク番号: CAB13705、Z99113)、およびエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) (ジェンバンク番号: BAA21816、D88825) である。

【0180】

「ブチリル - CoAデヒドロゲナーゼ」という用語は、クロトニル - CoAからブチリル - CoAへの変換を触媒する酵素を表す。例示的なブチリル - CoAデヒドロゲナーゼは、NADH依存性、NADPH依存性、またはフラビン依存性であってよく、それぞれ、E.C. 1.3.1.44、E.C. 1.3.1.38、およびE.C. 1.3.99.2に分類されうる。ブチリル - CoAデヒドロゲナーゼは、多数の産生源から得ることができ、それらの産生源は、例えば、C. アセトブチリウム (*C. acetobutylicum*) (ジェンバンク番号: NP_347102、NC_003030)、ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) (ジェンバンク番号: Q5EU90)、AY741582)、ストレプトマイセス・コリヌス (*Streptomyces collinus*) (ジェンバンク番号: AAA92890、U37135)、および

10

20

30

40

50

ストレプトマイセス・セリカラー (*Streptomyces coelicolor*) (ジェンバンク番号: CAA22721、AL939127) である。

【0181】

「ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ」という用語は、NADHまたはNADPHを補助因子として用いて、ブチリル-CoAからブチルアルデヒドへの変換を触媒する酵素を表す。NADHを優先するブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼは、E.C.1.2.1.57として知られており、例えば、クロストリジウム・ベエイジェリンキー (*Clostridium beijerinckii*) (ジェンバンク番号: AAD31841、AF157306) およびC.アセトブチリカム (*C. acetobutylicum*) (ジェンバンク番号: NP_149325、NC_001988) から得ることができる。

10

【0182】

「イソブチリル-CoAムターゼ」という用語は、ブチリル-CoAからイソブチリル-CoAへの変換を触媒する酵素を表す。この酵素は補酵素B₁₂を補助因子として用いる。例示的なイソブチリル-CoAムターゼは、酵素番号5.4.99.13で知られる。こうした酵素は、ストレプトマイセス・シンナモンシス (*Streptomyces cinnamonensis*) (ジェンバンク番号: AAC08713、U67612; CAB59633、AJ246005)、S.セリカラー (*S. coelicolor*) (ジェンバンク番号: CAB70645、AL939123; CAB92663、AL939121)、およびストレプトミセス・アベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) (ジェンバンク番号: NP_824008、NC_003155; NP_824637、NC_003155) を含む (ただし、これらに限定されない)、多数のストレプトマイセス属 (*Streptomyces*) に見いだされる。

20

【0183】

「アセト乳酸デカルボキシラーゼ」という用語は、アルファ-アセトラクテートからアセトインへの変換を触媒する酵素活性を有するポリペプチド (1種または複数種) を表す。例示的なアセト乳酸デカルボキシラーゼは、EC4.1.1.5として知られており、例えば、バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) (ジェンバンク番号: AAA22223、L04470)、クレブシエラ・テリゲナ (*Klebsiella terrigena*) (ジェンバンク番号: AAA25054、L04507) およびクレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) (ジェンバンク番号: AAU43774、AY722056) から得ることができる。

30

【0184】

「アセトインアミナーゼ」または「アセトイントランスアミナーゼ」という用語は、アセトインから3-アミノ-2-ブタノールへの変換を触媒する酵素活性を有するポリペプチド (1種または複数種) を表す。アセトインアミナーゼは、補助因子であるピリドキサル5'-ホスフェートまたはNADH (還元ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) またはNADPH (還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸) を利用することができる。得られる生成物は、3位で(R)または(S)立体配置を有しうる。ピリドキサルホスフェート依存性酵素は、アミノ供与体としてアラニンまたはグルタメートなどのアミノ酸を使用することができる。NADH依存性およびNADPH依存性の酵素は、別の基質としてアンモニアを使用できる。NADH依存性アセトインアミナーゼ (アミノアルコールデヒドロゲナーゼとしても知られている) の好適な例は、Ito, et al. (米国特許第6,432,688号明細書を参照) によって記載されている。ピリドキサル依存性アセトインアミナーゼの例には、Shin and Kim (J. Org. Chem. 67: 2848-2853, 2002) が記載している、アミン: ピルベートアミノトランスフェラーゼ (アミン: ピルベートトランスアミナーゼとも呼ばれる) がある。

40

【0185】

「アセトインキナーゼ」という用語は、アセトインからホスホアセトイン (phosphoacetoin) への変換を触媒する酵素活性を有するポリペプチド (1種または複

50

数種)を表す。アセトインキナーゼは、反応において、ホスフェート供与体としてATP(アデノシン三リン酸)またはホスホエノールピルビン酸を利用することができる。似たような基質であるジヒドロキシアセトンに対する類似の反応を触媒する酵素には、例えば、EC 2.7.1.29と知られる酵素(Garcia-Alles, et al., Biochemistry 43:13037-13046, 2004)がある。

【0186】

「アセトインホスフェートアミナーゼ(acetoin phosphate aminase)」という用語は、ホスホアセトインから3-アミノ-2-ブタノールO-ホスフェート(3-amino-2-butanol O-phosphate)への変換を触媒する酵素活性を有するポリペプチド(1種または複数種)を表す。アセトインホスフェートアミナーゼは、補助因子であるピリドキサル5'-ホスフェート、NADHまたはNADPHを使用できる。得られる生成物は、3位で(R)または(S)立体配置を有しうる。ピリドキサルホスフェート依存性酵素は、アラニンまたはグルタメートなどのアミノ酸を使用することができる。NADH依存性およびNADPH依存性の酵素は、別の基質としてアンモニアを使用できる。ホスホアセトインでのこの反応を触媒する酵素に関する報告はないが、似たような基質であるセリノールホスフェート(serinol phosphate)に対する類似反応を行わせるために提案されているピリドキサルホスフェート依存性酵素がある(Yasuta, et al., Appl. Environ. Microbial. 67:4999-5009, 2001)。

10

20

【0187】

「アミノブタノールホスフェートホスホリアーゼ(amino butanol phosphate phospholyase)」(「アミノアルコールO-ホスフェートリアーゼ(amino alcohol O-phosphate)」とも呼ばれる)という用語は、3-アミノ-2-ブタノールO-ホスフェートから2-ブタノンへの変換を触媒する酵素活性を有するポリペプチド(1種または複数種)を表す。アミノブタノールホスフェートホスホリアーゼは、補助因子のピリドキサル5'-ホスフェートを利用することができる。似たような基質である1-アミノ-2-プロパノールホスフェートでの類似反応を触媒する酵素に関する報告がある(Jones, et al., Biochem J. 134:167-182, 1973)。米国特許出願公開第2007/0259410号明細書は、生物であるエルウィニア・カロトボラ(Erwinia carotovora)からのアミノブタノールホスフェートホスホリアーゼを記載している。

30

【0188】

「アミノブタノールキナーゼ(amino butanol kinase)」という用語は、3-アミノ-2-ブタノールから3-アミノ-2-ブタノールO-ホスフェート(3-amino-2-butanol O-phosphate)への変換を触媒する酵素活性を有するポリペプチド(1種または複数種)を表す。アミノブタノールキナーゼは、ホスフェート供与体としてATPを利用することができる。3-アミノ-2-ブタノールでのこの反応を触媒する酵素に関する報告はないが、似たような基質であるエタノールアミンおよび1-アミノ-2-プロパノールでの類似反応を触媒する酵素に関する報告はある(Jones, et al. (上記を参照))。米国特許出願公開第2009/0155870号明細書は、実施例14で、エルウィニア・カロトボラ(Erwinia carotovora)の亜種アトロセプティカ(Atroseptica)のアミノアルコールキナーゼについて記載している。

40

【0189】

「ブタンジオールデヒドロゲナーゼ」(「アセトインレダクターゼ」としても知られる)という用語は、アセトインから2,3-ブタンジオールへの変換を触媒する酵素活性を有するポリペプチド(1種または複数種)を表す。ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(Butanediol dehydrogenases)は、アルコールデヒドロゲナーゼの広範なファミリーのサブセットである。ブタンジオールデヒドロゲナーゼ酵素は、アルコール生成物において(R)または(S)立体配置の生成特異性を有しうる。(S)特異

50

性ブタンジオールデヒドロゲナーゼは、EC 1.1.1.76として知られており、例えば、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) (ジェンバンク番号: BBA13085、D86412) から得ることができる。(R) 特異性ブタンジオールデヒドロゲナーゼは、EC 1.1.1.4として知られており、例えば、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) (ジェンバンク番号 NP830481、NC_004722; AAP07682、AE017000)、およびラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) (ジェンバンク番号 AAK04995、AE006323) から得ることができる。

【0190】

「ブタンジオールデヒドラターゼ」(「ジアールデヒドラターゼ (dialdehydratase)」または「プロパンジオールデヒドラターゼ」としても知られる) という用語は、2, 3-ブタンジオールから2-ブタノンへの変換を触媒する酵素活性を有するポリペプチド(1種または複数種)を表す。ブタンジオールデヒドラターゼは、補助因子のアデノシルコバラミン(補酵素 B₁₂ またはビタミン B₁₂ としても知られる。ただし、ビタミン B₁₂ は、補酵素 B₁₂ ではない他の形態のコバラミンを表すこともある)を利用することができる。アデノシルコバラミン依存性酵素は、EC 4.2.1.28として知られており、例えば、クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) (ジェンバンク番号: AA08099 (アルファサブユニット)、D45071; BAA08100 (ベータサブユニット)、D45071; および BBA08101 (ガンマサブユニット)、D45071 (3つのサブユニットはすべて活性に必要とされることに注目)、およびクレブシエラ肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) (ジェンバンク番号: AAC98384 (アルファサブユニット)、AF102064; ジェンバンク番号: AAC98385 (ベータサブユニット)、AF102064、ジェンバンク番号: AAC98386 (ガンマサブユニット)、AF102064) から得ることができる。他の好適なジアールデヒドラターゼとしては、サルモネラ・チフィウム (*Salmonella typhimurium*) (ジェンバンク番号: AAB84102 (大きなサブユニット)、AF026270; ジェンバンク番号: AAB84103 (中くらいのサブユニット)、AF026270; ジェンバンク番号: AAB84104 (小さなサブユニット)、AF026270); およびラクトバチルス・コリノイデス (*Lactobacillus collinoides*) (ジェンバンク番号: CAC82541 (大きなサブユニット)、AJ297723; ジェンバンク番号: CAC82542 (中くらいのサブユニット); AJ297723; ジェンバンク番号: CAD01091 (小さなサブユニット)、AJ297723) から得ることができる B₁₂ 依存性ジアールデヒドラターゼ; およびラクトバチラス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*) (特に、菌株 CNRZ734 および CNRZ735。Speranza, et al., J. Agric. Food Chem. 45: 3476-3480, 1997) からの酵素、および対応する酵素をコードするヌクレオチド配列があるが、これらに限定されない。ジオールデヒドラターゼ遺伝子の分離方法は、当該技術分野において周知である(例えば、米国特許第 5,686,276 号明細書)。

【0191】

「ピルビン酸デカルボキシラーゼ」という用語は、ピルビン酸の脱炭酸を触媒してアセトアルデヒドおよび二酸化炭素にする酵素を表す。ピルビン酸デカルボキシラーゼは、酵素番号 4.1.1.1 で知られている。こうした酵素は、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) (ジェンバンク番号: CAA97575、CAA97705、CAA97091) を含め、多数の酵母菌に見出される。

【0192】

本明細書に記載のイソブタノール生合成経路を含む宿主細胞は、1つまたは複数の更なる修飾をさらに含むことが理解されるであろう。米国特許出願公開第 2009/0305363 号明細書(これを援用する)は、サイトゾルに局在化するアセト乳酸合成酵素を発現しかつピルビン酸デカルボキシラーゼ活性が実質的になくなるよう酵母菌を操作す

10

20

30

40

50

ることにより、ピルベートからアセトラクテートへの変換が増大することを開示している。実施形態によっては、宿主細胞は、グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ活性を低下させる修飾、及び/またはピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1種の遺伝子の破損、またはピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子発現を制御する調節エレメントをコードする少なくとも1種の遺伝子の破損（米国特許出願公開第2009/0305363号明細書（本明細書に援用する）に記載）、エントナー・ドウドロフ経路によって炭素フラックスが増大するようにさせるかまたは等価物バランス（equivalents balance）を減少させる宿主細胞の修飾（米国特許出願公開第2010/0120105号明細書（本明細書に援用する）に記載）を含む。他の修飾としては、ピルベートを利用する生合成経路中のステップを触媒するポリペプチドをコードする少なくとも1種のポリヌクレオチドの組み込みがある。

10

【0193】

更なる修飾としては、アセト乳酸レダクターゼ（acetolactate reductase）活性を有するポリペプチドをコードする内在性ポリヌクレオチドにおける少なくとも1つの欠失、変異、及び/または置換がある。本明細書で使用される「アセト乳酸レダクターゼ活性」は、アセト乳酸からDHMBへの変換を触媒することができる任意のポリペプチドの活性を表す。そのようなポリペプチドは、当該技術分野において周知でありかつ本明細書に開示されている方法で特定できる。本明細書で使用される「DHMB」は、2, 3 - ジヒドロキシ - 2 - メチルブチレートを表す。DHMBには、「ファースト（fast）DHMB」（2S、3S配置を有する）および「スロー（slow）DHMB」（2S、3R配置（configure）を有する）がある。Kaneko et al., *Phytochemistry* 39:115-120 (1995)（その全体を本明細書に援用する）を参照されたい。それは、ファーストDHMBをアングリセリン酸（anglyceric acid）と呼び、スローDHMBを取りグリセリン酸（tiglyceric acid）と呼んでいる。複数の実施形態において、アセト乳酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドは、サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）のYMR226Cまたはそのホモログである。

20

【0194】

更なる修飾としては、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性及び/またはアルデヒドオキシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする内在性ポリヌクレオチドにおける欠失、変異、及び/または置換がある。本明細書で使用される「アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性」は、アルデヒドデヒドロゲナーゼの生物学的機能を有する任意のポリペプチドに関係している。そのようなポリペプチドとしては、アルデヒドの酸化（脱水素）を触媒するポリペプチドがある。そのようなポリペプチドとしては、イソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換を触媒するポリペプチドがある。そのようなポリペプチドには、酵素番号EC1.2.1.3、EC1.2.1.4またはEC1.2.1.5に対応するポリペプチドも含まれる。そのようなポリペプチドは、当該技術分野において周知でありかつ本明細書に開示されている方法によって特定することができる。本明細書で使用される「アルデヒドオキシダーゼ活性」は、アルデヒドオキシダーゼの生物学的機能を有する任意のポリペプチドに関係している。そのようなポリペプチドとしては、アルデヒドからのカルボン酸の生成を触媒するポリペプチドがある。そのようなポリペプチドとしては、イソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換を触媒するポリペプチドがある。そのようなポリペプチドには、酵素番号EC1.2.3.1に対応するポリペプチドも含まれる。そのようなポリペプチドは、当該技術分野において周知でありかつ本明細書に開示されている方法によって特定できる。実施形態によっては、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドは、サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）からのALD6またはそのホモログである。

30

40

【0195】

グルコース発現を少なくする効果を有する遺伝子修飾（酵母産生宿主（yeast p

50

roduction host cell) が pdc - である) が、米国特許出願公開第 2011/0124060 号明細書 (これを本明細書に援用する) に記載されている。実施形態によっては、欠失するかまたはダウンレギュレーションされるビルビン酸デカルボキシラーゼは、PDC1、PDC5、PDC6、およびこれらの組合せからなる群から選択される。実施形態によっては、ビルビン酸デカルボキシラーゼは、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) からの PDC1 ビルビン酸デカルボキシラーゼ、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) からの PDC5 ビルビン酸デカルボキシラーゼ、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) からの PDC6 ビルビン酸デカルボキシラーゼ、カンジダ・グラブラタ (*Candida glabrata*) からのビルビン酸デカルボキシラーゼ、ピキア・スティピティス (*Pichia stipitidis*) からの PDC1 ビルビン酸デカルボキシラーゼ、ピキア・スティピティス (*Pichia stipitidis*) からの PDC2 ビルビン酸デカルボキシラーゼ、クルイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*) からのビルビン酸デカルボキシラーゼ、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) からのビルビン酸デカルボキシラーゼ、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) からのビルビン酸デカルボキシラーゼ、およびザイゴサッカロミセス・ロキシ (*Zygosaccharomyces rouxii*) からのビルビン酸デカルボキシラーゼから選択される。実施形態によっては、宿主細胞は、グリセルアルデヒド - 3 - ホスフェートからグリセラート 1, 3, ビスホスフェート (glycerate 1, 3, bisphosphate) への変換を触媒するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの欠失またはダウンレギュレーションを含む。実施形態によっては、この反応を触媒する酵素はグリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼである。

【0196】

WIPO の国際公開第 2011/103300 号パンフレットは、(a) ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の異種性ポリヌクレオチド; (b) (i) Fe - S クラスター生合成に影響するポリペプチドをコードする内在性遺伝子における少なくとも 1 つの欠失、変異、及び / または置換; 及び / または (ii) Fe - S クラスター生合成に影響するポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の異種性ポリヌクレオチドを含む組換え宿主細胞を開示している。複数の実施形態において、Fe - S クラスター生合成に影響するポリペプチドは、AFT1、AFT2、FRA2、GRX3、または CCC1 によってコードされる。複数の実施形態において、Fe - S クラスター生合成に影響するポリペプチドは、構成型変異体 (constitutive mutant) である AFT1 L99A、AFT1 L102A、AFT1 C291F、または AFT1 C293F である。

【0197】

さらに、宿主細胞は、米国特許出願第 2012/0156735 号明細書 (本明細書に援用する) に記載されているように、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種性ポリヌクレオチド、及び / またはホスホトランスアセチラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種性ポリヌクレオチドを含む。

【0198】

実施形態によっては、任意の特定の核酸分子またはポリペプチドは、本明細書に記載したヌクレオチド配列またはポリペプチド配列に、少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% だけ同じものであってよい。当該技術分野において知られている「同一性パーセント」という用語は、2 つ以上のポリペプチド配列または 2 つ以上のポリヌクレオチド配列の間の関係であり、それらの配列を比較することによって求められる。当該技術分野においては、「同一性」は、場合によっては、ポリペプチド配列間またはポリヌクレオチド配列間の配列の関連度をも意味し、そのような配列の列と列との間での突き合わせによって求められる。「同一性」および「類似性」は、以下

に開示されている方法（これらに限定されない）を含む周知の方法で容易に計算できる：

- 1.) Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., Ed.) Oxford University: NY (1988);
- 2.) Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., Ed.) Academic: NY (1993);
- 3.) Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., Eds.) Humana: NJ (1994);
- 4.) Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., Ed.) Academic (1987); および
- 5.) Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., Eds.) Stockton: NY (1991)。

10

【0199】

標準組換えDNAおよび分子クローニングの技術は当該技術分野において周知であり、Sambrook, et al. (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989 (ここでは、Maniatisと呼ぶ) および Ausubel, et al. (Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, pub. by Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, 1987) によって記載されている。ブタノール生合成経路を含む微生物を構築するための方法の例は、例えば、米国特許第7,851,188号明細書、および米国特許出願公開第2007/0092957号明細書；米国特許出願公開第2007/0259410号明細書；米国特許出願公開第2007/0292927号明細書；米国特許出願公開第2008/0182308号明細書；米国特許出願公開第2008/0274525号明細書；米国特許出願公開第2009/0155870号明細書；米国特許出願公開第2009/0305363号明細書；および米国特許出願公開第2009/0305370号明細書に開示されており、それぞれの内容全体を本明細書に援用する。

20

30

【0200】

サッカロマイセス・セレビスエ (SACCHAROMYCES CEREVISIAE) でのブタノール生合成経路の発現

サッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) での遺伝子発現方法は、当該技術分野において知られている（例えば、Methods in Enzymology, Volume 194, Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Part A, 2004, Christine Guthrie and Gerald R. Fink Eds., Elsevier Academic Press, San Diego, CA）。酵母菌内での遺伝子の発現には、典型的には、プロモーター（注目している遺伝子が後に続いている）および転写ターミネーターが必要とされる。イソブタノール生合成経路をコードする遺伝子の発現カセットを構築するのに、本明細書の実施例で使用されるものも含め幾種類もの酵母菌プロモーター（構成的プロモーターである FBA、GPD、ADH1、および GPM、および誘導性プロモーターである GAL1、GAL10、および CUP1 があるが、これらに限定されない）を使用できる。好適な転写ターミネーターとしては、FBAt、GPDt、GPMt、ERG10t、GAL1t、CYC1、および ADH1 があるが、これらに限定されない。例えば、好適なプロモーター、転写ターミネーター、およびイソブタノール生合成経路の遺伝子は、米国特許出願公開第2010/0129886号明細書に記載されているように、大腸菌 (E. coli) - 酵母菌シャトルベクター内にクローン化し、酵母細胞に入れて形質転換することが

40

50

できる。こうしたベクターにより、大腸菌 (*E. coli*) および酵母菌株の両方で菌株増殖が可能になる。典型的にはベクターは、選択マーカーおよび配列を含み、所望の宿主内での自律増殖または染色体の組込みが可能である。典型的には、酵母菌内の使用プラスミドは、シャトルベクター pRS423、pRS424、pRS425、および pRS426 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) であり、これらは大腸菌 (*E. coli*) 複製開始点 (例えば、pMB1)、酵母菌の 2 μ 複製開始点、および栄養選択 (nutritional selection) 用マーカーを含む。これら 4 つのベクター用の選択マーカーは、His3 (ベクター pRS423)、Trp1 (ベクター pRS424)、Leu2 (ベクター pRS425) および Ura3 (ベクター pRS426) である。注目しているポリペプチドをコードする遺伝子を有する発現ベクターの構築は、大腸菌 (*E. coli*) 内での標準分子クローニング技術、または酵母菌内でのギャップ修復組換え (gap repair recombination) 法のいずれかによって実施できる。

【0201】

ギャップ修復クローニングの取り組み方は、酵母菌内での高効率な相同組換えを利用している。典型的には、酵母菌ベクター DNA は (例えば、その複数のクローニング部位で) 消化されて、その配列内に「ギャップ」が作られる。5' 末端と 3' 末端の両方に 21 bp 以上の配列を含む、注目している幾つかの挿入 DNA が生成され、それらの末端は、互いに順次に重なり、またベクター DNA の 5' および 3' 終端と順次に重なる。例えば、「遺伝子 X」用の酵母菌発現ベクターを構築するために、酵母菌プロモーターおよび酵母菌ターミネーターを発現カセット用として選択する。プロモーターおよびターミネーターは酵母菌のゲノム DNA から増幅し、遺伝子 X は、その元の生物から PCR 増幅するか、または遺伝子 X 配列を含むクローニングベクターから得る。線状にしたベクターの 5' 末端とプロモーター配列との間、プロモーターと遺伝子 X との間、遺伝子 X とターミネーター配列との間、およびターミネーターと線状にしたベクターの 3' 末端との間に、少なくとも 21 bp のオーバーラップ配列がある。その後、「ギャップ」ベクターおよび挿入 DNA を一緒に酵母菌株に入れて形質転換し、プラスミド上での栄養選択マーカー (nutritional selection markers) の相補を可能にする適切な化合物混合物を含む培地で平板培養する。正しい挿入物の組合せが存在することは、選択した細胞から調製したプラスミド DNA を用いて、PCR マッピングにより確認できる。次いで、酵母菌から分離されたプラスミド DNA (普通は低濃度) を大腸菌 (*E. coli*) 菌株 (例えば、TOP10) に入れて形質転換し、続いてミニプレップおよび制限酵素マッピングを行ってプラスミド構築物をさらに検証する。最後に、構築物は配列分析で検証できる。

【0202】

ギャップ修復技術のように、酵母菌ゲノムへの組み込みでは、酵母菌での相同組換え系も利用する。典型的には、コード領域および調節領域 (プロモーターおよびターミネーター) と栄養要求性マーカーとを含むカセットは、高忠実度の DNA ポリメラーゼで PCR 増幅するが、その際に、カセットとハイブリッド形成し、かつ挿入の望まれるゲノム領域の領域 5' および 3' と配列相同性のある 40 から 70 個の塩基対を含んでいるプライマーを用いて行う。その後、PCR 産物を酵母菌内に入れて形質転換し、組み込まれた栄養要求性マーカーの選択が行われるようなふさわしい化合物混合物を含む培地で平板培養する。例えば、「遺伝子 X」を染色体の位置「Y」に組み込むために、プロモーターとコード領域 X とターミネーターとの構築物をプラスミド DNA 構築物から PCR 増幅し、独立栄養性マーカー (URA3 など) に結合させるが、これは、SOE PCR か、または一般の制限消化とクローニングのいずれかで行う。プロモーターとコード領域 X とターミネーターと URA3 領域とを含む完全カセットを、プライマー配列と一緒に PCR 増幅するが、そのプライマー配列は、酵母菌染色体上の場所「Y」の領域 5' および 3' との相同性のある 40 ~ 70 bp を含む。PCR 生成物を酵母菌に入れて形質転換し、ウラシルを欠いている増殖培地上で選択する。形質転換体は、コロニー PCR かまたは染色体 DNA

の直接シーケンシングのいずれかで確認できる。

【0203】

産生させるための成長

本明細書に開示されている組換え宿主細胞は、(典型的には、発酵培地中の)好適な炭素物質と接触させる。更なる炭素物質としては、単糖類(フルクトースなど)、オリゴ糖類(乳糖、マルトース、ガラクトース、またはスクロースなど)、多糖類(デンプンまたはセルロースなど)またはそれらの混合物、および再生可能な供給原料(チーズホエーの透過物、コーンステープリカー、テンサイ糖密、および大麦の麦芽など)からの未精製混合物があるが、これらに限定されない。他の炭素物質としては、エタノール、ラクテート、スクシネート、またはグリセロールを挙げることができる。

10

【0204】

さらに、炭素物質は、重要な生化学的中間体への代謝変換が実証されている炭素1個の物質(二酸化炭素、またはメタノールなど)であってもよい。炭素1個および2個の物質に加えて、メチロフ生物は、メチルアミン、グルコサミンおよび様々なアミノ酸など他の幾つもの種類の炭素含有化合物を、代謝活性に利用することも知られている。例えば、メチロトロフ酵母は、メチルアミンの炭素を利用してトレハロースまたはグリセロールを生じることが知られている(Bellion et al., Microb. Growth C1 Compd., [Int. Symp.], 7th (1993), 415-32, Editors: Murrell, J. Collin, Kelly, Don P.; Publisher: Intercept, Andover, UK)。同様に、カンジダ属(Candida)の様々な種がアラニンまたはオレイン酸を代謝する(Sulter et al., Arch. Microbiol. 153: 485-489 (1990))。それゆえに、本発明に利用する炭素源は多種多様な炭素含有物質を包含することができ、またそれは生物の選択によって限定されるのみであることが企図される。

20

【0205】

本発明においては上述の炭素物質およびそれらの混合物はすべて適すると考えられるが、実施形態によっては、炭素物質は、グルコース、フルクトース、およびスクロース、あるいはこれらと、キシロース及び/またはアラビノースなどC5の糖類(C5の糖類を利用するよう修飾された酵母細胞のためのもの)との混合物である。スクロースは、サトウキビ、サトウダイコン、カッサバ、サトウモロコシ、およびそれらの混合物などの再生可能な砂糖源から得ることができる。グルコースおよびデキストロースは、穀物(トウモロコシ、小麦、ライ麦、大麦、オートムギ、およびそれらの混合物など)を含むデンプン系の供給原料を糖化させることによって、再生可能な穀物源から得ることができる。さらに、発酵性糖類は、例えば、米国特許出願公開第2007/0031918A1号明細書(本明細書に援用する)に記載されている前処理および糖化のプロセスによって、再生可能なセルロース質バイオマスまたはリグノセルロースバイオマスから得ることができる。バイオマスは(炭素基質に関連して使用される場合)、任意のセルロース系物質またはリグノセルロース系物質を指し、それには、セルロースを含む物質、および任意選択的に、ヘミセルロース、リグニン、デンプン、オリゴ糖類及び/または単糖類をさらに含む物質がある。バイオマスはまた、タンパク質及び/または脂質などの更なる成分を含みうる。バイオマスは単一の源から得ることができるか、またはバイオマスは複数の源から得た混合物を含むことができる。例えば、バイオマスは、トウモロコシの穂軸とトウモロコシのわらの混合物、または草と葉の混合物を含むことができる。バイオマスとしては、バイオエネルギー作物、農業残渣、固形都市廃棄物、固形産業廃棄物、紙製造のスラッジ、庭ゴミ、木屑および林業廃棄物があるが、これらに限定されない。バイオマスの例としては、トウモロコシ穀粒、トウモロコシの穂軸、穀物残渣(トウモロコシの皮など)、トウモロコシのわら、草、小麦、小麦のわら、大麦、大麦のわら、干し草、稲わら、スイッチグラス、紙くず、サトウキビバガス、モロコシ、大豆、(穀物、木、枝、根、葉、木片、おがくず、低木および灌木の)粉碎によって得られる成分、野菜、果物、花、家畜ふん尿、およびそれらの混合物があるが、これらに限定されない。

30

40

50

【0206】

ふさわしい炭素源に加えて、発酵培地は、好適な無機質、塩類、共同因子、緩衝液および当業者に知られている他の成分（培養物を成長させ、本明細書で述べた酵素経路を促進するのに適したもの）を含まなければならない。

【0207】

培養条件

典型的には、細胞は、約20～約40の範囲の温度において、ふさわしい培地中で成長する。本発明における好適な増殖培地は、一般の商業生産された培地であり、それには *Luria Bertani* (LB) 培地、サブローデキストロース (SD) 培地または *Yeast Medium* (YM) 培地（つまり、酵母菌窒素塩基、硫酸アンモニウム、および（炭素/エネルギー源として）デキストロースを含む培地）あるいは YPD 培地（ほとんどのサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株を成長させるのに最適な割合の、ペプトンと酵母菌抽出物とデキストロースとのブレンド）などがある。他の定められた増殖培地または合成増殖培地を使用してもよく、特定の微生物の成長に適した培地は、微生物学または発酵科学の当業者に知られているであろう。カタボライトリプレッションを直接または間接的に調整することで知られている試薬を使用すること、例えば、環状アデノシン2', 3'-モノホスフェート (cAMP) を発酵培地に含めることもできる。

10

【0208】

発酵に適した pH 範囲は、pH 5.0～pH 9.0の間であり、初期条件としては pH 6.0～pH 8.0 が好ましい。酵母菌の発酵にとって好適な pH 範囲は、典型的には約 pH 3.0～約 pH 9.0の間である。1つの実施形態では、約 pH 5.0～約 pH 8.0 が初期条件に使用される。他の微生物の発酵にとって好適な pH 範囲は、約 pH 3.0～約 pH 7.5の間である。1つの実施形態では、約 pH 4.5～約 pH 6.5 が初期条件に使用される。

20

【0209】

発酵は、好気条件または嫌気条件下で実施できる。1つの実施形態では、嫌気条件または微好氣的条件が発酵に使用される。

【0210】

工業におけるバッチ発酵および連続発酵

ブタノール（または他の生成物）は、バッチ発酵法を用いて産生させることができる。古典的なバッチ発酵は、培地の組成を発酵の開始時に設定し、発酵の間に人為的な変更を実施しない閉鎖系である。標準バッチ方式の変形形態が、供給バッチ方式 (fed batch system) である。供給バッチ発酵プロセスも本発明では好適であり、発酵の進行に伴い物質を徐々に添加することを除いて、これは典型的なバッチ方式を含む。カタボライトリプレッションが細胞の代謝を妨げる傾向があるとき、また培地における物質の量を限定することが望ましい場合に、供給バッチ方式は有用である。バッチ式発酵および供給バッチ式発酵は、一般的かつ当該技術分野において周知のものであり、その例は、*Thomas D. Brock in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Second Edition* (1989) *Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.*, または *Deshpande, Mukund V., Appl. Biochem. Biotechnol.*, 36: 227, (1992)（本明細書に援用する）に見出すことができる。

30

40

【0211】

ブタノール（または他の生成物）は、連続発酵法を用いて産生させることもできる。連続式発酵は、定められた発酵培地が連続的にバイオリアクターに添加され、同時に、同量の馴化培地が処理のために除去される開放系である。連続発酵では一般に、細胞が主に対数期増殖 (log phase growth) の状態にある一定の高密度に培養物を保つ。連続式発酵では、細胞成長または最終産物濃度に影響を及ぼす1つの因子または任意

50

の数の因子を調節することが可能である。連続式発酵プロセスでの栄養素および成長因子の調節方法ならびに産物形成の速度を最大にする技術は、工業微生物学の技術分野において周知であり、様々な方法が B r o c k (上記を参照) によって詳述されている。

【 0 2 1 2 】

ブタノール (または他の生成物) の製造は、バッチプロセス、供給バッチプロセスまたは連続プロセスを用いて実施できること、また知られている任意の発酵方式が適しているであろうことが考えられる。さらに、細胞は、全細胞触媒としての物質上に固定化し、ブタノール産生のための発酵条件にさらしてよいと考えられる。

【 0 2 1 3 】

発酵培地からブタノールを分離する方法

10

生物産生ブタノールは、A B E 発酵に関して当該技術分野において知られている方法を用いて、発酵培地から分離することができる (例えば、D u r r e , A p p l . M i c r o b i o l . B i o t e c h n o l . 4 9 : 6 3 9 - 6 4 8 (1 9 9 8) , G r o o t e t a l . , P r o c e s s . B i o c h e m . 2 7 : 6 1 - 7 5 (1 9 9 2) 、およびその中の文献を参照) 。例えば、固形分は、遠心分離、濾過、デカンテーションなどによって発酵培地から除去できる。ブタノールは、蒸留、共沸蒸留、液 - 液抽出、吸着、気体ストリッピング、膜蒸発 (m e m b r a n e e v a p o r a t i o n) 、または透析蒸発などの方法を用いて、発酵培地から分離できる。

【 0 2 1 4 】

ブタノールは、低沸点の、水との共沸混合物を生じるので、蒸留を用いて、混合物をその共沸組成になるまで分離することができる。蒸留は、本明細書で述べたプロセスと組み合わせて用いて、共沸混合物とならないようにして分離を行うことができる。蒸留と併用してブタノールを分離および精製する方法には、デカンテーション、液 - 液抽出、吸着、および膜に基づく技法があるが、これらに限定されない。さらに、ブタノールは共留剤を用いた共沸蒸留を使用して分離できる (例えば、D o h e r t y a n d M a l o n e , C o n c e p t u a l D e s i g n o f D i s t i l l a t i o n S y s t e m s , M c G r a w H i l l , N e w Y o r k , 2 0 0 1 を参照) 。

20

【 0 2 1 5 】

ブタノール - 水の混合物は、不均一な共沸混合物を生じるので、蒸留をデカンテーションと併用してイソブタノールを分離および精製することができる。この方法では、ブタノールを含んでいる発酵ブロス蒸留して共沸組成に近づけることができる。その後、共沸混合物を濃縮し、ブタノールをデカンテーションで発酵培地から分離する。デカンテーションで取られた水性相は、還流液として第 1 蒸留塔に、あるいは別個の回収塔に戻すことができる。ブタノールを多量に含んでいる、デカンテーションで取られた有機相は、第 2 蒸留塔において蒸留でさらに精製することができる。

30

【 0 2 1 6 】

ブタノールは、液 - 液抽出を蒸留と併用して発酵培地から分離することもできる。この方法では、ブタノールは、好適な溶剤による液 - 液抽出を用いて発酵ブロスから抽出される。次いで、ブタノールを含んでいる有機相を蒸留して、ブタノールを溶剤から分離する。

40

【 0 2 1 7 】

吸着と組み合わせた蒸留も、ブタノールを発酵培地から分離するのに使用できる。この方法では、ブタノールを含んでいる発酵ブロス蒸留して共沸組成に近づけ、その後、残っている水を、モレキュラーシーブなどの吸着剤を使用して除去する (A d e n e t a l . , L i g n o c e l l u l o s i c B i o m a s s t o E t h a n o l P r o c e s s D e s i g n a n d E c o n o m i c s U t i l i z i n g C o - C u r r e n t D i l u t e A c i d P r e h y d r o l y s i s a n d E n z y m a t i c H y d r o l y s i s f o r C o r n S t o v e r , R e p o r t N R E L / T P - 5 1 0 - 3 2 4 3 8 , N a t i o n a l R e n e w a b l e E n e r g y L a b o r a t o r y , J u n e 2 0 0 2) 。

50

【0218】

さらに、透析蒸発と組み合わせた蒸留を用いて、ブタノールを発酵培地から分離し、精製することができる。この方法では、ブタノールを含んでいる発酵ブロス蒸留して共沸組成に近づけ、その後、残っている水を親水性膜に通して透析蒸発によって除去する (Guo et al., J. Membr. Sci. 245, 199-210 (2004))。

【0219】

現場での生成物取り出し (in situ product removal) (ISPR) (抽出発酵とも呼ぶ) は、発酵容器からブタノール (または他の発酵アルコール) を、それが産生されるにつれて取り出すことができ、それによって、微生物がブタノールを高い収率で産生できるようにする。当該技術分野において述べられてきた発酵アルコールを取り出すための ISPR の 1 つの方法は、液-液抽出である。一般に、例えば、ブタノール発酵に関しては、(微生物を含む) 発酵培地を、ブタノール濃度が毒性レベルに達する前の時点で有機エクストラクトと接触させる。有機エクストラクトおよび発酵培地は二相性混合物を形成する。ブタノールは有機エクストラクト相に分配され、微生物を含んでいる水性相における濃度が減少し、それにより阻害的なブタノールに微生物をさらすのが抑制される。

【0220】

液-液抽出は、例えば、米国特許出願公開第 2009/0305370 号明細書および米国特許出願公開第 2011/0097773 号明細書 (これらの開示については、その全体を本明細書に援用する) に記載されているプロセスにしたがって実施できる。米国特許出願公開第 2009/0305370 号明細書および米国特許出願公開第 2011/0097773 号明細書は、液-液抽出を用いて発酵ブロスからブタノールを製造し回収するための方法を記載しており、その方法は、発酵ブロスを水不混和性エクストラクトと接触させて、二相混合物 (水性相と有機相を含む) を形成させるステップを含む。典型的には、エクストラクトは、飽和、一不飽和、多価不飽和 (およびそれらの組合せ) の $C_{12} \sim C_{22}$ 脂肪アルコール、 $C_{12} \sim C_{22}$ 脂肪酸、 $C_{12} \sim C_{22}$ 脂肪酸のエステル、 $C_{12} \sim C_{22}$ 脂肪アルデヒド、およびそれらの混合物からなる群から選択される有機エクストラクトであってよい。ISPR 用のエクストラクトは、非アルコール性エクストラクトであってよい。ISPR エクストラクトは、オレイルアルコール、ベヘニルアルコール、セチルアルコール、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、ステアリルアルコール、1-ウンデカノール、オレイン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸、メチルミリステート、オレイン酸メチル、ウンデカノール、ラウリンアルデヒド、20-メチルウンデカノール (methyl undecanal)、およびそれらの混合物などの外部 (exogenous) 有機エクストラクトであってよい。

【0221】

実施形態によっては、発酵培地中のアルコールを、有機酸 (例えば、脂肪酸) および触媒 (アルコールと有機酸とのエステル化を行わせることができるもの) と接触させることにより、アルコールエステルを形成させることができる。そのような実施形態では、有機酸は、アルコールエステルが分配される ISPR エクストラクトとして働くことができる。有機酸は、発酵容器に供給することができ、かつ/または発酵容器に送られる発酵性炭素を供給するバイオマスから得ることができる。供給原料中に存在する脂質は、触媒作用により有機酸に加水分解することができ、その同じ触媒 (例えば、酵素) は、有機酸とアルコールとのエステル化を行わせることができる。ある特定の実施形態では、供給原料中に存在する脂質は、上述の触媒 (例えば、酵素) を利用して、脂肪酸とグリセロールに変換できる。グリセロールは、例えば、発酵容器に供給して、本明細書で述べたグリセロール産生の低下した微生物に補充することができる。微生物への補充は、例えば、バイオマス生産および微生物細胞の健康を向上させることができる。グリセロールは、発酵条件下で酵素によって産生される量を十分に超える量が供給されるであろう。発酵時に生じるカルボン酸は、同じ触媒または異なる触媒によって産生されるアルコールと、さらに

エステル化されうる。触媒は、発酵の前に供給原料に供給できるか、または供給原料の供給の前またはその供給と同時に発酵容器に供給できる。触媒を発酵容器に供給すると、脂質が加水分解されて有機酸になり、さらに実質的に同時に、発酵容器中に存在するブタノールと有機酸とのエステル化が行われて、アルコールエステルを得ることができる。有機酸及び/または(供給原料から得られない)自然の油も発酵容器へ供給することができ、自然の油は加水分解されて有機酸になる。アルコールとのエステル化を行わない有機酸はすべて、I S P Rエクストラクトの一部として働くことができる。アルコールエステルを含んでいるエクストラクトは、発酵培地から分離することができ、アルコールをエクストラクトから回収できる。エクストラクトは発酵容器へ送って再利用できる。したがって、例えば、ブタノール製造の場合、ブタノールからエステルへの変換により、発酵培地中の遊離ブタノールの濃度は低下し、ブタノール濃度の増大による毒性作用から微生物が保護される。さらに、分別されていない穀物は、その中に含まれている脂質を分離せずに供給原料として使用することができる。というのは、脂質は触媒作用により加水分解されて有機酸になり、それによってI S P Rエクストラクト中での脂質の蓄積速度は減少するからである。

10

20

30

40

50

【0222】

現場での生成物取り出しは、バッチ方式でも連続方式でも実施できる。現場での生成物取り出しの連続方式では、生成物を反応器から連続的に取り出す。現場での生成物取り出しのバッチ方式では、ある量の有機エクストラクトを発酵容器に加え、エクストラクトはそのプロセスの間取り除かない。現場での生成物取り出しでは、発酵の開始時に有機エクストラクトは発酵培地と接触しうるので、二相性発酵培地が形成される。あるいは、微生物が所望の量だけ成長を成し遂げた後(これは、培養物の光学濃度を測定することにより判断できる)、有機エクストラクトは発酵培地と接触できる。さらに、発酵培地中の生成物アルコールレベルが、予め選んだレベルに達した時点で、有機エクストラクトは発酵培地と接触できる。本発明の一部の実施形態にしたがったブタノール産生の場合、ブタノール濃度が毒性レベルに達する前の時点で有機酸エクストラクトが発酵培地と接触できる。これは、ブタノールを有機酸とエステル化させてブタノールエステルを生じさせ、その結果として、発酵容器中のブタノールの濃度が低下するようにさせるためである。その後、エステルを含んでいる有機相は、ブタノールエステルの所望の有効滴定濃度が達成された後に、発酵容器から取り出すこと(さらに水性相を構成する発酵ブロスから分離すること)ができる。実施形態によっては、発酵容器中での利用可能な発酵性糖の発酵が実質的に完了した後に、エステルを含んでいる有機相を水性相から分離する。

【0223】

イソブタノール産生の確認

培地中のイソブタノールの存在及び/または濃度は、当該技術分野において知られている幾つもの方法で明らかにすることができる(例えば、米国特許第7,851,188号明細書(これを援用する)を参照)。例えば、特定の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法では、Shodex SH-1011 カラムとShodex SHGガードカラム(どちらもWaters Corporation(Milford, MA)から購入できる)と一緒に使用し、屈折率(RI)検出を用いる。クロマトグラフ分離は、0.01M H_2SO_4 を移動相として用い、0.5 mL/minの流量および50 のカラム温度で実施する。イソブタノールは、使用される条件下では保持時間が46.6 minである。

【0224】

あるいはまた、ガスクロマトグラフィー(GC)法を利用できる。例えば、特定のGC法では、水素炎イオン化検出器(FID)を備えた、HP-INNOWaxカラム(30 m x 0.53 mm(内径)、1 μ の膜厚、Agilent Technologies, Wilmington, DE)を使用する。キャリアーガスは、4.5 mL/minの流量(150 において一定の頭部圧力で測定した場合)のヘリウムであり、注入器のスプ

リット (split) は 200 で 1 : 25 であり、オープン温度は、1 min の間 45、10 / min では 45 ~ 220、5 min の間 220 であり、さらに FID 検出 (240、26 mL / min のヘリウムメイクアップガス (helium make up gas)) を使用した。イソブタノールの保持時間は 4.5 min である。

【0225】

本発明の様々な実施形態を本明細書に記載したが、それらは単なる例として示したものであり、限定するものではないことを理解すべきである。本発明の意図および範囲を逸脱しない限り、それらに対して形態および詳細に関する様々な変更を行うことができることは、当業者にとって明らかであろう。したがって、本発明の領域や範囲は、上述の例示の実施形態のいずれによっても限定されるものではなく、請求項およびそれらに相当するものにしたがってのみ定義されるべきである。

10

【0226】

本明細書で挙げた刊行物、特許、および特許出願はすべて、本発明が関係する当業者の技術レベルを示しており、またそれらを援用するが、それぞれの個別の刊行物、特許または特許出願を本明細書に援用することを具体的かつ個別に示しているのと同程度に援用する。

【実施例】

【0227】

本発明を、以下の実施例でさらに明確に示す。そうした実施例は、本発明の実施形態を示すものだが、単なる例として示すものであることを理解すべきである。上記の説明およびこうした実施例から、当業者は本発明の本質的な特徴を見定めることができ、本発明の意図および範囲を逸脱しない限り、本発明に様々な変更および修正を加えて様々な用途および条件に適合させることができる。

20

【0228】

一般的方法

実施例に使用されている標準組換え DNA、分子クローニングの技術および形質転換プロトコルは当該技術分野において周知であり、Sambrook et al. (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989 (本明細書では、Maniatis と呼ぶ), Ausubel et al. (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, pub. by Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, 1987) および Amberg et al. (Amberg, D. C., Burke, D. J. and Strathern, J. N. (Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Press, 2005) によって記載されている。細菌培養の維持および成長に適した物質および方法は、当該技術分野において周知である。以下の実施例で用いるのに適した技法は、Manual of Methods for General Bacteriology (Phillipp et al., eds., American Society for Microbiology, Washington, DC., 1994) で述べられているか、または Thomas D. Brock (Brock, Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Second Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1989)) が述べており、見出すことができる。バクテリア細胞の成長および維持に用いられた試薬、制限酵素および物質はすべて、特に明記されていない限り、Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO), BD Diagnostic Systems (Sparks, MD), Invi

30

40

50

trogen (Carlsbad, CA), HiMedia (Mumbai, India), SD Fine chemicals (India)、またはタカラバイオ株式会社 (滋賀県、日本) から得た。

【0229】

略号の意味は以下のとおりである: 「sec」は秒 (単数または複数) を意味し、「min」は分 (単数または複数) を意味し、「h」は時間 (単数または複数) を意味し、「nm」はナノメートルを意味し、「 μ L」はマイクロリットル (単数または複数) を意味し、「mL」はミリリットル (単数または複数) を意味し、「mg/mL」はミリグラム / ミリリットルを意味し、「L」はリットル (単数または複数) を意味し、「nm」はナノメートルを意味し、「mM」はミリモルを意味し、「M」はモルを意味し、「mmol」はミリモル (単数または複数) を意味し、「 μ mol」はマイクロモル (単数または複数) を意味し、「kg」はキログラムを意味し、「g」はグラム (単数または複数) を意味し、「 μ g」はマイクログラム (単数または複数) を意味し、「ng」はナノグラム (単数または複数) を意味し、「PCR」はポリメラーゼ連鎖反応を意味し、「OD」は光学濃度を意味し、「OD600」は600nmの波長で測定された光学濃度を意味し、「kDa」はキロダルトンを意味し、「g」は引力定数も意味し、「bp」は塩基対 (単数または複数) を意味し、「kbp」はキロ塩基対 (単数または複数) を意味し、「kb」はキロベースを意味し、「%」はパーセントを意味し、「%w/v」は重量 / 体積パーセントを意味し、「%v/v」は体積 / 体積パーセントを意味し、「HPLC」は高速液体クロマトグラフィーを意味し、「g/L」はグラム / リットルを意味し、「 μ g/L」はマイクログラム / リットルを意味し、「ng/ μ L」はマイクログラム / マイクロリットルを意味し、「pmol/ μ L」はピコモル / マイクロリットルを意味し、「RPM」は回転 / 分を意味し、「 μ mol/min/mg」はマイクロモル / 分 / ミリグラムを意味し、「w/v」は重量 / 体積を意味し、「v/v」は体積 / 体積を意味する。

【0230】

菌株の作成

菌株 PNY2115 の作成

サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株 PNY0827 を、PNY2115 の更なる遺伝子操作のための宿主細胞として用いる。PNY0827 は、ブダペスト条約に基づき2011年9月22日に、ATCC (American Type Culture Collection, Patent Depository 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) に寄託されており、かつ特許寄託指定 (patent deposit designation) PTA-12105 を有するサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) から得られる菌株を表す。

【0231】

URA3 の欠失および一倍体への胞子形成

内在性 URA3 コード領域を欠失させるために、欠失カセットを pLA54 (配列番号 95) から PCR 増幅した。その pLA54 は、(生体内での相同組換えおよびその後の KANMX4 マーカーの欠失を行えるようにするための) loxP 部位が隣接した P_{TEF₁}-kanMX4-TEF1t カセットを含んでいた。PCR は、Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs; Ipswich, MA) およびプライマー BK505 (配列番号 96) および BK506 (配列番号 97) を用いて行った。各プライマーの URA3 部分は、kanMX4 カセットの組み込みによって URA3 コード領域が置換されるように、URA3 ATG の上流にある 5' 領域の 180bp およびコード領域の下流にある 3' 領域の 78bp から得た。標準遺伝子操作 (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202) を用い

てPCR産物をPNY0827に入れて形質転換し、形質転換体は、30において、2%グルコースおよび100μg/mlジェネテシンで補われたYEP培地で選択した。形質転換体は、組み込みカセットが存在することを確認するために、プライマーLA468(配列番号98)およびLA492(配列番号99)を用いてコロニーPCRによって選別した。遺伝子型MATa/URA3/ura3::loxP-kanMX4-loxPを有するヘテロ接合性の二倍体を得た(NYLA98)。一倍体を得るために、標準的方法を用いてNYLA98を孢子形成させた(Codon AC, Gasent-Ramirez JM, Benitez T.。サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)のパン酵母における孢子形成および四分子形成の頻度および影響する因子。Appl Environ Microbiol. 1995 PMID: 7574601)。四分子はマイクロマニピュレーターを用いて離断し、2%グルコースで補われた富栄養YPE培地で成長させた。4つの生存可能な孢子を含んでいる四分子を、ウラシルを欠いている2%グルコースで補われた完全合成培地に斑点状に付着させ、プライマーAK109-1(配列番号100)、AK109-2(配列番号101)、およびAK109-3(配列番号102)を用いて、多重コロニーPCR(multiplex colony PCR)によって接合型を確かめた。NYLA103と呼ばれる得られた特定された一倍体菌株は、遺伝子型: MAT ura3 ::loxP-kanMX4-loxPを有し、PNYLA106と呼ばれるものは、遺伝子型: MAT a ura3 ::loxP-kanMX4-loxPを有する。

【0232】

HIS3の欠失

内在性HIS3コード領域を欠失させるために、損傷のない欠失カセットを使用した。損傷のないHIS3欠失用のPCRカセットの4つのフラグメントは、Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs; Ipswich, MA)およびテンプレートとしてのCEN.PK113-7DゲノムDNA(Gentra Puregene Yeast/Bact kit (Qiagen; Valencia, CA)で調製されたもの)を用いて増幅した。HIS3フラグメントAは、プライマーoBP452(配列番号103)およびプライマーoBP453(配列番号104)(HIS3フラグメントBの5'末端と同一性のある5'尾部(tail)を含んでいる)で増幅した。HIS3フラグメントBは、HIS3フラグメントAの3'末端と同一性のある5'尾部を含んでいるプライマーoBP454(配列番号105)、およびHIS3フラグメントUの5'末端と同一性のある5'尾部を含んでいるプライマーoBP455(配列番号106)で、増幅した。HIS3フラグメントUは、HIS3フラグメントBの3'末端と同一性のある5'尾部を含んでいるプライマーoBP456(配列番号107)、およびHIS3フラグメントCの5'末端と同一性のある5'尾部を含んでいるプライマーoBP457(配列番号108)で、増幅した。HIS3フラグメントCは、HIS3フラグメントUの3'末端と同一性のある5'尾部を含んでいるプライマーoBP458(配列番号109)、およびプライマーoBP459(配列番号110)で、増幅した。PCR産物は、PCR Purificationキット(Qiagen)で精製した。HIS3フラグメントABは、HIS3フラグメントAとHIS3フラグメントBとを混合し、プライマーoBP452(配列番号103)およびoBP455(配列番号106)で増幅することにより、オーバーラップPCR(overlapping PCR)で作成した。HIS3フラグメントUCは、HIS3フラグメントUとHIS3フラグメントCとを混合し、プライマーoBP456(配列番号107)およびoBP459(配列番号110)で増幅することにより、オーバーラップPCRで作成した。得られたPCR産物は、アガロースゲルで精製し、その後、Gel Extractionキット(Qiagen)を使用した。HIS3 ABUCカセットは、HIS3フラグメントABとHIS3フラグメントUCとを混合し、プライマーoBP452(配列番号103)およびoBP459(配列番号110)で増幅することにより、オーバーラップPCRで作成した。PCR産物は、PCR Purifi

10

20

30

40

50

cationキット (Qiagen) で精製した。NYLA106のコンピテント細胞を、HIS3 ABUC PCRカセットで形質転換し、30において、ウラシルを欠いている2%グルコースで補われた完全合成培地で平板培養した。形質転換体は、正しく組み込まれていることを確かめるために、30において、ヒスチジンを欠いている2%グルコースで補われた完全合成培地でのレプリカ平板法によって選別した。組み込まれたことを確かめるため、プライマーoBP460 (配列番号111) およびLA135 (配列番号112) (5'末端用) およびプライマーoBP461 (配列番号113) およびLA92 (配列番号114) (3'末端用) を用いて、PCRによってゲノムDNAを調製した。URA3マーカーは、標準プロトコルにしたがって、30において、2%グルコースおよび5-FOAで補われた完全合成培地で平板培養することにより再利用した。マーカーの除去は、5-FOAプレートからSD-URA培地へコロニーを斑点状に付着させて成長がないことを確かめることにより、確認した。得られた特定された菌株 (PNY2003と呼ぶ) は、次のような遺伝子型を有する: MATa ura3::loxP-kanMX4-loxP his3。

【0233】

PDC1の欠失

内在性PDC1コード領域を欠失させるため、欠失カセットをpLA59 (配列番号115) (生体内での相同組換えおよびその後のURA3マーカーの除去が行えるように、縮重loxP部位が隣接したURA3マーカーを含んでいる) からPCR増幅した。PCRは、Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs; Ipswich, MA) およびプライマーLA678 (配列番号116) およびLA679 (配列番号117) を用いて行った。URA3カセットの組み込みによってPDC1コード領域が置換されても、コード領域の最初の50bpと最後の50bpは残されるように、各プライマーのPDC1部分は、PDC1開始コドンの下流にある5'領域および停止コドンの上流にある3'領域50bpから得た。PCR産物は、標準遺伝子操作を用いてPNY2003に入れて形質転換し、形質転換体は、30において、ウラシルを欠いている2%グルコースで補われた完全合成培地で選択した。形質転換体は、正しく組み込まれたことを確かめるために、プライマーLA337 (配列番号118) (5'コード領域の外側にある) およびLA135 (配列番号112) (URA3の内側にあるプライマー) を用いてコロニーPCRによって選別した。その後、ポジティブ形質転換体 (positive transformants) を、プライマーLA692 (配列番号119) およびLA693 (配列番号120) (PDC1コード領域の内部にあるもの) を用いて、コロニーPCRによって選別した。URA3マーカーは、GAL1プロモーターの制御を受けるCREリコンビナーゼを含んでいるpLA34 (配列番号121) による形質転換によって再利用し、30において、ヒスチジンを欠いている2%グルコースで補われた完全合成培地で平板培養した。形質転換体を、0.5%ガラクトースで補われた富栄養培地で平板培養し、リコンビナーゼを誘発させた。マーカーの除去は、ウラシルを欠いている2%グルコースで補われた完全合成培地にコロニーを斑点状に付着させて成長がないことを確かめることにより確認した。得られた特定された菌株 (PNY2008と呼ぶ) は、次のような遺伝子型を有する: MATa ura3::loxP-kanMX4-loxP his3 pdc1::loxP71/66。

【0234】

PDC5の欠失

内在性PDC5コード領域を欠失させるため、欠失カセットをpLA59 (配列番号115) (生体内での相同組換えおよびその後のURA3マーカーの除去が行えるように、縮重loxP部位が隣接したURA3マーカーを含んでいる) からPCR増幅した。PCRは、Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs; Ipswich, MA) およびプライマーLA722 (配列番号122) およびLA733 (配列番号123) を用いて行った。各ブ

ライマーのPDC5部分は、URA3カセットの組み込みによってPDC5コード領域全体が置換されるように、PDC5開始コドンの上流にある5'領域の50bpおよび停止コドンの下流にある3'領域の50bpから得た。PCR産物は、標準遺伝子操作を用いてPNY2008に入れて形質転換し、形質転換体は、30において、ウラシルを欠いている1%エタノールで補われた完全合成培地で選択した。形質転換体は、正しく組み込まれたことを確かめるために、プライマーLA453(配列番号124)(5'コード領域の外側にある)およびLA135(配列番号112)(URA3の内側にあるプライマー)を用いてコロニーPCRによって選別した。その後、ポジティブ形質転換体を、プライマーLA694(配列番号125)およびLA695(配列番号126)(PDC5コード領域の内側にあるもの)を用いて、コロニーPCRによって選別した。URA3マーカーは、GALLプロモーターの制御を受けるCREリコンビナーゼを含んでいるpLA34(配列番号121)による形質転換によって再利用し、30において、ヒスチジンを欠いている1%エタノールで補われた完全合成培地で平板培養した。形質転換体を、1%エタノールおよび0.5%ガラクトースで補われた富栄養YEP培地で平板培養して、リコンビナーゼを誘発させた。マーカーの除去は、ウラシルを欠いている1%エタノールで補われた完全合成培地にコロニーを斑点状に付着させて成長がないことを確かめることにより確認した。得られた特定された菌株(PNY2009と呼ぶ)は次のような遺伝子型を有する: MATa ura3 : : loxP - kanMX4 - loxP his3 pdc1 : : loxP71/66 pdc5 : : loxP71/66。

10

20

【0235】

FRA2の欠失

FRA2の欠失は、コード配列の3'末端から250個のヌクレオチドを削除して、FRA2コード配列の最初の113個のヌクレオチドが無損傷のままとなるように設計した。インフレームの停止コドンは、欠失の下流のヌクレオチド7個のところにあった。損傷のないFRA2の欠失用のPCRカセットの4つのフラグメントは、Phusion High Fidelity PCR Master Mix(New England BioLabs; Ipswich, MA)およびテンプレートとしてのCEN.PK113-7DゲノムDNA(Gentra Pure gene Yeast/Bact kit(Qiagen; Valencia, CA)で調製されたもの)を用いて増幅した。FRA2フラグメントAは、プライマーoBP594(配列番号127)およびプライマーoBP595(配列番号128)(FRA2フラグメントBの5'末端と相同性のある5'尾部を含んでいる)で増幅した。FRA2フラグメントBは、FRA2フラグメントAの3'末端と相同性のある5'尾部を含んでいるプライマーoBP596(配列番号129)、およびFRA2フラグメントUの5'末端と相同性のある5'尾部を含んでいるプライマーoBP597(配列番号130)で、増幅した。FRA2フラグメントUは、FRA2フラグメントBの3'末端と相同性のある5'尾部を含んでいるプライマーoBP598(配列番号131)およびFRA2フラグメントCの5'末端と相同性のある5'尾部を含んでいるプライマーoBP599(配列番号132)によって増幅した。FRA2フラグメントCは、FRA2フラグメントUの3'末端と相同性のある5'尾部を含んでいるプライマーoBP600(配列番号133)、およびプライマーoBP601(配列番号134)によって増幅した。PCR産物は、PCR Purificationキット(Qiagen)で精製した。FRA2フラグメントABは、FRA2フラグメントAとFRA2フラグメントBとを混合し、プライマーoBP594(配列番号127)およびoBP597(配列番号130)で増幅することにより、オーバーラップPCRで作成した。FRA2フラグメントUCは、FRA2フラグメントUとFRA2フラグメントCとを混合し、プライマーoBP598(配列番号131)およびoBP601(配列番号134)で増幅することにより、オーバーラップPCRによって作成した。得られたPCR産物は、アガロースゲルで精製し、その後、Gel Extractionキット(Qiagen)を使用した。FRA2 ABCカセットは、FRA2フラグメントABとFRA2フラグメントUCとを混合し、プライマーoBP594(配列番号127)お

30

40

50

よび oBP601 (配列番号 134) で増幅することにより、オーバーラップ PCR によって作成した。PCR 産物は、PCR Purification キット (Qiagen) で精製した。

【0236】

内在性 FRA2 コード領域を欠失させるため、上で得られた損傷のない欠失カセットを、標準的手法を用いて PNY2009 に入れて形質転換し、ウラシルを欠いている 1% エタノールで補われた完全合成培地で平板培養した。組み込まれたことを確かめるため、プライマー oBP602 (配列番号 135) および LA135 (配列番号 112) (5' 末端用)、およびプライマー oBP602 (配列番号 135) および oBP603 (配列番号 136) を用いて座全体を増幅して、PCR によってゲノム DNA を調製した。URA3 マーカーは、標準プロトコルにしたがって、30 において、1% エタノールおよび 5-FOA (5-フルオロオロチン酸) で補われた完全合成培地で平板培養して再利用した。マーカーの除去は、ウラシルを欠いている 1% エタノールで補われた完全合成培地に、5-FOA プレートからのコロニーを斑点状に付着させて成長がないことを確かめることにより確認した。得られた特定された菌株 (PNY2037) は次の遺伝子型を有している: MATa ura3 ::loxP-kanMX4-loxP his3 pdc1 ::loxP71/66 pdc5 ::loxP71/66 fra2 。

10

【0237】

2 ミクロンの天然プラスミドの追加

loxP71-URA3-loxP66 マーカーは、Phusion DNA ポリメラーゼ (New England Biolabs; Ipswich, MA) を用いて、pLA59 (配列番号 115) から PCR 増幅し、30 において SE-URA プレート上で、LA811x817 (配列番号 137、138) および LA812x818 (配列番号 139、140) の 2-ミクロンプラスミドフラグメント (CEN.PK113-7D) からの 2-ミクロンの天然プラスミドから増幅されたもの。Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre) と一緒に、菌株 PNY2037 に入れて形質転換した。得られた菌株 PNY2037 (2μ::loxP71-URA3-loxP66) は、pLA34 (pRS423::cre) (pLA34 と呼ばれる) (配列番号 121) で形質転換し、30 において SE-HIS-URA プレート上で選択した。形質転換体は、YP-1% ガラクトースプレート上に斑点状に付着させて、30 において 48 hrs 成長するようにさせて、Cre リコンビナーゼの発現を誘発させた。その後、個々のコロニーを SE-URA、SE-HIS、および YPE のプレート上に斑点状に付着させて、URA3 マーカーが除去されたことを確認した。得られた特定された菌株 (PNY2050) は次のような遺伝子型を有する: MATa ura3 ::loxP-kanMX4-loxP, his3 pdc1 ::loxP71/66 pdc5 ::loxP71/66 fra2 2 ミクロン。

20

30

【0238】

PNY2050 からの PNY2115 の作成

PNY2050 からの PNY2115 [MATa ura3 ::loxP his3 pdc5 ::loxP66/71 fra2 2-ミクロンプラスミド (CEN.PK2) pdc1 ::P[PDC1]-ALS|alsS__Bs-CYC1t-loxP71/66 pdc6 ::(UAS) PGK1-P[FBA1]-KIVD|Lg(y)-TDH3t-loxP71/66 adh1 ::P[ADH1]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66 fra2 ::P[ILV5]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66 gpd2 ::loxP71/66] の作成は以下の通りであった。

40

【0239】

Pdc1 ::P[PDC1]-ALS|alsS Bs-CYC1t-loxP71/66

50

内在性 P D C 1 プロモーターを用いて a l s S を P N Y 2 0 5 0 の p d c 1 : : l o x P 6 6 / 7 座に組み込むために、組み込みカセットを p L A 7 1 (配列番号 1 4 6) から P C R 増幅した。その p L A 7 1 は、F B A 1 プロモーターおよび C Y C 1 ターミナーを有する、バシラス・サチリス (B a c i l l u s s u b t i l i s) 種からのアセト乳酸合成酵素遺伝子、および (生体内での相同組換えおよびその後の U R A 3 マーカーの除去が行えるようにするための) 縮重した l o x P 部位が隣接している U R A 3 マーカーを含んでいた。K A P A H i F i およびプライマー 8 9 5 (配列番号 1 4 9) および 6 7 9 (配列番号 1 5 0) を用いて P C R を行った。各プライマーの P D C 1 部分は、コード配列の上流の 6 0 b p および停止コドンの上流にある 5 3 b p である 5 0 b p から得た。P C R 産物は、標準遺伝子操作を用いて P N Y 2 0 5 0 に入れて形質転換し、形質転換体は、3 0 において、ウラシルを欠いている 1 % エタノールで補われた完全合成培地で選択した。形質転換体は、正しく組み込まれたことを確かめるために、プライマー 6 8 1 (配列番号 1 5 1) (3 ' コード領域の外側にある) および 9 2 (配列番号 1 5 2) (U R A 3 遺伝子の内側にある) を用いてコロニー P C R によって選別した。その後、ポジティブ形質転換体をゲノム D N A のために準備し、プライマー N 2 4 5 (配列番号 1 5 3) および N 2 4 6 (配列番号 1 5 4) を用いて P C R によって選別した。U R A 3 マーカーは、G A L 1 プロモーターの制御を受ける C R E リコンビナーゼを含んでいる p L A 3 4 (配列番号 1 2 1) による形質転換により再利用し、3 0 において、ヒスチジンを欠いている 1 % エタノールで補われた完全合成培地で平板培養した。形質転換体を、1 % エタノールおよび 0 . 5 % ガラクトースで補われた富栄養培地で平板培養して、リコンビナーゼを誘発させた。マーカーの除去は、ウラシルを欠いている 1 % エタノールで補われた完全合成培地にコロニーを斑点状に付着させて、成長がないことを確かめることにより確認した。得られた特定された菌株 (P N Y 2 0 9 0 と呼ぶ) は、遺伝子型 M A T a u r a 3 : : l o x P , h i s 3 , p d c 1 : : l o x P 7 1 / 6 6 , p d c 5 : : l o x P 7 1 / 6 6 f r a 2 2 - ミクロン p d c 1 : : P [P D C 1] - A L S | a l s S _ B s - C Y C 1 t - l o x P 7 1 / 6 6 を有している。

【 0 2 4 0 】

P d c 6 : : (U A S) P G K 1 - P [F B A 1] - K I V D | L g (y) - T D H 3 t - l o x P 7 1 / 6 6

内在性 P D C 6 コード領域を欠失させるために、組み込みカセットを p L A 7 8 (配列番号 1 4 7) から P C R 増幅した。その p L A 7 8 は、ハイブリッド F B A 1 プロモーターおよび T D H 3 ターミナーを有する、リステリア・グレイ (L i s t e r i a g r a y i) 種からの k i v D 遺伝子、および (生体内での相同組換えおよびその後の U R A 3 マーカーの除去が行えるようにするための) 縮重した l o x P 部位が隣接した U R A 3 マーカーを含んでいた。K A P A H i F i およびプライマー 8 9 6 (配列番号 1 5 5) および 8 9 7 (配列番号 1 5 6) を用いて P C R を行った。各プライマーの P D C 6 部分は、コード配列の上流の 6 0 b p およびコード領域の下流の 5 9 b p から得た。P C R 産物は、標準遺伝子操作を用いて P N Y 2 0 9 0 に入れて形質転換し、形質転換体は、3 0 において、ウラシルを欠いている 1 % エタノールで補われた完全合成培地で選択した。形質転換体は、正しく組み込まれたことを確かめるために、プライマー 3 6 5 (配列番号 1 5 7) および 3 6 6 (配列番号 1 5 8) (これらは、P D C 6 遺伝子の内側にあるプライマーである) を用いてコロニー P C R によって選別した。その後、生成物の存在しない形質転換体を、N 6 3 8 (配列番号 1 5 9) (遺伝子の 5 ' 末端の外側にある) および 7 4 0 (配列番号 1 6 0) (F B A 1 プロモーターの内側にある) を用いて、コロニー P C R によって選別した。その後、ゲノム D N A のためにポジティブ形質転換体を準備し、P D C 6 コード配列の外側にある 2 つのプライマーで P C R により選別した。ポジティブ組込体 (i n t e g r a n t s) では、4 7 2 0 b p の生成物が生じるであろうが、P D C 6 野生型形質転換体では、2 1 3 0 b p の生成物が生じるであろう。U R A 3 マーカーは、G A L 1 プロモーターの制御を受ける C R E リコンビナーゼを含んでいる p L A 3 4 による形質転換によって再利用し、3 0 において、ヒスチジンを欠いている 1 % エタノ

ールで補われた完全合成培地で平板培養した。形質転換体を、1%エタノールおよび0.5%ガラクトースで補われた富栄養培地で平板培養し、リコンビナーゼを誘発させた。マーカの除去は、ウラシルを欠いている1%エタノールで補われた完全合成培地にコロニーを斑点状に付着させて、成長がないことを確かめることにより確認した。得られた特定された菌株はPNY2093と呼ばれ、遺伝子型MATa ura3⁻ :loxP his3⁻ pdc5⁻ :loxP71/66 fra2⁻ 2-ミクロンpdc1⁻ :P[PDC1]-ALS|alsS__Bs-CYC1t-loxP71/66 pdc6⁻ ::(UAS)PGK1-P[FBA1]-KIVD|Lg(y)-TDH3t-loxP71/66を有している。

【0241】

Adh1⁻ :P[ADH1]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66

内在性ADH1コード領域を欠失させ、内在性ADH1プロモーターを用いてBiADHを組み込むために、組み込みカセットをpLA65(配列番号148)からPCR増幅した。そのpLA65は、ILV5プロモーターおよびADH1ターミネーターを有する、ベイジェリンキ(Beijerinckii)種からのアルコールデヒドロゲナーゼ、および(生体内での相同組換えおよびその後のURA3マーカの除去が行えるようにするための)縮重したloxP部位が隣接したURA3マーカを含んでいた。KAPA HiFiおよびプライマー856(配列番号161)および857(配列番号162)を用いてPCRを行った。各プライマーのADH1部分は、ADH1開始コドンの上流にある5'領域の50bpおよびコード領域の最後の50bpから得た。PCR産物は、標準遺伝子操作を用いてPNY2093に入れて形質転換し、形質転換体は、30において、ウラシルを欠いている1%エタノールで補われた完全合成培地で選択した。形質転換体は、正しく組み込まれたことを確かめるために、プライマーBK415(配列番号163)(5'コード領域の外側にある)およびN1092(配列番号164)(BiADH遺伝子の内側にある)を用いてコロニーPCRによって選別した。その後、ポジティブ形質転換体は、プライマー413(配列番号169)(3'コード領域の外側にある)および92(配列番号152)(URA3マーカの内側にある)を用いてコロニーPCRによって選別した。URA3マーカは、GAL1プロモーターの制御を受けるCREリコンビナーゼを含んでいるpLA34(配列番号121)による形質転換によって再利用し、30において、ヒスチジンを欠いている1%エタノールで補われた完全合成培地で平板培養した。形質転換体を、1%エタノールおよび0.5%ガラクトースで補われた富栄養培地で平板培養し、リコンビナーゼを誘発させた。マーカの除去は、ウラシルを欠いている1%エタノールで補われた完全合成培地にコロニーを斑点状に付着させて、成長がないことを確かめることにより確認した。得られた特定された菌株(PNY2101と呼ばる)は、遺伝子型MATa ura3⁻ :loxP his3⁻ pdc5⁻ :loxP71/66 fra2⁻ 2-ミクロンpdc1⁻ :P[PDC1]-ALS|alsS__Bs-CYC1t-loxP71/66 pdc6⁻ ::(UAS)PGK1-P[FBA1]-KIVD|Lg(y)-TDH3t-loxP71/66 adh1⁻ :P[ADH1]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66を有している。

【0242】

Fra2⁻ :P[ILV5]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP71/66

BiADHをPNY2101のfra2⁻座に組み込むために、組み込みカセットをpLA65(配列番号148)からPCR増幅した。そのpLA65は、ILV5プロモーターおよびADH1ターミネーターを有する、ベイジェリンキ・インディカ(Beijerinckii indica)種からのアルコールデヒドロゲナーゼ、および(生体内での相同組換えおよびその後のURA3マーカの除去を行えるようにするための)縮重したloxP部位が隣接したURA3マーカを含んでいた。KAPA HiFiおよびプライマー906(配列番号165)および907(配列番号166)を用いてPCRを行った。各プライマーのFRA2部分は、ATGから始まるコード配列の最初の60bpおよび停止コドンの下流の56bpから得た。PCR産物は、標準遺伝子操作を用いてP

10

20

30

40

50

NY 2 1 0 1に入れて形質転換し、形質転換体は、30 において、ウラシルを欠いている1%エタノールで補われた完全合成培地で選択した。形質転換体は、正しく組み込まれたことを確かめるために、プライマー667(配列番号167)(5'コード領域の外側にある)および749(配列番号168)(ILV5プロモーターの内側にある)を用いてコロニーPCRによって選別した。URA3マーカーは、GAL1プロモーターの制御を受けるCREリコンビナーゼを含んでいるpLA34(配列番号121)による形質転換によって再利用し、30 において、ヒスチジンを欠いている1%エタノールで補われた完全合成培地で平板培養した。形質転換体を、1%エタノールおよび0.5%ガラクトースで補われた富栄養培地で平板培養して、リコンビナーゼを誘発させた。マーカーの除去は、ウラシルを欠いている1%エタノールで補われた完全合成培地にコロニーを斑点状に付着させて、成長がないことを確かめることにより確認した。得られた特定された菌株(PNY 2 1 1 0と呼ぶ)は、遺伝子型MATa ura3 ::loxP his3 pdc5 ::loxP 66/71 2-ミクロンpdc1 ::P[PDC1]-ALS|alsS__Bs-CYC1t-loxP 71/66 pdc6 ::(UAS)PGK1-P[FBA1]-KIVD|Lg(y)-TDH3t-loxP 71/66 adh1 ::P[ADH1]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP 71/66 fra2 ::P[ILV5]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP 71/66を有している。

【0243】

GPD2の欠失

内在性GPD2コード領域を欠失させるため、欠失カセットをpLA59(配列番号115)からPCR増幅した。そのpLA59は、生体内での相同組換えおよびその後のURA3マーカーの除去を行えるようにする、縮重loxP部位が隣接したURA3マーカーを含んでいた。KAPA HiFiおよびプライマーLA512(配列番号141)およびLA513(配列番号142)を用いてPCRを行った。URA3カセットの組み込みによってGPD2コード領域全体が置換されるように、各プライマーのGPD2部分は、GPD2開始コドンの上流にある5'領域の50bpおよび停止コドンの下流にある3'領域の50bpから得た。PCR産物は、標準遺伝子操作を用いてPNY 2 1 1 0に入れて形質転換し、形質転換体は、30 において、ウラシルを欠いている1%エタノールで補われた完全合成培地で選択した。形質転換体は、正しく組み込まれたことを確かめるために、プライマーLA516(配列番号143)(5'コード領域の外側にある)およびLA135(配列番号112)(URA3の内側にある)を用いてコロニーPCRによって選別した。その後、ポジティブ形質転換体を、プライマーLA514(配列番号144)およびLA515(配列番号145)(GPD2コード領域の内側にあるもの)を用いて、コロニーPCRによって選別した。URA3マーカーは、GAL1プロモーターの制御を受けるCREリコンビナーゼを含んでいるpLA34(配列番号121)による形質転換によって再利用し、30 において、ヒスチジンを欠いている1%エタノールで補われた完全合成培地で平板培養した。形質転換体を、1%エタノールおよび0.5%ガラクトースで補われた富栄養培地で平板培養して、リコンビナーゼを誘発させた。マーカーの除去は、ウラシルを欠いている1%エタノールで補われた完全合成培地にコロニーを斑点状に付着させて、成長がないことを確かめることにより確認した。得られた特定された菌株(PNY 2 1 1 5と呼ぶ)は、遺伝子型MATa ura3 ::loxP his3 pdc5 ::loxP 66/71 fra2 2-ミクロンpdc1 ::P[PDC1]-ALS|alsS__Bs-CYC1t-loxP 71/66 pdc6 ::(UAS)PGK1-P[FBA1]-KIVD|Lg(y)-TDH3t-loxP 71/66 adh1 ::P[ADH1]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP 71/66 fra2 ::P[ILV5]-ADH|Bi(y)-ADHt-loxP 71/66 gpd2 ::loxP 71/66を有している。

【0244】

PNY 2 1 1 5からのPNY 2 1 4 5の作成

10

20

30

40

50

p d c 5 座にホスホケトラゼ遺伝子カセットを更に組み込み、かつ天然 A M N 1 遺伝子を、C E N . P K からの相同分子種をコドン最適化型 (c o d o n o p t i m i z e d v e r s i o n) と置換することにより、P N Y 2 1 4 5 を P N Y 2 1 1 5 から作成した。組み込み作成物について以下にさらに説明する。

【 0 2 4 5 】

p d c 5 : : F B A (L 8) - x p k 1 - C Y C 1 t - l o x P 7 1 / 6 6

p R S 4 2 3 : : T E F (M 4) - x p k 1 + E N O 1 - e u t D からの T E F (M 4) - x p k 1 - C Y C 1 t 遺伝子 (配列番号 1 7 0) を、プライマー N 1 3 4 1 および N 1 3 3 8 (配列番号 1 7 1 および 1 7 2) を用いて P C R 増幅して、3 . 1 k b の生成物を生じさせた。p L A 5 9 (配列番号 1 1 5) からの l o x P 隣接 U R A 3 遺伝子カセットを、プライマー N 1 0 3 3 c および N 1 3 4 2 (配列番号 1 7 3 および 1 7 4) を用いて増幅して、1 . 6 k b の生成物を生じさせた。x p k 1 および U R A 3 の P C R 産物は、P C R の更なる 1 0 サイクルのために、プライマーなしで、P h u s i o n D N A ポリメラーゼを用いてそれらを結合させることにより融合させた。その後、得られた反応混合物を、K A P A H i F i およびプライマー N 1 3 4 2 および N 1 3 6 4 (配列番号 1 7 4 および 1 7 5) を用いた P C R 反応のテンプレートとして使用した。電気泳動アガロースゲル (Z y m o キット) による精製によって、4 . 2 k b の P C R 産物を回収した。プライマー N 1 3 6 6 および N 1 3 6 8 (配列番号 1 7 7 および 1 7 8) を用いて、F B A プロモーター変種 L 8 (配列番号 1 7 6) を増幅した。P C R をさらに繰り返して、x p k 1 : : U R A 3 の P C R 産物を F B A プロモーターと結合させた。得られた生成物をポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、E c o R V で消化し子ウシの腸のフォスファターゼで処理した p B R 3 2 2 に連結した。連結反応物 (l i g a t i o n r e a c t i o n) を大腸菌 (E . c o l i) 細胞 (インピトロゲンからの S t b 1 3 コンピテント細胞) に入れて形質転換した。組み込みカセットは、シークエンシングによって確認した。組み込み用 D N A を調製するために、プラスミドは、K a p a H i F i およびプライマー N 1 3 7 1 および N 1 3 7 2 (配列番号 1 7 9 および 1 8 0) による P C R 反応においてテンプレートとして使用した。P C R 産物は、フェノール - クロロホルム抽出およびエタノール沈殿 (標準法を使用。例えば、M a n i a t a s , e t a l .) によって分離した。5 マイクログラムの D N A を用いて、菌株 P N Y 2 1 1 5 を形質転換した。ウラシルを欠いている培地 (ウラシルのない、炭素源として 1 % エタノールを含む完全合成培地) で形質転換体を選択した。組み込みのために、プライマー B K 9 3 および N 1 1 1 4 (配列番号 1 8 1 および 1 8 2) による P C R (J u m p S t a r t) を用いて、コロニーを選別した。2 種類のクローンを選択して進めた。U R A 3 マーカーは、G A L 1 プロモーターの制御を受ける C R E リコンビナーゼを含んでいる p J T 2 5 4 (配列番号 1 8 3) による形質転換によって再利用し、3 0 において、ヒスチジンの欠けている 1 % エタノールで補われた完全合成培地で平板培養した。形質転換体を、1 % エタノールで補われた富栄養培地で成長させて、リコンビナーゼを抑制解除した。マーカーの除去は、単一のコロニー分離物に関して、ウラシルを欠いている 1 % エタノールで補われた完全合成培地に斑点状に付着させて、成長がないことを確かめることにより確認した。リコンビナーゼプラスミド (p J T 2 5 4) の消失は、ヒスチジンを欠けている 1 % エタノールで補われた完全合成培地にコロニーを斑点状に付着させて確認した。マーカーが適切に除去されたことは、P C R (プライマー N 1 6 0 S e q F 5 (配列番号 1 8 4) および B K 3 8 0) によって確認した。得られた 1 つのクローンを P N Y 2 2 9 3 と命名した。

【 0 2 4 6 】

a m n 1 : : A M N 1 (y) - l o x P 7 1 / 6 6

内在性 A M N 1 のコピーを C E N . P K 2 からの A M N 1 遺伝子のコドン最適化型と置き換えるために、C E N . P K A M N 1 プロモーター、A M N 1 (y) 遺伝子 (核酸配列番号 1 8 5 ; アミノ酸配列番号 1 8 6) 、および C E N . P K A M N 1 ターミネーターを含んでいる組み込みカセットを、S O E P C R で組み立て、シャトルベクター p L A 5 9 内にサブクローン化した。S . セレビシエ (S . c e r e v i s i a e) 用にコード

10

20

30

40

50

ン最適化された AMN1 (y) 遺伝子を DNA2.0 に注文した。完成された pLA67 プラスミド (配列番号 187) は、以下のものを含んでいた: 1) 大腸菌 (E. coli) 複製オリジンとアンピシリン耐性遺伝子とを含む pUC19 ベクター骨格配列 (backbone sequence); 2) loxP71 および loxP66 部位が隣接した URA3 選択マーカー; および 3) P_{AMN1 (CEN. PK)} - AMN1 (y) - term_{AMN1 (CEN. PK)} 発現カセット。AMN1 (y) - loxP71 - URA3 - loxP66 カセットの PCR 増幅は、KAPA HiFi (Kapa Biosystems, Woburn, MA からのもの) およびプライマー LA712 (配列番号 188) および LA746 (配列番号 189) を用いて行った。PCR 産物は、標準遺伝子操作を用いて PNY2293 に入れて形質転換し、形質転換体は、30 において、ウラシルを欠いている 1% エタノールで補われた完全合成培地で選択した。対照 (PNY2293) に関連してクランピング (clumping) 表現型がないかどうかを、形質転換体を拡大して観察した。上述したように、pJT254 Cre リコンビナーゼプラスミドを用いて URA3 マーカーを再利用した。マーカー再利用後に、クランピング表現型がないことを確認するために、再びクローンを拡大して観察した。得られた特定された菌株 (PNY2145) は、次の遺伝子型を有している: MATa ura3 :: loxP his3 pdc5 :: P [FBA (L8)] - XPK | xpk1 __ Lp - CYCt - loxP66 / 71 fra2 2 - ミクロンプラスミド (CEN. PK2) pdc1 :: P [PDC1] - ALS | alsS __ Bs - CYC1t - loxP71 / 66 pdc6 :: (UAS) PGK1 - P [FBA1] - KIVD | Lg (y) - TDH3t - loxP71 / 66 adh1 :: P [ADH1] - ADH | Bi (y) - ADHt - loxP71 / 66 fra2 :: P [ILV5] - ADH | Bi (y) - ADHt - loxP71 / 66 gpd2 :: loxP71 / 66 amn1 :: AMN1 (y)。

【0247】

PNY2145 からの PNY2310 の作成

プラスミド pLH804 - L2V4 および pRS413 :: BiADH - kivD で菌株 PNY2145 を形質転換することにより、PNY2310 を作り出した。プラスミド pLH804 - L2V4 (配列番号 12) は、pHR81 (ATCC 番号 87541) に基づいた酵母菌 - 大腸菌 (E. coli) シャトルベクターである。これは、KARI 変異種 K9JB4P および DHAD 変異種 L2V4 を発現するための遺伝子を含んでいる。プラスミド pRS413 :: BiADH - kivD (配列番号 13) は、pRS413 (ATCC 番号 87518) に基づいた酵母菌 - 大腸菌 (E. coli) シャトルベクターである。これは、BiADH および kivD を発現するための遺伝子を含んでいる。両方のプラスミドにおける関連した遺伝子特徴 (gene features) の位置を表 3 および 4 にリストしてある。炭素源として 1% (v/v) エタノールを含みウラシルおよびヒスチジンを欠いている完全合成培地で平板培養することにより、プラスミド形質転換体を選択した。コロニーは、斑点状に付着させて、新鮮なプレートに移した。2 日後に、斑点からの細胞を、炭素源として 2% (w/v) グルコースを有する (ウラシルおよびヒスチジンのない) 完全合成培地を含んだプレートに移した。得られた菌株を PNY2310 と名付けた。

【0248】

【表 6】

表 3:プラスミド pLH804-L2V4 における経路遺伝子特徴のヌクレオチド位置

要素	記述	開始	終了	ストランド
プロモーター	ILV5p	427	1620	T
CDS	JB4P	1628	2659	T
ターミネーター	ILV5t	2685	3307	T
ターミネーター	FBA1t	3320	3632	B
CDS	ILVD-L2V4	3641	5356	B
プロモーター	TEF1(M7)p	5366	5766	B

10

【 0 2 4 9 】

【表 7】

表 4:プラスミド pRS413::BiADH-kivD における経路遺伝子特徴のヌクレオチド位置

要素	記述	開始	終了	ストランド
プロモーター	FBA1p	2293	2893	T
CDS	kivD_Lg(y)	2902	4548	T
ターミネーター	TDH3t	4560	5139	T
プロモーター	PDC1p	5983	6852	T
CDS	adhBiy	6853	7896	T
ターミネーター	ADH1t	7905	8220	T

20

【 0 2 5 0 】

PNY2145からのCPN97の作成

サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の内在性 GPD1 を、大腸菌 (*E. coli*) gpsA と置き換えるために、大腸菌 (*E. coli*) gpsA のオープンリーディングフレームを増幅して、ATG 開始コドンの上流にある領域および内在性サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) GPD1 停止コドン維持する染色体位置を、内在性 GPD1 に挿入するように、プライマーを設計した。オーバーラップ PCR を使用して、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) GPD1 の上流にある組換え用の 50 個の塩基対、大腸菌 (*E. coli*) gpsA 遺伝子、loxP-URA3-loxP カセット、および PNY2145 のサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) GPD1 の下流にある組換え用 50 個の塩基対を含んでいる PCR 産物を得た。テンプレートとして大腸菌 (*E. coli*) BL21 染色体 DNA を利用して、プライマー F1 (配列番号 234) および R1 (配列番号 235) で大腸菌 (*E. coli*) gpsA ORF (PCR 産物 1) を増幅した。テンプレートとして pLA59 (配列番号 27) を利用して、プライマー F2 (配列番号 236) および R2 (配列番号 237) を用いて、loxP-URA3-loxP カセット (PCR 産物 2) を増幅した。テンプレートとしての PCR 産物 1 および 2 およびプライマー F1 (配列番号 234) および R2 (配列番号 237) を利用して、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) GPD1 の上流にある 50 個の塩基対、大腸菌 (*E. coli*) gpsA 遺伝子、loxP-URA3-loxP カセットおよびサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) GPD1 の下流にある 50 個の塩基対を含む PCR 産物 (PCR 産物 3) を増幅した。PCR 反応はすべて、製造業者の条件にしたがって酵素 Herculase (Agilent; Santa Clara, CA) を用いて行われた。

30

40

【 0 2 5 1 】

50

PCR産物3は、精製によって回収し、酵母菌形質転換キット(Sigma-Aldrich; St. Louis, MO)を用いてPNY2145に入れて形質転換した。1%エタノールを含んでいるがウラシルを含んでいない酵母菌合成培地で、コロニーを選択した。酵母菌合成培地: 6.7 g/Lの酵母菌窒素塩基(アミノ酸を含まない)(Becton Dickinson; East Rutherford, NJ)、1.85 g/LのKaiserのドロップアウトHis-Ura(Formedium; Norfolk, UK)。必要とされた場合、ヒスチジンまたはウラシルを76 mg/Lだけ加えた。

【0252】

URA3マーカーを再利用するために、1つのコロニーを選択し、GAL1プロモーターの制御を受けるCREリコンビナーゼを含んでいるプラスミドpJT254(配列番号183)で形質転換し、さらに1%エタノールを含みヒスチジンを含まない酵母菌合成培地で平板培養した。1つのコロニーを選択し、YPE培地(20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、10 g/Lエタノール)で一晩成長させ、YPEプレート(20 g/Lペプトン、10 g/L酵母エキス、10 g/Lエタノール、15 g/L寒天)上で再び画線培養した。コロニーを選択し、酵母菌合成培地のプレート(1%エタノールを含みウラシルを含まないもの、1%エタノールを含みヒスチジンを含まないもの)およびYPEプレートに、斑点状に付着させた。ウラシルおよびヒスチジンを欠いているプレートでは成長できないコロニーを選択し、マーカーの除去および大腸菌(E. coli) g p s Aの挿入のためにPCRで選別した。そのコロニーをCPN82と名付けた。

10

【0253】

イソブタノール産生経路を有する菌株を作るために、上述のようにして、CPN82を、pLH804::L2V4(配列番号12)およびpRS413::BiADH-ki v D(配列番号13)で形質転換した。ウラシルおよびヒスチジンを欠いている1%エタノールを含んだ酵母菌合成培地で形質転換体(transformation)を平板培養し、3つのコロニーを選び、ヒスチジンおよびウラシルを欠いている3 g/Lグルコースおよび3 g/Lエタノールを含んだ酵母菌合成培地上で再び画線培養した。イソブタノール産生されるかどうかについてコロニーを試験し、1つのコロニーを選んでCPN97と名付けた。

20

【0254】

PNY2145からの酵母菌コドン最適化GPD1のM、M3、およびM8変種菌株の作成

30

酵母菌コドン最適化GPD1変種の組み込み

宿主サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)菌株のGPD1変異体を試験するために、S.セレビシエ(S. cerevisiae)コドン使用頻度を用いて、天然GPD1をDNA 2.0によって合成されたGPD1のコドン最適化型と交換した。

【0255】

組み込みカセットの調製

プロモーターおよびターミネーターを伴うURA3マーカー遺伝子と、URA3マーカー遺伝子の下流のクローン化GPD下流相同性領域とを含んでいるベクターpBP3518(配列番号9)内に、2つのフラグメント(上流GPD1上流相同性領域およびコドン最適化酵母菌GPD1フラグメント)をクローン化することにより、遺伝子交換カセット(gene swap cassette)を調製した。

40

【0256】

Phusion High Fidelity PCR Master Mix(New England Biolabs Inc.; Ipswich, MA)、プライマーoBP1329(配列番号1)およびoBP1333(配列番号2)および(Yeastar TM Genomic DNAキット(Zymo Research))を用いて調製されたテンプレートとしてのPNY2145ゲノムDNAを用いて、組み込みカセット用のフラグメント1を増幅した。プライマーoBP1334(配列番号3)およびoB

50

P 1 3 3 5 (配列番号 4) および (テンプレートとしての) 合成コドン最適化酵母菌 G P D 1 または適切な G P D 1 変種を用いて、フラグメント 2 を増幅した。プライマー o B P 1 3 3 3 (配列番号 2) は、フラグメント 2 (合成コドン最適化 G P D 1) の 5' 領域と相溶性のある 5' 尾部を有しており、プライマー o B P 1 3 3 4 (配列番号 3) は、フラグメント 1 (G P D 上流領域) の 3' 末端と相溶性のある 5' 尾部を有している。プライマー o B P 1 3 2 9 (配列番号 1) および o B P 1 3 3 5 (配列番号 4) を用いたオーバーラップ PCR によって、2 つのフラグメントを結合させた。この結合フラグメントは、ベクター p B P 3 5 1 8 (配列番号 9) 内の A s c I および P m e I 部位にクローン化し、得られたベクター (p B P 3 5 1 8 G P D* で表す) (配列番号 10) を、A g i l e n t X L 1 B l u e コンピテント細胞 (A g i l e n t T e c h n o l o g i e s , U S A) に入れて形質転換した。

10

【0257】

PNY 2 1 4 5 での組み込みカセットの形質転換

プラスミド o B P 3 5 1 8 G P D* (配列番号 10) は、Q I A p r e p S p i n ニプレッ Kit (Q i a g e n , G m b H) を用いて分離し、S a c I および P a c I 制限酵素 (N e w E n g l a n d B i o l a b s I n c . I p s w i c h , M A) を用いて制限した。得られた 4.2 kb のフラグメント (組み込みカセット全体、G P D 上流相溶性領域、コドン最適化 G P D (C o d o n O p t G P D)、U R A 3 マーカー遺伝子および下流 G P D 領域を含んでいる) を、F r o z e n E Z Y e a s t T r a n s f o r m a t i o n I I K i t (Z y m o R e s e a r c h) を用いて、PNY 2 1 4 5 に入れて形質転換した。形質転換混合物を、30 において、ウラシルを欠いている 0.5% エタノールを含んでいる完全合成で 48 時間平板培養した。組み込み部位を確認するため、2 組のプライマー o B P 1 3 4 2 (配列番号 6) および o B P 1 3 4 4 (配列番号 7) および o B P 1 3 4 1 (配列番号 5) および o B P 1 3 4 5 (配列番号 8) (両端での組み込みを確認するため) を用いて、形質転換体を選別した。プライマー o B P 1 3 4 2 (配列番号 6) および o B P 1 3 4 5 (配列番号 8) は、右側の組み込みを確認するため、カセットの外側の領域から設計した。

20

【0258】

U R A 3 マーカーの除去

確認された形質転換体 (菌株 PNY 2 1 4 5 G P D 1 : : C O G P D 1 U R A 3) は、F r o z e n - E Z Y e a s t T r a n s f o r m a t i o n I I (商標) キット (Z y m o R e s e a r c h C o r p o r a t i o n , I r v i n e , C A) を用いて、p R S 4 2 3 : : P_{G A L 1}-c r e で形質転換し、ヒスチジンおよびウラシルを欠いている 0.5% エタノールで補われた完全合成培地に蒔き、30 で 48 時間培養した。形質転換体は、ヒスチジンを欠いている 0.5% エタノールを含んだ完全合成培地で一晩成長させ、マーカーのために、0.5% エタノールおよび 0.1% 5 F O A を含んでいる完全合成培地で平板培養した。マーカーの除去は、プライマー o B P 1 3 4 1 (配列番号 5) および o B P 1 3 4 5 (配列番号 8) を用いて、コロニー PCR によって確認した。

30

【0259】

経路プラスミドの形質転換

その後、菌株 PNY 2 1 4 5 G P D 1 : : C O G P D 1 は、F r o z e n - E Z Y e a s t T r a n s f o r m a t i o n I I (商標) キット (Z y m o R e s e a r c h C o r p o r a t i o n , I r v i n e , C A) を用いて、プラスミド p L M H 1 1 - J M 4 4 (配列番号 240) で形質転換し、ウラシルを含まない 0.5% エタノールを有する完全合成培地で平板培養した。得られた菌株は、M、M 3 (F 7 3 A)、および M 8 (F 7 3 G / F 1 2 9 G) と名付けた。

40

【0260】

PNY 2 1 4 5 からの大腸菌 (E . c o l i) のコドン最適化酵母菌 G P D 1 の E C 1、E 3、および E 8 菌株の作成

50

大腸菌 (*E. coli*) 用に最適化された酵母菌 GPD1 コドンの組み込み

宿主サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株の GPD1 変異体を試験するために、天然 GPD1 を、大腸菌 (*E. coli*) コドン使用頻度を用いて DNA 2.0 によって合成された GPD1 の大腸菌 (*E. coli*) コドン最適化型と交換した。

【0261】

組み込みカセットの調製

プロモーターおよびターミネーターを伴う URA3 マーカー遺伝子と、URA3 マーカー遺伝子の下流のクローン化 GPD 下流相同性領域とを含んでいるベクター pBP3518 (配列番号 9) 内に、2つのフラグメント (上流 GPD1 上流相同性領域およびコドン最適化酵母菌 GPD1 フラグメント) をクローン化することにより、遺伝子交換カセットを調製した。

【0262】

Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs Inc.; Ipswich, MA)、プライマー oBP1329 (配列番号 1) および oBP1350 (配列番号 241) および (Yeastar™ Genomic DNA キット (Zymo Research) を用いて作成されたテンプレートとしての) PNY2145 ゲノム DNA を用いて、組み込みカセット用のフラグメント 1 を増幅した。プライマー oBP1351 (配列番号 242) および oBP1352 (配列番号 243) および大腸菌 (*E. coli*) の合成コドン酵母菌最適化 GPD1 遺伝子および (テンプレートとしての) E3 および E8 変種を用いて、フラグメント 2 を増幅した。プライマー oBP1350 (配列番号 241) は、フラグメント 2 (合成コドン最適化 GPD1) の 5' 領域と相同性のある 5' 尾部を有しており、プライマー oBP1351 (配列番号 242) は、フラグメント 1 (GPD 上流領域) の 3' 末端と相同性のある 5' 尾部を有している。プライマー oBP1329 (配列番号 1) および oBP1352 (配列番号 243) を用いたオーバーラップ PCR によって、2つのフラグメントを結合させた。この結合フラグメントは、ベクター pBP3518 (配列番号 9) の AscI および PmeI 部位においてクローン化し、得られたベクター (pBP3518 GPD1__EcOpt で表す) (配列番号 249) を、Agilent XL 1 Blue コンピテント細胞 (Agilent Technologies, USA) に入れて形質転換した。

【0263】

PNY2145 における組み込みカセットの形質転換

プラスミド pBP3518 GPD1__EcOpt (配列番号 249) は、QIAprep Spin ミニプレップ Kit (Qiagen, GmbH) を用いて分離し、SacI および PacI 制限酵素 (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) を用いて制限した。得られた 4.2 kb のフラグメント (組み込みカセット全体、GPD 上流相同性領域、大腸菌 (*E. coli*) コドン最適化 GPD1、URA3 マーカー遺伝子および下流 GPD 領域を含んでいる) を、Frozen EZ Yeast Transformation II Kit (Zymo Research) を用いて、PNY2145 に入れて形質転換した。形質転換混合物を、30 において、ウラシルを欠いている 0.5% エタノールを含んだ完全合成培地で 48 時間平板培養した。組み込み部位を確認するため、2組のプライマー oBP1342 (配列番号 6) および oBP1352 (配列番号 243) および oBP1357 (配列番号 248) および oBP1345 (配列番号 8) (両端での組み込みを確認するため) を用いて、形質転換体を選別した。プライマー oBP1342 (配列番号 6) および oBP1345 (配列番号 8) は、右側の組み込みを確認するため、カセットの外側の領域から設計した。

【0264】

URA3 マーカーの除去

確認された形質転換体 (菌株 PNY2145 GPD1 : : EC CO GPD1

URA3)は、Frozen-EZ Yeast Transformation II (商標)キット(Zymo Research Corporation, Irvine, CA)を用いてpRS423::PGAL1-creで形質転換し、ヒスチジンおよびウラシルを欠いている0.5%エタノールで補われた完全合成培地に蒔き、30で48時間培養した。形質転換体は、ヒスチジンを欠いている0.5%エタノールを含んだ完全合成培地で一晚成長させ、URA3マーカーのために、0.5%エタノールおよび0.1%5FOAを含んでいる完全合成培地で平板培養した。マーカーの除去は、プライマーoBP1357(配列番号248)およびoBP1345(配列番号8)を用いて、コロニーPCRによって確認した。

【0265】

経路プラスミドの形質転換

その後、菌株PNY2145GPD1::EC CO GPD1は、Frozen-EZ Yeast Transformation II(商標)キット(Zymo Research Corporation, Irvine, CA)を用いて、プラスミドpLMH11-JM44(配列番号240)で形質転換し、ウラシルを含まない0.5%エタノールを有する完全合成培地で平板培養した。得られた菌株は、EC1、E3(F73A)、およびE8(F73G/F129G)と名付けた。

【0266】

PNY2145からの天然酵母菌GPD1のN、N3、およびN8菌株の作成

酵母菌天然GPD1変種の組み込み

宿主サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)の酵母菌天然GPD1変異体を試験するために、酵母菌コドン最適化GPD1を、菌株PNY2145 GPD1::CO GPD1の酵母菌天然型GPD1と交換した。

【0267】

組み込みカセットの調製

プロモーターおよびターミネーターを伴うURA3マーカー遺伝子と、URA3マーカー遺伝子の下流のクローン化GPD下流相同性領域とを含んでいるベクターpBP3518(配列番号9)内に、2つのフラグメント(上流GPD1上流相同性領域および酵母菌天然GPD1フラグメント)をクローン化することにより、遺伝子交換カセットを調製した。

【0268】

Phusion High Fidelity PCR Master Mix(New England Biolabs Inc.; Ipswich, MA)、プライマーoBP1329(配列番号1)およびoBP1353(配列番号244)および(Yeastar™ Genomic DNAキット(Zymo Research))を用いて調製されたテンプレートとしてのPNY2145ゲノムDNAを用いて、組み込みカセット用のフラグメント1を増幅した。プライマーoBP1354(配列番号245)およびoBP1355(配列番号246)およびPNY2145ゲノムDNAおよび(テンプレートとしての)適切な変種を用いて、フラグメント2を増幅した。プライマーoBP1353(配列番号244)は、フラグメント2(酵母菌天然GPD1)の5'領域と相同性のある5'尾部を有しており、プライマーoBP1354(配列番号245)は、フラグメント1(GPD上流領域)の3'末端と相同性のある5'尾部を有している。プライマーoBP1329(配列番号1)およびoBP1355(配列番号246)を用いたオーバーラップPCRによって、2つのフラグメントを結合させた。この結合フラグメントは、ベクターpBP3518(配列番号9)のAscIおよびPmeI部位にクローン化し、得られたベクター(pBP3518GPD1__Nativeで表す)(配列番号250)を、Agilent XL1Blueコンピテント細胞(Agilent Technologies, USA)に入れて形質転換した。

【0269】

PNY 2145での組み込みカセットの形質転換

プラスミドpBP3518GPD1__Native(配列番号250)は、QIAprep SpinミニプレップKit(Qiagen, GmbH)を用いて分離し、SacIおよびPacI制限酵素(New England Biolabs Inc., Ipswich, MA)を用いて制限した。得られた4.2 kbのフラグメント(組み込みカセット全体、GPD上流相同性領域、酵母菌天然GPD1、URA3マーカー遺伝子および下流GPD領域を含んでいる)を、Frozen EZ Yeast Transformation II Kit(Zymo Research)を用いて、PNY 2145 GPD1::CO GPD1に入れて形質転換した。形質転換混合物を、30において、ウラシルを欠いている0.5%エタノールを含んだ完全合成培地で48時間平板培養した。組み込み部位を確認するため、2組のプライマーoBP1342(配列番号6)およびoBP1355(配列番号246)、ならびにoBP1356(配列番号247)およびoBP1345(配列番号8)(両端での組み込みを確認するため)を用いて、形質転換体を選別した。

10

【0270】

URA3マーカーの除去

確認された形質転換体(菌株PNY 2145 CO GPD1::Native GPD1 URA3)は、Frozen-EZ Yeast Transformation II(商標)キット(Zymo Research Corporation, Irvine, CA)を用いてpRS423::PGAL1-creで形質転換し、ヒスチジンおよびウラシルを欠いている0.5%エタノールで補われた完全合成培地に蒔き、30で48時間培養した。形質転換体は、ヒスチジンを欠いている0.5%エタノールを含んだ完全合成培地で一晚成長させ、URA3マーカーのために、0.5%エタノールおよび0.1%5FOAを含んでいる完全合成培地で平板培養した。マーカーの除去は、プライマーoBP1356(配列番号247)およびoBP1345(配列番号8)を用いて、コロニーPCRによって確認した。

20

【0271】

経路プラスミドの形質転換

その後、菌株PNY 2145 CO GPD1::Native GPD1は、Frozen-EZ Yeast Transformation II(商標)キット(Zymo Research Corporation, Irvine, CA)を用いて、プラスミドpLMH11-JM44(配列番号240)で形質転換し、ウラシルを含まない0.5%エタノールを有する完全合成培地で平板培養した。得られた菌株は、N、N3(F73A)、およびN8(F73G/F129G)と名付けた。

30

【0272】

GPD1変種の組み込み

各GPD1変種についてフラグメント2の増幅に用いたテンプレートが、表5にリストした変異を含む対応コード配列であること以外は、コドン最適化GPD1交換について上述したのと同じ方法でGPD1変種用の組み込みカセットを調製した。

【0273】

40

【表 8】

表 5:対応する変異を有する GPD 変種

GPD 変種	変異	菌株
GPD2	F129G	
GPD3	F73A	E3, M3, N3
GPD4	F73G	
GPD7	F73A129G	
GPD8	F73G129G	E8, M8, N8

E3 および E8 は、大腸菌(*E.coli*)コドン最適化を使用した GPD1 の変種であり、M3 および M8 は、*S.セレビシエ*(*S.cerevisiae*)コドン最適化を使用した変種 GPD1 であり、N3 および N8 は、*S.セレビシエ*(*S.cerevisiae*)コドン使用頻度を有する変種 GPD1 である。

10

【0274】

異種性 GPD の組み込み

異種性 GPD 用の組み込みカセットは、組み込みカセットが適切に組み立てられるように挿入される異種性 GPD1 に基づいて、当業者がプライマーを再設計するであろうこと以外は、コドン最適化 GPD1 に関して上で述べたのと同じようにして調製できる。

【0275】

実施例 1：変種 GPD1 酵素

この実施例では、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) GPD1 の変種型 (variant versions) を作成し、大腸菌 (*E. coli*) での発現によって試験し、その後、未精製細胞抽出物で酵素分析を行った。

20

【0276】

GPD1 突然変異誘発

酵素の他の速度論的パラメーターに影響を与えることなく、NADH の場合の K_M を増大させたいという願いから、酵母菌 GPD1 の突然変異誘発を行わせることになった。突然変異誘発に対する取り組みは、ヒト GPD1 の高解像度の結晶構造に基づくものであり (Ouet al, 2005, J. Mol. Biol. 357: 858 - 869)、それによると、補助因子結合ポケット中の NAD の一定距離内のアミノ酸を決定できる。アミノ酸残基と実際の接触のタイプとを分析することにより、アミノ酸変更の数を制限して、NADH の場合の K_M 値を増大させることが可能となった。表 6 は、この分析の結果を示している。その中で、結合 NAD の 5 オングストローム以内のアミノ酸残基が数えられており、NAD 結合における役割が説明された。結合 NAD のパイ - スタッキング安定化 (pi - stacking stabilization) におけるその役割ゆえに、最初の焦点は、切り取られたヒト GPD1 の phe41 および phe97 (配列番号 84) (酵母菌 GPD1 の phe73 および phe129) と一致する位置の突然変異誘発に合わせた。

30

【0277】

【表 9】

表6.ヒトの結晶構造中の結合NADの5オングストローム(Å)以内のアミノ酸残基、およびNADH K_M 値を増大させる可能性のある突然変異誘発の標的

残基 (ヒトGPD1 の場合の 数)	酵母菌GDP の場合の数 (異なる場合 の残基)	NADとの 接触の 数	相互作用の タイプ	可能な役割	同等の 代わりの 残基	次の もので KMが増大	原理
Ser(11)	42	3					
Asn(13)	44	18	極性	NADとのH結合		A, C, G, I, L, M, S, V	かさばらない非極性残基は、NADへの引力を減少させることができる
Trp(14)	45	66	π -スタッキング	おそらく、安定した電子移動のためにピリミジン環を安定化する	Phe, Tyr	A, C, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V	非環状残基(あまりに多くのファンデルワールス衝突を生じさせず、負ではない)は、NADの場合の K_M を増大させることができるが、 π -スタッキング固定を取り除くことで電子伝達を不安定化する。 K_{cat} を変える可能性もある。
Trp(39)	71	6					
Phe(41)	73	64	π -スタッキング	結合後に安定化する	Tyr, Trp, おそらく Arg, Lys (カチオン- π の せいで)	G, A, R, K	小さな残基はアデニンのエントロピーを増大させる。大きな残基は入り込むのが難しくなる。長い正の残基は、カチオン- π のせいで他の環と一緒にゲートを閉じる。
Glu(43)	75	2					

10

20

30

【表 10】

Tyr(63)	95	39		水の安定化			
Val(92)	124 (Gln)	6					
Pro(94)	126	25					
Phe(97)	129	64	π -スタッキング	結合後に安定化する	Tyr, Trp, おそらく Arg, Lys (カチオン- π のせいで)	G, A, R, K	小さな残基はアデニンのエントロピーを増大させる。大きな残基は入り込むのが難しくなる。長い正の残基は、カチオン- π のせいで他の環と一緒にゲートを閉じる。
Ile(119)	151 (Ile)	5					
Lys(120)	152	20	極性	DHAPとのH結合およびそれを安定化する			極性の反転または除去により、NADの場合の K_M が増大しうるが、 K_{cat} またはDHAPの場合の K_M が変わりうる。
Asn(151)	183	3					
Ile(152)	184	2					
Ala(153)	185	4					
Asn(205)	246	1		おそらく、電子伝達を助ける			K_{cat} またはDHAPの場合の K_M を変えうる。
Arg(269)	310	33		電子伝達を安定化する。おそらく、NADのジホスフェートのために引きつけることができる			正でない残基に変わると、NADのジホスフェートが不安定になりうるが、 K_{cat} またはDHAPの場合の K_M が変わりうる。
Gln(295)	336	14					
Lys(296)	337 (Ser)	17		NADとのH結合		A, C, D, E, G, I, L, M, N, Q, S, V	h結合形成を防ぎ、極性を逆転させ、NADへの引力を減少させる
Gln(298)	339	14		H結合、およびNADの回りの残基を安定化する		A, C, G, I, L, M, S, V	かさばらない非極性の残基は、NADへの引力を減少させる

【0279】

菌株および培地

大腸菌 (*Escherichia coli*) TOP10 を、Life Technologies Corp. (カタログ番号 C404003。Grand Island, NY) から得た。発現プラスミド pBAD は前述のものである (米国特許第 7,910,342 号明細書)。合成酵母菌 GPD1 遺伝子 (酵母菌での発現用に最適化されている) を、DNA2.0 (Menlo Park, CA) から得た。細胞は、37 °C において、0.02% L-(+)-アラビノース (カタログ番号 A3256。Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) および 100 μ g/mL アンピシリン (カタログ番号 A1066。Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) を含んだ Miller の LB ブロス (カタログ番号 46-050-CM。Mediatech, Inc., Herndon, VA) 中で成長させた。細胞は、100 μ g/mL アンピシリン (カタログ番号 L1004。Teknova, Inc., Hollister, CA) を含んでいる LB 寒天平板で平板培養した。

【0280】

GPD1 変種の作成

変異は、表 7 にしたがって 4 つの異なるアミノ酸位置に導入した。突然変異誘発は、QuikChange Lightning Kit (カタログ番号 210519。Agilent Technologies, La Jolla, CA) を用い、製造業者の指示にしたがって実施した。突然変異誘発プライマーは、Sigma-Aldrich Co. LLC St. Louis MO) から得た。Gene Amp 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Norwalk, CT) において、反応に対してヒートサイクルを実施した。大腸菌 (*Escherichia coli*) TOP10 は、製造業者の指示にしたがって、1 μ l の QuikChange 反応生成物で形質転換し、形質転換体を、100 μ g/mL のアンピシリンを含む LB 寒天平板で選択した。所望の変異を含むものを識別するために、各形質転換から複数の分離物の DNA 配列を得た。

10

【0281】

突然変異誘発反応におけるテンプレートがすでに変異の 1 つを含んでいたこと、また適切なプライマーを使用して第 2 変異を導入したこと以外は、二重変異体を同じ方法で作成した。

【0282】

【表 1 1】

表7:GPD1変種およびその作成に使用したプライマー

位置	配列番号	順方向プライマー 配列番号	逆方向プライマー 配列番号
Asn44		20	
N44A	212	21	54
N44C	213	22	55
N44G	214	23	56
N44I	215	24	57
N44L	216	25	58
N44M	217	26	59
N44S	218	27	60
N44V	219	28	61
Trp45		29	
W45A	220	30	62
W45C	221	31	63
W45G	222	32	64
W45H	223	33	65
W45I	224	34	66
W45K	225	35	67
W45L	226	36	68
W45M	227	37	69
W45N	228	38	70
W45Q	229	39	71
W45R	230	40	72
W45S	231	41	73
W45T	232	42	74
W45V	233	43	75
Phe73		44	
F73G	196	45	76
F73A	197	46	77
F73R	198	47	78
F73K	199	48	79
Phe129		49	
F129G	200	50	80
F129A	201	51	81
F129R	202	52	82
F129K	203	53	83

【0283】

GPD1の分析

Mini-Bead-beater (カタログ番号3110BX。Biospec Products, Bartlesville, OK)において、100mM MOPS (pH6.8)、10mM MgCl₂、1mM EDTA中でビーズビートング (bead beating) (2×10秒)を行って、可溶性分画の細胞抽出物を培養液5mlから調製した。細胞抽出物タンパク質濃度は、Pierce BCAアッセイ (カタログ番号23224および23228。Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL)で求めた。

【0284】

100mM MOPS (pH6.8)、1mM EDTA、1mMグルコース-6-ホスフェート、3mU/μlのグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (カタログ

番号 G 8 4 0 4。Sigma - Aldrich, Inc., St. Louis, MO)、1 mM のジヒドロキシアセトンホスフェート (カタログ番号 D 7 1 3 7。Sigma - Aldrich, Inc., St. Louis, MO)、様々な濃度の NADH、および様々な濃度の細胞抽出物が含まれている 100 μ l の量で、分析を行った。水 (Omni solv, WX 0 0 0 1 - 1, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) 中に 0.1 % ギ酸 (Suprapur, 1 1 6 7 - 1, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) を含む液に入れて 4 倍に希釈して、反応を終了させた。グリセロール - 3 - ホスフェートの産生は、LC / MS で測定した。

【 0 2 8 5 】

LC / MS 法

30 の温度で、HSS T3 カラム (2.1 \times 100 mm、1.8 μ m、186003539 (Waters, Milford, MA)) を使用して、2 μ l の各試料を、Waters Acuity UPLC / SQD System に注入した。UPLC 移動相は、0.1 % ギ酸水溶液 (移動 A) および 0.1 % ギ酸のアセトニトリル溶液 (Omni solv, AX 0 1 5 6 - 1, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) (移動 B) からなっており、0.3 mL / min の一定流量だった。最初の 1 分間は 99 % A であり、その後、0.5 分間の直線の傾斜があり 75 % B で終わり、その後、0.5 分間の直線の傾斜が 99 % A に戻る (次の試料を注入する前) という傾斜だった。MS 分析は、30 V のコーン電圧および $m/z = 171$ においてエレクトロスプレー負イオン化 (electrospray negative ionization) で行った。保持時間およびピーク強度は、Mass Lynx 4.1 ソフトウェア (Waters, Milford, MA) を用いて求めた。外部標準 (グリセロール - 3 - ホスフェート、カタログ番号 G 7 8 8 6、Sigma - Aldrich, Inc., St. Louis, MO) を、定量化の場合と同様に分析した。

10

20

【 0 2 8 6 】

GPD1 変種の分析

GPD1 変種の活性は、最初に、2 種類の NADH 濃度 (30 および 300 μ M) で、グリセロール 3 ホスフェート (G3P) の初期形成速度を測定することにより、調べた。これは、NADH の場合の変種の K_M を示す測定値の代わりになる。30 μ M よりかなり小さい K_M の場合、比率は 1.0 となり、300 μ M よりかなり大きい K_M の場合、比率は 1.0 となるであろう。個々の単一変異体の結果を表 8 に示す。

30

【 0 2 8 7 】

【表 1 2】

表8:初期G3P形成速度で測定したGPD1の活性

変種	活性比率
129R	78.0
129K	73.1
129G	67.8
129A	65.9
44G	2.4
44M	2.4
44S	2.3
45G	2.2
44V	2.2
73A	2.0
44A	1.8
73G	1.8
44C	1.8
44L	1.8
44I	1.7
45C	1.7
73R	1.5
45M	1.4
45A	1.4
45H	1.3
73K	1.2
45I	1.0
45S	1.0
45V	1.0
45T	0.9
45K	0.8
45L	0.7
45N	0.6
45Q	0.6
45R	0.6
GPD1 wt	1.3 +/- 0.3

10

20

30

【0 2 8 8】

このデータは、1 . 6 (3 つの対照測定値の平均値 + 標準偏差) より大きい比率を有する変種は、野生型 G P D 1 より大きい N A D H K_M を有することを示していると解釈できる。K_M が大きい個々の単一変異体の二重変異体を、上記のようにして作成した。二重変異体および単一変異体を選択するための、N A D H K_M 値の徹底的な分析を表 9 に示す。

【0 2 8 9】

【表 13】

表 9:NADH の場合の GPD1 変種のミカエリス定数(K_M)

変種	Vmax (U/ml)	K_M (μ M)
GPD1 WT_y	9	13
F129A	14	234
F129G	21	200
F129K	14	136
F129R	11	76
F73A	11	101
F73G	9	42
N44A	6	14
N44C	3	5
N44G	29	26
N44L	1	8
N44M	9	8
N44S	6	51
N44V	3	3
F129A	33	199
F129R	32	70
F73A129G (配列番号 204)	30	605
F73A129A (配列番号 205)	12	595
F73A129R (配列番号 206)	14	734
F73A129K (配列番号 207)	9	2989
F73G129G (配列番号 208)	29	515
F73G129A (配列番号 209)	15	554
F73G129R (配列番号 210)	7	1364
F73G129K (配列番号 211)	6	1671

10

20

30

【0290】

S. セレビシエ (S. cerevisiae) GPD の残基 44、45、73、および 129 (単独または組合せ) に対応するアミノ酸の変異により、NADH の場合の GPD の K_M を増大させることができることを、このデータは示している。図 2 に示すように、S. セレビシエ (S. cerevisiae) GPD のアミノ酸 73 および 129 はそれぞれヒト GPD のアミノ酸 41 および 97 に相当する。

【0291】

実施例 2: S. セレビシエ (S. cerevisiae) GPD よりも NADH の場合の K_M が大きい異種性 GPD 酵素

この実施例では、NADH の場合のミカエリス定数 (K_M) が酵母菌 GPD1 よりも大きいほかのグリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ酵素を特定した。

40

【0292】

NADH K_M の大きい酵素を特定するための 1 つの方法は、以前に特定された酵素について文献に公開されている値を使用することである。表 10 は、サッカロミセス属 (Saccharomyces) GPD1 に関して報告されたものよりも NADH K_M が大きい刊行物を挙げている。

【0293】

【表 1 4】

表 10:公開されている GPD の NADH K_M

NADH K_M (mM)	産生源	文献
0.023	サッカロミセス・セレビ シエ(<i>Saccharomyces</i> <i>Cerevisiae</i> GPD1)	Albertyn <i>et al.</i> 1992, <i>FEBS Lett.</i> 308:130
0.024	メキシコリーシュマニア (<i>Leishmania</i> <i>mexicana</i>)	Marche <i>et al.</i> , 2000, <i>Mol Biochem Parasitol.</i> 106: 83-91
0.032	オオミユビトビネズミ (<i>Jaculus orientalis</i>)	Berrada <i>et al.</i> , 2002 <i>Mol Cell Biochem.</i> 231: 117-27
0.0589	ドナリエラ・ヴィリディス (<i>Dunaliella viridis</i> GPDH1)	He <i>et al.</i> , 2009, <i>Plant Mol Biol.</i> 71:193-205
0.0592	ドナリエラ・ヴィリディス (<i>Dunaliella viridis</i> GPDH2)	He <i>et al.</i> , 2009, <i>Plant Mol Biol.</i> 71:193-205
0.078	キイロショウジョウバエ (<i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>)	Niesel <i>et al.</i> , 1982, <i>Methods Enzymol.</i> 89, 296-301

10

20

【0294】

上記で引用したキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の文献の酵素は、ショウジョウバエ (*Drosophila*) の飛行筋から来ている「GPDH1」と特定していた。しかし、その文献は、その酵素をコードする遺伝子に関する配列情報より前のものである。その後、この酵素の配列は、ショウジョウバエ (*Drosophila*) のゲノム配列からのアイソフォーム C であるグリセロール 3 ホスフェートデヒドロゲナーゼと特定された (gi: 22945708) (Carmon & MacIntyre, 2010, *Journal of Heredity* 101: 225 - 234)。実施例 1 に略述した技法を用いて、この酵素を大腸菌 (*E. coli*) 内で発現させた。 K_M 値は、大腸菌 (*E. coli*) が発現したサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) GPD1 を測定するために用いたその条件と類似の仕方で、また同じ条件下で測定した。1つの実験では、NADH K_M は、測定すると、どちらの酵素についても 5 μ M であった。すなわち、大きな違いはなかった。

30

【0295】

NADH の場合の K_M が大きい自然界に存在する GPD を特定するための別の方法は、酵素委員会命名 (enzyme commission nomenclature) の EC 1.1.1.94 で定義された GPD に含まれているもの評価することである。それらの酵素には、NADH と NADPH の両方を同様にうまく用いるものもあるが (例えば、Edgar & Bell, 1980, *J Biol Chem* 255: 3492 - 34 - 97)、NADPH に対する選択性を有することを特徴としたものもある (Frohlich *et al.*, 2010, *J Bacterio* 192: 4281 - 4288; Watanabe *et al.*, 2008, *Yeast* 25: 107 - 116; Sakasegawa *et al.*, 2004, *Protein Science* 13: 1361 - 1371; Ruijter *et al.*, 2004, *Microbiology* 150: 1095 - 1101)。こうした選択性は、(同じ酵素の NADPH の場合の K_M と比べて) NADH の場合の K_M が大きいものとして示される可能性がある。実施例 1 に略述した技法を使用して、以下の GPD 酵素についての pBad 発現ベクターの合成遺伝子を調製した: (a) アーケオグロブス・フルギダス (*Archaeoglobus*

40

50

s fulgidus) DSM4304 (gi|11497621:c775889-774882) (配列番号14); (b) グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼのためのカンジダ・バーサチルス (Candida versatilis) CvGPD1 遺伝子 (gi|157060214|dbj|AB296385.1) (配列番号15); および (c) 発疹チフスリケッチア (Rickettsia prowazekii) 株 BuV67-CWPP 染色体 (gi|383499256:539930-540880) (配列番号16)。

【0296】

実施例1の場合のように、これらのタンパク質を大腸菌 (E. coli) で発現させ、未精製細胞抽出物を用いて $\text{NADH} \quad K_M$ 値を測定した。カンジダ・バーサチルス (Candida versatilis) GPD は、測定できるほど大きな活性を生み出さなかった。アーキオグロブス・フルジダス (Archaeoglobus fulgidus) の酵素は、測定可能な活性があり、 NADPH については $K_M = 7 \mu\text{M}$ 、 NADH については $5 \mu\text{M}$ であった。また発疹チフスリケッチア (Rickettsia prowazekii) の酵素も測定可能な活性があり、 NADPH については $K_M = 4 \mu\text{M}$ 、 NADH については $664 \mu\text{M}$ であった。

【0297】

発疹チフスリケッチア (Rickettsia prowazekii) の酵素の NADH の場合の K_M は、サッカロミセス属 (Saccharomyces) の場合の K_M より大きかった。酵素のどの側面が NADH に対する親和性のこの減少に寄与するかをさらに評価するために、リケッチア属 (Rickettsia) の酵素の配列を、結合部位に NAD^+ のあるヒト酵素の結晶構造と比較した。ヒト酵素の注目すべき特徴として、 NAD 複合体が、 NAD^+ のアデニン環の回りに挟まれた phe41 および phe97 のパイ-スタッキングであるという点がある (pdb: 1X0X; Ouet al, 2006 J Mol Biol 357: 858-869)。パイ-スタッキングは、非常に安定した構造であり、配列アラインメントは、相同の位置 (homologous positions) が酵母菌 GPD1 配列に維持されることを明らかにしている (phe73、phe129)。しかし、リケッチア属 (Rickettsia) では、アラインメントの相同の位置は、arg35 および ala85 である (図2を参照)。これらのアミノ酸は、 NADH 結合を不安定化させるであろうと予想され、 $\text{NADH} \quad K_M$ の増大につながる。このことは、実施例1のこれらの位置での突然変異誘発によって確認された。

【0298】

$\text{NADH} \quad K_M$ の増大におけるこうしたアミノ酸の位置の役割をさらに確証するものとして、リケッチア属 (Rickettsia) に含まれないもっとも密接に関連した GPD 配列のうちの2つが、NCBI データベースの BLAST 検索によって特定された。もっとも密接に関連した配列のうちの2つは、ベギアトア・アルバ (Beggiatoa alba) からのもので (BLAST E 値 = $2e-51$ 、37% の配列同一性; 配列番号17) およびカンジエラ・コレンシス (Kangielia koreensis) からのもので (BLAST E 値 = $2e-50$ 、37% の配列同一性; 配列番号18) である。これらのタンパク質は、前述のようにして合成し、検査した。

【0299】

こうした酵素の大腸菌 (E. coli) での発現レベルは低かったが、ベギアトア属 (Beggiatoa) の酵素で測定された値は、 NADPH については $K_M = 6 \mu\text{M}$ であり、 NADH については $101 \mu\text{M}$ であった。一方、カンジエラ属 (Kangielia) の酵素の値は、 NADPH については $K_M = 1 \mu\text{M}$ であり、 NADH については $2018 \mu\text{M}$ であった。ヒト酵素内でパイ-スタッキングを形成する2個のフェニルアラニンと相同の位置にあるアミノ酸は、ベギアトア属 (Beggiatoa) の酵素の lys85 および gly86 であり、カンジエラ属 (Kangielia) の酵素の arg35 および ala86 である (図2を参照)。

【0300】

10

20

30

40

50

こうした結果は、他の生物体からのある特定 G P D は、N A D H の場合の K_M が高いことを確認しており、さらに、（例えば、パイ - スタッキングのフェニルアラニンの対に關係するアミノ酸を修飾することで）G P D 酵素を改変することにより、N A D H の場合の K_M を上昇させることができることも支持している。

【0301】

実施例 3：G D 1 酵素変種を含む酵母菌株でのイソブタノールおよびグリセロールの産生
この実施例では、上で説明した変種の G P D 1 酵素が作り出される酵母菌株を、イソブタノールおよびグリセロールの産生について試験した。

【0302】

イソブタノール経路プラスミドを有する P N Y 2 1 4 5 の G P D および G P D 変種株を、完全合成寒天平板 [アミノ酸を含まない 1 X 酵母室素原基礎培地 (D i f c o)、2 % 寒天 (D i f c o) を含むウラシルを含まない 1 X アミノ酸ドロップアウト (d r o p - o u t) (C l o n e - t e c h)、0 . 2 % エタノール] に蒔き、3 0 0 C の培養器 (N e w B r u n s w i c k) で 7 2 時間培養した。

10

【0303】

細胞を、完全合成培地 [アミノ酸を含まない 1 X 酵母室素原基礎培地 (D i f c o)、2 % 寒天 (D i f c o) を含むウラシルを含まない 1 X アミノ酸ドロップアウト (C l o n e t e c h)、1 % グルコース (S i g m a)、0 . 2 % エタノール] に斑点状に付着させ、3 0 の培養器 (N e w B r u n s w i c k) で 7 2 時間培養した。3 0 日間にわたって、3 日ごとに同じ培地で繰り返し平板培養することにより細胞を適応させた。

20

【0304】

適応させた細胞の斑点を、初代培養である 1 2 5 m l フラスコ (B D) 中の 1 0 m l の完全合成液状培地 [アミノ酸を含まない 1 X 酵母室素原基礎培地 (D i f c o)、ウラシル (C l o n e t e c h) を含まず 2 % 寒天 (D i f c o) を含む 1 X アミノ酸ドロップアウト、1 % グルコース (S i g m a)、0 . 2 % エタノール] に接種し、培養器シェーカー (N e w B r u n s w i c k) 内で 3 0 において 2 4 時間、2 5 0 r p m で培養した。初代培養物からの二次培養物を同じ培地 (初期 O D が 0 . 5) に接種し、さらに 2 4 時間成長させた。2 4 時間後に、三次培養物を二次培養物 (初期 O . D が 0 . 5) からの同じ培地に接種し、さらに 2 4 時間成長させた。その後、これらの細胞を G P D 変種の評価研究に使用した。

30

【0305】

遠心分離機 (E p p e n d o r f) で遠心分離 (3 6 0 0 r p m、5 分間、室温) により細胞を回収し、1 5 m l のファルコンチューブ (f a l c o n t u b e s) 内の産生培地 (アミノ酸を含まない 1 X 酵母室素原基礎培地 (D i f c o)、ウラシルを含まない 1 X アミノ酸ドロップアウト (C l o n e t e c h)、3 5 g / L グルコース (S i g m a)、2 g / L エタノール、1 0 0 m M M E S (S i g m a) 1 X ペプトン (D i f c o)、1 X 酵母エキス (D i f c o)、1 M H C L (S i g m a) (p H 5 . 2)) (初期 O D が 2) に懸濁させた。その後、培養物を、3 0 において培養器シェーカー (N e w B r u n s w i c k) (2 2 5 r p m) で 2 0 時間培養した。2 0 時間で試料を回収し、H P L C (A g i l e n t L i f e S c i e n c e s) で分析した (図 3)。

40

【0306】

試料調製

2 0 時間で産生の終わりに培養物を回収し、1 X プロテアーゼ阻害剤 (R o c h e) を含んでいる 1 0 0 m M の M O P S (p H 6 . 8) に各細胞ペレットを再び懸濁させた。細胞に対して 3 0 秒間のビーズビーティング (M i n i - B e a d b e a t e r - 1 6 , B i o s p e c) を 5 サイクル行って溶解させた。各サイクルの間に 2 m i n の間隔をあけた。溶解試料を、4 0 において、遠心分離機で遠心分離 (1 3 , 0 0 0 r p m、3 0 m i n) にかけた。上澄みを注意深く別のチューブに移した。タンパク質の評価は、B r a d f o r d 試薬 (カタログ番号 5 0 0 - 0 2 0 5、B i o - R a d) を用いて行った。凍結融解ステップは行わずに、新しい試料に対して直ちに G P D 試験を行った。

50

【0307】

分析条件

グリセロール - 3 - ホスフェート (GPD) の分析は、Cary 100 紫外可視分光光度計を使用し、100 mM MOPS (Sigma) (pH 6.8)、1 mM EDTA、1 mM のグルコース - 6 - ホスフェート、3 mU / μ l のグルコース - 6 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (カタログ番号 G8404、Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO)、1 mM のジヒドロキシアセトンホスフェート (カタログ番号 D51269, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO)、0.3 mM NADH、および様々な濃度の細胞抽出物を含んでいる 1 ml の量で行った。反応速度は、340 nm での NADH 濃度の減少に関して最初の 1 min の傾斜を取って、計算した。NADH の吸光係数は、 $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と見なした。変種 N8__1、E8__1 および M8__1 (すなわち、二重変異体 F73G / F129G を有するもの) の場合、NADH 濃度は 0.45 mM まで増大した。これは、これらの変種にとって NADH の飽和に達していないレベルである。

【0308】

結果の回帰分析

この部で用いたデータを表 11 に示す。そのデータは、代謝産物の測定値および上述した GPD の生体外の測定値を含んでいる。上昇する測定 GPD 活性が、飽和に達していない量の NADH での測定と異なることを考慮に入れるため、 V_{max} での全活性を、速度に関する GPD (U / mg) および表 9 で求めた K_M 値を用いて、 V_{max} に関する単一基質の Michaelis-Menton 方程式を解くことにより計算した。

【0309】

【表 15】

表11:代謝生成物の生体外の測定および様々な対照および変種のイソブタノロゲン菌株 (異種性/天然GPD配列にいろいろな置換がある)のGPDの比活性

菌株	グルコース 濃度(g/L)	Gly (g/L)	EtOH (g/L)	iBuOH (g/L)	収率 (g/g)	iBuOH/Gly比	GPD (U/mg)	GPD K_M (μ M)	GPD V_{max} (U/mg)
EC 1	21.52	1.55	0.4	4.14	0.19	2.67	0.0014	11	0.0015
E3 1	18.82	1.91	0.13	3.63	0.19	1.90	0.0018	101	0.0024
E8 1	12.16	0.75	0.13	3.11	0.26	4.15	0.0003	554	0.0007
M3 1	23.81	2.44	0.35	4.36	0.18	1.79	0.0053	101	0.0071
M8 1	22.91	2.89	0.2	4.64	0.20	1.61	0.0035	554	0.0078
N3 1	22.32	3.4	0.49	3.3	0.15	0.97	0.0097	101	0.0130
N8 1	13.95	2.1	0.19	2.16	0.15	1.03	0.0084	554	0.0187
2145	30.68	3.43	0.2	5.46	0.18	1.59	0.0025	11	0.0026

【0310】

最初、変更のない GPD と変種 GPD の両方の組み込みを上記の方法にしたがって行くと、GPD 活性の量 (イソブタノール産生の後の酵母菌細胞抽出物で分析) が変わることが観察された。GPD の比活性は、10 倍も変化しうる。イソブタノール / グリセロールの比率も、図 4 に示すように、検出された GPD 活性のレベルとは逆相関を示した。その図に示されるように、この関係の線形回帰の R^2 値は、60.1% であったが、交差検証された $R - Sq_{(pred)}$ 値 (イソブタノール / グリセロール比率の未知の値を、GPD 活性データが予測できる力を示す) は、たった 25.04% だった。この結果は、相関はあっても、GPD 活性だけは、この比率の良好な予測因子とはならないことを示した。

【0311】

この因子により、グリセロールおよびイソブタノールの産生に対する、 K_M の大きい GPD 変種の寄与の変化を検出するのが困難になった。というのは、NADH K_M の増大による有益な効果が、予測不能な活性レベルによって覆われたからである。こうした効果をさらに理解するために、表 11 のデータに多重線形回帰分析を適用して、変種の特性が

いっそう明確に定量化できるかどうかを判断した。Minitab (Minitab V 16.2.1, Minitab Inc.; State College, PA)を用いて、モデル化パラメーターに対して複数回の線形回帰 (multiple rounds of linear regression) を行い、残りの係数のP値がすべて0.05未満になるまで、手作業で最大P値の寄与パラメーターを取り除いた。これにより、最大R-sq (pred) 値の回帰方程式が得られた。これは、新しい観測値をそのモデルが予測できることを示した。表11中の代謝測定値の2つにより、生理学的に解釈される独立した寄与パラメーターを持つモデルが生み出された。

【0312】

イソブタノール濃度は、表11からの以下のパラメーターを用いてモデル化した：消費されたグルコース、エタノール、グリセロール、収率、GPD K_M 、およびGPD V_{max} 。もっとも重要性の低いパラメーターを除去すると、3個のパラメーター（予測因子）（消費されたグルコース、GPD K_M 、およびGPD V_{max} ）を有する回帰モデルが得られた（図5および表12に示す）。このモデルのR-Sq値は98.6%である。このモデルのR-Sq (pred) 値は、94.32%であり、この回帰方程式により、高度の予測値が与えられることを示している。回帰モデルを生理学的に解釈すると、イソブタノール濃度は、消費されたグルコースおよびGPD K_M 値からのプラスの寄与、およびGPD V_{max} 値からのマイナスの寄与によって予測されることが示唆される。したがって、消費されるグルコースがどんな量でも、GPD K_M が高くなると、イソブタノール濃度が増大することになる。同様に、（ V_{max} 値として）測定されるGPD

【0313】

【表16】

表 12:イソブタノール濃度(g/L)についての回帰モデル

予測因子	係数	SE 係数	T	P	VIF
定数	0.3316	0.3499	0.95	0.397	
消費されたグルコース(g/L)	0.17741	0.01382	12.83	0.000	1.804
GPD K_M (μ M)	0.0013789	0.0003309	4.17	0.014	1.977
GPD V_{max} (U/mg)	-75.81	10.10	-7.50	0.002	1.146

【0314】

回帰モデルでは、これらの効果の大きさを評価できた。30 g/Lのグルコース消費レベルおよび0.0026 U/mgのGPD V_{max} では、 K_M を11 μ M（野生型）から550 μ Mに増大させると、イソブタノール濃度が14%増大した。しかし、30 g/Lのグルコース消費レベル、11 μ Mの K_M では、GPDレベルが0.0015 U/mgから0.019 U/mgに増大すると（表11からの活性の最大の変化）、イソブタノール濃度が25%減少する。したがってこの回帰モデルは、NADHに対するGPD親和性を減少させると（ K_M の増大）、ここに示した試料のイソブタノール濃度が増大することを示した。

【0315】

イソブタノールの収率（イソブタノール（グラム）/消費されたグルコース（グラム））は、表12からのパラメーター（消費されたグルコース、エタノール、グリセロール、イソブタノール、GPD K_M 、およびGPD V_{max} ）を用いて同様にモデル化した。もっとも重要性の低いパラメーターを除去すると、2つのパラメーター（GPD K_M 、およびGPD V_{max} ）を用いた回帰モデルが得られる（図6および表13を参照）。この回帰モデルは、R-Sq値が93.9%であった。この回帰モデルは、R-Sq (pred) 値が76.3%である収率を予測した。注目すべき点として、このモデルは、GPD酵素の活性レベルおよび K_M だけに依存するものである。イソブタノール濃度回帰モデルと同様に、GPD V_{max} は収率に対しては好ましくない影響を及ぼす。この回帰モデルでは、観察された最低のGPD活性レベルである0.0015 U/mgで、GPD

の K_M が $11 \mu M$ (野生型) から $550 \mu M$ に増大すると、収率が 28% 向上した。ここで観察された最大の GPD 活性レベル ($0.019 U/mg$) では、収率の向上は 78% だった。

【0316】

【表17】

表 13: 収率についての回帰モデル(g/g)

予測因子	係数	SE 係数	T	P	VIF
定数	0.199176	0.005908	33.71	0.000	
GPD K_M (μM)	0.00009410	0.00001597	5.89	0.002	1.144
GPD V_{max} (U/mg)	-5.2197	0.6404	-8.15	0.000	1.144

10

【0317】

実施例 4 : 予測 (Prophetic)

この実施例では、上述の異種性 GPD 1 酵母菌組み込み体を、イソブタノールおよびグリセロールの産生に関して試験する。

【0318】

増殖培地および手順

酵母菌株の成長が進行する間、2 種類の培地 (好気性の培養前の培地および嫌気性の培地) を使用する。薬品はすべて、特に記載のない限り、Sigma (St. Louis, MO) から得ている。

20

【0319】

好気性の培養前培地 (SE-Ura-His) : $6.7 g/L$ 酵母室素原基礎培地 (アミノ酸を含まない) (Difco, 291940, Sparks, MD)、 $1.4 g/L$ 酵母菌合成ドロップアウトサプリメント (ヒスチジン、ロイシン、トリプトファンおよびウラシルを含まない)、 0.2% エタノール、 0.2% グルコース、 0.01% (w/v) ロイシンおよび 0.002% (w/v) トリプトファン。

【0320】

嫌気性の培地 (SEG-Ura-His) : $50 mM$ MES ($pH 5.5$)、 $6.7 g/L$ 酵母室素原基礎培地 (アミノ酸を含まない) (Difco, 291940, Sparks, MD)、 $1.4 g/L$ 酵母菌合成ドロップアウトサプリメント (ヒスチジン、ロイシン、トリプトファンおよびウラシルを含まない)、 0.1% エタノール、 3% グルコース、 0.01% ロイシン、 0.002% トリプトファン、 $30 mg/L$ ニコチン酸、 $30 mg/L$ チアミンおよび $10 mg/L$ エルゴステロール ($50/50 (v/v)$) Tween/エタノール溶液中に含まれる)。

30

【0321】

斑点状の細胞を $25 mL$ の SEG-Ura-His 培地 (0.2% グルコースおよび 0.2% エタノールを含む) に接種し、蓋が閉じられた状態で漸進的に酸素が制限される条件下で、 30 においておよそ 48 時間、振盪させながら成長させる。これは、目的とする OD_{600} 値であるおよそ $1.5 \sim 2$ が達成されるまで行う。 OD_{600} の値を記録する。細胞は遠心分離でペレット化し、上澄みを廃棄する。細胞ペレットを Coy Anaerobic Bag (Grass Lake, MI) に移し、その中で、ペレットを $1.0 mL$ の嫌気性増殖培地 (SEG-Ura-His) 中に再懸濁させる。再懸濁細胞ペレットを用いて、 $50 mL$ 血清瓶 (Wheaton, 223748, Millville, NJ) 内の $30 mL$ の SEG-Ura-His 培地に接種して、目的の初期 OD_{600} 値である 0.2 にする。接種の前に、嫌気性培地、血清バイアル、栓およびクリンプはすべて、少なくとも 24 時間、嫌気性バッグの中でガスが抜けるようにする。血清瓶に栓をし、クリンプし、嫌気性バッグから取り出して、 $240 rpm$ で振盪させながら 30 で成長させる。嫌気性培養物は、 OD_{600} 値が少なくとも 1.2 となるように $24 \sim 72$ 時間成長させる。更なる嫌気性成長ステップでは、前の嫌気性培養ステップからの細胞を

40

50

接種材料として用いた。それぞれの変種について3種類の形質転換体を評価した。

【0322】

変種および異種性酵母菌GPD1菌株のHPLC分析

HPLC分析のため、またOD₆₀₀値を得るために、嫌気性成長期間の終わりに試料を採取する。Shodex Sugar SH-GpプレカラムおよびShodex Sugar SH1011分離カラム(Shodex, JM Science, Grand Island, NY)と一緒に、Waters 2695分離装置、2996フォトダイオードアレイ検出器、および2414屈折率検出器(Waters, Milford, MA)を用いて、HPLC分析を実施した。0.5 mL/minの流量で、0.01 N 硫酸での定組成溶離で化合物を分離する。Waters Empower Proソフトウェアを用いて、クロマトグラムを分析した。グリセロール、イソブタノールのモル収率およびイソブタノール/グリセロール比率を求める。それぞれの変種および異種性GPDについて3回分析して、平均偏差および標準偏差を計算した。コドン最適化GPD1対照値との値の違いが、統計学的に有意かどうかスチューデントt検定を使用して判定した。

【0323】

実施例5: イソブタノール産生に対するgpsAの影響

100 mM MES (2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)、3 g/Lのグルコースおよび3 g/Lのエタノールを含みヒスチジンおよびウラシルが欠けている酵母菌合成培地で、菌株CPN97およびPNY2310を成長させた。各菌株からのコロニーを選択し、10 g/Lのグルコースおよび100 mM MESを含みヒスチジンおよびウラシルを含まない10 mLの酵母菌合成培地に接種し、30 °Cにおいて200 rpmで一晩培養した。一晩中培養した後、20 g/Lのグルコースおよび100 mM MESを含みヒスチジンおよびウラシルを含まない10 mLの酵母菌合成培地中に、OD₆₀₀ = 0.4になるまで、細胞を再懸濁し、30 °Cにおいて200 rpmで4時間培養した。その後、細胞を回収し、20 mLの血清バイアル(Wheaton; Millville, NJ)中の20 g/Lのグルコースおよび100 mM MESを含みヒスチジンおよびウラシルを含まない10 mLの酵母菌合成培地に、OD₆₀₀ = 0.2になるまで再懸濁し、ブチルゴム栓で蓋をし、密閉した。バイアルを30 °Cの培養器に入れ、200 rpmで回転させ、28時間および42.5時間培養した。試験する菌株ごとに2つのバイアルを用意した。

【0324】

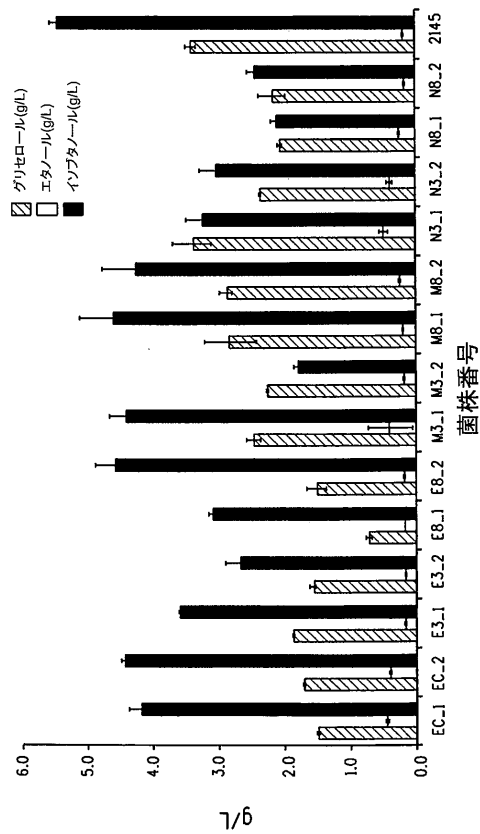
28時間および42.5時間後に、1つのバイアルの蓋を開け、OD₆₀₀を測定し、ブロスをHPLCで分析した。300 mm x 7.8 mm BioRad-Aminex HPLC-87H排除カラム(BioRad; Hercules, CA) (50 °Cで保温され、BioRad-Microguard Cation Hスペア(30 mm x 4.6 mm)が装備されている)を用いて、屈折率検出器を備えているAgilent 1100シリーズHPLCシステムでHPLC分析を実施した。0.6 mL/minの流量で、0.01 N 硫酸の流動緩衝液で試料を流した。HPLC分析から、イソブタノール収率(図7)およびイソブタノール/グリセロール比率(図8)は、CPN97ではPNY2310と比べて増大し、グルコース消費は、CPN97ではPNY2310と比べて減少する(図9)ことが、観察された。好気条件で成長する一方、時間との関係での光学濃度(OD)は類似していた。

【0325】

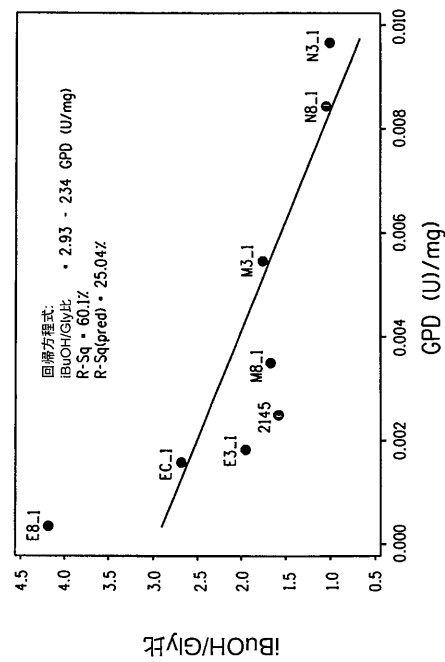
実施例6: フィードバック抵抗性gpsAの生成予測

大腸菌(E. coli) MG1655染色体DNAおよびプライマーP

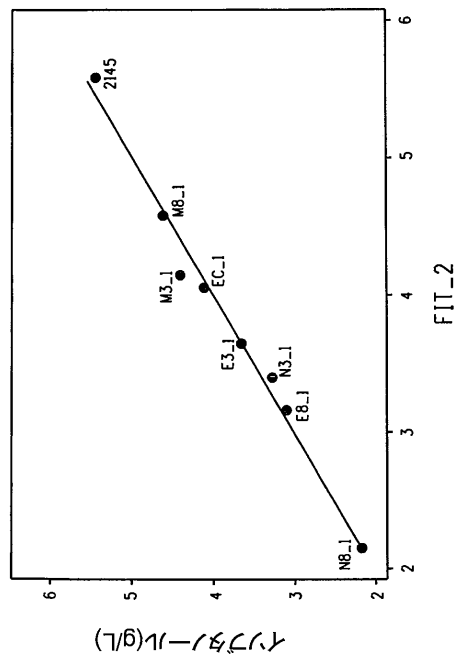
【 図 3 】



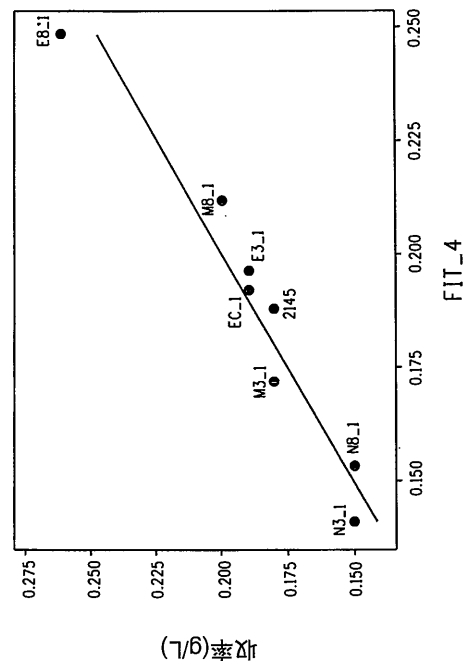
【 図 4 】



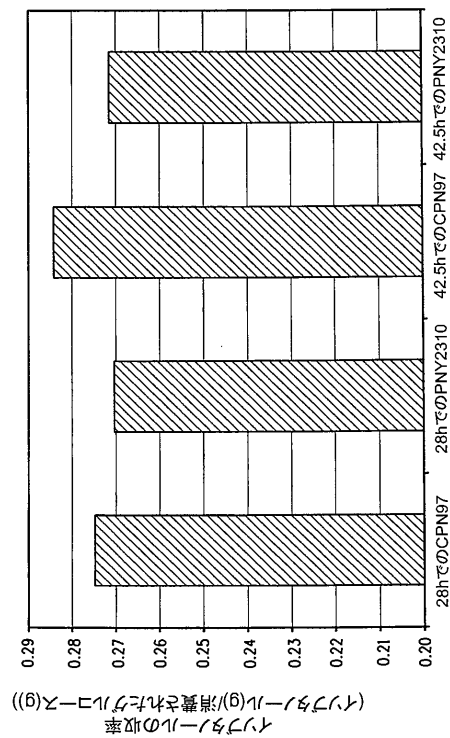
【 図 5 】



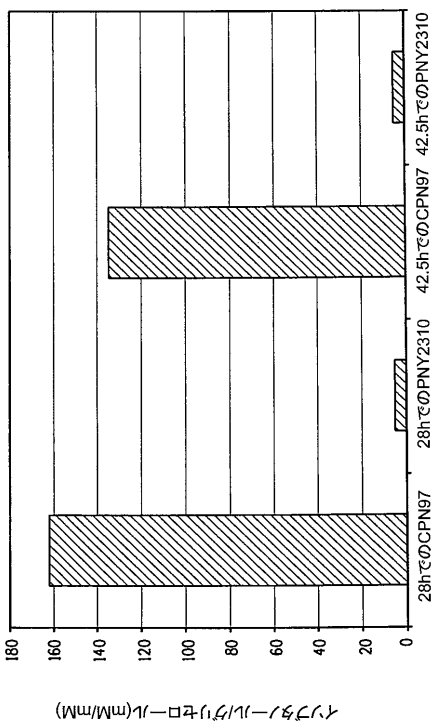
【 図 6 】



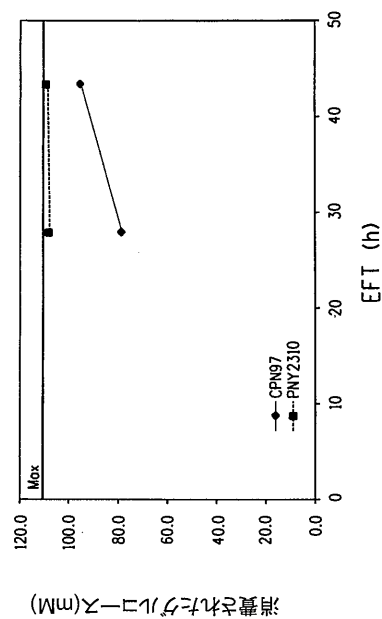
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2016511010000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/025714

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N1/18 C12P7/16 ADD.				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12P				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, WPI Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	VISHIST K JAIN ET AL: "Effect of alternative NAD-regenerating pathways on the formation of primary and secondary aroma compounds in aglycerol-defective mutant", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 93, no. 1, 1 July 2011 (2011-07-01), pages 131-141, XP019997909, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S00253-011-3431-Z	1,2,5-9, 31,32, 34-63		
Y	the whole document abstract, p. 133, col. 2, Table 1 ----- -/--	3,4, 10-30,33		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents : <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report		
27 June 2014		11/07/2014		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentean 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sauer, Tincuta		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/025714

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/138942 A1 (MASCOMA CORP [US]; ARGYROS AARON [US]; SILLERS WILLIAM RYAN [US]; BARR) 11 October 2012 (2012-10-11)	35,37, 39, 42-44, 52,53, 55,58, 59,62,63
Y	para. 5-7, 13, 23	1-34,36, 38,40, 41, 45-51, 54,56, 57,60,61
X	----- WO 2011/149353 A1 (C5 YEAST COMPANY B V [NL]; DE BONT JOHANNES ADRIANUS MARIA [NL]; TEUNI) 1 December 2011 (2011-12-01) the whole document SEQ ID NO: 16	16,22
X	----- WO 2009/009142 A2 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC [US]; ABAD MARK [US]; AHRENS JEFFREY [US]; AUG) 15 January 2009 (2009-01-15) the whole document SEQ ID NO: 2417	16,17,22
X	----- DATABASE UniProtKB [Online] 2 September 2008 (2008-09-02), "Glycerol-3-phosphate dehydrogenase", XP002726310, Database accession no. B3LGS7 the whole document	16,17,22
Y	----- WO 2012/129555 A2 (BUTAMAX TM ADVANCED BIOFUELS [US]; ANTHONY LARRY CAMERON [US]; GIBSON) 27 September 2012 (2012-09-27) cited in the application the whole document p. 2, l. 21 - p. 3, l. 10, p. 8, ll. 14-21, p. 168, ll. 29-33	1-63
Y	----- US 2011/020889 A1 (FELDMAN REID M RENNY [US] ET AL) 27 January 2011 (2011-01-27) the whole document -----	1-63

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/025714

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012138942 A1	11-10-2012	CA 2832279 A1 CN 103649321 A EP 2694662 A1 WO 2012138942 A1	11-10-2012 19-03-2014 12-02-2014 11-10-2012
WO 2011149353 A1	01-12-2011	NONE	
WO 2009009142 A2	15-01-2009	EP 2175714 A2 EP 2380988 A2 EP 2573178 A2 US 2011265221 A1 US 2013283461 A1 WO 2009009142 A2	21-04-2010 26-10-2011 27-03-2013 27-10-2011 24-10-2013 15-01-2009
WO 2012129555 A2	27-09-2012	AU 2012230737 A1 CA 2831130 A1 CN 103827304 A EP 2689014 A2 JP 2014508541 A US 2013071898 A1 US 2014030782 A1 US 2014030783 A1 WO 2012129555 A2	19-09-2013 27-09-2012 28-05-2014 29-01-2014 10-04-2014 21-03-2013 30-01-2014 30-01-2014 27-09-2012
US 2011020889 A1	27-01-2011	US 2011020889 A1 US 2012028323 A1 US 2013252298 A1	27-01-2011 02-02-2012 26-09-2013

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	7/16	(2006.01)	C 1 2 P	7/16
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00
				A

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

(72) 発明者 リチャー・バーラ
インド国コンパリー 5 0 0 0 1 4 . ガンドラポチャンパリーロード . ザネイバーフッド . ハウスナンバー 4 3

(72) 発明者 ゴーパル・ケー・チュータニ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 3 0 . ミルブレイ . シャムロックコート 1 0

(72) 発明者 マイケル・ドナー
アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 7 0 7 . ホッケシン . ストーンブリッジドライブ 3 6

(72) 発明者 マーク・ジェイ・ネルソン
アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 7 1 1 . ニューアーク . フィスクレーン 7 0 7

(72) 発明者 ダニエル・ピー・オキーフ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 7 8 - 2 7 3 1 . リドリーパーク . ショーロード 3 2 8

(72) 発明者 キャロライン・エム・ベレス
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 3 0 4 - 1 0 1 3 . パロアルト . ページミルロード 9 2 5

(72) 発明者 ジャーナビ・チャンドラ・プラサド
アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 8 0 9 . ウィルミントン . ヘブンロード 2 1 2 4 . アパートメントエフ

(72) 発明者 ジャンーフランソワ・トーム
アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 8 0 3 . ウィルミントン . ヘイバーヒルロード 6 2 7

F ターム (参考) 4B024 AA03 BA08 BA80 CA04 CA20 DA12 EA04 GA16 GA25 HA14
4B050 CC03 LL05
4B064 AC04 AC06 CA06 CA19 CC06 CC24 CD06 CD09 CD13
4B065 AA01X AA26X AA58X AA72X AA80X AA90X AB01 AC14 BA02 BB06
BB12 BB15 BC05 CA05 CA27